

Entwicklung von DNA- und Expressions-Markern zum Nachweis von menschlichen künstlichen Chromosomen und *in vivo* Transfektionsanalyse verbesserter HAC Vektoren

Andreas Laner

München, September 2004

**Entwicklung von DNA- und Expressions-Markern zum
Nachweis von menschlichen künstlichen
Chromosomen und *in vivo* Transfektionsanalyse
verbesserter HAC Vektoren**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt in der Abteilung Medizinische Genetik, Kinderpoliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Leiter der Abteilung: Prof. Dr. med. Jan Murken

Vorgelegt von Andreas Laner
München
September 2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 5. März 2003 von Dr. Dirk Schindelhauer betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

München, den 20.09.2004

.....

Andreas Laner

Dissertation eingereicht am:	20.09.2004
1. Gutachter:	Prof. Dr. Thomas Cremer
2. Gutachter:	Prof. Dr. Heinrich Leonhardt
Sondergutachter:	Dr. Dirk Schindelhauer
Tag der mündlichen Prüfung:	12.07.2005

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Material	13
2.1.1 Zellen	13
2.1.2 Bakterienstämme	13
2.1.3 Plasmide und PACs	13
2.1.4 Oligonukleotide	14
2.1.5 Materialien für die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	15
2.1.6 Enzyme	15
2.1.7 Chemikalien und andere Materialien	16
2.1.8 Kits	17
2.1.9 Längenstandards	17
2.1.10 Puffer und Lösungen	17
2.1.11 Medien und Lösungen für die Zellkultur	18
2.1.11.1 Bakterienkultur	18
2.1.11.2 Eukaryotische Zellkultur	19
2.1.12 Geräte	19
2.1.13 Verbrauchsmaterial	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Prokaryotische Zellkultur	21
2.2.2 Eukaryotische Zellkultur	21
2.2.3 Isolierungs- und Präparationstechniken für Nukleinsäuren	22
2.2.3.1 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien	22
2.2.3.2 DNA Isolierung aus Zelllinien	22
2.2.4 Gelelektrophorese	23
2.2.5 FISH Protokoll	23
2.2.5.1 Chromosomenpräparation: Herstellung von Metaphasenpräparaten	23
2.2.5.2 PCR-Amplifikation der DNA-Pools	25
2.2.5.3 Markieren der Sonden mittels Labeling-PCR	27
2.2.5.4 Markieren der Sonden mittels Nicktranslation	28

2.2.5.5	DNase I Verdau	28
2.2.5.6	Fällung	28
2.2.5.7	Hybridisierung	29
2.2.5.8	Nachweis	29
2.2.5.9	Auswertung der Metaphasen	30
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)	30
2.2.6.1	Standard-PCR	30
2.2.6.2	Reinigung von PCR-Produkten	31
2.2.7	DNA-Sequenzierung	31
2.2.8	Enzymatische Modifikation von DNA	32
2.2.8.1	Restriktionsendonukleasespaltung	32
2.2.8.2	Dephosphorylierung von 5'-Enden	32
2.2.8.3	Phosphorylierung von 5'-Hydroxyl-Enden	33
2.2.8.4	Erzeugung von „stumpfen“ Enden („blunt ends“) mittels S1-Nuklease	33
2.2.8.5	Ligierung	33
2.2.9	Klonierung	34
2.2.9.1	Kompetente Bakterien	34
2.2.9.2	Transformation mittels Elektroporation	34
2.2.10	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	35
2.2.11	Hybridisierungs-, Wasch- und Nachweisbedingungen	36
2.2.12	Molekularbiologische Methoden für das Arbeiten mit langer DNA	36
2.2.12.1	Präparation von PAC DNA in Agarosegelpugs	37
2.2.12.2	Herstellung der Agaroseplugs	37
2.2.12.3	Lysozymbehandlung	38
2.2.12.4	Proteinase K Behandlung	39
2.2.12.5	Reinigung der Plugs	39
2.2.12.6	Präparation chromosomaler DNA in Agaroseplugs	40
2.2.12.7	Spaltung langer DNA in Agaroseplugs	40
2.2.12.8	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	40
2.2.12.9	Klonierung mit PACs	42
2.2.12.10	Elektroelution von langer DNA aus Agarose	43
2.2.12.11	Ligierung	43
2.2.12.12	Elektroporation	44
2.2.13	Mikroinjektion	44
2.2.13.1	Mikroinjektion von Reporter-Genen	45
2.2.13.2	Mikroinjektion von künstlichen Chromosomenkonstrukten	45
2.2.14	Lipofektion	46
2.2.15	Baktofektion	46
2.2.16	Erzeugung stabiler Zellklone	49
2.2.17	Immunfärbung	50

2.2.18	Datenbanken und Computerprogramme.....	51
2.2.18.1	Datenbanken und Internetseiten	51
2.2.18.2	Sequenzanalyse	52
2.2.18.3	Computerprogramme	52
3	ERGEBNISSE	53
3.1	Einzelne intranukleär mikroinjizierte cDNA-Reporter Gene reichen nicht aus um transiente Expression nachzuweisen.....	54
3.2	Multimerisierung von DNA- und Expressionsmarkern zum Nachweis niedriger Kopiezahlen <i>in vivo</i>	57
3.2.1	Multimerisierung eines EGFP-Arrays zum Nachweis transienter Expression	59
3.2.2	Multimerisierung von DNA-tags für direkten Nachweis in Modellzellen.....	60
3.2.2.1	Gal4-BD-Array	60
3.2.2.2	Lac-Operator-Array.....	63
3.3	Konstruktion verbesserter HAC Vektoren	64
3.3.1	Konstruktion des tetratelomerischen HAC Vektors pTT	66
3.3.1.1	Klonierung einer lacZ Kasette in pTAT.....	66
3.3.1.2	Konstruktion von pTGT.....	68
3.3.1.3	Konstruktion von pTT	69
3.3.2	Klonierung homogener α -sat-Arrays in pTT und pTAT-Bs	71
3.3.3	Konstruktion des CFTR-Expressionsmarkers CGT21	74
3.4	Klon- und HAC Formierungsassay.....	75
3.5	Der neue HAC Vektor pTT erzeugt mit den cen5 Arrays stabile grüne Kolonien und formiert HACs <i>de novo</i>	77
3.6	Werden aus transient EGFP exprimierenden Zellen stabile, HAC tragende Klone?.....	81
3.7	Das Expressionskonstrukt CGT21 wird exprimiert und korrekt gespleisst	82
3.8	Baktinfektion von Vektoren zur Erzeugung künstlicher menschlicher Chromosomen	88
3.8.1	Baktinfektion von pTTE ₁ führt zur Bildung grüner Kolonien und <i>de novo</i> HAC Formierung.....	95
3.8.2	Baktinfektion von CGT21 erzeugt Klone mit hoher Effizienz	97

4	DISKUSSION.....	99
4.1	Marker für <i>in vivo</i> Gentransfer weniger Vektormoleküle	100
4.2	pTT, ein verbesserter HAC Vektor	105
4.3	Cotransfektion: Synergismus oder additiver Effekt?	109
4.4	Klonformierung und Kopiezahl der transfizierten Konstrukte	111
4.5	CGT21 als CFTR Expressionsmodell für Zellkultur und Tiermodell	113
4.6	Bakterien, ein idealer Gentransfer Vektor?	116
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	120
5	ANHANG	122
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	129
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	131
8	PUBLIKATIONEN.....	139
9	LEBENS LAUF	141
	DANKSAGUNG	142

1 Einleitung

Eine der grössten intellektuellen und technischen Herausforderungen der modernen Medizin ist die Therapie menschlicher Erkrankungen durch die Molekularbiologie und Gentechnologie. Speziell die Gentherapie verspricht Heilung von Krankheiten, bei denen konventionelle Therapien bis heute versagen. Dazu zählen neben den geschätzten 3.500 bis 4.000 monogenen Erbkrankheiten wie Mukoviszidose (Cystische Fibrose, im folgenden Text „CF“), Phenylketonurie oder den Muskeldystrophien Duchenne/Becker vor allem die grossen Volksleiden wie Krebs, Diabetes, Herz-Kreislauf Erkrankungen und Alzheimer. Obwohl einige Arbeiten in den letzten Jahren ein „proof-of-principle“ der Gentherapie belegen (Zabner, 1995; Qasim, 2004; Herzog, 2003; Hacein-Bey-Abina, 2002), bleibt ihre Anwendung bisher wegen technischer Schwierigkeiten stark eingeschränkt. Der hohe Erwartungsdruck sowie eine falsche Einschätzung der Zeitspanne bis zur klinischen Anwendung führten bei Wissenschaftlern, Fachärzten, und Patienten zu grossen Enttäuschungen.

Ungelöste Schwierigkeiten bestehen in allen Aspekten der Gentherapie (Klink, 2004). Dazu gehören vor allem die Sicherheit, die Transfereffizienz, eine robuste, voraussagbare Funktion des transferierten Gens, also die stabile Vererbung und die Genregulation im Chromatinkontext, die Herstellbarkeit und Bezahlbarkeit sehr grosser Vektormengen und eine einfache Applikation. Gleichwohl gilt das Konzept der Gentherapie zur kausalen Therapie uneingeschränkt und insbesondere die Cystische Fibrose stellt bereits seit Jahren das Leitmodell für eine funktionelle Gentherapie bei einer rezessiven Erkrankung dar, die bereits bei Vorhandensein eines normalen und eines mutierten Gens einen gesunden Phänotyp ermöglicht.

Somatische Gentherapie für die CF

Zu den schlagenden Vorteilen einer Gentherapie gehört neben der prinzipiell möglichen anhaltenden Heilung u.a. die Tatsache, dass z.B. die pathophysiologischen Prozesse bei einer genetischen Erkrankung nicht vollständig verstanden werden müssen. Durch Hinzufügen eines funktionellen Gens, vorausgesetzt es kann in betroffene somatische Zellen, inklusive Stammzellen, eingeschleust werden, wird eine vollständige Heilung erwartet. Das trifft auch für CF zu, eine komplexe Erkrankung, bei der die krankheitsverursachenden molekularen Vorgänge nicht gut verstanden werden. Über die Vorstellung einer Elektrolytregulationsstörung mit zähem Schleim hinaus scheinen noch zusätzliche Mangelzustände durch Dysregulationen der Resorption und einen gestörten Lipidhaushalt der Zellmembranen beteiligt zu sein.

Eine Grenze der Wirksamkeit einer somatischen Gentherapie ist allerdings erreicht, wenn ein Organ irreversiblen Schaden genommen hat. So könnte bei CF eine frühe Therapie notwendig

werden, um einer Schädigung der Bauchspeicheldrüse vorzubeugen oder das Fortschreiten der Lungenerkrankung zu stoppen. Voraussagen sind nach heutigem Wissensstand schwer zu treffen, allerdings steht die lokale Behandlung der Lunge im Vordergrund, weil andere Symptome konventionell behandelt werden können (Ersatz der Bauchspeicheldrüsenenzyme, hochkalorische Ernährung) und die Lungenerkrankung die häufigste Todesursache darstellt.

CF ist eine monogene, autosomal rezessive Erbkrankheit. Mit einer Inzidenz von ca. 1:2.500 Neugeborenen ist sie eine der häufigsten schweren mendelischen Erbkrankheiten bei Kaukasiern, und 3-4% der Bevölkerung sind heterozygote, symptomlose Träger eines mutierten Allels. Es sind zurzeit 1.338 Mutationen (Stand: Juni 2004) im CFTR-(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) Gen mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die Funktion des 1.480 Aminosäuren umfassenden CFTR-Proteins beschrieben (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>), wobei die Deletion des Phenylalanins an Position 508 ($\Delta F508$) die bei weitem häufigste (ca. 70%) aller krankheitsrelevanten CF-Mutationen ist (Kerem, 1989; Bobadilla, 2002). Der Verlauf der Krankheit ist schwer und kann bis heute nur verzögert, nicht aber gestoppt werden. Betroffen sind vor allem die Atemwege aber auch andere exokrine Gewebe wie Pankreas und Darm. In den Atemwegen bildet sich aufgrund einer erhöhten Salzkonzentration und eines herabgesetzten Wassergehaltes des „airway surface fluid“ (ASF) ein abnorm visköser Schleim (lat. mucus) und ein gestörtes Flimmerepithel mit einer eingeschränkten mukoziliären Funktion („mucociliar clearance“). Der Schleim, der normalerweise Staub, abgestorbene Zellen und Mikroorganismen bindet, kann nicht mehr effizient aus den Atemwegen entfernt werden, was zu einer Obstruktion der Atemwege mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen führt. Letztlich führen chronische bakterielle Entzündungsreaktionen zu einem fortschreitenden Verlust der Lungenfunktion und häufig bis zum Ende des dritten Lebensjahrzehnts zum Tode.

Die Identifizierung des für CF verantwortlichen Gens auf Chromosom 7 (7q31.2) im Jahre 1989 (Riordan, 1989) und die günstig erscheinende Zugänglichkeit des primär betroffenen Gewebes, das Lungenepithel der oberen Bronchien, weckte sehr früh Hoffnungen, die Krankheit mittels somatischer Gentherapie in naher Zukunft heilen zu können. Schon 1993 wurde eine CF-Gentherapiestudie durchgeführt (Zabner, 1995), in der gezeigt werden konnte, dass mithilfe von Adenovirus vermitteltem Transfer einer CFTR-cDNA Kasette der Gendefekt kurzfristig kompensiert werden konnte. Jedoch stellte sich heraus, dass wiederholte Applikation, die wegen der transienten Expression notwendig war, eine Immunantwort des Patienten provozierte, welche die adenoviralen Vektoren effizient an einer erneuten Infektion des Lungenepithels hinderte (Griesenbach, 2002). Die Verwendung retroviraler Vektoren, welche für

gentherapeutische Studien anderer Erkrankungen eingesetzt wurden, erwies sich vor allem wegen der Gefahr der ungerichteten Rekombination in endogene Chromosomen als problematisch (Hacein-Bey-Abina, 2003; Marshall, 2003). Nachdem ein Patient, welcher an einer angeborenen, nicht lebensbedrohlichen OTC-Defizienz (Ornithin Transcarbamylase) erkrankt war, nach Applikation adenoviraler Vektoren, aufgrund einer unkontrollierbaren Immunantwort, verstarb (Raper, 2003), wurden klinische Studien mit viralen Vektoren hoher Titer vorerst ausgesetzt. Es setzt sich mehr und mehr die Überzeugung durch, dass nur ein stabiler Gentransfer von Vektoren auf chromosomaler Basis die geforderten Sicherheitsstandards erfüllen kann, und zwar aus zwei einfachen Gründen: Erstens stören eigenständige genetische Elemente, die ohne zusätzliche Fremdproteine (wie z.B. EBNA-1 bei EBV) stabil an Tochterzellen weitergegeben werden, nicht das Wirtsgenom. Zweitens können auf künstlichen Chromosomen tatsächlich ganze Gene bzw. Genloci untergebracht werden. Diese enthalten Introns, Exons, und angrenzende regulatorische Regionen und sind in der Lage eine eigene Chromatindomäne aufzubauen, die im Kontext des Zellkerns eine regulierte Expression ermöglicht. Die bisher verwendeten „Gene“ waren zumeist cDNA-Konstrukte mit kurzen Promotoren, die zwar die richtige Information für das Protein enthalten, dieses aber nicht immer verlässlich in richtigen Mengen in den richtigen Zellen produzieren.

Künstliche Chromosomen, ein sicheres Konzept

Bisher stellen künstliche Chromosomen das einzige Konzept dar, das gleichzeitig Sicherheit, regulierte Expression und Langzeitwirkung erreichen kann. Sie werden als freies Episom stabil mitotisch vererbt (nicht-integrativ), benötigen keine Fremdproteine (nicht-immunogen) und haben praktisch unlimitierte Kapazität. Es können Gene oder ganze Gendomänen mitsamt regulatorischen Bereichen, die für eine zelltypspezifische Expression des Transgens unerlässlich sind, inseriert werden. Darüber hinaus bietet die Herstellung und Lagerung praktisch unbegrenzter Vektormengen, zumindest im „bottom up“ Ansatz (siehe Abb. 1), eine technische Voraussetzung für eine Realisierbarkeit, die von anderen Vektoren bisher kaum anvisiert wird. Die Entwicklung künstlicher menschlicher Chromosomen (HACs, von „Human Artificial Chromosomes“), hat sich seit der Beschreibung HACs erster Generation (Harrington, 1997) rasant fortgesetzt. Es steht heute eine Vielzahl künstlicher Chromosomenvektoren, wie z.B. PAC-, BAC- oder YAC-basierende Konstrukte und Mini-Chromosomen zur Verfügung (Review: Lipps, 2003), und im Laufe ihrer Konstruktion konnte enormes Wissen über die funktionellen Elemente eukaryotischer Chromosomen, wie z.B. Zentromere, Telomere oder Replikationsursprünge, gewonnen werden (Huxley, 1994; Ascenzioni, 1997; Willard, 1998; Warburton, 1999; Vos, 1999; Ebersole, 2000; Cooke, 2001; Lewis, 2001; Lipps, 2001, 2003, 2004; Grimes, 2002a,b; Saffery und Choo, 2002).

HACs können prinzipiell auf zwei völlig verschiedenen Wegen erzeugt werden (Abb. 1). Ein Ansatz, der als „top down“ bezeichnet wird, basiert auf Fragmentierung natürlicher Chromosomen (bzw. Marker-Chromosomen) in Zellkultur mit dem Ziel, ihren DNA-Gehalt auf ein Minimum zu reduzieren. Dies kann entweder durch zufälliges Brechen endogener Chromosomen nach Bestrahlung (Benham, 1989; Auriche, 2001) oder Integration telomerischer Sequenzen (Farr, 1992) sowie nach Integration exogener DNA in zentromerische Bereiche und Amplifikation zentromerischer Replikons erreicht werden (Kereso, 1996; Csonka, 2000). In jedem Fall ist das Endprodukt der Fragmentierung(en) aus einem endogenen Chromosom entstanden, welches als Chromatinstruktur innerhalb der lebenden Zelle modifiziert wurde. Einen völlig anderen Weg beschreitet die *de novo*-Formierung künstlicher Chromosomen nach Transfektion definierter Input-Sequenzen, bestehend aus zentromerischer, telomerischer und genomischer DNA, die Protein kodierende Bereiche enthalten kann. Dieser Weg wird als „bottom up“-Ansatz bezeichnet und wurde unter anderem von Willards und Cookes Gruppen bei der Konstruktion der ersten HACs verwendet (Harrington, 1997, Ikeno 1998).

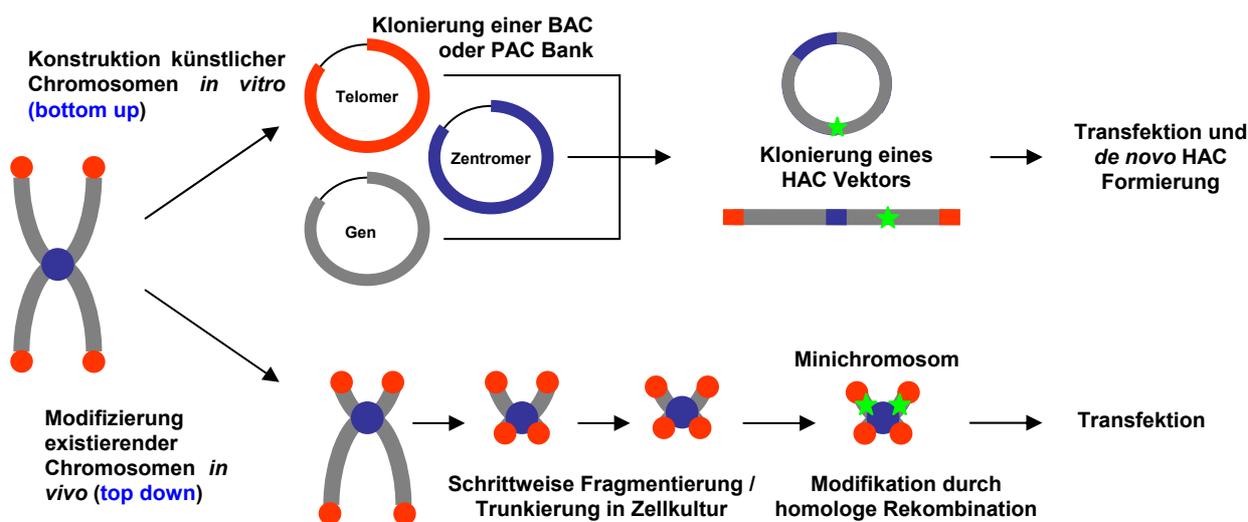


Abbildung 1: „Top-down“ und „bottom-up“. Schematische Darstellung der beiden Methoden zur Erzeugung künstlicher Chromosomen. Der „bottom up“ Ansatz (oben) zielt auf eine *de novo*-Formierung von HACs nach Transfektion „nackter“ DNA Konstrukte aus funktionellen chromosomalen Sequenzelementen. Diese telomerischen, zentromerischen und genomischen Sequenzelemente können z.B. aus BAC-, PAC- oder YAC-Banken isoliert werden und durch biochemische Reaktionen (Rekombination, PCR, Ligierung) kloniert und modifiziert werden. Dabei können Markergene oder therapeutische Gene in die Chromosomen eingebracht werden. Der DNA-Gehalt der einzelnen Komponenten ist bekannt. Ein alternativer Ansatz besteht in der Fragmentation existierender Chromosomen *in vivo* (unten). Nach mehreren Verkürzungen kann ein minimales menschliches Chromosom erzeugt werden (Farr, 1992; Saffery, 2002), das durch homologe Rekombination weiter modifiziert werden kann. Die exakte Sequenz-Zusammensetzung des Minichromosoms kann allerdings nicht vorausbestimmt werden, da die langen zentromerischen Tandem Repeats und die perizentrischen Bereiche, die häufig Duplikationen genomischer Abschnitte (von z.B. 100 kb) tragen, noch große Lücken in der Sequenz des menschlichen Genoms darstellen (Zentromerische DNA, blau; telomerische Sequenzen, orange; genomische Sequenzen, grau; therapeutisches Gen oder Selektionsmarker, grüner Stern).

HAC-Technologie: MiniChromosomen, Neozentromere, Epigenetik

Auf isolierter DNA-basierende HAC Vektoren zielen auf eine *de novo* Erzeugung künstlicher Chromosomen aus funktionellen chromosomalen Elementen. In Analogie zu den künstlichen Chromosomen der Hefe (YACs) sollen drei funktionelle Einheiten gebildet werden: Zentromere dienen der stabilen Segregation der „low copy“ episomalen Elemente (1-2 pro Zelle) während der Zellteilung, genomische Regionen enthalten die Gene und gegebenenfalls Replikationsursprünge, und Telomere schützen das künstliche Chromosom vor Rekombinationen und sollen der Endreplikation dienen. Anders jedoch als in der Hefe, in der alle drei Sequenzelemente, die Telomere ($[G_{1-3}T]_{n>100}$), ein Replikationsursprung (ars, „autonomous replicating sequence“; 11 bp plus 50 kb unspezifische Armsequenz) und eine spezifische Zentromersequenz von 120 bp (cen I, II, III) benötigt werden, um ein mitotisch stabiles „Yeast Artificial Chromosome“ (YAC) zu erzeugen (Murray und Szostak, 1983), ist die Situation bei den Chromosomen höherer Eukaryonten deutlich komplexer. Frühe Analysen mit Telomersequenzen (in allen Vertebraten ein Tandem Repeat des Hexanukleotids $[TTAGGG]_n$) zeigten, dass weniger als 1 kb telomerische DNA auf transfizierten Konstrukten ein funktionelles Telomer in eukaryotischen Zellen bilden kann (Farr, 1991; Itzhaki, 1992; Hanish, 1994). Die im Menschen 1-20 kb langen Repeatarrays (in der Maus bis 100 kb) formieren am Chromosomenende einen Duplex-Loop (T-Loop) (Griffith, 1999; Stansel, 2001) und verhindern so die Zugänglichkeit des freien DNA-Endes für Rekombinationen (chromosomale Translokationen mit Enden oder zufälligen Bruchstellen anderer Chromosomen). Auch ori-Sequenzen scheinen kein Problem bei der HAC Formierung darzustellen, da sich fast alle Sequenzen über 15 kb als Replikationskompetent erwiesen (Krysan, 1993; Gilbert, 2001, Schaarschmidt, 2004). Doch der für eine stabile mitotische Segregation wichtigste Teil des Chromosoms, das Zentromer, blieb lange die am wenigsten verstandene Komponente der künstlichen Chromosomen. Das Zentromer der Säugetiere, dessen Funktion mit der Bindung der Chromosomen an den mitotischen und meiotischen Spindelapparat schon vor vielen Jahren beschrieben wurde, wird von hoch repetitiver (Satelliten) DNA gebildet. Diese besteht beim Menschen grösstenteils aus alpha-Satelliten (α -sat) DNA, 171 bp Monomeren, die in Chromosomen-spezifischen „higher order repeats“ organisiert sind (Waye, 1987; Warburton 1990; Lee, 1997). Lange Abschnitte dieser α -sat DNA wurden in Transfektionsexperimenten verwendet, und erzeugten nur funktionelle Zentromere wenn sie homogene Arrays bildeten (Harrington, 1997; Ikeno, 1998; Masumoto, 1998; Henning, 1999; Ebersole, 2000; Schueler, 2001), was eine Abhängigkeit der Zentromerfunktion von der höheren Struktur der Sequenzen nahelegte. Allerdings wiesen eine Reihe von Beobachtungen (z.B. die Entstehung von α -sat freien Neozentromeren auf Markerchromosomen) auf einen epigenetischen Mechanismus der Zentromerfunktion hin. Im Gegensatz zur Hefe, bei der alle drei Sequenzelemente (ars und tel

und cen) essentiell sind für die *de novo*-Formierung von stabilen YACs, konnte gezeigt werden, dass homogene α -sat DNA von ca. 80 kb als einzige menschliche DNA-Komponente ausreicht um ein *de novo* Chromosom zu formieren, wenn die DNA in zirkulärer Form, also ohne freie DNA Enden transfiziert wird (Ebersole, 2000). In linearer Form werden allerdings zusätzlich Telomersequenzen benötigt, die sogar dann die transfizierten Zentromere vor Integrationen schützen, wenn die Telomersequenzen nicht unmittelbar am Ende der Konstrukte, oder sogar in umgekehrter Richtung auf den Konstrukten angebracht werden.

Für die Zentromerfunktion selbst, also die fortwährende Propagierung eines bestimmten Chromatinbereichs in sich teilenden Zellen, scheinen epigenetische Mechanismen eine wesentliche Rolle zu spielen. Aus Arbeiten mit Hefe und *Drosophila* schlossen Karpen und Allshire dass einmal gebildete, aktive Zentromere als selbst-propagierende Strukturen, unabhängig der zugrunde liegenden DNA-Sequenz existieren (Karpen und Allshire, 1997). Neozentromere auf Markerchromosomen, die weltweit in etwa 30 Fällen beobachtet wurden (Warburton, 2000a), binden alle Proteine, die ein aktives Zentromer bzw. Kinetochor kennzeichnen (CENP-A, CENP-C, CENP-E ect.; Depinet, 1997; Warburton, 2000a; Saffery, 2000), bilden sich aber offenbar sehr selten, in nicht-zentromerischen Chromatinregionen mit normalen Armsequenzen ohne α -sat DNA (Saffery, 2001). Allerdings ist unklar, wie oft bei der Entstehung von Markerchromosomen keine Neozentromere gebildet werden können und diese instabil bleiben (gegebenenfalls Aborte). Interessanterweise waren isolierte neozentromerische Sequenzen nach Transfektion nicht in der Lage ein künstliches Chromosom *de novo* zu formieren (Abb. 2.; Saffery, 2001; Willard, 2001). Zusammen genommen sprechen diese Daten für ein Modell, in dem epigenetische Mechanismen die Basis für die fortwährende zentromerische Funktion bilden, aber homogene α -sat DNA die bei weitem effektivste Sequenz für die *de novo*-Formierung eines Zentromers darstellen (Abb. 2).

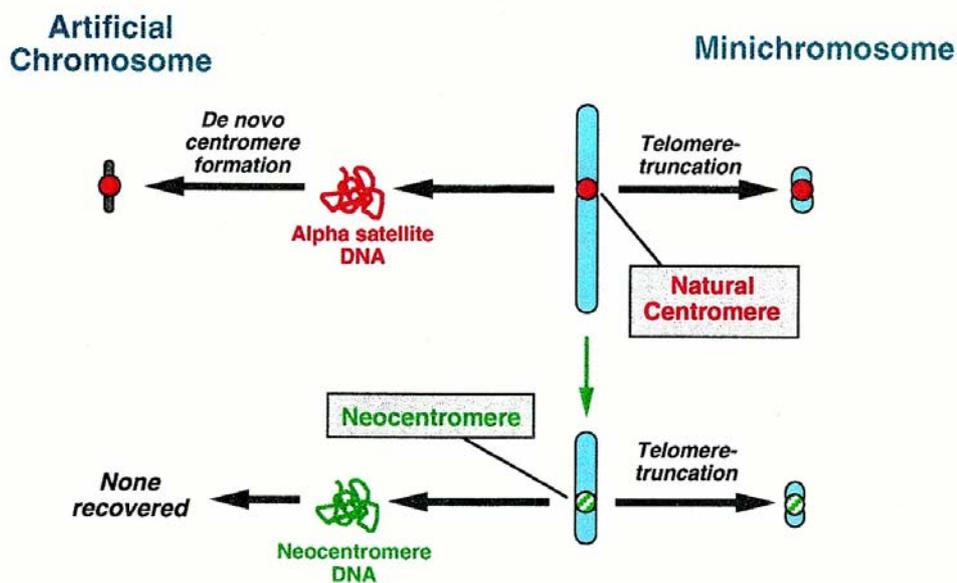


Abbildung 2: Ein Neozentromer ist stabil, aber erlaubt keine *de novo*-Formierung (aus Willard, 2001). Minichromosomen können aus endogenen Chromosomen und aus neozentromerischen Markerchromosomen generiert werden, weil beide die epigenetischen Merkmale für ein aktives Zentromer besitzen (rechts). Eine *de novo*-Formierung aktiven Zentromerchromatins konnte bisher ausschliesslich aus isolierter zentromerischer α -sat DNA nach Transfektion erzeugt werden, nicht aber aus isolierten neozentromerischen Sequenzen (links). Bezüglich der *de novo*-Formierung von HACs aus nackter DNA hat nur die α -sat DNA eine Bedeutung.

In dieser Arbeit werden Vektoren auf P1- (Sternberg, 1977) oder PAC-Basis („Phage $\underline{P}1$ Artificial Chromosome“ Ioannou, 1994) für die Klonierung der chromosomalen Komponenten (Zentromere, Telomere und genomische Sequenzen) verwendet. P1 und PACs wurden ursprünglich entwickelt, um lange genomische DNA stabil zu klonieren. Während P1 Phagen-Banken noch eine Verpackung der DNA benötigten, was ihre Länge auf maximal 105 kb begrenzte, erlaubte die Elektroporation genomische Banken mit einer Durchschnittslänge von > 120 kb. Der „unit-copy“ Status dieser Vektoren in *E.coli* (Sternberg, 1977) ermöglicht die stabile Klonierung genomischer und repetitiver Sequenzen (Ioannou, 1994). So konnten multiple Telomerrepeats in invertierter Anordnung (unveröffentlichte Daten; Ebersole, 2002; diese Arbeit) und lange zentromerische Tandem Repeatarrays (100-200 kb) mit 99% homologen Einheiten (von 0,34-3 kb) (Schindelbauer und Schwarz, 2002; diese Arbeit) stabil in einem Plasmid kloniert werden. Nach der Entwicklung von Methoden zur Herstellung grosser Mengen intakter, langer DNA wurde die biochemische Konstruktion langer HAC Vektoren über lox/Cre „site specific recombination“ (Abremski, 1983) möglich, die nun nach dem Baukastenprinzip konstruiert werden können (Schindelbauer und Cooke, 1997). Modifikationen eines Standard PAC Vektors, wie die Klonierung zweier telomerischer Repeats von 810 bp Länge (TTAGGG)₁₃₅ sowie Insertion eines Blasticidin-S Resistenzmarkers (BS, zur Selektion in Eukaryoten) und

einer loxP Stelle (zur Cre-vermittelten Rekombination), führten schliesslich zur Konstruktion des Basis HAC Vektors pTAT-Bs (Schindelhauer, 1999; Acc.Nr. BN000528/9; Abb. 3).

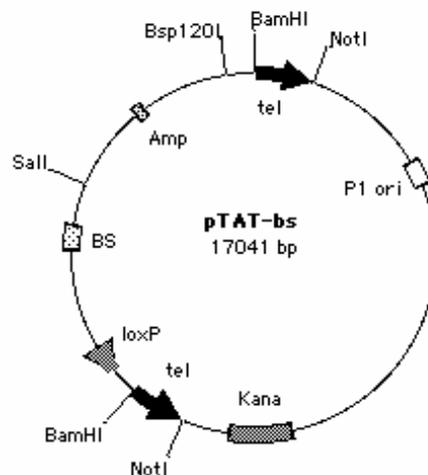


Abbildung 3: pTAT-Bs. Der Basis HAC Vektor pTAT-Bs wurde von Dr. Schindelhauer konstruiert um genomische Sequenzen und/oder α -sat Arrays stabil zu klonieren, und auf ihre Eignung zu testen *de novo* künstliche menschliche Chromosomen zu erzeugen. *Not I* Spaltung erzeugt ein lineares, telomerisiertes Konstrukt. Zur Selektion in eukaryotischen Zellen wurde der Blasticidin-S Resistenzmarker verwendet, die loxP Stelle kann zur Cre-vermittelten, spezifischen Rekombination verwendet werden und erlaubt die Addition beliebiger PAC-klonierbarer Komponenten *in vitro*.

Steigerung der *de novo*-Formierungseffizienz über die Optimierung der Vektoren

Neben der erforderlichen Steigerung des physikalischen Transfers der Konstrukte über Mukus und Zellmembranbarrieren scheinen beim Gentransfer zusätzliche genetische Barrieren eine wesentliche Rolle zu spielen. Der Knackpunkt liegt dabei in der Beschaffenheit der Konstrukte und in ihrer Bereitschaft, nach erfolgtem Transfer genetische Funktionen zu übernehmen. Da Gene alleine nicht stabil existieren können, werden HACs benötigt, die nicht nur die genetische Funktion der Genexpression und Genregulation aquirieren müssen, sondern auch die genetischen Funktionen eines Zentromers, der Telomere, und der Replikation vermitteln. Der physikalische DNA Transfer in Zellkultur oder Gewebezellen (viral und nicht-viral) wurde in den letzten Jahren hauptsächlich unter Verwendung cDNA-basierender Reportersysteme optimiert was, durch die transiente Expression des Reporters bedingt, eher zu einer selektiven Entwicklung hin zum Massentransfer kurzer DNA Fragmente führte. Dadurch erreichen heute nicht virale Techniken (z.B. kationische Lipide, kationische Peptide, Elektroporation) oder virale Systeme (z.B. Lentiviren, Adenoviren, Adeno-Assoziierte-Viren, Retroviren) teilweise beachtliche Transfektionseffizienzen von über 50% in den unterschiedlichsten Zellkultursystemen und Geweben (Brunner, 2002; Porcellini, 2004; Zaric, 2004). Diese Methoden haben einen sehr hohen Stellenwert für die Herstellung von Proteinen in Zellkultur oder für Anwendungen, wie zum Beispiel die Immunisierung. Für eine stabile Anwesenheit und regulierte Expression in

teilungsfähigen Zellen (klonale Linien), wie sie von künstlichen Chromosomen angestrebt wird, scheint ein cDNA Massentransfer jedoch nicht geeignet zu sein. Nur in seltenen Fällen werden damit stabile Zelllinien erzeugt, die auf zufälliger Integration des Vektors unter Selektion in endogene Chromosomen beruhen (oft nur 1-10 Klone auf einer Platte mit 10^6 Zellen). Durch den Einsatz PAC-basierender Vektoren der ersten Generation konnten erstmals stabile HACs, allerdings mit einer ähnlich niedrigen Rate, erzeugt werden (Harrington, 1997). Zwei grundlegende Verbesserungen der HAC Formierungseffizienz konnten seitdem durch die Klonierung von langen α -sat DNA-Arrays und Telomer Repeats auf HAC Vektoren realisiert werden (Ebersole, 2000; Grimes, 2001).

Weitere Verbesserungen werden durch die „richtige“ Anordnung der Sequenz Komponenten auf den HAC Vektoren erwartet. Bei korrekter Sequenzanordnung sollte es möglich sein, dass die DNA Moleküle unmittelbar nach ihrem Transfer ein funktionelles, dreidimensionales Chromatin ausbilden können, ohne dabei auf seltene "aktivierende" Ereignisse (wie zum Beispiel Rekombinationen, Reparaturvorgänge an den Enden, oder Konkatemerisierungen) angewiesen zu sein. Tatsächlich wurde beobachtet, dass die Input DNA Konstrukte sich zu längeren Strukturen verketteten, so dass die entstehenden Minichromosomen in der Regel größer sind, als ein Input DNA Molekül (Harrington, 1997; Ikeno 1998). Es ist bislang unklar, ob durch die Verkettungen eine Mindestgröße für stabile Chromosomen überschritten wird, oder ob Rekombinationen einen geeigneten (längeren) Zentromerabschnitt bewirken könnten. Eine für die HAC Formierung kompetente Struktur scheint jedoch nach Transfektion nicht häufig und spontan in der Zelle zu entstehen, worauf die geringe Zahl stabiler Klone hinweist (oft nur 10-100 Klone pro Platte mit 5×10^5 Zellen). Diese liegt nicht wesentlich höher als bei normaler Integration von Selektionsmarkern in zufällige Positionen des Genoms. Um Zentromer- und Genkombinationen gezielt zu verbessern, müssen die Vektoren systematisch in Transfektionsstudien optimiert werden. Dazu ist es notwendig die Anzahl der transfizierten Konstrukte pro Zelle, die Gesamtzahl an transfizierten Zellen und die Fraktion der transfizierten Zellen, die HACs formieren zu bestimmen, um zu ermitteln ob eine bestimmte Konstruktzahl, Vektor-Konfiguration oder DNA-Komponente besonders effizient HACs formiert. So könnte allein die Anwesenheit einer grossen Anzahl freier DNA Enden nach Transfektion einer grossen Anzahl Vektormoleküle (>1.000 /Zelle), durch Überlastung der DNA Reparatursysteme, zellzyklusspezifische „Check-Points“ aktivieren, was „cellular senescence“ (Teilungsunfähigkeit) oder Apoptose zur Folge hätte. Die Transfektion geringer Molekülzahlen (1-10/Zelle) wäre, dieser Theorie folgend, für die Zelle weniger belastend. Möglicherweise sind aber viele Vektormoleküle notwendig, damit sich durch Ligierung oder Rekombination längere Strukturen ausbilden können, um eine mögliche Mindestgröße für funktionelle Chromosomen zu

erreichen, welche über der der transfizierten Vektoren liegt. Zur Klärung dieser grundlegenden Fragen sind Marker erforderlich, um zu erfassen, wieviele Vektormoleküle notwendig sind, um die verschiedenen Funktionen (Replikation, Zentromerformierung, Genexpression) zu begünstigen. Am Ende der Optimierung würde ein idealer HAC Vektor stehen, welcher quasi unbemerkt von der Zielzelle effizient künstliche Chromosomen formiert.

Marker als Voraussetzung für die Vektoroptimierung

Die Anforderungen an einen idealen Marker sind sehr umfangreich, denn er sollte den Ort, die Beschaffenheit (Intaktheit), die Molekülzahl und die Funktion (Minimalfunktion wie transiente Expression bis hin zum funktionellen Chromatinstatus von Zentromeren und Genen) anzeigen können. Diese Anforderungen sind praktisch nicht mit einem einzigen System erreichbar: Ein Sequenz-tag, das einen Fluoreszenzmarker binden kann, ist in der Regel eine begrenzte Region (z.B. 20 kb) die zwar sensitiv nachgewiesen werden kann (mitunter sogar als einzelne Kopie in lebenden Zellen, ohne genetische Funktion zu benötigen), aber z.B. nichts über die Anwesenheit anderer Bereiche der langen Konstrukte (Intaktheit) aussagen kann.

FISH ist geeignet, um die Anwesenheit mehrerer Sequenzen in einem HAC nachzuweisen, aber weniger, um eine Kopiezahl oder die Intaktheit exakt zu bestimmen. Ausserdem kann diese Technik nicht in einer einzigen lebenden Zelle oder unmittelbar nach Transfektion, wenn nur wenige Moleküle im Kern viele aber im Zytosol lokalisiert sind, angewendet werden.

Transiente Expression eines cDNA Markers erlaubt den frühen Nachweis transfizierter DNA in einzelnen lebenden Zellen, bedeutet aber weder, dass lange intakte DNA anwesend ist, noch dass die gleichen Moleküle, die transient exprimieren, später HACs formieren.

Stabile Expression dagegen, kann erst nach vielen Tagen und Zellteilungen nachgewiesen werden, sagt also nichts über die Lokalisation oder die Zahl der erfolgreichen transfizierten Moleküle kurz nach Transfektion aus.

Um den intakten Transfer langer DNA nachzuweisen, können sehr lange Vektoren verwendet werden, die nur funktionieren, wenn alle Teilbereiche vorhanden sind (z.B. ein genomisches Gen), aber der Expressionsnachweis allein (z.B. mittels RT-PCR) sagt nichts über die Position der langen DNA.

In der Regel werden also gleichzeitig mehrere Analysen mit verschiedenen Markern notwendig werden, jede hat ihren eigenen typischen Einsatzbereich und Aussagen sind nur begrenzt möglich.

In dieser Arbeit wurden folgende Markersysteme entwickelt:

- Nachweis über transiente Expression eines Reporter Gens (EGFP-cDNA)
- Direkter Nachweis gelabelter DNA (DNA-tag)
- Nachweis über Funktion/Expression eines genomischen Gens (HGPRT, CFTR)

Als transienter Expressionsmarker wurde eine EGFP-cDNA Kasette verwendet, die in den neu konstruierten tetratelomeren Vektor pTT kloniert wurde. Es wurden umfangreiche Mikroinjektionsstudien mit bekannten Kopiezahlen durchgeführt, um die Sensitivität des Markers festzustellen. Um erfolgreich transfizierte Zellen früh nachweisen zu können wurden ausserdem zur Steigerung der Sensitivität mehrere Kopien des EGFP Reporters als Tandem Arrays kloniert. Als direkte DNA-tags wurden die Sequenz der Gal4-Bindedomäne (Gal4-BD), welche von der DNA-Bindedomäne des Hefe Transkriptionsaktivator-Proteins Gal4 spezifisch gebunden wird sowie die lac-Operator Sequenz aus *E.coli* getestet. Durch Verwendung des HGPRT-Gens (in HGPRT-defizienten Zellen) sowie des CFTR-Expressionskonstruktes CGT21 kann intakter Transfer der HAC Konstrukte über die Funktion bzw. Expression des genomischen Gens bestimmt werden (>42 kb HPRT, >80 kb CFTR/EGFP).

Die in vorliegender Arbeit gewonnenen Daten und Erkenntnisse weisen darauf hin, dass der Transfer niedriger Kopiezahlen als neue Methode für den stabilen und funktionellen Gentransfer etabliert werden muss. Allerdings versagen dabei herkömmliche Gentransfer-Analysemethoden, die auf transienter Expression beruhen. Aus diesem Grund wurden die multimeren Expressionsmarker (EGFP-Array) und DNA-tags (Gal4-BD, lac-Operator) entwickelt, die nun für einen Einsatz bereit stehen.

Ein CFTR Expressionskonstrukt für die CF-Gentherapieforschung

Das bisherige Scheitern einer sicheren und stabilen CFTR-Gentherapie ist nur zum Teil auf die Verwendung mangelhafter Vektoren und ineffizienter Gentransfersysteme zurückzuführen. Ein weiterer Grund ist das unvollständige Wissen über die endogene CFTR-Expression auf zellulärer Ebene. So wurden nur ansatzweise die Sub-Zelltypen in Epithelzellen identifiziert, welche CFTR exprimieren und bezüglich einer temporären Regulation der CFTR-Expression sind unsere Kenntnisse ebenfalls unvollständig. Um ein CFTR-Expressionsmodell zu schaffen, wurde das von Sonja Cattani konstruierte CFTR-Expressionskonstrukt CG2 (Cattani, 2000; Abb. 4) in den Basisvektor pTAT-Bs kloniert. Das ditelomere Konstrukt (159 kb) kann nun der Identifikation stark CFTR-exprimierender Zellen dienen, da das vom endogenen CFTR-Promotor regulierte „synthetische“ Gen (Exon 10-EGFP) leicht vom endogenen CFTR zu unterscheiden ist. Eine weitere Anwendung wäre, durch Deletionsstudien neue regulatorische

Elemente des CFTR-Gens zu identifizieren. Solche Elemente, die im Chromatinkontext wirken, sind durch ihre räumliche Organisation im Zellkern massgeblich an der Genregulation beteiligt.

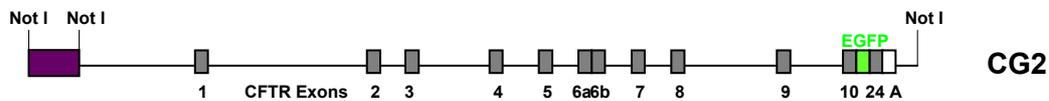


Abbildung 4: Das CFTR-Expressionskonstrukt CG2. Das von Sonja Cattani im Rahmen ihrer Diplomarbeit konstruierte CFTR-Expressionskonstrukt CG2 (142,5 kb) enthält den CFTR-Lokus von ca. - 60 kb 5' bis Exon 10, sowie Exon 24/Poly A (A) und 2 kb der CFTR 3' Region. Das in pEGFP-N1 konstruierte synthetische Exon 10-EGFP-Exon 24 wurde „in frame“ kloniert. Der PAC Vektor Anteil (purpur) kann durch *Not I* Spaltung abgetrennt werden (nicht maßstabsgetreu).

Bakterieller Gentransfer und künstliche Chromosomen

In Kollaboration mit Dr. Catherine Grillot-Courvalin (Institut Pasteur, Paris) wurden zwei neue, innovative Techniken miteinander verbunden. HACs können nun durch bakteriellen Gentransfer erzeugt werden. Die Verwendung eines bakteriellen Transfersystems vereint die Vorteile der „Baktinfektion“ (keine DNA Isolierung vor Transfektion nötig, „low copy“ Transfer) mit den Vorteilen der künstlichen Chromosomen (keine Rekombination, Integration und Toxizität) und leistet damit einen Beitrag zur Verbesserung und drastischen Vereinfachung des physikalischen Gentransfers. Ein von Dr. Grillot-Courvalin entwickelter Diaminopimelin-Säure (dap) auxotropher *E.coli* Transferbakterienstamm (Grillot-Courvalin, 1995, 1998, 1999) exprimiert das Invasin-Gen (*inv*) aus *Yersinia pseudotuberculosis* sowie das Listeriolysin O-Gen (*hly*) aus *Listeria monocytogenes*. Dies ermöglicht eine effiziente Aufnahme der Bakterien sowie die Freisetzung der DNA-Fracht nach dap-Mangel induzierter Lyse der Bakterien („suicidal invasion“) ins Cytoplasma von Zielzellen. Durch das Prinzip dieses Systems ist es möglich, bei Verwendung einer bestimmten „multiplicity of infection“ (MOI), die Kopiezahl der transfizierten Konstrukte einzustellen. Ziel ist es, mit einer möglichst geringen MOI (z.B. ein Bakterium pro Zelle, um toxische Effekte zu vermeiden und um die Zellen nicht mit DNA zu überladen) Zielzellen stabil zu transfizieren. In dieser Arbeit ist es gelungen die prinzipielle Anwendbarkeit diese Systems für die HAC Formierung und für die Expression des langen genomischen CFTR Genkonstrukts nachzuweisen. Dadurch wurde ein bedeutender Schritt hin zu einem effizienten und sicheren *in vivo* Transfektionssystem für künstliche Chromosomen erreicht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

- HT1080 (menschliche Lungen-Sarkom Zellen)
- HT1080⁻ (HT1080 mit deletiertem HPRT-Gen)
- 16HBE14o⁻ (immortalisierte menschliche Bronchialepithel Zelllinie)
- Primäre menschliche Fibroblasten

Die HT1080 Zelllinien stammen von Brenda Grimes (MRC, Edingburgh, Schottland), die 16HBE14o⁻ Zellen wurden von Dieter Grunert (University of California, USA) bereitgestellt und primäre menschliche Fibroblasten wurden von Konstanze Hörtnagel im Hause aus Patientenmaterial kultiviert.

2.1.2 Bakterienstämme

Stamm	Bemerkung	Referenz
<i>E. coli</i> ElectroMAX™ DH10B™	Hohe Elektrokompetenz, Standardst.	Gibco BRL
<i>E. coli</i> GM2929	<i>dam</i> und <i>dcm</i> negativ	CGSC # 7080, Berlyn, 1998
<i>E. coli</i> BM2710-pGB2Ω <i>inv-hly</i>	Transferstamm, <i>inv-hly</i> auf pGB2	Grillot-Courvalin, 1998

2.1.3 Plasmide und PACs

Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und PACs.

Name	Bemerkung	Referenz
pUC19	Klonierung, lacZ Kasette	Gibco BRL
pCLuc4	Expressionskontrolle nach Mikroinjektion	Clontech
pEGFP-N1	Klonierung, EGFP-Kasette	Clontech
pBluescript-SK+	Klonierung, blau/weiss Selektion	Stratagene
pTAT-Bs	PAC basierender, ditelomerischer HAC Vektor	Schindelhauer
pTAT-bbd	pTAT-Bs, del <i>Bsp</i> 120 I bis <i>Bss</i> H II	Schindelhauer
pTHT ₂₂	pTAT-Bs mit ca. 95 kb HGPRT-Gen Lokus	Schindelhauer
B ₂ T ₈	pTAT-Bs mit ca. 190 kb α-sat Array von Chr.17	Schindelhauer
pSV-dhfr 8.32	pSV-dhfr basierend, mit 32 Kopien des lac-Operators	Robinett et. al.
pTT	PAC basierender, tetratelomerischer HAC Vektor	Diese Arbeit
pTTF ₁	pTT mit ca. 125 kb α-sat F ₁ von Chr.5	Diese Arbeit
pTTE ₁	pTT mit ca. 116 kb α-sat E ₁ von Chr.5	Diese Arbeit

pTF ₁ T	pTAT-Bs mit ca. 125 kb α -sat F ₁ von Chr.5	Diese Arbeit
pTE ₁ T	pTAT-Bs mit ca. 116 kb α -sat E ₁ von Chr.5	Diese Arbeit
pTGT	pTZT mit EGFP-Kassette in Bsp120I	Diese Arbeit
pTZT	pTAT-Bs mit lacZ Fragment in Sal I	Diese Arbeit
CGT21	CFTR-Expressionskonstrukt, auf pTAT-Bs Basis	Cattani, Laner

2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden vom Genzentrum der Universität München (Dr. Arnold) bezogen. 40 nmol lyophilisiertes Oligonukleotid wurden in 50 μ l TE Puffer gelöst. Davon wurde eine 1:10 Verdünnung (in TE) angesetzt, welche in die PCR Reaktion eingesetzt wurde. Die Oligonukleotide wurden bei -20°C gelagert. In nachfolgende Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

Name	Bemerkung	Sequenz (5' nach 3')
5IF	Chr.5 α -sat E ₁ , Hulsebos und Rocchi	GTGAGGAAACAGTCTGTTTGTC
5IR	Chr.5 α -sat E ₁ , Hulsebos und Rocchi	GAATCATTCTGTCTAGTTTTTATAC
17-1A	Chr.17 α -sat, Warburton, 1990	TGTTTAGTCAGCTGAAATT
17-2A	Chr.17 α -sat, Warburton, 1990	ATAACTGCACCTAACTAAACG
ABF	pTZT, ds-Oligo, fügt Bsp 120 I in Apa I (methyliert) ein	ACCCAAAGGGCCCAAATGTGGCC
ABR	pTZT, ds-Oligo, fügt Bsp 120 I in Apa I (methyliert) ein	ACATTTGGGCCCTTTGGGTGGCC
AmF	pTAT-Bs, Amp ^R -Gen intern	TCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTT
AmR	pTAT-Bs, Amp ^R -Gen intern	CCGCGCACATTTCCCGGAA
B3F	CFTR Exon 9; Beck, 1999	AATGTAACAGCCTTCTGGGAG
BemF	pTAT-Bs, BEM46-Gen (<i>E.coli</i>), zwischen Amp ^R und tel	CATGCTCACGGCAATGCCGG
BemR	pTAT-Bs, BEM46-Gen (<i>E.coli</i>), zwischen Amp ^R und tel	TGGCACTTTGCGTATCGTCCA
BemF1	pTAT-Bs, BEM46-Gen (<i>E.coli</i>), zwischen Amp ^R und tel	GGCACTGCCAGTGAACAAACG
BemR1	pTAT-Bs, BEM46-Gen (<i>E.coli</i>), zwischen Amp ^R und tel	CCAGCCTTGCAGACGAGTAC
BcF	pTAT-Bs, BS-Gen intern	TGGGAGCGGCAATTCGTACG
BcR	pTAT-Bs, BS-Gen intern	GGGTGTCTAACAGCTACAATCG
BcF2	pTAT-Bs, zeigt 10 bp del im BS-Gen	GGATAATAACATCATGTGGGAGC
C16D	CFTR revers; Beck, 1999	GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC
DSF	pTAT-bbd, ds-Oligo, del Sal I	TCGAGGAGGTGGCGGTGGA
DSR	pTAT-bbd, ds-Oligo, del Sal I	TCGATCCACCGCCACCTCC
CL1	Alu-PCR Primer	TCCCAAAGTGCTGGGATTATTACAG
CL2	Alu-PCR Primer	CTGCACTCCAGCCTGGG
EGF	pEGFP-N1, GFP-Kassette intern	AGGGCGAGGAGCTGTTACAC
EGR	pEGFP-N1, GFP-Kassette intern	GTGCGCTCCTGGACGTAGC
GFP-AL	CFTR-Exon10-GFP revers	GAACTTCAGGGTCAGCTTG
GGF	pEGFP-N1, GFP-Kassette, Xho I klonierbar	CCTGATTCTCGAGATAACCGTATTACCGCCATG
GGR	pEGFP-N1, GFP-Kassette, Xho I klonierbar	ATAGTGGACTCGAGTTCCAAACTGGAACAACAC TC
GGRS	pEGFP-N1, GFP-Kassette, Sal I klonierbar	GGATAGTGGAGTCGACTTCCAAACTGGAACAAC ACTC

GZf	pTGT, del MCS GFP-Kassette, <i>Mlu</i> I klonierbar	CCTGATTCACGCGTTAACCGTATTACCGCCATG
GZr	pTGT, del MCS GFP-Kassette <i>Xho</i> I klonierbar, fügt <i>Bsp</i> 120 I ein	ATAGTGGACTCGAGGGCCCAACTGGAACAACAC TC
G3F	Synth. Gal4-BD mit CENP-B Box	TCGAGAGTCCTCCGGAGACCGGAAGACCTTCGT CCGAAACGGGAGACAGTCCTCCGAGCGG
G3R	Synth. Gal4-BD mit CENP-B Box	TCGACCGCTCGGAGGACTGTCTCCCGTTTCGGA CGAAGGTCTTCCGGTCTCCGGAGGACTC
G438	pTAT-Bs, hinter dem tel auf PAC	TATTCCCACAGTTAACTGCGGTCAAGATA
G439	pTAT-Bs, hinter dem tel auf PAC	GGCCTATATTACCCCTGTTATCCCTAGCGC
ISF	pTATbbd, ds-Oligo, fügt <i>Sal</i> I in <i>Bam</i> HI/ <i>Nhe</i> I Fragment ein	GATCTGGAGGTGGGGTCGACGGTGGA
ISR	pTATbbd, ds-Oligo, fügt <i>Sal</i> I in <i>Bam</i> HI/ <i>Nhe</i> I Fragment ein	CTAGTCCACCGTCGACCCACCTCCA
KF	pTAT-Bs, Kana-Gen intern	GGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAG
KR	pTAT-Bs, Kana-Gen intern	CCATGAGTGACGACTGAATCCGGT
LPF	pTAT und PAC Vektor, loxP	GAAACGGCCTTAACGACGTAGTCG
LPR	pTAT und PAC Vektor, loxP	ATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTG
LZF	pUC19, lac-Z-Kassette, <i>Xho</i> I/ <i>Sal</i> I klonierbar	CGCCCACTCGAGCAACGCGGCCTTTTTACGGG CCTG
LZR	pUC19, lac-Z-Kassette, <i>Xho</i> I/ <i>Sal</i> I klonierbar	GGAGCACTCGAGCCCGTCAGCGCGCGTCAGCG
M13F	pUC19, flankiert <i>Sal</i> I Klonierstelle	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13R	pUC19, flankiert <i>Sal</i> I Klonierstelle	CAGGAAACAGCTATGACCATG
SuR	pTAT-Bs, im Polylinker zwischen Spacer und Telomer	TTCGAGCTCGGTACCCGGG
RsF	pTAT-Bs, FISH Sonde, Vektor-Teil	AGCGGTCGGACCGTGCTC
T3	pBluescript MCS	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	pBluescript MCS	TAATACGACTCACTATAGGG

2.1.5 Materialien für die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Folgende Materialien und Substanzen wurden in dieser Arbeit für die FISH Analyse verwendet.

Produkt	Hersteller
Antifade (p-Phenylendiaminodihydrochlorid)	Sigma
Avidin-Cy3.5	Rockland/Biomol
Biotin-16-dUTP	Roche
Cot-1 DNA	Gibco BRL
Cy5-dUTP	Amersham
Cy3.5-dUTP	Amersham
DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole)	Roche
Digoxigenin-11-dUTP	Roche
DNase I	Roche
DNA-Polymerization Kit	Amersham
Salmon-Testes-DNA	Sigma
Sheep-Anti-Dig-FITC	Roche

2.1.6 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, New England Biolabs und Stratagene bezogen und nach Vorschrift in dem entsprechenden Spaltungspuffer eingesetzt.

Produkt	Hersteller
Agarase	Gibco BRL
Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	Boehringer Mannheim
Lysozym	Fluka BioChemika
Polynukleotid Kinase	Boehringer Mannheim
Proteinase K	ICN
RNase A, DNase frei	Roche
S1-Nuklease	Amersham
Taq-DNA-Polymerase	Roche

2.1.7 Chemikalien und andere Materialien

Anorganische und organische Grundchemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad „p.a.“ und wurden von den angegebenen Firmen bezogen.

Produkt	Hersteller
Agar	Fluka
Agarose (Sea Kem)	Biozym
Agarose (Low melting point)	Gibco BRL
ATP	Sigma
β-Mercaptoethanol	Merck
Borsäure	Fluka
Brij 58	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
Chloroform	Merck
Deoxycholat	Sigma
Dextransulfat	Amersham
DMSO	Roth
Dihydrofuran	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
EGTA	Merck
Eisessig (100% Essigsäure)	Merck
Ethanol absolut (99,8%)	Merck
Ethanol vergällt (96%)	Klinikapotheke
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll 400	Amersham
Formamid (deionisiert)	Merck
Gelatine	Sigma
Glycerin (87%)	Merck
Hefeextrakt	Fluka
Hydrochinon	Sigma
Isoamlyalkohol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
LiChrosolv-H ₂ O	Merck
Magnesiumchlorid	Sigma
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumacetat	Merck
Natronlauge NaOH	Merck
N-Lauryl-Sarcosin	Sigma
Orange G	Sigma
Phenol (H ₂ O-gesättigt)	Appligene Oncor

PEG 8000	Sigma
POP6-Matrix für Sequenzierautomaten	Applied Biosystems
Puffer für Sequenzierautomaten	Applied Biosystems
Salzsäure (32% HCl)	Merck
Sephadex G50	Amersham
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Serva
Spermidin	Sigma
Titriplex III (EDTA)	Merck
Triton X-100	Sigma
Tri-Natrium-Citrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Tris-HCl	USB
Trypton/Pepton	Fluka
Tween 20	Merck
Xylencyanol	Merck
Zinkchlorid	Sigma

2.1.8 Kits

QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Plasmid Mini Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Plasmid Midi/Maxi Kit	QIAGEN
Vectastain Elite ABC Kit	Vectastain
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing	Applied Biosystems
DNA-Polymerization Kit	Amersham

2.1.9 Längenstandards

- 1 kb Ladder (Gibco BRL)
- DNA Molecular Weight Marker V (LS V; Roche)
- MidRange II PFG Marker (New England BioLabs)
- Yeast-Chromosome-Marker (New England BioLabs)

Yeast-Chromosome und MidRange II PFG Marker liegen in Gelform vor und wurden per Deckgläschen in ca. 2 mm dicke Scheiben geschnitten, wovon 1/4 in die Tasche eines PFG geladen wurde. Die anderen Marker wurden mit TE und DNA-Auftragspuffer (orange oder blau) im Verhältniss 1:5:4 verdünnt. Davon wurden 3 μl (= 300 ng; 1 kb Ladder) bzw. 5-20 μl (LS V) geladen.

2.1.10 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurden Standardlösungen nach Sambrook et al. (1989) mit Aqua bidest. angesetzt und je nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert. Danach wurde der pH-Wert laut Vorschrift eingestellt. Gelagert wurden die Lösungen und Puffer bei Raumtemperatur, wenn nicht anders vermerkt. Für enzymatische Reaktionen wurden die entsprechenden Puffer der Hersteller verwendet. Häufig verwendete Standardlösungen sind:

- Auftragspuffer (25% Ficoll in 10 mM Tris, pH 7,4; 1 mM EDTA; 1 Spatelspitze Orange G, Bromphenolblau oder Xylencyanol)
- ATP (100 mM; in autoklaviertem Aqua bidest.; -20°C)
- DTT (Dithiothreitol) (1 M; 4°C)
- EC-Lysis (6 mM Tris, pH 7,4; 1 M NaCl; 100 mM EDTA, pH 7,8; 0,5% Brij 58; 0,2% Deoxycholat; 0,5% N-Lauroyl-Sarkosin)
- EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)
- Kaliumchlorid-Lösung (1 M KCl)
- Magnesiumchlorid-Lösung (1 M MgCl₂)
- Natriumacetat (3 M NaOAc, pH 5-5,4)
- Natriumchlorid-Lösung (5 M NaCl)
- Natronlauge (10 M NaOH)
- NDS (0,5 M EDTA, pH 9; nach Autoklavieren 1% N-Lauroyl-Sarkosin)
- Pett IV (10 mM Tris, pH 7,4; 1 M NaCl)
- Proteinase K (10 mg/ml; in autoklaviertem Aqua bidest.; sterilfiltrieren; -20°C)
- RNase A (10 mg/ml; in autoklaviertem Aqua bidest.; -20°C)
- Salzsäure (1 M HCl)
- Tris-HCl (1 M)
- 10x PBS (Gibco BRL)
- 20% SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)
- 20x SSC (3 M Natriumchlorid; 0,3 M Natriumcitrat)
- 10x STE (1 M NaCl; 10 mM Tris, pH 8,3; 10 mM EDTA, pH 8,3; -20°C)
- 50x TAE-Puffer (2 M Tris; 1 M Eisessig; 50 mM EDTA)
- 10x TBE-Puffer (900 mM Tris; 900 mM Borat; 20 mM EDTA; pH 8)
- 1x TE-Puffer (10 mM Tris, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 7,8)
- TTE (0,1% Triton X-100, 20 mM Tris, pH 8,3; 2 mM EDTA, pH 7,8)
- SE-Puffer (75 mM NaCl; 25 mM EDTA, pH 8,0 mit NaOH einstellen)

Spezielle Lösungen und Puffer sind in den entsprechenden Abschnitten des Methodenteils gesondert aufgeführt.

