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

Andreas Laner

München, September 2004

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

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

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

Vorgelegt von Andreas Laner
München
September 2004

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

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

München, den 20.09.2004

.....

Andreas Laner

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

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS I

1 EINLEITUNG 1

2 MATERIAL UND METHODEN 13

2.1 Material 13
2.1.1 Zellen 13
2.1.2 Bakterienstämme 13
2.1.3 Plasmide und PACs 13
2.1.4 Oligonukleotide 14
2.1.5 Materialien für die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) 15
2.1.6 Enzyme 15
2.1.7 Chemikalien und andere Materialien 16
2.1.8 Kits 17
2.1.9 Längenstandards 17
2.1.10 Puffer und Lösungen 17
2.1.11 Medien und Lösungen für die Zellkultur 18
2.1.11.1 Bakterienkultur 18
2.1.11.2 Eukaryotische Zellkultur 19
2.1.12 Geräte 19
2.1.13 Verbrauchsmaterial 20

2.2 Methoden 21
2.2.1 Prokaryotische Zellkultur 21
2.2.2 Eukaryotische Zellkultur 21
2.2.3 Isolierungs- und Präparationstechniken für Nukleinsäuren 22
2.2.3.1 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien 22
2.2.3.2 DNA Isolierung aus Zelllinien 22
2.2.4 Gelelektrophorese 23
2.2.5 FISH Protokoll 23
2.2.5.1 Chromosomenpräparation: Herstellung von Metaphasenpräparaten 23
2.2.5.2 PCR-Amplifikation der DNA-Pools 25
2.2.5.3 Markieren der Sonden mittels Labeling-PCR 27
2.2.5.4 Markieren der Sonden mittels Nicktranslation 28

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

2.2.18 Datenbanken und Computerprogramme 51
2.2.18.1 Datenbanken und Internetseiten 51
2.2.18.2 Sequenzanalyse 52
2.2.18.3 Computerprogramme 52

3 ERGEBNISSE 53

3.1 Einzelne intranukleär mikroinjizierte cDNA-Reporter Gene reichen nicht aus um transiente Expression nachzuweisen 54

3.2 Multimerisierung von DNA- und Expressionsmarkern zum Nachweis niedriger Kopiezahlen *in vivo* 57
3.2.1 Multimerisierung eines EGFP-Arrays zum Nachweis transienter Expression 59
3.2.2 Multimerisierung von DNA-tags für direkten Nachweis in Modellzellen 60
3.2.2.1 Gal4-BD-Array 60
3.2.2.2 Lac-Operator-Array 63

3.3 Konstruktion verbesserter HAC Vektoren 64
3.3.1 Konstruktion des tetratelomerischen HAC Vektors pTT 66
3.3.1.1 Klonierung einer lacZ Kassette in pTAT 66
3.3.1.2 Konstruktion von pTGT 68
3.3.1.3 Konstruktion von pTT 69
3.3.2 Klonierung homogener α-sat-Arrays in pTT und pTAT-Bs 71
3.3.3 Konstruktion des CFTR-Expressionsmarkers CGT21 74

3.4 Klon- und HAC Formierungsassay 75

3.5 Der neue HAC Vektor pTT erzeugt mit den cen5 Arrays stabile grüne Kolonien und formiert HACs *de novo* 77

3.6 Werden aus transient EGFP exprimierenden Zellen stabile, HAC tragende Klone? 81

3.7 Das Expressionskonstrukt CGT21 wird exprimiert und korrekt gespleisst 82

3.8 Baktofektion von Vektoren zur Erzeugung künstlicher menschlicher Chromosomen 88
3.8.1 Baktofektion von $pTTE_1$ führt zur Bildung grüner Kolonien und *de novo* HAC Formierung 95
3.8.2 Baktofektion von CGT21 erzeugt Klone mit hoher Effizienz 97

4 DISKUSSION 99

4.1 Marker für *in vivo* Gentransfer weniger Vektormoleküle 100

4.2 pTT, ein verbesserter HAC Vektor 105

4.3 Cotransfektion: Synergismus oder additiver Effekt? 109

4.4 Klonformierung und Kopiezahl der transfizierten Konstrukte 111

4.5 CGT21 als CFTR Expressionsmodell für Zellkultur und Tiermodell 113

4.6 Bakterien, ein idealer Gentransfer Vektor? 116

4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 120

5 ANHANG 122

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 129

7 LITERATURVERZEICHNIS 131

8 PUBLIKATIONEN 139

9 LEBENSLAUF 141

DANKSAGUNG 142

1 Einleitung

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

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

Somatische Gentherapie für die CF

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

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

CF ist eine monogene, autosomal rezessive Erbkrankheit. Mit einer Inzidenz von ca. 1:2.500 Neugeborenen ist sie eine der häufigsten schweren mendelischen Erbkrankheiten bei Kaukasiern, und 3-4% der Bevölkerung sind heterozygote, symptomlose Träger eines mutierten Allels. Es sind zurzeit 1.338 Mutationen (Stand: Juni 2004) im CFTR-(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) Gen mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die Funktion des 1.480 Aminosäuren umfassenden CFTR-Proteins beschrieben (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/), wobei die Deletion des Phenylalanins an Position 508 (ΔF508) die bei weitem häufigste (ca. 70%) aller krankheitsrelevanten CF-Mutationen ist (Kerem, 1989; Bobadilla, 2002). Der Verlauf der Krankheit ist schwer und kann bis heute nur verzögert, nicht aber gestoppt werden. Betroffen sind vor allem die Atemwege aber auch andere exokrine Gewebe wie Pankreas und Darm. In den Atemwegen bildet sich aufgrund einer erhöhten Salzkonzentration und eines herabgesetzten Wassergehaltes des „airway surface fluid“ (ASF) ein abnorm visköser Schleim (lat. mucus) und ein gestörtes Flimmerepithel mit einer eingeschränkten mukoziliären Funktion („mucociliar clearance“). Der Schleim, der normalerweise Staub, abgestorbene Zellen und Mikroorganismen bindet, kann nicht mehr effizient aus den Atemwegen entfernt werden, was zu einer Obstruktion der Atemwege mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen führt. Letztlich führen chronische bakterielle Entzündungsreaktionen zu einem fortschreitenden Verlust der Lungenfunktion und häufig bis zum Ende des dritten Lebensjahrzehnts zum Tode.

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

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

Künstliche Chromosomen, ein sicheres Konzept

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

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

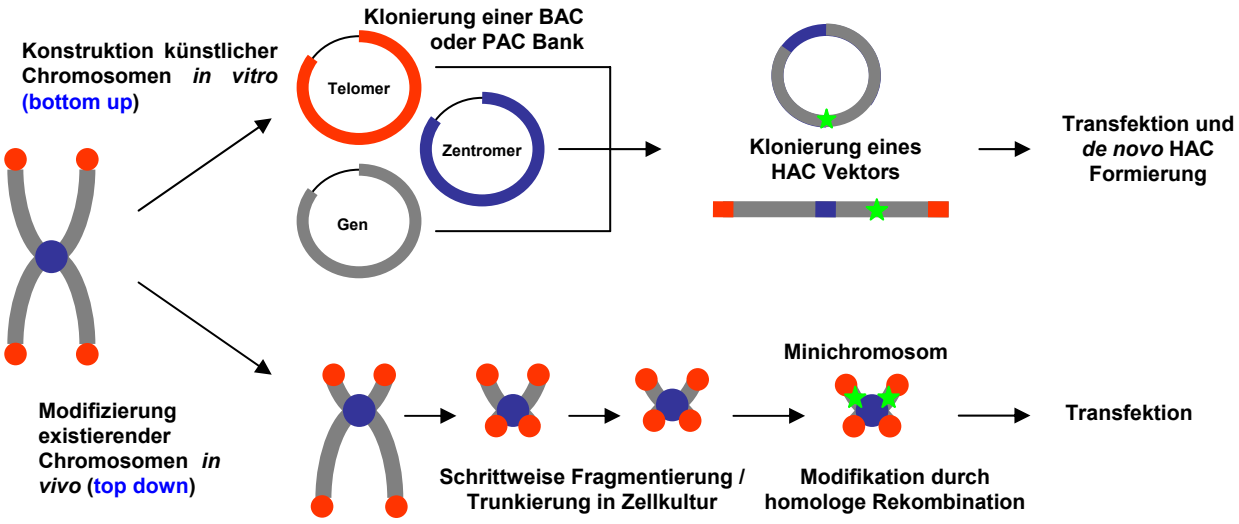


Abbildung 1: **“Top-down” und “bottom-up”.** Schematische Darstellung der beiden Methoden zur Erzeugung künstlicher Chromosomen. Der „bottom up“ Ansatz (oben) zielt auf eine *de novo*-Formierung von HACs nach Transfektion „nackter“ DNA Konstrukte aus funktionellen chromosomalen Sequenzelementen. Diese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

HAC-Technologie: MiniChromosomen, Neozentromere, Epigenetik

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

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

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

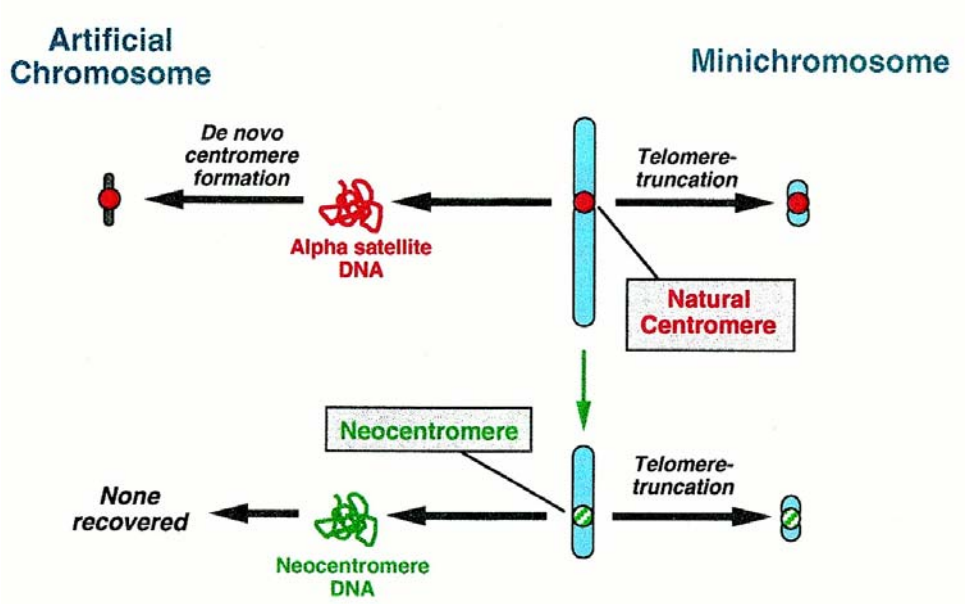


Abbildung 2: **Ein Neozentromer ist stabil, aber erlaubt keine *de novo*-Formierung** (aus Willard, 2001). Minichromosomen können aus endogenen Chromosomen und aus neozentromerischen Markerchromosomen generiert werden, weil beide die epigenetischen Merkmale für ein aktives Zentromer besitzten (rechts).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

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

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

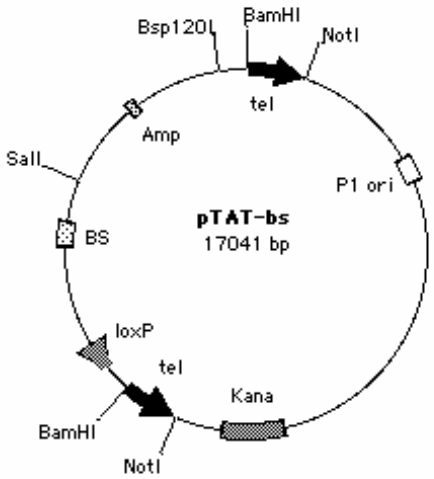


Abbildung 3: **pTAT-Bs**. Der Basis HAC Vektor pTAT-Bs wurde von Dr. Schindelhauer konstruiert um genomische Sequenzen und/oder α-sat Arrays stabil zu klonieren, und auf ihre Eignung zu testen *de novo* künstliche menschliche Chromosomen zu erzeugen. *Not I* Spaltung erzeugt ein lineares, telomerisiertes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

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

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

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

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

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

Marker als Voraussetzung für die Vektoroptimierung

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

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

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

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

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

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

In dieser Arbeit wurden folgende Markersysteme entwickelt:

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

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

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

Ein CFTR Expressionskonstrukt für die CF-Gentherapieforschung

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

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

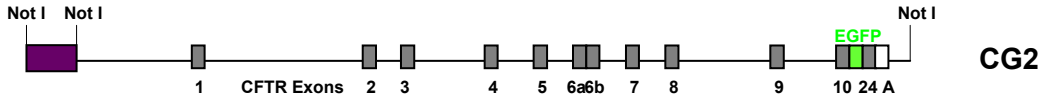


Abbildung 4: **Das CFTR-Expressionskonstrukt CG2**. Das von Sonja Cattani im Rahmen ihrer Diplomarbeit konstruierte CFTR-Expressionskonstrukt CG2 (142,5 kb) enthält den CFTR-Lokus von ca. -60 kb 5` bis Exon 10, sowie Exon 24/Poly A (A) und 2 kb der CFTR 3` Region. Das in pEGFP-N1 konstruierte synthetische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

Bakterieller Gentransfer und künstliche Chromosomen

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

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

- HT1080 (menschliche Lungen-Sarkom Zellen)
- HT1080$^-$ (HT1080 mit deletiertem HPRT-Gen)
- 16HBE14o- (immortalisierte menschliche Bronchialepithel Zellinie)
- Primäre menschliche Fibroblasten

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

2.1.2 Bakterienstämme

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

2.1.3 Plasmide und PACs

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

Name	Bemerkung	Referenz
pUC19	Klonierung, lacZ Kassette	Gibco BRL
pCLuc4	Expressionskontrolle nach Mikroinjektion	Clontech
pEGFP-N1	Klonierung, EGFP-Kassette	Clontech
pBluescript-SK+	Klonierung, blau/weiss Selektion	Stratagene
pTAT-Bs	PAC basierender, ditelomerischer HAC Vektor	Schindelhauer
pTAT-bbd	pTAT-Bs, del *Bsp* 120 I bis *Bss* H II	Schindelhauer
$pTHT_{22}$	pTAT-Bs mit ca. 95 kb HGPRT-Gen Lokus	Schindelhauer
B_2T_8	pTAT-Bs mit ca. 190 kb α-sat Array von Chr.17	Schindelhauer
pSV-dhfr 8.32	pSV-dhfr basierend, mit 32 Kopien des lac-Operators	Robinett et. al.
pTT	PAC basiernder, tetratelomerischer HAC Vektor	Diese Arbeit
$pTTF_1$	pTT mit ca. 125 kb α-sat F_1 von Chr.5	Diese Arbeit
$pTTE_1$	pTT mit ca. 116 kb α-sat E_1 von Chr.5	Diese Arbeit

pTF_1T	pTAT-Bs mit ca. 125 kb α-sat F_1 von Chr.5	Diese Arbeit
pTE_1T	pTAT-Bs mit ca. 116 kb α-sat E_1 von Chr.5	Diese Arbeit
pTGT	pTZT mit EGFP-Kassette in Bsp120I	Diese Arbeit
pTZT	pTAT-Bs mit lacZ Fragment in *Sal* I	Diese Arbeit
CGT21	CFTR-Expressionskonstrukt, auf pTAT-Bs Basis	Cattani, Laner

2.1.4 Oligonukleotide

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

Name	**Bemerkung**	**Sequenz (5´nach 3´)**
5IF	Chr.5 α-sat E_1, Hulsebos und Rocchi	GTGAGGAAACAGTCTGTTTGTC
5IR	Chr.5 α-sat E_1, Hulsebos und Rocchi	GAATCATTCTGTCTAGTTTTTATAC
17-1A	Chr.17 α-sat, Warburton, 1990	TGTTTAGTCAGCTGAAATT
17-2A	Chr.17 α-sat, Warburton, 1990	ATAACTGCACCTAACTAAACG
ABF	pTZT, ds-Oligo, fügt *Bsp* 120 I in *Apa* I (methlyiert) ein	ACCCAAAGGGCCCAAATGTGGCC
ABR	pTZT, ds-Oligo, fügt *Bsp* 120 I in *Apa* I (methlyiert) ein	ACATTTGGGCCCTTTGGGTGGCC
AmF	pTAT-Bs, Amp^R-Gen intern	TCCCTTAACGTGAGTTTTCGTT
AmR	pTAT-Bs, Amp^R-Gen intern	CCGCGCACATTTCCCCGAA
B3F	CFTR Exon 9; Beck, 1999	AATGTAACAGCCTTCTGGGAG
BemF	pTAT-Bs, BEM46-Gen (*E.coli*), zwischen Amp^R und tel	CATGCTCACGGCAATGCCGG
BemR	pTAT-Bs, BEM46-Gen (*E.coli*), zwischen Amp^R und tel	TGGCACTTTGCGTATCGTCCA
BemF1	pTAT-Bs, BEM46-Gen (*E.coli*), zwischen Amp^R und tel	GGCACTGCCAGTGAACAAACG
BemR1	pTAT-Bs, BEM46-Gen (*E.coli*), zwischen Amp^R und tel	CCAGCCTTGCAGACGAGTAC
BcF	pTAT-Bs, BS-Gen intern	TGGGAGCGGCAATTCGTACG
BcR	pTAT-Bs, BS-Gen intern	GGGTGTCTAACAGCTACAATCG
BcF2	pTAT-Bs, zeigt 10 bp del im BS-Gen	GGATAATAAACATCATGTGGGAGC
C16D	CFTR revers; Beck, 1999	GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC
DSF	pTAT-bbd, ds-Oligo, del *Sal* I	TCGAGGAGGTGGCGGTGGA
DSR	pTAT-bbd, ds-Oligo, del *Sal* I	TCGATCCACCGCCACCTCC
CL1	Alu-PCR Primer	TCCCAAAGTGCTGGGATTATTACAG
CL2	Alu-PCR Primer	CTGCACTCCAGCCTGGG
EGF	pEGFP-N1, GFP-Kassette intern	AGGGCGAGGAGCTGTTCAC
EGR	pEGFP-N1, GFP-Kassette intern	GTGCGCTCCTGGACGTAGC
GFP-AL	CFTR-Exon10-GFP revers	GAACTTCAGGGTCAGCTTG
GGF	pEGFP-N1, GFP-Kassette, *Xho* I klonierbar	CCTGATTCTCGAGATAACCGTATTACCGCCATG
GGR	pEGFP-N1, GFP-Kassette, *Xho* I klonierbar	ATAGTGGACTCGAGTTCCAAACTGGAACAACAC TC
GGRS	pEGFP-N1, GFP-Kassette, *Sal* I klonierbar	GGATAGTGGAGTCGACTTCCAAACTGGAACAAC ACTC

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

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

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

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

2.1.6 Enzyme

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

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

2.1.7 Chemikalien und andere Materialien

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

Produkt	Hersteller
Agar	Fluka
Agarose (Sea Kem)	Biozym
Agarose (Low melting point)	Gibco BRL
ATP	Sigma
β-Mercaptoethanol	Merck
Borsäure	Fluka
Brij 58	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
Chloroform	Merck
Deoxycholat	Sigma
Dextransulfat	Amersham
DMSO	Roth
Dihydrofuran	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
EGTA	Merck
Eisessig (100% Essigsäure)	Merck
Ethanol absolut (99,8%)	Merck
Ethanol vergällt (96%)	Klinikapotheke
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll 400	Amersham
Formamid (deionisiert)	Merck
Gelatine	Sigma
Glycerin (87%)	Merck
Hefeextrakt	Fluka
Hydrochinon	Sigma
Isoamlyalkohol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
LiChrosolv-H_2O	Merck
Magnesiumchlorid	Sigma
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumacetat	Merck
Natronlauge NaOH	Merck
N-Lauryl-Sarcosin	Sigma
Orange G	Sigma
Phenol (H_2O-gesättigt)	Appligene Oncor

PEG 8000	Sigma
POP6-Matrix für Sequenzierautomaten	Applied Biosystems
Puffer für Sequenzierautomaten	Applied Biosystems
Salzsäure (32% HCl)	Merck
Sephadex G50	Amersham
Sodium-Dodecy-Sulfat (SDS)	Serva
Spermidin	Sigma
Titriplex III (EDTA)	Merck
Triton X-100	Sigma
Tri-Natrium-Citrat ($Na_3C_6H_5O_7$ x 2 H_2O)	Merck
Tris-HCl	USB
Trypton/Pepton	Fluka
Tween 20	Merck
Xylencyanol	Merck
Zinkchlorid	Sigma

2.1.8 Kits

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

2.1.9 Längenstandards

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

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

2.1.10 Puffer und Lösungen

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

- Auftragspuffer (25% Ficoll in 10 mM Tris, pH 7,4; 1 mM EDTA; 1 Spatelspitze Orange G, Bromphenolblau oder Xylencyanol)
- ATP (100 mM; in autoklaviertem Aqua bidest.; -20°C)
- DTT (Dithiothreitol) (1 M; 4°C)
- EC-Lysis (6 mM Tris, pH 7,4; 1 M NaCl; 100 mM EDTA, pH 7,8; 0,5% Brij 58; 0,2% Deoxycholat; 0,5% N-Lauroyl-Sarkosin)
- EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)
- Kaliumchlorid-Lösung (1 M KCl)
- Magnesiumchlorid-Lösung (1 M $MgCl_2$)
- Natriumacetat (3 M NaOAc, pH 5-5,4)
- Natriumchlorid-Lösung (5 M NaCl)
- Natronlauge (10 M NaOH)
- NDS (0,5 M EDTA, pH 9; nach Autoklavieren 1% N-Lauroyl-Sarkosin)
- Pett IV (10 mM Tris, pH 7,4; 1 M NaCl)
- Proteinase K (10 mg/ml; in autoklaviertem Aqua bidest.; sterilfiltrieren; -20°C)
- RNase A (10 mg/ml; in autoklaviertem Aqua bidest.; -20°C)
- Salzsäure (1 M HCl)
- Tris-HCl (1 M)
- 10x PBS (Gibco BRL)
- 20% SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)
- 20x SSC (3 M Natriumchlorid; 0,3 M Natriumcitrat)
- 10x STE (1 M NaCl; 10 mM Tris, pH 8,3; 10 mM EDTA, pH 8,3; -20°C)
- 50x TAE-Puffer(2 M Tris; 1 M Eisessig; 50 mM EDTA)
- 10x TBE-Puffer(900 mM Tris; 900 mM Borat; 20 mM EDTA; pH 8)
- 1x TE-Puffer (10 mM Tris, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 7,8)
- TTE (0,1% Triton X-100, 20 mM Tris, pH 8,3; 2 mM EDTA, pH 7,8)
- SE-Puffer (75 mM NaCl; 25 mM EDTA, pH 8,0 mit NaOH einstellen)

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

2.1.11 Medien und Lösungen für die Zellkultur

2.1.11.1 Bakterienkultur

LB_0-Medium: 10 g Trypton/Pepton; 5 g Hefeextrakt; 10 g Natriumchlorid auf 1 l Aqua dest.; sofort autoklavieren; für LB_0 –Agar 1 l Medium mit 20 g Agar versetzen, dann autoklavieren

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

2xYT-Medium: 17 g Trypton/Pepton; 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 l Aqua dest.; mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und sofort autoklavieren; für LB_0 –Agar 1 l Medium mit 20 g Agar versetzen, dann autoklavieren

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

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

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

2.1.11.2 Eukaryotische Zellkultur

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

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

2.1.12 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Schütt
Brutschrank Bakterienkultur	National Appliance
Brutschrank eukaryotische Zellkultur (CO_2-begasbar;)	Hereus
CCD-Kamera „Cell Cam Color-TWAIN“	Klughammer; Phase
Elektroporationsapparat „Gene Pulser II“	BioRad
Elektrophoresekammern	BioRad und Hauswerkstatt
Elektroelutionssystem „BioTrap BT1000“	Schleicher & Schuell
Heizblock	Liebisch
Kamera Gelphotos „EASY 429K“	Herolab

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

2.1.13 Verbrauchsmaterial

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

2.2 Methoden

2.2.1 Prokaryotische Zellkultur

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

2.2.2 Eukaryotische Zellkultur

Kultivierung

HT1080 Zellen und primäre Fibroblasten wurden in DMEM-Medium kultiviert, 16HBE14o- Zellen in MEM-Medium. Supplementiert wurden beide Medien mit 10% FCS und 1-2% PenStrept. Die Zellen wurden bei 37°C, 10% CO_2 und 80% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Abhängig vom Zellwachstum erfolgte in Abständen von 1-3 Tagen ein Austausch des Mediums bzw. ein Umsetzen (Splitten) der Zellen. Dazu wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen und mit Typsin (ca. 0,5-1 ml bei T25-Zellkulturflaschen (25 cm^2) und 2 ml bei T75-Zellkulturflaschen (75 cm^2)) für ca. 5-10 min inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen (Kontrolle unter dem Inversionsmikroskop) wurde das Trypsin durch Zugabe von Medium (5 ml bei T25 bzw. 10 ml bei T75) inaktiviert. Je nach Zelltyp und Anwendung wurden 0,5 bis 2 ml des Ansatzes in eine neue Zellkulturflasche mit Medium überführt.

Zellen einfrieren

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

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

Zellen auftauen

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

Fixieren der Zellen für die Immunfärbung

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

2.2.3 Isolierungs- und Präparationstechniken für Nukleinsäuren

2.2.3.1 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien

Präparative Plasmidisolierung nach alkalischer Lyse

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

Schnellpräparation von Plasmid-DNA für Kolonie-PCR

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

2.2.3.2 DNA Isolierung aus Zelllinien

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

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

2.2.4 Gelelektrophorese

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

2.2.5 FISH Protokoll

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

2.2.5.1 Chromosomenpräparation: Herstellung von Metaphasenpräparaten

Colcemid-Behandlung

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

Trypsin-Behandlung

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

Hypotone Behandlung

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

- Pellet mit Pasteurpipette kurz resuspendieren
- 8 ml Natriumcitrat (0,8% in H_2O, auf 37°C vorgewärmt) vorsichtig zugeben, resuspendieren und mit Glaspipette in ein 15 ml Falkonröhrchen überführen
- 40 min im 37°C Wasserbad inkubieren und dann bei 1.200 U/min zentrifugieren
- Überstand bis auf ca. 1 ml absaugen

Fixierung

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

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

Auftropfen und Lagerung

Der Ansatz wird mit einer Pasteurpipette auf H_2O-benetzte Objektträger aufgetropft (aus ca. 30-50 cm Höhe), wobei die Metaphasen-Zellkerne platzen und die kondensierten Chromosomen auf dem Objektträger fixiert werden. Die Objektträger wurden zuvor über Nacht in 100% Ethanol gewaschen und anschliessend in Aqua bidest. auf Eis inkubiert. Nach dem Auftropfen werden die Objektträger luftgetrocknet.

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

RNase-Behandlung

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

Pepsin-Behandlung

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

Denaturierung der Objektträger

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

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

2.2.5.2 PCR-Amplifikation der DNA-Pools

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

Sonde	**Amplifikation des DNA Pool (Primer)**	**Markierung**:	**Nachweis**:
CFTR	Inter-Alu-PCR (CL1/CL2)	Cy5-dUTP	Direkt
HGPRT	Inter-Alu-PCR (CL1/CL2)	Cy5-dUTP	Direkt
cen5 F_1	PCR (5IIF/R)	Digoxigenin-11-dUTP	Sheep-Anti-Dig-FITC
cen5 E_1	PCR (5IF/R)	Digoxigenin-11-dUTP	Sheep-Anti-Dig-FITC
cen17	PCR (17-1A/2A)	Digoxigenin-11-dUTP	Sheep-Anti-Dig-FITC
E.coli	DNA-Präparation	Nicktranslation mit Biotin	Avidin-Cy3.5
RsF-Vektor	PCR (RsF)	Biotin-16-dUTP	Avidin-Cy3.5

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

CFTR- und HGPRT-Sonde:

Um Sonden für das CFTR- bzw. HGPRT-Gen zu generieren wurde eine inter-Alu-PCR mit dem Primerpaar CL1/CL2 (50°C) durchgeführt. Als Ausgangs-DNA dienten die PAC Konstrukte CGT21 (CFTR) und $pTHT_{22}$ (HGPRT), welche jeweils genomische DNA der entspechenden Gene tragen. Der inter-Alu-PCR Ansatz amplifiziert DNA Fragmente zwischen Alu Sequenzen („Alu repeats"). „Alu repeats" sind ca. 300 bp lange Sequenzen, die relativ gleichmässig über die nichtkodierenden Bereiche des gesamten menschlichen Genoms verteilt sind und ca. 5-

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

Zentromer-Sonden Chr.5 und Chr.17:

Um spezifische Sonden der Zentromere von Chromosom 17 und 5 zu synthetisieren wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden 17-1A/17-2A, 5IF/5IR und 5IIF/5IIR (alle 60°C) durchgeführt. Als Template dienten die PAC Konstrukte B_2T_8 (enthält ca. 190 kb eines α-sat Arrays von Chr.17), „E_1" (enthält ca. 116 kb des α-sat Arrays Typ I von Chr.5) und „F_1" (enthält ca. 125 kb des α-sat Arrays Typ II von Chr.5). Da die verwendeten Primer für die jeweilige α-sat-Familie spezifisch sind und Arrays verschiedener Chromosomen oft nur 60-90% Sequenzhomologie aufweisen, können Sonden erzeugt werden, welche nur geringe Kreuzhybridisierung mit anderen α-sat Repeats zeigen. Die PCR-Produkte wurden über QIAGEN-Säulen gereinigt und in die Labeling-PCR eingesetzt.

Vektor-Sonde:

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

Stocklösung	**Menge in µl**	**Endkonzentration**
DNA-Pool	1	
10x PCR Puffer	5	1x
50 mM $MgCl_2$	2	2 mM
5 mM dNTP´s	2	0,2 mM
100 µM Primer F	1	2 µM
100 µM Primer R	1	2 µM
Taq-Polymerase	0,3	1,5 U
Aqua bidest.	37,7	

Die Bedingungen der PCR waren wie folgt:

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

2.2.5.3 Markieren der Sonden mittels Labeling-PCR

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

Digoxygenin / Cy5

Stocklösung	**Menge in µl**	**Endkonzentration**
10x PCR Puffer	5	1x
50 mM $MgCl_2$	2	2 mM
5 mM AGC-Mix	2	0,2 mM
5 mM dTTP	1	0,1 mM
1 mM Dig / Cy5	5	0,1 mM
100 µM Primer F	1	2 µM
100 µM Primer R	1	2 µM
Aqua bidest.	30,6	
Taq-Polymerase	0,4	1U
DNA-Pool	2	

Biotin

Stocklösung	**Menge in µl**	**Endkonzentration**
10x PCR Puffer	5	1x
50 mM $MgCl_2$	2	2 mM
5 mM AGC-Mix	2	0,2 mM
5 mM dTTP	1,5	0,15 mM
1 mM Bio	2,5	0,05 mM
100 µM Primer F	1	2 µM
100 µM Primer R	1	2 µM
Aqua bidest.	32,6	
Taq-Polymerase	0,4	1U
DNA-Pool	2	

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

2.2.5.4 Markieren der Sonden mittels Nicktranslation

Um ein Sonde aus *E.coli* DNA zu generieren, wurde genomische *E.coli* DNA aus 100 ml LB_0-Kultur nach der Methode von Jones und Bartlet (Sambrook, 1989) präpariert und durch Nicktranslation mit Biotin markiert.

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

2.2.5.5 DNase I Verdau

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

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

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

2.2.5.6 Fällung

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

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

2.2.5.7 Hybridisierung

Mastermix: 40% Dextransulfat in 4x SSC

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

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

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

2.2.5.8 Nachweis

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

1) 4x SSC / 0,2% Tween-20 — 3 x 5 min waschen
   42°C Wasserbad

2) 1x SSC — 3 x 5 min waschen
   60°C Wasserbad

3) 4x SSC / 0,2% Tween-20 — kurz eintauchen
   42°C Wasserbad

4) Blocking Lösung (3% BSA) 5 ml 4x SSC / 0,2% Tween-20 / 150 mg BSA	1 ml pro Slide 30 min feuchte Kammer 37°C
5) 4x SSC /0,2% Tween-20 45°C Wasserbad	kurz eintauchen
6) Antikörper Stammlösung (1% BSA) 4 ml 4x SSC / 0,2% Tween-20 / 50 mg BSA Antikörper in entsprechender Verdünnung	45 min, feuchte Kammer 37°C
7) 4 x SSC / 0,2%Tween-20 42°C Wasserbad	3 x 5 min waschen
8) DAPI 1 µl DAPI in 10 ml 4x SSC / 0,2% Tween-20	3 min bei RT

9) Antifade

mit Aqua dest. abspülen, lufttrocknen und mit 35 µl Antifade eindeckeln

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

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

2.2.5.9 Auswertung der Metaphasen

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

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

2.2.6.1 Standard-PCR

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

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

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

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

2.2.6.2 Reinigung von PCR-Produkten

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

2.2.7 DNA-Sequenzierung

Sequenzreaktion

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode. In die Sequenzreaktion wurden 50-100 ng gereinigtes PCR-Produkt bzw. 0,4-2 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Zur doppelsträngigen DNA-Matritze wurden 2 µl BigDye™ Terminator Mix, 16 pmol Primer und ddH_2O bis auf ein Gesamtvolumen von 10 µl zugegeben. Der Sequenzansatz wurde für Vorwärts- (F) und Rückwärts- (R) Primer jeweils getrennt angesetzt. Bei PCR-Fragmenten wurden die zur Amplifikation verwendeten Primer oder nested Primer in die Sequenzreaktion eingesetzt. Die Sequenzreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

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

Fällung der Sequenzierungsprodukte

Nach Beendigung der zyklischen Sequenzierungsreaktion wurden die Reaktionsprodukte ausgefällt. Zu 10 µl Sequenzreaktionsansatz wurden 25 µl Ethanol absolut zugegeben, 15 min bei RT inkubiert und 30 min bei RT zentrifugiert (13.000 rpm). Nach einem Waschschritt mit 125 µl 70% -igem Ethanol (10 min, RT, 13.000 rpm) wurde die präzipitierte DNA bei RT luftgetrocknet und in 25-80 µl LiChrosolv-H_2O (Merck) gelöst.

Sequenzanalyse

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

2.2.8 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.8.1 Restriktionsendonukleasespaltung

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

2.2.8.2 Dephosphorylierung von 5´-Enden

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

Vektor DNA	100 µl
10x AP Puffer	20 µl
AP	2 µl
ddH_2O	78 µl

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

2.2.8.3 Phosphorylierung von 5´-Hydroxyl-Enden

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

ds-Oligo	10 µl
10x PNK Puffer	3 µl
ATP (100 mM)	1 µl
Polynukleotid Kinase	1 µl
ddH_2O	16 µl

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

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

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

2.2.8.5 Ligierung

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

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

2.2.9 Klonierung

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

2.2.9.1 Kompetente Bakterien

Kompetente Bakterienzellen wurden entweder frisch vom Hersteller bezogen (ElectroMAX DH10B) und laut Vorschrift eingesetzt (für Klonierungen von langer DNA bzw. Klonierungen mit erwarteter geringer Effizienz), oder selbst aus einem Glycerinstock gezogen: 10 µl Glycerinkultur der Bakterienstämme wurden in 6 ml LB-Medium (oder BHI-Medium, im Falle von Transferbakterienstämmen) über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37°C und 250 U/min angezogen. Nach 12 h wurden die Bakterien auf Eis in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefässe überführt und im Kühlraum 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 1 ml eiskaltem Aqua bidest. resuspendiert und 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Die kompetenten Bakterienzellen wurden in Aliquots bei –70°C gelagert (in 10% Glycerin) oder sofort elektroporiert. Die Kontrolle der Effizienz der Kompetenzinduktion erfolgte durch Bestimmung der Transformationsrate nach Transformation von 250 ng bis 1 µg zirkulärer pUC19 Plasmid DNA und führte bei den von Gibco BRL bezogenen DH10B optimalerweise zu $1x10^8$ – $1x10^{10}$ Einzelkolonien. Die Transformationseffizienz der selbst gezogenen, kompetenten Bakterien lag üblicherweise um den Faktor 10^2-10^3 niedriger.

