

***In vivo* Genkorrektur mittels modifizierter
mRNA-Nukleasen am murinen Modell der
Surfactant Protein-B Defizienz**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Marc Alexander Dewerth
aus Karlsruhe

Tübingen
2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

30. Oktober 2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Jun.-Prof. Dr. Michael Kormann

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dominik Hartl

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. Joachim Müller-Quernheim

Es heißt, der größte Fehler ist es aufzugeben und dass wahre Stärke darin liegt, es weiter zu versuchen.

Wenn man darauf vertraut, dass alles gut wird, und man sich daran erinnert, was man alles geschafft hat, so hat man den richtigen Blick auf die Dinge und hört nicht auf zu kämpfen. Denn zu guter Letzt bleibt einem nur die Gewissheit, dass man sein Möglichstes getan hat und dass man es morgen wieder versuchen kann.

[Zitat aus „*Being Erica*“]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	IV
Abstract	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Physio- und Pathophysiologische Aspekte des <i>Surfactant</i>	1
1.1.1 <i>Surfactant</i>	1
1.1.2 <i>Surfactant</i> Protein B	3
1.1.3 Hereditäre SP-B Defizienz	4
1.2 Gentherapie	7
1.2.1 Prinzipielle Aspekte der Gentherapie	7
1.2.2 Zink-Finger Nukleasen	10
1.2.3 TALE Nukleasen	12
1.3 Vektorsysteme	14
1.3.1 Adeno-assoziierte Viren (AAV)	14
1.3.2 Nanopartikel	15
1.3.3 <i>In vitro</i> transkribierte (IVT) mRNA	16
1.4 Prinzip der IVT mRNA-vermittelten Genkorrektur	20
1.5 Zielsetzung	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Reagenzien & Chemikalien	23
2.1.2 Lösungen & Puffer	24
2.1.3 Hergestellte Lösungen und Puffer	25
2.1.4 Kits	25
2.1.5 Enzyme	25
2.1.6 Antikörper	26
2.1.7 Modifizierte Nukleotide	26
2.1.8 ELISAs	26
2.1.9 Zelllinien	26
2.1.10 Versuchstiere	26
2.1.11 Plasmide & AAVs	27
2.1.12 Primer	27
2.1.13 Verbrauchsmaterialien	28
2.1.14 Geräte	29
2.1.15 Software	30

2.2	Methoden	31
2.2.1	Plasmid-Präparation	31
2.2.1.1	Kultivierung	31
2.2.1.2	Plasmid-Isolation	32
2.2.1.3	Plasmid-Aufreinigung	34
2.2.1.4	Linearisierung von Plasmiden	35
2.2.1.5	Klonierung	37
2.2.1.6	Transformation	39
2.2.2	Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration	40
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.4	Synthese von ZFNs und TALENs	42
2.2.5	<i>Dual Luciferase Single Strand Assay</i> (DLSSA)	44
2.2.6	Reparatur <i>Templates</i>	46
2.2.7	IVT mRNA-Synthese	46
2.2.8	Zellkultur und Transfektionen	49
2.2.8.1	Zelllinien	49
2.2.8.2	Subkultivierung	50
2.2.8.3	Bestimmung der Zellzahl	51
2.2.8.4	Transfektion	52
2.2.8.5	Transduktion	52
2.2.9	Isolation genomischer DNA	53
2.2.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	54
2.2.11	T7-Endonuklease I Assay	56
2.2.12	Durchflusszytometrie	58
2.2.13	Nanopartikel	62
2.2.14	AAV-Vektor Produktion	62
2.2.15	Tierexperimente	63
2.2.15.1	Versuchstiere und Haltung	63
2.2.15.2	Intratracheale Applikation	64
2.2.15.3	Behandlung	65
2.2.15.4	Tötung und Organentnahme	66
2.2.15.5	Bronchoalveoläre Lavage	66
2.2.15.6	<i>Compliance</i> der Atemwege	67
2.2.15.7	Messung des Atemwiderstand	68
2.2.16	Cytospin	69
2.2.17	Histopathologie	71
2.2.17.1	Immunzytochemische Färbung	72
2.2.17.2	Immunfluoreszenz	73
2.2.18	Western Blot	74
2.2.19	ELISA	76
2.2.19.1	Interferon (IFN)- α	77
2.2.19.2	Interleukin (IL)-12	78

2.2.20	Sequenzierung der Zielsequenz	79
2.2.21	RNA-Isolation aus Gewebe	80
2.2.22	Reverse Transkriptase- (RT-) PCR.....	81
2.2.23	Quantitative Real-Time PCR.....	82
2.2.24	Korrelative Mikroskopie	84
2.2.25	Statistiken.....	86
2.2.25.1	Paarweise fixierter Reallokations – Randomisations – Test.....	86
2.2.25.2	Wilcoxon-Mann-Whitney – Test.....	87
2.2.25.3	Varianzanalyse - ANOVA.....	87
3.	Ergebnisse	88
3.1	Selektion der ZFNs und TALENs.....	88
3.2	Vergleich zwischen modifizierter IVT mRNA und pDNA.....	90
3.3	Optimierung der Z3 mRNA Expression	92
3.4	<i>In vivo</i> Immunreaktion auf Z3 mRNA	97
3.5	<i>In vivo</i> Genkorrektur der SP-B Defizienz.....	99
3.5.1	Gentherapeutischer Ansatz	99
3.5.2	Transgene Donor-Integration <i>ex vivo</i>	100
3.5.3	Gentherapeutische Manipulation SP-B defizienter Mäuse	102
3.5.4	Nachweis der SP-B Protein-Expression	103
3.5.5	Messung der <i>Compliance</i> und des Atemwiderstands.....	105
3.5.6	Immunologische Untersuchungen	110
3.5.7	Nachweis der Homologen Rekombination	112
3.5.8	Expression der Z3-Nukleasen im Lungengewebe	114
4.	Diskussion	117
4.1	Evaluierung von ZFNs und TALENs	117
4.2	mRNA- versus pDNA-kodierende Nukleasen	119
4.3	Modifizierte mRNA und dessen Vorteile	122
4.4	Nuklease-vermittelte Homologe Rekombination <i>in vivo</i>	126
4.5	Evaluierung des gentherapeutischen Sicherheitsprofils	132
4.6	Grenzen des SP-B Tiermodells	134
4.7	Aussicht.....	137
5.	Anhang.....	139
5.1	Abbildungen.....	139
5.2	Sequenzen – SP-B Kasette, mRNA- <i>Templates</i> und AAVs	145
	Referenzen	165
	Danksagung.....	178
	Publikationen.....	179
	Curriculum Vitae.....	180

Zusammenfassung

Zink-Finger- bzw. *transcription activator-like effector*-Nukleasen (ZFNs/TALENs) sind vielversprechende Werkzeuge im Zuge der Reparatur genomischer Mutationen, indem diese den Mechanismus der Homologen Rekombination begünstigen. In Studien zur Hämophilie konnte bereits eine Nukleasevermittelte Genkorrektur unter Verwendung von AAV-Vektoren demonstriert werden. Dabei kodierten diese sowohl für die Doppelstrangbruch- (DSB) induzierenden ZFN-Nukleasen, als auch den Einbau des Reparatur-*Templates* durch den Reparaturmechanismus der Homologen Rekombination (HDR, engl. *homology-directed repair*). Während der Einsatz von stabil exprimierenden AAV-Vektoren zwar als sicher angesehen werden kann, ist eine transiente Expression von Nukleasen ausreichend, um genomische Modifikationen zu erzeugen. Demzufolge wäre die zeitlich begrenzte Expression von ZFNs ein entscheidender Vorteil, um potentielle Nuklease-bedingte Nebeneffekte zu reduzieren. In den letzten Jahren hat sich als Alternative zu traditionellen, viralen gentherapeutischen Vektoren, modifizierte *messenger RNA* (mRNA) als vielversprechend herausgestellt. Dessen Vorteile liegen sowohl in einer transienten Proteinexpression, bei gleichzeitiger Vermeidung genomischer Integration, als auch in dessen chemischen Modifizierungen, die eine stabile Expression und das Ausbleiben von Immunantworten begünstigen. Eine solche Co-Transfektion mRNA-kodierender Nukleasen in einem gentherapeutischen Kontext macht mRNA daher zu einem idealen Vehikel. In dieser Studie wurden solche optimierten mRNA-kodierenden Nukleasen verwendet, um die erfolgreiche Genkorrektur am murinen Modell der SP-B Defizienz zu demonstrieren.

Für die Genkorrektur des SP-B Locus wurde zunächst ein Panel aus *in silico* generierten ZFNs und TALENs hergestellt. Der *dual-luciferase single-strand* Assay sowie der T7-Endonuklease I -Assay verifizierten für TALEN-1 (T1) und ZFN-3 (Z3) eine hohe Schnitt-Effizienz *ex vivo*, wodurch bis zu 39 % der Allele durch das nicht-homologe *end-joining* (NHEJ) repariert wurden. Im Gegensatz zu Plasmid-DNA (pDNA) stieg dabei die Induktion an DSBs signifikant an ($P < 0,05$). Die Kombination mit einem Reparatur-*Template*, welches eine NheI-Restriktionsschnittstelle in den SP-B Locus einfügte, konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg in der HDR für mRNA verzeichnet werden ($P < 0,05$). Da Z3 effizienter in der DSB-Induktion sowie der HDR war, wurde diese für alle folgenden Experimente verwendet. Zur Optimierung der Z3-Expression *in vivo* wurden zwei Modifikationen ($\Psi_{(1.0)}/m5C_{(1.0)}$ und $s2U_{(0.25)}/m5C_{(0.25)}$) mit und ohne Komplexierung in mit Chitosan-beschichteten poly(D,L-Laktid-Co-Glycolid) Nanopartikeln (NPs) getestet. Dabei ergaben sich für markierte $s2U_{(0.25)}/m5C_{(0.25)}$ Z3 mRNA (im Weiteren als Z3 nec-mRNA bezeichnet) mit NPs die höchsten Expressionslevel- nach intratrachealer (i.t.) Applikation in die Lunge. Über einen IFN- α ELISA wurde zusätzlich ein signifikanter immunstimulatorischer Effekt der Z3 nec-mRNA ausgeschlossen. Die sequenzspezifische HDR wurde anschließend *ex vivo* über die Co-Applikation eines CAG-Promoter enthaltenden AAV- Donor-*Templates* (AAV6-Donor) zusammen mit AAV-kodierender Z3 (Z3 AAV) oder Z3 nec-mRNA erfolgreich getestet. Diese gentherapeutische Manipulation zeigte sich ebenfalls in Gen-korrigierten, transgenen SP-B Mäusen mit signifikant höheren Überlebensraten als die der Mock-behandelten Gruppen ($P < 0,001$). Korrigierte SP-B Mäuse zeigten dabei eine normale Lungenfunktion im Vergleich zu Positivkontrollen. Ebenfalls wurde im Vergleich zu PBS-behandelten Mäusen kein signifikanter Anstieg in der IL-12 Produktion beobachtet. Sequenzspezifische DSB-Induktion sowie HDR bestätigten die Ausprägung eines normalen Phänotyps, wobei zwischen Z3 AAV und Z3 nec-mRNA keine Unterschiede zu erkennen waren. Die immunhistochemischen Analysen bestätigten zusätzlich die zeitlich limitierte Expression der Z3 nec-mRNA im Vergleich zu Z3 AAV.

Die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigen eindrucksvoll, dass die Applikation von nec-mRNA in Kombination eines AAV-Donors zur erfolgreichen Genkorrektur des transgenen SP-B Locus führt und somit die konstitutive SP-B Expression sowie eine normale Lungenfunktion nach Absetzen von Doxycyclin erlaubt. Verglichen mit AAV, zeigte Z3 nec-mRNA eine zeitlich limitierte Nuklease-Expression, wodurch mögliche Nebeneffekte im Gegensatz zu dauerhaft aktiven AAV-Nukleasen reduziert werden können. Zusätzlich macht die Abwesenheit einer Immunantwort nec-mRNA zu einem idealen Vehikel für mehrmalige Applikationen hinsichtlich einer dauerhaften Genkorrektur der Lunge. Zusammengefasst besitzt nec-mRNA damit ein enormes Potential im Zuge klinisch relevanter, gentherapeutischer Strategien für die Behandlung erblich-bedingter Lungenerkrankungen sowie weiterer monogenetischer Defekte.

Abstract

Zinc-finger or transcription activator-like effector nucleases (ZFNs/TALENs) facilitate homologous recombination and represent a promising approach for repairing genomic mutations. Recently, an *in vivo* model of haemophilia was used to demonstrate nuclease-guided genome editing by using AAV vectors to encode for both the ZFN pair initiating the double strand break (DSB), as well as the donor template that facilitate homology-directed repair (HDR). While the use of stably expressing AAV vectors is documented to be safe, transient expression of the nuclease is sufficient for stable modification of the genome, making advanced, short-term ZFN expression strategies an advantageous approach. In recent years, modified messenger RNA (mRNA) has been pioneered, owing the potential as an alternative to traditional viral gene therapy vectors. While modified mRNA has been shown to provide a short half-life pulse of protein expression, it avoids also genomic integration. In addition, modification schemes can customize the stability of expression from these vectors and avoid immune activation even in mammals. Therefore, coupling nonviral delivery of nucleases with transient expression of mRNAs *in vivo* qualifies mRNA as an ideal delivery vehicle for genome editing nucleases. Here we utilize such optimized mRNA to deliver site-specific nuclease pairs to the lungs, to facilitate targeted gene correction in a mouse model of SP-B deficiency.

To prove gene correction in the lungs, a panel of *in silico* designed ZFNs and TALENs was customized. Proxy dual-luciferase single-strand assay and T7-Endonuclease I-Assay confirmed TALEN-1 (T1) and ZFN-3 (Z3) to exhibit substantial cleavage efficiency, reaching up to 39 % of alleles repaired by non-homologous end-joining (NHEJ) *ex vivo*. Further analysis revealed also a significant increase in DSB-induction when encoded by mRNA versus Plasmid-DNA (pDNA, $P < 0.05$). In combination with a repair template designed to insert a novel NheI restriction enzyme site, T1 and Z3 also showed a significant increase in the efficiency of HDR compared to pDNA-encoded nucleases ($P < 0.05$). As Z3 was more efficient than T1 in both DSB-induction and HDR, Z3 nuclease was used for further experimentation. To optimize Z3 expression in an *in vivo* setting, two mRNA modification schemes ($\Psi_{(1.0)}/m5C_{(1.0)}$ and $s2U_{(0.25)}/m5C_{(0.25)}$) were tested. Lung expression analysis following intratracheal (i.t.) administration of tagged Z3 mRNA, with or without complexation with Chitosan-coated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles (NPs), showed that $s2U_{(0.25)}/m5C_{(0.25)}$ Z3 mRNA (referred to as Z3 nec-mRNA) complexed to NPs yielded the highest expression levels in both total lung cells and AT-II cells. Immunogenicity was monitored by IFN- α ELISA revealing no significant stimulation. Next, site-specific HDR using an AAV-encoded donor template (AAV6-donor), containing a constitutive CAG promoter, was efficiently transduced either with Z3-encoding AAV (Z3 AAV) or with Z3 nec-mRNA in primary fibroblasts. Therapeutic, genomic manipulation was also achieved in transgenic SP-B mice after delivery of donor and Z3 AAV or Z3 nec-mRNA, respectively, resulting in a significant prolonged survival compared to mock treated groups after doxycyclin removal ($P < 0.001$). Normal lung function was maintained in gene corrected mice with SP-B levels similar to that of positive controls with no apparent pathology. Compared to PBS-treated mice, ELISA for IL-12 expression revealed also no significant increase. Site-specific cleavage and HDR confirmed these phenotypic improvements, reaching similar HDR-levels in both Z3 AAV and Z3 nec-mRNA treated groups. Immunohistochemistry confirmed no expression of Z3 nec-mRNA after 20 days of treatment, whereas Z3 AAV was still detectable.

The results confirm that gene targeting using nec-mRNA combined with an AAV-donor results in successful *in vivo* genetic engineering of the transgenic SP-B locus, allowing constitutive expression of SP-B, improved lung function, and prolonged survival in the absence of doxycyclin. Compared to AAV, nec-mRNA provided a shorter burst of nuclease expression, which may lessen the threat of ongoing cleavage activity. Furthermore, due to their ability to be non-immunogenic, repeated administration of modified mRNA to the lung can be applicable.

In conclusion, nec-mRNA is an important step in the development of clinically relevant, therapeutic gene correction strategies for the treatment of inherited lung disease and other monogenetic diseases.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro- (10 ⁻⁶)
10x	10-fach konzentriert
AAV	<u>A</u> deno- <u>a</u> ssoziierte <u>V</u> ektoren
Abb.	<u>A</u> bbildung
AD	<u>A</u> ktivierungs <u>d</u> omäne
AK	<u>A</u> ntikörper
Anh.	<u>A</u> nhang
ANOVA	Varianzanalyse, engl. <i>analysis of variance</i>
APC	<u>A</u> llophycocyanin
ARCA	Cap-Analog, engl. <i>anti reverse cap analog</i>
AT-II	<u>a</u> lveolärer <u>T</u> yp <u>I</u> I
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BAL	<u>b</u> roncho <u>a</u> lveoläre <u>L</u> avage
BALF	<u>b</u> roncho <u>a</u> lveoläre <u>L</u> avage- <u>F</u> lüssigkeit
bp	<u>B</u> asenpaare
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
CCR5	<u>C</u> C-Motiv- <u>C</u> hemokin- <u>R</u> ezeptor <u>5</u>
cDNA	komplementäre DNA, engl. <i>complementary DNA</i>
CF	<u>C</u> ystische <u>F</u> ibrose
cm	Zentimeter
CMV	<u>C</u> ytomegalovirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTP	<u>C</u> ytosin <u>t</u> riphosphat
Cy3	<u>C</u> yanin <u>3</u>
cys	<u>C</u> ystein
DAPI	4',6- <u>D</u> iamidin-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndol
DEPC H ₂ O	<u>D</u> iethylpyroc <u>a</u> ronat H ₂ O
DLSSA	Methode zum Nachweis Nuklease-induzierter DSBs, engl. <i>Dual Luciferase Single Strand Assay</i>
DMEM	Kulturmedium, engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<u>D</u> esoxyribonukleotid <u>t</u> riphosphat
DPPC	<u>D</u> ipalmitoylphosphatidyl <u>l</u> cholin

DSB	<u>D</u> oppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA, engl. <i>double stranded DNA</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, engl. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	Antikörper-basiertes Nachweisverfahren, engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	und andere, lat. <i>et alii</i>)
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie, engl. <i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i>
FBS	fetales Kälberserum, engl. <i>fetal bovine serum</i>
FCS	Vorwärtsstreulicht, engl. <i>forward scatter</i>
FITC	<u>F</u> luorescein- <u>I</u> sothiocyanat
FLASH-System	System für die Synthese von TALENs, engl. <i>fast ligation-based automatable solid-phase high-throughput system</i>
FoxP3	<u>F</u> orkhead- <u>B</u> ox-Protein <u>P</u> 3
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GTP	<u>G</u> uanin <u>t</u> riphosphat
H₂O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
HDR	Homologe Rekombination, engl. <i>homology directed repair</i>
his	<u>H</u> istidin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus, engl. <i>human immunodeficiency virus</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase, engl. <i>horseradish peroxidase</i>
i.p.	intra <u>p</u> eritoneal
i.t.	intra <u>t</u> racheal
IFN	<u>I</u> nter <u>f</u> eron
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
indels	<u>I</u> nsertionen/ <u>D</u> eletionen
IPL	isolierte Lungenperfusion, engl. <i>isolated perfused lung</i>
IQR	Interquartilsabstand, engl. <i>interquartile range</i>
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle, engl. <i>internal ribosomal entry site</i>
ITR	engl. <i>inverted terminal repeats</i>
IVT	<i>in vitro</i> transkribiert
kb	<u>K</u> ilobase
kDA	<u>K</u> ilodalton
KGW	<u>K</u> örperge <u>w</u> icht
l	<u>L</u> iter
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>

M	<u>M</u> olar
m	<u>milli-</u> (10^{-3}) oder <u>M</u> eter
m5C	<u>5-Methylcytosin</u> triphosphat
MCS	Polylinker, engl. <i>multiple cloning site</i>
MetOH	Methanol
min	<u>M</u> inute
Mio.	<u>M</u> illion (10^6)
MOI	Multiplizität der Infektion, engl. <i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	<u>n</u> ano- (10^{-9})
n.d.	<u>n</u> icht <u>d</u> etektiert
n.s.	<u>n</u> icht <u>s</u> ignifikant
n.v.	<u>n</u> icht <u>v</u> erifiziert
NaCl	<u>N</u> atrium <u>ch</u> lorid
NaOH	Natriumhydroxid
NC	<u>N</u> itro <u>g</u> ellulose
NHEJ	<u>N</u> icht- <u>h</u> omologes <i>end-joining</i> , engl. <i>non-homologous end-joining</i>
NLS	<u>n</u> ukleäres <u>L</u> okalisationss <u>s</u> ignal
NP	<u>N</u> anopartikel
NTP	<u>N</u> ukleotidtriphosphat
O₂	Sauerstoff
ORF	offener Leserahmen, engl. <i>open reading frame</i>
OT	<u>O</u> bjektträger
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> eleelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PC	<u>P</u> hosphatidyl <u>ch</u> olin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PDI	<u>P</u> oly <u>d</u> ispersitäts <u>i</u> ndex
pDNA	<u>P</u> lasmid- <u>D</u> NA
PE	<u>P</u> hycoerythrin
PEI	<u>P</u> olyetylen <u>i</u> min
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLA	Polymilchsäure, engl. <i>poly lactic acid</i>
PLGA	Polylactid-co-Glycolid, engl. <i>poly lactic-co-glycolic acid</i>
PLL	<u>p</u> oly(<u>L</u> - <u>L</u> ysin)
PMT	Photovervielfacher, engl. <i>photomultiplying tubes</i>
PVDF	<u>P</u> oly <u>v</u> inylid <u>e</u> n <u>f</u> luorid

qm ²	Quadratmeter
qRT-PCR	quantitative <u>Real-Time PCR</u>
REM	<u>Raster</u> elektronen <u>mikroskop</u>
RFLP	<u>Restriktions</u> fragment <u>längen</u> polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
RNase	<u>Ribonuklease</u>
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>rounds per minute</i>
RT	<u>Raum</u> temperatur
RT-PCR	<u>Reverse</u> <u>Transkriptase</u> <u>PCR</u>
rtTA	<u>reverser</u> <u>Tetracyclin</u> - <u>Transaktivator</u>
RVD	sich wiederholende, variable Doppelreste, engl. <i>repeat variable di-residue</i>
s	<u>Sekunde</u>
s.c.	<u>sub</u> cutan
s2U	2-Thiouridintriphosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SE	<u>Sekundäre</u> lektron
SFTPB	humanes SP-B Gen
SP-B	<u>Surfactant</u> <u>Protein</u> <u>B</u>
SSC	Seitwärtsstreulicht, engl. <i>side scatter</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA, engl. <i>single stranded DNA</i>
t	Zeit
T	<u>TALEN</u>
TAE	<u>Tris</u> - <u>Acetat</u> - <u>EDTA</u>
TALEN	Nuklease-Typ, engl. <i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
TBS	Trisgepufferte Salzlösung, engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor, engl. <i>toll-like receptor</i>
Tris	<u>Tris</u> (hydroxymethyl)-aminomethan
UTP	<u>Uridin</u> triphosphat
UTR	<u>un</u> translatierte <u>Region</u>
V	<u>Volumen</u>
w/v	Massenkonzentration, engl. <i>weight/volume</i>
WB	<u>Western</u> <u>Blot</u>
Z	<u>ZFN</u>
ZF	<u>Zink</u> finger
ZFN	<u>Zink</u> finger <u>Nuklease</u>
ΨU	Pseudouridin-5'-Triphosphat

1. Einleitung

1.1 Physio- und Pathophysiologische Aspekte des *Surfactant*

1.1.1 *Surfactant*

Die menschliche Lunge als, zentrales Atmungsorgan, sorgt für den lebenswichtigen Gasaustausch von Sauerstoff (O₂) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) zwischen Körper und Umwelt. Dabei wird O₂ über die Luftröhre (Trachea), die beiden symmetrisch angeordneten Bronchien, sowie die Bronchiolen bis hin zu den Lungenbläschen (Alveolen) transportiert. In den Lungenbläschen erfolgt der Austausch beider Gase durch Diffusion in die bzw. aus den angrenzenden Blutkapillaren. Dies ist zwei physiologischen Tatsachen geschuldet: 1) Aufgrund der Verzweigung des Atemapparates und der daraus resultierenden Anzahl an Alveolen (ca. 300 Mio) wird die Gesamtoberfläche für den Gasaustausch auf ca. 70 – 100 qm² enorm vergrößert, wodurch ausreichende Mengen an O₂ aufgenommen bzw. an CO₂ abgegeben werden können. 2) Die Blut-Luft Barriere bzw. die Wandstärke der Alveolen ist mit 0,6 µm – 2 µm sehr dünn, wodurch für den Gasaustausch kein aktiver Transport notwendig ist, sondern dieser rein physikalisch über Diffusion erfolgen kann.

Die Oberfläche der Alveolen ist zudem mit einem hauchdünnen Flüssigkeitsfilm (*Surfactant*) bedeckt. Dieser hat die Aufgabe die Oberflächenspannung in den Lungenbläschen zu reduzieren und somit einen Kollaps der Alveolen zu verhindern. Kleine Blasen bzw. Alveolen haben im Gegensatz zu Alveolen mit einem größeren Durchmesser - entsprechend dem Gesetz von Laplace - einen höheren Innendruck p ($p_{\text{Alveole groß}} < p_{\text{Alveole klein}}$). Bei gleicher Oberflächenspannung käme es demnach zu einer Umverteilung der Gasvolumina in Richtung der größeren Alveolen und resultierend zu einem Kollaps der Kleineren. Die Folge wäre eine Destabilisierung der Lunge und ihrer Funktion¹. Dem Flüssigkeitsfilm kommen demnach entscheidende Rollen zu: Zum einen unterstützt er die Senkung des Eröffnungsdrucks kleiner Alveolen bei der Inspiration und folglich die Vermeidung eines Kollaps. Zum anderen erhöht er die Lungennachgiebigkeit (*Compliance*), also deren Dehnbarkeit. Daneben verhindert der Flüssigkeitsfilm ebenfalls die Entstehung eines Alveolarkollapses nach der Exhalation, da sich der intrathorakale Druck dem alveolären Druck annähert¹⁻⁴. Zusätzlich zum Druckausgleich erfüllt das *Surfactant* noch weitere Aufgaben. So dient es unter anderem auch als Barriere gegen Pathogene, verbessert den mukoziliären Transport und verringert die Gefahr von durch Oberflächenspannung bedingten Ödemen^{3,5}.

Verantwortlich für die Synthese des *Surfactant* sind bestimmte epitheliale Zellen, welche die Alveolen auskleiden und den sog. alveolären Pneumozyten zugeschrieben werden. Alveoläre Pneumozyten können in zwei Zelltypen unterteilt werden: alveoläre Typ I (AT-I) Zellen und alveoläre Typ II (AT-II) Zellen. Diese können wiederum morphologisch als auch in Bezug auf ihre Funktion unterschieden werden. Mit 95 % stellen AT-I Zellen den größten Anteil der alveolären Oberfläche dar ^{6,7}. Morphologisch charakteristisch ist dabei ihr flaches, plattenartiges Aussehen. Sie besitzen weniger Organellen und sind metabolisch weniger aktiv. Funktional reduzieren sie den Gewebewiderstand und erlauben die freie Diffusion von Gasen an der alveolären Oberfläche ⁸. Darüber hinaus spielen sie beim Transport von Ionen, Wasser sowie weiteren Makromolekülen eine entscheidende Rolle und sind dementsprechend wichtig für die Zusammensetzung und das Volumen des Flüssigkeitsfilms, welche die pulmonare Oberfläche bedeckt ⁹⁻¹³. AT-II Zellen weisen dagegen eine cuboidale Form auf und bedecken die restlichen 5 % der alveolären Oberfläche ^{6,7}. Sie sind klein und befinden sich vorwiegend am Rand der Alveolen, da diese nicht am Gasaustausch beteiligt sind. AT-II Zellen sind metabolisch aktive Zellen und reich an membrangebundenen Organellen, den sog. Lamellarkörperchen, welche für die Synthese, Sekretion und Speicherung des *Surfactant* hauptverantwortlich sind ^{14,15}. Aufgrund ihrer Fähigkeit sich in AT-I Zellen differenzieren zu können, kommen AT-II Zellen ebenfalls Stammzeleigenschaften zu ¹⁶⁻¹⁸. Zusätzlich spielen diese Zellen eine entscheidende Rolle in der Regulation des *Surfactant*, in der Zellreparatur, der Beseitigung von apoptotischen Zellen sowie in der Immunregulation ¹⁴.

Betrachtet man die Zusammensetzung des *Surfactant*, so besteht dieses zu 90 % aus Lipiden und zu 10 % aus Proteinen. Von den Phospholipiden macht der Hauptbestandteil mit etwa 75-80 % Phosphatidylcholin (PC) aus. Darunter zählt, als vorwiegend oberflächen-aktiver Bestandteil, Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) als gesättigtes Phospholipid, das ca. 50 % der PCs ausmacht. Dem DPPC kommt dabei die Aufgabe zu, die Oberflächenspannung in den Alveolen zu reduzieren und ist damit ein wichtiger Bestandteil des *Surfactant* ². Daneben zählen als meist ungesättigte PCs Phosphatidylglycerol und Phosphatidylinositol zu den Phospholipiden ^{5,19,20}. Obwohl das *Surfactant* aus nur ca. 10 % Proteinen besteht - den sog. *Surfactant*-assoziierten Proteinen *Surfactant* Protein (SP) -A, SP-B, SP-C und SP-D - so kommen diesen jedoch entscheidende Rollen in der Regulierung des alveolären Flüssigkeitsfilms zu ^{21,22}. SP-A und SP-D sind relative große, hydrophile Glykoproteine, die wichtige immunregulatorische Aufgaben übernehmen, aber auch an der Metabolisierung des *Surfactant* entscheidend beteiligt sind ^{4,5,21-25}. SP-B und SP-C hingegen

sind kleine, hydrophobische Polypeptide. Sie sind vorwiegend für die Reduktion der Oberflächenspannung verantwortlich, wodurch ein Kollaps der alveolären Strukturen verhindert wird^{25,26}. Die beiden Proteine unterstützen dabei die Adsorption sowie die Redistribution von Phospholipiden innerhalb des *Surfactants* und sorgen so für eine Stabilisierung der Lunge.^{3-5,22,27}

Dem *Surfactant* kommt somit eine multimodale Rolle zu, die entscheidend für die Stabilisierung der alveolären Strukturen und damit für die Funktionsfähigkeit der Lunge ist.

1.1.2 *Surfactant Protein B*

Das *SFTPB* Gen, welches für das humane *Surfactant* Protein-B kodiert, ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 2 (2p12 → p11.2) lokalisiert^{28,29}. Das *SFTPB* Gen enthält 11 Exons, 10 Introns und umspannt ca. 9500 bp. Ausgehend von dieser Sequenz wird während des Transkriptionsprozesses eine etwa 2000 bp lange mRNA (engl. *messenger RNA*) synthetisiert, wobei das Exon 11 mit ca. 800 bp untranskribiert bleibt^{30,31}. Die mRNA wird anschließend in ein 381 aa (Aminosäure, engl. *amino acid*) großes Preproprotein translatiert. Die ersten 23 aa, die ein Signalpeptid umfassen, werden noch während des Translationsprozesses entfernt. Das so verbleibende Proprotein (proSP-B) wird anschließend an den aminoterminalen sowie an den carboxyterminalen Enden proteolytisch prozessiert, so dass schließlich ein 79 aa (ca. 8700 kDa) großes Polypeptid entsteht. Dieses reife SP-B Protein, welches sich auch im *Surfactant* wieder findet, entspricht den Aminosäuren 201 – 297 des Preproproteins, welches wiederum durch die beiden Exons 6 und 7 kodiert wird (siehe [Abb. 1.1](#))^{31,32}. Jedes reife Monomer enthält fünf α -Helices und drei intramolekulare Disulfidbrücken (cys8-cys77, cys11-cys71 und cys35-cys46), welche für die Stabilisierung der Tertiärstruktur verantwortlich sind³³. Von den im Polypeptid insgesamt vorhandenen sieben Cysteinen ist das letzte Cystein (cys48) für die Dimerisierung des reifen SP-B Proteins durch Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke verantwortlich.

SP-B wird vorwiegend in AT-II Zellen synthetisiert, daneben findet sich das Protein auch in Clara-Zellen wieder³⁴. Nach posttranslationaler Modifikation (über proteolytische Spaltung und Glykosylierung) in Vesikeln des Golgi-Apparates wird die reife Form des SP-B zusammen mit weiteren Phospholipiden über kleine, multivesikuläre Körper zu den Lamellarkörperchen transportiert³⁵. Nach physischer (mechanische Dehnung oder Kontraktion der AT-II Zellen) oder chemischer (u.a. Catecholamine, Histamin, Vasopressin) Stimulation werden diese Lamellarkörperchen wiederum zur apikalen Seite der AT-II Zellen

transportiert. Über den Prozess der Exozytose werden nachfolgend *Surfactant*-Proteine, wie SP-B sowie Phospholipide an die extrazelluläre Matrix abgegeben³⁶. Durch strukturelle Änderungen sowie Änderungen in der Konformation der sekretierten Komponenten bildet sich eine intermediäre netzartige Struktur aus, die als tubuläres Myelin bezeichnet wird. Durch Adsorption weiterer Phospholipide bildet sich letztlich ein oberflächenaktiver Film, das *Surfactant*³⁷. Die Hauptfunktion des SP-B liegt demnach in der Ausbildung eines solchen oberflächenaktiven Films und zwar in dem Maße, als dass es die Bildung des *Surfactant* um den Faktor 150 beschleunigt. Zudem ist es auch an der Wiederaufnahme von Phospholipiden in AT-II Zellen beteiligt³⁷.

Die Abwesenheit von SP-B, bedingt durch fehlende oder funktionsgestörte Synthese dieses Proteins, kann somit zu schweren Atemnotsyndromen führen. Je nach Schwere und Ausprägung müssen diese medizinisch behandelt werden oder führen gar zum Tod des Patienten.

1.1.3 Hereditäre SP-B Defizienz

Bei der SP-B Defizienz handelt es sich um eine schwere, autosomal-rezessiv vererbare Lungenerkrankung, die durch Mutationen im *SFTPB* Gen verursacht wird. Dabei kommt es im Allgemeinen zu einem Funktionsverlust oder gar zur fehlenden Synthese des SP-B Proteins (siehe [Abb.1.1](#))³⁸. Die Krankheit tritt relativ selten auf, klinischen Schätzungen zufolge liegt die Inzidenz bei 1:1.000.000 Geburten^{39,40}. Mutationen treten dabei über die gesamte Länge des SP-B Gens auf. Zu diesen zählen Insertionen und Deletionen, wie *nonsense*-, *missense*-, *frameshift*- und *splice site*- Mutationen. Von den bis heute mehr als 40 bekannten Mutationen im SP-B Gen ist die Häufigste die sog. Insertion „121ins2“. Dabei handelt es sich um eine GAA-Substitution für das Nukleotid Cytosin an der genomischen Position g.1549 in Exon 4 des *SFTPB* Gens^{41,42}. Diese kommt bei etwa 2/3 aller erkrankten Neugeborenen vor. Durch Verschiebung des Leserasters kommt es zur Entstehung eines frühzeitigen Stoppcodons, wodurch ein instabiles SP-B Transkript gebildet wird, dessen mRNA-Level im Vergleich zu gesunden Neugeborenen geringer sind. Das Transkript wird somit nicht adäquat translatiert und die Bildung von preSP-B und der reifen Form des Proteins bleiben aus (siehe [Abb. 1.1](#))⁴³.

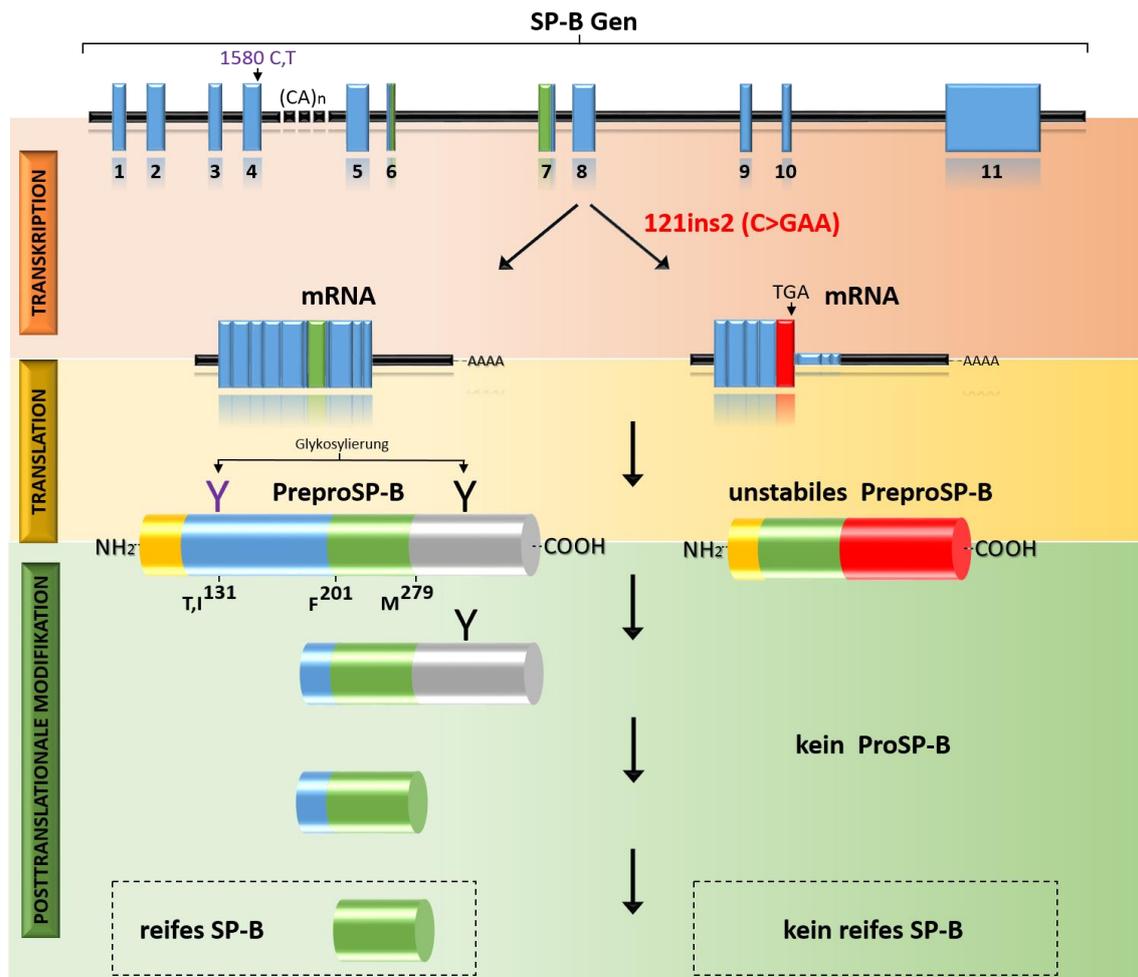


Abb. 1.1 – Prozessierung des SP-B Gens: Das SP-B Gen besteht aus 11 Exonen und 10 Intronen (Exone: blaue Rechtecke, Introne: schwarzen Linien). Die reife Form des SP-B wird durch die Exone 6 und 7 kodiert, entsprechend den Codons 201 (Phenylalanin, F) bis 279 (Methionin, M). Die normale Transkription, Translation sowie posttranslationale Prozessierung des SP-B Gens ist auf der linken Seite dargestellt. Die Anwesenheit eines SNPs (C oder T) an Position 1580) in Exon 4 resultiert in den Aminosäuren Isoleucin (I) oder Threonin (T) in Codon 131, wodurch die Glykosylierungsstelle verändert wird. Außerdem entsteht eine variable Tandem *Repeat* Region $[CA]_n$. Dies hat jedoch keine Auswirkungen auf die weitere Prozessierung bzw. Faltung des proSP-B Proteins. Die Insertion zweier Nukleotide, welche in der Mutation 121ins2 resultieren ist auf der rechten Seite dargestellt. Die Insertion ändert das Leseraster (rot), so dass ein neues Stoppcodon an Position 214 (TGA) entsteht. Das so resultierende Proprotein kodiert nicht mehr für die normale, reife Form des SP-B. Dieser Frameshift ist ebenfalls instabil und führt zu geringeren mRNA-Leveln

Phänotypisch zeigt sich die SP-B Defizienz als eine diffuse parenchymale Lungenerkrankung bei Neugeborenen, die klinisch und radiographisch dem Bild eines akuten Atemnotsyndroms bei Frühgeborenen ähnelt⁴⁴⁻⁴⁶. Die Krankheit tritt meist schon innerhalb der ersten 24 bis 48 Stunden nach der Geburt auf, ihr Verlauf ist progressiv und führt innerhalb der ersten drei bis sechs Monate zum Tod durch Lungenversagen⁴⁷. Komplette SP-B Defizienz liegt per Definition vor, wenn weniger als 1 % der Normalwerte des SP-B Proteins in der Lunge nachgewiesen werden kann. Betroffene müssen dabei meist medizinisch beatmet werden. Die einzige Möglichkeit heutzutage Patienten mit SP-B Defizienz vollständig zu kurieren liegt in einer Lungentransplantation. Eine mögliche

exogene SP-B Ersatztherapie spricht bei erkrankten Neugeborenen nur bedingt an bzw. ist diese in vielen Fällen wirkungslos oder meist nur transient wirksam. Auch Korticoesteroiden, mit dem Hintergrund die Transkriptionsrate des *SFTPB* Gens und folglich die Proteinbiosynthese zu erhöhen, sind bei diesem Krankheitsbild wirkungslos^{47,48}.

Auf molekularer Ebene zeichnet sich die Krankheit nicht nur durch das Fehlen bzw. die aberrante Synthese von proSP-B und ihrer reifen Form aus, sondern auch durch eine Akkumulation der *Surfactant* Proteine SP-A sowie der nicht vollständig prozessierten Form proSP-C im alveolären Lumen. Die Prozessierung des 21 kDa großen proSP-C Peptids in seine kleinere, 4 kDa reife Form SP-C, geschieht normalerweise durch sukzessive proteolytische Spaltung der carboxy- und aminoterminalen Enden^{41,42}. Die Anwesenheit eines partiell prozessierten, 6 kDa großen proSP-C Polypeptids im alveolären Oberflächenfilm lässt vermuten, dass reifes SP-B unter anderem für die normale Prozessierung bzw. den Transport des proSP-C verantwortlich ist. Die Akkumulation der unreifen Form im *Surfactant* von Betroffenen zeigt folglich auch eine weitere Reduktion der Oberflächenaktivität dieses Proteins und trägt somit zum Krankheitsbild der SP-Defizienz bei⁴⁹. Zudem zeigen sich in AT-II Zellen SP-B defizienter Neugeborener nur wenig bis keine normal erscheinenden Lamellarkörperchen – die Speicherorte für *Surfactant* –, stattdessen weisen diese Einschlüsse mit zahlreichen kleinen Vesikeln und wenig gepackten Lammellae auf⁵⁰. Da in den Lamellarkörperchen auch die finalen Prozessierungen der Proteine SP-B und SP-C stattfinden, könnte die Unfähigkeit diese Organellen zu formen, ebenfalls für die unvollständige Prozessierung von SP-C Polypeptids verantwortlich sein. Die molekularen Mechanismen hierfür sind jedoch noch ungeklärt^{31,51}.

Die heutigen kurativen Therapiemöglichkeiten beschränken sich ausschließlich auf die Option einer Lungentransplantation. Da diese mit erheblichen Risiken, wie der einer Abstoßungsreaktion der Spenderlunge sowie schweren Infektionen nach Transplantation verbunden sind, ist die Suche nach alternativen und dauerhaften Möglichkeiten zur Behandlung der SP-B Defizienz sehr wichtig⁵². Im Bereich der Gentherapie hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten im Hinblick auf die Korrektur monogenetischer Erkrankungen ein vielversprechendes Feld für zukünftige kurative Behandlungen aufgetan. Mit der Entwicklung von Nukleasen, welche sequenzspezifisch im Genom einen Doppelstrangbruch erzeugen und der zeitgleichen Anwesenheit einer funktionalen Kopie des entsprechenden Gens bzw. Sequenzabschnitten davon, können Mutationen über den Prozess der Homologen Rekombination dauerhaft korrigiert werden. Im Folgenden wird dies näher erläutert.

1.2 Gentherapie

1.2.1 Prinzipielle Aspekte der Gentherapie

Mit dem Beginn gentherapeutischer Ansätze in den frühen 1960er Jahren hat sich im Laufe der letzten zwanzig Jahre ein neues Paradigma im Hinblick auf die medizinische Behandlung verschiedenster genetisch bedingter Krankheitsbilder etabliert, das mittlerweile auch klinische Anwendung findet ^{53,54}. Das Ziel der Gentherapie umfasst dabei den therapeutischen Ansatz, genetisch verursachte Erkrankungen, die sowohl erblich bedingt als auch erworben sein können, so zu korrigieren, dass diese im Idealfall dauerhaft kuriert oder zumindest in ihrer Symptomatik gemildert werden ⁵⁵. Prinzipiell unterscheiden sich die Therapieansätze hinsichtlich der folgenden drei Faktoren:

- (1) Art des Zelltyps: Hier unterscheidet man zwischen der somatischen und der Keimbahn-Therapie. Bei der somatischen Gentherapie werden die Zellen bzw. das Erbgut des Patienten so verändert, dass solch eine Veränderung ausschließlich auf den Patienten beschränkt bleibt, wohingegen bei der Keimbahntherapie genetische Veränderungen an die nächsten Generationen weitergetragen werden. In diesem Fall werden Gameten oder aber befruchtete Eizellen manipuliert ^{56,57}.
- (2) Art der Durchführung: Je nachdem wie gut Zellen aus dem Körper eines Patienten zu isolieren bzw. diese auch in ausreichenden Mengen zu kultivieren sind, kann zwischen einer *ex* und *in vivo* Gentherapie unterschieden werden. Bei der *ex vivo* Gentherapie werden dem Patienten Zellen entnommen, diese kultiviert und entsprechend dem Gendefekt korrigiert und selektiert. Anschließend werden die genetisch korrigierten Zellen dem Patienten wieder reimplantiert und so ein vorübergehender oder stabiler therapeutischer Effekt erreicht ⁵⁸. *In vivo* Genkorrekturen finden Anwendung, wenn die Machbarkeit der Zellisolation und *in vitro*-Kultivierung nicht gegeben ist, so zum Beispiel bei der Cystischen Fibrose (CF) oder bei muskulären Dystrophien ⁵⁹⁻⁶².
- (3) Art der genetischen Modifikation: Hier unterscheidet man zwischen der Gensupplementation, dem Gen-*Silencing* bzw. *Knockdown* und der Genkorrektur. Bei der Gensupplementation werden zusätzliche korrekte und funktionsfähige Kopien des betroffenen Gens über virale und nicht-virale Vektoren in die Zelle eingebracht, um nachfolgend die Expression und damit die Menge an funktionsfähigem Protein

zu steigern. Dies hat beispielsweise Relevanz bei Krankheiten wie CF, bei denen durch Mutationen entsprechende Gene bzw. deren Genprodukte nicht ausreichend synthetisiert werden ⁶³. Der Nachteil einer solchen Therapie besteht jedoch darin, dass bei dominant-negativen Mutationen eine Supplementation des Wildtyp-Gens keinen nennenswerten therapeutischen Erfolg erzielt, da defekte RNA bzw. Proteine gebildet werden, welche die Funktion des normalen Genprodukts blockieren. Zudem muss bei viralem Gentransfer das entsprechende Gen unter der Kontrolle eines cis-regulatorischen Elements stehen, um eine Unter- bzw. Überexpression zu vermeiden ⁶⁴.

Beim Gen-*Silencing* bzw. dem Gen-*Knockdown* wird dagegen versucht, die Genexpression gezielt zu hemmen bzw. komplett auszuschalten. Dies geschieht meist über den Transfer sog. miRNA *sponges* oder shRNAs bzw. dsRNAs (engl. *micro, short hairpin, double stranded*) Anwendung findet diese Art der Therapie unter anderem bei bestimmten Krebs- sowie neurodegenerativen Erkrankungen, bei denen beispielsweise die Transkriptionsrate bestimmter Gene gedrosselt werden soll ^{65,66}. Der Ansatz der Genkorrektur beruht dagegen auf der dauerhaften Korrektur eines defekten Gens durch Einbau bzw. Austausch einer entsprechend funktionsfähigen und intakten Gensequenz. Das Ziel dabei ist das betroffene Gen wieder so herzustellen, dass der Phänotyp dem eines Gesunden entspricht. Dabei wird mit Hilfe von sequenzspezifischen Nukleasen ein Doppelstrangbruch (DSB) innerhalb des Genoms erzeugt. Dieser Nuklease-induzierte DSB kann wiederum über zwei zelluläre Mechanismen, die in fast allen Zelltypen und Organismen vorkommen, repariert werden (siehe [Abb. 1.2](#)). Zu diesen zählen das Nicht-homologe *end-joining* (NHEJ, engl. *non-homologous end-joining*) sowie der Mechanismus der Homologen Rekombination (HDR, engl. *homology-directed repair*). Der durch die Nukleasen erzeugte DSB führt dazu, dass die jeweiligen DNA-Enden inkompatibel zueinander sind. Damit der Strang wieder ligiert werden kann müssen entsprechend Nukleotide über 3'- und 5'-Nukleasen entweder entfernt oder über Ligasen hinzugefügt werden. Das hat zur Folge, dass während des Prozesses des NHEJ Insertionen bzw. Deletionen, sog. indels, entstehen, die das Leseraster der kodierenden Sequenz unterbrechen. Somit können wiederum neue Mutationen entstehen ⁶⁷. Die durch HDR vermittelte Reparatur kann dagegen eingesetzt werden, um einerseits spezifische Punktmutationen zu erzeugen, andererseits um gewünschte Gen-

Sequenzen über die Rekombination des Ziellokus mit exogen zugeführter DNA – sog. Donor-/Reparatur-*Templates* – zu integrieren. Dabei verläuft die HDR mittels Donor-*Templates* nach demselben Prinzip wie diese auch während der Meiose stattfindet. Nach dem DSB nähern sich die homologen Bereiche beider Chromatiden so an, dass es zu einem sog. Crossing-over und damit zum Austausch von Desoxyribonukleotiden kommt. Das Schwesternchromatid, das die korrekte Sequenzabfolge enthält, dient dabei als Vorlage ^{68,69}. Um den Vorgang der HDR mittels exogenem Donor-*Template* zu erzielen muss das *Template* in entsprechend hoher Konzentration vorhanden sein und entsprechend große homologe Bereiche um den endogenen Locus aufweisen ⁷⁰.

Um einen DSB und damit HDR zu induzieren haben sich in den letzten zwei Jahrzehnten drei entscheidende Nuklease-basierte Plattformen aufgetan, die es ermöglichen sequenzspezifisch DSBs zu erzeugen und so zielgerichtet den Einbau fremder DNA in das Genom zu ermöglichen ⁷¹. Diese drei Systeme werden im Folgenden näher vorgestellt.

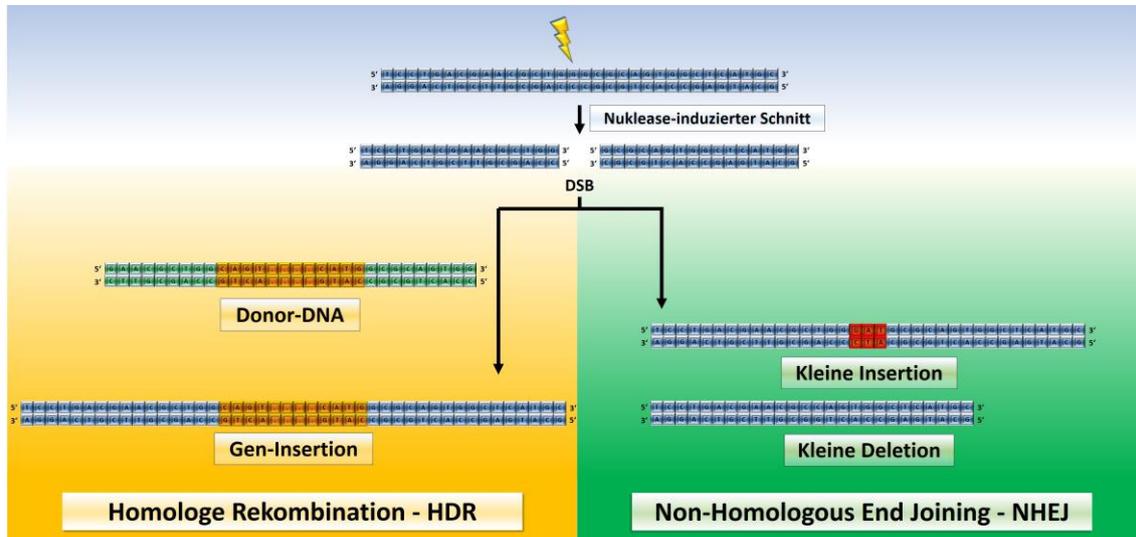


Abb. 1.2: Reparaturmechanismen eines Nuklease-induzierte Doppelstrangbruchs. Durch Nuklease-induzierte Doppelstrangbrüche (DSB) kann es in Anwesenheit einer Donor-DNA durch homologe Rekombination (HDR) zur Gen-Insertion kommen. DSBs können jedoch auch über das fehleranfällige nicht-homologe *end-joining* (NHEJ) repariert werden, wodurch kleine Insertionen bzw. Deletionen entstehen können. Für das NHEJ ist die Anwesenheit einer Donor-DNA nicht erforderlich.

1.2.2 Zink-Finger Nukleasen

Die Klasse der Zink-Finger Nukleasen (ZFN) zählt zu den vielseitigsten und effektivsten angewandten Nukleaseformen der letzten Jahre. Grundlegend bestehen diese Nukleasen aus einer DNA-Bindungsdomäne, welche für die sequenzspezifische Bindung an die DNA notwendig ist, und einer DNA-Spaltungsdomäne, die entsprechend einen DSB innerhalb der DNA ermöglicht (siehe Abb. 1.3). Diese synthetisch herzustellenden Proteine haben ihren Ursprung in der Beobachtung, dass das neutrale Typ IIS-Restriktionsenzym, *FokI*, voneinander getrennte Bindungs- und Spaltungsaktivität besitzt⁷². Dabei hat die Spaltungsdomäne keine offensichtliche Sequenzspezifität. Chandragesagan und Kollegen konnten zeigen, dass trotz Substitution unterschiedlicher DNA-Erkennungsdomänen die Spaltungsdomäne *FokI* sequenzunspezifisch agiert⁷³⁻⁷⁵. Als effektivste Bindungsdomänen stellten sich sog. Cys₂His₂ Zink-Finger (ZF) Domänen heraus. Diese Motive sind innerhalb der Eukaryoten die am Häufigsten vorkommen DNA-Bindungsdomänen und zusätzlich die zweithäufigsten kodierten Proteindomänen im menschlichen Genom. Jeder ZF besteht dabei aus ungefähr 30 aa, die in einer konservierten $\beta\beta\alpha$ -Konfiguration angeordnet sind (siehe Abb. 1.3)⁷⁶. Jede Domäne bindet dabei über mehrere Aminosäuren auf der Oberfläche der α -Helix drei Basenpaare in der großen Furche der DNA mit unterschiedlicher Selektivität⁷¹.

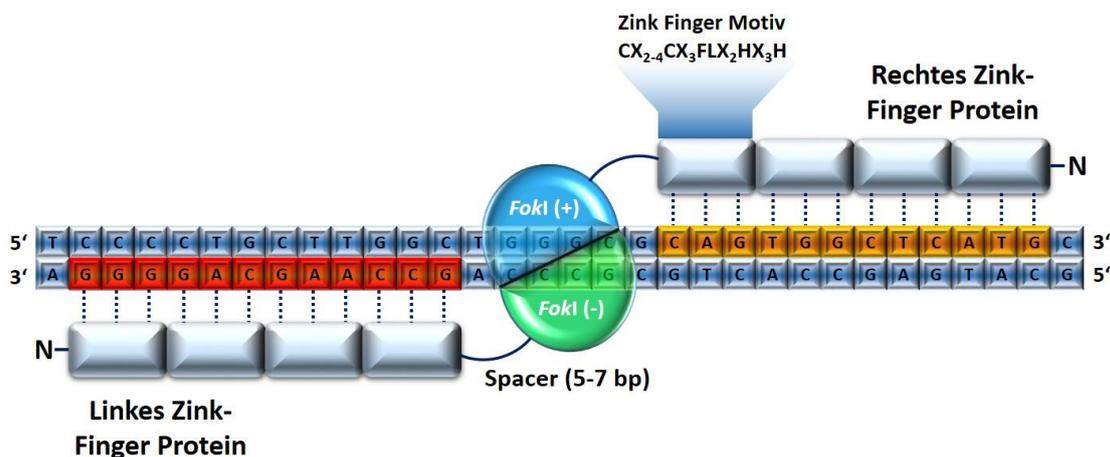


Abb. 1.3: Schematische Darstellung eines Zink-Finger Nuklease (ZFN)-Paares. Jede ZFN besteht aus einem Zink-Finger Protein am aminoterminalen Ende und der *FokI*-Nukleasedomäne am carboxyterminalen Ende. Im Zink-Finger Motiv repräsentiert X jede beliebige Aminosäure. Typischerweise ist die Zielsequenz der Zink-Finger Paare 18 – 36 bp lang (ohne *Spacer*).

Die modulare Struktur der ZF macht sie daher zu einem idealen Werkzeug für das Design von individuell und sequenzspezifisch herzustellenden ZF-Proteinen. Wegweisend dafür war die Entwicklung nicht-natürlich vorkommender ZF-Anordnungen, die mehr als drei Domänen beinhalteten. Hierfür war die Entdeckung einer hoch konservierten Verbindungssequenz (engl. *linker sequence*) grundlegend, welche die Konstruktion synthetisch hergestellter ZF-Proteine mit einer DNA-Erkennungssequenz von 9 – 18 bp ermöglichten⁷⁷. Da eine 18 bp lange Erkennungssequenz nur ein einziges Mal in 68 Milliarden bp vorkommt, erlaubt diese Methode die zielgerichtete und sequenzspezifische Bindung an DNA-Sequenzen innerhalb des menschlichen Genoms^{78,79}. Die ZF-Domänen wurden dabei so entwickelt, dass sie fast alle 64 möglichen Kombinationen an Nukleotid-Triplets abdecken. Durch ihr modulares Verhalten können diese in einer Tandem-Anordnung entsprechend der Zielsequenz zusammengebaut werden^{76,78-80}. Der Zusammenbau bzw. die Auswahl sequenzspezifischer ZF-Domänen kann *in silico* über entsprechende Bibliotheken von ZF-Modulen, wie z.B. OPEN (engl. *oligomerized pool engineering*), generiert werden^{76,81}.

Im Gegensatz zu den ZF-Domänen besitzt die DNA-Spaltungsdomäne *FokI* keine DNA-Bindungsaktivität und ist daher sequenzunspezifisch. *FokI* ist eine aus dem *Flavobacterium okeanokoites* stammende Restriktionsendonuklease der Klasse Typ IIS. Das Enzym setzt sich aus einer N-terminalen Bindungsdomäne (mit den Subdomänen D1, D2 und D3) und der C-terminalen DNA-Spaltungsdomäne zusammen. Dabei bindet *FokI* die Sequenz 5'-GGATC-3' und schneidet nach Dimerisierung DNA-Phosphodiestergruppen 9 bp (sense) bzw. 13 bp (anti-sense) *downstream* der Bindungssequenz⁸². Diese spezifische Bindung spielt jedoch bei synthetisch hergestellten ZFNs keine Rolle mehr. Das Enzym bzw. dessen katalytische Domäne ist als Monomer inaktiv, d.h. die Bindung eines *FokI*-Monomers an die DNA reicht für die Aktivierung des katalytischen Zentrums nicht aus. Erst wenn die funktionellen Reste der jeweiligen katalytischen Domänen an der Dimerisierungsstelle miteinander interagieren, werden diese auch aktiv. D.h. nach Bindung an den jeweils gegenüberliegenden DNA-Strang kommt es zur räumlichen Annäherung und Aktivierung beider Enzyme, woraufhin beide DNA-Stränge über die Phosphodiesterbindungen aufgebrochen werden⁸³.

ZFNs sind somit ein Produkt aus der Fusion der katalytisch aktiven, C-terminalen Region der *FokI*-Endonuklease und drei oder mehr variabel wählbaren ZF-Domänen. Diese werden so konzipiert, dass die ZFNs in einer *tail-to-tail*-Orientierung liegen. Zwischen den Bindungssequenzen liegt zusätzlich ein 4-6 bp langer Sequenzbereich – der sog. *Spacer* – in dem der Schnitt erfolgt⁸⁴. Durch ihre modulare Vielfalt können ZFNs für nahezu jeden

Lokus innerhalb des menschlichen Genoms designiert werden und sind mittlerweile ein bedeutendes Werkzeug im Bereich der Gentherapie geworden. So hat beispielsweise ein zur Behandlung gegen HIV (engl. *human immunodeficiency virus*) entwickeltes ZFN Paar bereits erste klinische Studien erfolgreich durchlaufen. Dabei wurden isolierte CD4 T-Zellen aus Patienten so korrigiert, dass diese nicht mehr von den Viren penetriert werden können. Durch das Einfügen einer Mutation in die Gensequenz des Co-Rezeptors CCR5, welcher wichtig für das Eindringen von HI-Viren in CD4 T-Zellen ist, konnte gezeigt werden, dass modifizierte Zellen länger in HIV-Patienten überleben und so die Viruslast auch ohne konventionelle medikamentöse Behandlung unter Kontrolle hielten⁸⁵⁻⁸⁷.

1.2.3 TALE Nukleasen

Transcription activator-like (TAL) *effector*- Nukleasen (TALENs) gehören wie die ZFNs zur Gruppe der Protein-basierten Systeme, die durch ihre modularen Eigenschaften ebenfalls individuell anpassbare DNA-Bindungsspezifitäten ermöglichen. TALENs sind in ihrem Aufbau grundlegend mit denen der ZFNs zu vergleichen. So besitzen diese eine variable aminoternale Domäne, welche für Bindung an die DNA erforderlich ist, und eine über einen *Spacer* gekoppelte, katalytisch aktive, carboxyterminale *FokI*-Domäne (siehe Abb. 1.4)^{88,89}.

TAL Effektoren sind natürlich vorkommende, hoch konservierte Proteine, die durch bakterielle Pflanzenpathogene des *Genus Xanthomonas* gebildet werden. Während des Infektionsprozesses schleusen die Pathogene über den sog. Typ III Sekretionsweg TAL Effektoren in die pflanzliche Zelle, weshalb diese auch Typ III-Effektoren genannt werden. Von dort aus gelangen die Proteine über ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) in den Zellkern, wo sie Effektor-spezifische DNA-Sequenzen binden und so die Transkription bestimmter Gene veranlassen. Die dadurch gebildeten Proteine steigern die Empfänglichkeit des Wirts hinsichtlich der pathogenen Kolonisierung. Je nach genetischem Kontext des Wirts können aber auch dessen Verteidigungsmechanismen über TAL Effektoren eingeschaltet werden⁹⁰⁻⁹².

Jeder bakterielle TAL Effektor besitzt drei für die Aktivierung von Genen wichtige Motive: ein NLS, eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne (AD) sowie eine zentrale Region aus sich wiederholenden Einheiten (engl. *Repeats*) von je 34 aa. Diese Region ist entscheidend für die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen. Dabei ist jeder der *Repeats* fast identisch zueinander mit Ausnahme zweier variabler Aminosäuren an den Positionen 12 und 13. Diese

1.3 Vektorsysteme

Eine der fundamentalen Herausforderungen genbasierter Therapien ist die Entwicklung von sicheren und effektiven Vektoren für den Gentransfer. Dabei werden sowohl virale als auch nicht-virale Vektoren verwendet. Virale Vektoren sind in nahezu 70 % aller klinischen Studien das Mittel der Wahl. Zu diesen zählen Retroviren, Lentiviren, Adenoviren oder aber Adeno-assoziierte Viren (AAV)⁹⁹. Neben einer vorwiegend guten Transduktionseffizienz birgt jedes dieser Vektorsysteme jedoch gewisse Risiken. Dazu gehört die Entstehung von Tumoren durch Integration in das Genom, die Aktivierung des Immunsystems als Reaktion auf das Transgen oder den Vektor selbst, die Eigenschaft eines breiten Tropismus – also die Fähigkeit sich in mehreren Zelltypen zu replizieren –, sowie die Limitierung in der Packungskapazität für Transgene^{99,100}.

Nicht-virale Vektoren wie z.B. neutrale und kationische Lipid-basierte (z.B. DOTMA, DOPE) oder Polymer-basierte [z.B. poly(L-Lysin) (PLL), Polyetylenimin (PEI)] Vektoren haben den Vorteil weniger immunogen als virale Vektoren zu sein. Dadurch können diese wiederholt verabreicht werden. Zusätzlich können größere Informationen genetischen Materials verpackt werden. Die Synthese solcher Vektoren ist ebenfalls einfacher, d.h. eine bessere Verfügbarkeit ist gewährleistet. Im Hinblick auf einen stabilen Gentransfer sind diese Systeme in klinischer Hinsicht jedoch weniger effizient. Zu berücksichtigen ist auch, dass sich nicht-degradierbare Polymere wie PEI im Körper akkumulieren können⁹⁹⁻¹⁰¹.

Aufgrund der Vielfalt an viralen und nicht-viralen Vektorsystemen werden im Folgenden die für diese Arbeit relevanten Systeme vorgestellt.

1.3.1 **Adeno-assoziierte Viren (AAV)**

Das humane AAV gehört zu den kleinsten Viren mit einem unbehüllten ikosaedrischen Kapsid. Für die Vermehrung der AAVs ist für gewöhnlich die Co-Infektion eines Helfervirus‘ erforderlich, weshalb sie dem Genus der Dependoviren zugeschrieben werden. AAVs sind nicht-pathogene Viren, trotz ihrer hohen Seroprävalenz in der Bevölkerung (etwa 80 % der Menschen sind seropositiv auf AAV2). AAVs besitzen ein lineares, einzelsträngiges DNA-Genom von ungefähr 4,7 kb. Für gentherapeutische Ansätze weisen AAVs als rekombinante Vektoren nur noch sog. *inverted terminal repeats* (ITRs) auf, die notwendig für die Replikation, die Verpackung und die Zellintegration sind. Alle viral kodierenden Sequenzen wurden dabei komplett entfernt, so dass diese Replikations-defizient und vorwiegend episomal (>99 %) vorliegen. Integrationen kommen meist in Regionen vor, in

denen DNA-Brüche vorliegen. Ähnlich wie adenovirale Vektoren können AAVs sowohl sich teilende als auch sich nicht in der Teilung befindliche Zellen transduzieren. Sie haben zudem den Vorteil eine transgene Langzeitexpression auch in postmitotisch befindlichen, oder sich nur langsam teilenden Zellen zu gewährleisten, ohne entsprechende Immunantworten auszulösen^{101,102}.

Aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften (hohe Transduktionsfähigkeit, episomales Vorliegen und transgene Langzeitexpression) werden rekombinante AAVs vielfach in präklinischen und klinischen Studien eingesetzt¹⁰⁰. So konnten Li und Kollegen in einer Studie zur Genkorrektur der erblich bedingten Bluterkrankung Hämophilie einen klinisch relevanten Anstieg des Koagulationsfaktors IX durch einen stabilen AAV-vermittelten Transfer in Mäusen zeigen¹⁰³. Auch in Studien zur Transduktionseffizienz in Lungen konnte ein stabiler AAV-Transfer beobachtet werden, wobei sich der Serotyp AAV6 als effizientester herausstellte¹⁰⁴.

1.3.2 Nanopartikel

Nanopartikel (NP) sind feste, kolloidale Partikel mit einem Durchmesser von 1 – 1000 nm. Sie bestehen aus makromolekularen Materialien und werden therapeutisch für die Aufnahme von Peptiden, DNA oder RNA in Zielzellen verwendet. Zu den NPs zählen unter anderem natürlich oder synthetisch abbaubare Polymere, wie die hydrophoben Materialien der α -Hydroxy-Säuren, worunter das synthetisch hergestellte Polylactid-co-Glycolid PLGA (engl. *poly lactic-co-glycolic acid*) fällt. Natürlich vorkommende Polymere umfassen komplexe Zucker wie Hyaluronsäure oder Chitosan.

PLGA ist ein Co-Polymer das sich aus Polymilchsäure (PLA, engl. *poly lactic acid*) und Polyglycolsäure (PGA, engl. *poly glycolic acid*) zusammensetzt. Das Polymer kann dabei in nahezu jeder Form und Größe hergestellt werden und Moleküle jeglicher Größe ummanteln. Die Methylgruppen im PLA haben hydrophobe Eigenschaften, weshalb Milchsäure-reiche PLGA-Polymere weniger hydrophil und dadurch stabiler sind. Über das Verhältnis von PGA zu PLA kann somit die Freisetzung der in NPs enthaltenen Peptide, DNA oder RNA gesteuert werden¹⁰⁵. PLGA-Polymere weisen eine negativ geladene Oberfläche auf, weshalb DNA oder RNA im Zuge der NP-Produktion während des Doppel-Emulsion-Verfahrens u.a. organischen Lösungsmitteln ausgesetzt sind, um eine entsprechende Verpackung der Nucleinsäuren zu gewährleisten. Dies kann jedoch zu Problemen hinsichtlich der Stabilität und Bioverfügbarkeit der DNA oder RNA führen. Um dies zu umgehen können kationische,

modifizierte Partikel den PLGA-Polymeren zugesetzt werden, die negativ geladene DNA/RNA binden und diese auch kondensieren. Zu diesen kationischen Partikeln zählt das Chitosan, welche die negative Ladung des PLGA umkehrt ¹⁰⁶. Dadurch verbessert Chitosan auch die Interaktion der NPs mit der Zellmembran und fördert so die Aufnahme durch Endozytose in die Zelle. Aufgrund seiner bioadhesiven Eigenschaften wird Chitosan bei Administrationen über die Lunge mittlerweile standardmäßig als Co-Polymer in NPs eingesetzt ¹⁰⁷. Mit Makromolekülen bepakte NPs werden hierbei über einen Zerstäuber als Aerosol in die Lunge appliziert. Je nach Partikelgröße gelangen die NPs bis in den alveolären Bereich (NPs < 0,5 µm), wo diese über Diffusion, Endozytose oder aber über Makrophagen aufgenommen werden ¹⁰⁵.