2.1.11 Medien und Lösungen für die Zellkultur

2.1.11.1 Bakterienkultur

LB₀-Medium: 10 g Trypton/Pepton; 5 g Hefeextrakt; 10 g Natriumchlorid auf 1 l Aqua dest.; sofort autoklavieren; für LB₀-Agar 1 l Medium mit 20 g Agar versetzen, dann autoklavieren

SOC-Medium: 20 g Trypton/Pepton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g Natriumchlorid; 10 ml Kaliumchlorid (250 mM); 0,2 ml Natronlauge (5 N); 5 ml Magnesiumdichlorid (2 M) und 20 ml Glukose (1 M) nach dem autoklavieren zugeben

2xYT-Medium: 17 g Trypton/Pepton; 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 l Aqua dest.; mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und sofort autoklavieren; für LB₀-Agar 1 l Medium mit 20 g Agar versetzen, dann autoklavieren

Brain-Heart-Infusion: BHI (Difco Laboratories) wurde nach Angaben des Herstellers verwendet

Folgende Zusätze wurden erst nach dem Autoklavieren der Medien nach Abkühlung auf ca. 60°C zugesetzt. Stocklösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

- Ampicillin (Sigma; Stock: 50 mg/ml; Arbeitskonzentration: 100 µg/ml)
- Chloramphenicol (Sigma; Stock: 84 mg/ml in Ethanol abs.; Arbeitskonzentration: 84 µg/ml)
- DL- α , ϵ -Diaminopimelinsäure (dap) (Sigma; Stock: 100 mM; Arbeitskonzentration: 0,5 mM)
- Glukose (Merck; Stock: 1 M; Arbeitskonzentration: 20 mM)
- IPTG (Sigma; Stock: 25 mg/ml; Arbeitskonzentration: 50 µg/ml)
- Kanamycin (Sigma; Stock: 30 mg/ml; Arbeitskonzentration: 30 µg/ml)
- Spectinomycin (Sigma; Stock: 25 mg/ml; Arbeitskonzentration: 25 µg/ml)
- X-Gal (Sigma; Stock: 40 mg/ml in Dihydrofuran; Arbeitskonzentration: 40 µg/ml)

2.1.11.2 Eukaryotische Zellkultur

Sofern nicht anders vermerkt wurden alle Medien und Lösungen bei 4°C gelagert. Fötales Rinder Serum (FCS) wurde vor Gebrauch auf 37°C erwärmt und dann 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Die Medien wurden mit 10% des inaktivierten FCS und 1-2 Vol% PenStrept versetzt. Ausserdem wurden verwendet:

Produkt	Hersteller
Aminopterin	Sigma
Blasticidin-S Hydrochlorid (4 mg/ml in Aqua bidest.; -20°C)	ICN
Colcemid	Roche
DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle Medium)	Gibco BRL
FCS (-80°C bzw. -20°C nach Hitzeinaktivierung)	Biochrom, PAA
Gentamycin (Arbeitskonzentration: 20-50 µg/ml)	Gibco-BRL
HT-Supplement (50x)	Gibco BRL
HAT-Supplement (50x) (-20°C)	Gibco BRL
Hypoxanthin	Sigma
LipofectAMINE Reagent™	Gibco BRL
L-Mimosine (4°C)	Sigma
MEM (Minimal Essential Medium; mit Glutamax-I)	Gibco BRL
Neomycin-Sulfat (G418; 50 mg/ml)	Calbiochem
OptiMEM-I (ohne FCS und PenStrept)	Gibco BRL
PBS (Dulbecco's, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ und Natriumbicarbonat;)	Gibco BRL
Pen/Strept (10.000 U/ml; -20°C)	Gibco BRL
Thymidin	Sigma
Trypsin/EDTA (in HBBS, -20°C)	Gibco BRL

2.1.12 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Schütt
Brutschrank Bakterienkultur	National Appliance
Brutschrank eukaryotische Zellkultur (CO ₂ -begasbar;)	Hereus
CCD-Kamera „Cell Cam Color-TWAIN“	Klughammer; Phase
Elektroporationsapparat „Gene Pulser II“	BioRad
Elektrophoresekammern	BioRad und Hauswerkstatt
Elektroelutionssystem „BioTrap BT1000“	Schleicher & Schuell
Heizblock	Liebisch
Kamera Gelphotos „EASY 429K“	Herolab

Kolbenhubpipetten 2, 20, 200, 1.000 µl	Gilson
Mikroinjektionsgerät „transjector 5246“	Eppendorf
Mikroinjektion Steuergerät „micromanipulator 5171“	Eppendorf
Mikroinjektion Steuergerät „injectman“	Eppendorf
Mikroskop „Axiovert 25“ mit Fluoreszenzapparatur	Zeiss
Mikroskop „Axiovert 10“ mit Fluoreszenzapparatur	Zeiss
PCR-Maschine „DNA Engine“	Biozym
PFG- Elektrophorese Kammer Interlock + Pumpe	BioRad
PFG-Control Module „CHEF-DR II“	BioRad
PFG-Drive Module „CHEF-DR II“	BioRad
pH-Meter „pH 530“	WTW
Schüttler für Bakterienkultur „Unitron“	Infors HT
Schwenkbecherzentrifuge „Rotixa/RP“ (gekühlt)	Hettich
Sequenzierapparat ABI PRISM™-System 3100	Applied Biosystems
Sterilbank Bakterienkultur	BDK
Sterilbank Zellkultur	BDK
Tischzentrifuge „Mikro 12-24“ (gekühlt)	Hettich
UV-Transilluminator „UVT-20 S/M“	Herolab
Vortex „REAX 2000“	Heidolph
Waagen „AC100“ und „P1210“	Mettler
Wasserbad „T/MA6“ und „RMS/RM6“	Lauda
Wasserbad Zellkultur	GFL
Zählkammer	Neubauer
Zentrifuge „J-21B“, gekühlt	Beckman

2.1.13 Verbrauchsmaterial

1-Kammer-Objektträger	Falkon
6-well Schalen	Falkon
Blott-Membran „Biodyne B“	PALL
Cryotubes (1,8 ml)	Nunc
Elektroelutionsmembranen „BT1“ und „BT2“	Schleicher und Schuell
Gelblöckchenform (CHEF; Dispolable Plug Mold)	BioRad
Kloniererringe aus Glas (5 mm)	Scienceware; BioRad
Küvetten für Elektroporation (1 und 2 mm)	BioRad
Mikrotiterplatten (96-well)	Biozym
Mikroinjektionsspitzen „Femtotips II“	Eppendorf
Mikroreaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Sarstedt; Eppendorf
Mikroreaktionsgefäße mit Schraubdeckel (1,5 ml)	Sarstedt
Pasteur-Pipetten	Volac
Petrishalen (2 und 10 cm)	Greiner
Pipettenspitzen (gelb, blau)	Sarstedt
Pipettenspitzen (weiss)	Biozym
Plastik Pipetten (5, 10 und 25 ml)	Sarstedt
Röhrchen Zellkultur (15 und 50 ml)	Falkon
Röhrchen (14 ml; 15 und 50 ml)	Greiner; Sarstedt
Sterilfilter (0,20 µm)	Sartorius
Transferpipetten Plastik (3 ml)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (12 ml)	Nunc
Zellkulturschalen (10 cm)	Falkon
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm ²)	Falkon

2.2 Methoden

2.2.1 Prokaryotische Zellkultur

Die Anzucht von *E.coli* in Flüssigkultur (5 ml bis 2 l) erfolgte im Rotationsschüttler bei 37°C und 220-260 U/min über Nacht. Kulturen auf festem Nährboden wurden bei 37°C über Nacht in einem Inkubator angezogen. Zur dauerhaften Konservierung wurden 0,5 ml Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an 87% -igem, sterilem Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

2.2.2 Eukaryotische Zellkultur

Kultivierung

HT1080 Zellen und primäre Fibroblasten wurden in DMEM-Medium kultiviert, 16HBE14o- Zellen in MEM-Medium. Supplementiert wurden beide Medien mit 10% FCS und 1-2% PenStrept. Die Zellen wurden bei 37°C, 10% CO₂ und 80% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Abhängig vom Zellwachstum erfolgte in Abständen von 1-3 Tagen ein Austausch des Mediums bzw. ein Umsetzen (Splitten) der Zellen. Dazu wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen und mit Trypsin (ca. 0,5-1 ml bei T25-Zellkulturflaschen (25 cm²) und 2 ml bei T75-Zellkulturflaschen (75 cm²)) für ca. 5-10 min inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen (Kontrolle unter dem Inversionsmikroskop) wurde das Trypsin durch Zugabe von Medium (5 ml bei T25 bzw. 10 ml bei T75) inaktiviert. Je nach Zelltyp und Anwendung wurden 0,5 bis 2 ml des Ansatzes in eine neue Zellkulturflasche mit Medium überführt.

Zellen einfrieren

Einfriermedium:	10 ml DMEM/MEM, 20% FCS, 20% DMSO (sterilfiltriert)
-----------------	---

Nach Anreicherung der Zellen in einer großen Kulturflasche (T75) wurden die Zellen wie oben beschrieben gesplittet und der Ansatz in ein 50 ml Falcon übergeführt. Nach Zentrifugation (10 min, 1.200 rpm) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet mit 2 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryotube überführt. Nach Lagerung bei -70°C für 2 Tage wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C) endgelagert.

Zellen auftauen

Die Reaktivierung eingefrorener Zellen erfolgte durch rasches Auftauen bei 37°C und Resuspension in 5 ml Medium. Die Zellen wurden zuerst in T25 Kulturflaschen ausgesät und später, bei Bedarf, in größere Kulturflaschen überführt.

Fixieren der Zellen für die Immunfärbung

Um Zellen für Immunfärbung-Analysen zu Fixieren, wurde das Medium abgegossen und die Zellen 3 x in PBS-Puffer bei RT gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit 4% Paraformaldehyd bei 4°C für 30 min. Die Präparate wurden dann entweder direkt gelabelt oder bei 4°C in PBS für längere Zeit gelagert.

2.2.3 Isolierungs- und Präparationstechniken für Nukleinsäuren

2.2.3.1 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien

Präparative Plasmidisolierung nach alkalischer Lyse

Plasmide, welche für Sequenzierung, Klonierung oder Mikroinjektion verwendet werden sollten, wurden mit dem QUIAprep-Spin-Kit („Mini“, „Midi“ oder „Maxi“), entsprechend dem Kulturvolumen, nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt und mittels Agarosegel auf Integrität, Konzentration und Reinheit überprüft. Je nach benötigter Plasmidmenge wurden dazu 5 ml bis 2 l Bakterienkultur über Nacht angezogen.

Schnellpräparation von Plasmid-DNA für Kolonie-PCR

Um Bakterienkolonien auf Agarplatten schnell mittels PCR auf Anwesenheit eines bestimmten DNA Fragments zu testen, wurden die Klone mit einer steriler Impföse abgenommen und in 25µl TTE-Puffer resuspendiert. Der Ansatz wurde dann 10 min bei 95°C inkubiert und die Zelltrümmer bei 13.000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 1-3 µl in eine PCR eingesetzt.

2.2.3.2 DNA Isolierung aus Zelllinien

Nach Trypsinierung und Zentrifugation der Zellen wurde das Pellet kurz mit PBS gewaschen und dann mit 2 ml SE-Puffer, nach Zugabe von 12 µl Pronase E (Sigma; 20 mg/ml) und 100 µl SDS (20%) über Nacht bei 37°C proteolytisch aufgeschlossen. Die Proteinfällung erfolgte durch Zugabe von 0,8 ml 5 M NaCl, intensivem mischen und Zentrifugation bei 3000 U/min für 15 min bei RT. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und die darin enthaltene DNA mit 2 Volumen Ethanol absolut (-20°C) gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol (-20°C) und Trocknung an der Luft, wurde die DNA in 20-100 µl TE-Puffer (pH 8) gelöst und bei 4°C gelagert. Zur Ermittlung der DNA Konzentration wurden 1 und 5 µl einer 1:10 Verdünnung auf einem 1% -igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidium-Bromid gefärbt. Durch

Fluoreszenzvergleich mit der 1 kb Bande des 1 kb Längenstandards, welche bei einem Auftragsvolumen von 3 μ l genau 3 ng DNA entspricht, ist eine Abschätzung der DNA-Konzentration möglich.

2.2.4 Gelelektrophorese

Für die horizontale Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von genomischer DNA, PCR-Produkten und Plasmiden wurden 0,7-3% -ige Agarosegele (in 1x TBE) von 6–10 mm Geldicke mit 0,2 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt und in 1x TBE-Puffer bei 2-5 V/cm Elektrodenabstand betrieben. Ein mitgeführter Längenstandard (1 kb oder LS V) diene zur Interpretation der Ergebnisse. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte unter einem UV-Transilluminator bei 300 nm Wellenlänge. DNA Fragmente zwischen 20-100 bp (z.B. ds-DNA Fragmente aus einzelsträngigen Oligonukleotiden oder sehr kurze PCR-Produkte) wurden in einem 1+3% - igem Gel (1 Teil Agarose + 3 Teile LMP-Agarose) aufgetrennt.

2.2.5 FISH Protokoll

Es wurde folgendes FISH Protokoll aus dem Labor von Michael Speicher (Jentsch, 2003) verwendet.

2.2.5.1 Chromosomenpräparation: Herstellung von Metaphasenpräparaten

Colcemid-Behandlung

Zur Anreicherung von Metaphasen in der Zellkultur wurde das Spindelgift Colcemid verwendet, welches eine Depolymerisation der Microtubuli verursacht und damit eine Trennung der Metaphasenchromosomen blockiert. Das Medium wird mit ca. 0,6–0,7 μ g Colcemid pro ml Medium versetzt. Nach 2–12 h Inkubation bei 37°C können die Zellen trypsinisiert werden. Je nach Inkubationsdauer befinden sich bis zu 50% aller Zellen im Metaphase-Block.

Trypsin-Behandlung

Nach Abschütten des Mediums werden die Zellen kurz in PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin (2 ml bei T75 und 0,5 ml bei T25 Flaschen) vom Boden der Gewebekulturflaschen gelöst. Alternativ können die Metaphase-Zellen auch ohne Trypsinieren, durch kräftiges schütteln der Gewebekulturflasche („shake-off“), isoliert werden. Nach Ablösen der Zellen (Kontrolle am inversen Mikroskop) wurde das Trypsin durch Zugabe von 5–8 ml Medium inaktiviert. Die Zellen wurden in ein 15 ml Falkonröhrchen überführt, bei 1.200 U/min abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt.

Hypotone Behandlung

Um das Aufplatzen der Zellkerne beim Auftropfen zu erleichtern, wurden die Zellen einer hypertonischen Behandlung („quellen“) unterzogen:

- Pellet mit Pasteurpipette kurz resuspendieren
- 8 ml Natriumcitrat (0,8% in H₂O, auf 37°C vorgewärmt) vorsichtig zugeben, resuspendieren und mit Glaspipette in ein 15 ml Falconröhrchen überführen
- 40 min im 37°C Wasserbad inkubieren und dann bei 1.200 U/min zentrifugieren
- Überstand bis auf ca. 1 ml absaugen

Fixierung

Die vorbehandelten Zellen wurden mit –20°C vorgekühltem Fixativ (75 ml Methanol + 25 ml Eissessig) fixiert:

- Ca. 1 ml Fixativ (-20°C) zugeben und vorsichtig mit einer Pasteurpipette resuspendieren
- Auf 8 ml mit Fixativ auffüllen, mischen und bei 1200 U/min zentrifugieren
- Überstand bis auf ca. 1 ml absaugen und Pellet erneut resuspendieren.
- Mit frischem Fixativ auf 8 ml auffüllen und diesen Vorgang 3-4 mal wiederholen
- Nach dem letzten Waschschrift nur soviel Fixativ zugeben (ca. 0,5-1 ml) bis der Ansatz „milchig“ erscheint.

Auftropfen und Lagerung

Der Ansatz wird mit einer Pasteurpipette auf H₂O-benetzte Objektträger aufgetropft (aus ca. 30-50 cm Höhe), wobei die Metaphasen-Zellkerne platzen und die kondensierten Chromosomen auf dem Objektträger fixiert werden. Die Objektträger wurden zuvor über Nacht in 100% Ethanol gewaschen und anschliessend in Aqua bidest. auf Eis inkubiert. Nach dem Auftropfen werden die Objektträger luftgetrocknet.

Vor der Hybridisierung ist es ratsam, die Chromosomenpräparate durch 3-4 tägige Lagerung bei RT und anschliessender Inkubation in 70% Ethanol bei 4°C altern zu lassen. Wenn die Präparate für längere Zeit gelagert werden sollten wurden sie in 70% Ethanol bei 4°C aufbewahrt und die Küvette mit Parafilm versiegelt. Da nach dem Auftropfen noch unterschiedliche Mengen an RNA und Cytoplasma auf den Objektträgern vorhanden sind welche die Hybridisierung stören können, werden die Chromosomenpräparate einem RNase A und Pepsinverdau unterzogen.

RNase-Behandlung

- Objektträger kurz in 2x SSC aufnehmen
- pro Objektträger 200 µl SSC + 2 µl RNase A (10 ng/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 + 15 mM NaCl), eindeckeln
- 1 h bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren
- 3x 5 min in 2x SSC auf Schüttler bei RT waschen

Pepsin-Behandlung

- Präparate kurz in 2x SSC aufnehmen
- Für ein 50 ml Volumen werden 49,5 ml Aqua bidest + 0,5 ml HCl (1 N) + 15 µl Pepsin (Stocklösung: 10% Pepsin, Boehringer Mannheim, in 0,01 M HCl pH 2,3) bei 37°C vorgewärmt.
- Je nach Cytoplasma-Anteil der Präparate werden diese 45 sec bis 5 min im Pepsin-Ansatz bei 37°C inkubiert.
- 2 x 5 min in 1 x PBS bei RT auf Schüttler waschen.
- In aufsteigender Ethanolreihe (4°C; 70, 90 und 100%) je 3 min inkubieren.
- Präparate lufttrocknen und unter dem Mikroskop den Erfolg der Vorbehandlung kontrollieren

Denaturierung der Objektträger

Bevor die Chromosomenpräparate hybridisiert werden können, muss die DNA mit Hilfe von Formamid denaturiert werden.

- Für einen 50 ml Ansatz Denaturierungslösung werden 35 ml Formamid in 15 ml 2x SSC (pH 7,0) eingestellt
- Die Präparate werden für 2 min bei 72°C in der vorgewärmten Lösung (72°C) denaturiert.
- Dehydrierung in aufsteigenden Ethanolreihe (70, 90 und 100%) je 3 min und Lufttrocknung

2.2.5.2 PCR-Amplifikation der DNA-Pools

Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten FISH-Sonden, die Art der Amplifikation des DNA-Pools, die Art ihrer Markierung sowie deren Nachweis.

Sonde	Amplifikation des DNA Pool (Primer)	Markierung:	Nachweis:
CFTR	Inter-Alu-PCR (CL1/CL2)	Cy5-dUTP	Direkt
HGPRT	Inter-Alu-PCR (CL1/CL2)	Cy5-dUTP	Direkt
cen5 F ₁	PCR (5IIF/R)	Digoxigenin-11-dUTP	Sheep-Anti-Dig-FITC
cen5 E ₁	PCR (5IF/R)	Digoxigenin-11-dUTP	Sheep-Anti-Dig-FITC
cen17	PCR (17-1A/2A)	Digoxigenin-11-dUTP	Sheep-Anti-Dig-FITC
E.coli	DNA-Präparation	Nicktranslation mit Biotin	Avidin-Cy3.5
RsF-Vektor	PCR (RsF)	Biotin-16-dUTP	Avidin-Cy3.5

Für die Amplifikation der DNA-Pools wurden verschiedene PCR Ansätze gewählt:

CFTR- und HGPRT-Sonde:

Um Sonden für das CFTR- bzw. HGPRT-Gen zu generieren wurde eine inter-Alu-PCR mit dem Primerpaar CL1/CL2 (50°C) durchgeführt. Als Ausgangs-DNA dienten die PAC Konstrukte CGT21 (CFTR) und pTHT₂₂ (HGPRT), welche jeweils genomische DNA der entsprechenden Gene tragen. Der inter-Alu-PCR Ansatz amplifiziert DNA Fragmente zwischen Alu Sequenzen („Alu repeats“). „Alu repeats“ sind ca. 300 bp lange Sequenzen, die relativ gleichmässig über die nichtkodierenden Bereiche des gesamten menschlichen Genoms verteilt sind und ca. 5-

10% der menschlichen DNA darstellen. Die PCR Produkte wurden über QIAGEN-Säulen gereinigt und in die Labeling-PCR eingesetzt.

Zentromer-Sonden Chr.5 und Chr.17:

Um spezifische Sonden der Zentromere von Chromosom 17 und 5 zu synthetisieren wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden 17-1A/17-2A, 5IF/5IR und 5IIF/5IIR (alle 60°C) durchgeführt. Als Template dienten die PAC Konstrukte B₂T₈ (enthält ca. 190 kb eines α-sat Arrays von Chr.17), „E₁“ (enthält ca. 116 kb des α-sat Arrays Typ I von Chr.5) und „F₁“ (enthält ca. 125 kb des α-sat Arrays Typ II von Chr.5). Da die verwendeten Primer für die jeweilige α-sat-Familie spezifisch sind und Arrays verschiedener Chromosomen oft nur 60-90% Sequenzhomologie aufweisen, können Sonden erzeugt werden, welche nur geringe Kreuzhybridisierung mit anderen α-sat Repeats zeigen. Die PCR-Produkte wurden über QIAGEN-Säulen gereinigt und in die Labeling-PCR eingesetzt.

Vektor-Sonde:

Die Sonde zum Nachweis des pTAT Vektors wurde durch eine PCR mit dem Oligonukleotid RsF (60°C) aus pTAT-Bs generiert. Das PCR-Produkt von ca. 3,15 kb Länge wurde über QIAGEN-Säulen gereinigt und in die Labeling-PCR eingesetzt. Die PCRs wurden in einem Volumen von 50 µl angesetzt. Für jeden Ansatz wurde eine negativ Kontrolle (ohne DNA) mitgeführt. Die PCR Produkte wurden nach der QIAGEN Reinigung auf einem 1% -igen Agarosegel kontrolliert. Das Pipettierschema lautet wie folgt:

Stocklösung	Menge in µl	Endkonzentration
DNA-Pool	1	
10x PCR Puffer	5	1x
50 mM MgCl ₂	2	2 mM
5 mM dNTP's	2	0,2 mM
100 µM Primer F	1	2 µM
100 µM Primer R	1	2 µM
Taq-Polymerase	0,3	1,5 U
Aqua bidest.	37,7	

Die Bedingungen der PCR waren wie folgt:

	Amplifikation	Markierung
94°C	3 min	3 min
94°C	1 min	1 min
50°C / 60°C	1 min	1 min
72°C	4 min	6 min
35 Zyklen		
72°C	10 min	10 min

2.2.5.3 Markieren der Sonden mittels Labeling-PCR

Die amplifizierten DNA-Pools wurden in dieser PCR mit den entsprechenden Fluorochromen markiert. Die Gen-Sonden CFTR und HGPRT wurden mit Cy5 bzw. Cy3.5 direkt gelabelt, die anderen Pools wurden mit Haptenen (Digoxigenin, Biotin) markiert, was einen gesonderten Nachweis mit gelabelten Antikörpern bzw. gelabeltem Avidin erforderte. Für die verschiedenen Fluorochrome wurden unterschiedliche Pipettierschemata optimiert. So sind die Schemata für Digoxigenin und Cy5 identisch, Biotin ist gesondert aufgeführt. Die Primer sind mit denen der vorhergehenden PCR identisch. Für einen 50 µl Ansatz lauten die Schemata wie folgt:

Digoxigenin / Cy5

Stocklösung	Menge in µl	Endkonzentration
10x PCR Puffer	5	1x
50 mM MgCl ₂	2	2 mM
5 mM AGC-Mix	2	0,2 mM
5 mM dTTP	1	0,1 mM
1 mM Dig / Cy5	5	0,1 mM
100 µM Primer F	1	2 µM
100 µM Primer R	1	2 µM
Aqua bidest.	30,6	
Taq-Polymerase	0,4	1U
DNA-Pool	2	

Biotin

Stocklösung	Menge in µl	Endkonzentration
10x PCR Puffer	5	1x
50 mM MgCl ₂	2	2 mM
5 mM AGC-Mix	2	0,2 mM
5 mM dTTP	1,5	0,15 mM
1 mM Bio	2,5	0,05 mM
100 µM Primer F	1	2 µM
100 µM Primer R	1	2 µM
Aqua bidest.	32,6	
Taq-Polymerase	0,4	1U
DNA-Pool	2	

Das Programm der Labeling-PCR ist mit dem der Pool-PCR identisch, bis auf die um 2 min verlängerte Syntheszeit (6 min). Die PCR-Produkte wurden auf einem 1% -igen Agarosegel aufgetrennt.

2.2.5.4 Markieren der Sonden mittels Nicktranslation

Um ein Sonde aus *E.coli* DNA zu generieren, wurde genomische *E.coli* DNA aus 100 ml LB₀-Kultur nach der Methode von Jones und Bartlet (Sambrook, 1989) präpariert und durch Nicktranslation mit Biotin markiert.

Stocklösung	Menge in μl
10x NT Puffer	5
5 mM dAGC-Mix	5
0,1 M β -Mercaptoethanol	5
1 mM Biotin-16-dUTP	1
DNA-Polymerase I	1
DNase (1:10.000)	5
DNA	20
Aqua bidest.	8

2.2.5.5 DNase I Verdau

Für optimale Hybridisierungsergebnisse sollte die Länge der Sonden 3 kb nicht überschreiten. Besonders bei Verwendung von Alu-Primern entstehen jedoch häufig längere Fragmente. Diese wurden durch DNase Behandlung auf eine Länge von 200–800 bp gespalten. Die Menge an DNase I und die Dauer des Verdaus wurde anhand des Gelbildes aus der Labeling-PCR sowie aus Erfahrungswerten bestimmt. Die PCR Produkte wurden in

- 5 μl 10x Nicktranslationspuffer
- 8-15 μl 1:1000 verdünnte DNase I
- ad 50 μl Aqua bidest.

für ca. 1-2 h in bei 15°C (Wasserbad) inkubiert. Danach wurde 1/10 Volumen auf einem 1% -igen Agarosegel aufgetrennt, um die Länge der Fragmente zu überprüfen. Während des Gellaufs wurde der Ansatz auf Eis gestellt. Wenn die Fragmente noch nicht die erwartete Länge zeigten konnte nachverdaut werden, bei Erreichen der optimalen Länge wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μl 0,5 M EDTA (10 min, 65°C) gestoppt.

2.2.5.6 Fällung

Die DNA Fragmente wurden in Anwesenheit von Cot-1 (nur bei CFTR- und HGPRT-Sonde) und Salmon-Testis DNA mit 1/10 Volumen Natriumacetat und 2,5-fachem Volumen Ethanol (100%) über Nacht bei –20°C gefällt. Nach der Fällung wurde der Mix für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen (10 min; 13.000 rpm) und luftgetrocknet.

Ansatz	DNA in μl	Cot-1 DNA in μl	Lachs-Testis- DNA in μl	Σ in μl	3 M NaOAc in μl	100% Ethanol in μl
mit Cot-1	50	50	2	102	10,2	280
ohne Cot-1	50	-	2	52	5,2	143

2.2.5.7 Hybridisierung

Mastermix: 40% Dextransulfat in 4x SSC

Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 10 μl deionisiertem Formamid bei 37°C auf dem Schüttler für ca. 0,5-1 h gelöst. In dieser Form sind die markierten Sonden lange bei -20°C haltbar, so dass man diesen Mix einfrieren und nach Bedarf die benötigte Menge für eine Hybridisierung herauspipettieren kann.

Zu dem Formamid-Ansatz pipettiert man das gleiche Volumen an Mastermix, denaturiert den Ansatz bei 75°C für 7 min und lässt ihn 30 min bei 37°C vorhybridisieren.

Der Hybridisierungsmix wird dann auf ein denaturiertes Chromosomenpräparat (siehe oben) luftblasenfrei aufgetragen, mit einem passenden Deckglas versehen und mit Fixogum zum Schutz vor Austrocknung luftdicht verschlossen. Je nach Anzahl und Lage der Metaphasen kann man sich für verschiedene Hybridisierungsfeldgrößen entscheiden. So benötigt man für ein 15x15 mm Deckglas 8 μl Hybridisierungsmix und für den gesamten Objektträger 20 μl Hybridisierungsmix. Hybridisiert wird zwischen 1-3 Tagen in einer Hybridisierungsbox bei 37°C.

2.2.5.8 Nachweis

Bei diesem Schritt werden Digoxygenin und Biotin mit den Fluorochromen FITC und Cy3.5 nachgewiesen. Das Deckglas wird entfernt, dann

- | | |
|--|-------------------|
| 1) <u>4x SSC / 0,2% Tween-20</u>
42°C Wasserbad | 3 x 5 min waschen |
| 2) <u>1x SSC</u>
60°C Wasserbad | 3 x 5 min waschen |
| 3) <u>4x SSC / 0,2% Tween-20</u>
42°C Wasserbad | kurz eintauchen |

- | | |
|---|--|
| 4) <u>Blocking Lösung (3% BSA)</u>
5 ml 4x SSC / 0,2% Tween-20 / 150 mg BSA | 1 ml pro Slide 30 min
feuchte Kammer 37°C |
| 5) <u>4x SSC /0,2% Tween-20</u>
45°C Wasserbad | kurz eintauchen |
| 6) <u>Antikörper Stammlösung (1% BSA)</u>
4 ml 4x SSC / 0,2% Tween-20 / 50 mg BSA
Antikörper in entsprechender Verdünnung | 45 min, feuchte Kammer 37°C |
| 7) <u>4 x SSC / 0,2%Tween-20</u>
42°C Wasserbad | 3 x 5 min waschen |
| 8) <u>DAPI</u>
1 µl DAPI in 10 ml 4x SSC / 0,2% Tween-20 | 3 min bei RT |
| 9) <u>Antifade</u>
mit Aqua dest. abspülen, lufttrocknen und mit 35 µl Antifade eindeckeln | |

Bei direkt markierten Sonden werden die Schritte 3) bis 7) übersprungen. Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

- Avidin-Cy3.5 (1:300)
- Sheep-anti-dig-FITC (1:150)

2.2.5.9 Auswertung der Metaphasen

Die hybridisierten Objektträger wurden mit einem Leica Mikroskop, welches an eine CCD-Kamera angeschlossen war, analysiert. Mikroskop und Kamera wurden über die Software „Leica Q-FISH“ gesteuert. Pro Zelllinie wurden mindestens 15 Metaphasen aufgenommen und ausgewertet, falls nicht anders vermerkt.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

2.2.6.1 Standard-PCR

Amplifikation von DNA mithilfe der Standard-PCR erfolgte nach der Methode von Saiki et al. (1988). Die Reaktionsansätze variierten abhängig von der verwendeten Ausgangs-DNA (genomische DNA, cDNA, Plasmid DNA, PCR-Produkte). Die DNA-Oligonukleotide (Primer)

wurden von Dr. Arnold (Genzentrum, LMU-München) synthetisiert und lyophilisiert (40 nmol/μl) geliefert. Diese wurden in 50 μl TE gelöst. Davon wurde eine 1:10 Verdünnung (80 pmol/μl) in TE hergestellt, wovon 0,5-1 μl in einen 50μl PCR-Ansatz (dNTPs, 2 mM; Taq-Polymerase, 5U/μl; DNA, 50-200 ng) eingesetzt wurde, falls nicht anders aufgeführt. Die eigentliche PCR-Reaktion erfolgte in 0,5 ml Reaktionsgefäßen in einem programmierbaren Thermocycler „DNA Engine“ unter folgenden Bedingungen:

1. initiale Denaturierung	94°C	5 min
2. Denaturierung	94°C	15-60 sec
3. Primeranlagerung	48-60°C	30-60 sec
4. Synthese	72°C	30 sec–6 min
5. Wiederholung der Schritte 2-4	in 10-34 Zyklen	
6. finale Elongation	72°C	5 min

Das PCR-Reaktionsprogramm umfasste zwischen 10 und 35 Zyklen, wobei die PCR-Variablen wie Temperatur und Zeit der Primer-DNA-Anlagerung in Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung und Länge der jeweiligen Primer, und die DNA-Synthesezeit (4. Schritt) je nach Größe des zu amplifizierenden PCR-Produkts optimiert wurden. Für jede PCR Reaktion wurde eine negativ Kontrolle (ohne DNA) mitgeführt.

2.2.6.2 Reinigung von PCR-Produkten

Um die amplifizierten Fragmente aus der PCR-Reaktion für eine nachfolgende Sequenzierung oder Klonierung (von Puffer, Nukleotiden und Primern) zu reinigen, wurde eine PCR-Reinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Entstanden bei einer PCR mehrere Banden, wurde die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben gereinigt.

2.2.7 DNA-Sequenzierung

Sequenzreaktion

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode. In die Sequenzreaktion wurden 50-100 ng gereinigtes PCR-Produkt bzw. 0,4-2 μg Plasmid-DNA eingesetzt. Zur doppelsträngigen DNA-Matrize wurden 2 μl BigDye™ Terminator Mix, 16 pmol Primer und ddH₂O bis auf ein Gesamtvolumen von 10 μl zugegeben. Der Sequenzansatz wurde für Vorwärts- (F) und Rückwärts- (R) Primer jeweils getrennt angesetzt. Bei PCR-Fragmenten wurden die zur Amplifikation verwendeten Primer oder nested Primer in die Sequenzreaktion eingesetzt. Die Sequenzreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 94°C 30 sec
2. 50°C 15 sec
3. 60°C 4 min
4. Wiederholung der Schritte 1.-3. in 25 Zyklen

Fällung der Sequenzierungsprodukte

Nach Beendigung der zyklischen Sequenzierungsreaktion wurden die Reaktionsprodukte ausgefällt. Zu 10 µl Sequenzreaktionsansatz wurden 25 µl Ethanol absolut zugegeben, 15 min bei RT inkubiert und 30 min bei RT zentrifugiert (13.000 rpm). Nach einem Waschschrift mit 125 µl 70% -igem Ethanol (10 min, RT, 13.000 rpm) wurde die präzipitierte DNA bei RT luftgetrocknet und in 25-80 µl LiChrosolv-H₂O (Merck) gelöst.

Sequenzanalyse

Die automatisierte Sequenzbestimmung wurde auf dem Sequenziergerät ABI PRISM™-System 3100 (Applied Biosystems) mit POP6-Matrix (Applied Biosystems) nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Je 25 µl der gereinigten DNA-Sequenzreaktion wurden auf die Sequenzplatte auftragen. Die Laufzeit für einen Lauf (16 Sequenzen) beträgt je nach Kapillarlänge (35 oder 50 cm) 1,5-2,5 h. Die Sequenzrohdaten wurden mit dem Softwarepaket 3100 Data Collection Software Version 1.1 erfasst und im „Staden Package“ als Elektropherogramm dargestellt und analysiert.

2.2.8 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.8.1 Restriktionsendonukleasespaltung

Zur Spaltung oder Kartierung von DNA Konstrukten wurde 1-5 µg DNA mit 2-5 U Restriktionsendonuklease in 1x Restriktionspuffer (je nach Enzym) verdaut. Meist wurde der Ansatz in 20 µl Gesamtvolumen bei der enzymespezifischen, vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur für 1-6 h inkubiert. Die Restriktionsspaltung wurde auf einem Agarosegel kontrolliert.

2.2.8.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um Religierung von Plasmidvektoren bei Klonierungen zu minimieren, wurde der gespaltene Vektor mit alkalischer Phosphatase (AP) am 5'-Ende dephosphoryliert:

Vektor DNA	100 µl
10x AP Puffer	20 µl
AP	2 µl
ddH ₂ O	78 µl

Der Ansatz wurde 10 min (mild) bis 30 min (stark) bei 37°C inkubiert und mit 2,5 Vol% SDS (20%) und 1/10 Vol. STE-Puffer (10x) für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Anschliessend wurde der Ansatz mit Phenol/Chloroform gereinigt, mit Ethanol (100%) gefällt und luftgetrocknet. Nach Aufnahme in 20-50 µl TE und Kontrolle auf einem Agarosegel (1/10 Vol) konnte die DNA weiter verarbeitet werden.

2.2.8.3 Phosphorylierung von 5'-Hydroxyl-Enden

Bei Klonierungen von Oligonukleotiden, welche unphosphorylierte 5'-Enden trugen (z.B. bei Erzeugung eines ds-Oligos aus zwei ss-Oligos), war es nötig die Enden mittels Polynukleotid Kinase (PNK) zu phosphorylieren.

ds-Oligo	10 µl
10x PNK Puffer	3 µl
ATP (100 mM)	1 µl
Polynukleotid Kinase	1 µl
ddH ₂ O	16 µl

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert, 5 min bei 65°C hitzeinaktiviert und bis zur Ligierung auf Eis gelagert.

2.2.8.4 Erzeugung von „stumpfen“ Enden („blunt ends“) mittels S1-Nuklease

Das Enzym S1 Nuklease ist eine Endonuklease, welche die spezifische Degradierung von einzelsträngiger DNA zu 5'-Mononukleotiden katalysiert. Sie wurde verwendet um einzelsträngige DNA Überhänge nach Restriktionsspaltungen abzdauen (Erzeugung von „blunt ends“). Dazu wurde die DNA mit 1 U S1 Nuklease in 1x Nuklease-Puffer in Anwesenheit von 1 mM Zinksulfat für 1-5 min bei RT inkubiert. Inaktiviert und gereinigt wurde der Ansatz durch Zugabe von 100 mM EDTA und anschliessender Phenolisierung/Ethanol-fällung.

2.2.8.5 Ligierung

Das Enzym T4-Ligase katalysiert die Verknüpfung benachbarter freier DNA-Enden. Da die Aktivität von T4-Ligase durch hohe Salzkonzentrationen gehemmt wird, wurde die DNA vor der Ligierung mittels Phenolisierung und Ethanol-fällung gereinigt. DNA-Fragmente mit glatten („blunt“) bzw. überstehenden („sticky“) Enden wurden mit 1 U T4-Ligase in 1x Ligationspuffer über Nacht inkubiert. Die Ligierung von überhängenden Enden erfolgte bei 4-12°C, glatte Enden wurden bei 15-25°C ligiert. Für jede Ligierung wurde eine negativ Kontrolle (ohne T4-Ligase) mitgeführt. 1/10 Vol. des Ligierungsansatzes wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt,

um das Ausmass der Ligierung durch Abschätzen der relativen Fluoreszenzintensität der Gelbanden von Substrat und Reaktionsprodukt zu bestimmen.

2.2.9 Klonierung

Der gespaltene Vektor wurde dephosphoryliert, mittels Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt. Per Gelelektrophorese wurde die Menge und Integrität des Vektors bestimmt. Vektor und Insert wurden im Verhältniss 1:3 über Nacht ligiert und per Elektroporation in *E.coli* transformiert. Nach Ausplattieren auf Selektionsagar wurden die Kolonien per PCR analysiert und in einer Übernachtkultur expandiert. Je nach Aufgabenstellung wurden die Plasmide isoliert, sequenziert und weiterverarbeitet.

2.2.9.1 Kompetente Bakterien

Kompetente Bakterienzellen wurden entweder frisch vom Hersteller bezogen (ElectroMAX DH10B) und laut Vorschrift eingesetzt (für Klonierungen von langer DNA bzw. Klonierungen mit erwarteter geringer Effizienz), oder selbst aus einem Glycerinstock gezogen: 10 µl Glycerinkultur der Bakterienstämme wurden in 6 ml LB-Medium (oder BHI-Medium, im Falle von Transferbakterienstämmen) über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37°C und 250 U/min angezogen. Nach 12 h wurden die Bakterien auf Eis in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefässe überführt und im Kühlraum 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 1 ml eiskaltem Aqua bidest. resuspendiert und 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Die kompetenten Bakterienzellen wurden in Aliquots bei -70°C gelagert (in 10% Glycerin) oder sofort elektroporiert. Die Kontrolle der Effizienz der Kompetenzinduktion erfolgte durch Bestimmung der Transformationsrate nach Transformation von 250 ng bis 1 µg zirkulärer pUC19 Plasmid DNA und führte bei den von Gibco BRL bezogenen DH10B optimalerweise zu 1×10^8 – 1×10^{10} Einzelkolonien. Die Transformationseffizienz der selbst gezogenen, kompetenten Bakterien lag üblicherweise um den Faktor 10^2 - 10^3 niedriger.

2.2.9.2 Transformation mittels Elektroporation

Die Elektroporation von zirkulärer Plasmid DNA bzw. Ligationsansätzen erfolgte mit dem Gene Pulser II bei 1,8 kV, 200 Ω und 25 µF in 1 mm Küvetten. Die Küvetten wurden 10 min auf Eis inkubiert und mit 50 µl eiskaltem Aqua bidest. befüllt. Ein Aliquot der kompetenten Bakterienzellen wurde ca. 5 min auf Eis aufgetaut. Davon wurden sofort 2–20 µl in die Küvette pipettiert, mit 1-5 µl DNA vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Puls wurde der

Ansatz in 1 ml SOC-Medium für 1 h bei 37°C auf dem Rad inkubiert. Zum Ausplattieren auf Selektionsagar wurden die Bakterien abzentrifugiert und in ca. 150 µl LB₀-Medium resuspendiert. Davon wurden dann verschiedenen Mengen (1, 10, 100 µl) auf Selektivagar-platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.10 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

[$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP (370 MBq/ml, 10 mCi/ml, Amersham Pharmacia Biotech)
 BSA (10 mg/ml, Sigma)
 Klenow Fragment, exonukleasefreie DNA-Polymerase (10 U/µl, USB)
 OLB A (oligo labelling buffer): Gemisch aus Lösungen A, B und C im Verhältnis 1:2,5:1,5
 Lösung 0: 1,25 M Tris-HCl (pH 8,0), 125 mM MgCl₂
 Lösung A: 1 ml Lösung 0, 18 µl β-Mercaptoethanol, je 5 µl 0,1 M dCTP, dGTP, dTTP
 Lösung B: 2 M HEPES (Sigma), mit NaOH auf pH 6,6
 Lösung C: Zufallsprimer (5'-pd(N)₆-Oligonukleotide, Amersham Pharmacia Biotech)
 in TE-Puffer pH 7,6; EK 90 OD₂₆₀ U/ml
 Salmon Testis DNA (10 mg/ml, Sigma)
 Sephadex G50 (Amersham Pharmacia Biotech)
 TES-Puffer (pH 7,5): 20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,25% SDS, 0,25% (w/v)
 Bromphenolblau (Sigma)

Die verwendete DNA-Sonde wurde mithilfe der Primerverlängerung („random priming“) und einem modifizierten Protokoll nach Feinberg und Vogelstein (1983) radioaktiv markiert. 10-20 ng der aufgereinigten DNA-Sonde wurden in einem Gesamtvolumen von 32 µl 10 min bei 95°C denaturiert und danach für 10 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl OLB A, 2 µl BSA, 0,4 µl Klenow-Polymerase und 2 µl [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP wurde die Markierungsreaktion für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 100 µl TES-Puffer gestoppt. Die markierte DNA-Sonde wurde über eine Sephadex G50-Säule durch Zentrifugation (10 min, 2.000 U/min) von freien Nukleotiden getrennt. Das Eluat und 100 µl Salmon Testis DNA (10 mg/ml) wurden in separaten Reaktionsgefäßen 10 min bei 95°C denaturiert, 2 min auf Eis gestellt und in die Hybridisierungsröhre pipettiert.

2.2.11 Hybridisierungs-, Wasch- und Nachweisbedingungen

Prähyb-Mix:	1,5x SSPE, 1% SDS, 0,5% Magermilchpulver
20x SSPE:	3,6 M NaCl, 0,2 M Na ₂ HPO ₄ , 0,2 M EDTA; pH 7 mit Phosphorsäure
Hyb-Mix:	1,5x SSPE, 1% SDS, 0,5% Magermilchpulver, 10% Dextransulfat
Waschlösung 1:	2x SSC, 0,1% SDS
Waschlösung 2:	0,5x SSC, 0,1% SDS
Waschlösung 3:	0,1x SSC, 0,1% SDS

Die in 2x SSC geschwenkte Nylonmembran wurde in eine Hybridisierungsröhre gerollt und nach Zugabe von 10 ml Prähyb-Mix für 1 h bei 65°C im Hybridisierungssofen unter ständigem Rotieren vorhybridisiert. Der Prähyb-Mix wurde durch 10 ml vorgewärmten Hyb-Mix ersetzt und nach Zugabe der denaturierten, radioaktiv markierten Sonde sowie der denaturierten Salmon Testis DNA über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Die darauffolgenden Waschbedingungen waren abhängig von Sonde und Filter. Standardmässig wurde die Membran kurz mit 2x SSC gespült und mit steigender Stringenz gewaschen. Zuerst wurde der Filter bei RT für 15 min in Waschlösung 1 und 2 geschwenkt, und bei Bedarf für 5-15 min in Waschlösung 3. Die Autoradiographie erfolgte mit Fuji-RX-Röntgenfilmen unter Verwendung von CAWO SE6 Verstärkerfolie bei -70°C. Die Expositionszeit variierte zwischen 2 min und zwei Wochen.

2.2.12 Molekularbiologische Methoden für das Arbeiten mit langer DNA

Lange, genomische DNA grösser als ca. 50 kb, bedarf einer besonderen Handhabung da Sie anfällig gegenüber Einzel- und Doppelstrangbrüchen (ESB/DSB, hervorgerufen z.B. durch mechanische Scherung oder enzymatischen Abbau) ist. Schon DNA von 20 kb Länge wird beim Einfrieren Brüche erfahren. Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte auf PAC Basis tragen jedoch genomische DNA von über 200 kb Länge. Generell darf lange DNA in flüssiger Form (nach Elution, für Ligierungen oder Transfektionen) nicht schnell pipettiert werden, sondern wird mit schräg abgeschnittenen blauen Spitzen mit der Pipette „hochgeschraubt“. Um Lösungen mit langer DNA zu mischen (z.B. bei Ligierungen, Spaltung und Transformation) darf niemals gevortext oder stark geschüttelt werden, stattdessen werden diese Lösungen vorsichtig mit einer Pipettenspitze umgerührt. Darüber hinaus ist lange DNA äusserst anfällig gegenüber UV-Strahlen, Schwermetallionen und starken Temperaturschwankungen. Im Folgenden werden die Methoden zum Umgang mit diesem empfindlichen Material beschrieben.

2.2.12.1 Präparation von PAC DNA in Agarosegelplugs

Standard Manipulation (Pipettieren, Restriktionsverdau, Fällern, Klonieren usw.) von DNA über 50 kb in wässrigen Lösungen könnte zur Akkumulation von Einzel- oder Doppelstrang Brüchen führen. Deshalb wird die PAC-tragende Bakterienkolonie nach Expansion in Agaroseblöckchen („Plugs“) gegossen, was eine mechanische Stabilisierung der DNA-Moleküle nach Lyse der Bakterien durch das Agarosenetzwerk bewirkt. Abbildung 5 gibt einen Überblick über die Technik der Präparation hochreiner, intakter PAC DNA aus Agaroseblöckchen.

2.2.12.2 Herstellung der Agaroseplugs

Folgendes Protokoll beschreibt die Herstellung von Agaroseplugs für die Reinigung der supercoiled PAC-DNA Fraktion in einem Plug von gebrochener und genickter DNA:

- Animpfen der PAC tragenden Bakterien aus Glycerinkultur in 50 ml Selektionsmedium
- Inkubation auf Schüttler (37°C; 250 rpm) für 12-16 h
- Auffüllen der Kultur mit 0,2-2 l frischem, 37°C warmen Selektionsmedium (je nach gewünschter Plug Ausbeute)
- Inkubation für weitere 2-4 h (Bakterien in log Phase halten)
- 30 min vor Ernte Zugabe von 84 µg/ml Chloramphenicol (Proteinhemmung verhindert DNA Neusynthese und erhöht somit die Ausbeute an vollständig replizierten PACs)
- Bakterien auf Eis in 250 ml Zentrifugenbecher verteilen und bei 4°C, 4.000 rpm für 15 min (Beckman, J-21B) sedimentieren
- Pellet in 10 ml Pett IV auf Eis resuspendieren, in 50 ml Falconröhrchen überführen und abzentrifugieren (4°C, 4.000 rpm, 15 min)
- Pellet (0,5-2 ml) im gleichen Volumen Pett IV resuspendieren (im Wasserbad bei 42°C)
- Ansatz 1:1 mit 2% -iger, 50°C warmer LMP-Agarose („ultrapure“) vermischen und sofort mit blauen Spitzen luftblasenfrei in Plug-Molds giessen
- 10 min bei 4°C inkubieren bis Agaroseplugs fest sind

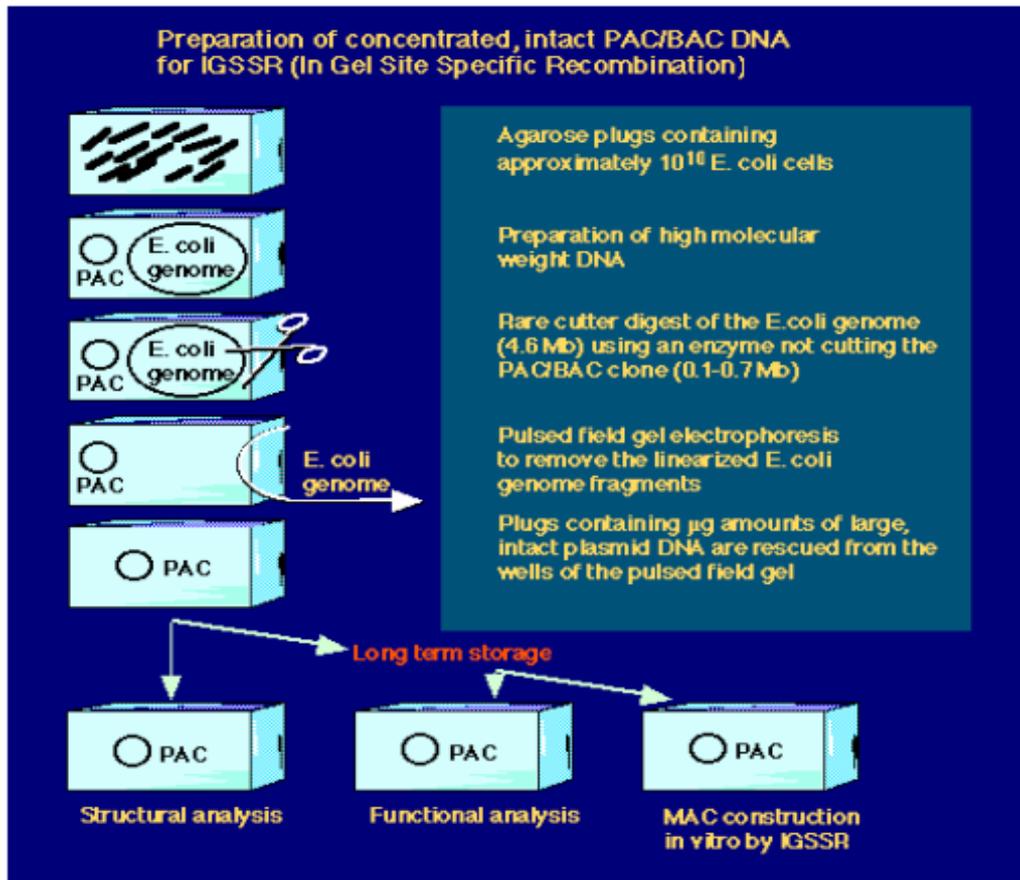


Abbildung 5: Präparation langer DNA in Agaroseblöckchen (Schindelbauer, 1997). Bakterien, welche den gewünschten PAC enthalten, werden in LMP-Agaroseplugs (BxHxT, 10x5x1 mm) gegossen und mit Lysozym behandelt, um die *E. coli* Zellwand zu zerstören. Nachfolgende Waschschritte mit NDS und Proteinase K lassen nur *E. coli* DNA und PACs in den Blöckchen zurück. Durch Spaltung der *E. coli* DNA mit einem selten schneidenden Enzym („rare cutter“) welches den PAC nicht spaltet (z.B. Asc I), kann die bakterielle DNA linearisiert werden. Im anschließenden PFG wandert lineare DNA (gespaltene *E. coli* und gebrochene PAC DNA) in das Gel, nur intakte, supercoiled PAC DNA bleibt im Plug zurück und kann dort weiter modifiziert bzw. eluiert werden. Mithilfe dieser Technik wurde es erstmals möglich grosse Mengen hochreiner, intakter DNA mehrerer hundert kb Länge darzustellen. Die Besonderheit der Methode liegt nicht an der Verwendung der schützenden Agarose, sondern an der Möglichkeit linearisierte *E. coli* DNA und PACs mit Doppelstrang- / bzw. Einzelstrangbrüchen in einem PFG-Schritt komplett zu entfernen. Die im Blöckchen gewonnene PAC DNA ist hoch konzentriert (μg Mengen pro 100 μl) und 100 % intakt. Kleinere Moleküle ($< 40\text{-}50$ kb, z.B. Plasmide, Cosmide) können mit dieser Methode nicht dargestellt werden, da supercoiled-DNA Fraktionen dieser Längen in das PFG wandern können. Ein Einsatz der Methode bei linearen YACs ist ebenfalls ausgeschlossen, weil diese nicht im Gelblöckchen zurückgehalten werden können und ebenfalls in PFG wandern.

2.2.12.3 Lysozymbehandlung

Nach Abziehen des Klebestreifens wurden die Plugs mit einem Pasteurpipetten-Gummiball aus den Plug-Molds in 50 ml Falkonröhrchen, gefüllt mit 30 ml EC-Lysis Puffer, herausgetrieben. Nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und 20 μl RNase A (10 mg/ml) pro Röhrchen wurden die Plugs über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Lyse der Bakterienzellen ist durch eine Abnahme der Trübung der Plugs zu beobachten.

2.2.12.4 Proteinase K Behandlung

Um Zellwandreste, Proteine und Enzyme der lysierten Bakterien möglichst vollständig zu entfernen, wurden die Plugs für zwei Tage in NDS mit 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 50°C inkubiert. Die Plugs wurden für zwei weitere Tage in frischem NDS (ohne Proteinase K) bei 50°C in den Heizschrank gestellt, um die Proteinase selbst abzubauen. Nach diesem Schritt sind die Plugs für mehrere Jahre in NDS bei RT (lichtgeschützt) lagerbar.

Die Proteinase K Behandlung wurde ausser bei der Neupräparation von Plugs auch nach jeder enzymatischen Modifikation der Plugs durchgeführt, um die Plugs von dem jeweiligen Enzym zu reinigen.

2.2.12.5 Reinigung der Plugs

Prä-Restriktionsreinigung:

Nach der NDS-Proteinase K Behandlung wurden die Plugs 3 x 1 h mit TE-Puffer gewaschen und einer PFGE unterzogen (siehe nächsten Abschnitt, S.42). Durch dieses Prä-Restriktions-PFG wird ein Grossteil störender Makromoleküle und Pufferreste aus den Plugs entfernt, welche die Effizienz der späteren Asc I Spaltung herabsetzen. Nach der PFGE wurden die Plugs vorsichtig aus den Taschen wiedergewonnen und in frischem TE bei 4°C gelagert oder für die Spaltung in 1x Asc Restriktionspuffer auf Eis inkubiert.

Asc I Reinigung:

Bei diesem Schritt wird das 4,6 Mb lange *E.coli* Genom, welches supercoiled neben der zirkulären PAC DNA in den Plugs vorliegt, durch die Restriktionsendonuklease Asc I gespalten. In der anschliessenden PFGE wandert diese, ebenso wie der Anteil gebrochener und „genickter“ PAC DNA, aus den Plugs. In den Agaroseblöckchen bleibt nur zirkuläre supercoiled PAC DNA zurück (siehe Abb. 5). Die gewünschte Anzahl Plugs wurde in 1x Asc I Restriktionspuffer überführt, 3 x mit frischem Puffer gewaschen und nach dem Protokoll unter 2.2.12.7 „Spaltung von langer DNA in Agaroseplugs“ behandelt. Nach Spaltung und anschliessender Proteinase K Behandlung, wurden die Plugs durch PFGE von der *E.coli* DNA getrennt, in TE bei 4°C gelagert oder direkt in 1x Restriktionspuffer der nächsten Spaltung inkubiert.

2.2.12.6 Präparation chromosomaler DNA in Agaroseplugs

Um Zelllinien nach Transfektion auf Anwesenheit der transferierten DNA Konstrukte zu testen, wurden die Zellen trypsiniert, abzentrifugiert und in 10 ml PBS resuspendiert. Nach Auszählung in einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen abzentrifugiert, im entsprechenden Volumen PBS resuspendiert, mit 2% -iger LMP-Agarose 1:1 (Wasserbad 42°C) vermischt und in „Plug-Molds“ (BioRad) gegossen, sodass pro Plug (100 µl) 10⁶ Zellen enthalten waren. Die Plugs wurden zwei Tage in NDS/Proteinase K bei 50°C sowie für weitere 3-5 Tage in NDS bei RT inkubiert. Nach Spaltung mit einem geeigneten Restriktionsenzym (*Not* I oder *I-Sce* I) wurden die Plugs auf ein 1% -iges PFG geladen und die DNA mit geeigneten Laufbedingungen (20 kb bis 1.5 Mb) aufgetrennt. Das PFG konnte anschliessend per Southern-Blot mit einer geeigneten Sonde analysiert werden.

2.2.12.7 Spaltung langer DNA in Agaroseplugs

Je nach Aufgabenstellung wurde die in den Plugs enthaltene, lange PAC DNA mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen gespalten. Die benötigte Anzahl an Plugs (bei Testspaltungen oder Kartierungen wurde nur 1/10 Plug mit einem Deckgläschen abgetrennt, für quantitative Spaltungen wurden bis zu 10 Plugs verwendet) wurde in 1x Restriktionspuffer inkubiert und je 3 x 1 h mit frischem Puffer gewaschen. Dann wurden die Plugs in 1x Spaltpuffer inkubiert, sodass sie noch knapp mit Puffer bedeckt waren (ca. 100 µl für 10 Plugs in einem 50 ml Röhrchen). Der Ansatz wurde mit 1-2 µl Enzym (10 U/µl) pro Plug auf Eis über Nacht inkubiert, um dem Enzym die Möglichkeit zu geben in die Agaroseplugs zu diffundieren. Der Ansatz wurde für 4-10 h bei 37°C gespalten. Es folgte eine Proteinase K Behandlung, bevor die Plugs per PFGE analysiert wurden.

2.2.12.8 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Um DNA >20 kb Länge in einem Gel aufzutrennen, wurde eine "Pulsed-Field-Gel-Electrophoresis" (PFGE; Schwartz und Cantor, 1984; Snell und Wilkins, 1986; Bernards, 1986; Olson, 1989) verwendet. Der Unterschied zur Standard-Gelelektrophorese besteht im Wesentlichen darin, dass sowohl der Puls als auch die Laufrichtung des Stromflusses nicht konstant sind (Birren, 1989). Mit dem in dieser Arbeit verwendeten "contour-clamped homogenous electric fields" ("CHEF") PFGE-Gerät können lineare DNA-Fragmente bis zu ca. 10 Mb aufgetrennt werden.

Standard-PFGE

Zunächst wurde das zu analysierende Stück (1/10 bis 1/5) Agaroseblöckchen, nach Spaltung und Proteinase K Behandlung, 3 x 1 h in TE gewaschen, um restlichen NDS Puffer zu entfernen. Die verwendeten Pulsfeld Gele hatten eine Grösse von 20x20 cm und wurden aus 1% -iger Sea Kem-Agarose in 0,5x TAE Puffer gegossen. Um Stücke in Taschen zu fixieren, wurden sie mit einem Spatel am vorderen Ende (relativ zu Laufrichtung des Gels) der Geltasche plaziert und mit 1% -ige LMP-Agarose eingegossen. Um das Laden der Taschen zu erleichtern wurden die Gelstücke und Marker mit Bromphenolblau gefärbt. Je nach erwarteter Grösse der Banden wurden unterschiedliche Marker (Yeast-Chromosome-Marker, MidRange II oder 1 kb Ladder) verwendet. Nach dem Lauf wurden die Plugs aus den Geltaschen entfernt, das Gel in Ethidiumbromid gefärbt und analysiert. Die Auftrennung der DNA im PFG hängt von mehreren Faktoren wie z.B. Spannungsstärke, Wechsel der Laufrichtungswinkel, Agarosekonzentration, Temperatur und Pufferzusammensetzung ab. Die Laufkammer war durch eine Wasserkühlung mit Pumpe auf 12°C eingestellt. Der optimale Auftrennungsbereich wird in dieser Apparatur über die Pulszeiten („switch time) geregelt. Je länger die „switch time“, desto längere DNA-Fragmente werden aufgetrennt (siehe Aufstellung). Um Fragmente zwischen ca. 10 und 200 kb optimal auf 20 cm aufzutrennen wurden folgende Bedingungen gewählt:

		Switch time	Opt. Auftrennungsbereich
Initial switch time:	1 sec	0,1 – 1 sec	< 50 kb
Final switch time:	30 sec	1 – 10 sec	< 100 kb
Laufzeit:	16 h	1 – 30 sec	< 500 kb
Leistung:	6V/cm	30 – 120 sec	< 1 Mb
		120 sec – 1 h	< 10 Mb

Präparative PFGE

Um grössere Mengen langer DNA Fragmente aus einem PAC darzustellen (z.B. für Klonierungen, Ligierungen oder Transfektionen), wurden bis zu Plugs, nach Spaltung und Proteinase K Behandlung, in PFG-Taschen geladen. Durch Abkleben eines Kamms wurde eine durchgehende Tasche erzeugt, um alle Plugs ohne Zwischenraum aufnehmen zu können. Wie oben beschrieben wurden die Plugs eingegossen und aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden ca. 0,5 cm links und rechts der abgeklebten Spur mit dem Skalpell abgetrennt und in Ethidiumbromid gefärbt. Der Mittelteil, welcher den Grossteil der gewünschten DNA enthielt, wurde in 0,5x TAE Puffer lichtgeschützt gelagert. Unter dem UV-Schirm wurde in den gefärbten

Spuren die gewünschte DNA Bande markiert, der entsprechende Bereich im ungefärbten Gel ausgeschnitten, und in Falconröhrchen bei 4°C lichtgeschützt bis zur Elektroelution aufbewahrt.