2.2.9.2 Transformation mittels Elektroporation

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

Ansatz in 1 ml SOC-Medium für 1 h bei 37°C auf dem Rad inkubiert. Zum Ausplattieren auf Selektionsagar wurden die Bakterien abzentrifugiert und in ca. 150 µl LB_0-Medium resuspendiert. Davon wurden dann verschieden Mengen (1, 10, 100 µl) auf Selektivagar-platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.10 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

[α^{32}P]-dATP (370 MBq/ml, 10 mCi/ml, Amersham Pharmacia Biotech)
BSA (10 mg/ml, Sigma)
Klenow Fragment, exonukleasefreie DNA-Polymerase (10 U/µl, USB)
OLB A (oligo labelling buffer): Gemisch aus Lösungen A, B und C im Verhältnis 1:2,5:1,5
Lösung 0: 1,25 M Tris-HCl (pH 8,0), 125 mM $MgCl_2$
Lösung A: 1 ml Lösung 0,18 µl β-Mercaptoethanol, je 5 µl 0,1 M dCTP, dGTP, dTTP
Lösung B: 2 M HEPES (Sigma), mit NaOH auf pH 6,6
Lösung C: Zufallsprimer (5'-pd$(N)_6$-Oligonukleotide, Amersham Pharmacia Biotech) in TE-Puffer pH 7,6; EK 90 OD_{260} U/ml
Salmon Testis DNA (10 mg/ml, Sigma)
Sephadex G50 (Amersham Pharmacia Biotech)
TES-Puffer (pH 7,5): 20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,25% SDS, 0,25% (w/v) Bromphenolblau (Sigma)

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

2.2.11 Hybridisierungs-, Wasch- und Nachweisbedingungen

Prähyb-Mix:	1,5x SSPE, 1% SDS, 0,5% Magermilchpulver
20x SSPE:	3,6 M NaCl, 0,2 M Na_2HPO_4, 0,2 M EDTA; pH 7 mit Phosphorsäure
Hyb-Mix:	1,5x SSPE, 1% SDS, 0,5% Magermilchpulver, 10% Dextransulfat
Waschlösung 1:	2x SSC, 0,1% SDS
Waschlösung 2:	0,5x SSC, 0,1% SDS
Waschlösung 3:	0,1x SSC, 0,1% SDS

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

2.2.12 Molekularbiologische Methoden für das Arbeiten mit langer DNA

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

2.2.12.1 Präparation von PAC DNA in Agarosegelplugs

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

2.2.12.2 Herstellung der Agaroseplugs

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

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

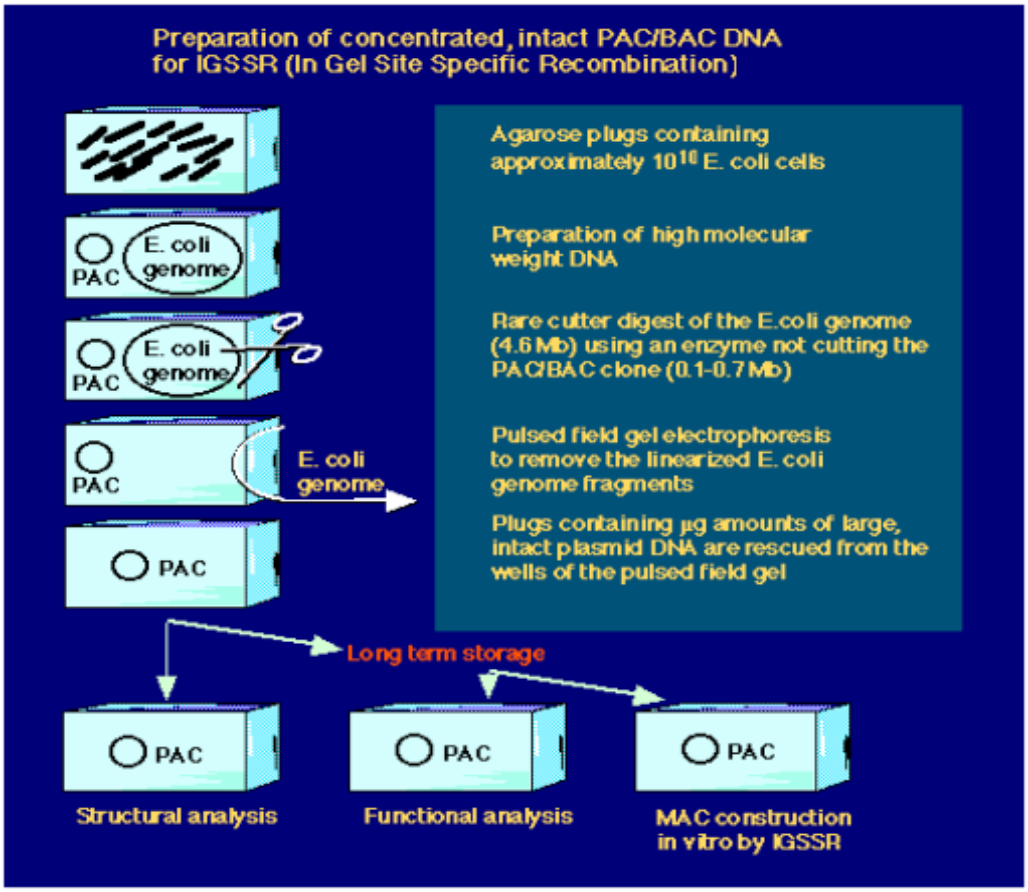


Abbildung 5: **Präparation langer DNA in Agaroseblöckchen** (Schindelhauer, 1997). Bakterien, welche den gewünschten PAC enthalten, werden in LMP-Agaroseplugs (BxHxT, 10x5x1 mm) gegossen und mit Lysozym behandelt, um die *E.coli* Zellwand zu zerstören. Nachfolgende Waschschritte mit NDS und Proteinase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

2.2.12.3 Lysozymbehandlung

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

2.2.12.4 Proteinase K Behandlung

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

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

2.2.12.5 Reinigung der Plugs

Prä-Restriktionsreinigung:

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

Asc I Reinigung:

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

2.2.12.6 Präparation chromosomaler DNA in Agaroseplugs

Um Zelllinien nach Transfektion auf Anwesenheit der transferierten DNA Konstrukte zu testen, wurden die Zellen trypsiniert, abzentrifugiert und in 10 ml PBS resuspendiert. Nach Auszählung in einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen abzentrifugiert, im entsprechenden Volumen PBS resuspendiert, mit 2% -iger LMP-Agarose 1:1 (Wasserbad 42°C) vermischt und in „Plug-Molds“ (BioRad) gegossen, sodass pro Plug (100 µl) 10^6 Zellen enthalten waren. Die Plugs wurden zwei Tage in NDS/Proteinase K bei 50°C sowie für weitere 3-5 Tage in NDS bei RT inkubiert. Nach Spaltung mit einem geeigneten Restriktionsenzym (*Not* I oder *I-Sce* I) wurden die Plugs auf ein 1% -iges PFG geladen und die DNA mit geeigneten Laufbedingungen (20 kb bis 1.5 Mb) aufgetrennt. Das PFG konnte anschliessend per Southern-Blot mit einer geeigneten Sonde analysiert werden.

2.2.12.7 Spaltung langer DNA in Agaroseplugs

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

2.2.12.8 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

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

Standard-PFGE

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

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

Präparative PFGE

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

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

Prä- und Post-Asc PFGE

Prä-Restriktionsreinigung:

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

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

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

„Post-Asc“ PFGE

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

2.2.12.9 Klonierung mit PACs

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

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

2.2.12.10 Elektroelution von langer DNA aus Agarose

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

2.2.12.11 Ligierung

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

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

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

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

2.2.12.12 Elektroporation

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

2.2.13 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion ist eine Technik, mit der DNA oder Proteine direkt in Cytoplasma bzw. Nucleus einer Zelle injiziert werden können (Überblick: EMBO Protocoll Practical Course „Microinjection and Detection of Probes in Cells", 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde sie dazu verwendet, Plasmide bzw. cDNA-Kassetten von Reporter-Genen (EGFP, LUC) und PAC Konstrukte (B_2T_8, $pTTE_1$) in die Kerne menschlicher Zellen zu injizieren. Alle Lösungen wurden vor der Injektion für 15 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, um Kontaminationen zu sedimentieren und verstopfen der Spitze zu vermeiden. Die Zellen wurden mindestens 24 h vor Injektion in 1-Kammer-Objektträger bzw. Gewebekulturschalen ausgesät, sodass zum Zeitpunkt der Injektion eine Konfluenz von ca. 70-90% erreicht war. Die Zellen wurden kurz vor der Injektion mit frischem Medium (ohne Antibiotika) gewaschen und mit einem Eppendorf Transjector 5246, Micromanipulator 5171, und Injectman, welche an ein Zeiss Axiovert 10 Mikroskop angeschlossen waren, injiziert. Bilder wurden an einem Zeiss Axiovert 25 Mikroskop mit einer Klughammer „Cell Cam Color-TWAIN" Digital Kamera aufgenommen und mit der Software Axio-Vision 2.0 sowie Photoshop 5.0 verarbeitet. Um Schwankungen des Injektionsvolumens zu minimieren wurden standardisierte Injektionsnadeln (Femtotips II von Eppendorf; Durchmesser der Austrittsöffnung: 0,5 µm +/- 0,2 µm) verwendet. Die Einstellungen der Mikroinjektionsanlage waren wie folgt:

Injektionsdruck:	120 hPa
Injektionszeit:	0,3 sec

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

2.2.13.1 Mikroinjektion von Reporter-Genen

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

Um die Wiederfindung injizierter Zellen zu ermöglichen, wurden auf die Unterseiten der 1-Kammer-Objektträger Markierungen (Punkte, daneben die verwendete Verdünnung) mit einem wasserfesten Stift angebracht, von denen aus in eine Richtung exakt je 100 Zellen, mit der entsprechenden Verdünnung, injiziert wurden. Verdünnungen (10^5 bis 1 Molekül pro pl Injektionsvolumen) von pEGFP-N1 wurden in TE mit pUC19 Plasmid ($2x10^5$ Moleküle pro pl) als nicht exprimierende Träger-DNA (um die Viskosität und Plasmidkonzentration konstant zu halten, und um den Verlust von Reporter-Plasmiden durch Assoziation mit Oberflächen zu minimieren) angesetzt. Als weitere Kontrolle für alle erfolgreich injizierten Zellen, wurde allen Verdünnungen $2x10^4$ Moleküle des Plasmids pCLuc4 pro pl zugefügt, welches per Immunfärbung nach Fixierung der Zellen detektierbar war. Um die DNA-Konzentration vor der Injektion zu überprüfen, wurden die Verdünnungen 1:1.000 in Hefe t-RNA (konstant 50 ng/ml; als DNA-Träger) verdünnt und 1 µl davon in eine PCR mit dem Primerpaar EGF/R eingesetzt. Diese PCR gab gewöhnlich positive Resultate ab einer Grenze von 1-10 Molekülen pro Reaktionsansatz (Abb. 7, S. 54). Für manche Versuche wurden Zellen in verschiedenen Stadien des Zellzyklus geblockt. So wurde zum einen der Replikations-Hemmer L-Mimosine verwendet (Zugabe von 500-800 µM L-Mimosine für 10-12h) um die Zellen in der S-Phase des Zellzyklus zu blocken (Hughes, 1996; Krude, 1999), andererseits wurden die Zellen durch „Serum-starvation“ (Inkubation in Medium ohne Serum für 20 h) künstlich in der G1-Phase gehalten, und dann mikroinjiziert. Die Plasmid Verdünnungen wurden, wie oben beschrieben, entlang einer imaginären Linie von den Markierungen ausgehend in die Kerne von 100 Zellen injiziert und die Fluoreszenz nach verschiedenen Zeitpunkten (2-16 h) unter dem Mikroskop bestimmt.

2.2.13.2 Mikroinjektion von künstlichen Chromosomenkonstrukten

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

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

2.2.14 Lipofektion

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

Protokoll:

- Zellen mit PBS waschen und in 2-3 ml OptiMEM I inkubieren (Brutschrank)
- Lösung A: 190 µl OptiMEM I + 10 µl Lipofectamin, gut mischen und 30 min bei RT inkubieren (zur Ausbildung der Liposomen)
- Lösung B (nach 25-minütiger Inkubation von Lösung A): 0,5-500 ng DNA (vorher 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren um Kontaminationen zu sedimentieren) mit OptiMEM I auf 200 µl auffüllen und nach 5 min Inkubation bei RT mit Lösung A vermischen (vorsichtig mit 3 ml Transferpipette)
- Transfektionsmix 5 min bei RT inkubieren und gleichmässig auf die Zellen auftropfen
- Inkubation für 12-16 h im Brutschrank (37°C, 10% CO_2)
- Transfektionsmix gegen Vollmedium (ohne Selektion) tauschen und für 12-24 h inkubieren
- Dannach konnten der Transfektionsansatz auf Selektionsmedium gesetzt werden, um stabile Zellklone zu erzeugen. Es wurde immer ein Kontrollansatz ohne DNA mitgeführt.

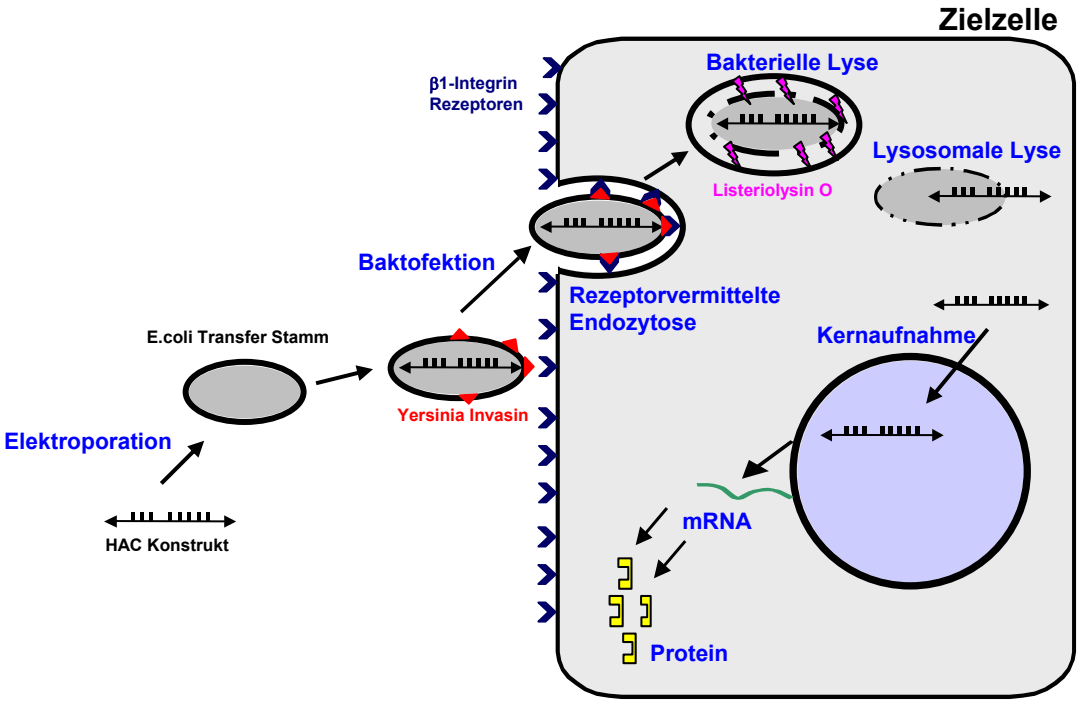
2.2.15 Baktofektion

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

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

Baktofektion Protokoll

- Elution der DNA aus 1/2 Agaroseplug mittels Agarase-Behandlung (Plug in 200 µl Aqua bidest. 65°C für 10 min; + 1 µg/ml Agarase und 1 h bei 40°C inkubieren)
- Elektroporation (vgl. 2.2.12.12): 1, 3 und 5 µl DNA in 20 µl elektrokompetente Transferbakterien + 60-80 µl Aqua bidest.
- Selektion von Transformanden auf BHI-Agar (mit dap/Amp/Kana) über Nacht bei 37°C
- Test der Klone auf STS-Marker per Kolonie PCR (vgl. 2.2.3.1)
- Positive Klone in 50 ml flüssig BHI-Kultur (dap/Amp/Kana/Spect) animpfen, Inkubation auf Schüttler bei 30°C über Nacht; Transferbakterien in log-Phase (OD_{600} ca. 0,7-1,0) ernten
- Zentrifugation von 40 ml der Transferbakterien (13.000 rpm, 15 min) und Präparation von Agaroseplugs (vgl. 2.2.12.2; zur nachträglichen Kontrolle auf Intaktheit des Konstruktes)
- Restliche Transferbakterien abzentrifugieren und in DMEM (+ 0,5 mM dap) resuspendieren Die Konzentration von Bakterien in Medium betrug zwischen $5x10^6$ und $2,5x10^7$ pro ml
- Zugabe der Bakterien auf HT1080 Zellen (MOI von 2 bis 20.000) für 2 h bei 30°C
- Platten 3 x mit DMEM waschen (+ 20 µg/ml Gentamycin) und Inkubation für 30 min, 37°C in DMEM (10 % FCS; 50 µg/ml Gentamycin) um evtl. Kontaminationen zu vermeiden
- Inkubation für 2 Tage in DMEM (10 % FCS; 20 µg/ml Gentamycin) und Selektion für ca. 2 Wochen mit Blasticidin-S (vgl. 2.2.16)



Die in dieser Arbeit beschriebenen Baktofektionen wurden von mir im Labor von Prof. Patrice Courvalin am Institut Pasteur („Unite des Agents Antibacteriens“) in Paris durchgeführt. Es wurde der dap auxotrophe *E.coli* K12 Stamm BM2710-pGB2Ω *inv-hly* verwendet, welcher die Gene *inv* und *hly* auf dem nicht-autotransferierenden „low-copy“ Plasmid pGB2 trug. Als Transfer DNA wurden die PAC Konstrukte B_2T_8, $pTTE_1$ und CGT21 eingesetzt, um zu prüfen ob die Konstrukte ohne vorherige Isolierung direkt in Zellen transfiziert werden können und um zu prüfen ob die Methode geeignet ist *de novo* HACs zu formieren. Die zirkulären Konstrukte befanden sich in Agaroseblöckchen welche *Asc* I gespalten, NDS/Proteinase K behandelt und per PFGE gereinigt wurden. Kurz vor der Elektroporation in den Transferstamm wurden die Konstrukte per Agarase aus den Blöckchen gelöst. Die HT1080 Zellen wurden am Tag vor dem Transfer in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät, sodass sie am Tag der Baktofektion zwischen 60-90% Konfluenz erreicht hatten.

FACS-Analyse

Um die Expression des EGFP-Markers von $pTTE_1$ nach der Baktofektion zu messen, wurden die Zellen mittels „Fluorescence-Activated Cell Sorting“ (FACS) analysiert. Dazu wurden die Zellen trypsiniert, einmal mit PBS (+ 3% FCS) gewaschen, im gleichen Medium zu 10^6 Zellen/ml resuspendiert und $3x10^6$ Zellen per FACS („FACScan Flow Cytometer“ mit „CellQuest“ Software; Becton-Dickinson) analysiert.

2.2.16 Erzeugung stabiler Zellklone

Zur Erzeugung stabiler, eukaryotischer Zellklone wurden zwei unterschiedliche Selektionsmarker auf den DNA Konstrukten verwendet. So enthielten alle Konstrukte im pTAT Anteil, auf dem alle Vektoren basieren, das Gen BS (kodiert für das Enzym Blasticidin-S-Deaminase, zur Selektion auf Blasticidin-S). Ein weiterer Selektionsmarker stand bei Transfektionen mit dem Konstrukt $pTHT_{22}$, welches den menschlichen HGPRT-Gen Lokus enthält, zur Verfügung. Das HGPRT-Gen kodiert für das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, welches am „salvage-pathway" (Wiederverwertungsweg) des Purinnukleotid Abbaus beteiligt ist (Stryer, 1995) und bei Patienten, welche am Lesh-Nyhan-Syndrom erkrankt sind, mutiert ist. Das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase katalysiert die Reaktionen von Hypoxanthin zu Inosinat und Guanin zu Guanylat, welche daraufhin erneut in die Nukleotidsynthese eingeschleust werden können.

Hypoxanthin + PRPP → **Inosinat + PP_i**

Guanin + PRPP → **Guanylat + PP_i**

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

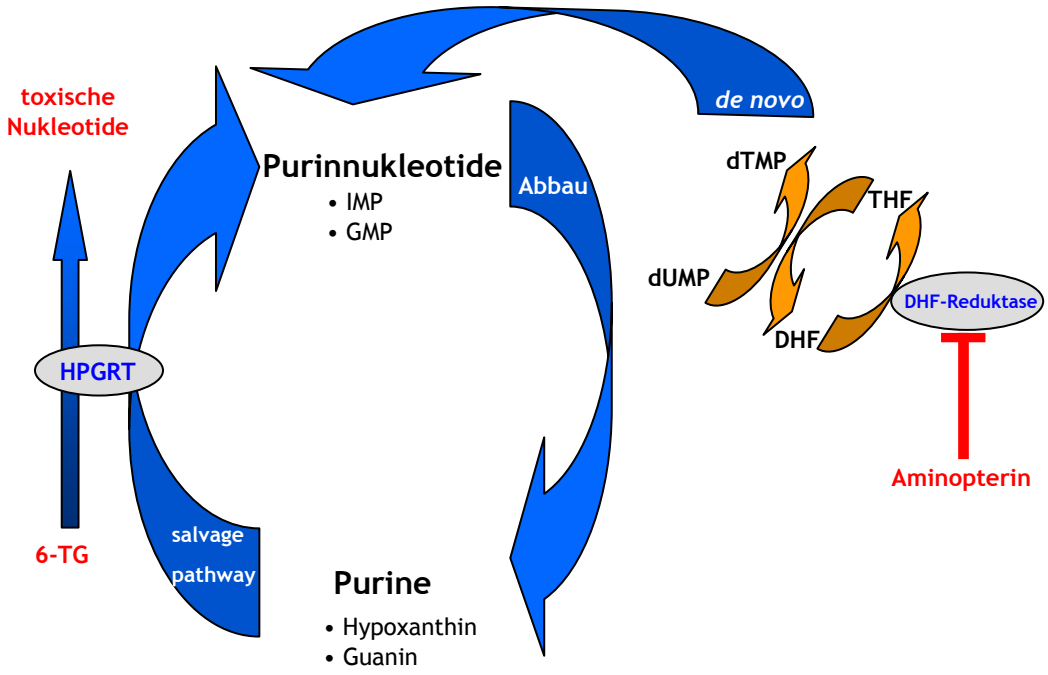


Abbildung 6: **Schematischer Überblick über die Rolle von HGPRT bei der Purinnukleotid Biosynthese**. Wenn das HGPRT-Gen deletiert oder mutiert ist, können Zellen nicht mehr auf den „salvage pathway", der Wiederverwertung von Purinen für die Purinnukleotid-Synthese, zurückgreifen. Neue Purinnukleotide,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

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

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

2.2.17 Immunfärbung

Nach Fixierung mikroinjizierter Zellen konnte mittels Immunfärbung gegen das Luciferase-Protein die Rate an erfolgreich injizierten und exprimierenden Zellen bestimmt werden. Da das Plasmid pCLuc4 in allen Verdünnungen in hoher Konzentration (ca. $2x10^4$ Moleküle pro

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

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

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

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

Immunfärbung Protokoll

- Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd (in PBS) für 30 min bei 4°C
- Objektträger 3 x kurz mit PBS waschen
- Inkubation in 0,3% H_2O_2 in Methanol für 2 x 10 min, um endogene Peroxidasen zu „quenchen“, dann 2 x in PBS waschen
- Inkubation in Blocking-Lösung für 30 min auf Schüttler
- Zugabe von 300 µl primären Antikörpers („Rabbit anti-firefly Luciferase“; Europa Bioproducts), 1:500 in Blocking-Lösung verdünnt, über Nacht auf dem Schüttler
- 3 x 5 min mit PBS auf dem Schüttler waschen
- Inkubation mit Biotinyliertem „Goat anti-Rabbit“ (Vector) Antikörper, 1:500 in PBS, 0,05% Tween 20 verdünnt, für 2 h auf dem Schüttler
- 3 x 5 min mit PBS auf dem Schüttler waschen
- Inkubation mit ABC-Lösung für 1 h
- 2 x 5 min mit PBS waschen und 1 x kurz in Tris-HCl (100 mM; pH 7.5) spülen
- Inkubation in Nachweis-Lösung für 10 min, dann 2 x 5 min mit Wasser spülen
- Gegenfärbung mit Hematoxylin (Sigma) und Mounting mit DPX Mountant (Fluka)

2.2.18 Datenbanken und Computerprogramme

2.2.18.1 Datenbanken und Internetseiten

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

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

2.2.18.2 Sequenzanalyse

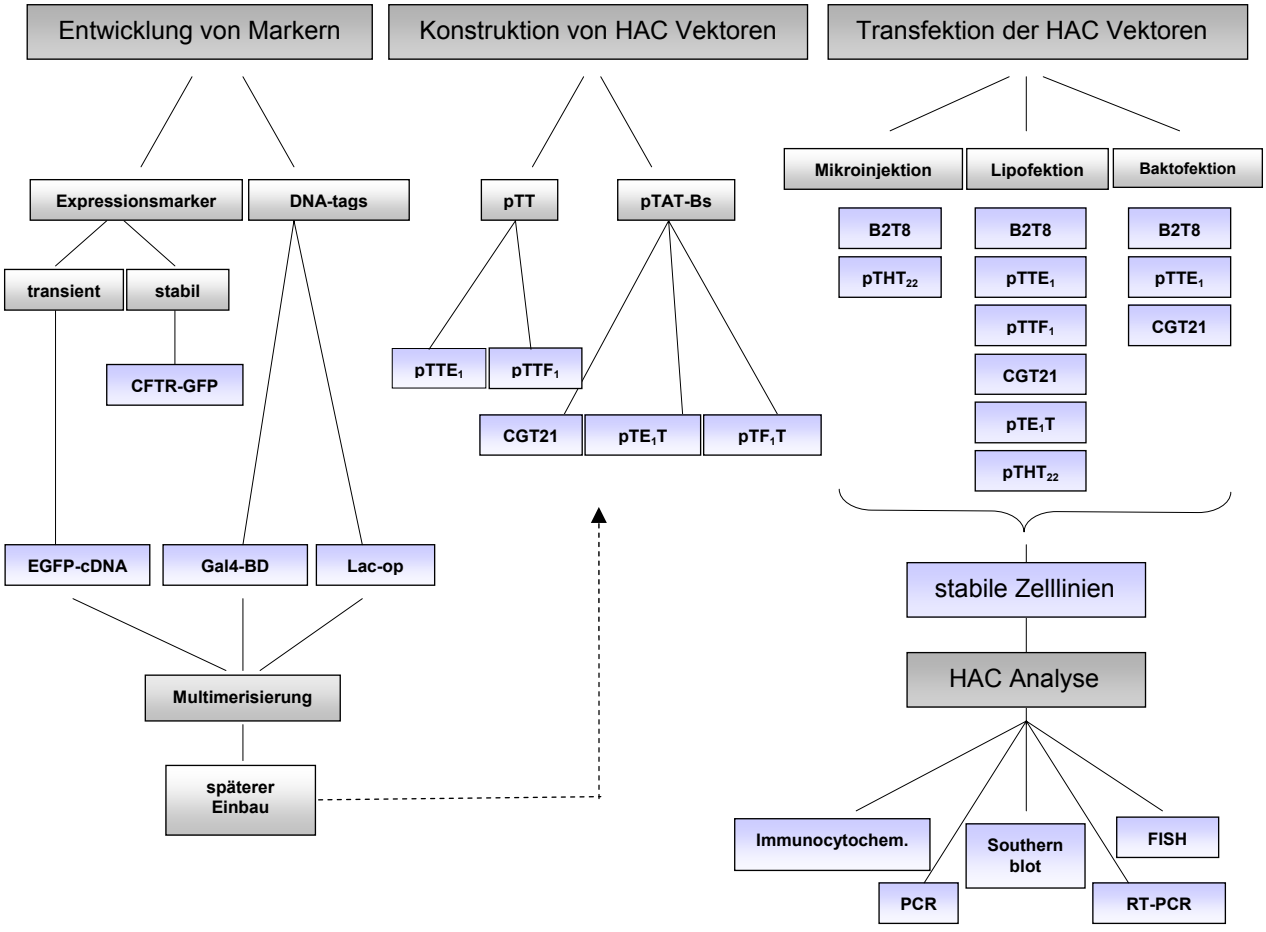
Das HUSAR Programm (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources, DKFZ Heidelberg) wurde zum Vergleich der Übereinstimmung von mehreren Sequenzen (DNA oder Aminosäuren) sowie zur *in silico* Restriktionsanalyse (Programm „MapSort“) verwendet.

2.2.18.3 Computerprogramme

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

3 Ergebnisse

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



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

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

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

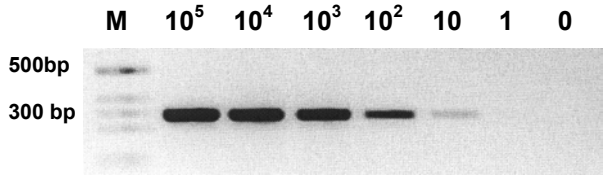


Abbildung 7: **PCR Kontrolle der Verdünnungen.** Kontrolle der Kopiezahl von pEGFP-N1 in einer Verdünnungsreihe für die intranukleäre Mikroinjektion. Je 1 μl der 1/1.000 verdünnten Injektionslösungen wurde in eine Standard-PCR (35 Zyklen) mit dem Primerpaar EGF/EGR eingesetzt. 10 Moleküle des Reporters,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

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

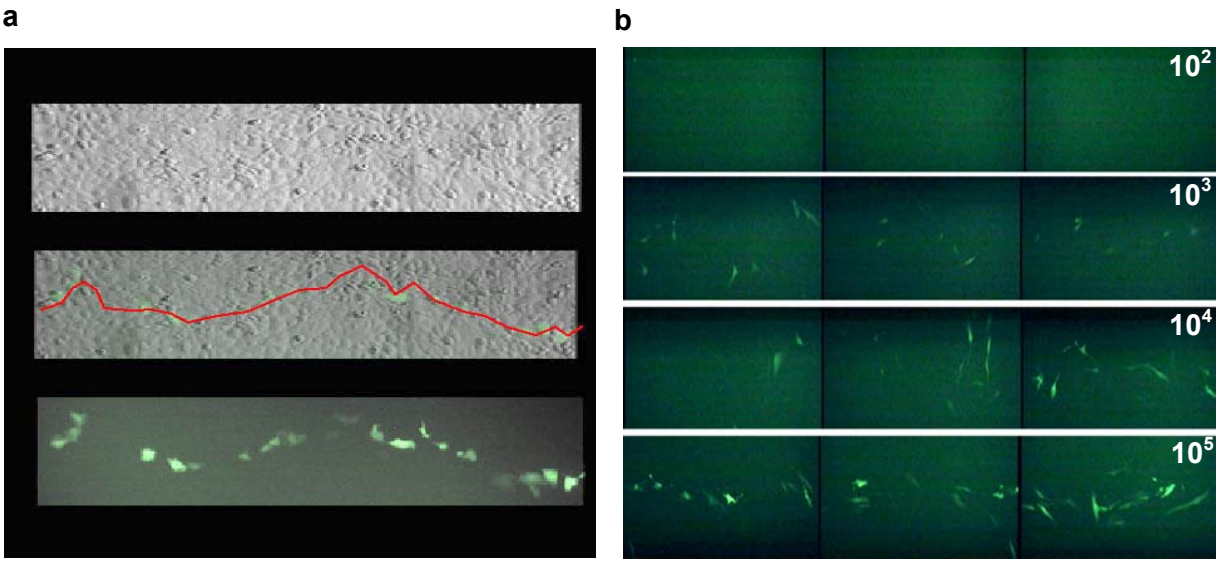


Abbildung 8: **Intranukleäre Mikroinjektion und Nachweis von grünen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop in Abhängigkeit von der Kopiezahl**. a) Schematische Darstellung der Injektion von Zellen entlang einer gedachten Linie (rot). Überlagerte Phasenkontrast- und Fluoreszenzphotographien desselben Ausschnittes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

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

Von allen Zelllinien zeigte HT1080 die grösste Überlebens- und Expressionsrate von bis zu 90%, welche durch auszählen der grünen Zellen 16 h nach intranukleärer Mikoinjektion von 10^5 Molekülen des EGFP-Plasmids bestimmt wurde (siehe Tab. 1, Abb. 9). Da die Überlebensrate von Zellen mit 10^5 und 10^6 injizierten Reporterplasmiden gleichermassen hoch war, und alle Verdünnungen den gleichen Anteil des nicht-exprimierenden pUC19 Plasmids (10^6 Moleküle/pl; um Viskosität und Plasmidmenge im Ansatz konstant zu halten, und um den Verlust einzelner Reporterplasmide durch Assoziation mit Oberflächen zu vermeiden) enthielten, wurde für die niedrigeren, nichtgrün fluoreszierenden Verdünnungen vergleichbare Überlebensraten angenommen. Bestätigt wurde diese Vermutung durch ein Kontrollexperiment in dem HT1080 Zellen mit pEGFP Verdünnungen mit und ohne einer konstanten Zahl von pCLuc-4 ($2x10^4$ Moleküle pro Injektionsvolumen) injiziert wurden. Ein Vergleich der Fluoreszenzbilder mit Immunfärbung Aufnahmen fixierter Zellen (mit anti-luciferase-antibody) zeigte vergleichbare Überlebensraten bei niedrigen und hohen pEGFP-N1 Verdünnungen (nicht gezeigt). Ein weiteres Kontrollexperiment mit HT1080 Zellen zeigte unveränderte Detektierbarkeit der Fluoreszenz nach Mikroinjektion von pEGFP-Verdünnungen ohne pUC19-Trägerplasmid, was eine Beeinflussung der Träger-DNA auf die transiente Expression des Reporters ausschliesst, zumindest im getesteten Bereich zwischen 10^2 und 10^5 Molekülen. Eine Toxizität der hohen Dosen prokaryotischer DNA auf die eukaryotischen Zellen kann daher in diesem Experiment ausgeschlossen werden. Primäre menschliche Fibroblasten zeigten eine durchschnittliche Überlebens- und Expressionsrate von 68%, die 16HBE14o- Zellen lagen bei 78% (siehe Tab. 1, Abb. 9). Es wurden pro Serie 6 Reihen mit je 100 Zellen injiziert und mindestens 5 unabhängige Serien pro Verdünnung ausgewertet. Nach Minaschek, (1989) können die teilweise drastischen Unterschiede in den Überlebens-/Expressionsraten der verschiedenen Zelllinien u.a. auf physikalische Faktoren wie Plastizität, Form oder Grösse der Zellen, Reaktion auf mechanischen Stress sowie Verstopfung der Injektionsnadel hervorgerufen werden.