1.3.3 *In vitro* transkribierte (IVT) mRNA

Das Konzept genetische Informationen mittels *in vitro* transkribierter (IVT) mRNA zu vermitteln ist erst in den letzten Jahren in den Fokus wissenschaftlicher Forschung gerückt. Fortschritte, wie die Stabilisierung bzw. die Verlängerung der Halbwertszeit von IVT mRNA sowie die Reduktion der Immunogenität gegenüber dem körpereigenen Abwehrsystem machen Nukleinsäure-kodierende Peptide mittlerweile zu einem potentiell klinisch relevanten Forschungsfeld. Dabei ist das Einsatzgebiet von IVT mRNA sehr vielseitig: So wird beispielsweise IVT mRNA nicht nur bei der Vakzinierung diverser Infektionskrankheiten wie Influenza, Tuberkulose oder Atemwegsinfekten präklinisch getestet, sondern findet sich mittlerweile auch als Immuntherapeutikum gegen zahlreiche Tumorentitäten (wie bspw. Melanome, Prostatakrebs, Leukämie) in unterschiedlichen klinischen Phasen wieder. Daneben ist synthetisch hergestellte mRNA Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen bei der Toleranzentwicklung diverser Allergien sowie bei der Proteinsupplementation bzw. dessen Ersatz für bspw. Diabetes *insipidus* oder erblich bedingte Lungenerkrankungen ¹⁰⁸⁻¹¹⁸.

IVT mRNA hat dabei mehrere Vorteile gegenüber konventionell üblichen Nukleinsäure- oder viral-basierten Anwendungen:

- (1) IVT mRNA muss nicht in den Zellkern translozieren, um funktional aktiv zu werden. Sobald es im Cytoplasma vorliegt wird diese umgehend umgeschrieben. Im Gegensatz dazu müssen DNA-basierte Therapeutika erst den Zellkern erreichen, um anschließend in mRNA umgeschrieben zu werden, so dass deren Funktionalität primär vom Zellkernzusammenbruch während der Zellteilung abhängt.

- (2) Ungleich Plasmid-DNA oder viraler Vektoren integriert IVT mRNA nicht in das Genom. Das Risiko der Mutagenese bleibt damit aus.
- (3) IVT mRNA ist nur transient aktiv und wird restlos über physiologische Metabolisierungsprozesse abgebaut. Dies birgt für viele pharmazeutische Anwendungen einen enormen Vorteil, kann so die Expression und Dauer aktiver Peptide gesteuert werden.

Prinzipiell kann IVT mRNA über zwei Routen appliziert werden. Zum einen über die *ex vivo*-Applikation, wobei Zellen des Patienten entnommen und im Labor transfiziert werden. Anschließend werden diese dem Patienten wieder zugeführt. Zum anderen kann der Transfer auch direkt erfolgen. Hier wird über unterschiedliche Applikationswege IVT mRNA dem Patienten direkt zugeführt. Sobald die IVT mRNA in den Zellen vorliegt gilt für beide Routen dasselbe Prinzip der *in vivo* Translation der mRNA in ihr korrespondierendes Protein. Das so synthetisierte Proteinprodukt ist das eigentlich pharmakologisch aktive Peptid. IVT mRNA imitiert daher natürlich vorkommende, reife und prozessierte mRNA im Cytoplasma eukaryotischer Zellen. Dementsprechend besitzt IVT mRNA auch alle Eigenschaften nativer mRNA: sie besteht aus einem Einzelstrang, weist eine 5' Cap-Struktur sowie einen 3' Poly(A)-Schwanz auf. Der offene Leserahmen (ORF, engl. *open reading frame*) kodiert dabei das gewünschte Protein, das durch ein Start- und Stoppkodons markiert wird. Flankiert wird der ORF zusätzlich durch Bereiche sog. untranslatierter Regionen (UTRs, siehe [Abb. 1.5](#))¹¹⁹. Unabhängig davon, ob IVT mRNA *in vivo* oder *ex vivo* den Zellen zugeführt wird, bestimmen zwei Schlüsselfaktoren deren cytoplasmatische Bioverfügbarkeit. Zum einen ist dies der schnelle Abbau durch hoch aktive, ubiquitär vorkommende RNasen. Zum anderen zählt dazu die Zellmembran, welche durch ihre positive Ladung die passive Diffusion der negativ geladenen mRNA verhindert. Für die zelluläre Aufnahme werden dazu meist komplexierende Stoffe wie bspw. NPs verwendet, die den Transfer in die Zelle begünstigen. Die Stabilität der IVT mRNA liegt wiederum in der 5' Cap-Struktur, dem Poly(A)-Schwanz, der 5' und 3' UTR und der zu kodierenden Sequenz begründet (siehe [Abb. 1.5](#)).

5' Cap-Struktur

Die Cap-Struktur ist für die stabile Translation der mRNA notwendig. Natürlich vorkommende eukaryotische mRNA besitzt dabei eine 7-Methylguanosin (m⁷G) – Cap-Struktur, die während des Transkriptionsprozesses über eine 5'-5'-Triphosphatbrücke (ppp) angefügt wird (m⁷GpppN-Struktur). Die Bindung der Cap-

Struktur an den eukaryotischen, translationalen Initiationsfaktor 4E (EIF4E) ist dabei entscheidend für die regelrechte Translation, wohingegen die Bindung an die *decapping* Enzyme DCP1, DCP2 und DCPS den mRNA-Abbau reguliert. Eine natürlich vorkommende m⁷GpppN Cap-Struktur würde jedoch im Rahmen der IVT mRNA-Synthese in nahezu 50 % der Fälle dazu tendieren sich in umgekehrter Orientierung mit der zu kodierenden RNA-Sequenz zu verbinden. Solche reversen Cap-Strukturen werden nicht durch EIF4E erkannt. Durch das Anfügen eines sog. anti-reversen Cap-Analogs (ARCA, m₂^{7,3'-O}GpppG), das die korrekte Bindung ermöglicht, kann die Translationseffizienz gesteigert werden ¹²⁰.

Poly(A)-Schwanz

Der Poly(A)-Schwanz reguliert in Synergie mit der 5' Cap-Struktur sowohl die Stabilität als auch die translationale Effizienz der mRNA, sowie die Bindung an die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES, engl. *internal ribosomal entry site*). Der IVT mRNA kann dabei entweder über eine enzymatische Reaktion mittels rekombinanter Poly(A) Polymerase der Poly(A)-Schwanz angefügt werden, wobei die Anzahl der Adenosine bei jeder Reaktion variiert, oder aber der Poly(A)-Schwanz wird gleich in den Vektor eingefügt, über den das Peptid auch transkribiert wird. Studien an Dentritischen Zellen haben dabei gezeigt, dass für eine optimale Translation die Anzahl der Adenosine zwischen 120 und 150 liegen sollten ^{121,122}.

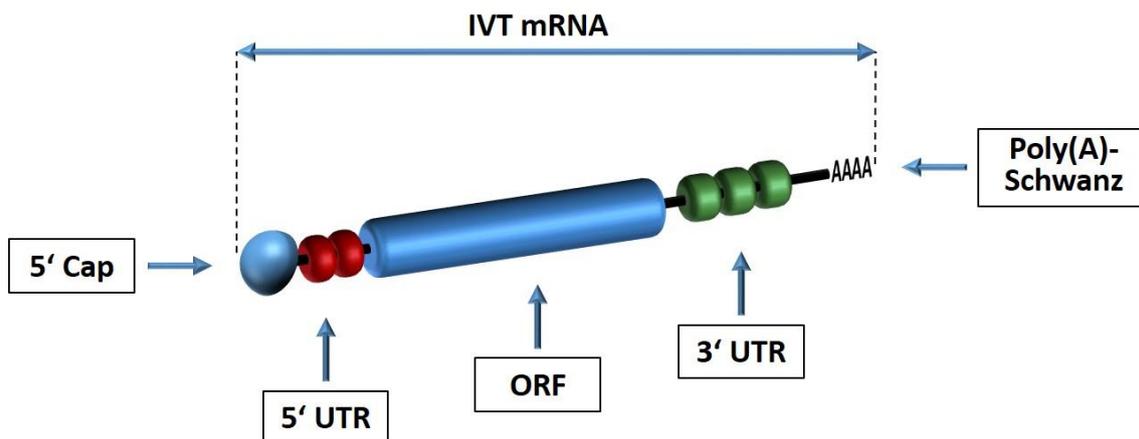


Abb. 1.5: Strukturelle Elemente der *in vitro* transkribierten (IVT) mRNA. Die IVT mRNA besteht aus einer 5' Cap-Struktur, aus Bereichen 5' und 3' untranslatierter Regionen (UTRs), einem Poly(A)-Schwanz sowie einem offenen Leserahmen (ORF), welcher die Nukleotidsequenz des zu kodierende Proteins enthält.

5' und 3' UTRs

Eine weitere Strategie um die Stabilität bzw. die translationale Effizienz zu erhöhen ist das Einbringen von UTRs, welche regulatorische Sequenzelemente beinhalten, die nachgewiesen die Translation und Stabilität endogener mRNA modulieren. Zu solchen UTRs zählen unter anderem 3' UTRs der α - und β -Globin mRNA. Der Effekt kann zusätzlich verstärkt werden, indem zwei solcher UTRs in einer Kopf-an-Schwanz Orientierung aneinander gefügt werden ^{121,123}.

Kodierende Sequenz

Zwei prinzipielle Aspekte in der kodierenden Sequenz können zu einer erhöhten Translationseffizienz beitragen: die Kodon-Zusammensetzung und der Kodon-Kontext (also benachbarte Nukleotide und Kodons). Hinsichtlich der Zusammensetzung kann der Ersatz von selten vorkommenden Kodons mit bedeutungsgleichen, häufig vorkommenden Kodons die translationale Effizienz erhöhen. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass manche Proteine für die ordnungsgemäße Faltung einen relativ langsamen Translationsvorgang benötigen, der durch selten vorkommende Kodons gewährleistet wird. Vor- und Nachteile von Kodon-Optimierungen sind daher stets abzuwägen ¹²⁴⁻¹²⁶.

Neben den genannten Aspekten für eine optimierte translationale Effizienz der IVT mRNA spielt auch die kontextabhängige Aktivierung des Immunsystems für die Wirksamkeit des kodierten Proteins eine entscheidende Rolle. Im Rahmen von Vakzinierungen sind ein starker immunstimulatorischer Effekt sowie eine intrinsisch adjuvante Aktivität der IVT mRNA gewünscht und von Vorteil. Bei gentherapeutischen Ansätzen oder auch Gensupplementationen, in welchen IVT mRNA bedarfsweise wiederholt gegeben werden muss, sollten Antigen-spezifische zelluläre und humorale Immunantworten ausbleiben, um einen Verlust der Wirksamkeit zu vermeiden. Die Aufnahme von IVT mRNA in Immunzellen führt dabei u.a. zur Aktivierung von *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs, wie TLR7 und TLR8) und folglich zur Sekretion von immunstimulatorischen Interferonen ^{127,128}. In nicht immuno-logischen Zellen wird dagegen Interferon durch die Aktivierung des cytosolischen Rezeptors RIG-I (engl. *retinoic acid-inducible gene I protein*) sowie MDA5 (engl. *melanoma differentiation-associated protein 5*) induziert. Daneben beeinflussen auch cytoplasmatische RNA-Sensoren die Translationseffizienz. Diese wird teilweise durch die Proteinkinase PKR (engl. *protein kinase RNA-activated*) vermittelt, die den eukaryotischen

Translations-Initiationsfaktor 2α (eIF2 α) phosphoryliert und somit die Translation der mRNA inhibiert ¹²⁹⁻¹³².

Gering immunisierende IVT mRNA kann durch Inkorporation natürlich vorkommender, modifizierter Nucleoside wie Pseudouridin (Ψ U), 2-Thiouridin (s2U) oder 5-Methylcytidin (m5C) erreicht werden. Durch Einfügen solcher Modifikationen, wie 25 % s2U/m5C, konnte beispielsweise Kormann *et al.* einen erheblichen Abfall in der durch IVT mRNA-bedingten Stimulation von Interferonen verzeichnen ¹¹⁷. Modifizierte IVT mRNA scheint dabei die Aktivierung von TLR7, TLR8 oder RIG-I zu vermeiden ¹³³.

Im Bereich der Genkorrektur bietet die IVT mRNA ebenfalls ein ideales Werkzeug für die Kodierung sequenzspezifischer Nucleasen. Eine anhaltende Expression solcher DNA-schneidender Enzyme, wie sie üblicherweise durch DNA- oder viral basierte Vektoren verursacht werden, kann somit zu erheblichen genomischen Veränderungen durch induzierte Schnitte außerhalb des gewünschten Sequenzbereichs führen (sog. *off-target* Effekte). Dadurch können kleine Insertionen bzw. Deletionen verursacht werden, die die Entstehung von Krebs begünstigen. Da Nucleasen aber nur für ein relativ kleines Zeitintervall aktiv sein müssen, können transient exprimierte Nucleasen *off-target* Effekte minimieren ¹³⁴⁻¹³⁷.

Im Folgenden wird der für diese Arbeit genetherapeutische Ansatz mittels IVT mRNA-kodierter Nucleasen dargestellt.

1.4 Prinzip der IVT mRNA-vermittelten Genkorrektur

Um eine möglichst effiziente Genkorrektur zu erzielen wird das Donor-*Template* (üblicherweise ein Gen bzw. Sequenzabschnitte davon) in einen viralen Vektor verpackt und in die Zielzelle transduziert, so dass dieses langfristig exprimiert wird (Abb. 1.6, Box I). Für den Nuklease-induzierten Schnitt wird IVT mRNA mit den entsprechenden kodierenden Sequenzen hergestellt und diese in NPs verpackt, so dass die IVT mRNA möglichst effizient in die Zelle aufgenommen wird (Abb. 6, Box II).

Sind die NPs über den aktiven Transport bzw. Endozytose aufgenommen, wird die IVT mRNA über die Ribosomen in das korrespondierende Protein umgeschrieben. Die so entstehenden Nucleasen enthalten ein NLS, worüber diese in den Zellkern translozieren (Abb. 6, Box III). Im Zellkern binden die Nucleasen entsprechend ihrer Zielsequenz innerhalb des Genoms. Durch Dimerisierung der Nuklease-Domänen kommt es zu einem DSB. Dieser wird entweder über den Prozess der HR (Abb. 6, Box IV) oder aber über das NHEJ repariert. Nach Einbau des Donor-*Templates* in die genomische DNA kann dieses

1.5 Zielsetzung

Vor dem Hintergrund der geringeren Immunogenität sowie der zeitlich begrenzten Verfügbarkeit mRNA-kodierender Proteine, lag das Ziel dieser Arbeit in der Evaluierung eines auf modifizierten mRNA-Nukleasen basierenden, therapeutischen Ansatzes zur Genkorrektur transgener *Surfactant* Protein-B-defizienter Mäuse.

Aus einem Panel verschiedener, sequenzspezifischer Nukleasen (ZFNs und TALENs) sollte zunächst diejenige ermittelt werden, deren Effizienz Nuklease-induzierte DSBs zu erzeugen am vielversprechendsten ist. Über die Umschreibung dieser in die korrespondierende, mRNA-kodierende Form sollte anschließend die Kinetik und Expression unter Zuhilfenahme chemisch modifizierter Nukleotide optimiert werden.

Für die eigentliche *in vivo*-Genkorrektur SP-B-defizienter Mäuse wurde zusätzlich ein AAV Reparatur-*Template* konstruiert, welches die konstitutiv aktive CAG-Promoter Sequenz enthält. Die Applikation sowohl der optimierten, mRNA-kodierenden Nukleasen in Kombination mit dem Donor-*Template* sollte durch Induktion von DSBs zum Reparaturmechanismus der Homologen Rekombination und somit zum Einbau der Promoter-Sequenz vor die SP-B cDNA führen. Die eigentlich unter der Kontrolle eines Doxycyclin-abhängigen Promoters stehende SP-B cDNA transgener Mäuse führt bei erfolgreicher Insertion des Donors zur konstitutiven Expression von *Surfactant* Protein B. Damit würde nach Absetzen von Doxycyclin der Phänotyp dem Doxycyclin-behandelter Mäuse entsprechen und so die Expression des für die Ausbildung des *Surfactants* essentiellen SP-B gewährleistet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien & Chemikalien	
2-Mercaptoethanol www.sigmaaldrich.com	Lipofectamine 2000 (1 mg/ml) www.lifetechnologies.com
3K-Narkose (Fentanyl, Midazolam, Medetomidin) Pharmakologie Tübingen	Luria Broth (LB) www.lifetechnologies.com
Agarose, Biozym LE www.biozym.com	May-Grünwalds Eosin Methylenblau www.merckmillipore.com
Agarose, Ultra pure www.lifetechnologies.com	MEM Non Essential Amino Acids www.lifetechnologies.com
AmpliTaq Gold 360 Mastermix www.lifetechnologies.com	Meyer's Hämalaunlösung www.merckmillipore.com
Anti Reverse Cap Analog (ARCA) www.trilinkbiotech.com	Milchpulver www.carlroth.com
Antidot (Naloxon, Flumazenil, Atipamezol) Pharmakologie Tübingen	Natriumacetat (NaAc) www.sigmaaldrich.com
Carbenicillin Dinatriumsalz www.carlroth.com	Natriumchlorid (NaCl) www.sigmaaldrich.com
Cellclip® www.tharmac.com	Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard www.lifetechnologies.com
Cellfunnel® www.tharmac.com	NuPAGE® Antioxidant www.lifetechnologies.com
Cellfunnel® Filterpapier www.tharmac.com	NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X) www.lifetechnologies.com
Cytoträger, 1Kreis, beschichtet www.tharmac.com	Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) www.lifetechnologies.com
DAPI www.applichem.com	Pentobarbital Pharmakologie Tübingen
Diethylpyrocarbonat (DEPC) – Wasser www.lifetechnologies.com	Pertex®-Eindeckmedium www.medit.de
Dimethylsulfoxid (DMSO) www.sigmaaldrich.com	Power SYBR® Green Master Mix www.bdbioscience.com
DNA Ladder 1 kb, GeneRuler, 0,5 µg/ml www.lifetechnologies.com	RNA Loading Dye (2x) www.neb.com
DNA Ladder 100 bp, GeneRuler, 0,5 µg/ml www.lifetechnologies.com	Roti® Histofix www.carlroth.com
DNA Loading Dye, 6-fach www.thermoscientific.com	S.O.C. Medium www.lifetechnologies.com
ECL Western Blotting Detection Reagent www.gelifesciences.com	Select Agar www.lifetechnologies.com
Entellan ® Neu www.merckmillipore.com	ssRNA Ladder www.neb.com
Eosin Y www.vwr.com	Taq DNA Polymerase www.peqlab.com
Essigsäure www.merckmillipore.com	Triton X-100 www.lifetechnologies.com
Ethanol (100 %), absolute for analysis www.merckmillipore.com	Trizma® Base www.sigmaaldrich.com
Filterpapiere www.carlroth.com	Trizma® Hypochlorid www.sigmaaldrich.com

2.1.1 Reagenzien & Chemikalien

GelRed Nucleic Acid Stain, 10000 x in Water www.biotium.com	Trypanblau (0,4 %) www.sigmaaldrich.com
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblau www.merckmillipore.com	Trypsin - Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,25 % www.lifetechnologies.com
Glycerol www.carlroth.com	Tween-20 www.carlroth.com
HCl (2N) www.merckmillipore.com	VentR DNA Polymerase www.neb.com
Isofluoran CP® (1 ml/ml) www.cp-pharma.de	Wasserstoffperoxid (30 %) www.merckmillipore.com
Isopropanol, absolute for analysis www.merckmillipore.com	Xylol-Ersatzmedium Roti®-Histol www.carlroth.com
Kanamycinsulfat www.sigmaaldrich.com	Ziegenserum, normal www.dako.com
Kollagenase, Typ I www.lifetechnologies.com	Zitronensäure Monohydrat www.merckmillipore.com
L-Glutamine www.bionity.com	

2.1.2 Lösungen & Puffer

ACK-Lysepuffer www.lifetechnologies.com	NE-Buffer 2 www.neb.com
Antarctic Phosphatase Reaction Buffer (10x) www.neb.com	NuPAGE® LDS Sample Buffer www.lifetechnologies.com
Bovine Serum Albumin (BSA, 100x) www.neb.com	NuPAGE® MES SDS Running Buffer www.lifetechnologies.com
Cut Smart Buffer (10x) www.neb.com	Opti-MEM, Reduced Serum Medium www.lifetechnologies.com
DMEM/F-12 Medium www.lifetechnologies.com	T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x) www.neb.com
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) www.lifetechnologies.com	Thermopol Puffer www.neb.com
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) www.atmp-ready.com	Tris-Acetat-EDTA (TAE) Buffer (10x) www.lifetechnologies.com
Fetal Bovine Serum (FBS), heat inactivated www.lifetechnologies.com	

2.1.3 Hergestellte Lösungen und Puffer

10x Citratpuffer (100 mM; pH, 6,0)	Zitronensäure Monohydrat	21,01 g
	HCl (2N)	pH 6,0
	ad dH2O	1000 ml
3 M Natriumacetat (pH 5,2)	Natriumacetat	40,82 g
	HCl (2N)	ph 5,2
	ad dH2O	10 ml
10x Tris-Buffered Saline (TBS) (0,25 M Tris-Base, 1,4 M NaCl; pH7,5)	Trizma® Base	30,28 g
	Natriumchlorid	81,82 g
	HCl (2N)	pH 7,5
	ad dH2O	1000 ml

2.1.4 Kits

Cytofix/Cytoperm™ Fixation/ Permeabilization Kit www.bdbioscience.com	NucleoSpin Gel and PCR clean-up www.mn-net.com
DAB Substrate Kit SK-4100 www.vectorlabs.com	NucleoSpin Tissue – Genomic DNA from Tissue www.mn-net.com
iScript cDNA Synthesis Kit www.bio-rad.com	peqGold XChange Maxi Kit www.peqlab.com
MEGAclear Kir www.ambion.com	peqGold XChange Midi Kit www.peqlab.com
MEGAscript T7 Kit www.ambion.com	RNeasy Mini Kit www.qiagen.com
mi-Plasmid Miniprep Kit www.metabion.com	

2.1.5 Enzyme

Antarctic Phosphatase www.neb.com	PmlI www.neb.com
BamHI www.neb.com	SacI www.neb.com
EcoRI www.neb.com	T4 DNA Ligase www.neb.com
KpnI www.neb.com	T7-Endonuklease I www.neb.com
NotI www.neb.com	XbaI www.neb.com

2.1.6 Antikörper

anti-Clara Cell Secretory Protein mit APC anti-mouse IgG1, Clone RMG1-1 www.sigmaaldrich.com	mouse monoclonal anti-SP-B antibody www.abcam.com
APC anti-mouse Ly6A/E (Sca-1) www.biolegend.com	PE anti-mouse CD31, Clone MEC13.3 www.biolegend.com
CyTM3 AffiniPure goat anti-rabbit IgG www.jacksonimmuno.com	PE anti-mouse CD45, Clone 30-F11 www.biolegend.com
goat anti-rabbit IgG (clone pAb)-HRPO www.dianova.com	rabbit polyclonal anti-DDDDK-tag Antibody www.abcam.com
mouse monoclonal anti-FLAG® M2-FITC, Clone M2 www.sigmaaldrich.com	ZytoChem Plus HRP One-Step Polymer anti-Mouse/Rabbit/Rat www.zyto.com

2.1.7 Modifizierte Nukleotide

2-Thio-Uridintriphosphat (s2U) www.trilinkbiotech.com	Pseudouridin-5'-Triphosphat (Ψ) www.trilinkbiotech.com
5-Methyl-Cytosintriphosphat (m5C) www.trilinkbiotech.com	

2.1.8 ELISAs

Mouse IFN alpha Platinum ELISA www.ebioscience.com	Mouse IL-12 p70 ELISA Ready-set-go® www.ebioscience.com
---	--

2.1.9 Zelllinien

A549 www.cell-lines-service.com	primäre Fibroblasten isoliert aus Mausstamm SP-C rTA/(teto) ₇ SP-B/SP-B ^{-/-}
MLE12 www.lgcstandards-atcc.com	

2.1.10 Versuchstiere

BALB/cAnNCrl www.criver.com	SP-C rTA/(teto)₇ SP-B/SP-B^{-/-} Melton <i>et al</i> (2003), aus München
---	---

2.1.11 Plasmide & AAVs

Bezeichnung	Insert	Hersteller
pVAX.1		www.lifetechnologies.com
pVAX.A120		www.lifetechnologies.com
pCS2+_dsRed.T4	dsRed	www.clontech.com
pVAX.dsRed.A120	dsRed	Klonierung
pVAX.Foxp3.A120	Foxp3	Klonierung
pAAV.CAG.SP-B_donor	SP-B Donor- <i>Template</i>	www.lifetechnologies.com
TUB07-pFB-ZFN3-repair-template (AAV6-Donor- <i>Template</i>)	SP-B Donor <i>Template</i>	www.virovek.com
pDNA.102425-NELD	T1 rechts	www.sangamo.com
pDNA.102427-CKKR	T1 links	www.sangamo.com
pDNA.102429-NELD	T2 rechts	www.sangamo.com
pDNA.102430-CKKR	T2 links	www.sangamo.com
pDNA.102435-NELD	T4 rechts	www.sangamo.com
pDNA.102036-CKKR	T4 links	www.sangamo.com
pDNA.38546-NELD	Z2 links	www.sangamo.com
pDNA.38547-CKKR	Z2 rechts	www.sangamo.com
pDNA.38558-NELD	Z3 links	www.sangamo.com
pDNA.38561-CKKR	Z3 rechts	www.sangamo.com
pDNA.38566-NELD	Z4 links	www.sangamo.com
pDNA.38567-CKKR	Z4 rechts	www.sangamo.com
Bezeichnung	Insert	Hersteller
pDNA.38582-NELD	Z5 links	www.sangamo.com
pDNA.38583-CKKR	Z5 rechts	www.sangamo.com
pVAX.25527.A120	T1 links	Klonierung
pVAX.25529.A120	T1 rechts	Klonierung
pVAX.38558.A120	Z3 links	Klonierung
pVAX.38561.A120	Z3 rechts	Klonierung
TUB09-pFB-CMV-3Flag-NLS-38558-Fok-KKR-bGHpA (AAV6-ZFN3-LEFT)	Z3 links	www.virovek.com
TUB09-pFB-CMV-3Flag-NLS-38561-Fok-KKR-bGHpA (AAV6-ZFN3-RIGHT)	Z3 rechts	www.virovek.com

2.1.12 Primer

	Sequenz (5' – 3')	T _m (°C)
T1 fwd	GTA GGC GTG TAC GGT GGG AG	65
T1 rev	CAG CAG AGG GTA GGA AGC AGC	65
Z3-1 fwd (P3)	TGT ACG GTG GGA GGC CTA T	59
Z3-1 rev (P1)	CCT GGC AGG TGA TGT GG	57
Z3-2 fwd	TGT ACG GCT ACA GGG GAA	56
Z3-2 rev	GCC GAT AGG CAG ATT GTA	54
CAG fwd (P2)	AGG CAC TGG GCA GGT AAG TA	60
pVAX for	CCA CTG CTT ACT GGC TTA TCG	61
off-target 1 fwd	GCA AGT TTG GCG TCG CTC CA	63
off-target 1 rev	AGA GGA AGG CGC GGC AGG	63

2.1.12 Primer		Sequenz (5' – 3')	T _m (°C)
off-target 2 fwd		TTC TTG CTC CAG TGA CTC TCT TA	61
off-target 2 rev		AGC CTA GTA AAG ACA ACA CTA GTG	62
off-target 3 fwd		CAA CGT GAC CTG CGA GCG	61
off-target 3 rev		GTG CAC GCT CCA CTT CTC G	62
off-target 4 fwd		CTG GAG ATG CAT CCT TGT CTG T	62
off-target 4 rev		GAG GGT GAA GAC TTT TGG AGC T	62
off-target 5 fwd		CAG CAC CAG ATG TTC CCT GTT A	62
off-target 5 rev		TGG AAA GCA ATA GTT CTA GGA TGA	60
off-target 6 fwd		GAG GCT GTG TCA CTA GCA GGA	63
off-target 6 rev		CAA AGT GGT ACC TTG GCA AGA G	62
off-target 7 fwd		AGA AAG CCA GCT GAG TAC CA	58
off-target 7 rev		TGT TGG CTT GTT TGG ACT CAT G	60
off-target 8 fwd		TGA CTA CAA TCA TGC TTC TTG GTT	60
off-target 8 rev		TGT AGG CCT TCA GTG ATC TAG G	62
off-target 9 fwd		AAG GAC TTC ATC TTT GCT GGA T	58
off-target 9 rev		GAA TCA ACA GCC TGG CAG C	59
off-target 10 fwd		ACA TTT TCT GGA GTG TAG TGT G	58
off-target 10 rev		GCT CTT TCG GTA ACA CAG TTC TT	61
Beta-Aktin fwd		TAG GCA CCA GGG TGA TG	55
Beta-Aktin rev		GCC ATG TTC AAT GGG GTA CT	58

2.1.13 Verbrauchsmaterialien	
Butterfly Safety Multify®-Set (21G x 3/4") www.sarstedt.com	Petrischalen (96 x 14 mm) www.greinerbioone.com
Deckgläser (24 x 60 mm) www.langenbrinck.com	Pipettenspitzen (10 µl, 1000µl) www.greinerbioone.com
Descosept AF Schnelldesinfektionmittel www.schumacher-online.com	Pipettenspitzen (200 µl) www.sarstedt.com
DNAase AWAY® www.sigmaaldrich.com	Präzisionswischtücher Kimtech Science www.kimberly-clark.com
Dualfilterspitzen ep Dualfilter T.I.P.S (0,1 – 1000 µl) www.eppendorf.com	Reaktionsgefäße Cellstar® Tubes (15 ml, 50 ml) www.greinerbioone.com
ECL Hyperfilm www.gelifesciences.com	Reaktionsgefäße Eppendorf Tubes (0,5 – 2 ml) www.eppendorf.com
Einmal-Handschuhe Peha-soft nitrile www.hartmann.de	Reaktionsgefäße FACS Rundboden Falcon Tubes (5 ml) www.bdbioscience.com
Einmal-Handschuhe PurpleNitrile www.kimberly-clark.com	Reaktionsgefäße PCR 8-Tube Strips (0,2 ml) www.greinerbioone.com

2.1.13 Verbrauchsmaterialien

Einmal-Skalpelle www.bbraun.de	Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes (1,5 ml) www.ependorf.com
Einmal-Wägeschalen www.carlroth.com	RNase AWAY® www.sigmaldrich.com
Entsorgungsbeutel www.brand.de	Sicherheitsvenenverweilkatheter Insyte™ www.bdbioscience.com
Feindosierungsspritze mit integrierter Kanüle (0,01 – 1 ml) Omnican® I www.bbraun.de	Spritzen Injekt® Einmalspritzen (5 – 50 ml) www.bbraun.de
Fettstift Dako Pen www.dako.com	Spritzen Injekt®-F Einmalspritzen (1 ml) www.bbraun.de
iBlot® Transfer Stacks, PVDF www.lifetechnologies.com	Spritzenaufsatz BD Microlance 3 (30G x ½“) www.bdbioscience.com
MicroAmp™ Optical 96-well Reaction Plate www.appliedbiosystems.com	Stabpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml) www.corning.com
NuPAGE® Novex® 10 % Bis-Tris Gele www.lifetechnologies.com	Zellkulturflaschen (175 cm²) www.greinerbioone.com
Objektträger SuperFrost® Plus (25 x 75 x 1,0 mm) www.langenbrinck.com	Zellkulturplatten 24-well/Zellkultur-Platten www.corning.com
Parafilm M® www.parafilm.com	Zellsieb Falcon® Cell Strainer (40 µm/70 µm) www.bdbioscience.com

2.1.14 Geräte

Autoklav Systec VX-150 www.systec-lab.de	Nanodrop 2000c www.implen.de
CO₂ Inkubator Heraeus HERAccl (Brutschrank) www.thermofischer.com	neoLab Spectrafuge www.neolab.com
Darkhood DH-50 www.biostep.de	Netzgerät MP-300V www.major-sci.com
Easypet www.ependorf.com	Pipetten (0,1-2,5 µl; 1-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl) www.ependorf.com
Eisschrank MEDline (-20 °C) www.liebherr.com	PowerEase® 500 Power Supply www.lifetechnologies.com
Eisschrank Model 905 (-80 °C) www.thermofischer.com	Thermocycler peqSTAR 96 universal www.peqlab.com
ELISA-Reader Multiscan EX www.thermofischer.com	Thermo-Shaker Univortemp MT 100 www.hysic.de
FMJ-250 Hochdruck Injektionsspritze www.penncentury.com	Trockenschrank Heraeus Function Line www.thermofischer.com
Gelkammer Model 40-0911 www.peqlab.com	ViiA 7 Real-Time PCR System www.lifetechnologies.com

2.1.14 Geräte

iBlot Transfer System

www.lifetechnologies.com

iBlot® Transfer System

www.lifetechnologies.com

Inkubator INFORS HT Ecotron

www.infors-ht.com

Kern EW 2200-2NM Waage

www.sartorius.com

Kühlschrank MEDline (4 °C)

www.liebherr.com

Laminar-Flow Sicherheitswerkbank

www.bdk-online.de

LSR-II

www.bd.com

Microtom Leica RM 2155

www.leicabiosystems.com

Mikroskop, Typ Wilvert 30

www.hund.de

Mikrospray® Aerosolizer Modell IA-1C

www.penncentury.com

Mikrowelle

www.venalisia.de

Vortex-Mixer Model 7-2020

www.neolab.com

Wasserbad

www.memmert.com

XCell® SureLock Mini Cell

www.lifetechnologies.com

Zählkammer Neubauer improved

www.hecht-assistent.de

Zeiss Axio Imager.M2

www.zeiss.com

Zeiss AxioCam MRC

www.zeiss.com

Zentrifuge 5430R

www.eppendorf.com

Zentrifuge Cellspin® II

www.tharmac.com

Zentrifuge Himac CT 15RE

www.hitachi-koki.com

Zentrifuge Megafuge 16R

www.thermoscientific.com

Zentrifuge Sprout

www.heathrowscientific.com

2.1.15 Software

Geneious® R8

www.geneious.com

Graphpad Prism®

www.graphpad.com

REST 2009

www.gene-quantification.com

FCS Express 4

www.denovosoftware.com

2.2 Methoden

2.2.1 Plasmid-Präparation

2.2.1.1 Kultivierung

Um Plasmide in großen Mengen zu erhalten ist die Kultivierung Plasmid-tragender Bakterien, wie bspw. *Escherichia coli* (*E. coli*) erforderlich. Sofern diese unter optimalen Bedingungen gehalten werden, d.h. unter entsprechenden Temperatur-, Sauerstoff- und Nährstoffbedingungen, können vier Wachstumsphasen kultivierter Mikroorganismen unterschieden werden:

- (1) Latenzphase: Während dieser Phase kommt es noch nicht zur Teilung der Bakterien. Hier passt sich der Stoffwechsel der Bakterien an die umgebenden Nährstoffbedingungen an. Durch Aufnahme von Nährstoffen werden die für die weitere bakterielle Vermehrung notwendigen Enzyme hergestellt.
- (2) Log-Phase: Die Log-Phase ist charakterisiert durch ein logarithmisches, also exponentielles Wachstum der Bakterien, in der sich die Mikroorganismen in relativ kurzer Zeit stark vermehren.
- (3) Stationäre Phase: In dieser Phase bleibt die Zellzahl weitgehend konstant. Die Bakterien haben die im Medium befindlichen Nährstoffe nahezu verbraucht und stellen ihre Zellteilung ein. Es sammeln sich zudem toxische, bakterielle Abbauprodukte an.
- (4) Absterbe-Phase: Fehlende Nährstoffe können den Energiebedarf der ruhenden Bakterien nicht mehr decken. Die Akkumulation von Giftstoffen führt zum Absterben der Bakterien.

Mit jeder bakteriellen Zellteilung wird auch das Plasmid proportional dazu vermehrt. Daraus ergibt sich, dass gegen Ende der Log-Phase die Ausbeute nach Plasmid-Isolation am ergiebigsten ist. Durch photometrische Messungen lassen sich die unterschiedlichen Wachstumsphasen der Bakterien bestimmen, wobei für die optimale Plasmidausbeute eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) zwischen 0,6 und 0,7 angestrebt wird, welche die späte Log-Phase darstellt.

Für die Vermehrung der Plasmide wurden 10 µl (für Midi-Kit Plasmid Präparationen) bzw. 20 µl (für Maxi-Kit Plasmid Präparationen) an Bakterienstammkultur in Antibiotika-haltiges LB-Medium (30 ml bzw. 100 ml) entsprechend ihrer Antibiotika-Resistenz (1 % Kanamycin

bzw. Carbenicillin) pipettiert und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm in einem Schüttelinkubator kultiviert. Nach ca. 12 – 16 Stunden befanden sich die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* DH5 α entsprechend ihrer Wachstumskinetik in der Log-Phase. Eine photometrische Messung war daher nicht erforderlich.

2.2.1.2 Plasmid-Isolation

Über die Isolation der Plasmide aus Bakterien werden je nach kultivierten Volumina und verwendetem Kit entsprechend große Ausbeuten erzielt. Das Prinzip der Isolation beruht dabei auf dem erstmals von Birnhoim und Duly im Jahr 1979 beschriebenen Prinzip der Alkalischen Lyse ¹³⁸.

Nach Kultivierung und Wachstum der gewünschten Plasmid-tragenden Bakterien werden diese über einen Zentrifugationsschritt pelletiert und das Nährmedium abgenommen. Das Pellet wird anschließend in einer Lösung resuspendiert, das üblicherweise Tris, EDTA, Glucose und RNase A enthält. EDTA komplexiert dabei divalente Kationen wie Magnesium (Mg²⁺) oder Kalzium (Ca²⁺), die essentiell für die Aktivität von DNasen sowie die Integrität der bakteriellen Zellmembran sind. Durch Komplexierung wird demnach eine Schädigung des Plasmids durch DNasen verhindert. Zugleich hilft EDTA die bakterielle Zellmembran zu destabilisieren. Glukose wiederum hält den osmotischen Druck aufrecht und verhindert ein Platzen der Bakterien. RNase A baut die zelluläre RNA ab, sobald die Zellen lysiert sind. Der Lysepuffer enthält im Allgemeinen Natriumhydroxid (NaOH) und das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS). Während SDS die Zellmembran auflöst und auch den Großteil zellulärer Proteine denaturiert, unterstützt NaOH ebenfalls die Zellauflösung und führt zu einer Denaturierung der dsDNA in ssDNA durch Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Basen. Dieser Schritt beinhaltet die eigentliche alkalische Lyse.

Durch Zugabe von Kaliumacetat wird das alkalische Milieu neutralisiert. Dadurch wird die erneute Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der ssDNA erreicht. Diese renaturieren im Folgenden wieder zu dsDNA, jedoch nur die kleine, zirkuläre Plasmid-DNA. Genomische DNA kann aufgrund ihrer Größe nicht mehr entsprechend zusammengefügt werden. Während die Plasmid-DNA durch Renaturierung gut in Lösungen gehen kann, wird die einzelsträngige genomische DNA zusammen mit den denaturierten Proteinen und SDS durch Ausbildung hydrophober Bindungen als weißes Präzipitat

ausgefällt. Durch Zentrifugation kann dieses relativ leicht von der Plasmid-DNA getrennt werden.

Um die Plasmid DNA von den in der Lösung befindlichen Salzen, EDTA, RNasen und Zellresten isolieren, erfolgt anschließend eine Aufreinigung und Konzentrierung der DNA über Ethanol-Präzipitation oder Silica-Membran basierte Kits (siehe Abschnitt 2.2.1.3).

Für die Plasmid-Isolation wurden die peqGold Xchange Midi- und Maxi-Kits (www.peqlab.com) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die einzelnen Schritte sind Tab. 2.1 zu entnehmen.

Tab. 2.1: Durchführung des peqGold XChange Midi- und Maxi-Kits

Protokoll	Midiprep	Maxiprep	Durchführung
	Volumina		
Anzucht der Bakterien	30 ml	100 ml	In LB-Medium + 1 % Antibiotikum 12-16 h bei 37 °C Zentrifugation bei 15.000 x g für 15 min
Lyse der Bakterien	8 ml	12 ml	Zugabe Solution I/RNase A und resuspendieren
	8 ml	12 ml	Zugabe Solution II und invertieren
	8 ml	12 ml	Zugabe Solution III und invertieren 5 min auf Eis inkubieren
Äquilibrieren der Säule	2,5 ml	5 ml	XChange Column mit EQ-Buffer füllen und Durchfluss verwerfen
Aufklären des Lysats			Lysat auf Filter gießen und Durchfluss auffangen
Laden und Binden			Aufgeklärtes Lysat auf äquilibrierte XChange Column pipettieren und durchfließen lassen und verwerfen
Waschen I	12 ml	2 x 24 ml	Wash-Buffer I zugeben und durchfließen lassen, anschließend verwerfen
Waschen II		2 x 12 ml	Wash-Buffer II zugeben und durchfließen lassen, anschließend verwerfen
Elution	5 ml	15 ml	Elution-Buffer zugeben und DNA eluieren, Durchfluss behalten
Präzipitation	3,5 ml	11 ml	Isopropanol zum Eluat geben und DNA fällen 30 min bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugieren, Überstand verwerfen
Waschen und Trocknen des Pellets	2 ml	5 ml	70 % EtOH hinzugeben und resuspendieren 10 min bei 15.000 x g und RT zentrifugieren, Überstand verwerfen und Pellet trocknen lassen
Lösen der DNA	50 µl	100 µl	Deionisiertes H ₂ O hinzugeben und DNA lösen

2.2.1.3 Plasmid-Aufreinigung

Für die Aufreinigung von Plasmiden werden im Allgemeinen zwei geläufige Methoden verwendet: die Ethanol-Präzipitation und die Silica-basierte Aufreinigung. Im Folgenden werden diese eingehender erklärt.

Ethanol-Präzipitation:

Die EtOH-Präzipitation dient dazu, Plasmide bzw. DNA zu entsalzen und aufzukonzentrieren. Dabei werden 0,1 – 0,5 M monovalente Kationen (bspw. Natriumacetat) zusammen mit 70 %igem EtOH der DNA beigefügt. Da EtOH anders als H₂O eine geringere Dielektrische Konstante (24 für EtOH, 80 für H₂O) besitzt, wird diese durch Zugabe von EtOH zur DNA-Lösung herabgesetzt. Dadurch steigen die Anziehungskräfte zwischen den positiv geladenen Kationen und dem negativ geladenen DNA-Rückgrat. Sobald diese miteinander interagieren, wird die DNA neutralisiert und ist folglich nicht mehr in H₂O löslich. Die DNA fällt als Präzipitat aus. Zudem führt das EtOH zu Konformationsänderungen in der DNA-Struktur. Dabei sind die entgegenwirkenden Kräfte zwischen negativ geladenen Phosphaten und einem Nukleinsäurepolymer so gering, dass interhelikale Interaktionen möglich werden, so dass es zur Aggregation der DNA kommt. Durch Zentrifugation und anschließender Abnahme des Überstandes kann so die DNA isoliert, aufgereinigt und durch Zugabe eines entsprechenden Volumens deionisiertem H₂O (dH₂O) aufkonzentriert werden ¹³⁹.

Die zu präzipitierende DNA bzw. Plasmide wurden für die folgenden Aufreinigungen mit 3 M Natriumacetat (pH 5,2) im Verhältnis 1:10 versetzt (ausgehend vom ursprünglich eingesetzten Volumen). Anschließend wurde das 2,5-fache Volumen an 100 % EtOH zugegeben und gemischt. Für die eigentliche Präzipitation wurde die Lösung für ca. 1 ½ h bei -80 °C inkubiert und anschließend in einer Zentrifuge bei 13.000 rpm für 30 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl 70 %igem EtOH gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min und 4 °C wurde der Überstand wiederum verworfen und das gereinigte Pellet in einem entsprechendem Volumen dH₂O resuspendiert.

Silica-basierte Aufreinigung:

Das Prinzip der Silica-basierten Säulenaufreinigung basiert auf der hohen Affinität des negativ geladenen DNA-Phosphatrückgrats mit den positiv geladenen Silica-Partikeln. Durch Zugabe hoher Konzentrationen chaotroper Salze und einem niedrigen pH-Wert (≤ 7) werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Wasserstoff des H_2O und den negativ geladenen Sauerstoffionen der Silica-Partikel sowie der DNA aufgebrochen. Das hat zur Folge, dass die Hydrathülle der Partikel und der DNA destabilisiert wird. Die Kationen der chaotropen Salze sättigen nun die negativen Ladungen der Silica-Partikel als auch des negativ geladenen DNA-Phosphatrückgrats ab, wodurch die Bindung an die Säule ermöglicht wird. Die Anlagerung der DNA an die Partikel ist dabei reversibel und kann durch Zugabe von Lösungen mit geringer Salzkonzentration (bei einem $pH \geq 7$) rückgängig gemacht werden. Durch die Bindung der DNA ist es möglich alle Proteine und Zelltrümmer der ursprünglichen DNA-Lösung zu entfernen, da diese nicht an die Säule binden. Durch Waschen der Membran mit Lösungen entsprechend hoher Salzkonzentrationen, wird die DNA somit gereinigt. Die Zugabe niedriger Salzlösungen führt wiederum zur Bildung einer Hydrathülle sowohl um die Silica-Partikel als auch um die DNA, wodurch diese eluiert werden kann ¹⁴⁰.

Soweit nicht anders angegeben wurde für die Aufreinigung von DNA und Plasmiden das NucleoSpin® Gel and PCR clean-up Kit entsprechend der Anleitung des Herstellers verwendet.

2.2.1.4 Linearisierung von Plasmiden

Für Klonierungszwecke sowie im Zuge der Herstellung von IVT mRNA mussten Plasmide zunächst linearisiert werden, um entsprechend weiter zu verfahren. Dabei wurden Restriktionsendonukleasen (REs) verwendet.

REs sind eine Klasse von Enzymen, die ubiquitär in prokaryotischen Organismen vorkommen und deren biologische Funktion es ist, das Wirtsgenom gegenüber Fremd-DNA (speziell Bakteriophagen-DNA) zu schützen. Per Definition gehören REs einem Restriktions-Modifikations-System an, das sich aus einer Endonuklease- und einer Methyltransferase-Komponente zusammensetzt. Dadurch, dass die Erkennungssequenz der REs relativ kurz sind (i.d.R. 4-8 bp), diese jedoch im Wirtsgenom ebenso häufig vorkommen, wird über die Methyltransferase-Aktivität eigene DNA durch Anbringen von Methylgruppen

so markiert, dass die Bindungsstelle für das entsprechende RE maskiert wird und so von Fremd-DNA unterschieden werden kann. Daraus ergibt sich, dass unmethylierte DNA geschnitten wird, während methylierte DNA ungeschnitten verbleibt.

REs können in vier Hauptgruppen (REs Typ I, II, III, IV) unterteilt werden, die jeweils unterschiedliche Subtypen aufweisen. Die Hauptgruppen unterscheiden sich dabei hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, der jeweiligen Anforderungen an Co-Faktoren, ihrer Zielsequenz und der Position ihrer Schnittstelle relativ zur jeweiligen Zielsequenz. Die gebräuchlichsten REs sind die REs vom Typ II. Diese schneiden an definierten Stellen, nahe oder innerhalb ihrer Zielsequenz. Zudem schneiden viele der Typ II REs palindromische oder symmetrische Sequenzen, da diese als Homodimer an die DNA binden. Der Umstand, dass nach erfolgtem Schnitt immer ein 3'-Hydroxyl- sowie ein 5'-Phosphatende entsteht und deren hohe Spezifität machen REs dieser Gruppe zu idealen Werkzeugen für DNA-Analysen sowie Klonierungen ^{141,142}.

Für Linearisierungen bzw. Restriktionsverdau wurde ein 50 µl Ansatz bestehend aus dem Plasmid, dem jeweiligen RE, Puffer und je nach Bedarf BSA hergestellt. Ein entsprechender Ansatz ist in Tab. 2.2 dargestellt.

Tab. 2.2. Ansatz zur Linearisierung von Plasmiden

Reagenzien	Volumina
DNA	10,0 µg
Restriktionsenzym	2,0 µl
CutSmart Buffer (10X)	5,0 µl
BSA (10X)	(nach Bedarf) 5,0 µl
H ₂ O	ad 50,0 µl

Der Ansatz wurde über Nacht in Abhängigkeit der erforderlichen Temperatur des REs im Schüttler inkubiert und je nach Bedarf und Möglichkeit des REs anschließend bei 65 °C oder 80 °C hitzeinaktiviert. Linearisierte Plasmide für die mRNA-Synthese wurden nachfolgend entsprechend Abschnitt 2.2.1.3 aufgereinigt. Herausgeschnittene DNA-Fragmente im Zuge von Klonierungen wurden elektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechenden Banden herausgeschnitten und über das NucleoSpin Gel and PCR clean-up Kit aufgereinigt.

2.2.1.5 Klonierung

Die Klonierungen der ZFN- und TALEN-Konstrukte in den für die mRNA-Synthese erforderlichen Vektor pVAX.A120 erfolgte nach dem folgenden prinzipiellen Schema:

Nach Plasmid-Isolation entsprechend Abschnitt 2.2.1.2 wurden jeweils 10 µg Plasmid in einem Restriktionsansatz (siehe Abschnitt 2.2.1.4) verdaut und anschließend über ein Agarosegel aufgetrennt, um das ZFN-/TALEN-Fragment aus diesem herauszuschneiden und aufzureinigen (siehe Abschnitte 2.2.1.3). Sofern die Enden der Fragmente mit denen des Vektorrückgrats kompatibel bzw. komplementär zueinander waren, konnte sogleich mit der Ligation fortgefahren werden. Bei nicht-komplementären Enden mussten die Überhänge durch sog. *blunten* mit Nukleotiden aufgefüllt werden. Dabei wurde die Vent_R DNA-Polymerase verwendet. Das Enzym füllt dabei die 5'-Überhänge mit Nukleotiden auf. Gleichzeitig besitzt die Polymerase eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch im gleichen Zuge die 3'-Überhänge entfernt werden. Für das *blunten* wurde jeweils der gesamte Ansatz an aufgereinigtem Insert und Vektor verwendet. Tab. 3 veranschaulicht dazu das Pipettierschema. Dabei wurden die Ansätze jeweils für 15 min bei 72 °C inkubiert und anschließend wiederum aufgereinigt.

Der pVAX.A120 wurde für die Klonierung der Fragmente zunächst linearisiert (siehe Abschnitt 2.2.1.4) und (nach bedarfsweisem *blunten* und Aufreinigung) dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung dient dabei der Entfernung des 5'-Phosphats an der Schnittstelle der DNA und verhindert so die Selbst-Ligation des Vektor-Rückgrats. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit leere Vektoren ohne Insert zu erhalten reduziert. Die Ansätze wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

Für die anschließende Ligation wurde die T4 DNA-Ligase verwendet. Diese katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen den benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyltermini. Die Ligrationsrate ist dabei abhängig vom Verhältnis des eingesetzten Vektors zur Menge und Fragmentgröße des Inserts. Je größer das Insert ist, desto höher sollte das Verhältnis Vektor zu Insert sein. Üblicherweise wird für die Berechnung ein Ligrationskalkulator verwendet (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html), welcher die entsprechenden Mengen an Vektor und Insert berechnet. Als initiale Mengenverhältnisse werden im Allgemeinen Ratios zwischen 1:3 (Vektor:Insert) bis 1:30 verwendet. Die Ligation selbst erfolgte anschließend bei 16 °C über Nacht. Als Kontrolle diente dabei ein Religationsansatz, dem kein Insert beigefügt wurde. Dadurch kann die Effizienz des Dephosphorylierungsansatzes des Vektors ermittelt werden, um etwaige Selbstligationen auszuschließen. Der Ligrationsansatz ist in Tab. 2.3 dargestellt.

Tab. 2.3: Ansätze für Blunten, Dephosphorylierung und Ligation

Reagenzien	Volumina
<u>Blunten</u>	
Vektor/Insert	50,0 µl
dNTPs	1,0 µl
Vent _R DNA Polymerase	0,5 µl
ThermoPol-Puffer	6,0 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 60,0 µl
<u>Dephosphorylierung</u>	
Vektor	30,0 µl
Antarctic Phosphatase	4,0 µl
Reaction Buffer (10X)	
Antarctic Phosphatase	1,5 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 40,0 µl
<u>Ligation</u>	
Vektor	10 ng
Insert	Abhängig von der Größe des Insert und dem Verhältnis zum Vektor
T4 DNA Reaction Buffer	1,0 µl
T4 DNA Ligase	1,0 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 10,0 µl

Nach Ligation wurden die Vektoren in den Bakterienstamm DH5 α transformiert (siehe Abschnitt 2.2.1.6).

Die klonierten Vektor-Konstrukte, welche für diese Arbeit hergestellt wurden, können Tab. 2.4 entnommen werden. Die dazugehörigen Sequenzen und Plasmid-Karten können dem Anhang entnommen werden. Der pVAX.A120 wurde dabei immer über die Restriktionsschnittstelle NotI geöffnet und je nach Insert vor Ligation geblunten.

Tab. 2.4: klonierte Vektorkonstrukte

Hergestellter Vektor	Kloniertes Insert	Verwendete Restriktionsschnittstellen	Ausgangs-Vektor	Blüten
pVAX.38558.A120	Z3 (links)	EcoRI / XbaI	pDNA.38558	ja
pVAX.38561.A120	Z3 (rechts)	EcoRI / XbaI	pDNA.38561	ja
pVAX.102425.A120	T1 (links)	SacI / PmlI	pDNA.102425	ja
pVAX.102427.A120	T1 (rechts)	SacI / PmlI	pDNA.102427	ja
pVAX.dsRed.A120	dsRed	BamHI / XbaI	pCS2+_dsRed.T4	ja
pVAX.Foxp3.A120	Foxp3	KpnI / EcoRI	pDNA.Foxp3	ja

2.2.1.6 Transformation

Die Transformation ermöglicht die Aufnahme exogener DNA bzw. Plasmide, durch Bindung an die bakterielle Zellwand und anschließender Aufnahme in die Bakterien selbst, einzubringen. Dabei haben manche Bakterien-Genera, wie *Haemophilus* oder *Bacillus* die Eigenschaft der natürlichen Aufnahme exogener DNA über Oberflächenproteine, welche die DNA binden und in die Zelle transportieren. Solche Zellen werden als kompetent bezeichnet. Es gibt jedoch Bakterienstämme wie beispielsweise *E. coli*, denen diese Eigenschaft fehlt. Diese Bakterien können jedoch über eine chemische Behandlung, wie die Calciumchlorid- oder Rubidiumchlorid-Methode kompetent gemacht werden. Bei diesen Methoden werden die negativen Ladungen der bakteriellen Zellwand durch Zugabe von zweiwertigen Kationen abgefangen, weshalb es für exogene DNA möglich wird an Lipopolysaccharide der Zellwand zu binden. Durch einen anschließenden Hitzeschock der Bakterien bei 42 °C kommt es zur Freisetzung aus der äußeren Zellmembran und damit zur Bildung von Poren, wodurch adsorbierte DNA nachfolgend in die Zelle aufgenommen werden kann. Zudem führt der Hitzeschock zur Depolarisation der inneren Membran, so dass das negative, innere Zellpotential reduziert wird. Dadurch kann die negativ geladene DNA leichter aufgenommen werden ^{143,144}.

Im Zuge der Transformation wurden 100 µl kompetenten DH5α-Zellen 1 ng Plasmid-DNA zugegeben und diese auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 2 min. Zur Regeneration und damit sich die bakterielle Zellwand wieder schließt, wurden die Zellen nachfolgend für 5 min auf Eis gelagert. Die Bakteriensuspension wurde mit 900 µl S.O.C.-Medium versetzt und im Schüttler bei 37 °C für 1 ½ h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 6000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen, so dass im *Tube* noch ca. 50-100 µl an Bakteriensuspension verblieben. Diese

wurde zu je 10 µl und 90 µl auf LB-Agarplatten mit der entsprechenden Antibiotikaresistenz mittels eines Drigalskispatels ausgestrichen. Aus Gründen der Sterilität wurde dieser Schritt direkt neben einem Gasbrenner durchgeführt, so dass Kontaminationen ausgeschlossen werden konnten. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, so dass sich die Bakterien vermehren konnten. Am folgenden Tag wurden mehrere Kolonien gepickt und diese in Antibiotika-versetztem LB-Medium angeimpft. Dadurch konnten einerseits Bakterienstammkulturen durch Zugabe von 500 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) zu 500 µl gewachsener Bakteriensuspension hergestellt werden, welche bei -80 °C aufbewahrt wurden sind. Andererseits konnte über Plasmid-Isolation und -Aufreinigung (siehe Abschnitt 2.2.1.2. und 2.2.1.3) sowie Restriktionsverdau und Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.1.4 und 2.2.3) bzw. Sequenzierung (siehe Abschnitt 2.2.20) entsprechende Plasmide verifiziert werden.

2.2.2 Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration

Wie alle photometrischen Messungen liegt auch das Prinzip des Nanophotometers auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz begründet. Dies erlaubt die Berechnung von Nukleinsäure-Konzentrationen anhand der Absorption von monochromatischem Licht. Das Gesetz beschreibt die Abschwächung der Strahlungsintensität beim Durchgang durch eine Lösung mit einer absorbierenden Substanz (siehe Abb. 2.1A). Der Intensitätsunterschied ist dabei abhängig von der Konzentration des zu untersuchenden Stoffes in der Lösung, sowie von der Schichtdicke des Gefäßes, welches der Lichtstrahl durchlaufen muss.

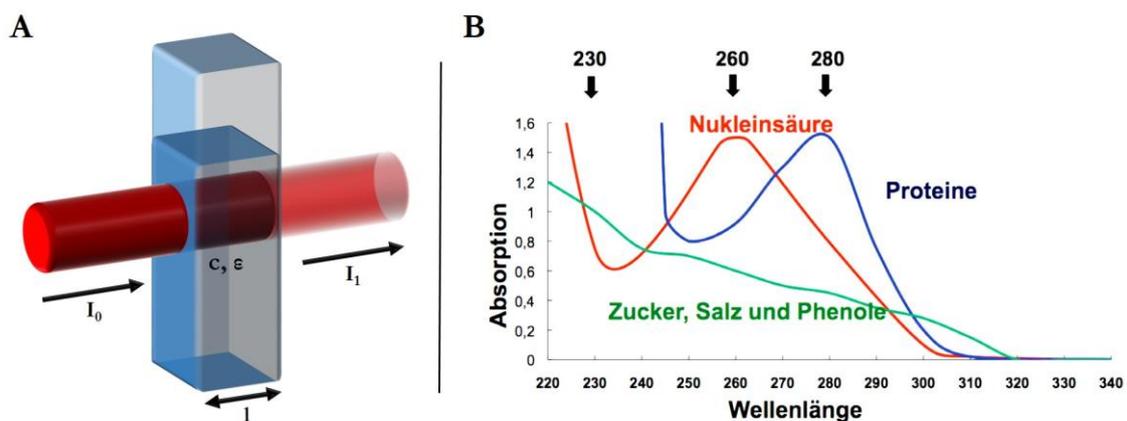


Abb. 2.1: (A) Schematische Darstellung des Lambert-Beer'schen Gesetz der Lichttransmission durch eine Küvette . I_0 Intensität des einfallenden Lichtstrahls; I_1 Intensität des austretenden Lichtstrahls; l Schichtdicke; c Konzentration der zu untersuchenden Lösung des Gefäß; ϵ Absorptionskoeffizient. (B) Absorptionsverlauf einer Nukleinsäure-Probe und möglicher Kontaminationen (entnommen aus: Eppendorf, Application Note 279 - Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen)

Da Nukleinsäuren und Proteine unterschiedliche Absorptionsmaxima aufweisen kann über die Berechnung des jeweiligen Quotienten auch eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäuren getroffen werden. DNA und RNA zeigen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, während das von Proteinen oder Salzen bei 280 nm bzw. 230 nm liegt (siehe [Abb. 2.1B](#)). Liegt der Quotient des Extinktionskoeffizienten $A_{260}/280$ für Nukleinsäuren bei einem Wert um $\sim 1,8$ (DNA) bzw. $\sim 2,0$ (RNA), so können diese als rein angesehen werden, d.h. eine Kontamination mit Proteinen oder Zelltrümmern ist gering. Dasselbe gilt für den Quotienten $A_{260}/230$. Liegt dieser für Nukleinsäuren zwischen 2,0 und 2,2, so sind die zu messenden Lösungen rein von Salzen oder Phenolen.

Der Nanophotometer misst Volumina im μl -Bereich. 1-2 μl zu messende Lösung wurde in den Strahlengang des Nanophotometers pipettiert und anschließend gemessen. Um die optische Dichte und folglich die Konzentration von Nukleinsäuren exakt zu erfassen, musste vor jeder Messung das Gerät auf einen Nullwert kalibriert werden, d.h. die Lösung, in welcher die Nukleinsäuren gelöst waren, wurde als Referenz eingesetzt.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist wohl die am weitesten verbreitete Methode, um Nukleinsäure-Fragmente voneinander zu trennen. Dabei können Fragmente zwischen 100 bp und 25 kbp aufgetrennt werden. Die Agarose wird hierfür aus den Rotalgengattungen *Gelidium* und *Gracilaria*, gewonnen und besteht aus sich wiederholenden Agarobiose- (D- und L-Galaktose) Untereinheiten. Im erhitzten Zustand ist Agarose flüssig und geliert während der Abkühlung. Dabei bilden die Agarose-Polymere nicht-kovalente Bindungen und formen ein Netzwerk aus Bündeln, dessen Porengröße die Auftrennung der Nukleinsäuren bestimmt. Je höher der Anteil an Agarose in einem Gel ist, desto kleinporiger wird dieses und desto kleinere Fragmente können aufgetrennt werden. Um DNA oder RNA aufzutrennen wird während der Elektrophorese über einen Versorgungseinheit Strom angelegt. Das Phosphat-Rückgrat der DNA- und RNA-Moleküle ist dabei negativ geladen, d.h. im elektrischen Feld wandern die Moleküle demnach zur positiv geladenen Anode. Da DNA und RNA ein gleichmäßiges Verhältnis von Masse zu Ladung besitzen, werden diese entsprechend ihrer Größe im Agarosegel getrennt, und zwar in dem Maße, als dass die zurückgelegte Strecke umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts ist. Die Geschwindigkeit, mit der ein DNA- oder RNA-Molekül im Gel wandert hängt dabei

von folgenden Faktoren ab: (1) der Größe des Moleküls; (2) der Konzentration der Agarose; (3) der DNA-Konformation; (4) der Stromzufuhr; (5) der Anwesenheit von Ethidiumbromid; (6) dem Agarose-Typ und (7) dem Elektrophoresepuffer. Nachdem die DNA/RNA aufgetrennt ist, kann diese mittels fluoreszierenden Farbstoffen, wie Ethidiumbromid oder dem weniger toxischen GelRed unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Diese Farbstoffe interkalieren in Nukleinsäuren und verändern dabei ihr Absorptionsspektrum, wodurch es unter UV-Licht sichtbar wird ¹⁴⁵.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Agarose-Gelelektrophoresen wurde je nach aufzutrennenden Nukleinsäure-Fragmenten eine Agarose-Konzentration zwischen 1 – 2 % (w/v) gewählt. Dementsprechend wurden 1 – 2 g Agarose auf 100 ml 1X TAE-Puffer gegeben, mit 5 µl GelRed versetzt und in einem hitzebeständigen Kolben in der Mikrowelle aufgeköcht. Die flüssige Agarose wurde in eine Gelkammer mit entsprechendem Kammeinsatz gefüllt. Nach ca. 30 min war das Gel ausgeliert und der Kamm zum Befüllen des Gels wurde gezogen. Die Gelkammer wurde anschließend mit ca. 500 ml 1X TAE-Laufpuffer aufgefüllt und die Proben in die Geltaschen pipettiert. Zuvor versetzte man die Proben – zur Erhöhung der Dichte und damit diese beim Probenauftrag in die Taschen sinken – mit einem 6X-Ladepuffer im Verhältnis 1:6. Um die Nukleinsäure-Größen nach erfolgten Lauf zu verifizieren wurde zusätzlich 4 µl einer DNA-Leiter in jeweils eine Tasche aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde mit einer Spannung von 80 – 100 V und einer Stromstärke von 400 mA durchgeführt. Anschließend wurde das Gel zur Sichtbarmachung der Nukleinsäure-Fragmente unter UV-Licht in einem dafür vorgesehenen Gerät (Dark Hood DH-50) gelegt und über eine Kamera mittels der Software Biostep Argus X1 das Gel dokumentiert.

2.2.4 Synthese von ZFNs und TALENs

Die ZFN-Paare Z2 (38547/38546), Z3 (38561/38558), Z4 (38567/38566), Z5 (38583/38582) und die TALEN-Paare T1 (102425/102427), T2 (102429/102430), T4 (102435/102036), welche dem Ergebnis des *dual luciferase single strand assays* (DLSSA; siehe Abschnitt 2.2.4) nach die potentiell effizientesten Nukleaseaktivität besitzen wurden freundlicherweise von der Firma Sangamo BioScience (www.sangamo.com) zur Verfügung gestellt.

Der Zusammenbau und die Auswahl der ZFN-Erkennungssequenzen sind urheberrechtlich durch die Firma Sangamo BioScience geschützt. Prinzipiell werden drei Methoden

angewendet, welche den Zusammenbau der ZFN ermöglichen. Dazu gehört (1) der modulare Zusammenbau, (2) die Strategie der Kontext-sensitiven Selektion und (3) die 2+2-Strategie, welche von Sangamo BioScience patentiert ist. Im Folgenden werden die drei Strategien näher erläutert ¹⁴⁶.

- (1) Modularer Zusammenbau: Der Prozess basiert auf dem Zusammenbau von einzelnen ZF-Domänen mit bekannter DNA-Bindungsspezifität, um eine spezifische DNA-Bindungsdomäne zu erhalten. Die Module werden dabei aus großen Archiven an ZF-Domänen selektiert und zusammengefügt. Um potentielle DNA-Bindungsdomänen zu identifizieren, stehen Web-basierte Software-Algorithmen zur Verfügung, welche die Auswahl von ZF-Erkennungssequenzen erleichtern und zugleich die richtige Order für den Zusammenbau der ZF-Module ermöglichen. Obwohl diese Strategie relativ einfach ist, so ist die Erfolgsrate Sequenz-spezifische Domänen zu synthetisieren, welche optimale DNA-Bindungsaffinität und -Spezifität besitzen, sehr variabel.
- (2) Kontext-sensitive Selektion: Zu dieser Art der Strategie zählen Methoden wie die *bi-partite* Selektion, die sequentielle Optimierung oder aber die Kontext-sensitive Parallel-Optimierung. Diese Methoden haben gemeinsam, dass sie die relative Position eines einzelnen, individuellen ZF-Moduls in der finalen ZF-Zusammensetzung berücksichtigen. Zusätzlich wird die Auswirkung der benachbarten ZF-Module auf das jeweilige Modul berücksichtigt. Diese Plattformen haben den Vorteil, stabile ZF-Domänen mit einer hohen DNA-Bindungsaffinität zu erzeugen. Synthetisierte ZFNs zeigen zudem eine höhere Effektivität DSBs zu erzeugen und sind dabei weniger toxisch.
- (3) 2+2-Strategie: Der Zusammenbau der ZF-Domänen ist weitestgehend unbekannt, da diese Plattform urheberrechtlich im Besitz der Firma Sangamo Bioscience ist. Es wird vermutet, dass die aus vier ZF-Domänen bestehenden ZFN aus einem zweistufigen Prozess hervorgehen. Die erste Stufe ist dabei der Zusammenbau der Bindungsdomäne aus jeweils zwei miteinander verbundenen ZF-Einheiten. Diese Einheiten stammen aus einem bereits existierenden Archiv an ZF-Domänen mit bekannter DNA-Bindungsspezifität. Im zweiten Schritt werden so entstandene und vielversprechende ZFN-Proteine über eine auf einem Algorithmus basierende Methode optimiert. Die über diese Plattform hergestellten ZFNs konnten, anders als

die beiden vorherigen Strategien, erfolgreich Schnitte in Genen von Säugern erzielen ¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

Für den Zusammenbau von TALENs werden weitgehend zwei Methoden herangezogen, die in ihrer Durchführung relativ einfach und zeitsparend sind. Beide Methoden beruhen auf dem modularen Zusammenbau einzelner DNA-Fragmente. Der *Golden Gate-Assembly* beruht dabei auf der Verwendung von TypII S Restriktionsenzymen, die außerhalb ihrer Erkennungssequenzen schneiden und 4 bp lange Überhänge (*sticky ends*) erzeugen. Durch Verdau und Ligation der einzelnen Fragmente können diese in einer Reaktion zu einer TALE-Domäne zusammengefügt werden. Über Klonierung der TALE-Domäne in einen Vektor, welcher neben amino- und carboxyterminalen Elementen des TAL-Effektors auch die *FokI*-Domäne enthält, können so entsprechend TALEN durch modularen Zusammenbau hergestellt werden ¹⁵⁰. Das FLASH-System (engl. *fast ligation-based automatable solid-phase high-throughput*) beruht dagegen auf dem schrittweisen Zusammenbau einzelner TALE-Einheiten über magnetische Bindungen an eine Festphase. Durch Restriktion und Ligation werden diese nacheinander zusammengefügt und anschließend ebenfalls in einen dafür vorgesehenen Vektor kloniert, so dass funktional TALENs entstehen ¹⁵¹.

2.2.5 Dual Luciferase Single Strand Assay (DLSSA)

Der DLSSA ist eine Methode, um die Aktivität bzw. Effizienz von ZFNs und TALENs in transient transfizierten Zellen zu quantifizieren. Das System basiert auf dem Dual-Luciferase Reporter® Assay System von Promega und erlaubt die sequentielle Messung zweier unabhängiger Reporterenzyme, der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase. Dabei ist das *Firefly*-Reporterkonstrukt gentechnisch so verändert, dass dieses zwei unvollständige Kopien der kodierenden Region des *Firefly*-Gens enthält, welche durch die DNA-Erkennungssequenz der ZFNs bzw. TALENs unterbrochen wird (siehe [Abb. 2.2, I.](#)). Die 5'-Kopie setzt sich dabei aus etwa 2/3 des aminoterminalen Teils des *Firefly*-Gens zusammen, die 3'-Kopie aus 2/3 des carboxyterminalen Teils. Diese voneinander getrennten Fragmente haben etwa 600 bp an homologen Sequenzbereichen gemeinsam, besitzen jedoch keine Luciferase-Aktivität. Ein durch ZFNs oder TALENs verursachter DSB führt zur Rekombination der flankierenden, homologen Bereiche und somit zur Wiederherstellung der *Firefly*-Luciferase Aktivität (siehe [Abb. 2.2, II.-V.](#)). Der zugrunde liegende Mechanismus beruht hierbei auf dem sog. *single-stranded annealing* Reparatursystem. Nach erfolgtem Schnitt der ZFNs bzw. TALENs wird die DNA dabei an den 5'-Enden jeweils soweit zurückgeschnitten, dass beide

flankierenden homologen Bereiche des Firefly-Gens freigelegt werden. Die entstehenden 3'-Überhänge können sich so aufgrund ihrer homologen Sequenz wieder rekombinieren (siehe Abb. 2.2). Die Aktivität der Luciferase gibt demnach Auskunft über die Effizienz der ZFNs bzw. TALENs einen DSB zu erzeugen.

