

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung  
Technische Universität München  
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

Untersuchungen zum interzellulären Transport  
durch die Proteintransduktionsdomänen VP22 und MTS  
mit Hilfe von fluoreszierenden Fusionsproteinen

Kai Oliver Megerle

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher  
2. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann

Die Dissertation wurde am 27.08.2003 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.02.2004 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>2</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Therapie mit Proteinen als Alternative zur klassischen Gentherapie .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Überwindung von Membranen durch Proteintransduktion .....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Proteintransduktion wird durch Proteintransduktionsdomänen vermittelt.....	9
1.2.2. Der Mechanismus der Proteintransduktion ist nicht bekannt .....	10
1.2.3. Die Effizienz der Proteintransduktion wird widersprüchlich beurteilt .....	10
<b>1.3. Verwendete Protransduktionsdomänen .....</b>	<b>11</b>
1.3.1. Das Herpes Simplex Virus Protein VP22 .....	11
1.3.2. Membrane Translocating Sequence (MTS) .....	12
<b>1.4. Markierung von Proteinen durch Enhanced green fluorescent protein (EGFP) .....</b>	<b>14</b>
1.4.1. Nachweis von Proteintransduktion durch Fusionierung mit EGFP .....	15
<b>1.5. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>15</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Zellbiologische Verfahren.....</b>	<b>17</b>
2.1.1. Zellkultur .....	17
2.1.2. Transfektion .....	18
2.1.3. Kryokonservierung .....	19
2.1.4. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	20
2.1.5. Protein-Präparation .....	22
2.1.6. RNA-Präparation.....	23
2.1.7. Immunfluoreszenz.....	23
<b>2.2. Molekularbiologische Verfahren .....</b>	<b>24</b>
2.2.1. PCR .....	24
2.2.2. RT-PCR .....	26
2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese .....	27
2.2.4. Verdau mit bakteriellen Restriktionsenzymen .....	29
2.2.5. Ligation von DNA-Fragmenten (Subklonierung) .....	30
2.2.6. Transformation von Bakterien mit DNA.....	31
2.2.7. Plasmid-Präparation aus Bakterien.....	32
2.2.8. Klonierung mit Hilfe des VP22-TOPO-Isomerase-Kits .....	33
2.2.9. Western Blot Analyse.....	34
<b>2.3. Statistische Analyse.....</b>	<b>34</b>

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Klonierung der Vektoren.....</b>	<b>35</b>
3.1.1. Klonierung von pcVP22-EGFP.....	35
3.1.2. Klonierung von pcVP22-GFTS.....	36
3.1.3. Klonierung von pcGFTS.....	38
<b>3.2. Nachweis der vollständigen Expression von EGFP, VP22-EGFP, VP22-GFTS und GFTS.....</b>	<b>38</b>
3.2.1. Western Blot-Analyse der klonierten Konstrukte.....	38
3.2.2. RT-PCR zum Expressionsnachweis der MTS enthaltenden Fusionsproteine.....	39
<b>3.3. Selektion stabil exprimierender Zelllinien .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4. Nachweis der Transduktion durch direkte Fluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>41</b>
3.4.1. EGFP .....	41
3.4.2. VP22-EGFP .....	41
3.4.3. VP22-GFTS .....	43
3.4.4. GFTS .....	45
<b>3.5. Mikroskopischer Nachweis der Transduktion nach Fixation der Zellen in 100% Methanol.....</b>	<b>47</b>
<b>3.6. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Hybridproteine nach Antikörpermarkierung.....</b>	<b>49</b>
<b>3.7. Quantifikation der Transduktion mit Hilfe der Durchflusszytometrie .....</b>	<b>50</b>
3.7.1. Anzahl der fluoreszierenden Zellen.....	51
3.7.2. Durchflusszytometrisch bestimmte Fluoreszenzintensität der Zellen nach Expression der Fusionsproteine.....	51
3.7.3. Vergleich der Fluoreszenzintensitäten .....	59
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1. EGFP ist als Nachweissystem zur Quantifizierung von Proteintransduktion nicht geeignet .....</b>	<b>61</b>
<b>4.2. Ist die Proteintransduktion durch VP22 ein Fixationsartefakt?.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3. Vergleich des Verhaltens von VP22-EGFP, VP22-GFTS und MTS in der mikroskopischen und durchflußzytometrischen Analyse .....</b>	<b>66</b>
4.3.1. Das MTS-Peptid verändert die intrazelluläre Proteinverteilung des VP22-EGFP-Proteins.....	66
4.3.2. Eine Translokation durch MTS kann weder mikroskopisch noch durchflußzytometrisch bewiesen werden .....	67
4.3.3. Unterschiede der Fusionsproteine in der durchflußzytometrischen Analyse.....	67
4.3.4. Mögliche Synergieeffekte zwischen MTS und VP22.....	68
<b>4.4. Ausblick.....</b>	<b>69</b>

<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>71</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>7. Danksagung .....</b>	<b>77</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BFP	blue fluorescent protein
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CTP	Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	desoxyribonucleid acid = Desoxyribonukleinsäure = DNS
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FACS	fluorescence activated cell sorter, Durchflußzytometrie
FCS	fetal calf serum = fötales Kälberserum
GCV	Ganciclovir
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanintriphosphat
HSV	Herpes Simplex Virus
LB	Luria-Bertani
LM	low melting, mit niedrigem Schmelzpunkt
M	Molar
MTS	membrane translocating sequence
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered Saline = Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PBST	PBS-Tween
PCR	polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PTD	Proteintransduktionsdomäne
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SSC	sideward scatter
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat
TBE	Tris/Borat
TE	Tris/EDTA
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
v/v	Volumenprozent
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

# 1. Einleitung

## 1.1 Therapie mit Proteinen als Alternative zur klassischen Gentherapie

Das Prinzip der klassischen Gentherapie ist einfach: In erkrankte Zellen sollen neue oder modifizierte Gene eingebracht werden, um durch die in ihnen kodierten Proteine therapeutische Effekte zu erzielen. Trotz erheblichem finanziellem und wissenschaftlichem Aufwand in hunderten von Studien konnten seit Beginn der neunziger Jahre bislang allerdings nur einige wenige Patienten auf diese Weise dauerhaft therapiert werden. Die Ursache für diese Diskrepanz liegt vor allem in der Schwierigkeit, geeignete Übertragungssysteme (Vektoren) für die zu transferierende DNA zu entwickeln, denn die Anforderungen an ein solches System sind hoch: der eingesetzte Vektor sollte selbst leicht zu vermehren sein und beim Gentransfer in einer ausreichend hohen Konzentration vorliegen, so dass eine große Anzahl von Zellen infiziert werden kann. Er sollte die neuen Gene an einer spezifischen Stelle ins Genom der Zielzellen (und nur dieser) integrieren, wobei die übertragene Information in vielen Fällen mit einfachen Steuermechanismen jederzeit kontrollierbar bleiben sollte. Zudem sollte er möglichst frei von unerwünschten Nebenwirkungen sein und vor allem keine immunologische Antwort des Empfängers auslösen (Luft, 1999, p. 575). Viele dieser Anforderungen konnten bis heute nicht zufriedenstellend gelöst werden, die gentherapeutischen Therapieansätze scheitern häufig an der Insuffizienz der verwendeten Vektoren.

Die ursprünglichen gentherapeutischen Ansätze, bei denen zwangsläufig gerade eine stabile Expression, also eine dauerhafte Integration ins Erbgut der behandelten Patienten notwendig ist, zielten auf eine Reihe meist monogenetischer Krankheiten wie z.B. zystische Fibrose oder verschiedene Enzymmangelsyndrome. In diesem Fall ist die Erfüllung vieler der oben genannten Kriterien, besonders die zielgerechte Übertragung und stabile Expression der Gene *in vivo* unerlässlich und macht die Entwicklung dieser neuen Therapieformen für diese Krankheiten besonders schwierig.

Heute stehen diese Krankheiten in der gentherapeutischen Forschung allerdings im Hintergrund. Für die große Mehrheit der momentan in Erforschung befindlichen Projekte, darunter vor allem die zahlreichen Ansätze zur Therapie von Tumoren, ist eine dauerhafte Expression keine notwendige Voraussetzung. Ziel ist in der Regel der direkte Zelltod der Tumorzellen oder die Auslösung einer Immunreaktion, die den

Tod der mutierten Zellen zur Folge hat. Für dieses Ziel sind nur kurzzeitig hohe Mengen an Proteinen notwendig, die die gewünschten therapeutischen Effekte vermitteln. Neben der Möglichkeit, mit der DNA die Erbinformation dieser Proteine in die erkrankten Zellen zu übertragen, besteht hier die Möglichkeit einer Therapie direkt durch Verabreichung der Proteine selbst unter Umgehung der Ebene von zelleigener Transkription und Translation. Dieses Vorgehen hat gegenüber der Übertragung von Genen verschiedene Vorteile: Unerwünschte Mutationen des ursprünglichen Erbgutes der Zielzellen durch neue DNA werden vermieden, Dauer und Dosierung der Therapie sind besser kontrollierbar und Störungen des Transkriptionsprozesses in den Zielzellen sind ohne Bedeutung (Derer et al., 1999, p. 609).

Sind die Zielstrukturen der therapeutisch verabreichten Proteine extrazellulär lokalisiert, so ist die Applikation der Proteine einfach, eine Injektion in die Blutbahn oder direkt ins Gewebe ist in der Regel ausreichend. Analog zum Transfer von Genen wird die Situation jedoch komplizierter, wenn die Proteine ins Innere der Zielzellen gelangen müssen, wo die Zellfunktionen kontrolliert werden. In diesem Fall müssen die meist hydrophilen Proteine die hydrophobe Zellmembran passieren. Zur Lösung dieses Problems existieren verschiedene Ansätze, etwa durch Fusion der zu transferierenden Entitäten mit Proteinen, mit deren Hilfe eine rezeptorgesteuerte Aufnahme ins Zellinnere erfolgen kann. Eine neuere Variante besteht in der Kombination der Zielproteine mit speziellen Proteinen oder Aminosäuresequenzen, die eine kanal- und rezeptorunabhängige Aufnahme des Gesamtproteins ermöglichen. Dieser Vorgang wird als Proteintransduktion bezeichnet.

## **1.2 Überwindung von Membranen durch Proteintransduktion**

Die zelluläre Plasmamembran ist für Proteine in der Regel impermeabel und die Aufnahme von Proteinen in Zellen erfolgt mit Hilfe rezeptorgesteuerter Endozytose oder spezieller Transportersysteme. Bereits 1988 wurde jedoch die Eigenschaft des HIV1 TAT Proteins, durch einfache Zugabe ins Kulturmedium in Zellen und sogar deren Kern einzudringen, unabhängig voneinander durch Green und Frankel gezeigt (Green und Loewenstein, 1988; Frankel und Pabo, 1988). Dieser Vorgang, die Überwindung von Membranen unabhängig von Rezeptoren oder Transportermechanismen, wird als Proteintransduktion bezeichnet. Nach dieser Beobachtung wurden viele weitere Proteine mit identischen Eigenschaften

identifiziert, von denen das Drosophila Antennapedia Peptid und das Herpes Simplex VP22 Protein (HSV-VP22) bis heute am besten erforscht sind. Interessanterweise ist die Rolle des TAT- und VP22-Proteins im Rahmen der natürlichen Zyklen der Viren bis heute unbekannt. Vermutungen, dass Nachbarzellen der bereits infizierten Zellen für die folgende Infektion vorbereitet werden sollten, konnten bis jetzt nicht bestätigt werden, eventuell handelt es sich bei der Transduktion um eine zufällige, in der Evolution nicht selektionierte Eigenschaft der viralen Proteine (Schwarze et al., 2000, p. 290).

Neben den oben erwähnten Proteinen existieren zahlreiche vor allem in der Erforschung von Signalkaskaden eingesetzte kleinere Peptide, die ebenfalls die Eigenschaft der rezeptorunabhängigen Membrantranslokation aufweisen. Diese entsprechen zu einem großen Teil hydrophoben Regionen (h-Regionen) diverser zellulärer Signalsequenzen (Hawiger, 1999, p. 89).

### **1.2.1. Proteintransduktion wird durch Proteintransduktionsdomänen vermittelt**

Verantwortlich für die Fähigkeit zur Proteintransduktion sind kurze, zwischen zehn und 30 Aminosäuren lange, hydrophobe Peptidsequenzen dieser Proteine, sogenannte Proteintransduktionsdomänen (PTDs). Ihre besondere Beachtung haben diese membranpermeablen Peptide dadurch erlangt, dass durch Verbindung der Transduktionsdomänen mit anderen Proteinen diese ebenfalls permeabel für Membranen gemacht werden können, ohne dabei ihre biologische Aktivität zu verlieren. Diese Fusionsproteine können dadurch ihren Wirkort im Zellinneren unabhängig von speziellen Transportersystemen oder Rezeptoren erreichen. Die Transduktionsdomäne und das funktionelle Peptid können dabei auf unterschiedliche Art und Weise miteinander verknüpft werden. Nachdem zunächst eine Verbindung der exprimierten Peptide etwa mittels einer Peptidbindung oder einer nichtpeptidischen Thiazolidinbindung erfolgte, erweiterte Rojas den Einsatz dieser Transportsequenzen durch die Herstellung von rekombinanten Fusionsproteinen (Rojas et al., 1998). Hierbei werden die Anteile auf Ebene der DNA miteinander verknüpft und bereits das permeable Fusionsprotein als ganzes exprimiert. Der Einsatz dieser Fusionsproteine ist dabei sowohl *in-vivo* als auch *ex-vivo* möglich, z.B. zur Expansion von Stammzellen durch Übertragung des SV40-Large-T-Antigens (Kobayashi et al., 2000).