Tabelle 1: EGFP-Expression 16 h nach intranukleärer Mikroinjektion

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

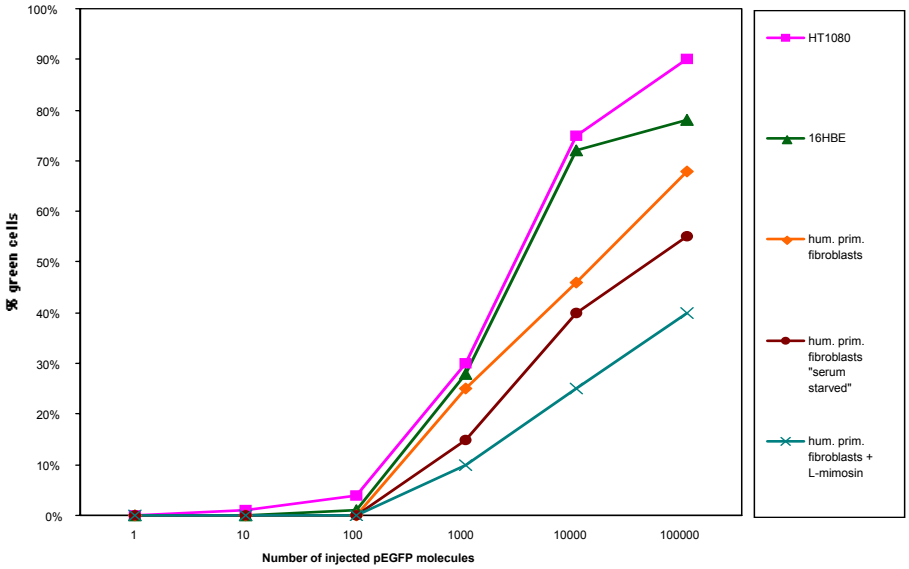


Abbildung 9: **EGFP Expression verschiedener Zelllinien nach intranukleärer Mikroinjektion**. Die Daten aus Tabelle 1 wurden für jede Zelllinie graphisch aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Zahl der mikroinjizierten pEGFP-N1 Plasmide, auf der x-Achse sind die grünen Zellen in % aufgetragen. Der Nachweis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

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

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

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

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

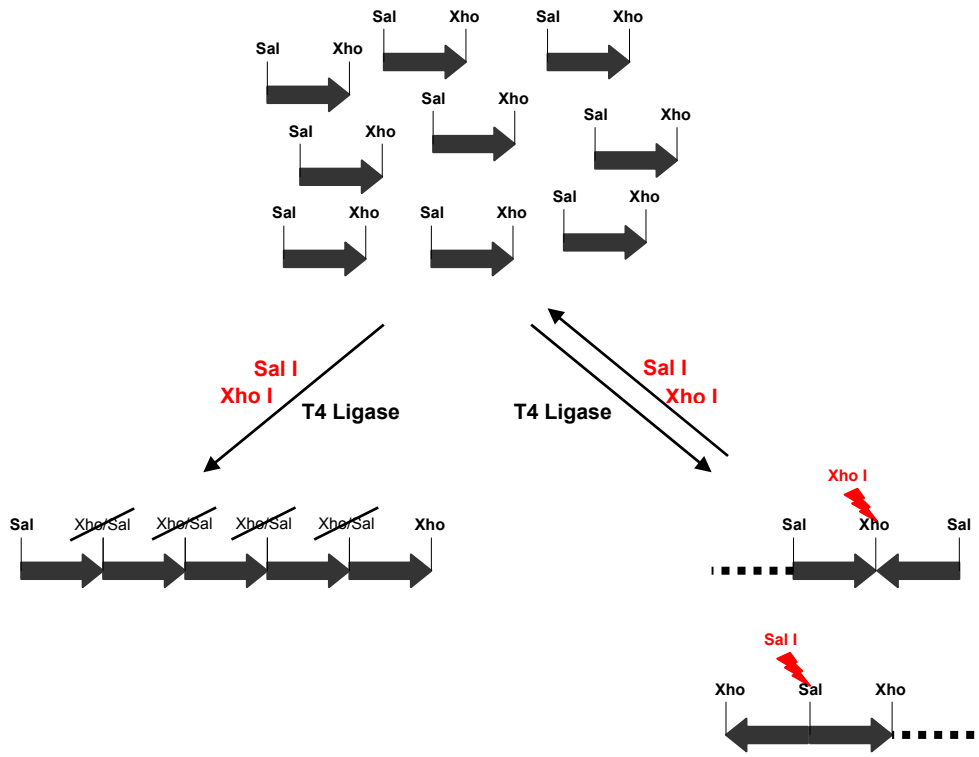


Abbildung 10: **Prinzip der expansiven Klonierung:** Ausgehend von DNA Fragmenten mit komplementären, kohäsiven Enden (z.B. *Sal* I und *Xho* I) können Tandem Repeat Arrays ligiert werden. Zugabe der entsprechenden Restriktionsenzyme (hier: *Sal* I und *Xho* I, rot) zwingt die Reaktion zur Ligierung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

3.2.1 Multimerisierung eines EGFP-Arrays zum Nachweis transienter Expression

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

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

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

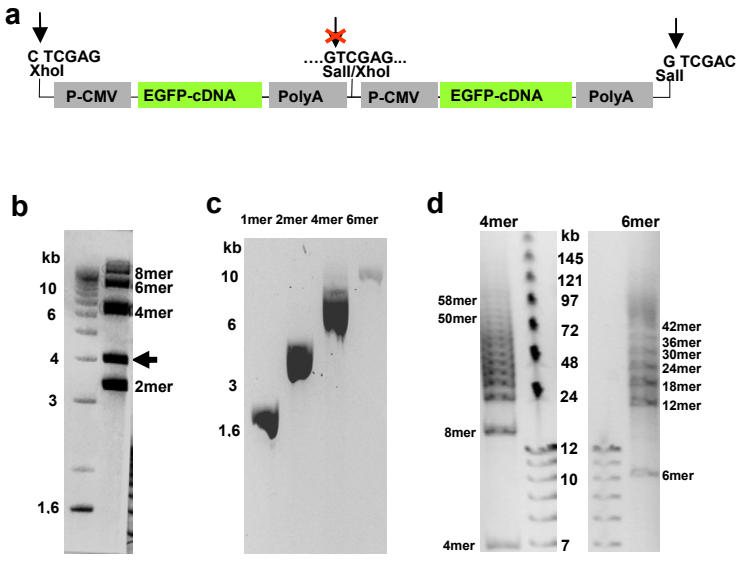


Abbildung 11: **Konstruktion multimerer EGFP-cDNA Tandem Repeatarrays**. a) Die 1,7 kb lange EGFP-cDNA Kassette aus dem modifizierten Plasmid pEGFP-delNBX (Deletion der Schnittstellen *Not* I, *Bsp*120 I und *Xho* I; siehe S.68) wurde durch PCR Amplifikation mit den Oligonukleotiden GGF (fügt eine *Xho*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

3.2.2 Multimerisierung von DNA-tags für direkten Nachweis in Modellzellen

3.2.2.1 Gal4-BD-Array

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

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

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

Abbildung 12: **Klonierung der Gal4-BD Arrays**. a) Das in (b) gezeigte Gal4-BD 2-mer wurde expansiv über mehrere Zwischenstufen zu einem ca. 700 bp langen 21-mer ligiert, welches als Ausgangsprodukt für die Klonierung längerer Arrays diente. b) Sequenz des Gal4-BD 2-mers. Die beiden Gal4-BD sind rot unterlegt, Basen die direkt mit dem Gal4-Protein in Kontakt treten sind unterstrichen und Abweichungen von der Konsensus-Sequenz sind durch Kleinbuchstaben markiert. Die Position einer CENP-B-Box-Sequenz ist mit grünen Punkten gekennzeichnet. Wenn zwei Monomere (mit jeweils nur 2 intakten Gal4-BD) ligieren, entsteht ein Fragment mit 5 intakten Bindestellen, da sich die 5´ und 3´ Enden zu einer weiteren intakten Gal4-BD ergänzen. c) Um die Klonierung zu überprüfen, wurden die in pBluescript subklonierten Arrays sequenziert. Gezeigt ist die Sequenz eines 744 bp langen 34-mers, welches 12 Kopien des 61 bp Gal4-BD 2-mers enthält. 34 Gal4-Bindungsstellen (rot) sowie 12 potentielle CENP-B-Boxen (schwarz gepunktet) sind intakt. Zwischen den einzelnen Gal4-Bindungsstellen befinden sich verschiedene Spacer von 2, 3 und 4 bp, und in der Mitte des 744 bp Fragments befindet sich eine Insertion von 6 bp, wodurch die Einheiten perfekter Wiederholung länger sind, als die einzelnen Monomere.

Arrays verschiedener Länge wurden als *Sal* I/*Xho* I Fragmente in unterschiedliche Reporter Plasmide (pBluescript, pEGFP-N1) kloniert um ihre Bindungseigenschaften zu analysieren und ihren Einfluss auf den Gentransfer zu untersuchen, bevor sie auf HAC Vektoren kloniert werden. In ersten, vorläufigen Tests, welche am Institut Pasteur mit in pBluescript 4-meren, 17-meren und 34-meren per Baktofektion durchgeführt wurden, zeigte sich in einem transienten Expressionssystem, das zur Messung der Aufnahme einzelner Kopien nicht geeignet ist, lediglich eine moderater Effekt gegenüber einem Kontrollplasmid ohne Gal4-BD (unpublizierte Ergebnisse). Arrays verschiedener Längen stehen nun für ein weiteres expansives Klonieren in einen HAC Vektor bereit, um auf ihre Fähigkeit getestet zu werden, niedrige Kopiezahlen in transfizierten Zellen direkt nachzuweisen.

3.2.2.2 Lac-Operator-Array

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

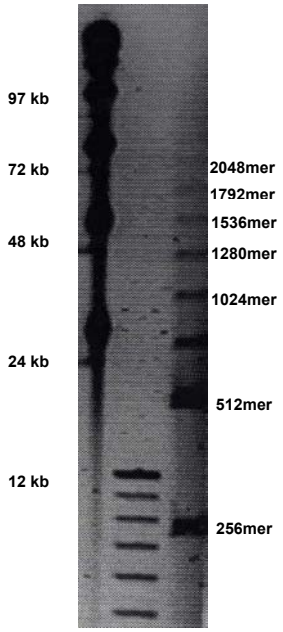


Abbildung 13: **Ligierung der Lac-Operator Arrays**. Das 9,7 kb lange 256-mer wurde aus dem Plasmid pSV-8.32 per *Sal* I/*Xho* I Spaltung isoliert und mit 10 U T4 Ligase und je 0,5 U *Sal* I/*Xho* I in 1x Ligasepuffer über Nacht bei 12°C zu Tandem Arrays über 70 kb Länge ligiert und per PFGE aufgetrennt.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

3.3 Konstruktion verbesserter HAC Vektoren

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

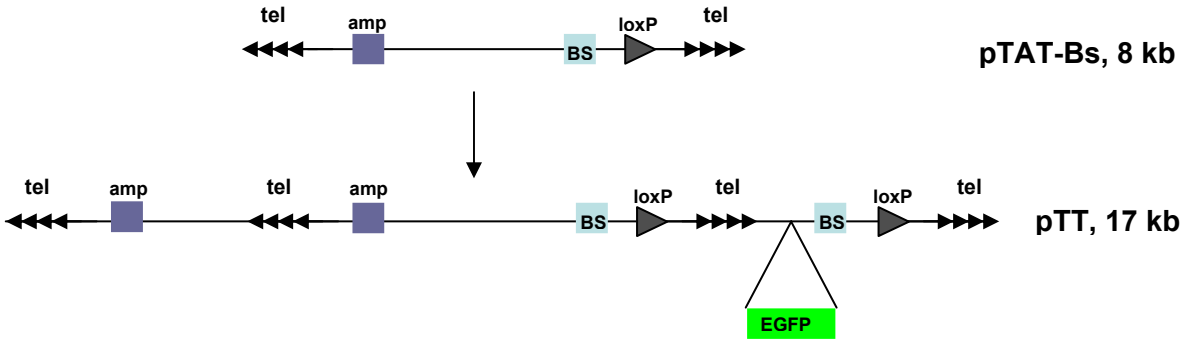


Abbildung 14: **Konstruktion des tetratelomerischen PAC Vektors pTT aus dem Basis HAC Vektor pTAT-Bs** (nicht masstabsgetreu). Die Bereitstellung duplizierter Vektorsequenzen soll die intramolekulare Rekombination/Reparatur erleichtern, von der angenommen wird, dass sie einen positiven Einfluss auf die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

Die Klonierung repetitiver, telomerischer Sequenzen $(TTAGGG)_{n=135}$ dieser Länge in entgegengesetzter Orientierung erfordert zwingend „unit copy“ Status des Vektors in Bakterien, um intermolekulare Rekombinationen zu vermeiden. In zirkulärer Form (siehe Einleitung, Abb. 3) befinden sich zwischen den beiden telomerischen Repeats ca. 8.700 bp PAC Sequenzen mit dem P1-ori sowie einem Kanamycin Resistenzmarker für die stabile Vermehrung in *E.coli*. Durch die Anordnung eines zweiten prokaryotischen Selektionsmarkers (amp-tel-kana) kann während der *E.coli* Wachstumsphase gegen Deletionen zwischen den Telomeren selektioniert werden. Die Duplikation von Vektor- und Telomersequenzen könnte die intramolekulare homologe Rekombination erleichtern, von der angenommen wird, dass sie einerseits die initiale Reparatur der freien DNA Enden und die T-Loop Formierung unterstützten könnte, und andererseits eine fortwährende Reparatur von Strangbrüchen erleichtern könnte, und somit zu einer verbesserten HAC Formierungseffizienz und Stabilität beitragen könnte (Abb. 14, 36). T-Loops sind an Telomeren lokalisierte D-Loops (Duplex), bei denen der endständig überhängende 3´Einzelstrang in weiter proximal liegende Bereiche einwandert und mit dem komplementären Strang der internen Doppelhelix paart. Diese „triple-Helix“ Struktur wird durch spezifische Telomer bindende Proteine (TBPs) stabilisiert (Griffith, 1999). Die Gruppe um Titia de Lange konnte zeigen, dass in Lymphozyten telomerische Repeats von ca. 1 kb Länge in der Lage sind T-Loops zu bilden. In früheren Arbeiten zur Telomerformierung konnte gezeigt werden, dass bereits durch die Transfektion von ca. 0,5 kb und Integration in ein Chromosom ein *de novo* Telomer erhalten werden kann, das durch Telomeraseaktivität "heilen" kann und verlängert wird (Farr, 1991; Itzhaki, 1992; Hanish, 1994). Die Anordnung zweier 810 bp Telomere an jedem HAC Ende in jeweils gleicher Orientierung und einem Abstand von mehreren kb, könnte die unmittelbare Bildung von T-Loops auf HACs erheblich erleichtern.

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

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

3.3.1 Konstruktion des tetratelomerischen HAC Vektors pTT

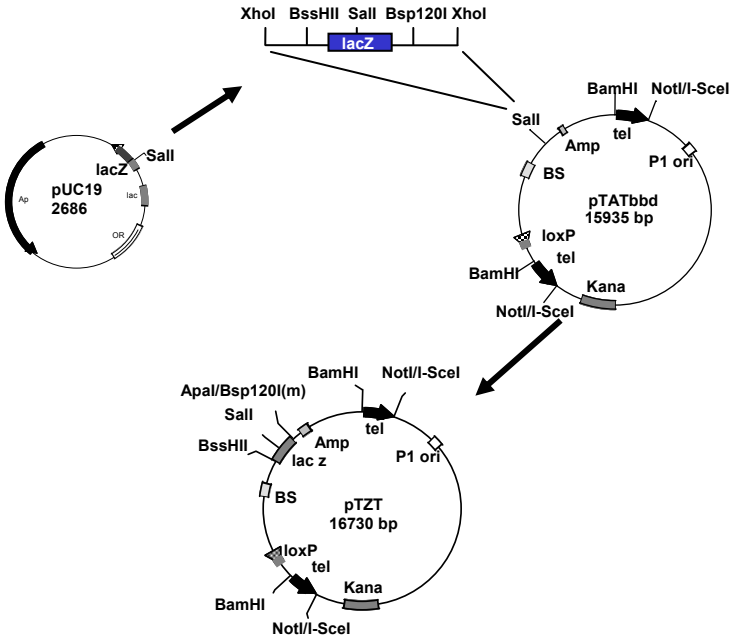
Der von Dirk Schindelhauer entwickelte ditelomerische PAC Vektor pTAT-Bs (17.041 bp; basierend auf dem „unit-copy" P1 Replikon des Vektors PCYPAC2N; Ioannou, 1994) wird in der Arbeitsgruppe dazu verwendet die chromosomalen Komponenten (cen, tel, ori, Gene) stabil zu klonieren. Nach *Not* I oder I-*Sce*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

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

3.3.1.1 Klonierung einer lacZ Kassette in pTAT

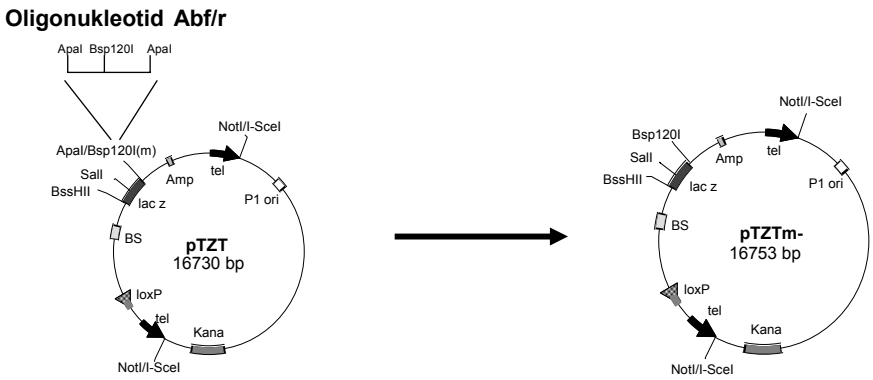
Um die angestrebten Modifikationen am Vektor pTAT-Bs (17.041 bp) vorzunehmen, mussten zuerst die beiden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *BssH* II (Position 2 in pTAT-

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



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

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

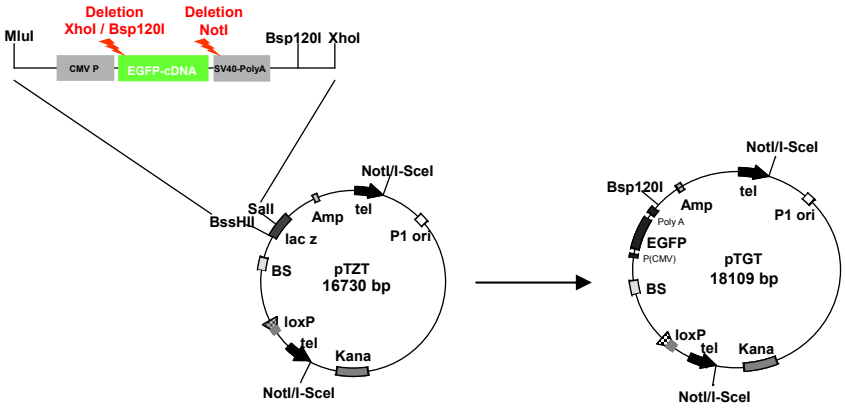


3.3.1.2 Konstruktion von pTGT

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

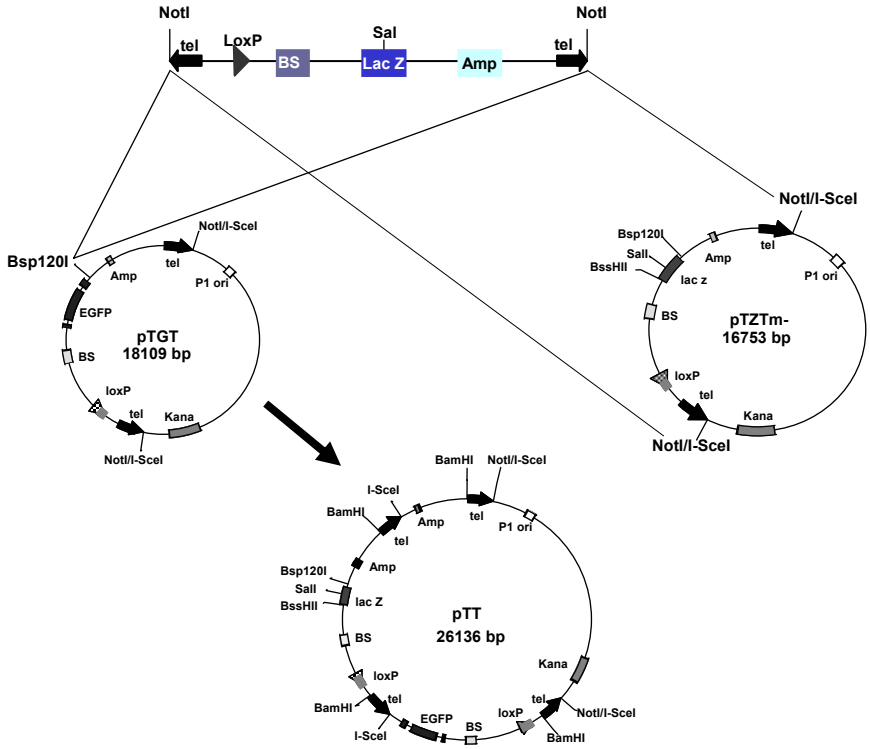
Um die modifizierte EGFP-cDNA Kassette in die *Sal* I und *Bss* HII Stelle von pTZT zu klonieren, wurden Oligonukleotidprimer konstruiert, welche *Mlu* I (komplementär zu *Bss* HII; Primer GZf) und *Xho* I (komplementär zu *Sal* I; Primer GZr) Schnittstellen in die Enden der PCR Produkte inserierten.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

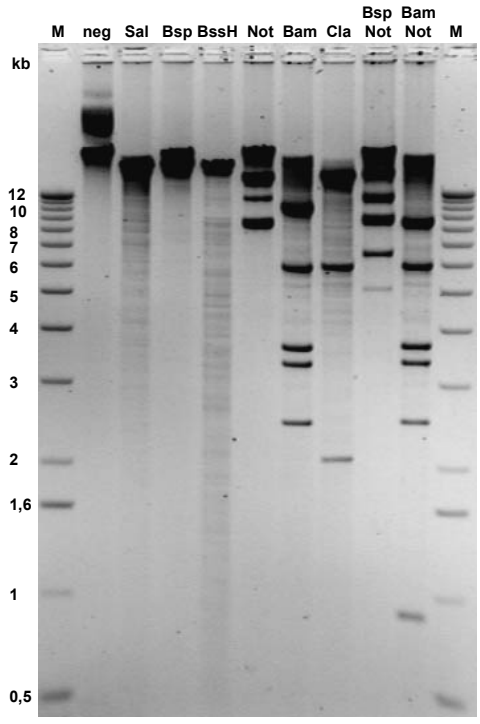
Plasmids (ca. 1.000 Moleküle). Dies zeigt, dass die Modifikationen die Funktion der transienten Expression der EGFP-Kassette nicht oder nur unwesentlich beeinflusste.



3.3.1.3 Konstruktion von pTT

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





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

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

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

Die Formierung eines aktiven Zentromers aus „nackter“, transfizierter α-sat DNA ist ein artifizieller Vorgang, der nicht hinreichend verstanden wird. Während bei der *de novo* Zentromer Formierung die „higher order“ Struktur und die Homogenität der Arrays eine fundamentale Rolle spielen (Schueler, 2001; Grimes, 2002b; Rudd, 2003), sind für die Aufrechterhaltung eines aktiven Zentromers epigenetische Mechanismen verantwortlich (Saffery, 2000/2002; Amor, 2002). Auf die Fähigkeit nach Transfektion ein funktionelles Zentromer *de novo* zu formieren, wurden bisher chromosomenspezifische α-sat Arrays getestet, darunter Sequenzen der Chromosomen 2, 8, 11, 15, 19, 21, 22, X, und Y. (Harrington, 1997; Ikeno, 1998; Henning 1999, Ebersole, 2000; Schueler, 2001; Grimes, 2002b; Mejia, 2002; Ohzeki, 2002; Kouprina, 2003). So verwendete die Gruppe um Willard (Harrington, 1997), bei der Erzeugung der ersten HACs, synthetische α-sat-Arrays von Chr.17. Diese wurden durch eine „directional cloning“ (expansive Klonierung) Strategie, ausgehend von einem per PCR amplifizierten 2,7 kb „higher order repeat“ von Chr.17 (*D17Z1*), konstruiert. Ein auf gleiche Art erzeugter Y-chromosomaler α-sat Array erwies sich als ungeeignet um *de novo* Zentromere auf HACs zu bilden. Ikeno et al testete zwei unterschiedliche α-sat Arrays von Chr.21 (α21-I und α21-II) auf ihre Kompetenz, künstliche Chromosomen zu erzeugen. Es zeigte sich, dass nur der homogene α21-I Array (enthält CENP-B boxen, eine 17 bp Sequenz welche von CENP-B, Centromere binding Protein B, spezifisch gebunden wird), nicht aber der divergierte α21-II Array (enthält keine CENP-B Boxen) dazu in der Lage war (Ikeno, 1998).

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

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

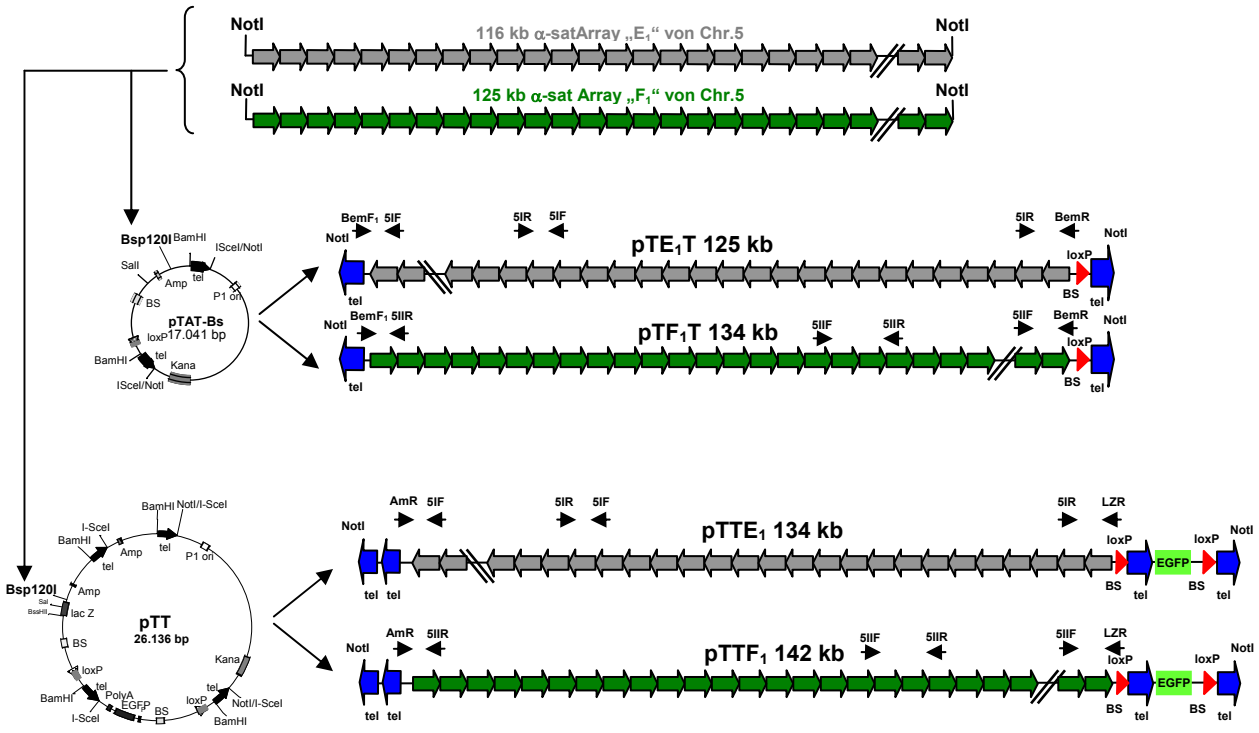


Abbildung 16: **Schema der Klonierung zweier α-sat Arrays von Chr.5 in die Vektoren pTT und pTAT-Bs**. Arrays vergleichbarer Länge (E_1, graue Pfeile; F_1, grüne Pfeile) wurden aus PACs per *Not* I Spaltung und PFGE aufgetrennt und mittels Elektroelution isoliert. Über die *Not* I Stelle wurden sie in die mit *Bsp* 120 I gespaltenen Vektoren kloniert (pTT und pTAT-Bs). Mit *Not* I wurden die linearen, telomerisierten HAC-Vektoren erhalten. Primerpaare die zur Bestimmung der Orientierung der Arrays verwendet wurden sind angegeben. Die Pfeile geben die Orientierung in Bezug auf die CENP B Box (5´-TCC CGT TTC CAA CGA AG und Varianten) wieder (F-Konstrukte in „forward“, E-Konstrukte in „revers“; nicht masstabsgetreu).

Da eine Lipofektion zweier $pTTE_1$ Konstrukte (ca. 100 ng auf $1x10^6$ HT1080 Zellen) mit verschiedener α-sat Array Orientierung (Transfektion der Klone 9 und 10) keinen Unterschied der nach 2 Wochen BS Selektion gebildeten Koloniezahlen zeigte (Daten nicht gezeigt), war das ein Hinweis darauf, dass die Orientierung des Arrays keinen Einfluss auf die Klonformierung durch Hemmung der Expression des BS-Gens hat. Aus diesem Grund wurden für die folgenden Transfektionsversuche die beiden in obiger Grafik aufgeführten, neu entwickelten Konstrukte ($pTTE_1$ und $pTTF_1$) mit unterschiedlicher Tandem Repeat Orientierung und ähnlicher Länge verwendet. Die Klonierung der beiden α-sat Arrays in die *Bsp* 120 I Schnittstelle von pTAT-Bs erfolgte nach obigem Schema und resultierte in den beiden Konstrukten pTE_1T (ca. 125 kb) und pTF_1T (ca. 134 kb). Die Orientierung der Tandem Repeats wurde durch Kombination der Oligonukleotidpaare 5IF und 5IR (bzw. 5IIF und 5IIR) mit BemF1 und BemR, welche die *Bsp* 120 I Klonierstelle auf dem Vektor pTAT-Bs flankieren, bestimmt (siehe Abb. 16). Um im Transfektionsassay (vgl Kapitel 3.4) nur die α-sat DNA Sequenz-Typen und die Vektor-DNA Konfigurationen (Duplikationen) zu vergleichen, die Untersuchungen aber

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

3.3.3 Konstruktion des CFTR-Expressionsmarkers CGT21

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

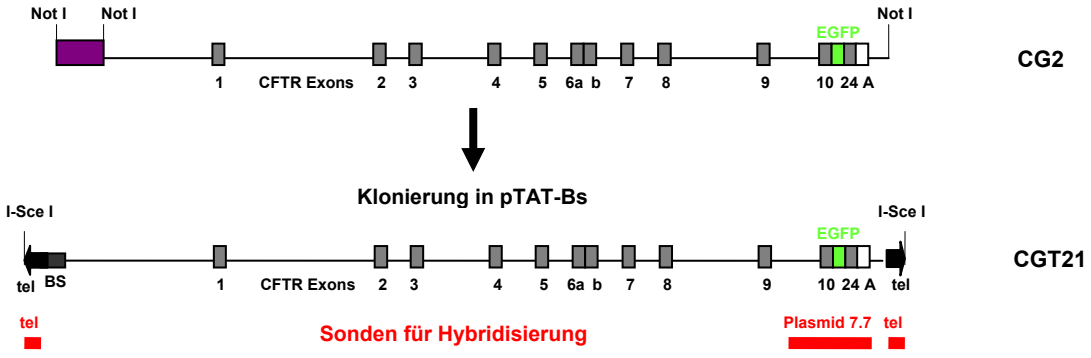


Abbildung 17: **Klonierung von CGT21.** Das *Not* I Fragment von CG2 (142,5 kb) wurde vom PAC Anteil (violett, 8,7 kb) getrennt und in die *Bsp*120 I Stelle von pTAT-Bs (17 kb) kloniert, welcher ein Blasticidin-S Resistenzgen zur Selektion in eukaryotischen Zellen trägt. Das daraus resultierende Konstrukt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

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

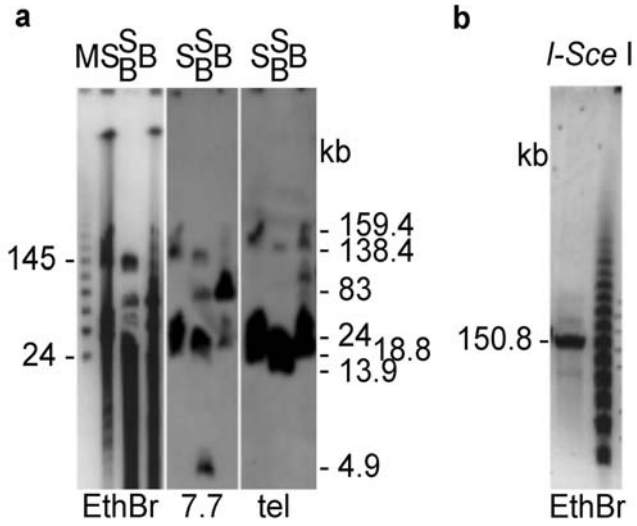


Abbildung 18: **Analyse von CGT21**. a) Southern Analyse zur Kontrolle von Integrität und Orientierung des CG2 Inserts. Je 1/10 Plug (ca. 500 ng DNA) von CGT21 wurden mit *Sal* I (S) und *Bss* HII (B) gespalten per PFGE aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (M, Midrange Marker II). Im mittleren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

3.4 Klon- und HAC Formierungsassay

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

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

Des Weiteren wurden zwei bisher uncharaktersierte α-sat Arrays von Chr. 5 als zentromerische Komponenten auf den oben genannten Vektoren getestet. Nach Lipofektion der α-sat-tragenden Konstrukte $pTTE_1$, pTE_1T, $pTTF_1$ und pTF_1T (Abb. 16) einzeln und in Kombination mit den beiden Gen tragenden pTAT-Bs Konstrukten CGT21 (CFTR; Abb. 17) bzw. THT_{22} (trägt den humanen HGPRT-Gen Lokus, ca. 100 kb; nicht gezeigt), die als genomische Komponente dienten, wurde die Zahl der stabilen Kolonien sowie die Rate an *de novo* erzeugten HACs verglichen. Die Daten sind in Tabelle 4 (siehe Anhang) zusammengefasst. Abbildung 19 zeigt Gelbilder der verwendeten Konstrukte zur Konzentrationskontrolle vor Transfektion.

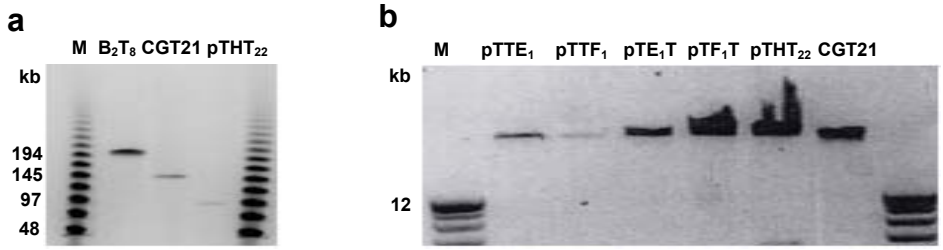


Abbildung 19: **Konzentrationskontrolle der Konstrukte vor Transfektion**. a) Auf einem PFG wurden 10 µl der angegeben, telomerisierten Konstrukte aufgetrennt (nach Elektroelution in ca. 250 µl 0,25x TAE Puffer aufgenommen). Durch Vergleich mit der Intensität der Ethidiumbromid gefärbten 1 kb (= 3 ng) Markerbande wurde die Konzentration der elektroeluierten DNA abgeschätzt. Das pTAT-Bs Konstrukt B_2T_8 (Spur 1; 220 kb), das ein ca. 190 kb langes, homogenes α-sat Array von Chr. 17 trägt, wurde unter anderem bei der Baktofektion eingesetzt. b) Kontrolle der eingesetzten Mengen auf einem 0,8% -igen Agarosegel mit Ethidiumbromid.

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

Lipofektion unterschiedlicher Mengen des telomerisierten $pTTE_1$ in $HT1080^-$ erzeugte 36 BS resistente Kolonien (Tab. 4, Anhang) von denen 27 stabile grüne Fluoreszenz unter dem Mikroskop zeigten. Davon wurden vier grüne Kolonien isoliert ($pTTE_1$ 20-23), 30 Tage unter BS expandiert und Metaphasen präpariert. Der Nachweis mit der Vektorsonde Rsf (3,15 kb Fragment, das die loxP Stelle und den BS Resistenzmarker enthält) und der Zentromersonde 5I (PCR Fragment, das in den etwa 340 „higher order repeats“ des cen5I Array enthalten ist) zeigte in allen untersuchten Linien HACs (Abb. 20a-d, Kreise) in mehr als 40% der untersuchten Metaphasen (10-20 pro Linie). Dies liegt im Bereich der normalen Detektierbarkeit einzelner stabiler HACs mit „Dual colour“ FISH in unserem Labor. Verlustraten in Re-Selektionstests nach 30 Tagen ohne Selektion von nur <1-2 % pro Mitose, zeigten allerdings eine praktisch 100% -ige Stabilität der HACs, unabhängig von der beobachteten HAC Rate in Metaphasen, die oft auch zwischen verschiedenen Objektträgern Schwankungen aufwiesen (z.B. nur 40-70% HAC Nachweis durch technische Verluste bedingt). Integration wurde in keiner Metaphase beobachtet. Die cen5 I Probe ist nur nach starker Anhebung des FITC-Kanals auf den HACs nachzuweisen. Dabei geben allerdings auch die Megabasen langen Zentromere der endogenen Chromosomen 5, 19, und 1 spezifische, stark überstrahlte Signale und die Zentromere mit näher verwandten α-sat werden ebenfalls detektiert. Bei Unterdrückung des FITC-Kanals lassen sich die Signale auf die spezifische Sequenz der Cromosomen 5, 19 und 1 begrenzen, wodurch die Funktionalität der Sonde bestätigt wird.

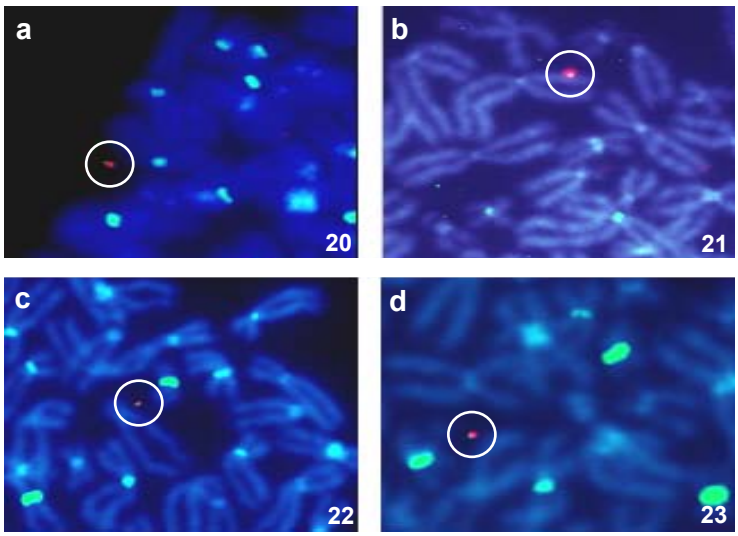


Abbildung 20: **Nachweis der *de novo* HAC Formierung des Vektors $pTTE_1$**. Metaphasen von 4 BS resistenten Linien ($pTTE_1$ 20-23) wurden mit der Vektorsonde Rsf (rot) und der Zentromersonde 5I (grün) hybridisiert. Pro Linie wurden 10-20 Metaphasen analysiert und HACs wurden in mindestens 40% aller

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

Diese Daten zeigen sowohl die Kompetenz des Chr. 5 α-sat Arrays E_1 ein Zentromer *de novo* zu formieren als auch die Fähigkeit des verbesserten Konstuktes pTT als effizienter HAC Vektor zu dienen. Die Beobachtung, dass pTT nach Selektion stabil grün fluoreszierende Zelllinien erzeugt, bestätigt die Funktion der EGFP-cDNA Kassette als Marker, um stabilen HAC Transfer anzuzeigen. Durch die eingefügten Restriktionsschnittstellen können beliebige DNA-Fragmente schnell und effizient eingebaut und in Zellkultur getestet werden. Der Vektor $pTTE_1$ erfüllt somit wesentliche Kriterien eines verbesserten Basis HAC Vektors für die Entwicklung künstlicher Chromosomen.