Die co-transfizierte *Renilla*-Luciferase dient dabei als interne Kontrolle und erlaubt die Normalisierung der bei Transfektionen auftretenden internen Variabilität, die durch Unterschiede in der Zellviabilität und/oder in der Transfektionseffizienz entstehen und so minimiert werden können.

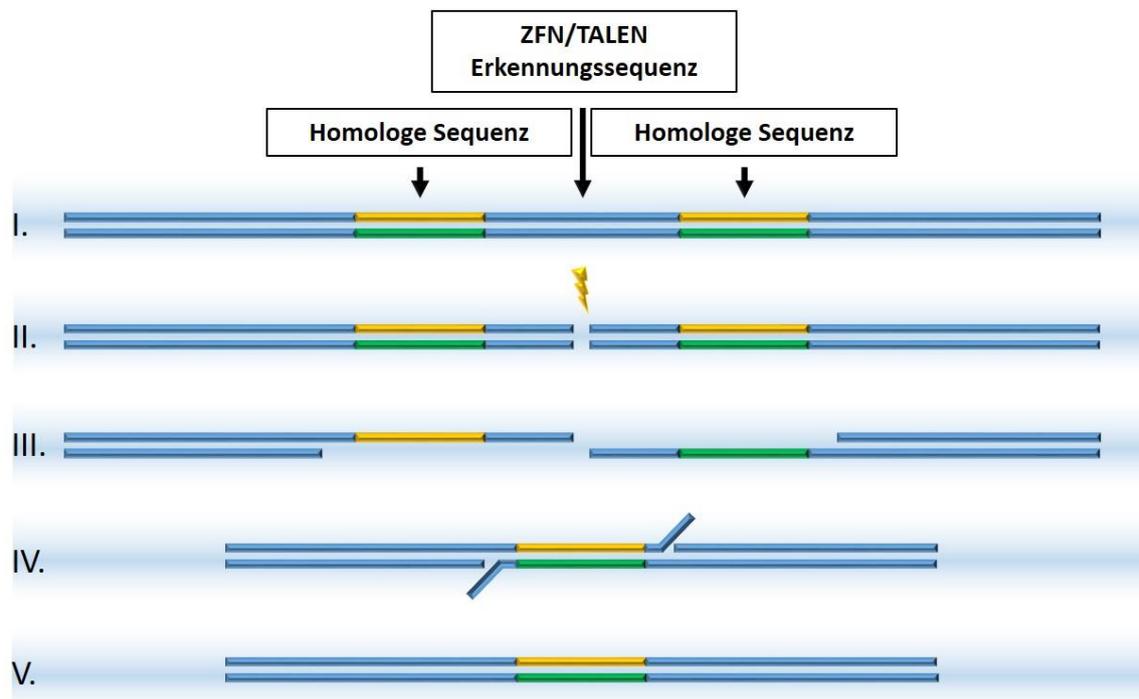


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des *Dual Luciferase Single Strand Assays* (DLSSA).

Für die Quantifizierung der Nukleasen-induzierter DSBs wurde ein Panel aus *in silico* generierten ZFNs und TALENs (siehe Abschnitt 2.2.4) getestet. Dabei wurden die unter der Kontrolle des *cytomegalovirus* (CMV) *immediate early*-Promoters stehenden Vektoren ZFN1/ZFN2 bzw. TALEN1/TALEN2, pDLSSA-*Firefly* und pDLSSA-*Renilla* verwendet. Einen Tag vor Transfektion wurden hierfür 20.000 murine Neuro2A Zellen (www.atcc.org) in 96-well Platten ausplattiert und in Dulbecco's Modified Eagle Medium [DMEM, 5 mM L-Glutamin; 10 % FBS] für 24 h kultiviert. Je 6,25 ng der entsprechenden Vektoren wurden anschließend mittels Lipofectamine 2000 co-transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet und die Aktivität der beiden Luciferasen gemessen. Die Messung der Lumineszenz erfolgte über einen Luminometer unter Verwendung des Dual-Glo Luciferase

Systems entsprechend dem Protokoll des Herstellers (www.promega.com). Die Auswertung der ZFN bzw. TALEN-Aktivität erfolgte dabei aus dem Verhältnis von *Firefly*-Luciferase Aktivität zu *Renilla*-Luciferase Aktivität.

2.2.6 Reparatur *Templates*

Das Donor-*Template*, welches den CAG-Promoter enthält, wurde aus synthetischen Oligonukleotiden und PCR-Produkten zusammengesetzt (synthetisiert von LifeTechnologies) und anschließend über eine Sequenzierung verifiziert. Die vollständige Sequenz des Reparatur-*Templates* ist dem Anhang 5.2 zu entnehmen. Der Vektor setzt sich dabei aus Sequenzabschnitten zusammen, die u.a. den linken und rechten Homologiearm markieren, sowie den CAG-Promoter, welcher in die genomische DNA eingebaut werden soll. Der CAG-Promoter besteht dabei aus einem *cytomegalovirus early enhancer*-Element, einem Promoter, der sich aus dem ersten Exon und ersten Intron des β -Aktin Gens des Huhns zusammensetzt, sowie aus einem *Splice*-Akzeptor des β -Globin Gens des Hasen ¹⁵².

Das NheI-Donorplasmid wurde durch das Entfernen des CAG-Promoters aus dem Reparatur-*Template* über einen NheI-Verdau hergestellt. Durch den Verdau verbleibt eine einzelne NheI-Restriktionsstelle, welche für den Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP-Assay) verwendet wurde.

2.2.7 IVT mRNA-Synthese

Die *in vitro* Transkription beruht auf der Verwendung monomerer DNA-abhängiger RNA-Polymerasen, die anders als in Pro- oder Eukaryoten keine weiteren Untereinheiten für die Initiation des Transkriptionsprozesses benötigen. Zu diesen zählen unter anderem die T7-, T3- und die Sp6-Polymerase. Bei der im Folgenden verwendeten T7-Polymerase handelt es sich um ein 883 aa großes Enzym (MW 90 kDa), das erstmals 1986 aus den mit T7-Bakteriophagen infizierten *Escherichia coli* Zellen isoliert wurde. Diese erkennt eine 23 bp lange Konsensussequenz, die aus zwei funktional unterschiedlichen Bereichen besteht. Die Bindung der T7-Polymerase erfolgt dabei an den Positionen -17 bis -6, während sich die Initiation auf den Bereich -6 bis +6 beschränkt. Dabei interagiert die Polymerase asymmetrisch mit dem Promoter (mit Kontakt an den Positionen -17 bis -13, -7 bis -1, -14 bis -9 und -3 bis +2), welche sich hauptsächlich in der großen Furche der DNA ergibt. Diese Interaktion ist für die Entwindung und Auftrennung der DNA wichtig, so dass über die

komplementäre Basenpaarung am *sense*-Strang mRNA synthetisiert werden kann. Für die *in vitro*-Transkription ist ebenfalls die Verfügbarkeit eines 5'-Überhangs bzw. eines *blunt end* am Ende des *Templates* von Vorteil, weshalb Plasmide vor IVT mRNA-Synthese linearisiert werden. So wird einerseits verhindert, dass vom komplementären Strang ebenfalls RNA synthetisiert wird, zum anderen wird die Länge des abzulesenden DNA-Abschnitts definiert¹⁵³.

Für die Synthese der IVT mRNA wurden zunächst die 3xFLAG-markierten Nukleasen T1 und Z3 aus dem Originalvektor geschnitten und in einen Poly(A)-120-Schwanz enthaltenen pVAX1 subkloniert (siehe Abschnitt 2.2.1.5). Die so erhaltenen Plasmide wurden anschließend für die *in vitro*-Transkription über das Enzym XbaI linearisiert, aufgereinigt und die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe Abschnitte 2.2.1.3, 2.2.1.4 und 2.2.2). Die Transkription der *Templates* erfolgte über das MEGAscript T7 Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

Den Ansätzen wurden dabei unterschiedlich modifizierte Nukleotide in unterschiedlichen prozentualen Anteilen beigefügt. Tabellen 2.5 geben das genaue Pipettierschema, sowie den Anteil der modifizierten Nukleotide im Reaktionsansatz wieder.

Tab. 2.5: Reaktionsansatz für unmodifizierte und modifizierte RNA

unmodifiziert				
Reagenz	Volumen (µl)	Molarität Lösung (mM)	Endmolarität Ansatz (mM)	Anteil Nukleotid (%)
ATP	2,0	75	7,5	100 %
CTP	2,0	75	7,5	100 %
UTP	2,0	75	7,5	100 %
GTP	1,0	75	3,75	-
ARCA	1,2	100	6	-
Reaktionspuffer (10X)	2,0	-	-	-
Plasmid	1 µg	-	-	-
Enzym Mix	ad 20 µl	-	-	-
DEPC-H ₂ O	2,0	-	-	-

25 % s2Uridin (s2U), 25 % 5-Methylcytosin (m5C)				
Reagenz	Volumen (µl)	Molarität Lösung (mM)	Endmolarität Ansatz (mM)	Anteil Nukleotid (%)
ATP	2,0	75	7,500	100 %
CTP	1,5	75	5,625	75 %
m5CTP	2,5	15	1,875	25 %
UTP	1,5	75	5,625	75 %
s2UTP	2,5	15	1,875	25 %
GTP	1,0	75	3,750	-
ARCA	1,2	100	6,000	-
Reaktionspuffer (10X)	2,0	-	-	-
Plasmid	1 µg	-	-	-
Enzym Mix	ad 20 µl	-	-	-
DEPC-H ₂ O	2,0	-	-	-

100 % Pseudouridin (Ψ), 100 % 5-Methylcytosin (m5C)				
Reagenz	Volumen (µl)	Molarität Lösung (mM)	Endmolarität Ansatz (mM)	Anteil Nukleotid (%)
ATP	2,0	75	7,5	100 %
m5CTP	2,0	75	7,5	100 %
Ψ-UTP	2,0	75	7,5	100 %
GTP	1,0	75	3,75	-
ARCA	1,2	100	6	-
Reaktionspuffer (10X)	2,0	-	-	-
Plasmid	1 µg	-	-	-
Enzym Mix	ad 20 µl	-	-	-
DEPC-H ₂ O	2,0	-	-	-

Für die IVT mRNA-Synthese wurden alle Reagenzien auf Eis aufgetaut und die Ansätze entsprechend auf Eis pipettiert. Dabei wurden je 1 µg an Plasmid-DNA als *Template* verwendet. Nachdem die Reaktionsansätze angesetzt waren, wurden diese jeweils vorsichtig gemischt und für 2-3 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Nach Transkription durch die T7-Polymerase wurde je 1 µl TurboDNase den Ansätzen beigefügt, um die enthaltene DNA abzubauen. Diese wurden wiederum bei 37 °C für 15 min inkubiert.

Für die nachfolgende Aufreinigung der IVT mRNA wurde das MEGAclean Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die synthetisierte mRNA wurde auf

ein Volumen von 100 µl mit der im Kit enthaltenen Elution Solution aufgefüllt und nachfolgend mit 350 µl Binding Solution und 250 µl 100 %igen EtOH versetzt. Damit die RNA vom restlichen Ansatz isoliert werden konnte, wurde der komplette Ansatz auf Säulen übertragen und für 30 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die an den Säulen gebundene RNA zwei Mal mit je 500 µl Wash Solution gewaschen (13.000 rpm, 30 s), um etwaige Reste an Nukleotiden, Enzym und DNA zu entfernen. Anschließend wurde die Säule bei 13.000 rpm für 1 min trocken zentrifugiert, um mögliche Ethanolreste zu entfernen. Zur Elution der synthetisierten mRNA wurden die Säulen in neue, RNase-freie *Tubes* überführt und die Säule selbst mit 40 µl Elution Solution beladen. Der Ansatz wurde bei 70 °C für 10 min im Schüttler inkubiert, so dass sich die RNA von der Membran der Säule lösen konnte. Nach erneutem Abzentrifugieren für 1 min bei 13.000 rpm konnte so die aufgereinigte RNA erhalten werden. Dieser Schritt wurde ebenfalls unter den gleichen Bedingungen wiederholt, um restlich gebundene RNA zu eluieren. Die Konzentration der RNA wurde nachfolgend am Nanophotometer ermittelt (siehe Abschnitt 2.2.2). Die Lagerung der IVT mRNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C im Gefrierschrank.

2.2.8 Zellkultur und Transfektionen

Um Kontaminationen der Zellen mit Bakterien, Pilzen oder Viren zu vermeiden, wurde stets unter Laminar-Flow Reinluftwerkbänken gearbeitet. Alle verwendeten Materialien wurden entweder steril filtriert, autoklaviert oder steril verpackt vom Hersteller geliefert. Die Arbeitsfläche der Werkbank sowie alle verwendeten Gegenstände wurden vor und nach der Benutzung mit 70 %igem EtOH desinfiziert.

2.2.8.1 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in 175 cm² großen Zellkulturflaschen, in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Das entsprechende Kulturmedium ist den einzelnen Abschnitten zu entnehmen.

A549 Zellen: Diese Zelllinie besteht aus humanen, alveolären Adenokarzinom-Zellen, die erstmals 1972 durch Giard und Kollegen isoliert wurden. Die Zelllinie stammt dabei aus

einem 58-Jahre alten Mann kaukasischer Herkunft und repräsentiert basale Epithelzellen. Im normalen Lungengewebe sind diese plattenförmigen Zellen für den Transport von Wasser und Elektrolyten über die alveoläre Membran verantwortlich. Unter Kulturbedingungen sind die Zellen hypotriploid, positiv auf Keratin und in der Lage Lecithin zu synthetisieren. Zudem enthalten sie einen hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren, welche wichtig für die Erhaltung der Phospholipide in der Zellmembran sind. A549-Zellen wachsen in Kulturgefäßen adhärent in Form eines flachen Zellrasens, einem sog. *monolayer*¹⁵⁴. Als Grundmedium wurde Dulbecco's MEM (DMEM) mit einem Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet.

MLE12-Zellen: Die murine Zelllinie besteht aus epithelialen, adhärent wachsenden Lungenzellen. Diese wurde erstmals 1992 durch Wikenheiser et. al. aus Lungentumoren einer fünf Monate alten, weiblichen transgenen Maus isoliert. Charakteristisch ist unter anderem die Expression der *Surfactant* Proteine B und C. Die Zellen wurden in DMEM, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Primäre Fibroblasten aus transgenen SP-B Mäusen: Fibroblasten sind im Bindegewebe vorkommende Zellen mesenchymalen Ursprungs. Die Zellen stammen dabei aus der Rückenhaut der transgenen Mauslinie SP-C rtTA/(teto)₇ SP-B/SP-B^{-/-} (siehe Abschnitt 2.2.15.1). Die Kultivierung erfolgte in speziellem Fibroblastenmedium (DMEM/Ham's F-12 Medium versetzt mit 10 % FCS, 1x MEM nicht-essentielle Aminosäuren, 1x Natriumpyruvat, 0,1 mM 2-Mercaptoethanol, 1 % Penicillin/Streptomycin).

2.2.8.2 Subkultivierung

Die Zellen wachsen in den Zellkulturflaschen aufgrund der elektrostatisch geladenen und mit Amino- und Carboxylgruppen beschichteten Oberfläche als Monolayer. Durch Kontaktinhibition der Zellen kann jedoch eine weitere Proliferation gehemmt werden. Sobald die Zellen zu ca. 80 – 90 % konfluent waren, wurden diese entweder subkultiviert oder für weitere Versuche in entsprechender Zellzahl ausplattiert. Dazu wurde das Medium abpipettiert und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Um die Zellen vom Boden der Kulturflaschen zu lösen wurde anschließend 2 ml 0,25 % Trypsin-haltige EDTA-Lösung auf die Zellen pipettiert und diese 2 – 3 min im Brutschrank

bei 37 °C inkubiert. Durch die Trypsin-EDTA-Lösung verursachte Proteolyse der Adhäsionsproteine wurden die Zellen vom Boden abgelöst. Die Zugabe von 10 ml vorgewärmten Kulturmedium stoppte die Reaktion, um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden. Diese wurden resuspendiert und je nach Zellzahl in ein neues Zellkulturgefäß mit 25 ml frischem Kulturmedium gegeben. Für die Subkultivierung wurden die Zellen wiederum im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.8.3 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der resuspendierten Zellsuspension mit einem gleichen Volumen an Trypan-Blau gemischt und für 2 min inkubiert. Tote Zellen nehmen dabei aufgrund der nicht intakten Zellmembran den Farbstoff auf. Das Gemisch wurde anschließend seitlich auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetropft und durch Kapillarkraft in diese gesaugt. Lichtmikroskopisch (40x Vergrößerung) wurden vier Großquadrate, bestehend aus je 16 Kleinquadraten, mäanderförmig ausgezählt. Das doppelte Zählen von Zellen, die auf den Linien der großen Quadrate lagen, wurde durch Diskriminierung zweier Ränder vermieden. Das aus den vier Großquadraten gebildete arithmetische Mittel wurde mit dem Kammerfaktor 104 multipliziert. Dieser ergab sich aus der Fläche eines Großquadrates (0,1 mm²) und der Kammertiefe (0,1 mm), woraus sich ein Volumen von 0,1 µl errechnen lies. Durch Einbeziehen des Kammerfaktors konnte so die ermittelte Zellzahl auf einen Milliliter bezogen werden, wobei zusätzlich der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden musste.

Bei Einbeziehung der 1:1-Verdünnung mit Trypan-Blau ergab sich die Zellzahl pro Milliliter nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \emptyset \text{ Zellzahl der Großquadrate} \times 10^4 \times 2$$

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet auf die gewünschte Konzentration durch Zugabe von Kulturmedium eingestellt.

2.2.8.4 Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man den Transfer von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen. Dieser kann sowohl über chemische (u.a. Lipofection, Kalzium-Phosphat Präzipitation, Nanopartikel) als auch physikalische (u.a. Mikroinjektion, Elektroporation, Sonoporation) Methoden erreicht werden. Bei der Lipofection mittels Lipofectamine 2000 handelt es sich um die Verwendung kationischer, liposomaler Formulierungen, welche über die positiv geladenen Stickstoffatome in den Kopfgruppen der Lipide die negativ geladenen Nukleinsäuren komplexieren und so die elektrostatische Abstoßung der Zellmembran überwinden. Die Lipide sind dabei häufig mit Co-Lipiden versetzt, welche die Fusion der Liposomen mit der Zellmembran vermitteln. Über Endozytose gelangen die Nukleinsäuren schließlich in die Zelle¹⁵⁵.

Für die Transfektionen wurden die Zellen am Vortag entsprechend Abschnitt 2.2.8.2 und 2.2.8.3 vom Boden der Kulturflaschen gelöst und die Lebendzellzahl bestimmt. 50.000 bzw. 80.000 Zellen pro *well* wurden in 24-*well* Platten in je 500 µl Antibiotika-freiem Kulturmedium ausgelegt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Sofern die Zellen am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70 – 90 % aufwiesen, wurden die Zellen entsprechend behandelt. Dazu wurden zwei Reaktionsgefäße (A+B) vorbereitet. Für jedes zu transfizierende *well* wurden 2 µl Lipofectamine 2000 mit 48 µl Opti-MEM in Reaktionsgefäß A zusammen vorgelegt und gemischt. Anschließend wurde der Ansatz 5 min inkubiert. In Reaktionsgefäß B wurde die zu transfizierende mRNA mit Opti-MEM auf ein Volumen von 50 µl gebracht. Nach der Inkubationszeit wurden die beiden Ansätze miteinander vermischt und weitere 20 min bei RT inkubiert, so dass sich die Nukleinsäure-Lipofectamine Komplexes bilden konnten. Die 100 µl an Komplexen wurden nachfolgend auf die ausgesäten Zellen pipettiert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium versehen und so lange kultiviert bzw. passagiert, wie es der jeweilige Versuch vorsah.

2.2.8.5 Transduktion

Als Transduktion bezeichnet man das Einbringen fremder DNA in Zellen über virale Vektoren. Um das Verhältnis der Viruspartikel zu den Zielzellen zu beschreiben, wird die sog. MOI (engl. *multiplicity of infection*) herangezogen. Liegt diese bei 1, so werden genauso

viele virale Agenzien verwendet wie Zellen in der Kulturflasche vorhanden sind. Die MOI kann durch folgende Formel berechnet werden:

$$MOI = \frac{Volumen_{virus} \times Konzentration_{virus}}{Volumen_{zellkultur} \times Konzentration_{zellkultur}}$$

Für die Transduktion wurden wie bei der Transfektion (siehe Abschnitt 2.2.8.4) ebenso die zu behandelnden Zellen am Tag vor der Transduktion in entsprechender Zellzahl (50.000 bzw. 80.000 Zellen pro *well*) in 24-*well* Platten in je 500 µl Serum- und Antibiotika-freiem Medium ausgesät. Bei einer Konfluenz von ebenfalls 70 – 90 % wurden die Zellen am Tag der Behandlung einmal mit je 500 µl PBS gewaschen, anschließend mit je 500 µl Opti-MEM bedeckt und mit einer MOI von 1×10^5 v.g. (engl. *viral genomes*) versetzt. Nach 6 h bei 37 °C im Brutschrank wurde den Zellen 10 % FCS zugegeben und nach weiteren 24 h das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und nachfolgend 500 µl Kulturmedium hinzugefügt. Die transduzierten Zellen wurden anschließend bis zum Versuchsende im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.9 Isolation genomischer DNA

Um Veränderungen genomischer DNA durch Nuklease-induzierte Schnitte zu verifizieren wurde aus *in vitro* behandelten Zellen (siehe Abschnitte 2.2.8.4 und 2.2.8.5) bzw. Lungengewebe von SP-B-Mäusen DNA isoliert. Dazu wurde das NucleoSpin® Tissue Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

Für die Lyse des Probenmaterials wird eine Proteinase K-/SDS-Lösung verwendet, welche die Zellen/das Gewebe aufschließt. Die Isolation der genomischen DNA beruht wie auch das NucleoSpin® Gel and PCR clean-up Kit (siehe Abschnitt 2.2.1.2) auf der reversiblen Bindung an eine Silica-Membran. Das Protokoll kann Tab. 2.6 entnommen werden.

Tab. 2.6: Protokoll des NucleoSpin® Tissue Kit zur Isolation genomischer DNA

Protokoll	Durchführung Zellen	Durchführung Gewebe
Vorbereitung Probenmaterial	25 mg Gewebe in kleine Stücke schneiden	bis zu 10 ⁷ Zellen in 200 µl Puffer T1 aufnehmen; Zugabe von 25 µl Proteinase K und 200 µl Puffer B3; Vortexen und 10 – 15 min bei 70 °C inkubieren
Prä-Lyse	Zugabe von 180 µl Puffer T1 und 25 µl Proteinase K; Vortexen und bei 56 °C mind. 1 – 3 h (oder o/n) inkubieren	
Lyse	Zugabe von 200 µl Puffer B3; Vortexen und 10 min bei 70 °C inkubieren	
Einstellung der DNA-Bindungs-Bedingungen	Zugabe von 200 µl EtOH (100 %)	
DNA-Bindung an die Säule	Auftrag des DNA-/Protein-Gemisch auf die Silica-Säule; Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g; Durchfluss verwerfen	
Waschschritt (1)	Zugabe von 500 µl Puffer BW auf die Säule; Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g; Durchfluss verwerfen	
Waschschritt (2)	Zugabe von 600 µl Puffer B5 auf die Säule; Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g; Durchfluss verwerfen	
Trocknen	Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g	
Elution	NucleoSpin® Säule in neues Reaktionsgefäß platzieren und 100 µl Puffer BE auf die Silica-Membran pipettieren; Inkubation der Säule für 1 min bei RT; Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g	
Lagerung	Lagerung der isolierten gDNA bei -20 °C im Gefrierschrank	

2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt die Vervielfältigung von spezifischen DNA-Regionen unter Verwendung des Enzyms DNA-Polymerase. Die Methode wurde in den 1980er Jahren von Mullis und Kollegen entwickelt und zählt bis heute zu einer der wichtigsten Techniken in Wissenschaft und biomedizinischer Forschung.

Die PCR setzt sich dabei aus vier Schlüsselkomponenten zusammen: (1) eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), welche aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt und den sich wiederholenden Erhitzungs- und Abkühlungszyklen während der DNA-Amplifikation standhält; (2) Nukleotid-Triphosphate (NTPs), die während der PCR eingebaut werden; (3) Proben-DNA, die als Vorlage zur Vervielfältigung dient und (4) Gen-

spezifische Primer, welche kurze, sequenzspezifische Oligonukleotide darstellen und komplementär zur untersuchten DNA sind. Die PCR besteht wiederum aus drei sich wiederholenden, konsekutiven Schritten. Während der Denaturierung wird die DNA auf ca. 90-95 °C erhitzt und so die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgetrennt. In der Phase der Elongation wird der PCR-Ansatz auf 50 - 60 °C heruntergekühlt, wodurch sich die Basen-spezifischen Primer an komplementäre DNA-Stränge anlagern können (*Annealing*). Die sich anschließende Elongation erlaubt die Synthese neuer DNA-Stränge durch Anlagerung der DNA-Polymerase an die gebundenen Primer. Das Enzym nutzt die im Ansatz vorhandenen NTPs für die Synthese dieser neuen, komplementären DNA-Stränge. Dieser Schritt wird bei 72 °C durchgeführt, bei dieser Temperatur wird eine optimale katalytische Aktivität der Taq-Polymerase erreicht ¹⁵⁶.

Die Wiederholung dieses dreistufigen Prozesses resultiert in einer theoretischen Verdopplung der Kopienzahl mit jedem Zyklus (Kopienzahl = 2^n , wobei n die Anzahl der Zyklen widerspiegelt) und führt im Idealfall zur exponentiellen Bildung von PCR-Produkten, welche jedoch nach ca. 30 – 40 Zyklen aufgrund des Verbrauchs der Reagenzien im Ansatz ein Amplifikations-Plateau erreichen. Hier sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass alle Reaktionspartner zusammenfinden.

Zum Nachweis der Nuklease-induzierter DSBs (siehe Abschnitt 2.2.11) sowie für den Nachweis von off-target-Effekten und den Einbau des Donor-*Templates* in die Zielsequenz wurden PCR-Amplifikationen durchgeführt.

Dafür wurde der AmpliTaq® Gold 360 Master Mix entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Als Negativ-Kontrolle diente der jeweilige PCR-Ansatz, jedoch ohne die Zugabe von DNA. Eine Auflistung der Reagenzien, der PCR-Bedingungen sowie der Schmelztemperatur T_m der einzelnen Primer können den Tab. 2.7, 2.8 und Abschnitt 2.1 entnommen werden.

Tab. 2.7: PCR-Ansatz

Reagenzien	Volumen
DNA (ng)	100 ng
Primer for (0,5 µM)	2 µl
Primer rev (0,5 µM)	2 µl
Master Mix	25 µl
GC-Enhancer	2 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Tab. 2.8: PCR-Bedingungen

Anzahl Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1x	Aktivierung des AmpliTaq® 360 Master Mix	95 °C	10 min
40x	Denaturierung	95 °C	30 s
	Annealing	Primer T _m	30 s
	Elongation	72 °C	60 s
1x	Finale Elongation	72 °C	7 min
1x	Finaler Halt	4 °C	∞

2.2.11 T7-Endonuklease I Assay

Der T7-Endonuklease I (T7EI) Assay ist eine Methode zur Verifizierung von Nuklease-induzierten Schnitten. Der Assay basiert auf der Detektion von Mutationen, wie Insertionen oder Deletionen innerhalb einer Heteroduplex-DNA, d.h. doppelsträngiger DNA, die *Mismatch*-Basenpaarungen aufweisen. Hierfür ist das Enzym T7-Endonuklease I verantwortlich, welches ursprünglich aus dem mit Bakteriophagen T7 infizierten Bakterienstamm *E. coli* stammt. Das Enzym ist biologisch verantwortlich für die Auflösung von sog. *holiday junctions*, viersträngigen DNA-Strukturen, die während der Replikation bzw. homologen Rekombination des Phagen auftreten. Zudem degradiert das Enzym zelluläre Wirts-DNA nach Infektion des Phagen ¹⁵⁷.

Das Prinzip des T7EI-Assay beruht auf der Amplifikation der DNA-Sequenz, in welcher der Nuklease-induzierte Schnitt erfolgt (siehe [Abb. 2.3](#)). Da nicht jede Zielsequenz geschnitten wird, kommt es im Laufe der PCR zur Vervielfältigung zweier DNA-Produkte: (1) Sequenzen, in denen kein Schnitt erfolgt und (2) Sequenzen, welche - bedingt durch den Nuklease-induzierten Reparaturmechanismus des NHEJ - kleine Mutationen aufweisen. Diese PCR-Amplikons werden nachfolgend im Zuge einer Hybridisierungsreaktion durch Erhitzen und anschließender Abkühlungsphase neu arrangiert. Durch das Erhitzen trennen sich die doppelsträngigen DNA-Fragmente voneinander und neue, komplementäre Bindungen entstehen während des Abkühlungsprozesses. Dadurch gehen vier mögliche Kombinationen an DNA-Fragmenten hervor: (1) die dsDNA setzt sich aus ungeschnittener ssDNA zusammen (Homodimere), (2) beide Stränge der dsDNA enthalten des geschnittene Produkt (Homodimere) und (3+4) die dsDNA enthält je einen ungeschnittenen bzw. geschnittenen Strang (Heterodimere).

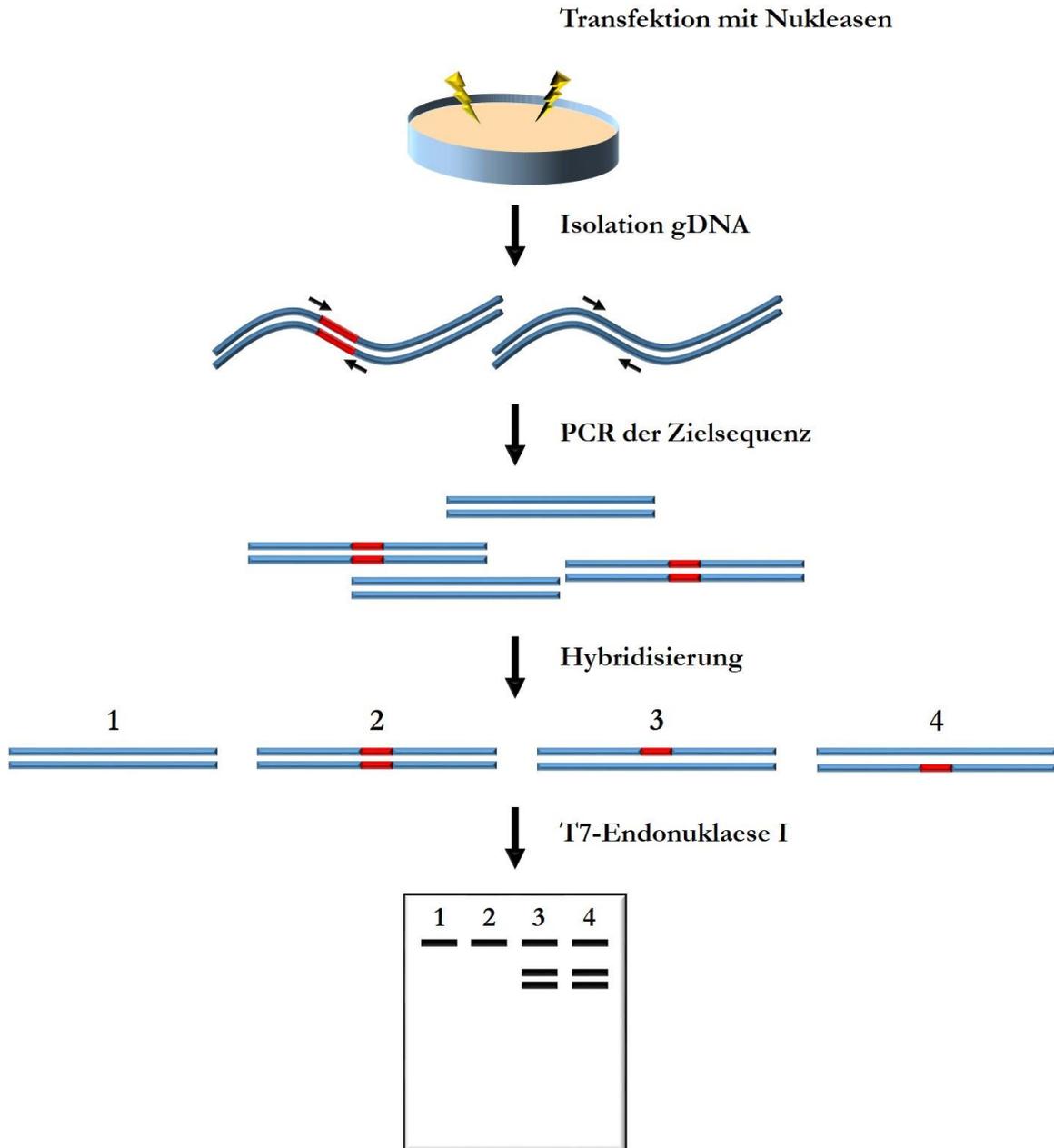


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des T7-Endonuklease I Assays.

Die T7EI erkennt solche *Mismatch*-Basenpaarungen in Heterodimeren und schneidet folglich an dieser Stelle. Dadurch entstehen kleinere DNA-Fragmente, die zusammen mit den nicht geschnittenen Homodimeren elektrophoretisch aufgetrennt werden können. So entsteht ein Bandenmuster, dessen Intensität Aufschluss über die Nuklease-Effizienz gibt (siehe [Abb. 2.3](#)).

Nach Transfektion bzw. Transduktion der entsprechenden Nukleasen *in vitro* und *in vivo* (siehe Abschnitte 2.2.8.4 und 2.2.8.5 sowie 2.2.15.2) sowie Isolation der gDNA (siehe Abschnitt 2.2.9) wurde über eine PCR die jeweiligen DNA-Abschnitte, in welcher der Nuklease-induzierte Schnitt erfolgte, vervielfältigt (siehe Abschnitt 2.2.10). Die Fragmentgröße der erhaltenen PCR-Produkte wurde anschließend auf einem Agarosegel (siehe Abschnitt 2.2.3) aufgetrennt und verifiziert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte gDNA. Die PCR-Amplikons wurden anschließend über eine EtOH-Präzipitation aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.2.1.3), in 20 µl DEPC-H₂O gelöst und die Konzentration über einen Nanophotometer bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.2). 2 µg des aufgereinigten PCR-Produkts wurden für die nachfolgende Hybridisierung mit 2 µl NEB Buffer 2 und H₂O auf ein Volumen von 19 µl gebracht. Die Hybridisierung erfolgte unter den in Tab. 2.9 beschriebenen Bedingungen. Zu den Proben wurde nachfolgend je 1 µl T7EI (10 Units) pipettiert und der Ansatz für 15 min bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl EDTA (0,25 M) gestoppt. Nach einer weiteren EtOH-Präzipitation wurde das Präzipitat in 20 µl DEPC-H₂O gelöst und die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Um die Effizienz der Nukleasen zu beurteilen, wurde die Intensität der Banden über das Programm ImageJ quantifiziert.

Tab. 2.9: Hybridisierungs-Bedingungen

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	5 min
Hybridisierung	95 - 85 °C	-2 °C/s
	85 - 25 °C	-0,1 °C/s
Lagerung	4 °C	∞

2.2.12 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein quantitatives Messverfahren zur Analyse der Expression von Zelloberflächenmolekülen sowie intrazellulärer Proteine, Peptide oder DNA. Das Verfahren ist weitläufig auch unter dem Namen FACS (engl. *fluorescence activated cell sorting*) bekannt, ist jedoch ein urheberrechtlich geschützter Name. Grundlage der Analyse ist eine (gefärbte) Einzelzellsuspension, welche über eine Kapillare in das Messgerät eingesaugt und dabei von einem Laserstrahl erfasst wird (siehe Abb. 2.4). Das so entstehende Streu- und Fluoreszenzlicht der Zellen kann über Detektoren separat nachgewiesen werden. Dabei

korreliert das gestreute Licht mit der Größe und der Komplexität der Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. *forward scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und korreliert mit der Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. *side scatter*) ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel darstellt. Das SSC hängt von der Granularität und Dichte innerhalb der Zelle ab. Neben dem Streulicht kann auch Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlängen detektiert werden. Fluorochrome emittieren dabei Licht definierter Wellenlänge, sobald diese den Laser passieren. Dieses kann über geeignete Filter und Spiegel innerhalb des Geräts von Sensoren (sog. *photomultiplying tubes*, PMTs) erfasst und detektiert werden (siehe [Abb. 2.4](#)). Die PMTs wiederum konvertieren die Energie eines Photons in ein elektrisches Signal. Dabei misst das PMT die Amplitude eines jeden Pulses, das von den Photonen der fluoreszierenden Zellen ausgeht. Der Ausschlag der Amplitude korreliert direkt mit der Intensität der Fluoreszenz. Während der Messung ist es möglich mehrere, verschiedene Marker zu detektieren, sofern sich die Wellenlängen des emittierenden Fluoreszenzlichts der eingesetzten Fluorophore unterscheiden. Da die Fluorophore jedoch nicht streng eine Farbe ausstrahlen, sondern ein ganzes Farbspektrum, gelangt das Fluoreszenzsignal eines Fluorophors nicht nur in den dafür vorgesehenen Kanal, sondern verursacht teilweise auch in anderen Kanälen einen Impuls. Dies beeinträchtigt die zu beurteilenden Ergebnisse und kann zu falsch positiven Signalen führen. Aus diesem Grund wird bei Mehrfachmessungen eine Kompensation durchgeführt, also eine Korrektur jedes Fluoreszenzkanals für die jeweilige spektrale Überlappung.

Um die Expression 3xFLAG-markierter TALENs und ZFNs in MLE12-Zellen sowie in Lungenzellen (Clara- und AT-II-Zellen) zu quantifizieren wurden diese mit entsprechenden Oberflächen- und intrazellulären Markern gefärbt. Die hierfür verwendeten Antikörper sind [Tab. 2.10](#) zu entnehmen. Zuvor transfizierte MLE12-Zellen (siehe [Abschnitt 2.2.8.4](#)) wurden dafür vom Boden der 24-*well* Platte abgelöst, gezählt und zu je 1×10^6 Zellen in FACS-*Tubes* überführt. Diese wurden anschließend mit PBS gewaschen und für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde entsprechend der intrazellulären Färbung weiter behandelt. Um die Lungenzellen aus dem Gewebe zu gewinnen, wurde nach Organentnahme (siehe [Abschnitt 2.2.15.4](#)) die Lunge in kleine Gewebestücke mit einem Skalpell geschnitten. Für den Verdau des Gewebes wurden die Gewebestücke in Kollagenase Typ I-haltigem Medium (DMEM, 1 mg/ml Kollagenase Typ I, 1 % DNase, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin) für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Kollagenase degradiert dabei dreifach

helikale, native Kollagenfibrillen durch die Spaltung der Verbindung zwischen einer neutralen Aminosäure X und Glycin (Gly) an der Sequenz Pro-X-Gly-Pro. Für die weitere Auftrennung wurde das verdaute Gewebe anschließend durch ein 70 µm Zellsieb passiert und dieses mit 50 ml PBS nachgespült. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert. Nachfolgend wurde die Suspension über ein 40 µm Zellsieb weiter aufgetrennt, so dass sich eine Einzelzellsuspension ergab. Das Sieb wurde wiederum mit 50 ml nachgespült. Nach Zentrifugation bei 300 x g für weitere 10 min wurde der Überstand verworfen und die Zellen

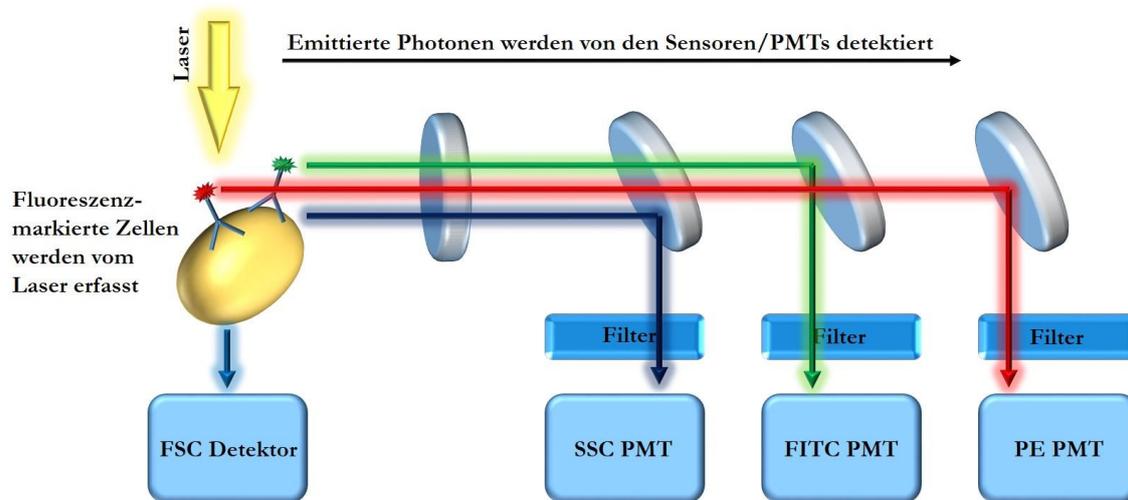


Abb. 2.4: Messung von Streulicht und Fluoreszenz bei der Durchflusszytometrie. Zellen, welche den Laserstrahl passieren, werden entsprechend ihrer Größe über das Vorwärtsstreulicht vom FSC Detektor detektiert. Das Seitwärtsstreulicht wird dagegen vom SS PMT-Sensor erfasst und misst die Dicht bzw. Granularität der Zelle. Die vom Laser angeregten Fluorophore emittieren Licht entsprechender Wellenlänge und werden über Spiegel und Filter von PMT-Sensoren erfasst. So werden die vom Laserstrahl angeregten Photonen entsprechend der emittierenden Wellenlänge der Fluorophore von spezifischen PMT-Sensoren (bspw. FITC bei 519 nm und PE bei 575 nm) detektiert und gemessen.

in 10 ml ACK (Amonium-Chlorid-Kalium)-Lysepuffer für 5 min bei RT aufgenommen. Dadurch wurden die roten Blutzellen lysiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 300 x g für 5 min wurde das Pellet nochmals in 10 ml PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert (300 x g, 5 min) Nach Bestimmung der Zellzahl und Einstellen dieser auf je 1×10^6 Zellen (siehe Abschnitt 2.2.8.3) standen die isolierten Zellen für die anschließende FACS-Färbung bereit.

Für die Färbung von Oberflächenmolekülen wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen, mit dem entsprechenden Antikörpern versetzt und für 15 – 30 min im Dunklen bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen, bei 300 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Rücklauf an Puffer im Röhrchen wurde für die anschließende Messung verwendet.

Tab. 2.10: Verwendete FACS-Antikörper, deren Bindungsspezifität sowie die emittierenden Wellenlängen der korrespondierenden Fluorochrome

Antikörper	Epitop	emittierte Wellenlänge	intrazellulär/ extrazellulär
PE anti-mouse CD45, Clone 30-F11	CD45 (<i>leucocyte common antigen</i> , LCA)– Glykoprotein, exprimiert auf hämatopoetischen Zellen, außer Erythrozyten und Thrombozyten	532 nm	extrazellulär
PE anti-mouse CD31, Clone MEC13.3	CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1) – Glykoprotein exprimiert auf endothelialen Zellen	532 nm	extrazellulär
APC anti-mouse Ly6A/E (Sca-1)	Ly-6A/E (Sca-1) – Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-gebundenes Protein exprimiert auf hämatopoetischen Stammzellen	633 nm	extrazellulär
anti-Clara Cell Secretory Protein mit APC anti-mouse IgG1, Clone RMG1-1	Clara Cell Secretory Protein (CCSP) – Uteroglobulin exprimiert auf Clara-Zellen	633 nm	extrazellulär
Monoclonal anti-FLAG® M2-FITC, Clone M2	FLAG-Fusionsproteine – exprimiert in 3xFLAG TALENs und ZFNs	492 nm	intrazellulär

Bei (zusätzlicher) intrazellulärer Färbung wurden die Zellen vorher mit dem BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit permeabilisiert und fixiert. Dazu wurde das Zellpellet in 250 µl Fixation/Permeabilization Solution aufgenommen und 20 min bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in je 1 ml 1x BD Perm/Wash Buffer wurde das Pellet in 50 µl 10x BD Perm/Wash Buffer resuspendiert und das entsprechende Volumen an Fluorochrom-markierten Antikörpern zugegeben. Die Ansätze wurden anschließend für 30 – 60 min bei 4 °C im Dunklen inkubiert, wiederum in je 250 µl 1x BD Perm/Wash Buffer gewaschen und für die Messung in Staining Buffer resuspendiert. Die Analysen wurden am LSR-II Durchflusszytometer durchgeführt. Für jeder Probe wurden mindestens 10.000 Zellen gemessen und die Ergebnisse als durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (MFI, engl. *mean fluorescence intensity*) dargestellt.

Die für diese Arbeit verwendeten Antikörper und deren Bindungsreaktivität sowie die emittierenden Wellenlängen der entsprechenden Fluorochrome können Tab. 2.10 entnommen werden.

2.2.13 Nanopartikel

Die Herstellung von Polylactid-co-Glycolid (PLGA, engl. *poly lactic-co-glycolic acid*) -Nanopartikeln (NPs) erfolgte am Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung, Saarbrücken, unter der Leitung von Prof. Claus-Michael Lehr. Die NPs wurden bereits fertig für die Beladung von IVT mRNA TALENs und ZFNs geliefert.

Die mit Chitosan beladenen PLGA-NPs können über verschiedene Methoden, wie dem Aussalzen, der Nanopräzipitation oder der *cross-flow*-Filtration hergestellt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten NPs wurden über ein spezielles Verfahren der Emulsionspolymerisation (*emulsion-diffusion-evaporation*-Technik) synthetisiert¹⁰⁶. Dabei wurden 100 mg PLGA [Poly-d,l-lactide-co-glycolide, 75:25 (Resomer RG 752H)] in Ethylacetat gelöst und tropfenweise zu einer mit 15 mg Chitosan [83 % deacetyliert (Protasan UP CL 113)] enthaltenden 2,5 %igen PVA (Polyvinylalkohol, Mowiol 4-88)-Lösung (Stabilisierer) hinzugefügt. Die Emulsion wurde für 1 ½ h bei RT gerührt und anschließend bei 17.000 rpm für 10 min in einem Polytron PT 2500E homogenisiert. Die so erhaltenen positiv geladenen NPs wurden steril filtriert und über einen Malvern Zetasizer Nano ZSP charakterisiert (hydrodynamischer Durchmesser: $157,3 \pm 0,87$; PDI (*polydispersity index*): 0,11; Zetapotential: $+30,8 \pm 0,115$ mV).

Pro Maus wurden 100 µl der fertigen und mit mRNA beladenen Nanopartikel appliziert (siehe Abschnitt 2.2.15.2) Dabei wurden je 20 µg mRNA (10 µg linker Z3, 10 µg rechter Z3) den NPs beigefügt und mit PBS auf das entsprechende Endvolumen gebracht.

2.2.14 AAV-Vektor Produktion

AAV-Vektoren vom Serotyp 6 für das ZFN-Paar Z3 sowie der Donorsequenz wurden über die Firma Virovek, Inc. produziert und gekauft. Die Synthese der AAV-Vektoren erfolgt dabei über einen dreistufigen Prozess: (1) Subklonierung des Zielgens (GOI, engl. *gene of interest*) in *Shuttle*-Vektoren, (2) Generierung von Baculoviren, welche das GOI enthalten und (3) AAV-Vektor Produktion.

Die Verwendung der aus dem Virus AcMNPV (*Autographa Californica multiple nucleopolyhedrovirus*) stammenden rekombinanten Baculoviren bzw. das Sf9/Baculovirus System ist in der Gentechnologie eine weit verbreitete Methode für die Großproduktion von AAV-Vektoren. Das System beruht auf der Infektion von Insektenzellen (Sf9-Zellen) mit drei rekombinanten Baculoviren, welche die *rep*- und *cap*- Gene auf je zwei separaten

Baculoviren bereitstellen und zusätzlich den rAAV-Vektor auf einem weiteren Baculovirus. Dadurch können AAV-Mengen in der Größe von $1,1 \times 10^{14}$ Vektorgenomen (v.g.)/L hergestellt werden ¹⁵⁸.

2.2.15 Tierexperimente

Sämtliche Tierexperimente wurden entsprechend den Richtlinien der Tierschutzkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen (Projekt-Nr. K4/11) durchgeführt.

2.2.15.1 Versuchstiere und Haltung

Die Versuchstiere wurden unter konstanten, pathogenfreien Standardlaborbedingungen bei 22 ± 2 °C und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 57 % gehalten. Die Besetzungsdichte pro Käfig (Makrolonkäfig Typ IV) lag dabei bei 1 – 6 Mäusen. Die Versuchstiere wurden zudem unter einem künstlichen Tag-/Nachtrhythmus (12 h-Zyklus) gehalten und erhielten eine Fütterung *ad libitum* mit Doxycyclin-haltigen/-freien Pellets und autoklaviertem Wasser.

Für die Versuche der Genkorrektur wurden 6 – 8 Wochen alte BALB/c- bzw. transgene SP-B Mäuse [SP-C rTA/(teto)₇ SP-B/SP-B^{-/-}] verwendet.

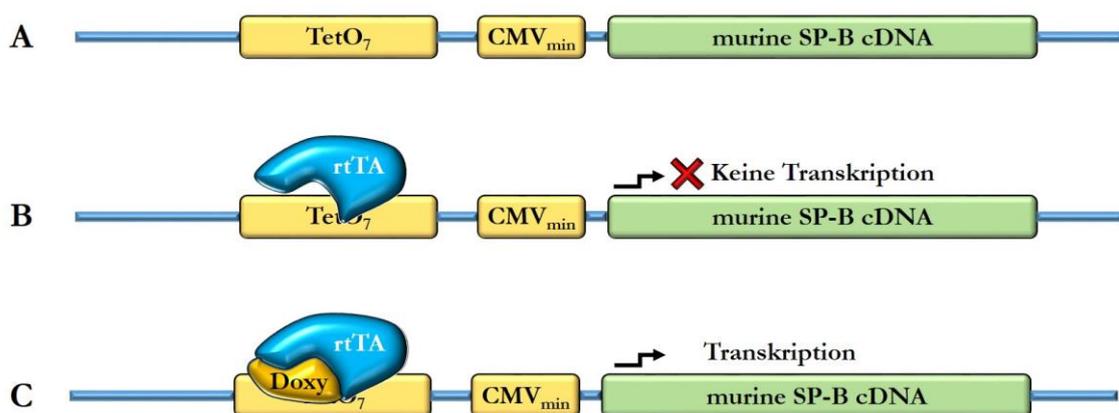


Abb. 2.5: Muriner SP-B Locus und das Doxycyclin-abhängige System. (A) Der murine SP-B Locus besteht aus einem TetO₇-Promoter, einem CMV minimal Promoter sowie der distal gelegenen SP-B cDNA. (B) In Abwesenheit von Doxycyclin (Doxy) kann der TetO₇-Promoter nicht gebunden werden. Das reverse Tetracyclin-abhängige Transaktivator-Protein (rtTA) wird erst durch die Bindung an Doxycyclin aktiv. Die Transkription der SP-B cDNA bleibt folglich aus. (C) Nach Bindung von Doxycyclin an den Aktivator bindet der Komplex an den Promoter und es kommt zu Transkription und damit Expression von SP-B.

Bei den SP-B-Mäusen handelt es sich um eine transgene Linie, welche 2003 von Melton und Kollegen das erste Mal beschrieben wurde ¹⁵⁹. In die Mauslinie wurde eine transgene SP-B cDNA Kasette, welche unter der Kontrolle eines Tetracyclin-abhängigen (TetO)₇-Promoters steht, eingebracht (siehe [Abb. 2.5](#)). Das SP-B Protein wird dabei nur konditionell, unter der Kontrolle des reversen Tetracyclin-Transaktivator Proteins (rtTA) in Typ II Zellen in SP-B^{-/-} Mäusen exprimiert. Der Aktivator ist wiederum abhängig von der Anwesenheit und Bindung von exogen zugeführtem Doxycyclin. Bindet dieses an den Aktivator, wird dieser aktiv und kann nachfolgend an den (teto)₇-Promoter binden. Dadurch wird die Transkription der *downstream* gelegenen SP-B cDNA initiiert und es kommt zur Expression von funktionalem *Surfactant* Protein B. In Abwesenheit von Doxycyclin bleibt der Aktivator inaktiv, d.h. dieser bindet nicht an den Promoter und führt demnach auch nicht zur Expression von SP-B. Entzug von Doxycyclin-haltigem Futter führt aufgrund der Abnahme an funktionalem SP-B nach ca. 3 – 7 Tagen zum Tod der Mäuse durch Lungenversagen. Ähnlich dem Krankheitsbild humaner Patienten kommt es zur Schädigung des Lungenparenchyms, sowie Perfusions- und Gerinnungsstörungen der Alveolarwände ¹⁵⁹. Dieses konditionelle, von einem Aktivator bzw. Doxycyclin-abhängige SP-B Modell bietet daher die ideale Grundlage für Nuklease-induzierte, gentherapeutische Ansätze, da Genkorrekturen phänotypisch leicht erkennbar sind.

2.2.15.2 Intratracheale Applikation

Die Applikation der in NPs enthaltenen Z3 mRNA bzw. AAVs (siehe Abschnitte 2.2.6 und 2.2.7) erfolgte intratracheal (i.t.) über die Luftröhre in Form eines Aerosols. Dafür wurden die Versuchstiere zuvor durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von 100 µl 3K-Narkose (Fentanyl 0,05 mg/kg KGW (Körpergewicht); Midazolam 5 µg/kg KGW; Medetomidin 0,5 mg/kg KGW) anästhesiert. Die Mäuse wurden für ca. 10 min in den Käfig zurückgesetzt, um die komplette Anästhesie zu gewährleisten. Zusätzlich wurde zur Bestätigung der Analgesie und Tiefennarkose der Zwischenzehenreflex getestet. Für die i.t.-Applikation wurde das Versuchstier auf eine Mäuse-Intubationsplattform eingespannt und die Zunge mittels eines Wattestäbchens beiseitegeschoben. Um Zugang zum Pharynx und der Trachea zu erhalten wurde ein Laryngoskop in die Mundhöhle eingeführt. Die mRNA wurde anschließend mit Hilfe eines Mikrospray®-Aerosolizer, Modell IA-1C, und einer FMJ-250 Hochdruckinjektionsspritze durch Einführen der Kanülenspitze in die Luftröhre in die Lunge appliziert. Pro Versuchstier wurden je 100 µl à 20 µg mRNA, mRNA komplexiert in

NPs oder AAV6 verabreicht. Kontrolltiere erhielten 100 µl PBS. Während der i.t.-Applikation wurde darauf geachtet, dass der Vorgang nicht länger als 2 min dauerte, wobei der Mikrospray®-Aerolizer nicht länger als 10 s in der Trachea verblieb. Nach der jeweiligen Behandlung wurde die Narkose entsprechend ausgeleitet. Dazu wurden 100 µl Antidot (Naloxon 24 µg/kg KGW; Flumazenil 10 µg/kg KGW; Atipamezol 50 µg/kg KGW) subkutan (s.c.) injiziert. Die Versuchstiere wurden wieder in ihre Käfige zurückgesetzt und verblieben dort bis zum Versuchsende.

2.2.15.3 Behandlung

Die Versuchstiere wurden in 6 Gruppen (A-F) eingeteilt. Die entsprechende Behandlung kann Tab. 2.11 entnommen werden. Die i.t.-Applikation der viralen Vektoren (AAV6 Donor, Z3 AAV, Mock AAV6) wurde dabei 10 Tage vor eigentlichem Versuchsbeginn (Absetzen von Doxycyclin) durchgeführt. Drei Tage vor Versuchsbeginn wurde IVT mRNA i.t. appliziert.

Kriterien für das vorzeitige Ende der Versuche waren eine deutlich verminderte Futter- bzw. Wasseraufnahme, Apathie, motorische Ausfallerscheinungen, abnorme Körperhaltung oder Gewichtsverlust von mehr als 20 % gegenüber dem Eigengewicht.

Alle Versuchstiere wurden zuvor und während der Versuche regelmäßig gewogen sowie deren Zustand kontrolliert.

Tab. 2.11: Behandlungen der jeweiligen Versuchstier-Gruppen

	Gruppe	AAV6- Donor ($2,5 \times 10^{11}$ v.g.)	Z3 AAV (5×10^{10} v.g.)	Mock - AAV6 (5×10^{10} v.g.)	Z3 mRNA (20 µg)	Mock - <i>Foxp3</i> mRNA (20 µg)	NP	Anzahl Versuchstiere
Haupt- gruppen	A	✓	-	-	✓	-	✓	13
	B	✓	✓	-	-	-	-	13
Kontroll- gruppen	C	✓	-	-	-	✓	✓	6
	D	-	-	✓	✓	-	✓	6
	E	-	-	✓	-	-	-	6
	F	-	-	-	-	-	-	6

2.2.15.4 Tötung und Organentnahme

Nach Versuchsende und für weitere molekularbiologische sowie histologische Auswertungen wurden die Tiere getötet. Zudem wurde eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt bzw. die Lungen entnommen. Den Tieren wurden dazu 200 µl Pentobarbital (10 mg/ml) i.p. injiziert. Anschließend wurden die Versuchstiere mit 70 %igem EtOH desinfiziert und mit Nadeln auf dem Rücken fixiert. Für die Lungenentnahme wurde der Thorax eröffnet. Dazu wurde in diesem Bereich mit einer Schere das Fell entfernt und die Spitze des Sternums mit einer Pinzette leicht angehoben. Vom Sternum ausgehend wurden zwei laterale Schnitte gesetzt und das Zwerchfell vorsichtig durchgeschnitten. Die Rippen wurden anschließend in Richtung kranial auf beiden Seiten der Maus geschnitten und über einen beidseitig medialen Schnitt die ventrale Seite des Brustkorbs entfernt. Um die Lunge zu spülen wurde eine Venenverweilkanüle in die rechte Herzkammer eingeführt und der Lungenkreislauf mit 50 ml PBS gespült, wodurch Erythrozyten entfernt wurden. Die Lungenlappen wurden nachfolgend mit einer Schere herauspräpariert.

2.2.15.5 Bronchoalveoläre Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) ist eine Methode zur Entnahme der alveolären Flüssigkeit (BALF, engl. *bronchoalveolar lavage fluid*). Über dieses Verfahren können Bestandteile der inneren Oberfläche des distalen Respirationstrakts gewonnen und hinsichtlich ihrer zellulären und biochemischen Zusammensetzung untersucht werden. Das Spülen der luminalen Oberfläche der Lunge kann dabei sowohl histologisch als auch molekularbiologisch als Nachweis unterschiedlicher Entzündungsparameter dienen.

Die auf der alveolären Oberfläche häufig vorkommenden Zellpopulationen sind neben Makrophagen, Neutrophilen und Eosinophilen, auch Erythrozyten und Lymphozyten. Neben diesen können auch Proteine, Zytokine oder Chemokine nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei einigen Versuchstieren eine Tracheotomie und Lungenlavage durchgeführt, um die dadurch erhaltene BALF auf verschiedene Entzündungsparameter (IFN- α , IL-12, immunhistologische Auswertung, siehe Abschnitte 2.2.17 und 2.2.19) bzw. auf die Expression von SP-B (siehe Abschnitt 2.2.12 und 2.2.18) in der alveolären Flüssigkeit zu untersuchen.

Um die BALF zu erhalten wurden die Versuchstiere entsprechend Abschnitt 2.2.15.4 getötet und an den Gliedmaßen fixiert. Der Kopf wurde leicht überstreckt und an der Schnauze

zusätzlich fixiert. Nach Desinfektion mit 70 %igem EtOH wurde der tracheale Bereich freipräpariert und die Luftröhre durch einen feinen Schnitt eröffnet. In diese wurde eine Insyte™ Sicherheitsvenenverweilkatheter eingeführt. Durch Aufsetzen eines mit 1 ml PBS befüllten Kanülenaufsatzes wurde die Lunge anschließend gespült. Das PBS sowie die BALF wurden nachfolgend wieder in die Spritze aufgesaugt und der Vorgang nochmals mit frischem PBS wiederholt. Die so erhaltene alveoläre Flüssigkeit (Volumen ca. 2 ml) wurde jeweils in ein Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.15.6 *Compliance* der Atemwege

Die Messung der *Compliance* wurde von Herrn Benedikt Mothes am Institut für Pharmakologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt.

Die *Compliance* (dt. Nachgiebigkeit) der Atemwege ist ein Maß der Lunge sich zu dehnen und auszuweiten. Dabei gibt die Lungen-*Compliance* an, wie viel Gas oder Flüssigkeit man in das Lungenlumen füllen kann, bis der Druck um eine Druckeinheit ansteigt. Aufgrund der nichtlinearen Beziehung von Füllungs- und Druckzustand der Lunge, zeigt sich das Verhältnis typischerweise in einem gewissen Bereich konstant und fällt mit Annäherung an die Elastizitätsgrenze steil gegen den Wert Null. Zusätzlich findet sich im Bereich kleiner Füllungsvolumina ebenfalls eine Änderung der *Compliance*, hervorgerufen durch das der Entfaltung entgegengesetzte Wirken von Adhäsionskräften und Oberflächenspannung (siehe Abb. 12). Die *Compliance* (C) kann dabei aus dem Verhältnis von Volumenänderung (ΔV) zur transmuralen Druckdifferenz (ΔP) errechnet werden.

$$C = \frac{\Delta V [l]}{\Delta P [cm H_2O]}$$

Dabei besitzen besonders dehnbare Strukturen eine hohe *Compliance*, steife eine relativ niedrige *Compliance* (siehe Abb. 2.6).

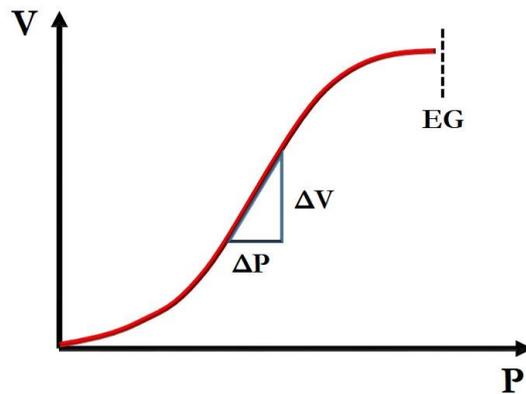


Abb. 2.6: Darstellung der *Compliance* in einem Druck-Volumen-Diagramm. Während sich die Druck (P)- und Volumenverhältnisse (V) im mittleren Bereich nahezu proportional verhalten, bedingt eine Zunahme des Volumen bei kleinen Füllungsvolumina einen höheren Anstieg des Drucks. Bei hohen Volumina steigt der Druck nur noch minimal bis zum Erreichen der Elastizitätsgrenze (EG).

Die Messung der *Compliance* bei Versuchstieren nach entsprechender Behandlung wurde über ein *ex vivo* Modell, der sog. isolierten Lungenperfusion (IPL, engl. *isolated perfused lung*), durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse nach Beendigung des jeweiligen Versuchs entsprechend Abschnitt 2.2.15.4 getötet und in eine Thoraxkammer platziert, von wo sie über eine tracheal angelegte Kanüle beatmet wurden. Die Ventilationsrate wurde dabei auf 90 Atemzüge pro Minute festgelegt, bei einer negativen Druckventilation zwischen 2,8 cm H₂O und 8,5 cm H₂O. Um eine Atelektase (Belüftungsdefizit der Lunge) zu vermeiden, wurde eine Hyperinflation (ca. 25 cmH₂O) alle 5 min ausgelöst. Die Perfusion der Lungen wurde anschließend mit 4 % Hydroxyethylstärke enthaltenem Perfusionspuffer über die Pulmonalarterie durchgeführt (Durchfluss 1 ml/min). Die Lungenfunktionsparameter wurden automatisch festgehalten und die *Compliance* über die HSE-HA Pulmodyn W Software ausgerechnet. Dabei wurden die durchschnittlich errechneten *Compliance*-Werte der letzten zehn Ventilationen (40 s) eines jeden 5 min-Messintervalls (je zwischen zwei Hyperinflationen) einbezogen.

2.2.15.7 Messung des Atemwiderstand

Die Messung des Atemwegwiderstands wurde ebenfalls von Herrn Benedikt Mothes am Institut für Pharmakologie der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt.

Die Messung des Atemwiderstands erfolgte durch Provokation der Lunge mit Methacholin (MCh). Bei dem Arzneistoff handelt es sich um einen nicht-selektiven Muscarinrezeptor-

Agonist, welcher das parasympathische Nervensystem stimuliert (Parasympathomimetikum). Allgemein wird es als Diagnostikum bronchialer Hyperreaktivität in Lungen-Provokationstest verwendet. Der Methacholin-Test spielt beispielsweise bei der Diagnose von chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen eine Rolle. Dabei führt die Inhalation von Methacholin zu einer Bronchokonstriktion, die dosisabhängig über die Messung des Atemwiderstands eine Aussage über den Grad der Ventilationsstörung gibt. Eine Verengung der Bronchien führt dabei zu einer Erhöhung des Atemwiderstands. Der Atemwiderstand selbst kann als der Widerstand angesehen werden, der beim Atmen überwunden werden muss. Dieser setzt sich aus dem elastischen Atemwiderstand der Lunge und dem viskösen Widerstand der Atemwege und des Lungengewebes zusammen. Der natürliche Atemwiderstand (R) ergibt sich dabei aus dem Verhältnis von Druckdifferenz (ΔP) und dem pro Zeit (Δt) ein- und ausströmenden Volumen (ΔV).

$$R = \frac{\Delta P [cm H_2O]}{(\Delta t [s]/\Delta V [l])}$$

Für die Messung wurden die Versuchstiere wie in Abschnitt 2.2.15.4 getötet und über die IPL der Atemwiderstand gemessen. Dabei wurde zunächst als Referenz über einen Zeitraum von 20 min die Nulllinie festgelegt. Die Lungen wurden anschließend für je 10 min mit zunehmenden Konzentrationen an Methacholin (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M) perfundiert. Nach jeder Konzentrationsmessung wurde die Lunge wiederum für 10 min mit Perfusionspuffer ausgewaschen. Die Lungenfunktionsparameter wurden dabei automatisch festgehalten und der Atemwiderstand über die HSE-HA Pulmodyn W Software ausgerechnet. Dabei wurden die durchschnittlich errechneten Werte der letzten zehn Messungen (40 s) eines jeden 10 min-Messintervalls einbezogen.

2.2.16 Cytospin

Cytospin ist eine zytologische Methode, um spezifisch Zellen zu konzentrieren. Mittels Zytozentrifugation können Monolayer auf einem Objektträger (OT) erstellt werden. Durch die Wahl der geeigneten Beschleunigung behalten die Zellen zudem ihre charakteristische Form. Nachfolgend können diese über zytologische oder immunhistochemische Verfahren evaluiert werden.

Für diese Arbeit wurden Zellen aus der BALF konzentriert, gefärbt und mikroskopisch entsprechend ihrer Morphologie ausgewertet. Die in der BALF enthaltenen Makrophagen, Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten wurden dabei ausgewertet.

Makrophagen sind dabei ca. 23 µm große, rundkernige Zellen mit unregelmäßiger Oberflächenstruktur und mehr oder weniger granuliertem oder vakuolisierten Zytoplasma. Diese können amöboid bewegliche Zellausläufer aufweisen sowie einverleibte Fremdpartikel in Phagosomen. Lymphozyten sind 10 – 16 µm große Zellen mit rundem Zellkern und kondensiertem Chromatin und weisen ein granuliertes Zellplasma auf. Eosinophile Granulozyten dagegen sind runde bis ovoide Zellen mit einem Durchmesser von 12 – 15 µm. Lichtmikroskopisch erkennt man ihren zweigeklappten Kern sowie die großen bikonvexen azidophilen Granula. Neutrophile Granulozyten dagegen sind polymorphkernig, d.h. der Zellkern besteht aus drei bis fünf Segmenten. Die Zellen weisen eine kugelförmige Form auf mit einem Durchmesser von 10 – 15 µm.

Im Zuge der Evaluierung einer Zunahme von Entzündungszellen als Reaktion auf die Z3 IVT mRNA-, respektive der AAV-Vektor-Applikation (siehe Abschnitt 2.2.15.2), wurden Cytospins aus der BALF von Mäusen hergestellt, welche 20 Tage zuvor von Doxycyclin abgesetzt wurden. 100 µl der BALF (siehe Abschnitt 2.2.15.5) wurden dafür mit 200 µl PBS in einem Reaktionsgefäß auf Eis gemischt. Die Vorrichtung für den Cytospin wurde anschließend zusammengebaut. Dazu wurde der Cellclip® aufgeklappt, ein beschichteter OT eingelegt und eine Filtercard mit der Öffnung nach unten aufgelegt. Der Cellfunnel® wurde aufgelegt und beide Metallbügel des Cellclip® eingehackt. Der zusammengebaute Cellclip® wurde nachfolgend in den Rotor einer Cellspin® II-Zentrifuge eingesetzt und die Zellsuspension in den Cellfunnel® Trichter pipettiert. Die Zentrifugation der Proben erfolgte für BALFs bei 800 rpm (Beschleunigung: Stufe 4, Abbremsen: Stufe 6) für 10 min bei 6 °C. Anschließend wurde der Einsatz wieder auseinandergelöst, wobei darauf geachtet wurde, dass die Filtercard die Zellschicht nicht berührte. Mit einer anschließenden panoptischen Färbung nach Pappenheim, welche auch unter dem Namen May-Grünwald-Giemsa Färbung bekannt ist, konnten die Zellbestandteile der BALF mikroskopisch untersucht und differenziert werden. Dabei werden durch die in den Lösungen enthaltenen Färbestoffe (May-Grünwald: Eosin, Methylenblau; Giemsa: Azur-A-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid) entsprechende Zellstrukturen angefärbt, wodurch die jeweiligen Zelltypen unterschieden werden können. Zellkerne sowie Granula erscheinen im Allgemeinen durch Anreicherung in die DNA bzw. in saure Granula rot, das Cytoplasma

bläulich. Nach Cytospin wurden die OTs 3 min in unverdünnter May-Grünwald-Lösung getaucht und anschließend für weitere 3 min in eine 1:1-Verdünnung aus dH₂O und May-Grünwald-Lösung. Die OTs wurden mit Leitungswasser abgespült und für 20 min in einer Giemsalösung (1:20-Verdünnung mit dH₂O) inkubiert. Abschließend wurden die OTs wiederum unter Leitungswasser leicht abgespült und trocknen gelassen. Zum Eindecken der Zellen wurde auf die OTs ein Tropfen Entellan® Neu aufpipettiert, ein Deckglas aufgelegt und dieses vorsichtig festgedrückt. Die OTs wurden für mindestens 20 min getrocknet und konnten anschließend ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch am Zeiss Axio Imager.M2. Aufnahmen wurden über eine AxioCam MRC Kamera gemacht. Für die Auswertung wurden die OTs mäanderförmig ausgezählt und mindestens 100 Zellen pro OT ausgezählt. Die ermittelten Zellzahlen je Zelltyp wurden anschließend auf 1 ml BALF bezogen.