Prä- und Post-Asc PFGE

Prä-Restriktionsreinigung:

Die Plugs wurden in je eine Tasche (mit 1x TAE Puffer gefüllt) eines 1% -igen PFG geladen. Um das Einführen der Plugs in die Geltaschen zu erleichtern, wurden die Agaroseblöckchen kurz vor dem Laden mit einer Bromphenolblau-Lösung (in TE) gefärbt. Die Plugs wurden durch Auflegen eines Geldeckels, welcher nach der Elektrophorese wieder entfernt werden konnte, fixiert. Das PFG wurde mit folgenden Bedingungen gefahren:

Initial switch time:	0,1 sec
Final switch time:	100 sec
Laufzeit:	18 h
Leistung:	6V/cm

Bei diesen Pulszeiten wurden sowohl kleinere als auch sehr grosse DNA Fragmente (bzw. andere Makromoleküle, welche weitere enzymatische Reaktionen stören könnten) aus den Plugs entfernt. Nachdem die Plugs vorsichtig mit einem Spatel aus den Taschen entnommen wurden, konnte das PFG mit Ethidiumbromid gefärbt werden, um die entfernte DNA Fraktion abzuschätzen.

„Post-Asc“ PFGE

Nach der Asc I Spaltung wurden die Agaroseblöckchen wie oben beschrieben in die Taschen eines 1% -igen PFG (in 1x TAE) geladen. Die Laufbedingungen waren mit denen der Standard PFGE identisch. Nach Entnahme der Plugs wurde das PFG zur Kontrolle der Asc I Spaltung mit Ethidiumbromid gefärbt und analysiert.

2.2.12.9 Klonierung mit PACs

Zum Klonieren wurde die PAC DNA in den Agaroseblöckchen mit dem entsprechenden Restriktionsenzym gespalten und nach Proteinase K Behandlung per präparativer PFGE aufgetrennt. Die Fragmente wurden dann mittels Elektroelution aus dem Agaroseblock isoliert und direkt in den Ligierungsansatz eingesetzt. Die Transformation der Bakterien erfolgte durch Elektroporation. Um die Gefahr der Rekombination in den Bakterien während des Wachstums möglichst gering zu halten, wurden die Kolonien auf Selektivagarplatten sofort mittels Kolonie-PCR analysiert und positive Klone in eine neue Übernacht-Kultur angeimpft. Die Bakterien

wurden am nächsten Morgen sofort in Agaroseblöckchen gegossen nachdem ein Glycerin-Stock angelegt wurde.

2.2.12.10 Elektroelution von langer DNA aus Agarose

Um die linearisierte DNA aus einem Agarosegel zu eluieren, wurde das Elektroelutionsgerät „BIOTRAP BT1000“ von Schleicher&Schuell/Biometra verwendet. Das BIOTRAP-Gerät wurde in eine horizontale, mit 0,5x TAE Puffer gefüllte (die Agarosegelstücke sollten gerade noch mit Puffer bedeckt sein) Elektrophoresekammer gestellt und mit Agarosegelstücken beladen. Makromoleküle wandern im elektrischen Feld (Laufzeit: 10-16 h; Stromstärke: 35 V) aus der Elutionskammer in eine „Falle“ (Volumen 200-800 µl, je nach Füllstand der Kammer) die durch zwei unterschiedliche, stromdurchlässige Membrantypen gebildet wird. Die Membran am Falleneingang, „BT2“, dient als Vorfilter und verhindert den Durchgang grösserer Partikel, während die DNA durchgelassen wird. Die Membran am Fallenausgang, „BT1“, hält im elektrischen Feld alle Makromoleküle über 3-5 kD innerhalb der Falle zurück. Die DNA-Fragmente werden nach kurzer Umpolung vorsichtig aus der Falle entnommen. Es folgte eine sofortige Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min um mögliche Kontaminationen zu sedimentieren. Die eluierte DNA wurde bei 0°C auf Eis gelagert, per PFGE auf Integrität sowie Konzentration kontrolliert und möglichst frisch in Ligierungen bzw. Transfektionen eingesetzt.

2.2.12.11 Ligierung

Ligierungen mit langer DNA als Substrat erfordern besondere Vorgehensweisen. Die DNA Fragmente wurden vor der Ligierung zur Mengen- und Längenbestimmung per PFGE analysiert. DNA und Ligierungsansatz wurden durch langsames Umrühren mit einer Pipettenspitze vermischt. Für eine Ligierung wurde in der Regel DNA mit überhängenden Enden eingesetzt:

- DNA (50 – 250 kb) x µl (ca. 50 ng)
- PAC Vektor x µl (ca. 150 ng)
- 10x Ligase Puffer 10 µl
- T4-DNA-Ligase 5 µl
- Aqua bidest. ad 100 µl

Ligiert wurde über Nacht bei 12°C. Am nächsten Morgen wurde der Ansatz dann jeweils 3 x für 10 min auf Eis, RT und 37°C inkubiert. Um die Transformationseffizienz der anschliessenden Elektroporation zu erhöhen wurde auf eine Hitzeinaktivierung (10 min bei 65°C) verzichtet. Für jede Ligierung wurde eine negativ Kontrolle (ohne T4-Ligase) mitgeführt. 10-50% des Ligierungsansatzes wurden auf ein PFG aufgetragen um das Ausmass der Ligierung durch

Abschätzen der relativen Fluoreszenzintensität der Gelbanden von Substrat und Reaktionsprodukt zu bestimmen.

2.2.12.12 Elektroporation

Aufgrund der Grösse der zu transformierenden DNA weicht das Protokoll in einigen Punkten von der Standard Elektroporation (siehe 2.2.9.2) ab. So wurden aufgrund der geringeren DNA Konzentrationen mehrere Küvetten pro Ligierung, mit unterschiedlichen Mengen des Ligierungsansatzes (1, 2, 4 und 5 μ l), transformiert. Die Spannung wurde auf 1,4 bis 1,6 kV reduziert und pro Küvette wurden bis zu 20 μ l elektrokompetente DH10B „ElectroMAX“ eingesetzt. Bei sehr geringer DNA Konzentration wurde bis zu 20 μ l des Ligierungsansatzes, verteilt auf mehrere Küvetten, eingesetzt.

2.2.13 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion ist eine Technik, mit der DNA oder Proteine direkt in Cytoplasma bzw. Nucleus einer Zelle injiziert werden können (Überblick: EMBO Protocoll Practical Course „Microinjection and Detection of Probes in Cells“, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde sie dazu verwendet, Plasmide bzw. cDNA-Kassetten von Reporter-Genen (EGFP, LUC) und PAC Konstrukte (B_2T_8 , pTTE₁) in die Kerne menschlicher Zellen zu injizieren. Alle Lösungen wurden vor der Injektion für 15 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, um Kontaminationen zu sedimentieren und verstopfen der Spitze zu vermeiden. Die Zellen wurden mindestens 24 h vor Injektion in 1-Kammer-Objektträger bzw. Gewebekulturschalen ausgesät, sodass zum Zeitpunkt der Injektion eine Konfluenz von ca. 70-90% erreicht war. Die Zellen wurden kurz vor der Injektion mit frischem Medium (ohne Antibiotika) gewaschen und mit einem Eppendorf Transjector 5246, Micromanipulator 5171, und Injectman, welche an ein Zeiss Axiovert 10 Mikroskop angeschlossen waren, injiziert. Bilder wurden an einem Zeiss Axiovert 25 Mikroskop mit einer Klughammer „Cell Cam Color-TWAIN“ Digital Kamera aufgenommen und mit der Software Axio-Vision 2.0 sowie Photoshop 5.0 verarbeitet. Um Schwankungen des Injektionsvolumens zu minimieren wurden standardisierte Injektionsnadeln (Femtotips II von Eppendorf; Durchmesser der Austrittsöffnung: 0,5 μ m +/- 0,2 μ m) verwendet. Die Einstellungen der Mikroinjektionsanlage waren wie folgt:

Injektionsdruck: 120 hPa
Injektionszeit: 0,3 sec

Mit den gewählten Bedingungen wurde das Injektionsvolumen auf 1 pl +/- 0,5 pl (Minascheck, 1989) geschätzt, was in Übereinstimmung mit anderen Gruppen war (Pollard, 1998).

2.2.13.1 Mikroinjektion von Reporter-Genen

Um die Zahl der Reporter-Gen Moleküle zu bestimmen, welche nach intranukleärer Mikroinjektion ein sichtbares Signal durch transiente Expression erzeugen, wurden Verdünnungen des zirkulären Plasmids pEGFP-N1 in die Kerne verschiedener menschlichen Zelllinien (HT1080, 16HBE14o- und primäre Fibroblasten) injiziert, und mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurde folgender Versuchsaufbau verwendet:

Um die Wiederfindung injizierter Zellen zu ermöglichen, wurden auf die Unterseiten der 1-Kammer-Objektträger Markierungen (Punkte, daneben die verwendete Verdünnung) mit einem wasserfesten Stift angebracht, von denen aus in eine Richtung exakt je 100 Zellen, mit der entsprechenden Verdünnung, injiziert wurden. Verdünnungen (10^5 bis 1 Molekül pro μl Injektionsvolumen) von pEGFP-N1 wurden in TE mit pUC19 Plasmid (2×10^5 Moleküle pro μl) als nicht exprimierende Träger-DNA (um die Viskosität und Plasmidkonzentration konstant zu halten, und um den Verlust von Reporter-Plasmiden durch Assoziation mit Oberflächen zu minimieren) angesetzt. Als weitere Kontrolle für alle erfolgreich injizierten Zellen, wurde allen Verdünnungen 2×10^4 Moleküle des Plasmids pCLuc4 pro μl zugefügt, welches per Immunfärbung nach Fixierung der Zellen detektierbar war. Um die DNA-Konzentration vor der Injektion zu überprüfen, wurden die Verdünnungen 1:1.000 in Hefe t-RNA (konstant 50 ng/ml; als DNA-Träger) verdünnt und 1 μl davon in eine PCR mit dem Primerpaar EGF/R eingesetzt. Diese PCR gab gewöhnlich positive Resultate ab einer Grenze von 1-10 Molekülen pro Reaktionsansatz (Abb. 7, S. 54). Für manche Versuche wurden Zellen in verschiedenen Stadien des Zellzyklus geblockt. So wurde zum einen der Replikations-Hemmer L-Mimosine verwendet (Zugabe von 500-800 μM L-Mimosine für 10-12h) um die Zellen in der S-Phase des Zellzyklus zu blocken (Hughes, 1996; Krude, 1999), andererseits wurden die Zellen durch „Serum-starvation“ (Inkubation in Medium ohne Serum für 20 h) künstlich in der G1-Phase gehalten, und dann mikroinjiziert. Die Plasmid Verdünnungen wurden, wie oben beschrieben, entlang einer imaginären Linie von den Markierungen ausgehend in die Kerne von 100 Zellen injiziert und die Fluoreszenz nach verschiedenen Zeitpunkten (2-16 h) unter dem Mikroskop bestimmt.

2.2.13.2 Mikroinjektion von künstlichen Chromosomenkonstrukten

Um künstliche Chromosomen Konstrukte zu erzeugen, wurden verschiedene PAC Konstrukte in HT1080 Zellen mikroinjiziert. Abweichend von obigem Protokoll wurden bis zu 1.000 Zellen pro Ansatz injiziert und es wurde auf sorgfältigen Umgang mit der langen, linearen, in 0,5x TAE

eluierten DNA geachtet. Die Femtotips wurden nicht mit den handelsüblichen „Microloadern“ beladen, sondern mit gelben Spitzen, welche nach Erhitzen mit einer Flamme ca. 5 cm lang gezogen und mit einem Skalpell schräg abgeschnitten wurden. Durch dieses Vorgehen wurde der Durchmesser der Öffnung vergrößert um Scherkräfte beim pipettieren zu minimieren. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden die Schalen sofort nach der Injektion mit frischem Vollmedium (mit Pen/Strept) gewaschen und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Selektionsmedium zugegeben, um stabile Zelllinien zu erzeugen.

2.2.14 Lipofektion

Um menschliche Zelllinien zu transfizieren wurde unter anderem LipofectAMINE™ verwendet (Felgner, 1989). Dabei bilden sich durch polykationische Lipide in wässriger Phase Komplexe aus Nukleinsäuren an Liposomen. Diese sind in der Lage, die Zellmembran endozytotisch zu passieren (Duzgunes, 1993). Die zu transformierenden Zellen wurden 1 Tag zuvor in 10 cm Zellkulturschalen gesplittet, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 50-90% Konfluenz erreicht hatten.

Protokoll:

- Zellen mit PBS waschen und in 2-3 ml OptiMEM I inkubieren (Brutschrank)
- Lösung A: 190 µl OptiMEM I + 10 µl Lipofectamin, gut mischen und 30 min bei RT inkubieren (zur Ausbildung der Liposomen)
- Lösung B (nach 25-minütiger Inkubation von Lösung A): 0,5-500 ng DNA (vorher 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren um Kontaminationen zu sedimentieren) mit OptiMEM I auf 200 µl auffüllen und nach 5 min Inkubation bei RT mit Lösung A vermischen (vorsichtig mit 3 ml Transferpipette)
- Transfektionsmix 5 min bei RT inkubieren und gleichmässig auf die Zellen auftropfen
- Inkubation für 12-16 h im Brutschrank (37°C, 10% CO₂)
- Transfektionsmix gegen Vollmedium (ohne Selektion) tauschen und für 12-24 h inkubieren
- Danach konnten der Transfektionsansatz auf Selektionsmedium gesetzt werden, um stabile Zellklone zu erzeugen. Es wurde immer ein Kontrollansatz ohne DNA mitgeführt.

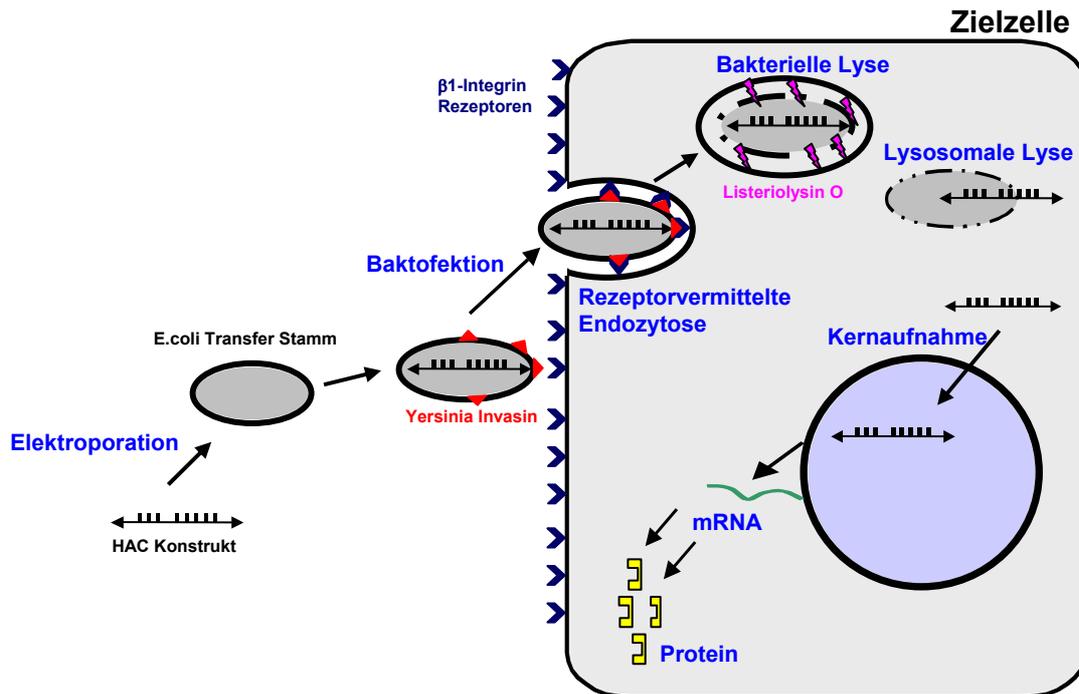
2.2.15 Baktinfektion

Die Transfektion eukaryotischer Zellen durch Bakterien bezeichnet man als Baktinfektion. Zu diesem Zweck wurde der *E.coli* Stamm K12 von Dr. Grillot-Courvalin (Institut Pasteur, Paris) so verändert, dass er effizient von den meisten Zelltypen phagozytiert wird, in den Lysosomen autolytisch und seine DNA Fracht, nach Zerstörung der Lysosomenmembran, ins Cytoplasma der Zielzellen abgibt (Grillot-Courvalin, 1998). Der erste Schritt, die Aufnahme in die Zelle, wird durch Expression des *Yersinia pseudotuberculosis*-Gens *inv* vermittelt. Das entsprechende Protein, Invasin, bindet spezifisch an β_1 -Integrin-Rezeptoren, die fast ubiquitär auf

menschlichen Zellen vorhanden sind und ermöglicht die effiziente Aufnahme der Bakterien in Endosomen (Isberg, 1985; Grillot-Courvalin, 1998). Da der Transferstamm für Diaminopimelinsäure (dap) auxotroph ist (Courvalin, 1995), und dap (das weder im Transfermedium noch in eukaryotischen Zellen vorhanden ist) für die Zellwandbiosynthese von *E.coli* essentiell ist, lysieren die Transferbakterien unmittelbar nach Zelleintritt. Durch Lyse der Bakterien kommt das Protein Listeriolysin O, welches vom *hly*-Gene von *Listeria monocytogenes* kodiert wird, in Kontakt mit der lysosomalen Membran und bewirkt dessen Zerstörung, was eine Freisetzung der DNA Fracht in das Cytoplasma zur Folge hat. Listeriolysin O, welches von *L. monocytogenes* sekretiert wird, wurde im Transferstamm in der Membran verankert, um sicherzustellen, dass die Bakterien zuerst lysieren bevor ein DNA Transfer möglich ist („suicidal invasion“; Grillot-Courvalin, 1999). Die Abbildung auf Seite 48 zeigt ein Modell der bei der Baktinfektion ablaufenden Schritte.

Baktinfektion Protokoll

- Elution der DNA aus 1/2 Agaroseplug mittels Agarase-Behandlung (Plug in 200 µl Aqua bidest. 65°C für 10 min; + 1 µg/ml Agarase und 1 h bei 40°C inkubieren)
- Elektroporation (vgl. 2.2.12.12): 1, 3 und 5 µl DNA in 20 µl elektrokompetente Transferbakterien + 60-80 µl Aqua bidest.
- Selektion von Transformanten auf BHI-Agar (mit dap/Amp/Kana) über Nacht bei 37°C
- Test der Klone auf STS-Marker per Kolonie PCR (vgl. 2.2.3.1)
- Positive Klone in 50 ml flüssig BHI-Kultur (dap/Amp/Kana/Spect) animpfen, Inkubation auf Schüttler bei 30°C über Nacht; Transferbakterien in log-Phase (OD₆₀₀ ca. 0,7-1,0) ernten
- Zentrifugation von 40 ml der Transferbakterien (13.000 rpm, 15 min) und Präparation von Agaroseplugs (vgl. 2.2.12.2; zur nachträglichen Kontrolle auf Intaktheit des Konstruktes)
- Restliche Transferbakterien abzentrifugieren und in DMEM (+ 0,5 mM dap) resuspendieren Die Konzentration von Bakterien in Medium betrug zwischen 5x10⁶ und 2,5x10⁷ pro ml
- Zugabe der Bakterien auf HT1080 Zellen (MOI von 2 bis 20.000) für 2 h bei 30°C
- Platten 3 x mit DMEM waschen (+ 20 µg/ml Gentamycin) und Inkubation für 30 min, 37°C in DMEM (10 % FCS; 50 µg/ml Gentamycin) um evtl. Kontaminationen zu vermeiden
- Inkubation für 2 Tage in DMEM (10 % FCS; 20 µg/ml Gentamycin) und Selektion für ca. 2 Wochen mit Blasticidin-S (vgl. 2.2.16)



Die in dieser Arbeit beschriebenen Baktinfektionen wurden von mir im Labor von Prof. Patrice Courvalin am Institut Pasteur („Unité des Agents Antibactériens“) in Paris durchgeführt. Es wurde der *dap* auxotrophe *E.coli* K12 Stamm BM2710-pGB2 Ω *inv-hly* verwendet, welcher die Gene *inv* und *hly* auf dem nicht-autotransferierenden „low-copy“ Plasmid pGB2 trug. Als Transfer DNA wurden die PAC Konstrukte B₂T₈, pTTE₁ und CGT21 eingesetzt, um zu prüfen ob die Konstrukte ohne vorherige Isolierung direkt in Zellen transfiziert werden können und um zu prüfen ob die Methode geeignet ist *de novo* HACs zu formieren. Die zirkulären Konstrukte befanden sich in Agaroseblöckchen welche *Asc* I gespalten, NDS/Proteinase K behandelt und per PFGE gereinigt wurden. Kurz vor der Elektroporation in den Transferstamm wurden die Konstrukte per Agarase aus den Blöckchen gelöst. Die HT1080 Zellen wurden am Tag vor dem Transfer in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät, sodass sie am Tag der Baktinfektion zwischen 60-90% Konfluenz erreicht hatten.

FACS-Analyse

Um die Expression des EGFP-Markers von pTTE₁ nach der Baktinfektion zu messen, wurden die Zellen mittels „Fluorescence-Activated Cell Sorting“ (FACS) analysiert. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, einmal mit PBS (+ 3% FCS) gewaschen, im gleichen Medium zu 10⁶ Zellen/ml resuspendiert und 3x10⁶ Zellen per FACS („FACScan Flow Cytometer“ mit „CellQuest“ Software; Becton-Dickinson) analysiert.

2.2.16 Erzeugung stabiler Zellklone

Zur Erzeugung stabiler, eukaryotischer Zellklone wurden zwei unterschiedliche Selektionsmarker auf den DNA Konstrukten verwendet. So enthielten alle Konstrukte im pTAT Anteil, auf dem alle Vektoren basieren, das Gen BS (kodiert für das Enzym Blasticidin-S-Deaminase, zur Selektion auf Blasticidin-S). Ein weiterer Selektionsmarker stand bei Transfektionen mit dem Konstrukt pTHT₂₂, welches den menschlichen HGPRT-Gen Lokus enthält, zur Verfügung. Das HGPRT-Gen kodiert für das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, welches am „salvage-pathway“ (Wiederverwertungsweg) des Purinnukleotid Abbaus beteiligt ist (Stryer, 1995) und bei Patienten, welche am Lesh-Nyhan-Syndrom erkrankt sind, mutiert ist. Das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase katalysiert die Reaktionen von Hypoxanthin zu Inosinat und Guanin zu Guanylat, welche daraufhin erneut in die Nukleotidsynthese eingeschleust werden können.



HGPRT-negativen Zellen (HT1080⁻) sind also zur Purinnukleotid Synthese ausschliesslich auf *de novo* Synthese angewiesen und können freie Purinbasen nicht wiederverwerten. Die Zugabe von HAT (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) in das Medium bewirkt bei diesen Zellen eine Vergiftung durch Aminopterin, welches einen wichtigen Reaktionschritt (Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat) bei der *de novo* Synthese von Nukleotiden durch kompetitive Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase blockiert (Abb. 6). Nur solche HT1080⁻ Zellen, die das funktionsfähige HGPRT-Gen per Transfektion aufgenommen haben, sind in der Lage mit Hypoxanthin und Thymidin einen Nebenweg der Nukleotidsynthese einzuschlagen und somit die Stoffwechselblockade zu umgehen. Durch HAT kann man daher sehr effizient HT1080⁻ Zellen selektieren, welche das HGPRT-Gen stabil aufgenommen haben. Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt des HGPRT-Systems ist die Möglichkeit, Zellen gegen die Anwesenheit des HGPRT-Gens zu selektieren bzw. die Mutationsrate durch Wachstum auf 6-TG zu bestimmen. Dazu wird das Guanin-Analogon 6-Thioguanin (6-TG) verwendet, welches durch das Produkt des HGPRT-Gens zu toxischen Nukleotiden metabolisiert wird. Zellen bei denen das HGPRT-Gen nicht funktionsfähig oder epigenetisch inaktiviert ist, überleben eine 6-TG Zugabe. Abbildung 6 gibt einen schematischen Überblick über das HGPRT-Selektionssystem.

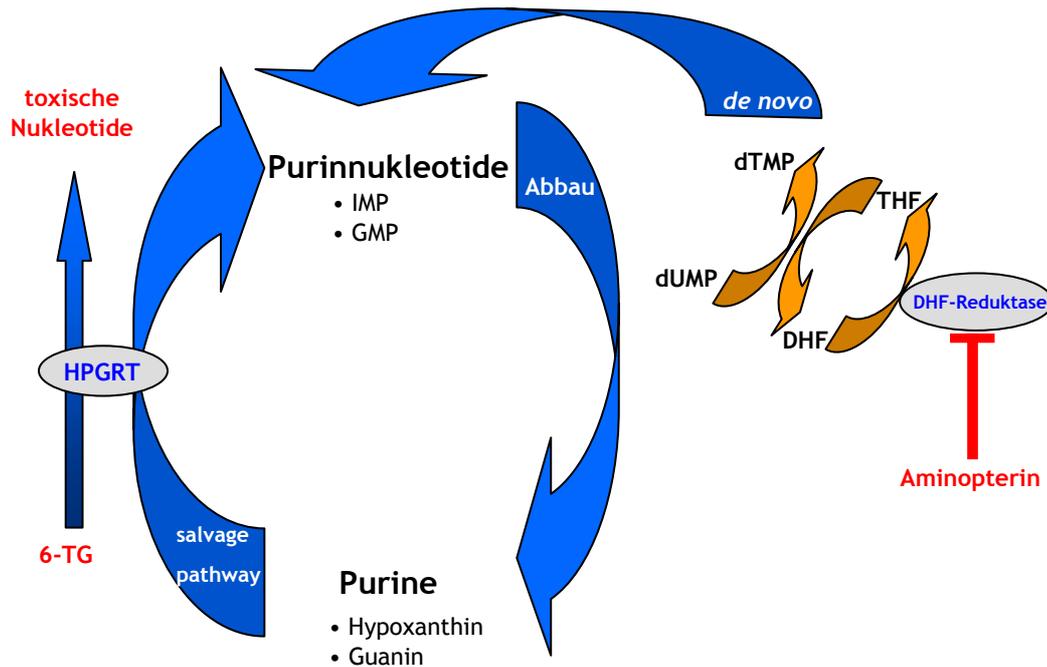


Abbildung 6: Schematischer Überblick über die Rolle von HGPRT bei der Purinnukleotid Biosynthese. Wenn das HGPRT-Gen deletiert oder mutiert ist, können Zellen nicht mehr auf den „salvage pathway“, der Wiederverwertung von Purinen für die Purinnukleotid-Synthese, zurückgreifen. Neue Purinnukleotide, welche für die DNA-Synthese unerlässlich sind, können daher ausschliesslich durch *de novo* Synthese gebildet werden. Zugabe von Aminopterin hemmt die Regeneration von THF aus DHF, einen wichtigen Schritt der *de novo* Synthese. Somit kann in Zellkultur auf die Anwesenheit des HGPRT-Gens selektiert werden. Zugabe von 6-TG führt bei HGPRT-positiven Zellen zu einer Vergiftung durch Bildung toxische Nukleotide.

Um nach Transfektion (Mikroinjektion, Lipofektion oder Baktofektion) stabile Zellklone zu erzeugen, wurde das Selektionsmedium jeden zweiten Tag gewechselt und die Zellen für mindestens zwei Wochen unter Selektion gehalten, bis sich einzelne, freistehende Kolonien bildeten. Dann wurden die Kolonien mit Klonierlingen isoliert, in 6-well-Zellkulturschalen überführt und expandiert.

Bei Doppelselektion (nach Cotransfektion mit zwei Konstrukten, die entweder das BS-Gen oder das HGPRT-Gen trugen) konnte bis zur Isolierung der Klone nur mit Blasticidin-S selektiert werden um dann, nach zusätzlicher HAT-Selektion, die Rate an Klonen zu bestimmen welche nur einen oder alle beide Konstrukte funktionell aufgenommen haben.

2.2.17 Immunfärbung

Nach Fixierung mikroinjizierter Zellen konnte mittels Immunfärbung gegen das Luciferase-Protein die Rate an erfolgreich injizierten und exprimierenden Zellen bestimmt werden. Da das Plasmid pCLuc4 in allen Verdünnungen in hoher Konzentration (ca. 2×10^4 Moleküle pro

Injektionsvolumen) vorhanden war, konnte die Anzahl an überlebenden und exprimierenden Zellen auch bei Zellen mit GFP-Expression unterhalb der Nachweisgrenze bestimmt werden.

Blocking-Lösung: 2% Normal-Goat-Serum (Vector); 2% Bovines-Serum-Albumin (Albumax 1; Gibco-BRL); 0,05% Tween 20 in PBS

ABC-Lösung: 1 Tropfen Lösung A; 1 Tropfen Lösung B; in 5 ml PBS 0,05% Tween 20; 30 min vor Verwendung ansetzen

Nachweis-Lösung: 0,8 mg/ml Diaminobenzadin (DAB; Sigma) in 100 mM Tris-HCl, pH 7,5

Immunfärbung Protokoll

- Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd (in PBS) für 30 min bei 4°C
- Objektträger 3 x kurz mit PBS waschen
- Inkubation in 0,3% H₂O₂ in Methanol für 2 x 10 min, um endogene Peroxidasen zu „quenchen“, dann 2 x in PBS waschen
- Inkubation in Blocking-Lösung für 30 min auf Schüttler
- Zugabe von 300 µl primären Antikörpers („Rabbit anti-firefly Luciferase“; Europa Bioproducts), 1:500 in Blocking-Lösung verdünnt, über Nacht auf dem Schüttler
- 3 x 5 min mit PBS auf dem Schüttler waschen
- Inkubation mit Biotinyliertem „Goat anti-Rabbit“ (Vector) Antikörper, 1:500 in PBS, 0,05% Tween 20 verdünnt, für 2 h auf dem Schüttler
- 3 x 5 min mit PBS auf dem Schüttler waschen
- Inkubation mit ABC-Lösung für 1 h
- 2 x 5 min mit PBS waschen und 1 x kurz in Tris-HCl (100 mM; pH 7.5) spülen
- Inkubation in Nachweis-Lösung für 10 min, dann 2 x 5 min mit Wasser spülen
- Gegenfärbung mit Hematoxylin (Sigma) und Mounting mit DPX Mountant (Fluka)

2.2.18 Datenbanken und Computerprogramme

2.2.18.1 Datenbanken und Internetseiten

Unter der „National Institute of Health“ Internetseite der „Human Genome Resources“ finden sich Programme, Suchmaschinen und Datenbanken zur Untersuchung von Nukleotid- und Proteinsequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human>). BLASTN („Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide“, Altschul, 1990) vergleicht eine Nukleotidsequenz gegen die EMBL/Genbank Nukleotidsequenz-Einträge. In OMIM („Online Mendelian Inheritance in Man“)

werden mendelisch vererbte Krankheiten symptomatisch und, falls bekannt, mit krankheitsverursachenden Genen beschrieben. Darüber hinaus wurden Datenbanken wie „Uni Gene“ und „Map Viewer“ als Informationsquellen verwendet.

2.2.18.2 Sequenzanalyse

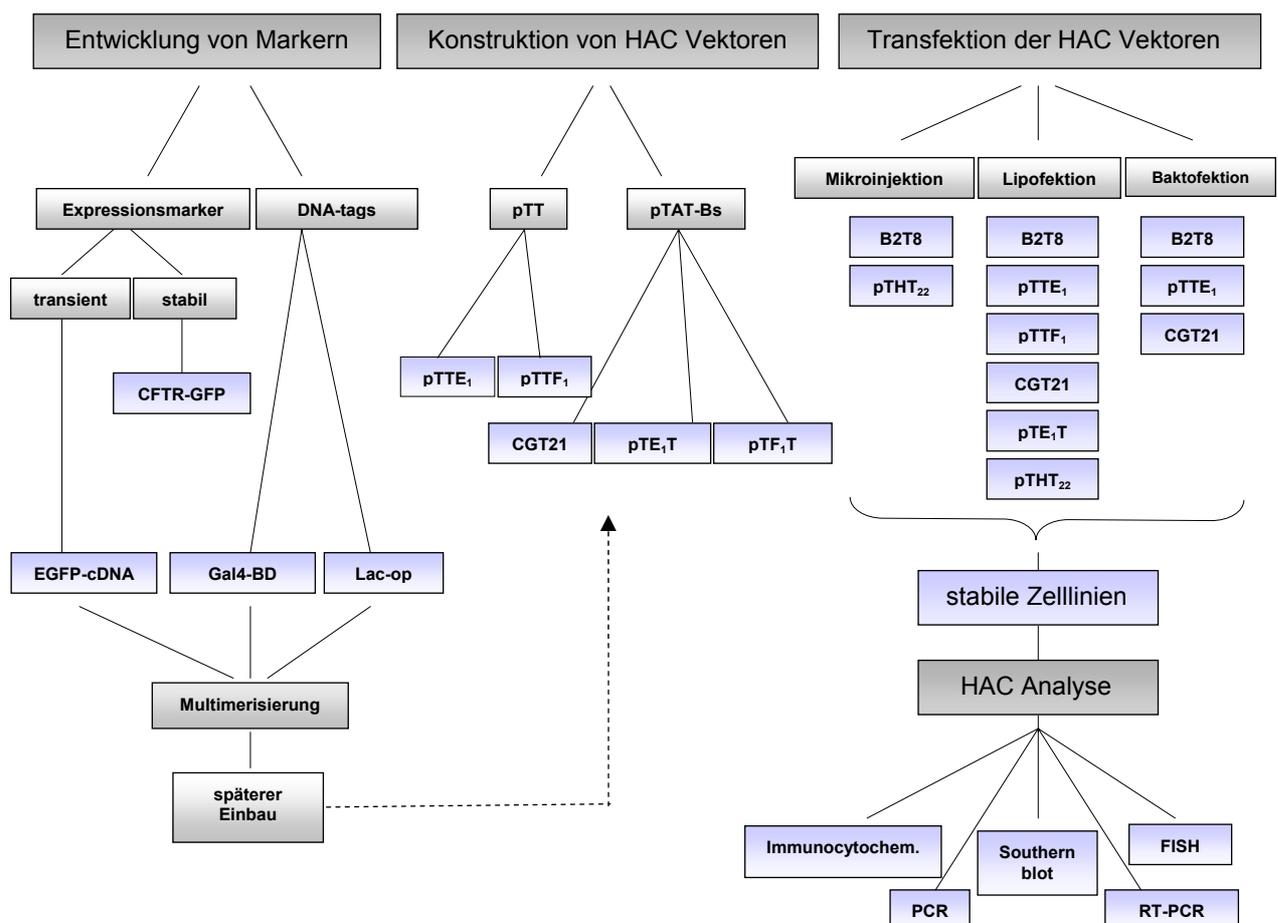
Das HUSAR Programm (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources, DKFZ Heidelberg) wurde zum Vergleich der Übereinstimmung von mehreren Sequenzen (DNA oder Aminosäuren) sowie zur *in silico* Restriktionsanalyse (Programm „MapSort“) verwendet.

2.2.18.3 Computerprogramme

- Für Aufnahme und Speicherung von Gelphotos wurde das Programm „EasyWin32“ von Herolab verwendet.
- FISH-Fluoreszenzbilder wurden mit dem Programm „Q-FISH“ von Zeiss erstellt und mit „Photoshop 5.0“ von Adobe weiterbearbeitet.
- Licht- und Fluoreszenzbilder wurden mit dem Programm „Axio-Vision 2.0“ von Zeiss erstellt
- Das Programm „DNA-Strider“ wurde verwendet um Restriktionskarten zu erstellen. Mit dem Programm „Mac-Plasmap“ wurden Plasmidkarten erstellt.

3 Ergebnisse

Für die stabile, regulierte Expression eines therapeutischen Gens in Zielzellen stellen künstliche menschliche Chromosomen (HACs) derzeit das einzige Konzept dar, das hohe Sicherheit und technische Realisierbarkeit bietet. In der vorliegenden Arbeit sollte die zugrundeliegende *de novo* HAC-Technologie der Arbeitsgruppe, die sich auf die Konstruktion und den intakten Transfer von PACs mit den funktionellen Komponenten menschlicher Chromosomen konzentriert, weiterentwickelt werden. Dafür wurden zunächst Marker benötigt, die Anzeigen können wieviele Zellen mit wievielen Vektormolekülen transfiziert wurden und wieviele der erfolgreich transfizierten Zellen stabile HACs bilden. Folgendes Schema zeigt die drei Hauptpunkte der vorliegenden Arbeit: Die Entwicklung von DNA- und Expressionsmarkern für den Nachweis transienten und stabilen „low-copy“ Gentransfers, die Konstruktion von HAC Vektoren sowie deren Transfektion zur Bestimmung von Klon- und HAC Formierungseffizienz durch Analyse der erzeugten stabilen Zelllinien.



3.1 Einzelne intranukleär mikroinjizierte cDNA-Reporter Gene reichen nicht aus um transiente Expression nachzuweisen

Eine wichtige Voraussetzung für die Optimierung menschlicher künstlicher Chromosomen als Gentransfer Vektoren ist die Bestimmung der Effizienz der *de novo*-Formierung nach erfolgter Transfektion. Im Gegensatz zu Expressionsplasmiden, die in grosser Kopiezahl transferiert werden müssen, um transient eine genügend grosse Menge an therapeutischem Protein zu exprimieren, zielen HAC Vektoren auf eine regulierte Expression von mitotisch stabil vererbten künstlichen Chromosomen. Um diese „low copy“ Vektoren weiter zu verbessern, muss zunächst ein Testsystem geschaffen werden, das geeignet ist die Fraktion der Zellen zu bestimmen, die erfolgreich künstliche Chromosomen formieren, wenn sie eine geeignete Zahl an Molekülen des Konstrukts erhalten haben. Dafür wäre ein Reporter Gen hilfreich, das über transiente Expression eine schnelle Identifizierung derjenigen Zellen ermöglichen würde, die niedrige Kopiezahlen des Konstrukts aufgenommen haben.

Um zu prüfen, ob die transiente Expression der EGFP Reporter genkassette des Plasmids EGFP-N1, bestehend aus dem viralen CMV „immediate-early“ Promotor, der EGFP-cDNA und der SV40-Poly A Sequenz, für den frühen Nachweis transferierter DNA geeignet wäre, wenn nur einzelne DNA Konstrukte erfolgreich in den Zellkern transfiziert werden, wurden verschiedene Kopiezahlen des Plasmids in die Zellkerne menschlicher Zellen mikroinjiziert. Zum Vergleich verschiedener Zellklassen wurden die menschliche Lungensarkom Zelllinie HT1080, die immortalisierte menschliche Bronchialepithelzelllinie 16HBE14o- (von Dieter Gruenert überlassen), sowie primäre menschliche Fibroblasten (von Konstanz Hörtnagel frisch aus Präputium isoliert) verwendet. Zur Injektion wurden absteigende Verdünnungsreihen des Reporterplasmids mit gleichbleibend hoher Träger-DNA-Konzentration (pCLUC-4) verwendet. Die Kopiezahl des Reporter Gens wurde mittels PCR überprüft (Abb. 7).

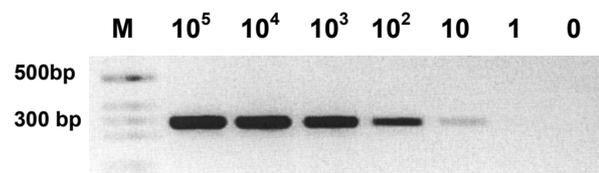


Abbildung 7: PCR Kontrolle der Verdünnungen. Kontrolle der Kopiezahl von pEGFP-N1 in einer Verdünnungsreihe für die intranukleäre Mikroinjektion. Je 1 μ l der 1/1.000 verdünnten Injektionslösungen wurde in eine Standard-PCR (35 Zyklen) mit dem Primerpaar EGF/EGR eingesetzt. 10 Moleküle des Reporters, nicht aber eine Kopie pro Picoliter Injektionsvolumen, werden in der Regel nachgewiesen, was der normalen PCR-Sensitivität in unserem Labor entspricht.

Die Injektion erfolgte, wie in Abbildung 8a dargestellt, entlang einer Markierung in 100 Zellkerne, wobei nur erfolgreich injizierte Kerne gewertet wurden (kurzes Aufblähen des Nukleus, ohne diesen zu zerstören). Ausgehend von den Markierungen wurden grüne Zellen 2-16 h nach Injektion gezählt und anhand der Intensität der Fluoreszenz (per Mikroskop beurteilt) in stark und schwach fluoreszierend eingeteilt. Unabhängig vom Typ der Zelllinie wurden mindestens 10^3 Moleküle des Plasmids pEGFP-N1 benötigt, um in einer grossen Fraktion der injizierten Zellen eine transiente Expression zu beobachten. Zwischen 10^3 und 10^5 injizierten Kopien nahm die Intensität der Fluoreszenz beträchtlich zu (siehe Abb. 8b). Bei Injektion von mehr als 10^5 Kopien pro Zellkern konnte keine weitere Zunahme der Fluoreszenzintensität mehr beobachtet werden. Die kopiezahlabhängige Fluoreszenz war meist bereits 2 h nach Injektion voll ausgebildet und das Intensitätsmaximum war nach 6-16 h erreicht. Die verhältnismässig schnell etablierte kopiezahlabhängige Expression in praktisch allen unmittelbar überlebenden Zellen legt den Schluss nahe, dass allein die Anwesenheit des Plasmids im Nukleus und dessen unregulierte Expression durch vermutlich chromatinunabhängige Polymeraseaktivität am CMV-Promotor für das Signal verantwortlich sind, und nicht etwa Zellzyklus abhängige Prozesse oder eine geordnete Formierung einer replizierenden Chromatinstruktur. Diese Vermutung wird dadurch gestärkt, dass Zellen, die durch L-Mimosin bzw. „serum-starvation“ in verschiedenen Phasen des Zellzyklus gehemmt wurden, ein ähnliches Expressionsmuster zeigten (siehe Tab. 1, Abb. 9).

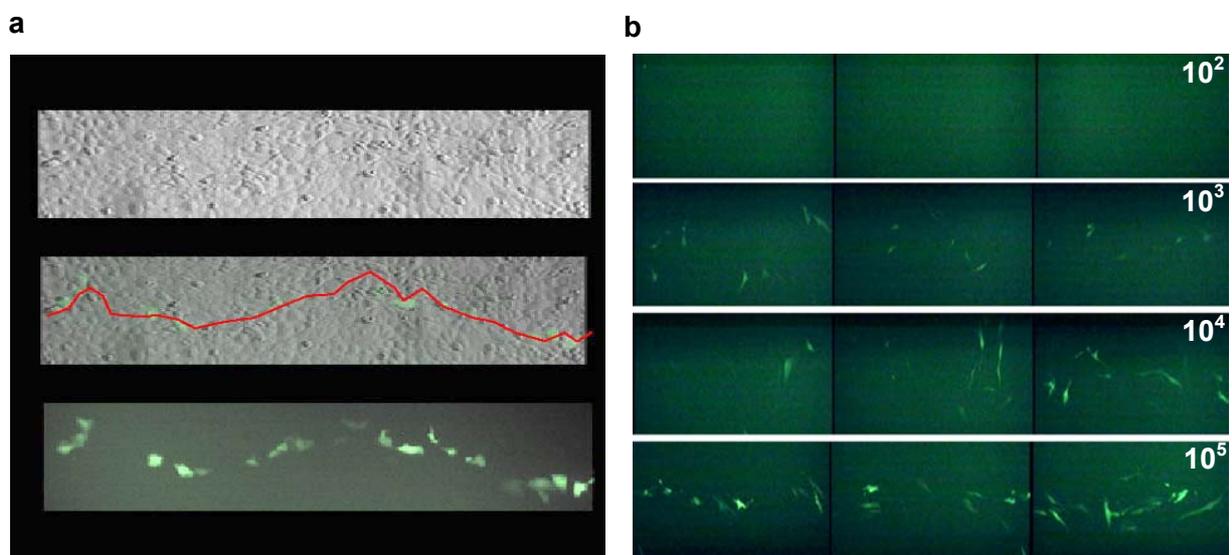


Abbildung 8: Intranukleäre Mikroiinjektion und Nachweis von grünen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop in Abhängigkeit von der Kopiezahl. a) Schematische Darstellung der Injektion von Zellen entlang einer gedachten Linie (rot). Überlagerte Phasenkontrast- und Fluoreszenzphotographien desselben Ausschnittes von annähernd konfluenten 16HBEo- Zellen, (10^5 Kopien pEGFP-N1 pro Picoliter Injektionslösung). b) Reihen von menschlichen primären Fibroblasten die mit aufsteigenden Kopiezahlen (in weiss) injiziert wurden. Die Signalintensität nimmt von 10^3 bis 10^5 injizierten Molekülen pro Zellkern deutlich zu, während die Gesamtzahl der exprimierenden Zellen ab der

Nachweisgrenze von etwa 10^3 relativ konstant bleibt (40-90%, im Wesentlichen abhängig von der Überlebensrate des injizierten Zelltyps).

Von allen Zelllinien zeigte HT1080 die grösste Überlebens- und Expressionsrate von bis zu 90%, welche durch auszählen der grünen Zellen 16 h nach intranukleärer Mikroinjektion von 10^5 Molekülen des EGFP-Plasmids bestimmt wurde (siehe Tab. 1, Abb. 9). Da die Überlebensrate von Zellen mit 10^5 und 10^6 injizierten Reporterplasmiden gleichermassen hoch war, und alle Verdünnungen den gleichen Anteil des nicht-exprimierenden pUC19 Plasmids (10^6 Moleküle/pl; um Viskosität und Plasmidmenge im Ansatz konstant zu halten, und um den Verlust einzelner Reporterplasmide durch Assoziation mit Oberflächen zu vermeiden) enthielten, wurde für die niedrigeren, nichtgrün fluoreszierenden Verdünnungen vergleichbare Überlebensraten angenommen. Bestätigt wurde diese Vermutung durch ein Kontrollexperiment in dem HT1080 Zellen mit pEGFP Verdünnungen mit und ohne einer konstanten Zahl von pCLuc-4 (2×10^4 Moleküle pro Injektionsvolumen) injiziert wurden. Ein Vergleich der Fluoreszenzbilder mit Immunfärbung Aufnahmen fixierter Zellen (mit anti-luciferase-antibody) zeigte vergleichbare Überlebensraten bei niedrigen und hohen pEGFP-N1 Verdünnungen (nicht gezeigt). Ein weiteres Kontrollexperiment mit HT1080 Zellen zeigte unveränderte Detektierbarkeit der Fluoreszenz nach Mikroinjektion von pEGFP-Verdünnungen ohne pUC19-Trägerplasmid, was eine Beeinflussung der Träger-DNA auf die transiente Expression des Reporters ausschliesst, zumindest im getesteten Bereich zwischen 10^2 und 10^5 Molekülen. Eine Toxizität der hohen Dosen prokaryotischer DNA auf die eukaryotischen Zellen kann daher in diesem Experiment ausgeschlossen werden. Primäre menschliche Fibroblasten zeigten eine durchschnittliche Überlebens- und Expressionsrate von 68%, die 16HBE14o- Zellen lagen bei 78% (siehe Tab. 1, Abb. 9). Es wurden pro Serie 6 Reihen mit je 100 Zellen injiziert und mindestens 5 unabhängige Serien pro Verdünnung ausgewertet. Nach Minaschek, (1989) können die teilweise drastischen Unterschiede in den Überlebens-/Expressionsraten der verschiedenen Zelllinien u.a. auf physikalische Faktoren wie Plastizität, Form oder Grösse der Zellen, Reaktion auf mechanischen Stress sowie Verstopfung der Injektionsnadel hervorgerufen werden.

Tabelle 1: EGFP-Expression 16 h nach intranukleärer Mikroinjektion

Zelllinie	1	10	10^2	10^3	10^4	10^5
HT1080 (10 Serien)	0	1	4	30	75	90
16HBE14o- (8 Serien)	0	0	1	28	72	78
prim. Fibroblasten (6 Serien)	0	0	0	25	46	68
prim. Fibroblasten „serum starved“ (5 Serien)	0	0	0	15	40	55
prim. Fibroblasten L-Mimosin (5 Serien)	0	0	0	10	25	40

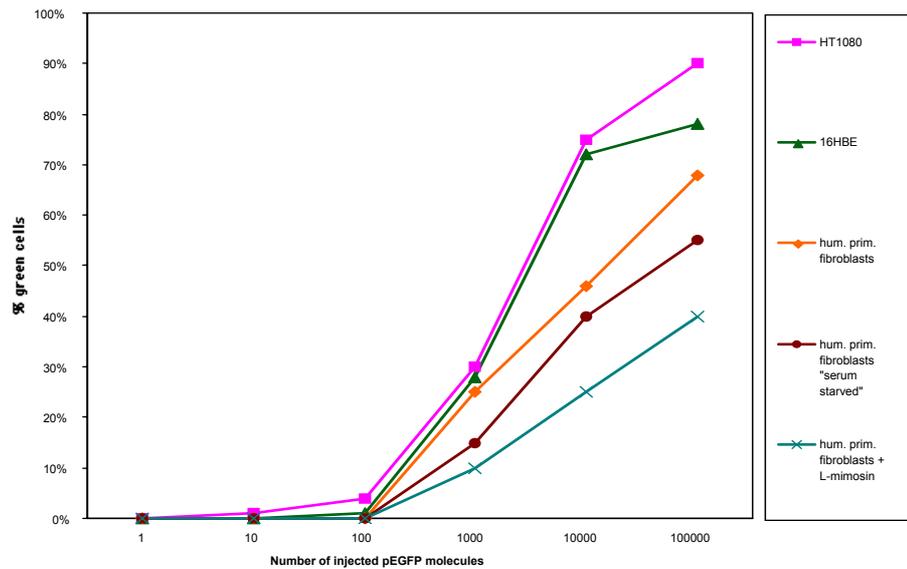


Abbildung 9: EGFP Expression verschiedener Zelllinien nach intranukleärer Mikroinjektion. Die Daten aus Tabelle 1 wurden für jede Zelllinie graphisch aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Zahl der mikroinjizierten pEGFP-N1 Plasmide, auf der x-Achse sind die grünen Zellen in % aufgetragen. Der Nachweis der transienten Expression bei einer Molekülzahl zwischen 1 und 10.000 gleicht einem Roulette-Spiel. Noch zwischen 100 und 10.000 Molekülen werden drastische Unterschiede in der Expression beobachtet, die trotz sicherer Anwesenheit des Reporters zwischen undetektierbar und hell fluoreszierend schwanken können. Erst bei 10.000-100.000 Kopien deutet sich eine Sättigung an.

Diese Daten zeigen klar, dass einzelne Moleküle des EGFP-Reporters auf HAC-Molekülen nicht ausreichen, um durch reine Anwesenheit im Zellkern und transiente Expression eine detektierbare Menge Protein zu bilden. Um dennoch ein Reportersystem auf EGFP-Basis mit der geforderten hohen Sensitivität auf den HAC Vektoren verwenden zu können, wurden multimerere der EGFP-cDNA Expressionskassette als Tandem Arrays kloniert.

3.2 Multimerisierung von DNA- und Expressionsmarkern zum Nachweis niedriger Kopiezahlen *in vivo*

Um multiple Kopien von cDNA Expressionskassetten bzw. DNA-tags für den Nachweis weniger transfizierter Vektormoleküle zu klonieren, wurde die von Willard et al. (Harrington, 1997) für die Klonierung von zentromerischen Tandem Repeatarrays angewandte Technik des expansiven Klonens verwendet. Diese Technik basiert auf der Ligierung multipler Kopien eines Restriktionsfragments mit komplementären, kohesiven Enden bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Restriktionsendonukleasen. Geeignete komplementäre Enzymopaare sind z.B. *Sal I/Xho I*, *Not I/Bsp 120 I*, *BssH II/Mlu I* oder *BamH I/Bgl II*. Die Nukleasen spalten isogene Ligierungsprodukte (z.B. *Xho I-Xho I* bzw. *Sal I-Sal I*) aber nicht heterogene (z.B. *Sal I-Xho I*). Auf diese Weise werden, vorausgesetzt alle Enden werden mit intakter Sequenz ligiert,

ausschliesslich Tandem Repeats in „head-to-tail“ Orientierung erhalten (Abb. 10). Die Anordnung multipler Kopien in Tandem ist zwingend erforderlich, da entgegengesetzt gerichtete („inverted“) Repeats sehr lange, perfekte Palindrome darstellen würden, die durch Klonierinstabilität in *E.coli* nur wenige Kopien zulassen würden (Weber, 1986; Leach, 1987) und spätestens auf HACs zu genomischer Instabilität führen würden. Im menschlichen Genom wurde beobachtet, dass perfekte „inverted“ Repeats mit Längen über wenige 10-100 Basenpaare praktisch nicht vorkommen, oder durch längere Spacer voneinander getrennt vorliegen (Akgun et al, 1997; Bzymek, 2001).

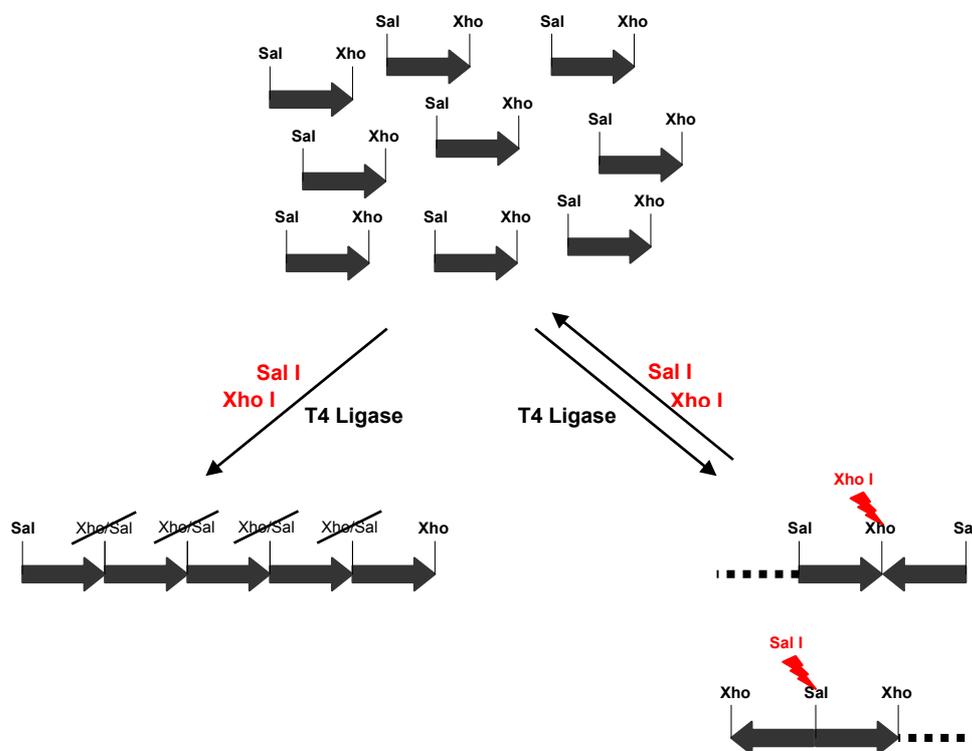


Abbildung 10: Prinzip der expansiven Klonierung: Ausgehend von DNA Fragmenten mit komplementären, kohäsiven Enden (z.B. *Sal* I und *Xho* I) können Tandem Repeat Arrays ligiert werden. Zugabe der entsprechenden Restriktionsenzyme (hier: *Sal* I und *Xho* I, rot) zwingt die Reaktion zur Ligation der Monomere in „head-to-tail“ Anordnung. Wenn DNA Fragmente mit identischen Enden (*Xho* I-*Xho* I oder *Sal* I-*Sal* I) verknüpft werden, wird die entstehende Schnittstelle wieder gespalten. Da die Ligation von *Sal* I /*Xho* I Enden keine der beiden Schnittstellen erzeugt, entstehen multimere Tandem Repeats mit definierter Orientierung.

3.2.1 Multimerisierung eines EGFP-Arrays zum Nachweis transienter Expression

Um einen EGFP-cDNA Array als frühen, transienten Expressionsmarker zu konstruieren, wurde die Expressionskassette aus pEGFP-N1, bestehend aus dem viralen CMV „immediate-early“ Promotor, der EGFP-cDNA und der SV40-Poly A Sequenz, verwendet. Da der Marker später in HAC Vektoren Verwendung finden sollte, mussten Modifikationen vorgenommen werden, um keine unerwünschten Restriktionsschnittstellen (*Not* I, *Bsp* 120 I) in die HAC Konstrukte einzuführen. Ausserdem musste eine *Xho* I Stelle deletiert werden, da die monomeren Fragmente über *Sal* I/*Xho* I Enden ligiert wurden. Alle durchgeführten Modifikationen am Plasmid pEGFP-N1 sind im Abschnitt „Konstruktion von pTGT“ (S. 68) detailliert beschrieben. Per PCR Amplifikation aus pEGFP-delNBX wurden über Oligonukleotide, welche an den Enden die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Sal* I (GGRS) und *Xho* I (GGF) trugen, monomere EGFP Fragmente mit *Sal* I und *Xho* I Stellen an den Enden erzeugt.

Um zu prüfen, wieviele Kopien in einem herkömmlichen „high copy“ Plasmid stabil kloniert werden können, wurden die 1,7 kb langen PCR-Produkte nach *Sal* I und *Xho* I Spaltung in pBluescript subkloniert. Linearisierung des als pBlue-E1 bezeichneten Vektors und Ligierung einer weiteren 1,7 kb EGFP-Kassette erzeugte den Vektor pBlue-E2, der ein 3,4 kb langes EGFP Tandemdimer stabil trug. Ausgehend von diesem 2-mer wurden durch expansive Klonierung Tandem Arrays bis über 15 kb Länge ligiert. Die verschiedenen Multimere wurden isoliert und in pBluescript subkloniert. Auf diese Weise konnte ein stabiles EGFP 4-mer (6,8 kb) in den „high copy“ Vektor pBluescript kloniert werden, ein 6-mer von 10,2 kb Länge erwies sich als instabil (nicht gezeigt). Beide Fragmente wurden aus den Konstrukten pBlue-E4 bzw. E6 per *Sal* I/*Xho* I Spaltung isoliert, bis zu einer Länge von ca. 100 kb (58-mer entspricht 98,6 kb) ligiert (Abb. 11d).

Sowohl die EGFP 4- und 6-mere wie auch ligierte Tandem Arrays verschiedener Längen wurden für die Weiterklonierung per intranukleärer Mikroinjektion in HT1080 auf ihre Funktionalität geprüft. Die für die Überprüfung eingesetzten hohen Kopiezahlen (ca. 10^5 Moleküle/pl) zeigten stets starke grüne Fluoreszenz 2 h nach der Injektion. Tandem Arrays verschiedener Längen (12-mer bis 58-mer) stehen nun für die Klonierung auf HAC Vektoren bereit.

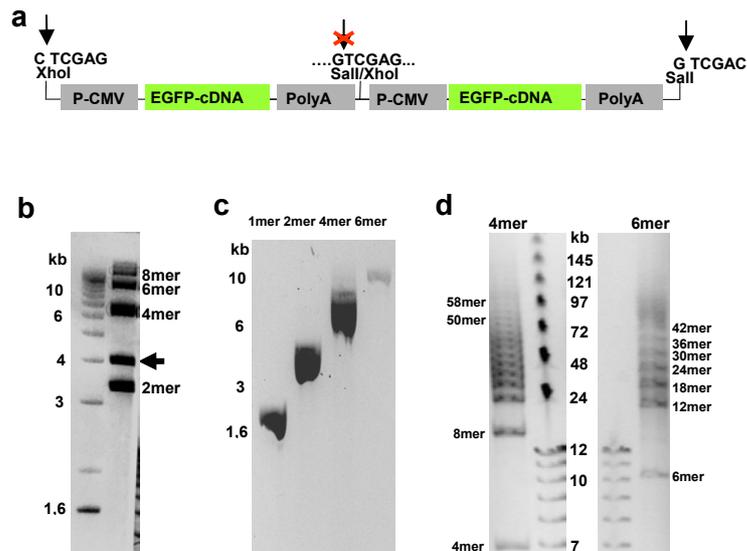


Abbildung 11: Konstruktion multimerer EGFP-cDNA Tandem Repeatarrays. a) Die 1,7 kb lange EGFP-cDNA Kasse aus dem modifizierten Plasmid pEGFP-deINBX (Deletion der Schnittstellen *Not* I, *Bsp*120 I und *Xho* I; siehe S.68) wurde durch PCR Amplifikation mit den Oligonukleotiden GGF (fügt eine *Xho* I Stelle am 5'-Ende ein) und GGRS (fügt eine *Sal* I Stelle am 3'-Ende ein) erzeugt. Nach Spaltung des PCR Produktes mit *Sal* I und *Xho* I wurde das Fragment in pBluescript kloniert (pBlue-E1). pBlue-E1 wurde durch *Xho* I linearisiert und mit einer weiteren 1,7 kb EGFP-Kasse zu pBlue-E2 ligiert. Ausgehend von pBlue-E2 wurde durch *Sal* I/ *Xho* I Spaltung das EGFP 2-mer isoliert (3,4 kb; a) und zu Multimeren ligiert. Dazu wurden ca. 1-5 µg des EGFP 2-mers mit 10 U T4-Ligase und je 0,5 U *Sal* I und *Xho* I in 1x T4 Puffer für 12 h bei 12°C inkubiert und anschliessend je 3 mal für 10 min bei 37°C und 4°C inkubiert. b) Der Ligierungsansatz wurde nach Hitzeinaktivierung (10 min, 65°C) auf einem 1% -igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Ausgehend vom 2-mer zeigt sich eine 3,4 kb Leiter, welche die Multimere repräsentieren. Fragmente der gewünschten Länge konnten aus einer benachbarten Spur (ohne UV-Bestrahlung) isoliert und subkloniert werden. Die Bande bei ca. 4 kb (Pfeil) könnte ein zirkuläres Ligationsprodukt darstellen c) Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel auf dem die isolierten EGFP Monomere (1,7 kb), 2-mer (3,4 kb), 4-mer (6,8 kb) und 6-mer (10,2 kb) aufgetrennt wurden. d) Zur Ligierung längerer Multimere wurde von 4- und 6-meren ausgegangen. Die Produkte wurden mittels PFGE aufgetrennt und je 1/10 der präparativen Spur mit Ethidiumbromid gefärbt. Fragmente der gewünschten Länge werden anschliessend aus der nicht mit UV-Licht bestrahlten Spur elektroeluiert.