Die Anwendung von PTDs ist jedoch nicht auf den Transport von Proteinen begrenzt. Auch die Translokation anderer Entitäten wie etwa Chemotherapeutika unter Überwindung der Blut-Hirn-Schranke konnte nachgewiesen werden (Rousselle et al., 2000).

### **1.2.2. Der Mechanismus der Proteintransduktion ist nicht bekannt**

Trotz der Identifikation immer neuer membranpermeabler Peptide und dem nachgewiesenen Transport zahlreicher Peptide ist der genaue Mechanismus der Transduktion durch die PTDs nach wie vor nicht bekannt (Schwarze et al., 2000, p. 290). Unklar ist ebenso, inwieweit die bisher beschriebenen PTDs identische oder ähnliche Transportmechanismen aufweisen. Von der Einschleusung dieser Sequenzen ins Zellinnere existieren nur Modellvorstellungen, in deren Mittelpunkt die Interaktion der Peptide mit der Zellmembran der Zellen steht. Entscheidend zur Überwindung der Plasmamembran scheint in jedem Fall die hydrophobe Region der Transduktionsdomänen. So korreliert die Eigenschaft von Peptiden, sich in die Zellmembran einzufügen, mit dem Grad der Hydrophobie ihrer hydrophoben Regionen, ohne dass die primären Sequenzen dabei identisch sein müssen (Hoyt und Gierasch, 1991). Im Vergleich zu anderen Bereichen des Peptids oder Proteins liegt hier die stabilste Helix-Konfiguration des Peptids vor. Während Proteine ohne entsprechende hydrophobe Regionen außerhalb der Membran bleiben, kann sich die Translokationssequenz in die Membran integrieren und dann in einem zweiten Schritt das gesamte Peptid in die Zelle einschleusen. Ein mögliche Variante hierbei umfasst die Bildung von invertierten Micellen durch Interaktion eines Tryptophananteils mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran (Lindgren et al., 2000, p. 102).

Bekannt ist hingegen, welche Mechanismen nicht für die Transduktion verantwortlich sind: die Peptide passieren die Membran weder durch klassischen, rezeptor-, endosomvermittelten Transport noch durch einen adsorptiv-endocytotischen Prozess (Elliott und O'Hare, 1997; Derossi et al., 1994; Derossi et al., 1996; Vives et al., 1997; Mann und Frankel, 1991).

### **1.2.3. Die Effizienz der Proteintransduktion wird widersprüchlich beurteilt**

Ebenso unklar wie der Mechanismus ist die Effizienz des durch die Transduktionsdomänen vermittelten Transports. Hierzu werden für die einzelnen Peptide in der Literatur z.T. widersprüchliche Angaben gemacht (s. Kapitel 1.3.1,

1.3.2.). Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Proteintransport zweier ausgewählter Proteintransduktionsdomänen zu quantifizieren.

### **1.3. Verwendete Protransduktionsdomänen**

Zu diesem Ziel wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Transduktionsdomänen verwendet, das Herpes-Virus-Protein VP22 sowie die hydrophobe Region der Signalsequenz des Kaposi Fibroblasten Wachstumsfaktors (FGF), die in der Literatur auch als membrane translocating sequence (MTS) bekannt ist.

#### **1.3.1. Das Herpes Simplex Virus Protein VP22**

Das VP22-Protein des Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) ist ein 38kDa großes Protein des Teguments des Virus, der Region zwischen Hülle und Kapsid. Es besteht aus 361 Aminosäuren und wird durch das UL49-Gen kodiert (Elliott und Meredith, 1992). Als basisches Protein liegt VP22 zu einem hohen Grad in phosphorylierter Form vor und weist eine hohe Affinität zu Chromatin auf. Es konnte sowohl im Nukleus infizierter Zellen als auch in Virionen nachgewiesen werden (Gibson und Roizman, 1974; Knopf und Kaerner, 1980).

VP22 kann als Proteintransduktionsdomäne Zellmembranen überwinden. Aus einer Zelle, die VP22 bzw. Fusionsproteine mit VP22 exprimiert, findet sich daher eine interzelluläre Ausbreitung auf die Nachbarzellen („spreading“) (Elliott und O'Hare, 1997). Die Verteilung des Proteins innerhalb der Zellen, die das Protein selbst exprimieren unterscheidet sich dabei deutlich von der Verteilung in den Zellen, die Protein durch Transduktion aufnehmen, aber nicht selbst exprimieren. In den „Herstellerzellen“ ist das Protein zunächst im Zytoplasma mit einer Assoziation zum Mikrotubulusapparat nachzuweisen. Es zeigt ein komplexes Muster von Expression und subzellulärer Lokalisation und liegt während der Mitose im Zellkern an Chromatin gebunden vor (Aints et al., 2001). In den „Empfängerzellen“ ist VP22 dagegen überwiegend im Nukleus nachweisbar. Auf diese Weise lassen sich Herstellerzellen und Empfängerzellen bereits durch die unterschiedliche Verteilung des Proteins eindeutig unterscheiden (Elliott und O'Hare, 1997).

Wie bereits oben ausgeführt, ist der Mechanismus der Proteintransports (der Proteintransduktion) nach wie vor ungeklärt. Es handelt sich weder um einen klassischen rezeptorvermittelten, noch um einen vom Golgi-Apparat abhängigen

Prozess. Ein intaktes System von Aktin-Filamenten ist jedoch Voraussetzung für eine Translokation des Proteins durch VP22 (Bennett und Dalby, 2002; Elliott und O'Hare, 1997). Eine Verbindung zwischen den Zellen mittels gap-junctions ist dabei nicht notwendig, ein Transport zwischen Neuroblastomzellen ohne diese Zellverbindungen konnte ebenso nachgewiesen werden wie eine Translokation zwischen Zellen unterschiedlicher Gewebe und Spezies sowie eine Aufnahme in ausdifferenzierte Muskelzellen (Dilber et al., 1999; Elliott und O'Hare, 1997; Derer et al., 1999).

Entsprechend der anderen Proteintransduktionsdomänen kann auch das VP22-Protein zum Transport von Proteinen eingesetzt werden. Durch eine Fusion mit VP22 gelang bereits die Transduktion von enhanced green fluorescent protein (EGFP), p53, Herpes-Simplex-Thymidin-Kinase (HSV-TK),  $\beta$ -Galaktosidase und Flp-Rekombinase (Elliott und O'Hare, 1997; Dilber et al., 1999; Phelan et al., 1998; Bennett und Dalby, 2002).

Eine direkte Aufnahme des Proteins bzw. von Hybriden des Proteins mit verschiedenen funktionellen Peptiden konnte auch nach kurzer Inkubation ausschließlich mit dem aufgereinigtem Protein selbst gezeigt werden (Elliott und O'Hare, 1997, p. 229).

Umstritten ist die Effizienz der Proteintransduktion durch VP22. Während *Elliott* berichtet, ein VP22-Fusionsprotein in nahezu 100% der Zellen in einem Monolayer nachweisen zu können, können *Fang et al.* in zytometrischen Durchflussanalysen keinerlei interzellulären Transport feststellen (Elliott und O'Hare, 1999; Fang et al., 1998). *Lundberg* bezweifelt die Transduktionsfähigkeit des VP22-Peptids grundsätzlich und vermutet ein Artefakt (Lundberg und Johansson, 2001). Für zahlreiche Peptide konnte allerdings eine Wirkungsverbesserung durch Fusion mit VP22 im Vergleich zum nativen Protein alleine festgestellt werden (Dilber et al., 1999; Phelan et al., 1998; Cheng et al., 2001; Bennett und Dalby, 2002).

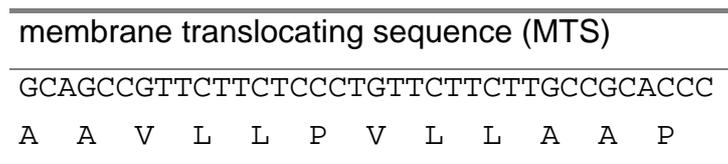
Zum Nachweis des VP22-Proteins wird in der Literatur in der Regel das fluoreszierende Markerprotein enhanced green fluorescent protein (EGFP) eingesetzt.

### **1.3.2. Membrane Translocating Sequence (MTS)**

Wie bereits oben erwähnt, sind neben den großen, vergleichsweise gut charakterisierten Proteinen VP22, HIV TAT und dem Antennapedia Peptid zahlreiche kürzere hydrophobe Peptide bekannt, die ebenfalls die Fähigkeit zur Penetration von Zellmembranen aufweisen und dadurch als Proteintransduktionsdomänen andere

funktionelle Peptide in Zellen einschleusen können. Eine große Gruppe dieser PTDs entspricht den hydrophoben Regionen (h-Regionen) verschiedener zellulärer Signalsequenzen. Die vorliegende Arbeit verwendet eine modifizierte, 12 Aminosäuren umfassende h-Region der Signalsequenz des Kaposi Fibroblasten Wachstumsfaktors (FGF, s.

Abbildung 1-1). In Anlehnung an eine Arbeit von *Rojas* wird diese im Folgenden als membrane translocation sequence (MTS) bezeichnet (Rojas et al., 1998).



**Abbildung 1-1: membrane translocating sequence (MTS)**

MTS stellt eine 12 Aminosäuren umfassende Transduktionsdomäne dar, die auf den Fibroblastenwachstumsfaktor des Kaposi-Virus zurückzuführen ist

1. Reihe DNA-Sequenz, 2. Reihe Aminosäurenkürzel

Mit Hilfe dieser kurzen hydrophoben Peptidsequenz konnte die zelluläre Aufnahme von Proteinen bis zu einer Größe von 45 kDa gezeigt werden (Rojas et al., 1998, p. 374).

Die zelluläre Aufnahme von Peptiden mit Hilfe von kovalent verknüpften h-Regionen ist nicht auf einen bestimmten Zelltyp limitiert und konnte in mehreren menschlichen und tierischen Zelllinien nachgewiesen werden (Lin et al., 1995; Zhang et al., 1998; Torgerson et al., 1998). Der Import ist ferner konzentrations- und temperaturabhängig, steht aber nicht im Zusammenhang mit klassischer endosomaler Aufnahme, da er nicht durch entsprechende Inhibitoren gehemmt wird (Lin et al., 1995, p. 14258), der genaue Mechanismus der Zellpenetration ist jedoch wie auch bei den anderen PTDs nicht bekannt. Die Aufnahme ist nicht abhängig von membranösen Kaveolae, da sie auch in humanen T-Lymphozyten auftritt, die diese Strukturen nicht aufweisen (Torgerson et al., 1998). Der zelluläre Import tritt auch bei entleerten zellulären ATP-Speichern auf, eine intakte Plasmamembran hingegen ist Voraussetzung für die Translokation durch diese zellmembranpermeablen Peptide (Lin et al., 1995, p. 14258).

Die h-Region kann zur Gewinnung der permeablen Fusionsproteine sowohl an das N-terminale als auch an das C-terminale Ende des funktionellen Peptids angehängt werden (Du et al., 1998).

Eine Quantifikation des Proteintransports durch MTS ist bislang nicht publiziert.

#### **1.4. Markierung von Proteinen durch Enhanced green fluorescent protein (EGFP)**

In der vorliegenden Arbeit wurde zum Nachweis der klonierten Konstrukte das ursprünglich aus der Qualle *Aequora victoria* isolierte und molekularbiologisch modifizierte enhanced green fluorescent protein (EGFP) verwendet. EGFP hat sich als Reportersystem zur Analyse von Genexpression und –lokalisierung bewährt, da es im Gegensatz zu anderen biolumineszenten Reportern intrinsisch in der Primärstruktur der Proteine integriert ist und keine Substrate und Cofaktoren benötigt. Nach seiner Exzitation mit UV- oder blauem Licht (maximale Anregung bei 395 nm) emittiert es ein helles grünes Licht mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 509 nm. Durch weitere Modifikationen wurden mittlerweile weitere Varianten des Proteins hergestellt, die von grün unterschiedliche Fluoreszenzen aufweisen, wie z.B. das blue fluorescent protein (BFP).

Während sich das native Protein homogen im Zytoplasma der exprimierenden Zellen verteilt, zeigt es in Fusion mit anderen Peptiden eine spezifische subzelluläre Lokalisation, die ausschließlich durch dieses zweite Peptid bestimmt wird. Obwohl das eigentliche Chromophor des 238 Aminosäuren umfassenden EGFPs nur wenige Aminosäuren umfasst, ist zur Fluoreszenz-Emission allerdings das komplette und nicht denaturierte Protein notwendig. Bei einer Fusion von Proteinen oder Peptiden mit EGFP bleibt aber durch dessen stabile Konfiguration einerseits das funktionelle Peptid in seiner Funktion weitestgehend unbeeinträchtigt, andererseits wird auch die Fluoreszenz nicht abgeschwächt (Hink et al., 2000, p. 17559; Margolin, 2000, p. 67). Bei einer Fusion kann das Fluoreszenzprotein sowohl am N-terminalen Ende, C-terminalen Ende oder sogar innerhalb eines zweiten Peptids lokalisiert sein (Biondi et al., 1998). Verteilung und Dynamik von mit EGFP markierten Proteinen lassen sich daher ohne großen Aufwand und ohne die Gefahr von Fixationsartefakten in lebenden Zellen untersuchen.