Das Konstrukt $pTTF_1$, das den zweiten Array Typ von Chromosom 5 (5II, 13-mere) in „forward" Orientierung (siehe Abb. 16, S. 73) enthält, erzeugte ingesamt vier BS resistente Kolonien, die alle stabile grüne Fluoreszenz zeigten. „Dual colour" FISH Analyse zweier Linien mit den Sonden Rsf und cen5 II zeigte ebenfalls *de novo*-Formierung von künstlichen Chromosomen in $HT1080^-$ Zellen (siehe Tabelle 4, Anhang). Der Chr. 5 α-sat Array F_1 (5II) ist also ebenso wie der Array E_1 (5I) in der Lage die Funktion eines Zentromers auf *de novo* erzeugten HACs zu übernehmen, die Richtung der α-sat Repeats scheint dabei keinen Einfluss auf die Klonformierungsrate zu haben (vgl. Tab. 4, Anhang; $pTTE_1$, 10 und 50 ng; $pTTF_1$, 10 und 50 ng). Der direkte Vergleich der beiden tetratelomerischen Konstrukte $pTTE_1/F_1$ mit ihren ditelomerischen Vorläufern pTE_1T/pTF_1T zeigte, dass durch die duplizierten Vektoranteile keine spürbare Verbesserung der absoluten Rate an gebildeten Kolonien erhalten wurde. Da pTT zwei Kopien des BS Markers enthält, und pTAT-Bs nur eine, kann aus diesem Experiment geschlossen werden, dass die doppelte Dosis des BS Resistenzmarkers auf einem Input DNA Molekül keinen positiven Effekt auf die Zahl selektionierbarer Klone hat (bei 4 µg/ml BS). Die E_1 Konstrukte (5I) zeigten sich tendentiell den F_1 Konstrukten (5II) überlegen, wegen der begrenzten Zahl der analysierten Linien (im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar) ist eine sichere Aussage jedoch nicht möglich.

Von der richtigen Anordnung der Komponenten auf den Vektoren wird eine deutliche Steigerung der HAC *de novo*-Formierungsrate erwartet. Dazu könnte die in unserem Labor mehrfach beobachtete Steigerung der Klonzahl durch Cotransfektion eines telomerisierten genomischen Genkonstrukts mit dem telomerisierten Zentromerkonstrukt passen (siehe Anhang, Tab. 4: pTE_1T 100 ng + CGT21 25 ng; TTE_1 50 ng + THT_{22} 200 ng). Durch die Gen-Komponenten steigen die Klonzahlen gelegentlich vielfach über die Zahl der Zentromer-

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

Andere Erklärungen des Phänomens könnten aber auch eine unterstützende Wirkung der zusätzlichen Vektorsequenzen (als eine Art "Reparatur-Kit") in der Phase der HAC Formierung sein, oder einfach die Anwesenheit eines zweiten Resistenzmarkers (BS), was die Selektionierbarkeit entstehender HAC-Linien steigern könnte. Zuletzt genannter Punkt wäre zwar für die letztendliche Anwendung irrelevant, würde aber erhebliche technische Schwierigkeiten in den Zellkulturarbeiten verursachen, bei denen es darauf ankommt, isolierte Ereignisse zu betrachten. Da die Schwankungsbreite zwischen den einzelnen Experimenten jedoch viel zu gross war, um klare Aussagen über die HAC Formierung in Abhängigkeit von verschiedenen cotransfizierten Komponenten zu erlauben, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, in dem nur die pTAT-Bs Vektorsequenzen, einerseits mit einem funktionellen BS-Gen und andererseits mit einem mutierten, funktionslosen BS-Gen cotransfiziert wurden. Dafür wurde im Vektor pTAT-Bs das Gen für die Blasticidin-S Deaminase durch Spaltung mit dem Enzym *Sun* I (siehe Position 13.142 oder 19.158 in pTT, Anhang) und anschliessender S1-Nuklease Behandlung zerstört. Durch Sequenzierung wurde eine 10 bp Deletion der kodierenden Sequenz des BS-Gens bestätigt, die zu einem Protein führt, das von den normalerweise 140 Aminosäuren nur die ersten 35 Aminosäuren enthält und nach 50 Aminosäuren ein Stoppcodon erzeugt. Cotransfektion von gleichen Mengen des cen5 tragenden Konstrukts pTE_1T mit beiden pTAT Versionen (Bs und Bs-del) zeigten, dass die Deletion des zweiten BS-Gens die Klon-Formierung in etwa halbiert (29 mit pTAT-Bs zu 13 mit pTAT-Bs-del, Tab. 4). Dies weist in diesem Experiment deutlich auf einen additiven Effekt des zweiten BS-Gens auf dem cotransfizierten Vektorfragment hin. Um zusätzlich zu analysieren, ob auch nicht-selektionsfähige pTAT-Bs-del Vektorsequenzen durch Inkorporation (Verkettung) in die HACs unterstützend zur HAC Formierung beigetragen haben könnten, wurden cotransfizierte HAC Linien mittels PCR untersucht. Wenn Cotransfektionen zusätzlicher Vektor-Sequenzen tatsächlich einen positiven Einfluss auf die Klonformierung haben, sollte zusätzlich zum BS-Gen auf der Zentromerkomponente auch das deletierte BS-Gen des cotransfizierten pTAT-Bs-del in den stabilen Linien zu finden sein (es wurde nicht davon ausgegangen, dass in den HAC Linien unter Selektionsdruck immer eine vollständige Konversion der deletierten, nicht-funktionellen BS-Gene stattfinden könnte). Deshalb wurde eine PCR mit dem Primerpaar BcF2/BcR

durchgeführt, das die 10 bp Deletion in pTAT-Bs umspannt und ein Produkt von entweder 176 bp (funktionell) oder 166 bp (deletiert) generiert. Alle fünf getesteten pTAT-Bs-del+pTE$_1$T Linien zeigten ausschliesslich die Bande des intakten, undeletierten BS-Gens (Abb. 21a). Da man bei einer unterstützenden Wirkung zusätzlicher Vektorsequenzen die Anwesen-heit von Sequenzen beider Konstrukte, zumindest in einem Teil der erzeugten Klone erwarten würde, spricht dieses Ergebnis nicht für einen positiven Effekt zusätzlicher Vektorsequenzen durch eine stabile Inkorporation in die HACs. FISH Analyse von vier der pTAT-Bs-del+pTE$_1$T Linien mit Vektor- und cen5-Sonden zeigte, dass *de novo* HACs ohne Integration in drei Linien formiert wurden. Eine Linie mit dem cotransfizierten, intakten BS-Gen (pTAT-Bs+TE1T_11) zeigte eine telomerische Integration (cen und Vektor Signale) in ein endogenes Chromosom in (61%) der analysierten (n=18) Metaphasen (siehe Abb. 21c; Tab. 4 im Anhang).

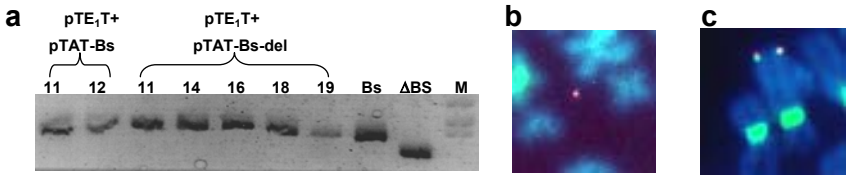


Abbildung 21: **PCR und FISH Analyse der cotransfizierten Vektoren pTAT-Bs und pTAT-Bs-del**. a) PCR aus genomischer DNA sieben cotransfizierter Linien, die mit einem funktionellen, und einem deletierten BS-Gen cotransfiziert wurden. Die PCR mit den Primern (BcF2/BcR) detektiert das funktionelle BS-Gen (Spur BS) und die 10 bp Deletion des mutierten BS-Gens (Spur ΔBS). In allen cotransfizierten Linien konnte lediglich die funktionelle Kopie des BS-Gens detektiert werden (von pTE$_1$T stammend). Die PCR Produkte wurden auf einem 3% -igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (M: Marker LS V). b) Die „Dual colour" FISH Analyse (nach 30 Tagen BS Selektion) bestätigte eine *de novo*-Formierung von HACs (Beispiel: pTAT-Bs-del_11; rot=Rsf, grün=cen5 E$_1$), unabhängig von der Funktion des cotransfizierten BS-Gens. c) Linie pTAT-Bs+pTE$_1$T_11 zeigt eine telomerische Integration mit Signalen beider Proben (cen5 E1, Rsf).

Zur besseren Abschätzung des Effekts einer Cotransfektion von telomerisierten Genkomponenten, wurde eine größere Zahl von Transfektionen durchgeführt. Dabei wurden zusätzlich zu den Komponenten auch die Konzentrationen variiert. Es konnte ein eindeutiger Trend festgestellt werden, hin zu höheren Klonzahlen mit kleineren Konstruktmengen (siehe Tab. 4, Anhang). Die BS und HAT Doppelselektion nach 14-tägiger BS Selektion, bei Cotransfektion mit pTHT$_{22}$ als Genkomponente belegt, dass praktisch alle Cotransfektionen beide Resistenzmarker funktionell exprimieren (Tab. 4; z.B. pTE$_1$T (100 ng) + pTHT$_{22}$ (25 ng), pTTE$_1$ (10 bzw. 50 ng) + pTHT$_{22}$ (100 bzw. 200 ng) und pTF$_1$T (200 ng) + pTHT$_{22}$ (200 ng)). FISH Analyse von 4 pTTE$_1$ + pTHT$_{22}$ Linien zeigte darüber hinaus, dass in allen vier Linien HACs nachgewiesen werden können, was an fehlenden Integrationen sowie colokalisierten Vektor- (Rsf) und Zentromersignalen (cen I bzw. cen II) auf episomalen DAPI-Elementen (in mindestens 40% der analysierten Metaphasen) bestimmt wurde. Dagegen zeigten lineare Genkomponenten ohne zentromerische Komponenten (z.B. CGT21) konsistente Integrationen

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

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

Zuvor durchgeführte Untersuchungen mit intranukleärer Mikroinjektion zeigten bereits, dass einzelne Kopien einer EGFP-cDNA Kassette nicht geeignet sind, um mittels transienter Expression die erfolgreich transfizierten Zellen zu einem frühen Zeitpunkt nachzuweisen (siehe 3.1, S.54). Die Beobachtung, dass eine Lipofektion von $pTTE_1$ bereits nach 12 h einzelne, stark grün fluoreszierende Zellen erzeugen kann, warf die Frage auf, ob diese früh grünen Zellen zu stabilen Zellklonen führen oder lediglich auf massenhafter Anwesenheit des Vektors beruhen. Da das 134 kb Konstrukt $pTTE_1$ nur eine Kopie der EGFP-cDNA Kassette trägt, die transient nicht nachgewiesen werden kann (Schindelhauer, 2002), muß entweder eine größere Zahl transfiziert worden sein, oder einzelne Konstrukte wurden durch einen geeigneten Chromatinkontext "aktiviert" und viel stärker exprimiert, als dies mit transienter Expression allein möglich wäre.

Um dieser Fragestellung nachzugehen wurde $pTTE_1$ (ca. 150 ng) in HT1080 Zellen (8 Platten aus zwei Experimenten) lipofiziert und von Tag 1 nach Transfektion (Start der BS Selektion) bis zur Bildung von Kolonien (Tag 14) beobachtet und nach grünen Zellen abgesucht. Grüne Zellen wurden markiert und täglich auf Teilung und Fluoreszenz kontrolliert. Um einen möglichen negativen Effekt der täglichen Bestrahlung unter dem Fluoreszenzmikroskop festzustellen, wurde eine Hälfte der Platten abgeklebt und erst am Tag 14 untersucht (Abb. 22). In den markierten Bereichen von 41 grün fluoreszierenden Zellen, die schon am Tag 1 nach der Lipofektion nachgewiesen werden konnten, entwickelte sich nur in einem eine stabile, grüne Kolonie. Die anderen 40 früh grünen Zellen stellten das Wachstum nach dem 1-8-Zellstadium ein. Im Gegensatz dazu bildeten sich aus Zellen, die erst nach dem Tag 6 grüne Fluoreszenz zeigten, 16 stabile, grüne Kolonien. Auf den unbestrahlten Seiten bildeten sich Kolonien (n=9) und nicht weiterwachsende grüne Zellen (n=29) in vergleichbarer Anzahl, was einen Einfluss der Beleuchtung auf die Klon Formierung in diesem Experiment ausschliesst. Dieses Ergebnis legt den wichtigen Schluss nahe, dass der Transfer grosser Konstruktmengen zwar transienten Nachweis kurz nach der Transfektion ermöglicht, für die Formierung stabiler Klone jedoch eher hinderlich ist.

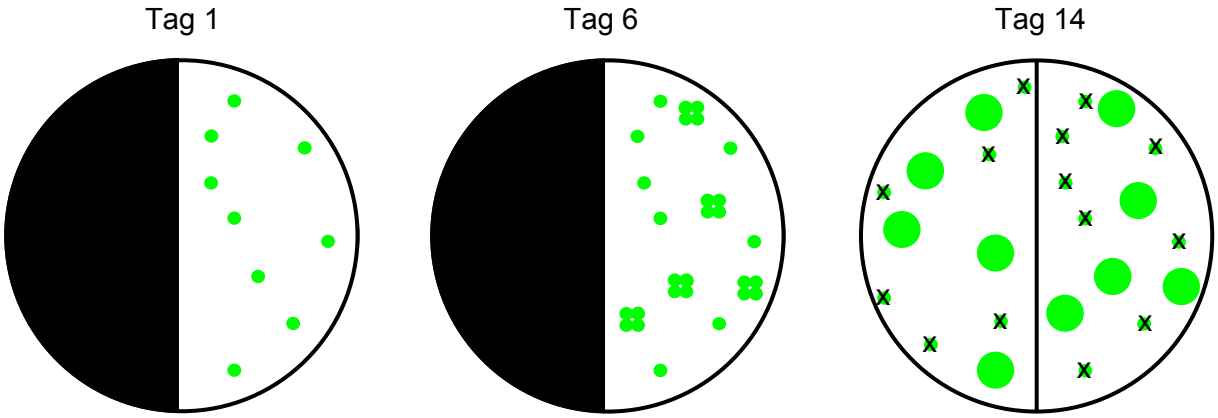


Abbildung 22: **Klonformierung nach Lipofektion von pTTE$_1$.** 50% der Zellkulturschalen, die ca. 5x10^5 HT1080 Zellen enthielten, wurden abgeklebt um mögliche Schäden durch tägliche Hellfeld- und Fluoreszenzuntersuchungen festzustellen. Pro Platte wurden ca. 150 ng *Not* I linearisierter pTTE$_1$ lipofiziert und die transiente und stabile EGFP Expression bzw. Klonformierung über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Am ersten Tag wurden 41 „früh“ grüne Zellen beobachtet und mit einem Ring (5 mm) markiert (einzelne grüne Punkte). Nach 14 Tagen entwickelte sich nur eine Kolonie (grosse grüne Punkte) im Areal einer „früh“ grün markierten Zelle, die restlichen 40 stellten das Wachstum nach dem 1-8 Zellstadium (überwiegend 1-2 Zellen) ein (schwarzes **X**). In 16 anderen Bereichen der Platten entwickelten sich erst zwischen Tag 4 und Tag 6 grüne Zellen (meist schon im 8-16 Zellstadium dargestellt als 4 kleine grüne Punkte), aus denen sich bis zum Tag 14 stabile, grüne Kolonien entwickelten. Auf den abgeklebten Seiten entwickelten sich Kolonien vergleichbarer Anzahl (9 grüne Kolonien und 29 nicht-teilende grüne Zellen).

3.7 Das Expressionskonstrukt CGT21 wird exprimiert und korrekt gespleisst

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

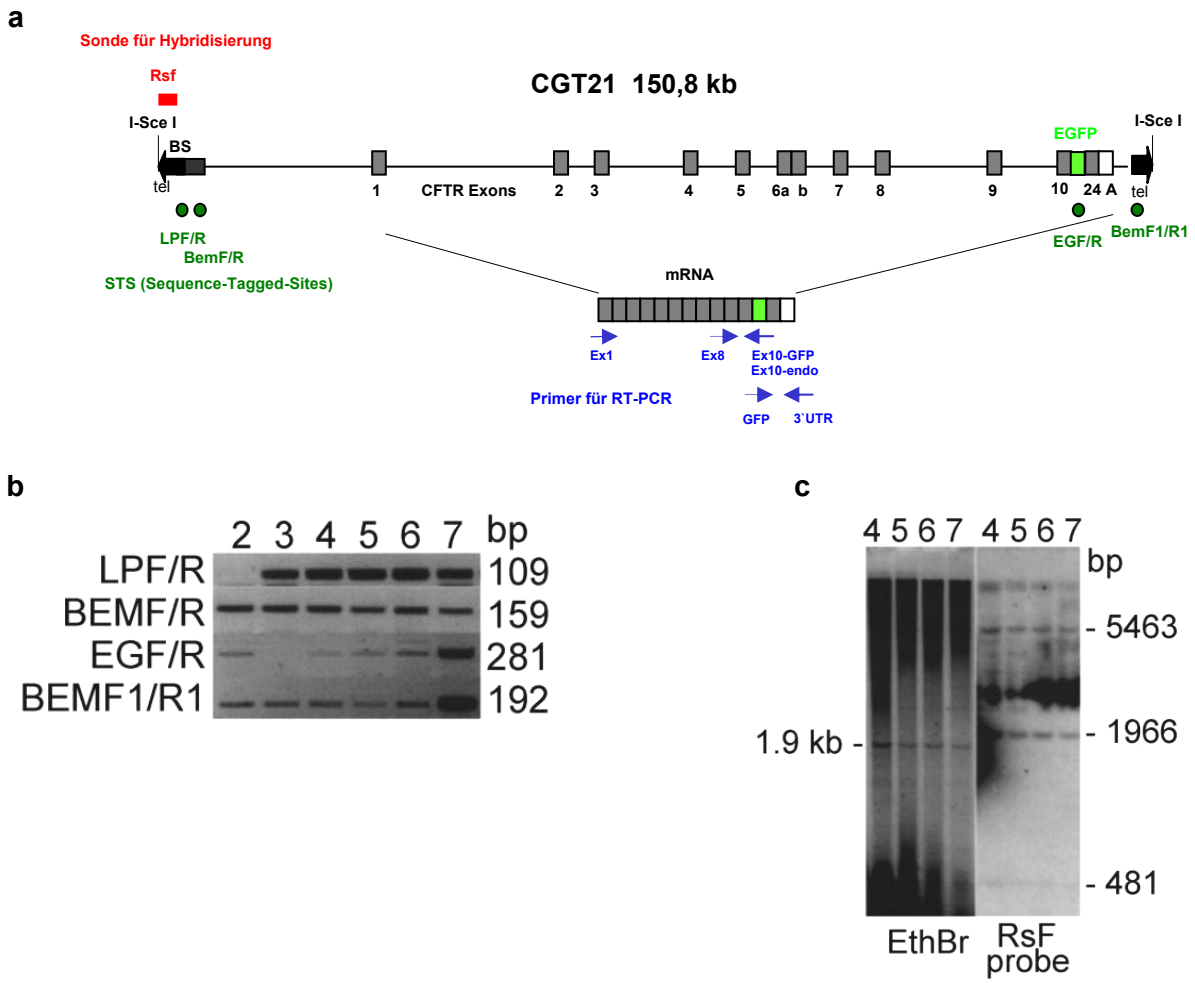


Abbildung 23: **Analyse der transfizierten CGT21 Linien**. a) CGT21 in telomerisierter Form, ohne den 8,7 kb P1 Anteil des Vektors pTAT-Bs: Die Lage der für die Hybridisierung verwendeten Sonde Rsf (rot) sowie die "sequence tagged sites" (STS) (grüne Kreise) sind gekennzeichnet. Unter dem Konstrukt sind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

Das genomische CFTR-Expressionskonstrukt CGT21 wurde zur Erzeugung stabiler Zelllinien in HT1080 transfiziert, um die vom CFTR-Lokus gesteuerte Expression des synthetischen Konstruktes (per RT-PCR Analyse) als Expressionsmarker für intakten Transfer langer DNA zu verwenden. Lipofektion von ca. 1 μg telomerisiertem CGT21 in $5x10^5$ HT1080 Zellen führte zu

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

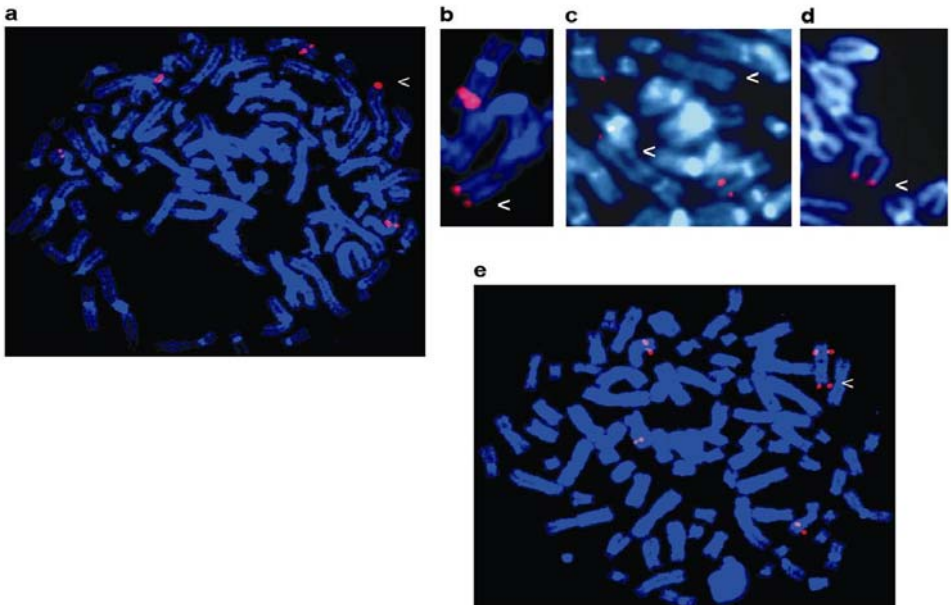


Abbildung 24: **FISH Analyse der Linien 5 und 7**. Die lange genomische PAC Probe CF1 (135 kb) erlaubt den verlässlichen Nachweis des CFTR-Gens auf Chromosom 7q31.2 und die "single copy" oder „low copy“ Integrationen des Transgens. Linie 5 zeigt eine Integration am Telomer des kurzen Arms von Chromosom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

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

Da die bisherigen Daten für einen vollständigen Transfer in den Linien 4, 5 und 7 mit einer geringen Kopiezahl sprechen, wurden die Zellen mittels RT-PCR Analyse auf Expression des CTFR-EGFP Fusionsproteins untersucht (in Kollaboration mit Margarida Amaral, Lisabon). Durch die Konstruktion des synthetischen Exon 10-EGFP wird ein qualitativer und halb-quantitativer Vergleich zwischen den endogenen CFTR Genen und dem Expressionskonstrukt CGT21 möglich. Zu diesem Zweck wurden mehrere Oligonukleotidpaare synthetisiert, die unterschiedliche Sequenzen auf der CFTR mRNA, der synthetischen Exon 10-EGFP mRNA sowie der mRNA der flankierenden 3´UTR erkennen. Letztere beiden sind ausschliesslich auf die mRNA des Konstrukts CGT21 beschränkt (siehe Abb 23a). Die Kombination des „Forward" Primers B3F (Exon 8) mit dem „Reverse" Primer $EGFP_1$-AL (Exon 10 von CG2) zeigte in Linie 7 die erwartete Bande von 474 bp der gespleissten cDNA des CFTR-EGFP Konstruktes (Abb 25a). Die Expression des 3´ Anteils von CG2 wurde durch Kombination mit den Oligonukleotiden EGFP-seq (Forward, im EGFP-Gen) und G1L (Reverse, im 3´UTR des CFTR-Gens) überprüft und in Linie 7 durch Amplifikation des 828 bp Produkts bestätigt (Abb 25b). Die Linien 4, 5 und 6 (6, nicht gezeigt) exprimieren CGT21 nicht. Um die Expression vom endogenen CFTR Lokus zu analysieren, wurde ein alternativer „Reverse" Primer eines Teils von Exon 10 des CFTR-Gens, der nicht auf dem Konstrukt enthalten war, in Kombination mit dem „Forward" Primer von Exon 8 (B3F) verwendet. Das gespleisste Produkt von 391 bp, war in allen Linien in etwa gleichen Mengen vorhanden, was für eine klonale Stabilität der (relativ schwachen) CFTR-Expression in HT1080 Zellen spricht. Um das Ausmass des normalen Exon 9-skipping der endogenen CFTR Allele in untransfizierten HT1080 mit beiden Allelen des endogenen CFTR-Gens und des Integrierten CGT21 in der exprimierenden Linie 7 zu vergleichen, wurde ein Kontrollplasmid mitgeführt, das die beiden Varianten der gespleissten CFTR cDNA mit Exon 9 und ohne Exon 9 im Verhältnis 1:1 als interne Kontrolle enthielt (C). Die Analyse ergab, dass beide RT-PCR Produkte mit geskipptem Exon 9 (CFTR, 208 bp und CGT21, 291 bp) nur einen sehr geringen Teil der gespleissten Transkripte ausmachten (untere Bande in 25a, 25c, 25d). Die Analyse des Exon 9 skipping ist deshalb von Interesse, weil CGT21 nach einer weiteren Modifikation, und zwar dem Austausch des synthetischen Exon 10-EGFP gegen die normale CFTR cDNA (siehe Diskussion, Abb. 37), als Gentherapie Vektor verwendet werden kann. Um korrektes spleissen aller Introns von CGT21 mit RT-PCR zu

bestätigen, wurde das Oligonukleotid A1R (Translationsstart im Exon1 des CFTR-Gens) mit dem Oligonukleotid $EGFP_1$-AL des synthetischen Exon 10 kombiniert. Das Produkt von 1.668 bp zeigt an, dass das Fusionsgen unter der Kontrolle des CFTR-Promotors exprimiert wird und das alle 9 Introns korrekt gespleisst wurden (Abb. 25e). Sequenzierung des 1.668 bp Produkts (Accession Nr. AY299332) bestätigte die erwartete CFTR Sequenz sowie alle vorgenommenen Modifikationen zur Optimierung der CFTR-Funktion (Austausch des M470V Polymorphismus, da im Vorläufer PAC CF1 nur die Variante mit 1,7-fach schwächerer Chloridkanalfunktion vorhanden war, vgl. Cuppens, 1998).

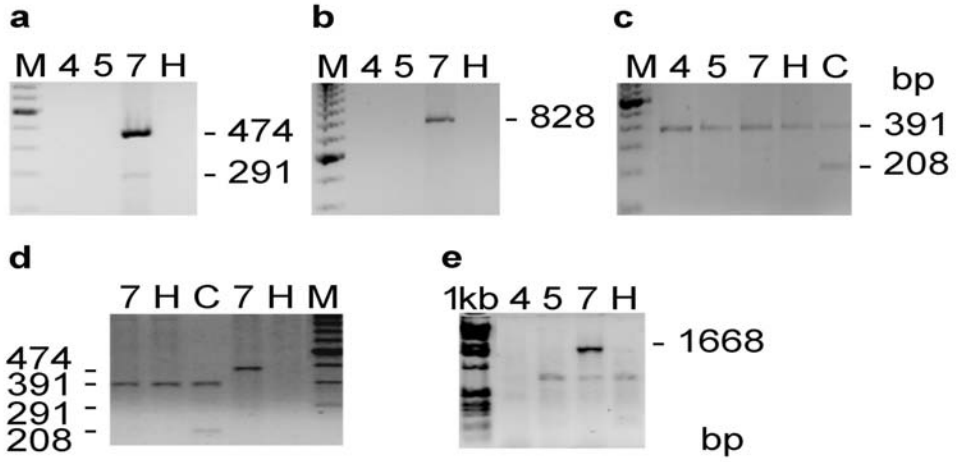


Abbildung 25: **RT-PCR Analyse der Linien 4, 5, 7 und HT1080 (H) Kontrollzellen**. a) Das 474 bp Produkt das mit dem Primerpaar B3F und $EGFP_1$-AL amplifiziert wurde, zeigt Expression und korrektes Spleissen der synthetischen Intron 9-Exon 10 Region in der Linie 7. Die 291 bp Bande zeigt, dass eine kleine Fraktion der CG2 Transkripte ein geskipptes Exon 9 besitzen (siehe Abb. 36), was für eine normale Funktion spricht. b) Die Oligonukleotidpaare EGFP-seq und G1L amplifizieren ein 828 bp Fragment der EGFP/CFTR-3´UTR Region. c) Die Primer B3F und C16D erzeugen ein 391 bp Produkt von Exon 8 bis Exon 10 ausschliesslich von den endogenen CFTR mRNAs. Ähnliche Expression in allen Linien spricht für eine klonale Stabilität der endogenen CFTR Expression in HT1080 Zellen. Der Vergleich mit einem Kontrollplasmid mit einer geskippten (208 bp)und einer ungeskippten cDNA Version (1:1), zeigt dass in HT1080 eine kleine Fraktion der endogenen CFTR Transkripte (kaum detektierbar) mit geskipptem Exon 9 vorliegt (dies entspricht einer normalen CFTR Funktion). d) Um die Expression von CGT21 in Linie 7 mit der endogenen CFTR Expression und in untransfizierten HT1080 (H) zu vergleichen, wurde die Exon 8-Exon 10 Region mit den Primerpaaren B3F/ $EGFP_1$-AL (nur auf CGT21) und B3F/C16D (nur auf endogenem CFTR) amplifiziert. Ähnlich niedrige Level des geskippten Exon 9 wurden für beide Gene beobachtet (291 bp bei CG2 und 208 bp bei endogenem CFTR), was auf ein normales Spleissen am transfizierten Genlocus hinweist. e) Mit den Oligonukleotiden A1R (Exon1) und $EGFP_1$-AL (Exon 10-EGFP) konnte das erwartete Produkt von 1.668 bp amplifiziert werden. Sequenzierung bewies das korrekte Spleissen aller CGT21 Introns (M: 100 bp Leiter. 1 kb: 1 kb Längenstandard).

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

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

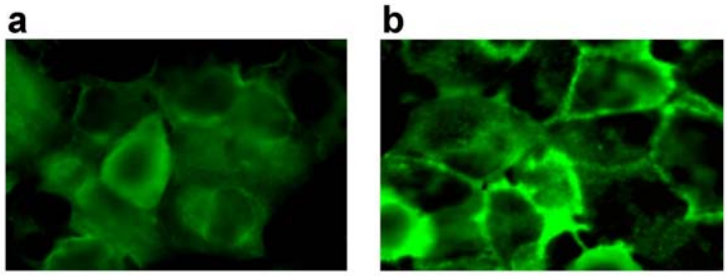


Abbildung 26: **Nachweis des EGFP Proteins durch anti-GFP Immunfluoreszenz-Analyse**. Im Vergleich zum grösstenteils zytosolischen Hintergrund in untransfizierten HT1080 Kontrollzellen (a), zeigt die exprimierende Linie 7 spezifische Signale an der Zellmembran (b).

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

3.8 Baktofektion von Vektoren zur Erzeugung künstlicher menschlicher Chromosomen

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

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

Um diese grundsätzlichen Fragen zu klären, wurden mit den Konstrukten B_2T_8, CGT21 und $pTTE_1$ stabile $HT1080^-$ Zelllinien erzeugt, und diese dann mittels PCR, Southern Hybridisierung und FISH analysiert. Die Stabilität EGFP exprimierender HAC Zelllinien ($pTTE_1$) wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS untersucht.

In die Baktofektion wurde zunächst ein homogener α-sat Array von Chr.17 (ca. 190 kb) eingesetzt, der zuvor mittels Lipofektion und intranukleärer Mikroinjektion auf seine HAC Formierungskompetenz geprüft wurde (Schindelhauer 2002; diese Arbeit, Daten nicht gezeigt). Bei der Mikroinjektion führten ca 1.200 intranukleäre Injektionen mit ca. $10\text{-}10^2$ Molekülen des telomerisierten, linearen B_2T_8 (Abb. 27) pro pl Injektionsvolumen zu drei stabilen Klonen. Das bedeutet, dass eine kontrolliert niedrige Kopiezahl eine verhältnismässig hohe Effizienz der Klonformierung zeigt. Im Vergleich wird bei der Lipofektion, die in der Regel zur Aufnahme vieler Moleküle in einer grossen Fraktion der Zellen führt, nur eine Klonformierungsrate von 1-100 in 10^6 Zellen beobachtet. Alle drei per FISH analysierten Linien zeigten HACs in mindestens 1/3 der Metaphasen (15 Metaphasen pro Linie).
Lipofektion von 100 ng telomerisierten B_2T_8 in $HT1080^-$ Zellen resultierte in 12 BS resistenten Kolonien (in $5x10^5$ Zellen), von denen 3 mit FISH untersucht wurden. In einem Fall integrierte der Vektor in die telomerische Region eines endogenen Chromosoms, in 2 Fällen wurden *de novo* formierte HACs beobachtet (unveröffentlichte Ergebnisse).

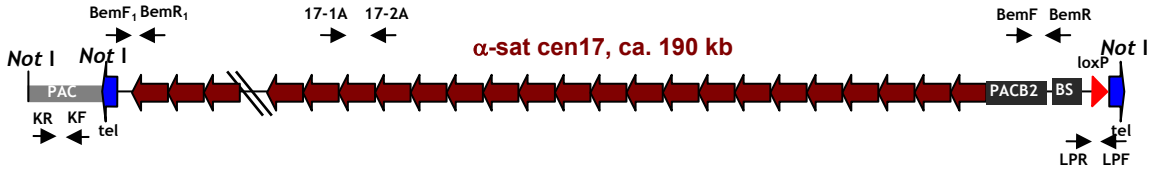


Abbildung 27: **B_2T_8**. Ein homogenes Chr. 17 α-sat Array aus PAC B2 (ca. 190 kb) wurde von Dr. Schindelhauer als *Not* I Fragment (ca. 206 kb) in die *Bsp* 120 I Stelle des ditelomerischen Vektor pTAT-Bs (17 kb) kloniert. Nach *Not* I Spaltung kann das PAC-Backbone (8,7 kb) abgespalten werden um einen ca. 215 kb langen, telomerisierten HAC Vektor zu erzeugen, der für Mikroinjektionen und Lipofektionen verwendet wurde. In Baktofektionen wurde das zirkuläre Konstrukt (ca. 223 kb) eingesetzt. Die Primerpaare für STS Nachweise per PCR sind mit Pfeilen angegeben. Die Primer 17-1A und 17-2A (Warburton et al., 1990) binden ebenfalls in den tausendfach vorhandenen Repeats der α-sat Arrays der endogenen Chromosomen 17 (nicht masstabsgetreu).

Für die Baktofektion wurde DNA aus 1/10 Agaroseplug des zirkulären B_2T_8 per Agarase eluiert und in die Transferbakterien elektroporiert. PCR Analyse der Bakterienkolonien bestätigte die Anwesenheit der Marker (LPF/R, BemF/R, KF/R, BemF1/R1 und 17-1A/2A; siehe Abb. 27) in der Mehrzahl der erzeugten Kolonien. Baktofektion einer niedrigen MOI von 25 erzeugte 21 BS resistente HT1080$^-$ Kolonien von denen drei (10-3, 10-6 und 10-8) in BS expandiert wurden. Dies zeigt, dass Baktofektion niedriger MOI der Transferbakterien, wovon jedes nur 1-3 Konstrukte enthält, eine effiziente Methode ist, um lange HAC Vektoren stabil zu Transfizieren. Linie 10-8 stellte nach ca. 10 Tagen BS Selektion das Wachstum ein und wurde verworfen. Kerne der Linien 10-3 und 10-6 wurden nach 30 Tagen Selektion, sowie nach weiteren 30 Tagen ohne BS auf Objektträger getropft, um per FISH Analyse die Stabilität des Transgens ohne Selektion zu bestimmen. In beiden Linien waren, unabhängig vom Zeitpunkt der Präparation, zwei bis drei HACs pro Metaphase zu erkennen (Abb. 28). In Linie 10-3 sind ein bis zwei, in Linie 10-6 meist zwei bis drei (gelegentlich bis zu fünf) HAC Signale pro Metaphase nachweisbar. Die cen17 Sonde lokalisiert mit zwei grünen Punkten auf den blauen DAPI Spots. Die Rsf Sonde (rot) lokalisiert ebenfalls deutlich auf den HACs (Abb. 28a, b, d, e). Kombination einer *E.coli* gesamt-DNA Sonde (rot) mit der cen17 Sonde (grün) erzeugte ebenfalls deutliche Signale auf den HACs (Abb. 28c, f) was auf den Transfer prokaryotischer DNA-Anteile hinweisen könnte. Tests der E.coli DNA-Sonde auf lipofizierten Linien (linearisiert, ohne P1 Replikon des PAC-Vektors) zeigten per „Dual colour" FISH keine spezifischen Signale. Es muss nun geklärt werden, ob ein Sequenz Anteil des Vektors für eine Kreuzhybridisierung mit der *E.coli*-Sonde verantwortlich ist, oder ob ein bakterieller DNA Anteil übertragen wurde.