3.2.2 Multimerisierung von DNA-tags für direkten Nachweis in Modellzellen

3.2.2.1 Gal4-BD-Array

Neben der Möglichkeit einen DNA Transfer indirekt über transiente Expression eines Reportergens zu bestimmen, kann man die transfizierte DNA auch direkt nachweisen. Dabei kann die DNA selbst mit Fluorochromen gelabelt werden, oder man verwendet Zelllinien die Markerproteine exprimieren, die spezifisch an eine DNA Sequenz (tag) binden die auf dem HAC

Konstrukt enthalten ist. In der Literatur sind zahlreiche DNA-bindende Proteine sowie deren Erkennungssequenzen beschrieben. Ein sehr gut charakterisiertes System kommt im „Yeast two-hybrid“ System zum Einsatz. Dabei werden zwei Proteindomänen, die N-terminale DNA-Bindedomäne und eine starke, C-terminal lokalisierte Transkriptions-Aktivator-Domäne des Gal4-Proteins, das bei der Regulation der Gene des Galactose Stoffwechsels von *Sacharomyces cerevisiae* eine wichtige Rolle spielt, eingesetzt (Fields, 1989). Dieses System wird im Allgemeinen dazu verwendet, Protein-Protein Wechselwirkungen zu analysieren. Wir zielen dagegen auf die spezifische Bindung der Gal4-DNA Bindedomäne zu seiner DNA Zielsequenz, der Gal4-Bindedomäne (Gal4-BD). Es galt zu prüfen, ob ein Fusionsprotein aus Gal4 und einem fluoreszierenden Protein (z.B. EGFP oder ds-Red) ausreichend sensitiv ist, um „low copy“ Gentransfer von Gal4-BD tragenden HAC Vektoren nachzuweisen. Da nicht zu erwarten ist, dass eine oder wenige Kopien der Gal4-BD auf den Vektoren ausreicht, um detektierbare Mengen an markiertem Gal4-Protein zu binden, sollten mit der Methode des expansiven Klonens Multimere der Gal4-BD ligiert werden. Dazu wurde ein ds-Oligonukleotid auf Grundlage der von Giniger, Varnum und Ptashne (1985) beschriebenen DNA-Erkennungssequenz für das Gal4-Protein synthetisiert, welches als 61 bp Fragment mit komplementären *Sal* I und *Xho* I Enden zwei intakte Kopien der Gal4-BD trägt (Abb. 12b). Zusätzlich ergänzen sich die 3' und 5' Bereiche jedes Oligonukleotids bei Ligierung zu einer weiteren intakten Gal4-BD. Auf dem Oligonukleotid konnte ausserdem eine 17 bp Sequenz mit hoher Homologie zu funktionellen CENP B Boxen (Ohzeki, 2002) im Linkerbereich der beiden Gal4-BD durch den Austausch zweier Basen, die nicht an der Bindung des Gal4-Proteins beteiligt sind, eingefügt werden. Der Gal4-BD Array sollte deshalb, zusätzlich zum Gal4-tag, mittels Immunfärbung mit Antikörpern gegen CENP-B oder mit einem Fusionsprotein aus CENP-B und EGFP bzw. ds-Red nach Transfektion nachgewiesen werden können.

Eine weitere Eigenschaft des Gal4-Proteins könnte dazu beitragen den Kerntransport von HAC Vektoren, welche die Gal4-BD Sequenz tragen, zu erleichtern. Da die Überwindung der Kernmembran eine physikalische Barriere des nicht-viralen Gentransfers darstellt, besteht ein enormes Interesse an der Identifizierung geeigneter Methoden, DNA Moleküle effizient in den Nukleus zu transportieren. Das Gal4-Protein trägt an seinem N-terminalen Ende eine „Nuclear-Localisation-Sequence“ (NLS), die nach spezifischer Bindung von Importin β sowie weiterer Proteine, den aktiven Kerntransport des im Nukleus wirkenden Gal4-Proteins vermitteln (Chan, 1998). Wenn sich aufgrund der grösseren Anzahl gebundener Gal4-Proteine die Aufnahme der DNA in den Zellkern steigern liesse, wäre dies ein wichtiger Beitrag für den physikalischen Gentransfer.

3.2.2.2 Lac-Operator-Array

Aus dem Galaktose-Verwertungsweg von *E.coli* stammt ein weiteres gut charakterisiertes System eines DNA-bindenden Proteins, dem Lac-Repressor, und seiner DNA Erkennungssequenz, dem Lac-Operator. Robinett et al (1996) konnte zeigen, dass ein Array mit 256 Kopien des Lac-Operators auf einem Plasmid mit DHFR-Selektionsmarker nach Transfektion und Erzeugung stabiler Zelllinien durch ein Lac-Repressor-EGFP Fusionsprotein *in vivo* nachgewiesen werden kann. Bei der Integration des Vektors findet nach Selektion mit Methotrexat eine für das DHFR-System typische Amplifikation des Transgens am Integrationsort statt, was den Nachweis erleichtert. Zwar konnten die Autoren zeigen, dass schon 256 Kopien des Lac-Operators ausreichen, um detektierbare Mengen des Fusionsproteins zu binden, doch für die Verwendung in HAC Vektoren muss die Sensitivität deutlich gesteigert werden, da für die episomalen HACs keine Integrationsstelle auf einem langen endogenen Chromosom als Orientierungshilfe in Frage kommt. Um die Lac-Operator Sequenz als direktes DNA-tag auf HAC Vektoren zu verwenden, wurde das 256 Kopien tragende Lac-Operator Array (9,7 kb) als *Sal* I/*Xho* I Fragment aus dem Plasmid pSV8.32 (Robinett, 1996; von Steffen Dietzel freundlicherweise zur Verfügung gestellt) isoliert und mittels expansiver Klonierung auf über 70 kb ligiert, was mehr als 2.000 Kopien des Lac-Operators entspricht (Abb. 13) Arrays verschiedener Länge wurden mittels PFGE isoliert und stehen nun für Klonierungen auf HAC Vektoren bereit.

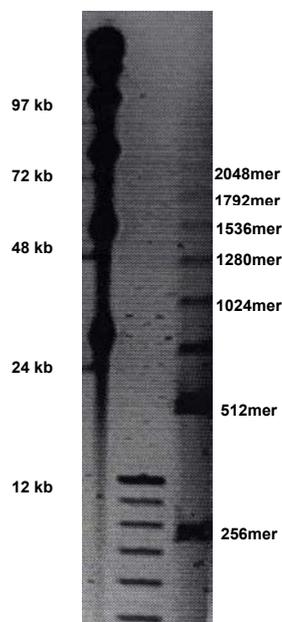


Abbildung 13: Ligierung der Lac-Operator Arrays. Das 9,7 kb lange 256-mer wurde aus dem Plasmid pSV-8.32 per *Sal* I/*Xho* I Spaltung isoliert und mit 10 U T4 Ligase und je 0,5 U *Sal* I/*Xho* I in 1x Ligasepuffer über Nacht bei 12°C zu Tandem Arrays über 70 kb Länge ligiert und per PFGE aufgetrennt. Gezeigt ist die Ethidiumbromid gefärbte Spur zur Überprüfung der Ligierung. Aus der benachbarten, nicht-UV bestrahlten Spur werden die längeren Multimere isoliert.

3.3 Konstruktion verbesserter HAC Vektoren

Das Ziel der HAC Vektor Optimierung ist die ungehinderte Eingliederung der transfizierten Konstrukte in das zelleigene Genom als episomale Einheit und die unmittelbare Aufnahme aller genetischen Funktionen (z.B. Replikation, Zentromerfunktion, Regulation der Genexpression). Derzeitig verwendete Vektoren werden nach Transfektion in einem weitgehend unverstandenen Prozess der Verkettung der Input DNA Moleküle durch zelluläre Reparatur/Rekombination zu längeren Einheiten verknüpft. Offenbar bestimmt die Notwendigkeit solcher Vorgänge bis zur Formierung funktionellen Chromatins die Klonformierungseffizienz, die zurzeit nur unwesentlich über der Effizienz einer zufälligen Integration eines Selektionsmarkers in endogene Chromosomen (herkömmlicher stabiler Gentransfer) liegt. Demzufolge müssen die Konstrukte selbst und die Anordnung der funktionellen Sequenzeinheiten in Transfektionsassays schrittweise optimiert werden. Unsere Gruppe konzentrierte sich auf die Verwendung des ditelomerischen PAC Vektors pTAT-Bs (Schindelhauer, 1999) für die Klonierung chromosomaler Elemente, welcher gegenüber den Vektoren erster Generation eine deutliche Steigerung der *de novo* HAC Formierung erreicht. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die weitere Verbesserung dieses Basis HAC Vektors, der als linearisiertes Fragment zwei telomerische Enden von 810 bp besitzt (Abb.3; Abb.14).

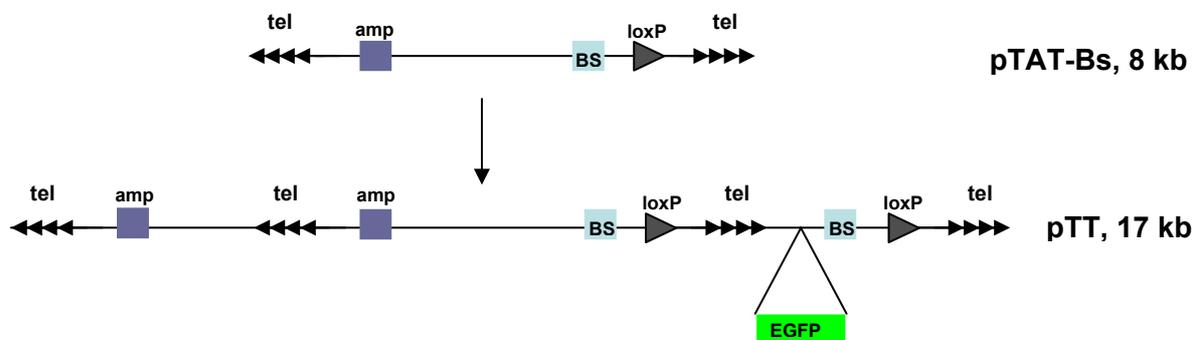


Abbildung 14: Konstruktion des tetratelomerischen PAC Vektors pTT aus dem Basis HAC Vektor pTAT-Bs (nicht maßstabgetreu). Die Bereitstellung duplizierter Vektorsequenzen soll die intramolekulare Rekombination/Reparatur erleichtern, von der angenommen wird, dass sie einen positiven Einfluss auf die Stabilität vererbbarer DNA-Einheiten (Chromosomen) hat. So könnten, z.B. später in HAC tragenden Zellen auftretende Strangbrüche in den „single copy“ Vektorsequenzen, die im gesamten menschlichen Genom nicht vorkommen, mithilfe der benachbarten, identischen Sequenzabschnitte effizient durch homologe Rekombination repariert werden. Es ist bekannt, dass bereits ein einziger nicht-reparierter Doppelstrangbruch zum Zellzyklusarrest führt. Die Duplikation der beiden telomerischen Repeats wurde vorgenommen, um die Formierung der natürlichen Konfiguration menschlicher Telomere in mehrere Kilobasen großen Duplex-Loops (den T-Loops) zu erleichtern. Beide prinzipiell hilfreichen Struktureigenschaften könnten im Vorläufervektor nur durch sekundäre Amplifikationen erwartet werden. Die zusätzliche Klonierung einer EGFP Expressionsskassette dient dem Nachweis HAC tragender Zellen. Beide Vektoren tragen „unique“ Restriktionsschnittstellen (*Bsp*120 I, *BssH* II, *Sal* I) für die stabile Klonierung langer, repetitiver Zentromer DNA (Tandem Repeats) und genomischer Gene mit ihren in der Regel >50% repetitiven Sequenzanteilen („interspersed repeats“).

Die Klonierung repetitiver, telomerischer Sequenzen $(TTAGGG)_{n=135}$ dieser Länge in entgegengesetzter Orientierung erfordert zwingend „unit copy“ Status des Vektors in Bakterien, um intermolekulare Rekombinationen zu vermeiden. In zirkulärer Form (siehe Einleitung, Abb. 3) befinden sich zwischen den beiden telomerischen Repeats ca. 8.700 bp PAC Sequenzen mit dem P1-ori sowie einem Kanamycin Resistenzmarker für die stabile Vermehrung in *E.coli*. Durch die Anordnung eines zweiten prokaryotischen Selektionsmarkers (amp-tel-kana) kann während der *E.coli* Wachstumsphase gegen Deletionen zwischen den Telomeren selektioniert werden. Die Duplikation von Vektor- und Telomersequenzen könnte die intramolekulare homologe Rekombination erleichtern, von der angenommen wird, dass sie einerseits die initiale Reparatur der freien DNA Enden und die T-Loop Formierung unterstützten könnte, und andererseits eine fortwährende Reparatur von Strangbrüchen erleichtern könnte, und somit zu einer verbesserten HAC Formierungseffizienz und Stabilität beitragen könnte (Abb. 14, 36). T-Loops sind an Telomeren lokalisierte D-Loops (Duplex), bei denen der endständig überhängende 3' Einzelstrang in weiter proximal liegende Bereiche einwandert und mit dem komplementären Strang der internen Doppelhelix paart. Diese „triple-Helix“ Struktur wird durch spezifische Telomer bindende Proteine (TBPs) stabilisiert (Griffith, 1999). Die Gruppe um Titia de Lange konnte zeigen, dass in Lymphozyten telomerische Repeats von ca. 1 kb Länge in der Lage sind T-Loops zu bilden. In früheren Arbeiten zur Telomerformierung konnte gezeigt werden, dass bereits durch die Transfektion von ca. 0,5 kb und Integration in ein Chromosom ein *de novo* Telomer erhalten werden kann, das durch Telomeraseaktivität "heilen" kann und verlängert wird (Farr, 1991; Itzhaki, 1992; Hanish, 1994). Die Anordnung zweier 810 bp Telomere an jedem HAC Ende in jeweils gleicher Orientierung und einem Abstand von mehreren kb, könnte die unmittelbare Bildung von T-Loops auf HACs erheblich erleichtern.

Der neue tetratelomerische Vektor wurde eingesetzt, um zwei unterschiedliche alpha-Satelliten DNA Familien, die nebeneinander am Zentromer des Chromosoms 5 als lange Tandemarrays vorkommen, in ihrer *de novo*-Formierungseffizienz zu vergleichen. Die Arrays wurden von Tobias Schwarz aus der Arbeitsgruppe isoliert. Sie zeigen mit der Restriktionsnuklease *Eco* RI homogene „higher order repeats“ des Typ I (0,34 kb, 2-mer) und Typ II (2,2 kb, 13-mer) von Chromosom 5. Ein EGFP-cDNA Marker sollte initiale Anwesenheit von DNA im Zellkern und Stabilität der HACs durch Expression anzeigen. Über die Basis-Vektor Entwicklung hinaus, sollte die Klonierung eines genomischen CFTR-Expressionskonstruktes zum einen der Analyse des intakten DNA Transfers dienen und zum anderen ein CFTR-Expressionsmodell schaffen, welches z.B. zur Identifizierung stark CFTR-exprimierender Zellen im Organismus und in der Zellkultur verwendet werden kann. Zuletzt genannte Punkte sind wichtige Schritte für den

intakten Transfer und einfachen funktionellen Nachweis hin zu einer sicheren und effizienten CF-Gentherapie auf HAC Basis.

3.3.1 Konstruktion des tetratelomerischen HAC Vektors pTT

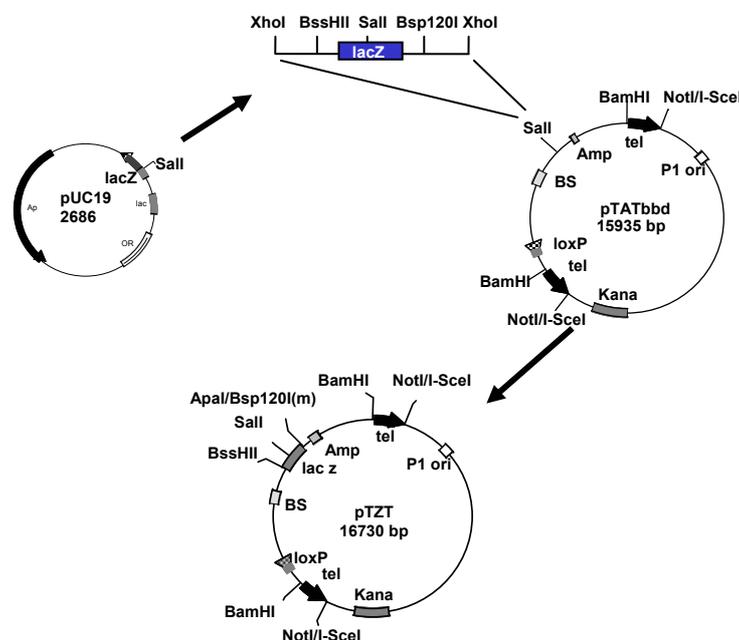
Der von Dirk Schindelhauer entwickelte ditelomerische PAC Vektor pTAT-Bs (17.041 bp; basierend auf dem „unit-copy“ P1 Replikon des Vektors PCYPAC2N; Ioannou, 1994) wird in der Arbeitsgruppe dazu verwendet die chromosomalen Komponenten (cen, tel, ori, Gene) stabil zu klonieren. Nach *Not* I oder *I-Sce* I Spaltung kann ein lineares, mit telomerischen Enden versehenes Molekül erzeugt werden. Als weitere nützliche Komponenten sind ein Blasticidin-S Resistenzgen, für Selektion in eukaryotischen Zellen, sowie die 34 bp *loxP* Sequenz, zur Cre-Rekombinase vermittelten Rekombination (Abremski, 1983) auf dem Vektor enthalten. Für die Selektion in *E.coli* stehen Ampicillin- und Kanamycin Resistenzgene zur Verfügung.

Um diesen Basis HAC Vektor weiter zu entwickeln, sollte durch die Bereitstellung duplizierter Vektorsequenzen auf dem Konstrukt die intramolekulare, homologe Rekombination ermöglicht werden. Die Beobachtung, dass *de novo* erzeugte HACs in der Regel aus verketteter oder amplifizierter Input DNA zusammengesetzt sind (Harrington 1997; Warburton, 2000; Lipps, 2003) legte die Vermutung nahe, dass die Verkettung notwendig sein könnte, um eine entweder längere, oder repetitive Struktur aus den „single copy“ Vektorsequenzen zu bilden, die besser mit stabilen Chromosomen vereinbar wäre. So könnten, durch die Bereitstellung duplizierter Sequenzen innerhalb eines einzigen nicht-verketteten Input Moleküls, homologe Rekombinationen stattfinden, die bei der Formierung des Chromatins, der Replikation, und der Reparatur von DNA-Brüchen eine wichtige Rolle für die Aufnahme der Funktion und die stabile Vererbung spielen könnten. Um die T-Loop Formierung der Konstrukte zu erleichtern, sollten zwei weitere, homogene telomerische Repeats (TTAGGG)_{n=135} innerhalb der bestehenden Telomerenden in gleichgerichteter Anordnung kloniert werden. Zum schnellen, transienten *in vivo* Nachweis des Vektors sollte ausserdem eine EGFP-cDNA Kasette auf dem Vektor inseriert werden. Die Integration von weiteren „unique restriction sites“ in den Vektor dient der erleichterten Klonierung von DNA Sequenzen, um diese als HAC Komponenten zu testen (z.B. α -sat Arrays, genomische Gene oder Marker-Konstrukte). Die Klonierung umfasste mehrere Vorläuferkonstrukte von pT \underline{Z} T (\underline{Z} =lacZ) über pT \underline{G} T (\underline{G} =grün) zu p \underline{II} I (tetratelomerisch).

3.3.1.1 Klonierung einer lacZ Kasette in pTAT

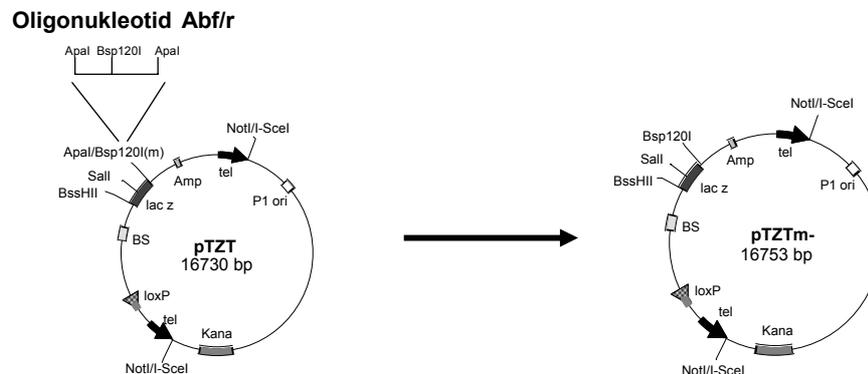
Um die angestrebten Modifikationen am Vektor pTAT-Bs (17.041 bp) vorzunehmen, mussten zuerst die beiden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *BssH* II (Position 2 in pTAT-

Bs) und *Bsp* 120 I (Position 15.915 in pTAT-Bs) entfernt werden, da diese spätere Klonierschritte stören würden. Dazu wurde pTAT-Bs mit *Bsp* 120 I und *Bss* HII gespalten, auf einem 0,8% Gel vom 1.108 bp Fragment getrennt und mit einem synthetischen Oligonukleotid mit komplementären Enden (BBDF/BBDR) zur kurzen Zwischenversion pTATbbd ligiert (pTATbbd, 15.935 bp). Um nachfolgende Klonierschritte zu ermöglichen, wurde die *lacZ*-Kassette aus dem Plasmid pUC19, die eine *Sa*I Stelle enthält (in der *lacZ* cDNA) und mit *Bsp* 120 I und *Bss* HII Stellen über die Oligonukleotidprimer LZF/LZR ausgestattet wurde, in die *Sa*I Stelle von pTATbbd kloniert. Da die Oligonukleotidprimer LZF/LZR so konstruiert waren, dass sie an den Enden des PCR Produktes *Xho*I Schnittstellen inserierten, konnte das aus pUC19 amplifizierte PCR Produkt (795 bp) in die *Sa*I Stelle von pTATbbd kloniert werden, wobei diese nicht erhalten wurde.



Der resultierende Vektor wurde pTZT (16.730 bp) genannt. Testspaltungen zeigten jedoch, dass die über den Primer eingefügte *Bsp* 120 I Schnittstelle, in welche DNA Fragmente (z.B. α -sat Arrays) mit kompatiblen *Not* I-Enden kloniert werden sollten, im verwendeten *E. coli* Stamm DH10B methyliert war, und mit *Bsp* 120 I nicht gespalten werden konnte. Das Restriktionsenzym *Apa* I, ein Isoschizomer von *Bsp* 120 I mit einer alternativen „cleavage site“, ist nicht methylierungssensitiv und konnte deshalb zur Spaltung von pTZT verwendet werden. Um die benötigte *Bsp* 120 I Schnittstelle in den Vektor zu integrieren, wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid (Abf/r; 23 bp), mit beidseitigen *Apa* I Enden und einer *Bsp* 120 I Schnittstelle in der Mitte, in die *Apa* I Stelle von pTZT kloniert. Der resultierende Vektor

(pTZTm-) hatte eine Länge von 16.753 bp. Um eine erneute Methylierung der *Bsp* 120 I Stelle zu vermeiden, wurde das Konstrukt in den *dam*⁻ / *dcm*⁻ *E.coli*-Stamm GM2929 transferiert.

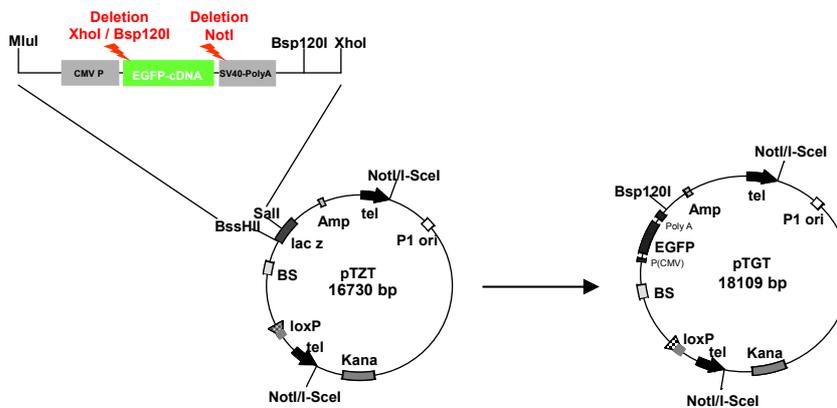


3.3.1.2 Konstruktion von pTGT

Bevor die EGFP-cDNA Expressionskassette aus dem Plasmid pEGFP-N1 in den Vektor pTZT kloniert werden konnte, mussten verschiedene Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen aus der EGFP-cDNA entfernt werden, da diese spätere Klonierschritte stören würden. Um die Schnittstellen *Xho* I und *Bsp* 120 I aus der „Multiple Cloning Site“ (MCS) zu entfernen wurde das Plasmid pEGFP-N1 mit *Nhe* I und *Bam* HI gespalten, S1-Nuklease behandelt, um glatte Enden zu erzeugen und mit T4-Ligase religiert. Das resultierende Konstrukt wurde sequenziert und zeigte eine Deletion zwischen den Basenpaaren 590 und 661 der pEGFP-N1 Sequenz, ausserhalb der EGFP-cDNA. Um die *Not* I Schnittstelle an Position 1.400 zu deletieren wurde das Plasmid *Not* I gespalten und S1-Nuklease behandelt (pEGFP-delNBX), was zu einem um 2 Aminosäuren trunkierten Protein (LYKX in pEGFP-N1 zu LX in pTT am C-Terminus), mit normaler Funktion (durch intranukleäre Mikroinjektion geprüft) führte.

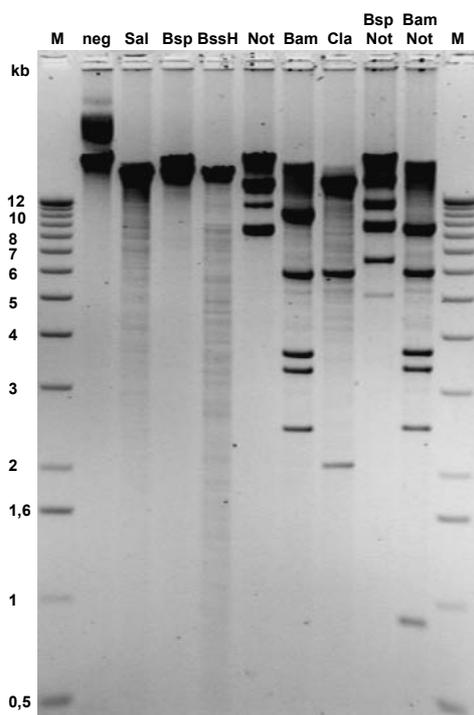
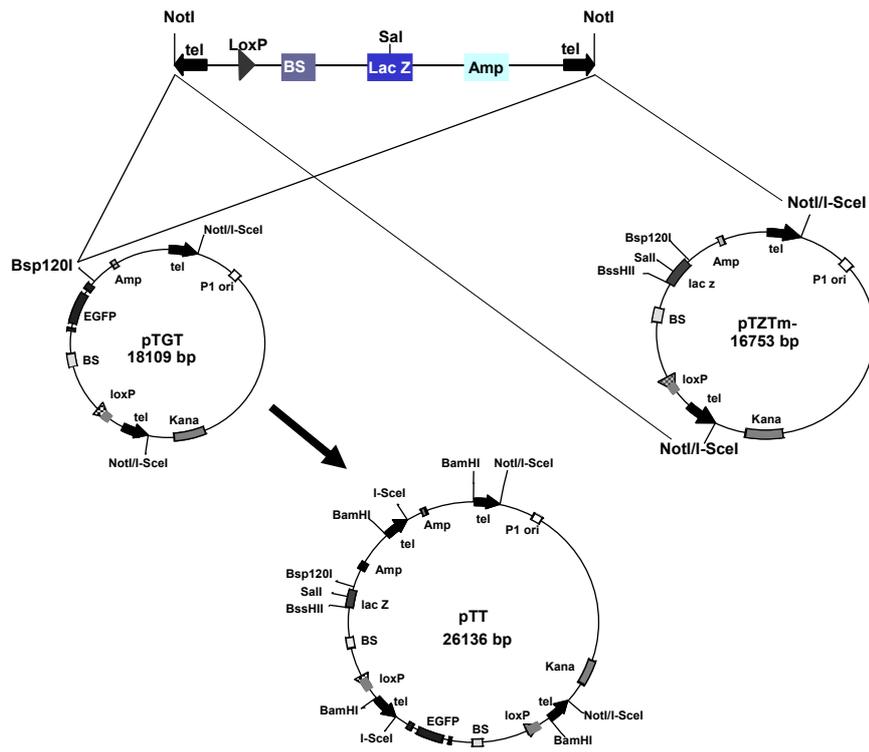
Um die modifizierte EGFP-cDNA Kassette in die *Sal* I und *Bss* HII Stelle von pTZT zu klonieren, wurden Oligonukleotidprimer konstruiert, welche *Mlu* I (komplementär zu *Bss* HII; Primer GZf) und *Xho* I (komplementär zu *Sal* I; Primer GZr) Schnittstellen in die Enden der PCR Produkte inserierten. Nach PCR Amplifikation wurde das Produkt *Xho* I/*Mlu* I gespalten (1.722 bp), gereinigt und in den *Sal* I/*Bss* HII gespaltenen pTZT (*Bsp* 120 I methyliert!) ligiert. Da das Oligonukleotid GZr ausserdem eine *Bsp* 120 I Schnittstelle enthielt, konnte der Vektor an dieser *Bsp* 120 I Stelle gespalten werden, um kompatible *Not* I Fragmente klonieren zu können. Der resultierende Vektor wurde pTGT (18.109 bp) genannt. Mikroinjektion von ca. 1.000 Kopien des per QIAGEN-Miniprep gereinigten pTGT in Kerne von HT1080 Zellen erzeugte grün fluoreszierende Zellen mit einer Effizienz und Intensität vergleichbar der des pEGFP-N1

Plasmids (ca. 1.000 Moleküle). Dies zeigt, dass die Modifikationen die Funktion der transienten Expression der EGFP-Kassette nicht oder nur unwesentlich beeinflusste.



3.3.1.3 Konstruktion von pTT

Der Vektor pTGT erfüllt nun die geforderten Voraussetzungen (eine *Bsp* 120 I Schnittstelle und Expression von EGFP) für die Klonierung der zusätzlichen Vektor- und Telomersequenzen, die vom Konstrukt pTZTm- bereitgestellt wurden. pTZTm- wurde *Not* I gespalten, um ein lineares, mit telomerischen Enden versehenes Fragment von 8.027 bp Länge zu erzeugen. Dieses wurde in die *Bsp* 120 I Stelle von pTGT kloniert, sodass ein tetratelomerischer PAC Vektor (pTT) von 26.136 bp Länge entstand (siehe Sequenz im Anhang). Die *Bsp* 120 I Stelle ist im Konstrukt pTT für die Klonierung langer *Not* I Fragmente (α -sat-Arrays oder genomische Gene aus PACs) vorgesehen. Ausserdem wurde eine blau/weiss selektionierbare *Sa* I Schnittstelle und eine *Bss* HII Schnittstelle durch Einfügung der *lacZ* Kassette bereitgestellt, was die Klonierung verschiedener zusätzlicher Fragmente (z.B. Marker Arrays, genomische Gene und α -sat-Arrays in einem Konstrukt) und die Herstellung genomischer DNA-Banken in pTT erlaubt. Die Funktion der EGFP-Kassette wurde durch intranukleäre Mikroinjektion in HT1080 Zellen überprüft.



Enzym	Position der Schnittstellen	Länge der Fragmente in bp
Sal I	20.236	26.136
Bsp 120I	20.659 24.061 (m)	26.136
Bss H II	19.911	26.136
Not I	900 9.600	8.700 17.436
Bam HI	7 (19) 10.482 16.498 20.224 22.752 (22.764)	2.528 3.372 3.726 6.016 10.463
Cla I	8.750 10.853 16.869	2.103 6.016 18.017
Not I + Bsp 120I	900 9.600 20.659	8.700 6.377 11.059

Abbildung 15: Kartierung von pTT: Für die Kartierung wurden ca. 500 ng von pTT mit den angegebenen Enzymen gespalten (neg, ungespalten) und auf einem 0,8% -igen Agarosegel aufgetrennt. Die Längen der Spaltprodukte stimmte mit den errechneten Fragmentlängen (Software: HUSAR Mapsort) überein. Die methylierte *Bsp* 120 I Schnittstelle ist gekennzeichnet (m). Bei nahe zusammenliegenden Schnittstellen (*Bam* HI) ist die zweite Schnittstelle in Klammern aufgeführt. Zur besseren Übersicht sind nicht alle in der Tabelle aufgeführten Schnittstellen in der Grafik (nicht maßstabsgetreu) eingezeichnet.

3.3.2 Klonierung homogener α -sat-Arrays in pTT und pTAT-Bs

Die Formierung eines aktiven Zentromers aus „nackter“, transfizierter α -sat DNA ist ein artifizieller Vorgang, der nicht hinreichend verstanden wird. Während bei der *de novo* Zentromer Formierung die „higher order“ Struktur und die Homogenität der Arrays eine fundamentale Rolle spielen (Schueler, 2001; Grimes, 2002b; Rudd, 2003), sind für die Aufrechterhaltung eines aktiven Zentromers epigenetische Mechanismen verantwortlich (Saffery, 2000/2002; Amor, 2002). Auf die Fähigkeit nach Transfektion ein funktionelles Zentromer *de novo* zu formieren, wurden bisher chromosomenspezifische α -sat Arrays getestet, darunter Sequenzen der Chromosomen 2, 8, 11, 15, 19, 21, 22, X, und Y. (Harrington, 1997; Ikeno, 1998; Henning 1999, Ebersole, 2000; Schueler, 2001; Grimes, 2002b; Mejia, 2002; Ohzeki, 2002; Kouprina, 2003). So verwendete die Gruppe um Willard (Harrington, 1997), bei der Erzeugung der ersten HACs, synthetische α -sat-Arrays von Chr.17. Diese wurden durch eine „directional cloning“ (expansive Klonierung) Strategie, ausgehend von einem per PCR amplifizierten 2,7 kb „higher order repeat“ von Chr.17 (*D17Z1*), konstruiert. Ein auf gleiche Art erzeugter Y-chromosomaler α -sat Array erwies sich als ungeeignet um *de novo* Zentromere auf HACs zu bilden. Ikeno et al testete zwei unterschiedliche α -sat Arrays von Chr.21 (α 21-I und α 21-II) auf ihre Kompetenz, künstliche Chromosomen zu erzeugen. Es zeigte sich, dass nur der homogene α 21-I Array (enthält CENP-B boxen, eine 17 bp Sequenz welche von CENP-B, Centromere binding Protein B, spezifisch gebunden wird), nicht aber der divergierte α 21-II Array (enthält keine CENP-B Boxen) dazu in der Lage war (Ikeno, 1998).

Neuere Arbeiten der Gruppe um Masumoto (Ohzeki, 2002) zeigten ebenfalls, dass ausschliesslich homogene α -sat Arrays welche CENP-B Box enthielten zur *de novo*-Formierung eines funktionellen Zentromers in der Lage waren. Da sich α -sat Familien beträchtlich in ihrer Effizienz zur Erzeugung von *de novo* HACs unterscheiden (Harrington, 1997; Ikeno, 1998; Ebersole, 2000; Mejia, 2002; Grimes, 2002b; Rudd, 2003), könnte die Identifizierung von neuen, effizienteren α -sat Sequenzen (im Sinne der *de novo* Zentromer Formierung) der Optimierung eines HAC Vektors dienen.

Um verschiedene homogene α -sat Arrays als zentromerische Komponente für *de novo* HACs zu testen und um den tetratelomerischen PAC pTT mit seinem ditelomerischen Vorläufer pTAT-Bs zu vergleichen, wurden ca. 120 kb lange Tandem Repeats der Chr.5 spezifischen α -sat vom Typ I (E_1 , 2-mer aus 171 bp α -sat Monomeren) und Typ II (F_1 , 13-mer aus 171 bp α -sat Monomeren) als *Not* I Fragmente in die *Bsp* 120 I Schnittstellen von pTT und pTAT-Bs kloniert. Da in der Abteilung ein ringförmiges Markerchromosom in Lymphozyten eines Patienten identifiziert wurde (Schuffenhauer, 1996), das Typ I und Typ II Sequenzen enthielt, aber ein deletiertes Chromosom 5 zurückliess, das nur Typ II Sequenzen enthielt, das stabil vererbt wird (Brenda Grimes, unveröffentlicht), lag damals, ohne eine klare Vorstellung von epigenetisch aktivierbaren Neozentromeren, der Verdacht nahe, dass Typ II allein für die Zentromerfunktion verantwortlich sein könnte, und möglicherweise besser geeignet wäre als Typ I, *de novo* Zentromere zu formieren. Die homogenen Arrays E_1 (ca. 116 kb von Typ I, ca. 341 Repeats) und F_1 (ca. 125 kb von Typ II, ca. 57 2.2 kb Repeats), die von Tobias Schwarz in der Arbeitsgruppe aus einer PAC Bank isoliert wurden, wurden durch *Not* I Spaltung und PFGE aus den PACs isoliert und in die *Bsp* 120 I gespaltenen, dephosphorylierten PAC-Vektoren pTAT-Bs und pTT kloniert. Array E_1 erzeugte 11 Kolonien, welche mittels PCR mit dem für Typ I-spezifischen Oligonukleotidpaar 5IF/5IR getestet wurden. Drei Kolonien (8, 9 und 10) zeigten die charakteristischen 340 bp Repeats (Daten nicht gezeigt) und wurden in Agaroseblöckchen gegossen, gespalten und im PFG aufgetrennt, um Deletionen als Klonierartefakte auszuschliessen. Alle 3 Klone enthielten die ursprüngliche Länge von ca. 116 kb des E_1 α -sat Arrays. Die Klonierung von 125 kb des Array F_1 resultierte in 29 Kolonien von denen 12 die mit dem Primerpaar 5IIF/5IIR amplifizierbare Bande von 1.881 bp zeigten, zwei Klone (17 und 25) wurden in Plugs gegossen, nach Spaltung per PFGE überprüft und zeigten eine Länge von ca. 142 kb (Daten nicht gezeigt). Durch Kombination der Oligonukleotidprimer AmR und LZR, die auf dem pTT Vektoranteil die *Bsp* 120 I Klonierstelle flankieren, und mit den Primern 5IF und 5IR (bzw. 5IIF und 5IIR) konnte durch PCR Analyse die Orientierung der Tandem Repeats relativ zum Vektor pTT bestimmt werden. Dies ist von Bedeutung, da das E_1 Array mit dem F_1 Array im tetratelomerischen pTT, als auch im ditelomerischen Vorläufer pTAT-Bs, hinsichtlich seiner Klon- und HAC Formierungseffizienz verglichen werden sollte. Um möglicherweise unterschiedliche epigenetische Einflüsse je nach Orientierung der Tandem Repeats auf die Expression des Resistenzmarkers (Blasticidin-S) (und umgekehrt, der Expression auf die *de novo*-Formierung) auszuschliessen, mussten die Konstrukte die gleiche relative Richtung der α -sat Arrays zum BS-Gen aufweisen.

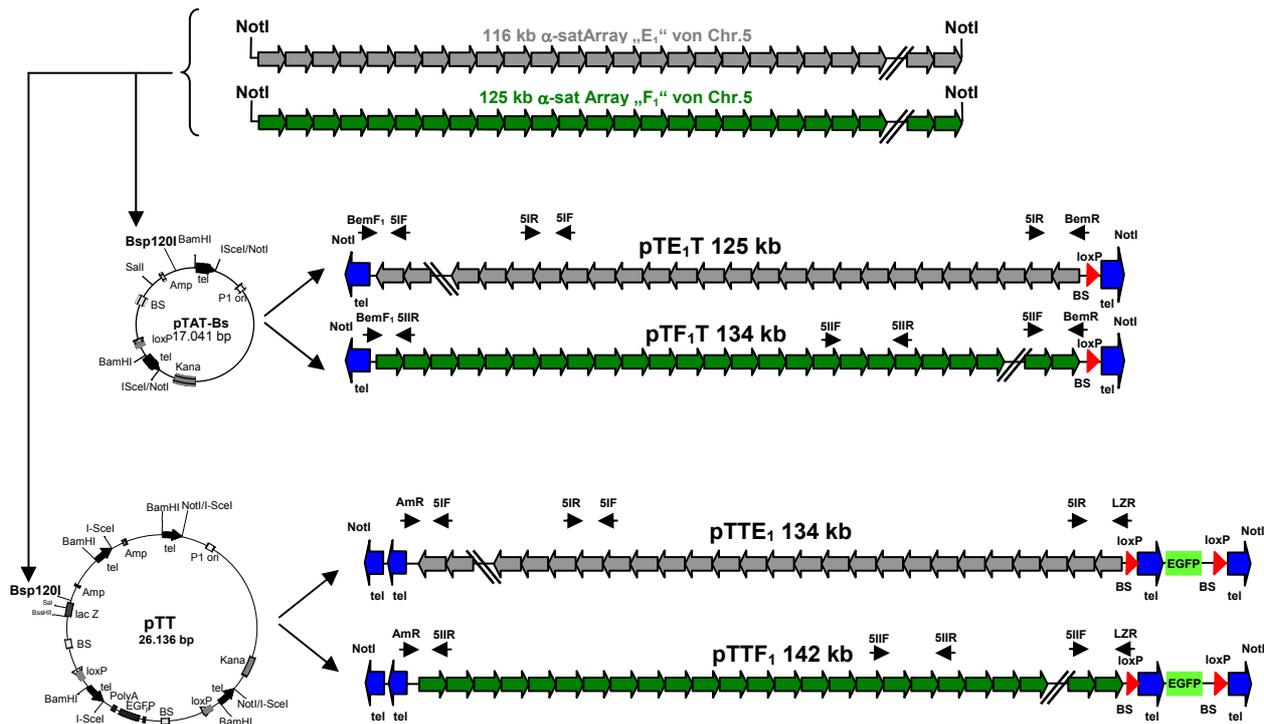


Abbildung 16: Schema der Klonierung zweier α -sat Arrays von Chr.5 in die Vektoren pTT und pTAT-Bs. Arrays vergleichbarer Länge (E₁, graue Pfeile; F₁, grüne Pfeile) wurden aus PACs per Not I Spaltung und PFGE aufgetrennt und mittels Elektroelution isoliert. Über die Not I Stelle wurden sie in die mit Bsp 120 I gespaltenen Vektoren kloniert (pTT und pTAT-Bs). Mit Not I wurden die linearen, telomerisierten HAC-Vektoren erhalten. Primerpaare die zur Bestimmung der Orientierung der Arrays verwendet wurden sind angegeben. Die Pfeile geben die Orientierung in Bezug auf die CENP B Box (5'-TCC CGT TTC CAA CGA AG und Varianten) wieder (F-Konstrukte in „forward“, E-Konstrukte in „revers“; nicht maßstabgetreu).

Da eine Lipofektion zweier pTTE₁ Konstrukte (ca. 100 ng auf 1×10^6 HT1080 Zellen) mit verschiedener α -sat Array Orientierung (Transfektion der Klone 9 und 10) keinen Unterschied der nach 2 Wochen BS Selektion gebildeten Koloniezahlen zeigte (Daten nicht gezeigt), war das ein Hinweis darauf, dass die Orientierung des Arrays keinen Einfluss auf die Klonformierung durch Hemmung der Expression des BS-Gens hat. Aus diesem Grund wurden für die folgenden Transfektionsversuche die beiden in obiger Grafik aufgeführten, neu entwickelten Konstrukte (pTTE₁ und pTTF₁) mit unterschiedlicher Tandem Repeat Orientierung und ähnlicher Länge verwendet. Die Klonierung der beiden α -sat Arrays in die Bsp 120 I Schnittstelle von pTAT-Bs erfolgte nach obigem Schema und resultierte in den beiden Konstrukten pTE₁T (ca. 125 kb) und pTF₁T (ca. 134 kb). Die Orientierung der Tandem Repeats wurde durch Kombination der Oligonukleotidpaare 5IF und 5IR (bzw. 5IIF und 5IIR) mit BemF1 und BemR, welche die Bsp 120 I Klonierstelle auf dem Vektor pTAT-Bs flankieren, bestimmt (siehe Abb. 16). Um im Transfektionsassay (vgl Kapitel 3.4) nur die α -sat DNA Sequenz-Typen und die Vektor-DNA Konfigurationen (Duplikationen) zu vergleichen, die Untersuchungen aber

nicht durch mögliche Einflüsse der Sequenzrichtungen zu verfälschen, wurden jeweils Klone mit der gleichen Orientierungen gewählt, ($pTE_1T = pTTE_1$ ist ungleich $pTF_1T = pTTF_1$). Dadurch konnte geprüft werden, ob sich di- und tetratelomerische Konstrukte oder eine der beiden Orientierungen in der Rate der HAC *de novo*-Formierung unterscheiden. Dafür wurden die Konstrukte wie im Methodenteil beschrieben präpariert und, nach *Not* I Linearisierung und Überprüfung von Konzentration und Integrität per PFGE (Abb. 19), in Lipofektionen eingesetzt.

3.3.3 Konstruktion des CFTR-Expressionsmarkers CGT21

Um stabilen „low-copy“ Gentransfer, welcher für die Entwicklung einer sicheren und effizienten CF-Gentherapie auf Basis künstlicher Chromosomen unerlässlich ist, über die Expression des Transgens nachzuweisen, konstruierte Sonja Cattani im Rahmen ihrer Diplomarbeit den Prototypen eines CFTR-EGFP Expressionskonstruktes (CG2, 142,5 kb als lineares *Not* I Fragment). Dieses PAC-basierende Konstrukt umspannt die chromosomale Region des CFTR-Lokus von ca. –60 kb 5' des Translationsstartes bis zur Mitte des Exon 10 des CFTR-Gens. An das Exon 10 Fragment wurde „in frame“ die EGFP-cDNA Kasette sowie Exon 24/Poly-A und 2 kb 3' Sequenzen des CFTR-Gens kloniert (Cattani, 2000). Um das Expressionskonstrukt in den ditelomerischen PAC Vektor pTAT-Bs zu klonieren, wurde CG2 *Not* I gespalten, per PFGE vom PAC Anteil getrennt und in die dephosphorylierte *Bsp* 120 I Stelle von pTAT-Bs ligiert. Das Konstrukt CGT21 hat eine Länge von 150,8 kb und ist mit telomerischen Kappen sowie zusätzlichen Resistenzmarkern versehen (BS und Tet).

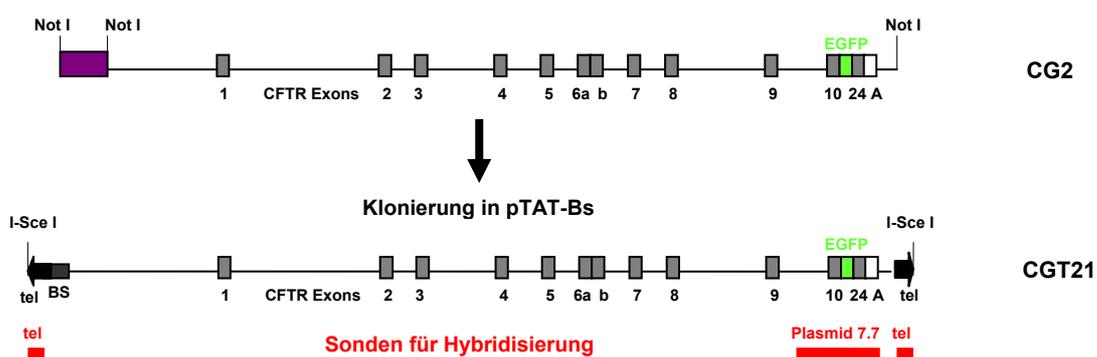


Abbildung 17: Klonierung von CGT21. Das *Not* I Fragment von CG2 (142,5 kb) wurde vom PAC Anteil (violett, 8,7 kb) getrennt und in die *Bsp*120 I Stelle von pTAT-Bs (17 kb) kloniert, welcher ein Blasticidin-S Resistenzgen zur Selektion in eukaryotischen Zellen trägt. Das daraus resultierende Konstrukt CGT21 (159,4 kb) wurde mit *I-Sce* I linearisiert um telomerische Enden zu erzeugen, vom PAC Anteil (8,7 kb) durch PFGE getrennt und in Transfektionen eingesetzt. Die Lage der Sonden für die Hybridisierung (Abb. 18a) sind unter dem Konstrukt als rote Balken angegeben (nicht maßstabsgetreu)

Um die Struktur des Klons CGT21 genauer zu bestimmen, wurde je ca. 1/10 Agaroseplug (Volumen ca. 10 μ l; enthält ca. 500 ng DNA) mit den Enzymen *Sal* I (S) und *Bss* HII (B) gespalten und durch PFGE aufgetrennt. Blot und Hybridisierung zeigten die erwarteten Banden und bestätigten die erfolgreiche Klonierung. Klon CGT20 zeigte ebenfalls die erwarteten Banden und wies die entgegengesetzte Orientierung in pTAT-Bs auf. Durch Linearisierung mit *I-Sce* I, PFGE und Elektroelution wurden grosse Mengen des intakten, 150,8 kb langen, telomerisierten CGT21 für Transfektionen zur Verfügung gestellt (siehe Abb. 18b).

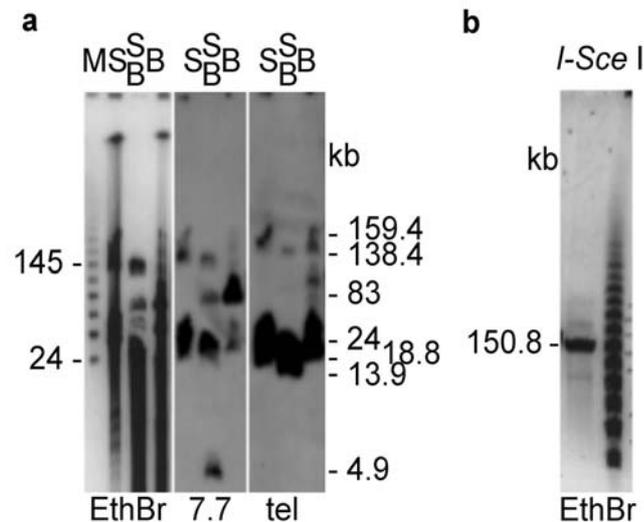


Abbildung 18: Analyse von CGT21. a) Southern Analyse zur Kontrolle von Integrität und Orientierung des CG2 Inserts. Je 1/10 Plug (ca. 500 ng DNA) von CGT21 wurden mit *Sal* I (S) und *Bss* HII (B) gespalten per PFGE aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (M, Midrange Marker II). Im mittleren Bild wurde das 7,7 kb lange Plasmid Insert, welches sich von Intron 9 des CFTR-Gens bis zum Tet-Resistenzgen erstreckt, als P_{32} -markierte Sonde verwendet (Lage: siehe Abb. 17). Diese hybridisiert, wie vorhergesagt, teilweise mit einem 138,4 kb *Sal* I Fragment, welches den CFTR-Lokus (schwach) trägt und mit einem kleineren Fragment von 18,8 kb Länge, welches sich über die Klonierstelle erstreckt. Ausserdem zeigt das 83 kb *Bss* HII Fragment, dass die Region vom CFTR-Promoter bis zum rechten Telomer im Vektor enthalten ist. Im rechten Bild erkennt die telomerische Sonde (siehe Abb. 17) Vektor Fragmente mit beiden Telomeren und Fragmente welche sich in angrenzende Regionen erstrecken (ein 13,9 kb *Sal* I / *Bss* HII Fragment, ein 18,8 kb *Sal* I Fragment und ein ein 24 kb *Bss* HII Fragment). Spuren von partial gespaltenem Vektor mit voller Länge (159,4 kb) sind in den Spuren S und B zu erkennen. b) Analyse der Integrität von *I-Sce* I gespaltenener, elektroeluierteter CGT21 DNA auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten PFG. Obwohl relativ grosse Mengen geladen wurden, kann kein relevanter Abbau des 150,8 kb Konstruktes nachgewiesen werden.

3.4 Klon- und HAC Formierungsassay

Da die Anforderungen an einen idealen HAC Vektor (unmittelbare Ausübung genetischer Funktion, ohne die Notwendigkeit zusätzlicher struktureller Umwandlungen der Input DNA durch seltene zelluläre Vorgänge) noch nicht hinreichend verstanden sind, müssen Vektoren mit unterschiedlichen Eigenschaften und Design (DNA-Gehalt, Struktur, Anzahl, ect.) in

Transfektionsassays miteinander verglichen werden. Um die Qualität eines HAC Vektors bzw. einer Komponente (z.B. α -sat Familie oder genomische DNA) zu testen, soll die Anzahl BS resistenter Klone und das Verhältnis von *de novo* HAC Bildung gegenüber gewöhnlicher Integration als Masstab dienen. Werden vorwiegend Integrationen festgestellt, läuft die *de novo*-Formierung sehr ineffizient ab, mit einer geringeren Rate als die ohnehin seltenen Integrationsereignisse. Werden in stabilen Zelllinien dagegen vorwiegend HACs ohne Integrationen beobachtet, läuft die *de novo*-Formierung effizienter ab. Es wurden verschiedene Konzentrationen (Abb. 19) der zu vergleichenden Konstrukte unter identischen Bedingungen in Transfektionsassays eingesetzt, um unter BS Selektion stabile Zelllinien zu erzeugen. Diese wurden mit Hilfe der „Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung“ (FISH) analysiert, um zwischen stabiler Integration in endogene Chromosomen und episomalen HACs zu unterscheiden. In vorliegender Arbeit wurde der neu konstruierte, tetratelomerische Vektor pTT mit seinem ditelomerischen Vorläufer pTAT-Bs verglichen.

Des Weiteren wurden zwei bisher uncharakterisierte α -sat Arrays von Chr. 5 als zentromerische Komponenten auf den oben genannten Vektoren getestet. Nach Lipofektion der α -sat-tragenden Konstrukte pTTE₁, pTE₁T, pTTF₁ und pTF₁T (Abb. 16) einzeln und in Kombination mit den beiden Gen tragenden pTAT-Bs Konstrukten CGT21 (CFTR; Abb. 17) bzw. THT₂₂ (trägt den humanen HGPRT-Gen Locus, ca. 100 kb; nicht gezeigt), die als genomische Komponente dienen, wurde die Zahl der stabilen Kolonien sowie die Rate an *de novo* erzeugten HACs verglichen. Die Daten sind in Tabelle 4 (siehe Anhang) zusammengefasst. Abbildung 19 zeigt Gelbilder der verwendeten Konstrukte zur Konzentrationskontrolle vor Transfektion.

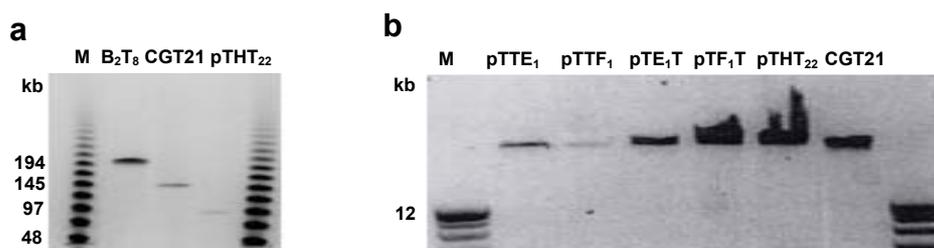


Abbildung 19: Konzentrationskontrolle der Konstrukte vor Transfektion. a) Auf einem PFG wurden 10 μ l der angegebenen, telomerisierten Konstrukte aufgetrennt (nach Elektroelution in ca. 250 μ l 0,25x TAE Puffer aufgenommen). Durch Vergleich mit der Intensität der Ethidiumbromid gefärbten 1 kb (= 3 ng) Markerbande wurde die Konzentration der elektroeluierten DNA abgeschätzt. Das pTAT-Bs Konstrukt B₂T₈ (Spur 1; 220 kb), das ein ca. 190 kb langes, homogenes α -sat Array von Chr. 17 trägt, wurde unter anderem bei der Baktofektion eingesetzt. b) Kontrolle der eingesetzten Mengen auf einem 0,8% -igen Agarosegel mit Ethidiumbromid.

3.5 Der neue HAC Vektor pTT erzeugt mit den cen5 Arrays stabile grüne Kolonien und formiert HACs *de novo*

Lipofektion unterschiedlicher Mengen des telomerisierten pTTE₁ in HT1080^r erzeugte 36 BS resistente Kolonien (Tab. 4, Anhang) von denen 27 stabile grüne Fluoreszenz unter dem Mikroskop zeigten. Davon wurden vier grüne Kolonien isoliert (pTTE₁ 20-23), 30 Tage unter BS expandiert und Metaphasen präpariert. Der Nachweis mit der Vektorsonde Rsf (3,15 kb Fragment, das die loxP Stelle und den BS Resistenzmarker enthält) und der Zentromersonde 5I (PCR Fragment, das in den etwa 340 „higher order repeats“ des cen5I Array enthalten ist) zeigte in allen untersuchten Linien HACs (Abb. 20a-d, Kreise) in mehr als 40% der untersuchten Metaphasen (10-20 pro Linie). Dies liegt im Bereich der normalen Detektierbarkeit einzelner stabiler HACs mit „Dual colour“ FISH in unserem Labor. Verlustraten in Re-Selektionstests nach 30 Tagen ohne Selektion von nur <1-2 % pro Mitose, zeigten allerdings eine praktisch 100% - ige Stabilität der HACs, unabhängig von der beobachteten HAC Rate in Metaphasen, die oft auch zwischen verschiedenen Objektträgern Schwankungen aufwiesen (z.B. nur 40-70% HAC Nachweis durch technische Verluste bedingt). Integration wurde in keiner Metaphase beobachtet. Die cen5 I Probe ist nur nach starker Anhebung des FITC-Kanals auf den HACs nachzuweisen. Dabei geben allerdings auch die Megabasen langen Zentromere der endogenen Chromosomen 5, 19, und 1 spezifische, stark überstrahlte Signale und die Zentromere mit näher verwandten α -sat werden ebenfalls detektiert. Bei Unterdrückung des FITC-Kanals lassen sich die Signale auf die spezifische Sequenz der Chromosomen 5, 19 und 1 begrenzen, wodurch die Funktionalität der Sonde bestätigt wird.

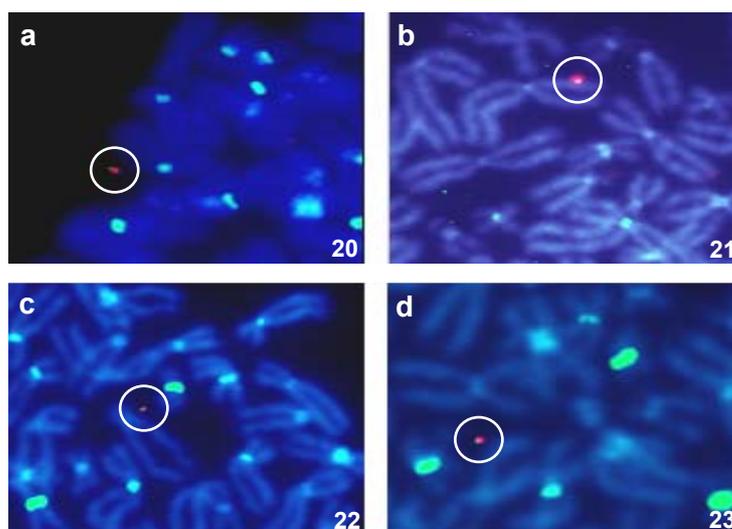


Abbildung 20: Nachweis der *de novo* HAC Formierung des Vektors pTTE₁. Metaphasen von 4 BS resistenten Linien (pTTE₁ 20-23) wurden mit der Vektorsonde Rsf (rot) und der Zentromersonde 5I (grün) hybridisiert. Pro Linie wurden 10-20 Metaphasen analysiert und HACs wurden in mindestens 40% aller

Metaphasen durch Colokalisation beider Signale auf DAPI-Elementen nachgewiesen (a-d, Kreise). Die cen5 Sonde hybridisiert spezifisch mit Zentromeren der Chromosomen 5, 19, und 1, bei starker Anhebung des Kanals auch mit eng verwandten Arrays der Zentromere weiterer Chromosomen.

Diese Daten zeigen sowohl die Kompetenz des Chr. 5 α -sat Arrays E₁ ein Zentromer *de novo* zu formieren als auch die Fähigkeit des verbesserten Konstruktes pTT als effizienter HAC Vektor zu dienen. Die Beobachtung, dass pTT nach Selektion stabil grün fluoreszierende Zelllinien erzeugt, bestätigt die Funktion der EGFP-cDNA Kasette als Marker, um stabilen HAC Transfer anzuzeigen. Durch die eingefügten Restriktionsschnittstellen können beliebige DNA-Fragmente schnell und effizient eingebaut und in Zellkultur getestet werden. Der Vektor pTTE₁ erfüllt somit wesentliche Kriterien eines verbesserten Basis HAC Vektors für die Entwicklung künstlicher Chromosomen.