Auch außerhalb der Verwendung als Fusionsprotein lässt sich EGFP sowohl als Reporter zum Nachweis von Expression als auch in zahlreichen anderen

Bereichen einsetzen (Zimmer, 2002, p. 770). In Amerika wurde es außerhalb der Forschung in der Öffentlichkeit bekannt durch den Auftritt eines transgenen Rhesusaffen in Talkshows (Chan et al., 2001).

Ein kontrovers diskutiertes Problem des Reportersystems ist die mögliche Toxizität des fluoreszierenden Proteins. In einigen Fällen wurde eine Induktion von Apoptose und größeren Genrearrangements beobachtet (Hanazono et al., 1997; Liu et al., 1999). Diese Beobachtungen werden jedoch von anderen Gruppen angezweifelt (Wahlfors et al., 2001, p. 61).

#### **1.4.1. Nachweis von Proteintransduktion durch Fusionierung mit EGFP**

Zur Erforschung von VP22 werden bis heute vor allem Fusionsproteine aus VP22 und fluoreszierenden Markerproteinen, vor allem EGFP, eingesetzt, da dieses Verfahren einfach und zeitsparend ist. Hersteller- und Empfängerzellen lassen sich hierdurch bereits wie oben beschrieben durch die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation unterscheiden. Der Nachweis einer Transduktion derartiger Fusionsproteine mit Hilfe dieses Reportersystems ist in lebenden Zellen bis heute allerdings nicht gelungen - der fluoreszenzmikroskopische Nachweis mittels EGFP gelingt nur nach vorangegangener Fixation und damit Zerstörung der Zellmembran der zu untersuchenden Zellen (Elliott und O'Hare, 1999).

Auch der Nachweis der Proteintransduktion durch MTS wurde durch Hybridproteine geführt. Der interzelluläre Transport durch die Sequenz erfolgte jedoch im Gegensatz zu VP22 hierbei nicht durch fluoreszierende Markerproteine, sondern indirekt durch die Wirkung anderer transduzierter funktioneller Peptidanteile, z. B. durch die Regulation von Zellzyklen (Rojas et al., 1998). Ein mikroskopischer Nachweis einer Proteintransduktion mit Hilfe von EGFP oder anderen fluoreszierenden Proteinen ist bislang nicht beschrieben.

### **1.5. Zielsetzung der Arbeit**

Die Proteintransduktion ermöglicht das Einschleusen von Proteinen in beliebige Zellen ohne spezielle Transportersysteme. Zur Effizienz der Proteintransduktion existieren momentan allerdings nur wenige, teils widersprüchliche Daten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Effizienz der Proteintransduktion der zwei Proteintransduktionsdomänen VP22 und MTS zu quantifizieren. Hierzu wurden

Fusionsproteine aus VP22 und EGFP sowie MTS und EGFP kloniert und neben mikroskopischen Untersuchungen durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. Bislang ebenso unbekannt ist das Verhalten von Proteinen, die zwei unterschiedliche, kovalent miteinander verknüpfte Proteintransduktionsdomänen tragen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher zudem die Frage untersucht, ob durch eine Kombination zweier Transduktionsdomänen die Effizienz des Transports verbessert werden kann. Hierzu wurden Hybridproteine aus den drei Peptiden VP22, MTS und EGFP kloniert, die mikroskopisch und durchflusszytometrisch untersucht wurden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Zellbiologische Verfahren**

#### **2.1.1. Zellkultur**

##### **2.1.1.1. Kulturbedingungen**

Nicht anderweitig aufgeführte Materialien und Methoden entsprechen den üblichen Empfehlungen. Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden in Schalen mit 100mm Durchmesser gezüchtet (TPP, Schweiz). Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zellen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biochrom, Berlin) kultiviert, das mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin), Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml, Biochrom, Berlin) und L-Glutamin (Endkonzentration 2mM, Biochrom, Berlin) ergänzt wurde.

##### **2.1.1.2. Zellpassage**

Zur Zellpassage wurde zunächst das Kulturmedium komplett mit einer sterilen Pasteurpipette entfernt und die Zellen zweimal mit warmer PBS-Puffer-Lösung (Biochrom, Berlin) gewaschen. Zur Ablösung der Zellen wurde Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma, München) zugegeben, sodass die Zellen gerade bedeckt waren. Die Lösung wurde anschließend sofort abpipettiert und die Zellen kurz bei 37°C inkubiert. Unter dem Mikroskop konnte nach kurzer Zeit ein Ablösen der Zellen von der Kulturschale beobachtet werden. Sobald dies der Fall war, wurden die Zellen in 5ml warmen Kulturmedium resuspendiert und auf neuen Kulturschalen ausplattiert.

##### **2.1.1.3. Verwendete Zelllinien**

Sämtliche mikroskopischen und durchflusszytometrischen Versuche wurden mit COS-7-Zellen (ATCC CRL1651) durchgeführt. Diese Zelllinie entstammt aus Nierenzellen von *Cercopithecus aethiops* (afrikanischer Grünaffe). Sie geht auf die Zelllinie CV-1 zurück, die mit einer defektiven Variante des SV40-Virus transformiert wurde, die für das T-Antigen codiert. COS-Zellen haben sich bei der Erforschung von VP22-Proteinen bewährt. (Elliott und O'Hare, 1999; Wybranietz et al., 1999). Die Zellen wachsen adhärent in einem Monolayer und wurden dreimal pro Woche in einem Verhältnis von 1:4 bzw. 1:8 passagiert.

293 (ATCC CRL-1573) ist eine menschliche Zelllinie, die auf embryonale Nierenzellen zurückgeht und mit menschlichem Adenovirus Typ 5 (Ad 5)

transformiert wurde. Die Zellen wachsen adhärent in einem Monolayer und wurden dreimal pro Woche in einem Verhältnis von 1:2 und 1:4 passagiert.

Bei CMS-5-Zellen handelt es sich um aus Mäusen isolierte Fibrosarkomzellen. Sie wachsen adhärent im Monolayer und wurden dreimal pro Woche in einem Verhältnis von 1:4 und 1:2 passagiert.

MDA 435 SM ist eine humane Zelllinie, die aus humanen Adenocarcinomzellen der Mamma isoliert wurde und spontane Metastasierung zeigt. Sie zeigt adhäsives Wachstum im Monolayer und wurde dreimal pro Woche in einem Verhältnis von 1:3 bzw. 1:5 passagiert.

### **2.1.2. Transfektion**

Die Transfektion der Zellen wurde mittels Lipofektion durchgeführt. Hierbei wird die DNA in Lipidkomplexe eingebettet und kann so in die Zelle eingeschleust werden.

Die dabei verwendeten kationischen (positiv geladenen) Lipide überführen die negativ geladenen DNA-Moleküle durch die elektrostatische Anziehung in eine kompakte Struktur. Die so kondensierten Komplexe interagieren aufgrund ihrer äußeren kationischen Ladung und lipophilen Struktur mit der negativ geladenen, hydrophoben Doppelschicht der Zellmembran und schleusen die DNA in die Zielzelle ein.

Es wurden neben den üblichen Medien und Materialien Lipofectamin (LifeTechnologies, Karlsruhe), PLUS Reagens (Life-Technologies, Karlsruhe) und OPTI-MEM mit GLUTAMAX (GibcoBRL, Karlsruhe) verwendet. Die Transfektionen wurden in 60mm-Schalen (TPP, Schweiz) und zweikammerigen Glasträgern (Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt.

Vor jeder Transfektion wurde die DNA-Menge durch Messung ihrer spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm photometrisch quantifiziert ( $A_{260}$ ) (Messung mit GeneQuant II, Pharmacia Biotech, Freiburg). Zusätzlich wurde die Absorption von möglichen Proteinverunreinigungen bei einer Wellenlänge von 280nm bestimmt ( $A_{280}$ ). Der Quotient von  $A_{260}/A_{280}$  sollte für reine DNA bei etwa 1,8 liegen.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, von den Kulturschalen abgelöst und mit Hilfe eines Hämatocytometers nach Färbung mit Trypan-Blau (Sigma, München) gezählt. Die Zellen wurden so ausplattiert, dass sie am Tag der Transfektion zu etwa 50% bis 90% konfluent waren, dazu waren am Vortag etwa

$4 \times 10^5$  Zellen pro 60mm Schale bzw.  $5 \times 10^4$  Zellen pro Glasträgerkammer notwendig. Diese Menge variierte je nach Größe der verwendeten Zellen.

Zur Durchführung der Transfektion wurde zunächst das Medium der Kulturschalen mit serumfreiem Medium (OPTI-MEM, GibcoBRL, Karlsruhe) ausgetauscht. Danach wurde die zu transfizierende DNA in OPTI-MEM verdünnt und mit PLUS-Reagens (Life-Technologies, Karlsruhe) gemischt und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dieses präkomplexierte Gemisch zu Lipofectamin (Life-Technologies, Karlsruhe) hinzugefügt, das ebenfalls in OPTI-MEM verdünnt worden war. Das komplette Transfektionsgemisch wurde dann nach vorsichtigem Durchmischen für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Gemisch den Zellen zugegeben und für 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Inkubationsgemisch wurde anschließend durch normales Kulturmedium ersetzt. Nach 24h wurden die Zellen mikroskopisch kontrolliert und ein Mediumwechsel vorgenommen. Nach 48h waren die Zellen bereit für die durchzuführenden Experimente. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verwendeten Mengen der Lösungen.

	DNA	PLUS	Lipofectamin	Medium zur Verdünnung (2x)	Medium
60mm	2µg	5µg	10µl	250µl	2ml
Kammer	1µg	2µg	6 µl	100µl	0,5ml

**Tabelle 1:** Übersicht über die verwendeten Transfektionsmengen und –volumina

### 2.1.3. Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung von Zellen wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und die Zellen wie in Abschnitt 2.1.1.2 beschrieben von den Kulturschalen gelöst. Nach der Resuspension in 5ml frischen Mediums wurden die Zellen für 3min bei 1400 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 3ml bis 5ml einer Kryokonservierungslösung resuspendiert. Diese bestand aus 40% FCS (Biochrom, Berlin), 45% DMEM (Biochrom, Berlin) und 15% DMSO (Biochrom, Berlin). Die so vorbereiteten Zellen wurden in Portionen von 1ml in spezielle Kryokonservierungsröhrchen (Nalgene, USA) überführt. Um sie den Empfehlungen entsprechend annähernd kontinuierlich in einer Rate von 1°C/min abzukühlen wurden sie zunächst für etwa 24h in einer

Ethanolkammer bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff umgelagert.

Zum Wiederauftauen der kryokonservierten Zellen wurden diese in einem Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  vorsichtig erwärmt, bis sich ein erster Tropfen am oberen Rand des eingefrorenen Mediums bildete. Sobald dies zu beobachten war, wurde der Inhalt des Kryoröhrchens durch behutsames Auf- und Abpipettieren von warmem Komplettmedium in dieses resuspendiert und auf neue 100mm-Kulturschalen überführt. Nach 24h erfolgte nach mikroskopischer Kontrolle der Zellen ein erneuter Mediumwechsel.

## **2.1.4. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

### **2.1.4.1. Prinzip**

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers können die physikalischen und biologischen Eigenschaften biologischer Partikel (Zellen) bestimmt werden. Das System misst hierbei das Emissionsverhalten von Zellen, die einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an einem Exzitationssystem vorbeigeleitet werden. Auf diese Art und Weise ist es möglich, in kurzer Zeit eine große Anzahl von Zellen hinsichtlich verschiedener Parameter zu charakterisieren und zu quantifizieren. Es ist zusätzlich möglich, die Zellen nach diesen Kriterien zu sortieren.

Zunächst müssen die Zellen eventuell mit einem passenden Marker (z.B. Antikörper) markiert und in eine geeignete Lösung gebracht werden. Nach dem Ansaugen der Zellsuspension wird diese in einem Flüssigkeitssystem mittels einer hydrodynamischen Fokussierung in einen dünnen Strahl eingebracht. In diesem passieren die Zellen einzeln ein Exzitationssystem (hier Argon-Laser), wo sie mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden (hier  $\lambda=488\text{nm}$ ). Beim Durchgang durch diesen Strahl werden das Licht, das von der Zelle gestreut wird sowie die Fluoreszenz von einem System von Lichtdetektoren gesammelt, gefiltert und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Auf diese Weise kann man jede einzelne Zelle auf verschiedene Parameter hin untersuchen. Die Größe der Zelle korreliert mit deren FSC (forward scatter)-Wert, die binnenseitigen Eigenschaften bestimmen maßgeblich den SSC (sideward-scatter)-Wert. Mittels geeigneter fluoreszierender Antikörper können zudem beispielsweise bestimmte Oberflächenepitope untersucht werden oder die Fluoreszenz von Substraten oder Markerproteinen ausgenutzt werden. Die so gewonnenen Daten werden dann in einem weiteren System gespeichert und können zu einem beliebigen Zeitpunkt ausgewertet werden.

Zur Messung wurde das FACSVantage-System (Beckton Dickinson, Heidelberg) verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software FACS-Quest.

Im vorliegenden Fall entfiel die Markierung der Zellen, da das Expressionsverhalten von Konstrukten zu untersuchen war, die alle mit enhanced green fluorescent Protein (EGFP) hybridisiert worden waren und somit eine Eigenfluoreszenz aufwiesen.