Die Ergebnisse belegen eindrucksvoll, dass Baktofektion eine effiziente Methode ist, um mit dem Konstrukt B_2T_8 *de novo* HACs zu bilden, die ohne Selektion mitotisch stabil in HT1080 segregieren.

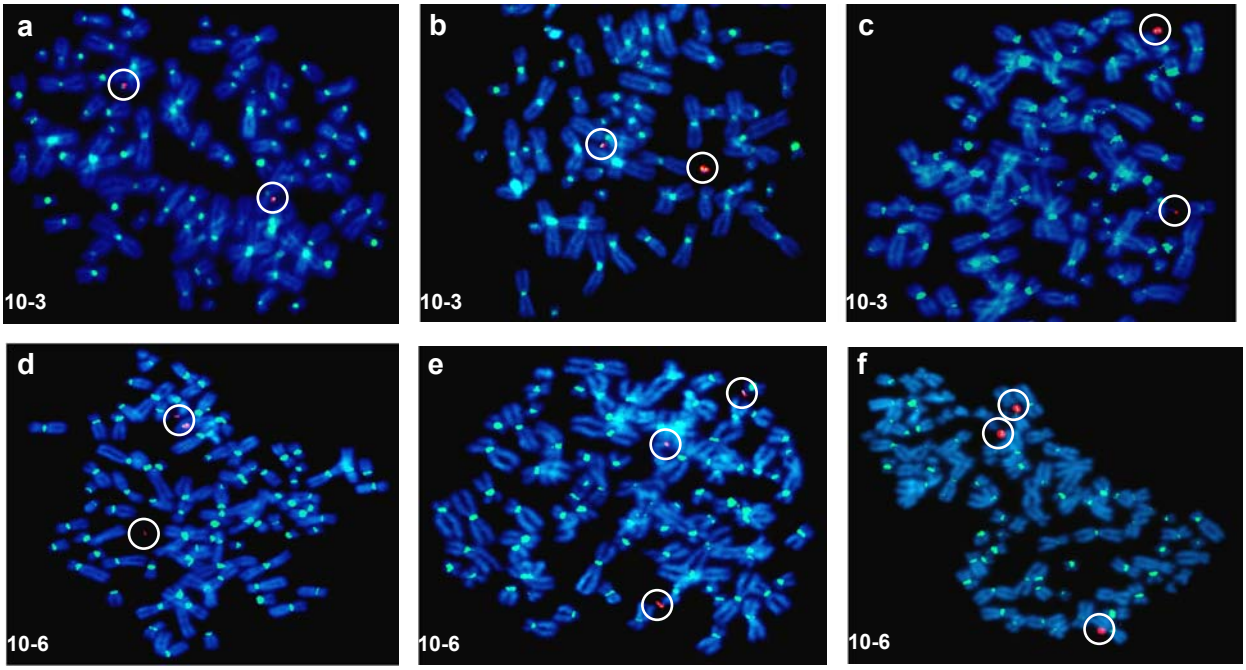


Abbildung 28: **HAC Nachweis in den baktofizierten Linien 10-3 und 10-6 mittels „Dual colour" FISH**. a) Metaphasen der Linie 10-3 zeigten nach 30 Tagen Blasticidin-S (BS) Selektion 1-3 HACs (weisse Kreise). (grün: α-sat Probe von Chromosom 17; rot: Vektorprobe "Rsf", ein 3,15 kb pTAT-Bs-Vektorfragment,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

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

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

Um zu überprüfen, ob bakterielle DNA auf HACs übertragen wurde, wurden PCR Analysen aus chromosomaler DNA der Linien 10-3 und 10-6 durchgeführt. Mit Oligonukleotidprimern, die für das IS1 Element („Insertion Element 1“; repetitives Element das in 12 Kopien im Genom des Transferstamms vorliegt; Grillot-Courvalin, 1998) spezifisch sind, konnten Produkte aus beiden Linien 10-3 und 10-6 (nach 30 Tagen BS Selektion) amplifiziert werden (nicht gezeigt). Dies könnte für eine Cotransfektion genomischer *E.coli* DNA mit den HACs sprechen, oder für eine Transposition des IS1 Elements in die HAC Konstrukte während der Vermehrung in *E.coli* (im Stamm DH10B während der Konstruktion oder nach Übertragung auf den Transferstamm). Aus diesem Grund wurde *I-Sce* I gespaltene DNA der Konstrukte pTT, B_2T_8, TTE_1 und CGT21, im ursprünglichen *E.coli* Stamm DH10B und im Transferstamm im PFG aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der Sonde IS1 hybridisiert.

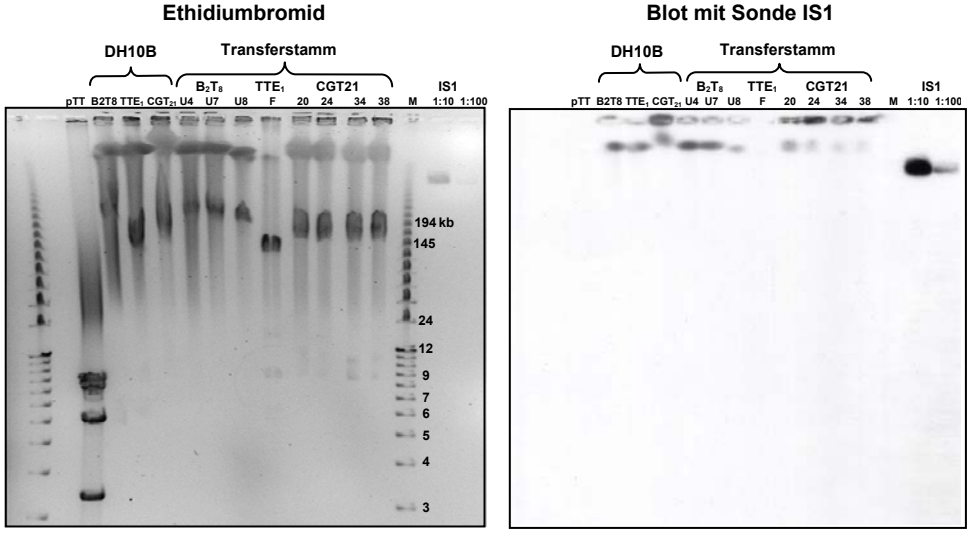


Abbildung 29: **Nachweis der Stabilität der PAC Konstrukte im Transferstamm**. 1/10 Agaroseplug der angegebenen Vektoren wurde mit *I-Sce* I gespalten, auf einem PFG aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (links). Neben dem Konstrukt pTT (26 kb, flüssige Präparation) wurde B_2T_8 (220 kb), TTE_1 (142 kb) und CGT21 (159 kb) analysiert. Die gleichen Konstrukte wurden auf Transferbakterien übertragen, mehrere Klone wurden expandiert und ebenfalls aufgetragen (B_2T_8: U4, 7 und 8; TTE_1: F; CGT21: 20, 24, 34, und 38). Alle übertragenen Konstrukte zeigten im Transferstamm die gleiche Länge. Das Pulsfeldgel wurde geblottet (Southern) und mittels Hybridisierung mit einer P_{32}-markierten IS1 Sonde analysiert (rechts). In allen Vektoren konnte damit die Anwesenheit des *E.coli*-Elements IS1 eindeutig ausgeschlossen werden. Die Kontrollbahnen mit der IS1 Sequenz (IS1 PCR Produkt, 1:10 und 1:100, kurz vor Gellaufende aufgetragen) und die *E.coli* DNA, die nach Reinigung noch in kleinen Mengen in der Bande limitierter Mobilität auftrat (unterhalb der Taschen, im Ethidiumbromidgel zusammen mit ungespaltener, „genickter" DNA der Vektoren), hybridisierte spezifisch mit der IS1 Probe (M, 1 kb Leiter und „Midrange II").

Wie in Abb. 29 deutlich zu erkennen, sind auf keinem der Vektoren IS1 Sequenzen enthalten. Dieser Befund würde also eher für eine Übertragung von *E.coli* Sequenzen bei der HAC Formierung sprechen. Aus diesem Grund wurde genomische DNA aus verschiedenen baktofizierten und einer lipofizierten Linie in Agaroseblöckchen präpariert und ungespalten oder mit *Not* I gespalten auf einem Pulsfeldgel mit einer Auftrennung zwischen 10 kb und 3 Mb analysiert. Dabei konnten jedoch keine spezifischen *Not* I Banden der gespaltenen *E.coli* DNA (zwischen 20 kb und 1 Mb; Smith, 1987) nachgewiesen werden (Abb. 30). Da die Sonde stark mit Material in den Taschen hybridisierte, könnte die *Not* I Spaltung unvollständig gewesen sein, etwa durch Methylierung der CpGs in den *Not* I Stellen. Der nach 2-wöchiger Exposition gleichmässig in allen Spuren auftretende Schmier spricht eher für eine unspezifische Hybridisierung der Sonde. Ein Film der bereits nach zwei Tagen entwickelt wurde, (nicht gezeigt) zeigte nur bei der Positivkontrolle ein deutliches Signal (*E.coli* gesamt-DNA, ca. 50 ng). Als Kontrolle wurden ausserdem zwei $pTTE_1$ Linien aufgetragen, von denen eine mit Baktofektion (TTE_1-F100/4) und eine mit Lipofektion (TTE_1-20) erzeugt wurde. Da beide Linien im Wesentlichen das gleiche Hybridisierungsmuster zeigten, inklusive der deutlichen Signale in den Taschen, und schwacher Banden bei ca. 380 kb, die spezifisch für beide Linien mit dem Konstrukt $pTTE_1$ waren, konnte durch dieses Experiment ein Vorhandensein stabil vererbter, deutlicher Mengen von *E.coli* DNA durch die Baktofektion ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse können leider nicht hinreichend klären, wie es zu den starken FISH Signalen mit der *E.coli* gesamt-DNA Sonde kam, legen aber die Möglichkeit nahe, dass es sich um eine im Wesentlichen unspezifische Bindung an die HACs handeln könnte, und nicht um die Anwesenheit großer Mengen *E.coli* Sequenzen selbst. Eine „Blast" Suche zur möglichen Kreuzhybridisierung mit pTAT und PAC Vektorsequenzen erbrachte Regionen mit einer hohen Übereinstimmung, z.B. 95% über eine Länge von 170 bp (Tab. 2). Die längste perfekte Übereinstimmung betrifft ein *E.coli* Fragment mit einer Länge von 1,9 kb, das im ursprünglichen Vektor pTAT als Spacer zwischen den Telomersequenzen bei der Klonierung des Ampicillin Resistenzgens zusätzlich inserierte.

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

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

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

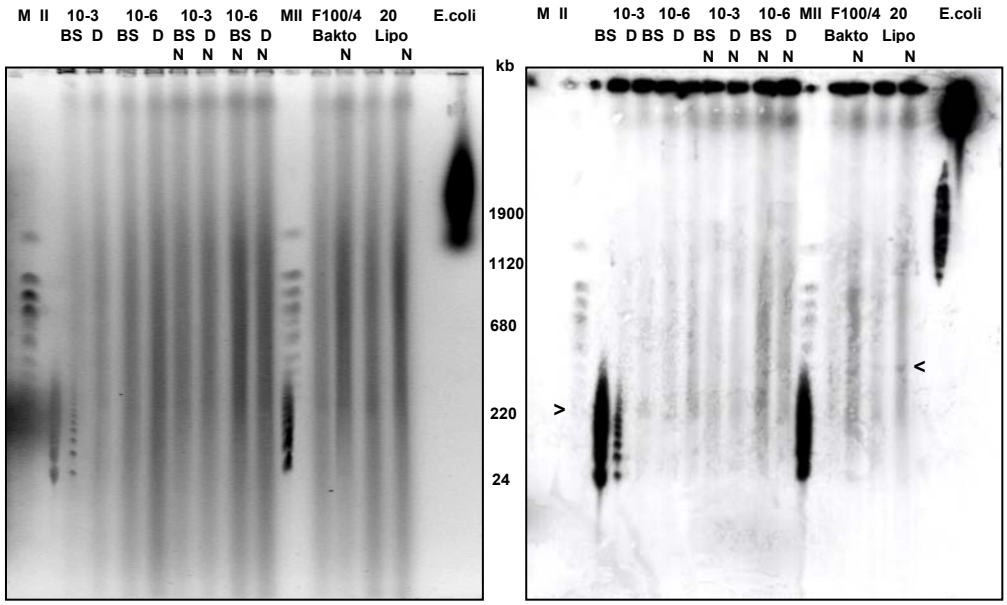


Abbildung 30: **Test auf *E.coli* DNA.** Pulsfeldgelektrophorese genomischer DNA der baktofizierten B_2T_8 Linien 10-3 und 10-6, sowie der TTE_1 Linie F100/4 und der lipofizierten TTE_1 Linie 20. Genomische DNA wurde nach 30 Tagen Blasticidin-S Selektion (BS) und nach weiteren 30 Tagen ohne Blasticidin-S Selektion in Agaroseblöckchen präpariert. Ein halbes Blöckchen mit ca. $5x10^5$ Zellen wurde entweder ungespalten, oder *Not* I gespalten (N) aufgetragen (6V/cm, 16 h, Switch Zeit: 1s-60s), und mit Ethidiumbromid gefärbt (links). Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde die DNA mit einer P_{32} markierten *E.coli* gesamt-DNA Sonde hybridisiert und zwei Wochen auf einem Röntgenfilm exponiert (rechts). Die letzte Spur enthielt genomische *E.coli* gesamt-DNA (ca 50 ng) als positiv-Kontrolle, die 2 h vor Ende des PFG-Laufes aufgetragen wurde. In der *E.coli* Kontrollbahn ist im mit Ethidiumbromid gefärbten Gel vor allem eine große Menge *E.coli* RNA zu sehen. Die ungespaltene *E.coli* DNA (gefällte, gelöste DNA) läuft knapp unterhalb der Tasche (schwach gefärbte Bande). Die Sonde erkennt zwar einen leichten Schmier in allen Spuren, sowie schwache Signale bei einer Länge um 220 kb („>“) (bei

den Linien 10-3 und 10-6 aus dem Konstrukt B_2T_8 das eine zirkuläre Input Länge von 220 kb hat), diese sind allerdings gleichermassen in den ungespaltenen und in den *Not* I gespaltenen Bahnen anwesend, und könnten unspezifisch linearisierte Fragmente darstellen. In den TTE_1 Linien (Input Länge von 142 kb) ist bei ca. 380 kb eine ähnliche, unspezifisch linearisierte Bande zu sehen („<"). Da diese auch in der lipofizierten Linie 20 erkennbar war, in der weder mit PCR noch mit FISH detektierbare Mengen an *E.coli* DNA nachgewiesen werden konnten, handelt es sich in allen Spuren wahrscheinlich um einen unspezifischen Schmier, oder um eine schwache Kreuzhybridisierung der *E.coli* DNA Sonde mit unspezifisch gebrochenen Fragmenten, die höchstwahrscheinlich auf die (unterschiedlich langen) Input DNAs zurückzuführen sind. Zusätzlich zum unspezifischen Schmier und den schwachen kreuzhybridisierenden Banden, befinden sich stärkere Signale in den Taschen. Diese könnten eine zirkuläre DNA Fraktion darstellen, die mit *Not* I ungespalten bleibt, wenn eine Methylierung der CpGs der *Not* I Stellen im Genom stattgefunden hat. Auch diese mögliche zirkuläre DNA Fraktion ist gleichermassen in baktofizierten und in lipofizierten Linien vorhanden. Diese Ergebnisse sprechen eher gegen das Vorhandensein größerer Mengen *E.coli* DNA durch die Baktofektion, und für eine deutliche Kreuzhybridisierung mit HAC Vektoranteilen. (M, PFG Marker I; II, PFG Marker II).

Um die HAC Stabilität zusätzlich zu den FISH Daten mittels Hybridisierung eines Dosis-Southern Blots zu bestimmen, wurde genomische DNA der Linien 10-3 und 10-6 nach 30 Tagen BS Selektion und nach weiteren 30 Tagen ohne Selektion präpariert, *Hind* III gespalten und zu gleichen Konzentrationen auf einem 1% -igen Agarosegel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde die DNA mit der P_{32} markierten Sonde "Rsf", die eine 3,15 kb Region auf pTAT-Bs darstellt und den BS Resistenzmarker enthält, hybridisiert (Abb. 31). Mit und ohne Selektion werden die HACs und das Resistenzgen stabil vererbt (vgl. Abb. 23c).

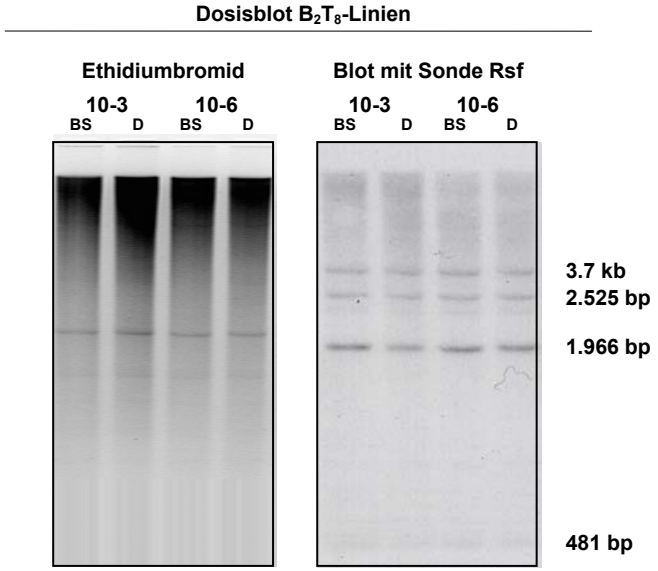


Abbildung 31: **Dosisblot der B_2T_8-Linien 10-3 und 10-6**. Um eine stabile Vererbung der HACs und eines darauf enthaltenen Resistenzgens nachzuweisen, wurde chromosomale DNA der Linien 10-3 und 10-6 (30 Tage mit (BS) und 30 Tage ohne Selektion (D)) *Hind* III gespalten, zu gleichen Mengen auf einem 1% -igen Agarosegel aufgetrennt und Ethidiumbromid gefärbt (links). Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde die DNA mit der P_{32}-markierten Vektor Sonde "Rsf" hybridisiert. Die Sonde erkennt die B_2T_8 spezifischen Vektorbanden von 481 bp (sehr schwach), 1.966 bp, 2.525 bp und ca. 3,7 kb. Die Intensität der Banden ändert sich über die Zeit (30 Tage) nicht, dies spricht für die hohe mitotische Stabilität der HACs und ihres enthaltenen Resistenzgens unabhängig von der Selektion.

3.8.1 Baktofektion von pTTE$_1$ führt zur Bildung grüner Kolonien und *de novo* HAC Formierung

Der in dieser Arbeit konstruierte HAC Vektor pTTE$_1$, der ca. 116 kb α-sat DNA von Chr. 5 enthält und nach Telomerisierung und Lipofektion HACs *de novo* bildete, wurde auf seine Kompetenz getestet, per Baktofektion stabile Linien mit HACs zu erzeugen. Die DNA von 1/10 Agaroseblöckchen, welches hochreinen, zirkulären pTTE$_1$ enthielt, wurde per Agarase freigesetzt und 1 µl davon in den Transferstamm BM2710 elektroporiert. Dies erzeugte über 50 Kolonien, die mit geeigneten Oligonukleotidprimern nach STS (LPF/R, BemF/R, KF/R, BemF1/R1, EGF/R und 5IF/R; siehe Abb. 32) getestet wurden. In nahezu allen Klonen konnten die analysierten STS nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was für einen vollständigen Transfer von pTTE$_1$ in die Bakterien spricht. Die stabile Vermehrung des intakten Konstrukts wurde mittels Längenbestimmung auf einem Pulsfeldgel überprüft (siehe Klon F; Abb. 29).

***Abbildung 32:* pTTE$_1$ für Baktofektion.** Das Konstrukt pTTE$_1$ (ca. 116 kb α-sat Array E$_1$ von Chromosom 5 in pTT kloniert), wurde aus 1/10 Gelblöckchen isoliert und zirkulär in Baktofektionen eingesetzt. Die Lage der „sequence tagged sites“ (STS) ist mit den entsprechenden Primerpaaren angegeben (nicht masstabsgetreu).

Baktofektion in HT1080$^-$ mit einer MOI von 25 erzeugte über 17 BS resistente Kolonien, von denen sechs (TTE$_1$-F100-1, 3, 4, 5, 6 und 7) isoliert und expandiert wurden. Die überwiegende Mehrzahl der gebildeten Klone zeigte eine homogene, unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich sichtbare Expression des EGFP Markers in allen oder fast allen Zellen. Um die Stabilität der Expression über einen längeren Zeitraum hinweg zu beobachten, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten per FACS-Analyse und unter dem Mikroskop die Fraktion grüner Zellen bestimmt. Aus Tabelle 3 geht hervor, dass der Prozentsatz EGFP-exprimierender Zellen in drei Linien (F100-1, 4 und 5) über den Zeitraum von 30 Tagen ohne Selektion sehr langsam abnahm, was durch einen seltenen mitotischen Verlust von HACs (eine Verlustrate von < 1% pro Mitose ist als normale Stabilität zu werten), oder gelegentliche epigenetische Gen-Inaktivierung (Silencing) zu erklären wäre. Linie F100-7 („Ausreisser“) zeigte eine deutliche Zunahme an grün fluoreszierenden Zellen, wobei diese Linie zu Beginn nur vereinzelt grüne Zellen aufwies.

Tabelle 3: Analyse der Stabilität der grünen Fluoreszenz in den TTE_1 F100 Linien

TTE_1 Linien	**% grüne Zellen** FACS (25d BS)	**% grüne Zellen** Mikroskop (30d BS)	**% grüne Zellen** Mikroskop (30d ohne BS)
F100-1	99,5	100	70
F100-3	60	90	90
F100-4	99,4	100	75
F100-5	94,5	95	90
F100-6	100	100	100
F100-7	0,6	5	30

Metaphasen der Linien F100-1 und F100-4 wurden nach 30-tägiger BS Selektion und weiteren 30 Tagen ohne Selektion präpariert, und mittels „Dual colour“ FISH mit den Sonden Rsf (rot) sowie cen5I E_1 (grün) hybridisiert. In der Linie F100-1 wurden in 10 von 19 Metaphasen 1-2 HACs nachgwiesen, Linie F100-4 zeigte in 16 von 23 untersuchten Metaphasen deutliche HAC Signale (1-2 pro Metaphase) (Abb. 33).

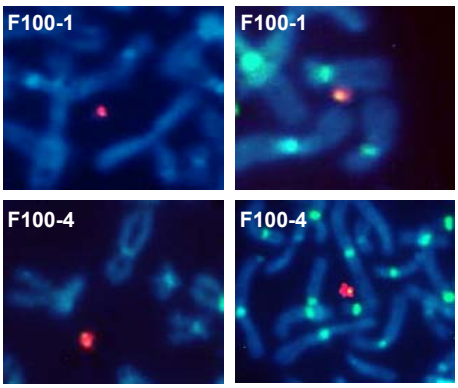


Abbildung 33: **Nachweis von HACs in den stabilen TTE_1 Linien F100-1 und F100-4 mittels „Dual colour“ FISH**. Ausschnitte aus je zwei Metaphasen beider Linien. In beiden Linien sind in mindestens 50% aller Metaphasen deutliche HAC Signale (rot = Rsf; grün = cen5I “E_1“; blau =DAPI) zu erkennen.

Diese Resultate zeigen, dass der neu konstruierte HAC Vektor $pTTE_1$ mit Baktofektion in die Zellinie HT1080 stabile künstliche Chromosomen *de novo* formiert. Die „low copy“ HACs segregieren auch ohne Selektion stabil (30 Tage entspricht etwa 30 Zellteilungen). Diese hohe Stabilität der HACs ohne Integration in endogene Chromosomen spricht für die Formierung funktioneller Zentromere.

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

3.8.2 Baktofektion von CGT21 erzeugt Klone mit hoher Effizienz

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

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

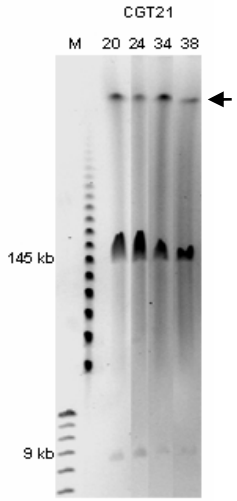


Abbildung 34: **Stabilität von CGT21 in Transferbakterien.** Die 4 Transferbakterienkulturen CGT21 20, 24, 34 und 38 wurden zum Zeitpunkt der Baktofektion in Agaroseplugs gegossen, gereiningt und zur Längenbestimmung der Konstrukte mit *I-Sce* I gespalten. PFGE und Ethidiumbromidfärbung bestätigte intakten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

4 Diskussion

Das Ziel einer Gentherapie mit Hilfe künstlicher menschlicher Chromosomen ist die Etablierung einer zelltypspezifischen, regulierten Expression eines therapeutischen Gens in Zielzellen, und zwar ohne die Zelle und nachfolgende Tochterzellen zu schädigen. Die Übertragung eines Gens in einer Weise, die über das reine Ablesen der kodierenden Sequenzen hinausgeht und eine mitotisch stabile Vererbung der Sequenzen ermöglicht, die dabei ein funktionelles Chromatin ausbilden, das eine normale, regulierte Expression in den verschiedenen Zelltypen erlaubt, ist allerdings ein komplexes Vorhaben. Zahlreiche Transfektionsstudien zeigten, dass der rein physikalische Transfer eines Genfragments in den Zellkern unzureichend ist. Nur in seltenen Fällen werden trotz Anwesenheit der (Resistenz)Gene stabile Linien erhalten. Diese weisen dann alle eine Integration in zelleigene Chromosomen auf, die im Wesentlichen durch zelleigene Reparaturvorgänge mit der transfizierten DNA an zufälligen Stellen entstehen.
Für eine stabile Vererbung der DNA ohne Integration in die Chromosomen des Wirts wird konsequenterweise ein voll funktionstüchtiges Chromosom notwendig, das das Transgen trägt. Nur so können die essentiellen Funktionen erhalten werden (Segregation, Replikation, regulierte Expression, Reparatur, etc.), die auch an den endogenen DNA Sequenzen fortwährend ablaufen. Die stabile mitotische Vererbung eines Chromosoms setzt voraus, dass seine Sequenz einmal pro Zellzyklus komplett repliziert wird und gegebenenfalls auftretende Schäden effizient repariert werden. Um ein für die Expression des Transgens geeignetes Chromatinumfeld auszubilden, ist ferner die Anordnung im dreidimensionalen Gefüge des Zellkerns entscheidend.

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

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

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

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

4.1 Marker für *in vivo* Gentransfer weniger Vektormoleküle

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

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

Da nicht klar ist, ob einzelne, stabil in endogene Chromosomen integriere Reportermoleküle (z.B. EGFP) mitunter für einen verlässlichen Nachweis ausreichen könnten, sollte untersucht werden ob eine EGFP-cDNA Kassette auf „low copy“ Konstrukten nachgewiesen werden kann, die stabile HACs formieren. Die Klonierung einer EGFP-Kassette auf den neu konstruierten Vektor pTT dient deshalb der Identifizierung erfolgreich transfizierter Zellen, die den Reporter von stabil vererbten Kopien exprimieren (im Gegensatz zu transienter Expression).
Diese Überlegung trifft auch auf das CFTR-Expressionskonstrukt CGT21 zu, in dem die EGFP-cDNA unter Einhaltung des Leserahmens an Exon 10 des genomischen CFTR-Lokus kloniert wurde und somit unter der Kontrolle des endogenen CFTR-Promotors steht. Mit diesem Konstrukt kann (einerseits durch Fluoreszenz nach verstärkter Expression, andererseits durch RT-PCR Analyse der Expression des künstlichen Fusionsproteins) der intakte Transfer von 80 kb des Primärtranskripts (vom CFTR Minimalpromotor-Exon 1 bis Exon 10-GFP-Exon 24) bestimmt werden.

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

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

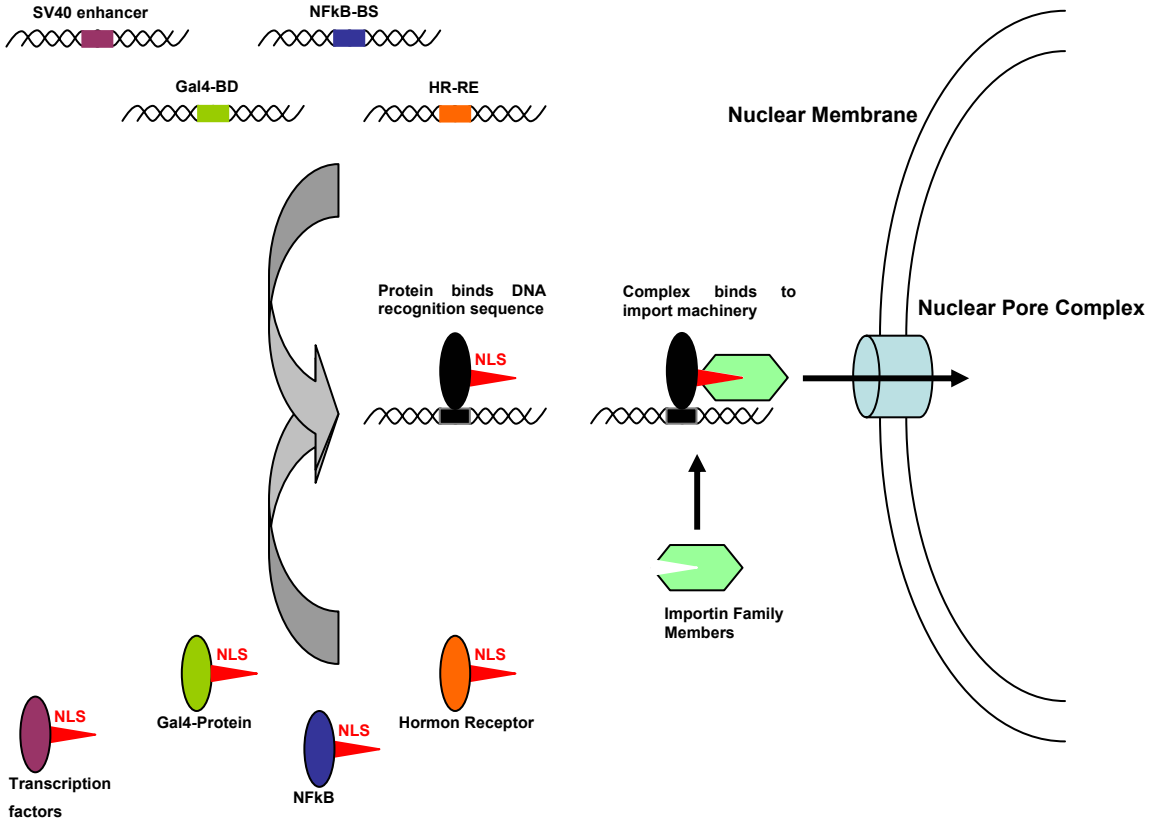


Abbildung 35: **Modell des „Nuclear hitchhiking" extrachromosomaler DNA-Sequenzen mit Erkennungsstellen für NLS-tragende Proteine:** Die im Cytoplasma synthetisierten, kernlokalisierten Proteine (allgemeine Transkriptionsfaktoren (lila), Gal4-Protein (grün), NFκB (blau) oder Hormon-Rezeptoren (orange))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

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

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

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

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

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

4.2 pTT, ein verbesserter HAC Vektor

Da *de novo* gebildete HACs in der Regel länger erscheinen (Propidiumjodid-Färbung, Größe der DAPI-Elemente) als die eingesetzten Input DNA Moleküle vorgeben, wird von einer Konkatemerisierung bzw. Verkettung mehrerer Input Moleküle ausgegangen. Dabei könnten seltene zelleigene Mechanismen (Rekombination, Ligation, Replikation, Reparatur, ect.) an den transfizierten Konstrukten stattfinden, die die Effizienz der Formierung möglicherweise senken, aber Voraussetzung dafür sein könnten, dass sich HACs überhaupt formieren. Von einer „richtigen“ Anordnung der Komponenten auf den Vektoren wird eine Steigerung der HAC Formierungseffizienz erwartet. Gegenüber einer frühen Methode der HAC Erzeugung, der Cotransfektion gesamt-genomischer Sequenzen und telomerischer Sequenzen mit einem selektionierbaren α-sat Array (Harrington 1997), stellte die Entwicklung von PAC-basierenden ditelomerischen Vektoren als Träger der isolierten Komponenten eine deutliche Verbesserung dar (Schindelhauer, 1999; Ebersole, 2000). Der Konstruktion von pTT gingen mehrere Überlegungen voraus:
So sollte überprüft werden, ob die Duplikation von Vektorsequenzen, die im Gegensatz zur genomischen DNA keine homologen Sequenzen für Rekombination oder Reparatur besitzt, die Klonformierungsrate beeinflusst. Dieser Überlegung liegt zugrunde, dass genomische DNA praktisch nie in „single copy“ vorliegt und somit jederzeit effizient über homologe Rekombination repariert werden kann. Da sich α-sat Arrays-tragende HAC Vektoren nach Transfektion scheinbar zu multimeren der Input DNA formieren, könnte das ein Hinweis auf die Notwendigkeit der Anwesenheit duplizierter Sequenzen für die HAC Stabilität sein. Duplizierte Telomer Repeats könnten das Konstrukt über die erleichterte Ausbildung endständiger T-Loops zusätzlich stabilisieren.

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

Schmid, 1991; Zirbel, 1993; van Driel, 1995; Kurz, 1995; Ferreira, 1997; Zink, 1998; Cremer, 2000). Dem „Multi-Loop-Subcompartment“ (MLS) Modell folgend scheint das menschliche Chromatin in Loops von ca. 100 kb Länge organisiert zu sein, welche sich zu Rosetten formieren die untereinander durch Linker verknüpft sind (Knoch, 2003; Langowski, pers. Mitteilung). Wenn HAC Vektoren unmittelbar nach Transfektion eine dem endogenen Chromatin vergleichbare Organisation/Struktur annehmen würden, sollte dies den limitierenden ersten Schritt der HAC Formierung dramatisch verbessern. Um HAC Vektoren eine Loop-Bildung durch Bereitstellung duplizierter Vektor und Telomer Sequenzen zu erleichtern wurde $pTTE_1$, ein 142 kb PAC Konstrukt mit einem ca. 116 kb α-sat Array von Chromosom 5 konstruiert (Abb. 36, siehe auch Abb. 16).

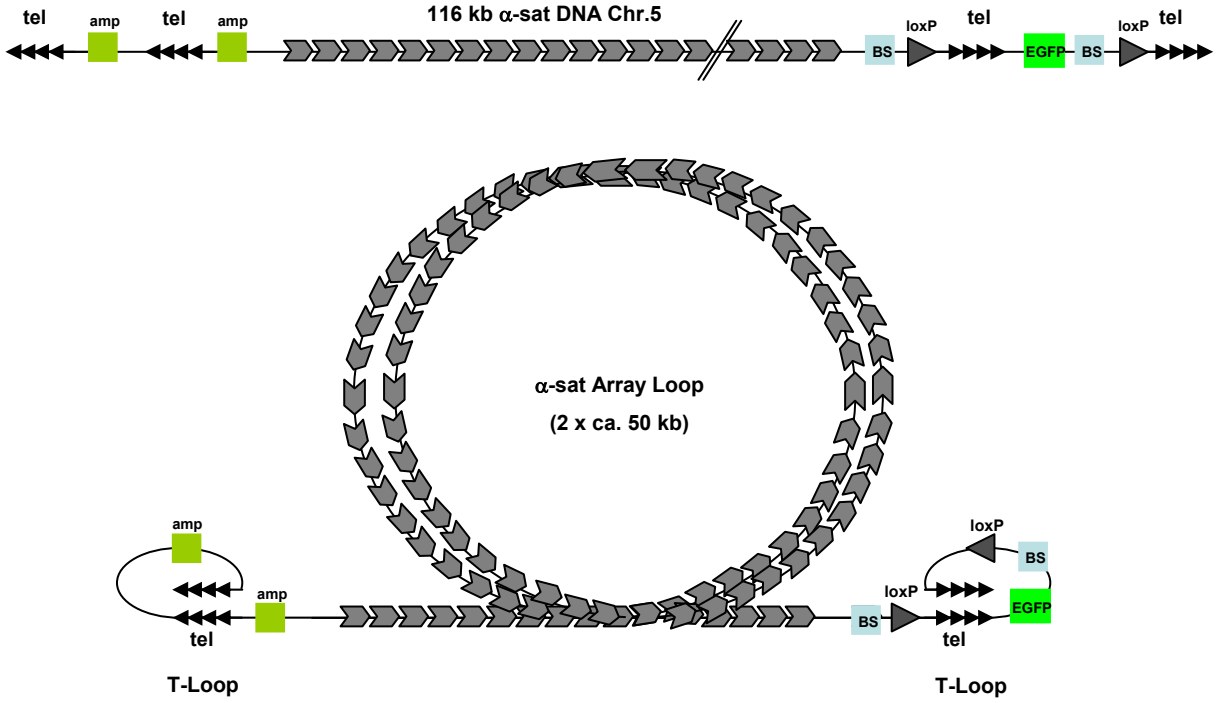


Abbildung 36: **Modell einer erleichterten Loop-Bildung von HAC Vektoren durch Bereitstellung duplizierter Vektor und Telomer Sequenzen sowie langer, homogener α-sat Arrays.** Um der Organisation des Chromatins im Nukleus (zumindest ansatzweise) Rechnung zu tragen, wurde der HAC Vektor $pTTE_1$ (142 kb) konstruiert (obere Hälfte, als telomerisierter Vektoranteil ohne PAC-backbone mit ca. 134 kb). Die Anordnung je zweier telomerischer Repeats im Abstand von 2,5 kb und 5,1 kb zueinander könnte eine T-Loop Bildung unterstützen (untere Hälfte). Die Bereitstellung duplizierter Vektorsequenzen soll dem Konstrukt intramolekulare Rekombination ermöglichen, was die *de novo* HAC Formierung oder die Reparatur von Doppelstrangbrüchen auf stabilen HACs unterstützen könnte. Die Klonierung von ca. 116 kb repetitiver, hoch homogener cen5 α-sat vom Typ I (2-mer Familie) könnte eine flexible, bei verschiedenen Loopgrößen gleichermassen passende DNA-Loop Anordnung (z.B. 2 x 50 kb) ermöglichen (nicht masstabsgetreu).