Das Konstrukt pTTF₁, das den zweiten Array Typ von Chromosom 5 (5II, 13-mere) in „forward“ Orientierung (siehe Abb. 16, S. 73) enthält, erzeugte insgesamt vier BS resistente Kolonien, die alle stabile grüne Fluoreszenz zeigten. „Dual colour“ FISH Analyse zweier Linien mit den Sonden Rsf und cen5 II zeigte ebenfalls *de novo*-Formierung von künstlichen Chromosomen in HT1080⁻ Zellen (siehe Tabelle 4, Anhang). Der Chr. 5 α -sat Array F₁ (5II) ist also ebenso wie der Array E₁ (5I) in der Lage die Funktion eines Zentromers auf *de novo* erzeugten HACs zu übernehmen, die Richtung der α -sat Repeats scheint dabei keinen Einfluss auf die Klonformierungsrate zu haben (vgl. Tab. 4, Anhang; pTTE₁, 10 und 50 ng; pTTF₁, 10 und 50 ng). Der direkte Vergleich der beiden tetratelomerischen Konstrukte pTTE₁/F₁ mit ihren ditelomerischen Vorläufern pTE₁T/pTF₁T zeigte, dass durch die duplizierten Vektoranteile keine spürbare Verbesserung der absoluten Rate an gebildeten Kolonien erhalten wurde. Da pTT zwei Kopien des BS Markers enthält, und pTAT-Bs nur eine, kann aus diesem Experiment geschlossen werden, dass die doppelte Dosis des BS Resistenzmarkers auf einem Input DNA Molekül keinen positiven Effekt auf die Zahl selektionierbarer Klone hat (bei 4 μ g/ml BS). Die E₁ Konstrukte (5I) zeigten sich tendentiell den F₁ Konstrukten (5II) überlegen, wegen der begrenzten Zahl der analysierten Linien (im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar) ist eine sichere Aussage jedoch nicht möglich.

Von der richtigen Anordnung der Komponenten auf den Vektoren wird eine deutliche Steigerung der HAC *de novo*-Formierungsrate erwartet. Dazu könnte die in unserem Labor mehrfach beobachtete Steigerung der Klonzahl durch Cotransfektion eines telomerisierten genomischen Genkonstrukts mit dem telomerisierten Zentromerkonstrukt passen (siehe Anhang, Tab. 4: pTE₁T 100 ng + CGT21 25 ng; TTE₁ 50 ng + THT₂₂ 200 ng). Durch die Gen-Komponenten steigen die Klonzahlen gelegentlich vielfach über die Zahl der Zentromer-

Konstrukte alleine. Die Cotransfektion, die häufig durch Verkettung der Komponenten zu HACs mit beiden Komponenten führt, benötigt zwar einerseits den relativ ineffizienten Prozess der Verkettung, hat aber im Gegensatz zu vorgefertigten „Seite-an-Seite“ Anordnungen eines Gens und eines Zentromers in einem Konstrukt, den Vorteil der flexiblen Zusammensetzung. Dadurch könnten im HAC z.B. auch zwei oder drei Zentromerkomponenten nebeneinander lokalisiert sein, und dann zusammen mit der Genkomponente effektiver eine funktionelle Einheit bilden, als das mit vorgefertigten Konstrukten möglich wäre.

Andere Erklärungen des Phänomens könnten aber auch eine unterstützende Wirkung der zusätzlichen Vektorsequenzen (als eine Art "Reparatur-Kit") in der Phase der HAC Formierung sein, oder einfach die Anwesenheit eines zweiten Resistenzmarkers (BS), was die Selektierbarkeit entstehender HAC-Linien steigern könnte. Zuletzt genannter Punkt wäre zwar für die letztendliche Anwendung irrelevant, würde aber erhebliche technische Schwierigkeiten in den Zellkulturarbeiten verursachen, bei denen es darauf ankommt, isolierte Ereignisse zu betrachten. Da die Schwankungsbreite zwischen den einzelnen Experimenten jedoch viel zu gross war, um klare Aussagen über die HAC Formierung in Abhängigkeit von verschiedenen cotransfizierten Komponenten zu erlauben, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, in dem nur die pTAT-Bs Vektorsequenzen, einerseits mit einem funktionellen BS-Gen und andererseits mit einem mutierten, funktionslosen BS-Gen cotransfiziert wurden. Dafür wurde im Vektor pTAT-Bs das Gen für die Blasticidin-S Deaminase durch Spaltung mit dem Enzym *Sun I* (siehe Position 13.142 oder 19.158 in pTT, Anhang) und anschliessender S1-Nuklease Behandlung zerstört. Durch Sequenzierung wurde eine 10 bp Deletion der kodierenden Sequenz des BS-Gens bestätigt, die zu einem Protein führt, das von den normalerweise 140 Aminosäuren nur die ersten 35 Aminosäuren enthält und nach 50 Aminosäuren ein Stoppcodon erzeugt. Cotransfektion von gleichen Mengen des cen5 tragenden Konstrukts pTE₁T mit beiden pTAT Versionen (Bs und Bs-del) zeigten, dass die Deletion des zweiten BS-Gens die Klon-Formierung in etwa halbiert (29 mit pTAT-Bs zu 13 mit pTAT-Bs-del, Tab. 4). Dies weist in diesem Experiment deutlich auf einen additiven Effekt des zweiten BS-Gens auf dem cotransfizierten Vektorfragment hin. Um zusätzlich zu analysieren, ob auch nicht-selektionsfähige pTAT-Bs-del Vektorsequenzen durch Inkorporation (Verkettung) in die HACs unterstützend zur HAC Formierung beigetragen haben könnten, wurden cotransfizierte HAC Linien mittels PCR untersucht. Wenn Cotransfektionen zusätzlicher Vektor-Sequenzen tatsächlich einen positiven Einfluss auf die Klonformierung haben, sollte zusätzlich zum BS-Gen auf der Zentromerkomponente auch das deletierte BS-Gen des cotransfizierten pTAT-Bs-del in den stabilen Linien zu finden sein (es wurde nicht davon ausgegangen, dass in den HAC Linien unter Selektionsdruck immer eine vollständige Konversion der deletierten, nicht-funktionellen BS-Gene stattfinden könnte). Deshalb wurde eine PCR mit dem Primerpaar BcF2/BcR

durchgeführt, das die 10 bp Deletion in pTAT-Bs umspannt und ein Produkt von entweder 176 bp (funktionell) oder 166 bp (deletiert) generiert. Alle fünf getesteten pTAT-Bs-del+pTE₁T Linien zeigten ausschliesslich die Bande des intakten, undeletierten BS-Gens (Abb. 21a). Da man bei einer unterstützenden Wirkung zusätzlicher Vektorsequenzen die Anwesenheit von Sequenzen beider Konstrukte, zumindest in einem Teil der erzeugten Klone erwarten würde, spricht dieses Ergebnis nicht für einen positiven Effekt zusätzlicher Vektorsequenzen durch eine stabile Inkorporation in die HACs. FISH Analyse von vier der pTAT-Bs-del+pTE₁T Linien mit Vektor- und cen5-Sonden zeigte, dass *de novo* HACs ohne Integration in drei Linien formiert wurden. Eine Linie mit dem cotransfizierten, intakten BS-Gen (pTAT-Bs+TE1T₁₁) zeigte eine telomerische Integration (cen und Vektor Signale) in ein endogenes Chromosom in (61%) der analysierten (n=18) Metaphasen (siehe Abb. 21c; Tab. 4 im Anhang).

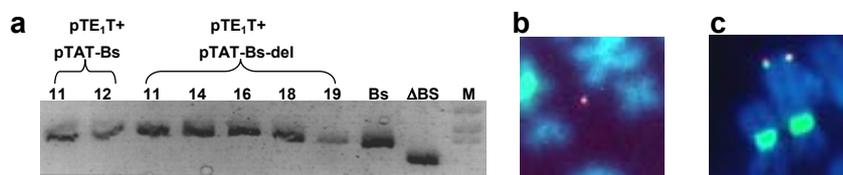


Abbildung 21: PCR und FISH Analyse der cotransfizierten Vektoren pTAT-Bs und pTAT-Bs-del. a) PCR aus genomischer DNA sieben cotransfizierter Linien, die mit einem funktionellen, und einem deletierten BS-Gen cotransfiziert wurden. Die PCR mit den Primern (BcF2/BcR) detektiert das funktionelle BS-Gen (Spur BS) und die 10 bp Deletion des mutierten BS-Gens (Spur ΔBS). In allen cotransfizierten Linien konnte lediglich die funktionelle Kopie des BS-Gens detektiert werden (von pTE₁T stammend). Die PCR Produkte wurden auf einem 3% igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (M: Marker LS V). b) Die „Dual colour“ FISH Analyse (nach 30 Tagen BS Selektion) bestätigte eine *de novo*-Formierung von HACs (Beispiel: pTAT-Bs-del₁₁; rot=Rsf, grün=cen5 E₁), unabhängig von der Funktion des cotransfizierten BS-Gens. c) Linie pTAT-Bs+pTE₁T₁₁ zeigt eine telomerische Integration mit Signalen beider Proben (cen5 E₁, Rsf).

Zur besseren Abschätzung des Effekts einer Cotransfektion von telomerisierten Genkomponenten, wurde eine größere Zahl von Transfektionen durchgeführt. Dabei wurden zusätzlich zu den Komponenten auch die Konzentrationen variiert. Es konnte ein eindeutiger Trend festgestellt werden, hin zu höheren Klonzahlen mit kleineren Konstrukt Mengen (siehe Tab. 4, Anhang). Die BS und HAT Doppelselektion nach 14-tägiger BS Selektion, bei Cotransfektion mit pTHT₂₂ als Genkomponente belegt, dass praktisch alle Cotransfektionen beide Resistenzmarker funktionell exprimieren (Tab. 4; z.B. pTE₁T (100 ng) + pTHT₂₂ (25 ng), pTTE₁ (10 bzw. 50 ng) + pTHT₂₂ (100 bzw. 200 ng) und pTF₁T (200 ng) + pTHT₂₂ (200 ng)). FISH Analyse von 4 pTTE₁ + pTHT₂₂ Linien zeigte darüber hinaus, dass in allen vier Linien HACs nachgewiesen werden können, was an fehlenden Integrationen sowie kolokalisierten Vektor- (Rsf) und Zentromersignalen (cen I bzw. cen II) auf episomalen DAPI-Elementen (in mindestens 40% der analysierten Metaphasen) bestimmt wurde. Dagegen zeigten lineare Genkomponenten ohne zentromerische Komponenten (z.B. CGT21) konsistente Integrationen

in endogene Chromosomen (in der Regel in telomerischen Positionen, $n=3$). Dies ist ein starker Hinweis auf einen möglichen synergistischen Effekt der Klonformierung bei Cotransfektion von cen und Gen Komponenten.

3.6 Werden aus transient EGFP exprimierenden Zellen stabile, HAC tragende Klone?

Zuvor durchgeführte Untersuchungen mit intranukleärer Mikroinjektion zeigten bereits, dass einzelne Kopien einer EGFP-cDNA Kasette nicht geeignet sind, um mittels transienter Expression die erfolgreich transfizierten Zellen zu einem frühen Zeitpunkt nachzuweisen (siehe 3.1, S.54). Die Beobachtung, dass eine Lipofektion von pTTE₁ bereits nach 12 h einzelne, stark grün fluoreszierende Zellen erzeugen kann, warf die Frage auf, ob diese früh grünen Zellen zu stabilen Zellklonen führen oder lediglich auf massenhafter Anwesenheit des Vektors beruhen. Da das 134 kb Konstrukt pTTE₁ nur eine Kopie der EGFP-cDNA Kasette trägt, die transient nicht nachgewiesen werden kann (Schindelbauer, 2002), muß entweder eine größere Zahl transfiziert worden sein, oder einzelne Konstrukte wurden durch einen geeigneten Chromatinkontext "aktiviert" und viel stärker exprimiert, als dies mit transienter Expression allein möglich wäre.

Um dieser Fragestellung nachzugehen wurde pTTE₁ (ca. 150 ng) in HT1080 Zellen (8 Platten aus zwei Experimenten) lipofiziert und von Tag 1 nach Transfektion (Start der BS Selektion) bis zur Bildung von Kolonien (Tag 14) beobachtet und nach grünen Zellen abgesucht. Grüne Zellen wurden markiert und täglich auf Teilung und Fluoreszenz kontrolliert. Um einen möglichen negativen Effekt der täglichen Bestrahlung unter dem Fluoreszenzmikroskop festzustellen, wurde eine Hälfte der Platten abgeklebt und erst am Tag 14 untersucht (Abb. 22). In den markierten Bereichen von 41 grün fluoreszierenden Zellen, die schon am Tag 1 nach der Lipofektion nachgewiesen werden konnten, entwickelte sich nur in einem eine stabile, grüne Kolonie. Die anderen 40 früh grünen Zellen stellten das Wachstum nach dem 1-8-Zellstadium ein. Im Gegensatz dazu bildeten sich aus Zellen, die erst nach dem Tag 6 grüne Fluoreszenz zeigten, 16 stabile, grüne Kolonien. Auf den unbestrahlten Seiten bildeten sich Kolonien ($n=9$) und nicht weiterwachsende grüne Zellen ($n=29$) in vergleichbarer Anzahl, was einen Einfluss der Beleuchtung auf die Klon Formierung in diesem Experiment ausschliesst. Dieses Ergebnis legt den wichtigen Schluss nahe, dass der Transfer grosser Konstrukt mengen zwar transienten Nachweis kurz nach der Transfektion ermöglicht, für die Formierung stabiler Klone jedoch eher hinderlich ist.

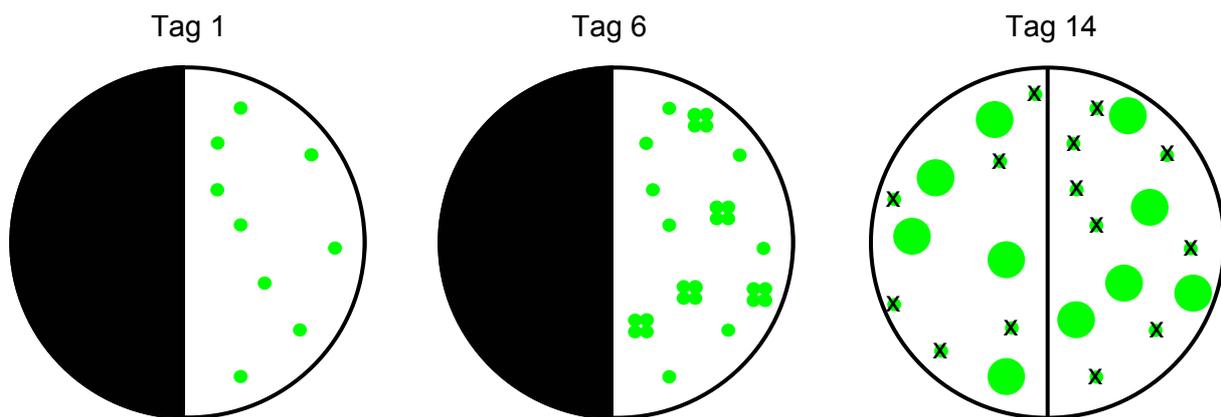


Abbildung 22: Klonformierung nach Lipofektion von pTTE₁. 50% der Zellkulturschalen, die ca. 5×10^5 HT1080 Zellen enthielten, wurden abgeklebt um mögliche Schäden durch tägliche Hellfeld- und Fluoreszenzuntersuchungen festzustellen. Pro Platte wurden ca. 150 ng *Not I* linearisierter pTTE₁ lipofiziert und die transiente und stabile EGFP Expression bzw. Klonformierung über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Am ersten Tag wurden 41 „früh“ grüne Zellen beobachtet und mit einem Ring (5 mm) markiert (einzelne grüne Punkte). Nach 14 Tagen entwickelte sich nur eine Kolonie (grosse grüne Punkte) im Areal einer „früh“ grün markierten Zelle, die restlichen 40 stellten das Wachstum nach dem 1-8 Zellstadium (überwiegend 1-2 Zellen) ein (schwarzes X). In 16 anderen Bereichen der Platten entwickelten sich erst zwischen Tag 4 und Tag 6 grüne Zellen (meist schon im 8-16 Zellstadium dargestellt als 4 kleine grüne Punkte), aus denen sich bis zum Tag 14 stabile, grüne Kolonien entwickelten. Auf den abgeklebten Seiten entwickelten sich Kolonien vergleichbarer Anzahl (9 grüne Kolonien und 29 nicht-teilende grüne Zellen).

3.7 Das Expressionskonstrukt CGT21 wird exprimiert und korrekt gespleisst

Das genomische CFTR-Expressionskonstrukt CG2, das in pTAT-Bs kloniert wurde (Klon CGT21), dient über die Eigenschaft als Markergen für die Expressionsregulation vom endogenen CFTR Promoter hinaus, für eine Reihe weiterer Fragestellungen. Durch seine lange funktionelle Einheit, das Gen umspannt vom ersten Exon (CFTR Exon 1) bis zum letzten Exon (das ein synthetisches Exon aus CFTR Exon 10, EGFP kodierenden Sequenzen, und dem Exon 24 des CFTR Gens ist) etwa 80 Kilobasen, kann das Gen nur funktionieren, wenn zumindest diese 80 kb und ein minimaler CFTR-Promoter intakt transfiziert wurden. Darüberhinaus enthält das Konstrukt weitere regulatorische Regionen des CFTR-Lokus, eine ca. 55 kb Region 5' vom Startcodon, und eine ca. 2 kb Region 3' des Stopcodons (3'UTR und genomische Sequenzen 3' des CFTR Gens).

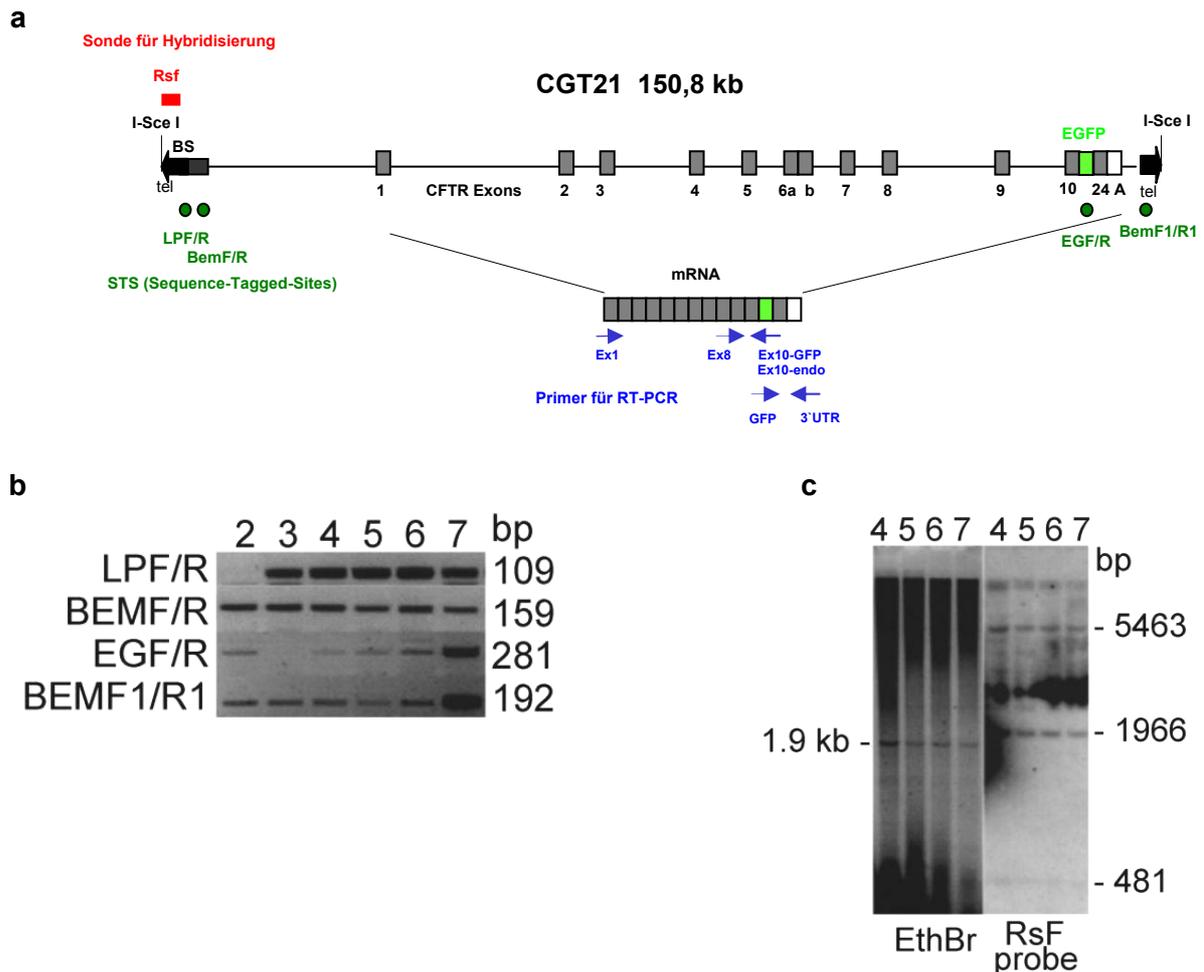


Abbildung 23: Analyse der transfizierten CGT21 Linien. a) CGT21 in telomerisierter Form, ohne den 8,7 kb P1 Anteil des Vektors pTAT-Bs: Die Lage der für die Hybridisierung verwendeten Sonde Rsf (rot) sowie die "sequence tagged sites" (STS) (grüne Kreise) sind gekennzeichnet. Unter dem Konstrukt sind in blauen Pfeilen die auf der mRNA lokalisierten Oligonukleotidpaare angegeben, die zur RT-PCR Analyse der stabilen Zelllinien verwendet wurden (siehe Abb. 25). b) STS Analyse: Mittels Standard-PCR aus isolierter genomischer DNA der stabilen Linien 2-7 (nach 30 Tagen BS Selektion) wurden 4 STS an beiden Enden des Konstruktes, nachgewiesen. Die Linien 2 und 3 wurden aufgrund fehlender Marker von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Oligonukleotidpaare und Produktlängen sind angegeben c) Kontrolle der Kopiezahl: Gleiche Mengen *Hind* III gespaltener genomischer DNA der Linien 4-7 wurden auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, Ethidiumbromid gefärbt (links) und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit der Sonde Rsf (erkennt den pTAT-Bs-Vektor Anteil von CGT21) hybridisiert. Die Autoradiographie (rechts) bestätigte die Anwesenheit der erwarteten *Hind* III Fragmente von 5.463 bp, 1.966 bp und 481 bp nach 2-wöchiger Exposition. Die ähnliche Intensität in allen Spuren und der schwache Nachweis der Rsf Probe mit FISH (siehe Abb. 24) sprechen gegen eine starke Amplifikation des Vektor Anteils. Der starke Hintergrund am linken Rand resultiert aus der 1,6 kb Markerbande der 1 kb-Leiter, die in 2 Spuren Abstand aufgetragen wurde und mit der Probe kreuzhybridisiert. Die 1,9 kb Satelliten Bande (links) entspricht nicht der 1.966 bp Vektor Bande (aus Hybridisierungen anderer Linien eindeutig festgestellt).

Das genomische CFTR-Expressionskonstrukt CGT21 wurde zur Erzeugung stabiler Zelllinien in HT1080 transfiziert, um die vom CFTR-Lokus gesteuerte Expression des synthetischen Konstruktes (per RT-PCR Analyse) als Expressionsmarker für intakten Transfer langer DNA zu verwenden. Lipofektion von ca. 1 μ g telomerisiertem CGT21 in 5×10^5 HT1080 Zellen führte zu

18 Blastocidin-S (BS) resistenten Kolonien, von denen sechs individuelle Kolonien (Linien 2-7) isoliert und bis zum Tag 30 (entspricht etwa 30 Zellgenerationen) unter BS Selektion expandiert wurden. Mittels PCR wurde die genomische DNA der Linien auf Anwesenheit der STS-Marker untersucht. In Linie 2, die nur sehr langsam wuchs, konnte der äusserste linke STS-Marker (LPF/R) nicht nachgewiesen werden, was entweder durch einen unvollständigen Transfer eines schadhafte Moleküls, oder durch sekundäre Deletion der Region verursacht worden sein konnte. Linie 3 zeigte eine Deletion im Bereich der EGFP kodierenden Sequenzen des Gens (Abb. 23b). Beide Linien wurden deshalb nicht weiter analysiert. Eine Southern Blot Hybridisierung genomischer DNA der Linien 4, 5, 6 und 7, die alle STS enthielten, mit einer pTAT-BS Vektor-Sonde (Rsf, 3,15 kb) zeigte nach 2-wöchiger Exposition, dass alle drei für den Vektor pTAT-Bs spezifischen *Hind* III Banden (481, 1.966 und 5.463 bp) relativ schwach, aber in gleicher Stöchiometrie nachweisbar waren. Die FISH Analyse der Linien 4-7 mit der PAC Probe CF1, die den 135 kb genomischen Anteil von -55 kb bis Intron 9 des Konstrukts CGT21 repräsentiert, zeigte Integrationen an den Telomeren endogener Chromosomen in den Linien 4 (nicht gezeigt), 5 (Abb. 24e) und 7 (Abb. 24a-d). In Linie 6 konnte kein zusätzliches CFTR Signal beobachtet werden, was auf unvollständigen Transfer oder Verlust eines grossen genomischen Anteils schliessen lässt (nicht gezeigt).

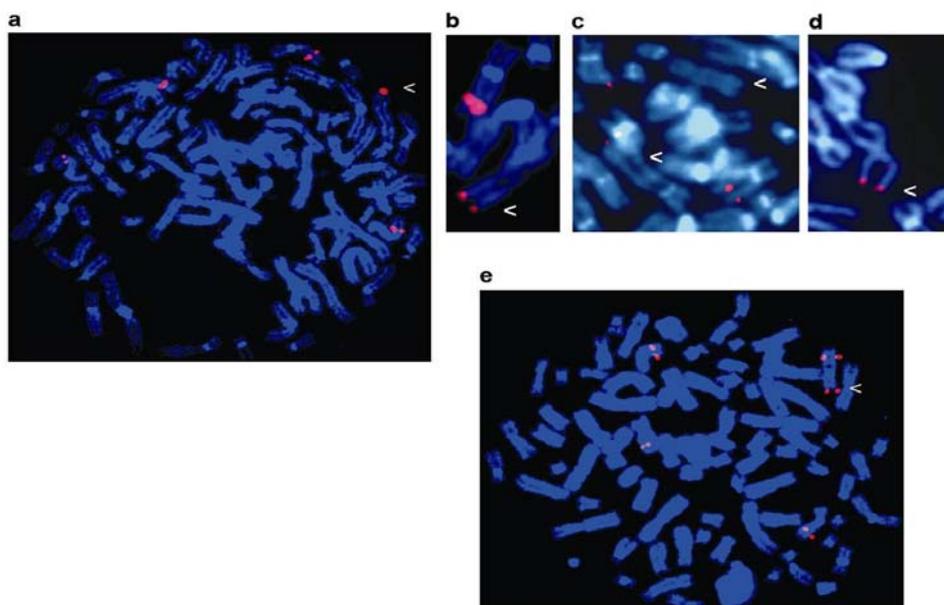


Abbildung 24: FISH Analyse der Linien 5 und 7. Die lange genomische PAC Probe CF1 (135 kb) erlaubt den verlässlichen Nachweis des CFTR-Gens auf Chromosom 7q31.2 und die "single copy" oder „low copy“ Integrationen des Transgens. Linie 5 zeigt eine Integration am Telomer des kurzen Arms von Chromosom 7 (e, Pfeil). Linie 7 zeigt eine telomerische Integration am äussersten Ende eines abnormal langen Chromosoms (a, b, d, Pfeile). Die Anwesenheit eines zweiten Chromosoms mit dem gleichen Erscheinungsbild, aber ohne Integration (c, rechter Pfeil) in der pseudo-tetraploiden HT1080 Linie, und die ungewöhnliche Länge des langen Arms, machen eine primäre telomerische Integration wahrscheinlicher als eine Integration des Transgens mit anschliessender Trunkation. Bei Verwendung einer 3,15 kb Probe des Vektors pTAT-Bs als Sonde (im Bereich des BS Selektionsmarkers lokalisiert) betrug die Nachweisrate nur 23% (d, schwaches Signal am Telomer von Linie 7, Pfeil), entgegen 77% mit der langen PAC Sonde CF1 (von Susi Christan ermittelt).

In Linie 7 ist eine Integration an der äussersten Spitze des langen Arms eines abnormal langen, endogenen Chromosoms zu erkennen (Abb. 24a-d). Da in dieser pseudo-tetraploiden Linie ein zweites Chromosom mit der gleichen Erscheinungsform vorhanden ist (Abb. 24c, rechter Pfeil), datiert die Entstehung des abnormen Chromosoms vor den Zeitpunkt der Tetraploidisierung und Transfektion.

Da die bisherigen Daten für einen vollständigen Transfer in den Linien 4, 5 und 7 mit einer geringen Kopiezahl sprechen, wurden die Zellen mittels RT-PCR Analyse auf Expression des CFTR-EGFP Fusionsproteins untersucht (in Kollaboration mit Margarida Amaral, Lisabon). Durch die Konstruktion des synthetischen Exon 10-EGFP wird ein qualitativer und halb-quantitativer Vergleich zwischen den endogenen CFTR Genen und dem Expressionskonstrukt CGT21 möglich. Zu diesem Zweck wurden mehrere Oligonukleotidpaare synthetisiert, die unterschiedliche Sequenzen auf der CFTR mRNA, der synthetischen Exon 10-EGFP mRNA sowie der mRNA der flankierenden 3'UTR erkennen. Letztere beiden sind ausschliesslich auf die mRNA des Konstrukts CGT21 beschränkt (siehe Abb 23a). Die Kombination des „Forward“ Primers B3F (Exon 8) mit dem „Reverse“ Primer EGFP₁-AL (Exon 10 von CG2) zeigte in Linie 7 die erwartete Bande von 474 bp der gespleissten cDNA des CFTR-EGFP Konstruktes (Abb 25a). Die Expression des 3' Anteils von CG2 wurde durch Kombination mit den Oligonukleotiden EGFP-seq (Forward, im EGFP-Gen) und G1L (Reverse, im 3'UTR des CFTR-Gens) überprüft und in Linie 7 durch Amplifikation des 828 bp Produkts bestätigt (Abb 25b). Die Linien 4, 5 und 6 (6, nicht gezeigt) exprimieren CGT21 nicht. Um die Expression vom endogenen CFTR Locus zu analysieren, wurde ein alternativer „Reverse“ Primer eines Teils von Exon 10 des CFTR-Gens, der nicht auf dem Konstrukt enthalten war, in Kombination mit dem „Forward“ Primer von Exon 8 (B3F) verwendet. Das gespleisste Produkt von 391 bp, war in allen Linien in etwa gleichen Mengen vorhanden, was für eine klonale Stabilität der (relativ schwachen) CFTR-Expression in HT1080 Zellen spricht. Um das Ausmass des normalen Exon 9-skipping der endogenen CFTR Allele in untransfizierten HT1080 mit beiden Allelen des endogenen CFTR-Gens und des Integrierten CGT21 in der exprimierenden Linie 7 zu vergleichen, wurde ein Kontrollplasmid mitgeführt, das die beiden Varianten der gespleissten CFTR cDNA mit Exon 9 und ohne Exon 9 im Verhältnis 1:1 als interne Kontrolle enthielt (C). Die Analyse ergab, dass beide RT-PCR Produkte mit geskipptem Exon 9 (CFTR, 208 bp und CGT21, 291 bp) nur einen sehr geringen Teil der gespleissten Transkripte ausmachten (untere Bande in 25a, 25c, 25d). Die Analyse des Exon 9 skipping ist deshalb von Interesse, weil CGT21 nach einer weiteren Modifikation, und zwar dem Austausch des synthetischen Exon 10-EGFP gegen die normale CFTR cDNA (siehe Diskussion, Abb. 37), als Gentherapie Vektor verwendet werden kann. Um korrektes spleissen aller Introns von CGT21 mit RT-PCR zu

bestätigen, wurde das Oligonukleotid A1R (Translationsstart im Exon1 des CFTR-Gens) mit dem Oligonukleotid EGFP₁-AL des synthetischen Exon 10 kombiniert. Das Produkt von 1.668 bp zeigt an, dass das Fusionsgen unter der Kontrolle des CFTR-Promotors exprimiert wird und dass alle 9 Introns korrekt gespleisst wurden (Abb. 25e). Sequenzierung des 1.668 bp Produkts (Accession Nr. AY299332) bestätigte die erwartete CFTR Sequenz sowie alle vorgenommenen Modifikationen zur Optimierung der CFTR-Funktion (Austausch des M470V Polymorphismus, da im Vorläufer PAC CF1 nur die Variante mit 1,7-fach schwächerer Chloridkanalfunktion vorhanden war, vgl. Cuppens, 1998).

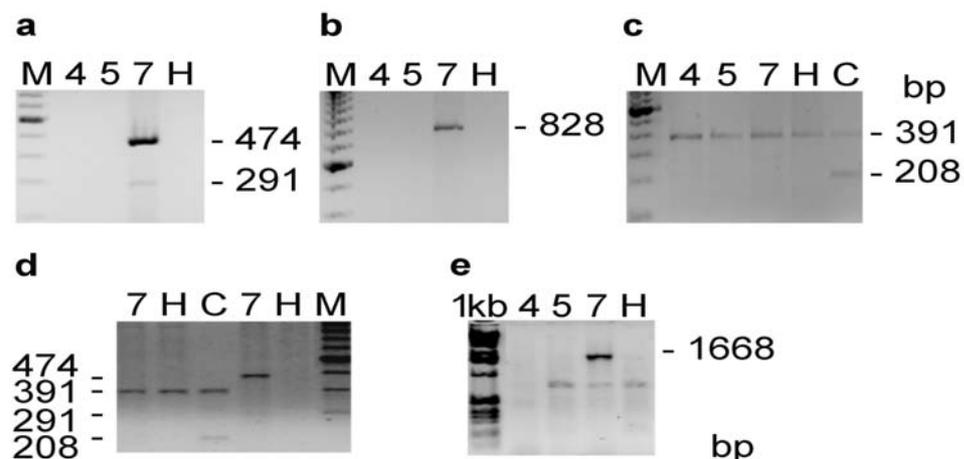


Abbildung 25: RT-PCR Analyse der Linien 4, 5, 7 und HT1080 (H) Kontrollzellen. a) Das 474 bp Produkt das mit dem Primerpaar B3F und EGFP₁-AL amplifiziert wurde, zeigt Expression und korrektes Spleissen der synthetischen Intron 9-Exon 10 Region in der Linie 7. Die 291 bp Bande zeigt, dass eine kleine Fraktion der CG2 Transkripte ein geskipptes Exon 9 besitzen (siehe Abb. 36), was für eine normale Funktion spricht. b) Die Oligonukleotidpaare EGFP-seq und G1L amplifizieren ein 828 bp Fragment der EGFP/CFTR-3'UTR Region. c) Die Primer B3F und C16D erzeugen ein 391 bp Produkt von Exon 8 bis Exon 10 ausschliesslich von den endogenen CFTR mRNAs. Ähnliche Expression in allen Linien spricht für eine klonale Stabilität der endogenen CFTR Expression in HT1080 Zellen. Der Vergleich mit einem Kontrollplasmid mit einer geskippten (208 bp) und einer ungeskippten cDNA Version (1:1), zeigt dass in HT1080 eine kleine Fraktion der endogenen CFTR Transkripte (kaum detektierbar) mit geskipptem Exon 9 vorliegt (dies entspricht einer normalen CFTR Funktion). d) Um die Expression von CGT21 in Linie 7 mit der endogenen CFTR Expression und in untransfizierten HT1080 (H) zu vergleichen, wurde die Exon 8-Exon 10 Region mit den Primerpaaren B3F/EGFP₁-AL (nur auf CGT21) und B3F/C16D (nur auf endogenem CFTR) amplifiziert. Ähnlich niedrige Level des geskippten Exon 9 wurden für beide Gene beobachtet (291 bp bei CG2 und 208 bp bei endogenem CFTR), was auf ein normales Spleissen am transfizierten Genlocus hinweist. e) Mit den Oligonukleotiden A1R (Exon1) und EGFP₁-AL (Exon 10-EGFP) konnte das erwartete Produkt von 1.668 bp amplifiziert werden. Sequenzierung bewies das korrekte Spleissen aller CGT21 Introns (M: 100 bp Leiter. 1 kb: 1 kb Längenstandard).

Eine wichtige Eigenschaft des CFTR-EGFP Konstrukts wäre die Detektion einer spezifischen, hohen Expression anhand grüner, lebender Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Da lebende HT1080 Zellen zu einem gewissen Grad Autofluoreszenz zeigen und die Expression des künstlichen CFTR-EGFP (wie die des endogenen CFTR) relativ schwach war, konnte unter dem Mikroskop keine spezifische Fluoreszenz mit Sicherheit festgestellt werden. Deshalb

wiesen wir das EGFP Protein mit einem monoklonalen anti-GFP Antikörper nach. Mittels Immunfluoreszenz Analyse (durchgeführt von Deborah Penque, Lissabon) wurde ein erhöhtes Signal/Hintergrund Verhältnis festgestellt, wodurch der Nachweis spezifischer Signale durch Anwesenheit des CFTR-EGFP Fusionsproteins möglich wurde. Während in untransfizierten HT1080 Kontrollzellen eine schwache Hintergrundfluoreszenz im gesamten Zytosol festzustellen war (Abb. 26a), zeigte Linie 7 zusätzlich spezifische Signale an der zellulären Peripherie (Abb. 26b). Dies zeigt, dass einerseits das Fusionsprotein tatsächlich in HT1080 synthetisiert wird und dass eine detektierbare Menge des Proteins sogar in der Zellmembran lokalisiert ist, obwohl nur eine der zwei Transmembrandomänen von CFTR im künstlichen Fusionsprotein vorhanden ist.

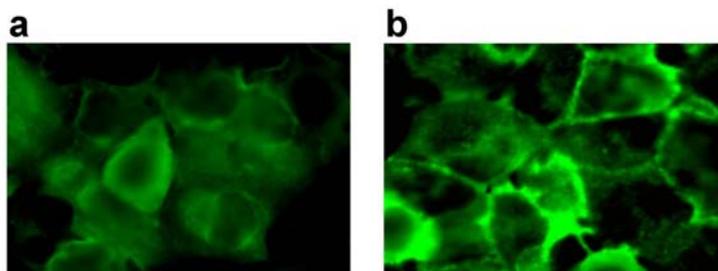


Abbildung 26: Nachweis des EGFP Proteins durch anti-GFP Immunfluoreszenz-Analyse. Im Vergleich zum grösstenteils zytosolischen Hintergrund in untransfizierten HT1080 Kontrollzellen (a), zeigt die exprimierende Linie 7 spezifische Signale an der Zellmembran (b).

Diese Daten zeigen, dass CGT21 als Expressionsmarker geeignet ist, um 1) intakten Transfer langer DNA (>80 kb) nachzuweisen, um 2) eine einzige funktionelle Kopie mittels FISH zu lokalisieren, und um 3) auf der Ebene individueller Zellen die Expression sichtbar zu machen. Damit stellt CGT21 ein hervorragendes Konstrukt dar, um den „low-copy“ Gentransfer und Nachweis zu verbessern. Damit wurden für zwei Kategorien der Gentherapieforschung, dem physikalischen Transfer der Konstrukte, und dem funktionellen Gen Nachweis auf nicht-integrativen, stabilen HACs, unschätzbare Fortschritte gemacht. Dabei spielt u.a. auch eine grosse Rolle, dass das Konstrukt CGT21 in praktisch unbegrenzten Mengen hergestellt werden kann, oder weiter modifiziert werden kann, um ein funktionelles CFTR Protein zu kodieren. Bereits im nächsten Abschnitt des Ergebnisteils wird der äusserst erfolgreiche Einsatz des Konstrukts für einen funktionellen Nachweis für den intakten Transfer geringer Kopiezahl durch einen modifizierten *E.coli*-Stamm beschrieben.

3.8 Baktofektion von Vektoren zur Erzeugung künstlicher menschlicher Chromosomen

Um bakteriellen Transfer von künstlichen Chromosomen als Methode zu etablieren, müssen zunächst einige wichtige Fragen geklärt werden:

- Können lange Gene intakt transferiert werden?
- Können lange, teilweise hoch repetitive, PAC-basierende Konstrukte stabil im *E.coli* Transferstamm vermehrt werden?
- Sind Transferbakterien in der Lage mit niedrigen Kopiezahl der Konstrukte stabile Klone zu formieren?
- Sind für eine erfolgreiche Transformation niedrige MOI (multiplicity of infection) ausreichend, um toxische Effekte durch Überladung der Zellen mit Bakterien zu verhindern?
- Kann mit Baktofektion eine *de novo*-Formierung von HACs, wie sie bei Mikroinjektion und Lipofektion „nackter“ DNA Konstrukte beobachtet wurde, erreicht werden?

Um diese grundsätzlichen Fragen zu klären, wurden mit den Konstrukten B₂T₈, CGT21 und pTTE₁ stabile HT1080⁻ Zelllinien erzeugt, und diese dann mittels PCR, Southern Hybridisierung und FISH analysiert. Die Stabilität EGFP exprimierender HAC Zelllinien (pTTE₁) wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS untersucht.

In die Baktofektion wurde zunächst ein homogener α -sat Array von Chr.17 (ca. 190 kb) eingesetzt, der zuvor mittels Lipofektion und intranukleärer Mikroinjektion auf seine HAC Formierungskompetenz geprüft wurde (Schindelhauer 2002; diese Arbeit, Daten nicht gezeigt). Bei der Mikroinjektion führten ca. 1.200 intranukleäre Injektionen mit ca. 10¹⁰ Molekülen des telomerisierten, linearen B₂T₈ (Abb. 27) pro μ l Injektionsvolumen zu drei stabilen Klonen. Das bedeutet, dass eine kontrolliert niedrige Kopiezahl eine verhältnismässig hohe Effizienz der Klonformierung zeigt. Im Vergleich wird bei der Lipofektion, die in der Regel zur Aufnahme vieler Moleküle in einer grossen Fraktion der Zellen führt, nur eine Klonformierungsrate von 1-100 in 10⁶ Zellen beobachtet. Alle drei per FISH analysierten Linien zeigten HACs in mindestens 1/3 der Metaphasen (15 Metaphasen pro Linie).

Lipofektion von 100 ng telomerisierten B₂T₈ in HT1080⁻ Zellen resultierte in 12 BS resistenten Kolonien (in 5x10⁵ Zellen), von denen 3 mit FISH untersucht wurden. In einem Fall integrierte der Vektor in die telomerische Region eines endogenen Chromosoms, in 2 Fällen wurden *de novo* formierte HACs beobachtet (unveröffentlichte Ergebnisse).

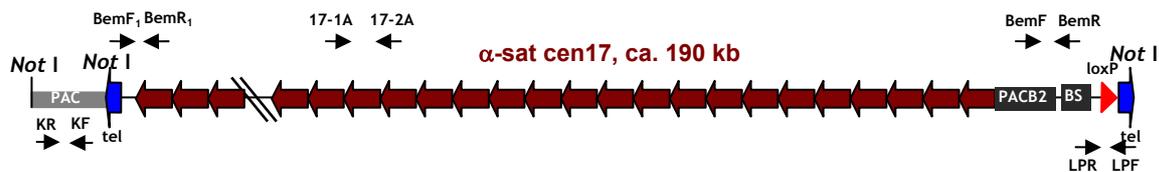


Abbildung 27: B₂T₈. Ein homogenes Chr. 17 α -sat Array aus PAC B2 (ca. 190 kb) wurde von Dr. Schindelbauer als *Not* I Fragment (ca. 206 kb) in die *Bsp* 120 I Stelle des ditelomerischen Vektor pTAT-Bs (17 kb) kloniert. Nach *Not* I Spaltung kann das PAC-Backbone (8,7 kb) abgespalten werden um einen ca. 215 kb langen, telomerisierten HAC Vektor zu erzeugen, der für Mikroinjektionen und Lipofektionen verwendet wurde. In Baktofektionen wurde das zirkuläre Konstrukt (ca. 223 kb) eingesetzt. Die Primerpaare für STS Nachweise per PCR sind mit Pfeilen angegeben. Die Primer 17-1A und 17-2A (Warburton et al., 1990) binden ebenfalls in den tausendfach vorhandenen Repeats der α -sat Arrays der endogenen Chromosomen 17 (nicht maßstabsgetreu).

Für die Baktofektion wurde DNA aus 1/10 Agaroseplug des zirkulären B₂T₈ per Agarase eluiert und in die Transferbakterien elektroporiert. PCR Analyse der Bakterienkolonien bestätigte die Anwesenheit der Marker (LPF/R, BemF/R, KF/R, BemF1/R1 und 17-1A/2A; siehe Abb. 27) in der Mehrzahl der erzeugten Kolonien. Baktofektion einer niedrigen MOI von 25 erzeugte 21 BS resistente HT1080⁻ Kolonien von denen drei (10-3, 10-6 und 10-8) in BS expandiert wurden. Dies zeigt, dass Baktofektion niedriger MOI der Transferbakterien, wovon jedes nur 1-3 Konstrukte enthält, eine effiziente Methode ist, um lange HAC Vektoren stabil zu transfizieren. Linie 10-8 stellte nach ca. 10 Tagen BS Selektion das Wachstum ein und wurde verworfen. Kerne der Linien 10-3 und 10-6 wurden nach 30 Tagen Selektion, sowie nach weiteren 30 Tagen ohne BS auf Objektträger getropft, um per FISH Analyse die Stabilität des Transgens ohne Selektion zu bestimmen. In beiden Linien waren, unabhängig vom Zeitpunkt der Präparation, zwei bis drei HACs pro Metaphase zu erkennen (Abb. 28). In Linie 10-3 sind ein bis zwei, in Linie 10-6 meist zwei bis drei (gelegentlich bis zu fünf) HAC Signale pro Metaphase nachweisbar. Die cen17 Sonde lokalisiert mit zwei grünen Punkten auf den blauen DAPI Spots. Die Rsf Sonde (rot) lokalisiert ebenfalls deutlich auf den HACs (Abb. 28a, b, d, e). Kombination einer *E.coli* gesamt-DNA Sonde (rot) mit der cen17 Sonde (grün) erzeugte ebenfalls deutliche Signale auf den HACs (Abb. 28c, f) was auf den Transfer prokaryotischer DNA-Anteile hinweisen könnte. Tests der *E.coli* DNA-Sonde auf lipofizierten Linien (linearisiert, ohne P1 Replikon des PAC-Vektors) zeigten per „Dual colour“ FISH keine spezifischen Signale. Es muss nun geklärt werden, ob ein Sequenz Anteil des Vektors für eine Kreuzhybridisierung mit der *E.coli*-Sonde verantwortlich ist, oder ob ein bakterieller DNA Anteil übertragen wurde.

Die Ergebnisse belegen eindrucksvoll, dass Baktinfektion eine effiziente Methode ist, um mit dem Konstrukt B₂T₈ *de novo* HACs zu bilden, die ohne Selektion mitotisch stabil in HT1080 segregieren.

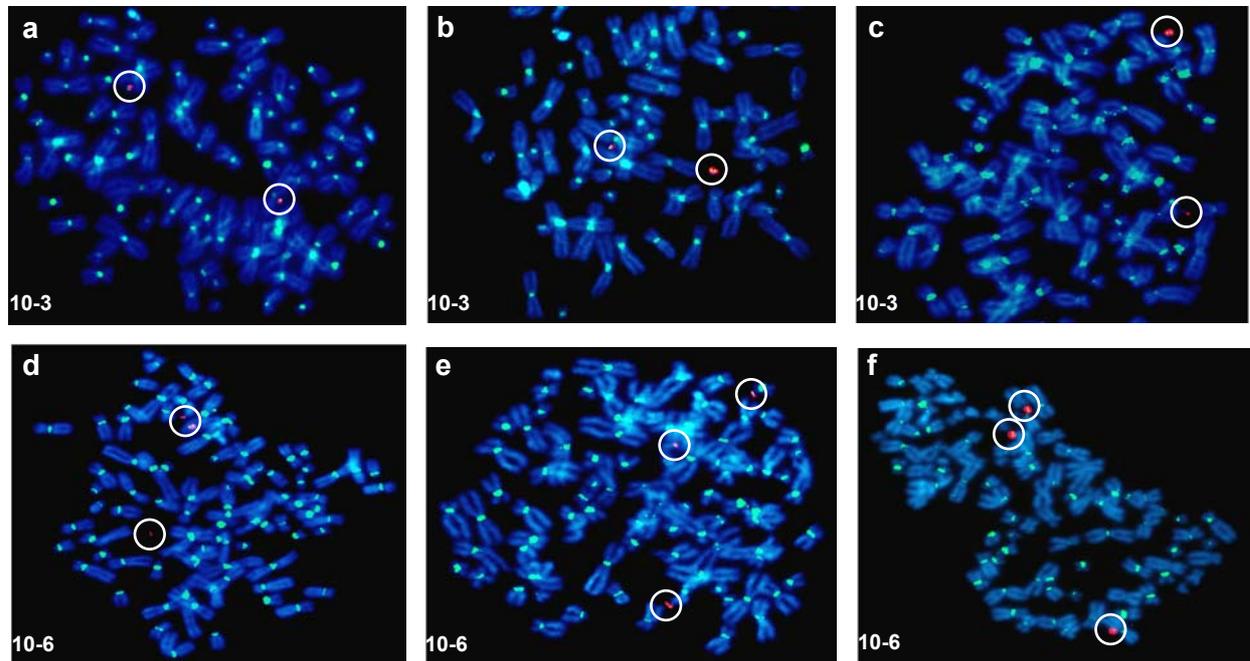


Abbildung 28: HAC Nachweis in den baktifizierten Linien 10-3 und 10-6 mittels „Dual colour“ FISH. a) Metaphasen der Linie 10-3 zeigten nach 30 Tagen Blastocidin-S (BS) Selektion 1-3 HACs (weiße Kreise). (grün: α -sat Probe von Chromosom 17; rot: Vektorprobe "Rsf", ein 3,15 kb pTAT-Bs-Vektorfragment, das u.a. eine loxP Stelle und das Blastocidin-S Resistenzgen enthält. Teile der Probe sind zusätzlich in dem Vektoranteil des Chromosom 17 Zentromer-PACs "B2" enthalten, der in den ditelomeren Vektor pTAT-Bs kloniert wurde). b) Nach weiteren 30 Tagen ohne BS Selektion (entspricht etwa 30 Generationen), sind unverändert HACs vorhanden, was für ihre hohe mitotische Stabilität spricht. c) Die prokaryotische *E.coli* gesamt-DNA Sonde (rot) colokalisiert ebenfalls mit der cen17 Sonde auf den HACs, was entweder für das Vorhandensein prokaryotischer DNA spricht (ein ca. 1,7 kb Anteil des pTAT-Bs Vektors enthält eine *E.coli*-Sequenz) oder für eine unspezifische Kreuzhybridisierung. In jedem Fall kann mit beiden Probenkombinationen keine Integration in die zelleigenen Chromosomen nachgewiesen werden. Der FITC-Kanal (grün) wurde eher unterbelichtet, weil die Megabasen langen α -sat Arrays der endogenen Chromosomen 17, 11 und X sehr starke, überstrahlende Signale erzeugen, und im Experiment die verwandten α -sat Sequenzen auf anderen Chromosomen kreuzhybridisieren. Dabei ist der α -sat Gehalt der HACs (die Input DNA enthält nur 0,2 Mb, der tatsächliche Gehalt auf den HACs ist aber unbekannt) kaum zu erkennen. Aus einer größeren Zahl analysierter Linien mit dem gleichen Konstrukt (aus Mikroinjektionen oder Lipofektionen) wurden allerdings auch Probenbedingungen gefunden, bei denen unter spezifischen Bedingungen (cens 17, 11, X) die Chromosomen 17 DNA auf den HACs hybridisierte, ohne gleichzeitig mit unverwandten Arrays kreuzzuhybridisieren. Ein α -sat Kompetitionsassay von Herrn Schindelbauer (nicht gezeigt), bei dem unmarkierte Chromosom 17 α -sat DNA des Konstrukts in großen Mengen zugesetzt wurde, konnte mit einer Pan-Zentromerprobe eindeutig nachgewiesen werden, dass die HACs keine zusätzlichen α -sat Sequenzen anderer Chromosomen aufgenommen haben. d-f) Metaphasen der Linie 10-6 zeigten 1-4 (in einer Metaphase fünf) deutliche HAC Signale nach 30 Tagen mit (d) und nach 30 Tagen ohne Selektion (e) und ebenfalls keine Integration aller drei Proben in endogene Chromosomen (f).

Eine wichtige Fragestellung ist nun, ob es möglich ist, prokaryotische DNA, falls diese bei der Baktinfektion tatsächlich auf die HACs in Linie 10-6 übertragen wurde, stabil in eukaryotischen

Zellen zu vermehren. Die prokaryotische DNA unterscheidet sich drastisch von der eukaryotischen, z.B. in der generellen Abwesenheit längerer repetitiver Sequenzelemente. Während die Genome höherer Säugetiere zu ca. 50% aus immer wiederkehrenden Sequenzen bestehen (z.B. Alu-repeats, LINE elemente), trägt das prokaryotische Genom im Wesentlichen nur kodierende „single copy“ Sequenzen. Sollte es möglich sein, dass lange, funktionslose DNA (es wird davon ausgegangen, dass prokaryotische Gene in Eukaryoten völlig funktionslos sind) ohne einen hohen repetitiven Anteil stabil in eukaryotischen Zellen vermehrt werden kann, wäre das eine wichtige Erkenntnis für das Design neuer HAC Konstrukte. Für die Konstruktion funktioneller Chromosomen stellen wir uns in der Arbeitsgruppe die Frage, ob die repetitive Struktur der DNA höherer Eukaryoten für Funktionen bei der stabilen Vererbung, wie der Replikation, oder der DNA Reparatur notwendig ist, oder ob seine wesentliche Rolle bei der Zelldifferenzierung und Genregulation liegt.

Um zu überprüfen, ob bakterielle DNA auf HACs übertragen wurde, wurden PCR Analysen aus chromosomaler DNA der Linien 10-3 und 10-6 durchgeführt. Mit Oligonukleotidprimern, die für das IS1 Element („Insertion Element 1“; repetitives Element das in 12 Kopien im Genom des Transferstamms vorliegt; Grillot-Courvalin, 1998) spezifisch sind, konnten Produkte aus beiden Linien 10-3 und 10-6 (nach 30 Tagen BS Selektion) amplifiziert werden (nicht gezeigt). Dies könnte für eine Cotransfektion genomischer *E.coli* DNA mit den HACs sprechen, oder für eine Transposition des IS1 Elements in die HAC Konstrukte während der Vermehrung in *E.coli* (im Stamm DH10B während der Konstruktion oder nach Übertragung auf den Transferstamm). Aus diesem Grund wurde *I-Sce* I gesplattene DNA der Konstrukte pTT, B₂T₈, TTE₁ und CGT21, im ursprünglichen *E.coli* Stamm DH10B und im Transferstamm im PFG aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der Sonde IS1 hybridisiert.

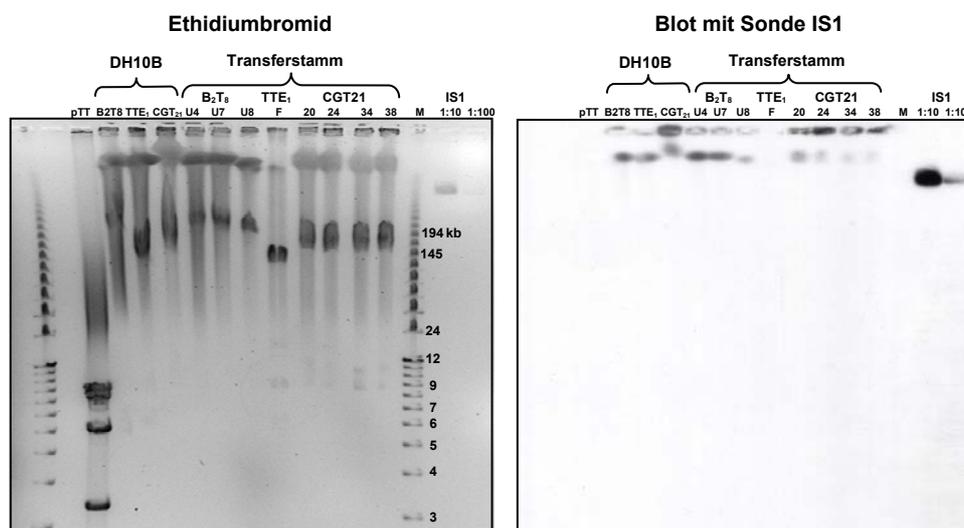


Abbildung 29: Nachweis der Stabilität der PAC Konstrukte im Transferstamm. 1/10 Agaroseplug der angegebenen Vektoren wurde mit *I-Sce I* gespalten, auf einem PFG aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (links). Neben dem Konstrukt pTT (26 kb, flüssige Präparation) wurde B₂T₈ (220 kb), TTE₁ (142 kb) und CGT21 (159 kb) analysiert. Die gleichen Konstrukte wurden auf Transferbakterien übertragen, mehrere Klone wurden expandiert und ebenfalls aufgetragen (B₂T₈: U4, 7 und 8; TTE₁: F; CGT21: 20, 24, 34, und 38). Alle übertragenen Konstrukte zeigten im Transferstamm die gleiche Länge. Das Pulsfeldgel wurde geblottet (Southern) und mittels Hybridisierung mit einer P₃₂-markierten IS1 Sonde analysiert (rechts). In allen Vektoren konnte damit die Anwesenheit des *E.coli*-Elements IS1 eindeutig ausgeschlossen werden. Die Kontrollbahnen mit der IS1 Sequenz (IS1 PCR Produkt, 1:10 und 1:100, kurz vor Gellaufende aufgetragen) und die *E.coli* DNA, die nach Reinigung noch in kleinen Mengen in der Bande limitierter Mobilität auftrat (unterhalb der Taschen, im Ethidiumbromidgel zusammen mit ungespaltener, „genickter“ DNA der Vektoren), hybridisierte spezifisch mit der IS1 Probe (M, 1 kb Leiter und „Midrange II“).

Wie in Abb. 29 deutlich zu erkennen, sind auf keinem der Vektoren IS1 Sequenzen enthalten. Dieser Befund würde also eher für eine Übertragung von *E.coli* Sequenzen bei der HAC Formierung sprechen. Aus diesem Grund wurde genomische DNA aus verschiedenen baktifizierten und einer lipofizierten Linie in Agaroseblöckchen präpariert und ungespalten oder mit *Not I* gespalten auf einem Pulsfeldgel mit einer Auftrennung zwischen 10 kb und 3 Mb analysiert. Dabei konnten jedoch keine spezifischen *Not I* Banden der gespaltenen *E.coli* DNA (zwischen 20 kb und 1 Mb; Smith, 1987) nachgewiesen werden (Abb. 30). Da die Sonde stark mit Material in den Taschen hybridisierte, könnte die *Not I* Spaltung unvollständig gewesen sein, etwa durch Methylierung der CpGs in den *Not I* Stellen. Der nach 2-wöchiger Exposition gleichmässig in allen Spuren auftretende Schmier spricht eher für eine unspezifische Hybridisierung der Sonde. Ein Film der bereits nach zwei Tagen entwickelt wurde, (nicht gezeigt) zeigte nur bei der Positivkontrolle ein deutliches Signal (*E.coli* gesamt-DNA, ca. 50 ng). Als Kontrolle wurden ausserdem zwei pTTE₁ Linien aufgetragen, von denen eine mit Baktofektion (TTE₁-F100/4) und eine mit Lipofektion (TTE₁-20) erzeugt wurde. Da beide Linien im Wesentlichen das gleiche Hybridisierungsmuster zeigten, inklusive der deutlichen Signale in den Taschen, und schwacher Banden bei ca. 380 kb, die spezifisch für beide Linien mit dem Konstrukt pTTE₁ waren, konnte durch dieses Experiment ein Vorhandensein stabil vererbter, deutlicher Mengen von *E.coli* DNA durch die Baktofektion ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse können leider nicht hinreichend klären, wie es zu den starken FISH Signalen mit der *E.coli* gesamt-DNA Sonde kam, legen aber die Möglichkeit nahe, dass es sich um eine im Wesentlichen unspezifische Bindung an die HACs handeln könnte, und nicht um die Anwesenheit großer Mengen *E.coli* Sequenzen selbst. Eine „Blast“ Suche zur möglichen Kreuzhybridisierung mit pTAT und PAC Vektorsequenzen erbrachte Regionen mit einer hohen Übereinstimmung, z.B. 95% über eine Länge von 170 bp (Tab. 2). Die längste perfekte Übereinstimmung betrifft ein *E.coli* Fragment mit einer Länge von 1,9 kb, das im ursprünglichen Vektor pTAT als Spacer zwischen den Telomersequenzen bei der Klonierung des Ampicillin Resistenzgens zusätzlich inserierte.

Tabelle 2: Homologe Regionen von pTAT-Bs bzw. PAC „B2“ mit dem *E.coli* Genom

PAC-Vektor „B2“ U09128	pTAT-Bs BN000528/9	<i>E.coli</i> K12 NC 000913	Größe	Homologie
14.115-14.285		365524-365690	170 bp	95%
5.984-6.122	3.588-3.726	1502793-1502932	139 bp	79%
	17.041-15.133	2661503-2663411	1908 bp	100%

Falls nun die im Wesentlichen uncharakterisierte *E.coli* Sonde sehr lange markierte Fragmente enthält, die über kurze spezifische Sequenzen an die HACs binden, könnten sehr starke FISH Signale entstehen. Durch die zirkuläre Input DNA bei der Baktinfektion ist der Vektoranteil der jeweiligen Konstrukte komplett vorhanden. Bei den linearisierten Fragmenten einer Lipofektion, denen das P1-Replikon vom Vektor pTAT fehlt (nicht aber die 1.7 kb *E.coli* Sequenz), könnte solch eine Kreuzhybridisierung deutlich schwächer ausfallen. Allerdings wäre damit zwar das unterschiedliche Verhalten der Linien bei der FISH Analyse erklärt, nicht aber die positive IS1 PCR in den baktifizierten Linien. Eine einfache Kontamination der PCR Reaktion mit *E.coli* DNA durch eine rekombinante Polymerase (aus *E.coli*) kann aber eher nicht verantwortlich gemacht werden, weil lipofizierte Linien und Leerkontrollen nicht positiv für IS1 waren.