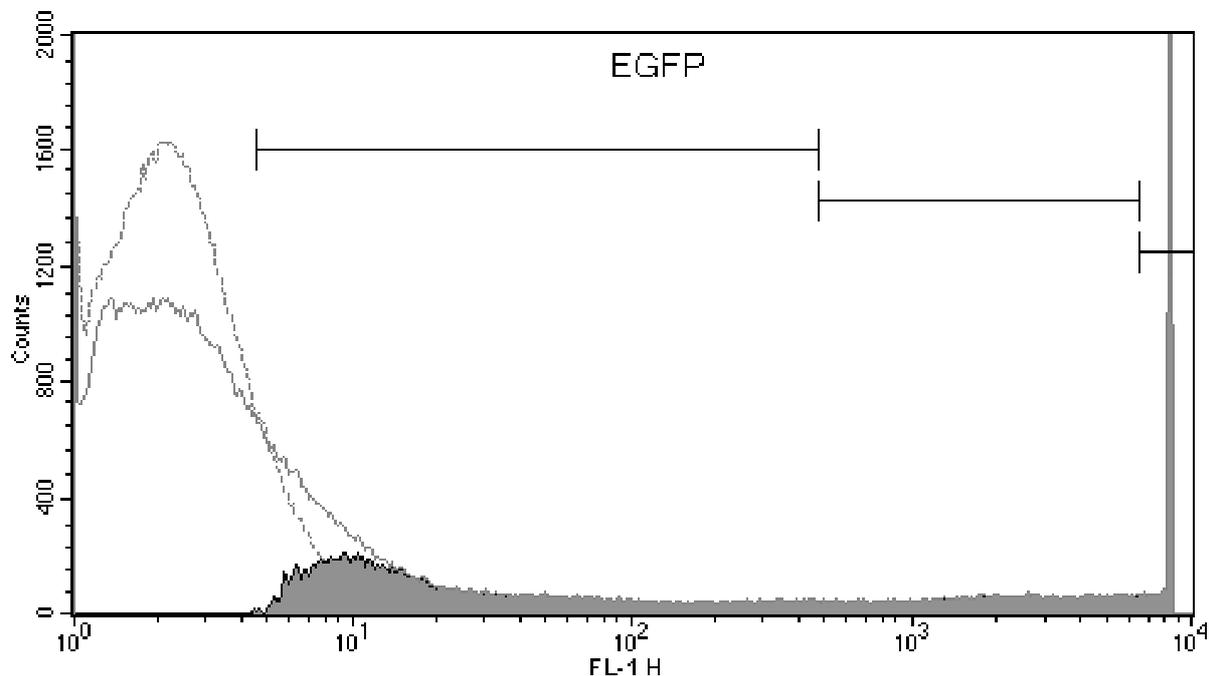
Die zu untersuchenden Zellen wurden 48h nach Transfektion wie beschrieben von den Kulturplatten abgelöst, nach Trypanblau-Färbung gezählt, zentrifugiert, in PBS resuspendiert und sofort gemessen. Die Viabilität der Zellen wurde mittels Propidium-Iodid-Essays kontrolliert. Propidium-Iodid interkaliert nur in nichtintakten Zellen mit der enthaltenen DNA, während lebende Zellen dies aufgrund ihrer intakten Membranen nicht zulassen.

#### **2.1.4.2. Erhebung und Auswertung der Daten**

Um in der Durchflußzytometrie sinnvolle Aussagen machen zu können, ist es notwendig, die Datenmenge auf den tatsächlich gewünschten und aussagekräftigen Bereich zu reduzieren. In der FSC-SSC-Darstellung sollten daher nur Bereiche („regions“) gewählt werden, in denen sich die zu untersuchenden, lebenden Zellen befinden. Durch die Verwendung der Propidium-Iodid-Färbung kann diese Trennung präzisiert werden, indem die Auswertung nur auf zuvor definierte Bereiche („gates“) beschränkt wird.

Ziel der Arbeit war ein quantitativer Nachweis der Proteintransduktion in der Durchflußzytometrie. Um statistische Aussagen treffen zu können, wurden in einem Reihenversuch 10 Gruppen von COS-7-Zellen mit der definierten Menge von 2 µg DNA der zu untersuchenden Plasmide pro 60mm-Schale transfiziert. Die Messungen wurden jeweils bei 300.000 Zellen pro Versuch durchgeführt. Diese Mengen hatten sich in Vorversuchen als geeignet zum Vergleich der Konstrukte gezeigt. Zur Bestimmung der Anzahl an fluoreszenzpositiven Zellen wurden für jede Gruppe getrennt die Anzahl der Zellen einer definierten Fluoreszenz der Negativkontrolle von der entsprechenden Anzahl in der zu untersuchenden Probe subtrahiert. Dabei entstehende, negative Werte wurden gleich Null gesetzt. Zur Verdeutlichung dient Abbildung 2-1. Zusätzlich zur absoluten Anzahl an positiven Zellen pro Transfektion wurde auch der zur jeweiligen Positivkontrolle in Verhältnis gesetzte relative Anteil der positiven Zellen berücksichtigt. Die Effizienz der Transfektion innerhalb einer Gruppe wurde jeweils mittels der Positivkontrolle ermittelt. Die Zellen wurden nach der Intensität ihrer Fluoreszenz in eine niedrig-, mittel- und hochfluoreszente Gruppe

eingeteilt. Die Grenzen dieser Bereiche wurden bei einer FL1-H-Fluoreszenz von 470 bzw. 6700 festgelegt.



**Abbildung 2-1:** Berechnungsprinzip der durchflußzytometrischen Daten

Um die Ergebniskurve zu erhalten (grau gefüllt) wurden jeweils die Werte der Negativkontrolle von den Probenwerten subtrahiert. Negative Werte wurden mit Null gleich gesetzt. Die Balken entsprechen dem niedrig-, mittel- und hochfluoreszentem Bereich.

### 2.1.5. Protein-Präparation

Bei der Präparation von Proteinen ist grundsätzlich die Inaktivierung von Proteasen zu beachten. Die Proteine werden nach Lysierung der Zellen durch Zentrifugation abgetrennt.

Die Zellen wurden nach Entfernung des Kulturmediums zunächst zweimal mit warmer PBS-Pufferlösung gewaschen und die Kulturschalen auf Eis gestellt. Es folgte ein weiterer Waschvorgang mit gekühlter PBS-Lösung. Nach Entfernung aller Lösungsreste wurde 500ml Lysispuffer (0,5% Triton X-100, 20mM Tris/HCl pH 8,0, 137mM NaCl, 2mM EDTA, dazu auf 10ml 1 Tablette Protease-Inhibitor-Cocktail, Boehringer Mannheim) zugesetzt und die Schalen unter leichtem Schütteln für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem Schaber von den Schalen gelöst und das Lysat in Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 12000rpm und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.1.6. RNA-Präparation**

Schwierigkeiten bei der Präparation von RNA entstehen vor allem durch die Anwesenheit von Ribonukleasen, die meist sehr stabil sind und zudem keine Kofaktoren zum Spalten der RNA benötigen. Die Lyse der Zellen muss daher in einem Milieu erfolgen, in dem die Ribonukleasen denaturiert werden. Nach der Zerstörung der Zellstruktur wird die RNA von den übrigen Bestandteilen abgetrennt. Um potentielle Kontamination zu vermeiden, sollten die verwendeten Materialien und Reagentien mit Diethylpyrokarbonat (DEPC) behandelt werden, das Proteine inaktiviert. Weitere Maßnahmen zum Schutz der RNA sind die Verwendung von nur unmittelbar zuvor geöffneten Plastikmaterialien und das Tragen von Handschuhen.

Zur Extraktion der RNA wurden zunächst das Medium aus den Kulturschalen entfernt und die Zellen mit gekühltem PBS-Puffer (Biochrom, Berlin) gewaschen. Nach Entfernung aller Restflüssigkeit wurden 3ml eines Guanidinium-Thiocyanat/Phenol-Gemisches (RNAClean, ThermoHybaid, Ulm) zugegeben, das für 5 Minuten unter gelegentlichem Auf- und Abpipettieren auf den Zellen belassen wurde. Die restlichen Zellen wurden nun mit einem Zellschaber abgelöst, das Homogenat in zwei 2ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 150µl Chloroform und gutem Durchmischen wurde der Ansatz für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert und für 15 Minuten bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert. Die auf diese Weise abgetrennte wässrige Phase des Gemisches wurde in ein neues Röhrchen überführt, ein gleiches Volumen Isopropanol zugegeben und der Ansatz für 15 Minuten gekühlt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 14000rpm und 4°C. Der Überstand wurde abgegossen und das entstandene Pellet zweimal durch Zugabe von 1ml 70% Ethanol und anschließendem Zentrifugieren gereinigt. Nach dem Trocknen im Vakuum für 10 Minuten wurde das Pellet in 20µl bis 50µl 0,2% DEPC-haltigem Wasser gelöst und anschließend die Konzentration und Qualität der RNA photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm überprüft (siehe auch Abschnitt 2.1.2). Die Lagerung der RNA erfolgte bei -70°C.

### **2.1.7. Immunfluoreszenz**

Bei der Färbung der Zellen mit Antikörpern müssen die Zellen zunächst durchlässig gemacht werden, damit die Antikörper bis zu den Zielproteinen innerhalb der Zelle gelangen können. Zur fluoreszierenden Markierung von Proteinen können entweder

Antikörper benutzt werden, an die der fluoreszierende Farbstoff direkt gekoppelt ist oder es muss wie im vorliegenden Fall nach Inkubation mit einem ersten Antikörper eine weitere Inkubation mit einem markierten Sekundärantikörper erfolgen, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist.

Zunächst wurden die Zellen nach Entfernen des Kulturmediums in warmer PBS-Lösung gewaschen und für 10 Minuten in eiskaltem Ethanol fixiert. Nach erfolgter Fixation wurden die Zellen noch zwei Mal mit PBS-Lösung gewaschen und anschließend durch eine 30minütige Inkubation in 10%BSA in PBS-Tween (PBST) blockiert. Danach erfolgte für 120 Minuten die Inkubation mit dem an EGFP bindenden Antikörper (Living Peptide Antibody, Clontech, Heidelberg), der zuvor in einem Verhältnis von 1:40 bis 1:200 in 10% BSA-PBST-Lösung verdünnt worden war. Es wurde anschließend ein 45minütiger Waschvorgang mittels PBST-Lösung durchgeführt, währenddessen das PBST vier Mal gewechselt wurde. Danach wurden die Zellen mit dem ebenfalls in 20% PBST-Lösung verdünnten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-Antikörper, Dianova, Hamburg) für 120 Minuten inkubiert. Analog folgte nach diesem Schritt ein erneutes 45minütiges Waschen mit PBST.

## **2.2. Molekularbiologische Verfahren**

### **2.2.1. PCR**

#### **2.2.1.1. Prinzip**

Mit Hilfe der von Kari Mullis beschriebenen Polymerasekettenreaktion (PCR) können DNA-Fragmente einfach und schnell vervielfältigt werden. Grundlage ist die Fähigkeit von DNA-Polymerasen eine Startsequenz (Primer) entlang einer einsträngigen DNA-Matrize komplementär in 5' → 3' Richtung zu verlängern. Zur Vervielfältigung einer bestimmten Sequenz müssen zumindest deren Anfang und deren Ende bekannt sein. Die eingesetzten Primer werden dabei so entworfen, dass sie am 5'-Ende (vorwärts-primer) oder 3'-Ende (rückwärts-primer) je auf einem der beiden DNA-Doppelstränge komplementär zur Originalsequenz sind. Zur Durchführung wird die DNA-Matrize zusammen mit den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dATP, dGTP, dCTG, dATG) und einer DNA-Polymerase in einer Pufferlösung inkubiert.

Die Reaktion besteht aus sich wiederholenden Zyklen, die aus je drei Teilschritten bestehen: Im ersten Schritt wird die zu vervielfältigende DNA auf über 90°C erhitzt, um die zu diesem Zeitpunkt vorliegende doppelsträngige DNA durch Öffnen der

Wasserstoffbrückenbindungen in zwei Einzelstränge zu trennen (Denaturierung). Danach folgt eine rasche Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 40°C bis 65°C. Dabei lagern sich die primer an die jeweils komplementären Sequenzen der DNA-Matrize an (Anlagerung, annealing). Die richtige Anlagerungstemperatur ist ein kritischer Parameter der Reaktion und hängt von Länge und Sequenz der verwendeten Primer ab. Mit dem Binden der Primer sind die Voraussetzungen für die Amplifikation des Fragments geschaffen. Im dritten und letzten Schritt des Reaktionszyklus, der Elongation oder Extension, wird die Temperatur auf die optimale Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase (72°C) gebracht. Diese synthetisiert nun entlang der DNA-Matrize wieder einen neuen DNA-Doppelstrang, der an die gebundenen Primer angeknüpft. Die Dauer diesen Schritts ergibt sich aus der Länge des amplifizierten Fragments.

Vor diesen Reaktionszyklen wurde bei jeder PCR-Reaktion ein einmaliges Erhitzen auf 94°C für 5 Minuten durchgeführt. Dabei wurde der Reaktionsansatz erst nach vorherigem Erhitzen des Thermocyclers zugegeben (hot start). Zur Komplettierung der Reaktion folgte nach Beendigung der Zyklen ein einmaliges dreiminütiges Erhitzen auf 72°C.