2.2.17 Histopathologie

Die Immunhistochemie ist eine Methode, mit der mittels eines Antikörper (AK)-gekoppelten Detektionssystems spezifische Gewebestrukturen sichtbar gemacht werden können. Durch die Affinität der AKs, bestimmte Oberflächenstrukturen (Epitope) zu binden, können so Proteine und andere Strukturen nachgewiesen werden. Als Detektionssysteme dienen dabei Enzym-basierte Systeme, welche auf der Umsetzung von AK-markierten Substraten beruhen und so angefärbt werden. Dazu zählt beispielsweise die Konversion von chromogenen Substraten (DAB, TMB, ABTS) durch die Meerrettichperoxidase (HRP, engl. *horse radish peroxidase*, siehe [Abb. 2.7A](#)). Daneben können spezifische Gewebestrukturen auch über Fluorochrome nachgewiesen werden, welche durch Anregung von Licht bestimmter Wellenlänge sichtbar gemacht werden (siehe [Abb. 2.7B](#)). Eine schematische Darstellung der beiden Detektionssysteme zeigt [Abb. 2.7](#).

Für die Färbung von Gewebeschnitten wurden Mäuselungen nach Versuchsende entsprechend Abschnitt 2.2.15.4 herauspräpariert und über Nacht bei 4 °C in Histofix (4,5 %) fixiert. Das im Histofix enthaltene Formaldehyd führt dabei zur Vernetzung von Proteinstrukturen, ohne dass diese denaturiert werden. So wird der ursprüngliche Aktivitätszustand der Proteine erhalten. Nach Einbettung der Lungen wurden die Paraffinblöcke an einem Mikrotom geschnitten. 10 Schnitte pro Probe, mit einer Schichtdicke von 4 – 5 µm, wurden dabei angefertigt. Die so erhaltenen Schnitte wurden mit

einem Pinsel vorsichtig in ein auf 45 °C vorgewärmtes Wasserbad überführt und dadurch gestreckt. Anschließend wurden diese glatt auf einen OT positioniert und bei 60 °C auf einer Heizplatte getrocknet. Die Lagerung der fertigen OTs erfolgte bei RT.

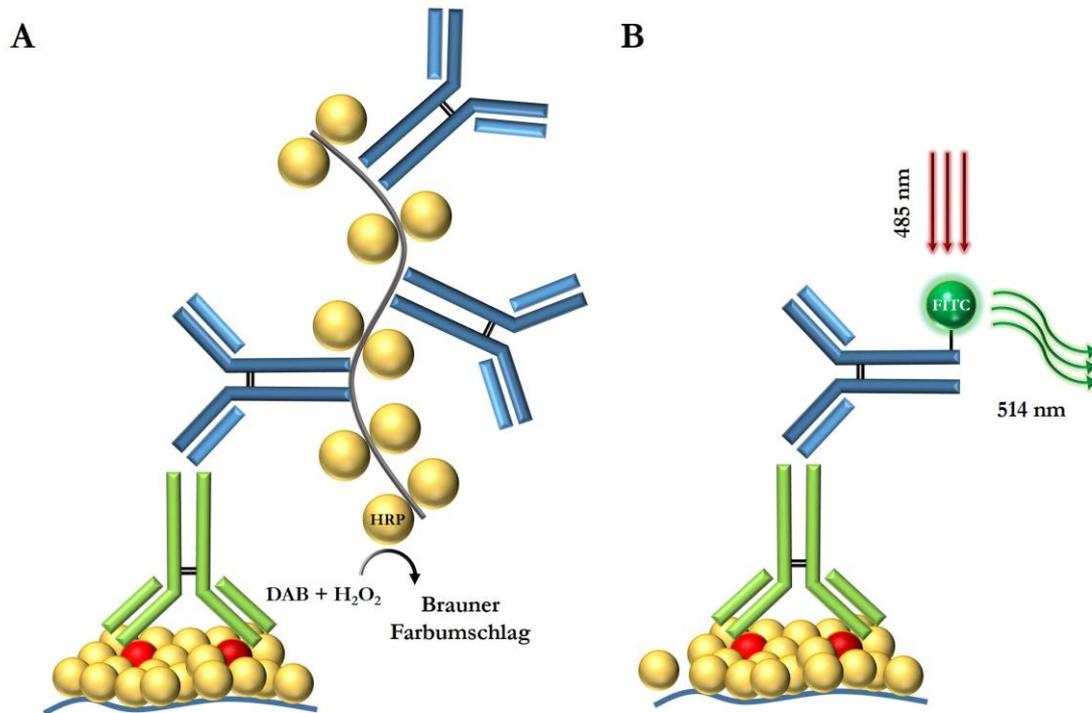


Abb. 2.7: Schematische Darstellung Antikörper-vermittelter Detektionssysteme. **(A)** Bei der immunzytochemischen Färbung mittels DAB werden HRP-markierte Sekundärantikörper verwendet. Diese können über eine Aminosäuresequenz miteinander verbunden werden, so dass das entstehende Signal (bräunlicher Farbumschlag) durch die oxidative Umwandlung des chromogenen Substrats verstärkt wird. **(B)** Zur Visualisierung von Gewebestrukturen können auch mit Fluorochromen (wie z.B. FITC) markierte Antikörper verwendet werden, die durch Anregung von Licht einer bestimmten Wellenlänge sichtbar werden.

2.2.17.1 Immunzytochemische Färbung

Um die Expression von 3xFLAG-markierten Z3 in Lungenschnitten behandelter Mäuse nachzuweisen, wurden diese immunzytochemisch angefärbt. Dazu wurden die Gewebeschnitte über eine absteigende Alkoholreihe, beginnend mit dem organischen Lösungsmittel Xylol, deparaffiniert (für je 3 min: 3x Xylol, 2x 100 % EtOH, 1x 95 % EtOH, 1x 70 % EtOH und 1x *Aqua dest.*). Die Schnitte wurden anschließend in Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle für 15 min aufgekocht und so demaskiert. Hierbei wurden die Formalinbedingten Eiweißvernetzungen, die einige Antigene maskieren können und somit einer immunhistologischen Untersuchung unzugänglich machen können, teilweise aufgebrochen. Zum Abkühlen wurde die Schnitte für 15 min auf Eis gelegt und anschließend 2x für 10 min

in 1x TBS gewaschen. Um endogene Peroxidasen zu blockieren wurde auf jeden Schnitt für 10 min 3 %iges Wasserstoffperoxid (H₂O₂) pipettiert. Nach weiterem 5-minütigem Waschen in 1x TBS wurden die OTs mit einem staubfreien Tuch vom TBS befreit und die Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Präparate für 30 min bei RT mit 4 % Ziegenserum (in Tris-BSA, 0,1 % Triton X 100) inkubiert. Nachfolgend wurde der Primär-AK [anti-*Surfactant* Protein B (*mature*)] in einer Verdünnung von 1:100 in Tris-BSA (0,1 % Triton X 100) auf die Schnitte pipettiert (50 µl/Gewebeschnitt). Der Primär-AK wurde bei 4 °C über Nacht in einer Feuchtekammer inkubiert. Für die Negativkontrolle erfolgte die Zugabe ohne primären AK. Anschließend wurden die Schnitte 3x für 5 min in 1x TBS gewaschen und der sekundäre AK auf die Schnitte pipettiert. Bei diesem AK handelte es sich um eine Aminosäurekette, an die mehrere Moleküle Sekundär-AK mit mehreren Molekülen HRP kovalent gebunden sind (ZytoChem Plus HRP One-Step Polymer anti-Mouse/Rabbit/Rat). Der Sekundär-AK wurde dabei 1:100 in Tris-BSA (0,1 % Triton X 100) verdünnt und pro Gewebeschnitt 50 µl aufgetragen. Nach Inkubation für 30 min in der Feuchtekammer erfolgte das dreimalige Waschen für je 2 min in 1x TBS. Zur Visualisierung wurde anschließend DAB-Substrat (3,3' Diaminobenzidin) pipettiert. Dabei katalysiert die HRP durch Oxidation die Konversion des chromogenen Substrats in einen bräunlichen Farbstoff, d.h. positive Zellen erschienen braun. Je 50 µl der Substratlösung (DAB Substrate Kit SK-4100) wurden auf die Schnitte pipettiert und diese für 2 – 10 min entsprechend der Farbumsetzung inkubiert. Sobald die gewünschte Farbintensität erreicht war, wurde die Reaktion durch Waschen mit *Aqua dest.* gestoppt. Für die Gegenfärbung und Sichtbarmachung von Gewebestrukturen wurden die OTs für 30 s in Meyer's Hämalaunlösung eingetaucht und anschließend unter fließendem H₂O gebläut. Für die anschließende mikroskopische Untersuchung wurden die Präparate in Pertex eingebettet und bei RT gelagert. Die Auswertung und Lichtbildaufnahmen erfolgten an einem Lichtmikroskop (Zeiss Axio ImagerM.2 mit AxioCam MRc Kamera) bei 20-facher Vergrößerung.

2.2.17.2 Immunfluoreszenz

Für die Färbungen von Z3 über die 3xFLAG-markierten Nukleasen wurden die Gewebeschnitte wie in Abschnitt 2.2.17.1 über eine absteigende Alkoholreihe deparaffiniert und anschließend 2x für 10 min in 1x TBS gewaschen. Die Demaskierung erfolgte ebenfalls in Citratpuffer für 15 min in der Mikrowelle. Nach weiteren 15 min auf Eis wurden die

Schnitte wiederum 2x für 10 min in TBS gewaschen. Die Blockierung erfolgte wie auch bei der Immunzytochemie in 200 µl 4 %igem Ziegen Serum (in Tris-BSA, 0,1 % Triton X 100) für 30 min in der Feuchtekammer. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgekippt und die Schnitte mit 200 µl des Primär-AK (anti-DDDDK antibody, ab21536, 1:200; in Tris-BSA, 0,1 % Triton X 100) über Nacht bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Die folgenden Inkubations- und Waschschrte erfolgten ausnahmslos im Dunkeln, um eine Ausbleichung der Fluorochrome zu vermeiden. Nach 2x Waschen für je 10 min in 1x TBS wurden die Gewebeschnitte mit 200 µl Tris-BSA (0,1 % Triton X 100) und Zugabe des jeweiligen sekundären AK (CyTM3 AffiniPure goat anti-rabbit IgG, 111-165-144, 1:100; monoclonal anti-FLAG® M2 FITC, F4049; 1:100) sowie DAPI (A1001, 1:1000; für die Färbung des Zellkerns) für 1 h bei RT im Dunklen einer Feuchtekammer inkubiert. Nach wiederum 3x Waschen der Schnitte in 1x TBS für je 10 min wurden die Schnitte mit dem Dako Fluorescence Mounting Medium eingebettet. Die OTs wurden anschließend bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Auswertung und Fluoreszenzaufnahmen erfolgten an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio ImagerM.2 mit AxioCam MRc Kamera) bei 20-facher Vergrößerung

2.2.18 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blot (WB)-Systems ist es möglich, spezifische Proteine aus einem komplexen Pool von Proteinen, welche zuvor aus Zellen isoliert worden sind, zu identifizieren. Der WB kann dabei in drei elementare Schritte unterteilt werden: (1) die Trennung der Proteine aufgrund ihrer Größe, (2) der Transfer der Proteine auf eine Trägermembran und (3) die Visualisierung der gewünschten Proteine durch Markierung mit primären und sekundären AKs.

Für die Auftrennung der Proteine werden die Proben meist vorbehandelt. Dazu wird dem Proteinlysate in der Regel SDS zugefügt und der Ansatz erhitzt, wodurch die Proteine aufgrund des Aufbrechens von Wasserstoffbrückenbindungen sowie der Sekundär- und Tertiärstruktur, denaturiert und damit linearisiert werden. Die eigentliche Auftrennung der Proteine erfolgt üblicherweise über eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Das anionische Tensid SDS überdeckt dabei die Eigenladungen der Proteine, so dass diese eine konstant negative Ladungsverteilung aufweisen. Dies und die Denaturierung erlauben somit eine Auftrennung nach der Kettenlänge, proportional zur Molekülmasse. Dabei werden die längeren Proteine im Gel

stärker zurückgehalten als kürzere Proteine. Das Gel mit den aufgetragenen Proteinen wird anschließend in ein Elektrolytpuffer eingelegt und Spannung erzeugt. Aufgrund der negativen Ladung der Proteine können diese folglich aufgetrennt werden. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine dabei erst über ein Sammelgel konzentriert und anschließend über das Trenngel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die so separierten Proteine werden auf eine Membran transferiert. Dabei wird senkrecht zum Polyacrylamidgel Spannung angelegt. Die Proteine wandern so aus dem Gel in Richtung Membran zur Anode hin. Dabei ist die Membran so beschaffen, dass die Proteine aufgrund hydrophober bzw. ionischer und polarer Wechselwirkungen [bspw. PVDF (Polyvinylidenfluorid) bzw. NC (Nitrocellulose)] an dieser haften bleiben. Die Proteine werden so für die anschließende Immundetektion zugänglich gemacht. Durch zusätzliches Auswaschen des SDS erhalten die Proteine ebenfalls ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder zurück.

Die Detektion spezifischer Proteine erfolgt über die Markierung mit AKs. Das Prinzip ist dem der vorher beschriebenen AK-Färbung von Gewebeschnitten gleichzusetzen (siehe [Abb. 2.7](#)). Dabei können Proteine über die HRP-vermittelte Oxidation von Dioxetanen, wie Luminol, detektiert werden. Die oxidierte Form von Luminol setzt dabei optische Strahlung in Form von Lumineszenz frei und ist proportional zur Menge an Protein. Mit Hilfe eines lichtsensitiven Films, welcher die Chemilumineszenz detektiert, können so AK-markierte Proteine sichtbar gemacht werden ¹⁶⁰.

Der WB wurde zum Nachweis der Expression von SP-B in der BALF von behandelten und Kontrolltieren durchgeführt. Dafür wurde bei den über die Lavage (siehe Abschnitt 2.2.15.5) erhaltenen BALFs zunächst die Proteinkonzentration am Nanophotometer ermittelt und je 10 µg Gesamtprotein für den WB verwendet. Die Proben wurden für die folgende SDS-PAGE mit je 8 µl NuPAGE LDS Sample Buffer, 2 µl NuPAGE Sample Reducing Agent (10x) und dH₂O auf ein Volumen von 20 µl eingestellt. Diese wurden anschließend bei 90 °C für 10 min denaturiert und bei RT abgekühlt. Die denaturierten Proben wurden auf bereits für die SDS-PAGE fertige NuPAGE 10 % Bis-Tris Gele geladen. Zusätzlich wurden 10 µl Proteinstandard (Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard) als Größenreferenz aufgetragen. Die Gelkammer (XCell SureLock® Mini Cell) wurde vollständig mit Laufpuffer (NuPAGE MES SDS Running Buffer) befüllt und diese an eine Spannungsquelle (PowerEase® 500 Power Supply) angeschlossen. Die Proben wurden bei einer Spannung von 200 V und 120 mA für 35 min aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer herausgenommen und das Sammelgel mit Hilfe eines Spatels entfernt. Das Gel

wurde für den nachfolgenden Transfer auf eine PVDF-Membran (0,2 µm Porengröße) positioniert. Die Reihenfolge der unterschiedlichen Membranen war dabei wie folgt (von unten nach oben): iBlot Anode Stack (Bottom), PVDF-Membran, Gel, iBlot Filterpapier, iBlot Cathode Stack (Top), Schwamm, Kupferelektrode. Der Aufbau wurde in das iBlot Transfer System platziert und die Proteine bei 25 V transferiert. Nach 6 min wurde die Membran herausgenommen und in Blocklösung I (PBS, 5 % Milchpulver, 0,05 % Tween-20) für 2 h bei RT auf einem Rotator inkubiert. Das Blocken verhindert dabei eine nicht-spezifische Bindung der AKs an die Membran. Die Membran wurde 3x für 5 min in PBST (PBS, 0,05 % Tween-20, 5 % Milchpulver) gewaschen und anschließend mit primärem anti-AK (rabbit anti-SP-B, 1:1000; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Griese aus München) in Blocklösung II (PBS, 5 % Milchpulver) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran wiederum 3x für 5 min in PBST (PBS, 0,05 % Tween-20) gewaschen und diese anschließend mit dem HRP-gekoppelten sekundären AK [goat anti-rabbit IgG (clone pAb)-HRPO, 111-035-003] in einer Verdünnung von 1:10.000 in Blocklösung II für 2 h inkubiert. Die Membran wurde nochmals 5x für 5 min und 1x für 10 min in PBST (PBS, 0,05 % Tween-20) gewaschen. Für die Detektion wurde je 1 ml ECL Detection Reagent I mit 1 ml ECL Detection Reagent II gemischt und auf die Membran pipettiert. Diese wurde für 1 min bei RT inkubiert. Das Detektionsreagenz wurde von der Membran durch Abkippen der Flüssigkeit entfernt und zwischen zwei Plastikfolien in eine Filmkassette gelegt. Durch Auflegen eines lichtsensitiven Films (Hyperfilm ECL) auf die Membran konnte über die anschließende Entwicklung in einem dafür vorgesehen Gerät die zu erwartenden Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Die Detektion erfolgte dabei unter Lichtausschluss in einer Dunkelkammer. Eine semiquantitative Analyse der Blots wurde über die Software Quantity One durchgeführt.

2.2.19 ELISA

Als ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) bezeichnet man ein AK-basiertes Nachweisverfahren, welches auf einer AK-gekoppelten enzymatischen Farbreaktion basiert. Dadurch können Proteine, Viren, aber auch niedermolekulare Stoffe, wie Hormone oder Toxine nachgewiesen werden. Dazu werden meist sog. *Sandwich*-ELISAs verwendet. Diese Art des Immunadsorptionsverfahrens beruht auf der Bindung eines zuvor AK- (sog. *capture antibody*) markierten Antigens an eine solide Phase, welches über einen zweiten AK (sog. *detection antibody*) gebunden wird. Da beide AKs dasselbe Antigen binden, ist es essentiell, dass

diese jeweils unterschiedliche Epitope binden. Der Detektions-AK ist wiederum an Reporterenzyme, wie die HRP oder alkalische Phosphatase (AP), gebunden. Durch Zugabe des für die Enzyme jeweiligen chromogenen Substrats kann so ein Farbumschlag erzielt werden, dessen Konzentration mit der Intensität der Farbe ansteigt und damit auch die Konzentration des zu bestimmenden Antigens widerspiegelt. Diese kann anhand einer zuvor angelegten Verdünnungsreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen, welche parallel mit den AK-gebundenen Antigenen gemessen wird, quantifiziert und evaluiert werden. Die Messung erfolgt dabei photospektrometrisch durch Messung der jeweils emittierten Wellenlänge.

2.2.19.1 Interferon (IFN)- α

Zum Nachweis von IFN- α als Reaktion auf unterschiedlich modifizierte IVT mRNA sowie NPs (siehe Abschnitte 2.2.7 und 2.2.13) wurden Versuchstieren je 1 μg Z3 mRNA (unmodifiziert mit/ohne NPs; s2U_(0,25)m5C_(0,25) mit/ohne NPs; Ψ _(1,0)m5C_(1,0) mit/ohne NPs) entweder i.p oder i.t appliziert. Nach 6 h bzw. 24 h wurde den Mäusen durch Punktion des retrobulbären Venenplexus Blut zur Serumgewinnung entnommen. Das heparinisierte Blut wurde bei 7000 rpm für 3 min abzentrifugiert, wodurch sich der zelluläre Anteil des Bluts vom Plasma absetzte. Das so gewonnene Serum wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Vom Serum wurden je 50 μl für den ELISA verwendet. Dabei wurden Duplikate für die statistische Auswertung angesetzt. Der IFN- α ELISA wurde über den Mouse IFN α Platinum ELISA (BMS6027) entsprechend Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die benötigten *wells* 2x für 10 - 15 s mit je 400 μl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden je 50 μl 1x Assay-Puffer und 50 μl an Standard [die Standardreihe war dabei wie folgt: 0 pg/ml (Blank); 31,3 pg/ml; 62,5 pg/ml; 125 pg/ml; 250 pg/ml; 500 pg/ml; 1000 pg/ml; 2000 pg/ml] den *wells* zugegeben. Den Blanks wurden dabei je 50 μl Kalibrierverdünnung zugegeben. In die *wells*, welche die zu messenden Proben darstellten, wurden je 50 μl BAL pipettiert. Nachfolgend wurde in alle *wells* Biotin-Konjugat pipettiert und die Platte mit einem Adhäsionsfilm bedeckt. Diese wurde anschließend für 2 h bei RT auf einem Mikroplatten-Schüttler bei 400 rpm inkubiert. Die *wells* wurden 4x mit 400 μl Waschpuffer gewaschen und je 100 μl Streptavidin-HRP-Lösung hinzugegeben. Nach anschließender Inkubation der *wells* für 1 h bei RT auf einem Schüttler (400 rpm), wurden die *wells* wiederum 4x mit 400 μl Waschpuffer gewaschen. 100 μl TMB-Substratlösung wurden hinzu pipettiert und für 30 min

bei RT im Dunkeln inkubiert. Sobald der höchste Standard optisch tiefblau war (entspricht einer OD von 0,9 – 0,95 bei 620 nm) wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung gestoppt. Die Absorption wurde anschließend in einem Spektrophotometer (Multiscan EX) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Für die anschließende quantitative Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism® verwendet und aus den gemittelten Standardwerten zunächst deren lineare Regression berechnet. Aus dieser konnten die IFN α -Konzentrationen der BALF errechnet werden.

2.2.19.2 Interleukin (IL)-12

Zur Messung des IL-12-Spiegels in der BALF von behandelten Versuchstieren (Gruppen A-F, siehe Abschnitt 2.2.15.3) wurde ein Mouse IL-12 p70 ELISA Ready-SET-Go!® ELISA verwendet. Pro Probe und Standard wurden Duplikate erstellt. Dazu wurden Coat Corning Costar 9018-Platten mit 100 µl je *well* an *capture*-AK beschichtet und diese bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die *wells* wurden anschließend 3x mit 250 µl Waschpuffer gewaschen und nachfolgend mit 200 µl/*well* 1x Assay-Lösung für 1 h bei RT geblockt. Für die Standardreihe wurden die Standards in einer 1:1-Verdünnungsreihe mit 1x Assay-Lösung vorbereitet [Verdünnungsreihe wie folgt: 2000 pg/ml; 1000 pg/ml; 500 pg/ml; 250 pg/ml; 125 pg/ml; 62,5 pg/ml; 31,3 pg/ml; 0 pg/ml (Blank)]. Je 100 µl Standard oder BALF wurden anschließend in die *wells* pipettiert. Nach Inkubation der Proben bei 4 °C über Nacht wurden die *wells* 5x mit 250 µl Waschpuffer gewaschen und 100 µl Detektions-AK pro *well* zugegeben. Dieser wurde für 1 h bei RT inkubiert. Die *wells* wurden wiederum 5x mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen und 100 µl Avidin-HRP pipettiert und für 30 min bei RT inkubiert. Nach 7x Waschen mit je 250 µl Waschpuffer wurde die Substratlösung zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopplösung beendet. Die Absorption wurde anschließend in einem Spektrophotometer (Multiscan EX) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Für die anschließende quantitative Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism® verwendet und aus den gemittelten Standardwerten zunächst deren lineare Regression berechnet. Aus dieser konnten die IL-12-Konzentrationen der BALF errechnet werden.

2.2.20 Sequenzierung der Zielsequenz

Die Sequenzierung der SP-B-Zielsequenz auf Einbau des Donor-*Templates* sowie alle klonierten Plasmide (siehe Abschnitte 2.2.1 und 2.2.6) wurden über die Firma GATC Biotech AG durchgeführt.

Das Prinzip der Sequenzierung beruht dabei auf der Kettenabbruchreaktion nach Sanger. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass durch eine DNA-Polymerase eine der beiden DNA-Stränge durch Zugabe eines Primers amplifiziert wird. Dafür wird, wie bei der konventionellen PCR auch (siehe Abschnitt 2.2.10), die DNA-Doppelhelix denaturiert bzw. in Einzelstränge getrennt. Für den Kettenabbruch werden der Reaktion anstatt der üblichen dNTPs Anteile an Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs) zugegeben. Diese besitzen keine 3'OH-Gruppen und führen im Zuge der Neusynthese des komplementären Strangs zu einem Abbruch der DNA-Elongation. Die OH-Gruppe am 3'-Atom ist essentiell für die Verknüpfung der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids. Fehlt diese, so kann die DNA-Polymerase keine weiteren Nukleotide anfügen, es kommt zu einem Kettenabbruch. In der Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Da die ddNTPs heutzutage mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind, kann die Reaktion in einem einzelnen Reaktionsgefäß stattfinden. Die DNA-Fragmente werden anschließend über Kapillarelektrophoresen aufgetrennt und die ddNTPs am Ende eines jeden Strangs mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Aufgrund der unterschiedlichen Farbstoffe können diese über einen Detektor erkannt werden. Das daraus entstehende Elektropherogramm gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten Strangs wieder (siehe [Abb 2.8](#)).

Für die Sequenzierung wurde genomische DNA aus zuvor mit Z3- und Donor-*Template* behandelten, primären Fibroblasten bzw. AT-II-Zellen isoliert (siehe Abschnitte 2.2.8 und 2.2.9). Die Zielsequenz wurde über eine PCR entsprechend Abschnitt 2.2.10 durchgeführt. Die für die PCR verwendeten Primer waren P1 (5'-TGTACGGTGGGAGGCCTAT-3'), P2 (5'-CCTGGCAGGTGATGTGG-3') und P3 (5'-AGGCACTGGGCAGGTAAGTA-3'). Die erhaltenen Amplikons wurden direkt in pCR-TOPO Vektoren über das TOPO® TA Cloning Kit entsprechend Protokoll des Herstellers kloniert. Dabei wurden 4 µl PCR-Produkt mit 1 µl Salzlösung und 1 µl TOPO® Vektor zusammen pipettiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation der Vektoren in kompetente DH5α-Zellen (siehe Abschnitt 2.2.1.6). Nach Anwachsen der Kolonien wurden je 100 davon gepickt und die Plasmide isoliert (siehe Abschnitt 2.2.1.2). Diese wurden in einem Volumen

von 10 μl [100ng Plasmid-DNA, je 5 μM Primer M13 for (5'—GTAAAACGACGGCCAG-3') und M13 rev (5'—CAGGAAACAGCTATGAC-3')] zu GATC für die folgende Sequenzierung geschickt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse wurde über das Programm Geneious® R8 durchgeführt. Dafür wurden die klonierten Sequenzen mit der ursprünglichen SP-B Zielsequenz verglichen und auf den Einbau des Donor-*Templates* hin überprüft.

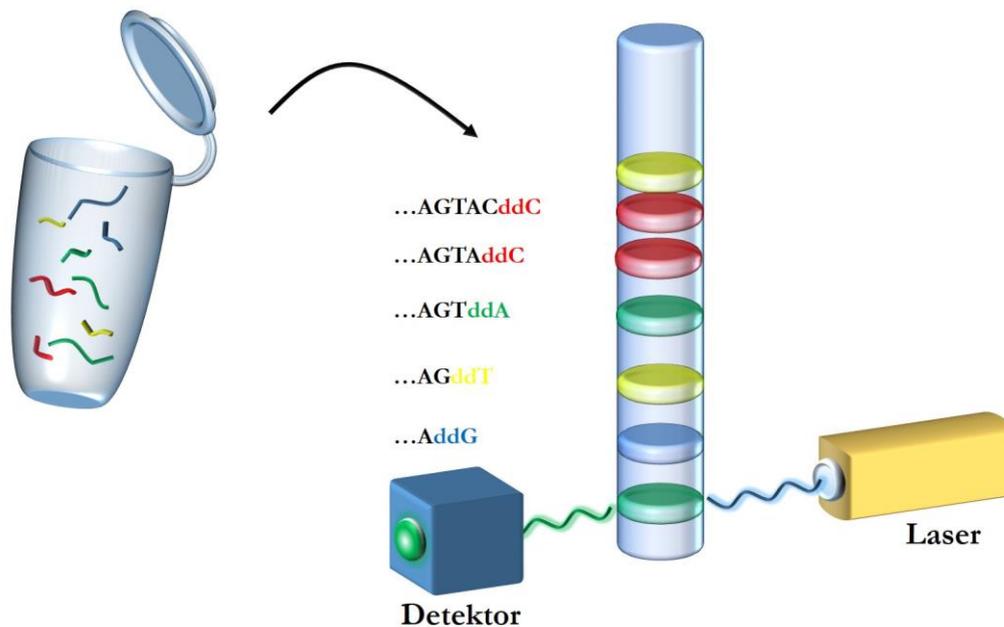


Abb. 2.8: Prinzip der Kettensbruch-Synthese nach Sanger. Durch den Einbau von Didesoxynucleotidtriphosphaten (ddNTPs) in den neu synthetisierten Strang kommt es zum Abbruch der Elongation durch die DNA-Polymerase. Die so entstandenen DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe können kapillarelektrophoretisch aufgetrennt werden. Aufgrund der in den ddNTPs unterschiedlich enthaltenen Fluoreszenz-Farbstoffe, können die Kettenabbrüche über ein Laser-Detektor-System ermittelt und so die genaue Basenabfolge angegeben werden.

2.2.21 RNA-Isolation aus Gewebe

Die Isolation von RNA ermöglicht die Untersuchung bzw. Analyse der momentanen Zelltätigkeit zum Zeitpunkt der Isolation. Aufgrund der Tatsache, dass RNA Ribose enthält und somit im Gegensatz zur DNA die Hydroxylgruppe an der 2'-Position des Pentoserings vorhanden ist, ist RNA gegenüber hydrolytischen Spaltungen sehr viel anfälliger und demnach instabiler. Bei der RNA-Isolation muss folglich die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindungen durch RNasen vorzeitig unterbunden werden, um einen Abbau der RNA zu vermeiden. Alle Arbeiten im Zuge der RNA-Isolation wurden demnach unter möglichst sterilen, RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Eine Möglichkeit RNasen zu

inaktivieren ist dabei die Verwendung des Chaotrops Guanidiniumthiocyanat. Dieses wird bei der Zellyse eingesetzt und inaktiviert gleichzeitig irreversibel RNasen und andere Enzyme. Für die RNA-Isolation werden neben der Flüssigkeits-basierten RNA-Auftrennung nach Chomczynski zumeist Silika-basierte Säulen verwendet. Diese funktionieren nach demselben Prinzip wie die Aufreinigung von DNA und beruhen auf der hohen Affinität von negativ geladener RNA zu den positiv geladenen Silika-Partikeln (siehe Abschnitt 2.2.1.3). Für die RNA-Isolation aus dem Lungengewebe wurde ein kleiner Teil der Lungen (ca. 20 mg) nach Explantation (siehe Abschnitt 2.2.15.4) mit Hilfe eines Skalpells in kleine Stücke geschnitten und über eine 1 ml-Spritze mit einem Spritzenaufsatz des Typs G20 in 350 µl RLT-Puffer homogenisiert. Die Isolation der RNA wurde über das Qiagen RNeasy Mini Kit entsprechend Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nach Homogenisierung wurde das Lysat bei maximaler Umdrehung der Zentrifuge abzentrifugiert, der Überstand in neues *Tube* überführt und dieses mit 350 µl 70 %igem EtOH vermischt. Anschließend wurde das geklärte Lysat auf eine Rneasy Spin-Säule aufgetragen und 15 s bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und auf die Säule 700 µl RW1-Puffer pipettiert. Nach Zentrifugation für weitere 15 s bei 8.000 x g wurde der Durchfluss wiederum verworfen und die Säule 2x mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 8.000 x g für 15 s bzw. 2 min). Die Säule wurde nachfolgend in ein neues *Tube* überführt und 30 µl RNase-freies H₂O auf die Membran gegeben. Die Elution der RNA erfolgte bei 8.000 x g für 1 min. Um die Konzentration zu ermitteln wurde das Eluat entsprechend Abschnitt 2.2.2 am Nanophotometer gemessen und stand bereit für die Umschreibung in cDNA. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -20 °C gelagert.

2.2.22 Reverse Transkriptase- (RT-) PCR

Als Reverse Transkriptase (RT-) PCR bezeichnet man die Umschreibung von zuvor isolierter RNA in komplementäre DNA (cDNA, complementary DNA). Die Methode wird verwendet, um nachfolgend die mRNA-Expression aktiver Gene innerhalb der Zelle quantifizieren zu können (siehe Abschnitt 2.2.23). Die RT-PCR wird dabei unter Verwendung retroviraler RNA-abhängiger DNA-Polymerasen vermittelt. Diese Enzyme sind gemeinhin Replikationsenzyme der Retroviren, die einzelsträngige RNA in DNA konvertieren. Während des Prozesses der Reversen Transkription lagern sich komplementäre Oligonukleotid-Primer an den RNA-Strang an und führen über die Elongation mit Hilfe von dNTPs zur Bildung einzelsträngiger cDNA. Zusätzlich zur Polymerase-Aktivität besitzen

retrovirale DNA-Polymerasen eine schwache DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität, der die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität fehlt. Daneben weisen die Polymerasen auch eine RNase H-Aktivität auf, welche RNA-*Templates* von RNA/DNA-Hybriden im Zuge der cDNA-Synthese degradieren. Für molekularbiologische Applikationen werden meist M-MLV (engl. *Moloney murine leukemia virus*) oder AMV (engl. *avian myeloblastosis virus*) als reverse Transkriptasen verwendet ¹⁶¹.

Im Zuge der RT-PCR wurden 50 ng zuvor isolierter RNA (siehe Abschnitt 2.2.21) verwendet. Für die Umschreibung wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit verwendet. Ein entsprechender Ansatz sowie die RT-PCR-Bedingungen sind Tab. 2.12 und Tab. 2.13 zu entnehmen. Nach cDNA-Synthese wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tab. 2.12: Ansatz für die RT-PCR

Reagenz	Volumen
5x iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transkriptase	1 µl
RNA	50 ng
Nuklease-freies H ₂ O	ad 20 µl

Tab. 2.13: RT-PCR-Bedingungen

Schritt	Temperatur	Zeit
Annealing	25 °C	5 min
Elongation	42 °C	30 min
Terminale Elongation	85 °C	5 min
Lagerung	4 °C	∞

2.2.23 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der PCR beruht. Zusätzlich zur Amplifikation des gewünschten Produkts ermöglicht das Verfahren zudem die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Somit kann die Expression des Zielgens bestimmt werden. Die Quantifizierung wird dabei mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung ist dabei die Nutzung von

Fluoreszenzfarbstoffen, wie SYBR® Green I, welches doppelsträngige DNA bindet und im grünen Wellenlängenbereich (λ_{max} 521 nm) Licht emittiert. Da während der Amplifikation des DNA-Fragments die doppelsträngige DNA zunimmt, erhöht sich auch das Fluoreszenzsignal im Ansatz. Die Auswertung erfolgt anschließend durch die Bestimmung des sog. C_T -Wertes (engl. *threshold cycle*). Der C_T -Wert gibt an, ab welchem Punkt die Fluoreszenz im PCR-Ansatz erstmals einen festgelegten Schwellenwert übersteigt. Mit Hilfe dieses Wertes kann die Expression des zu untersuchenden Gens bestimmt werden. Dafür stehen zwei Quantifizierungsstrategien zur Verfügung: (1) die absolute Quantifizierung, die mit Hilfe einer Kalibrierkurve durchgeführt wird, basierend auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR Produkten. Da diese allerdings schwer möglich ist, wird meist (2) die relative Quantifizierung bevorzugt. Hierbei wird die Genexpression des Zielgens auf ein nicht-reguliertes *housekeeping* Gen bezogen. Dafür werden Gene wie Tubulin, Glycerinaldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) oder Beta-Aktin verwendet. Diese werden oft bevorzugt, da deren Funktion relativ zum Grundhaushalt der Zelle als konstitutiv angesehen werden kann. Der Vorteil eines *housekeeping* Gens liegt demnach darin, dass nicht die absoluten Kopienzahlen bzw. Konzentrationen bestimmt werden, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens auf ein zweites, ubiquitär und homogen vorkommendes Gen bezogen wird.

Um die Expression von 3xFLAG-markkierten Z3 ZFNs nachzuweisen, wurden BALB/c Mäusen 20 μg Z3 mRNA (unmodifiziert mit/ohne NPs; s2U_(0,25)m5C_(0,25) mit/ohne NPs; Ψ _(1,0)m5C_(1,0) mit/ohne NPs i.t. appliziert (siehe Abschnitt 2.2.15.2). Zur Kontrolle wurde 100 μl PBS appliziert. Nach 24 h wurden die Lungen entnommen (siehe Abschnitt 2.2.15.4) und RNA isoliert (siehe Abschnitt 2.2.21). Für die qRT-PCR wurden 50 ng RNA in cDNA entsprechend Abschnitt 2.2.22 umgeschrieben. Die Detektion der Z3 cDNA erfolgte in einem Vii7. Das Pipettierschema der qPCR ist Tab. 2.14 zu entnehmen. Für jede Probe wurden dabei Triplikate nachgewiesen. Die Ansätze wurden für 10 min bei 95 °C inkubiert und anschließend für 40 Zyklen (15 s bei 95 °C und 2 min bei 50 °C) amplifiziert. Nachfolgend wurde eine Analyse der Schmelzkurven durchgeführt. Die für die pPCR verwendeten Primer können Tab. 2.15 entnommen werden. Die Auswertung der qRT-PCR bzw. der Expressionsunterschiede erfolgte über die REST® 2009 Software (siehe Abschnitt 2.2.25.1).

Tab. 2.14: Pipettierschema qPCR-Ansatz

Reagenz	Volumen (µl)
DNA	50 ng
SYBR Green	1,2 µl
Primer for (5 µM)	0,9 µl
Primer rev (5 µM)	0,9 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Tab. 2.15: verwendete Primer für die qPCR

Primer	Sequenz (5' – 3')
Z3-1 for	TGTACGGCTACAGGGGAA
Z3-2 rev	GCCGATAGGCAGATTGTA
Beta-Aktin for	TAGGCACCAGGGTGATG
Beta-Aktin rev	GCCATGTTCAATGGGGTACT

2.2.24 Korrelative Mikroskopie

Die korrelativen, mikroskopischen Aufnahmen wurden unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Claus-Michael Lehr am Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung, Saarbrücken, durchgeführt.

Als korrelative Mikroskopie (KM) bezeichnet man die Verwendung von unterschiedlichen Mikroskopie-Techniken, die sich sowohl hinsichtlich des Gerätetyps als auch auf Bildebene unterscheiden. Dadurch können verschiedene Technologien, wie die Licht-/Fluoreszenz und Elektronenmikroskopie, zur komplementären Charakterisierung an derselben Probenstelle zusammengeführt werden ¹⁶².

Die Fluoreszenzmikroskopie (FM) beruht auf dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz. Dabei werden die im untersuchten Präparat spezifisch angefärbten Strukturen durch Markierung mit Fluorochromen zur Emission bestimmter Wellenlängen angeregt. Durch Auswahl des passenden optischen Filters wird nur der Teil des Lichts durchgelassen, der für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs in einem bestimmten Wellenlängenbereich notwendig ist. Über einen Strahlteiler wird das Anregungslicht zum Objektiv gespiegelt und so die Fluoreszenz im Präparat erzeugt. Das emittierende, langwellige Fluoreszenzlicht wird anschließend wieder zum Strahlteiler reflektiert. Dieser lässt jedoch, aufgrund der Filtereigenschaft, das fluoreszierende Licht zum Okular bzw. Detektor durch, während das reflektierte Anregungslicht zum größten Teil wieder zur Lampe gelenkt wird. Der Teil des Anregungslichts, welcher jedoch den Strahlteiler passiert (aufgrund der höheren Intensität

des Anregungs- zum Fluoreszenzlicht), wird wiederum durch den Sperr- bzw. Emissionsfilter eliminiert. Durch geeignete Wahl des Anregungsfilters ist es so möglich, unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb eines Präparates zu verifizieren¹⁶³.

Das Prinzip der Rasterelektronenmikroskopie (REM) beruht dagegen auf der Erzeugung eines Elektronenstrahls, dessen Elektronen durch Wechselwirkung mit dem Objekt zur Erzeugung eines Bildes genutzt werden. Dabei wird die Oberfläche eines Präparats rasterförmig gescannt und so eine Tiefenschärfe dieser erreicht. Der Vorgang muss dabei im Hochvakuum stattfinden, um Wechselwirkungen von Elektronen der Luft zu eliminieren. Über eine Magnetspule wird dabei ein Elektronenstrahl erzeugt, der auf einen Punkt des Objekts fokussiert ist. Durch die Wechselwirkungen der Elektronen mit den Atomen der Oberfläche, kommt es zur Erzeugung von sog. Sekundärelektronen (SE). Diese besitzen eine relativ geringe Energie (≤ 50 eV, Elektronenvolt) und werden aus der atomaren K-Schale (innerste Schale des Atoms) des untersuchten Präparats ausgestoßen. Da diese nur aus den Oberflächen-nahen Regionen stammen, bilden diese somit nur die Topographie des Objektes ab. Die entstandenen SE werden anschließend über ein modifiziertes Szintillations-Photomultiplier-System, den Everhart-Thornley-Detektor, gemessen. Die Auflösung wird dabei nur durch den Strahldurchmesser bestimmt. Da dieser relativ klein ist, erlauben REM-Aufnahmen eine sehr hohe Auflösung von wenigen Nanometern¹⁶⁴.

Durch die Kombination der FM mit der REM ist es möglich, die Vorteile beider Systeme in einem Bild darzustellen. Dadurch können die funktionellen Informationen aus der FM mit den strukturellen Informationen der REM kombiniert werden und erlauben so eine direkte Beziehung der erhaltenen Informationen herzustellen.

Zum optischen Nachweis der Expression von Z3 ZFNs wurden A549-Zellen in RPMI-Medium (10 % FCS) bei 37 °C und 5 % CO₂, kultiviert. Die Zellen wurden dabei auf eigens präparierten Glas-Petrischalen vermehrt. Sobald die Zellen zu 50 – 60 % konfluent waren wurden diese 1x mit PBS gewaschen und RPMI-Medium - versetzt mit NP-komplexierter (NPX; Cs-PLGA NP) Z3 mRNA, an welches Fluoresceinamin-Isomer I kovalent gebunden war - zugegeben. Nach 24 h Inkubation wurde den Zellen nochmals NPX für 5 -10 min zugegeben, bevor diese mit 100 % Methanol (MetOH) fixiert worden sind. Für die FM wurden die Proben mit PBS gewaschen und anschließend mit einem FITC-markierten AK (monoclonal anti-FLAG® M2 FITC, F4049) für 1 h bei RT gefärbt. Die Zellen wurden gewaschen und die Zellmembran mit RCAI für 7 min bei RT gefärbt. Anschließend wurden die Zellen nochmals gewaschen und die Zellkerne mit DAPI (A1001) für 15 min bei RT

gefärbt. Die Quervernetzung der Proteine wurde durch Zugabe eines Fixativs (2 % Glutaraldehyd, 4 % Formaldehyd) erreicht. Nachfolgen wurden die Zellen in PBS gelagert. Die FM-Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop Zeiss LSM 780 [Axio observer inverted microscope; NDD PMT detector (405 nm: Dioden-Laser, 30 mW; 458/488/514 nm: Argon-Laser, 25 mW; 633 nm: Helium-Neon-Laser, 5 mW; verwendete Objektive: Plan-Apochromat 10x/0.45 W; Plan-Apochromat 20x/0.8 W (für Übersichtsbilder) und C-Apochromat 40x/1.2 W] durchgeführt. Nach den FM-Aufnahmen wurden die Proben für die anschließenden REM-Aufnahmen schrittweise dehydriert. Die Zellen wurden dafür in einer aufsteigenden MetOH-Reihe (10 - 100 %, Erhöhung um je 10 %) inkubiert und anschließend für je 3 min in 50 % MetOH/EtOH, 50 % MetOH/Aceton und nachfolgend 3x in 100 % Aceton, inkubiert. Die Zellen wurden mittels einer Überkritischen Trocknung durch CO₂ getrocknet und mit Platinpartikeln (10 mA, 20 s) besprüht. Die REM-Aufnahmen wurden an einem Zeiss Aurugia mittels SESI- (Sekundärelektronen/ Sekundärionen) Detektor bei einer Spannungsbeschleunigung von 1,5 kV und einer Distanz von 5 mm aufgenommen.

2.2.25 Statistiken

2.2.25.1 Paarweise fixierter Reallokations – Randomisations – Test

Für die Berechnung der mRNA-Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurde ein paarweise fixierter Reallokations-Randomisations-Test durchgeführt. Prinzipiell werden für die Quantifizierung zwei Strategien angewandt: (1) die absolute Quantifizierung und (2) die relative Quantifizierung (siehe Abschnitt 2.2.23). Dabei wird für die relative Quantifizierung das Verhältnis der relativen Expression eines Zielgens aufgrund der Effizienz (E) der qRT-PCR und den Unterschieden (Δ) der C_T-Werte zwischen der zu bestimmenden Probe und einer Kontrolle errechnet.

$$Ratio = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta C_T_{Zielgen(Kontrolle-Probe)}}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta C_T_{Referenzgen(Kontrolle-Probe)}}$$

In mathematischen Modellen wird die Expression des Zielgens üblicherweise durch ein nicht-reguliertes Referenzgen normalisiert. Alle diese Berechnungen erlauben nur die Bestimmung eines einzelnen transkriptionellen Unterschieds zwischen der Kontrolle und der

zu untersuchenden Probe ($n = 1$), jedoch keinen Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen ($n \geq 2$). Die REST© (engl. *relative expression software tool*) Software erlaubt eine Berechnung des relativen Unterschieds zwischen zwei Gruppen mit bis zu 16 Datenpunkten je Gruppe. Die Software prüft dabei die Gruppen auf signifikante Unterschiede mittels eines Randomisierungs-Tests. Der Test vermeidet dabei, anders als parametrische Tests, wie bspw. der t-Test oder die ANOVA (engl. *analysis of variance*), die Annahme von Normalverteilungen. Im Falle der Expressionsunterschiede, wo die erhobenen Mengen aus Verhältnissen herrühren und zudem Varianzen relativ hoch sein können, würde eine Normalverteilung nicht erwartet werden. Stattdessen basiert der Test auf der randomisierten Allokation, d.h. die beobachteten Werte werden wiederholt und randomisiert den beiden Gruppen zugewiesen. Der Test merkt sich diese scheinbaren Effekte (also das Verhältnis der Genexpression) und errechnet den p-Wert über das Verhältnis dieser Effekt zur tatsächlichen Beobachtung. Der p-Wert wird somit über das Verhältnis der randomisierten Allokation der durchschnittlich beobachteten Daten zu den Kontroll- und behandelten Gruppen errechnet, welcher einen stärkeren Hinweis auf den eigentlichen Behandlungseffekts geben sollte als die tatsächlich beobachtete Daten.

2.2.25.2 Wilcoxon-Mann-Whitney – Test

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (auch U-Test) ist ein nicht-parametrischer, statistischer Homogenitätstest und wurde zur Analyse aller – soweit nicht anders erwähnt - durchgeführten Experimente verwendet. Der Test wird zur Überprüfung der Signifikanz zweier Verteilungen herangezogen und erlaubt eine Aussage darüber, ob diese zu einer Grundgesamtheit gehören.

2.2.25.3 Varianzanalyse - ANOVA

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten der Lungen-*Compliance* (siehe Abschnitt 2.2.15.7) erfolgte über eine zweifaktorielle Varianzanalyse. Hierbei wurden zwei Faktoren (Volumen und Druck) zur Erklärung der Zielvariablen (HDR) berücksichtigt.

3. Ergebnisse

3.1 Selektion der ZFNs und TALENs

Für die Selektion sequenzspezifischer Zink-Finger Nukleasen (ZFN) sowie *Transcription activator-like* (TAL) *effector*- Nukleasen (TALENs), welche die homologe Rekombination (HDR, engl. *homology directed repair*) der transgenen *Surfactant Protein-B* (SP-B) Kasette mit dem *Donor-Template* gewährleisten sollen, wurden verschiedene ZFNs und TALENs synthetisiert. Diese binden und schneiden an verschiedenen Stellen innerhalb der Kasette und führen so zu einem Doppelstrangbruch (DSB, siehe [Abb. 3.1A](#); ausführliche Sequenz-Informationen sind dem Anhang 5.2 zu entnehmen). Um die Effizienz der synthetisierten Nukleasen zu testen, wurde extern ein DLSSA-Assay durchgeführt, dessen Verhältnis von *Firefly*- zu *Renilla*-Luciferase-Aktivität Aufschluss über die Schnitt-Effizienz gibt (siehe Anhang, [Anh. 5.1](#)). Hierbei zeigten sich die ZFNs 2 (Z2), Z3, Z4 und Z5 sowie die TALENs 1 (T1), T2 und T4 einen DSB zu erzeugen am vielversprechendsten. Die Luciferase-Ratio lag dabei im Vergleich zu den anderen synthetisierten Nukleasen deutlich höher. Zudem konnte eine stabile Transfektionseffizienz in MLE12-Zellen von durchschnittlich $10,65 \pm 0,76$ % mit 3xFLAG-markierten Nukleasen (siehe [Anh. 5.2](#)) nachgewiesen werden. Dafür wurden je 80.000 MLE12-Zellen in 24-*well* Platten ausgesät und diese nach 24 h einer durchflusszytometrischen Analyse durch AK-Markierung der 3xFLAG-markierten Nukleasen unterzogen. Verifiziert wurde die Generierung eines Nuklease-induzierten DSBs über einen T7-Assay. Dieser Assay weist Heterodimere nach, welche sich nach DSB und anschließender Hybridisierung ergeben. Dafür wurden primäre Fibroblasten (je 50.000 Zellen in 24-*well* Platten) mit je 5 µg ZFNs (Z2, Z3, Z4) bzw. TALENs (T1, T2, T4) transfiziert und die genomische DNA nach 72 h isoliert. Als Kontrolle dienten untransfizierte, primäre Fibroblasten. Ungeschnittene Amplifikate genomischer DNA wurden dabei im Agarosegel als eine 227 bp (T1) bzw. 211 bp (Z3) große Bande sichtbar. Nuklease-induzierte DSBs führten hingegen zu zwei zusätzlichen, kleineren Banden (T1: 110 bp/180 bp; Z3: 85 bp/126 bp). Während im T7-Assay die Nukleasen T2 und Z2 weniger induzierte DSBs erzeugten, zeigten alle anderen Nukleasen, entsprechend dem DLSSA-Assay, eine hohe Schnitt-Effizienz, hervorgerufen durch kleine Insertionen und Deletionen (indels), welche charakteristisch für den Reparaturmechanismus des Nicht-homologen *end-joining* (NHEJ, engl. *non-homologous end-joining*) sind. Dabei erreichten die TALENs indel-Raten von bis zu 33 % der Allele für T1 und 45 % für ZFN Z5 (siehe [Abb. 3.1B](#)). Das ZFN-Paar

Z3 generierte mit 39 % ähnlich hohe Nuklease-induzierte DSBs wie die durch Z5 verursacht wurden. Aufgrund dieser hohen Schnitt-Effizienz sowie der günstig gelegenen - direkt *upstream* der murinen SP-B cDNA - Bindungsstellen von Z3 innerhalb der transgenen SP-B-Kassette (siehe Abb. 4.1), wurde der Fokus für den weiteren experimentellen Verlauf auf das ZFN-Paar Z3 gelegt.

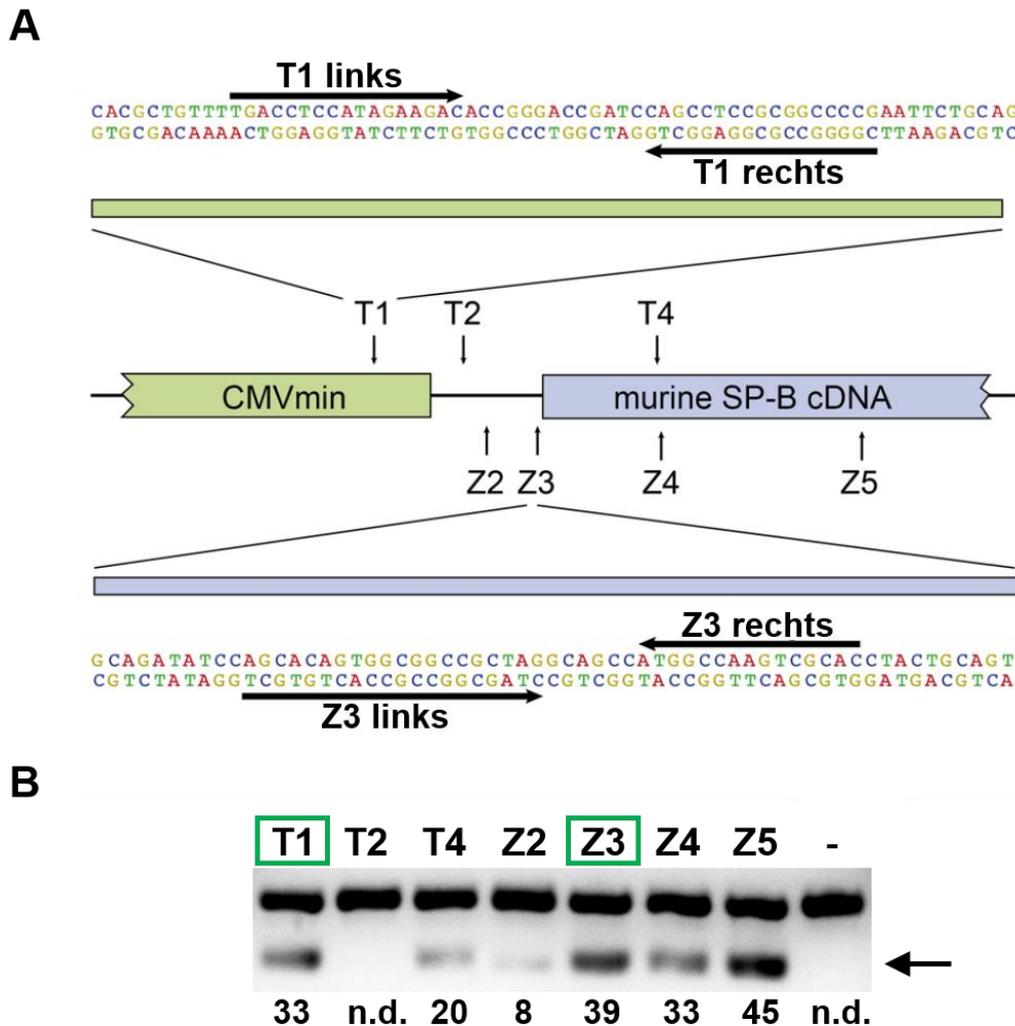


Abb. 3.1: (A) Transgene SP-B Kasette und Bindungsstellen der ZFNs und TALENs. Die jeweiligen Nukleasen binden dabei an unterschiedliche Sequenz-Bereiche innerhalb der SP-B-Kassette. Für die Nuklease-Paare T1 und Z3 sind zusätzlich die genauen Bindungssequenzen angegeben. (B) T7-Assay verschiedener Nukleasen. Primäre Fibroblasten wurden dabei mit je 5 µ ZFN-/TALEN-pDNA transfiziert und nach 72 h die genomische DNA isoliert. Der anschließende T7-Assay zeigt die prozentuale Häufigkeit der durch das NHEJ erzeugten kleinen Insertionen und Deletionen (indels). n.d., nicht detektiert.

3.2 Vergleich zwischen modifizierter IVT mRNA und pDNA

Aufgrund der geringeren Immunogenität von *in-vitro* transkribierter (IVT) mRNA zu Plasmid-DNA (pDNA) wurde im Folgenden die Effizienz dieser beiden unterschiedlich Nukleinsäure-kodierenden Formen, einen DSB zu generieren, zwischen den Nukleasen T1 und Z3 verglichen. Dazu wurden wiederum primäre Fibroblasten in aufsteigender Konzentration (0,5 – 5 µg) an mRNA- bzw. pDNA-kodierenden Nukleasen transfiziert und nach 3 Tagen die genomische DNA für den nachfolgenden T7-Assay isoliert. Als Kontrollen dienten untransfizierte Fibroblasten. Sofern die Nukleasen schnitten, ergab sich wiederum ein Bandenmuster mit einer 227 bp (T1) bzw. 1256 bp (Z3) großen, ungeschnittenen Bande sowie jeweils zwei geschnittenen Banden (T1: 110 bp/118 bp; Z3: 164 bp/1092 bp, siehe [Abb. 3.2](#)). Vergleicht man nur die beiden pDNA-transfizierten Nukleasen untereinander, so zeigte sich konzentrationsabhängig eine höhere Schnitt-Effizienz für die Ausprägung Nuklease-induzierter DSBs bei der ZFN Z3 im Vergleich zur TALEN T1 (23 % und 47 % [Z3] versus 18 % und 30 % [T1], siehe [Abb. 3.2A](#)). Die gleiche Tendenz zeigte sich ebenfalls für IVT mRNA-transfizierte Nukleasen: mit steigender Konzentration an mRNA-kodierender T1 und Z3 erhöhte sich die Häufigkeit für indels (32 % und 46 % [T1] versus 39 % und 58 % [Z3]). Dabei war die Rate Nuklease-induzierter DSBs innerhalb der mRNA-Gruppe signifikant höher und nahm, verglichen mit pDNA-transfizierten Fibroblasten, um durchschnittlich $34 \pm 9 \%$ zu ($P < 0,05$).

Zusätzlich wurde die Effizienz für den Einbau eines Donor-*Templates* durch den Reparaturmechanismus der HDR evaluiert. Dazu wurde ein *Template* konstruiert, welches an der Stelle des Nuklease-induzierten DSBs eine neue NheI-Restriktionsschnittstelle einbaute. Primäre Fibroblasten wurden dazu mit den IVT mRNA- oder pDNA- kodierenden Nukleasen T1 bzw. Z3 (je 5 µg) transfiziert, als auch zusätzlich in aufsteigenden Konzentrationen mit einem NheI-Donorplasmid (0 – 4 µg). Nach 72 h wurde die genomische DNA isoliert. Als Kontrolle dienten dabei untransfizierte Fibroblasten bzw. eine Transfektion mit Mock-pDNA (*Foxp3*). Über einen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP-Assay) wurde der Einbau des NheI-Inserts festgestellt. Dazu wurde der entsprechende Sequenzbereich amplifiziert und nachfolgend mit dem Restriktionsenzym NheI verdaut. Ungeschnittenes Amplifikat zeigte sich im Agarose-Gel als ein 252 bp (T1) bzw. 1281 bp großes DNA-Fragment, während geschnittenes PCR-Produkt zudem zwei kleinere Banden aufwies (T1: 112 bp/141 bp; Z3: 166 bp/1115 bp, siehe [Abb. 3.2B](#)).

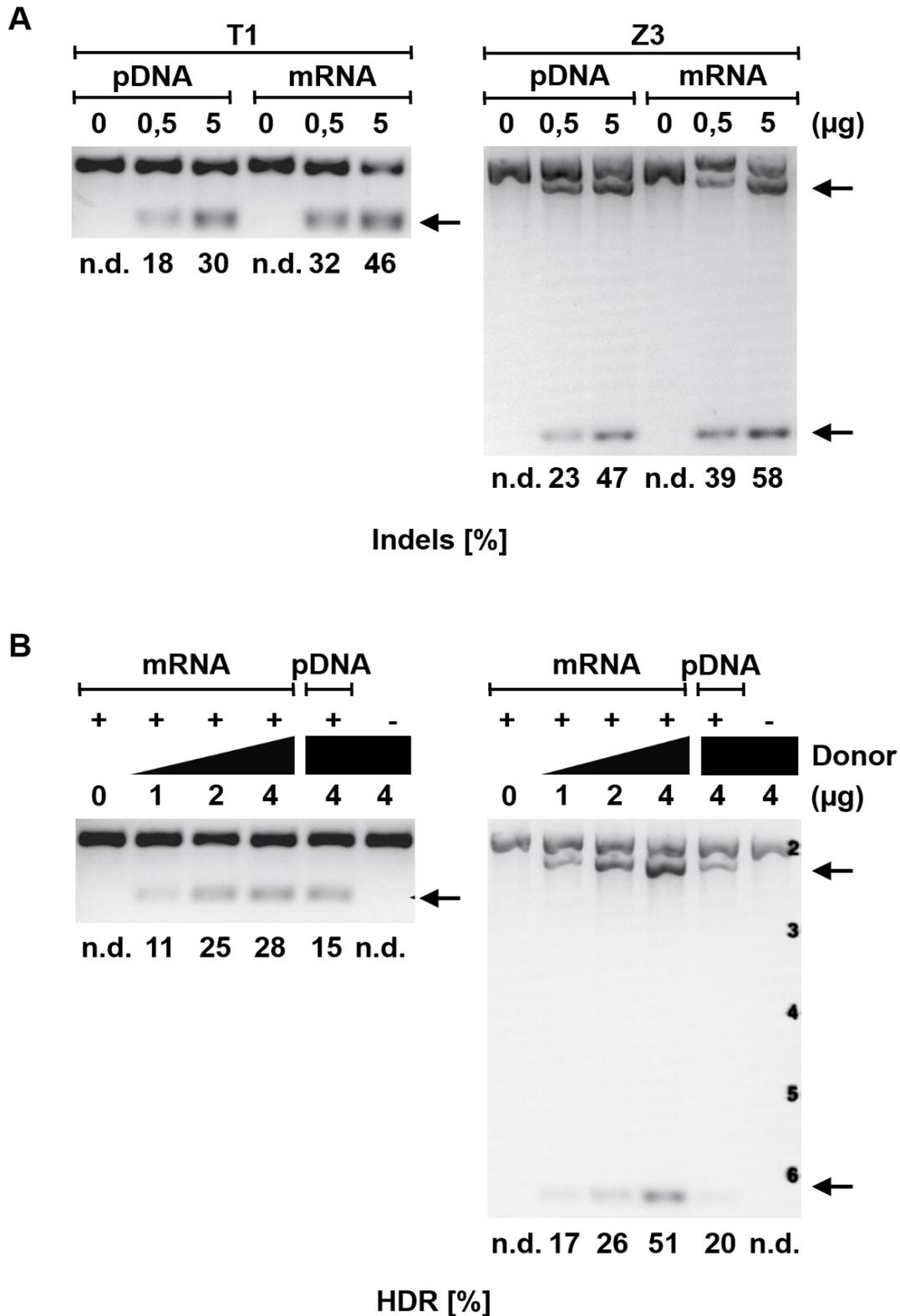


Abb. 3.2: Vergleich der Schnitt-Effizienz und HDR-vermittelten Integration zwischen pDNA und IVT mRNA. (A) Im T7-Assay wiesen mRNA-kodierende Nukleasen eine deutlich höhere Effizienz auf einen DSB zu erzeugen auf, als pDNA. Indels, Insertionen und Deletionen. (B) Im RFLP-Assay zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der HDR-vermittelten Integration des NheI-Inserts bei Co-Transfektion mit mRNA-kodierenden ZFNs und TALENs. HDR, *Homology Directed Repair* (Homologe Rekombination); n.d., nicht detektiert.

Innerhalb der Gruppe pDNA-transfizierter Fibroblasten lag die Effizienz einer HDR-vermittelten Integration des Inserts zwischen 15 % (T1) und 20 % (Z3). Dieses Ergebnis wurde bereits mit der Co-Transfektion von 1 µg Donor-*Template* in der mRNA-Gruppe erreicht (11 % [T1] versus 17 % [Z3]). Hier stieg der Anteil der HDR sogar signifikant mit zunehmender Konzentration auf bis zu 28 % für T1 und 51 % für Z3 an ($P < 0,05$). Da die ZFN Z3 im Vergleich zur TALEN T1 sowohl in der Effizienz einen Nuklease-induzierten DSB zu erzeugen, als auch in der Effizienz der HDR-vermittelten Integration des Donor-*Templates* überlegen war (siehe [Abb. 3.2](#)), wurde die Nuklease Z3 für alle weiteren experimentellen Ansätze verwendet. Die korrespondierende Aminosäure-Sequenz ist [Anh. 5.3](#) zu entnehmen.

Dass mRNA-kodierende ZFN Z3 auch in Zellen exprimiert und auch im Nukleus lokalisiert sind, zeigen die korrelativen, mikroskopischen Aufnahmen in [Anh. 5.4](#). Dazu wurden humane, alveoläre A549-Zellen mit Nanopartikeln (NPs) komplexierter, 3xFLAG-markierter Z3-mRNA transfiziert und am Fluoreszenz- bzw. Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Überlagerung unabhängig voneinander erstellter Aufnahmen unterschiedlicher Fluoreszenzen und Auflösung erlaubt dabei die genaue Lokalisation der im FITC-Kanal detektierten Nukleasen relativ zur Zelle. Die ZFN Z3 konnte somit im Zellkern (DAPI, blau Färbung), entsprechend ihrer Funktion, ausgemacht werden.

3.3 Optimierung der Z3 mRNA Expression

Vor dem Hintergrund einer in vivo-Applikation der Z3 mRNA, wurde zunächst eine Optimierung der mRNA mittels modifizierter Nukleotide vorgenommen. Zwei bereits etablierte mRNA-Modifikations-Schemata wurden dafür herangezogen: $\Psi_{(1,0)}/m5C_{(1,0)}$ sowie $s2U_{(0,25)}/m5C_{(0,25)}$ ^{116-118,165,166}. Für die Modifikation $\Psi_{(1,0)}/m5C_{(1,0)}$ wurden alle UTPs sowie CTPs durch die modifizierten Analoge Pseudouridin (Ψ) bzw. 5-Methylcytosin (m5C) ersetzt. Im Falle der Modifikation $s2U_{(0,25)}/m5C_{(0,25)}$ wurden je 25 % der UTPs und CTPs durch 2-Thiouridin bzw. m5C ausgetauscht.

Die unterschiedlich modifizierten, mRNA-kodierenden Z3 Nukleasen wurden zunächst auf ihre zeitliche Expression hin untersucht. Dafür wurden je 1 µg modifizierte, sowie als Referenz unmodifizierte Z3 mRNA in A549-Zellen transfiziert. Parallel dazu wurde als Vergleich Z3 AAV (1×10^6 v.g. für jede Z3 ZFN) transduziert. Nach 1, 2, 3, 4, 5, 7 sowie 14 Tagen wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch auf deren Expression über den 3xFLAG-*Tag* untersucht (siehe [Abb. 3.3](#)). Als Kontrolle diente die Zugabe von PBS.

Wie Abb. 3.3 veranschaulicht, wurde die Z3 mRNA in den ersten 72 h exprimiert und fiel ab Tag 4 rasch auf ein Expressionsniveau von unter 20 % ($14,76 \pm 5,56$ %) ab. Dabei waren Unterschiede zwischen den einzelnen Modifikationen zu erkennen. Im Vergleich zu unmodifizierter mRNA, welche in den ersten 3 Tagen eine durchschnittliche Expression von $35,21 \pm 7,2$ % aufwies, führten beide Modifikationen zu einer deutlich höheren Expression von $61,36 \pm 14,19$ % für $s2U_{(0,25)}/m5C_{(0,25)}$ und $84,15 \pm 6,35$ % für $\Psi_{(1,0)}/m5C_{(1,0)}$. Zudem wiesen die mRNA-Modifikationen eine höhere Stabilität auf. Während die Expression unmodifizierter Z3 mRNA mit Tag 2 rasch abnahm, blieb die Expression beider Modifikationen bis 72 h nach Transfektion relativ stabil. Im Gegensatz dazu erreichten die Z3 AAV Nukleasen erst mit Tag 7 ein entsprechendes Expressionsniveau, welches bis zum Versuchsende nur noch langsam anstieg ($74,53 \pm 3,16$ an Tag 7 versus $81 \pm 3,32$ % an Tag 14). So ergibt sich für Z3 mRNA und Z3 AAV eine unterschiedliche Kinetik. Während mRNA innerhalb der ersten 3 Tage exprimiert wurde und danach rasch an Intensität verlor, erreichte der Z3 AAV sein Expressionsplateau erst mit Tag 7.

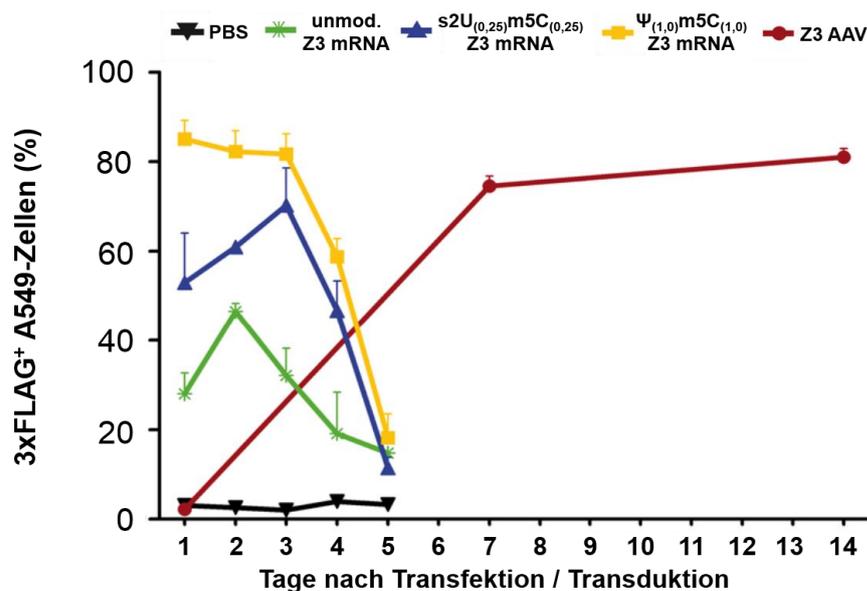


Abb. 3.3: Zeitliche Darstellung der Kinetik sowie der Stabilität von 3xFLAG-markierter Z3 mRNA versus Z3 AAV in A549-Zellen. 3xFLAG-markierte Z3 mRNA ($1 \mu\text{g}$) sowie Z3 AAV (1×10^6 v.g.) wurden in A549-Zellen transfiziert bzw. transduziert und nach 1, 2, 3, 4, 5, 7 und 14 Tagen über ein durchflusszytometrische Messung die Expression der 3xFLAG-markierten Z3-Nukleasen bestimmt ($n = 3$).