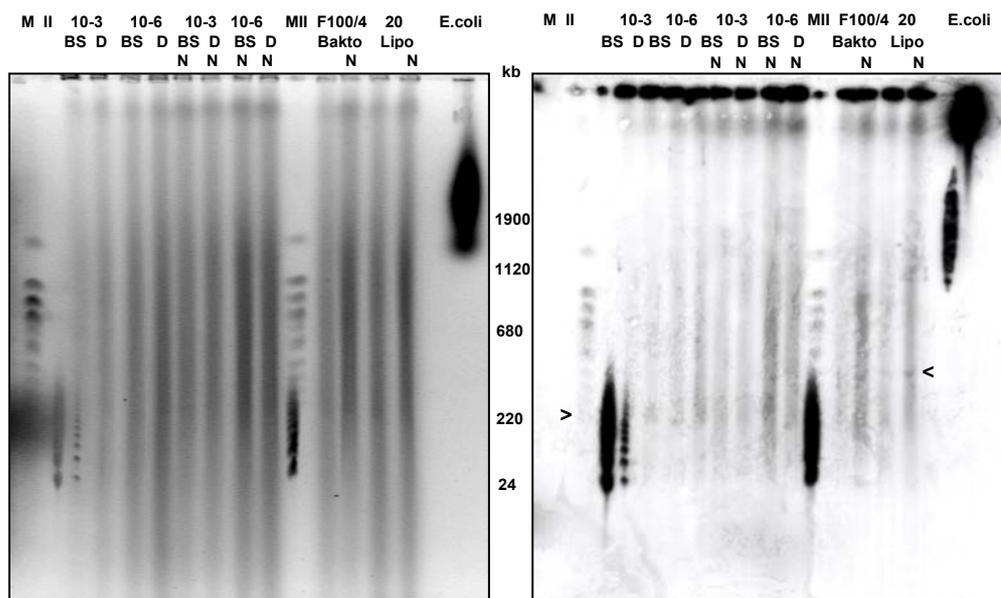


Abbildung 30: Test auf *E.coli* DNA. Pulsfeldgelelektrophorese genomischer DNA der baktifizierten B₂T₈ Linien 10-3 und 10-6, sowie der TTE₁ Linie F100/4 und der lipofizierten TTE₁ Linie 20. Genomische DNA wurde nach 30 Tagen Blasticidin-S Selektion (BS) und nach weiteren 30 Tagen ohne Blasticidin-S Selektion in Agaroseblöckchen präpariert. Ein halbes Blöckchen mit ca. 5x10⁵ Zellen wurde entweder ungespalten, oder *Not* I gespalten (N) aufgetragen (6V/cm, 16 h, Switch Zeit: 1s-60s), und mit Ethidiumbromid gefärbt (links). Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde die DNA mit einer P₃₂ markierten *E.coli* gesamt-DNA Sonde hybridisiert und zwei Wochen auf einem Röntgenfilm exponiert (rechts). Die letzte Spur enthielt genomische *E.coli* gesamt-DNA (ca 50 ng) als positiv-Kontrolle, die 2 h vor Ende des PFG-Laufes aufgetragen wurde. In der *E.coli* Kontrollbahn ist im mit Ethidiumbromid gefärbten Gel vor allem eine große Menge *E.coli* RNA zu sehen. Die ungespaltene *E.coli* DNA (gefällte, gelöste DNA) läuft knapp unterhalb der Tasche (schwach gefärbte Bande). Die Sonde erkennt zwar einen leichten Schmier in allen Spuren, sowie schwache Signale bei einer Länge um 220 kb („>“) (bei

den Linien 10-3 und 10-6 aus dem Konstrukt B₂T₈ das eine zirkuläre Input Länge von 220 kb hat), diese sind allerdings gleichermassen in den ungespaltenen und in den *Not* I gespaltenen Bahnen anwesend, und könnten unspezifisch linearisierte Fragmente darstellen. In den TTE₁ Linien (Input Länge von 142 kb) ist bei ca. 380 kb eine ähnliche, unspezifisch linearisierte Bande zu sehen („<“). Da diese auch in der lipofizierten Linie 20 erkennbar war, in der weder mit PCR noch mit FISH detektierbare Mengen an *E.coli* DNA nachgewiesen werden konnten, handelt es sich in allen Spuren wahrscheinlich um einen unspezifischen Schmier, oder um eine schwache Kreuzhybridisierung der *E.coli* DNA Sonde mit unspezifisch gebrochenen Fragmenten, die höchstwahrscheinlich auf die (unterschiedlich langen) Input DNAs zurückzuführen sind. Zusätzlich zum unspezifischen Schmier und den schwachen Kreuzhybridisierenden Banden, befinden sich stärkere Signale in den Taschen. Diese könnten eine zirkuläre DNA Fraktion darstellen, die mit *Not* I ungespalten bleibt, wenn eine Methylierung der CpGs der *Not* I Stellen im Genom stattgefunden hat. Auch diese mögliche zirkuläre DNA Fraktion ist gleichermassen in baktifizierten und in lipofizierten Linien vorhanden. Diese Ergebnisse sprechen eher gegen das Vorhandensein größerer Mengen *E.coli* DNA durch die Baktifikation, und für eine deutliche Kreuzhybridisierung mit HAC Vektoranteilen. (M, PFG Marker I; II, PFG Marker II).

Um die HAC Stabilität zusätzlich zu den FISH Daten mittels Hybridisierung eines Dosis-Southern Blots zu bestimmen, wurde genomische DNA der Linien 10-3 und 10-6 nach 30 Tagen BS Selektion und nach weiteren 30 Tagen ohne Selektion präpariert, *Hind* III gespalten und zu gleichen Konzentrationen auf einem 1% -igen Agarosegel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde die DNA mit der P₃₂ markierten Sonde "Rsf", die eine 3,15 kb Region auf pTAT-Bs darstellt und den BS Resistenzmarker enthält, hybridisiert (Abb. 31). Mit und ohne Selektion werden die HACs und das Resistenzgen stabil vererbt (vgl. Abb. 23c).

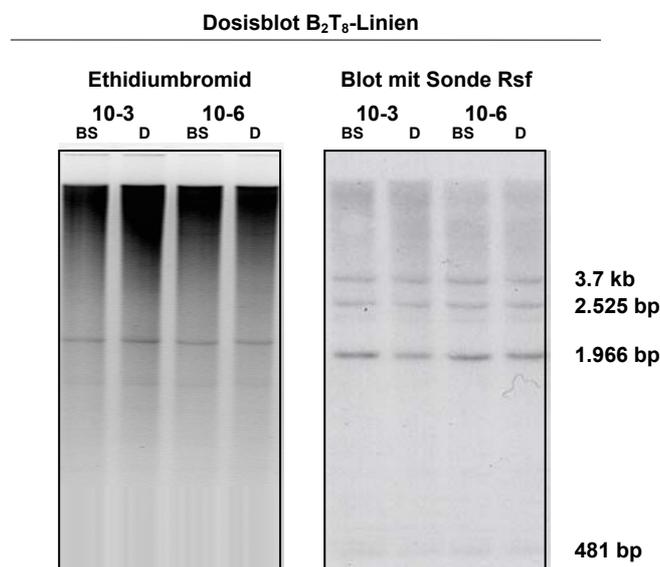


Abbildung 31: Dosisblot der B₂T₈-Linien 10-3 und 10-6. Um eine stabile Vererbung der HACs und eines darauf enthaltenen Resistenzgens nachzuweisen, wurde chromosomale DNA der Linien 10-3 und 10-6 (30 Tage mit (BS) und 30 Tage ohne Selektion (D)) *Hind* III gespalten, zu gleichen Mengen auf einem 1% -igen Agarosegel aufgetrennt und Ethidiumbromid gefärbt (links). Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde die DNA mit der P₃₂-markierten Vektor Sonde "Rsf" hybridisiert. Die Sonde erkennt die B₂T₈ spezifischen Vektorbanden von 481 bp (sehr schwach), 1.966 bp, 2.525 bp und ca. 3,7 kb. Die Intensität der Banden ändert sich über die Zeit (30 Tage) nicht, dies spricht für die hohe mitotische Stabilität der HACs und ihres enthaltenen Resistenzgens unabhängig von der Selektion.

3.8.1 Baktofektion von pTTE₁ führt zur Bildung grüner Kolonien und *de novo* HAC Formierung

Der in dieser Arbeit konstruierte HAC Vektor pTTE₁, der ca. 116 kb α -sat DNA von Chr. 5 enthält und nach Telomerisierung und Lipofektion HACs *de novo* bildete, wurde auf seine Kompetenz getestet, per Baktofektion stabile Linien mit HACs zu erzeugen. Die DNA von 1/10 Agaroseblöckchen, welches hochreinen, zirkulären pTTE₁ enthielt, wurde per Agarose freigesetzt und 1 μ l davon in den Transferstamm BM2710 elektroporiert. Dies erzeugte über 50 Kolonien, die mit geeigneten Oligonukleotidprimern nach STS (LPF/R, BemF/R, KF/R, BemF1/R1, EGF/R und 5IF/R; siehe Abb. 32) getestet wurden. In nahezu allen Klonen konnten die analysierten STS nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was für einen vollständigen Transfer von pTTE₁ in die Bakterien spricht. Die stabile Vermehrung des intakten Konstrukts wurde mittels Längenbestimmung auf einem Pulsfeldgel überprüft (siehe Klon F; Abb. 29).



Abbildung 32: pTTE₁ für Baktofektion. Das Konstrukt pTTE₁ (ca. 116 kb α -sat Array E₁ von Chromosom 5 in pTT kloniert), wurde aus 1/10 Gelblöckchen isoliert und zirkulär in Baktofektionen eingesetzt. Die Lage der „sequence tagged sites“ (STS) ist mit den entsprechenden Primerpaaren angegeben (nicht maßstabsgetreu).

Baktofektion in HT1080⁻ mit einer MOI von 25 erzeugte über 17 BS resistente Kolonien, von denen sechs (TTE₁-F100-1, 3, 4, 5, 6 und 7) isoliert und expandiert wurden. Die überwiegende Mehrzahl der gebildeten Klone zeigte eine homogene, unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich sichtbare Expression des EGFP Markers in allen oder fast allen Zellen. Um die Stabilität der Expression über einen längeren Zeitraum hinweg zu beobachten, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten per FACS-Analyse und unter dem Mikroskop die Fraktion grüner Zellen bestimmt. Aus Tabelle 3 geht hervor, dass der Prozentsatz EGFP-exprimierender Zellen in drei Linien (F100-1, 4 und 5) über den Zeitraum von 30 Tagen ohne Selektion sehr langsam abnahm, was durch einen seltenen mitotischen Verlust von HACs (eine Verlustrate von < 1% pro Mitose ist als normale Stabilität zu werten), oder gelegentliche epigenetische Gen-Inaktivierung (Silencing) zu erklären wäre. Linie F100-7 („Ausreisser“) zeigte eine deutliche Zunahme an grün fluoreszierenden Zellen, wobei diese Linie zu Beginn nur vereinzelt grüne Zellen aufwies.

Tabelle 3: Analyse der Stabilität der grünen Fluoreszenz in den TTE₁ F100 Linien

TTE ₁ Linien	% grüne Zellen FACS (25d BS)	% grüne Zellen Mikroskop (30d BS)	% grüne Zellen Mikroskop (30d ohne BS)
F100-1	99,5	100	70
F100-3	60	90	90
F100-4	99,4	100	75
F100-5	94,5	95	90
F100-6	100	100	100
F100-7	0,6	5	30

Metaphasen der Linien F100-1 und F100-4 wurden nach 30-tägiger BS Selektion und weiteren 30 Tagen ohne Selektion präpariert, und mittels „Dual colour“ FISH mit den Sonden Rsf (rot) sowie cen5I E₁ (grün) hybridisiert. In der Linie F100-1 wurden in 10 von 19 Metaphasen 1-2 HACs nachgewiesen, Linie F100-4 zeigte in 16 von 23 untersuchten Metaphasen deutliche HAC Signale (1-2 pro Metaphase) (Abb. 33).

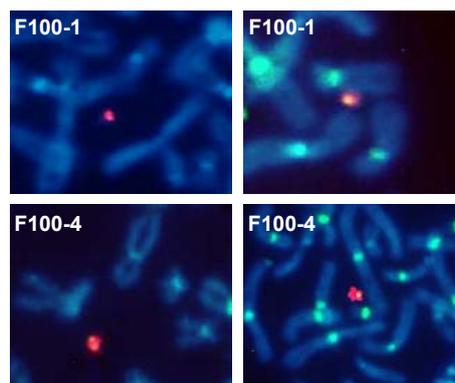


Abbildung 33: Nachweis von HACs in den stabilen TTE₁ Linien F100-1 und F100-4 mittels „Dual colour“ FISH. Ausschnitte aus je zwei Metaphasen beider Linien. In beiden Linien sind in mindestens 50% aller Metaphasen deutliche HAC Signale (rot = Rsf; grün = cen5I „E₁“; blau = DAPI) zu erkennen.

Diese Resultate zeigen, dass der neu konstruierte HAC Vektor pTTE₁ mit Baktinfektion in die Zelllinie HT1080 stabile künstliche Chromosomen *de novo* formiert. Die „low copy“ HACs segregieren auch ohne Selektion stabil (30 Tage entspricht etwa 30 Zellteilungen). Diese hohe Stabilität der HACs ohne Integration in endogene Chromosomen spricht für die Formierung funktioneller Zentromere.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Vektor DNA, die nicht wie bei einer Lipofektion als gereinigte, "nackte" DNA eingesetzt wurde, sondern direkt aus den Transferbakterien freigesetzt wurde, effizient Zentromere formieren kann.

3.8.2 Baktofektion von CGT21 erzeugt Klone mit hoher Effizienz

CGT21 (159,4 kb) ist die telomerisierte, mit dem Blasticidin-S Resistenzgen ausgestattete Version des genomischen CFTR/EGFP Fusionsgens CG2. CGT21, das keine Zentromerkomponente enthält, ist damit geeignet, die Expression ausgehend vom genomischen CFTR Promoter mittels konventioneller stabiler Integration des Transgens in ein endogenes Chromosom nachzuweisen. Da die 10 Exons des Fusionsgens über eine genomische Länge von 80 kb angeordnet sind, zeigt die Expression des synthetischen Exon 10-EGFP den intakten Transfer langer DNA an. Damit konnten zwei wesentliche Fragestellungen zur Baktofektion, den intakten Transfer langer DNA und die Ausbildung einer für die Expression geeigneten Chromatinstruktur, überprüft werden.

Um mit Baktofektion stabile Zelllinien zu erzeugen wurde, wie bei den HAC Vektoren im vorgehenden Kapitel, zirkuläre DNA aus 1/10 Agaroseblöckchen in die Transferbakterien elektroporiert. Mehrere Kolonien wurden per PCR Analyse auf die Anwesenheit der STS (LPF/R, BemF/R, EGF/R und BemF1/R1; siehe Abb. 23a) getestet und Klone, die alle Marker zeigten, in die Baktofektion von HT1080⁻ Zellen eingesetzt. Es konnten 60 BS resistente Kolonien aus zwei Baktofektionsrunden erzeugt werden, 40 wurden isoliert und 23 davon zeigten den EGFP-Marker (per EGF/R PCR aus genomischer DNA). Vier der 23 Transferbakterienkulturen wurden zum Zeitpunkt der Baktofektion mittels Pulsfeldgelelektrophorese untersucht. Alle zeigten die komplette Länge des Konstrukts in einer *I-Sce I* Spaltung (Abb. 34). Insgesamt wurden 14 baktofizierte HT1080 Linien per RT-PCR (von Exon 8 bis zum synthetischen Exon 10-EGFP) nach 30 Tagen BS Selektion analysiert, wovon neun Expression vom synthetischen CFTR Expressionskonstrukt CGT21 zeigten (Laner, 2005). Dies beweist den intakten Transfer, zumindest der minimalen funktionalen Geneinheit (ca. 80 kb), des 159,4 kb langen Konstruktes CGT21 (Abb. 23a), sowie Expression vom endogenen CFTR Promotor und korrektes Spleissen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Baktofektion eine einfache und effiziente Methode für den Gentransfer langer „low copy“ DNA-Konstrukte ist.

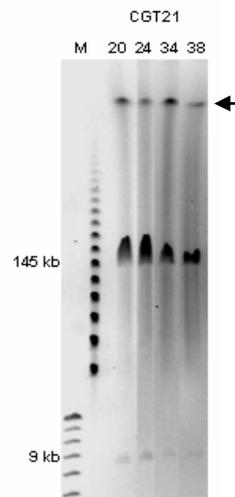


Abbildung 34: Stabilität von CGT21 in Transferbakterien. Die 4 Transferbakterienkulturen CGT21 20, 24, 34 und 38 wurden zum Zeitpunkt der Baktofektion in Agaroseplugs gegossen, gereinigt und zur Längenbestimmung der Konstrukte mit *I-Sce* I gespalten. PFGE und Ethidiumbromidfärbung bestätigte intakten Transfer und stabile Propagation in den Transferbakterien. Die 8,7 kb Bande repräsentiert den mit *I-Sce* I oder *Not* I abspaltbaren PAC-Backbone (siehe Abb. 32), ausserhalb der Telomere (M, PF Marker II; Pfeil, limitierte Mobilitätsbande).

4 Diskussion

Das Ziel einer Gentherapie mit Hilfe künstlicher menschlicher Chromosomen ist die Etablierung einer zelltypspezifischen, regulierten Expression eines therapeutischen Gens in Zielzellen, und zwar ohne die Zelle und nachfolgende Tochterzellen zu schädigen. Die Übertragung eines Gens in einer Weise, die über das reine Ablesen der kodierenden Sequenzen hinausgeht und eine mitotisch stabile Vererbung der Sequenzen ermöglicht, die dabei ein funktionelles Chromatin ausbilden, das eine normale, regulierte Expression in den verschiedenen Zelltypen erlaubt, ist allerdings ein komplexes Vorhaben. Zahlreiche Transfektionsstudien zeigten, dass der rein physikalische Transfer eines Genfragments in den Zellkern unzureichend ist. Nur in seltenen Fällen werden trotz Anwesenheit der (Resistenz)Gene stabile Linien erhalten. Diese weisen dann alle eine Integration in zelleigene Chromosomen auf, die im Wesentlichen durch zelleigene Reparaturvorgänge mit der transfizierten DNA an zufälligen Stellen entstehen.

Für eine stabile Vererbung der DNA ohne Integration in die Chromosomen des Wirts wird konsequenterweise ein voll funktionstüchtiges Chromosom notwendig, das das Transgen trägt. Nur so können die essentiellen Funktionen erhalten werden (Segregation, Replikation, regulierte Expression, Reparatur, etc.), die auch an den endogenen DNA Sequenzen fortwährend ablaufen. Die stabile mitotische Vererbung eines Chromosoms setzt voraus, dass seine Sequenz einmal pro Zellzyklus komplett repliziert wird und gegebenenfalls auftretende Schäden effizient repariert werden. Um ein für die Expression des Transgens geeignetes Chromatiumfeld auszubilden, ist ferner die Anordnung im dreidimensionalen Gefüge des Zellkerns entscheidend.

Für die stabile Segregation und Replikation des Gens werden also Replikationsursprünge, Zentromere, und Telomere notwendig. Beim Transfer von "nackter" DNA, die als solche nur ein ungeordneter, funktionsloser Molekülfaden ist, müssen Sequenzelemente verwendet werden, die bereitwillig genetische Funktionen erwerben, indem sie z.B. bestimmte Chromatinkomponenten bzw. Proteine binden, und somit die Bildung eines funktionellen, dreidimensionalen Gefüges ermöglichen. Können wir diese Prozesse durch die Wahl der Sequenzelemente und ihrer geeigneten Anordnung, sowie durch eine schonende Behandlung der Zellen soweit steigern, dass sie unmittelbar nach dem physikalischen Transfer ablaufen, sollte es möglich werden, Gene effizient und stabil zu übertragen.

Das wichtigste genetische Element eines Chromosoms stellt das Zentromer dar. Im Jahr 1997 ist es Willards Gruppe zum ersten Mal gelungen künstliche menschliche Chromosomen aus nackter DNA *de novo* zu erzeugen, indem lange Tandem Repeats klonierter Zentromer-DNA

mit gesamt-genomischen Sequenzen gemischt und cotransfiziert wurden. Seitdem berichteten mehrere Gruppen als „proof of principle“ den stabilen Transfer verschiedener isolierter Gene (HGPRT-Gen, Mejia und Larin, 2001; GCH1-Gen, Ikeno, 2002), durch *de novo*-Formierung künstlicher Chromosomen. Die Rate der Erzeugung stabiler Linien mit HACs ist allerdings noch sehr gering, nicht wesentlich effizienter als die Integration. Nun stellt sich die Herausforderung, wie HACs effizienter gemacht werden können, um eine klinische Anwendung vorzubereiten, die auf viele Zellen gleichzeitig zielt.

Da die Mechanismen, die einer unmittelbaren genetischen Funktion der transfizierten Konstrukte zugrunde liegen noch grösstenteils unverstanden sind, führt die Entwicklung effizienterer Vektoren über den Weg der schrittweisen Verbesserung in Transfektionsassays, in denen verschiedene Komponenten mit unterschiedlichen Anordnungen und variablen Kopiezahlungen eingesetzt werden. Dafür sind Marker notwendig, die eine schnelle, zuverlässige Bestimmung erlauben wieviele Vektor Moleküle in wieviele Zellen transfiziert wurden (und wieviele davon schliesslich stabile HACs bildeten), sowie Marker welche den intakten Transfer langer, genomischer Vektoren anzeigen können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Marker entwickelt, die jeweils eine dieser Aufgaben erfüllen können. Ein schneller Nachweis transfizierter Konstrukte kann prinzipiell entweder durch transiente Expression eines Reportergens (EGFP-cDNA Kasette) oder durch direktes Labeln der transfizierten DNA (Gal4-/ Lac-tag) erfolgen. Da gezeigt werden konnte, dass einzelne EGFP-Marker nicht ausreichen, um einen „low-copy“ Transfer mittels transienter Expression nachzuweisen (3.1, S. 54), und dass eine Überladung von Zielzellen mit DNA Konstrukten zwar die Nachweisbarkeit steigert, aber eine stabile Klonformierung behindert (3.6, S. 81), war die Entwicklung effizienter „low copy“ Nachweissysteme ein weiteres Ziel vorliegender Arbeit. Die dafür notwendige Steigerung der Sensitivität sollte durch die Klonierung von multiplen Kopien in Tandem Arrays erreicht werden. Das CFTR-EGFP Expressionskonstrukt CGT21, das vom CFTR Promotor exprimiert wird und alle Exons korrekt spleisst, erwies sich als geeigneter Marker, um den intakten Transfer langer genomischer Vektoren über die Expression des chimären Fusionsproteins (RT-PCR und Immunohistochemie) anzuzeigen (3.7, Abb. 25).

4.1 Marker für *in vivo* Gentransfer weniger Vektormoleküle

Durch Mikroinjektionsversuche der EGFP-cDNA Kasette des Plasmids pEGFP-N1, die durch den relativ starken, konstitutiven CMV(ie)-Promotor gesteuert wird und mit zu den sensitivsten Reportersystemen zählt, konnten wir zeigen (3.1, S. 54; Schindelbauer, 2002), dass einzelne Moleküle nicht ausreichen, um durch transiente Expression nachgewiesen zu werden. Die

kopiezahlabhängige Fluoreszenz ist erst bei Anwesenheit von mehr als ca. 10^3 - 10^4 Reportermolekülen im Nukleus voll ausgeprägt, unabhängig von der verwendeten Zelllinie. Zwar sind in seltenen Fällen auch bei hohen Verdünnungen (10^1 - 10^2 Moleküle pro Injektionsvolumen) schwache Signale detektierbar, diese sind jedoch zum verlässlichen, transienten Nachweis des Transgens ungeeignet. Durch Kontrollexperimente mit Zellen die in verschiedenen Phasen des Zellzyklus geblockt wurden konnten wir ausserdem zeigen, dass die Expression des Reporters nicht auf vom Zellzyklus abhängigen Prozessen (z.B. replikationsabhängige Amplifikation einzelner Moleküle) beruhte. Obwohl die Signalintensität zwischen 10^3 und 10^5 Molekülen beträchtlich zunahm (Abb. 8b), änderte sich die Gesamtzahl der grün fluoreszierenden Zellen in diesem Bereich nur moderat (Tab. 1, Abb. 9, S. 56-57). Dies spricht dafür, dass die Stärke der frühen, transienten Expression hauptsächlich additiver Natur ist und nicht auf einem statistischen Prozess beruht, der einzelne Plasmidmoleküle aktiviert. In letzterem Fall würde man erwarten, dass solch zufällige Prozesse weit weniger häufig bei niedrigeren Kopiezahlen auftreten, was jedoch nicht beobachtet werden konnte. Dem entsprechend war der Abstand zwischen zwei exprimierenden Zellen, ein nützlicher Parameter zum Ausschluss von Abschnitten nicht erfolgreicher Injektionen (z.B. in Folge einer verstopften Spitze), bei allen Reihen über 10^3 Molekülen identisch (Abb. 8b). Aus diesem Grund ist es sehr wahrscheinlich, dass auch ein Grossteil der Zellen von Gruppen mit niedrigen Kopiezahlen den EGFP-Reporter exprimieren, dieser jedoch nicht sichtbar wird, da er sich unterhalb der Nachweisgrenze befindet. Diese Daten zeigen, dass einzelne Moleküle des EGFP-Reporters nicht ausreichen, um transient eine detektierbare Menge Protein zu bilden.

Da nicht klar ist, ob einzelne, stabil in endogene Chromosomen integrierte Reportermoleküle (z.B. EGFP) mitunter für einen verlässlichen Nachweis ausreichen könnten, sollte untersucht werden ob eine EGFP-cDNA Kasette auf „low copy“ Konstrukten nachgewiesen werden kann, die stabile HACs formieren. Die Klonierung einer EGFP-Kasette auf den neu konstruierten Vektor pTT dient deshalb der Identifizierung erfolgreich transfizierter Zellen, die den Reporter von stabil vererbten Kopien exprimieren (im Gegensatz zu transienter Expression).

Diese Überlegung trifft auch auf das CFTR-Expressionskonstrukt CGT21 zu, in dem die EGFP-cDNA unter Einhaltung des Leserahmens an Exon 10 des genomischen CFTR-Lokus kloniert wurde und somit unter der Kontrolle des endogenen CFTR-Promotors steht. Mit diesem Konstrukt kann (einerseits durch Fluoreszenz nach verstärkter Expression, andererseits durch RT-PCR Analyse der Expression des künstlichen Fusionsproteins) der intakte Transfer von 80 kb des Primärtranskripts (vom CFTR Minimalpromotor-Exon 1 bis Exon 10-GFP-Exon 24) bestimmt werden.

Um jedoch auch frühe, transiente Expression durch physikalische Anwesenheit transfizierter DNA im Zellkern nachzuweisen, ist es notwendig, weit sensitivere Systeme auf den Vektoren zu verwenden. Eine einfache Methode ist dabei die Multimerisierung einer cDNA-Kassette. Da PAC Vektoren in ihrer Klonierkapazität praktisch keinen Beschränkungen unterliegen, könnten sehr lange Reporter-Arrays auf den Konstrukten verwirklicht werden. Die Klonierung multimerer EGFP-Expressionskassetten bis zu einer Länge von ca. 100 kb, was ca. 60 Kopien der monomeren 1,7 kb EGFP-cDNA Kasette entspricht, sollte den verlässlichen frühen Nachweis weniger Vektor Moleküle in Modellzellen ermöglichen (Abb. 11d). Insertion der Arrays auf verschiedene PAC Vektoren soll eine frühe Bestimmung der erfolgreich transfizierten Zellen und der Rate daraus gebildeter stabiler Klone ermöglichen, wodurch eine Identifizierung geeigneter HAC Vektoren bzw. HAC Komponenten beschleunigt und erleichtert wird.

Gleiches gilt für das neu konstruierte DNA-tag auf Basis der Gal4-BD (Teil der Gal4-UAS aus *S.cerevisiae*) und des lac-Operators (aus dem *E.coli* Galaktose-Verwertungsweg). Beide DNA Sequenzen, die spezifisch von den entsprechenden Proteinen (Gal4-DNA-Binde-Domäne bzw. Lac-Repressor) gebunden werden, stehen für *in vivo* Versuche in Modellzellen bereit. Das Gal4-tag könnte darüber hinaus mehr als nur die Rolle eines Markers übernehmen. Aus Massentransfektionsstudien mit Reporterplasmiden, welche zum Teil dutzende von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, Hormonrezeptoren und andere im Nukleus wirkende Proteine auf ihren Kontrollelementen (Promotor, Enhancer oder ori-Sequenzen) enthalten, konnte durch transiente Expression gezeigt werden, dass der Kerntransport großer Plasmidmassen im Vergleich zu Plasmiden ohne Kontrollelemente teilweise dramatisch erleichtert wurde (Zohar, 2001). Dieses „nuclear hitchhiking“ von DNA Konstrukten mit Bindestellen für NLS-tragende Proteine kann zur Steigerung des Gentransfers verwendet werden. Obwohl diese Daten durch Massentransfektion transienter Reporterplasmide gewonnen wurden, könnte auch für HAC Vektoren überprüft werden, ob durch zusätzliche Bindestellen für bestimmte Kernproteine (zu den unspezifisch vorhandenen) auch die Aufnahme oder Lokalisation von einzelnen HAC Konstrukten im Zellkern günstig beeinflusst werden könnte. Es ist bekannt, dass sich einige Viren (Eppstein-Barr, HIV, SV40) des „nuclear hitchhiking“ als Methode bedienen, um ihr Genom von wirtszelleigenen Komponenten in den Nukleus transportieren zu lassen (Dean, 1997; Zohar, 2001). Dean fand Hinweise, dass ein 72 bp Fragment des SV40 enhancers, der Konsensussequenzen für mehrere allgemeine Transkriptionsfaktoren wie SP1, AP1, Oct-1 und NF κ B besitzt, für den aktiven Kerntransport SV40 ori-tragender Plasmide verantwortlich ist (Dean, 1999). Abbildung 35 gibt einen Überblick über den Mechanismus von „nuclear hitchhiking“ transfizierter DNA Moleküle mit entsprechenden Erkennungssequenzen.

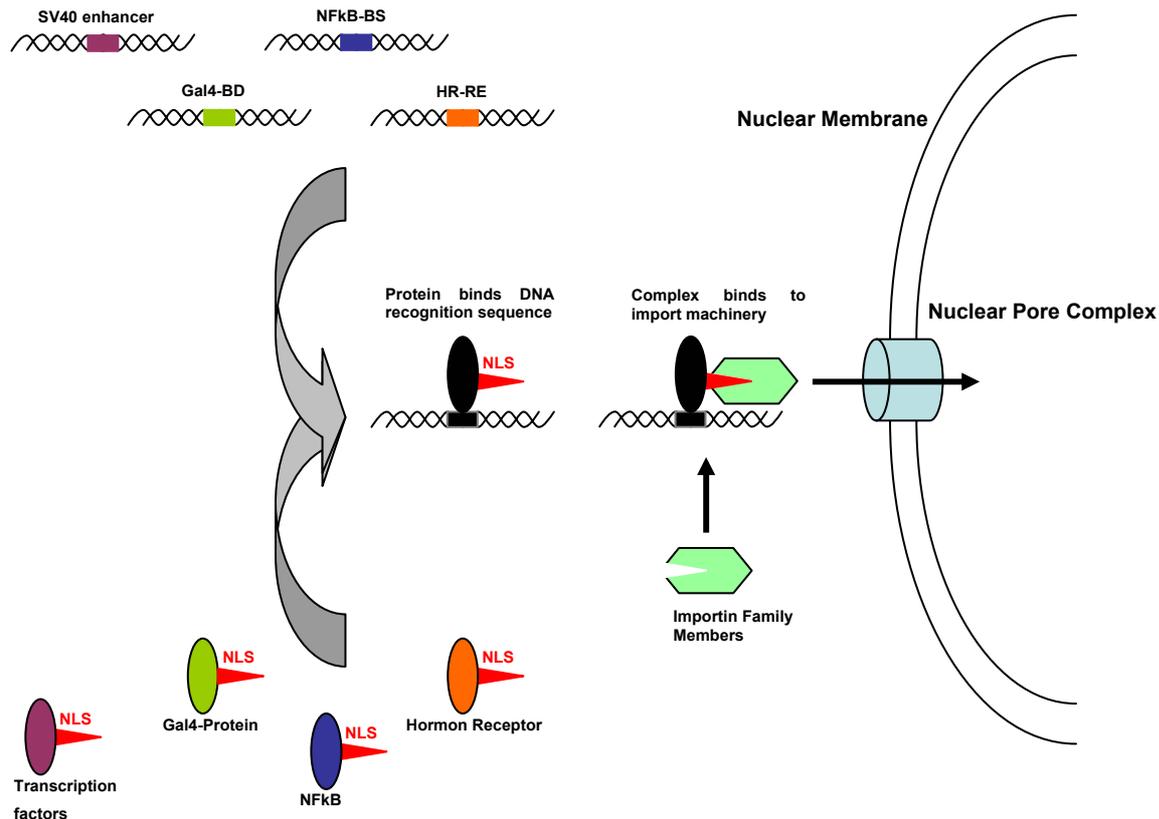


Abbildung 35: Modell des „Nuclear hitchhiking“ extrachromosomaler DNA-Sequenzen mit Erkennungsstellen für NLS-tragende Proteine: Die im Cytoplasma synthetisierten, kernlokalisierten Proteine (allgemeine Transkriptionsfaktoren (lila), Gal4-Protein (grün), NFκB (blau) oder Hormon-Rezeptoren (orange)) binden bereits im Cytoplasma an ihre jeweilige DNA-Erkennungssequenz (auf dem transfizierten DNA Konstrukt, in der entsprechenden Farbe) und können diese über ihre NLS-Domäne unter aktivem, Ran-GTP vermitteltem Transport durch den „Nuclear-Pore-Complex“ (NPC) schleusen. Die Klonierung entsprechender Erkennungssequenzen auf HAC Vektoren könnte den Transport in den Zellkern steigern. NFκB-BS, Bindestelle des Transkriptionsfaktors NFκB. HR-RE, Hormon-Rezeptor Response Element.

Transfektionsstudien mit Teilen des SV40 Genoms legen einen direkten Zusammenhang von schrittweiser Deletion des SV40 ori und Abnahme des Kerntransportes nahe. Dies könnte bedeuten, dass neben der Art auch die Menge an gebundenen Transkriptionsfaktoren ein Faktor für die Effizienz des Kerntransportes darstellt. Mesika et al verwendete fünf repetitive Bindestellen für den Transkriptionsfaktor NFκB, um die Rate des Gentransfers zu steigern, und konnte ebenfalls eine direkte Beziehung zwischen Effizienz des Transfers und Kopiezahl der Bindestellen zeigen (Mesika, 2001). Da diese Studien grösstenteils mit COS Zellen oder SV40 „large T Antigen“ immortalisierten Zelllinien durchgeführt wurden, spiegelt die eigentliche Expressionshöhe nicht direkt den Kerntransport wieder, obwohl der Kerntransport eines einzelnen Plasmids (und die anschliessende Amplifikation in diesen Zellen) jedoch eine Voraussetzung für eine Expression darstellt.

Verschiedene Hormon-Rezeptoren (HR) wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit untersucht, den Gentransfer von Plasmiden mit ihren entsprechenden DNA-Erkennungssequenzen („Response Elements“, RE) zu steigern. Als besonders effizient erwiesen sich dabei der Thyroidhormonrezeptor (Baumann 2001; Maruvada 2003). Dieses System ist zusätzlich durch Zugabe von Triiodothyroin (T_3), einem natürlichen Liganden des Rezeptors, induzierbar (T_3 rekrutiert Thyroidhormonrezeptoren aus dem Nukleus in das Cytoplasma), was es für Gentransfer Systeme im Hinblick auf eine *in vivo* Anwendung noch interessanter macht. Verschiedene Kopiezahlen (1-mer bis 5-mer) des Thyroidhormonrezeptor Response Elements F2 (TRE-F2) aus dem Hühner-Lysozym Enhancer (Zhu, 1997) wurden in Kollaboration mit Dr. Carsten Rudolph, Haunersche Kinderklinik, in Reporterplasmide kloniert und werden momentan in Transfektionsstudien auf ihre Effizienz getestet den Kerntransport von „high copy“ Reporterplasmiden zu steigern, bevor sie auf HAC Vektoren kloniert werden. Da die in diesen Studien verwendeten

Da der DNA Gehalt von HAC Konstrukten meist grösser ist als der transfizierter Vireng Genome (2,5 kb bei Hepatitis B Viren bis 150 kb bei Herpesviren; Kasamatsu, 1998) oder „high copy“ Plasmide, ist nicht klar, ob HAC Konstrukte gleichermassen über die ca. 28 nm (entspricht ca. einem „nackten“ DNA-Loop) grosse Kernpore transportiert werden können. Zusätzlich zu den auf den Konstrukten enthaltenen Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. im CMV-Promotor der EGFP-Kassette oder in den Promotorregionen der Resistenzgene Amp, Kana und Bs) könnten klonierte Multimere von spezifischen Bindestellen (z.B. Gal4-BD, TRE-F2) eine Steigerung des Kerntransportes bewirken.

Transfektionsstudien von Chan mit dem Gal4-Protein (Gal4-Transkriptions-Aktivator) führten zu dem Ergebnis, dass die NLS am N-Terminus des Gal4-Proteins geeignet ist, um Plasmide mit der 17 bp Gal4-Binde-Domäne (Gal4-BD) nach dem Prinzip des „nuclear hitchhiking“ in den Kern zu transportieren (Chan 1998/99). Somit könnte die Gal4-BD Sequenz auf den synthetischen Oligonukleotid-Arrays zwei Funktionen erfüllen: Den direkten Nachweis der transfizierten, Gal4-BD tragenden DNA über ein markiertes Gal4-Fusionsprotein sowie einen erleichterten Kerntransport nach cytoplasmatischer Bindung an Gal4-Proteine und NLS-vermitteltem Import über den NPC. Verschiedene Kopien der Gal4-BD (9-mer, 17-mer und 34-mer) wurden von Dr. Grillot-Courvalin (Institut Pasteur, Paris) auf ihre Effizienz getestet in transienten Transfektionsassays den Kerntransport von Reporterplasmiden zu steigern. In vorläufigen Versuchen konnte nur eine moderate Steigerung der transienten Reporterexpression gezeigt werden, der Transfer einzelner HAC Vektoren könnte jedoch trotzdem effizienter ablaufen. Die im Linkerbereich zwischen zwei Gal4-BD des synthetischen Oligonukleotides inserierte 17 bp Sequenz mit Homologie zur CENP-B Protein Erkennungsstelle (CENP-B Box) könnte zusätzlich für eine Immunfärbung mit anti-CENP-B

Antikörpern verwendet werden. Zur Zeit ist nicht geklärt, ob ein aktiver Transport einzelner HAC Vektoren eine *de novo*-Formierung stark begünstigen könnte, weil anders als bei der passiven Aufnahme in den Kern während der Mitose, andere DNA-Zahlenverhältnisse und Kernfunktionen oder Reparaturaktivitäten an den Kernporen zu erwarten wären.

4.2 pTT, ein verbesserter HAC Vektor

Da *de novo* gebildete HACs in der Regel länger erscheinen (Propidiumjodid-Färbung, Größe der DAPI-Elemente) als die eingesetzten Input DNA Moleküle vorgeben, wird von einer Konkaterisierung bzw. Verkettung mehrerer Input Moleküle ausgegangen. Dabei könnten seltene zelleigene Mechanismen (Rekombination, Ligation, Replikation, Reparatur, ect.) an den transfizierten Konstrukten stattfinden, die die Effizienz der Formierung möglicherweise senken, aber Voraussetzung dafür sein könnten, dass sich HACs überhaupt formieren. Von einer „richtigen“ Anordnung der Komponenten auf den Vektoren wird eine Steigerung der HAC Formierungseffizienz erwartet. Gegenüber einer frühen Methode der HAC Erzeugung, der Cotransfektion gesamt-genomischer Sequenzen und telomerischer Sequenzen mit einem selektionierbaren α -sat Array (Harrington 1997), stellte die Entwicklung von PAC-basierenden ditelomerischen Vektoren als Träger der isolierten Komponenten eine deutliche Verbesserung dar (Schindelhauer, 1999; Ebersole, 2000). Der Konstruktion von pTT gingen mehrere Überlegungen voraus:

So sollte überprüft werden, ob die Duplikation von Vektorsequenzen, die im Gegensatz zur genomischen DNA keine homologen Sequenzen für Rekombination oder Reparatur besitzt, die Klonformierungsrate beeinflusst. Dieser Überlegung liegt zugrunde, dass genomische DNA praktisch nie in „single copy“ vorliegt und somit jederzeit effizient über homologe Rekombination repariert werden kann. Da sich α -sat Arrays-tragende HAC Vektoren nach Transfektion scheinbar zu multimeren der Input DNA formieren, könnte das ein Hinweis auf die Notwendigkeit der Anwesenheit duplizierter Sequenzen für die HAC Stabilität sein. Duplizierte Telomer Repeats könnten das Konstrukt über die erleichterte Ausbildung endständiger T-Loops zusätzlich stabilisieren.

Arbeiten auf dem Gebiet der Kern-Architektur zeichneten in den letzten 20 Jahren ein immer detaillierteres Bild der Organisation des Chromatins im Nukleus (Igo-Kemenes, 1982; Cockerill, 1986; Gasser, 1986; Mirkovitch, 1987; Munkel, 1999; Paul, 1999; Cremer, 2000; Knoch, 2003). Es ist weithin akzeptiert, dass das Chromatin höherer Eukaryoten in DNA-Loops von ca. 50-500 kb Länge organisiert ist und eine „higher order“ Chromatin Struktur ausbildet, was nicht nur der Kompaktierung der DNA sondern auch der Regulation der Transkription dient (Haaf und

Schmid, 1991; Zirbel, 1993; van Driel, 1995; Kurz, 1995; Ferreira, 1997; Zink, 1998; Cremer, 2000). Dem „Multi-Loop-Subcompartment“ (MLS) Modell folgend scheint das menschliche Chromatin in Loops von ca. 100 kb Länge organisiert zu sein, welche sich zu Rosetten formieren die untereinander durch Linker verknüpft sind (Knoch, 2003; Langowski, pers. Mitteilung). Wenn HAC Vektoren unmittelbar nach Transfektion eine dem endogenen Chromatin vergleichbare Organisation/Struktur annehmen würden, sollte dies den limitierenden ersten Schritt der HAC Formierung dramatisch verbessern. Um HAC Vektoren eine Loop-Bildung durch Bereitstellung duplizierter Vektor und Telomer Sequenzen zu erleichtern wurde pTTE₁, ein 142 kb PAC Konstrukt mit einem ca. 116 kb α -sat Array von Chromosom 5 konstruiert (Abb. 36, siehe auch Abb. 16).

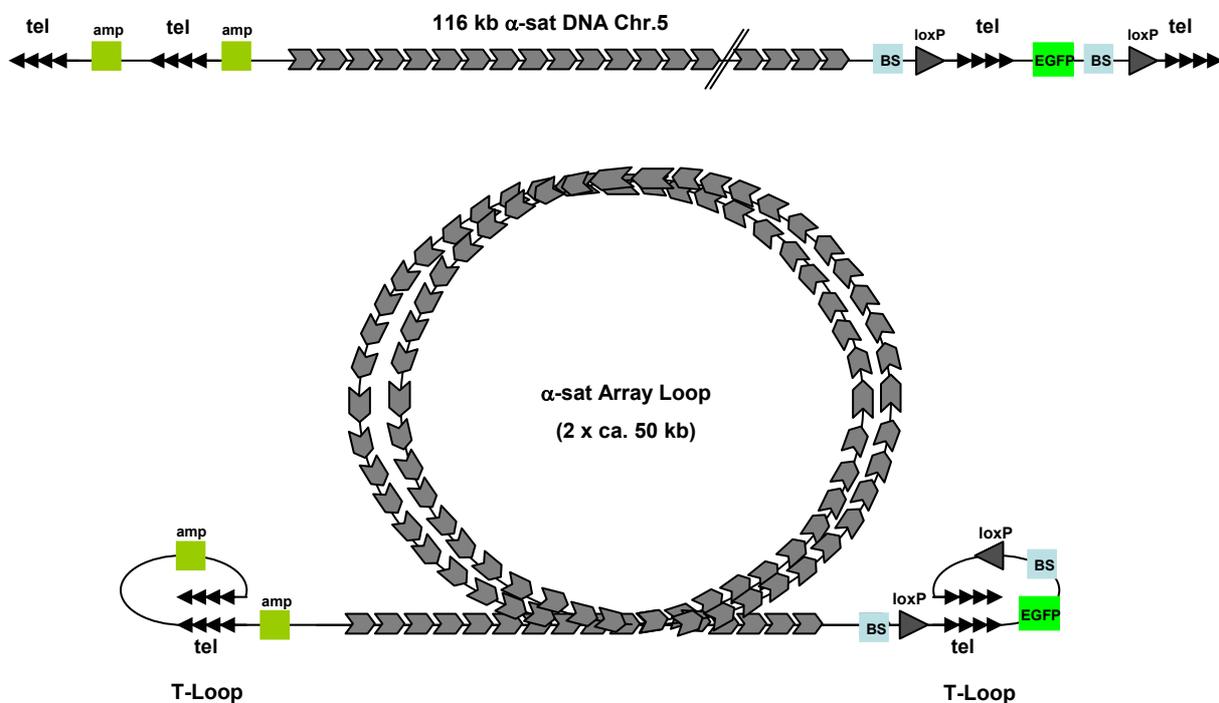


Abbildung 36: Modell einer erleichterten Loop-Bildung von HAC Vektoren durch Bereitstellung duplizierter Vektor und Telomer Sequenzen sowie langer, homogener α -sat Arrays. Um der Organisation des Chromatins im Nukleus (zumindest ansatzweise) Rechnung zu tragen, wurde der HAC Vektor pTTE₁ (142 kb) konstruiert (obere Hälfte, als telomerisierter Vektoranteil ohne PAC-backbone mit ca. 134 kb). Die Anordnung je zweier telomerischer Repeats im Abstand von 2,5 kb und 5,1 kb zueinander könnte eine T-Loop Bildung unterstützen (untere Hälfte). Die Bereitstellung duplizierter Vektorsequenzen soll dem Konstrukt intramolekulare Rekombination ermöglichen, was die *de novo* HAC Formierung oder die Reparatur von Doppelstrangbrüchen auf stabilen HACs unterstützen könnte. Die Klonierung von ca. 116 kb repetitiver, hoch homogener cen5 α -sat vom Typ I (2-mer Familie) könnte eine flexible, bei verschiedenen Loopgrößen gleichermassen passende DNA-Loop Anordnung (z.B. 2 x 50 kb) ermöglichen (nicht maßstabsgetreu).

Durch die Länge der hoch repetitiven α -sat DNA ist eine Anordnung des Konstruktes wie in Abbildung 36 gezeigt möglich. Dies könnte, zumindest rudimentär, zu einer dem endogenen

Chromatin ähnlichen Struktur führen, was möglicherweise in einer verbesserten Stabilität des Konstruktes und damit zu einer höheren Effizienz der Formierung von künstlichen Chromosomen beitragen könnte. Dabei ist der entscheidende Punkt die Tandemstruktur der Zentromere mit homogenen Repeateinheiten, die keine „starr“en“ Loops vorgeben, sondern jede beliebige Loop-Größe zwischen wenigen kb und 116 kb ermöglichen (gezeigt ist eine der Möglichkeiten mit ca. 50 kb Loops). Das bedeutet, dass sich eine besonders geeignete Loop-Größe für ein aktives Zentromer effizient finden kann, wenn genügend lange α -sat DNA angeboten wird.

In Transfektionsassays konnte durch direkten Vergleich des Vorläufers pTAT-Bs mit dem neu konstruierten pTT keine Verbesserung der Effizienz der HAC *de novo*-Formierung festgestellt werden (siehe Tab. 4, Anhang). Unabhängig davon, ob beide Vektoren nur mit den cen5 Arrays E₁ bzw. F₁ (pTE₁T, pTTE₁, pTF₁T, pTTF₁) oder in Cotransfektionen mit genomischen Komponenten (CGT21 und THT₂₂) verwendet wurden, konnte kein deutlicher Unterschied der Zentromersequenzen in der Klonformierungsrate beobachtet werden. Um statistisch eine mögliche Verbesserung über die Rate der Klonformierung zu zeigen, sind allerdings erheblich mehr Transfektionen pro Konstrukt nötig, was den Rahmen dieser Arbeit bei weitem überschreiten würde. Es traten in den einzelnen Versuchen so große Schwankungen auf (z.B. 200 ng pTF₁T + 50 ng CGT21 auf 2 Platten verteilt erzeugte 38 und 3 Kolonien), dass sich der durchgeführte Transfektionsassay über die Auszählung von stabilen Klonen pro transfizierter Platte als ungeeignet erwies.

Mittels „dual-colour“ FISH sollte in einem initialen Screening einer begrenzten Zahl von Metaphasen (n=10-20) mit Zentromer- und Vektor Proben in allen isolierten Klonen nach Integrationen gesucht werden, um für eine spätere Analyse der HACs Linien mit nicht erfolgreichen HAC Formierungen auszuschliessen. In der Regel wurden mit diesem Schnelltest bei fehlender Integration auch HACs mit den beiden Proben in Metaphasen nachgewiesen.

Die Rate an episomalen HACs zu stabil integrierten Konstrukten, die durch FISH Analyse bestimmt wurde, zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen pTT und seinem Vorläufer pTAT-Bs, die α -sat Arrays enthielten (Tab. 4, Anhang). Telomerisierte Konstrukte mit zentromerischen Komponenten bildeten in den meisten Fällen Linien mit HACs, genomische Komponenten ohne Zentromer Sequenzen integrierten dagegen ausnahmslos und waren immer im gleichen Chromosom, an einer einzigen Integrationsstelle, nachweisbar. Zwei Integrationsstellen in einem Klon wurden nicht beobachtet.

Die Verbesserung des Basis HAC Vektors pTAT-Bs umfasste neben der Duplikation von Vektor- und Telomersequenzen in pTT („strukturelle“ Modifikation) auch die Klonierung zweier homogener α -sat Familien von Chromosom 5 (Typ cen5I „E₁“ und cen5II „F₁“), um diese auf ihre Kompetenz zu testen, *de novo* ein Zentromer zu formieren. Die Gruppe von Willard zeigte, dass stabil vererbte HACs mit verschiedenen zentromerischen α -sat Arrays unterschiedliche *de novo*-Formierungsraten (Schueler, 2001) und „nondisjunction“ Frequenzen (> 5-fach, auf niedrigem Niveau) aufweisen (Rudd, 2003). Diese Daten weisen darauf hin, dass Variationen im DNA Gehalt der α -sat Arrays das mitotische Verhalten von HACs beeinflussen. Die Identifizierung neuer, HAC kompetenter α -sat Sequenzen dient deshalb der Optimierung zentromerischer HAC Komponenten. Beide Arrays (E₁ und F₁) erwiesen sich als geeignete Substrate, um als zentromerische Komponenten auf HAC Vektoren zu dienen (3.5). Sowohl in Einzel- als auch in Cotransfektionen mit genomischen Komponenten erzeugten sie HACs *de novo* (Tab. 4, Anhang). Die Orientierung der α -sat Arrays relativ zum BS Resistenzmarker hatte dabei keinen messbaren Einfluss auf die Rate der Klonformierung. Fukagawa (2004) konnte erst vor kurzem zeigen, dass Bereiche in bzw. nahe an menschlichen Zentromeren transkribiert werden. Mit einer konditionalen „knock-out“ Zelllinie für die RNase „dicer“ konnten die Autoren ausserdem zeigen, dass „dicer“, das u.a. eine Schlüsselrolle bei der RNA-Interferenz (RNAi) spielt, normalerweise die langen zentromerspezifischen Transkripte spaltet. Das Fehlen von „dicer“ bewirkte eine vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden und somit Mitosefehler. Diese Daten zeigen, dass zumindest perizentrisch Transkription der α -sat DNA stattfindet, und rechtfertigt den Verdacht, dass die Orientierung der α -sat Arrays einen Einfluss auf umliegende Gene ausüben könnte, was jedoch auf unseren HACs nicht beobachtet werden konnte.

Darüber hinaus zeigte sich die Klonierung einer EGFP-Kassette auf den neu konstruierten Vektor pTT als überaus nützlicher Marker, um stabile Kolonien mittels grüner Fluoreszenz zu bestimmen und im Zeitverlauf zu analysieren. Im Gegensatz zu transienter Expression, die sehr früh nach Transfektion von hohen Kopiezahlen des Reporters verursacht wird, zeigten die mit pTTE₁ bzw. pTTF₁ erzeugten Zelllinien eine stabile Expression der EGFP-Kassette von *de novo* erzeugten künstlichen menschlichen Chromosomen; in keiner der analysierten Linien des Konstruktes pTTE₁ (n=12; 4 von 4 aus pTTE₁ Lipofektion, 4 von 4 aus pTTE₁ + pTHT22 Co-Lipofektion, 2 von 2 aus pTTE₁ Lipofektion spät grüne und 2 von 2 aus pTTE₁ Baktofektion) konnte eine Integration in endogene Chromosomen beobachtet werden. Dies ist der erste beschriebene HAC Vektor, der mit Hilfe grüner Fluoreszenz eine stabile Klonformierung und eine *de novo* HAC Formierung *in vivo* mit hoher Wahrscheinlichkeit anzeigen kann.

Die Bereitstellung einer blau/weiss selektionierbaren, „unique“ *Sa*/I Restriktionsschnittstelle auf pTT (bzw. pTTE₁/F₁) vereinfacht ausserdem die weitere Klonierung von genomischen Komponenten (siehe Abb. 15 und Sequenz pTT im Anhang). Dies ist ein weiterer wichtiger Schritt, um HACs als Gentransfervektoren für die Gentherapie zu etablieren. Bisherige Methoden zur Erzeugung von HACs mit therapeutischen Genen bedienen sich der einfachen Cotransfektion von Zentromer- und Gen-tragenden Konstrukten, da die Voraussetzungen für eine gerichtete Anordnung auf einem Konstrukt unverstanden sind. Da der DNA Gehalt von HACs scheinbar einem Vielfachen der transfizierten Input DNA entspricht, werden replikationsabhängige (Duplikation) und/oder reparaturabhängige Prozesse (Verkettung bzw. Verknüpfung freier Enden der Konstrukte) als Ursachen diskutiert. Transfer von HAC Vektoren, welche sowohl Zentromersequenzen als auch therapeutische Gen-Loci tragen und unmittelbar nach Transfektion genetische Funktion übernehmen, ohne von der Zelle strukturell verändert zu werden, ist das Ziel der Vektor-Entwicklung für die gentherapeutische Anwendung. Bisherige Versuche zentromerische und genomische Komponenten auf einem Konstrukt zu vereinen erzielten jedoch keine deutliche Verbesserung gegenüber Cotransfektion der einzelnen Komponenten. Ein von Mejia und Larin konstruierter Vektor mit einem cen17 α -sat Array und dem HGPRT-Gen Locus zeigte gegenüber dem Kontrollvektor ohne HGPRT Gen keine erhöhte Stabilität und eine relativ geringe HAC Formierungseffizienz (Mejia, 2002). Mit den Vektoren pTTE₁ und pTTF₁ kann nun durch Cotransfektion (ungerichtete Anordnung), durch Klonierung weiterer Komponenten in einem Konstrukt (gerichtete Anordnung, setzt stabile Klonierbarkeit in einem PAC voraus) oder nach dem Baukastenprinzip (mittels lox/Cre Rekombination einer zweiten Komponente *in vitro*, zur biochemischen Verbindung zweier klonierter Sequenzen über die Kloniergrenzen hinaus) versucht werden, durch Variation der Struktur genomischer Komponenten und einer geeigneten physikalischen Bereitstellung, HAC Vektoren weiter zu optimieren.

4.3 Cotransfektion: Synergismus oder additiver Effekt?

In Tabelle 4 (Anhang) sind die Ergebnisse der Einzel- und Cotransfektionen des Transfektionsassays aufgeführt. Die Zahl der BS resistenten Kolonien und die Zahl der grün fluoreszierenden Kolonien (nur bei Transfektionen mit pTTE₁/pTTF₁) wurde nach 14 Tagen BS Selektion bestimmt. Daran folgte bei ausgewählten Cotransfektionen mit pTHT₂₂ eine 14-tägige BS+HAT Selektion, um den Anteil der weiterwachsenden Klone zu bestimmen, die beide Resistenzmarker funktionell exprimierten. Beim Vergleich der Klonzahlen aller Einzel- und Cotransfektionen wurde eine zum Teil beeindruckende Zunahme der Klonformierungsrate bei Cotransfektionen erhalten (Tab. 4, Anhang). Die Anzahl der erzeugten Klone stand dabei aber

nicht in einem linearen Verhältnis zur eingesetzten DNA Menge. Interessanterweise zeigten die meisten Einzeltransfektionen ein Optimum der Klonformierung bei sehr geringen DNA Mengen (ca. 0,5-10 ng). Eine einfache Steigerung der DNA Menge in Einzeltransfektionen bewirkte somit häufiger keine Steigerung der Klonzahlen, sondern eine Verringerung. Cotransfektionen erwiesen sich allerdings (mit Ausnahmen) als äusserst effizient in der Formierung stabiler Klone. Ausserdem zeigten einige Cotransfektionen gegenüber Einzeltransfektionen vergleichbarer Konzentrationen höhere Klonzahlen, als man durch Addition der einzelnen Komponenten erwarten würde (siehe Tab. 4; z.B. pTTE₁ (50 ng) + pTHT₂₂ (200 ng), pTF₁T (200 ng) + pTHT₂₂ (200 ng) oder pTE₁T (200 ng) + CGT21 (50 ng)). Um der Frage nachzugehen, ob die Zunahme der Klonzahlen auf additiven Mechanismen (Klone von einem Konstrukt plus Klone vom anderen Konstrukt) beruht oder ob synergistische Effekte cotransfizierter pTAT-Bs Vektorsequenzen (ohne Insert) eine Rolle spielen, wurde ein Kontrollexperiment mit einer Cotransfektion der pTAT-Bs Vektorsequenzen (mit dem funktionellen und einem um 10 bp deletierten BS-Gen; siehe 3.5, S. 79-80) durchgeführt. Die Analyse der Klonzahlen von Cotransfektionen des cen5l tragenden Konstruktes pTE₁T mit pTAT-Bs (bzw. pTAT-Bs-del) zeigte, dass die Deletion des zweiten BS-Gens die Klonzahlen in etwa halbierte, was zunächst einen additiven Effekt des zweiten BS-Gens nahe legte, aber auch durch die grosse Schwankungsbreite einzelner Transfektionen erklärt werden könnte. Die Beobachtung, dass pTAT-Bs-del mit PCR in keiner der formierten HAC Linien nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 21), spricht jedoch gegen einen deutlichen Synergismus bei der HAC Entstehung durch die zusätzlichen Vektorsequenzen. Aus diesem Grund nehmen wir an, dass auch pTAT-Bs sehr selten in HACs cointegrierte (bei der Integration besteht ja noch kein Selektionsdruck), und die Klone hauptsächlich auf pTE₁T basieren. Dazu passt, dass die einzige beobachtete Integration auch die Zentromer-Anteile enthielt und alle mit FISH untersuchten HACs eine Colokalisation von Zentromer- und Vektorsignal zeigten.

Damit wurde in allen vier Fällen kein Klon isoliert, der nur pTAT-Bs Sequenzen aufgenommen und integriert hat, was gegen einen additiven Klonzahleffekt spricht. Die oftmals beobachtete Steigerung der Klonzahl, über die Summe der Einzeltransfektionen hinaus, ist aus diesem Grund wahrscheinlich nicht auf die alleinige Anwesenheit zusätzlicher pTAT-Vektoranteile zurückzuführen und könnten im Wesentlichen auf der Anwesenheit genomischer Genabschnitte beruhen (vgl. Harrington 1997). Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der BS und HAT Doppelselektion gestärkt. Obwohl die HAT Selektion erst nach Bildung stabiler Kolonien (nach 14 Tagen BS Selektion) angewendet wurde, exprimierten die meisten Klone aus den Cotransfektionen pTE₁T (100 ng) + pTHT₂₂ (25 ng), pTTE₁ (10 bzw. 50 ng) + pTHT₂₂ (100 bzw. 200 ng) und pTF₁T (200 ng) + pTHT₂₂ (200 ng) beide Markergene (Tab. 4, Anhang). So erzeugte die Cotransfektion von pTTE₁ (50 ng) + pTHT₂₂ (200 ng) 93 stabile Kolonien, von

denen 4 von 4 mit „Dual colour“ FISH HACs mit eindeutigen cen5 Signale zeigten. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass auch der Grossteil der anderen erzeugten Klone auf beiden Komponenten (cen und Gen) beruhen. Da die meisten Cotransfektionen darüber hinaus auch mit beiden Resistenzmarkern selektionierbar waren, spricht dies eindeutig für einen synergistischen Effekt bei der Klonformierung von Cotransfektionen Zentromer- und Gen tragender Konstrukte (es ist sehr unwahrscheinlich, dass pTHT₂₂ zufällig auf alle gebildeten HACs cointegrierte. Diese Daten legen nahe, dass die Anwesenheit der genomischen Komponente, die ja erst 2 Wochen später für die HAT Selektion erforderlich wird, von Anfang an bewirkte, dass die cotransfizierten Ereignisse den nicht-cotransfizierten Ereignissen überlegen sind. Möglicherweise beeinflussen Faktoren wie die zusätzliche Länge, die Anwesenheit weiterer Replikationsursprünge, die CpG Insel des HPRT-Gens mit offener Chromatinstruktur, oder die intergenische Region hinter HPRT mit möglicherweise geschlossenem Chromatin (als Chromosomenarmsequenz für die Schwesterchromatid-cohäsion) die Klonformierung. Als weiteres Indiz für einen synergistischen Effekt ist anzuführen, dass die teilweise über 100 stabilen Klone pro Ansatz kaum durch die Summe der Klone der Einzeltransfektionen erklärbar sind (z.B. pTE₁T 200 ng + CGT21 50 ng; Tab.4, Anhang). Allerdings wären erheblich mehr Versuche nötig, um mögliche Effekte sicher nachzuweisen, da zwischen einzelnen Experimenten sehr grosse Schwankungen festgestellt wurden. Über den eindrucksvollen Trend mit allen hocheffektiven Klonformierungen aus Cotransfektionen hinaus, konnte mit den beschränkten Mitteln in Rahmen dieser Arbeit leider keine eindeutige Aussage getroffen werden. Ausserdem müssen in Folgeuntersuchungen die in dem FISH-Schnelltest identifizierten HAC-Kandidatenlinien auf Stabilität im Zeitverlauf mit Proben für alle enthaltenen Komponenten detailliert untersucht werden, um ein vollständiges Bild zu erhalten.

4.4 Klonformierung und Kopiezahl der transfizierten Konstrukte

Nicht-virale Transfektionssysteme bleiben in der Transformationseffizienz *in vivo*, gemessen an der transienten Expression cDNA-basierender Reporter Systeme, im Allgemeinen weit hinter viralen Systemen zurück. Zwar kann man in der Zellkultur mit kationischen Lipiden bzw. kationischen Polymeren oder mit Elektroporation hohe Transfektionseffizienzen (z.B. 50-90%) erzielen, doch bei Gentransferstudien im Tiermodell konnte in der Regel nur bei viralen Vektoren eine nennenswerte Transfektionskompetenz beobachtet werden. Die Entwicklung nicht-viraler Transfektionsprotokolle war deshalb bisher in erster Linie auf eine Steigerung der Transfektionseffizienz durch eine höhere DNA Beladung ausgerichtet. Im Unterschied zu cDNA-basierenden Systemen zielen HACs jedoch auf den stabilen Transfer langer, genomischer Konstrukte niedriger Kopiezahl.