#### **2.2.1.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen**

Um eine möglichst optimale Anlagerung der Primer zu ermöglichen, wurde eine Temperatur angestrebt, die 5°C unter der Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der verwendeten Primer lag. Die Schmelztemperatur errechnete sich unter der Berücksichtigung der direkt an die Matrize bindenden Basen aus der Formel:

$$T_M = 4(G+C) + 2(A+T)$$

Zusätzlich wurden die Reaktionsbedingungen der PCR-Reaktion durch Anpassung der Anlagerungstemperatur sowie der  $MgCl_2$ - bzw. der DMSO (Dimethylsulphoxid)-Konzentration der Pufferlösung optimiert.  $MgCl_2$ -Ionen komplexieren mit den dNTPs, Primern und der DNA-Matrize und beeinflussen so die Bindung der Primer. Die Taq-Polymerase benötigt zudem freie  $Mg^{++}$ -Ionen, sodass die optimale Konzentration für jedes Experiment neu bestimmt werden muss. DMSO erleichtert die Denaturierung der DNA-Doppelstränge und kann besonders bei Amplifikationsprodukten von über 1000 Basen die Reaktion günstig beeinflussen.

### 2.2.1.3. Verwendete Materialien

Für die Ansätze wurde jeweils ein Gesamtvolumen von 50µl oder 100µl gewählt. Verwendet wurden für jeden Ansatz 10 µl 10x PCR-Puffer (100mM Tris-HCl, 500mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3 bei 20°C), je 2µl 10mM dNTP (Endkonzentration je 0,2mM), je 1µl Primer (Endkonzentration 0,1mM), 1 µl Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim, #1435 094, entsprechend 1 bis 5 Units pro Reaktion) bzw. Vent-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt) sowie die DNA-Matrize in einer Menge von 50ng bis 100ng. Das Restvolumen wurde durch Zugabe von H<sub>2</sub>O ergänzt. Zur Variation der Bedingungen wurden MgCl<sub>2</sub> in verschiedenen Konzentrationen bis zu 4mM sowie bis zu 10% (v/v) DMSO verwendet.

### 2.2.1.4. Verwendete Primer

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die bei den Klonierungen verwendeten Primer.

Name	Richtung	Sequenz	Zielsequenz
OL-219	vorwärts	5' <u>CCGGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAG</u>	EGFP
OL-220	rückwärts	5'- <u>TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC</u>	EGFP
OL-221	rückwärts	5'- <u>AACGGCTGCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC</u>	EGFP
MTS1	vorwärts	5'- <u>GCAGCCGTTCTTCTCCCTGTTCTTCTTGCCGCACCCTAA</u>	MTS*
MTS2	rückwärts	5'- <u>TTAGGGTGCGGCAAGAAGAAGACAGGGAGAAGAACGGCTGC</u>	MTS*
OL-224	rückwärts	5'- <u>CCTCTAGATTAGGGTGCGGCAAGAAGAACAG</u>	MTS
OL-263	vorwärts	5'- <u>ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG</u>	EGFP
OL-268	vorwärts	5'- <u>GGCCCGGGCGGCGGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC</u>	EGFP

**Tabelle 2:** Verwendete Primer

Unterstreichungen zeigen den bindenden Bereich an

\* MTS1 und MTS2 stellen die kompletten zwei Einzelstränge der MTS-Sequenz dar

### 2.2.2. RT-PCR

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase(RT)-PCR-Reaktion lässt sich die Genexpression auf der Ebene der RNA analysieren. Hierbei wird zunächst durch die Aktivität der Reversen Transkriptase die isolierte RNA in die entsprechende komplementäre DNA (cDNA) übersetzt, um dann in einer wie in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen PCR-Reaktion vervielfältigt und nachgewiesen werden zu können. Prinzipiell ist es möglich, beide Reaktion einzeln mit unterschiedlichen Enzymen und Puffern durchzuführen oder durch eine spezielle DNA-Polymerase in einer einzigen Reaktion umzusetzen. In diesem Fall besitzt das Enzym neben der normalen DNA-

Polymerase-Aktivität zusätzlich die Fähigkeit unter geeigneten Reaktionsbedingungen RNA in cDNA umzusetzen.

Zunächst wurde die Konzentration der RNA durch photometrische Messung neu bestimmt (GeneQuant II, Pharmacia Biotech, Freiburg, siehe Abschnitt 2.1.2). Zur Durchführung der Reaktion wurde eine DNA-Polymerase mit RT-Aktivität verwendet (GeneAmp EZ rTth RNA PCR Kit, Perkin Elmer, Langen). Zur Bestimmung der Parameter Anlagerungszeit und –temperatur wurden bei Durchführung von 40 Zyklen die gleichen Berechnungsgrundlagen wie bei der herkömmlichen PCR verwendet (siehe Abschnitt 2.2.1). Für die Ansätze wurde jeweils ein Gesamtvolumen von 50µl gewählt. Verwendet wurden für jeden Ansatz 10µl 5xEZ-Puffer (250mM Bicin, 575mM Kaliumacetat, 40% (w/v) Glycerol, pH 8,2), 6µl dNTP-Mix (Endkonzentration 6mM), je 1,5µl Primer (Endkonzentration 0,15mM), 2 µl rTth DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Langen, entsprechend 5 Units pro Reaktion) sowie die RNA-Matrize in einer Menge von höchstens 1µg. Das Restvolumen wurde durch Zugabe von DEPC-H<sub>2</sub>O ergänzt. Zur Variation der Bedingungen wurden 2µl bis 6µl 1M Mn(OAc<sub>2</sub>) verwendet. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Fragmente nach Auftrennung durch eine Gelelektrophorese unter UV-Licht visualisiert.

### **2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese**

Die Elektrophorese in Agarosegelen ist eine einfache Methode um DNA-Fragmente nachzuweisen, zu identifizieren und zu trennen. Die negativ geladenen Phosphatreste in den DNA-Molekülen ermöglichen bei Anlage eines elektrischen Feldes eine Auftrennung nach deren Größe, da die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente unter anderem umgekehrt proportional zu deren Größe ist. Das Vorgehen besteht aus drei Arbeitsschritten. Zunächst wird das Gel entsprechend der zu erwarteten Fragmentgrößen und dem Verwendungszweck hergestellt. Danach werden die DNA-Proben aufgetragen und eine elektrische Spannung angelegt. Nach ausreichender Trennung wird das Gel eventuell gefärbt, falls noch kein entsprechendes Reagenz bei der Herstellung verwendet wurde und unter einer UV-Lampe betrachtet. Einzelne Banden können mit einem Skalpell ausgeschnitten und die enthaltene DNA isoliert werden.

#### **2.2.3.1. Herstellung des Agarosegels**

Zur Herstellung eines Präpatationsgels (zum späteren Ausschneiden der Fragmente) wurde ein Tris/Acetat (TAE)-Puffer und low-melting-Agarose (Boehringer Mannheim) verwendet, für alle anderen Gele ein Tris/Borat (TBE)-Puffer und Standard-Agarose

(Boehringer Mannheim). Mit Hilfe des Agarose-Pulvers wurde falls nicht anderes angegeben eine 1%-Lösung hergestellt, die zur Sichtbarmachung der DNA mit 1µl Ethidium-Bromid (Sigma, München) versetzt wurde. Dieses Gemisch wurde unter mehrmaligem Schwenken in einer Mikrowelle solange erhitzt, bis gerade die erste Blasenbildung zu beobachten war. Danach wurde je nach Größe des Gels die entsprechende Menge der Lösung unter Vermeidung von Blasenbildung in eine Form gegossen und die Kämme für die Aussparung der gewünschten Taschen im Gel aufgesteckt. Die Abkühlung erfolgte wie auch die Elektrophorese für TBE-Gele bei Zimmertemperatur, für TAE-Gele bei 4°C.

### **2.2.3.2. Elektrophorese**

Nach Herstellung des Gels wurde dieses in eine Elektrophoresekammer gesetzt, die mit der passenden Pufferlösung so gefüllt wurde, dass das Gel gerade benetzt war. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit Ladepuffer (x10) und H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10µl bis 20µl gebracht. Nach vorsichtigem Einpipettieren des Probengemisches und der DNA-Standards in die Taschen des Gels wurde an die Kammer je nach Gelgröße eine Spannung von 70V bis 120V angelegt. Da dem Ladepuffer ein Farbstoff beigemischt war, konnte der Fortschritt der Elektrophorese am Gel beobachtet werden. Nach ausreichender Trennung der Fragmente wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht betrachtet und einzelne Banden eventuell mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel isoliert (PCR Purification Kit, Promega, Mannheim, Protokoll nach Herstellerangaben).

### 2.2.3.3. Verwendete Lösungen

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die bei der Elektrophorese verwendeten Lösungen.

---

1xTAE-Laufpuffer	auf 2l:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 9,7g Tris-Puffer</li> <li>• 2,3ml Eisinessig</li> <li>• 4ml EDTA 0,5M pH 8,0</li> </ul>
1xTBE-Laufpuffer	auf 2l :	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 26,6g Tris-Puffer</li> <li>• 11g Borsäure wasserfrei</li> <li>• 8ml EDTA 0,5M pH 8,0</li> </ul>
DNA-Standard	auf 800µl:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20µl 1 kb ladder(1 µg/µl) (New England Biolabs, Frankfurt)</li> <li>• 132 µl 6xLadepuffer (s.o.)</li> <li>• 648 µl H<sub>2</sub>O</li> </ul>

---

**Tabelle 3:** Zur Elektrophorese verwendete Lösungen

### 2.2.4. Verdau mit bakteriellen Restriktionsenzymen

Bakterielle Endonukleasen erkennen kurze DNA-Sequenzen und spalten die Doppelstrang-DNA an spezifischen Stellen innerhalb oder in der Nähe dieser Erkennungssequenzen. Prinzipiell kann diese Spaltung symmetrisch oder asymmetrisch erfolgen, wobei dementsprechend „stumpfe“ Enden des Fragments (blunt ends) oder homologe kohäsive Enden (sticky ends) entstehen. Zur Spaltung mittels bakterieller Endonukleasen muss die zu modifizierende DNA nur mit dem oder den entsprechenden Enzymen in einer jeweils geeignet gepufferten Lösung bei einer für die Enzyme optimalen Temperatur inkubiert werden (meist 37°C). Eventuell kann die Zugabe von Bovinem Serumalbumin (BSA) oder anderen Zusätzen notwendig werden.

Im vorliegenden Fall wurden ausschließlich asymmetrisch spaltende Endonukleasen der Firma Boehringer Mannheim mit den passenden Puffern und Zusätzen verwendet (SureCut-Puffer, Boehringer Mannheim). Für die Reaktionsansätze wurden jeweils 5µg bis 8µg DNA, Enzyme in einer Konzentration von 1-2U/µg DNA und die Pufferlösung (x10) mit sterilem H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20µl bis 50 µl gebracht. Die Inkubationszeit betrug mindestens 1h. Im Falle der Spaltung eines DNA-Fragments durch zwei Enzyme, die nicht in einem gemeinsamen Puffermilieu arbeiteten, wurde zunächst der Ansatz für eines der beiden Enzyme hergestellt und inkubiert, das Gesamtvolumen dann verdoppelt und ein weiterer Verdau mit dem zweiten Enzym unter dessen optimalen Pufferbedingungen durchgeführt.

### **2.2.5. Ligation von DNA-Fragmenten (Subklonierung)**

DNA-Ligasen katalysieren in DNA-Fragmenten die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylresten der Stränge. Damit können einzelne Stücke miteinander verknüpft werden. Prinzipiell sind zwei Ligasen, nämlich die T4-Ligase und die *E.coli*-Ligase im allgemeinen Gebrauch üblich, die sich im wesentlichen durch die Energiequelle und die Fähigkeit zur Verknüpfung von „stumpfen“ Enden (blunt ends) unterscheiden (siehe Kapitel 2.2.4). Im vorliegenden Fall wurde die T4-Ligase verwendet, die die ATP-Spaltung zur Energiegewinnung nutzt und auch stumpfe Enden verknüpfen kann.

Bei einer Ligation von isolierten DNA-Fragmenten (insert) in einen Expressionsvektor (backbone) können neben den gewünschten Vektor-Insert-Konstrukten auch unerwünschte Produkte wie Vektor-Vektor- und Insert-Insert-Ligationen entstehen. Neben diesen intermolekularen Ereignissen kann es auch zu unerwünschten intramolekularen Ligationen kommen. Der Erfolg der DNA-Ligation hängt daher in hohem Maße von Menge und Verhältnis der eingesetzten Fragmente ab. Besonders bei der Klonierung mit stumpfen Fragmentenden sollte ein hoher molarer Überschuss des Inserts angestrebt werden. Im vorliegenden Fall wurden bei einem Ligationsvolumen von 10µl etwa 30ng reine Vektor-DNA und je nach Größe des Inserts ein 10 bis 30facher molarer Exzess verwendet.

Zur Berechnung des Ansatzes wurde folgende Formel verwendet:

$$ng\ Insert = \frac{ng\ Vektor \times kb\ Insert \times molarer\ \ddot{U}berschuss}{kb\ Vektor}$$

Zunächst wurden die DNA und 2µl Ligase-Puffer (x5, New England Biolabs, Frankfurt) mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 10µl gebracht. Von diesem Gemisch wurde 1µl zur Negativkontrolle entnommen, zu der noch 4µl H<sub>2</sub>O hinzugefügt wurden. Dafür wurde der ursprüngliche Ansatz durch Hinzugeben von 1µl T4-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt) erneut auf 10µl ergänzt. Beide Ansätze wurden über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Inkubation erfolgte die Transformation in Bakterienzellen (siehe Abschnitt 2.2.6).