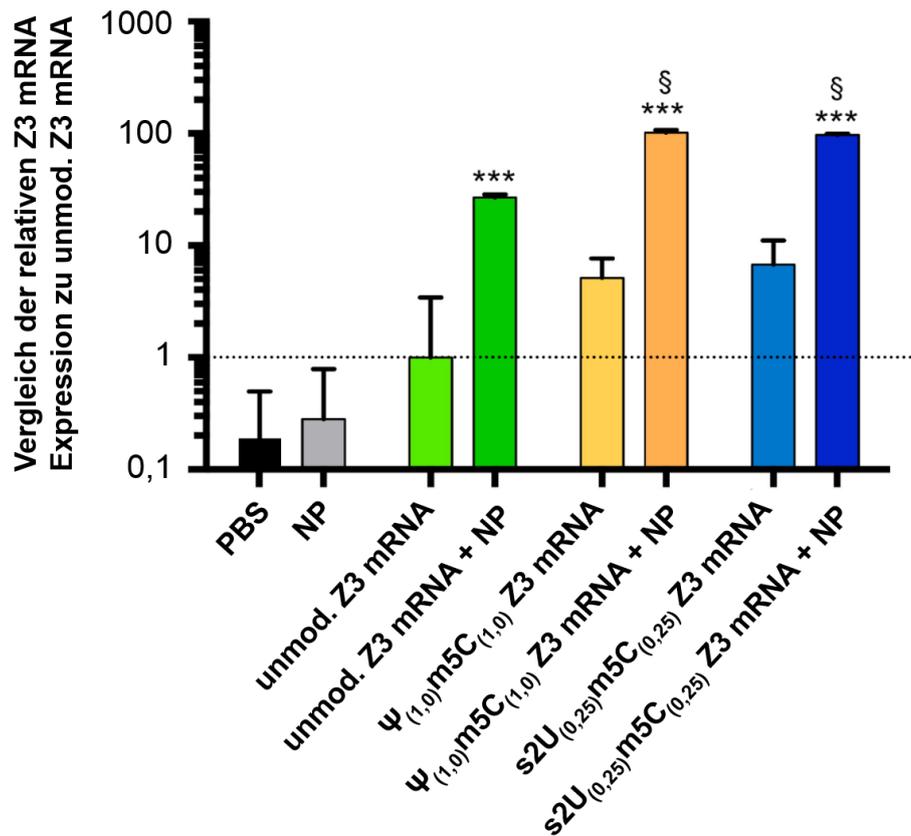
Die mRNA-Modifikationen wurden anschließend *in vivo* getestet und deren Expression in Lungenzellen evaluiert. Dafür wurden BALB/c-Mäusen je $20 \mu\text{g}$ 3xFLAG-markierte Z3 mRNA (modifiziert oder unmodifiziert, $n = 5$ je Gruppe) intratracheal (i.t.) über eine Hochdruck-injektionsspritze verabreicht. Zusätzlich wurde die mRNA in abbaubare, mit

Chitosan versetzte poly(D,L-Laktid-co-Glykosid) Nanopartikel (NPs) komplexiert, um die Expression der Nukleasen zwischen komplexierter und „nackter“ mRNA vergleichen zu können. Kontrollmäusen wurde entweder PBS oder reine NPs appliziert. Nach 24 h wurden die Lungen entnommen und die RNA aus dem Gewebe isoliert. Nach reverser Transkription in cDNA wurde diese über eine qRT-PCR quantitativ ausgewertet (siehe [Abb. 3.4A](#)). Die relative Expression der Z3 Nukleasen wurde dabei auf die Behandlung mit unmodifizierter Z3 mRNA normalisiert. Während Kontrollgruppen keine Expression der Z3 Nuklease zeigten, nahm die Expression für beide Modifikations-Schemata im Vergleich zu unmodifizierter mRNA zu. Diese blieb für die Administration ohne NP relativ moderat ($5,32 \pm 1,19$ % für $s2U_{(0,25)}/m5C_{(0,25)}$ und $6,42 \pm 1,27$ für $\Psi_{(1,0)}/m5C_{(1,0)}$). Die zusätzliche Komplexierung mit NPs führte jedoch zu einer signifikanten Erhöhung der Z3 Nuklease-Expression im Lungengewebe. Diese steigerte sich für unmodifizierte Z3 mRNA mit NPs im Vergleich zu rein unmodifizierter mRNA um $26,33 \pm 1,43$ % ($P < 0,001$). Des Weiteren führten die beiden Modifikationen der Z3 mRNA ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der Z3 Expression. So stieg im Vergleich zu unmodifizierter mRNA ohne NPs die Proteinexpression mit der Modifikation $s2U_{(0,25)}/m5C_{(0,25)}$ um das Hundertfache ($101,21 \pm 2,74$ %, $P < 0,001$) an. Ähnliche Werte erreichte die Modifikation $\Psi_{(1,0)}/m5C_{(1,0)}$ mit $97,32 \pm 1,12$ % ($P < 0,001$). Vergleicht man komplexierte, unmodifizierte Z3 mRNA mit den NP-versetzten Modifikationen, so ergab sich auch hier eine signifikante Erhöhung der Z3 Nuklease-Expression im Lungengewebe (siehe [Abb. 3.4A](#), $P < 0,05$).

Neben der Quantifizierung über die qRT-PCR wurden zusätzliche FACS-Expressionsanalysen der 3xFLAG-markierten Z3 Nukleasen in verschiedenen Zelltypen der Lunge durchgeführt. Neben der Gesamtheit an Lungenzellen wurden die für die Sekretion des *Surfactant* verantwortlichen Clara-Zellen, als auch die alveolären AT-II-Stammzellen untersucht (siehe [Abb. 3.4B](#)). Hierbei wurde der Vergleich zwischen in NPs komplexierter, modifizierter ($s2U_{(0,25)}/m5C_{(0,25)}$ sowie $\Psi_{(1,0)}/m5C_{(1,0)}$) und unmodifizierter Z3 mRNA gezogen. Zusätzlich wurde die Expression der Z3 Nukleasen bei i.t. Gabe der modifizierten Form $s2U_{(0,25)}/m5C_{(0,25)}$ ohne Komplexierung in NP analysiert.

Betrachtet man die Expression der Z3 Nukleasen in Lungenzellen, so erhöhte sich diese ebenfalls für die Applikation von modifizierter im Vergleich zu unmodifizierter mRNA. Im Falle unmodifizierter mRNA wurde diese in $32,96 \pm 2,39$ % aller Lungenzellen exprimiert.

A



B

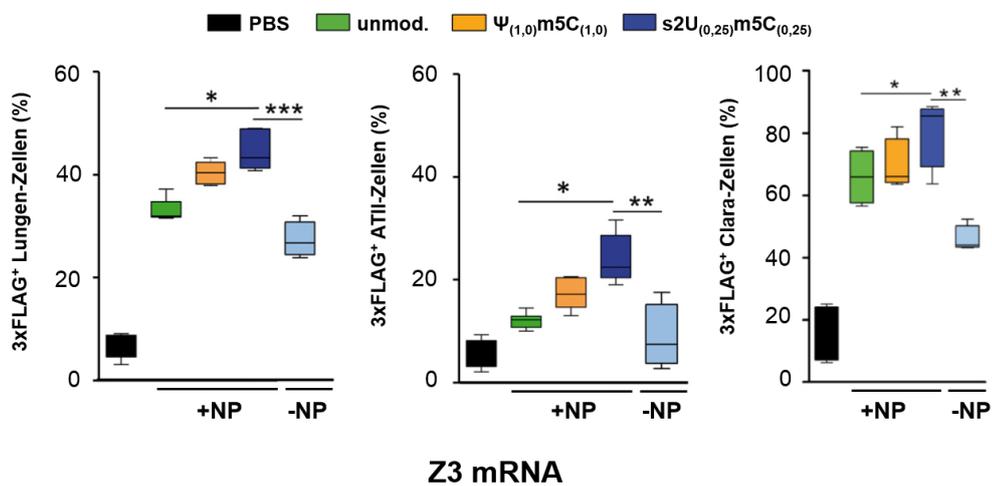


Abb. 3.4: Bestimmung der Protein Expression in Lungen-Zellen. (A) Die i.t.-Applikation von Z3 mRNA führt zu einer effektiven Expression der Nukleasen in Lungenzellen. BALB/c-Mäuse (n = 5 pro Gruppe) wurde dafür (un-)modifizierte Z3 mRNA (je 20 µg) mit oder ohne NPs appliziert und nach 24 h die RNA aus dem Lungengewebe isoliert. Nach reverser Transkription wurde die cDNA über eine qRT-PCR quantifiziert und auf unmodifizierte mRNA normalisiert. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$ versus unmod. Z3 mRNA ohne NP; § $P < 0,05$ versus unmod. Z3 mRNA mit NP. (B) BALB/c Mäuse (n = 4 je Gruppe) wurde i.t. 3x-FLAG-markierte Z3 mRNA appliziert. Nach 24 h wurden die Lungen entnommen, diese verdaut und die Lungenzellen isoliert und entsprechend dem Zelltyp für die anschließende FACS-Analyse markiert. Boxen repräsentieren Mediane \pm IQRs (Interquartilsabstände), Whisker die Minima und Maxima. NP, Nanopartikel; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$

Eine signifikante Erhöhung wurde hier ebenfalls durch die Gabe der Z3 mRNA mit der Modifikation s2U_(0,25)/m5C_(0,25) erreicht. Hier stieg der Anteil Nuklease-exprimierender Zellen signifikant auf $44,74 \pm 3,90$ % an ($P < 0,05$). Vergleicht man diese auf ihre Komplexierung mit NPs hin, so zeigte sich, dass in NP verpackte mRNA eine deutlich höhere Expression aufwies als „nackte“ mRNA. Der Unterschied war auch hier mit einer bedeutend geringeren Expression von $26,93 \pm 2,77$ % für nicht komplexierte mRNA signifikant ($P < 0,001$).

Die FACS-Analysen von AT-II- sowie Clara-Zellen wiesen die gleiche Tendenz auf (siehe [Abb. 3.4B](#)). Mit NPs applizierte, unmodifizierte mRNA exprimierten die Z3 Nukleasen im geringeren Maße als dies für die Applikation modifizierter mRNA der Fall war (AT-II-Zellen: $12,05 \pm 1,52$ % unmodifiziert versus $24,08 \pm 4,81$ % s2U_(0,25)/m5C_(0,25); Clara-Zellen: $65,95 \pm 8,64$ % unmodifiziert versus $80,8 \pm 11,49$ % s2U_(0,25)/m5C_(0,25)). Zu beachten ist jedoch, dass die beiden Zelltypen einen deutlichen Unterschied bezüglich der Expressionsstärke zeigten. Clara-Zellen exprimierten dabei im Durchschnitt $75 \pm 4,1$ % mehr Z3 Nukleasen als AT-II-Zellen. In beiden Zelltypen erreichte jedoch die Modifikation s2U_(0,25)/m5C_(0,25) komplexiert in NPs die höchste Expression. Dass die mRNA auch das alveoläre Lungenepithel erreichte und von Lungenzellen aufgenommen wurde, unterstreichen ebenfalls die Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Lungenschnitten aus den zuvor behandelten BALB/c-Mäusen. Über eine Fluoreszenz-markierte AK-Bindung an die 3xFLAG-Sequenz der Z3-Nukleasen wurden diese im alveolären Lungenepithel nachgewiesen (siehe [Abb. 3.5](#)). Die mit NP komplexierte und modifizierte mRNA erreichte dabei deutlich mehr alveoläre Epithelzellen, als unmodifizierte, mit NP verpackte Z3 mRNA. Zusammenfassend konnte für die Kombination aus modifizierter s2U_(0,25)/m5C_(0,25) Z3 mRNA, komplexiert mit NPs, eine effektive Aufnahme in Lungenzellen sowie die höchste Expression in Lungenzellen nachgewiesen werden.

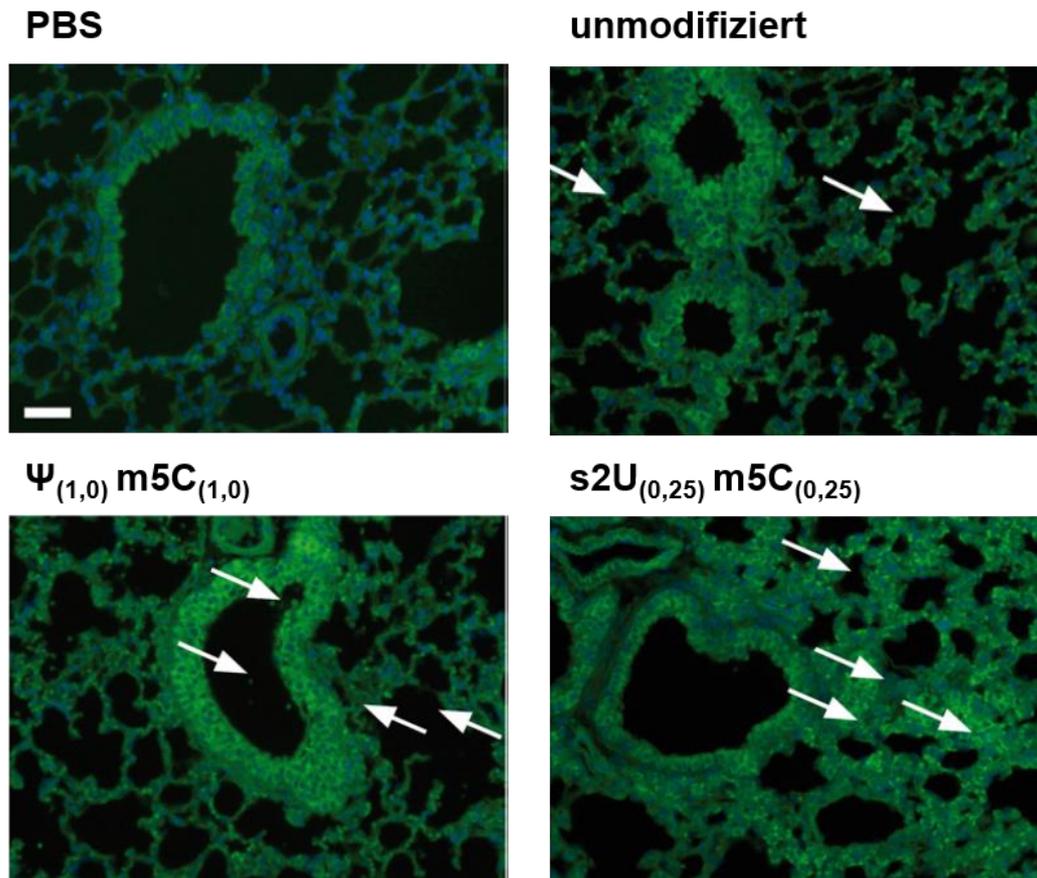


Abb. 3.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 3xFLAG-markierten Z3-Nukleasen in Lungenschnitten von BALB/c-Mäusen. Repräsentative histologische Lungenschnitte lassen die durch i.t. Applikation in alveoläre Epithelzellen aufgenommenen Z3 Nukleasen als grüne Fluoreszenz über deren 3xFLAG-Tag erkennen (siehe Pfeile). Maßstab, 50 μm .

3.4 In vivo Immunreaktion auf Z3 mRNA

IVT mRNA wird durch verschiedene endosomale Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt. Die Bindung dieser Rezeptoren führt wiederum zur Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden, welche eine Entzündungsreaktion auslösen können und u.a. im Zusammenhang mit der Produktion von Typ-I Interferonen, wie Interferon- α (IFN- α), stehen.¹¹⁹

Um die Reaktion unterschiedlich modifizierter Z3 mRNA auf die Synthese von IFN- α hin zu untersuchen, wurden je 1 μg IVT mRNA (unmodifiziert, s2U_(0,25)/m5C_(0,25) und $\Psi_{(1,0)}$ /m5C_(1,0)) mit oder ohne NP entweder intraperitoneal (i.p.) oder i.t. BALB/c-Mäusen (n = 3 je Gruppe) appliziert. Als Kontrolle dienten Mäuse, denen PBS injiziert wurde. Zusätzlich wurde die ausschließliche Gabe von NPs und deren Auswirkung auf die IFN- α Stimulation untersucht. Nach 6 h bzw. 24 h wurde das Serum aus dem Blut der Mäuse isoliert

und die IFN- α Produktion mittels eines ELISAs evaluiert (siehe Abb. 3.6). Hier zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe für die Administration von NPs bzw. IVT mRNA ohne NPs keine Erhöhung der IFN- α -Werte, weder 6 h noch 24 h nach Injektion. Diese lagen dabei im anti-inflammatorischen Bereich mit Werten von durchschnittlich $51,35 \pm 3,96$ pg/ml (6 h-Wert) bzw. $30,36 \pm 7,17$ pg/ml (Kontrollgruppen: $43,85 \pm 1,77$ nach 6 h bzw. $42,27 \pm 16,32$ pg/ml nach 24 h). Lediglich die i.p. Applikation modifizierter mRNA in Kombination mit NPs zeigte nach 6 h eine Erhöhung des IFN- α -Spiegels im Serum.

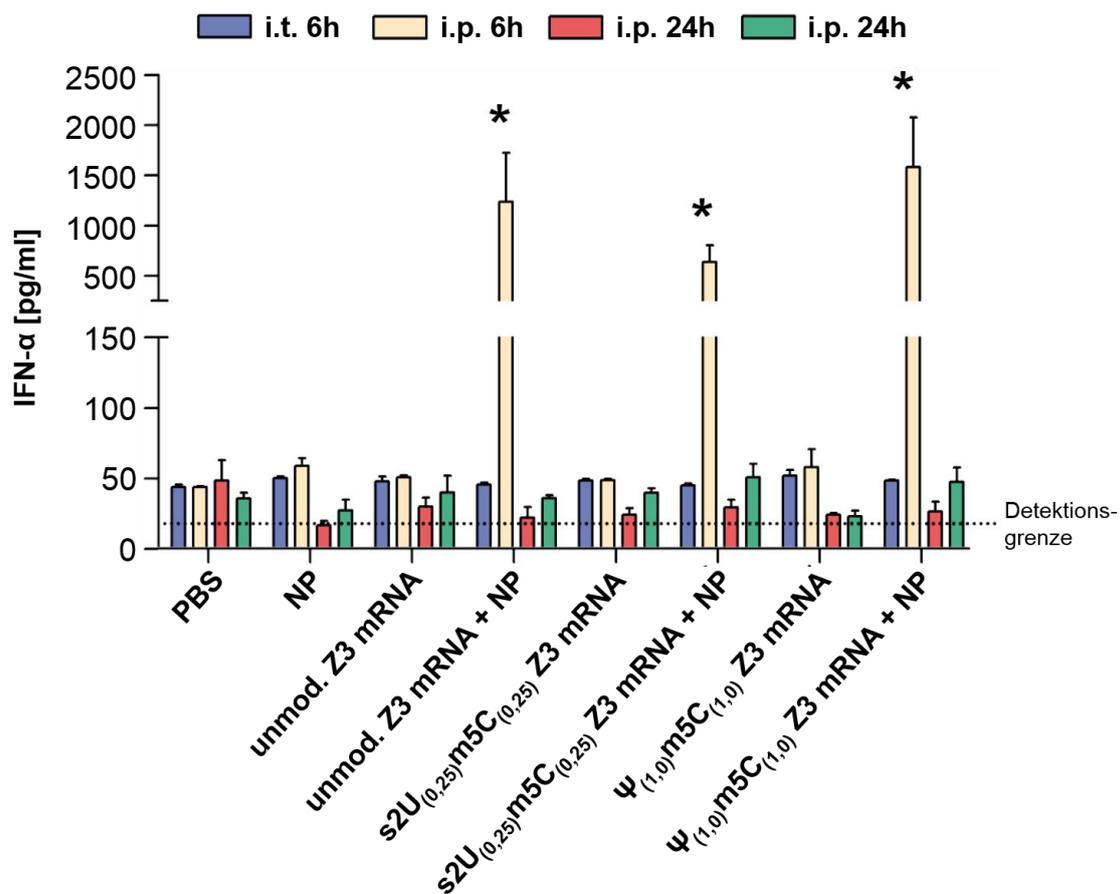


Abb. 3.6: *In vivo* Immunreaktion auf Z3 mRNA. BALB/c-Mäusen wurde je 1 μ g Z3 mRNA entweder i.p. oder i.t. injiziert (n = 3 pro Gruppe). Nach 6 h bzw. 24 h wurde aus dem Blut Serum gewonnen und die Konzentration an IFN- α über einen ELISA in Duplikaten gemessen.

Hier stiegen die Werte signifikant im Vergleich zur Applikation von reinen NPs auf durchschnittlich $1125,75 \pm 389,61$ pg/ml an (Z3 mRNA unmodifiziert: $1236,98 \pm 637,97$ pg/ml, s2U_(0,25)/m5C_(0,25): $639,05 \pm 282,56$ pg/ml, Ψ_(1,0)/m5C_(1,0): $1582,21 \pm 495,26$ pg/ml; $P < 0,05$). Dieser Effekt war jedoch nur vorübergehend zu beobachten. Nach 24 h normalisierten sich auch diese Werte wieder auf ein anti-entzündliches Niveau mit Werten von durchschnittlich $44,98 \pm 13,03$ pg/ml. Bei der i.t.

Applikation war dies jedoch nicht zu beobachten. Um sicherzustellen, dass die IVT mRNA auch die Lungenzellen erreichte, wurde zusätzlich eine Quantifizierung der Nuklease-Expression über eine qRT-PCR durchgeführt. Dabei konnte die Expression mRNA-kodierender Nukleasen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass weder die i.t. Applikation, noch die (un-)modifizierte Z3 mRNA zu einer Immunreaktion führten. Aufgrund der hohen Expression von in NP komplexierter, modifizierter s2U_(0,25)/m5C_(0,25) Z3 mRNA in AT-II-Zellen, sowie der nicht vorhandenen Immunstimulation der IVT mRNA nach i.t. Applikation, wurde diese für alle weiteren Versuche verwendet und wird der Einfachheit im Folgenden als Z3 nec-mRNA (engl. *nuclease-encoding chemically modified mRNA*) bezeichnet.

3.5 In vivo Genkorrektur der SP-B Defizienz

3.5.1 Gentherapeutischer Ansatz

Der gentherapeutische Ansatz zur Korrektur transgener SP-B Mäuse [SP-C rTA/(teto)₇ SP-B/SP-B^{-/-}] umfasst die Generierung eines sequenzspezifischen DSB mittels nec-mRNA proximal zum Tetracyclin-abhängigen Promoter (siehe Abb. 3.7A). Die zusätzliche, i.t. Applikation eines AAV6-Donor-*Templates* sollte dabei über den Reparaturmechanismus der Homologen Rekombination zum Einbau eines konstitutiv aktiven CAG-Promoters führen.

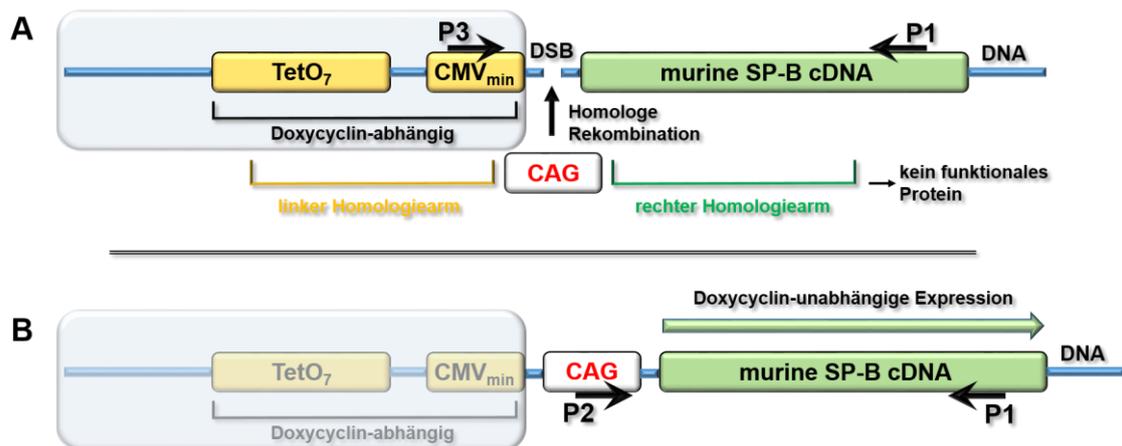


Abb. 3.7: Schema des gentherapeutischen Ansatzes zur Korrektur SP-B defizienter Mäuse. **(A)** Transgene SP-B-Mäuse [SP-C rTA/(teto)₇ SP-B/SP-B^{-/-}] exprimieren SP-B cDNA nur konditionell in Anwesenheit von Doxycyclin. Durch Bindung an einen Aktivator kann der Komplex an den Promoter binden und so die Expression von funktionalem SP-B gewährleisten. In Abwesenheit von Doxycyclin bleibt die Transkription der SP-B cDNA dagegen aus. Durch einen sequenzspezifischen DSB mittels Nukleasen kann über den Mechanismus der Homologen Rekombination jedoch ein konstitutiv aktiver CAG-Promoter eingebaut werden. Die Homologe Rekombination wird dabei über die homolog zur Zielsequenz flankierenden Bereiche (linker und rechter Homologiearm) des CAG-Promoters vermittelt. **(B)** Der Einbau des CAG-Promoters führt dabei zur konstitutiven Expression funktionalen SP-B Proteins. Über sequenzspezifische Primer (P1, P2, P3) kann die Insertion nachgewiesen werden.

Während der Tetracyclin-abhängige Promoter konditionell und nur in Anwesenheit von Doxycyclin zur Expression der murinen SP-B cDNA führt, verläuft diese nach Insertion eines CAG-Promoters Doxycyclin-unabhängig (siehe [Abb. 3.7B](#)). Dadurch kann der Nachweis der Genkorrektur einerseits durch Absetzen des Antibiotikums rein phänotypisch erfolgen, andererseits kann über sequenzspezifische Primer und anschließender PCR auch die Integration des Inserts nachgewiesen werden. Die vollständigen Sequenzen sowie die Sequenzbindungen der Primer sind dem Anhang 5.2 zu entnehmen.

3.5.2 Transgene Donor-Integration *ex vivo*

Der Nachweis einer Insertion des CAG-Promoters wurde zunächst in primären SP-B Fibroblasten getestet. Dazu wurden je *well* 50.000 Zellen ausgesät und diese mit dem AAV6-Reparatur-*Template* ($2,5 \times 10^5$ v.g.) transduziert. Zusätzlich erfolgte die Transduktion mit der Z3 AAV Nuklease (1×10^5 v.g.). Die Zellen wurden insgesamt 10 Tage wachsen gelassen, um eine optimale Expression der viralen Vektoren zu erreichen. Anschließend wurde die genomische DNA isoliert. Der gleiche Ansatz wurde ebenfalls mit nec-mRNA durchgeführt, jedoch erfolgte die Zugabe der Z3-kodierenden Nukleasen (2 μ g) erst 7 Tage nach Transduktion des Donors aufgrund der zeitlich limitierenden Expression (siehe Abschnitt 3.3). Als Kontrolle dienten untransfizierte/untransduzierte Fibroblasten. Um die HDR mit dem Donor-*Template* nachzuweisen, wurde über eine PCR mit sequenzspezifischen Primern (P1, P2, P3) Amplifikate generiert, welche anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen wurden. Als Kontrollen dienten PCR-Ansätze ohne die Zugabe eines DNA-*Templates*. Kontrollprimer hybridisierten dabei innerhalb des CMV minimal-Promoters (5', P3) sowie innerhalb der SP-B cDNA, hier jedoch außerhalb des Bereichs für den rechten Homologiearm des Donor-*Templates* (3', P1; siehe [Abb. 3.7](#)). Das Amplifikat bestätigte somit die Präsenz der transgenen SP-B Kasette in allen untersuchten Gruppen. Dagegen führte der Austausch des 5'-Primers P3 mit dem 5'-Primer P2, welcher innerhalb des CAG-Promoters bindet, zur Synthese eines Amplifikationsprodukts, das ausschließlich entstand, sofern die HDR mit dem Reparatur-*Template* erfolgte. Die [Abb. 3.8](#) veranschaulicht dies anhand der sich in der PCR ergebenden Amplifikate. Die Co-Transduktion des AAV Donors mit dem Z3 AAV bzw. die Transfektion mit Z3 nec-mRNA führte zu einer erfolgreichen HDR mit dem Donor-*Template*. Während sich in der Kontrollgruppe ohne die Zugabe von Z3 AAV und nec-mRNA ein P1/P3-Amplifikationsprodukt von 1239 bp ergab, führte die Transduktion/Transfektion des Donor-*Templates* zusammen mit den Nukleasen zum Einbau

des CAG-Promoters und so zu einem 976 bp größeren Amplifikat von 2215 bp Länge. Dies bestätigte auch die PCR mit den Primern P1/P2. Hier ergab sich in der Kontrolle keine ersichtliche Bande, da der 5'-Primer P2 nur bindet, sofern die Zielsequenz eingebaut worden war. Die Zugabe von Z3 AVV bzw. nec-mRNA und dem Reparatur-*Template* führte dementsprechend zu einer 1335 bp großen Bande. Die erhaltenen Ergebnisse unterstreichen damit die Effizienz der Nukleasen, sequenzspezifische Schnitte zu generieren. In Kombination mit einem geeigneten Donor-*Template* konnte hier die erfolgreiche transgene Integration des CAG-Promoters *ex vivo* nachgewiesen werden.

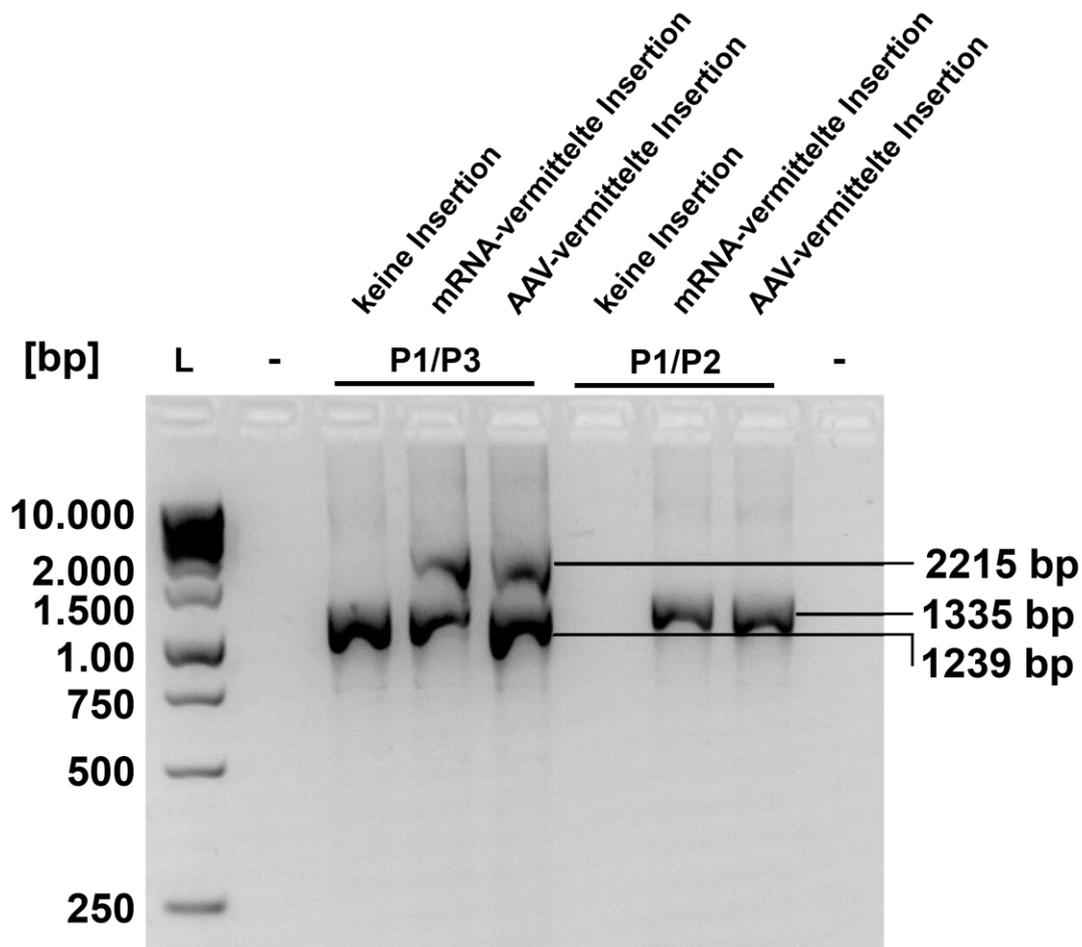


Abb. 3.8: Transgene Integration des CAG-Promoters *ex vivo*. Primäre Fibroblasten aus transgenen SP-B-Mäusen wurden mit $2,5 \times 10^5$ v.g. Donor-*Template* transduziert und zusätzlich entweder mit Z3 AVV (1×10^5 v.g.) transduziert, mit nec-mRNA ($2 \mu\text{g}$) transfiziert oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. L, DNA-Leiter; Bahnen mit entsprechenden Negativkontrollen („-“, PCR-Ansätze ohne DNA-*Template*). Angegeben sind die erwarteten Amplikongrößen.

3.5.3 Gentherapeutische Manipulation SP-B defizienter Mäuse

Nach erfolgreicher HDR *ex vivo* wurde das System aus Z3 nec mRNA und Reparatur-*Template* auf die genomische Manipulation des Doxycyclin-abhängigen Promoters in transgenen SP-B-Mäusen untersucht. Um sicherzustellen, dass dieser gentherapeutische Ansatz auch die Produktion ausreichender Mengen an SP-B gewährleistet, und somit die Lebensdauer SP-B defizienter Mäuse in Abwesenheit von Doxycyclin verlängert, wurden zwei Hauptgruppen (A und B) und vier Kontrollgruppen (C – F) getestet (siehe Abb. 3.9).

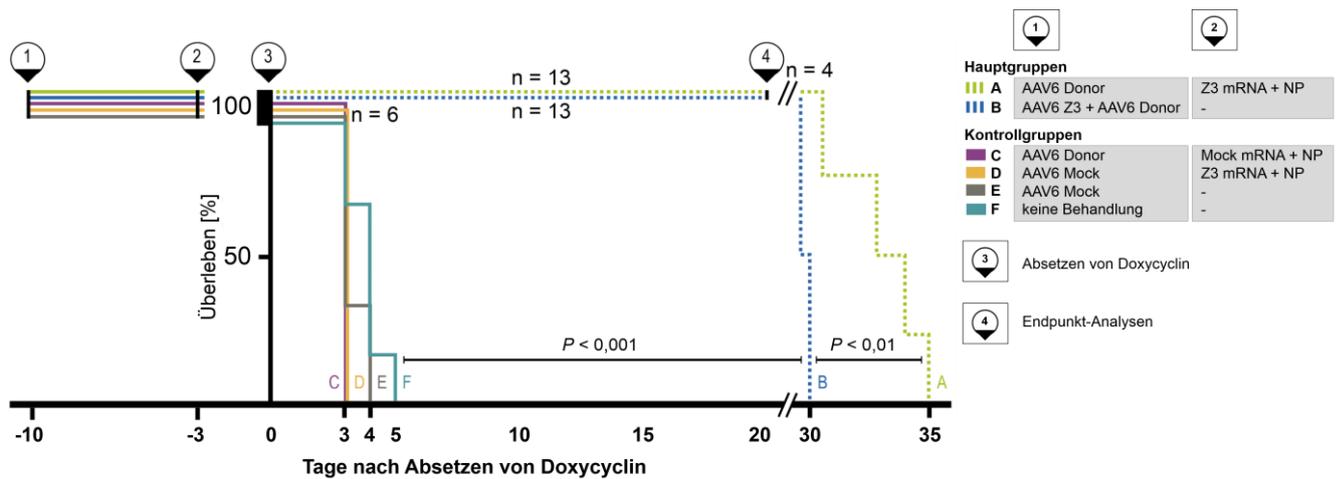


Abb. 3.9: Behandlungsschema und Lebenserwartung transgener SP-B Mäuse nach Absetzen von Doxycyclin. Alle Gruppen (Hauptgruppen, n = 13; Kontrollgruppen, n = 6) wurde entweder Z3 Donor-AAV bzw. Mock-AAV ($2,5 \times 10^{11}$ v.g.) und/oder Z3 nec-mRNA bzw. Mock mRNA ($20 \mu\text{g}$) komplexiert in NPs intratracheal verabreicht. Gezeigt sind Kaplan-Meier Überlebenskurven der entsprechenden Gruppen. Mit freundlicher Genehmigung von Frau Daniela Kormann.

Beide Gruppen wurden dabei an Tag 0 von Doxycyclin abgesetzt und das Überleben der Mäuse dokumentiert. Zehn Tage zuvor (Tag -10) wurde dafür beiden Hauptgruppen (n = 13) das AAV6-Donor-*Template* (je $2,5 \times 10^{11}$ v.g.) i.t. verabreicht. Gruppe B erhielt am gleichen Tag zusätzlich Z3 AAV (je 5×10^{10} v.g.). Der Hauptgruppe A wurde dagegen erst 7 Tage nach Donor-Applikation (Tag -3), aufgrund der hohen und zeitlich begrenzten Nuklease-Aktivität innerhalb der ersten 72 h (siehe Abb. 3.3), Z3 nec-mRNA ($20 \mu\text{g}$) komplexiert in NPs i.t. verabreicht. Kontrollgruppen (n = 6) erhielten entweder einen kontextunabhängigen AAV (Mock-AAV, *Foxp3*) oder das mRNA-kodierende Äquivalent (Mock mRNA, *Foxp3*) in Kombination mit dem Donor-*Template* oder der Z3 nec-mRNA. Die mRNA wurde dabei ebenfalls mit NPs komplexiert. Diesen Gruppen wurde entweder an Tag -10 AAV6 Donor (Gruppe C, je $2,5 \times 10^{11}$ v.g.) oder aber Mock-AAV (Gruppe D und E; je $2,5 \times 10^{11}$ v.g.) verabreicht bzw. erhielten keine Behandlung (Gruppe F). Zusätzlich wurde den Gruppen C und D drei Tage vor Doxycyclin-Entzug (Tag -3) entweder Mock-

mRNA mit NPs (Gruppe C; je 20 µg) oder Z3 nec-mRNA mit NPs (Gruppe D; je 20 µg) verabreicht (siehe [Abb. 3.9](#)).

Im Vergleich zu den Mäusen in den Kontrollgruppen, welche innerhalb der ersten 3 – 5 Tage nach Absetzen von Doxycyclin starben, lebten transgene SP-B Mäuse der Hauptgruppen dagegen signifikant länger ($P < 0,001$). Diese starben erst mit Beginn von Tag 29 und konnten für die Gruppe A (AAV Donor + Z3 nec-mRNA) sogar bis 35 Tage nach Doxycyclin-Entzug überleben. Auch innerhalb der beiden Hauptgruppen war ein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate zu erkennen ($P < 0,01$). So lebten Z3 nec-mRNA behandelte Mäuse im Durchschnitt $2,5 \pm 1,2$ Tage länger als Z3 AAV behandelte Mäuse.

Die hier erlangten Ergebnisse verdeutlichen die Signifikanz einer gentherapeutischen Korrektur mit Z3 nec-mRNA in Kombination eines Reparatur-*Templates*. Verglichen mit der reinen Applikation von AAV-Vektoren war diese sogar geringfügig effektiver.

3.5.4 Nachweis der SP-B Protein-Expression

Nach 20 Tagen Doxycyclin-Entzug wurden 9 der 13 Mäuse der Hauptgruppen für Endpunktanalysen verwendet. Als Nachweis für den korrekten Einbau des CAG-Promoters wurden zunächst Lungenschnitte immunhistochemisch auf die Expression von SP-B hin untersucht. Als Kontrollen wurden dafür Schnitte von SP-B Mäusen angefertigt, welche unter kontinuierlicher Doxycyclin-Gabe (+Doxy) standen, um einen Vergleich der ursprünglichen SP-B Expression anstellen zu können. Die [Abb. 3.10](#) zeigt die immunhistochemischen Färbungen repräsentativer Lungenschnitte. Wie deutlich zu erkennen ist, exprimierten dabei die Gruppen A und B ähnlich viel SP-B (braune Färbung) wie in den Kontrollen nachzuweisen war. Die Gruppen C bis F dagegen zeigten keinerlei Proteinexpression des Zielgens. Diese Beobachtung wurde ebenfalls über Western Blot-Analysen bestätigt. Dafür wurde BALF (bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit) den Mäusen entnommen und die Proteine (10 µg) über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Das SP-B Protein wurde anschließend über Antikörper-vermittelte Chemilumineszenz detektiert und liegt als reifes Protein mit einer molekularen Masse von ca. 15 kDa vor^{31,32}.

In [Abb. 3.11A](#) sind die Western Blots der entsprechenden Gruppen dargestellt. Auch hier zeigte sich eine nahezu identische Proteinexpression zwischen der Positivkontrolle +Doxy und den Gruppen A und B. Die Analyse der Bandenintensität ergab dabei eine vollständige Wiederherstellung des SP-B Proteins nach Behandlung mit dem Donor-*Template* und der

nec-mRNA (101 % Expression zur Positivkontrolle) bzw. dem Z3 AAV (94 % Expression zur Positivkontrolle). Bei den Kontrollgruppen C bis F kam es dagegen, wie bereits die immunhistochemischen Färbungen zeigen konnten, zu keiner bzw. einer schwachen SP-B Expression (Gruppe C: 9,7 %, Gruppe D und E: nicht detektiert, Gruppe F: 6,3 %).

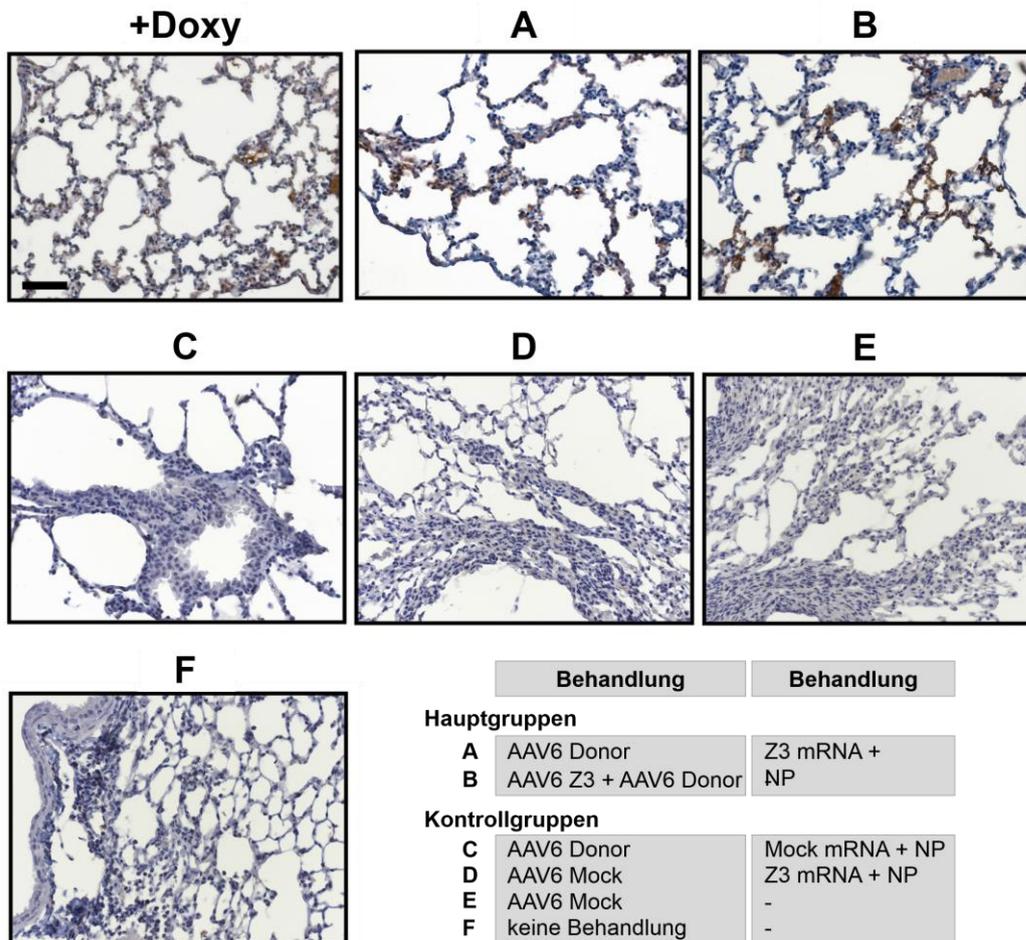


Abb. 3.10: Repräsentative Lungenschnitte der SP-B Expression von behandelten, transgenen SP-B Mäusen. Zwanzig Tage nach Absetzen von Doxycyclin wurden 9 der 13 Mäuse aus den behandelten Hauptgruppen getötet und für Endpunktanalysen verwendet. Lungenschnitte aller Gruppen wurden immunhistochemisch auf SP-B gefärbt. Maßstab, 50 μ m.

Zusätzlich wurde der SP-B Proteingehalt in der BAL errechnet (siehe [Abb. 3.11B](#)). Die Positivkontrollen wiesen dabei einen durchschnittlichen SP-B Gehalt von $0,47 \pm 0,25$ ng/ μ g Gesamtprotein auf. In den beiden Hauptgruppen A und B war dieser mit $0,48 \pm 0,23$ ng/ μ g bzw. $0,44 \pm 0,21$ ng/ μ g nahezu identisch. In den Kontrollgruppen war dagegen eine vernachlässigbare (Gruppe C: $0,05 \pm 0,004$ ng/ μ g, Gruppe F: $0,03 \pm 0,02$ ng/ μ l) bis gar kein (Gruppen D und E) SP-B Proteinexpression zu erkennen.

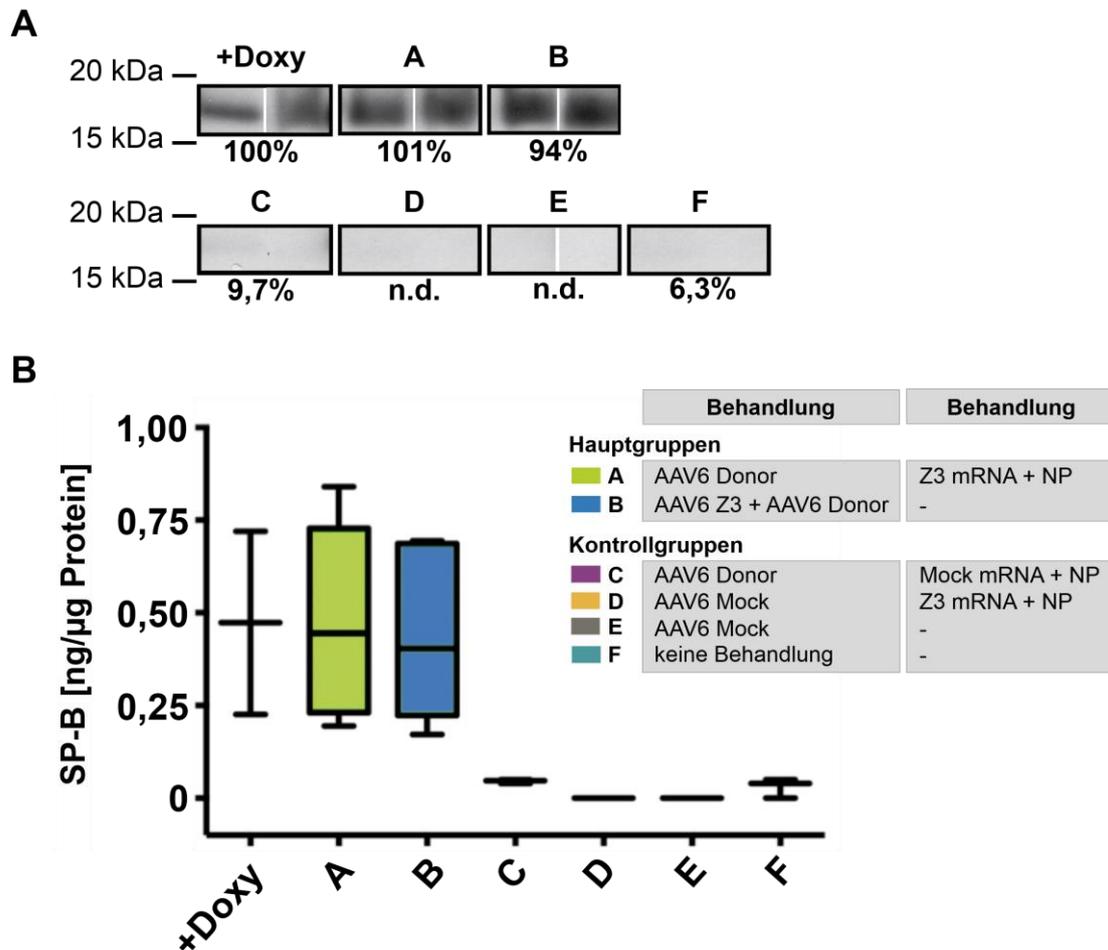


Abb. 3.11: Western Blot-Analysen des SP-B Proteins in der BALF behandelter Mäuse. (A) Western Blot der BALF unterschiedlich behandelter Gruppen. Das SP-B Protein wurde dabei über einen spezifischen anti-SP-B Antikörper detektiert. Dargestellt sind die aus der Bandenintensität errechneten, prozentualen Verhältnisse zur Positivkontrolle (+Doxy). (B) SP-B Proteingehalt in der BALF in ng/μg Gesamtprotein. Die Auswertung erfolgte über die Software Quantity One. Boxen repräsentieren Mediane ± IQRs (Interquartilsabstände), Whisker die Minima und Maxima. n = 6 pro Gruppe.

3.5.5 Messung der *Compliance* und des Atemwiderstands

Die *Compliance* (dt. Nachgiebigkeit) der Atemwege ist ein Maß der Lunge sich zu dehnen und auszuweiten. Bei regelrechter Ausbildung des *Surfactants* wird die alveoläre Oberfläche der Lunge so mit dem Flüssigkeitsfilm bedeckt, dass dieser Adhäsionskräften und Oberflächenspannungen beim Ein- und Ausatmen entgegenwirkt. Bei fehlender Synthese des für den Flüssigkeitsfilms notwendigen SP-Bs fallen die Lungenbläschen zunehmend in sich zusammen, es kommt – bedingt durch die Unterversorgung des Organismus mit Sauerstoff – zur Zyanose, Hypoxie und führt schließlich zum Tod^{43,45}.

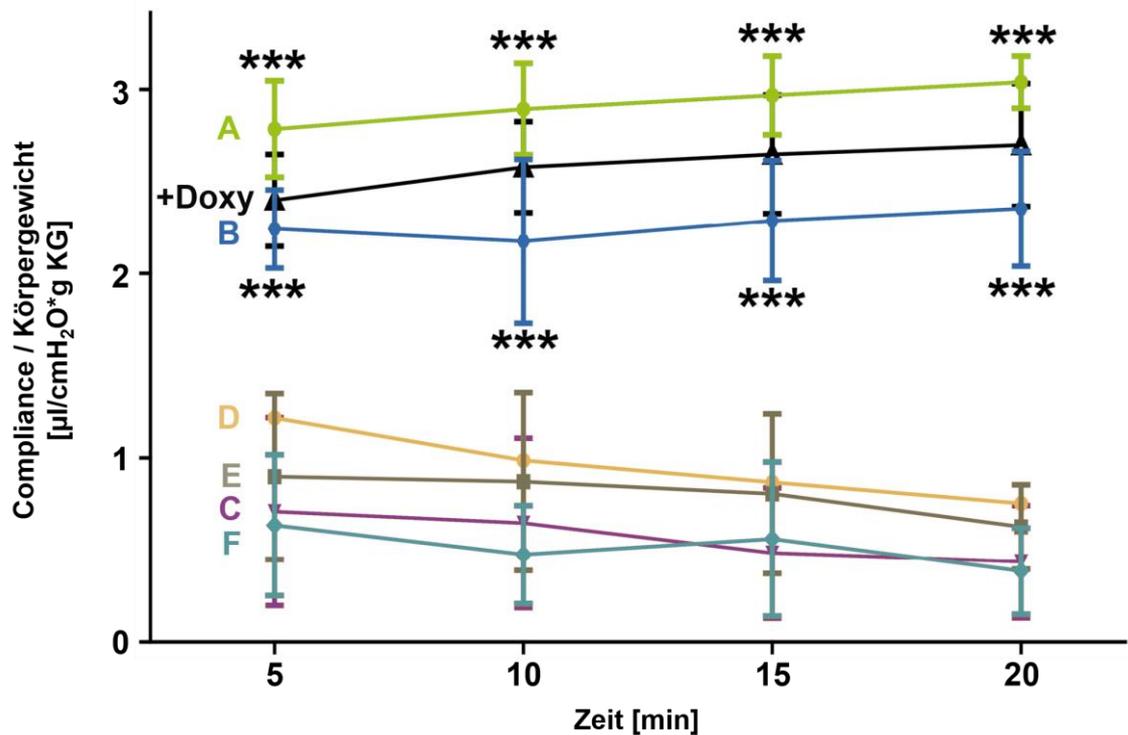


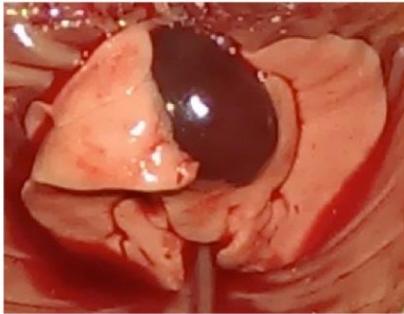
Abb. 3.12: Messung der Lungen-Compliance. Die Lungennachgiebigkeit wurde 20 Tage nach Absetzen von Doxycyclin gemessen und auf das entsprechende Körpergewicht (KG) bezogen (n = 3). Die Messung der Grundlinie wurde für je 20 min durchgeführt und die *Compliance*-Werte vor jeder Hyperinflation errechnet. *** $P < 0,001$ versus Kontrollgruppen C – F. Die schwarze Linie entspricht Positivkontrollen (Mäuse ohne Absetzen von Doxycyclin).

Für die Messung der *Compliance* nach Versuchsende (20 Tage nach Absetzen von Doxycyclin) für die Hauptgruppen A und B) bzw. Tod der Mäuse wurden diese in eine Thoraxkammer platziert und die Lungennachgiebigkeit über das Modell der isolierten Lungenperfusion (IPL) gemessen und entsprechend ausgewertet (n = 3 je Gruppe). Die Messung der Grundlinie erfolgte dabei für 20 min. Für die Berechnung der durchschnittlichen *Compliance*-Werte wurden die letzten 10 Ventilationen (von insg. 90 Ventilationen pro Intervall) eines jeden 5 min-Messintervalls (je zwischen zwei Hyperinflationen) einbezogen. Für Positivkontrollen (+Doxy) ergab sich dabei ein durchschnittlicher *Compliance*-Wert von $2,58 \pm 0,26 \mu\text{l}/\text{cmH}_2\text{O}$ (siehe Abb. 3.12). Dieser war ähnlich zu den in den Hauptgruppen A und B erhaltenen Werten. Dabei wiesen Gen-korrigierte Mäuse, welchen Donor-AAV und Z3 nec-mRNA (Gruppe A) appliziert wurden, einen durchschnittlichen Wert von $2,92 \pm 0,20 \mu\text{l}/\text{cmH}_2\text{O}$ auf. Dieser lag somit im Bereich normaler Lungennachgiebigkeit. Für die Hauptgruppe B wurden ähnliche Werte ($1,78 \pm 0,71 \mu\text{l}/\text{cmH}_2\text{O}$) erreicht. Vergleicht man die beiden Hauptgruppen mit den Kontrollgruppen C – F, so ergab sich hier ein signifikanter Unterschied bezüglich der Lungennachgiebigkeit ($P < 0,001$). Diese wiesen einen bis zu 4-

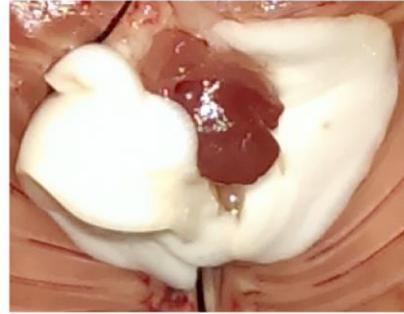
fach niedrigeren Wert auf, deren Durchschnitt bei $0,66 \pm 0,09 \mu\text{l}/\text{cmH}_2\text{O}$ lag. In Gen-korrigierten Mäuse konnte somit eine normale Lungen-*Compliance* nachgewiesen werden. Daneben wurden der Atemwiderstand sowie die Bildung hämorrhagischer Lungenareale nach Doxycyclin-Entzug ausgewertet. Der Atemwiderstand kann dabei als der Widerstand angesehen werden, der beim Atmen überwunden werden muss. Über die Inhalation von Methacholin, welches zu einer Bronchokonstriktion der Atemwege führt, kann dosisabhängig über die Messung des Atemwiderstands eine Aussage über den Grad der Ventilationsstörung gegeben werden. Eine Verengung der Bronchien führt dabei zu einer Erhöhung des Atemwiderstands. Den Mäuse-Lungen der Hauptgruppen ($n = 3$) wurde dafür Methacholin in zunehmender Konzentration ($0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$) verabreicht und anschließend der Widerstand gemessen. Dabei wurden die durchschnittlich errechneten Werte der letzten 10 Messungen eines jeden 10 min-Messintervalls einbezogen (siehe [Anh. 5.5](#)). Hier stiegen die Werte der Kontrollgruppe (+Doxy) mit zunehmender Konzentration an Methacholin auf $9,43 \pm 1,44 \text{ cmH}_2\text{O}/\text{ml}/\text{s}$ ($100 \mu\text{M}$ Methacholin) an. Gleiche Ergebnisse konnten ebenfalls für die beiden Hauptgruppen A und B erzielt werden, mit Werten von $7,44 \pm 1,21 \text{ cmH}_2\text{O}/\text{ml}/\text{s}$ bzw. $9,43 \pm 1,95 \text{ cmH}_2\text{O}/\text{ml}/\text{s}$. Das heißt, auch in den Messungen des Atemwiderstandes ergaben sich im Vergleich zu Mäusen, welche eine kontinuierliche Doxycyclin-Zufuhr erhalten hatten, keine signifikanten Unterschiede. Die Lungenfunktion blieb somit für die Gruppe der Gen-manipulierten SP-B Mäuse innerhalb der Normalwerte. Zusätzlich wurde das Ausmaß für die Bildung hämorrhagischer Lungenareale nach Absetzen von Doxycyclin semiquantitativ vor und nach Lungenperfusion bzw. Lungenfunktionsmessungen evaluiert (siehe [Anh. 5.6](#)). Dazu wurde der linke und rechte Lungenflügel objektiv und mit Hilfe einer numerischen Bewertung auf Einblutungen hin untersucht. Sofern am linken Lungenflügel eine partielle Hämorrhagie zu erkennen war, wurde dies als „1“ gewertet. War mehr als die Hälfte des Flügels betroffen, so wurde dies als „2“ gewertet. Für alle vier rechten Lungenlappen wurden hämorrhagische Areale als „1“ je Lungenlappen gewertet, wodurch ein Maximalwert von 6 erreicht werden konnte (2 für den linken Lungenflügel + 4 für den rechten Lungenflügel). Repräsentative Lungenaufnahmen der Positivkontrollen und Hauptgruppen (siehe [Abb. 3.13](#)) sowie der Kontrollgruppen C bis F (siehe [Abb. 3.14](#)) veranschaulichen dies nochmals.

+Doxy

vor Perfusion

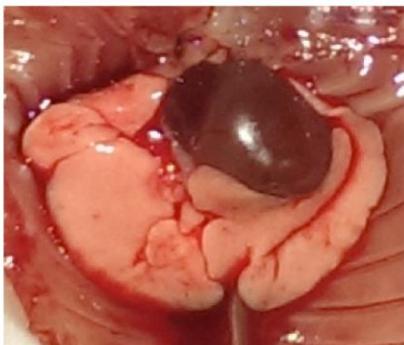


nach Perfusion



Gruppe A (Donor AAV, Z3 nec-mRNA, -Doxy)

vor Perfusion



nach Perfusion



Gruppe B (Donor AAV, Z3 AAV, -Doxy)

vor Perfusion



nach Perfusion

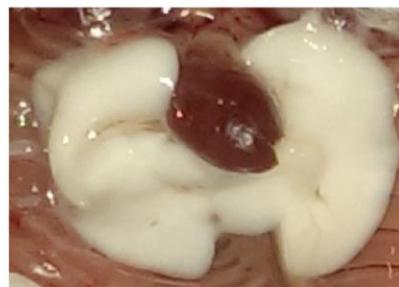
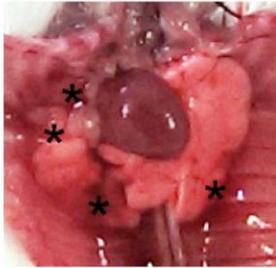


Abb. 3.13: Repräsentative Lungenaufnahmen der Gruppen +Doxy, A und B, vor und nach Perfusion bzw. Lungenfunktionsmessungen (n = 3).

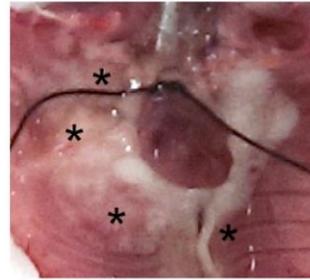
Gruppe C (Donor AAV, Mock-mRNA, -Doxy)

vor Perfusion



Asterisken indizieren:
 - rechte Lunge hämorrhagisch (besonders *cranialis/medialis*)
 - linke Lunge hämorrhagisch

nach Perfusion



Asterisken indizieren:
 - rechte Lunge hämorrhagisch (besonders *cranialis/medialis*)
 - linke Lunge hämorrhagisch

Gruppe D (Mock AAV, Z3 nec-mRNA, -Doxy)

vor Perfusion



Asterisken indizieren:
 - rechte Lunge hämorrhagisch (cranialer Bereich)
 - linke Lunge hämorrhagisch (besonders *cranialis*)

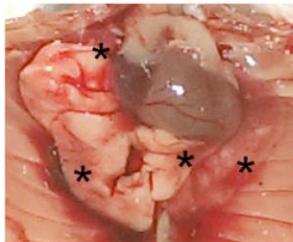
nach Perfusion



Asterisken indizieren:
 - rechte Lunge hämorrhagisch (cranialer Bereich)
 - linke Lunge hämorrhagisch (besonders *cranialis*)

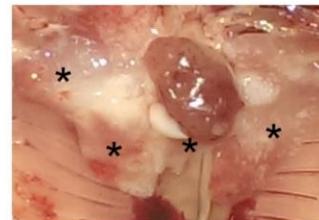
Gruppe E (Mock AAV, -Doxy)

vor Perfusion



Asterisken indizieren:
 - rechte Lunge hämorrhagisch
 - linke Lunge zeigt Ödem-
 bildung

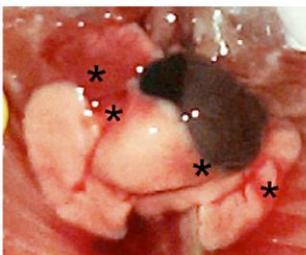
nach Perfusion



Asterisken indizieren:
 - rechte Lunge hämorrhagisch
 - linke Lunge zeigt Ödem-
 bildung

Gruppe E (keine Behandlung, -Doxy)

vor Perfusion



Asterisken indizieren:
 - *Lobus caudalis* und caudale,
 linke Lunge hämorrhagisch

nach Perfusion



Asterisken indizieren:
 - Ödem-
 bildung, entstanden
 durch hämorrhagische
 Bereiche

Abb. 3.14: Repräsentative Lungenaufnahmen der Kontrollgruppen C bis F, vor und nach Perfusion bzw. Lungenfunktionsmessungen (n = 3). Die Indikationen des linken Lungenflügels sind jeweils rechts des jeweiligen Bildes beschrieben. *, siehe Indikationen.

Hierbei war die Ausbildung hämorrhagischer Lungenareale in den Kontrollgruppen C bis F deutlich zu erkennen. Die Lungen der Mäuse wiesen dabei mit einer durchschnittlichen, hämorrhagischen Anzahl von $4,17 \pm 0,37$ vor bzw. $4,50 \pm 0,17$ nach Perfusion deutlich mehr an Einblutungen auf, als dies in den Hauptgruppen der Fall war. Die Lungen Genmanipulierter Mäuse (Gruppen A und B) ließen demnach nur wenige bis gar keine Hämorrhagien erkennen. Ebenso zeigten Lungen der Positivkontrollen (+Doxy) keine solcher Areale. Vergleicht man die Haupt- mit den Kontrollgruppen, so ergab sich hier ein signifikanter Unterschied mit deutlicher hämorrhagischer-Ausprägung in den Kontrollgruppen ($P < 0,05$, siehe Anh. 5.6).

3.5.6 Immunologische Untersuchungen

Die einzelnen Gruppen wurden ebenfalls auf die Bildung des pro-inflammatorischen Interleukin-12 (IL-12) als Reaktion einer Antigen-vermittelten Stimulation des Immunsystems untersucht. IL-12 ist dabei vornehmlich das Produkt aktivierter, inflammatorischer Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophile oder Dentritischen Zellen. Im Zuge einer viralen Infektion wird das Zytokin innerhalb der ersten Tage ausgeschüttet und ist unter anderem an der Ausprägung T_H1 -vermittelter Immunantworten beteiligt. Zudem ist es ein starker Aktivator des Zytokins Interferon- γ (IFN- γ), ein für die Inhibition viraler Replikation wichtiges Interferon¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

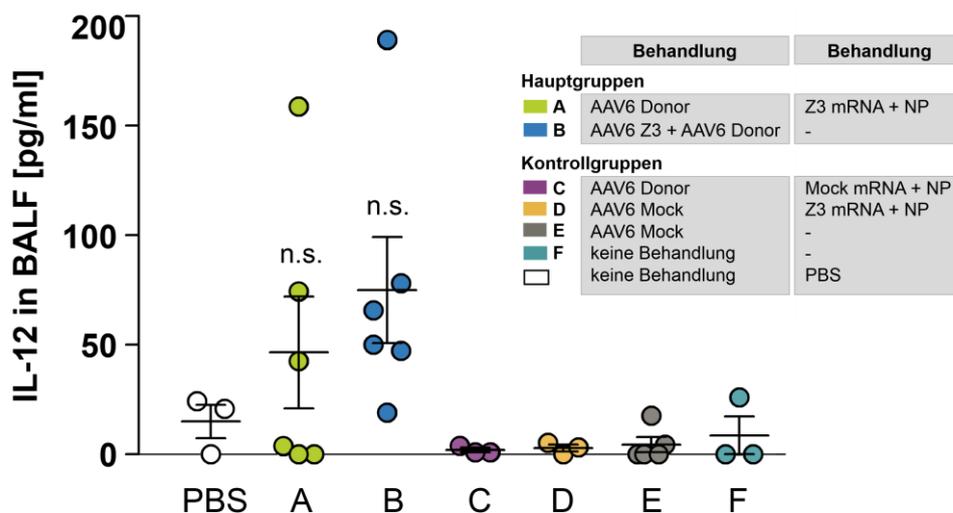


Abb. 3.15: IL-12 ELISA in BALF. Die Zytokin-Spiegel wurden in der BALF von Mäusen zum Zeitpunkt des jeweiligen Versuchsendes (Hauptgruppen: Tag 20; Kontrollgruppen und PBS-behandelte Gruppe: bei Auftreten eines Abbruchkriteriums nach Absetzen von Doxycyclin) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. $n = 3 - 6$ pro Gruppe; n.s., nicht signifikant versus PBS.

Für die Bestimmung des IL-12-Spiegels in der BALF wurden die Versuchstiere (n = 3 - 6 je Gruppe) spätestens mit Tag 20 einer BAL unterzogen. Zusätzlich zu den Haupt- und Kontrollgruppen wurde als Referenz eine weitere Gruppe hinzugezogen, denen PBS verabreicht wurde. Je 100 µl der erhaltenen BALF wurden anschließend für einen IL-12 ELISA verwendet. Je Probe wurden Duplikate eingesetzt. Wie in [Abb. 3.15](#) zu erkennen ist, waren in Bezug auf die Referenzgruppe die IL-12-Werte in den Hauptgruppen A und B teilweise leicht, jedoch nicht signifikant erhöht. In der BALF von Mäusen, die PBS erhalten hatten, lagen die durchschnittlichen Werte dabei bei $15,02 \pm 10,72$ pg/ml, die der Hauptgruppen bei $48,85 \pm 55,49$ pg/ml (Gruppe A) bzw. $74,87 \pm 55,48$ pg/ml (Gruppe B). Die IL-12-Werte der Kontrollgruppen lagen dagegen allesamt unter einem Wert von 20 pg/ml. Eine Aktivierung des Immunsystems als Reaktion auf die applizierten viralen Vektoren blieb somit in allen Gruppen aus.

Zusätzlich wurden die in der BALF enthaltenen Zellen über eine May-Grünwald/Giemsa-Färbung lichtmikroskopisch auf das Verhältnis von Makrophagen, Lymphozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten hin untersucht (siehe [Abb. 3.16](#)). Im Zuge einer Immunreaktion auf bestimmte Oberflächenstrukturen exogener Stoffe oder Organismen wie Viren, kommt es zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, Granulozyten), das wiederum die Aktivierung einer adaptiven Immunantwort (Lymphozyten) mit sich führen kann¹⁷⁰. Aufgrund der Applikation viraler Vektoren wurde die BALF der jeweiligen Gruppen auf einen Anstieg der jeweiligen Zelltypen evaluiert. Dabei wurden hämatologische Standardkriterien für die Zellcharakterisierung angewandt und mindestens 100 Zellen je Färbung ausgezählt (n = 2 – 6 pro Gruppe). Betrachtet man die Fraktion der Makrophagen, so lag hier die durchschnittliche Zellzahl bei 26.800 ± 1.723 Zellen/ml für Gruppe A und 29052 ± 807 Zellen/ml für Gruppe B. Der Anteil an Makrophagen in der mit PBS-behandelten Gruppe lag dabei ähnlich hoch (29.648 ± 540 Zellen/ml), war im Vergleich zu den Kontrollgruppen (C: 17.258 ± 3.029 Zellen/ml, D: 12.951 ± 3.758 Zellen/ml, E: 1.912 ± 927 Zellen/ml, F: 12.096 ± 5.768 Zellen/ml) jedoch deutlich höher. Alle weiteren Zellfraktionen wiesen dagegen relativ geringe Anteile auf, mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 393 ± 133 Zellen/ml für Lymphozyten, 1202 ± 1192 Zellen/ml für Eosinophile und 2628 ± 1719 Zellen/ml für Neutrophile. In der BALF PBS-behandelter Mäuse waren diese Fraktionen nicht detektierbar. Eine durch die AAV-Vektoren bzw. NPs oder mRNA hervorgerufene Immunreaktion konnte somit ausgeschlossen werden.