Im Laufe dieser Arbeit entstand der Eindruck, dass bei der Lipofektion von μg -Mengen eines Reporter Plasmids möglicherweise ein Grossteil der Zellen in Kultur physikalisch DNA in den Kern aufnimmt, aber nur diejenige Fraktion der transfizierten Zellen nachweisbar ist, die eine transiente Expression von mehr als ca. 10^3 Moleküle im Nukleus aufweisen (Schindelbauer, 2002; 3.2, Abb. 8, S. 55). Lipofektion von HAC Vektoren führt zwar routinemässig zur Formierung stabiler Klone, die tatsächliche Konstruktzahl pro Zelle, die eine Klonformierung unterstützt, kann dabei jedoch nicht bestimmt werden. Da die gängigen nicht-viralen Systeme auf hohe transiente Expression hin optimiert wurden, stellte sich die Frage, ob solche „high copy“ Transfersysteme mit einer stabilen Klonformierung mit wenigen HAC Vektoren pro Zelle vereinbar sind. Wie wir in einem einfachen HAC-Lipofektionstest mit dem neuen Konstrukt pTTE₁, das stabil einen EGFP Marker exprimiert, beobachten konnten, bildeten Zellen, die nach Transfektion von pTTE₁ früh grüne transiente Expression zeigten (also vermutlich hohe Kopiezahlen in den Kern aufgenommen haben) im Gegensatz zu Zellen, die erst nach einigen Tagen im Mehrzellstadium detektierbare grüne Fluoreszenz zeigten, keine stabilen Klone. Die massenhafte Anwesenheit transfizierter DNA scheint offensichtlich eine stabile Klonformierung zu behindern. Ein Grund hierfür könnte die Anwesenheit einer grossen Anzahl von Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen sein, die bei einer steigenden Zahl transfizierter DNA Konstrukte, zumindest bei der Verwendung linearer DNA, zwangsläufig auftreten und nach Transfektion die zellulären Reparatursysteme überlasten könnten. Zusätzlich könnten durch eine Überladung mit funktionellen chromosomalen DNA Sequenzen, z.B. die Telomere mit den zelleigenen Telomeren um begrenzte Chromatinfaktoren kompetieren. Für den stabilen Gentransfer haben diese Erkenntnisse eine unmittelbare Relevanz, denn die Entwicklung effizienter Transfersysteme sollte demnach als Erfolgskontrolle nicht eine grösstmögliche transiente Expressionsrate verwenden.

Dieser Befund wird auch durch Daten aus den Mikroinjektionen und Baktofektionen verschiedener Konstrukte gestärkt. Durch intranukleäre Mikroinjektion des Chromosom 17 α -sat DNA-basierenden Konstrukts B₂T₈ in HT1080 Zellen konnten wir zeigen, dass mit niedrigen Kopiezahlen (1-10 Moleküle pro Injektionsvolumen) stabile Klone und künstliche Chromosomen formiert werden (unpubliziert). Die Gruppe um Masumoto konnte mit einer niedrigen Kopiezahl mikroinjizierter YAC Konstrukte ebenfalls erfolgreiche Klonformierungen beobachten (Ikeno, 1998). Baktofektion verschiedener Konstrukte (B₂T₈, pTTE₁ und CGT21) erzeugte bei Verwendung niedriger MOI (2-20) mehr resistente Kolonien in HT1080 als hohe MOI (>1.000; Catherine Grillot-Courvalin, pers. Mitteilung). Möglicherweise ist die Menge an freien DNA Enden (äquivalent zu Doppelstrang-Brüchen), die bei einer steigenden Anzahl transfizierter

DNA Konstrukte zwangsläufig zunimmt, für die Zelle schädlich, da sie die Progression durch den Zellzyklus behindert oder gar Apoptose induziert. Dagegen scheint die Anwesenheit eines einzigen kompetenten HAC Vektor Moleküls für eine stabile Klonformierung ausreichend zu sein. Aufgrund der erarbeiteten Daten sind wir davon überzeugt, dass die Einschleusung kompetenter HAC Konstrukte in geringer Kopiezahl erfolgen muss, um zu einer stabilen Vererbung des Transgens zu führen, weil so die nachfolgenden Zellteilungen nicht gestört werden.

4.5 CGT21 als CFTR Expressionsmodell für Zellkultur und Tiermodell

Trotz grosser Fortschritte auf dem Gebiet der CFTR-Genexpression sind viele für die Entwicklung einer kausalen Gentherapie notwendige Zusammenhänge unverstanden. Zwar konnten Zellen in den Darmkrypten, Goblet Zellen des „surface airway epithelium“ sowie seröse Zellen submuköser Drüsen der Bronchialschleimhaut als CFTR exprimierende Zelltypen (und damit als mögliche targets) identifiziert werden (Jiang, 1998; Joo, 2002; Wine, 2003), doch könnte jede dieser zellulären Kompartimente eine andere funktionelle Rolle in der Pathogenese der Mukoviszidose spielen (Flüssigkeits- oder Elektrolyt-Haushalt, Regulation anderer Ionenkanäle, Vermittlung vesikulären Transports, Glykosylierung; Larson, 2000a/b). Ausserdem ist bisher nicht geklärt, welches dieser zellulären targets im Hinblick auf eine Gentherapie pathophysiologisch am relevantesten ist (Boucher, 1999). Die Identifizierung geeigneter Zielzellen ist jedoch Voraussetzung für die Entwicklung einer effizienten CF-Gentherapie. Auch hinsichtlich einer möglicherweise schädlichen CFTR-(Über)Expression in nicht-target Geweben ist bisher wenig bekannt (Alton, 1995). Es sind mehrere transgene Mausstämme als Tiermodell für Mukoviszidose konstruiert worden (Colledge, 1992; Dorin, 1992; Snouwaert, 1992), welche sich jedoch für viele Fragestellungen als ungeeignet erwiesen (Williams, 2003). So zeigen homozygote CFTR Null-Mutanten nicht die beim Menschen übliche Pathologie der Lunge (Rozmahel, 1996), da wesentliche Unterschiede im Expressionsmuster sowie der anatomischen Verteilung CFTR-exprimierender Zellen zwischen Mensch und Maus bestehen. Harris konnte zeigen, dass das Schaf in der Gewebs- und Entwicklungsspezifischen CFTR-Expression dem Menschen sehr viel ähnlicher ist als die Maus (Harris, 1997). Darüber hinaus stimmen menschliches und ovines CFTR auf DNA- und Proteinebene sehr viel besser überein als CFTR von Maus und Mensch (Harris, 1997). Diese Resultate lassen das Schaf als besseres CF-Tiermodell erscheinen. Versuche zur Erzeugung eines CFTR „knock-out“ Schafes schlugen jedoch aus Mangel embryonaler Stammzell-Kulturen bisher fehl. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Möglichkeit, dass eine sehr frühe stabile CF-Gentherapie *in utero* erfolgreicher sein könnte,

weil viele Gewebe und Organe erreicht werden könnten. Für die Wiederherstellung bzw. Aufrechterhaltung der Lungenfunktion, die für CF Patienten am relevantesten ist, wäre dies jedoch weniger ausschlaggebend, da die Lunge bei CF Patienten auch nach der Geburt noch voll funktionstüchtig ist. Daten entwicklungspezifischer CFTR-Expressionsanalysen in embryonalem Lungen- und Pankreasgewebe weisen jedoch auch auf die Anwesenheit von CFTR Protein vor der Geburt hin (Larson, 2000a/b; Broackes-Carter, 2002; Bob Scholte, pers. Mitteilung), was auf eine Rolle in der Embryonalentwicklung hinweisen könnte.

Um diese verschiedenen Fragestellungen zu bearbeiten, wäre ein funktionierendes CFTR-Expressionsmodell für Zellkultur und Tiermodell von entscheidender Bedeutung. Das CFTR-Expressionskonstrukt CGT21 soll dazu verwendet werden, CFTR hochexprimierende Zellen in der Zellkultur und im Tiermodell durch den Nachweis des fluoreszierenden Fusionsproteins unter der Kontrolle des normalen CFTR Promotors zu identifizieren. Dies könnte zur Identifizierung neuer, besserer zellulärer Targets für eine CF Gentherapie führen. Mit einem transgenen CGT21-Tiermodell könnte die räumliche/zeitliche CFTR-Expression in der Embryonalentwicklung leichter und detaillierter verfolgt werden, wodurch zusätzliche Erkenntnisse über die Rolle des CFTR-Proteins im Laufe der Entwicklung erlangt werden könnten. Des Weiteren können durch Deletionsstudien (z.B. der -60 kb 5'Region oder Intron/Exon Sequenzen) regulatorische Bereiche der CFTR-Transkription identifiziert bzw. funktionell analysiert werden (Smith et al. 2000). Letztendlich könnte das Konstrukt nach Austausch des künstlichen Exon 10 durch die restliche CFTR cDNA (Exon 10 bis Exon 24; siehe Abb. 37), für eine gentherapeutische Anwendung mit dem normalen CFTR-Protein verwendet werden.

Das CFTR Exon 9 ist dafür bekannt in verschiedenen endogenen CFTR-Loci mit unterschiedlicher Frequenz geskippt zu werden (Cuppens, 1998). Verschiedene Spleisstellen Polymorphismen, unter anderem am 3'-Ende von Intron 8 und am 5'-Ende von Intron 9, scheinen für die Rate des Exon 9 skipping verantwortlich zu sein (Hefferon, 2002; Niksic, 1999; Pagani, 2003). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten wir nur einen kleinen Anteil an CGT21 Transkripten mit geskipptem Exon 9, wie er für die im Konstrukt vorhandene TG₁₁T₇ Variante am 3'-Ende von Intron 8 und „normalen“ 5'-Intron 9 Sequenzen üblich ist, beobachten (siehe Abb. 25). Trotz einer ca. 5 kb Deletion des 3'-Ende von Intron 9 im Konstrukt CGT21 scheint die Anwesenheit der letzten 162 bp von Intron 9 und der ersten 104 bp von Exon 10 korrektes Spleissen des Intron 9 zu erlauben (siehe Abb. 37). Des Weiteren wurde auch das synthetische Exon 10, das aus den ersten 104 bp des endogenen Exon 10, der EGFP-cDNA und 1,5 kb von Exon 24 (3'UTR) konstruiert wurde (Cattani, 2000), korrekt gespleisst (Abb. 25). Dies zeigt, dass die Modifikationen in Intron 9 und Exon 10 weder zu einer Insertion noch zu

einer Deletion kryptischer Spleiss-enhancer oder -silencer führte. In diesem Fall erwies sich das einfache GU-AG Modell, zumindest bei Anwesenheit der 266 bp endogenen, die Spleisstelle flankierenden Sequenzen als ausreichend, um das CGT21-Transkript korrekt zu spleissen. Dies ist im Hinblick auf die mögliche Verwendung des modifizierten CGT21 für gentherapeutische Versuche von besonderer Bedeutung.

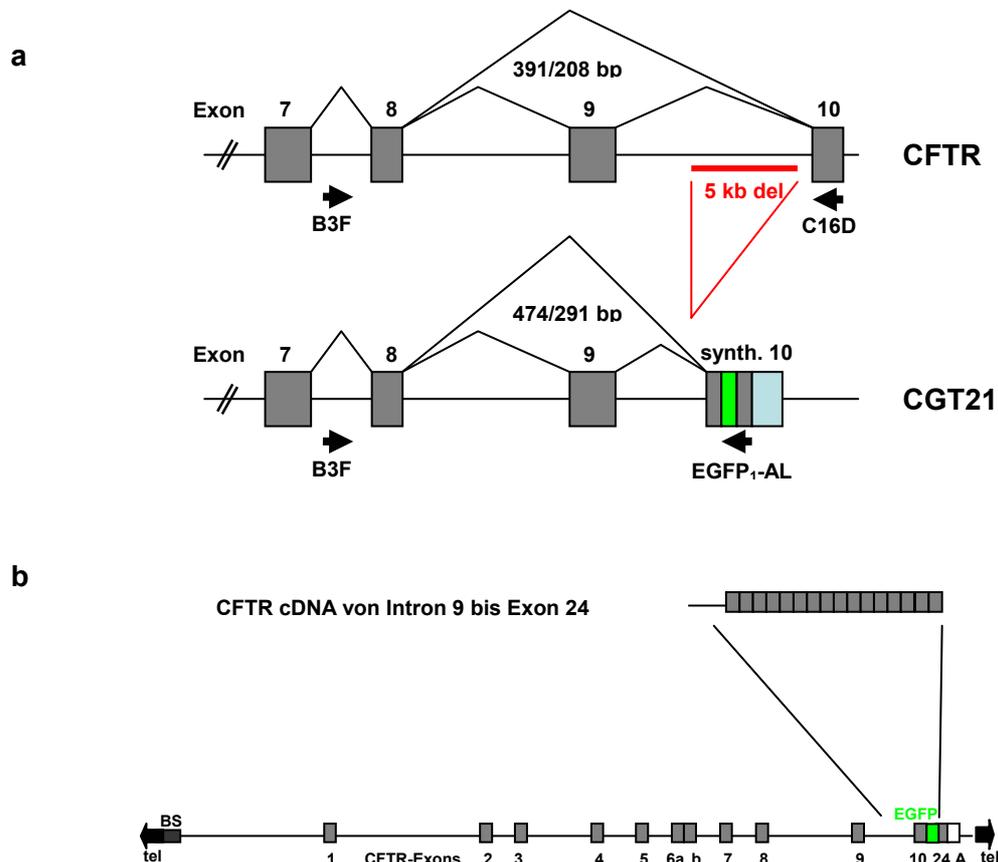


Abbildung 37: Exon 9 skipping und Klonierung eines funktionellen CFTR Konstrukts a) Schema des Exon 9 skipping im nativen CFTR-Transkript und der synthetischen CGT21 mRNA (nicht maßstabgetreu). Oligonukleotid Primer zur Analyse des Exon 9 skipping sowie die alternativen RT-PCR Produktlängen (siehe auch Abb.25) sind angegeben. b) Bei der Konstruktion wurde darauf geachtet, dass die CFTR-cDNA (Exon 10 bis Exon 24/Poly A) in wenigen Schritten gegen das synthetische Exon 10-EGFP ausgetauscht werden kann (nicht maßstabgetreu). Dies soll zu chimären Transkripten (genomische DNA *in frame* mit cDNA) führen, die für ein funktionelles CFTR-Protein kodieren.

Der Austausch des synthetischen Exon 10-EGFP gegen die CFTR-cDNA (Exon 10-Poly A), welche *in frame* an das genomische Konstrukt (Intron 9) kloniert werden kann, soll ein funktionsfähiges CFTR-Protein erzeugen. Dieses setzt sich wie in Abbildung 37 dargestellt, zum Teil aus der genomischen Region des CFTR-Lokus (ca. -60 kb 5' des Startkodons bis Mitte Intron 9) und der CFTR-cDNA (von Exon 10 bis Poly A) zusammen. Da der Einfluss des Sequenz-Kontexts auf mRNA Stabilität und alternatives Spleissen noch nicht vollständig verstanden ist (Tourriere, 2002; Hefferon, 2002) war es bedeutsam, dass nur ein sehr kleiner

Teil der CGT21 Transkripte ein skipping des Exon 9 zeigte, wie es auf endogenen Chromosomen 7 der Fall ist.

4.6 Bakterien, ein idealer Gentransfer Vektor?

Ein wesentlicher Punkt für die Entwicklung von künstlichen menschlichen Chromosomen als Genexpressions-Vektor ist der intakte Transfer langer DNA-Konstrukte in niedriger Kopiezahl. Zwar können mit „nackter“ DNA durch intranukleäre Mikroinjektion oder Lipofektion stabile Zelllinien erzeugt werden, doch ist die Effizienz dieser konventionellen Methoden für eine *in vivo* Applikation in Organen nicht ausreichend (Zabner, 1997; Fasbender, 1997; Wiesenhofer, 2000; Joseph Rosenegger, pers. Mitteilung). Aus der Notwendigkeit heraus ein effizientes und sicheres Transportsystem für HAC Vektoren zu entwickeln, wurde 1999 eine Kollaboration mit Dr. Grillot-Courvalin vom Pariser Pasteur Institut begonnen. Diese publizierte zu dieser Zeit Daten, die eindrucksvoll belegten, dass ein modifizierter *E.coli* K12 Stamm, welcher die Gene *inv* und *hly* exprimiert, in der Lage war menschliche Zellen mit Reporterplasmiden transient zu transfizieren. Es stellte sich die Frage, ob auch sehr lange Vektor DNA stabil in Transferbakterien propagiert werden kann und ohne Isolierung direkt in Zielzellen geschleust werden kann. Da die Transferbakterien sehr effizient über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden und nach Autolyse die HAC Konstrukte im Cytoplasma der Zielzellen freisetzen, könnte mit dieser Technik eine erhebliche Verbesserung der Transfektions- und HAC Formierungseffizienz erreicht werden.

Im Gegensatz zu manchen Viren, deren Gentransfersysteme sich im Laufe der Evolution an eine effiziente Transfektion ihrer eukaryotischen Wirte angepasst haben, sind bei Bakterien nur intracytoplasmatische Lebenszyklen bekannt (z.B. einige Vertreter von Mycobakterien, Yersinien, Salmonellen, Shigellen, Listerien, Mycoplasmen, Legionellen, Chlamydien und Rickettsien; Brock: Biology of Microorganisms, 1997), bakterieller Gentransfer wurde vor der Veröffentlichung von Dr. Grillot-Courvalins Gruppe, ausser beim pflanzenpathogenen Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* (Schell und Van Montagu 1977; Courvalin, 1995), nicht beschrieben. Durch die Expression zweier bakterieller Gene (kodierend für das Zelloberflächenprotein Invasin aus *Y. pseudotuberculosis* und das sezernierte Listeriolysin O aus *L. monocytogenes*) in einem *dap* auxotrophen *E.coli* Transferstamm konnte ein hoch effizienter Transfer der Bakterien in das Cytoplasma der Zielzelle und, nach *dap*-Mangel induzierter Lyse des bakteriellen Vektors, eine Freisetzung der DNA Fracht gezeigt werden (Grillot-Courvalin, 1998; diese Arbeit). Die Klonierung neuer, den Kerntransport vermittelnder

Proteine in den Transferbakterien (siehe Abb. 35) könnte zu einer weiteren, wesentlichen Verbesserung der Kernlokalisierung beitragen.

Da die zirkulären HAC Konstrukte bei der Baktofektion direkt in Transferbakterien elektroporiert werden, entfallen die für die Integrität langer DNA kritischen Schritte der Linearisierung, Elution und Lipofektion, was zu einer höheren Klonformierungsrate beitragen könnte. Ein weiterer Vorteil des bakteriellen Systems liegt in seiner grossen Kapazität, wodurch der Transfer von Vektoren mehrerer hundert kb ermöglicht wird. Wir konnten unter anderem zeigen, dass ein ca. 223 kb langer HAC Vektor (B₂T₈), mit ca. 190 kb hoch repetitiver α -sat DNA von Chromosom 17, stabil in Transferbakterien propagiert und effizient in menschliche Zielzellen baktifiziert werden kann (Abb. 28 und 29). Darüber hinaus erwies sich die Baktofektion verschiedener PACs als überaus effektiv in der Erzeugung stabil exprimierender Linien mit einem Genkonstrukt (CGT21; siehe 3.8.2) sowie der *de novo*-Formierung künstlicher menschlicher Chromosomen (B₂T₈, pTTE₁; siehe 3.8, Abb. 28 und 33). Somit stellt die Baktofektion eine einfache und effiziente Methode dar, um im Labor genomische, PAC-basierende Konstrukte in Zielzellen zu transfizieren, was z.B. die Analyse der Genexpression dramatisch erleichtert. Da im Laufe der letzten Jahre die Genome des Menschen und wichtiger genetischer Modellorganismen in PAC-/BAC-Bibliotheken zugänglich gemacht wurden, kann nun z.B. die Expression vieler uncharakterisierter Genkonstrukte mittels Baktofektion einfacher analysiert werden.

Entsprechend der Beobachtung, dass stabile HAC Klone aus primär mit unsichtbaren DNA-Mengen (transient) lipofizierten Zellen hervorgingen, zeigten sich auch Baktofektionen mit wenigen Bakterien pro Zelle in der Erzeugung resistenter Klone effektiver als Transfektionen hoher MOI. Da die Anzahl der Konstrukte pro Bakterienzelle durch den P1-ori der PAC-basierenden Vektoren auf ca. 2-3 Kopien beschränkt ist, kann die durchschnittliche Anzahl der DNA Konstrukte pro Zelle durch Wahl der MOI relativ genau eingestellt werden. Niedrige MOI sind auch im Hinblick auf eine mögliche toxische Wirkung der Transferbakterien im Zielgewebe wünschenswert, obwohl Warburton mit einem rekombinaten, invasiven *E.coli* DH10B Stamm ein Überleben eukaryotischer Zellen auch bei sehr hohen MOI beobachten konnte (transiente Expression eines EGFP Markers in einem BAC Vektor; Narayanan, 2003). Die von uns beobachtete Steigerung der Klonformierung ist daher wahrscheinlich auf den unterstützenden Effekt niedriger Kopiezahlen zurückzuführen. Ein weiterer Vorteil der Baktofektion ist die spezifische, Invasin vermittelte Internalisierung der Transferbakterien durch die in menschlichen Epithelzellen fast ubiquitär exprimierten β 1-Integrin Rezeptoren (Isberg, 1989; Grillot-Courvalin 1998, 1999; Dersch, 1999). Da das Zielgewebe zukünftiger CF-Gentherapien, das differenzierte

Atemwegs Epithel, eine wesentliche Barriere für virale wie nicht-virale Vektoren darstellt, könnte die Baktofektion einen Teil zur Lösung des ineffizienten physikalischen Gentransfers *in vivo* beitragen. Die Fähigkeit des rekombinanten Transferbakterienstamms BM2710, primäre Atemwegs Epithelzellen zu transfizieren, wenn β 1-Integrin zugänglich ist, konnte Grillot-Courvalins Gruppe erst vor kurzem mit einem Reporterplasmid demonstrieren (Fajac, 2004).

In beiden stabilen B₂T₈-Linien, die *de novo* HACs formierten, konnte durch PCR Analyse mit Oligonukleotiden des IS1-Element, auf dem *E.coli* Genom, ein IS1-spezifisches Fragment nachgewiesen werden. Da das repetitive IS1-Element in 12 Kopien im BM2710 Genom vorliegt (Grillot-Courvalin, 1998) und die PCR Signale sehr stark waren, könnte das ein starker Hinweis auf die Anwesenheit grosser Mengen *E.coli* DNA in den HAC Linien sein. Eine FISH Analyse der beiden B₂T₈-Linien 10-3 und 10-6 mit einer *E.coli* gesamt DNA Sonde zeigte starke Signale auf den HACs (Abb. 28), und eine Rsf-Vektor Sonde erzeugte auf den gleichen HACs ebenfalls starke Signale, was entweder für die Anwesenheit von *E.coli* DNA oder eine starke Kreuzhybridisierung der *E.coli* Sonde mit der HAC DNA spricht (Abb. 28). Nach unserem Kenntnisstand wäre dies der erste Bericht über eine stabile Cotransfektion bakterieller DNA auf (künstliche) menschliche Chromosomen. Allerdings zeigten Southern blots, die in der Regel sehr zuverlässig sind, einerseits die Abwesenheit von IS1-Elementen in allen Konstrukten, und eine *E.coli* gesamt DNA Probe zeigte darüber hinaus keinen Unterschied zwischen baktifizierten und lipofizierten Linien. Bisher konnte leider nicht hinreichend geklärt werden ob und wieviel *E. coli* DNA bei Baktofektion übertragen wurde. Der Grossteil aller per Baktofektion erzeugten Linien zeigte zwar eine positive IS1-PCR, eine Southern Analyse mit einer *E.coli* Sonde auf genomischer DNA der gleichen Linien konnte jedoch keine spezifischen *E.coli* Banden nachweisen. Ein spezifisches FISH Signal mit einer *E.coli* Sonde konnte darüber hinaus bisher ausschliesslich in den beiden B₂T₈ Linien nachgewiesen werden. Wegen dieser widersprüchlichen Ergebnisse ist eine detailliertere Analyse aller mit Baktofektion erzeugten Zelllinien notwendig, um eine genauere Aussage über den DNA Status der gebildeten HACs machen zu können. Klar ist allerdings, dass in keinem Fall transfizierte HAC oder *E.coli* DNA in endogene Chromosomen integrierte.

Es wird nicht davon ausgegangen, dass die GC-reiche, bakterielle DNA in menschlichen Zellen exprimiert wird (Patrice Courvalin, pers. Mitteilung), und falls tatsächlich *E.coli* DNA auf den HACs vorhanden wäre schiene diese eine *de novo* HAC Formierung nicht zu behindern, was am Fehlen von Integrationen in den stabilen Linien und an den 2-5 deutlichen episomalen HAC Signalen pro Metaphase in der „Dual colour“ FISH Analyse abzulesen ist. Im Gegenteil, die *E.coli* DNA könnte z.B. als funktionslose „Puffer“-DNA zwischen den menschlichen DNA

Komponenten (telomerischen, zentromerischen und genomischen Sequenzen) dienen, und damit unter Umständen zu einer erleichterten Expression des Transgens und einer verbesserten Nachweisbarkeit der HACs beitragen.

Falls sich die stabile Vererbung eines relevanten Abschnittes des *E.coli* Genoms auf HACs in Folgeexperimenten bestätigen liesse, wäre es interessant festzustellen, ob inerte „single copy“ Sequenzen oder duplizierte Sequenzen auf den HACs vorhanden wäre. Einer Hypothese von Dr. Schindelhauer zufolge, sind untranskribierte single copy Sequenzen (z.B. die *E.coli* Sequenzen auf HACs) schwierig zu reparieren, wenn sie nicht in einem protektiven Chromatinverbund eingebettet sind. Transkribierte Bereiche könnten für eine Reparatur – zumindest theoretisch – auf kurze RNA zurückgreifen. Herr Schindelhauer nimmt an, dass die Genreihenfolge auf Chromosomen nur deshalb über hunderte Millionen Jahre stabil blieb (z.B. Genabfolge in Fugu und Mensch um den CFTR-Lokus; Davidson, 2000), weil im Chromatin benachbart liegende Sequenzen zusammengehören, und so optimal repariert und damit stabil vererbt werden können. Somit könnten die Zelllinien interessante Anknüpfungspunkte darstellen, für die Untersuchung der stabilen Vererbung von inerten, „single copy“ DNA Sequenzen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Für die stabile, regulierte Expression eines therapeutischen Gens in Zielzellen stellen künstliche menschliche Chromosomen (HACs) derzeit das einzige Konzept dar, das hohe Sicherheit und technische Realisierbarkeit bietet. Künstliche Chromosomen (HACs) mit dem CFTR-Gen sollen sich durch den Transfer definierter HAC-Konstrukte effizient formieren, ohne dabei die Zielzellen zu stören. Im Augenblick werden künstliche Chromosomen zur Klärung vieler grundlegender Fragen auf dem Gebiet der Chromosomenstruktur und -funktion sowie der Genregulation konstruiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte die zugrundeliegende *de novo* HAC-Technologie der Arbeitsgruppe, die sich auf die Konstruktion und den intakten Transfer von PACs mit den funktionellen Komponenten menschlicher Chromosomen (zentromerische, telomerische und genomische Sequenzen mit *oris* und Gene) konzentriert, weiterentwickelt werden. Die Verwendung von PACs als Kloniervektoren erlaubt die stabile Klonierung langer, genomischer DNA, die biochemische Verknüpfung über *lox/Cre* vermittelte Rekombination, sowie die Darstellung grosser Mengen intakter, supercoiled PAC DNA durch Anwendung einer in der Arbeitsgruppe entwickelten Technik (Reinigung der supercoiled DNA Fraktion in Agaroseplugs von gebrochener und genickter DNA im elektrischen Feld). Eine Verbesserung der Vektoren ist nötig, da die Effizienz der HAC Formierung bisheriger Vektoren für eine klinische Anwendung nicht ausreicht. Dafür wurden zunächst Marker benötigt, die Anzeigen können wieviele Zellen mit wievielen Vektormolekülen transfiziert wurden und wieviele der physikalisch erfolgreich transfizierten Zellen stabile HACs bilden (genetische Funktion).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Expressionsmarker entwickelt, die eine Formierung stabiler HAC-Linien durch grüne Fluoreszenz anzeigen können. So wurde ein tetratelomerischer PAC-Vektor „pTT“ konstruiert, der stabil eine EGFP-Kassette exprimiert, ein funktionelles Zentromer trägt (TTE_1), und für die Klonierung weiterer genomischer Komponenten eine weiss/blau selektionierbare *SaI* I Stelle enthält. Ausserdem wurde ein CFTR-Gen-basierender „genomischer“ Marker (159 kb) vorgestellt, der den intakten Transfer langer, genomischer DNA und die Expression vom CFTR Promoter anzeigen kann.

Besonders hervorzuhebende Ergebnisse aus der Arbeit sind:

1) Kopiezahlabhängigkeit bei der transienten Expression. Einzelne Markergen-Kopien genügen nicht, um Anwesenheit der transfizierten DNA mittels transientscher Expression nachzuweisen.

2) Sichtbar transient exprimierende HAC Konstrukte (große Zahl) führen nicht zu stabilen Linien, was nahelegt, dass ein „low copy“ HAC Transfer benötigt wird. Für eine Optimierung und besseres „low copy“ HAC-Monitoring wurden multimere Marker (EGFP Array) und DNA-tags (Gal4-BD, Lac-Operator) entwickelt und stehen nun für einen Einsatz bereit.

3) Für den „low copy“ Transfer wurden neben Lipofektionsassays und der Mikroinjektion insbesondere eine neue Methode, die Baktinfektion, eingesetzt, bei der die DNA nicht aus Bakterien isoliert werden muss: Modifizierte Transferbakterien dringen in die Zelle ein und geben die DNA-Konstrukte nach Autolyse frei („suicidal transfer“). Dabei wurde ein funktioneller Transfer genomischer DNA nachgewiesen. Es konnte zum einen gezeigt werden, dass Zentromer tragende Konstrukte effizient *de novo* HACs bildeten, und zum anderen, dass das lange genomische CFTR Expressionskonstrukt CGT21 stabil vom CFTR Promoter exprimiert wird. Damit steht nun die Baktinfektion als effizienteste Methode zur HAC Optimierung zur Verfügung.

4) Durch Auszählung der stabilen Klone, Isolierung von Stichproben klonaler Linien und einem HAC-Formierungsassay mittels FISH Analyse, wurden folgende grundlegende Beobachtungen gemacht: Die Rate der Formierung stabiler Klone mit HAC Konstrukten hängt nicht von a) der Zahl der im einzelnen Konstrukt vorhandenen, oder cotransfizierten Zahl der BS Marker, b) nicht von der Orientierung der α -sat DNA relativ zum BS-Gen oder dem entgegengesetzt gerichteten EGFP-Gen, und c) nicht absolut von der Verwendung unterschiedlicher α -sat Sequenzen der zwei homogenen Array Typen auf Chr.5 ab, wobei der Vektor pTT mit dem Zentromer E1 die besten Ergebnisse der HAC Bildung erzielte und die höchsten Klonzahlen in Cotransfektionen mit einem telomerisierten Genkonstrukt erhalten wurden, nicht aber in Cotransfektionen mit dem Telomervektor ohne einklonierte genomische DNA. Diese Erkenntnisse haben direkte Relevanz für die Weiterentwicklung CFTR exprimierender HAC Vektoren.

Mit den Konstrukten pTTE₁ und CGT21, und den zukünftig erweiterten Konstrukten mit multimeren Markern bzw. Tags und einem kompletten CFTR Gen, kann nun auch der physikalische Transfer der HAC Konstrukte in Zielzellen, sowie deren Funktion effizient untersucht werden. Damit konnten wichtige Voraussetzungen für die Weiterentwicklung einer stabilen CFTR Gentherapie geschaffen werden.

5 Anhang

Accession Numbers in EMBL/Genbank:

- pTAT-Bs: BN000528 und BN000529
- pTT: pending
- CGT21: BN000167
- Cen5 E1: AJ717298. Insert von Plasmid pZ5.1 (von Theo Hulsebos)
- Cen17 Array (B₂T₈): AJ563631-AJ563650.

Tabelle 4: Transfektionsassay

Vektor	Lipofizierte Menge in ng	BS 14 d [grüne Kolonien]	BS+HAT 28 d	Linien für FISH (Metaphasen, Sonden)	FISH Int	FISH HAC	FISH ND
pTAT-Bs	0,5 1	8 1	n.a.	n.a.			
pTAT-BsΔ	0,5 1	0	n.a.	n.a.			
pTE ₁ T	0,25 0,5 1 2 20 100 500	10 6 32 5 6 0 0	n.a.	n.a.			
pTF ₁ T	1 20 100 200 400	3 0 4 0 0	n.a.	n.a.			
pTTE ₁	0,25 0,5 1 10 50	8 [5] 6 [5] 19 [16] 3 [1] 0	n.a.	TTE ₁ 20 „g“ (n=21, Rsf+E1) TTE ₁ 21 „g“ (n=14, Rsf+E1) TTE ₁ 22 „g“ (n=11, Rsf+E1) TTE ₁ 23 „g“ (n=11, Rsf+E1)		X X X X	
pTTF ₁	10 50	1 [1] 3 [3]	n.a.	TTF ₁ 1 „g“ (n=11, Rsf+F1) TTF ₁ 3 „g“ (n=9, Rsf+F1)		X	X
CGT21	2 4 5 8 25 1.000	22 18 0 8 22 18	n.a.	CGT21 4 (n>10, Rsf+CFTR) CGT21 5 (n>10, Rsf+CFTR) CGT21 6 (n>10, Rsf+CFTR) CGT21 7 (n=13, Rsf+CFTR)	X X X		X
THT ₂₂	1 2 4 20 100	0 30 22 0 17	0 30 22 0 17	THT ₂₂ 1 (n=25, Rsf+HPRT)	X		
pTAT-Bs+ pTE ₁ T	0,5 1	29	n.a.	TATbs+TE ₁ T 11 (n=16, Rsf+E1) TATbs+TE ₁ T 12 (n=16; Rsf+E1) TATbs+TE ₁ T 16 (n=13, Rsf+E1) TATbs+TE ₁ T 18 (n=14, Rsf+E1)	X	X X X	
pTAT-BsΔ + pTE ₁ T	0,5 1	13	n.a.	TATbsΔ+TE ₁ T 11 (n=11, Rsf+E1) TATbsΔ+TE ₁ T 14 (n=8, Rsf+E1) TATbsΔ+TE ₁ T 16 (n=12, Rsf+E1) TATbsΔ+TE ₁ T 18 (n=13, Rsf+E1)		X X X X	

Vektor	Lipofizierte Menge in ng	BS 14 d [grüne Kolonien]	BS+HAT 28 d	Linien für FISH (Metaphasen, Sonden)	FISH Int	FISH HAC	FISH ND
pTE ₁ T+ CGT21	0,25 2	16	n.a.	TE ₁ T+CGT 1 (n=11, Rsf+E1) TE ₁ T+CGT 2 (n=9, Rsf+E1) TE ₁ T+CGT 3 (n=12, Rsf+E1)		X X X	
pTE ₁ T+ CGT21	0,5 4	2	n.a.				
pTE ₁ T+ CGT21	1 8	52	n.a.				
pTE ₁ T+ CGT21	100 25	32	n.a.				
pTE ₁ T+ CGT21	200 50	118	n.a.				
pTE ₁ T+ pTHT ₂₂	100 25	25	23	n.a.			
pTE ₁ T+ pTHT ₂₂	200 50	1	1				
pTTE ₁ + CGT21	10 25	1 [1]	n.a.	n.a.			
pTTE ₁ + CGT21	50 50	1 [0]	n.a.				
pTTE ₁ + pTHT ₂₂	10 100	18 [13]	16	TTE ₁ +H 1 „g“ (n=17, Rsf+E1) TTE ₁ +H 4 „g“ (n=11, Rsf+E1) TTE ₁ +H 5 „g“ (n=11, Rsf+E1) TTE ₁ +H 6 „g“ (n=11, Rsf+E1)		X X X X	
pTTE ₁ + pTHT ₂₂	50 200	93 [78]	93				
pTTE ₁ + pTHT ₂₂	0,25 1	2 [2]	n.a.				
pTTE ₁ + pTHT ₂₂	0,5 2	33 [12]	n.a.				
pTTE ₁ + pTHT ₂₂	1 4	24 [11]	n.a.				
pTTE ₁ + pTHT ₂₂	10 100	0	n.a.				
pTTF ₁ + pTHT ₂₂	50 200	1	1	n.a.			
pTTF ₁ + CGT21	10 25	22 [12]	n.a.	TTF ₁ +CGT 1 „g/w“ (n=10, Rsf+F1) TTF ₁ +CGT 3 „g“ (n=6, Rsf+F1) TTF ₁ +CGT 4 „g/w“ (n=7, Rsf+F1) TTF ₁ +CGT 6 „g“ (n=7, Rsf+F1)	X	X	X X
pTTF ₁ + CGT21	50 50	23 [8]	n.a.				
pTF ₁ T+ pTHT ₂₂	100 100	1	1	n.a.			
pTF ₁ T+ pTHT ₂₂	200 200	51	51				
pTF ₁ T+ CGT21	100 25	21	n.a.	n.a.			
pTF ₁ T+ CGT21	200 50	41	n.a.				

Tabelle 4. Die Konstrukte wurden einzeln oder in Kombination in den angegebenen Konzentrationen (ng) in HT1080⁻ Zellen lipofiziert. Die Zahl der gebildeten Kolonien nach 14-tägiger BS Selektion ist angegeben (auf je 2 Platten mit ca. 5x10⁵ HT1080 Zellen; Zahl der grünen Kolonien nach 14-tägiger BS Selektion in []). Bei Cotransfektionen mit pTHT₂₂ wurde eine 14-tägige HAT+BS Selektion erst nach der BS Selektion (14 Tage) in ausgewählten Linien verwendet, um die Rate an Klonen zu bestimmen, die beide Konstrukte funktionell aufgenommen haben (Die Zahl der BS+HAT resistenten Klone nach insgesamt ca. 28 Tagen ist angegeben; n.a., nicht analysiert). Von ausgewählten Klonen der angegebenen Konstrukte (bzw. Konstruktkombinationen) wurden 1-4 Linien („w“ weisse, „g“ grüne Kolonie) für eine „dual colour“ FISH-Analyse ausgewählt (n, Zahl der analysierten Metaphasen; Verwendete Sonden). Das Ergebnis ist für jede Linie angegeben (Int, Integration eines Signals im Grossteil der Metaphasen des gleichen endogenen Chromosoms; HAC, Kandidatenlinie für episomale künstliche Chromosomen; ND, nicht nachweisbar, eine Integration beider Signale wurde jedoch nach Analyse der angegebenen Metaphasen (n) ausgeschlossen).

pTT, HAC-Kloniervektor auf PAC-Basis, Arbeitssequenz, 26136 bp

- Host: DH10B und Baktinfektionsstamm BM2710-pGB2 Ω *inv-hly*
- P1 Replicon für die stabile Klonierung langer genomischer Gene und Zentromere
- 4 x Telomersequenzen (TTAGGG)135 um linearisierte, transfizierte HAC-DNA vor Integration zu schützen
- Amp und Kana Resistenzen innerhalb und ausserhalb der Telomere für eine stabile Propagierung tetratelomerischer HAC-Konstrukte in *E. coli*.
- Anwesenheit duplizierter Vektor-DNA Anteile zwischen den Telomeren, um homologe Reparatur innerhalb eines Moleküls zu ermöglichen
- 2 Kopien des BS Markers für die stabile Expression der BS Resistenz in eukaryotischen Zellen und 1 Kopie eines EGFP Markers für die stabile Expression grüner Fluoreszenz und einfaches Monitoring
- *Bsp* 120 I, und *Bss* H II unique Klonierstellen zwischen den Telomeren zur Einklonierung von Zentromeren, Genen, oder DNA-tags.
- *Sal* I unique Klonierstelle, weiss blau selektionierbar, um schwierige Klonierungen oder die Klonierung genomischer Banken in einen Zentromervektor zu vereinfachen (*Sal* I, *Psp* XI Fragmente, oder *Xho* I partial)
- 2 x *Not* I Stellen, um lineare, telomerisierte Fragmente zu isolieren

1	CCGCGCGGAT	CCTCTAGAGG	ATCCCCGGGT	ACCGAGCTCG	AATTCGCGG	2101	CATCGAAAGC	GTAGAATAAT	ACGACTCCCT	TCCAACCGGC	TACGTTGGCC
51	AATTCGCGTG	GGGTTGGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	2151	GGTTTTTCAC	TTATCCACAT	TATCCACTGG	ATAGATCCAA	TAATCAGGTC
101	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	2201	CATACAGATC	CCAATTAGAT	CCATATAGAT	CCCTGATCGT	TGCAGGCCGC
151	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	2251	GCCACGCTCG	GCTTAGAAGT	GTATCGCGAT	GTGTGCTGGA	GGGAAAAACGA
201	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	2301	TGTGTGCTGG	AGGGATAAAA	ATGTGTGCTG	ACGGGTTGCT	AATGTGTGCT
251	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	2351	GGCGGGATAT	AGGATGTGTG	TTGACGGGAA	AGCTTGGGTA	GTTATCACCA
301	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	2401	CTTATAAAAA	CTATCCACAC	AATTCGGAAA	AAGTAATATG	AATCAATCAT
351	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	2451	TTATCTCCGA	TATCTTTTAC	GCAGACATTG	AAAGTAAGGC	AAAAGAACTA
401	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	2501	ACAGTTAATT	CAAACAACAC	TGTGACGCCT	GTAGCGTTGA	TGCCTTGGG
451	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	2551	GGTATTCTGT	CCGAAGCCAT	CAAAGAGCAA	AGGAGAAAAGT	AAAGAGATTG
501	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	2601	ATGCCACCAA	AGCGTTTTCC	CAGCTGGAGA	TAGCTAAAAGC	CGAGGGTTAC
551	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	2651	GATGATATTA	AAATCACCCG	TCCTCGACTC	GATATGGATA	CTGATTTCAA
601	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	2701	AACGTGGATC	GGTGTCACTT	ACGCGTTCCG	CAAATACGGC	TTGTCCCTCAA
651	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	2751	ACACCATCCA	GTTATCGTTT	CAGGAATTCG	CTAAAGCCCTG	TGGTTTCCCC
701	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	2801	TCAAAAACGTC	TGGATGCGAA	ACTGCGTTTA	ACCATTCAATG	AATCACTTGG
751	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	2851	ACGCTTGCCT	AACAAGGGTA	TCGCTTTTAA	GGCGGAAAA	GATGCTAAAG
801	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	2901	GGCGCTATCA	GACTGGTCTG	CTGAAGGTCC	GGCGTTTGA	TGCTGACCTT
851	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	2951	GATCTGATAG	AGCTGGAGGG	CTGATTCGAA	GTTGTGGGAG	CTGTTCCAGC
901	GGCGCATCG	CCTTAAGTTG	CGGTACAATT	GAAGTTCITT	ACGGATTTTT	3001	TTGATTATCG	CGTTCGTGTT	CAACACCACG	CCTTGCCTGC	CCTTCCGAAG
951	AGTAAACCTT	GTTCAAGTCT	AACACTACCG	GTACCCGCTC	TGCCGAAGCA	3051	AAAGAAGCTG	CACAAGCCAT	TTACACTTTC	ATCGAAAAGCC	TTCGCCAGAA
1001	TCAGCAAATA	AGGCCAGCAC	AGCCAGCGCA	GTTGCCGCTT	TGGTTCCTGA	3101	CCCGTTGCCG	CTATCGTTCC	CGCGAATCCG	TGAGCGCCCTG	GCTTTGCAGT
1051	TTCTGTTCTT	GATGAATTA	ACAAAGCGGC	ACAGTAACAA	AGGACTTCAT	3151	CAGCTGTGTTG	CGAGCAAAA	CGTATCATT	AGAAAGCGAT	AGAACAGCTT
1101	TGATAATTTT	TCTTCAGGAG	GAAGACATGT	CATTCTTTTC	TACGTTAAAA	3201	AAAACAATCG	GCTATCTCGA	CTGTTCTATT	GAGAAGAAAG	GCCGGGAAAG
1151	ACAGCTTTGT	CTTTGAAGGA	GAAACTTGCT	GCTACTGGTG	TTCTTGTCTT	3251	TTTTGTAATC	GTCCATTTCT	GCAATCCAAA	GCTGAAACTC	CCCGAATAAG
1201	GATTTGCACA	CTTGTGGTGG	CTGGGTTTGC	ATGGGAACGT	CATCAGCTAA	3301	TGTGTGCTGG	AGGGAAACCG	CATTAAAAAG	ATGTGTGCTG	CCGGGAAGGC
1251	AGCAAGCCAT	AGAGAAAATT	GGCAGTCTTG	ATCAGGCTGT	TAAGGAACGT	3351	TTGTCCAATT	TCCTGTTTTT	GAATGTGCGC	TGGAGGGGGA	CGCCCTCCAG
1301	GATAAGTCAA	TAATGGATCT	TAACAGACAC	ATTGAGACGA	TGAACAAGGC	3401	TTTGCCACGA	CTTTCCCTCC	AGCACACATC	TGTCCATCCG	CTTTTCCCTC
1351	AGAGCAACAT	TTTCACAGCC	AGGAAGTGAA	AAATGAATCA	GAACAAGCCA	3451	CAGTGCACAT	GTAATTTCTT	GCCTTTCCCT	CCAGCACACA	TATTTGATAC
1401	AGTATGCTGA	CAGGCAAATG	GAACGAAAAG	CTGAAGTTCA	GAACAACCTG	3501	CAGCGATCCC	TCCACAGCAC	ATAATTCAT	GCGACTTCCC	TCTATCGCAC
1451	GTTGCGGCGG	GTAATGTTGG	CCAGCGTATT	CCTGCTGACA	CTCAGCGGTT	3551	ATCTTAGACT	TTTATTTCTC	CTCCAGCACA	CATCGAAGCT	GCCGGGCAAG
1501	GCTCCGGGAG	TCGATCAGCG	AATTTAACGC	CGACGCCGAC	AAAGTTAAC	3601	CCGTTCTCAC	CAGTTGATAG	AGAGTGAAGC	TTGGTGCCTC	ATTGAAGCAG
1551	CACCCTGCC	CCAAAAGTGC	ATTTATGTGT	AGGATGCCAG	AGTTTACGAG	3651	GAAATCACCA	AAATGATTCA	GGTACAACC	TGAACGTAGA	AGAAATCCGC
1601	TGAATATTTT	GATGATCTGC	CAGCGTATAT	CCTCGATACA	GAAACGATGC	3701	GTCCTTTATG	CGTGGAGGAT	GCCAAAGCAT	GTTGTGACAC	ACTTGGCAAA
1651	TGATGGGGAT	TAACAGGAAG	AATCGCAACG	TTAATGATTA	CAACCGAGCT	3751	GGAGTAAGCA	TGCAGAGAAT	GCTATGTACA	AGCATCTACG	CATACATTAT
1701	ATTAGCGGTA	ACTAAAAGGG	ATTTTTATGT	CTGATAAAGT	AACAGTAAAG	3801	TATTTTATGC	AGCATTTTTA	ATTTAAATCA	AAAATACAGC	ATAAAGGATG
1751	CAAACTATCA	ACAAAGCGAC	TTCAATCTAC	AAAATTGAGC	AAATCACTGT	3851	ACTTTTCGATG	AGTGATTCCA	GCCAGTTTCA	CAAGTTGCT	CAAAGAGCAA
1801	TGCAAGCCA	GGATCTGAAC	AATACCGTGC	TGCTTTCGAG	CTTGCAGATC	3901	ACAGAATGCT	CAATGTTCTG	ACTGAACAAG	TACAGTTGCA	AAAGGATGAG
1851	AGCTTGGTTT	AAAACACCCG	GATTGCATTG	AGCATGTATT	TCCGACCTAT	3951	CTACACGGGA	ACGAGTTTTA	CCAGGTCTAT	GCGAAAGCGG	CAGTGGCAAA
1901	GCTGATGAGC	AATGTAATCA	TGTTCTTACC	GAAGAGGATT	TTTTTACGAC	4001	ATTGCCCTCTA	CTGACTCGAG	CGAACGTTGA	CTATGCCGTA	AGTGAATGG
1951	TGAAGAACGA	GAAGCGGTTG	ATCGCTGCAT	TGGTGTGATT	TGTTCTCCGG	4051	AAGAAAAGGG	TTATGTTTTT	GATAAACGCC	TGCTGGCTCT	TCAATGAAT
2001	TAAGTGATGA	GTTATTTCCCT	AATGTGCTCG	AATATGGTGG	TATTTGGATAC	4101	ATGCGATGTC	AATTCAGAAC	ATCATTGACA	TATATGAACA	TCCGGGAGTG
2051	CAATTCCTGT	ACGAGGGCGA	TGAGCTTAAA	TGCTATGAAC	ATGGCTTCTT	4151	CCAAAATACC	GGGATCGCTA	CAGCGAACGT	ATGTGATTTT	CATCTCCAAT
						4201	CTTAAAGGCG	GTGTGTCAAA	AACTGTATCG	ACGGTTTCTC	TGGCCGATGC

4251 AATGCGTCT CACCCTCATC TTCTTATGGA GGATTTAAGG ATTCTGGTTA
 4301 TTGACCTTGA TCCGCAATCT TCAGCAACGA TGTTTTTAAG CCATAAACAC
 4351 TCTATTGGTA TCGTAAACGC AACATCTGCA CAGGCTATGT TGCAGAATGT
 4401 AAGCCGTGAA GAGCTGTAG AGGAGTTTAT TGTTCTCTCT GTTGTACCTG
 4451 GGGTTGACGT TATGCTCTGC TCGATTGACG ATGCCTTTAT TGCATCCGAT
 4501 TGGAGAGAGC TGTGCAATGA GCATCTACCG GGTGAGAACA TCCATGCTGT
 4551 CCTGAAAGAA AATGTGATTG ATAAGCTGAA GAGCGATTAT GACTTTATCC
 4601 TCGTTGATAG TGGTCTCTAC CTTGACGCCT TCCTGAAAAA TGCTTTGGCC
 4651 TCGGCCAATA TACTGTTTAC ACCTCTGCCG CCAGCAACTG TCGATTTCCA
 4701 CTCATCGCTT AAATACGTTG CCCGCCTTCC TGAGTTGGTG AACTCATTTT
 4751 GGATGAAGGC TCGAGTGCC AGCTTGGCAG TAACATTGGT TTTATGTCCA
 4801 AGTTGAGTAA CAAGCCAGAC CATAAGTATT GCCATAGCCT GGCTAAAGAA
 4851 GTGTTGCGTG GGGATATGCT TGATGTCTTC CTCCCTCGCC TTGACGGTTT
 4901 TGAACGCTG CCGCGAGTCT TTTGACACTG TTATTTTCAG TAACCCGGCA
 4951 ACGTATGTTG GTAGTGCTGA TGCATTGAAG AACCGCGGAA TTGCCCGGGA
 5001 AGATTTTGT AAAGCAGTTT TTGACCGTAT TGAATTTATC AGATCTAACT
 5051 GAGGAGTAAG AAACCCCAT **AT** **parB start** **GTC**CAAGAAA AACAGACCAA CAATTGGGCG
 5101 AACCTTAAT CCTTCAATAT TAAGCGGATT TGATAGTTCT TCAGCCTCTG
 5151 GCGATCGAGT CGAGCAGGTA TTCAAGTTAT CAACTGGTCG CCAGCCACA
 5201 TTTATTGAAG AGGTAATACC TCCGAACCAG GTAGAAAGCG ATACCTTTGT
 5251 TGATCAGCAT AACAACGGCC GTGACCAGGC ATCTCTTACG CCAAAATCAT
 5301 TAAAAAGTAT CCGAAGCACT ATTAAGCATC AGCAATTTTA CCCTGCAATA
 5351 GGTGTTAGAC GGGCTACAGG GAAAAATTGAA ATTTTGGATG GTTCCCGGCG
 5401 TCGAGCTTCT GCCATCTTAG AGAACGTAGG GTTGCGGGTT TTAGTCACGG
 5451 ACCAGGAGAT CAGCGTTCAG GAAGCGCAAA ATTTAGCGAA AGACGTTTCC
 5501 ACAGCATTGC AGCAGCATCT TCGAGAAATA GGTCTGCGTT TGATGCGAAT
 5551 GAAAAATGAT GGGATGAGTC AGAAGGATAT TGCAGCCAAA GAAGGGCTGT
 5601 CTCAGCGCAA GGTCAACGCT GCTCTCCAGG CAGCGAGTGC TCCGGAAGAA
 5651 TTAGTCGCCC TTTTCCCTGT GCAGTCGGAA TTAACCTTTT CGGACTACAA
 5701 AACGCTTTGT GCTGTTGGCG ACGAAATGGG GTACAAGAAT TTAGAGTTTG
 5751 ATCAGCTTAT TCAAAACATA TCCCCGAAA TAAACGACAT CTTATCCATT
 5801 GAAGAAATGG CCGAAGATGA AGTTAAAAAT AAAATCCTGC GCTTGATAAC
 5851 AAAGGAAGCC TCACACTCA CGGATAAAGG TTCTAAAGAT AAGTCCGTAG
 5901 TTAAGTAAAT ATGAAATTTT GAGGACAAGG ATCGCTTTGC AAGGAAGCGC
 5951 GTGAAAGGCC GTGCATTTTC TTATGAGTTT AATCGACTCT CAAAAGAGTT
 6001 ACAGGAAGAA CTCGACAGGA TGATTGGGCA TATCCTTAGA AAGAGCCTCG
 6051 AAAAAAGCC GAAGCCTTAA **ACTTTCCGCA** **TTCAAAATTC** **ACTATTA**ACT
 6101 **GACTGTTTTT** **AAAGTAAAT** **ACTCTAAAAT** **TTCAAGGTGA** **AATGCCACG**
 6151 **ATTTACCTT** **GGATTTTACC** **TTCTCCCT** **CCTCCGAAA** **AAAAATAAAA**
 6201 **AATTGCTTGT** **CACGAGAAAG** **parS** **TCAACAAGTG** **ACTTTCAATA** **AAATCTCTT**
 6251 **CGAAAAGGGA** **TTCAACAAG** **TGCCTTGTGT** **TTAAGGAAGA** **GTAATTTGAG**
 6301 TAACTTACGC GAATACCAGA ATCGTATTGC AGATATCGCA AAACGCTCTA
 6351 AAGCTGTGCT TGGCTGGGCA AGCACTGCGC AGTTGCGTAC TGATAACCAA
 6401 TTCATTAAG ATGATGCCGC GCGTGCCGCA TCTATCCTTG AAGTGCACG
 6451 TAAAGACCCG GTTTTTGCGG GTATCTCTGA TAATGCCACC GCTCAAATCG
 6501 CTACAGCGTG GGCAAGTGCA CTGGCTGACT ACGCCGACG ACATAAATCT
 6551 ATGCCGCGTC CGGAAATTTT GGCCTCCTGC CACCAGACG TGGAAAATG
 6601 CCTGATAGAG TCCACCCGCA ATAGCATGGA TGCCACTAAT AAAGCGATGC
 6651 TGGAACTGT CGCAGCAGAG ATGATGAGCG TTTCTGACGG TGTATGCGT
 6701 CTGCCCTTAT TCCTCGCGAT GATCCTGCCT GTTCAGTTGG GGCAGCTAC
 6751 CGCTGATGCG TGTACTTCA TTCCGGTTAC GCGTGACCAG TCCGACATCT
 6801 ATGAAGTCTT TAACGTGGCA GGTTCATCTT TTGGTCTTFA TGCTGCTGGT
 6851 GATGTTCTG ACATGCAATC CGTCCGTTG TACAGCCAGT TACGTCGCCG
 6901 CTATGTGCTG GTGGCAAGCT CCGATGGCAC CAGCAAAACC GCAACCTTCA
 6951 AGATGGAAGA CTTCGAAGGC CAGAATGTAC CAATCCGAAA AGGTGCGACT
 7001 AACATCTACG TTAACCGTAT TAAGTCTGTT GTTGATAACG GTTCCGGCAG
 7051 CCTACTTAC TCGTTTACTA ATGCTGCTGG TGAGCAAATC ACTGTTACCT
 7101 GCTCTCTGAA CTACAACATT GGTGAGATTG CCCTGCTGTT CTCCAAAGCG
 7151 CCGGATAAAG GCACTGAGAT CGCAATTGAG ACGGAAATCA ATATTGAAGC
 7201 CGCTCCTGAG CTGATCCCGC TGATCAACCA CGAAATGAAG AAATACACCC
 7251 TGTTCCCAAG TCAGTTCTGT ATCGCGCGTG AGCACACGGT ACAGCGCGGG
 7301 TATGAAGCAC AGCGTGAATT TGCTCTGGAC CTGGGTTCCC TACAGTTCCG
 7351 CACCCTGAAG GAATACCTGT CTCATGAACA GGATATGCTG CGTCTTCCGA
 7401 TCATGATCTG GCGACTCTTT GCGACCGACA CCTTTGACAT CGCTCTGCCG
 7451 GTTAACCACT CTTTGTATGT ATGGCAACC ATCATTCTGT GCAAATPCCA
 7501 GACTGTATAT CCGACATTA TTGAGCGCGT TAAATCTTCT GGTCCGATGG
 7551 GGATGTTTGC TGGTCTGAT GCAGCATCTT TCTTCAAACA GTTCCCGAAG
 7601 GATTTCTTCC AGCCAGCCGA AGACTATATC CAGACTCCGT ATGTTCACTA
 7651 CATCGGTACC CCATTTAGGA CCACCCACAG CACCTAACAA AACGGCATCA
 7701 GCCTTCTTGG **AGGCTTCCAG** **CGCCTCATCT** **GGAAGTGGAA** **CACCTGTAGC**
 7751 **ATCGACCTGC** **AGGGGGGGGG** **GGGCGCTGAG** **GTCTGCCTCG** **TGAAGAAGGT**
 7801 GTTGCTGACT CATAACAGCG CTGAATCGCC CCATCATCCA GCCAGAAAGT
 7851 GAGGGAGCCA CGTGTGATGA GAGCTTTGTT GTAGTGGAC CAGTGTGTTA
 7901 TTTTGAACCT TTGCTTTGCC ACGGAACGGT CTGCTTGTG GGAAGATGC
 7951 GTGATCTGAT CCTTCAACTC AGCAAAAGTT CGATTTATTC AACAAAGCCG
 8001 CCGTCCCGTC AAGTCAGCGT AATGCTCTGC CAGTGTTACA ACCAATTAAC
 8051 CAATCTGAT TAGAAAAACT CATCGAGCAT CAAATGAAAC TGCAATTTAT
 8101 TCATATCAGG ATTAACAATA CCATATTTTT GAAAAAGCCG TTTCTGTAAT
 8151 GAAGGAGAAA ACTCACCGAG GCAGTTCCAT AGGATGGCAA GATCCTGGTA
 8201 TCGGTCTGCG ATTTCCGACT GTCCAACATC AATACAACCT ATTAATTTCC
 8251 CCTCGTCAA AATAAGGTTA TCAAGTGAAG AATCACCATG AGTGCAGACT
 8301 GAATCCGGTG AGAATGGCAA AAGCTTATGC ATTTCTTTCC AGACTTGTTC
 8351 AACAGGCCAG CCATTACGCT CGTCATCAA ATCACTCGCA TCAACCAAC
 8401 CGTTATTCAT TCGTGATTGC GCCTGAGCGA GACGAAATAC GCGATCGCTG
 8451 TTAAGAGGAC AATTACAAC AGGAATCGAA TGCAACCGGC CGAGGAACAC
 8501 TGCCAGCGCA TCAACAATAT TTTACCTGA ATCAGGATAT TCTTCTAATA
 8551 CCTGGAATGC TGTTTTCCCG GGGATCGCAG TGGTGTGATA CCATGCATCA
 8601 TCAGGAGTAC GGATAAAATG CTTGATGCTG GGAAGAGGCA TAAATCCGCT
 8651 CAGCCAGTTT AGTCTGACCA TCTCATCTGT AACATCATG GCAACGCTAC
 8701 CTTTGCCATG TTTCCAGAAC AACTCTGGCG CATCGGGCTT CCCATACAAT
 8751 CGATAGATTG TCGCACCTGA TTGCCCGACA TTATCGCGAG CCCATTTATA
 8801 CCCATATAAA TCAGCATCCA TGTTGGAATT TAATCGCGGC CTCGAGCAAG
 8851 ACGTTTCCCG TTGAATATGG **←Kana** **CTCATTAACAC** **CCCTTGTATT** **ACTGTTTATG**
 8901 TAAGCAGACA GTTTTATGTT TCATGATGAT ATATTTTTAT CTTGTGCAAT
 8951 GTAACATCAG AGATTTTGG ACACAACGCT GCTTTCCCCC **CCCCCTCTG**
 9001 AGGTCGATAG CAGCACCCAC AATTAATGA TTTTCGAAAT **TN903 ins** **CGAACTTGAC**
 9051 ATTGGAACGA ACATCAGAAA TAGCTTTAAG AACCTTAATG GCTTCGGCTG
 9101 TGATTTCTTG ACCAACGTGG TCACCTGGCA AAACGACGAT CTTCTTAGGG
 9151 GCAGACATTA GAATGGTATA TCCTTGAAAT ATATATATAT ATTGCTGAAA
 9201 TGTAAGAGGT AAGAAAAGTT AGAAAGTAAG ACGATTGCTA ACCACCTATT
 9251 GGAAAAAACA ATAGGTCCTT AAATAATATT GTCAACTTCA AGTATTGTGA
 9301 TGCAAGCATT TAGTCATGAA CGTCTCTCTA TTCTATATGA AAAGCCGGTT
 9351 CCGGCGCTCT CACCTTTCCT TTTTCTCCCA ATTTTTCAGT TGA AAAAGGT
 9401 ATATGCGTCA GCGGACCTCT GAAATTAACA AAAAAATTCC AGTCATCGAA
 9451 TTTGATTCTG TCGGATAGCG CCCTGTGTG TTCTCGTTAT GTTGAGGAAA
 9501 AAAATAATGG TTGCTAAGAG ATTGCAACTC TTGCATCTTA CGATACCTGA
 9551 GTATTCCAC AGTTAACTGC GGTCAAGATA TTTCTTGAAT CAGCGGAT**GC**
 9601 **Not I (2)** **I-Sce I (2)** **GGCCGCGCTA** **GGGATAACAG** **GGTAATATAG** **GCCGCAATTC** **GCAACCTTAA**
 9651 **CCCTAACCTT** **AACCTTAACC** **CTAACCTTAA** **CCCTAACCTT** **AACCTTAACC**
 9701 **CTAACCTTAA** **CCCTAACCTT** **AACCTTAACC** **CTAACCTTAA** **CCCTAACCTT**
 9751 **AACCTTAACC** **CTAACCTTAA** **CCCTAACCTT** **AACCTTAACC** **CTAACCTTAA**
 9801 **CCCTAACCTT** **AACCTTAACC** **CTAACCTTAA** **CCCTAACCTT** **AACCTTAACC**
 9851 **CTAACCTTAA** **CCCTAACCTT** **AACCTTAACC** **CTAACCTTAA** **CCCTAACCTT**