### 2.2.6. Transformation von Bakterien mit DNA

Bakterielle Transformation ist ein Vorgang durch den DNA-Plasmide in bakterielle Zellen aufgenommen werden. Wenn die fremde DNA einen Replikationsursprung aufweist, der von den bakteriellen Polymerasen erkannt wird, repliziert das Bakterium die fremde DNA wie seine eigene. Ist auf dem aufgenommenen Plasmid noch ein Resistenzgen für Antibiotika enthalten, so können die Bakterien, die die neue DNA produzieren gezielt selektiert werden. Bakterien, die die Eigenschaft besitzen, fremde DNA aufzunehmen, werden „kompetent“ genannt. Die Herstellung dieser speziellen Zellen erfolgt durch Behandlung der Bakterien mit Calcium-Chlorid in der frühen log-Phase der Wachstumskurve. Durch das kurzzeitige Erhitzen auf 42°C („heat shock“) wird die DNA beim eigentlichen Transformationsvorgang in die Zellen aufgenommen. Danach müssen die Zellen schnell wieder abgekühlt und bei 37°C kultiviert werden. Im vorliegenden Fall wurde eine Menge von 10ng bis 100ng DNA vorsichtig in 100 µl Bakterienlösung gegeben und der Ansatz für 15min bis 30min auf Eis inkubiert. Bei diesem Schritt wurde Wert auf besonders schonendes Pipettieren und Mischen gelegt, da kompetente Bakterien sehr empfindlich sind. Der Ansatz wurde anschließend in einem vorgewärmten Heizblock für 30 bis 50 Sekunden auf 42°C erhitzt, um danach sofort für weitere 5 Minuten im Eisbad abgekühlt zu werden. In einem weiteren Schritt wurden die Bakterien in etwa 100µl SOB-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM Glucose) überführt und für 1 Stunde in einem Falcon-Röhrchen bei 37°C geschüttelt. Danach wurden die Ansätze in verschiedenen Mengen (ca. 10µl und

190µl) auf eine LB-Agar-Platte (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl pH 7,0) ausplattiert, die 50 µg/ml Ampicillin enthielt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.2.7. Plasmid-Präparation aus Bakterien**

Grundsätzlich ist die Extraktion von geringen Mengen an DNA während der eigentlichen Klonierung (Minipreps) von der Herstellung großer Mengen eines bestimmten Plasmids (Maxipreps) zu unterscheiden.

Bei Durchführung der Minipreps werden die Bakterien, deren DNA isoliert werden soll, lysiert und die im Lysat enthaltenen Proteine durch Behandlung mit Proteinase K entfernt. Die danach noch enthaltene Reste von Zellwand, Polysacchariden etc. werden durch selektives Ausfällen abgetrennt, nach einer weiteren Präzipitation mittels Isopropanol erhält man nur noch die gereinigte DNA.

Im vorliegenden Fall wurden von den zu lysierenden Bakterien zunächst in einer 24-Loch-Platte (TPP, Schweiz) Flüssigkulturen in LB-Medium angelegt, die über Nacht bei 37°C bei etwa 125rpm geschüttelt wurden. Zur Extraktion wurde das Promega DNA-Purification-System (Promega, Mannheim) verwendet und das Herstellerprotokoll befolgt.

Bei Durchführung der Maxipreps wurden die Bakterien in Flüssigkulturen (250ml LB-Medium mit einem Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C und 125rpm geschüttelt. Diese Lösung wurde nach Zentrifugation bei 5000rpm für 10 Minuten in 40ml Lysozym-Puffer (10mM EDTA, 50mM Glucose, 25mM Tris/HCl pH 8,0, Lysozym in einer Endkonzentration von 5mg/ml) resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 80ml alkalischer SDS-Lösung (1% SDS, 0,2 N NaOH) folgte eine Inkubation auf Eis für 10 Minuten. Danach wurden 60ml KAc-Puffer (60ml 5M KAc, 11,5ml Eisessig, 28,5ml H<sub>2</sub>O) unter Umrühren zugegeben und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend für 30 Minuten bei 10000rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand abfiltriert. Nach Zugabe von einem 60%igem Volumen von Isopropanol folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Der Ansatz wurde dann erneut bei 10000rpm bei Raumtemperatur für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet getrocknet. Dieses wurde in 8ml 0,1xSSC-Lösung resuspendiert und auf 50 µl-Röhrchen verteilt. Nach Zugabe von genau 8g CsCl und vollständiger Auflösung wurde der neue Ansatz für 30 Min auf Eis inkubiert und dann bei 3800rpm zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand wurde in Beckman Quick Seal-Röhrchen (Beckman, Unterschleißheim) überführt, die vorher

mit 0,2ml Ethidium-Bromid-Lösung gefüllt worden waren. Das Restvolumen der Röhren wurde mit CsCl-Lösung (1g CsCl, 1ml 0,1xSSC) aufgefüllt. Nach Entfernung aller Flüssigkeits- und Kristallreste wurde das Röhren nach dem Herstellerprotokoll hitzeversiegelt und über Nacht bei 55000 Umdrehungen und 14°C zentrifugiert. Die untere Phase wurde durch Aspiration mit einer 2ml Spritze entfernt und das Ethidium-Bromid mit Isopropanol (mit CsCl in 25mM Tris/HCl, 10mM EDTA pH8,0 gesättigt) extrahiert. Ein dreifaches Volumen an TE-Puffer wurde hinzugefügt und der Ansatz mit Ethanol präzipitiert. Danach wurde das Gemisch mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und unter weiteren Zentrifugationsschritten mit 96% Ethanol und 70% Ethanol gereinigt. Das so entstandene Pellet wurde schließlich in TE-Puffer resuspendiert und mittels Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.3) kontrolliert.

### **2.2.8. Klonierung mit Hilfe des VP22-TOPO-Isomerase-Kits**

Zur Klonierung der VP22-haltigen Fusionsproteine wurde der VP22-TOPO-Isomerase-Kit der Firma Invitrogen verwendet (Invitrogen, #K4840-01).

Der Kit wird in linearisierter Form mit einem Thymidinüberhang am 3`-Ende ausgeliefert, an das kovalent eine Topoisomerase gebunden ist. Das Einfügen einer beliebigen DNA in den Vektor kann so durch einfaches Hinzufügen des PCR-Produkts in den Reaktionsansatz erfolgen. Um beim Ablesen eine Verschiebung des Leserasters zu vermeiden, müssen zwei zusätzliche Basen eingefügt werden. Hierfür wurden zwei Cytosin-Reste gewählt, um ein TCC-Codon zu erzeugen, das für Serin codiert. Durch diese Aminosäure sollte die Funktion des Fusionproteins so wenig wie möglich beeinflusst werden. Die Ligation des PCR-Produkts mit dem Thymidinüberhang des Grundvektors erfordert weiterhin die Verwendung der Taq-Polymerase, da diese eine matrizenunabhängige terminale Transferase-Aktivität aufweist, die eine einzelne Deoxyadenosin-Base an das 3`-Ende des PCR-Produkts anhängt. Dadurch wird eine sehr effiziente spontane Ligation innerhalb von 5 Minuten bei Raumtemperatur möglich. Es erfolgte eine Transformation des Plasmids in kompetente E. Coli-Zellen entsprechend Kapitel 2.2.6.

Die Zellen wurden auf Agar-Platten (50 µg/ml Ampicillin) ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus 20 Kolonien wurde DNA isoliert und mittels eines Restriktionsverdau charakterisiert. Aus einer der positiven Kolonien wurden daraufhin Maxipreps angefertigt.

### 2.2.9. Western Blot Analyse

Die zu analysierenden Proben wurden mit dem Lysispuffer (0,5% Triton X-100, 20mM Tris/HCl pH 8,0, 137mM NaCl, 2mM EDTA) auf gleiche Konzentration gebracht, im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer (0,2M Tris/HCl pH 6,8, 6% SDS, 20% Glycerol, 10% DTT, 0,1mg/ml Bromphenolblau) verdünnt und 5 Minuten bei 95°C gekocht. Sie wurden anschließend in einem 12% SDS-Polyacrylamidgel (Trenngelpuffer x4 aus 1,5M Tris/HCl pH 8,8, 0,4% SDS und Sammelgelpuffer x4 aus 0,5M Tris/HCl pH 6,8, 0,4% SDS) bei 200V elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine mit Ethanol getränkte Nitrocellulosemembran (Hybond-P, Amersham, Freiburg) bei ca. 0,8mA bis 1mA pro cm<sup>2</sup> Gel elektrotransferiert. Nach einem 15minütigen Waschschriff mit 0,1% PBST wurde die Membran mit 10% Milchpulver in 0,1% PBST für 30 Minuten geblockt. Es folgte die zweistündige Inkubation mit dem in 10% Milchpulver 0,1% PBST in Verhältnis 1:200 verdünnten Primärantikörper (Living Colors Peptide Antibody, Clontech, Heidelberg). Für 40 Minuten wurde die Membran daraufhin mit 0,1% PBST gewaschen, das dabei mindestens 7 Mal gewechselt wurde. Analog wurde die Membran anschließend für 2 Stunden mit dem in 10% Milchpulver 0,1% PBST verdünnten mit Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper (HRP-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper, Dianova, Hamburg) inkubiert und erneut für 40 Minuten mit 0,1% PBST gewaschen. Die Membran wurde dann für 1 Minute in frisch angesetztem ECL-Western-Blot-Detektionsmedium (Amersham, Freiburg) getränkt, zusammen mit einem Film in eine Photobox gelegt und nach Belichtungszeiten von 1 Minute, 15 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten sowie über Nacht entwickelt.

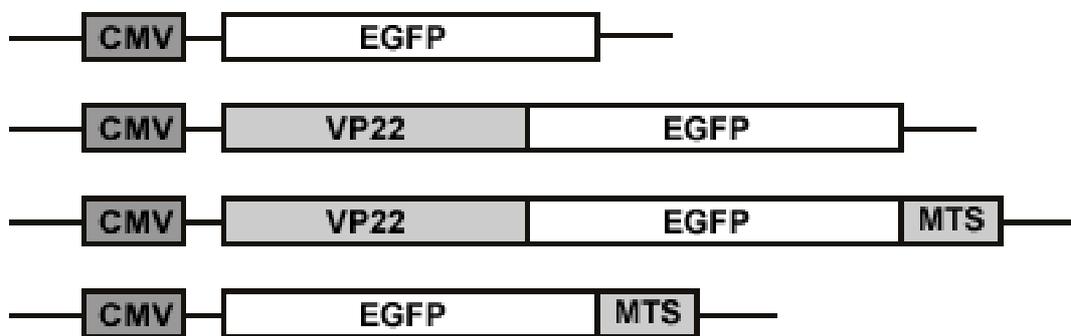
### 2.3. Statistische Analyse

Da in den Gruppen der durchflußzytometrisch gewonnenen Daten keine Normalverteilung der Messwerte vorlag, wurde der Mann-Whitney-Test bzw. für mehr als zwei Gruppen entsprechend die Kruskal-Wallis-Analyse durchgeführt, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu analysieren. Der Mann-Whitney-Test ist ein nichtparametrischer Test, der auf der Grundlage von Fallrängen überprüft, ob zwei unabhängige Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen. Mit dem Kruskal-Wallis-Test wird überprüft, ob mehrere Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen. Das Signifikanzniveau wurde für  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Klonierung der Vektoren

Ziel der Arbeit war es, die Proteintransduktion von VP22 und MTS mit Hilfe des kovalent verknüpften Markerproteins EGFP zu quantifizieren. Hierzu wurden drei Fusionsproteine kloniert, als Positivkontrolle diente EGFP ohne weiteren Peptidanteil. Alle Konstrukte standen unter Kontrolle eines Cytomegalievirus (CMV)-Promoters. Abbildung 3-1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Plasmide.



**Abbildung 3-1: Überblick über die verwendeten Konstrukte**

von oben nach unten: Positivkontrolle EGFP (Vektor pcEGFP), Fusionsprotein aus VP22 und EGFP (Vektor pcVP22-EGFP), Fusionsprotein aus VP22, EGFP und MTS (Vektor pc VP22-GFTS), Fusionsprotein aus EGFP und MTS (Vektor pcGFTS), die Größe der Balken korreliert nicht mit den tatsächlichen Sequenzlängen

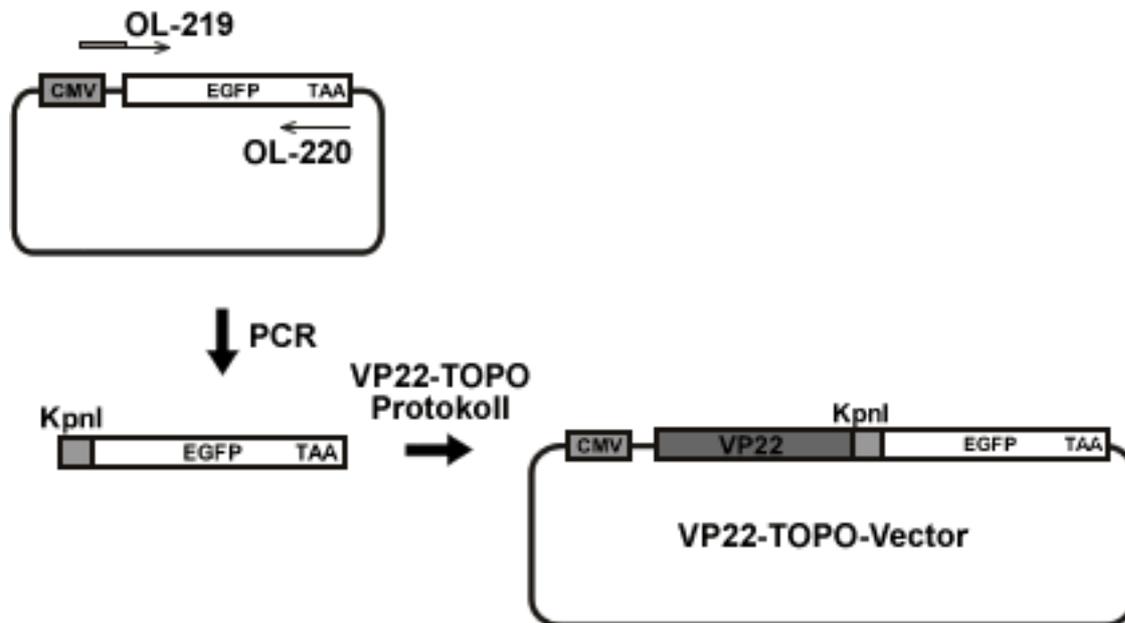
CMV: Cytomegalievirus-Promoter, EGFP: enhanced green fluorescent protein, MTS: membrane translocating Sequence

Im einzelnen wurden Vektoren kloniert, die ein Fusionsprotein aus VP22 und EGFP (Vektor pcVP22-EGFP), ein Fusionsprotein aus VP22, EGFP und der MTS-Sequenz des Kaposi-Sarkoma-Virus (Vektor pcVP22-GFTS) bzw. ein Fusionsprotein aus EGFP und MTS (Vektor pcGFTS) exprimierten. Als backbone diente jeweils ein pCDNA3.1-Vektor.