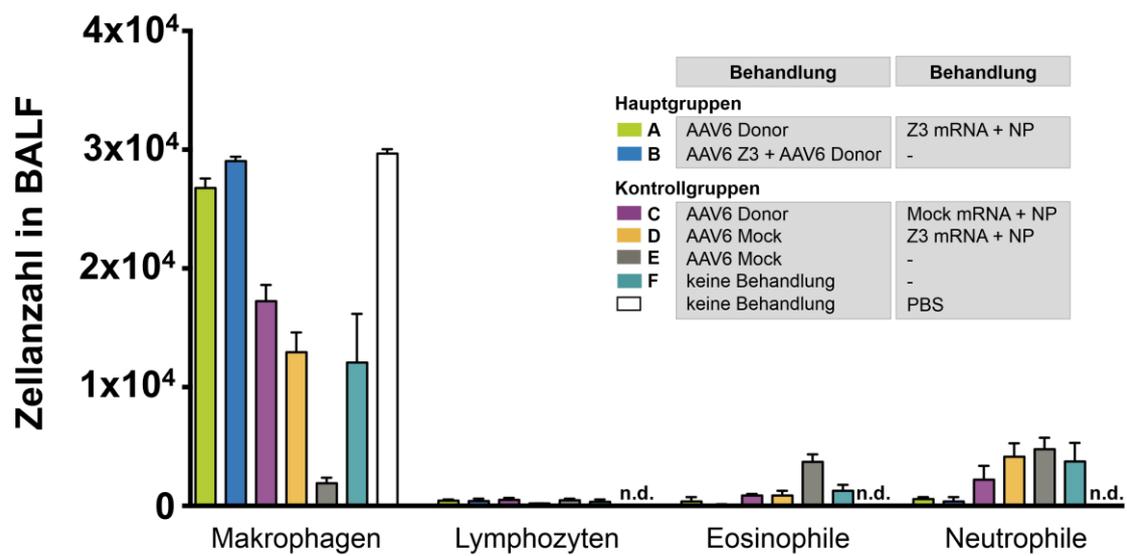


Abb. 3.16: Differentielle Zellzahl-Analyse der BALF. Zellen aus der Lavage von Lungen wurden mit einer May-Grünwald/Giemsa-Färbung angefärbt und diese lichtmikroskopisch gezählt, ausgewertet und auf 1 ml BALF bezogen. Die BALF wurde für die Hauptgruppen 20 Tage nach Absetzen von Doxycyclin und für die Kontrollgruppen sowie die PBS-behandelte Gruppe bei Auftreten eines Abbruchkriteriums nach Doxycyclin-Entzug entnommen. $n = 2 - 6$; n.d., nicht detektiert.

3.5.7 Nachweis der Homologen Rekombination

Um die phänotypischen Merkmale einer Wiederherstellung transkriptioneller SP-B Aktivität in den Gruppe A und B auch auf genomischer Ebene zu verifizieren, wurde nach Versuchsende die DNA der Lunge Gen-manipulierter Mäuse (Gruppen A und B) isoliert. Dafür wurde, wie in Abschnitt 3.1 bereits beschrieben, zunächst ein T7-Assay der einzelnen DNA-Proben ($n = 6$ je Gruppe) durchgeführt und die Effizienz hinsichtlich der Generierung Nuklease-induzierter DSBs für Z3 nec-mRNA bzw. Z3 AAV evaluiert (siehe Abb. 3.17A). Als Kontrolle diente ungeschnittene DNA aus Kontrollmäusen. Während die Kontroll-DNA zu einem Hybridisierungs-Produkt mit einer Länge von 1264 bp führte, zeigten sich im Agarosegel für geschnittene Amplifikate zwei zusätzliche Banden mit einer Länge von 1098 bp bzw. 164 bp. Die Effizienz Nuklease-induzierte DSBs zu erzeugen war dabei zwischen den Gruppen A und B annähernd gleich. So generierten mRNA-kodierende Z3 Nukleasen im Durchschnitt $21 \pm 4,55$ % indels, während AAV-kodierende Nukleasen eine durchschnittliche indel-Rate von $27,67 \pm 2,81$ % aufwiesen.

Neben der Evaluierung Nuklease-induzierter DSBs wurde die genomische DNA auf Homologe Rekombination mit dem Donor-Template untersucht. Dazu wurden die in Abb. 3.7 gezeigten Primer-Paare P1/P3 bzw. P2/P3 verwendet und die isolierte, genomische

DNA der beiden Hauptgruppen über eine PCR entsprechend amplifiziert (siehe [Abb. 3.17B](#)). Sofern der CAG-Promoter über den Reparaturmechanismus der HDR in die transgene SP-B Kassetten eingebaut wurde, ergab sich für das Primer-Paar P1/P3 eine Amplikonlänge von 2.214 bp. Ohne Insertion lag diese bei 1.239 bp.

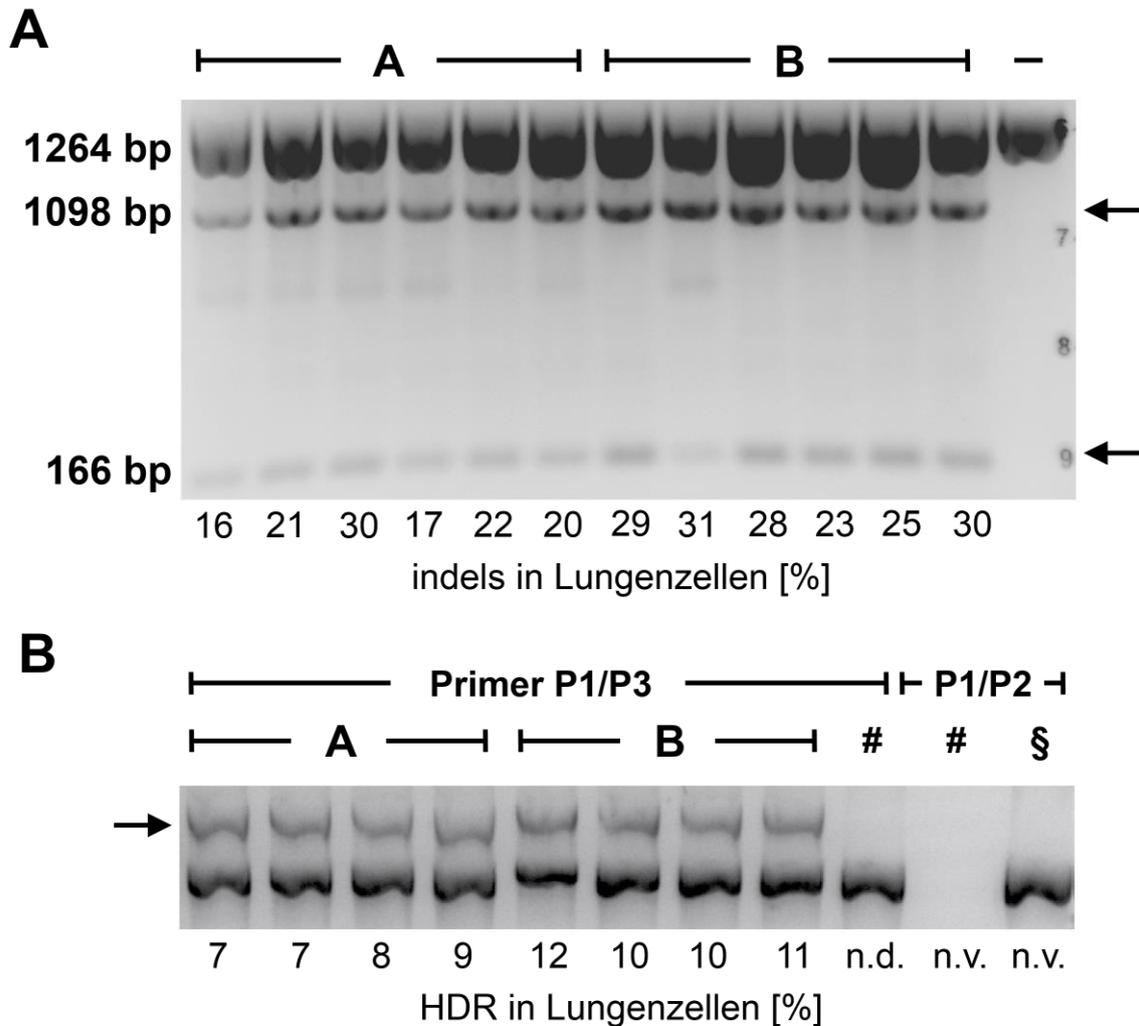


Abb. 3.17: Nachweis der Effizienz Nuklease-induzierter DSBs sowie der HDR. (A) Nach Versuchsende wurde die DNA Gen-manipulierter SP-B Mäuse (Gruppe A und B) isoliert und ein T7-Assay mit dem Primer-Paar P1/P3 durchgeführt. Jede Spur repräsentiert dabei die einzelnen Mäuse jeder Gruppe. Als Kontrollen (-) diente ungeschnittene, genomische DNA. Angegeben sind die indel-Raten aus dem Verhältnis von geschnittener zu ungeschnittener Bande. Die Auswertung wurde dafür mit Hilfe der Software *ImageJ* durchgeführt. **(B)** Die HDR wurde über eine PCR mit den Primer-Paaren P1/P3 sowie P1/P2 evaluiert. Angegeben sind die indel-Raten aus dem Verhältnis von geschnittener zu ungeschnittener Bande. Die Auswertung erfolgte über die Software *ImageJ*. #, Kontrollen (unbehandelt); §, DNA-Pool aus den Gruppen A und B; n.d., nicht detektiert; n.v., nicht verifizierbar.

Im Gegensatz dazu wurde für das Primer-Paar P1/P2 nur dann ein 1294 bp langes DNA-Fragment synthetisiert, sofern der CAG-Promoter eingebaut wurde. Als Kontrollen diente hier genomische DNA PBS-behandelter Mäuse. Die [Abb. 3.17B](#) zeigt dabei deutlich die Insertion des CAG-Promoters in die transgene SP-B Kassetten. Mit HDR-Raten von

7,75 ± 0,83 % für korrigierte SP-B Mäuse der Gruppe A bzw. 10,75 ± 0,83 % für Gruppe B waren diese ebenfalls relativ ähnlich zueinander. Die mit PBS-behandelten Mäuse zeigten dagegen nur das PCR-Fragment der ursprünglichen Sequenz der SP-B Kasette.

Die Integration des Donor-*Templates* innerhalb der Zielsequenz wurde zusätzlich über eine Sequenz-Analyse bestätigt (siehe [Anh. 5.7](#)). Kriterium für den korrekten Einbau war hier der nahtlose Übergang zwischen dem rechten Homologiearm und der SP-B cDNA nach P1/P2-Amplifikation gepoolter, genomischer DNA aus AT-II-Zellen der jeweiligen Gruppen A bis F. Der korrekte Einbau des CAG-Promoters konnte hier ebenfalls für beide Hauptgruppen verifiziert werden.

Abschließend wurde der zufällige Einbau des Reparatur-*Templates* in Abwesenheit DSB-induzierender Nukleasen über eine PCR genomischer DNA der Gruppe C (Behandlung nur mit AAV-Donor, n = 6) ausgeschlossen (siehe [Anh. 5.8](#)). Sofern der Donor nicht in die Zielsequenz integrierte, ergab sich für die Amplifikation mit dem Primer-Paar P1/P3 ein PCR-Fragment von 1264 bp Länge, entsprechend der originalen genomischen SP-B Sequenz. Hierbei bestätigte sich, dass die alleinige Gabe des AAV-Donors zu keiner Integration des CAG-Promoters führt. Zusätzlich wurden Proben aus den Hauptgruppen A und B gepoolt und über eine P1/P2-PCR mit Amplifikaten der Gruppe C verglichen. Während in den Hauptgruppen wiederum ein PCR-Fragment von 1294 bp nachzuweisen war, was auf die Integration des AAV-Donor schließen lässt, konnte in Gruppe C die Integration durch die fehlende Bande ausgeschlossen werden.

Die hier erlangten Ergebnisse bestätigen somit die phänotypische Ausprägung Genmanipulierter SP-B Mäuse der Gruppen A und B. Durch die erfolgreiche Integration des AAV-Donors durch sequenzspezifische, Nuklease-induzierte Schnitte innerhalb der SP-B Kasette konnte die transkriptionelle Aktivität der SP-B cDNA wiederhergestellt werden.

3.5.8 Expression der Z3-Nukleasen im Lungengewebe

Mit Tag 20 und somit dem Versuchsende des gentherapeutischen Ansatzes wurde außerdem das Expressions-Level der Z3 Nukleasen im Lungengewebe der behandelten Hauptgruppen A und B untersucht. Die 3xFLAG-markierten Z3 Nukleasen wurden dabei über einen spezifischen anti-3xFLAG-AK mit unterschiedlichen Fluorochromen (Cy3 und FITC) gefärbt. Als Negativkontrolle dienten Lungenschnitte unbehandelter Mäuse (+Doxy, siehe [Abb. 3.18](#)). Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Expression von Z3 AAV Nukleasen im Gegensatz zur Z3 nec-mRNA auch mit Tag 20 anhält. Die mRNA-

kodierenden Nukleasen waren wiederum nicht mehr nachweisbar. Das bestätigte ebenfalls die zusätzliche semiquantitative Auswertung der gefärbten Lungenschnitte auf deren Fluoreszenz-Intensität hin (siehe [Anh. 5.9](#)). Über die Auszählung und objektive Bewertung fluoreszierender Areale wurde hier ein Score erstellt, dessen Werte (0 bis 4, wobei 0 keine Expression und 4 die höchste Expression darstellt) eine Aussage über die Expression der Z3 Nukleasen in Lungengewebe gibt. Dafür wurden je 3 immunhistologisch gefärbte Schnitte evaluiert. Hier ergab sich für die Kontrollgruppe ein Expressions-Score von $0,52 \pm 0,3$. In Z3 nec-mRNA-behandelten Mäuse war dieser mit $0,38 \pm 0,3$ ebenfalls sehr niedrig und weist auf die fehlende Expression von Z3 nec-mRNA hin. Ein signifikanter Unterschied war dagegen in Gruppe B und damit der Behandlung mit Z3 AAV zu erkennen. Hier lag der Score deutlich höher, mit einem durchschnittlichen Wert von $3,68 \pm 0,45$ ($P < 0,05$). Das heißt, auch hier bestätigte sich das Bild einer persistierenden Z3 AAV-Expression versus einer zeitlich limitierten Expression der Z3 nec-mRNA.

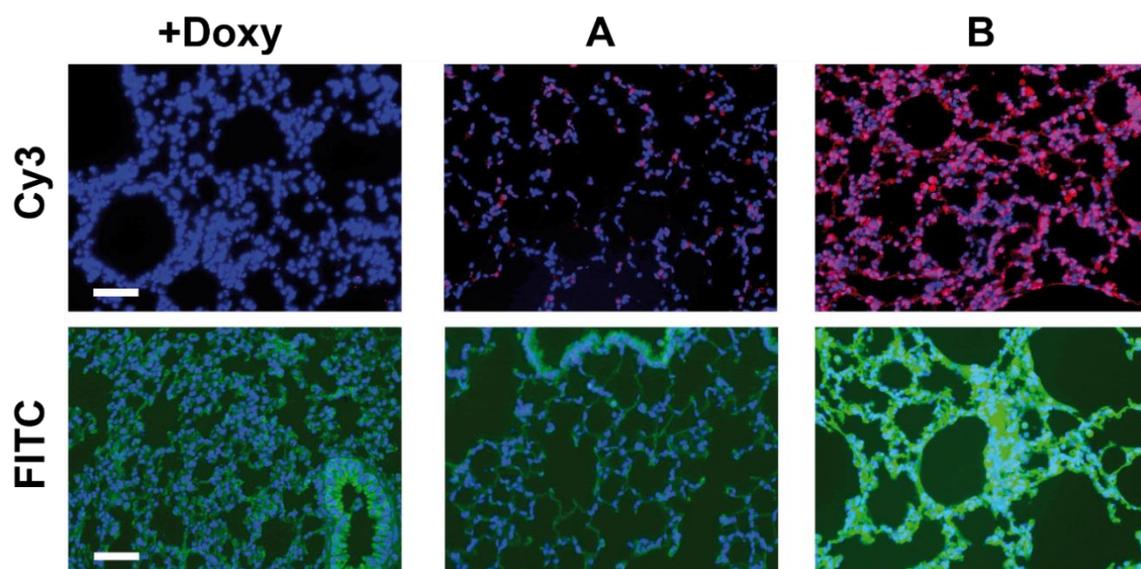


Abb. 3.18: Fluoreszenzaufnahmen 3xFLAG-markierter Nukleasen in Lungenschnitten von SP-B Mäuse. Die Z3 Nukleasen wurden dabei zwei unterschiedliche anti-3xFLAG AKs gefärbt. Diese waren entweder an Cy3 (rote Fluoreszenz) oder FITC (grüne Fluoreszenz) gekoppelt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von unbehandelten (+Doxy) Mäusen, sowie mit (A) Z3 AAV und (B) Z3 nec-mRNA-behandelter SP-B Mäuse. Maßstab, 50 μ m.

Die Unterschiede in der Expression wurden zudem über eine durchflusszytometrische Analyse in Lungen- und AT-II-Zellen evaluiert (siehe [Anh. 5.10](#)). Hierbei wurden wiederum die Nukleasen über ihren 3xFLAG-Tag markiert und der prozentuale Anteil innerhalb der Zellpopulationen der Gruppen A – F ermittelt. Als Referenz dienten unbehandelte Mäuse (+Doxy). In Lungen- sowie in AT-II-Zellen zeigte sich ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression der Z3 AAV Nukleasen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($P < 0,05$ für

Lungenzellen, $P < 0,01$ für AT-II-Zellen). Während in unbehandelte Mäusen keine Expression der Nukleasen nachgewiesen werden konnte ($2,1 \pm 1,94$ %), stieg der Anteil in Z3 AAV-behandelten Mäusen deutlich auf $22,52 \pm 3,31$ % in Lungenzellen bzw. $8,88 \pm 3,64$ % in AT-II-Zellen an. Im Gegensatz dazu war die Expression der Z3 nec-mRNA in Lungenzellen relativ gering mit einem prozentualen Anteil von $8,48 \pm 6,26$ %. In AT-II-Zellen hingegen konnte ein Wert von $6,03 \pm 4,56$ % ausgemacht werden. Vergleicht man die Kontrollgruppen D und E mit der Doxy-Gruppe, so stieg auch hier die Expression aufgrund der 3xFLAG-Markierung in den Mock AAV-behandelten Gruppen (D: $32,65 \pm 4,55$ % in Lungen- und $13,1 \pm 0,3$ % in AT-II-Zellen; E: $23,95 \pm 9,65$ % in Lungen- und $12,3 \pm 4,9$ %) signifikant an ($P < 0,05$ für Lungenzellen, $P < 0,01$ für AT-II-Zellen).

Zusammenfassend konnte eine zeitlich limitierende Expression der Z3 nec-mRNA gezeigt werden, was die in Abschnitt 3.3 erhaltenen Ergebnisse nochmals bestätigt. Die mit Z3 AAV Nukleasen behandelten SP-B Mäuse ließen dagegen eine dauerhafte Expression der Z3 Nuklease erkennen.

4. Diskussion

Die Notwendigkeit eine funktionale Kopie eines defekten Gens in Zielzellen einzubringen, ist die wesentliche Grundlage gentherapeutischer Ansätze. Ein Nachteil der in den letzten Jahrzehnten durchgeführten Gen-Ersatztherapien besteht jedoch darin, dass durch das Einbringen vorwiegend viraler Vektoren – und damit dem gewünschten Zielgen – die eigentliche genetische Mutation am endogenen Locus nicht grundlegend korrigiert wird. Ein solcher Ansatz kann jedoch mit Hilfe sequenzspezifischer Nukleasen erreicht werden. Durch die Nuklease-vermittelte Induktion eines Doppelstrangbruchs (DSBs) und der anschließenden Homologen Rekombination (HDR, engl. *homology directed repair*) mit Hilfe eines Reparatur-*Templates*, dessen Zielsequenz von homologen Bereichen flankiert wird, welche identisch der DSB-umgebenden Sequenz ist, kann der Einbau eines Zielgens in die genomische DNA erfolgen. Viral-basierende Nukleasen weisen dabei zahlreiche Limitationen auf, wie bspw. eine mögliche, auftretende Immunreaktion des Wirts gegenüber viralen Proteinen, die dauerhafte Expression der Nukleasen und damit die Gefahr von *off-target* Effekten sowie die Gefahr einer Integration viraler Elemente in das Genom. Ein gentherapeutischer Ansatz, welcher diese Aspekte minimiert, steigert somit das allgemeine Sicherheitsprofil und reduziert die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten unerwünschter Nebeneffekte. Basierend auf dieser Grundlage und vor dem Hintergrund einer auf *messenger* (m)RNA-kodierenden, Nuklease-vermittelten HDR konnte in dieser Arbeit die sichere und erfolgreiche *in vivo* Genkorrektur *Surfactant Protein-B* defizienter Mäuse durch Einbau eines konstitutiv aktiven Promoters gezeigt werden.

4.1 Evaluierung von ZFNs und TALENs

Für die Selektion einer sequenzspezifischen und DSB-induzierenden Nuklease wurde zunächst ein Panel aus 15 TALENs und 36 ZFNs extern auf deren Schnitt-Effizienz hin untersucht. Die Schnitt-Effizienz hängt dabei im Allgemeinen von der Bindungsspezifität der einzelnen TALE- bzw. ZF-Domänen an die entsprechende Zielsequenz ab^{146,171}. Ein Kriterium für die Auswahl von TALENs ist dabei die Anwesenheit eines Thymins an Position 0 der Erkennungssequenz. Diese Nukleinsäurebase ist essentiell für die Bindung und wird durch zwei degenerierte Module des Aminoterminus erkannt^{96,172}. Neben dieser Restriktion wird die Spezifität ebenfalls durch die Anwesenheit eines Adenins an Position 2

negativ beeinflusst. Cermak sowie Juillerat *et al.* konnten demnach zeigen, dass gerade für kurze Erkennungssequenzen von 9,5 – 12,5 *Repeats* die Aktivität der TALENs in Anwesenheit eines Adenins an Position 2 abnimmt.^{150,171} Ein wichtiger Faktor ist zudem die Berücksichtigung von Basenfehlpaarungen zwischen den einzelnen Domänen und der Zielsequenz. Für die meisten Domänen bindet eine RVD (engl. *repeat variable di-residue*) zwar eine spezifische Base und entspricht somit dem typischen 1:1-Code, jedoch kann es – beispielsweise im Falle der RVD NI, welche die Base Adenin binden soll – ebenfalls zu unspezifischen Bindungen mit weiteren Basen, wie Cytosin oder Guanin kommen⁸⁹. Bis zu einem gewissen Grad können diese unspezifischen Bindungen toleriert werden, dabei muss jedoch der kumulative Effekt aus mehreren Fehlpaarungen berücksichtigt werden, welcher die TALE-DNA Bindungsaffinität beeinflusst¹⁷¹. Für die Auswahl und Anordnung sequenzspezifischer TALE-Domänen werden im Allgemeinen statistische Analysen sowie Sequenz-basierte Algorithmen verwendet, welche Basenfehlpaarungen sowie die Bindungsspezifität berücksichtigen^{54,150,173}. Die ZFN-Proteine bzw. deren Selektivität gegenüber bestimmten Zielsequenzen werden ebenfalls über spezifische Algorithmen verifiziert und anschließend über Selektions-basierte Assays, wie dem DLSSA-Assay quantifiziert^{146,174,175}. Für den Zusammenbau der ZF-Domänen existieren verschiedene Protokolle, wie die der Kontext-sensitiven Selektion oder der hier angewandten 2+2-Strategie. Diese Methoden berücksichtigen dabei die Position einzelner, benachbarte ZF-Domänen zueinander. Basierend auf strukturellen Analysen konnte dabei gezeigt werden, dass ZF-Domänen nicht Kontext-unabhängig agieren, sondern je nach modularer Anordnung auch benachbarte Basen binden können. Zudem können spezifische Reste in der Erkennungshelix einzelner ZF-Domänen die Orientierung weiterer, benachbarter Helices beeinflussen und so die Bindungsspezifität herabsetzen¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. Der von Sangamo Bioscience durchgeführte DLSSA-Assay zeigte für die getesteten Nukleasen eine relativ ausgeprägte Schnitt-Effizienz für die TALENs T1, T2 und T4 sowie die ZFNs Z2 bis Z5. Hier war das Verhältnis von rekombinierter *Firefly*-Luciferase zur Referenz *Renilla*-Luciferase im Vergleich zu den anderen getesteten Nukleasen hoch, d.h. für diese Nukleasen wurde die Zielsequenz entsprechend gebunden und durch Dimerisierung der jeweiligen *FokI*-Domänen ein DSB erzeugt. Verifiziert wurde dieses Ergebnis über einen T7-Endonuklease I Assay. Hier bestätigte sich nochmals die Effizienz Nuklease-induzierter DSBs anhand des erhaltenen Verhältnisses von geschnittenen zu ungeschnittenen DNA-Fragmenten für die Nukleasen T1, T4 sowie Z2, Z3, Z4 und Z5. Dabei war die Rate an *indels* vergleichbar mit denen anderer Arbeiten^{151,180-182}. Die Nuklease T2 führte entgegen dem DLSSA-Assay zu

keiner Bildung von Heteroduplices während der Hybridisierung der amplifizierten Fragmente. Dementsprechend konnte das Enzym T7EI keine *Mismatch*-Basenpaarungen erkennen, wodurch nur die ungeschnittene Bande nach Auftrennung der DNA-Fragmente zu sehen war. Ein Grund hierfür könnte in der bereits erwähnten schwachen Ausbildung der Bindungsaffinität zur Zielsequenz bei zumindest einer der beiden TALE-Domänen liegen¹⁷¹. Dadurch kommen die beiden Restriktionsdomänen nicht mehr in unmittelbare Nähe zueinander, wodurch die Dimerisierung, Aktivierung und damit der Nuklease-induzierte DSB ausbleibt.⁸⁹

Aufgrund der hohen *indel*-Raten von T1 und Z3 wurde mit diesen weiterverfahren und der Vergleich zwischen Plasmid- und mRNA-kodierenden Nukleasen angestellt.

4.2 mRNA- versus pDNA-kodierende Nukleasen

Ein optimales Vektor-System zur Bildung Nuklease-induzierter DSBs muss prinzipiell drei Voraussetzungen erfüllen, um sicher und sequenzspezifisch zu schneiden: (1) Die Nukleasen müssen über einen begrenzten Zeitraum exprimiert werden. Eine dauerhafte Aktivität der Nukleasen würde die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Nebeneffekte, wie DSBs außerhalb der Zielsequenz, erhöhen. (2) Das Vektor-System, welches für die Expression der Nukleasen verantwortlich ist, sollte dabei effizient von Zielzellen aufgenommen werden, um eine entsprechende Expression zu gewährleisten. (3) Daneben sollte der Vektor ebenfalls nicht in das Genom integrieren, so dass Insertions-bedingte Mutagenesen ausgeschlossen werden können. Ein Vektor, der diese Voraussetzungen erfüllt ist mRNA. Kormann *et al.* konnten bereits die erfolgreiche, transiente Expression von funktionalem *Foxp3* nach dessen mRNA-Applikation in Lungen von BALB/c-Mäusen zeigen¹¹⁸. Dass die Expression mRNA-kodierender Nukleasen ebenfalls zu funktional aktiven Proteinen führen, wurde über einen T7-Assay über die Induktion von DSBs getestet. Hierbei zeigte sich eine signifikante Steigerung der Rate an *indels* im Vergleich zu Plasmid-kodierenden T1- und Z3-Nukleasen. Die Nuklease-Expressionslevel mRNA-transfizierter Fibroblasten stiegen dabei mit zunehmender Konzentration an und erreichten bereits bei niedriger Konzentration *indel*-Raten, die vergleichbar mit denen hoher Konzentrationen an Plasmid-DNA (pDNA) waren. Dieser konzentrationsabhängige Unterschied ist naheliegend, muss pDNA nach Eintritt in die Zelle zunächst in den Zellkern gelangen, um dann dem zentralen Dogma folgend über die Transkription und Translation in ein funktionales Protein prozessiert zu werden. Das reife Protein muss jedoch anschließend wieder über sein nukleäres Signalpeptid in den

Zellkern zurücktransportiert werden, um entsprechend seine Funktion auszuüben. Der Vorteil mRNA-kodierender Nukleasen liegt demnach darin, dass die Transkription, und somit der Transport in den Zellkern ausbleibt. Die bereits fertige mRNA kann nach Zelleintritt umgehend über die ribosomale Maschinerie in ein funktionales Protein umgeschrieben werden und hängt letztlich nur von der translationalen Kapazität der Zelle ab ^{119,183}. Für pDNA konnte zudem gezeigt werden, dass nur etwa 0,1 % der zytosolisch vorliegenden DNA den Nukleus über den sog. nukleären Porenkomplex (NPC, engl. *nuclear pore complex*) erreicht ¹⁸⁴. Im Gegensatz zu mRNA muss Plasmid-DNA neben dem teilweise endosomal/lysosomal bedingten Abbau der Nukleinsäuren demnach die Barriere der Kernmembran überwinden, wodurch zusätzlich die Protein-Expression gemindert werden kann. ^{185,186}

Die Integration eines Donor-*Templates* konnte zunächst durch den Einbau einer NheI-Schnittstelle innerhalb der SP-B Kasette nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich im Vergleich zu pDNA für die Applikation von mRNA-kodierenden Nukleasen in Kombination mit dem Donor-*Template* eine signifikant höhere HDR-vermittelte Integration der Zielsequenz. Für die Co-Transfektion von T1 bzw. Z3 mRNA reichte bereits eine vierfach geringere Menge an Donor-Plasmid, um eine ähnlich hohe HDR-vermittelte Integration des Inserts zu erreichen. Dies verdeutlicht nochmals die Überlegenheit mRNA-kodierender Nukleasen für deren Effizienz DSBs zu induzieren. Die hier zugrunde liegende Homologe Rekombination beruht dabei auf natürlich vorkommenden, zellulären Mechanismen zur Reparatur von DSBs. Dabei ist die Detektion und anschließende Reparatur entstandener DSBs essentiell für das Überleben der Zelle. Nicht reparierte DSBs können zu chromosomalen Neuaneinandersetzungen und damit zur genomischen Instabilität und Tumorgenese führen ¹⁸⁷. Bei der HDR-vermittelten Reparatur werden üblicherweise homologe Sequenzabschnitte des Schwesternchromatids oder auch des homologen Chromosoms verwendet, um DSBs zu reparieren. Anders als beim Nicht-homologen *end-joining* (NHEJ, engl. *non-homologous end-joining*), wo DNA-Enden direkt religiert werden und die Fehleranfälligkeit für Basen-Insertionen/-Deletionen relativ hoch ist, werden DSBs durch Verwendung einer homologen Sequenzvorlage relativ genau repariert ^{188,189}. Genterapeutische Ansätze nutzen diesen Umstand, indem mit Hilfe eines episomal bzw. extrachromosomal vorliegenden Donor-*Templates* - welches homologe Sequenzabschnitte um die einzubauende Zielsequenz aufweist - der Reparaturmechanismus einer natürlich vorkommenden HDR nachgeahmt wird.

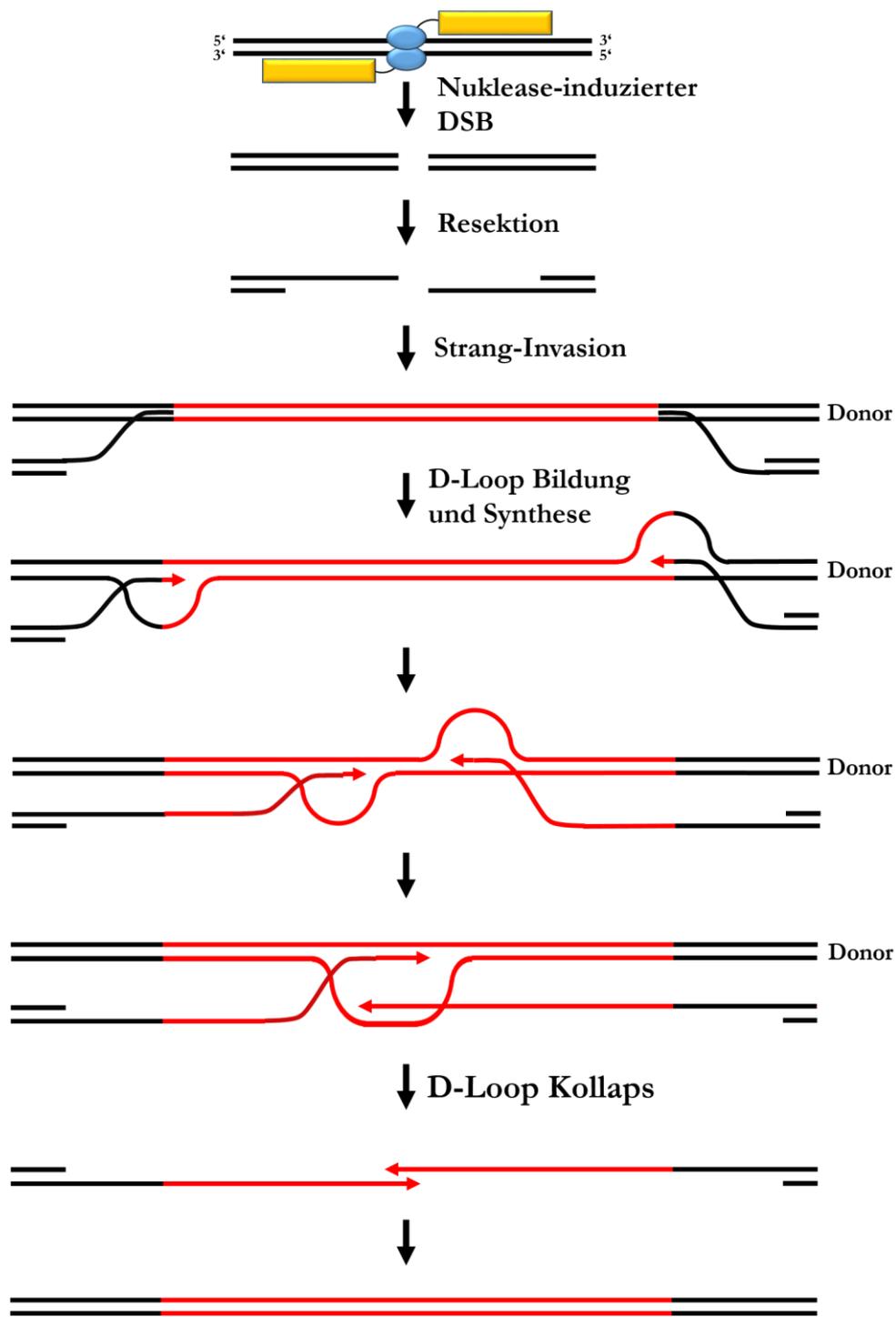


Abb. 4.1: Synthese-abhängige Strang-Anlagerung (SDSA) nach Nuklease-induzertem DSB. Nach der Bildung eines Nuklease-vermittelten DSBs kommt es zunächst zur Bildung von 3'-Überhängen durch Resektion des komplementären Strangs. Die Invasion dieser einzelsträngigen Überhänge an homologe Bereiche des Donor-*Templates* führt zur Bildung eines D-Loops (engl. *displacement loop*) mit kurzen Abschnitten an Heteroduplex-DNA. An den Enden der jeweiligen Einzelstränge kommt es nachfolgend zur DNA-Synthese, wobei die gebundene homologe Sequenz als Vorlage dient. Mit fortlaufender Synthese der beiden Stränge nähern sich diese einander an und es kommt in der Folge zum Zusammenbruch des D-Loops. Die beiden Einzelstränge lösen sich von der homologen Sequenz ab und lagern sich gegenseitig an. Abschließend werden die Lücken des jeweils komplementären Strangs aufgefüllt.

Die HDR macht sich dabei die in [Abb. 4.1](#) dargestellte Synthese-abhängige Strang-Anlagerung (SDSA, engl. *synthesis-dependent strand annealing*) zu Nutze^{190,191}. Liegt das *Template* im Überschuss in der Zelle vor, wird anstatt des Schwesternchromatids die in den Zellkern eingebrachte Vorlage favorisiert. Eine solche HDR-vermittelte Insertion konnte bereits für TALENs und ZFNs sowie weitere Nukleaseplattformen erfolgreich demonstriert werden¹⁹²⁻¹⁹⁵. Für ZFNs konnten Moehle und Kollegen ebenfalls die Insertion einer 12 bp langen *StuI*-Restriktionsschnittstelle in den endogenen IL2R γ -Lokus von K562-Zellen zeigen¹⁹⁶. Mit 15 % HDR-vermittelter Insertion des *Templates* war die Rate vergleichbar mit den hier erzielten Ergebnissen.

Vergleicht man nur die beiden getesteten Nukleasen T1 und Z3 als mRNA-kodierendes Analog, so zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der ZFN Z3 gegenüber der TALEN T1. Dies gilt sowohl im Hinblick auf deren Schnitt-Effizienz als auch im Bezug einer HDR-vermittelten Integration. Darüber hinaus liegen die Bindungsstellen der Z3 Nukleasen, und damit auch der Nuklease-induzierte DSB, für die gewünschte Integration eines Reparatur-*Templates* zwischen dem CMV-Promoter und der SP-B Kasette, wie [Abb. 3.1](#) veranschaulicht. Die bisher erlangten Ergebnisse zusammen mit der im Vergleich zur T1-Schnittstelle günstigeren Position ließen die Wahl für alle weiteren Versuche auf die ZFN Z3 fallen.

4.3 Modifizierte mRNA und dessen Vorteile

Im Zuge der Evaluierung der mRNA-kodierenden Nuklease Z3 wurde im weiteren Verlauf durch Modifikation unterschiedlicher Verhältnisse chemisch, modifizierter Nukleoside die Kinetik und Stabilität sowie deren immunstimulatorische Eigenschaften untersucht. Die hier erhaltenen Ergebnisse des zeitlichen Verlaufs der Z3-Expression in A549-Zellen zeigen für modifizierte mRNA eine deutlich höhere translationale Effizienz sowie intrazelluläre Stabilität für die Bildung von Z3 Nukleasen. Im Gegensatz zu unmodifizierter mRNA war hier eine mindestens doppelt so hohe Nuklease-Expression zu erkennen, deren Niveau erst 72 h nach Transfektion abfiel. Durch Inkorporation modifizierter Nukleoside in IVT mRNA, wie Pseudouridin (Ψ), 5-Methylcytosin (m5C) oder 2-Thiouridin (s2U) werden natürliche, in Zellen vorkommende Ribonukleotide eingebaut. Solch modifizierte mRNAs entgehen dadurch einer Aktivierung unterschiedlicher RNA-Sensoren, wie TLR7/8, RIG-I oder PKR und erhöhen somit die Stabilität und translationale Effizienz durch verminderten Abbau der exogen zugeführten mRNA^{133,197-199}. Vor dem Hintergrund, dass eine Zelle fünf-

bis zehnmal mehr RNA als DNA enthält, müssen auch hier spezifische, immunregulatorische Mechanismen greifen, um Fremd-RNA zu erkennen und folglich abzubauen. Genauso wie unmethylierte CpG-Motive in Fremd-DNA die strukturelle Basis für immunstimulatorische Antworten des angeborenen Immunsystems sind, liegt die Vermutung nahe, dass zelleigene mRNA durch unterschiedliche Modifikationen sich der zellulären Immunantwort entzieht¹³³. Tatsächlich sind bis heute mehr als 50 solcher einzigartig vorkommenden, modifizierten Nucleoside in Eukaryoten bekannt. Bakterien weisen dagegen keine dieser Modifikationen auf²⁰⁰. Für die Inkorporation modifizierter Nucleoside in IVT mRNA existieren mittlerweile unterschiedliche Ansichten für eine optimale Translation und Stabilität. So konnte Kariko *et al.* für den Einbau von 100 % Ψ ($\Psi_{(1,0)}$) eine höhere Proteinexpression für Luciferase- bzw. EPO-kodierende mRNA nachweisen, als dies für m5C-modifizierte mRNA der Fall war^{116,201}. Bei Kormann und Kollegen führte dagegen der Ersatz von 25 % Uridin und Cytosin mit m5C bzw. s2U zu einer erfolgreichen und stabilen Expression von EPO bzw. *Foxp3*^{117,118}. Die beiden, in dieser Arbeit verwendeten Doppelmodifikationen s2U_(0,25)/m5C_(0,25) und $\Psi_{(1,0)}$ /m5C_(1,0) zeigten beide im Vergleich zu unmodifizierter mRNA eine stabilere Kinetik und translationale Effizienz, wobei die Z3-Expression für die Modifikation $\Psi_{(1,0)}$ /m5C_(1,0) um nochmals 20 % höher lag.

Die Applikation des viralen Vektors Z3 AAV führte hingegen erst nach einem Zeitraum von 7 Tagen zu einer stabilen Expression der Z3 Nuklease. Während in anderen Studien für mRNA-kodierende Proteine bereits hohe Expressionslevel nach 6 h gezeigt werden konnte – was die hier gezeigten Daten eines hohen Expressionslevels nach 24 h unterstützt – müssen viral-basierende Vektoren zunächst über passive Diffusion bzw. aktiven, mikrotubulären Transport zum Nucleus gelangen, um nachfolgen über nukleäre Lokalisationssignale in den Zellkern aufgenommen zu werden^{116,202}. Obwohl gezeigt werden konnte, dass bereits 15 min post Transduktion erste AAVs im Zellkern vorliegen, kann eine stabile Protein-Expression bis zu mehreren Wochen benötigen²⁰³. Eine optimale AAV-Transduktion hängt dabei von der Effizienz eines jeden Infektionsschrittes ab, d.h. von der Bindung und dem Eintritt in die Zelle, dem Transport zum und in den Nucleus, dem *Uncoating* sowie der Zweitstrang-Synthese²⁰⁴. Limitierende Faktoren liegen besonders im zytosolischen Transport als auch in der Zweitstrangsynthese^{205,206}.

Im Gegensatz zu gentherapeutischen Ansätzen, bei denen eine dauerhafte Expression des Zielproteins angestrebt wird, wäre dies in Bezug auf Nucleasen und der damit einhergehenden Gefahr potentieller Nuklease-induzierter DSBs außerhalb der Zielsequenz

nachteilig. Für eine entsprechende Genkorrektur und im Rahmen einer HDR-vermittelten Insertion sollten Nukleasen nur für die Dauer des Prozesses der Homologen Rekombination DSBs erzeugen²⁰⁷. Die hier erlangten Ergebnisse unterstreichen das Potential modifizierter, mRNA-kodierender Nukleasen aufgrund der zeitlich begrenzten, stabilen Expression. Für *in vivo*-Applikationen muss mRNA zudem im entsprechendem Maße von Zellen des Lungengewebes aufgenommen werden, um eine adäquate Proteinexpression zu gewährleisten. Prinzipiell sind eukaryotische Zellen fähig „nackte“ mRNA aufzunehmen. Jedoch ist die Aufnahmerate sowie der zytoplasmatische Transport mit weniger als 1 von 10.000 Molekülen der initial eingesetzten mRNA minimal¹¹⁹. Die Aufnahme kann dabei durch komplexierende Strukturen wie Nanaopartikel (NPs) verbessert werden. Dies bestätigt auch der Vergleich intratracheal (i.t.) applizierter mRNA-kodierender Z3 Nukleasen unterschiedlicher Modifikationen mit und ohne Komplexierung in NPs. Hierbei stieg der Anteil 3xFLAG-exprimierender Nukleasen bei Administration mit NPs in allen behandelten Gruppen signifikant gegenüber der Gabe „nackter“, unmodifizierter mRNA. Dieser deutliche Unterschied, welcher bei modifizierten Z3 Nukleasen einen Anstieg um mehr als das Hundertfache mit sich führte, ist daher der Komplexierung in NPs geschuldet. Dabei bewerkstelligt das durch Chitosan erzeugte kationische PLGA-Polymer nicht nur die Kondensierung der Oligonukleotide um ein vielfaches, sondern fördert auch die Anlagerung und Aufnahme dieser an und durch die negativ geladene Zelloberfläche. Zudem weisen die meisten NPs protonierbare Aminogruppen auf, die bei saurem pH - und somit nach Aufnahme in Endosomen - durch Abfangen von Protonen einen weiteren Abfall des pH-Wertes verhindern. Nach endosomaler Aufnahme bewirkt dies zusätzlich einen Influx von Chloridionen. Damit erhöht sich die Ionenkonzentration innerhalb des Kompartiments und führt so zu einem Anstieg des osmotischen Drucks durch die gleichzeitige Aufnahme von H₂O. In Folge dessen kommt es zur Ruptur der Endosomen und zur Freisetzung der mRNA in das Zytoplasma der Zelle²⁰⁸. Dieser sog. Protonenschwamm-Effekt fördert somit die Aufnahme von mRNA in Lungenzellen und verhindert die vorzeitige Degradation durch RNasen²⁰⁹⁻²¹¹. Dies bestätigen auch die durchflusszytometrischen Analysen der Nuklease-Expression in Lungen-, AT-II- und Clara-Zellen. Hier zeigte sich im Vergleich zu unmodifizierter mRNA ebenfalls eine signifikant erhöhte Aufnahme und Expression modifizierter Z3 Nukleasen, wobei für die Modifikation s2U_(0,25)/m5C_(0,25) ein zusätzlicher Anstieg in der Expression zu beobachten war. Die Kombination aus modifizierter mRNA, welche körpereigene mRNA imitiert und sich dadurch einer Immunantwort entzieht, zusammen mit der verbesserten Aufnahme über die Komplexierung in NPs, führte demnach

zu einer deutlich gesteigerten Expression der Z3 Nukleasen im Lungengewebe. Dass diese auch in epitheliale Lungenzellen aufgenommen und exprimiert wurden, beweisen zudem die Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen. Auch hier zeigte sich im Gegensatz zur Applikation unmodifizierter Z3 mRNA für die Modifikationen ein höheres Fluoreszenzsignal.

Die Abwesenheit einer Immunreaktion auf synthetisch hergestellte IVT mRNA nach i.t. bzw. intraperitonealer (i.p.) Applikation unterstreicht nochmals dessen anti-inflammatorische Eigenschaften ^{117,118,133}. Einzelsträngige mRNA kann dabei von verschiedenen endosomalen (TLR3, TLR7 und TLR8) sowie zytoplasmatischen (PKR, RIG-I, MDA5 und OAS) Rezeptoren des angeborenen Immunsystems detektiert und als fremd erkannt werden. Die daraus resultierende Aktivierung unterschiedlicher pro-inflammatorischer Signalwege begünstigt die Synthese von Interferonen (IFN, bspw. IFN α und IFN β), dem *tumor necrosis factor* (TNF) sowie Interleukinen (IL, bspw. IL-6 und IL-12) ^{129,132,212,213}. Als potentestes, strukturelles pro-inflammatorisches Motif für die Bildung von IFN α in Immunzellen haben sich poly(U)-reiche Sequenzabschnitte herausgestellt. Diebold und Kollegen konnten hierfür die Aktivierung von TLR7 und die Synthese einer IFN α -vermittelten Immunantwort in dendritischen Zellen zeigen ¹²⁹. In nicht-immunologischen Zellen wird die Produktion von IFN vorwiegend durch die Rezeptoren RIG-I und MDA5 vermittelt ^{130,212-214}. Diese zytosolischen mRNA-Sensoren beeinflussen ebenfalls die Effizienz der mRNA-Translation und führen zum Stopp dieser sowie zum Abbau der RNA ¹³². Der Einbau modifizierter Nukleoside, wie Ψ oder s2U, hat demnach zur Folge, dass die mRNA für RNA-Sensoren undetektierbar bleibt und eine Immunantwort ausbleibt ¹³³. Die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigen dies deutlich. Weder nach 6 h noch nach 24 h nach i.t. Applikation konnte eine IFN α -vermittelte Immunantwort nachgewiesen werden. Dass die alleinige Gabe von NPs ebenfalls zu keiner erhöhten IFN α -Synthese führte unterstreicht auch dessen anti-inflammatorischen Charakter ²¹⁵. Lediglich die i.p. Gabe von IVT mRNA führte zu einem temporären Anstieg der IFN α -Level. Diese normalisierten sich jedoch wieder nach 24 h auf ein anti-inflammatorisches Niveau.

Die hier erhobenen Daten verdeutlichen die Bedeutung modifizierter, mRNA-kodierender Nukleasen für gentherapeutische Ansätze eindrucksvoll. So besitzt diese nicht nur eine für die Induktion eines DSBs zeitlich begrenzte und stabile Kinetik, sondern führen darüber hinaus durch die Inkorporation modifizierter Nukleotide zu einer effizienten Translation mRNA-kodierender Nukleasen bei gleichzeitigem Ausbleiben einer Immunantwort. Durch

die zusätzliche Gabe eines Donor-*Templates* konnte hier ebenfalls der erfolgreiche Einbau einer NheI-Restriktionsschnittstelle *ex vivo* nachgewiesen werden.

Aufgrund der besseren Aufnahme und Expression modifizierter s2U_(0,25)/m5C_(0,25)-mRNA in Lungenzellen von BALB/c-Mäusen, wurde diese für die folgende *in vivo*-Genkorrektur SP-B defizienter Mäuse verwendet. Der Einfachheit wurde diese Modifikation als Z3 nec-mRNA (engl. *nuclease-encoding, chemically modified mRNA*) bezeichnet.

4.4 Nuklease-vermittelte Homologe Rekombination *in vivo*

Der virale, Nuklease-vermittelte Transfer korrigierter Wildtyp-Kopien in Mutationen beherbergende Gen-Loci, konnte bereits erfolgreich für entsprechende Krankheitsbilder demonstriert werden, so zum Beispiel für die Bluterkrankheit Hämophilie B^{103,216}. Neben dem Risiko viral-bedingter Insertionen und der damit einhergehenden Gefahr chromosomaler Mutationen sowie dem Verlust endogener, regulatorischer Signale, kann eine dauerhafte Aktivität viral-vermittelter Nukleasen durch Induktion von DSBs außerhalb der Zielsequenz das Risiko zusätzlicher mutagener Ereignisse erhöhen²¹⁷⁻²²¹. Auch wenn ZFNs durch ihre sequenzspezifische Bindung und die Voraussetzung der Dimerisierung der *FokI*-Domäne die Wahrscheinlichkeit für etwaige Nebeneffekte reduzieren, so zeigte sich beispielsweise in einer Studie von Gabriel *et al.*, dass die Frequenz ZFN-vermittelter *off-target* Effekte im Vergleich zur Zielsequenz zwar um den Faktor 100 geringer war, jedoch Nuklease-induzierte DSBs und damit Insertionen/Deletionen an unerwünschten Gen-Loci auftraten²¹⁸. Eine zeitlich begrenzte Expression der Nukleasen durch IVT mRNA kann somit die Wahrscheinlichkeit unerwünschter DSBs außerhalb der Zielsequenz reduzieren und bietet damit einen grundlegenden Vorteil der Risikominimierung hinsichtlich klinisch relevanter Applikationen.

Dass die Z3 nec-mRNA-vermittelte Integration des CAG-Reparatur-*Templates* ebenso erfolgreich zu einer transgenen Insertion führte wie die durch Z3 AAV-Nukleasen, konnte hier zunächst über die *ex vivo* Genkorrektur primärer Fibroblasten festgestellt werden. Dabei zeigte sich eindeutig, dass mRNA-kodierende Z3 Nukleasen ebenfalls effektiv DSBs generierten und somit über das Reparatur-*Template* den Einbau des konstitutiv aktiven Promoters durch den Reparaturmechanismus der HDR gewährleisten. Dies bestätigte sich auch eindrucksvoll in den nachfolgenden Tierexperimenten hinsichtlich der Genkorrektur SP-B defizienter Mäuse. Nach i.t.-Applikation des AAV-Reparatur-*Templates* sowie der Z3

nec-mRNA bzw. des Z3 AAV konnte hier eine signifikante Steigerung der Überlebensrate im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden. Wie [Abb. 3.7](#) nochmals verdeutlicht, kam es hier zu der gewünschten Insertion des CAG-Promoters zwischen die SP-B cDNA und dem CMV Minimalpromoter. Nach Einbau der Zielsequenz hängt die Transkription der SP-B cDNA somit nicht mehr von der Anwesenheit exogen zugeführten Doxycyclins ab, sondern kann aufgrund der konstitutiven Aktivität des CAG-Promoters unabhängig davon stattfinden. Infolge dessen wird auch funktionales SP-B Protein synthetisiert, welches für die Ausbildung des Oberflächen-aktiven *Surfactants* und damit einer adäquaten Lungenfunktion essentiell ist ⁴³.

Dies beweisen zum einen die immunhistochemischen Untersuchungen auf SP-B in Lungenschnitten behandelter Mäuse, als auch der direkte Nachweis von SP-B über die Western Blot-Analysen. Im Vergleich zu Kontrollmäusen, welchen kontinuierlich Doxycyclin zugeführt wurde, war hier kein Unterschied in der Expression an funktionalem SP-B festzustellen, d.h. das natürliche Expressionsniveau konnte erfolgreich wiederhergestellt werden. Bei Mäusen, denen entweder Mock-AAV und/oder Mock-mRNA appliziert wurde, blieb die Synthese des SP-B Proteins aus. Dies verdeutlicht nochmals die Notwendigkeit eines entsprechend ausgerichteten AAV-Donor-*Templates*, dessen Sequenzbereiche um das Insert homolog der Zielsequenz sein müssen, sowie der Notwendigkeit sequenzspezifischer Nukleasen, welche den DSB erzeugen. In zahlreichen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sich durch die Induktion von DSBs die Häufigkeit für eine HDR um das bis zu 1000-fache erhöht ²²²⁻²²⁴. Dabei ist auch die Länge der homologen Bereiche um das Insert zu berücksichtigen ²²⁵. Moehle *et al.* konnten beispielsweise eine 5 %-ige transgene Insertion erreichen, dessen *Template* homologe Sequenzbereiche von 750 bp aufwies ¹⁹⁶. Dies ist vergleichbar mit der Länge, welche auch in dieser Studie für die homologen Sequenzabschnitte konzeptioniert wurden. Daneben liegt die erfolgreiche Insertion des Transgens auch in einem effizienten Transfer des AAV-Reparatur-*Templates* in das Lungengewebe begründet. Für die Transduktion wurden hier AAV6 Vektoren verwendet, welche bereits in Studien zur Transduktionseffizienz in Lungen ihre Überlegenheit gegenüber anderen AAV-Vektoren, wie AAV2 oder AAV5, verdeutlichten ²²⁶⁻²²⁸. Verantwortlich hierfür ist u.a. das im AAV6 vorkommende Heparin-Bindungsmotiv, welches die effiziente Bindung an das Glykosaminoglykan und damit die Transduktion alveolärer Epithelzellen begünstigt ^{226,229}. Dabei konnte in einer Studie gezeigt werden, dass im Vergleich zu AAV2-Vektoren eine AAV6 Vektor-Dosis von 10¹¹ distale Lungenbereiche um das bis zu 34-fache besser infiziert ²²⁷.

Die gentherapeutische Korrektur des SP-B Locus führte jedoch nicht nur auf molekularer Ebene zu einer erfolgreichen Wiederherstellung der SP-B Proteinsynthese, sondern zeigte ebenfalls eine deutliche Verbesserung der physiologischen Parameter. Die Messung der *Compliance* ist dabei ein wichtiger Indikator für die Dehnbarkeit der Lunge und gibt Auskunft darüber, inwieweit die Lunge aufgrund der fehlenden Ausbildung des *Surfactants* die Ausprägung hämorrhagischer und inflammatorischer Areale, sowie Ödemen begünstigt. Eine SP-B Defizienz führt dabei terminal zum Lungenversagen aufgrund der aberranten Ausbildung von SP-B und folgend des Oberflächen-aktiven Flüssigkeitsfilms. In Folge dessen reduziert sich die Oberflächenspannung im alveolären Lungengewebe und führt so zum Lungenkollaps^{43,45,46,230}. Die exogene Substitution von synthetisch hergestelltem *Surfactant* – und damit auch SP-B – wird bereits klinisch bei Neugeborenen mit respiratorischem Atemnotsyndrom (ARDS, engl. *acute respiratory distress syndrome*) eingesetzt und verdeutlicht dessen fundamentale Rolle in der Wiederherstellung einer adäquaten Lungenfunktion^{231,232}. Der gentherapeutische Ansatz lässt diese Substitution obsolet werden und korrigiert dauerhaft dessen Ursache. Dies unterstreicht ebenfalls die signifikante Steigerung der Lungen-*Compliance* behandelter SP-B Mäuse. Die i.t.-Applikation des Donor-*Templates* sowie der Z3 nec-mRNA führte dabei ebenso wie die Gabe des Z3 AAV zu einer regelrechten Ausbildung der *Compliance*. Dabei lagen die Werte im Normalbereich Doxycyclin-behandelter Mäuse. Aufgrund der fehlenden Synthese von SP-B in den Kontrollgruppen zeigte sich hier eine deutlich reduzierte Dehnbarkeit der Lunge. Dies bestätigten ebenfalls die Lungenaufnahmen sowie die quantitative Auswertung hämorrhagischer Lungenareale. Ähnlich dem klinischen Bild eines ARDS wiesen Kontrollgruppen zahlreiche Schädigungen des Lungenparenchyms, wie Einblutungen und Ödeme auf²³³. Die geringe bzw. ausbleibende SP-B Synthese führt dabei zu grundlegenden Veränderungen in der alveolären Stabilität und ist assoziiert mit Entzündungsreaktionen. In einer klinischen Studie zur Untersuchung *Surfactant*-assoziiierter Proteine in der BALF von Patienten vor und nach ARDS konnte ein direkter Zusammenhang zwischen niedrigen SP-A und SP-B Konzentrationen und der Ausbildung von Entzündungsreaktionen gezeigt werden. In der BALF von Patienten vor Auftreten eines ARDS stieg dabei die Anzahl an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten an^{234,235}. Im Zuge eines ARDS kommt es folgend zu einem Verlust der epithelialen Integrität, wodurch u.a. der Flüssigkeitstransport durch AT-II-Zellen beeinträchtigt wird. Dadurch wird die alveoläre Flüssigkeit nicht mehr ausreichend entfernt, was die Bildung von Ödemen begünstigt²³³. Der erfolgreiche Einbau

des CAG-Promoters und die damit verbundene SP-B Synthese konnte ebenfalls durch die Messung des Atemwiderstandes verifiziert werden. Auch hier zeigte sich im Vergleich zu den Positivkontrollen nach Methacholin-Gabe keine Abnahme des Atemwiderstands in den Hauptgruppen Gen-manipulierter SP-B Mäuse.

Im Rahmen einer durch Z3 nec-mRNA bzw. durch die viralen Vektoren verursachten Immunantwort wurde zusätzlich die BALF der jeweiligen Gruppen auf das pro-inflammatorische Interleukin IL-12 untersucht. IL-12 ist dabei das Produkt aktivierter Entzündungszellen und ist an der Ausprägung T_H1 -vermittelter Immunantworten beteiligt ¹⁶⁹. Das Interleukin ist vornehmlich für die Differenzierung naiver T-Zellen in T_H1 -Zellen verantwortlich und somit als T-Zell-stimulierender Faktor aktiv ²³⁶. IL-12 stimuliert dabei die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) und des Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und unterdrückt die IL-4 vermittelte Suppression von IFN- γ . Das Interferon wird wiederum als Antwort auf virale sowie bakterielle/*in vitro* translatierte Nukleinsäuren gebildet. Dadurch kommt es einerseits zur Inhibierung der viralen Proteinsynthese, andererseits werden als fremd erkannte Nukleinsäuren abgebaut ^{167,168,237}. Für IVT mRNA konnte Kormann sowie Kariko *et al.* bereits zeigen, dass unmodifizierte mRNA zur IL-12 Synthese in PBMCs sowie Dendritischen Zellen führt, während in Anwesenheit modifizierter Nukleoside eine solche Antwort ausbleibt ^{117,133}. Im Gegensatz dazu hängt die humorale und zelluläre Antwort bei AAV-Vektoren vom Kapsid sowie vom Transgen selbst ab. Dass diese relativ sicher in ihrer Applikation sind zeigen zahlreiche klinische Studien der letzten 20 Jahre. Dabei wurden AAV-Vektoren für verschiedene gentherapeutische Ansätze in unterschiedlichen Organen, wie der Leber, dem zentralen Nervensystem aber auch der Lunge verwendet ^{63,238}. Die Ausbildung einer humoralen Antwort ist dabei organspezifisch, beeinflusst jedoch eher die Effizienz des eingebrachten Transgens als das allgemeine Sicherheitsprofil selbst ²³⁸. Die hier erhobenen Daten zur IL-12 Konzentration in der BALF behandelter Mäuse bestätigen dies, sowohl für die Applikation der Z3 nec-mRNA als auch für die AAV-Vektoren. Weder in den Kontroll- noch in den behandelten Hauptgruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-12 Werte. Die ausbleibende Immunantwort auf Z3 nec-mRNA untermauert damit nochmals die fehlende Synthese des pro-inflammatorischen INF- α nach i.t.-Applikation. Die zusätzlich differentielle Zellzahl-Analyse der Immunzellen in der BALF zeigte ebenfalls keinen Nukleinsäure- bzw. viral-bedingten Anstieg an Neutrophilen, Eosinophilen sowie Lymphozyten. Im Vergleich zu PBS-behandelten SP-B Mäusen blieb auch der Anteil an Makrophagen konstant.

Insgesamt konnte damit für den gentherapeutischen Ansatz mit Z3 nec-mRNA ein im Vergleich zu Z3 AAV behandelten Mäusen vergleichbares Sicherheitsprofil nachgewiesen werden, wobei der Z3 nec-mRNA zusätzlich der Vorteil einer zeitlich limitierten Expression obliegt.

ZFNs, als ein vielseitiges Werkzeug für die Erzeugung sequenzspezifischer Deletionen/Insertionen hinsichtlich diverser Gen-Funktions-Analysen, aber auch im Hinblick eines HDR-vermittelten Transfers korrigierter Sequenzabschnitte im Zuge gentherapeutischer Ansätze, haben im Laufe der letzten Jahre zunehmend an Bedeutung gewonnen und wurden mittlerweile in unterschiedlichsten Modell-Organismen, wie der Maus, der Ratte, dem Zebrafisch oder *Xenopus* untersucht^{95,103,134,135,216}. So konnte beispielsweise die Generierung von Deletionen verschiedener Länge von bis zu 15 kb innerhalb des humanen *CCR5*-Gens demonstriert werden²³⁹. *CCR5* ist dabei ein ideales therapeutisches Ziel, aufgrund der Beobachtung, dass Individuen mit Mutationen, welche das Gen inaktivieren, nicht nur gesund sind, sondern auch eine natürliche Resistenz gegenüber HIV-Infektionen besitzen²⁴⁰. ZFNs, welche das *CCR5*-Gen sequenzspezifisch schneiden, finden sich auch mittlerweile erfolgreich in klinischen Studien wider^{85,87}. Dass mRNA-kodierende Nukleasen ebenso effektiv wie sequenzspezifisch schneiden können, zeigten unter anderem Geurts *et al.* für ZFNs sowie Wefers und Kollegen für TALENs hinsichtlich der Etablierung von *knock-out* Ratten via embryonaler Mikroinjektion^{135,137}. Dies bestätigen auch die durch den *Mismatch*-sensitiven T7-Endonuklease I Assay erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Schnitt-Effizienz der Z3 nec-mRNA. Verglichen mit dem viralen Transfer der Z3 Nukleasen war der Anteil in der Generierung von *indels* annähernd gleich. Auch wenn die mRNA-kodierenden Nukleasen zeitlich begrenzt exprimiert werden, so zeigt sich hier keine Einschränkung in der Nuklease-vermittelten Induktion von DSBs, was deren Potential zur Risikominimierung nochmals unterstreicht. Eine erfolgreiche HDR-vermittelte Insertion des CAG-Promoters in den SP-B Locus konnte ebenfalls nachgewiesen werden und untermauert somit die in dieser Studie gemachten Beobachtungen einer signifikant höheren Überlebensrate gentherapeutisch korrigierter SP-B Mäuse. Die Effizienz der HDR ist dabei mit anderen Studien vergleichbar. Li und Kollegen konnten beispielsweise in einem murinen Modell zur Korrektur der Hämophilie B eine Insertion des humanen *F9*-Gens (Exone 2-8) in den entsprechend mutierten Locus von ca. 5 % erreichen¹⁰³. Unter natürlichen Umständen würde die Frequenz einer homologen Rekombination bei 1:1.000.000 liegen, einem Level, das unzureichend für therapeutische Zwecke wäre^{241,242}. Die

sequenzspezifische Induktion Nuklease-induzierter DSBs erhöht jedoch das Ereignis einer HDR um ein Vielfaches, so dass 1 von 100 Zellen oder mehr sich dem gewünschten Reparaturmechanismus unterzieht ^{243,244}. Zu berücksichtigen ist auch, dass die Wahrscheinlichkeit einer HDR in der S- und G2-Phase des Zellzyklus höher ist, als in sich nicht teilenden Zellen ^{245,246}. Berücksichtigt man dies, so ist der hier ermittelte Anteil der HDR für die Insertion des Reparatur-*Templates* in einem therapeutisch relevanten Rahmen.

Der Umstand, dass die Gen-korrigierten SP-B Mäuse zwar signifikant länger als die der Kontrollgruppen überlebten, es jedoch nicht zu einer dauerhaft, stabilen Genexpression kam, kann der Tatsache geschuldet sein, dass hier die sich in den Alveolen vorwiegend befindlichen AT-I-Zellen korrigiert worden sind. Berücksichtigt man den Anteil alveolärer Stammzellen von 5 % in Bezug auf die Gesamtoberfläche, so lässt dies vermuten, dass nur ein geringer, jedoch nicht ausreichender Teil der AT-II-Zellen korrigiert worden ist. Prinzipiell müsste 25 % des ursprünglich synthetisierten SP-B wiederhergestellt werden, um das Überleben der transgenen Mäuse zu gewährleisten ¹⁵⁹. Die FACS-Analysen 3xFLAG-markierter Z3 AAV in AT-II-Zellen lassen jedoch mit einem Anteil von unter 10 % darauf schließen, dass auch die Transduktionsrate des Reparatur-*Templates* ebenso gering ausgefallen sein muss. Im Umkehrschluss bedeutet dies – bei einem natürlichen *Turnover* von durchschnittlich 21 Tagen einer Lungenzelle – dass nicht ausreichend viele Stammzellen korrigiert worden sind, als dass eine dauerhafte Korrektur gewährleistet werden konnte ²⁴⁷. Die Option mehrerer wiederholter i.t.-Applikationen könnte womöglich zu diesem gewünschten Therapieziel führen, da mit fortschreitender Behandlung die Anzahl korrigierter AT-II-Stammzellen ansteigen würde.

Überträgt man die hier erhaltenen Ergebnisse auf den Menschen, so würde eine Wiederherstellung der SP-B Synthese von 5 - 10 % ausreichen, um das Krankheitsbild zumindest in Richtung eines milden Verlaufs zu korrigieren ³². Die hier ermittelte HDR von etwa 9 % dürfte demzufolge ausreichen, um den Verlauf der Krankheit zu verbessern.

Die hier erhaltenen Daten verdeutlichen die Signifikanz mRNA-basierter Gentherapien. So konnte hier nicht nur die erfolgreiche Genkorrektur SP-B defizienter Mäuse gezeigt werden, sondern auch, dass durch die Modifikation *in vitro* transkribierter mRNA eine potentiell Risiko-behaftete Immunantwort durch Nachahmung natürlich vorkommender Nukleoside ausbleibt. Im Gegensatz zu einem rein viralen Transfer – dessen dauerhafte Nuklease-Expression etwaige *off-target* Effekte provoziert – liegt der zusätzliche Vorteil in der zeitlichen

Begrenzung mRNA-kodierender Nukleasen. Die Gefahr für potentielle, Nuklease-bedingte Mutationen wird dadurch minimiert und unterstreicht dessen Relevanz im Rahmen klinischer, gentherapeutischer Ansätze.

4.5 Evaluierung des gentherapeutischen Sicherheitsprofils

Obwohl das potentielle Risiko rekombinanter AAV Vektoren für eine chromosomale Insertion weitestgehend eliminiert wurde, können dennoch spontane Integrationen auftreten²⁴⁸. Wild-Typ AAVs enthalten für die Replikation und Kapsidbildung funktionale wichtige Gene, die sog. *rep*- und *cap*-Gene. Die Protein-Produkte, besonders des *rep*-Gens, interagieren dabei im Laufe der AAV DNA-Replikation mit spezifischen Sequenzen, wie dem RBE (engl. *rep-binding element*) und der trs (engl. *terminal resolution site*). Diese wiederum sind innerhalb der die *rep*- und *cap*-Gene flankierenden ITRs (engl. *inverted terminal repeats*) lokalisiert. Für eine chromosomale Integration des AAVs müssen die beiden Elemente, RBE und trs, ebenfalls in einem gewissen Abstand innerhalb des Genoms vorkommen²⁴⁹. Zwar weist das humane Genom mehrere *rep*-Bindungsstellen auf, jedoch konnte anhand von Datenbank-Recherchen gezeigt werden, dass eine solche Stelle nur ein einziges Mal – und zwar auf Chromosom 19 im *AAVS1*-Locus – vorkommt^{250,251}. Heutzutage werden rekombinante AAV-Vektoren verwendet, denen die *rep*- und *cap*-Gene fehlen. An Stelle dieser werden Transgene eingebaut. Da die ITRs ebenfalls *cis*-aktive Elemente für die Replikation enthalten, kann somit eine potentielle virale Integration ausgeschlossen werden. Dennoch konnten in Studien von Nakai sowie Donsante *et al.* AAV-Integrationen in Hepatozyten nachgewiesen werden^{252,253}. Nakai und Kollegen zeigten dabei, dass in einigen Fällen Sequenz-Mikrohomologien zwischen ITRs und der chromosomalen DNA bestehen. Darüber hinaus werden AAV-Insertionen mit chromosomalen Deletionen als Resultat von DSBs und anschließendem NHEJ assoziiert²⁵⁴. Dies unterstützen Untersuchungen, in denen eine direkte Korrelation zwischen genomischer Instabilität (hervorgerufen durch DNA-schädigende Substanzen) und stabiler AAV-Transduktion nachgewiesen werden konnte^{255,256}. Zudem konnte gezeigt werden, dass Proteine des NHEJ-Komplexes lineare AAV-DNA binden²⁵⁷. Im Umkehrschluss bedeutet dies jedoch, dass rekombinante AAVs nicht aktiv in das Genom integrieren, sondern vielmehr in bereits bestehende chromosomale DSBs integrieren. Im Rahmen gentherapeutischer Ansätze, in denen Nukleasen für den Einbau korrigierter Sequenzabschnitte verwendet werden, muss daher vielmehr auf das Sicherheitsprofil der Nukleasen selbst – d.h. deren potentielle Eigenschaft außerhalb der

Zielsequenz zu schneiden - geachtet werden, als auf eine durch den Virus bedingte, chromosomale Integration.