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

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

In Transfektionsassays konnte durch direkten Vergleich des Vorläufers pTAT-Bs mit dem neu konstruierten pTT keine Verbesserung der Effizienz der HAC *de novo*-Formierung festgestellt werden (siehe Tab. 4, Anhang). Unabhängig davon, ob beide Vektoren nur mit den cen5 Arrays E_1 bzw. F_1 (pTE_1T, $pTTE_1$, pTF_1T, $pTTF_1$) oder in Cotransfektionen mit genomischen Komponenten (CGT21 und THT_{22}) verwendet wurden, konnte kein deutlicher Unterschied der Zentromersequenzen in der Klonformierungsrate beobachtet werden. Um statistisch eine mögliche Verbesserung über die Rate der Klonformierung zu zeigen, sind allerdings erheblich mehr Transfektionen pro Konstrukt nötig, was den Rahmen dieser Arbeit bei weitem überschreiten würde. Es traten in den einzelnen Versuchen so große Schwankungen auf (z.B. 200 ng pTF_1T + 50 ng CGT21 auf 2 Platten verteilt erzeugte 38 und 3 Kolonien), dass sich der durchgeführte Transfektionsassay über die Auszählung von stabilen Klonen pro transfizierter Platte als ungeeignet erwies.

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

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

Die Verbesserung des Basis HAC Vektors pTAT-Bs umfasste neben der Duplikation von Vektor- und Telomersequenzen in pTT („strukturelle“ Modifikation) auch die Klonierung zweier homogener α-sat Familien von Chromosom 5 (Typ cen5I „E_1“ und cen5II „F_1“), um diese auf ihre Kompetenz zu testen, *de novo* ein Zentromer zu formieren. Die Gruppe von Willard zeigte, dass stabil vererbte HACs mit verschiedenen zentromerischen α-sat Arrays unterschiedliche *de novo*-Formierungsraten (Schueler, 2001) und „nondisjunction“ Frequenzen (> 5-fach, auf niedrigem Niveau) aufweisen (Rudd, 2003). Diese Daten weisen darauf hin, dass Variationen im DNA Gehalt der α-sat Arrays das mitotische Verhalten von HACs beeinflussen. Die Identifizierung neuer, HAC kompetenter α-sat Sequenzen dient deshalb der Optimierung zentromerischer HAC Komponenten. Beide Arrays (E_1 und F_1) erwiesen sich als geeignete Substrate, um als zentromerische Komponenten auf HAC Vektoren zu dienen (3.5). Sowohl in Einzel- als auch in Cotransfektionen mit genomischen Komponenten erzeugten sie HACs *de novo* (Tab. 4, Anhang). Die Orientierung der α-sat Arrays relativ zum BS Resistenzmarker hatte dabei keinen messbaren Einfluss auf die Rate der Klonformierung. Fukagawa (2004) konnte erst vor kurzem zeigen, dass Bereiche in bzw. nahe an menschlichen Zentromeren transkribiert werden. Mit einer konditionalen „knock-out“ Zelllinie für die RNase „dicer“ konnten die Autoren ausserdem zeigen, dass „dicer“, das u.a. eine Schlüsselrolle bei der RNA-Interferenz (RNAi) spielt, normalerweise die langen zentromerspezifischen Transkripte spaltet. Das Fehlen von „dicer“ bewirkte eine vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden und somit Mitosefehler. Diese Daten zeigen, dass zumindest perizentrisch Transkription der α-sat DNA stattfindet, und rechtfertigt den Verdacht, dass die Orientierung der α-sat Arrays einen Einfluss auf umliegende Gene ausüben könnte, was jedoch auf unseren HACs nicht beobachtet werden konnte.

Darüber hinaus zeigte sich die Klonierung einer EGFP-Kassette auf den neu konstruierten Vektor pTT als überaus nützlicher Marker, um stabile Kolonien mittels grüner Fluoreszenz zu bestimmen und im Zeitverlauf zu analysieren. Im Gegensatz zu transienter Expression, die sehr früh nach Transfektion von hohen Kopiezahlen des Reporters verursacht wird, zeigten die mit $pTTE_1$ bzw. $pTTF_1$ erzeugten Zelllinien eine stabile Expression der EGFP-Kassette von *de novo* erzeugten künstlichen menschlichen Chromosomen; in keiner der analysierten Linien des Konstruktes $pTTE_1$ (n=12; 4 von 4 aus $pTTE_1$ Lipofektion, 4 von 4 aus $pTTE_1$ + pTHT22 Co-Lipofektion, 2 von 2 aus $pTTE_1$ Lipofektion spät grüne und 2 von 2 aus $pTTE_1$ Baktofektion) konnte eine Integration in endogene Chromosomen beobachtet werden. Dies ist der erste beschriebene HAC Vektor, der mit Hilfe grüner Fluoreszenz eine stabile Klonformierung und eine *de novo* HAC Formierung *in vivo* mit hoher Wahrscheinlichkeit anzeigen kann.

Die Bereitstellung einer blau/weiss selektionierbaren, „unique“ *Sal* I Restriktionsschnittstelle auf pTT (bzw. $pTTE_1/F_1$) vereinfacht ausserdem die weitere Klonierung von genomischen Komponenten (siehe Abb. 15 und Sequenz pTT im Anhang). Dies ist ein weiterer wichtiger Schritt, um HACs als Gentransfervektoren für die Gentherapie zu etablieren. Bisherige Methoden zur Erzeugung von HACs mit therapeutischen Genen bedienen sich der einfachen Cotransfektion von Zentromer- und Gen-tragenden Konstrukten, da die Voraussetzungen für eine gerichtete Anordnung auf einem Konstrukt unverstanden sind. Da der DNA Gehalt von HACs scheinbar einem Vielfachen der transfizierten Input DNA entspricht, werden replikationsabhängige (Duplikation) und/oder reparaturabhängige Prozesse (Verkettung bzw. Verknüpfung freier Enden der Konstrukte) als Ursachen diskutiert. Transfer von HAC Vektoren, welche sowohl Zentromersequenzen als auch therapeutische Gen-Loci tragen und unmittelbar nach Transfektion genetische Funktion übernehmen, ohne von der Zelle strukturell verändert zu werden, ist das Ziel der Vektor-Entwicklung für die gentherapeutische Anwendung. Bisherige Versuche zentromerische und genomische Komponenten auf einem Konstrukt zu vereinen erzielten jedoch keine deutliche Verbesserung gegenüber Cotransfektion der einzelnen Komponenten. Ein von Mejia und Larin konstruierter Vektor mit einem cen17 α-sat Array und dem HGPRT-Gen Lokus zeigte gegenüber dem Kontrollvektor ohne HGPRT Gen keine erhöhte Stabilität und eine relativ geringe HAC Formierungseffizienz (Mejia, 2002). Mit den Vektoren $pTTE_1$ und $pTTF_1$ kann nun durch Cotransfektion (ungerichtete Anordnung), durch Klonierung weiterer Komponenten in einem Konstrukt (gerichtete Anordnung, setzt stabile Klonierbarkeit in einem PAC voraus) oder nach dem Baukastenprinzip (mittels lox/Cre Rekombination einer zweiten Komponente *in vitro*, zur biochemischen Verbindung zweier klonierter Sequenzen über die Kloniergrenzen hinaus) versucht werden, durch Variation der Struktur genomischer Komponenten und einer geeigneten physikalischen Bereitstellung, HAC Vektoren weiter zu optimieren.

4.3 Cotransfektion: Synergismus oder additiver Effekt?

In Tabelle 4 (Anhang) sind die Ergebnisse der Einzel- und Cotransfektionen des Transfektionsassays aufgeführt. Die Zahl der BS resistenten Kolonien und die Zahl der grün fluoreszierenden Kolonien (nur bei Transfektionen mit $pTTE_1/pTTF_1$) wurde nach 14 Tagen BS Selektion bestimmt. Daran folgte bei ausgewählten Cotransfektionen mit $pTHT_{22}$ eine 14-tägige BS+HAT Selektion, um den Anteil der weiterwachsenden Klone zu bestimmen, die beide Resistenzmarker funktionell exprimierten. Beim Vergleich der Klonzahlen aller Einzel- und Cotransfektionen wurde eine zum Teil beeindruckende Zunahme der Klonformierungssrate bei Cotransfektionen erhalten (Tab. 4, Anhang). Die Anzahl der erzeugten Klone stand dabei aber

nicht in einem linearen Verhältnis zur eingesetzten DNA Menge. Interessanterweise zeigten die meisten Einzeltransfektionen ein Optimum der Klonformierung bei sehr geringen DNA Mengen (ca. 0,5-10 ng). Eine einfache Steigerung der DNA Menge in Einzeltransfektionen bewirkte somit häufiger keine Steigerung der Klonzahlen, sondern eine Verringerung. Cotransfektionen erwiesen sich allerdings (mit Ausnahmen) als äussert effizient in der Formierung stabiler Klone. Ausserdem zeigten einige Cotransfektionen gegenüber Einzeltransfektionen vergleichbarer Konzentrationen höhere Klonzahlen, als man durch Addition der einzelnen Komponenten erwarten würde (siehe Tab. 4; z.B. $pTTE_1$ (50 ng) + $pTHT_{22}$ (200 ng), pTF_1T (200 ng) + $pTHT_{22}$ (200 ng) oder pTE_1T (200 ng) + CGT21 (50 ng)). Um der Frage nachzugehen, ob die Zunahme der Klonzahlen auf additiven Mechanismen (Klone von einem Konstrukt plus Klone vom anderen Konstrukt) beruht oder ob synergistische Effekte cotransfizierter pTAT-Bs Vektorsequenzen (ohne Insert) eine Rolle spielen, wurde ein Kontrollexperiment mit einer Cotransfektion der pTAT-Bs Vektorsequenzen (mit dem funktionellen und einem um 10 bp deletierten BS-Gen; siehe 3.5, S. 79-80) durchgeführt. Die Analyse der Klonzahlen von Cotransfektionen des cen5I tragenden Konstruktes pTE_1T mit pTAT-Bs (bzw. pTAT-Bs-del) zeigte, dass die Deletion des zweiten BS-Gens die Klonzahlen in etwa halbierte, was zunächst einen additiven Effekt des zweiten BS-Gens nahe legte, aber auch durch die grosse Schwankungsbreite einzelner Transfektionen erklärt werden könnte. Die Beobachtung, dass pTAT-Bs-del mit PCR in keiner der formierten HAC Linien nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 21), spricht jedoch gegen einen deutlichen Synergismus bei der HAC Entstehung durch die zusätzlichen Vektorsequenzen. Aus diesem Grund nehmen wir an, dass auch pTAT-Bs sehr selten in HACs cointegrierte (bei der Integration besteht ja noch kein Selektionsdruck), und die Klone hauptsächlich auf pTE_1T basieren. Dazu passt, dass die einzige beobachtete Integration auch die Zentromer-Anteile enthielt und alle mit FISH untersuchten HACs eine Colokalisation von Zentromer- und Vektorsignal zeigten.

Damit wurde in allen vier Fällen kein Klon isoliert, der nur pTAT-Bs Sequenzen aufgenommen und integriert hat, was gegen einen additiven Klonzahleffekt spricht. Die oftmals beobachtete Steigerung der Klonzahl, über die Summe der Einzeltransfektionen hinaus, ist aus diesem Grund wahrscheinlich nicht auf die alleinige Anwesenheit zusätzlicher pTAT-Vektoranteile zurückzuführen und könnten im Wesentlichen auf der Anwesenheit genomischer Genabschnitte beruhen (vgl. Harrington 1997). Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der BS und HAT Doppelselektion gestärkt. Obwohl die HAT Selektion erst nach Bildung stabiler Kolonien (nach 14 Tagen BS Selektion) angewendet wurde, exprimierten die meisten Klone aus den Cotransfektionen pTE_1T (100 ng) + $pTHT_{22}$ (25 ng), $pTTE_1$ (10 bzw. 50 ng) + $pTHT_{22}$ (100 bzw. 200 ng) und pTF_1T (200 ng) + $pTHT_{22}$ (200 ng) beide Markergene (Tab. 4, Anhang). So erzeugte die Cotransfektion von $pTTE_1$ (50 ng) + $pTHT_{22}$ (200 ng) 93 stabile Kolonien, von

denen 4 von 4 mit „Dual colour“ FISH HACs mit eindeutigen cen5 Signale zeigten. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass auch der Grossteil der anderen erzeugten Klone auf beiden Komponenten (cen und Gen) beruhen. Da die meisten Cotransfektionen darüber hinaus auch mit beiden Resistenzmarkern selektionierbar waren, spricht dies eindeutig für einen synergistischen Effekt bei der Klonformierung von Cotransfektionen Zentromer- und Gen tragender Konstrukte (es ist sehr unwahrscheinlich, dass $pTHT_{22}$ zufällig auf alle gebildeten HACs cointegrierte. Diese Daten legen nahe, dass die Anwesenheit der genomischen Komponente, die ja erst 2 Wochen später für die HAT Selektion erforderlich wird, von Anfang an bewirkte, dass die cotransfizierten Ereignisse den nicht-cotransfizierten Ereignissen überlegen sind. Möglicherweise beeinflussen Faktoren wie die zusätzliche Länge, die Anwesenheit weiterer Replikationsursprünge, die CpG Insel des HPRT-Gens mit offener Chromatinstruktur, oder die intergenische Region hinter HPRT mit möglicherweise geschlossenem Chromatin (als Chromosomenarmsequenz für die Schwesterchromatid-cohäsion) die Klonformierung. Als weiteres Indiz für einen synergistischen Effekt ist anzuführen, dass die teilweise über 100 stabilen Klone pro Ansatz kaum durch die Summe der Klone der Einzeltransfektionen erklärbar sind (z.B. pTE_1T 200 ng + CGT21 50 ng; Tab.4, Anhang). Allerdings wären erheblich mehr Versuche nötig, um mögliche Effekte sicher nachzuweisen, da zwischen einzelnen Experimenten sehr grosse Schwankungen festgestellt wurden. Über den eindrucksvollen Trend mit allen hocheffektiven Klonformierungen aus Cotransfektionen hinaus, konnte mit den beschränkten Mitteln in Rahmen dieser Arbeit leider keine eindeutige Aussage getroffen werden. Ausserdem müssen in Folgeuntersuchungen die in dem FISH-Schnelltest identifizierten HAC-Kandidatenlinien auf Stabilität im Zeitverlauf mit Proben für alle enthaltenen Komponenten detailliert untersucht werden, um ein vollständiges Bild zu erhalten.

4.4 Klonformierung und Kopiezahl der transfizierten Konstrukte

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

Im Laufe dieser Arbeit entstand der Eindruck, dass bei der Lipofektion von μg-Mengen eines Reporter Plasmids möglicherweise ein Grossteil der Zellen in Kultur physikalisch DNA in den Kern aufnimmt, aber nur diejenige Fraktion der transfizierten Zellen nachweisbar ist, die eine transiente Expression von mehr als ca. 10^3 Moleküle im Nukleus aufweisen (Schindelhauer, 2002; 3.2, Abb. 8, S. 55). Lipofektion von HAC Vektoren führt zwar routinemässig zur Formierung stabiler Klone, die tatsächliche Konstruktzahl pro Zelle, die eine Klonformierung unterstützt, kann dabei jedoch nicht bestimmt werden. Da die gängigen nicht-viralen Systeme auf hohe transiente Expression hin optimiert wurden, stellte sich die Frage, ob solche „high copy" Transfersysteme mit einer stabilen Klonformierung mit wenigen HAC Vektoren pro Zelle vereinbar sind. Wie wir in einem einfachen HAC-Lipofektionstest mit dem neuen Konstrukt $pTTE_1$, das stabil einen EGFP Marker exprimiert, beobachten konnten, bildeten Zellen, die nach Transfektion von $pTTE_1$ früh grüne transiente Expression zeigten (also vermutlich hohe Kopiezahlen in den Kern aufgenommen haben) im Gegensatz zu Zellen, die erst nach einigen Tagen im Mehrzellstadium detektierbare grüne Fluoreszenz zeigten, keine stabilen Klone. Die massenhafte Anwesenheit transfizierter DNA scheint offensichtlich eine stabile Klonformierung zu behindern. Ein Grund hierfür könnte die Anwesenheit einer grossen Anzahl von Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen sein, die bei einer steigenden Zahl transfizierter DNA Konstrukte, zumindest bei der Verwendung linearer DNA, zwangsläufig auftreten und nach Transfektion die zellulären Reparatursysteme überlasten könnten. Zusätzlich könnten durch eine Überladung mit funktionellen chromosomalen DNA Sequenzen, z.B. die Telomere mit den zelleigenen Telomeren um begrenzte Chromatinfaktoren kompetieren. Für den stabilen Gentransfer haben diese Erkenntnisse eine unmittelbare Relevanz, denn die Entwicklung effizienter Transfersysteme sollte demnach als Erfolgskontrolle nicht eine grösstmögliche transiente Expressionsrate verwenden.

Dieser Befund wird auch durch Daten aus den Mikroinjektionen und Baktofektionen verschiedener Konstrukte gestärkt. Durch intranukleäre Mikroinjektion des Chromosom 17 α-sat DNA-basierenden Konstrukts B_2T_8 in HT1080 Zellen konnten wir zeigen, dass mit niedrigen Kopiezahlen (1-10 Moleküle pro Injektionsvolumen) stabile Klone und künstliche Chromosomen formiert werden (unpubliziert). Die Gruppe um Masumoto konnte mit einer niedrigen Kopiezahl mikroinjizierter YAC Konstrukte ebenfalls erfolgreiche Klonformierungen beobachten (Ikeno, 1998). Baktofektion verschiedener Konstrukte (B_2T_8, $pTTE_1$ und CGT21) erzeugte bei Verwendung niedriger MOI (2-20) mehr resistente Kolonien in HT1080 als hohe MOI (>1.000; Catherine Grillot-Courvalin, pers. Mitteilung). Möglicherweise ist die Menge an freien DNA Enden (äquivalent zu Doppelstrang-Brüchen), die bei einer steigenden Anzahl transfizierter

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

4.5 CGT21 als CFTR Expressionsmodell für Zellkultur und Tiermodell

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

weil viele Gewebe und Organe erreicht werden könnten. Für die Wiederherstellung bzw. Aufrechterhaltung der Lungenfunktion, die für CF Patienten am relevantesten ist, wäre dies jedoch weniger ausschlaggebend, da die Lunge bei CF Patienten auch nach der Geburt noch voll funktionstüchtig ist. Daten entwicklungsspezifischer CFTR-Expressionsanalysen in embryonalem Lungen- und Pankreasgewebe weisen jedoch auch auf die Anwesenheit von CFTR Protein vor der Geburt hin (Larson, 2000a/b; Broackes-Carter, 2002; Bob Scholte, pers. Mitteilung), was auf eine Rolle in der Embryonalentwicklung hinweisen könnte.
Um diese verschiedenen Fragestellungen zu bearbeiten, wäre ein funktionierendes CFTR-Expressionsmodell für Zellkultur und Tiermodell von entscheidender Bedeutung. Das CFTR-Expressionskonstrukt CGT21 soll dazu verwendet werden, CFTR hochexprimierende Zellen in der Zellkultur und im Tiermodell durch den Nachweis des fluoreszierenden Fusionsproteins unter der Kontrolle des normalen CFTR Promotors zu identifizieren. Dies könnte zur Identifizierung neuer, besserer zellulärer Targets für eine CF Gentherapie führen. Mit einem transgenen CGT21-Tiermodell könnte die räumliche/zeitliche CFTR-Expression in der Embryonalentwicklung leichter und detaillierter verfolgt werden, wodurch zusätzliche Erkenntnisse über die Rolle des CFTR-Proteins im Laufe der Entwicklung erlangt werden könnten. Des Weiteren können durch Deletionsstudien (z.B. der -60 kb 5´Region oder Intron/Exon Sequenzen) regulatorische Bereiche der CFTR-Transkription identifiziert bzw. funktionell analysiert werden (Smith et al. 2000). Letztendlich könnte das Konstrukt nach Austausch des künstlichen Exon 10 durch die restliche CFTR cDNA (Exon 10 bis Exon 24; siehe Abb. 37), für eine gentherapeutische Anwendung mit dem normalen CFTR-Protein verwendet werden.

Das CFTR Exon 9 ist dafür bekannt in verschiedenen endogenen CFTR-Loci mit unterschiedlicher Frequenz geskippt zu werden (Cuppens, 1998). Verschiedene Spleisstellen Polymorphismen, unter anderem am 3´-Ende von Intron 8 und am 5´-Ende von Intron 9, scheinen für die Rate des Exon 9 skipping verantwortlich zu sein (Hefferon, 2002; Niksic, 1999; Pagani, 2003). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten wir nur einen kleinen Anteil an CGT21 Transkripten mit geskipptem Exon 9, wie er für die im Konstrukt vorhandene $TG_{11}T_7$ Variante am 3´-Ende von Intron 8 und „normalen“ 5´-Intron 9 Sequenzen üblich ist, beobachten (siehe Abb. 25). Trotz einer ca. 5 kb Deletion des 3´-Ende von Intron 9 im Konstrukt CGT21 scheint die Anwesenheit der letzten 162 bp von Intron 9 und der ersten 104 bp von Exon 10 korrektes Spleissen des Intron 9 zu erlauben (siehe Abb. 37). Des Weiteren wurde auch das synthetische Exon 10, das aus den ersten 104 bp des endogenen Exon 10, der EGFP-cDNA und 1,5 kb von Exon 24 (3´UTR) konstruiert wurde (Cattani, 2000), korrekt gespleisst (Abb. 25). Dies zeigt, dass die Modifikationen in Intron 9 und Exon 10 weder zu einer Insertion noch zu

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

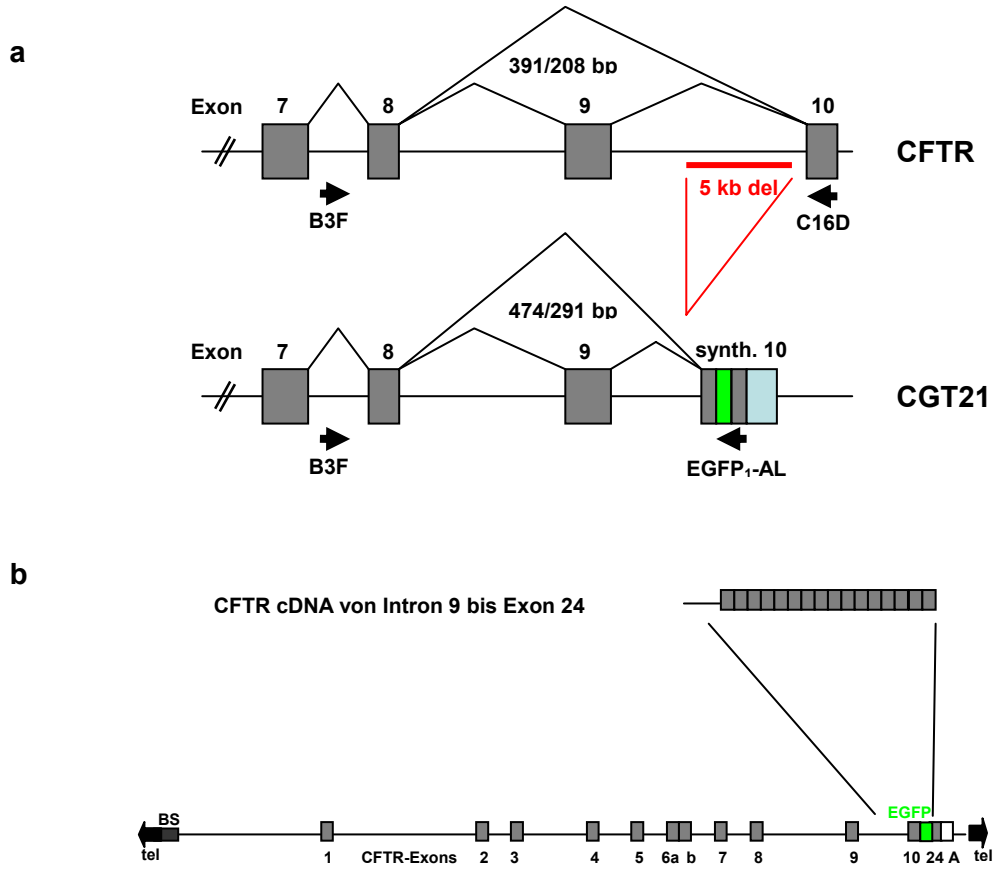


Abbildung 37: **Exon 9 skipping und Klonierung eines funktionellen CFTR Konstrukts** a) Schema des Exon 9 skipping im nativen CFTR-Transkript und der synthetischen CGT21 mRNA (nicht masstabsgetreu). Oligonukleotid Primer zur Analyse des Exon 9 skipping sowie die alternativen RT-PCR Produktlängen (siehe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

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

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

4.6 Bakterien, ein idealer Gentransfer Vektor?

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

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

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

Da die zirkulären HAC Konstrukte bei der Baktofektion direkt in Transferbakterien elektroporiert werden, entfallen die für die Integrität langer DNA kritischen Schritte der Linearisierung, Elution und Lipofektion, was zu einer höheren Klonformierungsrate beitragen könnte. Ein weiterer Vorteil des bakteriellen Systems liegt in seiner grossen Kapazität, wodurch der Transfer von Vektoren mehrerer hundert kb ermöglicht wird. Wir konnten unter anderem zeigen, dass ein ca. 223 kb langer HAC Vektor (B_2T_8), mit ca. 190 kb hoch repetitiver α-sat DNA von Chromosom 17, stabil in Transferbakterien propagiert und effizient in menschliche Zielzellen baktofiziert werden kann (Abb. 28 und 29). Darüber hinaus erwies sich die Baktofektion verschiedener PACs als überaus effektiv in der Erzeugung stabil exprimierender Linien mit einem Genkonstrukt (CGT21; siehe 3.8.2) sowie der *de novo*-Formierung künstlicher menschlicher Chromosomen (B_2T_8, $pTTE_1$; siehe 3.8, Abb. 28 und 33). Somit stellt die Baktofektion eine einfache und effiziente Methode dar, um im Labor genomische, PAC-basierende Konstrukte in Zielzellen zu transfizieren, was z.B. die Analyse der Genexpression dramatisch erleichtert. Da im Laufe der letzten Jahre die Genome des Menschen und wichtiger genetischer Modellorganismen in PAC-/BAC-Bibliotheken zugänglich gemacht wurden, kann nun z.B. die Expression vieler uncharakterisierter Genkonstrukte mittels Baktofektion einfacher analysiert werden.

Entsprechend der Beobachtung, dass stabile HAC Klone aus primär mit unsichtbaren DNA-Mengen (transient) lipofizierten Zellen hervorgingen, zeigten sich auch Baktofektionen mit wenigen Bakterien pro Zelle in der Erzeugung resistenter Klone effektiver als Transfektionen hoher MOI. Da die Anzahl der Konstrukte pro Bakterienzelle durch den P1-ori der PAC-basierenden Vektoren auf ca. 2-3 Kopien beschränkt ist, kann die durchschnittliche Anzahl der DNA Konstrukte pro Zelle durch Wahl der MOI relativ genau eingestellt werden. Niedrige MOI sind auch im Hinblick auf eine mögliche toxische Wirkung der Transferbakterien im Zielgewebe wünschenswert, obwohl Warburton mit einem rekombinaten, invasiven *E.coli* DH10B Stamm ein Überleben eukaryotischer Zellen auch bei sehr hohen MOI beobachten konnte (transiente Expression eines EGFP Markers in einem BAC Vektor; Narayanan, 2003). Die von uns beobachtete Steigerung der Klonformierung ist daher wahrscheinlich auf den unterstützenden Effekt niediger Kopiezahlen zurückzuführen. Ein weiterer Vorteil der Baktofektion ist die spezifische, Invasin vermittelte Internalisierung der Transferbakterien durch die in menschlichen Epithelzellen fast ubiquitär exprimierten β1-Integrin Rezeptoren (Isberg, 1989; Grillot-Courvalin 1998, 1999; Dersch, 1999). Da das Zielgewebe zukünfiger CF-Gentherapien, das differenzierte

Atemwegs Epithel, eine wesentliche Barriere für virale wie nicht-virale Vektoren darstellt, könnte die Baktofektion einen Teil zur Lösung des ineffizienten physikalischen Gentransfers *in vivo* beitragen. Die Fähigkeit des rekombinaten Transferbakterienstamms BM2710, primäre Atemwegs Epithelzellen zu transfizieren, wenn β1-Integrin zugänglich ist, konnte Grillot-Courvalins Gruppe erst vor kurzem mit einem Reporterplasmid demonstrieren (Fajac, 2004).

In beiden stabilen B_2T_8-Linien, die *de novo* HACs formierten, konnte durch PCR Analyse mit Oligonukleotiden des IS1-Element, auf dem *E.coli* Genom, ein IS1-spezifisches Fragment nachgewiesen werden. Da das repetitive IS1-Element in 12 Kopien im BM2710 Genom vorliegt (Grillot-Courvalin, 1998) und die PCR Signale sehr stark waren, könnte das ein starker Hinweis auf die Anwesenheit grosser Mengen *E.coli* DNA in den HAC Linien sein. Eine FISH Analyse der beiden B_2T_8-Linien 10-3 und 10-6 mit einer *E.coli* gesamt DNA Sonde zeigte starke Signale auf den HACs (Abb. 28), und eine Rsf-Vektor Sonde erzeugte auf den gleichen HACs ebenfalls starke Signale, was entweder für die Anwesenheit von *E.coli* DNA oder eine starke Kreuzhybridisierung der *E.coli* Sonde mit der HAC DNA spricht (Abb. 28). Nach unserem Kenntnisstand wäre dies der erste Bericht über eine stabile Cotransfektion bakterieller DNA auf (künstliche) menschliche Chromosomen. Allerdings zeigten Southern blots, die in der Regel sehr zuverlässig sind, einerseits die Abwesenheit von IS1-Elementen in allen Konstrukten, und eine *E.coli* gesamt DNA Probe zeigte darüber hinaus keinen Unterschied zwischen baktofizierten und lipofizierten Linien. Bisher konnte leider nicht hinreichend geklärt werden ob und wieviel *E. coli* DNA bei Baktofektion übertragen wurde. Der Grossteil aller per Baktofektion erzeugten Linien zeigte zwar eine positive IS1-PCR, eine Southern Analyse mit einer *E.coli* Sonde auf genomischer DNA der gleichen Linien konnte jedoch keine spezifischen *E.coli* Banden nachweisen. Ein spezifisches FISH Signal mit einer *E.coli* Sonde konnte darüber hinaus bisher ausschliesslich in den beiden B_2T_8 Linien nachgewiesen werden. Wegen dieser wiedersprüchlichen Ergebnisse ist eine detailliertere Analyse aller mit Baktofektion erzeugten Zelllinien notwendig, um eine genauere Aussage über den DNA Status der gebildeten HACs machen zu können. Klar ist allerdings, dass in keinem Fall transfizierte HAC oder *E.coli* DNA in endogene Chromosomen integrierte.

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

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

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

4 Zusammenfassung und Ausblick

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

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

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

Besonders hervorzuhebende Ergebnisse aus der Arbeit sind:

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

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

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

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

Mit den Konstrukten $pTTE_1$ und CGT21, und den zukünftig erweiterten Konstrukten mit multimeren Markern bzw. Tags und einem kompletten CFTR Gen, kann nun auch der physikalische Transfer der HAC Konstrukte in Zielzellen, sowie deren Funktion effizient untersucht werden. Damit konnten wichtige Voraussetzungen für die Weiterentwicklung einer stabilen CFTR Gentherapie geschaffen werden.

5 Anhang

Accession Numbers in EMBL/Genbank:

- pTAT-Bs: BN000528 und BN000529
- pTT: pending
- CGT21: BN000167
- Cen5 E1: AJ717298. Insert von Plasmid pZ5.1 (von Theo Hulsebos)
- Cen17 Array (B_2T_8): AJ563631-AJ563650.

Tabelle 4: Transfektionsassay

Vektor	Lipofizierte Menge in ng	BS 14 d [grüne Kolonien]	BS+HAT 28 d	Linien für FISH (Metaphasen, Sonden)	FISH Int	FISH HAC	FISH ND
pTAT-Bs	0,5 1	8 1	n.a.	n.a.			
pTAT-BsΔ	0,5 1	0	n.a.	n.a.			
pTE_1T	0,25 0,5 1 2 20 100 500	10 6 32 5 6 0 0	n.a.	n.a.			
pTF_1T	1 20 100 200 400	3 0 4 0 0	n.a.	n.a.			
$pTTE_1$	0,25 0,5 1 10 50	8 [5] 6 [5] 19 [16] 3 [1] 0	n.a.	TTE_1 20 „**g**“ (n=21, Rsf+E1) TTE_1 21 „**g**“ (n=14, Rsf+E1) TTE_1 22 „**g**“ (n=11, Rsf+E1) TTE_1 23 „**g**“ (n=11, Rsf+E1)		X X X X	
$pTTF_1$	10 50	1 [1] 3 [3]	n.a.	TTF_1 1 „**g**“ (n=11, Rsf+F1) TTF_1 3 „**g**“ (n=9, Rsf+F1)		 X	X
CGT21	2 4 5 8 25 1.000	22 18 0 8 22 18	n.a.	CGT21 4 (n>10, Rsf+CFTR) CGT21 5 (n>10, Rsf+CFTR) CGT21 6 (n>10, Rsf+CFTR) CGT21 7 (n=13, Rsf+CFTR)	X X X		 X
THT_{22}	1 2 4 20 100	0 30 22 0 17	0 30 22 0 17	THT_{22} 1 (n=25, Rsf+HPRT)	X		
pTAT-Bs+ pTE_1T	0,5 1	29	n.a.	TATbs+TE_1T 11 (n=16, Rsf+E1) TATbs+TE_1T 12 (n=16; Rsf+E1) TATbs+TE_1T 16 (n=13, Rsf+E1) TATbs+TE_1T 18 (n=14, Rsf+E1)	X	 X X X	
pTAT-BsΔ + pTE_1T	0,5 1	13	n.a.	TATbsΔ+TE_1T 11 (n=11, Rsf+E1) TATbsΔ+TE_1T 14 (n=8, Rsf+E1) TATbsΔ+TE_1T 16 (n=12, Rsf+E1) TATbsΔ+TE_1T 18 (n=13, Rsf+E1)		X X X X	

Vektor	Lipofizierte Menge in ng	BS 14 d [grüne Kolonien]	BS+HAT 28 d	Linien für FISH (Metaphasen, Sonden)	FISH Int	FISH HAC	FISH ND
pTE_1T+ CGT21	0,25 2	16	n.a.	TE_1T+CGT 1 (n=11, Rsf+E1) TE_1T+CGT 2 (n=9, Rsf+E1) TE_1T+CGT 3 (n=12, Rsf+E1)		X X X	
pTE_1T+ CGT21	0,5 4	2	n.a.				
pTE_1T+ CGT21	1 8	52	n.a.				
pTE_1T+ CGT21	100 25	32	n.a.				
pTE_1T+ CGT21	200 50	118	n.a.				
pTE_1T+ $pTHT_{22}$	100 25	25	23	n.a.			
pTE_1T+ $pTHT_{22}$	200 50	1	1				
$pTTE_1$+ CGT21	10 25	1 [1]	n.a.	n.a.			
$pTTE_1$+ CGT21	50 50	1 [0]	n.a.				
$pTTE_1$+ $pTHT_{22}$	10 100	18 [13]	16	TTE_1+H 1 „**g**“ (n=17, Rsf+E1) TTE_1+H 4 „**g**“ (n=11, Rsf+E1) TTE_1+H 5 „**g**“ (n=11, Rsf+E1) TTE_1+H 6 „**g**“ (n=11, Rsf+E1)		X X X X	
$pTTE_1$+ $pTHT_{22}$	50 200	93 [78]	93				
$pTTE_1$+ $pTHT_{22}$	0,25 1	2 [2]	n.a.				
$pTTE_1$+ $pTHT_{22}$	0,5 2	33 [12]	n.a.				
$pTTE_1$+ $pTHT_{22}$	1 4	24 [11]	n.a.				
$pTTF_1$+ $pTHT_{22}$	10 100	0	n.a.	n.a.			
$pTTF_1$+ $pTHT_{22}$	50 200	1	1				
$pTTF_1$+ CGT21	10 25	22 [12]	n.a.	TTF_1+CGT 1 „**g/w**“ (n=10, Rsf+F1) TTF_1+CGT 3 „**g**“ (n=6, Rsf+F1)		X	X
$pTTF_1$+ CGT21	50 50	23 [8]	n.a.	TTF_1+CGT 4 „**g/w**“ (n=7, Rsf+F1) TTF_1+CGT 6 „**g**“ (n=7, Rsf+F1)	X		X
pTF_1T+ $pTHT_{22}$	100 100	1	1	n.a.			
pTF_1T+ $pTHT_{22}$	200 200	51	51				
pTF_1T+ CGT21	100 25	21	n.a.	n.a.			
pTF_1T+ CGT21	200 50	41	n.a.				