##### 3.1.1. Klonierung von pcVP22-EGFP

Der Vektor pcVP22-EGFP wurde mit Hilfe des VP22-TOPO-Isomerase-Kits der Firma Invitrogen kloniert. Dazu wurde die DNA-Sequenz des pcEGFP mittels PCR amplifiziert (Primer OL-219, OL220) und nach dem Protokoll des TOPO-Isomerase-Kits in den backbone eingefügt (s. Abbildung 3-2). Bei der PCR-Reaktion wurde zusätzlich eine KpnI-Schnittstelle an das 5`-Ende des amplifizierten Fragments

hinzugefügt. Eine Sequenzanalyse der DNA bestätigte die korrekte Klonierung des Vektors.

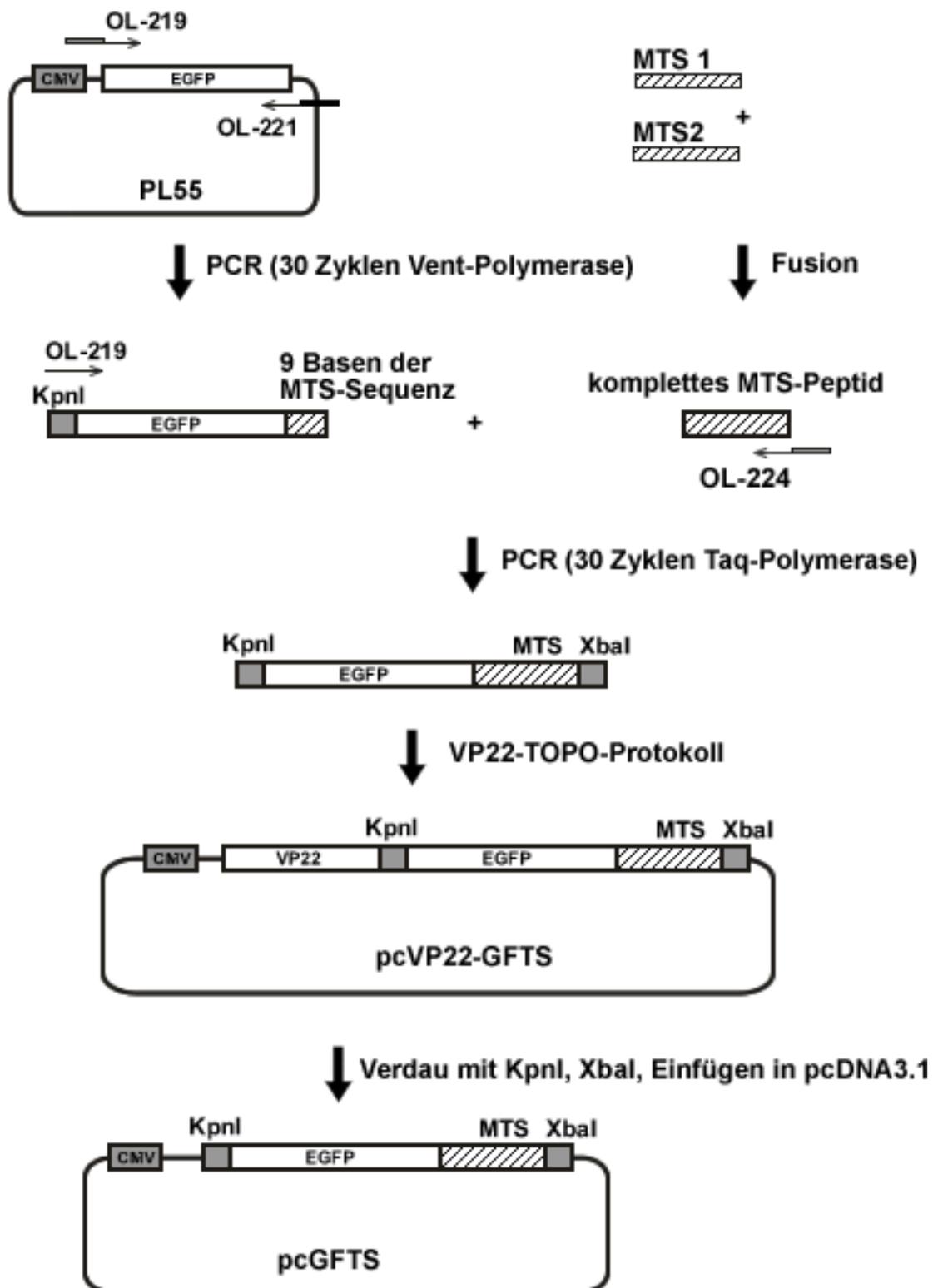


**Abbildung 3-2:** Klonierung von VP22-EGFP

Die Klonierung des Plasmids erfolgte durch Amplifikation der EGFP-Sequenz unter Schaffung einer neuen Schnittstelle für das Restriktionsenzym KpnI und Insertion in den VP22-TOPO-Vektor  
 OL-219, OL-220: PCR-Primer; CMV: CMV-Promoter; TAA: Stoppcodon des EGFP-Fragments; KpnI: Schnittstelle für Restriktionsenzym

### 3.1.2. Klonierung von pcVP22-GFTS

Zur Klonierung des für das Fusionprotein VP22-EGFP-MTS kodierenden Plasmids (pcVP22-GFTS) wurde ebenfalls der VP22-TOPO-Isomerase-Kit verwendet. Zunächst wurden mit Hilfe einer PCR-Reaktion die Sequenzen von EGFP und MTS fusioniert. Die komplementären DNA-Einzelstränge der MTS-Sequenz lagen hierbei zunächst als Oligos vor und wurden vor der Reaktion nach vierminütigem Erhitzen durch langsames Abkühlen auf Raumtemperatur fusioniert. Abbildung 3-3 gibt einen Überblick über die Schritte der Klonierung. Für die erste PCR-Reaktion wurde anstelle der Taq-Polymerase die Vent-Polymerase verwendet, um eine Adenylierung der 3`-Enden des PCR-Produkts zu vermeiden und Fehler in der Amplifikation möglichst zu verhindern. Die Vent-Polymerase besitzt eine 3`-5` Exonuklease-Aktivität, durch die deutlich weniger Fehler bei der PCR-Amplifikation auftreten als bei der Verwendung anderer Polymerasen ohne diese Eigenschaft (Mattila et al., 1991). Eine Sequenzanalyse der DNA bestätigte die korrekte Klonierung des Vektors.



**Abbildung 3-3:** Klonierung von pcVP22-GFTS und pcGFTS

Durch PCR-Fusion wurden die Sequenzen von EGFP und MTS verknüpft und in den VP22-TOPO-Vektor eingefügt. Durch die hierbei eingebrachten Schnittstellen für Restriktionsenzyme war eine erneute Isolation des gewünschten Fragments und eine Subklonierung in einen pcDNA3.1-backbone möglich, um den Vektor pcGFTS zu erhalten.

OL-219, OL-221, MTS-1, MTS-2, OL-224: PCR-Primer; KpnI, XbaI: Schnittstellen der Restriktionsenzyme; CMV: CMV-Promoter

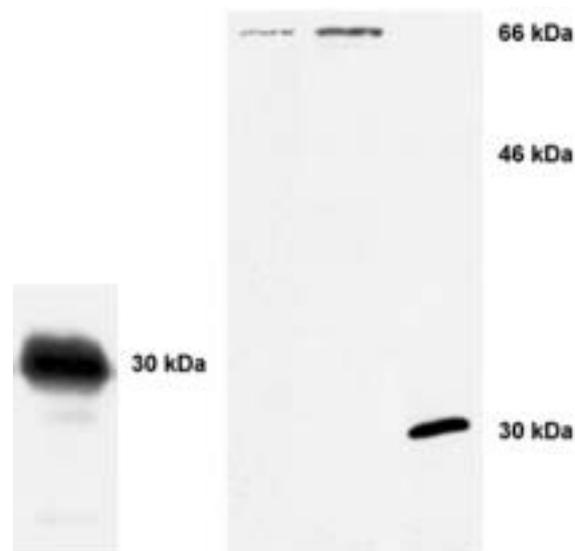
### 3.1.3. Klonierung von pcGFTS

Um das pcGFTS-Konstrukt zu erzeugen, wurde zunächst das für das Fusionsprotein aus EGFP und MTS kodierende Fragment mit Hilfe der Restriktionsenzyme KpnI und XbaI aus dem zuvor beschriebenen Vektor pcVP22-GFTS isoliert und in einen pcDNA3.1 backbone eingefügt (s. Abbildung 3-3). Die korrekte Sequenz wurde durch eine Sequenzanalyse bestätigt.

## 3.2. Nachweis der vollständigen Expression von EGFP, VP22-EGFP, VP22-GFTS und GFTS

### 3.2.1. Western Blot-Analyse der klonierten Konstrukte

Zum Nachweis der Expression der Vektoren wurden COS7-Zellen mittels Lipofektion mit den Konstrukten pcEGFP, pcVP22-EGFP, pcVP22-GFTS und pcGFTS transfiziert. Nach 48 Stunden wurde eine Proteinextraktion und anschließend eine Western-Blot-Analyse mit einem anti-EGFP-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 durchgeführt. Für die Vektoren pcDNA-EGFP und pcGFTS konnte eine Bande im Bereich einer Proteingröße von etwa 30 kDa (rechnerisch erwartet 27 kDa) nachgewiesen werden. In den Extrakten der Konstrukte pcVP22-EGFP und pcVP22-GFTS konnte jeweils ein Protein in der Größe von etwa 70 kDa (rechnerisch erwartet 66 kDa) nachgewiesen werden.



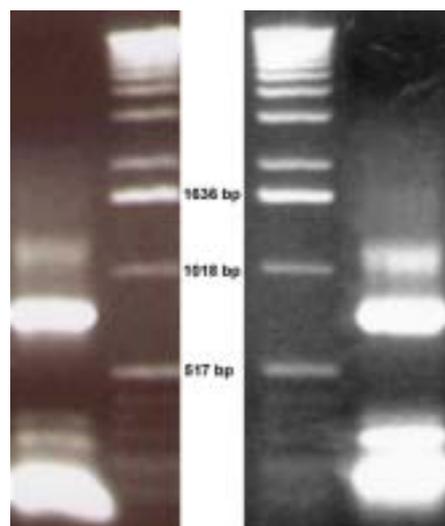
**Abbildung 3-4:** Western Blot der exprimierten Proteine EGFP, VP22-EGFP, VP22-GFTS und GFTS

Proteinextrakte aus mit den Plasmiden pcEGFP, pcVP22-EGFP, pcVP22-GFTS und pcGFTS transfizierten COS-7-Zellen wurden durch Elektrophorese aufgetrennt, auf eine Zellulosemembran transferiert und mit einem Antikörper gegen EGFP markiert

links: EGFP, rechts: 1. Spur VP22-EGFP, 2. Spur VP22-GFTS, 3. Spur GFTS

### 3.2.2. RT-PCR zum Expressionsnachweis der MTS enthaltenden Fusionsproteine

Da das Peptid der MTS-Sequenz das Protein nur um 13 Aminosäuren vergrößert, kann durch einen Western Blot allein der Nachweis für die vollständige Expression des Proteins inklusive des MTS-Anhangs nicht erbracht werden, da die Größendifferenz der Banden nicht eindeutig zu beurteilen wäre. Daher wurde für die Konstrukte, die für ein Protein mit einer zusätzlichen MTS-Sequenz kodierten, zusätzlich eine reverse-Transkriptase-PCR-Reaktion durchgeführt. Die Bindungsstellen für die Primer waren der Beginn des EGFP-Gens und das Ende der MTS-Sequenz. Hierfür wurden wiederum COS-7-Zellen mit den Vektoren pcGFTS und pcVP22-GFTS durch Lipofektion transfiziert. Nach 48 Stunden wurde die RNA aus den Zellen extrahiert. Die RT-PCR-Reaktion der isolierten RNA wurde mit einer PCR-Reaktion der Vektor der DNA verglichen. Es konnte jeweils eine Bande in der erwarteten Größe von etwa 800 Basenpaaren nachgewiesen werden.