Für die Effektivität und Spezifität von ZFNs sind wiederum mehrere Faktoren in Betracht zu ziehen: Zum einen muss die Zielsequenz zugänglich für die entsprechenden DNA-Bindungsdomänen sein. Kompakte Chromatinstrukturen, DNA-Modifikationen oder andere Faktoren können die Bindung an die Zielsequenz verhindern²⁵⁸. Daneben kann die Spezifität einzelner ZF-Domänen erheblich variieren. So binden manche ZF-Triplets ebenso gut an anderen Basen als die eigentlich präferierten Basen. Zu berücksichtigen ist auch, dass zwar die gesamte Bindungssequenz eines ZFN-Paares mindestens 18 bp (9 + 9) lang ist und somit einzigartig innerhalb des Genoms sein sollte, berücksichtigt man jedoch nur eine einzelne Bindungsdomäne, so kommt diese Sequenz innerhalb des Genoms mehr als 10.000 Mal vor, was mögliche *off-target* Effekte deutlich erhöht²⁵⁹. Die Bildung von *FokI*-Homodimeren kann ebenfalls dazu beitragen. So können sich bei hohen ZFN Konzentration auch Dimere bilden, die unabhängig von ihren Zielsequenzen auftreten und schneiden²⁶⁰. Um die Spezifität zu verbessern, hat sich der wissenschaftliche Fokus in den letzten Jahren vorwiegend auf drei wichtige Faktoren gerichtet:

- (1) Optimierung der ZF-Bindungs-Domäne durch Erhöhung der Affinität durch zusätzliche ZF bzw. durch Einbau kurzer Linker zwischen den ZF-Modulen^{149,258}.
- (2) Optimierung der Linker zwischen ZF-Domäne und *FokI* Nuklease durch Anpassung dieser an die Größe des jeweiligen *Spacers* (als *Spacer* wird die Sequenz bezeichnet, welche zwischen den beiden Bindungsdomänen liegt und in welcher der Schnitt erfolgt)²⁶¹.
- (3) Optimierung der *FokI* Nuklease-Domäne durch Einführung bestimmter Mutationen an den während der Dimerisierung funktional beteiligten Resten der katalytischen Domäne^{259,262,263}.

Die in dieser Arbeit verwendeten ZFNs weisen pro ZFN nicht nur drei, sondern gleich vier solcher Bindungsdomänen auf, was die Spezifität nochmals deutlich erhöht. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Sequenz innerhalb des murinen Genoms vorkommt, reduziert sich damit um den Faktor 64. Das heißt, eine solche Sequenz deckt sich anstatt der 10.000 Mal nur noch 190 Mal mit der gemischten Sequenz der Maus. Die zusätzliche Mutation innerhalb der katalytischen Domäne der *FokI*-Nuklease sorgt ebenfalls für die Spezifität durch Reduktion auftretender Homodimere. Die Analysen potentieller Sequenzabschnitte

für die Generierung von DSBs und damit möglicher viraler Integrationen außerhalb der Zielsequenz bestätigen dies (Daten nicht gezeigt). Hier zeigten sich keine Insertionen, was eine relativ hohe Spezifität vermuten lässt. Um weitere potentielle *off-target* Effekte auszuschließen, müsste eine ganzheitliche Genomanalyse durchgeführt werden. Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass sequenzspezifische Nukleasen, die einmalige, genomische Sequenzabschnitte binden, keine substantiellen *off-target* Effekte generierten^{264,265}.

Bezüglich des Sicherheitsaspekts dieses gentherapeutischen Ansatzes ist davon auszugehen, dass – bedingt durch die zeitlich begrenzte (im Falle der Z3 nec-mRNA), aber hohe Bindungsspezifität der Nukleasen sowie den Integrations-defizienten viralen Vektoren – genomische *off-target* Effekte weitestgehend vermieden werden konnten, was die Relevanz für mögliche klinische Anwendungen ebenfalls unterstreicht.

4.6 Grenzen des SP-B Tiermodells

Auch wenn die in dieser Arbeit korrigierte Zielsequenz ein Transgen ist, d.h. ein in den Mausstamm eingebrachtes SP-B cDNA-Konstrukt, und somit nicht der eines humanisierten Mausmodells entspricht, so ähnelt die phänotypische Ausprägung nach Absetzen von Doxycyclin doch sehr dem Krankheitsbild von Patienten mit SP-B Defizienz: neben Verdickungen der Alveolarwände, einer ausgeprägten zellulären Infiltration, der Bildung von interstitialen Ödemen, sowie dem Anstieg an Makrophagen und Neutrophilen, ist ebenfalls ein signifikanter Abfall in der Lungenfunktion (*Compliance*) sowie die Entwicklung eines akuten Atemnotsyndroms, welches innerhalb von drei bis fünf Tagen zum Tod der Mäuse führt, zu beobachten^{159,266}. Die SP-B Protein-Level, welche unter der Gabe von Doxycyclin erhalten wurden, entsprechen ebenfalls annähernd denen in Wild-Typ Mäusen (siehe [Abb. 4.2](#)). Nichtsdestotrotz steht hier nach korrektem Einbau der Zielsequenz die SP-B cDNA unter der Kontrolle eines konstitutiv und sehr stark aktiven CAG-Promoters, der entsprechend zu relativ hohen Konzentrationen an SP-B führt. Dies erklärt auch, warum die Korrektur eines geringen Anteils an Lungenzellen zu den hier erhaltenen hohen SP-B Leveln führt.

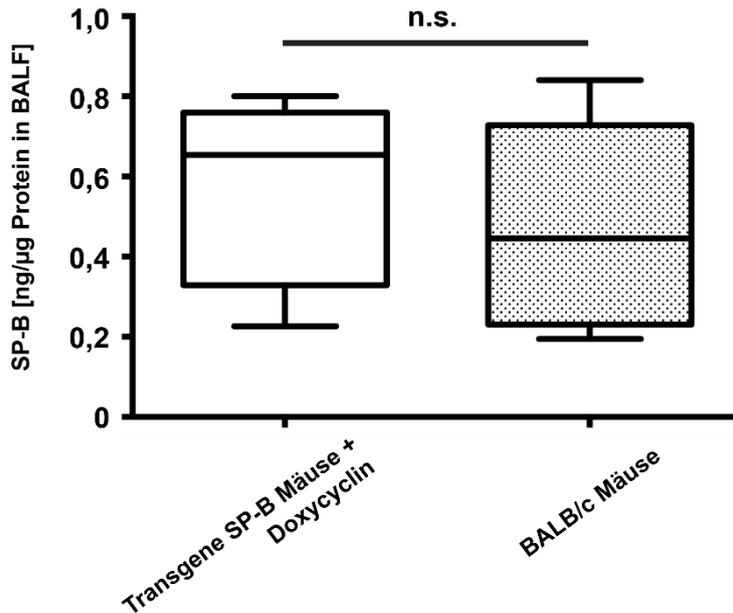


Abb. 4.2: SP-B Expression der BALF von transgenen SP-B und Wild-Typ BALB/c Mäusen. Der Unterschied in der Expression von SP-B war zwischen den beiden Mauslinien nicht signifikant (n.s.). Boxen repräsentieren Mediane \pm IQRs (Interquartilsabstände), Whisker die Minima und Maxima. n = 5 (SP-B Mäuse) und n = 6 (BALB/c Mäuse) pro Gruppe.

Transfizierte und korrigierte AT-II-Zellen produzieren demnach viel mehr an entsprechendem Protein, als dies in Wild-Typ AT-II-Zellen der Fall war. Zudem führt die starke Expression ebenfalls dazu, dass SP-B viel gleichmäßiger über die Lunge verteilt wird, was zu den hier erhaltenen, hohen Proteinkonzentrationen in den Western Blot Analysen führt. Daneben spiegelt die hier durchgeführte PCR-basierte Quantifizierung des CAG-Promoters wahrscheinlich nur einen gewissen Teil der tatsächlichen Integration wider, da hier Amplikons von zwei völlig unterschiedlichen PCR-Reaktionen verglichen wurden.

Vor dem Hintergrund, dass diese Studie der Grundlagenuntersuchung und somit dem *proof of principle* dient, repräsentieren die hier verwendeten transgenen SP-B defizienten Mäuse ein ideales Modell, und zwar aus den folgenden Gründen: (1) Das Absetzen von Doxycyclin führt hier zu phänotypischen Veränderungen, wie diese auch unter humanen Bedingungen beobachtet werden. (2) Die Administration von Doxycyclin führt zu SP-B Levels vergleichbar zu denen in Wild-Typ Mäusen. (3) Der Parameter „Überleben“ ist ein ideales Maß für die Effizienz des gentherapeutischen Ansatzes.

Für einen klinisch relevanten Ansatz müsste das System im Weiteren an humanisierten Tiermodellen untersucht und evaluiert werden. Das Einbringen humaner Gene in bspw. Mauslinien ermöglicht die Untersuchung diverser, human-bezogener Krankheiten und hat in den letzten zehn Jahren enorm an Bedeutung gewonnen²⁶⁷. Gerade im Hinblick auf die

Anwendung therapeutisch relevanter Ansätze bieten diese Tiermodelle die ideale Grundlage für zukünftige klinische Untersuchungen. Einer der entscheidenden Vorteile ist dabei, dass über die Transplantation humaner, hämatopoetischer Stammzellen sich diese in verschiedene hämatopoetische Zelllinien differenzieren können und somit humane Immunantworten widerspiegeln können ²⁶⁸⁻²⁷⁰. Erst kürzlich wurde ein Mausmodell entwickelt, in das vier humane Gene, welche für Zytokine kodieren und damit wichtig für die Zellentwicklung des angeborenen Immunsystems sind, in die entsprechenden Loci der Maus eingebracht worden sind ²⁷¹. Eine Evaluierung möglicher immunstimulatorischer Effekte gegenüber nec-mRNA oder AAVs könnte somit noch spezifischer evaluiert werden. Durch das zusätzliche Einbringen von Zielgenen, wie bspw. dem humanen SP-B Locus (mit oder ohne Krankheitsverursachenden Mutationen), könnten zudem für den Menschen potentiell hochspezifische, sowie *off-target* Effekt-arme Nukleasen im Vorfeld klinischer Anwendungen ausgemacht und verifiziert werden.

4.7 Aussicht

Das wissenschaftliche Feld gentherapeutischer Ansätze zur kurativen Behandlung Genbedingter Defekte hat in den letzten Jahren - gerade durch die Entwicklung sequenzspezifischer Nukleasen, wie ZFNs, TALENs oder dem CRISPR-Cas-System - enorm an Bedeutung gewonnen ^{95,272}.

Gerade vom dem Hintergrund klinisch relevanter Strategien ist die Sicherstellung Nebenwirkungs-armer Behandlungen eine essentielle Grundvoraussetzung, um die Gefahr potentiell auftretender, genotoxischer sowie immunstimulatorischer Effekte in einem abschätzbaren Rahmen zu halten. Durch den kontinuierlichen Fortschritt der verschiedenen Nuklease-Plattformen konnten bereits vielversprechende Erfolge hinsichtlich einer Minimierung von unerwünscht auftretenden *off-target* Effekten erzielt werden ⁷¹. Strukturelle Veränderungen sowie Selektions-basierte Ansätze haben dabei die Spezifität und Effektivität von ZFNs oder TALENs deutlich erhöht ^{260,262,263,273}. Neueste Forschungsergebnisse schlagen ebenfalls die zusätzliche Inhibition der für das NHEJ verantwortlichen DNA Ligase IV vor. Im Kontext eines gentherapeutischen Ansatzes konnte dabei die Rate für den Einbau eines Konstruktes zu Gunsten der HDR um das bis zu 19-fache erhöht werden ²⁷⁴.

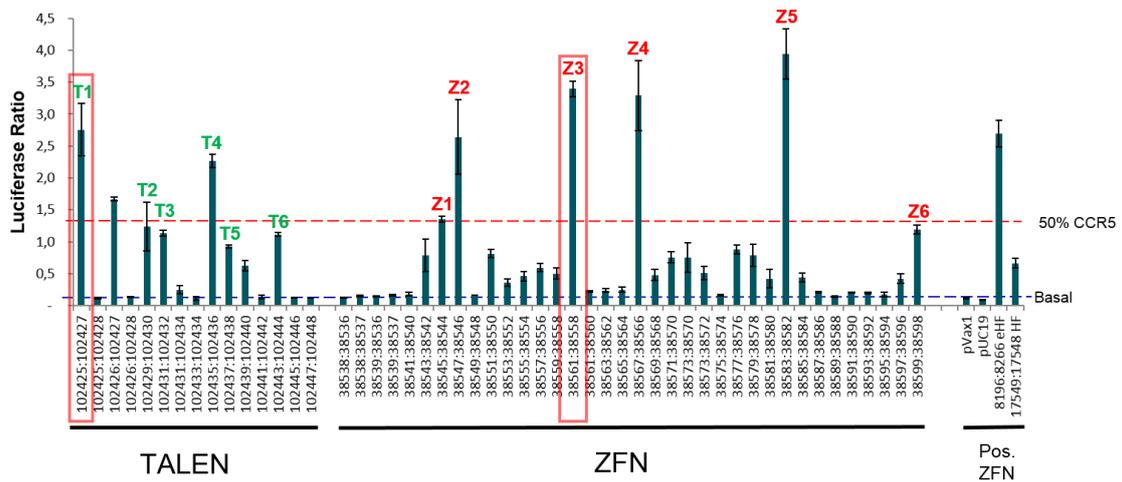
Um Nukleasen entsprechend in Zielzellen einzubringen, sind heutzutage virale Vektoren das Mittel der Wahl. Nahezu 70 % aller klinischen Studien im Bereich der Gentherapie beruhen auf einem solchen Transfer, bedingt durch deren hohe Effizienz einer stabilen Expression ^{275,276}. Obwohl die gebräuchlichsten viralen Vektoren (Lentiviren für den *ex vivo*-Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen, AAVs für den *in vivo*-Gentransfer in postmitotische Zellen) episomal vorliegen, so bergen diese doch ein gewisses Risiko, gerade im Hinblick auf Integrations-bedingte, genomische Mutationen, sowie die Stimulation einer Immunantwort ⁶¹. Die dauerhafte Expression im Zuge einer Nuklease-vermittelten Genkorrektur würde zudem die Wahrscheinlichkeit für das Risiko unerwünschter Nebeneffekte durch Induktion von DSBs außerhalb der Zielsequenz – und damit auch die Wahrscheinlichkeit viral-bedingter Mutationen – erhöhen ²⁵⁵. Für klinisch relevante Ansätze ist daher die Minimierung solcher genotoxischer Effekte von essentieller Bedeutung.

Eine vielversprechende Alternative zum viralen Nuklease-Transfer bietet die erst seit einigen Jahren in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen gerückte *messenger* RNA. Eine solche, auf mRNA-basierte Induktion von DSBs für den Einbau entsprechender Reparaturkonstrukte hat dabei entscheidende Vorteile: (1) Anders als virale Vektoren besitzt mRNA ein zeitlich begrenztes Expressionsmuster, wodurch etwaige, durch Nukleasen vermittelte, mutagene Effekte innerhalb des Genoms reduziert werden können. (2) Durch

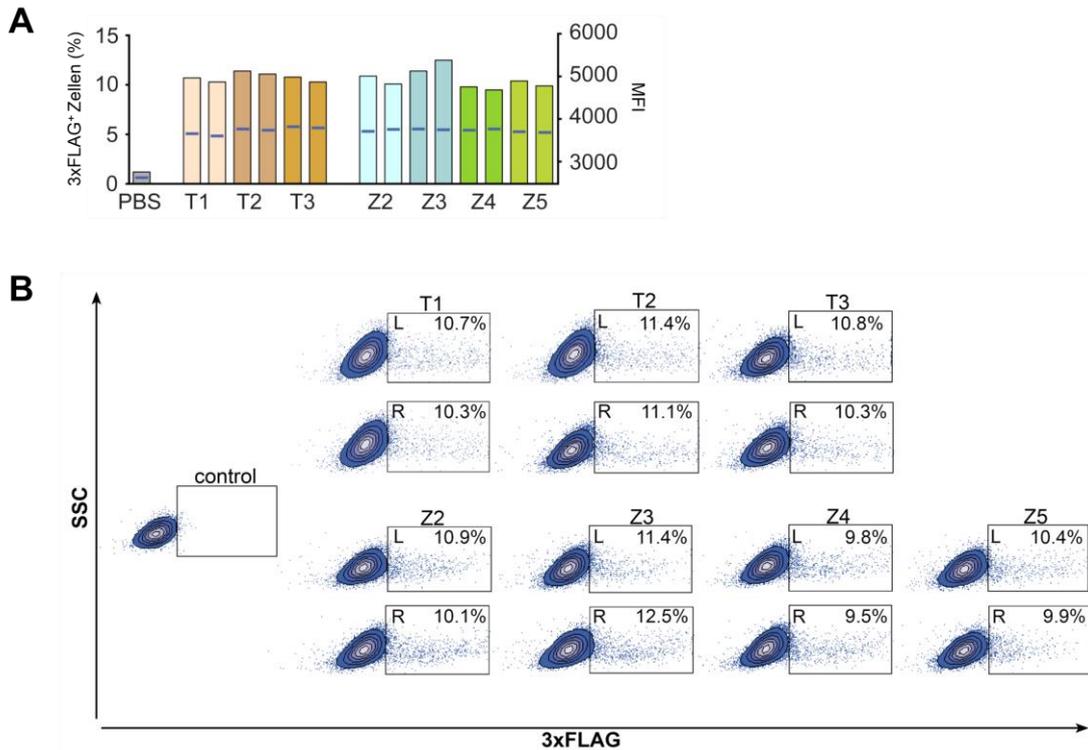
den Einbau chemisch modifizierter Nukleoside in die mRNA können Immunantworten weitestgehend vermieden werden, da diese natürlich vorkommende Nukleinsäuren nachahmen und so RNA-Sensoren für deren Abbau inaktiv bleiben. (3) Die transiente Nuklease-Expression vermindert zudem das Risiko viral-bedingter Mutationen und kann ebenfalls (4) die Gefahr für die Bildung neutralisierender Antikörper gegenüber viralen Vektoren reduzieren. (5) Die Eigenschaft von IVT mRNA, effektiv innerhalb der Zelle bzw. des Zellkerns exprimiert zu werden, ist zusätzlich dessen strukturellem Aufbau geschuldet. Durch die Modifikation des 5'-Caps (wie bspw. ARCA) sowie des 3'-Poly(A)-Schwanzes kann ebenfalls die Expressionsdauer sowie die Translationseffizienz gesteigert werden ¹¹⁹. Zusammen mit speziell beschichteten NPs, welche den optimalen Transfer in das Zielgewebe gewährleisten, kann so eine effektive und sichere Genmanipulation auch auf andere Krankheitsfelder übertragen werden und bietet somit eine vielversprechende und vor allem Risiko-minimierte Alternative für die kurative, gentherapeutische Behandlung, wie beispielsweise der Cystischen Fibrose, der β -Thalassämie oder Krebs-bedingten Erkrankungen.

5. Anhang

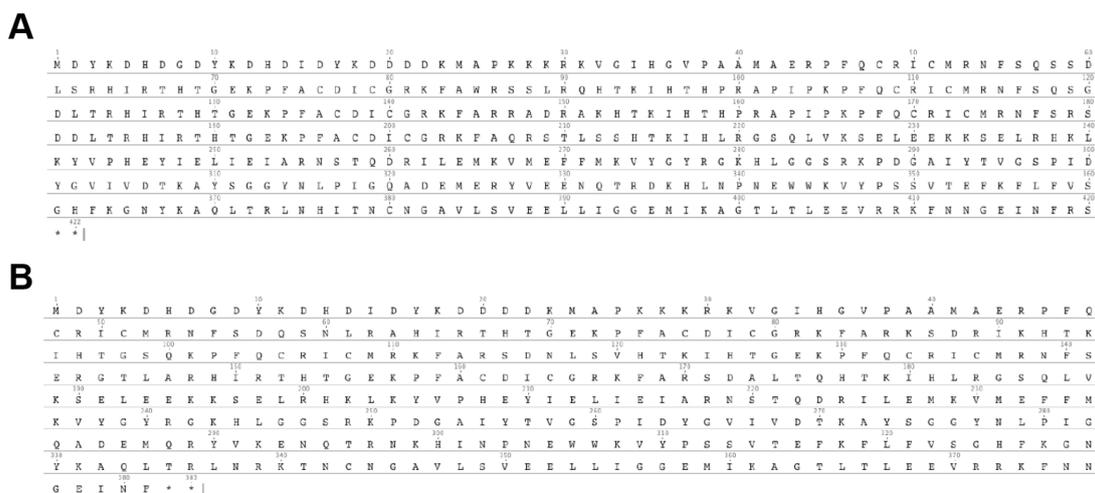
5.1 Abbildungen



Anh. 5.1: *Dual Luciferase Single Strand Assay (DLSSA)*. Im DLSSA wurden 15 TALEN- und 36 ZFN-Paare auf ihre Schnitt-Effizienz getestet und für die Auswertung das Verhältnis von *Firefly*-Luciferase-Aktivität zu *Renilla*-Luciferase-Aktivität als Luciferase Ratio dargestellt.



Anh. 5.2: Expression von 3xFLAG-markierten TALENs und ZFNs in MLE12-Zellen. (A) MLE12-Zellen (murine AT-II Zellen) wurden mit je 1 µg ZFN- oder TALEN-pDNA transfiziert (linker Balken = linke TALEN, rechter Balken = rechte TALEN) bzw. als Kontrolle untransfiziert gelassen. Nach 24 h wurde die Expression mittels Durchflusszytometrie gemessen. Gezeigt ist die Transfektionseffizienz (% 3xFLAG Expression, linke y-Achse) und die mediane Fluoreszenzintensität (MFI, rechte y-Achse, blaue Linien) aus drei gepoolten Proben. (B) Repräsentative FACS Dot-Plots von 3xFLAG-exprimierenden MLE12-Zellen. MLE12-Zellen wurden hierfür mit Plasmid-kodierenden TALEN- (T1, T2, T3) und ZFN- (Z2, Z3, Z4, Z5) Nukleasen transfiziert. L = linker Arm, R = rechter Arm. Alle Assays wurden in Triplikaten durchgeführt.

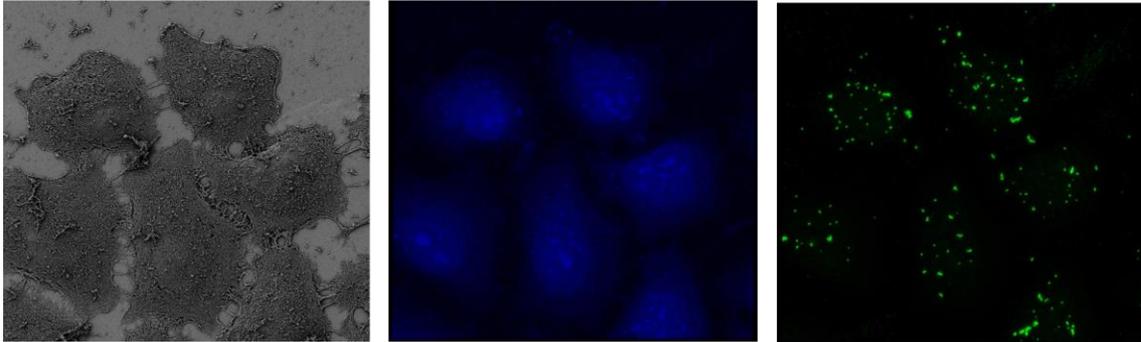


Anh. 5.3: Z3 Aminosäure-Sequenz. Aminosäure-Sequenz von 3xFLAG-markiertem (A) linkem Z3-Arm und (B) rechtem Z3-Arm

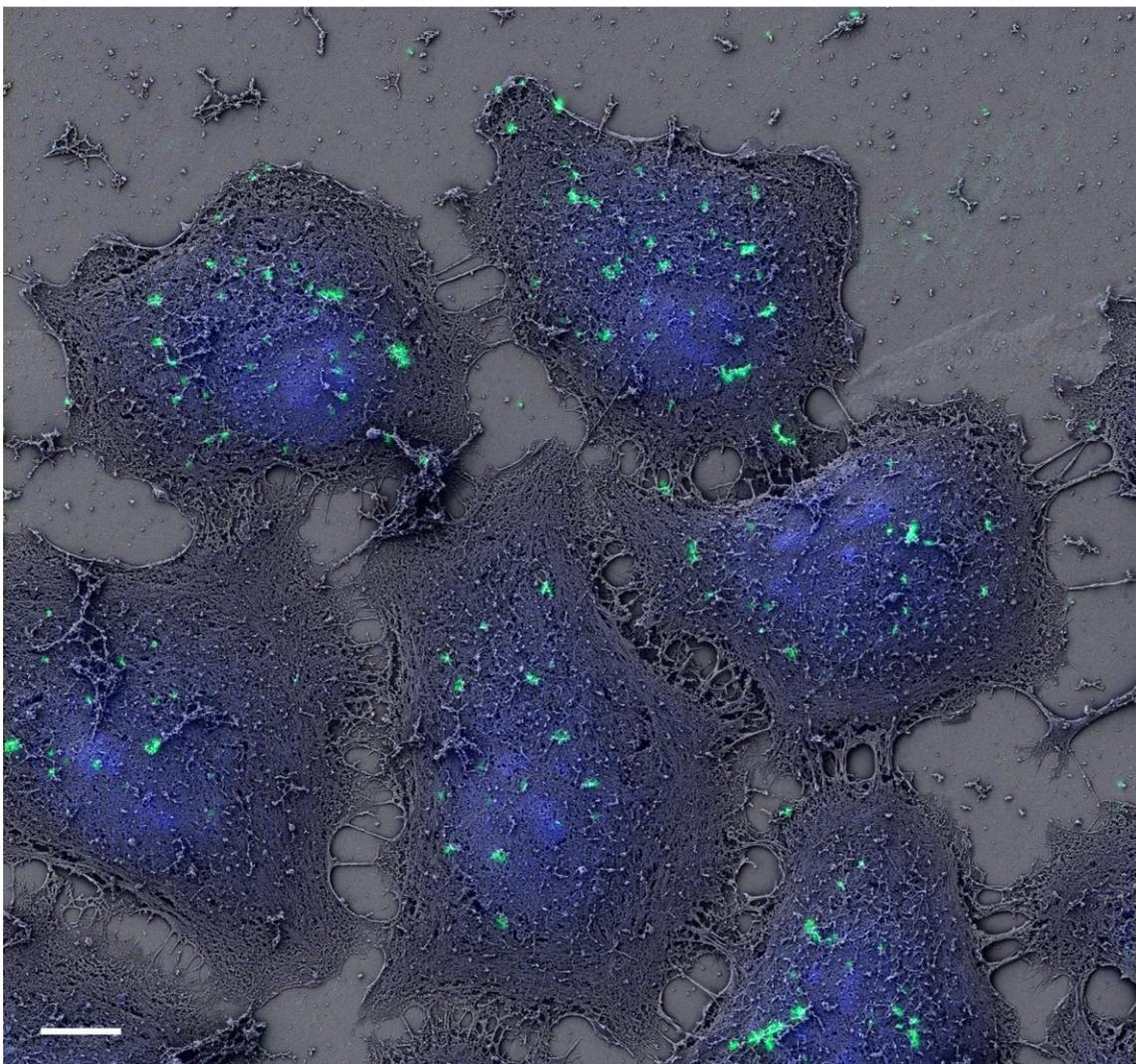
REM

DAPI

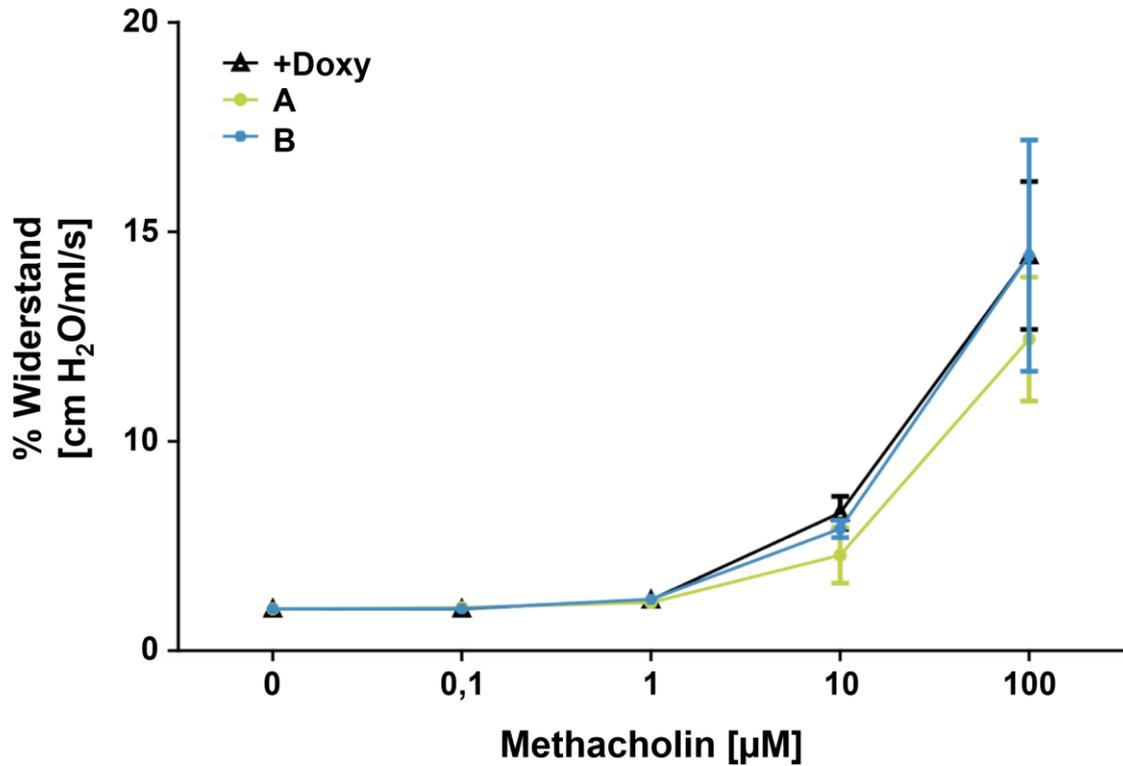
3xFLAG FITC



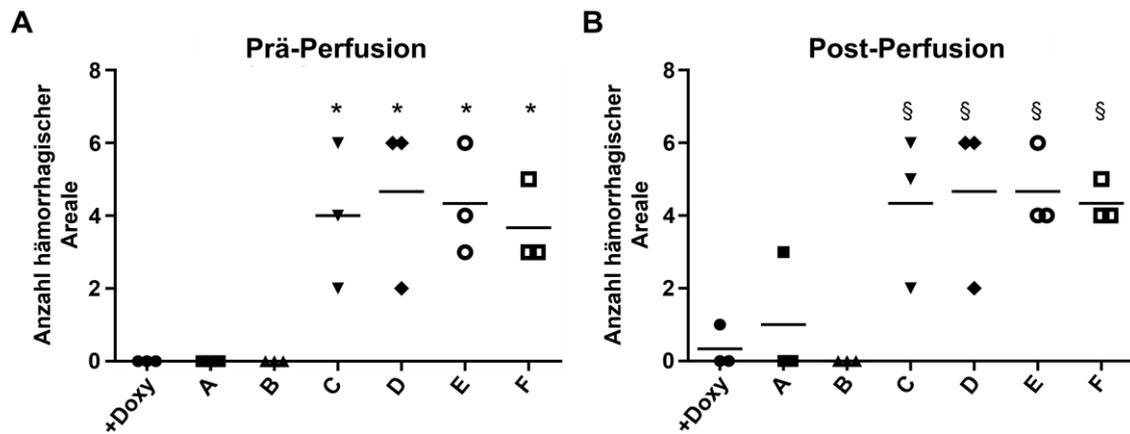
Korrelative Aufnahme



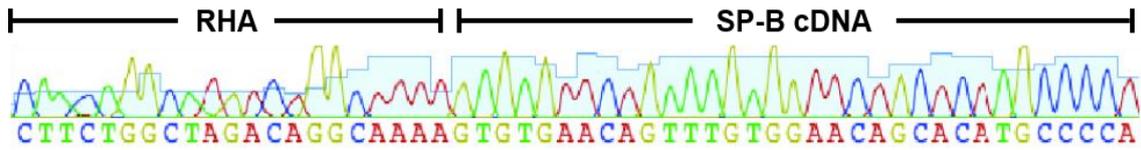
Anh. 5.4: Korrelative mikroskopische Aufnahme Z3 mRNA-transfizierte A549-Zellen. Die Überlagerung mehrerer unabhängiger Fluoreszenzmikroskopischer (DAPI und FITC) sowie Rasterelektronenmikroskopischer (REM) Aufnahmen, erlaubt die genaue Lokalisation 3xFLAG-markierter Z3-Nukleasen im Zellkern. Maßstab, 10 μ m.



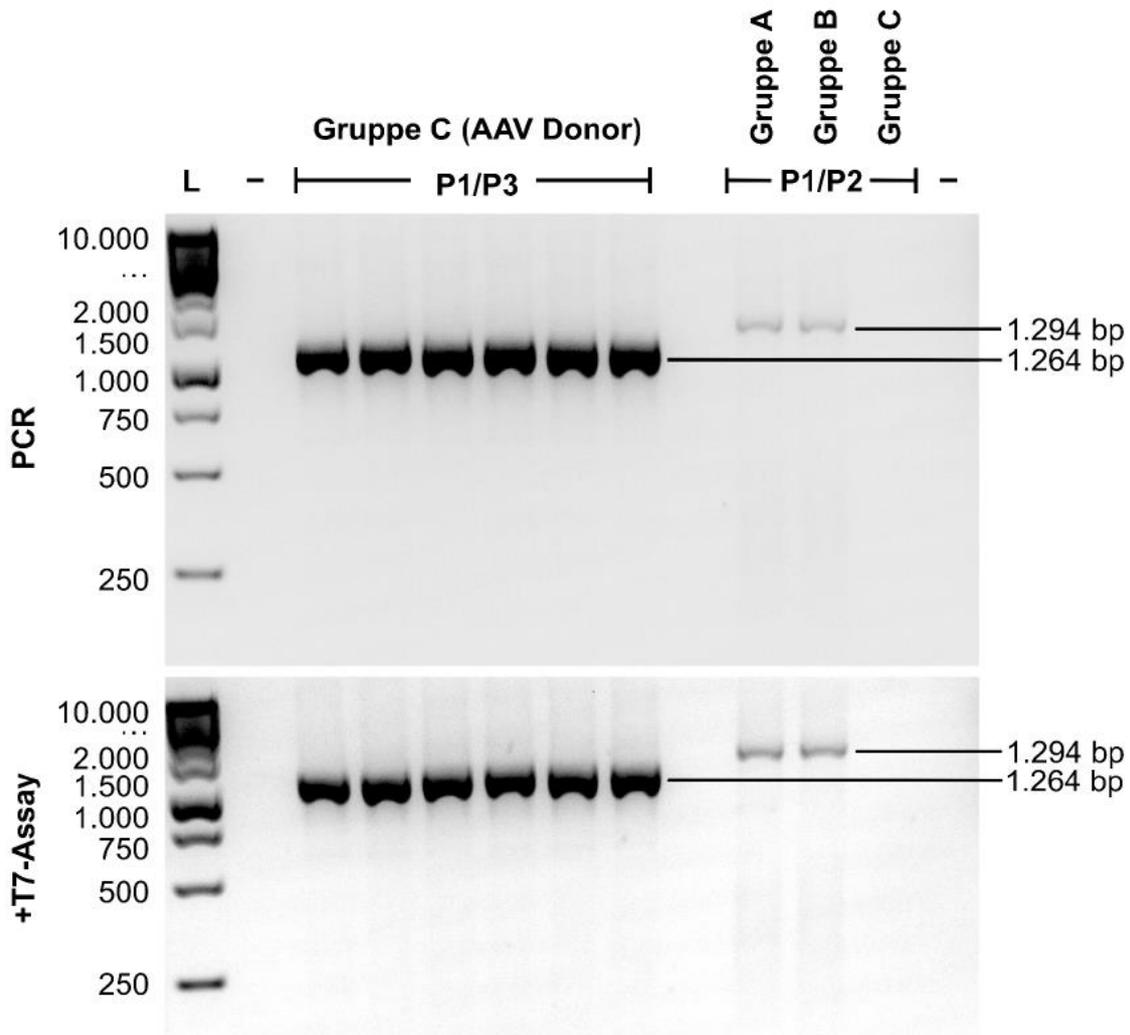
Anh. 5.5: Widerstand der Lungen nach Gen-Manipulation transgener SP-B Mäuse. Der Widerstand wurde in Bezug auf die durchschnittlich erhaltenen Werten nach Ende jeder Perfusion zu den Werten nach jeder Auswasch-Periode der Positivkontrollen (+Doxy) bzw. der Hauptgruppen A und B gesetzt. Dabei wurde Methacholin in ansteigenden Konzentrationen verabreicht, um die bronchiale Hyperreaktivität zu messen (n = 3 pro Gruppe).



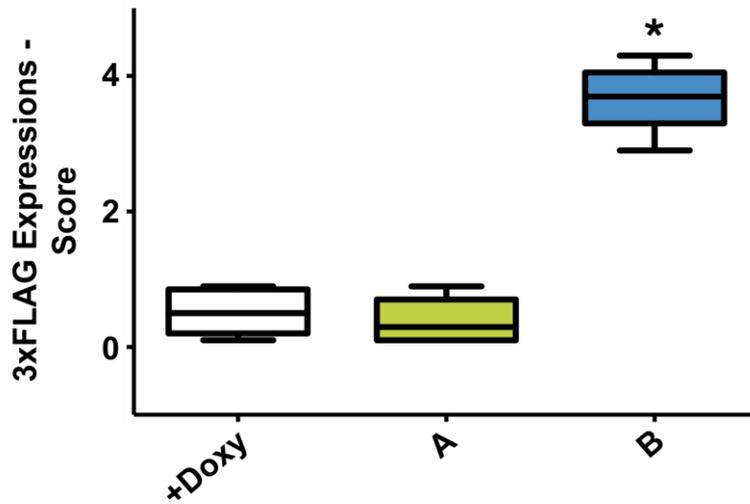
Anh. 5.6: Vergleich der hämorrhagischen Lungenareale (semiquantitative Analyse der Daten aus Anh. 4.5 und Abb. 3.13). Sofern die linke Lunge eine partielle Hämorrhagie zeigte, wurde dies als „1“ gewertet. Wenn mehr als die Hälfte des Lungenflügels betroffen war, wurde dies als „2“ gewertet. Dem rechten Lungenflügel (bestehend aus 4 Lungenlappen) wurde für Anzeichen hämorrhagischer Areale je Lappen die Zahl „1“ zugewiesen. Insgesamt konnte somit ein Maximalwert von „6“ erreicht werden. Linien repräsentieren den durchschnittlichen Wert der untersuchten Lungen (n = 3 je Gruppe). (A) Anzahl hämorrhagischer Areale vor Perfusion und (B) nach Perfusion. *, $P < 0,05$ versus Doxy-Kontrolle (+Doxy) sowie Gruppen A und B. §, $P < 0,05$ versus Doxy-Kontrolle und Gruppe B. Mann-Whitney Test, zweiseitig mit asymptotischer Signifikanz.



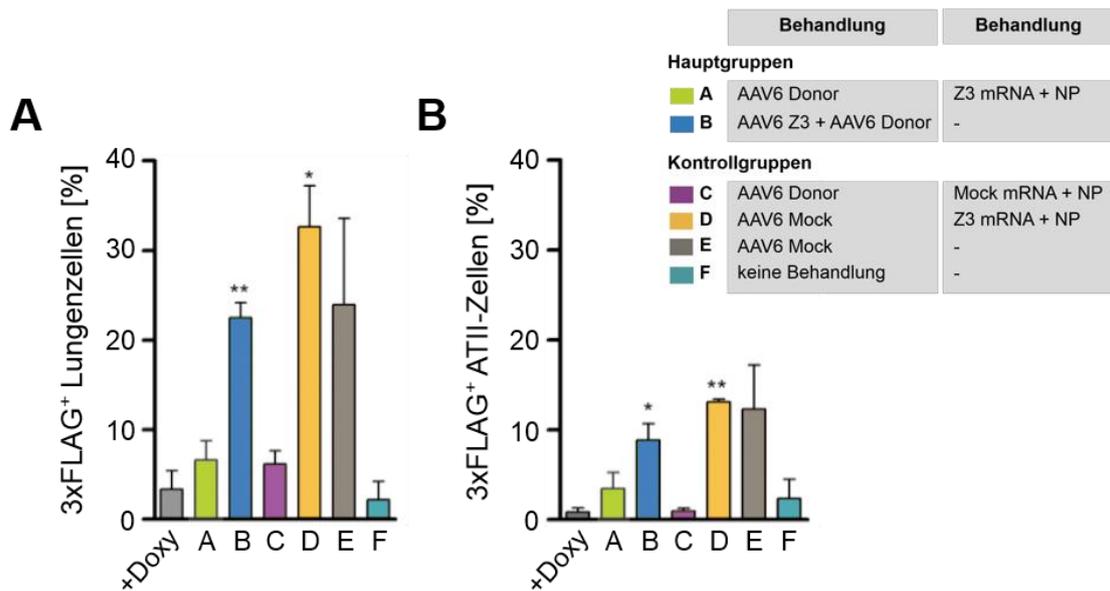
Anh. 5.7: Sequenzierung der Zielsequenz. Dazu wurden AT-II-Zellen innerhalb der Gruppen (A – F) gepoolt, die DNA isoliert und PCR-Amplifikate (P1/P2) in TOPO-Vektoren kloniert. Die Amplifikate wurden anschließend sequenziert. Die korrekte Integration der Zielsequenz wurde durch den nahtlosen Übergang zwischen rechtem Homologiearm (RHA) und SP-B cDNA verifiziert. Diese war positiv für PCR-Sequenzen der Gruppe A und B.



Anh. 5.8 PCR und T7-Assay von DNA-Proben der Gruppe C. Die Behandlung transgener SP-B-Mäuse mit dem AAV-Donor-Template führte zu keiner zufälligen Integration des CAG-Promoters, wie die Abwesenheit jeglicher Sekundärbanden beweist. Für die P1/P2-PCR wurde die DNA jeweils gepoolt (n = 6). L, DNA-Leiter; (-), Negativ-Kontrollen ohne DNA-Template.



Anh. 5.9: 3xFLAG Expressions-Score. Semiquantitative Analyse der Immunfluoreszenzaufnahmen aus Abb. 3.18. Boxen repräsentieren Mediane \pm IQRs (Interquartilsabstände), Whisker die Minima und Maxima. $n = 6$ pro Gruppe. *, $P < 0,05$ versus Kontrollgruppe (+Doxy) und Gruppe A.



Anh. 5.10: 3xFLAG-Exprssion in (A) Lungenzellen und (B) AT-II-Zellen. SP-B Mäusen ($n = 2 - 6$) wurden nach entsprechender Behandlung die Lungen entnommen, diese verdaut und die Lungenzellen isoliert und entsprechend dem Zelltyp für die anschließende FACS-Analyse markiert. * $P < 0,05$ versus Kontrollgruppe (+Doxy); ** $P < 0,01$ versus Kontrollgruppe (+Doxy).

5.2 Sequenzen – SP-B Kasette, mRNA-*Templates* und AAVs

SP-B Locus (die unterlegte Sequenz ist nicht mehr vorhanden, sobald die transgene Integration erfolgt ist)

rot = Bindungsstellen T1 (links und rechts)
grün = Bindungsstelle Z3 (links und rechts)
grau = tetO
orange = CMV mininaml promoter
blau = SP-B cDNA
„X“ = unbekannte Nukleotide

```
CCTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCC
CTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGA
AAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTT
TACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGT
GATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAA
GTCGAGCTCGGTACCCGGGTTCGAGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCA
GAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTG
CATAGAAGACACCCGGACCGATCCAGCCTCCGGCCCGCCAATTCTGCAGATATCCAG
CACAGTGGCGGCCGCTAGGCAGCCATGGCCAAGTCGCACCTACTGCAGTGGCTACTG
CTGCTTCTACCTCTGCTGCCAGGTGCAGCTATCACGTCCGCCCTCATCCCTGGAGT
GTGCACAAGGCCCTCAATTCTGGTGCCAAAGCCTGGAGCATGCAGTGCAGTGCAGAGC
CCTGGGGCACTGCCTGCAGGAAGTCTGGGGGCATGCAGGAGCTAATGACCTGTGCCA
AGAGTGTGAGGATATTGTCCACCTCCTCACAAAGATGACCAAGGAAGATGCTTTCCAGG
AAGCAATCCGGAAGTTCCCTGGAACAAGAATGTGATATCCTTCCCTTGAAGCTGCTTGTG
CCCCGGTGTGCGCAAGTGCTTGATGCTACCTGCCCTGGTTATTGACTACTTCCAGAG
CCAGATTAACCCCAAAGCCATCTGCAATCATGTGGCCCTGTGCCACGTGGGCAGGCT
AAGCCAGAACAGAATCCAGGGATGCCGGATGCCGTTCCAAACCTCTGCTGGACAAGC
TGGTCCCTCCCTGTGCTGCCAGGAGCCCTCTTGGCAAGGCCTGGGCCTCACACTCAGGA
CTTCTCTGAGCAACAGCTCCCCATTCCCTGCCCTTCTGCTGGCTTTGCAGAACTCTGA
TCAAGCGGGTTCAAGCCGTGATCCCCAAGGGTGTGCTGGCTGTGGCTGTGTCCAGGT
GTGCCACGTGGTACCCCTGGTGGTGGGTGGCATCTGCCAGTGCCTGGCTGAGCGCTA
CACAGTTCTCCTGCTAGACGCACCTGCTGGGCCGTGTGGTGGCCAGCTAGTCTGTGGC
CTTGTCTCCGATGTTCCACTGAGGATGCCATGGGCCCTGCCCTCCCTGCTGTGGAGC
CTCTGATAGAAGAATGGCCACTACAGGACACTGAGTGCCATTTCTGCAAGTCTGTGATC
AACCAGGCCTGGAACACCAGTGAACAGGCTATGCCACAGGCAATGCACCAGGCCTGCC
TTCGCTTCTGGCTAGACAGGCAAAAGTGTGAACAGTTTGTGGAACAGCACATGCCCCAG
CTGCTGGCCCTGGTGCCTAGGAGCCAGGATGCCACATCACCTGCCAGGCCCTTGGC
GTATGTGAGGCCCGGCTAGCCCTCTGCAGTCGTTCCAAACCCACACCTCTGAXXXX
XTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCC
```

Transgene SP-B Kasette nach Einbau in den SP-B Locus (unterstrichen ist der CAG-Promoter, farblich markiert seine einzelnen Elemente

- orange = CMV IE Enhancer,
- braun = CB Promoter,
- violett = pCI Part;
- grün = P3 (Z3 for),
- blau = P1 (Z3 rev)
- rot = P2 (CAG for)

CCTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTC
CCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGA
AAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTT
TACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGT
GATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAA
GTCGAGCTCGGTACCCGGGTCGAGGTAGGCG **TGTACGGTGGGAGGCCAT**ATAAGCA
GAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTC
CATAGAAGACACCGGGCTAGCGGATCCTCTAGAACTATAG **CTAGTCGACATTGATTATT**
GACTAGTTAATAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT
CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGC
CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGA
CGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA
TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATG
CCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCG
CTATTACCATGTCGAGGCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCAC
CCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTTTGTGCAGCGATGGGGGGCGGGGGGGG
GGGGCGCGCGCCAGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGCGG
AGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGC
GAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCGGGAGCAA
GCITTTATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAAGTCAGTGCTTCTGACACAA
CAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTCTGT **AGGCACTCGGCAGCTAGCT TCAA**
GGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGA
CTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTCTCTCC
ACAGGTGTCCACTCCAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAGTACTTAATACGACTCA
CTATAGGCTAGCCTCGAGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGCCGGCCGCTAGGCAG
CCATGGCCAAGTCGCACCTACTGCAGTGGCTACTGCTGCTTCTACCTCTGCTGCCC
AGGTGCAGCTATCACGTCGGCCTCATCCCTGGAGTGTGCACAAGGCCCTCAATTCTGG
TGCCAAAGCCTGGAGCATGCAGTGCAGTGCAGAGCCCTGGGGCACTGCCTGCAGGAA
GTCTGGGGGCATGCAGGAGCTAATGACCTGTGCCAAGAGTGTGAGGATATTGTCCACC
TCCTCACAAAGATGACCAAGGAAGATGCTTTCAGGAAGCAATCCGGAAGTTCTTGAA
CAAGAATGTGATATCCTTCCCTTGAAGCTGCTTGTGCCCGGTGTGCCAAGTGCITGA
TGTCTACCTGCCCTGGTTATTGACTACTTCCAGAGCCAGATTAACCCCAAAGCCATCT
GCAATCATGTGGCCTGTGCCACGTGGGCAGGCTAAGCCAGAACAGAATCCAGGGAT
GCCGGATGCCGTTCCAAACCCCTCTGCTGGACAAGCTGGTCCCTCCCTGTGCTGCCAGGA
GCCCTCTTGGCAAGGCCCTGGGCTCACACTCAGGACTTCTCTGAGCAACAGCTCCCCA
TTCCCTGCCCCTTCTGCTGGCTTTGCAGAACTCTGATCAAGCGGGTTCAAGCCGTGATC
CCCAAGGGTGTGCTGGCTGTGGCTGTGTCCCAGGTGTGCCACGTGGTACCCCTGGTG
GTGGGTGGCATCTGCCAGTGCCCTGGCTGAGCGCTACACAGTTCTCCTGCTAGACGCAC
TGCTGGGCCGTGTGGTCCCCAGCTAGTCTGTGGCCTTGTCTCCGATGTTCCACTGA
GGATGCCATGGGCCCTGCCCTCCCTGCTGTGGAGCCTCTGATAGAAGAATGGCCACTA
CAGGACACTGAGTGCCATTTCTGCAAGTCTGTGATCAACCAGGCCTGGAACACCAGTG
AACAGGCTATGCCACAGGCAATGCACCAGGCCTGCCTTCGCTTCTGGCTAGACAGGCA
AAAGTGTGAACAGTTTGTGGAACAGCACATGCCCCAGCTGCTGGCCCTGGTGCCTAGG
AGCCAGGATGC **CCACATCACCTGCCAGG**CCCTTGGCGTATGTGAGGCCCCGGCTAGC
CCTCTGCAGTCGTTCCAAACCCACACCTCTGAXXXXXTCTAGAGGGCCCCGTTAAACC

CGCTGATCAGCC

pVAX.102425.A120 (T1 links)

GACTCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTA
ATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATA
ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCA
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGT
GGACTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACAT
GACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
GGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGA
TTTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACG
GGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT
GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTA
CTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAA
ACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATAGCTCTCTG
GCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGA
GAGCCAAGCTGACTAGCGTTTTAAACTTAAGCTGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAIT
CGCCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGG
ATGACGATGACAAGATGGCCCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTCGGCATCCACGGGGTAC
CTATGGTGGACTTGAGGACACTCGGTTATTTCGCAACAGCAACAGGAGAAAATCAAGCCT
AAGGTCAGGAGCACCGTTCGCGCAACACCACGAGGCGCTTGTGGGGCATGGCTTCACT
CATGCGCATATTGTCGCGCTTTTACAGCACCTTGC GGCGCTTGGGACGGTGGCTGTCA
AATACCAAGATATGATTGCGGCCCTGCCGAAGCCACGCACGAGGCAATTGTAGGGGT
CGGTAACAGTGGTTCGGGAGCGCGAGCACITGAGGCGCTGCTGACTGTGGCGGGTGA
GCTTAGGGGGCCTCCGCTCCAGCTCGACACCGGGCAGCTGCTGAAGATCGCGAAGAG
AGGGGGAGTAACAGCGGTAGAGGCAGTGCACGCCTGGCGCAATGCGCTCACCGGGGC
CCCCTTGAACCTGACCCAGACCAGGTAGTCGCAATCGCGTCGAATGGCGGGGGAAAGC
AAGCCCTGGAAACCGTGCAAAGGTTGTTGCCGGTCCTTTGTCAAGACCACGGCCTT
ACACCGGATCAAGTCGTGGCCATTGCAAATAATAACGGTGGCAAACAGGCTCTTGAGAC
GGTTCAGAGACTTCTCCAGTTCTCTGTCAAGCCCACGGGCTGACTCCCGATCAAGTTG
TAGCGATTGCGAGCAACATCGGAGGGAAACAAGCATTGGAGACTGTCCAACGGCTCCT
TCCCGTGTGTTGTGTC AAGCCCACGGTTTGACGCCTGCACAAGTGGTTCGCCATCGCCTCC
CACGACGGCGGTAAGCAGGCGCTGGAAACAGTACAGCGCCTGCTGCCTGTACTGTGC
CAGGATCATGGACTACCCAGACCAGGTAGTCGCAATCGCGTTCGCATGACGGGGGAA
AGCAAGCCCTGGAAACCGTGCAAAGGTTGTTGCCGGTCCTTTGTCAAGACCACGGCCT
TACACCGGAGCAAGTCGTGGCCATTGCATCAAACGGAGGTGGCAAACAGGCTCTTGAG
ACGGTTCAGAGACTTCTCCAGTTCTCTGTCAAGCCCACGGGCTGACTCCCGATCAAGT
TGTAGCGATTGCGAGCCATGATGGAGGGAAACAAGCATTGGAGACTGTCCAACGGCTC
CTTCCCGTGTGTTGTCAAGCCCACGGTTTGACGCCTGCACAAGTGGTTCGCCATCGACT
CCCACGACGGCGGTAAGCAGGCGCTGGAAACAGTACAGCGCCTGCTGCCTGTACTGT
GCCAGGATCATGGGCTGACCCAGACCAGGTAGTCGCAATCGCGTCGAACATTGGGG
GAAAGCAAGCCCTGGAAACCGTGCAAAGGTTGTTGCCGGTCCTTTGTCAAGACCACGG
CCTTACACCGGAGCAAGTCGTGGCCATTGCATCAAACGGAGGTGGCAAACAGGCTCTT
GAGACGGTTCAGAGACTTCTCCAGTTCTCTGTCAAGCCCACGGGCTGACTCCCGATC
AAGTTGTAGCGATTGCGAGCAACATCGGAGGGAAACAAGCATTGGAGACTGTCCAACG
GCTCCTTCCCGTGTGTTGTGTC AAGCCCACGGTTTGACGCCTGCACAAGTGGTTCGCCATC
GCCAACAACAACGGCGGTAAGCAGGCGCTGGAAACAGTACAGCGCCTGCTGCCTGTAC
TGTGCCAGGATCATGGTTTTGACCCAGACCAGGTAGTCGCAATCGCGTCGAACATTGG
GGGAAAGCAAGCCCTGGAAACCGTGCAAAGGTTGTTGCCGGTCCTTTGTCAAGACCAC

GGCCTTACACCGGAGCAAGTCGTGGCCATTGCATCAAATATCGGTGGCAAACAGGCTC
TTGAGACGGTTCAGAGACTTCTCCCAGTTCTCTGTCAAGCCCACGGGCTGACTCCCGAT
CAAGTTGTAGCGATTGCGAATAACAATGGAGGGAAACAAGCATTGGAGACTGTCCAACG
GCTCCTTCCCGTGTGTGTCAAGCCCACGGTGTGACGCCTGCACAAGTGGTCGCCATC
GCCTCCAATATTGGCGGTAAGCAGGCGCTGGAAACAGTACAGCGCCTGCTGCCTGTAC
TGTGCCAGGATCATGGCCTGACACCCGAACAGGTGGTCGCCATTGCTAGCCACGATGG
AGGACGGCCAGCCTTGGAGTCCATCGTAGCCCAATTGTCCAGGCCCGATCCCGCGTTG
GCTGCGTTAACGGGATCCCAGCTGGTGAAGAGCGAGCTGGAGGAGAAGAAGTCCGAG
CTGCGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCA
GGAACAGCACCCAGGACCCGCATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGT
GTACGGCTACAGGGGAAAGCACCTGGGCGGAAGCAGAAAAGCCTGACGGCGCCATCTA
TACAGTGGGCAGCCCCATCGATTACGGCGTGTATCGTGGACACAAAGGCCTACAGCGGC
GGCTACAATCTGCCTATCGGCCAGGCCGACGAGATGGAGAGATACGTGGAGGAGAAC
CAGACCCGGGATAAGCACCTCAACCCCAACGAGTGGTGGAAAGGTGTACCCTAGCAGCG
TGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCTGTGAGCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCCA
GCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAATGGCGCCGTGCTGAGCGTGGAGGA
GCTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAAGCCGGCACCCCTGACACTGGAGGAGGTGCG
GCGCAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCAGATCTTGATAACTCGAGCTAATTCTGC
AGAA
AA
AAAAGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTG
CCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCITCCTTGACCCTGGAAG
GTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA
GGTGTCTATTCTTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTTGGG
AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTACTGGGCGGTT
TTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTGGGA
AGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTTCCTCGCCGCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGA
TCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATT
GCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAA
CAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGCCCG
GTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAG
CGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTG
TCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCC
TGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGC
TGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGA
GCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAG
CATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGAC
GGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAA
ATGGCCGCTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCA
GGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGAC
CGTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCG
CCTTCTTGACGAGTTCCTCTGAATTAATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTCTC
CTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTG
CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAAATACATTCAAAATATGTATCCGCTCATGAGAC
AATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGCTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAG
GATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAACGTGAGTTTT
GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTT
TCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTT
TGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAG
ATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTA
GCACCGCCTACATAACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCG
ATAAGTCGTGTCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACC GGATAAGGCGCAGCG
GTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACAC
CGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA
AAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA
GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTCGCCACCTCTGAC

TTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAG
CAACGCGCCTTTTACGGTTCTGGGCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTT

pVAX.102427.A120 (T1 rechts)

GACTCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTA
ATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATA
ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCA
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGT
GGACTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACAT
GACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
GGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGA
TTTCCAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACG
GGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT
GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTA
CTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAA
ACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTAGCTCTCTG
GCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGA
GAGCCAAGCTGACTAGCGTTTAAACTTAAGCTGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAAT
CGCTAGAGATCTGGCGGGGAGAGGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACCTGCGGTGACGT
GGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGACCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAA
GATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGATGGCCCCAAGAAGAAGAGGA
AGGTCGGCATTTCATGGGGTACCTATGGTGGACTTGAGGACACTCGGTTATTCGCAACA
GCAACAGGAGAAAATCAAGCCTAAGGTCAGGAGCACCGTCGCGCAACACCACGAGGC
GCTTGTGGGGCATGGCTTCACTCATGCGCATATTGTTCGCGCTTTCACAGCACCCCTGCG
GCGCTTGGGACGGTGGCTGTCAAATACCAAGATATGATTGCGGCCCTGCCGAAGCCA
CGCACGAGGCAATTGTAGGGGTTCGGTAAACAGTGGTTCGGGAGCGCGAGCACTTGAGG
CGCTGCTGACTGTGGCGGGTGGAGCTTAGGGGGCCTCCGCTCCAGCTCGACACCGGGC
AGCTGCTGAAGATCGCGAAGAGAGGGGGAGTAACAGCGGTAGAGGCAGTGCACGCCT
GGCGCAATGCGCTCACCGGGGCCCTTGAACCTGACCCAGACCAGGTAGTCGCAA
TCGCGTTCGCATGACGGGGGAAAGCAAGCCCTGGAAACCGTGCAAAGGTTGTTGCCGG
TCTTTGTCAAGACCACGGCCTTACACCGGATCAAGTCGTGGCCATTGCAAATAATAAC
GGTGGCAAACAGGCTCTTGAAGACGGTTCAGAGACTTCTCCAGTTCTCTGTCAAGCCCA
CGGGCTGACTCCCGATCAAGTTGTAGCGATTGCGAATAACAATGGAGGGAAACAAGCAT
TGGAGACTGTCCAACGGCTCCTTCCCGTGTGTGTCAAGCCACGGTTTGACGCCTG
CACAAGTGGTCGCCATCGCCAACAACAACGGCGGTAAGCAGGCGCTGGAAACAGTACA
GCGCCTGCTGCTGTACTGTGCCAGGATCATGGACTCACCCAGACCAGGTAGTCGCA
ATCGCCAACAATAACGGGGGAAAGCAAGCCCTGGAAACCGTGCAAAGGTTGTTGCCGG
TCCTTTGTCAAGACCACGGCCTTACACCGGAGCAAGTCGTGGCCATTGCATCACATGAC
GGTGGCAAACAGGCTCTTGAAGACGGTTCAGAGACTTCTCCAGTTCTCTGTCAAGCCCA
CGGGCTGACTCCCGATCAAGTTGTAGCGATTGCGAGCCATGATGGAGGGAAACAAGCA
TTGGAGACTGTCCAACGGCTCCTTCCCGTGTGTGTCAAGCCACGGTTTGACGCCTG
CACAAGTGGTCGCCATCGCCAACAACAACGGCGGTAAGCAGGCGCTGGAAACAGTACA
GCGCCTGCTGCTGTACTGTGCCAGGATCATGGGCTGACCCAGACCAGGTAGTCGCA
ATCGCGTCGCATGACGGGGGAAAGCAAGCCCTGGAAACCGTGCAAAGGTTGTTGCCG
GTCCTTTGTCAAGACCACGGCCTTACACCGGATCAAGTCGTGGCCATTGCAAATAATAA
CGGTGGCAAACAGGCTCTTGAAGACGGTTCAGAGACTTCTCCAGTTCTCTGTCAAGCC
CACGGGCTGACTCCCGATCAAGTTGTAGCGATTGCGAATAACAATGGAGGGAAACAAG
CATTGGAGACTGTCCAACGGCTCCTTCCCGTGTGTGTCAAGCCACGGTTTGACGCCT
GCACAAGTGGTCGCCATCGCCTCCAATATTGGCGGTAAGCAGGCGCTGGAAACAGTAC

AGCGCCTGCTGCCTGTACTGTGCCAGGATCATGGTTTGACCCCAGACCAGGTAGTCGC
AATCGCCAACAATAACGGGGGAAAGCAAGCCCTGGAAACCGTGCAAAGGTTGTTGCAG
GTCCTTTGTCAAGACCACGGCCTTACACCCGGATCAAGTCGTGGCCATTGCAAATAATAA
CGGTGGCAAACAGGCTCTTGAGACGGTTCAGAGACTTCTCCAGTTCTCTGTCAAGCC
CACGGGCTGACTCCCATCAAGTTGTAGCGATTGCGAGCCATGATGGAGGGAAACAAG
CATTGGAGACTGTCCAACGGCTCCTTCCCCTGTTGTGTCAAGCCCACGGTTTGACGCCT
GCACAAGTGGTGCCTATCGCCTCCAACGGTGGCGGTAAGCAGGCGCTGGAAACAGTA
CAGCGCCTGCTGCCTGTACTGTGCCAGGATCATGGCCTGACACCCGAACAGGTGGTGC
CCATTGCTAGCAATAAAGGAGGACGGCCAGCCTTGGAGTCCATCGTAGCCCAATTGTC
CAGGCCCGATCCCGCTGGCTGCGTTAACGGGATCCCAGCTGGTGAAGAGCGAGCT
GGAGGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACAT
CGAGCTGATCGAGATCGCCAGGAACAGCACCCAGGACCGCATCCTGGAGATGAAGGT
GATGGAGTTCTTATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGAAAGCACCTGGGCGGAAGCAGA
AAGCCTGACGGCGCCATCTATACAGTGGGCAGCCCCATCGATTACGGCGTGATCGTGG
ACACAAAGGCCTACAGCGGCGGCTACAATCTGCCTATCGGCCAGGCCGACGAGATGCA
GAGATACGTGAAGGAGAACCAGACCCGGAATAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGG
AAGGTGTACCCTAGCAGCGTGACCGAGTTCAGGTTCTGTTCTGTGAGCGGCCACTTCA
AGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCGCAAACCAACTGCAATGGCGC
CGTGCTGAGCGTGGAGGAGCTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAAGCCGGCACCCCT
GACACTGGAGGAGGTGCGGCGCAAGTTCACAACCGGCGAGATCAACTTCTGATAACTC
GAGCTAATTCTGCAGAAA
AAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATC
AGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTGTTGCCCCCTCCCCCTGCCTTCC
TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATGTCATCG
CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGG
GGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTT
CTACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCAGGAAATGCCAGCTGGGGCGCCCTCT
GGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTCGCCGCAAGGATCT
GATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGAT
TGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGC
TATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAG
CGCAGGGGCGCCCGTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACT
GCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGC
TGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCG
GGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGA
TGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTCCACCACCAAGCG
AAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTIONCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATG
ATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGG
CGAGCATGCCCCACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAAT
ATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTG
GCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCG
GCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCG
CATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCCTCTGAATTAATTAACGCTTACAATTTCTG
ATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACAGGTGGCACT
TTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTAATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGT
ATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGCTAAAACTTC
ATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCC
TTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTT
CTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTAC
CAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGC
TTCAGCAGAGCGCAGATAACAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCA
CTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGG
CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACC
GGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCCAGCTTGA
CGAACGACCTACACCGAACTGAGATACTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACG

CTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGA
GAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGGGT
TTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCT
ATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGGCTTTTGTGGCCTTTTG
CTCACATGTTCTT

pVAX.38558.A120 (Z3 links)

GACTCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTA
ATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATA
ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCA
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGT
GGACTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACAT
GACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
GGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGGA
TTTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACG
GGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT
GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCITA
CTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAA
ACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTAATTCGCCT
AGAGATCTGGCGGCGGAGAGGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACCTGCGGTGACGTGGAGG
AGAATCCCGGCCCTAGGACCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGAATTATAAAGATCAT
GACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGATGGCCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGCG
GCATTCATGGGGTACCCGCCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCAT
GCGTAACTTCAGTGACCAGTCCAACCTGCGCGCCACATCCGCACCCACACCGGCGAG
AAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCCGCAAGTCCGACCGCATCAA
GCATACCAAGATACACACGGGCAGCCAAAAGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCGT
AAGTTTTGCCGCTCCGACAACCTGTCCGTGCATACCAAGATACACACGGGCGAGAAGC
CCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCGTAACTTCAGTGAGCGCGGCACCCTGGCCCCCA
CATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTT
GCCCGCTCCGACGCCCTGACCCAGCATACCAAGATACACCTGCGGGGATCCAGCTG
GTGAAGAGCGAGCTGGAGGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGAAGTACGTG
CCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCAGGAACAGCACCCAGGACCGCATCC
TGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGAAAGCACCT
GGGCGGAAGCAGAAAGCCTGACGGCGCCATCTATACAGTGGGCAGCCCCATCGATTAC
GGCGTGATCGTGGACACAAAGGCCTACAGCGGCGGCTACAATCTGCCTATCGGCCAG
GCCGACGAGATGCAGAGATACGTGAAGGAGAACCAGACCCGGAATAAGCACATCAACC
CCAACGAGTGGTGGAAAGGTGTACCCTAGCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCGT
GAGCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCGCAAACC
AACTGCAATGGCGCCGTGCTGAGCGTGGAGGAGCTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCA
AAGCCGGCACCCCTGACACTGGAGGAGGTGCGGCGCAAGTTCAACAACGGCGAGATC
AACTTCTGATAACTCGAGTCTAGAATTTCTGCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
AAAGCGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCC
GTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCITCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTTGCC
CCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTTCTAATAAA
ATGAGGAAATTCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTG
GGGCAGGACAGCAAGGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG
GTGGGCTCTATGGCTTCTACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCAGGAATGGC
AGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTC

TCGCCGCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAG
GATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGT
GGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCC
GTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCG
GTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGG
GCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCT
ATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAA
GTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCC
CATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGG
TCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGT
TTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTTCGTGACCCATGGC
GATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTTCTGGATTTCATCGACTG
TGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATT
GCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTTCGTGCTTTACGGTATCGCCG
CTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTATTA
ACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACC
GCATACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTA
AATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAG
CACGTGCTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATC
TCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAA
AAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACA
AAAAACCACCGTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTT
TCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGC
CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACCTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCGCTA
ATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTTCGTGTCTTACCAGGTTGGACT
CAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCA
CACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCT
ATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG
CAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCT
TTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGT
CAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCTTG
GCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT

pVAX.38561.A120 (Z3 rechts)

GACTCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTA
ATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATA
ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCA
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTTGACGTCAATGGGT
GGACTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACAT
GACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
GGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGA
TTTTCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACG
GGACTTTCCAAAATGTTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT
GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTA
CTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTTAA
CTTAAGCTTGGTACCAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTAATTCCGCA
TGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGAC
GATGACAAGATGGCCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTCCGGCATCCACGGGGTACCCGCC
GCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCGTAACCTTCAGTTCAGTCTC

CGACCTGTCCCGCCACATCCGCACCCACACCCGGCGAGAAGCCTTTTGCCTGTGACATT
TGTGGGAGGAAATTTGCCTGGCGCTCCTCCCTGCGCCAGCATAACCAAGATAACACACGC
ATCCCAGGGCACCTATTCCCAAGCCCTTCCAGTGTGGAATCTGCATGCGTAACTTCAGT
CAGTCCGGCGACCTGACCCGCCACATCCGCACCCACACCCGGCGAGAAGCCTTTTGCCT
GTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCCGCCGCGCCGACCGCGCCAAGCATAACCAAGAT
ACACACGCACCCGCGCGCCCCGATCCCGAAGCCCTTCCAGTGTGGAATCTGCATGCGT
AACTTCAGTGTGCTCCGACGACCTGACCCGCCACATCCGCACCCACACCCGGCGAGAAGC
CTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCAGCGCTCCACCCTGTCTCCCAT
ACCAAGATAACCTGCGGGGATCCCAGCTGGTGAAGAGCGAGCTGGAGGAGAAGAAG
TCCGAGCTGCGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGA
TCGCCAGGAACAGCACCCAGGACCGCATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCAT
GAAGGTGTACGGCTACAGGGGAAAGCACCTGGGCGGAAGCAGAAAAGCCTGACGGCGC
CATCTATACAGTGGGCAGCCCCATCGATTACGGCGTGTATCGTGGACACAAAGGCCTAC
AGCGGCGGCTACAATCTGCCTATCGGCCAGGCCGACGAGATGGAGAGATACTGGAG
GAGAACCAGACCCGGGATAAGCACCTCAACCCCAACGAGTGGTGAAGGTGTACCCTA
GCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCTGTGAGCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAA
GGCCAGCTGACCGAGCTGAACCACATCACCAACTGCAATGGCGCCGTGCTGAGCGT
GGAGGAGCTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAAGCCGGCACCCCTGACACTGGAGGA
GGTGCGGCGCAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCAGATCTTGATAACTCGAGTCTA
GAATTTCTGAGAA
AA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCC
TCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCGTGCCITTCTTGA
CCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTCTTAATAAAAATGAGGAAATTCATCGCATT
GTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGG
AGGATTTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTAC
TGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCAGGAAATGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTA
AGGTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTCGCCGCAAGGATCTGATG
GCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAA
CAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATG
ACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTGAGCGCA
GGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAA
GACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGGCTTCCCTTGCAGCTGTG
CTCGACGTTGTACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGG
CAGGATCTCCTGTCTATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAAGTATCCATCATGGCTGATGC
AATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAA
CATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATC
TGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGA
GCATGCCCAGCGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATAT
CATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCG
GACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCG
AATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCAT
CGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTAATAACGCTTACAATTTCTGAT
GCGGTATTTTCTCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACAGGTGGCACTTTT
CGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGCTAAAACTTCAT
TTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCT
TGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCA
GCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTT
CAGCAGAGCGCAGATAACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACT
TCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGC
TGCCAGTGGCGATAAGTTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGG
ATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGC
GAACGACCTACCCGAAGTGAAGATACCTACAGCGTGAAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCT
TCCCGAAGGGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGA

GCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTT
CGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGGAGCCTAT
GGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCCTGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCT
CACATGTTCTT

pVAX.Fopp3.A120

GACTCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTA
ATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATA
ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCA
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT
GGACTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACAT
GACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
GGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGA
TTTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTTGGCACCAAAATCAACG
GGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT
GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTA
CTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTTAA
ACTTAAGCTTGGTACCTCAGACGAGACTTGGAAGACAGTCACATCTCAGCAGCTCCTCT
GCCGTTATCCAGCCTGCCTCTGACAAGAACCCAATGCCCAACCCTAGGCCAGCCAAGC
CTATGGCTCCTTCCTTGGCCCTTGGCCCATCCCAGGAGTCTTGCCAAGCTGGAAGAC
TGCACCAAGGGCTCAGAACTTCTAGGGACCAGGGGCTCTGGGGGACCCCTTCCAAGGT
CGGGACCTGCGAAGTGGGGGCCACACCTCTTCTTCCCTGAACCCCTGCCACCATCCC
AGCTGCAGCTGCCTACAGTGCCCTAGTCATGGTGGCACCGTCTGGGGCCCGACTAG
GTCCCTCACCCACCTACAGGCCCTTCTCCAGGACAGACCACACTTCATGCATCAGCTC
TCCACTGTGGATGCCCATGCCAGACCCCTGTGCTCCAAGTGCCTCCACTGGACAACC
CAGCCATGATCAGCCTCCACCACCTTCTGCTGCCACTGGGGTCTTCTCCCTCAAGGC
CCGGCCTGGCCTGCCACCTGGGATCAATGTGGCCAGTCTGGAATGGGTGTCCAGGGA
GCCAGCTCTACTCTGCACCTTCCCACGCTCGGGTACACCAGGAAAAGACAGCAACCTT
TTGGCTGCACCCCAAGGATCCTACCCACTGCTGGCAAATGGAGTCTGCAAGTGGCCTG
GTTGTGAGAAGGTCTTCGAGGAGCCAGAAGAGTTTCTCAAGCACTGCCAAGCAGATCAT
CTCCTGGATGAGAAAGGCAAGGCCAGTGCCTCCTCCAGAGAGAAGTGGTGCAGTCTC
TGAGAGCAGCAGCTGGAGCTGGAAAAGGAGAAGCTGGGAGCTATGCAGGCCACCTGG
CTGGGAAGATGGCGCTGGCCAAGGCTCCATCTGTGGCCTCAATGGACAAGAGCTCTTG
CTGCATCGTAGCCACCAGTACTCAGGGCAGTGTGCTCCCGGCCTGGTCTGCTCCICGG
GAGGCTCCAGACGGCGGCCTGTTTGCAAGTGCAGGAGGCACCTCTGGGGAAGCCATGGC
AATAGTTCCCTTCCCAGAGTTCTTCCACAACATGGACTACTTCAAGTACCACAATATGCGA
CCCCCTTTCACCTATGCCACCCCTTATCCGATGGGCCATCCTGGAAGCCCCGGAGAGGC
AGAGGACACTCAATGAAATCTACCATTGGTTTACTCGCATGTTTCGCCTACTTCAGAAACC
ACCCCGCCACCTGGAAGAATGCCATCCGCCACAACCTGAGCCTGCACAAGTGCTTTGT
GCGAGTGGAGAGCGAGAAGGGAGCAGTGTGGACCCTAGATGAATTTGAGTTTCGCAAG
AAGAGGAGCCAACGCCCAACAAGTGTCCAATCCCTGCCCTTGACCTCAAACCAAG
AAAAGGTGGGCGGGGGAGGGGGCCAAAACCATGAGACTGAGGCTGTGGGGGCAAGG
AGGCAAGTCCCTACGTGTACCTATGGAAACCGGAATTTCTGCAGAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
AAAGCGGCCGCTCGAGTC
TAGAGGGCCCGTTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATC
TGTTGTTTTGCCCTCCCCCTGCTTCTTGGACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTT
TCCTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCAATTTCTTGGGG
GGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCT

GGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACC
GGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGG
ATGGCTTTCTCGCCGCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGA
CAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGC
CGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCT
GATGCCCGCGTGTTCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCG
ACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGG
CCACGACGGGCGTTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCCTGAAGCGGGAAGGG
ACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGTCTCC
TGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCG
GCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAICTGGA
TGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCC
AGCCGAACTGTTCCGAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTG
GACCCATGGCGATGCCTGCTTCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTAC
CCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTCTTTAC
GGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGCTTCTATCGCTTCTTGACGAGTTCTT
CTGAATTATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGG
TATTTACACCCGATACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG
TTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATG
CTTCAATAATAGCACGTGCTAAAACCTTCAATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCC
TTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAG
ACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCT
GCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTFGCCGGATCAAGAGCTA
CCAACCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCCT
TCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACC
TCGCTCTGCTAATCCGTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTTCGTGTCTTACC
GGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGG
GGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTAC
AGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATC
CGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGGAGCTTCCAGGGGGAAAC
GCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT
GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTA
CGGTTCTGGGCTTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT

AAV CB7 CI-Foxp3

GCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGA
CCTTTGGTTCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGGAGTGGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACCAGG
GTAATGGGGATCCTCTAGAACTATAGCTAGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATA
GTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACT
TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATA
ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGA
CTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC
CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTC
GAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAA
TTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTAATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGG
GGGCGCGGCCAGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGCGG
AGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGA

GGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGGAGTCCG
TGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCC
GGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTC
CGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTGAA
AGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGC
GTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGCGGCT
GTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGA
GCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAG
GCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCCGTC
GGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCG
GGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGT
GGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGGAGGGCTC
GGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGC
CGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCC
AAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCACCCCCCTTAGCGGGCGCG
GGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCG
TCGCCGCGCCCGCTCCCCCTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGAC
GGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGG
CGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGG
CAACGTGCTGGTTAATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCACGCGTGGTACCT
CAGACGAGACTTGAAGACAGTCACATCTCAGCAGCTCCTCTGCCGTTATCCAGCCTG
CCTCTGACAAGAACCAATGCCAACCCTAGGCCAGCCAAGCCTATGGCTCCTTCCTTG
GCCCTTGCCCATCCCCAGGAGTCTTGCCAAGCTGGAAGACTGCACCAAGGGCTCAG
AACTTCTAGGGACCAGGGGCTCTGGGGGACCCTTCCAAGGTGCGGACCTGCGAAGTG
GGGCCACACCTCTTCTTCCCTGAACCCCCCTGCCACCATCCAGCTGCAGCTGCCTAC
AGTGCCCTAGTCATGGTGGCACCGTCTGGGGCCCGACTAGGTCCCTCACCCACCTA
CAGGCCCTTCTCCAGGACAGACCACACTTCATGCATCAGCTCTCCACTGTGGATGCCA
TGCCAGACCCCTGTGCTCCAAGTGCCTCCACTGGACAACCCAGCCATGATCAGCCTC
CCACCACCTTCTGCTGCCACTGGGGTCTTCTCCCTCAAGGCCCGGCTGGCCTGCCAC
CTGGGATCAATGTGGCCAGTCTGGAATGGGTGTCCAGGGAGCCAGCTCTACTCTGCAC
CTCCCACGCTCGGGTACACCCAGGAAAGACAGCAACCTTTTGGCTGCACCCCAAGGA
TCCTACCCACTGCTGGCAAATGGAGTCTGCAAGTGGCCTGGTTGTGAGAAGGTCTTCG
AGGAGCCAGAAGAGTTTCTCAAGCACTGCCAAGCAGATCATCTCCTGGATGAGAAAGG
CAAGGCCAGTGCCTCCTCCAGAGAGAAGTGGTGCAGTCTCTGGAGCAGCAGCTGGA
GCTGGAAGGAGAGAAGCTGGGAGCTATGCAGGCCACCTGGCTGGGAAGATGGCGCT
GGCCAAGGCTCCATCTGTGGCCTCAATGGACAAGAGCTCTTGCTGCATCGTAGCCACC
AGTACTCAGGGCAGTGTGCTCCCGGCTGGTCTGCTCCTCGGGAGGCTCCAGACGGC
GGCCTGTTTGCAGTGCAGGAGGCACCTCTGGGGAAGCCATGGCAATAGTTCCCTTCCCAG
AGTTCTTCCACAACATGGACTACTTCAAGTACCACAATATGCGACCCCTTTCACCTATG
CCACCTTATCCGATGGGCCATCCTGGAAGCCCCGGAGAGGCAGAGGACACTCAATGA
AATCTACCATTGGTTTACTCGCATGTTGCTACTTTCAGAAACCACCCCGCCACCTGGA
AGAATGCCATCCGCCACAACCTGAGCCTGCACAAGTGTCTTGTGCGAGTGGAGAGCGA
GAAGGGAGCAGTGTGGACCGTAGATGAATTTGAGTTTCGCAAGAAGAGGAGCCAACGC
CCCAACAAGTGTCCAATCCCTGCCCTTGACCTCAAAACCAAGAAAAGGTGGGCGGGG
GAGGGGGCCAAAACCATGAGACTGAGGCTGTGGGGGCAAGGAGGCAAGTCCCTACGTG
TACCTATGGAACCGCTCGAGGACGGGGTGAACCTACGCTGAGGATCCGATCTTTTC
CCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAA
TAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGCTCTCTCACTCGGA
GCAATTCGTTGATCTGAATTTGACCACCCATAATACCCATTACCCTGGTAGATAAGTAG
CATGGCGGGTTAATCATTAACCTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTC
TCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCCCGGG
CTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATTAACCTAATTCA
CTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTAATCG
CCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGAT
CGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGC
GCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCACG

GCCCTAGCGCCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTT
TCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGC
ACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACAGTAGTGGGCCATCGCCCTGA
TAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTG
CAAATGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTG
CCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTT
AACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCAGTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCC
CTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTG
ATAAATGCTTCAATAAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGC
CCTTATTTCCCTTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCGTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGT
GAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATC
TCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGC
ACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCA
ACTCGGTTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAG
AAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTTATGCAGTGCTGCCATAACCATG
AGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAA
CCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAG
CTGAATGAAGCCATAACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAA
CAACGTTGCGCAAATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTA
TAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCAGTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGC
TGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTG
CAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAG
TCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTA
AGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCA
TTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCT
TAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTC
TTGAGATCCTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACC
AGCGGTGGTTTTGTTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTTTCCGAAGGTAACITGGCT
TCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCAC
TTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC
TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCG
GATAAGGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAG
CGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGC
TTCCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAG
AGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTT
TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGGAGCCTA
TGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCTTGCCTTTTTGCTGGCCTTTTGC
TCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTTACCGCCTTTGA
GTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGA
GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAT
TAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAA
TTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTC
GTATGTTGTGTGGAATGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGCTATGACCAT
GATTACGCCAGATTTAATTAAGGCCTTAATTAG

AAV6 CAG SP-B Donor

5' AAV ITR: 3933 – 4051 (119 bp)
ZFN3-Donor-Template: 4087 – 6074 (1988 bp)
3' AAV ITR: 6112 – 6241 (130 bp)

GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTG
ACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCCTTCT
CGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCTCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTCAGGGTTC
CGATTTAGTGCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACCTGATTAGGGTGATGGTTCACG
TAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTCGCGCCCTTTCGCGCTTTCGAGTTCACGTTCT
TTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTT
TTGATTTATAAGGGATTTTCGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAC
AAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTCAGGTGGCACITTTTCG
GGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTATTATTTTCTAAATACATTTCAAATATGTATCC
GCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG
TATTTCAACATTTCCGTGTTCGCCCTTATTCCTTTTTCGCGGCATTTTCGCTTTCCTGTTTTG
CTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
TGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAA
GAACGTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGT
ATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT
GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC
GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCC
TTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAC
GATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTC
TAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTT
CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC
GTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
AGTTATCTACACGACGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT
GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATA
CTTTAGATTGATTTAAAACCTTCAATTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTG
ATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGT
AGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCA
AACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTC
TTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACCAAATACTGTCTTCTAGTG
TAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTCAAGAACCTGTAGCACCCGCTACATACTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTG
GACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTTCG
TGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTG
AGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAA
GCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGG
TATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGC
TCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCC
TGCCCTTTTTGCTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGG
ATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGA
GCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTTCTCCTT
ACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGACAGCCGCGTAACCTGGCAAAAATCGGTT
ACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCT
TAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTT
GTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTTGTTATGGCTA
AAGCAAACCTTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTTGCCCGTCGATTTAAAAGAGGGGCGTGGCC
AAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGGCTTGTGACAAATTTACCGAACAACCTCCGCGG
CCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTTCGATATC

AAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTC
ACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTG
AGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCCTCCGGTGTCTCGCCGGAGACTGCG
AGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGC
GAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTA
CGGAGCAAGTTCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGT
CTCCGAACCTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGG
GCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCATACTTGGAGCCACCTAACTTTGTTTATAGGGC
GACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACAT
CAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGGTGTGTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGT
ACAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCG
TTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATAACGCTACTTGCATTACAGTTTAC
GAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTGCTGCCCTTCCATCCGTTTCCACGGTGTGCGT
CACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTCTGTCTGGCTGGCGAAC
GAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCCTTGTGTTCTTCT
ACGGCAAGGTGCTGTGACGGATCTGCCCTGGCTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGC
CGTCGCGCGCTTGCCGGTGGTGTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTT
TCTGGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGC
TACATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCAGAGCATGCCTGCAGGCAGCTGCGC
GCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCGCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGTTCGCCCCGCC
CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT
GCGGCCGCACGCGTCTCACATGTGGCGCGCAACATGTCTCGAGCTGCGCGCTC
GCTCGCTCACTGAGGCCGCGCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGTTCGCC
CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG
GTTCTGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGCTCGGTACCCGGGTGAGGTAGGCGTG
TACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAG
ACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGC
GGCCCCGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTAGGGCTAGCGGATCCTC
TAGAACTATAGCTAGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGG
GTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC
ATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAAC
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCA
ATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGTCGAGGCCACGTTCTGCT
TCACTCTCCCCTCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAAT
ATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCG
GGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAG
CGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAA
AAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGCAAGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAA
ATTGCTAACGCAGTCAGTGCTTCTGACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGAAGTTG
GTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGACCAA
TAGAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGGCTTCTGATAGGCACCTATTGG
TCTTACTGACATCCACTTTGCCCTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGTTCAATTACAG
CTCTTAAGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCCTCGAGGCGGCCATGG
CCAAGTCGCACCTACTGCAGTGGCTACTGCTGCTTCCCTACCCCTGCTGCCAGGTGC
AGCTATCACGTCGGCCTCATCCCTGGAGTGTGCACAAGGCCCTCAATTCTGGTGCCAA
AGCCTGGAGCATGCAGTGCAGTGCAGAGCCCTGGGGCACTGCCTGCAGGAAGTCTGG
GGCATGCAGGAGCTAATGACCTGTGCCAAGAGTGTGAGGATATTGTCCACCTCCTCA
CAAAGATGACCAAGGAAGATGCTTCCAGGAAGCAATCCGGAAGTTCTGGAACAAGAA
TGTGATATCCTTCCCTTGAAGCTGCTTGTGCCCCGGTGTGCCAAGTGTGATGTCTA
CCTGCCCTGGTTATTGACTACTTCCAGAGCCAGATTAACCCCAAAGCCATCTGGAGGT
TGAGGATTAGAGTCCACTAGATGGGGATACGCGGAACGGTCCGGCGAGTCATTAGAGT
CCTGGAACCGGAGGGTTTAAACGACCCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC
TCTTGCAGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCGCACCAAAGTTCGCCCCGACGCCC

GGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCCCTTAATTAATCCGGACC
ACGTGCGGACCGAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTG
CGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGC
CCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGAAGCTGTAAGCTTG
TCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGCTT
TAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAAATGAATGCAATTTGTTGTTG
TAACTTGTATTATGTCAGCTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAAATTCACA
AATAAAGCATTTTTTTCCTGCACTTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTT
ATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATCGCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATC
TAGTTCCAAACTATTTTGTCAATTTTAAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTC
CCATCTATTTTGTCACTCTTCCCTAAAATAATCCTTAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCAGTT
CCCAACTATTTTGTCCGCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCCCTGTTATGTTTTTAAATCAAAC
ATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTCTCTGTACAGAAATG
AAAATTTTTCTGTCACTCTTTCGTTATTAATGTTTGTAAATGACTGAATATCAACGCTTATT
TGCAGCCTGAATGGCGAATG

AAV6-38558 (Z3 links)

5' AAV ITR: 3933 – 4051 (119 bp)
CMV Promoter: 4060 – 4638 (579 bp)
3Flag-NLS-38561-Fok-KKR: 4844 – 5992 (1149 bp)
bGHpA: 5999 – 6223 (225 bp)
3' AAV ITR: 6240 – 6369 (130 bp)

GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTG
ACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCCTTCT
CGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCTCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTC
CGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACG
TAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCT
TTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTT
TTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAC
AAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAGGGTGGCACTTTTCC
GGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCC
GCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG
TATTC AACATTTCCGTGTGCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCCCTGTTTTT
GCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGT
GGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAA
GAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGT
ATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTTAT
GCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC
GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCC
TTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAC
GATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTC
TAGCTTCCC GGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCCTT
CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC
GTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT
GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATA
CTTTAGATTGATTTAAAACCTTCAATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTG
ATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGT
AGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGTAGATCCTTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCA
AACAAAAAACACCAGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTC
TTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTG

TAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTG
GACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCC
TGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACTACAGCGTG
AGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAA
GCGGCAGGGTCTGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGG
TATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGC
TCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCC
TGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCIGATICTGTGG
ATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGA
GCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCT
ACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCAGACCAGCCGCTAACCTGGCAAAATCGGTT
ACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCT
TAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTT
GTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTATGGCTA
AAGCAAACCTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTTGCCCGTCGTATTAAGAGGGGGCGTGGCC
AAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTGTGTGACAATTTACCGAACAACCTCCGCG
CCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGTACTTGGGTGATATC
AAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGT
CACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGA
GGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCCTCCGGTGTCTCGCCGGAGACTGCG
AGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGC
GAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCTGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTA
CGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGT
CTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGG
GCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGC
GACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACAT
CAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGT
ACAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCG
TTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATAACGCTACTTGCATTACAGTTTAC
GAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGT
CACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCTGGCTGGCGAAC
GAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGTGTTCTTCT
ACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGC
CGTCGCGGCGCTTGCCGGTGGTGTGACCCCGGATGAAGTGGTTTCGCATCCTCGGTTT
TCTGGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGC
TACATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCAGAGCATGCCTGCAGGCAGCTGCC
GCGGACGCGTGGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC
CATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCA
ACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGTCAATAGGGA
CTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC
AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCT
GGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT
AGTCATCGCTATTACCATGGTGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC
GGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGT
GCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAAT
GGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGA
GAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCT
GGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTCGCCTAGAGAT
CTGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACCTGCGGTGACGTGGAGGAGAATCC
CGCCCTAGGACCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCG
ATTACAAGGATGACGATGACAAGATGGCCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTTCGGCATT
GGGGTACCCCGCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCGTAACT
CAGTGACCAGTCCAACCTGCGCGCCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTTGC

CTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCCGCAAGTCCGACCGCATCAAGCATACCAAGA
TACACACGGGCAGCCAAAAGCCCTTCCAGTGTGGAATCTGCATGCGTAAGTTTGCCCGCT
CCGACAACCTGTCCGTGCATACCAAGATAACACACGGGCGAGAAGCCCTTCCAGTGTGGA
TCTGCATGCGTAACITCAGTGAGCGCGGCACCCTGGCCCGCCACATCCGCACCCACACCG
GCGAGAAGCCTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCCGCTCCGACGCCCTG
ACCCAGCATACCAAGATAACACCTGCGGGGATCCAGCTGGTGAAGAGCGAGCTGGAGG
AGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTG
ATCGAGATCGCCAGGAACAGCACCCAGGACCGCATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTT
CTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGAAAGCACCTGGGCGGAAGCAGAAAAGCCTGAC
GGCGCCATCTATACAGTGGGCAGCCCCATCGATTACGGCGTGATCGTGGACACAAAAGGC
CTACAGCGGCGGCTACAATCTGCCTATCGGCCAGGCCGACGAGATGCAGAGATACTGTA
AGGAGAACCAGACCCGGAATAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGAAGGTGTACCTT
AGCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTTCGTGAGCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAA
GGCCAGCTGACCAGGCTGAACCGCAAAACCAACTGCAATGGCGCCGTGCTGAGCGTGG
AGGAGCTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAAGCCGGCACCCCTGACACTGGAGGAGGT
GCGGCGCAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCTGATAA CTCGAGCTGTGCCITCTAGT
TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTC
CCACTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCATT
CTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATA
GCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCGGACCGAGCGGCCGC AGGAACCC
TAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGA
CCAAAGGTGCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC
GCAG CTGCCTGCAGGAAGCTGTAAGCTTGTGCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCC
ATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCCTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCT
GAAACATAAAAATGAATGCAATTTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTA
CAAATAAAGCAATAGCATCACAAAATTCACAAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGT
TGTGGTTTTGTCAAAACCTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATCGC
CTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTTGTCATTTTTAATTT
TCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTTGTCACTCTTCCCTAAATAAT
CCTTAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCCAACTATTTTTGTCCGCCACAGCGGGG
CATTTTTCTTCCCTGTTATGTTTTAATCAAACATCCTGCCAACCTCATGTGACAAACCGTCA
TCTTCGGCTACTTTTTCTCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAAT
GTTTGAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATG

AAV6-38561 (Z3 rechts)

5' AAV ITR: 3933 – 4051 (119 bp)
CMV Promoter: 4060 – 4638 (579 bp)
3Flag-NLS-38558-Fok-ELD: 4766 – 6031 (1266 bp)
bGHpA: 6038 – 6262 (225 bp)
3' AAV ITR: 6279 – 6408 (130 bp)

GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTG
ACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCCTTCT
CGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTC
CGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACITGATTAGGGTGTATGGTTTACG
TAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCT
TTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTTCTT
TTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCGCCTATTTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAC
AAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTCAAGGTGGCACITTTTCG
GGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAAATACATTTCAAATATGTATCC
GCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG

TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTT
GCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
TGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAA
GAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCCT
ATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATAT
GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC
GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCC
TTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAC
GATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTC
TAGCTTCCCAGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCCTT
CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC
GTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT
GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATA
CTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTG
ATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGT
AGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCA
AACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTC
TTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACAAATACTGTCTTCTAGTG
TAGCCGTAGTTAGGCCACCCTCAAGAACTCTGTAGCACCCCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTG
GACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTG
TGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTG
AGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAA
GCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGG
TATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGC
TCGTACAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCC
TGCCTTTTTGTGGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCTTCCGTATCCCCIGATTCTGTGG
ATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGA
GCCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTT
ACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGACAGCCAGCCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTT
ACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCT
TAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTT
GTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTTGTTATGGCTA
AAGCAAACCTTTCATTTTTCTGAAGTGCAAATTTGCCCGTCGTATTAAGAGGGGGCGTGGCC
AAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAACAACCTCCGCGG
CCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTGATATC
AAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGT
CACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTG
AGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCCTCCGGTGTCTCGCCGGAGACTGCG
AGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGC
GAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTA
CGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGT
CTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTGACTTGGTCAGG
GCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCATACTTGAAGCCACCTAACCTTTGTTTTAGGGC
GACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACAT
CAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGT
ACAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCG
TTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATAACGCTACTTGCATTACAGTTTAC
GAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTTCGTGCCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGT
CACCCGGCAACCTTGGGACGAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCTTGGCTGGCGAAC
GAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCCTTGTGTTCTTCT
ACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTACAGGAGATCGGAAGACCTCGGC
CGTCCGCGCGCTTGGCGGTGGTGTGACCCCGGATGAAGTGGTTTCGCATCCTCGGTTT
TCTGGAAGGCGAGCATCGTTTTGTTGCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGC

TACATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCAGAGCATGCCTGCAGGCAGCTGCG
CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGCCT
CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT
GCGGCCGCACGCGTGGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT
AGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCCTGGCTGACC
GCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGTCAA
TAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCA
GTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG
GCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA
TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGG
CGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGG
GAGTTTTGTTTTGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGTAACAACCTCCGCCCC
ATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTC
TGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCTTATCGAAAATTAATACGACTCACTATAGG
GAGACCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAA
TTCGCCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAA
GGATGACGATGACAAGATGGCCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTCGGCATCCACGGGGT
ACCCGCCGTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTGGAATCTGCATGCGTAACCTCAGT
CAGTCCCTCCGACCTGTCCCGCCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTGCCT
GTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCTGGCGCTCCTCCCTGCGCCAGCATACCAAGAT
ACACACGCATCCAGGGCACCTATTTCCAAGCCCTTCCAGTGTGGAATCTGCATGCGTA
ACTTCAGTTCAGTCCGCGACCTGACCCGCCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGC
CTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCCGCCGCGCCGACCGCGCCAAGCA
TACCAAGATACACACGCACCCGCGCGCCCCGATCCCGAAGCCCTTCCAGTGTGGAATC
TGCATGCGTAACCTCAGTGCCTCCGACGACCTGACCCGCCACATCCGCACCCACACCG
GCGAGAAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCCAGCGCTCCACCCCT
GTCCTCCCATACCAAGATACACCTGCGGGGATCCCAGCTGGTGAAGAGCGAGCTGGAG
GAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGC
TGATCGAGATCGCCAGGAACAGCACCCAGGACCGCATCCTGGAGATGAAGGTGATGGA
GTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGAAAGCACCTGGGCGGAAGCAGAAAGCCT
GACGGCGCCATCTATACAGTGGGCAGCCCCATCGATTACGGCGTGATCGTGGACACAA
AGGCCTACAGCGGCGGCTACAATCTGCCTATCGGCCAGGCCGACGAGATGGAGAGAT
ACGTGGAGGAGAACCAGACCCGGGATAAGCACCTCAACCCCAACGAGTGGTGGAAAGG
TGTACCCTAGCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCTGTGAGCGGCCACTTCAAGGG
CAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAATGGCGCCGTG
CTGAGCGTGGAGGAGCTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAAGCCGGCACCCCTGACA
CTGGAGGAGGTGCGGCGCAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCAGATCTTGATAAC
TCGAGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCTT
TGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTCATCG
CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGG
GGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCGG
ACCGAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGTGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCT
CGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGG
GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGAAGCTGTAAGCTTGTGCG
AGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCCTTAA
AAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAAATGAATGCAATTTGTTGTTGTTA
ACTTGTATTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAA
TAAAGCATTTTTTTCACTGCATTTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAT
CATGTCGGATCTGATCACTGATATCGCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAATCT
AGTTCCAAACTATTTTGTTCATTTTTAATTTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTC
CCATCTATTTTTGTCACTCTTCCCTAAATAATCCTTAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCAG
TTCCCAACTATTTTGTCCGCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCTGTTATGTTTTTAATCAA
ACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTCTGTGCACAGA
ATGAAAATTTTTCTGTTCATCTCTTCGTTATTAATGTTTGTAAATTGACTGAATATCAACGCT
T

Referenzen

1. Maina, J.N. et al. Recent advances into understanding some aspects of the structure and function of mammalian and avian lungs. *Physiol Biochem Zool* **83**, 792-807 (2010).
2. Glasser, J.R. & Mallampalli, R.K. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection. *Microbes Infect* **14**, 17-25 (2012).
3. Mingarro, I., Lukovic, D., Vilar, M. & Perez-Gil, J. Synthetic pulmonary surfactant preparations: new developments and future trends. *Curr Med Chem* **15**, 393-403 (2008).
4. Rooney, S.A., Young, S.L. & Mendelson, C.R. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J* **8**, 957-967 (1994).
5. Blanco, O. & Perez-Gil, J. Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat Respiratory Distress Syndrome: role of the different components in an efficient pulmonary surfactant. *Eur J Pharmacol* **568**, 1-15 (2007).
6. Crapo, J.D., Barry, B.E., Gehr, P., Bachofen, M. & Weibel, E.R. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* **125**, 740-745 (1982).
7. Dobbs, L.G. et al. Highly water-permeable type I alveolar epithelial cells confer high water permeability between the airspace and vasculature in rat lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2991-2996 (1998).
8. Maina, J.N. Comparative respiratory morphology: themes and principles in the design and construction of the gas exchangers. *Anat Rec* **261**, 25-44 (2000).
9. Borok, Z. et al. Na transport proteins are expressed by rat alveolar epithelial type I cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**, L599-608 (2002).
10. Johnson, M.D., Widdicombe, J.H., Allen, L., Barbry, P. & Dobbs, L.G. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1966-1971 (2002).
11. Newman, G.R., Campbell, L., von Ruhland, C., Jasani, B. & Gumbleton, M. Caveolin and its cellular and subcellular immunolocalisation in lung alveolar epithelium: implications for alveolar epithelial type I cell function. *Cell Tissue Res* **295**, 111-120 (1999).
12. Ridge, K.M. et al. Alveolar type 1 cells express the alpha2 Na,K-ATPase, which contributes to lung liquid clearance. *Circ Res* **92**, 453-460 (2003).
13. Wang, S., Singh, R.D., Godin, L., Pagano, R.E. & Hubmayr, R.D. Endocytic response of type I alveolar epithelial cells to hypertonic stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **300**, L560-568 (2011).
14. Fehrenbach, H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res* **2**, 33-46 (2001).
15. Schmitz, G. & Muller, G. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J Lipid Res* **32**, 1539-1570 (1991).
16. Evans, M.J., Cabral, L.J., Stephens, R.J. & Freeman, G. Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. *Am J Pathol* **70**, 175-198 (1973).
17. Kapanci, Y., Weibel, E.R., Kaplan, H.P. & Robinson, F.R. Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxicity in monkeys. II. Ultrastructural and morphometric studies. *Lab Invest* **20**, 101-118 (1969).
18. Rock, J.R. et al. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E1475-1483 (2011).
19. Gomez-Gil, L., Schurch, D., Goormaghtigh, E. & Perez-Gil, J. Pulmonary surfactant protein SP-C counteracts the deleterious effects of cholesterol on the activity of

- surfactant films under physiologically relevant compression-expansion dynamics. *Biophys J* **97**, 2736-2745 (2009).
20. Veldhuizen, R., Nag, K., Orgeig, S. & Possmayer, F. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta* **1408**, 90-108 (1998).
 21. Barreira, E.R., Precioso, A.R. & Bousso, A. Pulmonary surfactant in respiratory syncytial virus bronchiolitis: the role in pathogenesis and clinical implications. *Pediatr Pulmonol* **46**, 415-420 (2011).
 22. Orgeig, S. et al. Recent advances in alveolar biology: evolution and function of alveolar proteins. *Respir Physiol Neurobiol* **173 Suppl**, S43-54 (2010).
 23. Haagsman, H.P., Hogenkamp, A., van Eijk, M. & Veldhuizen, E.J. Surfactant collectins and innate immunity. *Neonatology* **93**, 288-294 (2008).
 24. Muhlfeld, C. et al. Exogenous surfactant in ischemia/reperfusion: effects on endogenous surfactant pools. *J Heart Lung Transplant* **29**, 327-334 (2010).
 25. Mulugeta, S. & Beers, M.F. Surfactant protein C: its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung. *Microbes Infect* **8**, 2317-2323 (2006).
 26. Curstedt, T. & Johansson, J. Different effects of surfactant proteins B and C - implications for development of synthetic surfactants. *Neonatology* **97**, 367-372 (2010).
 27. Schurch, D., Ospina, O.L., Cruz, A. & Perez-Gil, J. Combined and independent action of proteins SP-B and SP-C in the surface behavior and mechanical stability of pulmonary surfactant films. *Biophys J* **99**, 3290-3299 (2010).
 28. Pilot-Matias, T.J. et al. Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B. *DNA* **8**, 75-86 (1989).
 29. Vamvakopoulos, N.C., Modi, W.S. & Floros, J. Mapping the human pulmonary surfactant-associated protein B gene (SFTP3) to chromosome 2p12-->p11.2. *Cytogenet Cell Genet* **68**, 8-10 (1995).
 30. Nogee, L.M. Genetics of the hydrophobic surfactant proteins. *Biochim Biophys Acta* **1408**, 323-333 (1998).
 31. Weaver, T.E. Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. *Biochim Biophys Acta* **1408**, 173-179 (1998).
 32. Nogee, L.M. Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. *Annu Rev Physiol* **66**, 601-623 (2004).
 33. Andersson, M., Curstedt, T., Jornvall, H. & Johansson, J. An amphipathic helical motif common to tumourolytic polypeptide NK-lysin and pulmonary surfactant polypeptide SP-B. *FEBS Lett* **362**, 328-332 (1995).
 34. Weaver, T.E. & Whitsett, J.A. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins. *Biochem J* **273(Pt 2)**, 249-264 (1991).
 35. Voorhout, W.F. et al. Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment. *Am J Physiol* **263**, L479-486 (1992).
 36. Akella, A. & Deshpande, S.B. Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders. *Indian J Exp Biol* **51**, 5-22 (2013).
 37. Griese, M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* **13**, 1455-1476 (1999).
 38. Wert, S.E., Whitsett, J.A. & Nogee, L.M. Genetic disorders of surfactant dysfunction. *Pediatr Dev Pathol* **12**, 253-274 (2009).
 39. Cole, F.S. et al. Population-based estimates of surfactant protein B deficiency. *Pediatrics* **105**, 538-541 (2000).
 40. Hamvas, A. et al. Population-based screening for rare mutations: high-throughput DNA extraction and molecular amplification from Guthrie cards. *Pediatr Res* **50**, 666-668 (2001).
 41. Nogee, L.M. et al. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest* **93**, 1860-1863 (1994).

42. Nogee, L.M., Wert, S.E., Proffitt, S.A., Hull, W.M. & Whitsett, J.A. Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 973-981 (2000).
43. Hamvas, A. Inherited surfactant protein-B deficiency and surfactant protein-C associated disease: clinical features and evaluation. *Semin Perinatol* **30**, 316-326 (2006).
44. Hamvas, A. Inherited surfactant protein-B deficiency. *Adv Pediatr* **44**, 369-388 (1997).
45. Hamvas, A., Nogee, L.M., deMello, D.E. & Cole, F.S. Pathophysiology and treatment of surfactant protein-B deficiency. *Biol Neonate* **67 Suppl 1**, 18-31 (1995).
46. Whitsett, J.A., Nogee, L.M., Weaver, T.E. & Horowitz, A.D. Human surfactant protein B: structure, function, regulation, and genetic disease. *Physiol Rev* **75**, 749-757 (1995).
47. Hartl, D. & Griese, M. Interstitial lung disease in children -- genetic background and associated phenotypes. *Respir Res* **6**, 32 (2005).
48. Hamvas, A. et al. Surfactant protein B deficiency: antenatal diagnosis and prospective treatment with surfactant replacement. *J Pediatr* **125**, 356-361 (1994).
49. Li, J. et al. N-terminally extended surfactant protein (SP) C isolated from SP-B-deficient children has reduced surface activity and inhibited lipopolysaccharide binding. *Biochemistry* **43**, 3891-3898 (2004).
50. deMello, D.E. et al. Ultrastructure of lung in surfactant protein B deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**, 230-239 (1994).
51. Voorhout, W.F., Weaver, T.E., Haagsman, H.P., Geuze, H.J. & Van Golde, L.M. Biosynthetic routing of pulmonary surfactant proteins in alveolar type II cells. *Microsc Res Tech* **26**, 366-373 (1993).
52. Kirkby, S. & Hayes, D., Jr. Pediatric lung transplantation: indications and outcomes. *J Thorac Dis* **6**, 1024-1031 (2014).
53. Friedmann, T. A brief history of gene therapy. *Nat Genet* **2**, 93-98 (1992).
54. Ginn, S.L., Alexander, I.E., Edelstein, M.L., Abedi, M.R. & Wixon, J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med* **15**, 65-77 (2013).
55. Verma, I.M. & Weitzman, M.D. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* **74**, 711-738 (2005).
56. Bank, A. Human somatic cell gene therapy. *Bioessays* **18**, 999-1007 (1996).
57. Matthews, Q.L. & Curiel, D.T. Gene therapy: human germline genetic modifications--assessing the scientific, socioethical, and religious issues. *South Med J* **100**, 98-100 (2007).
58. Naldini, L. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet* **12**, 301-315 (2011).
59. Mendell, J.R. et al. Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann Neurol* **68**, 629-638 (2010).
60. Mendell, J.R. et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol* **66**, 290-297 (2009).
61. Mingozzi, F. & High, K.A. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* **12**, 341-355 (2011).
62. Moss, R.B. et al. Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum Gene Ther* **18**, 726-732 (2007).
63. Griesenbach, U., Alton, E.W. & Consortium, U.K.C.F.G.T. Gene transfer to the lung: lessons learned from more than 2 decades of CF gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 128-139 (2009).
64. Li, H.L., Nakano, T. & Hotta, A. Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications. *Dev Growth Differ* **56**, 63-77 (2014).
65. Sharma, A., Tandon, M., Bangari, D.S. & Mittal, S.K. Adenoviral vector-based strategies for cancer therapy. *Curr Drug Ther* **4**, 117-138 (2009).
66. Xia, H. et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* **10**, 816-820 (2004).

67. Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 712-720 (2003).
68. Sung, P. & Klein, H. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 739-750 (2006).
69. Wyman, C. & Kanaar, R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* **40**, 363-383 (2006).
70. Wirt, S.E. & Porteus, M.H. Development of nuclease-mediated site-specific genome modification. *Curr Opin Immunol* **24**, 609-616 (2012).
71. Gaj, T., Gersbach, C.A. & Barbas, C.F., 3rd ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* **31**, 397-405 (2013).
72. Li, L., Wu, L.P. & Chandrasegaran, S. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4275-4279 (1992).
73. Kim, Y.G., Cha, J. & Chandrasegaran, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1156-1160 (1996).
74. Kim, Y.G. & Chandrasegaran, S. Chimeric restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 883-887 (1994).
75. Kim, Y.G., Smith, J., Durgesha, M. & Chandrasegaran, S. Chimeric restriction enzyme: Gal4 fusion to FokI cleavage domain. *Biol Chem* **379**, 489-495 (1998).
76. Beerli, R.R. & Barbas, C.F., 3rd Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nat Biotechnol* **20**, 135-141 (2002).
77. Liu, Q., Segal, D.J., Ghiara, J.B. & Barbas, C.F., 3rd Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5525-5530 (1997).
78. Beerli, R.R., Dreier, B. & Barbas, C.F., 3rd Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1495-1500 (2000).
79. Beerli, R.R., Segal, D.J., Dreier, B. & Barbas, C.F., 3rd Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14628-14633 (1998).
80. Kim, S., Lee, M.J., Kim, H., Kang, M. & Kim, J.S. Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs. *Nat Methods* **8**, 7 (2011).
81. Maeder, M.L. et al. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell* **31**, 294-301 (2008).
82. Wah, D.A., Bitinaite, J., Schildkraut, I. & Aggarwal, A.K. Structure of FokI has implications for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10564-10569 (1998).
83. Bitinaite, J., Wah, D.A., Aggarwal, A.K. & Schildkraut, I. FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10570-10575 (1998).
84. Durai, S. et al. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **33**, 5978-5990 (2005).
85. Perez, E.E. et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* **26**, 808-816 (2008).
86. Ratner, M. HIV treatment study clears virus, sends Sangamo stock soaring. *Nat Biotechnol* **32**, 405 (2014).
87. Tebas, P. et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med* **370**, 901-910 (2014).
88. Christian, M. et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761 (2010).
89. Miller, J.C. et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* **29**, 143-148 (2011).
90. Gu, K. et al. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* **435**, 1122-1125 (2005).

91. Romer, P. et al. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* **318**, 645-648 (2007).
92. Yang, B., Sugio, A. & White, F.F. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10503-10508 (2006).
93. Boch, J. et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**, 1509-1512 (2009).
94. Moscou, M.J. & Bogdanove, A.J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326**, 1501 (2009).
95. Kim, H. & Kim, J.S. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* **15**, 321-334 (2014).
96. Mak, A.N., Bradley, P., Cernadas, R.A., Bogdanove, A.J. & Stoddard, B.L. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* **335**, 716-719 (2012).
97. Joung, J.K. & Sander, J.D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 49-55 (2013).
98. Sun, N. & Zhao, H. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnol Bioeng* **110**, 1811-1821 (2013).
99. Yin, H. et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet* **15**, 541-555 (2014).
100. Kay, M.A. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet* **12**, 316-328 (2011).
101. Geiger, J., Aneja, M.K. & Rudolph, C. Vectors for pulmonary gene therapy. *Int J Pharm* **390**, 84-88 (2010).
102. Mays, L.E. & Wilson, J.M. The complex and evolving story of T cell activation to AAV vector-encoded transgene products. *Mol Ther* **19**, 16-27 (2011).
103. Li, H. et al. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* **475**, 217-221 (2011).
104. Halbert, C.L., Rutledge, E.A., Allen, J.M., Russell, D.W. & Miller, A.D. Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol* **74**, 1524-1532 (2000).
105. Paranjpe, M. & Muller-Goymann, C.C. Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review. *Int J Mol Sci* **15**, 5852-5873 (2014).
106. Ravi Kumar, M.N., Bakowsky, U. & Lehr, C.M. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials* **25**, 1771-1777 (2004).
107. Kaur, G., Narang, R.K., Rath, G. & Goyal, A.K. Advances in pulmonary delivery of nanoparticles. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* **40**, 75-96 (2012).
108. Martinon, F. et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol* **23**, 1719-1722 (1993).
109. Petsch, B. et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat Biotechnol* **30**, 1210-1216 (2012).
110. Lorenzi, J.C. et al. Intranasal vaccination with messenger RNA as a new approach in gene therapy: use against tuberculosis. *BMC Biotechnol* **10**, 77 (2010).
111. Weide, B. et al. Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. *J Immunother* **32**, 498-507 (2009).
112. Heiser, A. et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* **109**, 409-417 (2002).
113. Su, Z. et al. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol* **174**, 3798-3807 (2005).

114. Van Tendeloo, V.F. et al. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13824-13829 (2010).
115. Jirikowski, G.F., Sanna, P.P., Maciejewski-Lenoir, D. & Bloom, F.E. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science* **255**, 996-998 (1992).
116. Kariko, K., Muramatsu, H., Keller, J.M. & Weissman, D. Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. *Mol Ther* **20**, 948-953 (2012).
117. Kormann, M.S. et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol* **29**, 154-157 (2011).
118. Mays, L.E. et al. Modified Foxp3 mRNA protects against asthma through an IL-10-dependent mechanism. *J Clin Invest* **123**, 1216-1228 (2013).
119. Sahin, U., Kariko, K. & Tureci, O. mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 759-780 (2014).
120. Stepinski, J., Waddell, C., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E. & Rhoads, R.E. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG. *RNA* **7**, 1486-1495 (2001).
121. Holtkamp, S. et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* **108**, 4009-4017 (2006).
122. Mockey, M. et al. mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 1062-1068 (2006).
123. Kariko, K., Kuo, A. & Barnathan, E. Overexpression of urokinase receptor in mammalian cells following administration of the in vitro transcribed encoding mRNA. *Gene Ther* **6**, 1092-1100 (1999).
124. Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* **22**, 346-353 (2004).
125. Bossi, L. & Ruth, J.R. The influence of codon context on genetic code translation. *Nature* **286**, 123-127 (1980).
126. Kimchi-Sarfaty, C. et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* **315**, 525-528 (2007).
127. Diebold, S.S. et al. Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur J Immunol* **36**, 3256-3267 (2006).
128. Heil, F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529 (2004).
129. Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531 (2004).
130. Yoneyama, M. et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* **175**, 2851-2858 (2005).
131. Schlee, M. et al. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* **31**, 25-34 (2009).
132. Balachandran, S. et al. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* **13**, 129-141 (2000).
133. Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H. & Weissman, D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* **23**, 165-175 (2005).
134. Doyon, Y. et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* **26**, 702-708 (2008).

135. Geurts, A.M. et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* **325**, 433 (2009).
136. Tesson, L. et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol* **29**, 695-696 (2011).
137. Wefers, B. et al. Generation of targeted mouse mutants by embryo microinjection of TALEN mRNA. *Nat Protoc* **8**, 2355-2379 (2013).
138. Birnboim, H.C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523 (1979).
139. Piskur, J. & Rupprecht, A. Aggregated DNA in ethanol solution. *FEBS Lett* **375**, 174-178 (1995).
140. Vandeventer, P.E. et al. Multiphasic DNA adsorption to silica surfaces under varying buffer, pH, and ionic strength conditions. *J Phys Chem B* **116**, 5661-5670 (2012).
141. Loenen, W.A., Dryden, D.T., Raleigh, E.A., Wilson, G.G. & Murray, N.E. Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* **42**, 3-19 (2014).
142. Pingoud, A. & Jeltsch, A. Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* **29**, 3705-3727 (2001).
143. Panja, S., Aich, P., Jana, B. & Basu, T. How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*? *Mol Membr Biol* **25**, 411-422 (2008).
144. Yoshida, N. & Sato, M. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl Microbiol Biotechnol* **83**, 791-798 (2009).
145. Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.Y. & Kim, Y.H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp* (2012).
146. Cathomen, T. & Joung, J.K. Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Mol Ther* **16**, 1200-1207 (2008).
147. Lombardo, A. et al. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* **25**, 1298-1306 (2007).
148. Santiago, Y. et al. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5809-5814 (2008).
149. Urnov, F.D. et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435**, 646-651 (2005).
150. Cermak, T. et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* **39**, e82 (2011).
151. Reyon, D. et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol* **30**, 460-465 (2012).
152. Miyazaki, J. et al. Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene* **79**, 269-277 (1989).
153. Kochetkov, S.N., Rusakova, E.E. & Tunitskaya, V.L. Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism. *FEBS Lett* **440**, 264-267 (1998).
154. Giard, D.J. et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**, 1417-1423 (1973).
155. Dalby, B. et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* **33**, 95-103 (2004).
156. Ishmael, F.T. & Stellato, C. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Ann Allergy Asthma Immunol* **101**, 437-443 (2008).
157. Mashal, R.D., Koontz, J. & Sklar, J. Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases. *Nat Genet* **9**, 177-183 (1995).
158. Galibert, L. & Merten, O.W. Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. *J Invertebr Pathol* **107 Suppl**, S80-93 (2011).

159. Melton, K.R. et al. SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L543-549 (2003).
160. Mahmood, T. & Yang, P.C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* **4**, 429-434 (2012).
161. Haddad, F. & Baldwin, K.M. Reverse transcription of the ribonucleic acid: the first step in RT-PCR assay. *Methods Mol Biol* **630**, 261-270 (2010).
162. Watanabe, S. et al. Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy. *Nat Methods* **8**, 80-84 (2011).
163. Lichtman, J.W. & Conchello, J.A. Fluorescence microscopy. *Nat Methods* **2**, 910-919 (2005).
164. Fischer, E.R., Hansen, B.T., Nair, V., Hoyt, F.H. & Dorward, D.W. Scanning electron microscopy. *Curr Protoc Microbiol* **Chapter 2**, Unit 2B 2 (2012).
165. Kariko, K., Muramatsu, H., Ludwig, J. & Weissman, D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res* **39**, e142 (2011).
166. Wang, Y. et al. Systemic delivery of modified mRNA encoding herpes simplex virus 1 thymidine kinase for targeted cancer gene therapy. *Mol Ther* **21**, 358-367 (2013).
167. Cavanaugh, V.J., Guidotti, L.G. & Chisari, F.V. Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* **71**, 3236-3243 (1997).
168. Monteiro, J.M., Harvey, C. & Trinchieri, G. Role of interleukin-12 in primary influenza virus infection. *J Virol* **72**, 4825-4831 (1998).
169. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 133-146 (2003).
170. Paul, W.E. Bridging innate and adaptive immunity. *Cell* **147**, 1212-1215 (2011).
171. Juillerat, A. et al. Comprehensive analysis of the specificity of transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Res* **42**, 5390-5402 (2014).
172. Bochtler, M. Structural basis of the TAL effector-DNA interaction. *Biol Chem* **393**, 1055-1066 (2012).
173. Katsuyama, T. et al. An efficient strategy for TALEN-mediated genome engineering in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* **41**, e163 (2013).
174. Mandell, J.G. & Barbas, C.F., 3rd Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucleic Acids Res* **34**, W516-523 (2006).
175. Sander, J.D., Zaback, P., Joung, J.K., Voytas, D.F. & Dobbs, D. Zinc Finger Targeter (ZiFiT): an engineered zinc finger/target site design tool. *Nucleic Acids Res* **35**, W599-605 (2007).
176. Isalan, M., Choo, Y. & Klug, A. Synergy between adjacent zinc fingers in sequence-specific DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5617-5621 (1997).
177. Jamieson, A.C., Wang, H. & Kim, S.H. A zinc finger directory for high-affinity DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12834-12839 (1996).
178. Kim, C.A. & Berg, J.M. A 2.2 Å resolution crystal structure of a designed zinc finger protein bound to DNA. *Nat Struct Biol* **3**, 940-945 (1996).
179. Pavletich, N.P. & Pabo, C.O. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252**, 809-817 (1991).
180. Kim, H.J., Lee, H.J., Kim, H., Cho, S.W. & Kim, J.S. Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome Res* **19**, 1279-1288 (2009).
181. Lim, S. et al. A simple strategy for heritable chromosomal deletions in zebrafish via the combinatorial action of targeting nucleases. *Genome Biol* **14**, R69 (2013).
182. Wang, L. et al. Simultaneous screening and validation of effective zinc finger nucleases in yeast. *PLoS One* **8**, e64687 (2013).
183. Weissman, D. et al. HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response. *J Immunol* **165**, 4710-4717 (2000).

184. Lechardeur, D. et al. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* **6**, 482-497 (1999).
185. Akita, H., Ito, R., Khalil, I.A., Futaki, S. & Harashima, H. Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by a nonviral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy. *Mol Ther* **9**, 443-451 (2004).
186. Grosse, S., Thevenot, G., Monsigny, M. & Fajac, I. Which mechanism for nuclear import of plasmid DNA complexed with polyethylenimine derivatives? *J Gene Med* **8**, 845-851 (2006).
187. Bernstein, K.A. & Rothstein, R. At loose ends: resecting a double-strand break. *Cell* **137**, 807-810 (2009).
188. Lieber, M.R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* **79**, 181-211 (2010).
189. San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77**, 229-257 (2008).
190. Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W.R. & Gloor, G.B. Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Mol Cell Biol* **14**, 1613-1625 (1994).
191. Symington, L.S. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 630-670, table of contents (2002).
192. Arnould, S. et al. The I-Crel meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Eng Des Sel* **24**, 27-31 (2011).
193. Bogdanove, A.J. & Voytas, D.F. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* **333**, 1843-1846 (2011).
194. Chu, V.T. et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol* **33**, 543-548 (2015).
195. Handel, E.M. & Cathomen, T. Zinc-finger nuclease based genome surgery: it's all about specificity. *Curr Gene Ther* **11**, 28-37 (2011).
196. Moehle, E.A. et al. Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3055-3060 (2007).
197. Anderson, B.R. et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Res* **38**, 5884-5892 (2010).
198. Hornung, V. et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-997 (2006).
199. Nallagatla, S.R. & Bevilacqua, P.C. Nucleoside modifications modulate activation of the protein kinase PKR in an RNA structure-specific manner. *RNA* **14**, 1201-1213 (2008).
200. Limbach, P.A., Crain, P.F. & McCloskey, J.A. Summary: the modified nucleosides of RNA. *Nucleic Acids Res* **22**, 2183-2196 (1994).
201. Kariko, K. et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther* **16**, 1833-1840 (2008).
202. Campbell, E.M. & Hope, T.J. Gene therapy progress and prospects: viral trafficking during infection. *Gene Ther* **12**, 1353-1359 (2005).
203. Seisenberger, G. et al. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* **294**, 1929-1932 (2001).
204. Daya, S. & Berns, K.I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* **21**, 583-593 (2008).
205. Ferrari, F.K., Samulski, T., Shenk, T. & Samulski, R.J. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* **70**, 3227-3234 (1996).

206. Hauck, B., Zhao, W., High, K. & Xiao, W. Intracellular viral processing, not single-stranded DNA accumulation, is crucial for recombinant adeno-associated virus transduction. *J Virol* **78**, 13678-13686 (2004).
207. Mahiny, A.J. et al. In vivo genome editing using nuclease-encoding mRNA corrects SP-B deficiency. *Nat Biotechnol* **33**, 584-586 (2015).
208. Basarkar, A. & Singh, J. Nanoparticulate systems for polynucleotide delivery. *Int J Nanomedicine* **2**, 353-360 (2007).
209. Cormier, S.A. et al. T(H)2-mediated pulmonary inflammation leads to the differential expression of ribonuclease genes by alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**, 678-687 (2002).
210. Gilleron, J. et al. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nat Biotechnol* **31**, 638-646 (2013).
211. Varkouhi, A.K., Scholte, M., Storm, G. & Haisma, H.J. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J Control Release* **151**, 220-228 (2011).
212. Pichlmair, A. et al. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J Virol* **83**, 10761-10769 (2009).
213. Yoneyama, M. et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-737 (2004).
214. Züst, R. et al. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat Immunol* **12**, 137-143 (2011).
215. Panyam, J. & Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 329-347 (2003).
216. Bibikova, M. et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol* **21**, 289-297 (2001).
217. Cavazzana-Calvo, M. et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* **467**, 318-322 (2010).
218. Gabriel, R. et al. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol* **29**, 816-823 (2011).
219. Hacein-Bey-Abina, S. et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415-419 (2003).
220. Howe, S.J. et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* **118**, 3143-3150 (2008).
221. Pattanayak, V., Ramirez, C.L., Joung, J.K. & Liu, D.R. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat Methods* **8**, 765-770 (2011).
222. Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J.K. & Carroll, D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* **300**, 764 (2003).
223. Bollag, R.J., Waldman, A.S. & Liskay, R.M. Homologous recombination in mammalian cells. *Annu Rev Genet* **23**, 199-225 (1989).
224. Deng, C. & Capecchi, M.R. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* **12**, 3365-3371 (1992).
225. Shin, J., Chen, J. & Solnica-Krezel, L. Efficient homologous recombination-mediated genome engineering in zebrafish using TALE nucleases. *Development* **141**, 3807-3818 (2014).
226. Limberis, M.P., Vandenberghe, L.H., Zhang, L., Pickles, R.J. & Wilson, J.M. Transduction efficiencies of novel AAV vectors in mouse airway epithelium in vivo and human ciliated airway epithelium in vitro. *Mol Ther* **17**, 294-301 (2009).

227. Halbert, C.L., Allen, J.M. & Miller, A.D. Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. *J Virol* **75**, 6615-6624 (2001).
228. Halbert, C.L., Lam, S.L. & Miller, A.D. High-efficiency promoter-dependent transduction by adeno-associated virus type 6 vectors in mouse lung. *Hum Gene Ther* **18**, 344-354 (2007).
229. Zhang, F. et al. Characterization of interactions between heparin/glycosaminoglycan and adeno-associated virus. *Biochemistry* **52**, 6275-6285 (2013).
230. Tokieda, K. et al. Surfactant protein-B-deficient mice are susceptible to hyperoxic lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **21**, 463-472 (1999).
231. Sato, A. & Ikegami, M. SP-B and SP-C containing new synthetic surfactant for treatment of extremely immature lamb lung. *PLoS One* **7**, e39392 (2012).
232. Walther, F.J., Hernandez-Juviel, J.M., Gordon, L.M. & Waring, A.J. Synthetic surfactant containing SP-B and SP-C mimics is superior to single-peptide formulations in rabbits with chemical acute lung injury. *PeerJ* **2**, e393 (2014).
233. Ware, L.B. & Matthay, M.A. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **342**, 1334-1349 (2000).
234. Greene, K.E. et al. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 1843-1850 (1999).
235. Gregory, T.J. et al. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* **88**, 1976-1981 (1991).
236. Hsieh, C.S. et al. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**, 547-549 (1993).
237. Koski, G.K. et al. Cutting edge: innate immune system discriminates between RNA containing bacterial versus eukaryotic structural features that prime for high-level IL-12 secretion by dendritic cells. *J Immunol* **172**, 3989-3993 (2004).
238. Ferreira, V., Petry, H. & Salmon, F. Immune Responses to AAV-Vectors, the Glybera Example from Bench to Bedside. *Front Immunol* **5**, 82 (2014).
239. Lee, H.J., Kim, E. & Kim, J.S. Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res* **20**, 81-89 (2010).
240. Hutter, G. et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* **360**, 692-698 (2009).
241. Paques, F. & Duchateau, P. Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr Gene Ther* **7**, 49-66 (2007).
242. Vasquez, K.M., Marburger, K., Intody, Z. & Wilson, J.H. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8403-8410 (2001).
243. Jasin, M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet* **12**, 224-228 (1996).
244. Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6064-6068 (1994).
245. Hartlerode, A., Odate, S., Shim, I., Brown, J. & Scully, R. Cell cycle-dependent induction of homologous recombination by a tightly regulated I-SceI fusion protein. *PLoS One* **6**, e16501 (2011).
246. Takata, M. et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* **17**, 5497-5508 (1998).
247. Janssen, W.J. et al. Fas determines differential fates of resident and recruited macrophages during resolution of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **184**, 547-560 (2011).
248. Russell, D.W. AAV vectors, insertional mutagenesis, and cancer. *Mol Ther* **15**, 1740-1743 (2007).

249. Goncalves, M.A. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology* **2**, 43 (2005).
250. Kotin, R.M. et al. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2211-2215 (1990).
251. Samulski, R.J. et al. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* **10**, 3941-3950 (1991).
252. Donsante, A. et al. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* **317**, 477 (2007).
253. Nakai, H. et al. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol* **75**, 6969-6976 (2001).
254. Song, S., Laipis, P.J., Berns, K.I. & Flotte, T.R. Effect of DNA-dependent protein kinase on the molecular fate of the rAAV2 genome in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4084-4088 (2001).
255. Alexander, I.E., Russell, D.W. & Miller, A.D. DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors. *J Virol* **68**, 8282-8287 (1994).
256. Sanlioglu, S., Benson, P. & Engelhardt, J.F. Loss of ATM function enhances recombinant adeno-associated virus transduction and integration through pathways similar to UV irradiation. *Virology* **268**, 68-78 (2000).
257. Zentilin, L., Marcello, A. & Giacca, M. Involvement of cellular double-stranded DNA break binding proteins in processing of the recombinant adeno-associated virus genome. *J Virol* **75**, 12279-12287 (2001).
258. Carroll, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* **188**, 773-782 (2011).
259. Alwin, S. et al. Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. *Mol Ther* **12**, 610-617 (2005).
260. Szczepek, M. et al. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* **25**, 786-793 (2007).
261. Handel, E.M., Alwin, S. & Cathomen, T. Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. *Mol Ther* **17**, 104-111 (2009).
262. Doyon, Y. et al. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods* **8**, 74-79 (2011).
263. Miller, J.C. et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* **25**, 778-785 (2007).
264. Li, T. et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **39**, 6315-6325 (2011).
265. Yusa, K. et al. Targeted gene correction of alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* **478**, 391-394 (2011).
266. Clark, J.C. et al. Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7794-7798 (1995).
267. Ito, R., Takahashi, T., Katano, I. & Ito, M. Current advances in humanized mouse models. *Cell Mol Immunol* **9**, 208-214 (2012).
268. Hiramatsu, H. et al. Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/gammanull mice model. *Blood* **102**, 873-880 (2003).
269. Ishikawa, F. et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* **106**, 1565-1573 (2005).
270. Traggiai, E. et al. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* **304**, 104-107 (2004).

271. Rongvaux, A. et al. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat Biotechnol* **32**, 364-372 (2014).
272. Waehler, R., Russell, S.J. & Curiel, D.T. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **8**, 573-587 (2007).
273. Guo, J., Gaj, T. & Barbas, C.F., 3rd Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. *J Mol Biol* **400**, 96-107 (2010).
274. Maruyama, T. et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol* **33**, 538-542 (2015).
275. Boulaiz, H., Marchal, J.A., Prados, J., Melguizo, C. & Aranega, A. Non-viral and viral vectors for gene therapy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **51**, 3-22 (2005).
276. Rolland, A. Nuclear gene delivery: the Trojan horse approach. *Expert Opin Drug Deliv* **3**, 1-10 (2006).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. Michael Kormann bedanken. Danke, für die Möglichkeit eine so interessante und wissenschaftlich höchst anspruchsvolle Arbeit im Rahmen meiner Dissertation erarbeiten zu können. Danke auch für die produktiven Diskussionen, die zahlreichen Ideen und sein immerwährend offenes Ohr für die kleinen und großen Probleme, die die Wissenschaft mit sich bringt.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dominik Hartl für die Verantwortung des offiziellen Zweitbetreuers sowie dessen Unterstützung. Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Andreas Peschel sowie Frau PD Dr. Evi Stegmann dem Prüfungskomitee beizusitzen.

Was wäre diese Arbeit nur ohne die beste Technische Assistentin der Welt - Jennifer Rottenberger - geworden? Vielen lieben Dank für all die Hilfe und Unterstützung in den letzten Jahren, sowohl bei den kleinen als auch bei den großen Problemen wissenschaftlicher Arbeit, sowie für die zahlreichen Tipps und Tricks und noch viel, viel mehr. Es war mir eine Freude mit dir zusammenarbeiten zu können!

Ein großer Dank gilt ebenfalls Darina Siegmund für das Korrekturlesen, aber vor allem für all die Unterstützung und die netten Kaffeepausen, wann immer ein Tiefpunkt erreicht war. Danke auch an Franziska Zeyer, Philipp Reautschnig sowie Melanie Carevic, ohne die ebenfalls diese Arbeit nicht so geworden wäre, wie sie nun ist.

Martina Bakele möchte ich ebenfalls meinen großen Dank für jegliche Hilfe, sei es im Labor oder Privat, aussprechen. Ohne dich wäre diese Zeit nicht annähernd so schön gewesen und ich bin froh auf drei Jahre mit einer guten Freundin zurückblicken zu können. Am Ende des Tages bleibt nur die eine Frage offen: Von welchem Geld....

Mein größter und zugleich herzlichster Dank ist meiner Familie vorbehalten, insbesondere meiner Mutter, Yvonne Dewerth, meinem Bruder- und Schwesterherz, Christian und Jelena Dewerth. Ihr bedeutet mir unendlich viel! Ich bin froh, euch all die Jahre an meiner Seite gewusst zu haben und mir liegt nichts mehr am Herzen, als euch zutiefst für all das zu danken, was ihr für mich getan habt. Danke für all die Jahre der finanziellen, aber besonders der moralischen Unterstützung, sowie der liebevollen Anteilnahme in allen Belangen meines Lebens. Ich hab‘ euch sehr lieb!

Publikationen

[In vivo genome editing using nuclease-encoding mRNA corrects SP-B deficiency.](#)

Dewerth A, Mahiny AJ, Mays LE, Alkhaled M, Mothes B, Malaeksefat E, Loretz B, Rottenberger J, Brosch DM, Reautschnig P, Surapolchai P, Zeyer F, Schams A, Carevic M, Bakele M, Griese M, Schwab M, Nürnberg B, Beer-Hammer S, Handgretinger R, Hartl D, Lehr CM and Kormann MS.
Nat Biotechnol. 2015 Jun;33(6):584-6.

[Anti-tumor activity of sorafenib in a model of a pediatric hepatocellular carcinoma.](#)

Nagel C, Armeanu-Ebinger S, **Dewerth A**, Warmann SW and Fuchs J.
Exp Cell Res. 2015 Feb 1;331(1):97-104.

[BH3 mimetics reduce adhesion and migration of hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma cells.](#)

Vogt F, Lieber J, **Dewerth A**, Hoh A, Fuchs J and Armeanu-Ebinger S.
Exp Cell Res. 2013 Jun 10;319(10):1443-50.

[Increased efficacy of CDDP in a xenograft model of hepatoblastoma using the apoptosis sensitizer ABT-737.](#)

Lieber J, **Dewerth A**, Wenz J, Kirchner B, Eicher C, Warmann SW, Fuchs J and Armeanu-Ebinger S.
Oncol Rep. 2013 Feb;29(2):646-52.

[Effect of duplex drugs linking 2'-deoxy-5-fluorouridine \(5-FdU\) with 3'-C-ethynylcytidine \(ECyd\) on hepatoblastoma cell lines.](#)

Eicher C, **Dewerth A**, Ellerkamp V, Fuchs J, Schott S and Armeanu-Ebinger S.
Pediatr Surg Int. 2013 Feb;29(2):121-7.

[The activity of \$\gamma\delta\$ T cells against paediatric liver tumour cells and spheroids in cell culture.](#)

Hoh A, **Dewerth A**, Vogt F, Wenz J, Baeuerle PA, Warmann SW, Fuchs J and Armeanu-Ebinger S.
Liver Int. 2013 Jan;33(1):127-36.

[In vitro evaluation of the Aurora kinase inhibitor VX-680 for Hepatoblastoma.](#)

Dewerth A, Wonner T, Lieber J, Ellerkamp V, Warmann SW, Fuchs J and Armeanu-Ebinger S.
Pediatr Surg Int. 2012 Jun;28(6):579-89.

[Treatment effects of the multikinase inhibitor sorafenib on hepatoblastoma cell lines and xenografts in NMRI-Foxn1 nu mice.](#)

Dewerth A, Eicher C, Kirchner B, Warmann SW, Fuchs J and Armeanu-Ebinger S.
Liver Int. 2012 Apr;32(4):574-81.

[Development of a drug resistance model for hepatoblastoma.](#)

Eicher C, **Dewerth A**, Kirchner B, Warmann SW, Fuchs J and Armeanu-Ebinger S.
Int J Oncol. 2011 Feb;38(2):447-54.

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

NAME Marc Alexander Dewerth
GEBURTSDATUM 20. Oktober 1983
GEBURTSORT Karlsruhe
NATIONALITÄT Deutsch

SCHULBILDUNG & STUDIUMSWERDEGANG

01/2013 – HEUTE **Doktorarbeit** am Universitätsklinikum Tübingen, Abt. Pädiatrische Infektiologie und Immunologie, AG Translationale Genomik und Gentherapie, Prof. Dr. Michael Kormann

 Thema: *In vivo* Genkorrektur mittels modifizierter mRNA-Nukleasen am murinen Modell der *Surfactant* Protein-B Defizienz

10/2010 – 12/2012 **Doktorarbeit** am Universitätsklinikum Tübingen, Abt. Kinderchirurgie, Prof. Dr. Sorin Armeanu-Ebinger (abgebrochen)

 Thema: Differenzierungsmechanismen beim Hepatoblastom

10/2010 **Abschluss zum Diplom-Biologen (Note 1,0)**

12/2009 – 09/2010 **Diplomarbeit** am Universitätsklinikum Tübingen, Abt. Kinderchirurgie

 Thema: Das Hepatoblastom:
 Etablierung eines Chemoresistenzmodells *in vitro* und
 Evaluierung des Multikinaseinhibitors Sorafenib als neue
 Therapieoption

10/2009 Abschluss aller mündlichen Diplomprüfungen

 Hauptfach: Zellbiologie/Immunologie: 1,0
 Nebenfach: 1) Tierphysiologie: 1,0
 2) Pharmazie: 1,3

03/2009 – 11/2009 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Poliklinik für zahnärztliche Prothetik, Sektion Werkstoffe und Technologie, Universitätsklinikum Tübingen

09/2008 – 01/2009 **Hong Kong University (HKU)**, Hong Kong
Auslandssemester

08/2006 **Vordiplom**

2004 – 2010 Universität Tübingen: Fachrichtung Biologie

2003 – 2004 Universität Karlsruhe: Fachrichtung Mathematik/Chemie (ohne Abschluss)

1994 – 2003 Helmholtz-Gymnasium (Karlsruhe)

 Abschluss: Hochschulreife

TAGUNGEN & KONFERENZEN

11/2013	8. Retreat der Kinderklinik Tübingen, Reisingburg Poster: Designing TALENs and TALERs for genetic and epigenetic reprogramming
04/2012	American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting, Chicago Poster: Effect of Sorafenib combined with cytostatic agents on hepatoblastoma cell lines and xenografts
07/2011	Kind Philipp-Stiftung, Wilsede Vortrag: Evaluierung des Multikinaseinhibitors Sorafenib für das Hepatoblastom
07/2010	Kind Philipp-Stiftung, Wilsede Vortrag: Etablierung eines chemoresistenten Modells für das Hepatoblastom

SONSTIGE KENNTHNISSE

FREMD- SPRACHEN	Sehr gute Englisch-Kenntnisse in Wort und Schrift Grundkenntnisse in Französisch
EDV	Microsoft® Office – Paket GraphPad® Prism Geneious®
HOBBIES	Reisen Zeichnen Joggen Schwimmen