Tabelle 4. Die Konstrukte wurden einzeln oder in Kombination in den angegebenen Konzentrationen (ng) in $HT1080^-$ Zellen lipofiziert. Die Zahl der gebildeten Kolonien nach 14-tägiger BS Selektion ist angegeben (auf je 2 Platten mit ca. $5x10^5$ HT1080 Zellen; Zahl der grünen Kolonien nach 14-tägiger BS Selektion in [ ]). Bei Cotransfektionen mit $pTHT_{22}$ wurde eine 14-tägige HAT+BS Selektion erst nach der BS Selektion (14 Tage) in ausgewählten Linien verwendet, um die Rate an Klonen zu bestimmen, die beide Konstrukte funktionell aufgenommen haben (Die Zahl der BS+HAT resistenten Klone nach insgesamt ca. 28 Tagen ist angegeben; n.a., nicht analysiert). Von ausgewählten Klonen der angegeben Konstrukte (bzw. Konstruktkombinationen) wurden 1-4 Linien („**w**“ weisse, „**g**“ grüne Kolonie) für eine „dual colour“ FISH-Analyse ausgewählt (n, Zahl der analysierten Metaphasen; Verwendete Sonden). Das Ergebnis ist für jede Linie angegeben (Int, Integration eines Signals im Grossteil der Metaphasen des gleichen endogenen Chromosoms; HAC, Kandidatenlinie für episomale künstliche Chromosomen; ND, nicht nachweisbar, eine Integration beider Signale wurde jedoch nach Analyse der angegebenen Metaphasen (n) ausgeschlossen).

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

- Host: DH10B und Baktofektionsstamm BM2710-pGB2Ω *inv-hly*
- P1 Replicon für die stabile Klonierung langer genomischer Gene und Zentromere
- 4 x Telomersequenzen (TTAGGG)135 um linearisierte, transfizierte HAC-DNA vor Integration zu schützen
- Amp und Kana Resistenzen innerhalb und ausserhalb der Telomere für eine stabile Propagierung tetratelomerischer HAC-Konstrukte in *E coli*.
- Anwesenheit duplizierter Vektor-DNA Anteile zwischen den Telomeren, um homologe Reparatur innerhalb eines Moleküls zu ermöglichen
- 2 Kopien des BS Markers für die stabile Expression der BS Resistenz in eukaryotischen Zellen und 1 Kopie eines EGFP Markers für die stabile Expression grüner Fluoreszenz und einfaches Monitoring
- *Bsp* 120 I, und *Bss* H II unique Klonierstellen zwischen den Telomeren zur Einklonierung von Zentromeren, Genen, oder DNA-tags.
- *Sal* I unique Klonierstelle, weiss blau selektionierbar, um schwierige Klonierungen oder die Klonierung genomischer Banken in einen Zentromervektor zu vereinfachen (*Sal* I, *Psp* XI Fragmente, oder *Xho* I partial)
- 2 x *Not* I Stellen, um lineare, telomerisierte Fragmente zu isolieren

```
   1  CCGCGCGGAT CCTCTAGAGG ATCCCCGGGT ACCGAGCTCG AATTCCGCGG
  51  AATTCCGGTG GGGTTGGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT
 101  TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA
 151  GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG
 201  GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT
 251  TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA
 301  GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG
 351  GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT
 401  TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA
                                tel (1)
 451  GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG
 501  GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT
 551  TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA
 601  GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG
 651  GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT
 701  TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA
 751  GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG
 801  GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGGT
                                      I-Sce I (1)
 851  TAGGGTTAGG GTTCGGAATT GGGCCTATAT TACCCTGTTA TCCCTAGCGC
Not I (1)
 901  GGCCGCATCG CCTTAAGTTG GCGTACAATT GAAGTTCTTT ACGGATTTTT
 951  AGTAAACCTT GTTCAGGTCT AACACTACCG GTACCGCGCT TGCGGAAGCA
1001  TCAGCAAATA AGGCCAGCAC AGCCAGCGCA GTTGCCGCTT TGGTTCCTGA
1051  TTCTGTTCTT GATGAATTAA ACAAAGCGGC ACAGTAACAA AGGACTTCAT
1101  TGATAATTTT TCTTCAGGAG GAAGACATGT CATTCTTTTC TACGTTAAAA
1151  ACAGCTTTGT CTTTGAAGGA GAAACTTGCT GCTACTGGTG TTCTTGTTCT
1201  GATTTGCGCA CTTGTTGGTG CTGGGTTTGC ATGGGAACGT CATCAGCTAA
1251  AGCAAGCCAT AGAGAAAATT GGCAGTCTTG ATCAGGCTGT TAAGGAACGT
1301  GATAAGTCAA TAATGGATCT TAACCAGACC ATTGAGACGA TGAACAAAGC
1351  AGAGCAACAT TTTCACAGCC AGGAAGTGAA AAATGAATCA GAACAAGCCA
1401  AGTATGCTGA CAGGCAAATG GAACGAAAAG CTGAAGTTCA GAAACAACTG
1451  GTTGCGGCGG GTAATGTTCG CCAGCGTATT CCTGCTGACA CTCAGCGGTT
1501  GCTCCGGGAG TCGATCAGCG AATTTAACGC CGACGCCGAC AAAGGTTAAC
1551  CACCCTGCCC CCAAAAGTGC ATTTATGTGT AGGATGCCAG AGTTTAGCAG
1601  TGAATATTTT GATGATCTGC CAGCGTATAT CCTCGATACA GAAACGATGC
1651  TGATGGGGAT TAACAGGAAG AATCGCAACG TTAATGATTA CAACCGAGCT
1701  ATTAGCGGTA ACTAAAAGGG ATTTTTATGT CTGATAAAGT AACAGTAAAG
1751  CAAACTATCA ACAAAGCGAC TTCAATCTAC AAAATTGAGC AAATCACTGT
1801  TGGCAAGCCA GGATCTGAAC AATACCGTCG TGCTTTCGAG CTTGCCGATC
1851  AGCTTGGTTT AAAACACCCG GATTGCATTG AGCATGTATT TCCGACCTAT
1901  GCTGATGAGC AATGTACTCA TGTTCTTACC GAAGAGGATT TTTTCAGCAC
1951  TGAAGAACGA GAAGGCGTTG ATCGCTGCAT TGGTGTGATT TGTTCTTCGG
2001  TAAGTGATGA GTTATTCCCT AATGTGCCTG AATATGGTGG TATTGGATAC
2051  CAATTCCTGT ACGAGGGCGA TGAGCTTAAA TGCTATGAAC ATGGTCTTCT
```

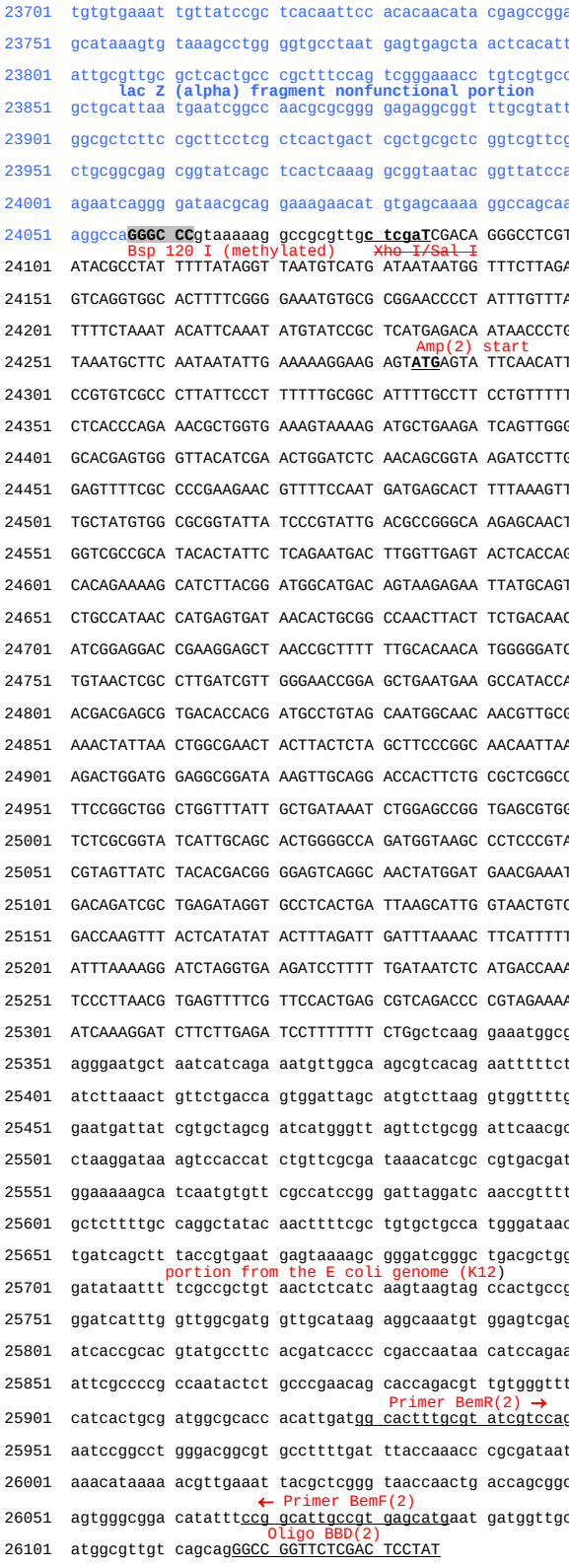
```
2101  CATCGAAAGC GTAGAATAAT ACGACTCCCT TCCAACCGGC TACGTTGGCC
2151  GGTTTTTCAC TTATCCACAT TATCCACTGG ATAGATCCAA TAATCAGGTC
2201  CATACAGATC CCAATTAGAT CCATATAGAT CCCTGATCGT TGCAGGCCGC
2251  GCCACGTCTG GCTTAGAAGT GTATCGCGAT GTGTGCTGGA GGGAAAACGA
2301  TGTGTGCTGG AGGGATAAAA ATGTGTGCTG ACGGGTTGCT AATGTGTGCT
2351  GGCGGGATAT AGGATGTGTG TTGACGGGAA AGCTTGGGTA GTTATCACCA
2401  CTTATAAAAA CTATCCACAC AATTCGGAAA AAGTAATATG AATCAATCAT
2451  TTATCTCCGA TATTCTTTAC GCAGACATTG AAAGTAAGGC AAAAGAACTA
2501  ACAGTTAATT CAAACAACAC TGTGCAGCCT GTAGCGTTGA TGCGCTTGGG
2551  GGTATTCGTG CCGAAGCCAT CAAAGAGCAA AGGAGAAAGT AAAGAGATTG
2601  ATGCCACCAA AGCGTTTTCC CAGCTGGAGA TAGCTAAAGC CGAGGGTTAC
2651  GATGATATTA AAATCACCGG TCCTCGACTC GATATGGATA CTGATTTCAA
2701  AACGTGGATC GGTGTCATCT ACGCGTTCAG CAAATACGGC TTGTCCTCAA
2751  ACACCATCCA GTTATCGTTT CAGGAATTCG CTAAAGCCTG TGGTTTCCCC
2801  TCAAAACGTC TGGATGCGAA ACTGCGTTTA ACCATTCATG AATCACTTGG
2851  ACGCTTGCGT AACAAGGGTA TCGCTTTTAA GCGCGGAAAA GATGCTAAAG
2901  GCGGCTATCA GACTGGTCTG CTGAAGGTCG GGCGTTTTGA TGCTGACCTT
2951  GATCTGATAG AGCTGGAGGG CTGATTCGAA GTTGTGGGAG CTGTTCCAGC
3001  TTGATTATCG CGTTCTGTTG CAACACCACG CCTTGCGTGC CCTTCCGAAG
3051  AAAGAAGCTG CACAAGCCAT TTACACTTTC ATCGAAAGCC TTCCGCAGAA
3101  CCCGTTGCCG CTATCGTTCG CGCGAATCCG TGAGCGCCTG GCTTTGCAGT
3151  CAGCTGTTGG CGAGCAAAAC CGTATCATTA AGAAAGCGAT AGAACAGCTT
3201  AAAACAATCG GCTATCTCGA CTGTTCTATT GAGAAGAAAG GCCGGGAAAG
3251  TTTTGTAATC GTCCATTCTC GCAATCCAAA GCTGAAACTC CCCGAATAAG
3301  TGTGTGCTGG AGGGAAACCG CATTAAAAAG ATGTGTGCTG CCGGGAAGGC
3351  TTGTCCAATT TCCTGTTTTT GAATGTGCGC TGGAGGGGGA CGCCCCTCAG
3401  TTTGCCCAGA CTTTCCCTCC AGCACACATC TGTCCATCCG CTTTTCCCTC
3451  CAGTGCACAT GTAATTCTCT GCCTTTCCCT CCAGCACACA TATTTGATAC
3501  CAGCGATCCC TCCACAGCAC ATAATTCAAT GCGACTTCCC TCTATCGCAC
3551  ATCTTAGACT TTTATTCTCC CTCCAGCACA CATCGAAGCT GCCGGGCAAG
3601  CCGTTCTCAC CAGTTGATAG AGAGTGAAGC TTGGCTGCCC ATTGAAGCAG
3651  GAAATCACCA AAATGATTCA GGCTACAACC TGAACGTAGA AGAAATCCGC
3701  GTCCTTTATG CGTGGAGGAT GCCAAAGCAT GTTGTGACAC ACTTGGCAAA
3751  GGAGTAAGCA TGCAGAGAAT GCTATGTACA AGCATCTACG CATACATTAT
3801  TATTTTATGC AGCATTTTTA ATTAAATTCA AAAATACAGC ATAAAGGATG
                                P1 parA start
3851  ACTTTCGATG AGTGATTCCA GCCAGCTTCA CAAGGTTGCT CAAAGAGCAA
3901  ACAGAATGCT CAATGTTCTG ACTGAACAAG TACAGTTGCA AAAGGATGAG
3951  CTACACGCGA ACGAGTTTTA CCAGGTCTAT GCGAAAGCGG CACTGGCAAA
4001  ATTGCCTCTA CTGACTCGAG CGAACGTTGA CTATGCCGTA AGTGAAATGG
4051  AAGAAAAGGG TTATGTTTTC GATAAACGCC TGCTGGCTCT TCAATGAAAT
4101  ATGCGATGTC AATTCAGAAC ATCATTGACA TATATGAACA TCGCGGAGTG
4151  CCAAAATACC GGGATCGCTA CAGCGAACGT ATGTGATTTT CATCTCCAAT
4201  CTTAAAGGCG GTGTGTCAAA AACTGTATCG ACGGTTTCTC TGGCGCATGC
```

```
4251  AATGCGTGCT CACCCTCATC TTCTTATGGA GGATTTAAGG ATTCTGGTTA
4301  TTGACCTTGA TCCGCAATCT TCAGCAACGA TGTTTTTAAG CCATAAACAC
4351  TCTATTGGTA TCGTAAACGC AACATCTGCA CAGGCTATGT TGCAGAATGT
4401  AAGCCGTGAA GAGCTGTTAG AGGAGTTTAT TGTTCCTTCT GTTGTACCTG
4451  GGGTTGACGT TATGCCTGCG TCGATTGACG ATGCCTTTAT TGCATCCGAT
4501  TGGAGAGAGC TGTGCAATGA GCATCTACCG GGTCAGAACA TCCATGCTGT
4551  CCTGAAAGAA AATGTGATTG ATAAGCTGAA GAGCGATTAT GACTTTATCC
4601  TCGTTGATAG TGGTCCTCAC CTTGACGCCT TCCTGAAAAA TGCTTTGGCC
4651  TCGGCCAATA TACTGTTTAC ACCTCTGCCG CCAGCAACTG TCGATTTCCA
4701  CTCATCGCTT AAATACGTTG CCCGCCTTCC TGAGTTGGTG AACTCATTTC
4751  GGATGAAGGC TGCGAGTGCC AGCTTGCGAC TAACATTGGT TTTATGTCCA
4801  AGTTGAGTAA CAAGGCAGAC CATAAGTATT GCCATAGCCT GGCTAAAGAA
4851  GTGTTCGGTG GGGATATGCT TGATGTCTTC CTCCCTCGCC TTGACGGTTT
4901  TGAAACGCTG CGGCGAGTCT TTTGACACTG TTATTTCAGC TAACCCGGCA
4951  ACGTATGTTG GTAGTGCTGA TGCATTGAAG AACGCGCGAA TTGCCGCGGA
5001  AGATTTTGCT AAAGCAGTTT TTGACCGTAT TGAATTTATC AGATCTAACT
                          P1 parB start
5051  GAGGAGTAAG AAACCCCCAT GTCAAAGAAA AACAGACCAA CAATTGGGCG
5101  AACCCTTAAT CCTTCAATAT TAAGCGGATT TGATAGTTCT TCAGCCTCTG
5151  GCGATCGAGT CGAGCAGGTA TTCAAGTTAT CAACTGGTCG CCAGGCCACA
5201  TTTATTGAAG AGGTAATACC TCCGAACCAG GTAGAAAGCG ATACCTTTGT
5251  TGATCAGCAT AACAACGGGC GTGACCAGGC ATCTCTTACG CCAAAATCAT
5301  TAAAAAGTAT CCGAAGCACT ATTAAGCATC AGCAATTTTA CCCTGCAATA
5351  GGTGTTAGAC GGGCTACAGG GAAAATTGAA ATTTTGGATG GTTCCCGGCG
5401  TCGAGCTTCT GCCATCTTAG AGAACGTAGG GTTGCGGGTT TTAGTCACGG
5451  ACCAGGAGAT CAGCGTTCAG GAAGCGCAAA ATTTAGCGAA AGACGTTCAG
5501  ACAGCATTGC AGCACAGCAT TCGAGAAATA GGTCTGCGTT TGATGCGAAT
5551  GAAAAATGAT GGGATGAGTC AGAAGGATAT TGCAGCCAAA GAAGGGCTGT
5601  CTCAGGCGAA GGTCACGCGT GCTCTCCAGG CAGCGAGTGC TCCGGAAGAA
5651  TTAGTCGCCC TTTTCCCTGT GCAGTCGGAA TTAACCTTTT CGGACTACAA
5701  AACGCTTTGT GCTGTTGGCG ACGAAATGGG GTACAAGAAT TTAGAGTTTG
5751  ATCAGCTTAT TCAAAACATA TCCCCGGAAA TAAACGACAT CTTATCCATT
5801  GAAGAAATGG CCGAAGATGA AGTTAAAAAT AAAATCCTGC GCTTGATAAC
5851  AAAGGAAGCC TCACTACTCA CGGATAAAGG TTCTAAAGAT AAGTCCGTAG
5901  TTACTGAATT ATGGAAATTT GAGGACAAGG ATCGCTTTGC AAGGAAGCGC
5951  GTGAAAGGCC GTGCATTTTC TTATGAGTTT AATCGACTCT CAAAAGAGTT
6001  ACAGGAAGAA CTCGACAGGA TGATTGGGCA TATCCTTAGA AAGAGCCTCG
6051  ATAAAAAGCC GAAGCCTTAA ACTTTCGCCA TTCAAATTTC ACTATTAACT
6101  GACTGTTTTT AAAGTAAATT ACTCTAAAAT TTCAAGGTGA AATCGCCACG
6151  ATTTCACCTT GGATTTTACC TTCCTCCCCT CCTCCCGAAA AAAATAAAAA
                          parS
6201  AATTGCTTGT CACGAGAAAG TCAACAAGTG ACTTTCAATA AAATCTCTTC
6251  CGAAAAGGGA TTCACACAAG TGCCTTGTGT TTAAGGAAGA GTAAATTGAG
6301  TAACTTACGC GAATACCAGA ATCGTATTGC AGATATCGCA AAACGCTCTA
6351  AAGCTGTGCT TGGCTGGGCA AGCACTGCGC AGTTCGGTAC TGATAACCAA
6401  TTCATTAAAG ATGATGCCGC GCGTGCCGCA TCTATCCTTG AAGCTGCACG
6451  TAAAGACCCG GTTTTTGCGG GTATCTCTGA TAATGCCACC GCTCAAATCG
6501  CTACAGCGTG GGCAAGTGCA CTGGCTGACT ACGCCGCAGC ACATAAATCT
6551  ATGCCGCGTC CGGAAATTCT GGCCTCCTGC CACCAGACGC TGGAAAACTG
6601  CCTGATAGAG TCCACCCGCA ATAGCATGGA TGCCACTAAT AAAGCGATGC
6651  TGGAATCTGT CGCAGCAGAG ATGATGAGCG TTTCTGACGG TGTTATGCGT
6701  CTGCCTTTAT TCCTCGCGAT GATCCTGCCT GTTCAGTTGG GGGCAGCTAC
6751  CGCTGATGCG TGTACCTTCA TTCCGGTTAC GCGTGACCAG TCCGACATCT
6801  ATGAAGTCTT TAACGTGGCA GGTTCATCTT TTGGTTCTTA TGCTGCTGGT
6851  GATGTTCTGG ACATGCAATC CGTCGGTGTG TACAGCCAGT TACGTCGCCG
6901  CTATGTGCTG GTGGCAAGCT CCGATGGCAC CAGCAAAACC GCAACCTTCA
6951  AGATGGAAGA CTTCGAAGGC CAGAATGTAC CAATCCGAAA AGGTCGCACT
7001  AACATCTACG TTAACCGTAT TAAGTCTGTT GTTGATAACG GTTCCGGCAG
7051  CCTACTTCAC TCGTTTACTA ATGCTGCTGG TGAGCAAATC ACTGTTACCT

7101  GCTCTCTGAA CTACAACATT GGTCAGATTG CCCTGTCGTT CTCCAAAGCG
7151  CCGGATAAAG GCACTGAGAT CGCAATTGAG ACGGAAATCA ATATTGAAGC
7201  CGCTCCTGAG CTGATCCCGC TGATCAACCA CGAAATGAAG AAATACACCC
7251  TGTTCCCAAG TCAGTTCGTT ATCGCGGCTG AGCACACGGT ACAGGCGGCG
7301  TATGAAGCAC AGCGTGAATT TGGTCTGGAC CTGGGTTCCC TACAGTTCCG
7351  CACCCTGAAG GAATACCTGT CTCATGAACA GGATATGCTG CGTCTTCGCA
7401  TCATGATCTG GCGCACTCTT GCGACCGACA CCTTTGACAT CGCTCTGCCG
7451  GTTAACCAGT CCTTTGATGT ATGGGCAACC ATCATTCGTG GCAAATTCCA
7501  GACTGTATAT CGCGACATTA TTGAGCGCGT TAAATCTTCT GGTGCGATGG
7551  GGATGTTTGC TGGTGCTGAT GCAGCATCTT TCTTCAAACA GTTGCCGAAG
7601  GATTTCTTCC AGCCAGCCGA AGACTATATC CAGACTCCGT ATGTTCACTA
7651  CATCGGTACC CCATTTAGGA CCACCCACAG CACCTAACAA AACGGCATCA
7701  GCCTTCTTGG AGGCTTCCAG CGCCTCATCT GGAAGTGGAA CACCTGTAGC
                          TN903 ins
7751  ATCGACCTGC AGGGGGGGGG GGGCGCTGAG GTCTGCCTCG TGAAGAAGGT
7801  GTTGCTGACT CATACCAGGC CTGAATCGCC CCATCATCCA GCCAGAAAGT
7851  GAGGGAGCCA CGGTTGATGA GAGCTTTGTT GTAGGTGGAC CAGTTGGTGA
7901  TTTTGAACTT TTGCTTTGCC ACGGAACGGT CTGCGTTGTC GGGAAGATGC
7951  GTGATCTGAT CCTTCAACTC AGCAAAAGTT CGATTTATTC AACAAAGCCG
8001  CCGTCCCGTC AAGTCAGCGT AATGCTCTGC CAGTGTTACA ACCAATTAAC
8051  CAATTCTGAT TAGAAAAACT CATCGAGCAT CAAATGAAAC TGCAATTTAT
8101  TCATATCAGG ATTATCAATA CCATATTTTT GAAAAAGCCG TTTCTGTAAT
8151  GAAGGAGAAA ACTCACCGAG GCAGTTCCAT AGGATGGCAA GATCCTGGTA
8201  TCGGTCTGCG ATTCCGACTC GTCCAACATC AATACAACCT ATTAATTTCC
8251  CCTCGTCAAA AATAAGGTTA TCAAGTGAGA AATCACCATG AGTGACGACT
8301  GAATCCGGTG AGAATGGCAA AAGCTTATGC ATTTCTTTCC AGACTTGTTC
8351  AACAGGCCAG CCATTACGCT CGTCATCAAA ATCACTCGCA TCAACCAAAC
8401  CGTTATTCAT TCGTGATTGC GCCTGAGCGA GACGAAATAC GCGATCGCTG
8451  TTAAAAGGAC AATTACAAAC AGGAATCGAA TGCAACCGGC GCAGGAACAC
8501  TGCCAGCGCA TCAACAATAT TTTCACCTGA ATCAGGATAT TCTTCTAATA
8551  CCTGGAATGC TGTTTTCCCG GGGATCGCAG TGGTGAGTAA CCATGCATCA
8601  TCAGGAGTAC GGATAAAATG CTTGATGGTC GGAAGAGGCA TAAATTCCGT
8651  CAGCCAGTTT AGTCTGACCA TCTCATCTGT AACATCATTG GCAACGCTAC
8701  CTTTGCCATG TTTCAGAAAC AACTCTGGCG CATCGGGCTT CCCATACAAT
8751  CGATAGATTG TCGCACCTGA TTGCCCGACA TTATCGCGAG CCCATTTATA
8801  CCCATATAAA TCAGCATCCA TGTTGGAATT TAATCGCGGC CTCGAGCAAG
                          ←Kana
8851  ACGTTTCCCG TTGAATATGG CTCATAACAC CCCTTGTATT ACTGTTTATG
8901  TAAGCAGACA GTTTTATTGT TCATGATGAT ATATTTTTAT CTTGTGCAAT
8951  GTAACATCAG AGATTTTGAG ACACAACGTG GCTTTCCCCC CCCCCCCTGC
                                                TN903 ins
9001  AGGTCGATAG CAGCACCACC AATTAAATGA TTTTCGAAAT CGAACTTGAC
9051  ATTGGAACGA ACATCAGAAA TAGCTTTAAG AACCTTAATG GCTTCGGCTG
9101  TGATTTCTTG ACCAACGTGG TCACCTGGCA AAACGACGAT CTTCTTAGGG
9151  GCAGACATTA GAATGGTATA TCCTTGAAAT ATATATATAT ATTGCTGAAA
9201  TGTAAAAGGT AAGAAAAGTT AGAAAGTAAG ACGATTGCTA ACCACCTATT
9251  GGAAAAAACA ATAGGTCCTT AAATAATATT GTCAACTTCA AGTATTGTGA
9301  TGCAAGCATT TAGTCATGAA CGCTTCTCTA TTCTATATGA AAAGCCGGTT
9351  CCGGCGCTCT CACCTTTCCT TTTTCTCCCA ATTTTTCAGT TGAAAAAGGT
9401  ATATGCGTCA GGCGACCTCT GAAATTAACA AAAAATTTCC AGTCATCGAA
9451  TTTGATTCTG TGCGATAGCG CCCCTGTGTG TTCTCGTTAT GTTGAGGAAA
9501  AAAATAATGG TTGCTAAGAG ATTCGAACTC TTGCATCTTA CGATACCTGA
9551  GTATTCCCAC AGTTAACTGC GGTCAAGATA TTTCTTGAAT CAGGCGATGC
      Not I (2)      I-Sce I (2)
9601  GGCCGCGCTA GGGATAACAG GGTAATATAG GCCGCAATTC CGAACCCTAA
9651  CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC
9701  CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT
9751  AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA
9801  CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC
9851  CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT
```

```
 9901  AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA
 9951  CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC
10001  CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT
                          tel (2)
10051  AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA
10101  CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC
10151  CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT
10201  AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA
10251  CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC
10301  CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT
10351  AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA
10401  CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCC AACCCCACCG
10451  GAATTCCGCG GAATTCGAGC TCGGTACCCG GGGATCCTCT AGTGGGTAGA
10501  TCCACAGGAC GGGTGTGGTC GCCATGATCG CGTAGTCGAT AGTGGCTCCA
10551  AGTAGCGAAG CGAGCAGGAC TGGGCGGCGG CCAAAGCGGT CGGACAGTGC
10601  TCCGAGAACG GGTGCGCATA GAAATTGCAT CAACGCATAT AGCGCTAGCA
10651  GCACGCCATA GTGACTGGCG ATGCTGTCGG AATGGACGAT ATCCCGCAAG
10701  AGGCCCGGCA GTACCGGCAT AACCAAGCCT ATGCCTACAG CATCCAGGGT
10751  GACGGTGCCG AGGATGACGA TGAGCGCATT GTTAGATTTC ATACACGGTG
10801  CCTGACTGCG TTTAGCAATT TTAACTGTGA TAAACTACCG CATTAAAGCT
10851  TATCGATGAT AAGCTGTCAA ACATGAGAAT TGATCCGGAA CCCTTAATAT
                          loxP (1)
10901  AACTTCGTAT AATGTATGCT ATACGAAGTT ATTAGGTCCC TCGACTACGT
10951  CGTTAAGGCC GTTTCTGACA GAGTAAAATT CTTGAGGGAA CTTTCACCAT
11001  TATGGGAAAT GGTTCAAGAA GGTATTGACT TAAACTCCAT CAAATGGTCA
11051  GGTCATTGAG TGTTTTTTAT TTGTTGTATT TTTTTTTTTT AGAGAAAATC
11101  CTCCAATATA TAAATTAGGA ATCATAGTTT CATGATTTTC TGTTACACCT
11151  AACTTTTTGT GTGGTGCCCT CCTCCTTGTC AATATTAATG TTAAAGTGCA
11201  ATTCTTTTTC CTTATCACGT TGAGCCATTA GTATCAATTT GCTTACCTGT
11251  ATTCCTTTAC ATCCTCCTTT TTCTCCTTCT TGATAAATGT ATGTAGATTG
11301  CGTATATAGT TTCGTCTACC CTATGAACAT ATTCCATTTT GTAATTTCGT
11351  GTCGTTTCTA TTATGAATTT CATTTATAAA GTTTATGTAC AAATATCATA
11401  AAAAAAGAGA ATCTTTTTAA GCAAGGATTT TCTTAACTTC TTCGGCGACA
11451  GCATCACCGA CTTCGGTGGT ACTGTTGGAA CCACCTAAAT CACCAGTTCT
11501  GATACCTGCA TCCAAAACCT TTTTAACTGC ATCTTCAATG GCCTTACCTT
11551  CTTCAGGCAA GTTCAATGAC AATTTCAACA TCATTGCAGC AGACAAGATA
11601  GTGGCGATAG GGTTGACCTT ATTCTTTGGC AAATCTGGAG CAGAACCGTG
11651  GCATGGTTCG TACAAACCAA ATGCGGTGTT CTTGTCTGGC AAAGAGGCCA
11701  AGGACGCAGA TGGCAACAAA CCCAAGGAAC CTGGGATAAC GGAGGCTTCA
11751  TCGGAGATGA TATCACCAAA CATGTTGCTG GTGATTATAA TACCATTTAG
11801  GTCGAgtacc gagctcgaat tcagacatga taagatacat tgatgagttt
11851  ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat
11901  ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag
11951  ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt ttcaggttca gggggaggtg
12001  tgggaggttt tttaaagcaa gtaaaacctc tacaaatgtg gtatggctga
12051  ttatgatctc tagtcaaggc actatacatc aaatattcct tattaacccc
12101  tttacaaatt aaaaagctaa aggtacacaa tttttgagca tagttattaa
12151  tagcagacac tctatgcctg tgtggagtaa gaaaaaacag tatgttatga
12201  ttataactgt tatgcctact tataaaggtt acagaatatt tttccataat
12251  tttcttgtat agcagtgcag ctttttcctt tgtggtgtaa atagcaaagc
12301  aagcaagagt tctattacta aacacagcat gactcaaaaa acttagcaat
12351  tctgaaggaa agtccttggg gtcttctacc tttctcttct tttttggagg
12401  agtagaatgt tgagagtcag cagtagcctc atcatcacta gatggcattt
12451  cttctgagca aaacaggttt tcctcattaa aggcattcca ccactgctcc
12501  cattcatcag ttccataggt tggaatctaa aatacacaaa caattagaat
12551  cagtagttta acacattata cacttaaaaa ttttatattt accttagagc
                          SV40 Poly A
12601  tttaaatctc tgtaggtagt ttgtccaatt atgtcacacc acagaagtaa
12651  ggttccttca caaagatccg gaccaaagcg gccatcgtgc ctccccactc
12701  ctgcagttcg ggggcatgga tgcgcggata gccgctgctg gtttcctgga
12751  tgccgacgga tttgcactgc cggtagaact ccgcgaggtc gtccagcctc
                                    BS STOP
12801  aggcagcagc caagcttggt atggtaaaac ttTTAatttc gggtatattt
12851  gagtggaatg agttcttcaa tcgtagtttt gactaacttg ccattcattt
12901  ctattaacac aaaacaatct ggtgcatagt ctgaaatcaa ctccctacac
12951  ataccacaag gacttaccac tcgaatactt ctatctactt cgtcagaata
13001  agggtgtcta acagctacaa tcgtgtcaaa atccttttgt ccattcgaaa
13051  ctgcactacc aatcgcaatg gcttctgcac aaacagttac tcgtcctata
                                                  Sun I
13101  tacgcttcaa tatgtactgc cgaaatgatt tctcctgttt tcgtacgaat
13151  tgccgctccc acatgatgtt tattatcctc ataaagcatt gtaatcttct
13201  ctgtcgctac ttctactaat tctagatctt gttgagaaat gttaaatgtt
                ←BS (1)
13251  ttCATatatt cttcttcctc cgatttctgc aaaaatgaat ccaagctttt
13301  tgcaaaagcc taggcctcca aaaaagcctc ctcactactt ctggaatagc
13351  tcagaggccg aggcggcctc ggcctctgca taaataaaaa aaattagtca
13401  gccatggggc ggagaatggg cggaactggg cggagttagg ggcgggatgg
13451  gcggagttag gggcgggact atggttgctg actaattgag atgcatgctt
                          SV40 Promotor (BS)
13501  tgcatacttc tgcctgctgg ggagcctggg gactttccac acctggttgc
13551  tgactaattg agatgcatgc tttgcatact tctgcctgct ggggagcctg
13601  gggactttcc acaccctaac tgacacacat tccacagcta gcgctatatg
13651  cgttgatgca atttctatgc gcacccgttc tcggagcact gtccgaccgc
13701  tttggccgcc gcccagtcct gctcgcttcg ctacttggag ccactatcga
13751  ctacgcgatc atggcgacca cacccgtcct gtggatctac ccactagtca
13801  attcaccatc ttgttgagaa ataaaagaaa atgccaatga agtatcggca
                                    SalI/XhoI BssHII/MluI
13851  ttttcttttt gctgttatta gttgactgtc agtcgagccc gtcagcgcgt
13901  TAACCGTATT ACCGCCATGC ATTAGTTATT AATAGTAATC AATTACGGGG
                          CMV promoter
13951  TCATTAGTTC ATAGCCCATA TATGGAGTTC CGCGTTACAT AACTTACGGT
14001  AAATGGCCCG CCTGGCTGAC CGCCCAACGA CCCCCGCCCA TTGACGTCAA
14051  TAATGACGTA TGTTCCCATA GTAACGCCAA TAGGGACTTT CCATTGACGT
14101  CAATGGGTGG AGTATTTACG GTAAACTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT
14151  GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA CGTCAATGAC GGTAAATGGC
14201  CCGCCTGGCA TTATGCCCAG TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG
14251  CAGTACATCT ACGTATTAGT CATCGCTATT ACCATGGTGA TGCGGTTTTG
14301  GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT TGACTCACGG GGATTTCCAA
14351  GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTTGGCA CCAAAATCAA
14401  CGGGACTTTC CAAAATGTCG TAACAACTCC GCCCCATTGA CGCAAATGGG
14451  CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT AAGCAGAGCT GGTTTAGTGA
                                    EGFP-CDNA
14501  ACCGTCAGAT CCACCGGTCG CCACCATGGT GAGCAAGGGC GAGGAGCTGT
14551  TCACCGGGGT GGTGCCCATC CTGGTCGAGC TGGACGGCGA CGTAAACGGC
14601  CACAAGTTCA GCGTGTCCGG CGAGGGCGAG GGCGATGCCA CCTACGGCAA
14651  GCTGACCCTG AAGTTCATCT GCACCACCGG CAAGCTGCCC GTGCCCTGGC
14701  CCACCCTCGT GACCACCCTG ACCTACGGCG TGCAGTGCTT CAGCCGCTAC
14751  CCCGACCACA TGAAGCAGCA CGACTTCTTC AAGTCCGCCA TGCCCGAAGG
14801  CTACGTCCAG GAGCGCACCA TCTTCTTCAA GGACGACGGC AACTACAAGA
14851  CCCGCGCCGA GGTGAAGTTC GAGGGCGACA CCCTGGTGAA CCGCATCGAG
14901  CTGAAGGGCA TCGACTTCAA GGAGGACGGC AACATCCTGG GGCACAAGCT
14951  GGAGTACAAC TACAACAGCC ACAACGTCTA TATCATGGCC GACAAGCAGA
15001  AGAACGGCAT CAAGGTGAAC TTCAAGATCC GCCACAACAT CGAGGACGGC
15051  AGCGTGCAGC TCGCCGACCA CTACCAGCAG AACACCCCCA TCGGCGACGG
15101  CCCCGTGCTG CTGCCCGACA ACCACTACCT GAGCACCCAG TCCGCCCTGA
15151  GCAAAGACCC CAACGAGAAG CGCGATCACA TGGTCCTGCT GGAGTTCGTG
                                    EGFP STOP
15201  ACCGCCGCCG GGATCACTCT CGGCATGGAC GAGCTCTAGA TCATAATCAG
15251  CCATACCACA TTTGTAGAGG TTTTACTTGC TTTAAAAAAC CTCCCACACC
15301  TCCCCCTGAA CCTGAAACAT AAAATGAATG CAATTGTTGT TGTTAACTTG
15351  TTTATTGCAG CTTATAATGG TTACAAATAA AGCAATAGCA TCACAAATTT
                          SV40 POLY A
15401  CACAAATAAA GCATTTTTTT CACTGCATTC TAGTTGTGGT TTGTCCAAAC
15451  TCATCAATGT ATCTTAAGGC GTAAATTGTA AGCGTTAATA TTTTGTTAAA
15501  ATTCGCGTTA AATTTTTGTT AAATCAGCTC ATTTTTTAAC CAATAGGCCG
15551  AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG AATAGACCGA GATAGGGTTG
```

```
15601  AGTGTTGTTC CAGTTgGGCC GCGCTAGGGA TAACAGGGTA ATATAGGCCG
                 Bsp120I/NotI      I-Sce I (3)
15651  CAATTCCGAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT
15701  AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA
15751  CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC
15801  CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT
15851  AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA
15901  CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC
                          tel (3)
15951  CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT
16001  AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA
16051  CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC
16101  CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT
16151  AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA
16201  CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC
16251  CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT
16301  AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA
16351  CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC
16401  CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT
16451  AACCCCAACC CCACCGGAAT TCCGCGGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA
16501  TCCTCTAGTG GGTAGATCCA CAGGACGGGT GTGGTCGCCA TGATCGCGTA
16551  GTCGATAGTG GCTCCAAGTA GCGAAGCGAG CAGGACTGGG CGGCGGCCAA
16601  AGCGGTCGGA CAGTGCTCCG AGAACGGGTG CGCATAGAAA TTGCATCAAC
16651  GCATATAGCG CTAGCAGCAC GCCATAGTGA CTGGCGATGC TGTCGGAATG
16701  GACGATATCC CGCAAGAGGC CCGGCAGTAC CGGCATAACC AAGCCTATGC
16751  CTACAGCATC CAGGGTGACG GTGCCGAGGA TGACGATGAG CGCATTGTTA
16801  GATTTCATAC ACGGTGCCTG ACTGCGTTTA GCAATTTTAA CTGTGATAAA
16851  CTACCGCATT AAAGCTTATC GATGATAAGC TGTCAAACAT GAGAATTGAT
                                  loxP (2)
16901  CCGGAACCCT TAATATAACT TCGTATAATG TATGCTATAC GAAGTTATTA
16951  GGTCCCTCGA CTACGTCGTT AAGGCCGTTT CTGACAGAGT AAAATTCTTG
17001  AGGGAACTTT CACCATTATG GGAAATGGTT CAAGAAGGTA TTGACTTAAA
17051  CTCCATCAAA TGGTCAGGTC ATTGAGTGTT TTTTATTTGT TGTATTTTTT
17101  TTTTTTAGAG AAAATCCTCC AATATATAAA TTAGGAATCA TAGTTTCATG
17151  ATTTTCTGTT ACACCTAACT TTTTGTGTGG TGCCCTCCTC CTTGTCAATA
17201  TTAATGTTAA AGTGCAATTC TTTTTCCTTA TCACGTTGAG CCATTAGTAT
17251  CAATTTGCTT ACCTGTATTC CTTTACATCC TCCTTTTTCT CCTTCTTGAT
17301  AAATGTATGT AGATTGCGTA TATAGTTTCG TCTACCCTAT GAACATATTC
17351  CATTTTGTAA TTTCGTGTCG TTTCTATTAT GAATTTCATT TATAAAGTTT
17401  ATGTACAAAT ATCATAAAAA AAGAGAATCT TTTTAAGCAA GGATTTTCTT
17451  AACTTCTTCG GCGACAGCAT CACCGACTTC GGTGGTACTG TTGGAACCAC
17501  CTAAATCACC AGTTCTGATA CCTGCATCCA AAACCTTTTT AACTGCATCT
17551  TCAATGGCCT TACCTTCTTC AGGCAAGTTC AATGACAATT TCAACATCAT
17601  TGCAGCAGAC AAGATAGTGG CGATAGGGTT GACCTTATTC TTTGGCAAAT
17651  CTGGAGCAGA ACCGTGGCAT GGTTCGTACA AACCAAATGC GGTGTTCTTG
17701  TCTGGCAAAG AGGCCAAGGA CGCAGATGGC AACAAACCCA AGGAACCTGG
17751  GATAACGGAG GCTTCATCGG AGATGATATC ACCAAACATG TTGCTGGTGA
17801  TTATAATACC ATTTAGGTCG Agtaccgagc tcgaattcag acatgataag
17851  atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat
17901  gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata
17951  agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca
18001  ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca
18051  aatgtggtat ggctgattat gatctctagt caaggcacta tacatcaaat
18101  attccttatt aaccccttta caaattaaaa agctaaaggt acacaatttt
18151  tgagcatagt tattaatagc agacactcta tgcctgtgtg gagtaagaaa
18201  aaacagtatg ttatgattat aactgttatg cctacttata aaggttacag
18251  aatatttttc cataatttcc ttgtatagca gtgcagcttt ttcctttgtg
18301  gtgtaaatag caaagcaagc aagagttcta ttactaaaca cagcatgact
18351  caaaaaactt agcaattctg aaggaaagtc cttggggtct tctacctttc
18401  tcttcttttt tggaggagta gaatgttgag agtcagcagt agcctcatca

18451  tcactagatg gcatttcttc tgagcaaaac aggttttcct cattaaaggc
18501  attccaccac tgctcccatt catcagttcc ataggttgga atctaaaata
18551  cacaaacaat tagaatcagt agtttaacac attatacact taaaaatttt
                                  SV40 Poly A
18601  atatttacct tagagcttta aatctctgta ggtagtttgt ccaattatgt
18651  cacaccacag aagtaaggtt ccttcacaaa gatccggacc aaagcggcca
18701  tcgtgcctcc ccactcctgc agttcggggg catggatgcg cggatagccg
18751  ctgctggttt cctggatgcc gacggatttg cactgccggt agaactccgc
                                                  STOP BS
18801  gaggtcgtcc agcctcaggc agcagccaag cttggtatgg taaaacttTT
18851  Aatttcgggt atatttgagt ggaatgagtt cttcaatcgt agttttgact
18901  aacttgccat tcatttctat taacacaaaa caatctggtg catagtctga
18951  aatcaactcc ctacacatac cacaaggact taccactcga atacttctat
19001  ctacttcgtc agaataaggg tgtctaacag ctacaatcgt gtcaaaatcc
19051  ttttgtccat tcgaaactgc actaccaatc gcaatggctt ctgcacaaac
19101  agttactcgt cctatatacg cttcaatatg tactgccgaa atgatttctc
                 Sun I
19151  ctgttttcgt acgaattgcc gctcccacat gatgtttatt atcctcataa
                                  ←BS (2)
19201  agcattgtaa tcttctctgt cgctacttct actaattcta gatcttgttg
19251  agaaatgtta aatgttttCA Tatattcttc ttcctccgat ttctgcaaaa
19301  atgaatccaa gctttttgca aaagcctagg cctccaaaaa agcctcctca
19351  ctacttctgg aatagctcag aggccgaggc ggcctcggcc tctgcataaa
19401  taaaaaaaat tagtcagcca tggggcggag aatgggcgga actgggcgga
19451  gttaggggcg ggatgggcgg agttaggggc gggactatgg ttgctgacta
                                  SV40 Promotor
19501  attgagatgc atgctttgca tacttctgcc tgctggggag cctggggact
19551  ttccacacct ggttgctgac taattgagat gcatgctttg catacttctg
19601  cctgctgggg agcctgggga ctttccacac cctaactgac acacattcca
19651  cagctagcgc tatatgcgtt gatgcaattt ctatgcgcac ccgttctcgg
19701  agcactgtcc gaccgctttg gccgccgccc agtcctgctc gcttcgctac
19751  ttggagccac tatcgactac gcgatcatgg cgaccacacc cgtcctgtgg
19801  atctacccac tagtcaattc accatcttgt tgagaaataa aagaaaatgc
                                                  SalI/XhoI
19851  caatgaagta tcggcatttt ctttttgctg ttattagttg actgtcagtc
                 BssH II (unique)
19901  gagcccgtca GCGCGCgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggctggctt
19951  aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg
20001  tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc aggcgccatt
20051  cgccattcag gctgcgcaac tgttgggaag ggcgatcggt gcgggcctct
20101  tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag
20151  ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca
              (MCS von PUC19)                Sal I (unique)
20201  gtgaattcga gctcggtacc cggggatcct ctagaGTCGA Cctgcaggca
                                  < lac Z (alpha)
20251  tgcaagcttg gcgtaatcat ggtCATagct gtttcctgtg tgaaattgtt
20301  atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa
20351  gcctggggtg cctaatgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc
20401  actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa
20451  tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct
20501  tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggt
20551  atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata
20601  acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc cagggccacc
          Bsp120 I (not affected by methylation) XhoI/SalI
20651  caaaGGGCCC aaatgtggcc cgtaaaaagg ccgcgttgct cgaTCGACAG
         (Oligo ABF/R)
20701  GGCCTCGTGA TACGCCTATT TTTATAGGTT AATGTCATGA TAATAATGGT
20751  TTCTTAGACG TCAGGTGGCA CTTTTCGGGG AAATGTGCGC GGAACCCCTA
20801  TTTGTTTATT TTTCTAAATA CATTCAAATA TGTATCCGCT CATGAGACAA
                                  Amp(1) start
20851  TAACCCTGAT AAATGCTTCA ATAATATTGA AAAAGGAAGA GTATGAGTAT
20901  TCAACATTTC CGTGTCGCCC TTATTCCCTT TTTTGCGGCA TTTTGCCTTC
20951  CTGTTTTTGC TCACCCAGAA ACGCTGGTGA AAGTAAAAGA TGCTGAAGAT
21001  CAGTTGGGTG CACGAGTGGG TTACATCGAA CTGGATCTCA ACAGCGGTAA
21051  GATCCTTGAG AGTTTTCGCC CCGAAGAACG TTTTCCAATG ATGAGCACTT
21101  TTAAAGTTCT GCTATGTGGC GCGGTATTAT CCCGTATTGA CGCCGGGCAA
21151  GAGCAACTCG GTCGCCGCAT ACACTATTCT CAGAATGACT TGGTTGAGTA
21201  CTCACCAGTC ACAGAAAAGC ATCTTACGGA TGGCATGACA GTAAGAGAAT
```