9901 AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA
 9951 CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT
 10001 CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT
 10051 AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA
 10101 CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT
 10151 CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT
 10201 AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA
 10251 CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT
 10301 CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT
 10351 AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA
 10401 CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT
 10451 GAATTCGCG GAATTCGAGC TCGTACCG GGGATCCTCT AGTGGGTAGA
 10501 TCCACAGGAC GGGTGTGGT GCCATGATCG CGTAGTCGAT AGTGGCTCCA
 10551 AGTAGCGAAG CGAGCAGGAC TGGGCGGCG CCAAAGCGGT CGGACAGTGC
 10601 TCCGAGAAG GGTGCGCATA GAAATTGCAT CAACGCATAT AGCGTAGCA
 10651 GCACGCCATA GTGACTGGCG ATGCTGTCCG AATGGACGAT ATCCCGCAAG
 10701 AGGCCCGCA GTACCGGCAT AACCAAGCCT ATGCCTACAG CATCCAGGGT
 10751 GACGGTCCG AGGATGACGA TGAGCGCAT GTTAGATTTC ATACACGGTG
 10801 CCTGACTGCG TTTAGCAATT TTAAGTGA TAAACTACCG CATTAAGTCT
 10851 TATCGATGAT AAGCTGTCGA ACATGAGAAT TGATCCGAA CCCTTAATAE
 10901 AACTTCGTAT AATGTATGCT ATACGAAGTT ATTAGTCCC TCGACTACGT
 10951 CGTTAAGGCC GTTCTGACA GAGTAAATTT CTTGAGGAA CTTTCACCAT
 11001 TATGGAAAT GGTTCAGAA GGTATTGACT TAAACTCCAT CAAATGGTCA
 11051 GGTCAATGAG TGTTTTTTAT TTGTTGATT TTTTTTTTT AGAGAAAATC
 11101 CTCCAATATA TAAATTAGGA ATCATAGTTT CATGATTTTC TGTTACACCT
 11151 AACTTTTTGT GTGGTCCCT CCTCCTTGC AATATTAATG TAAAGTGCA
 11201 ATTCTTTTTC CTTATCACGT TGAGCCATTA GTATCAATTT GCTTACCTGT
 11251 ATTCTTTTAC ATCCCTCTTT TCTCCTTCT TGATAAATGT ATGTAGATTG
 11301 CGTATATAGT TTCGCTACCT CTATGAACAT ATTCCATTTT GTAATTTCTG
 11351 GTCGTTTCTA TTAGAATTT CATTATAAAA GTTTATGTAC AAATATCATA
 11401 AAAAAAGAGA ATCTTTTTAA GCAAGGATTT TCTTAACTTC TTCGCGGACA
 11451 GCATCACCGA CTTCCGGTGT ACTGTTGGAA CCACCTAAAT CACCAGTTCT
 11501 GATACCTGCA TCCAAAACCT TTTTAACTGC ATCTTCAATG GCCTTACCTT
 11551 CTTACAGCAA GTTCAATGAC AATTTCAACA TCATTGCAGC AGACAAGATA
 11601 GTGGCGATAG GGTGACCTT ATTCTTTGCG AAATCTGGAG CAGAACCGTG
 11651 GCATGTTTCG TACAACCAA ATGCGGTGTT CTTGTCTGGC AAAGAGGCCA
 11701 AGGACGCGA TGCAACAAA CCCAAGGAAC CTGGGATAAC GGAGGCTTCA
 11751 TCGGAGATGA TATCACCAA CATGTTGCTG GTGATTATAA TACCATTAG
 11801 GTCGAgtagc gagctcgaat toagacatga taagatacat tgatgagttt
 11851 ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat
 11901 ttgtgatgct attgctttat ttgtaacctat tataagctgc aataaacaag
 11951 ttaacaacaa caattgcaat cattttatgt ttcaggttca gggggagggtg
 12001 tgggagggtt tttaaagcaa gtaaaacctc tacaatgtg gtagggctga
 12051 ttatgatctc tagtcaaggc actatacatc aaatattcct tattaacccc
 12101 tttacaaatt aaaaagctaa aggtacacaa tttttgagca tagttattaa
 12151 tagcagacac tctatgcctg tgtggagtaa gaaaaacag tatgttatga
 12201 ttataactgt tatgctact tataaagggt acagaatatt tttccataat
 12251 tttctgtat agcagtgca ettttctct tgtggtgtaa atagcaaaagc
 12301 aagcaagagt tctattacta aacacagcat gactcaaaaa acttagcaat
 12351 tctgaaggaa agtccctggg gtctctctacc tttctctct tttttggagg
 12401 agtagaatgt tgagagtcag cagtagcctc atcatcacta gatggcattt
 12451 cttctgagca aaacagggtt toctcattaa aggcattcca coactgetcc
 12501 cattcatcag ttocataggt tggaatctaa aatacacaaa caattagaat
 12551 cagtagttta acacattata cacttaaaaa ttttatattt accttagagc
 12601 tttaaatctc tgtaggtagt ttgtccaatt atgtcacacc acagaagtaa
 12651 ggttccttca caaagatccg gaccaaagcg gccatcgtgc ctccccactc
 12701 ctgcagttcg ggggcaatgga tgcgcgata gccgctgctg gtttctgga
 12751 tgccagcga tttgcactgc cggtagaact cgcgagggtc gtccagcctc
 12801 aggcagcagc caagctgtgt atggtaaaac ttTTAatttc ggggtatatt
 12851 gagtggaaat agttcttcaa tctgtagttt gactaaactg coattoattt
 12901 ctattaacac aaaaacaatc ggtgcatagt ctgaaatcaa ctccctacac
 12951 ataccacaag gacttaccac tccaataact ctatctactt cgtcagaata
 13001 aggggtgcta acagctacaa tctgtcctaa atccttttgt coattcgaaa
 13051 ctgcactacc aatcgcaatg gcttctgac aaacagttac tctctctata
 13101 taccgttcaa tatgtactgc cgaatgatt tctctgttt tctgtagaat
 13151 tgccgctccc acatgatgtt tattatctcc ataaagcatt gtaattctct
 13201 ctgtcgtctc ttctactaat tctagatctt gttgagaat gttaaatggt
 13251 ttCATatatt cttctctcct cgatttctgc aaaaatgaat ccaagctttt
 13301 tgcaaaagcc taggcctcca aaaaagcctc ctactactt ctggaatagc
 13351 tcagaggccg agggcgctcc ggccctctga taaataaaaa aaattagtca
 13401 gccatggggc ggagaatggg cggaaactgg cggagttagg gggggatgg
 13451 ggggagttag gggcgggact atgggtgtgt actaattgag atgcatgctt
 13501 tgcatacttc tgcctgctgg ggagcctggg gactttccac acctggttgc
 13551 tgactaattg agatgcatgc tttgcatact tctgctgct gggggagcctg
 13601 gggactttcc acaccctaac tgacacaact tccacagcta gcgctatgt
 13651 cgttgatgca atttctatgc gcaccctctc tgggagcact gtccagccgc
 13701 tttggccgcc gccccagctc gctcgtctgc ctacttggag ccaactatga
 13751 ctacgagcgc atggcgacca caccctctct gttgatctac ccaactagta
 13801 attcaccatc ttgttgagaa ataaagaaa atgccaatga agtatcggca
 13851 tttttttttt gctgttatta gttgactgtc agtccagccc gtcagcctt
 13901 TAACCGTATT ACCGCCATGC ATTAGTTATT AATAGTAATC AATTACGGGG
 13951 TCATTAGTTC ATAGCCCATTA TATGGAGTTC CGCGTTACAT AACTTACGGT
 14001 AAATGGCCCG CTGGCTGAC CGCCCAACGA CCCCAGCCCA TTGACGTCAA
 14051 TAATGACGTA TGTTCCCATTA GTAACGCCAA TAGGGACTTT CCATTGACGT
 14101 CAATGGGTGG AGTATTTACG GTAACCTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT
 14151 GTATCATATG CCAAGTACGC CCCTATTGTA CGTCAATGAC GGTAAATGCG
 14201 CCGCCTGGCA TTATGCCAGC TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG
 14251 CAGTACATCT ACGTATTAGT CATCGCTATT ACCATGGTGA TCGCGTTTGG
 14301 GCAGTACATC AATGGCGTGG GATAGCGGTT TGACTCACGG GATTTCCAA
 14351 GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTTGGCA CCAAATCAA
 14401 CGGGACTTTC CAAAATGTGC TAACAATCC GCCCATTGTA CGCAATGGG
 14451 CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT AAGCAGAGCT GGTTTAGTGA
 14501 ACCGTCAGAT CCACCGGTGC CCACCATGCT GAGCAAGGGC GAGGAGCTGT
 14551 TCACCGGGGT GGTGCCCATC CTGGTCCGAG TGGACGGCGA CGTAAACGGC
 14601 CACAAGTTCA GCGTGTCCGG CGAGGGCGAG GCGATGCCA CCTACGGCAA
 14651 GCTGACCTGT AAGTTTACTT GCACCACCGG CAAGTGTCCC GTGCCCTGGC
 14701 CCACCTGCTG GACCACCGCT ACCTACCGCG TCGAGTCTT CAGCCGCTAC
 14751 CCCGACCACA TGAAGCAGCA CGACTTCTCT AAGTCCGCCA TGCCCAAGG
 14801 CTACGTCCAG GAGCGCACCA TCTTCTTCAA GGACGACGGC AACTACAAGA
 14851 CCCGCGCCGA GGTGAAGTTC GAGGGCGACA CCTGGTGA ACGCATCGAG
 14901 CTGAAGGGCA TCGACTTCAA GGAGGACGGC AACATCTGCG GGCACAAGCT
 14951 GGAGTACAAC TACAACAGCC ACAACGTCTA TATCATGGCC GACAAGCAGA
 15001 AGAACGGCAT CAAGGTGAAC TTCAAGATCC GCCACAACAT CGAGGACGGC
 15051 AGCGTGCAGC TCGCCGACCA CTACCAGCAG AACACCCCCA TCGGCGACGG
 15101 CCCGTGCTG CTGCCCGACA ACCACTACTT GAGCACCAGG TCCGCCCTGA
 15151 GCAAAGACCC CAACGAGAAG CGCGATCACA TGGTCTGCTT GGAGTTCGTG
 15201 ACCGCGCCCG GGATCACTCT CGGCATGGAC GAGCTCTAGA TCATAATCAG
 15251 CCATACCACA TTTGTAGAGG TTTTACTTGC TTTAAAAAAC CTCCCACACC
 15301 TCCCCTGAA CCGTAAACAT AAAATGAATG CAATTGTTGT TGTTAACTTG
 15351 TTTATTGCGC CTTATAATGG TTCAAAATAA AGCAATAGCA TCACAAATTT
 15401 CACAAATAAA GCATTTTTTT CACTGCATTC TAGTTGTTGG TTGTCCAAAC
 15451 TCATCAATGT ATCTTAAGCG GTAATTTGTA AGCGTTAATA TTTTGTATAA
 15501 ATTCGCGTTA AATTTTTGTT AAATCAGCTC ATTTTTTAAC CAATAGGCCG
 15551 AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAGG AATAGACCGA GATAGGGTTG

15601 AGTGTGTTTC CAGTTGGCC GCGCTAGGGA TAACAGGGA ATATAGCCG
 Bsp120I/NotI I-Sce I (3)
 15651 CAATTCGGAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT
 15701 AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA
 15751 CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT
 15801 CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT
 15851 AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA
 15901 CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT
 te1 (3)
 15951 CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT
 16001 AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA
 16051 CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT
 16101 CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT
 16151 AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA
 16201 CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT
 16251 CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT
 16301 AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA
 16351 CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT
 16401 CTAACCTAA CCCTAACCT AACCTAACCT CTAACCTAA CCCTAACCT
 16451 AACCCCAACC CCACCGAAT TCCGCGAAT TCGAGCTCG TACCCGGGA
 16501 TCCTCTAGT GGTAGATCA CAGGACGGT GTGGTCGCCA TGATCGGTA
 16551 GTCGATAGT GCTCCAAGT GCGAAGCGAG CAGGACTGG CGCGGCCAA
 16601 AGCGGTCGA CAGTCTCCG AGAAGGGTG CGCATAGAAA TTGCATCAAC
 16651 GCATATAGC CTAGCAGCAC GCCATAGTGA CTGGCGATG TGTCGGAATG
 16701 GACGATATC CGCAAGAGC CCGGCAGTAC CGGCATAACC AAGCCTATGC
 16751 CTACAGCATC CAGGTGAGC GTGCCGAGGA TGACGATGAG CGCATTGTTA
 16801 GATTTCATC ACGTGCCTG ACTGCGTTA GCAATTTAA CTGTGATAAA
 16851 CTACCGCATT AAAGCTTATC GATGATAAG TGTCAAACAT GAGAATTGAT
 16901 CCGGAACCT TAATAAATC TCGTATAATG TATGCTATAC GAAGTTATTA
 10xP (2)
 16951 GGTCCCTCGA CTACGTCGT AAGGCCGTT CTGACAGAGT AAAATCTTG
 17001 AGGGAACCTT CACCATTATG GAAATGGTT CAAGAAGGTA TTGACTTAAA
 17051 CTCCATCAA TGGTCAGGTC ATTGAGTGT TTTTATTGT TGTATTTT
 17101 TTTTITAGAG AAAATCTCC AATATATAAA TTAGGAATCA TAGTTTCATG
 17151 ATTTCTGTT ACACCTAAT TTTTGTGTG TGCCCTCCTC CTGTCAATA
 17201 TTAATGTAA AGTGAATTC TTTTCTCTA TCACGTTGAG CCATTAGTAT
 17251 CAATTTGCTT ACCTGTATTC CTTTACATCC TCCTTTTTCT CTTCTTGAT
 17301 AAATGTATGT AGATTGCGTA TATAGTTTCG TCTACCTAT GAACATATTC
 17351 CATTITGTAA TTTGTTGTC TTTCTATTAT GAATTTTATT TATAAAGTTT
 17401 ATGTACAAAT ATCATAAAA AAGAGAATCT TTTTAAGCAA GGATTTTCTT
 17451 AACTTCTTCG GCGACAGCAT CACCGACTTC GGTGTTACTG TTGGAACCAC
 17501 CTAATCACC AGTCTGATA CCTGCATCCA AAACCTTTTT AACTGCATCT
 17551 TCAATGGCCT TACCTTCTC AGGCAAGTTC AATGACAATT TCAACATCAT
 17601 TGCAGGAGC AAGATAGTGG CGATAGGGT GACCTTATTC TTTGCAAAAT
 17651 CTGGAGCAGA ACCGTGGCAT GGTTCGTACA AACCAAATGC GGTGTTCTTG
 17701 TCTGGCAAAG AGGCCAAGGA CGCAGATGGC AACAAACCCA AGGAACCTGG
 17751 GATAACGGAG GCTTCATCG AGATGATATC ACCAAACATG TTGCTGGTGA
 17801 TTATAATACC ATTTAGTTCG Agtaccgagc tcgaattcag acatgataag
 17851 atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat
 17901 gctttatttg tgaattttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata
 17951 agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca
 18001 ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca
 18051 aatgtgggat ggctgattat gatctctagt caaggcacta tacatcaaat
 18101 attccttatt aaccctttaa caaattaaaa agctaagggt acacaatttt
 18151 tgagcatagt tattaatagc agacactcta tgcctgtgtg gagtaagaaa
 18201 aacagtatg ttatgattat aactgttatg cctacttata aaggttacag
 18251 aatatttttc cataattttc ttgtatagca gtcagctttt ttcctttgtg
 18301 gtgtaaatag caaagcaagc aagagtctta ttactaaaca cagcatgact
 18351 caaaaaactt agcaattctg aaggaaaagc cttggggctc tctaccttcc
 18401 tcttcttttt tggaggagta gaattgtgag agtcagcagt agcctcatca
 18451 tcaactagatg geattttctc tgagcaaaa aggttttctc cattaaggcc
 18501 attccaccac tgcctcccatt catcagttcc ataggttggg atctaaaata
 18551 cacaacaact tagaatcagt agtttaaac atatacaact taaaaatttt
 SV40 Poly A
 18601 atatttaoct tagagcttta aatctctgta ggtagtttgt coaattatgt
 18651 cacaccacag aagtaagggt ccttcacaaa gatccggacc aaagcgggca
 18701 tctgtcctcc coactcotgc agtccggggg catggatgcy cggatagccy
 18751 ctgctgggtt cotggatgcy gacggattgt cactgccggt agaactccgc
 18801 gaggtctgcc agcctcagc agcagccaag cttggtatgg taaaacttTT
 STOP BS
 18851 Aatttcgggt atatttgagt ggaatgagtt cttcaatcgt agttttgact
 18901 aacttgccat tcaatttctat taacacaaaa caatctgggt catagtctga
 18951 aatcaactcc ctacacatac cacaaggact taccactcga atactttat
 19001 ctactctgct agaataaggg tgtctaacag ctacaatcgt gtcaaaatcc
 19051 ttttggccat tggaaactgc actaccaatc gcaatggctt ctgcacaaa
 19101 agttactcgt cctatatagc cttcaaatgt tactgccgaa atgatttctc
 Sun I
 19151 ctgtttctgt acgaaattgc gctcccacat gatgtttatt atcctcataa
 19201 agcattgtaa tcttctctgt cgctactctt actaattcta gatcttggty
 ←BS (2)
 19251 agaaatgta aatgtttctCA Tattattctt ttcctccgat tctgcaaaa
 19301 atgaatccaa gctttttgca aaagcctagg cctccaaaaa agcctcctca
 19351 ctactctgcy aatagctcag aggcggaggc ggcctcggcc tctgcataaa
 19401 taaaaaaaat tagtcagcca tggggcgagg aatggcgagg actggcgagg
 19451 gttaggggcy ggtatgggcy agttagggcy gggactatgy ttgctgacta
 SV40 Promotor
 19501 attgagatgc atgctttgca tactctgccc tgcctggggg cctggggact
 19551 tccacacact ggttctgctc taattgagat geatgcttgy catactctg
 19601 cctgctgggy agcctgggga ctttccacac ctaactgac acacattcca
 19651 cagctagcgc tatatgctgt gatgcaattt ctatgcyac ccgttctcgy
 19701 agcaactgct gaccgcttgy gcccgcgcc agtctcctc cctctcctac
 19751 ttggagccac tatcagctac gcgatcctgy cgaaccacac cgtcctgtgy
 19801 atctaccac tagtcaatto accatctgtt tgagaataaa aagaaaatgc
 SalI/XhoI
 19851 caatgaagta tcggcatttt ctttttctgt ttattagttg actgtcaatc
 BssH II (unique)
 19901 gagcccgtca CCGCGctca gctgggtgty gctgggtgcy gggctggctt
 19951 aactatgcy catcagagca gattgtacty agagtgcacc atatgcygty
 20001 tgaataaccy cacagatgcy taaggagaaa ataccgcatc aggcgcatt
 20051 cgcattccag gctgcgcaac tgttgggag ggcgatcgtt cggcgctct
 20101 tgcctattac gccagctgcy gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag
 20151 ttgggtaacy ccagggtttt cccagtcacy acgttgtaaa acgagcgcca
 (MCS von PUC19) Sal I (unique)
 20201 gtgaattcga gctcggatcc cggggaacct ctagaGTCGA Cctgagcca
 < lac Z (alpha)
 20251 tgaagctg cygtaaatcat ggtCATagct gtttctctgy tgaattgtt
 20301 atccgctcac aattccacac aacatacagc cgggaagcat aaagtgtaaa
 20351 gctggggty ctaaatgagt gagctaactc acattaatgy cgttgcgctc
 20401 actgcccgtc ttccagctcy gaaacctgct gtcgagcty cattaatgaa
 20451 tggccaacy cgcggggaga ggcggttgc gtattgggcy ctctccgct
 20501 tctcctcga ctgactcgt gcgctcgtc gttcggctc ggcgagcgt
 20551 atcagctcac tcaaaggcgy taatagcgtt atccacagaa tcaagggata
 20601 acgcagaaa gaacatgta gcaaaagcc agcaaaagcc caggccacc
 Bsp120 I (not affected by methylation) XhoI/SalI
 20651 caaaGGCCC aatgtggcc cgtaaaaagg cgcggttctc cgaTCGACAG
 (Oligo ABF/R)
 20701 GGCTCTGTA TACGCTATT TTTATAGTT AATGTCATG TAATAATGTT
 20751 TTCTTAGACG TCAGGTGGCA CTTTCCGGG AAATGTCGC GGAACCCCTA
 20801 TTTGTTTATT TTTCTAATA CATTCAATA TGTATCCGCT CATGAGACAA
 Amp(1) start
 20851 TAACCTGAT AAATGCTTCA ATAATATTGA AAAAGGAAGA GTATGAGTAT
 20901 TCAACATTC CGTGTGCCC TTATTCCTT TTTTCCGCA TTTTGCCTTC
 20951 CTGTTTTTGC TCACCCAGAA ACCTGCTGA AAGTAAAAGA TGCTGAAGAT
 21001 CAGTTGGGTG CACGAGTGGT TTACATCGAA CTGGATCTCA ACAGCGGTA
 21051 GATCCTTGAG AGTTTTCCGC CCGAAGAAGC TTTTCCAATG ATGAGCACTT
 21101 TTAAGTTCT GCTATGTGC CCGTATTAT CCGTATTGA CGCCGGGCAA
 21151 GAGCAACTCG GTCGCCGAT ACCTATTCT CAGAATGACT TGGTTGAGTA
 21201 CTCACCAGTC ACAGAAAAGC ATCTTACGGA TGCCATGACA GTAAGAGAT

21251 TATGCAGTGC TGCCATAAC ATGAGTGATA AACTGCGGC CAACTTACTT

21301 CTGACAACGA TCGGAGGACC GAAGGAGCTA ACCGCTTTTT TCACACACAT

21351 GGGGGATCAT GTAACCTGCC TTGATCGTTG GGAACCGGAG CTGAATGAAG

21401 CCATACCCAA CGACGAGCGT GACACCACGA TGCGTGTAGC AATGGCAACA

21451 ACGTTGCGCA AACTATTAACT TGGCGAACTA CTTACTCTAG CTTCCCGCA

21501 ACAATTAATA GACTGGATGG AGGCGGATAA AGTTGCAGGA CCACTTCTGC

21551 GCTCGGCCCT TCCGGCTGGC TGGTTTATTG CTGATAAATC TGGAGCCGGT

21601 GAGCGTGGGT CTCGCGGTAT CATTGCAGCA CTGGGGCCAG ATGGTAAGCC

21651 CTCCCGTATC GTAGTTATCT ACACGACGGG GAGTCAGGCA ACTATGGATG

21701 AACGAAATAG ACAGATCGCT GAGATAGGTG CCTCACTGAT TAAGCATTGG

21751 TAACTGTCTAG ACCAAGTTTA CTCATATATA CTTTAGATTG ATTTAAAAC

21801 TCATTTTFAA TTTAAAAGGA TCTAGGTGAA GATCCTTTTT GATAATCTCA

21851 TGACCAAAAT CCCTTAACGT GAGTTTTCTG TCCACTGAGC GTCAGACCCC

21901 GTAGAAAAGA TCAAAGGATC TTCTTGAGAT CTTTTTTTTC Tggetcaag

21951 aaatggcgaa gggaaatgcta atcatcagaa atgttggcaa gcgtcacaga

22001 atttttctca tcttaaaact ttctgaccag tggattagca tgtcttaag

22051 tggttttgtg aatgattatc gtgctagcga tcatgggtta gttctcgga

22101 ttcaacgcgc taaggataaa gtccaccatc tgttcgcat aaacatcgcc

22151 gtgacgatcg gaaaagcat caatgtgttc gccatccggg attaggatca

22201 accgttttgg ctcttttggc aggcataca acttttctgt gtgtgccat

22251 gggataaact gatcagcttt accgtgaatg agtaaaagcg ggatccggct

22301 gacgtggcg atataatctt cgccgctgta actctcatca agtaagtagc

22351 cactgcccgg gatcatttgg ttggcgatgg ttgcataaga gccaatgtg

22401 gactcgagga toaccgcacg tatgccttca cgatcaccoc gaccaataac

22451 atccagaata ttogcccocg caataactctg ccgaacacag accagaagtt

22501 gtgggtttac atcaactcgca tggcgcaaca cattgatgac **Primer BemR(1) →**
acttttgcgta

22551 tcgtccagca atccggcctg ggaacggcgtg ccttttgatt taccaaaacc

22601 gcgataatca aacataaaaa cgttgaaatt acgctcgggt aaccaactga

22651 ccagcggcca gtggcgccac atatttccgg **← Primer BemF(1)**
cattgcccgtg agcatgaatg
Oligo BBD(1)

22701 atggttgcga tggcgctgtc agcagggccc GTTCTCGACT CCTATCGCG

22751 CGGATCCTCT AGAGGATCCC CGGGTACCGA GCTCGAATTC CGCGGAATTC

22801 CGGTGGGGTT GGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG

22851 TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT

22901 AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG

22951 GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG

23001 TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT

23051 AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG

23101 GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG

23151 TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT

23201 AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG

23251 GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG

23301 TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT

23351 AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG

23401 GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG

23451 TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT

23501 AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG

23551 GTTAGGGTT AGGGTTAGGG TTAGGGTTAG GTTAGGGTT AGGGTTAGGG

23601 TTAGGGTTAG GAATTGGGCC **TATATTACCC GTTATTCCCT AGCGGgccc**
Bsp-120I/NotI

23651 **tcgac**ctgca ggcacgcaag cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc
~~theI/SalI~~

23701 tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa

23751 gcataaaagt taaagcctgg ggtgcctaata gactgageta actcaacata

23801 attgctgtgc gctcaactgc cgttttccag tcgggaaacc tgtgctgcca
lac Z (alpha) fragment nonfunctional portion

23851 gctgcatata tgaactcggc aacgcgcggg gagaggcggg ttgctgattg

23901 ggctctcttc cgttctctgc ctcaactgact cgtgctgctc ggtgcttccg

23951 ctgctggcgg cggtatcagc tcaactcaag gcgtaatac ggttatccac

24001 agaatcaggg gataacgca gaaagaacat gtgagcaaaa gggcagcaaa

24051 **aggccaGGGC** CCGtaaaaag gcgcgcttgc **tcga**TCGACA GGGCCTCGTG
Bsp 120 I (methylated) ~~the I/Sal I~~

24101 ATACGCCAT TTTTATAGT TAATGTCATG ATAATAATGG TTTCTTAGAC

24151 GTCAGGTGC ACTTTCCGG GAAATGTGCG CGGAACCCCT ATTTGTTTAT

24201 TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCGC TCATGAGACA ATAACCCTGA
Amp(2) start

24251 TAAATGCTTC AATAATATTG AAAAAGGAAG AGT**ATG**AGTA TTCAACATTT

24301 CCGTGTGCC CTTATCCCT TTTTTCGGC ATTTTGCCCT CCGTTTTTG

24351 CTCACCCAGA AACGCTGGT AAAGTAAAAG ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT

24401 GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCCGTA AGATCCTTGA

24451 GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTTAAAGTTC

24501 TGCTATGTGG CGCGGTATTA TCCCGTATTG ACGCCGGGCA AGAGCAACTC

24551 GGTCCGCCCA TACACTATTC TCAGAATGAC TTGTTGAGT ACTCACCAGT

24601 CACAGAAAAG CATCTTACGG ATGGCATGAC AGTAAGAGAA TTATGCAGTG

24651 CTGCCATAAC CATGAGTAT AACACTGCGG CCACTTACT TCTGACAACG

24701 ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCCGTTTT TTGCACAACA TGGGGGATCA

24751 TGTAACCTGC CTTGATCGTT GGAACCCGGA GCTGAATGAA GCCATACCAA

24801 ACGACGACCG TGACACCACG ATGCCCTTAG CAATGGCAAC AACGTTGGCG

24851 AAACATTATA CTGGCGAACT ACTTACTCTA GCTTCCCGGC AACAAATAT

24901 AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAG ACCACTTCTG CGCTCGGCC

24951 TTCCGGCTGG CTGTTTTATT GCTGATAAAT CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG

25001 TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGGGGCCA GATGGTAAGC CCTCCCGTAT

25051 CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGC AACTATGGAT GAACGAATA

25101 GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTG GTAACGTGCA

25151 GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT GATTTAAAAC TTCATTTTTA

25201 ATTTAAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCTTTT TGATAATCTC ATGACAAAA

25251 TCCCTTAAAC TGAGTTTTCC TTCCACTGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAA

25301 ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT CTGgctcaag gaaatggcga

25351 agggaaatgct aatcatcaga aatggttgca agcgtcacag aatttttctc

25401 atcttaaaact gttctgacca gtggattagc atgtcttaag tgggttttgt

25451 gaatgattat cgtgctagcg atcatggggt agttctgctg atcaaacgcg

25501 ctaaggataa agtccaccat ctgttcgcga taaacatcgc cgtgacgatc

25551 ggaaaaagca tcaatgtggt cgccatccgg gattaggatc aaccgttttg

25601 gctcttttgc caggctatac aacttttgcg tgtgctgcca tgggataaac

25651 tgatcagctt taccgtgaat gagtaaaagc gggatcgggc tgacgtgctg
portion from the E coli genome (K12)

25701 gatataaatt tcgcccgtgt aactctcatc aagtaagtag ccaactgccg

25751 ggatcatttg gttggcgatg gttgcataag aggcaaatgt ggagctgag

25801 atcaaccgac gtatgccttc acgatcacc cgaccaataa catccagaat

25851 attcgcctcg ccaataactc gcccgcaacg caccagacgt tgtgggttta
Primer BemR(2) →

25901 catcactgcy atggcgcaac acattgatgg cactttgctg atcgctccagc

25951 aatccggcct gggacggcgt gccttttgat ttaccaaacc cgcgataatc

26001 aacataaaa acgttgaat tacgctcggg taaccaactg accagcggcc
← Primer BemF(2)

26051 agtggcgga catatttcc gcattgccgt gacgatgaat gatggttgcg
Oligo BBD(2)

26101 atggcgttgt cagcagGGCC GGTCTCTGAC TCCTAT

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
BAC	künstliches Bakterienchromosom (<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>)
bp	Basenpaare
ca.	circa
cen	Zentromer
Chr.	Chromosom
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalie-Virus
CpG(s)	CpG-Dinukleotid(e)
del	Deletion
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-Triphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	2'-Desoxyribo-Nukleotid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
dTTP	Desoxy-Thymidin-Triphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EBNA-1	Epstein-Barr-Virus Nuclear Antigen 1
E.coli	Escherichia coli
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
F	vorwärts (<i>Forward</i>)
h	Stunde (<i>hour</i>)
hPa	Hekto-Pascal
HAC	Künstliches menschliches Chromosom (<i>Human Artificial Chromosome</i>)
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galactopyranosid
IS1	„Insertion element 1“
kb	Kilobasenpaare (10 ³ bp)
kD	Kilodalton
konz.	konzentriert
kV	Kilovolt

l	Liter
LINE	„Long Interspersed Nucleotide Element“
M	Mol
mA	Milliampere
Mb	Megabasenpaare (10^6 bp)
μ g	Mikrogramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger-RNA</i>)
OD	optische Dichte
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (Katalog Nummer)
Ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
p	kurzer Chromosomenarm
pl	Picoliter
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
q	langer Chromosomenarm
R	rückwärts (<i>Reverse</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
sec	Sekunden (<i>seconds</i>)
STS	<i>sequence-tagged-sites</i>
SSC	<i>Standard Saline Citrate</i>
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
tel	Telomer
U	enzymatische Einheit (<i>Unit</i>)
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
Vol.	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid

7 Literaturverzeichnis

- Abremski K, Hoess R, Sternberg N. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell*. 1983;**32**:1301-11.
- Akgun E. et al. Palindrome resolution and recombination in the mammalian germ line. *Mol Cell Biol*. 1997 Sep;**17**(9):5559-70.
- Alton EW, Geddes DM. Gene therapy for respiratory diseases: potential applications and difficulties. *Thorax*. 1995 May;**50**(5):484-6.
- Altschult SF. et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;**215**(3):403-10.
- Amor DJ, Choo KH. Neocentromeres: role in human disease, evolution, and centromere study. *Am J Hum Genet*. 2002 Oct;**71**(4):695-714.
- Ascenzioni F, Donini P, Lipps HJ. Mammalian artificial chromosomes-vectors for somatic gene therapy. *Cancer Lett*. 1997 Oct 14;**118**(2):135-42.
- Auriche C, Donini P, Ascenzioni F. Molecular and cytological analysis of a 5.5 Mb minichromosome. *EMBO Rep*. 2001 Feb;**2**(2):102-7.
- Baumann CT. et al. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. Multiple protein interactions are required for nuclear retention. *J Biol Chem*. 2001 Apr 6;**276**(14):11237-45.
- Bernards A. et al. Pulsed field gradient electrophoresis of DNA digested in agarose allows the sizing of the large duplication unit of a surface antigen gene in trypanosomes. *Gene*. 1986;**42**(3):313-22.
- Benham F. et al. A method for generating hybrids containing nonselected fragments of human chromosomes. *Genomics*. 1989 May;**4**(4):509-17.
- Birren BW, Hood L, Lai E. Pulsed field gel electrophoresis: studies of DNA migration made with the programmable, autonomously-controlled electrode electrophoresis system. *Electrophoresis*. 1989 May-Jun;**10**(5-6):302-9.
- Bobadilla JL. et al. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*. 2002 Jun;**19**(6):575-606.
- Boucher RC. Status of gene therapy for cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest*. 1999Feb;**103**(4):441-5.
- Broackes-Carter FC. et al. Temporal regulation of CFTR expression during ovine lung development: implications for CF gene therapy. *Hum Mol Genet*. 2002 Jan 15;**11**(2):125-31.
- Brock. *Biology of Microorganisms*. Eight Edition, 1997. Prentice Hall International. New Jersey.
- Brunner S. et al. Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol Ther*. 2002 Jan;**5**(1):80-6.
- Bzymek M, Susan T, Lovett ST. Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms. *PNAS*. 2001 July 17;**98** (15): 8319–8325.
- Cattani S. Klonierung eines genomischen Expressionskonstruktes mit dem cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) – Gen. Diplomarbeit. 2002. Fakultät für Biologie der LMU-München.
- Chan CK, Jans DA. Synergy of importin alpha recognition and DNA binding by the yeast transcriptional activator GAL4. *FEBS Lett*. 1999 Nov 26;**462**(1-2):221-4.

- Chan CK. et al. Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery. *Gene Ther.* 1998 Sep;**5**(9):1204-12.
- Colledge WH. et al. Cystic fibrosis mouse with intestinal obstruction. (Letter) *Lancet* 1992. **340**. 680.
- Courvalin P, Goussard S, Grillot-Courvalin C. Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *C R Acad Sci III.* 1995 Dec;**318**(12):1207-12.
- Cuppens H. et al. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest.* 1998 Jan 15;**101**(2):487-96.
- Csonka E. et al. Novel generation of human satellite DNA-based artificial chromosomes in mammalian cells. *J Cell Sci.* 2000 Sep;**113**(18):3207-16.
- Cockerill PN, Garrard WT. Chromosomal loop anchorage sites appear to be evolutionarily conserved. *FEBS Lett.* 1986 Aug 11;**204**(1):5-7.
- Cooke H. Mammalian artificial chromosomes as vectors: progress and prospects. *Cloning Stem Cells.* 2001;**3**(4):243-9.
- Cremer T. et al. Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2000;**10**(2):179-212.
- Davidson H. et al. Genomic sequence analysis of Fugu rubripes CFTR and flanking genes in a 60 kb region conserving synteny with 800 kb of human chr. 7. *Genome Res.* 2000 Aug;**10**(8):1194-203.
- Dean DA. et al. Sequence Requirements for Plasmid Nuclear Import. *Exp Cell Res.* 1999 Dec 15;**253**(2):713-22.
- Dean DA. Import of Plasmid DNA into the Nucleus is Sequence Specific. *Exp Cell Res.* 1997 Feb 1;**230**(2):293-302.
- Depinet TW. et al. Characterization of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA. *Hum Mol Genet.* 1997 Aug;**6**(8):1195-204.
- Dersch P, Isberg RR. A region of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. *EMBO J.* 1999 Mar 1;**18**(5):1199-213.
- Dorin JR. et al: Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature* 1992. **359**:211-5.
- Duzgunes N, Felgner PL. Intracellular delivery of nucleic acids and transcription factors by cationic liposomes. *Methods Enzymol.* 1993;**221**:303-6.
- Van Driel R. et al. Nuclear domains and the nuclear matrix. *Int Rev Cytol.* 1995;**162**:151-89.
- Ebersole TA, Ross A, Clarke E, McGill N, Schindelbauer D, Cooke H, Grimes B. Mammalian artificial chromosome formation from circular alphoid input DNA does not require telomere repeats. *Hum Mol Genet.* 2000 Jul 1;**9**(11):1623-31.
- EMBO Protocoll: Practical Course „Microinjection and Detection of Probes in Cells“. 2000.
- Fajac I, Grosse S, Collombet JM, Thevenot G, Goussard S, Danel C, Grillot-Courvalin C. Recombinant Escherichia coli as a gene delivery vector into airway epithelial cells. *J Control Release.* 2004 Jun 18;**97**(2):371-81.
- Farr C, Fantes J, Goodfellow P, Cooke H. Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 15;**88**(16):7006-10.

- Farr C, Stevanovic M, Thomson EJ, Goodfellow P, Cooke H. Telomere-associated chromosome fragmentation: applications in genome manipulation and analysis. *Nat Genet.* 1992 Dec;**2**(4):275-82.
- Fasbender A. et al. A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia. *Gene Ther.* 1997 Nov;**4**(11):1173-80.
- Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983 Jul 1;**132**(1):6-13.
- Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature.* 1989 Jan 26;**337**(6205):387-8.
- Ferreira J. et al. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J Cell Biol.* 1997 Dec 29;**139**(7):1597-610.
- Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 1989 Jul 20;**340**(6230):245-6.
- Gasser SM, Laroche T, Falquet J, Boy de la Tour E, Laemmli UK. Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J Mol Biol.* 1986 Apr 20;**188**(4):613-29.
- Gilbert DM. Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science.* 2001 Oct 5;**294**(5540):96-100.
- Giniger E, Varnum SM, Ptashne M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell.* 1985 Apr;**40**(4):767-74.
- Griesenbach U. et al. Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther.* 2002 Oct;**9**(20):1344-50.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell.* 1999 May 14;**97**(4):503-14.
- Grillot-Courvalin C, Goussard S, Huetz F, Ojcius DM, Courvalin P. Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 1998;**16**(9):862-6.
- Grillot-Courvalin C, Goussard S, Courvalin P. Bacteria as gene delivery vectors for mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol.* 1999;**10**(5):477-81.
- Grimes BR, Shindelauer D, McGill N, Ross A, Ebersole TA, Cooke H. Stable gene expression from a mammalian artificial chromosome. *EMBO Rep.* 2001 Oct;**2**(10):910-4.
- Grimes BR, Warburton PE, Farr CJ. Chromosome engineering: prospects for gene therapy. *Gene Ther.* 2002a Jun;**9**(11):713-8.
- Grimes BR, Rhoades AA, Willard HF. Alpha-satellite DNA and vector composition influence rates of human artificial chromosome formation. *Mol Ther.* 2002b Jun;**5**(6):798-805.
- Haaf T, Schmid M. Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. *Exp Cell Res.* 1991 Feb;**192**(2):325-32.
- Hacein-Bey-Abina S, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Int J Hematol.* 2002 Nov;**76**(4):295-8.
- Hacein-Bey-Abina S. et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 2003 Jan 16;**348**(3):255-6.
- Hamm A. et al. Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng.* 2002 Apr;**8**(2):235-45.
- Hanish JP, Yanowitz JL, de Lange T. Stringent sequence requirements for the formation of human telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 13;**91**(19):8861-5.

- Harris A. Towards an ovine model of cystic fibrosis. *Hum. Mol. Genet.* 1997 Dez **6**: 2191-2193.
- Harrington JJ, Van Bokkelen G, Mays RW, Gustashaw K, Willard HF. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat Genet.* 1997 Apr;**15**(4):345-55.
- Hefferon TW. et al. Atypical 5' splice sites cause CFTR exon 9 to be vulnerable to skipping. *Am J Hum Genet.* 2002 Aug;**71**(2):294-303.
- Henning KA. et al. Human artificial chromosomes generated by modification of a yeast artificial chromosome containing both human alpha satellite and single-copy DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 19;**96**(2):592-7.
- Herzog RW, Arruda VR. Update on gene therapy for hereditary hematological disorders. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2003 Jul;**1**(2):215-32.
- Hughes TA, Cook PR. Mimosine arrests the cell cycle after cells enter S-phase. *Exp Cell Res.* 1996 Feb 1;**222**(2):275-80.
- Huxley C. Mammalian artificial chromosomes: a new tool for gene therapy. *Gene Ther.* 1994 Jan;**1**(1):7-12.
- Igo-Kemenes T, Horz W, Zachau HG. Chromatin. *Annu Rev Biochem.* 1982;**51**:89-121.
- Ikeno M, Grimes B, Okazaki T, Nakano M, Saitoh K, Hoshino H, McGill N, Cooke H, Masumoto H. Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nat Biotechnol.* 1998 May;**16**(5):431-9.
- Ioannou PA, Amemiya CT, Ganes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA, de Jong PJ. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet.* 1994 Jan;**6**(1):84-9.
- Isberg RR, Falkow S. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature.* 1985 Sep 19-25;**317**(6034):262-4.
- Isberg RR. Mammalian cell adhesion functions and cellular penetration of enteropathogenic *Yersinia* species. *Mol Microbiol.* 1989 Oct;**3**(10):1449-53.
- Itzhaki JE. et al. Targeted breakage of a human chromosome mediated by cloned human telomeric DNA. *Nat Genet.* 1992 Dez; **2**(4):283-7.
- Jentsch I. Entwicklung neuer molekularzytogenetischer Verfahren für die Tumordiagnostik. 2003. Dissertation. Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Jiang Q, Engelhardt JF. Cellular heterogeneity of CFTR expression and function in the lung: implications for gene therapy of cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet.* 1998 Jan;**6**(1):12-31.
- Joo NS. et al. Absent secretion to vasoactive intestinal peptide in cystic fibrosis airway glands. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;**277**(52):50710-5.
- Karpen GH, Allshire RCS. The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet.* 1997 Dec;**13**(12):489-96.
- Kasamatsu H, Nakanishi A. How do animal DNA viruses get to the nucleus? *Annu. Rev. Microbiol.* 1998. **52**:627-86.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science.* 1989 Sep 8;**245**(4922):1073-80.

- Kereso J. et al. De novo chromosome formation by large-scale amplification of the centromeric region of mouse chromosomes. *Chromosome Res.* 1996 Apr;**4**(3):226-39.
- Klink D, Schindelbauer D, Laner A, Tucker T, Bebok Z, Schwiebert EM, Boyd CA, Scholte BJ. Gene delivery systems-gene therapy vectors for cystic fibrosis. *J. of Cystic Fibrosis.* 2004.Aug **3**(2):203-12.
- Knoch T. Das MLP Model. (Poster) Transregio 5 Symposium: Chromatin – Assembly and Inheritance of Functional States. 2003 Oct, Genzentrum LMU-München.
- Kouprina N. Cloning of human centromeres by transformation-associated recombination in yeast and generation of functional human artificial chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 2003 Feb 1;**31**(3):922-34.
- Krude T. Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp Cell Res.* 1999 Feb 25;**247**(1):148-59.
- Krysan PJ, Smith JG, Calos MP. Autonomous replication in human cells of multimers of specific human and bacterial DNA sequences. *Mol Cell Biol.* 1993 May;**13**(5):2688-96.
- Kurz A. et al. Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J Cell Biol.* 1996 Dec;**135**(5):1195-205.
- Larson JE. et al. CFTR modulates lung secretory cell proliferation and differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000a Aug;**279**(2):L333-41.
- Larson JE. et al. Gene transfer into the fetal primate: evidence for the secretion of transgene product. *Mol Ther.* 2000b Dec;**2**(6):631-9.
- Leach D, Lindsay J, Okely E. Genome interactions which influence DNA palindrome mediated instability and inviability in Escherichia coli. *J Cell Sci Suppl.* 1987;**7**:33-40.
- Lee C. et al. Human centromeric DNAs. *Hum Genet.* 1997 Sep;**100**(3-4):291-304.
- Lewis M. Human artificial chromosomes: emerging from concept to reality in biomedicine. *Clin Genet.* 2001 Jan;**59**(1):15-16.
- Lipps HJ, Bode J. Exploiting chromosomal and viral strategies: the design of safe and efficient non-viral gene transfer systems. *Curr Opin Mol Ther.* 2001 Apr;**3**(2):133-41.
- Lipps HJ. et al. Chromosome-based vectors for gene therapy. *Gene.* 2003 Jan 30;**304**:23-33.
- Marshall E. Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science.* 2003 Jan 17;**299**(5605):320.
- Maruvada P. et al. Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem.* 2003 Apr 4;**278**(14):12425-32.
- Masumoto H, Ikeno M, Nakano M, Okazaki T, Grimes B, Cooke H, Suzuki M. Assay of centromere function using a human artificial chromosome. *Chromosoma.* 1998 Dec;**107**(6-7):406-16.
- Mejia JE. et al. Functional complementation of a genetic deficiency with human artificial chromosomes. *Am J Hum Genet.* 2001 Aug;**69**(2):315-26.
- Mejia JE. et al. Efficiency of de novo centromere formation in human artificial chromosomes. *Genomics.* 2002 Mar;**79**(3):297-304.
- Mesika A. et al. A regulated, NFkappaB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Mol Ther.* 2001 May;**3**(5 Pt 1):653-7.

- Minaschek G, Bereiter-Hahn J, Bertholdt G. Quantitation of the volume of liquid injected into cells by means of pressure. *Exp Cell Res*. 1989 Aug;**183**(2):434-42.
- Mirkovitch J, Gasser SM, Laemmli UK. Relation of chromosome structure and gene expression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1987 Dec 15;**317**(1187):563-74.
- Munkel C. et al. Compartmentalization of interphase chromosomes observed in simulation and experiment. *J Mol Biol*. 1999 Jan;**285**(3):1053-65.
- Murray AW, Szostak JW. Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature*. 1983 Sep 15-21;305(5931):189-93.
- Narayanan K, Warburton PE. DNA modification and functional delivery into human cells using *Escherichia coli* DH10B. *Nucleic Acids Res*. 2003 May 1;**31**(9):e51.
- Niksic M. et al. Functional analysis of cis-acting elements regulating the alternative splicing of human CFTR exon 9. *Hum Mol Genet*. 1999 Dec;**8**(13):2339-49.
- Ohzeki J. et al. CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA. *J Cell Biol*. 2002 Dec 9;**159**(5):765-75.
- Olson MV. Separation of large DNA molecules by pulsed-field gel electrophoresis. A review of the basic phenomenology. *J Chromatogr*. 1989 May 26;**470**(2):377-83.
- Pagani F. et al. Promoter architecture modulates CFTR exon 9 skipping. *J Biol Chem*. 2003 Jan 17;**278**(3):1511-7.
- Paul AL, Ferl RJ. Higher-order chromatin structure: looping long molecules. *Plant Mol Biol*. 1999 Dec;**41**(6):713-20.
- Pollard H. et al. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1998 Mar 27;**273**(13):7507-11.
- Porcellini A, De Blasi A. Viral infection protocols. *Methods Mol Biol*. 2004;**259**:155-66.
- Qasim W, Gaspar HB, Thrasher AJ. Gene therapy for severe combined immune deficiency. *Expert Rev Mol Med*. 2004 Jul 02;2004:1-15.
- Raper SE. et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 2003;**80**(1-2):148-58.
- Razin SV. Functional architecture of chromosomal DNA domains. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1996;**6**(2-3):247-69.
- Riordan JR. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989 Sep 8;**245**(4922):1066-73. Erratum in: *Science* 1989 Sep 29;**245**(4925):1437.
- Robinett CC. et al. In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *J Cell Biol*. 1996 Dec;**135**(6 Pt 2):1685-700.
- Rozmahel R. et al. Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nat Genet*. 1996 Mar;**12**(3):280-7.
- Rudd MK. et al. Human artificial chromosomes with alpha satellite-based de novo centromeres show increased frequency of nondisjunction and anaphase lag. *Mol Cell Biol*. 2003 Nov;**23**(21):7689-97.
- Saffery R. et al. Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of >20 functionally important kinetochore-associated proteins. *Hum Mol Genet*. 2000 Jan 22;**9**(2):175-85.

- Saffery R. et al. Construction of neocentromere-based human minichromosomes by telomere-associated chromosomal truncation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 8;**98**(10):5705-10.
- Saffery R, Choo KH. Strategies for engineering human chromosomes with therapeutic potential. *J Gene Med*. 2002 Jan-Feb;**4**(1):5-13.
- Saiki RK. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988 Jan 29;**239**(4839):487-91.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 1989. *Cold Spring Harbour Laboratory*, New York.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*. 1992;**24**:104-8.
- Schaarschmidt D. et al. An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *EMBO J*. 2004 Jan 14;**23**(1):191-201.
- Schell J, Van Montagu M. Transfer, maintenance, and expression of bacterial Ti-plasmid DNA in plant cells transformed with *A. tumefaciens*. *Brookhaven Symp Biol*. 1977 May 12-20;(29):36-49.
- Schindelhauer D, Cooke HJ. Efficient combination of large DNA in vitro: in gel site specific recombination (IGSSR) of PAC fragments containing alpha satellite DNA and the human HPRT-Gene locus. *Nucleic Acids Res*. 1997 Jun 1;**25**(11):2241-3.
- Schindelhauer D. Construction of mammalian artificial chromosomes: prospects for defining an optimal centromere. *Bioessays*. 1999 Jan;**21**(1):76-83.
- Schindelhauer D, Laner A. Visible transient expression of EGFP requires intranuclear injection of large copy numbers. *Gene Ther*. 2002 Jun;**9**(11):727-30.
- Schindelhauer D, Schwarz T. Evidence for a fast, intrachromosomal conversion mechanism from mapping of nucleotide variants within a homogeneous alpha-satellite DNA array. *Genome Res*. 2002 Dec;**12**(12):1815-26.
- Schneider D. et al. Genomic comparisons among *Escherichia coli* strains B, K-12, and O157:H7 using IS elements as molecular markers. *BMC Microbiol*. 2002 Jul 9;**2**(1):18.
- Schueler MG. et al. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science*. 2001 Oct 5;**294**(5540):109-15.
- Schuffenhauer S. et al. Interstitial deletion 5p accompanied by dicentric ring formation of the deleted segment resulting in trisomy 5p13-cen. *Am J Med Genet*. 1996 Oct 2;**65**(1):56-9.
- Smith CL, Cantor CR. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Large DNA Molecules. *Nature* 1986 Jan 30;**319**:701-701.
- Smith CL. et al. A Physical Map of the *E. coli* K12 Genome. *Science* 1987 Jun 12;**236**:1448-53.
- Smith DJ. et al. Multiple potential intragenic regulatory elements in the CFTR gene. *Genomics*. 2000 Feb 15; **64**(1):90-6.
- Snell RG, Wilkins RJ. Separation of chromosomal DNA molecules from *C. albicans* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. 1986 Jun 11;**14**(11):4401-6.
- Snouwaert JN. et al. An animal model for CF made by gene targeting. *Science* 1992. **257**:1083-88.
- Stansel RM, de Lange T, Griffith JD. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J*. 2001 Oct 1;**20**(19):5532-40.

- Sternberg N. In vitro packaging of a lambda Dam vector containing EcoRI DNA fragments of Escherichia coli and phage P1. *Gene*. 1977 May;**1**(3-4):255-80.
- Tourriere H, Chebli K, Tazi J. mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie*. 2002 Aug;**84**(8):821-37.
- Tyler-Smith C, Willard H. Mammalian chromosome structure. *Curr Opin Genet Dev*. 1993 Jun;**3**(3):390-7.
- Vos JM. Therapeutic mammalian artificial episomal chromosomes. *Curr Opin Mol Ther*. 1999 Apr;**1**(2):204-15.
- Warburton PE, Willard HF. Genomic analysis of sequence variation in tandemly repeated DNA. Evidence for localized homogeneous sequence domains within arrays of alpha-satellite DNA. *J Mol Biol*. 1990 Nov 5;**216**(1):3-16.
- Warburton PE. et al. Molecular cytogenetic analysis of eight inversion duplications of human chromosome 13q that each contain a neocentromere. *Am J Hum Genet*. 2000a Jun;**66**(6):1794-806.
- Warburton PE. et al. Detection of submicroscopic subtelomeric chromosome translocations: a new case study. *Am J Med Genet*. 2000b Mar 6;**91**(1):51-5.
- Waye JS, England SB, Willard HF. Genomic organization of α satellite DNA on human chromosome 7: evidence for two distinct alphoid domains on a single chromosome. *Mol Cell Biol*. 1987 Jan;**7**(1):349-56.
- Weber PC, Palchaudhuri S. An inverted repeat sequence of the IncFI plasmid ColV2-K94 increases multimerization-mediated plasmid instability. *J Gen Microbiol*. 1986 Apr;**132**(Pt 4):989-95.
- Wiesenhofer B, Humpel C. Lipid-mediated gene transfer into primary neurons using FuGene: comparison to C6 glioma cells and primary glia. *Exp Neurol*. 2000 Jul;**164**(1):38-44.
- Willard HF, Carrel L. Making sense (and antisense) of the X inactivation center. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;**98**(18):10025-7.
- Williams SH. et al. Evaluation of gene targeting by homologous recombination in ovine somatic cells. *Mol Reprod Dev*. 2003 Oct;**66**(2):115-25.
- Wine JJ. Rules of conduct for the cystic fibrosis anion channel. *Nat Med*. 2003 Jul;**9**(7):827-8.
- Zabner J. et al. Adenoviral-mediated gene transfer to fetal pulmonary epithelia in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 1995 Jun;**95**(6):2620-32.
- Zabner J. Cationic lipids used in gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997 Aug 11;**27**(1):17-28.
- Zaric V. et al. Effective polyethylenimine-mediated gene transfer into human endothelial cells. *J Gene Med*. 2004 Feb;**6**(2):176-84.
- Zhu XG. et al. The differential hormone-dependent transcriptional activation of thyroid hormone receptor isoforms is mediated by interplay of their domains. *J Biol Chem*. 1997 Apr 4;**272**(14):9048-54.
- Zink D. et al. Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Hum Genet*. 1998 Feb;**102**(2):241-51.
- Zirbel RM. et al. Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Res*. 1993 Jul;**1**(2):93-106.
- Zohar M, Mesika A, Reich Z. Analysis of genetic control elements in eukaryotes: transcriptional activity or nuclear hitchhiking? *Bioessays*. 2001 Dec;**23**(12):1176-9.

8 Publikationen

Schindelhauer D, Laner A. Visible transient expression of EGFP requires intranuclear injection of large copy numbers. *Gene Ther.* 2002. **9**:727-730.

Laner A, Schwarz T, Christan S, Schindelhauer D. Suitability of a CMV/EGFP-cassette to monitor stable expression from human artificial chromosomes but not transient transfer in the cells forming viable clones. *Cytogenet Genome Res.* 2004. **107**(1-2):9-13.

Klink D, Schindelhauer D, Laner A, Tucker T, Bebok Z, Schwiebert EM, Boyd CA, Scholte BJ. Gene delivery systems-gene therapy vectors for cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2004.Aug **3**(2):203-12.

Laner A, Goussard S, Ramalho AS, Schwarz T, Amaral MD, Courvalin P, Schindelhauer D, Grillo-Courvalin C. Bacterial transfer of large functional genomic DNA into human cells. *Gene Ther.* 2005 Jun 23; [Epub ahead of print].

Schindelhauer D, Christan S, Cattani S, Laner A, Ramalho A, Marques B, Penque D, Beck S, Amaral M. An engineered genomic CFTR construct is expressed and correctly spliced in the human lung sarcoma cell line HT1080. *submitted.*

Vorträge:

Laner, A., Ramalho, A., Cattani, S., Christan, S., Marques, B., Beck, S., Penque, D., Amaral, M., Schindelhauer, D. "PAC based engineering and expression of a genomic CFTR-GFP fusion gene". 25th European Cystic Fibrosis Conference, Workshop on Gene Therapy Update, Juni 2002, Genoa, Italien, *Journal of Cystic Fibrosis* **1(Suppl. 1)**: S42.

Laner, A., Ramalho, A., Cattani, S., Christan, S., Marques, B., Beck, S., Penque, D., Amaral, M., Schindelhauer, D. " An engineered genomic CFTR construct is expressed and correctly spliced in the human lung sarcoma cell line HT1080", April 2003, 4th Consensus Meeting of the Cystic Fibrosis Network, Cascais, Portugal

Laner, A., Cattani, S., Goussard, S., Grillot-Courvalin, C., Schindelhauer, D. "Bacterial Transfer of Human Artificial Chromosomes expressing CFTR". Mai 2003, Vortrag. 4^e Colloque des Jeunes Chercheurs de la Mucoviszidose, Paris, Frankreich

Poster:

Laner, A., Schindelhauer, D. (2001 Mai 15-19) "Visible transient expression of green fluorescent protein requires intranuclear microinjection of large copy numbers of pEGFP plasmid". 10th International Congress of Human Genetics, Vienna (Vienna Medical Academy). *Eur. J. Hum. Genet.* **9 (Suppl. 1):** 254.

Laner, A., Ramalho, A., Cattani, S., Christan, S., Marques, B., Beck, S., Penque, D., Amaral, M., Schindelhauer, D. (2002 Mai 25-29) "PAC based engineering and expression of a genomic CFTR-GFP fusion gene". European Human Genetics Conference 2002, Strasbourg, *Eur. J. Hum. Genet.* **10 (Suppl. 1):** 300.

Schindelhauer, D., Laner, A., Christan, S., Cattani, S., Ramalho, A., Marques, B., Beck, S., Penque, D., Amaral, M. (2002 Mai 25-29) "An engineered genomic CFTR-GFP fusion gene is expressed and correctly spliced on human artificial chromosomes". European Human Genetics Conference 2002, Strasbourg. *Eur. J. Hum. Genet.* **10 (Suppl. 1):** 301.

Laner A., Schwarz T., Christan S., Schindelhauer D. „Human artificial chromosome expression marker: One can't have both, early detection and stable transfer" European Human Genetics Conference 2004, Juni 2004, München. *Eur. J. Hum. Genet.* **10 (Suppl. 1):** 301.

9 Lebenslauf

Geburtsdatum:

12. Oktober 1971, München, Deutschland

Familienstand:

ledig, eine Tochter

Schulbildung:**1993**

Abitur, Adolf-Weber-Gymnasium, München

1993-1994

Zivildienst (Krankenhaus München Schwabing, Pathologie)

Studium:**1994-2000**

Studium der Biologie: Ludwig-Maximilians Universität, München;
Nebenfächer: Biochemie, Pharmakologie, Molekulare Zellbiologie.
Hauptfach: Mikrobiologie

2000

Diplomarbeit: Institut für Mikrobiologie und Genetik, Ludwig-Maximilians Universität, München, Prof. Dr. Volker Müller (Dr. Sascha Aufurth, Betreuer): "*Cloning of copA and overexpression of the corresponding corrinoid-binding protein from Acetobacter woodii*"

2000-2003

Doktorand in der Abteilung Medizinische Genetik, Kinderpoliklinik, Ludwig-Maximilians Universität, München, Labor für künstliche Chromosomen (Betreuer: Dr. Dirk Schindelhauer, Lehrstuhl Biotechnologie der Tiere, WCW Weihenstephan, Technische Universität, München)

Anstellung:**Februar 2004**

Post-Doc Stelle, Medizinisch Genetisches Zentrum (MGZ) München

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Dr Dirk Schindelhauer für die Bereitstellung des Themas sowie vor allem für die wunderbare Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Meinen Dank möchte ich ihm ausserdem für die stetige Unterstützung (auch in schwierigen Zeiten) sowie die exzellente Betreuung bei der Durchführung der Experimente aussprechen.

Prof. Thomas Cremer möchte ich für die Übernahme der offiziellen Betreuung meiner Arbeit mit allen damit verbundenen Aufgaben sowie für die vorbehaltlose und herzliche „Adoption“ in seine Arbeitsgruppe danken.

Mein besonderer Dank gilt ausserdem allen Wissenschaftlern die diese Arbeit durch Bereitstellung von Material und Wissen ermöglichten: Dr. Catherine Grillot-Courvalin, Sylvie Goussard, Dr. Carsten Rudolph, PD Dr. Joseph Rosenecker, PD Dr. Michael Speicher, Dr. Isabell Jentsch, Prof. Margarida Amaral, Dr. Deborah Penque, Dr. Anabela Ramalho, Dr. Steffen Dietzel, Dipl. Biol. Sonja Cattani, Tobias Schwarz, Susie Christan, Dr. Christoph Klein, Dr. Konstanze Hörtnagel, Prof. Dieter Grunert und Dr. Brenda Grimes.

Danken möchte ich auch der gesamten AG Meindl (Alfons, Juliane, Heide, Steffi, Claus, Marco und Celia) und dem restlichen Goethestr.-Team (Moni, Brigitte, AG Zink) für die grossartige Unterstützung, das fruchtbare Arbeitsklima sowie für die grosszügige Aufnahme in ihren Räumen und Schutz vor übereifrigen Behörden.

Meinen Eltern, ohne deren grossartige Unterstützung Studium und Promotion niemals möglich gewesen wären, gebührt besonderer Dank.

Meiner kleinen Familie, Dani und Chiara, danke ich für die grossartige moralische Unterstützung sowie das grenzenlose Verständnis, wenn es mal wieder „etwas“ später wurde.