portion of E coli genome (K12)
Primer BemR(1)
Primer BemF(1)
Oligo BBD(1)
tel (4)
I-Sce I (4)
Bsp 120I/NotI
XhoI/SalI


lac Z (alpha) fragment nonfunctional portion
Bsp 120 I (methylated)
Xho I/Sal I
Amp(2) start
portion from the E coli genome (K12)
Primer BemR(2)
Primer BemF(2)
Oligo BBD(2)

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
BAC	künstliches Bakterienchromosom (*Bacterial Artificial Chromosome*)
bp	Basenpaare
ca.	cirka
cen	Zentromer
Chr.	Chromosom
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalie-Virus
CpG(s)	CpG-Dinukleotid(e)
del	Deletion
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-Triphosphat
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
dH_2O	destilliertes Wasser
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*Desoxyribonucleic Acid*)
dNTP	2'-Desoxyribo-Nukleotid-5`-triphosphat (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
dTTP	Desoxy-Thymidin-Triphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EBNA-1	Epstein-Barr-Virus Nuclear Antigen 1
E.coli	Escherichia coli
EGFP	*Enhanced green fluorescent protein*
F	vorwärts (*Forward*)
h	Stunde (*hour*)
hPa	Hekto-Pascal
HAC	Künstliches menschliches Chromosom (*Human Artificial Chromosome*)
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galactopyranosid
IS1	„Insertion element 1“
kb	Kilobasenpaare (10^3 bp)
kD	Kilodalton
konz.	konzentriert
kV	Kilovolt

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

7 Literaturverzeichnis

Abremski K, Hoess R, Sternberg N. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell*. 1983;**32**:1301-11.

Akgun E. et al. Palindrome resolution and recombination in the mammalian germ line. *Mol Cell Biol*. 1997 Sep;**17**(9):5559-70.

Alton EW, Geddes DM. Gene therapy for respiratory diseases: potential applications and difficulties. *Thorax*. 1995 May;**50**(5):484-6.

Altschult SF. et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;**215**(3):403-10.

Amor DJ, Choo KH. Neocentromeres: role in human disease, evolution, and centromere study. *Am J Hum Genet*. 2002 Oct;**71**(4):695-714.

Ascenzioni F, Donini P, Lipps HJ. Mammalian artificial chromosomes-vectors for somatic gene therapy. *Cancer Lett*. 1997 Oct 14;**118**(2):135-42.

Auriche C, Donini P, Ascenzioni F. Molecular and cytological analysis of a 5.5 Mb minichromosome. *EMBO Rep*. 2001 Feb;**2**(2):102-7.

Baumann CT. et al. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. Multiple protein interactions are required for nuclear retention. *J Biol Chem*. 2001 Apr 6;**276**(14):11237-45.

Bernards A. et al. Pulsed field gradient electrophoresis of DNA digested in agarose allows the sizing of the large duplication unit of a surface antigen gene in trypanosomes. *Gene*. 1986;**42**(3):313-22.

Benham F. et al. A method for generating hybrids containing nonselected fragments of human chromosomes. *Genomics*. 1989 May;**4**(4):509-17.

Birren BW, Hood L, Lai E. Pulsed field gel electrophoresis: studies of DNA migration made with the programmable, autonomously-controlled electrode electrophoresis system. *Electrophoresis*. 1989 May-Jun;**10**(5-6):302-9.

Bobadilla JL. et al. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*. 2002 Jun;**19**(6):575-606.

Boucher RC. Status of gene therapy for cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest*. 1999Feb;**103**(4):441-5.

Broackes-Carter FC. et al. Temporal regulation of CFTR expression during ovine lung development: implications for CF gene therapy. *Hum Mol Genet*. 2002 Jan 15;**11**(2):125-31.

Brock. Biology of Microorganisms. Eight Edition, 1997. Prentice Hall International. New Jersey.

Brunner S. et al. Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol Ther*. 2002 Jan;**5**(1):80-6.

Bzymek M, Susan T, Lovett ST. Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms. *PNAS*. 2001 July 17;**98** (15): 8319–8325.

Cattani S. Klonierung eines genomischen Expressionskonstruktes mit dem cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) – Gen. Diplomarbeit. 2002. Fakultät für Biologie der LMU-München.

Chan CK, Jans DA. Synergy of importin alpha recognition and DNA binding by the yeast transcriptional activator GAL4. *FEBS Lett*. 1999 Nov 26;**462**(1-2):221-4.

Chan CK. et al. Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery. *Gene Ther*. 1998 Sep;**5**(9):1204-12.

Colledge WH. et al. Cystic fibrosis mouse with intestinal obstruction. (Letter) *Lancet* 1992. **340**. 680.

Courvalin P, Goussard S, Grillot-Courvalin C. Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *C R Acad Sci III*. 1995 Dec;**318**(12):1207-12.

Cuppens H. et al. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest*. 1998 Jan 15;**101**(2):487-96.

Csonka E. et al. Novel generation of human satellite DNA-based artificial chromosomes in mammalian cells. *J Cell Sci*. 2000 Sep;**113**(18):3207-16.

Cockerill PN, Garrard WT. Chromosomal loop anchorage sites appear to be evolutionarily conserved. *FEBS Lett*. 1986 Aug 11;**204**(1):5-7.

Cooke H. Mammalian artificial chromosomes as vectors: progress and prospects. *Cloning Stem Cells*. 2001;**3**(4):243-9.

Cremer T. et al. Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2000;**10**(2):179-212.

Davidson H. et al. Genomic sequence analysis of Fugu rubripes CFTR and flanking genes in a 60 kb region conserving synteny with 800 kb of human chr. 7. *Genome Res*. 2000 Aug;**10**(8):1194-203.

Dean DA. et al. Sequence Requirements for Plasmid Nuclear Import. *Exp Cell Res*. 1999 Dec 15;**253**(2):713-22.

Dean DA. Import of Plasmid DNA into the Nucleus is Sequence Specific. *Exp Cell Res*.1997 Feb 1;**230**(2):293-302.

Depinet TW. et al. Characterization of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA. *Hum Mol Genet*. 1997 Aug;**6**(8):1195-204.

Dersch P, Isberg RR. A region of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. *EMBO J.* 1999 Mar 1;**18**(5):1199-213.

Dorin JR. et al: Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature* 1992. **359**:211-5.

Duzgunes N, Felgner PL. Intracellular delivery of nucleic acids and transcription factors by cationic liposomes. *Methods Enzymol*. 1993;**221**:303-6.

Van Driel R. et al. Nuclear domains and the nuclear matrix. *Int Rev Cytol*. 1995;**162**:151-89.

Ebersole TA, Ross A, Clarke E, McGill N, Schindelhauer D, Cooke H, Grimes B. Mammalian artificial chromosome formation from circular alphoid input DNA does not require telomere repeats. *Hum Mol Genet*. 2000 Jul 1;**9**(11):1623-31.

EMBO Protocoll: Practical Course „Microinjection and Detection of Probes in Cells“. 2000.

Fajac I, Grosse S, Collombet JM, Thevenot G, Goussard S, Danel C, Grillot-Courvalin C. Recombinant Escherichia coli as a gene delivery vector into airway epithelial cells. *J Control Release*. 2004 Jun 18;**97**(2):371-81.

Farr C, Fantes J, Goodfellow P, Cooke H. Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Aug 15;**88**(16):7006-10.

Farr C, Stevanovic M, Thomson EJ, Goodfellow P, Cooke H. Telomere-associated chromosome fragmentation: applications in genome manipulation and analysis. *Nat Genet*. 1992 Dec;**2**(4):275-82.

Fasbender A. et al. A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia. *Gene Ther.* 1997 Nov;**4**(11):1173-80.

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. 1983 Jul 1;**132**(1):6-13.

Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposom-mediated transfection. *Nature.* 1989 Jan 26;**337**(6205):387-8.

Ferreira J. et al. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. J Cell Biol. 1997 Dec 29;139(7):1597-610.

Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. 1989 Jul 20;**340**(6230):245-6.

Gasser SM, Laroche T, Falquet J, Boy de la Tour E, Laemmli UK. Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J Mol Biol*. 1986 Apr 20;**188**(4):613-29.

Gilbert DM. Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science*. 2001 Oct 5;**294**(5540):96-100.

Giniger E, Varnum SM, Ptashne M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell.* 1985 Apr;**40**(4):767-74.

Griesenbach U. et al. Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther.* 2002 Oct;**9**(20):1344-50.

Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 1999 May 14;*97*(4):503-14.

Grillot-Courvalin C, Goussard S, Huetz F, Ojcius DM, Courvalin P. Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 1998;**16**(9):862-6.

Grillot-Courvalin C, Goussard S, Courvalin P. Bacteria as gene delivery vectors for mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol*. 1999;**10**(5):477-81.

Grimes BR, Shindelhauer D, McGill N, Ross A, Ebersole TA, Cooke H. Stable gene expression from a mammalian artificial chromosome. *EMBO Rep*. 2001 Oct;**2**(10):910-4.

Grimes BR, Warburton PE, Farr CJ. Chromosome engineering: prospects for gene therapy. *Gene Ther*. 2002a Jun;**9**(11):713-8.

Grimes BR, Rhoades AA, Willard HF. Alpha-satellite DNA and vector composition influence rates of human artificial chromosome formation. *Mol Ther*. 2002b Jun;**5**(6):798-805.

Haaf T, Schmid M. Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. *Exp Cell Res*. 1991 Feb;**192**(2):325-32.

Hacein-Bey-Abina S, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Int J Hematol*. 2002 Nov;**76**(4):295-8.

Hacein-Bey-Abina S. et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2003 Jan 16;**348**(3):255-6.

Hamm A. et al. Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng*. 2002 Apr;**8**(2):235-45.

Hanish JP, Yanowitz JL, de Lange T. Stringent sequence requirements for the formation of human telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 13;**91**(19):8861-5.

Harris A. Towards an ovine model of cystic fibrosis. *Hum. Mol. Genet*. 1997 Dez **6**: 2191-2193.

Harrington JJ, Van Bokkelen G, Mays RW, Gustashaw K, Willard HF. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat Genet*. 1997 Apr;**15**(4):345-55.

Hefferon TW. et al. Atypical 5' splice sites cause CFTR exon 9 to be vulnerable to skipping. *Am J Hum Genet*. 2002 Aug;**71**(2):294-303.

Henning KA. et al. Human artificial chromosomes generated by modification of a yeast artificial chromosome containing both human alpha satellite and single-copy DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jan 19;**96**(2):592-7.

Herzog RW, Arruda VR. Update on gene therapy for hereditary hematological disorders. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2003 Jul;**1**(2):215-32.

Hughes TA, Cook PR. Mimosine arrests the cell cycle after cells enter S-phase. *Exp Cell Res.* 1996 Feb 1;**222**(2):275-80.

Huxley C. Mammalian artificial chromosomes: a new tool for gene therapy. *Gene Ther*. 1994 Jan;**1**(1):7-12.

Igo-Kemenes T, Horz W, Zachau HG. Chromatin. *Annu Rev Biochem*. 1982;**51**:89-121.

Ikeno M, Grimes B, Okazaki T, Nakano M, Saitoh K, Hoshino H, McGill N, Cooke H, Masumoto H. Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nat Biotechnol*. 1998 May;**16**(5):431-9.

Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA, de Jong PJ. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet*. 1994 Jan;**6**(1):84-9.

Isberg RR, Falkow S. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. Nature. 1985 Sep 19-25;317(6034):262-4.

Isberg RR. Mammalian cell adhesion functions and cellular penetration of enteropathogenic Yersinia species. *Mol Microbiol*. 1989 Oct;**3**(10):1449-53.

Itzhaki JE. et al. Targeted breakage of a human chromosome mediated by cloned human telomeric DNA. *Nat Genet*. 1992 Dez; **2**(4):283-7.

Jentsch I. Entwicklung neuer molekularzytogentischer Verfahren für die Tumordiagnostik. 2003. Dissertation. Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Jiang Q, Engelhardt JF. Cellular heterogeneity of CFTR expression and function in the lung: implications for gene therapy of cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet*. 1998 Jan;**6**(1):12-31.

Joo NS. et al. Absent secretion to vasoactive intestinal peptide in cystic fibrosis airway glands. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;**277**(52):50710-5.

Karpen GH, Allshire RCS. The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet.* 1997 Dec;**13**(12):489-96.

Kasamatsu H, Nakanishi A. How do animal DNA viruses get to the nucleus? *Annu. Rev. Microbiol*. 1998. **52**:627-86.

Kerem B, Rommenns JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989 Sep 8;**245**(4922):1073-80.

Kereso J. et al. De novo chromosome formation by large-scale amplification of the centromeric region of mouse chromosomes. *Chromosome Res*. 1996 Apr;**4**(3):226-39.

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

Knoch T. Das MLP Model. (Poster) Transregio 5 Symposium: Chromatin – Assembly and Inheritance of Functional States. 2003 Oct, Genzentrum LMU-München.

Kouprina N. Cloning of human centromeres by transformation-associated recombination in yeast and generation of functional human artificial chromosomes. *Nucleic Acids Res*. 2003 Feb 1;**31**(3):922-34.

Krude T. Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp Cell Res*. 1999 Feb 25;**247**(1):148-59.

Krysan PJ, Smith JG, Calos MP. Autonomous replication in human cells of multimers of specific human and bacterial DNA sequences. *Mol Cell Biol*. 1993 May;**13**(5):2688-96.

Kurz A. et al. Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J Cell Biol*. 1996 Dec;**135**(5):1195-205.

Larson JE. et al. CFTR modulates lung secretory cell proliferation and differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000a Aug;**279**(2):L333-41.

Larson JE. et al. Gene transfer into the fetal primate: evidence for the secretion of transgene product. *Mol Ther*. 2000b Dec;**2**(6):631-9.

Leach D, Lindsay J, Okely E. Genome interactions which influence DNA palindrome mediated instability and inviability in Escherichia coli. *J Cell Sci Suppl*. 1987;**7**:33-40.

Lee C. et al. Human centromeric DNAs. *Hum Genet*. 1997 Sep;**100**(3-4):291-304.

Lewis M. Human artificial chromosomes: emerging from concept to reality in biomedicine. *Clin Genet*. 2001 Jan;**59**(1):15-16.

Lipps HJ, Bode J. Exploiting chromosomal and viral strategies: the design of safe and efficient non-viral gene transfer systems. *Curr Opin Mol Ther*. 2001 Apr;**3**(2):133-41.

Lipps HJ. et al. Chromosome-based vectors for gene therapy. *Gene*. 2003 Jan 30;**304**:23-33.

Marshall E. Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science*. 2003 Jan 17;**299**(5605):320.

Maruvada P. et al. Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem*. 2003 Apr 4;**278**(14):12425-32.

Masumoto H, Ikeno M, Nakano M, Okazaki T, Grimes B, Cooke H, Suzuki M. Assay of centromere function using a human artificial chromosome. *Chromosoma*. 1998 Dec;**107**(6-7):406-16.

Mejia JE. et al. Functional complementation of a genetic deficiency with human artificial chromosomes. *Am J Hum Genet*. 2001 Aug;**69**(2):315-26.

Mejia JE. et al. Efficiency of de novo centromere formation in human artificial chromosomes. *Genomics*. 2002 Mar;**79**(3):297-304.

Mesika A. et al. A regulated, NFkappaB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Mol Ther*. 2001 May;**3**(5 Pt 1):653-7.

Minaschek G, Bereiter-Hahn J, Bertholdt G. Quantitation of the volume of liquid injected into cells by means of pressure. *Exp Cell Res.* 1989 Aug;**183**(2):434-42.

Mirkovitch J, Gasser SM, Laemmli UK. Relation of chromosome structure and gene expression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1987 Dec 15;**317**(1187):563-74.

Munkel C. et al. Compartmentalization of interphase chromosomes observed in simulation and experiment. *J Mol Biol*. 1999 Jan;**285**(3):1053-65.

Murray AW, Szostak JW. Construction of artificial chromosomes in yeast. Nature. 1983 Sep 15-21;305(5931):189-93.

Narayanan K, Warburton PE. DNA modification and functional delivery into human cells using Escherichia coli DH10B. *Nucleic Acids Res*. 2003 May 1;**31**(9):e51.

Niksic M. et al. Functional analysis of cis-acting elements regulating the alternative splicing of human CFTR exon 9. *Hum Mol Genet.* 1999 Dec;**8**(13):2339-49.

Ohzeki J. et al. CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA. *J Cell Biol*. 2002 Dec 9;**159**(5):765-75.

Olson MV. Separation of large DNA molecules by pulsed-field gel electrophoresis. A review of the basic phenomenology. *J Chromatogr*. 1989 May 26;**470**(2):377-83.

Pagani F. et al. Promoter architecture modulates CFTR exon 9 skipping. *J Biol Chem*. 2003 Jan 17;**278**(3):1511-7.

Paul AL, Ferl RJ. Higher-order chromatin structure: looping long molecules. *Plant Mol Biol.* 1999 Dec;**41**(6):713-20.

Pollard H. et al. Polyethlyenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1998 Mar 27;**273**(13):7507-11.

Porcellini A, De Blasi A. Viral infection protocols. *Methods Mol Biol*. 2004;**259**:155-66.

Qasim W, Gaspar HB, Thrasher AJ. Gene therapy for severe combined immune deficiency. *Expert Rev Mol Med*. 2004 Jul 02;2004:1-15.

Raper SE. et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 2003;**80**(1-2):148-58.

Razin SV. Functional architecture of chromosomal DNA domains. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1996;**6**(2-3):247-69.

Riordan JR. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989 Sep 8;**245**(4922):1066-73. Erratum in: *Science* 1989 Sep 29;**245**(4925):1437.

Robinett CC. et al. In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *J Cell Biol*. 1996 Dec;**135**(6 Pt 2):1685-700.

Rozmahel R. et al. Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nat Genet*. 1996 Mar;**12**(3):280-7.

Rudd MK. et al. Human artificial chromosomes with alpha satellite-based de novo centromeres show increased frequency of nondisjunction and anaphase lag. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov;**23**(21):7689-97.

Saffery R. et al. Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of >20 functionally important kinetochore-associated proteins. *Hum Mol Genet*. 2000 Jan 22;**9**(2):175-85.

Saffery R. et al. Construction of neocentromere-based human minichromosomes by telomere-associated chromosomal truncation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 8;**98**(10):5705-10.

Saffery R, Choo KH. Strategies for engineering human chromosomes with therapeutic potential. *J Gene Med*. 2002 Jan-Feb;**4**(1):5-13.

Saiki RK. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan 29;**239**(4839):487-91.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 1989. *Cold Spring Harbour Laboratory*, New York.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*. 1992;**24**:104-8.

Schaarschmidt D. et al. An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *EMBO J*. 2004 Jan 14;**23**(1):191-201.

Schell J, Van Montagu M. Transfer, maintenance, and expression of bacterial Ti-plasmid DNA in plant cells transformed with A. tumefaciens. *Brookhaven Symp Biol*. 1977 May 12-20;(29):36-49.

Schindelhauer D, Cooke HJ. Efficient combination of large DNA in vitro: in gel site specific recombination (IGSSR) of PAC fragments containing alpha satellite DNA and the human HPRT-Gene locus. *Nucleic Acids Res*. 1997 Jun 1;**25**(11):2241-3.

Schindelhauer D. Construction of mammalian artificial chromosomes: prospects for defining an optimal centromere. *Bioessays*. 1999 Jan;**21**(1):76-83.

Schindelhauer D, Laner A. Visible transient expression of EGFP requires intranuclear injection of large copy numbers. *Gene Ther*. 2002 Jun;**9**(11):727-30.

Schindelhauer D, Schwarz T. Evidence for a fast, intrachromosomal conversion mechanism from mapping of nucleotide variants within a homogeneous alpha-satellite DNA array. *Genome Res*. 2002 Dec;**12**(12):1815-26.

Schneider D. et al. Genomic comparisons among Escherichia coli strains B, K-12, and O157:H7 using IS elements as molecular markers. *BMC Microbiol*. 2002 Jul 9;**2**(1):18.

Schueler MG. et al. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science*. 2001 Oct 5;**294**(5540):109-15.

Schuffenhauer S. et al. Interstitial deletion 5p accompanied by dicentric ring formation of the deleted segment resulting in trisomy 5p13-cen. *Am J Med Genet*. 1996 Oct 2;**65**(1):56-9.

Smith CL, Cantor CR. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Large DNA Molecules. *Nature* 1986 Jan 30;**319**:701-701.

Smith CL. et al. A Physical Map of the E. coli K12 Genome. *Science* 1987 Jun 12;**236**:1448-53.

Smith DJ. et al. Multpile potential intragenic regulatory elements in the CFTR gene. *Genomics.* 2000 Feb 15; **64**(1):90-6.

Snell RG, Wilkins RJ. Separation of chromosomal DNA molecules from C.albicans by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. 1986 Jun 11;**14**(11):4401-6.

Snouwaert JN. et al. An animal model for CF made by gene targeting. *Science* 1992. **257**:1083-88.

Stansel RM, de Lange T, Griffith JD. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. EMBO J. 2001 Oct 1;**20**(19):5532-40.

Sternberg N. In vitro packaging of a lambda Dam vector containing EcoRI DNA fragments of Escherichia coli and phage P1. *Gene*. 1977 May;**1**(3-4):255-80.
Tourriere H, Chebli K, Tazi J. mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie.* 2002 Aug;**84**(8):821-37.

Tyler-Smith C, Willard H. Mammalian chromosome structure. *Curr Opin Genet Dev*. 1993 Jun;**3**(3):390-7.

Vos JM. Therapeutic mammalian artificial episomal chromosomes. *Curr Opin Mol Ther.* 1999 Apr;**1**(2):204-15.

Warburton PE, Willard HF. Genomic analysis of sequence variation in tandemly repeated DNA. Evidence for localized homogeneous sequence domains within arrays of alpha-satellite DNA. *J Mol Biol*. 1990 Nov 5;**216**(1):3-16.

Warburton PE. et al. Molecular cytogenetic analysis of eight inversion duplications of human chromosome 13q that each contain a neocentromere. *Am J Hum Genet*. 2000a Jun;**66**(6):1794-806.

Warburton PE. et al. Detection of submicroscopic subtelomeric chromosome translocations: a new case study. *Am J Med Genet.* 2000b Mar 6;**91**(1):51-5.

Waye JS, England SB, Willard HF. Genomic organization of α satellite DNA on human chromosome 7: evidence for two distinct alphoid domains on a single chromosome. *Mol Cell Biol*. 1987 Jan;**7**(1):349-56.

Weber PC, Palchaudhuri S. An inverted repeat sequence of the IncFI plasmid ColV2-K94 increases multimerization-mediated plasmid instability. *J Gen Microbiol*. 1986 Apr;**132**(Pt 4):989-95.

Wiesenhofer B, Humpel C. Lipid-mediated gene transfer into primary neurons using FuGene: comparison to C6 glioma cells and primary glia. *Exp Neurol*. 2000 Jul;**164**(1):38-44.

Willard HF, Carrel L. Making sense (and antisense) of the X inactivation center. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;**98**(18):10025-7.

Williams SH. et al. Evaluation of gene targeting by homologous recombination in ovine somatic cells. *Mol Reprod Dev*. 2003 Oct;**66**(2):115-25.

Wine JJ. Rules of conduct for the cystic fibrosis anion channel. *Nat Med*. 2003 Jul;**9**(7):827-8.

Zabner J. et al. Adenoviral-mediated gene transfer to fetal pulmonary epithelia in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 1995 Jun;**95**(6):2620-32.

Zabner J. Cationic lipids used in gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997 Aug 11;**27**(1):17-28.

Zaric V. et al. Effective polyethylenimine-mediated gene transfer into human endothelial cells. *J Gene Med*. 2004 Feb;**6**(2):176-84.

Zhu XG. et al. The differential hormone-dependent transcriptional activation of thyroid hormone receptor isoforms is mediated by interplay of their domains. *J Biol Chem*. 1997 Apr 4;**272**(14):9048-54.

Zink D. et al. Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Hum Genet*. 1998 Feb;**102**(2):241-51.

Zirbel RM. et al. Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Res*. 1993 Jul;**1**(2):93-106.

Zohar M, Mesika A, Reich Z. Analysis of genetic control elements in eukaryotes: transcriptional activity or nuclear hitchhiking? *Bioessays*. 2001 Dec;**23**(12):1176-9.

8 Publikationen

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

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

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

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

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

Vorträge:

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

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

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

Poster:

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

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

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

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

9 Lebenslauf

Geburtsdatum:

12. Oktober 1971, München, Deutschland

Familienstand:

ledig, eine Tochter

Schulbildung:

1993	Abitur, Adolf-Weber-Gymnasium, München
1993-1994	Zivildienst (Krankenhaus München Schwabing, Pathologie)

Studium:

1994-2000	Studium der Biologie: Ludwig-Maximilians Universität, München; *Nebenfächer*: Biochemie, Pharmakologie, Molekulare Zellbiologie. *Hauptfach*: Mikrobiologie
2000	Diplomarbeit: Institut für Mikrobiologie und Genetik, Ludwig-Maximilians Universität, München, Prof. Dr. Volker Müller (Dr. Sascha Aufurth, Betreuer): *"Cloning of copA and overexpression of the corresponding corrinoid-binding protein from Acetobacter woodii"*
2000-2003	Doktorand in der Abteilung Medizinische Genetik, Kinderpoliklinik, Ludwig-Maximilians Universität, München, Labor für künstliche Chromosomen (Betreuer: Dr. Dirk Schindelhauer, Lehrstuhl Biotechnologie der Tiere, WCW Weihenstephan, Technische Universität, München)

Anstellung:

Februar 2004	Post-Doc Stelle, Medizinisch Genetisches Zentrum (MGZ) München

DANKSAGUNG

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

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

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

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

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

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