**Abbildung 3-5:** RT-PCR der RNA aus mit VP22-GFTS und GFTS transfizierten Zellen

RNA wurde aus mit pcVP22-GFTS und pcGFTS transfizierten Zellen extrahiert, in cDNA transkribiert und durch eine PCR-Reaktion mit Primern, die am MTS-Ende der Sequenz banden, amplifiziert. Es zeigte sich eine vollständige Expression der Proteine unter Einschluss des MTS-Peptids.

von links nach rechts: Reaktionsansatz der extrahierten RNA aus pcVP22-GFTS-transfizierten Zellen, 1kb Standard, 1 kb Standard, Reaktionsansatz der RNA der pcGFTS-transfizierten Zellen

### 3.3. Selektion stabil exprimierender Zelllinien

Um den Vergleich der Konstrukte zu vereinfachen wurde versucht, nach transienter Transfektion Zelllinien mit stabiler Expression der zu testenden Plasmide zu

selektionieren. Der pcDNA3.1-Vektor, der die Grundlage aller klonierten Konstrukte darstellt, enthält ein Neomycin-Resistenzgen zur Selektion dieser Zelllinien mittels G418. Eine Selektion wurden mit den Zelllinien, 293, CMS 5 und MDA 435 SM durchgeführt. Da jede Zelllinie unterschiedlich empfindlich auf G418 reagiert, wurde eine jeweils zur Selektion geeignete Konzentration des Antibiotikums ermittelt (Tabelle 4). Vor Selektion wurde eine transiente Expression durch direkte Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die Selektion wurde bis zum Absterben aller Zellen der Negativkontrolle durchgeführt. Obwohl für jede Zelllinie gegen Neomycin resistente Zellen selektiert werden konnten, verloren die Zellen jeweils 24 bis 48 Stunden nach Hinzufügen des Selektionsmediums ihre Fluoreszenz unter mikroskopischer Kontrolle. Die zu testenden Proteine konnten daher mit Hilfe von Mikroskopie und Durchflusszytometrie nicht mehr untersucht werden. Deshalb waren die auf diese Weise selektierten Zellen für weitere Untersuchungen der klonierten Konstrukte nicht geeignet. Alle folgenden Versuche wurden daher ausschließlich mit transient exprimierenden Zellen unternommen.

Zelllinie	293	CMS5	MDA 435 SM
Konzentration G418	800 µg/ml	1500 µg/ml	1500 µg/ml

**Tabelle 4:** Ermittelte Konzentrationen zur Selektion von stabilen Zelllinien

### **3.4. Nachweis der Proteintransduktion durch direkte Fluoreszenzmikroskopie**

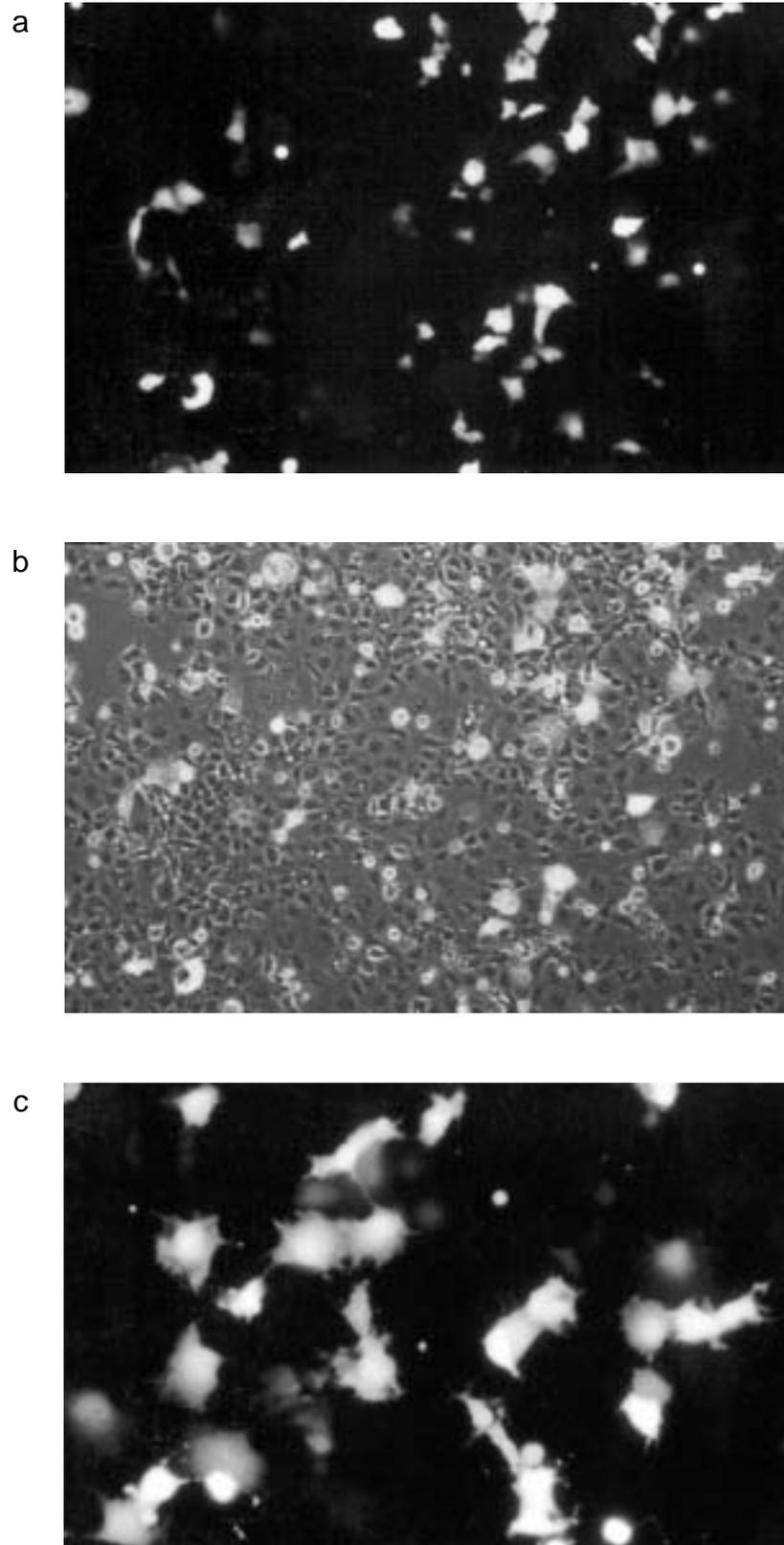
Nachdem eine vollständige Expression der klonierten Proteine bewiesen werden konnte, wurden COS-7-Zellen mit 200ng DNA der Plasmide pcEGFP, pcVP22-EGFP, pcVP22-GFTS und pcGFTS transfiziert, um den qualitativen Nachweis einer Proteintransduktion durch die Fusionsproteine zu erbringen. Nach 48 Stunden wurden die Zellkulturen durch direkte Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

#### **3.4.1. EGFP**

Die mit dem pcEGFP-Vektor transfizierten Zellen zeigten eine gleichmäßige zytoplasmatische und nukleäre Färbung (s. Abbildung 3-6). Die Intensität dieser Fluoreszenz war deutlich höher als bei allen anderen Konstrukten. Viele Zellen wiesen auch ein rund erscheinendes Fluoreszenzmuster auf. Bei Kontrolle mit eingeschaltetem Durchlicht war jedoch klar, dass es sich hierbei nicht um nukleäre Färbungen handelte, sondern dass diese Zellen im Absterben begriffen waren und deshalb eine kugelige Form annahmen. Die stärkste Fluoreszenz wiesen in der Regel bereits abgestorbene Zellen auf.

#### **3.4.2. VP22-EGFP**

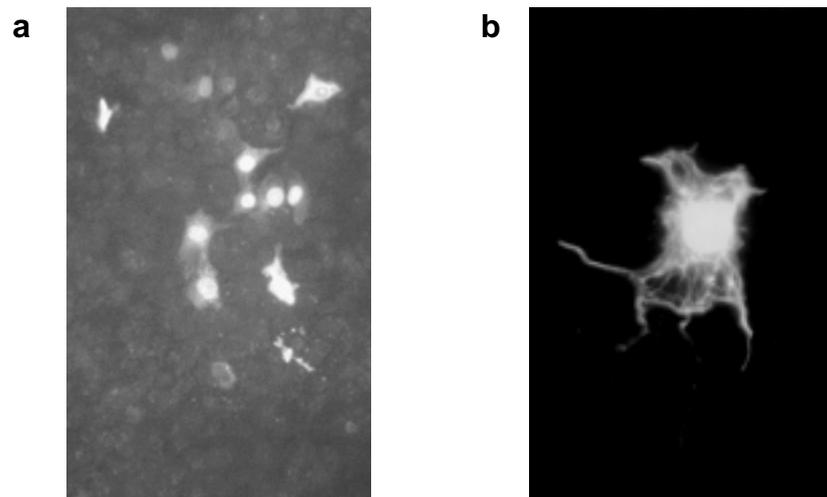
Zellen, die das Fusionprotein VP22-EGFP exprimierten, zeigten ein von EGFP deutlich unterschiedliches Fluoreszenzmuster. Das Zytoplasma dieser Zellen fluoreszierte nicht homogen, sondern in einem granulären Muster, die Kerne waren schwächer gefärbt. Einige wenige große Zellen wiesen eine filamentöse Verteilung des Proteins auf. Zellen in Mitose färbten sich überwiegend nukleär an. Eine Translokation der Fusionsproteine in Nachbarzellen konnte in diesen nativen Zellen nicht nachgewiesen werden. (s. Abbildung 3-7, Abbildung 3-8, Abbildung 3-9).



**Abbildung 3-6** :Direkte Fluoreszenzmikroskopie von EGFP exprimierenden Zellen

Direkte Fluoreszenzmikroskopie von COS-7 Zellen 48h nach Transfektion mit pcEGFP. Es zeigt sich eine gleichmäßige zytoplasmatische Färbung der Zellen

**a**: 20fache Vergrößerung, **b**: Durchlichtaufnahme der vorangehenden Abbildung, **c**: 40fache Vergrößerung



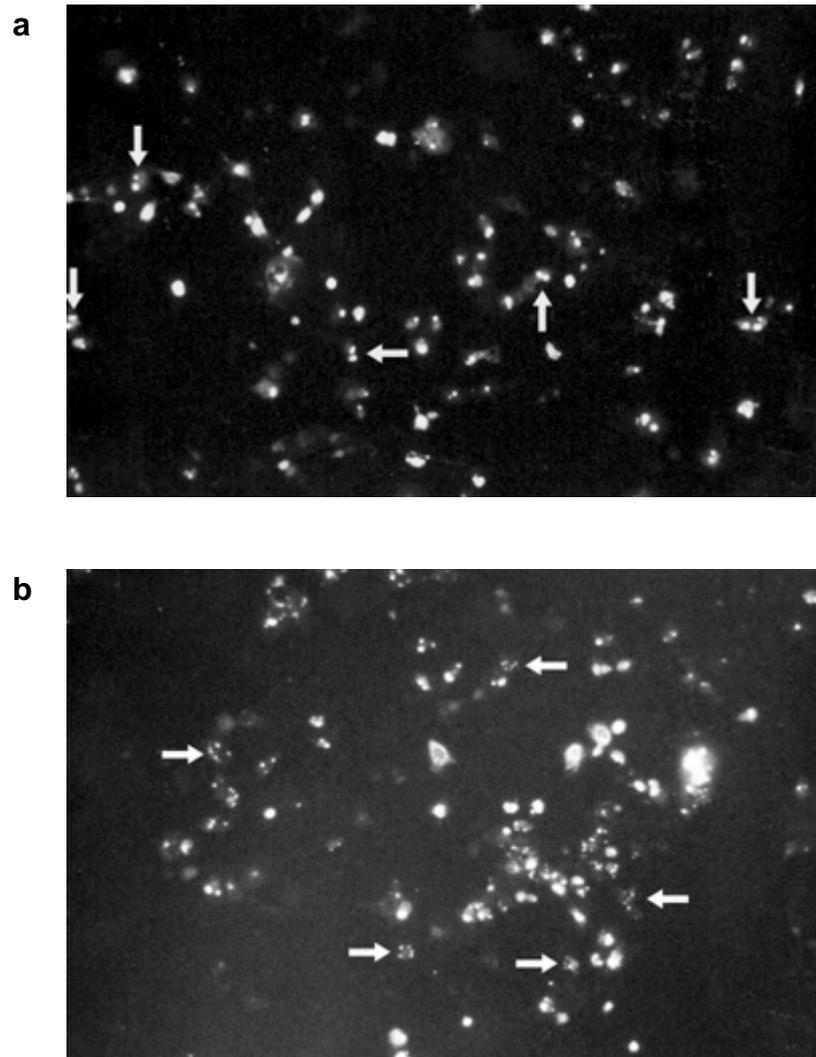
**Abbildung 3-7:** Direkte Fluoreszenzmikroskopie von VP22-EGFP exprimierenden Zellen

Direkte Fluoreszenzmikroskopie von COS-7 Zellen 48h nach Transfektion mit pcVP22-EGFP

**a:** in Mitose befindliche Zellen zeigen eine Anreicherung des Fusionsproteins im Nukleus, **b:** filamentöses Erscheinungsbild einer VP22-EGFP exprimierenden Zelle bei 60facher Vergrößerung

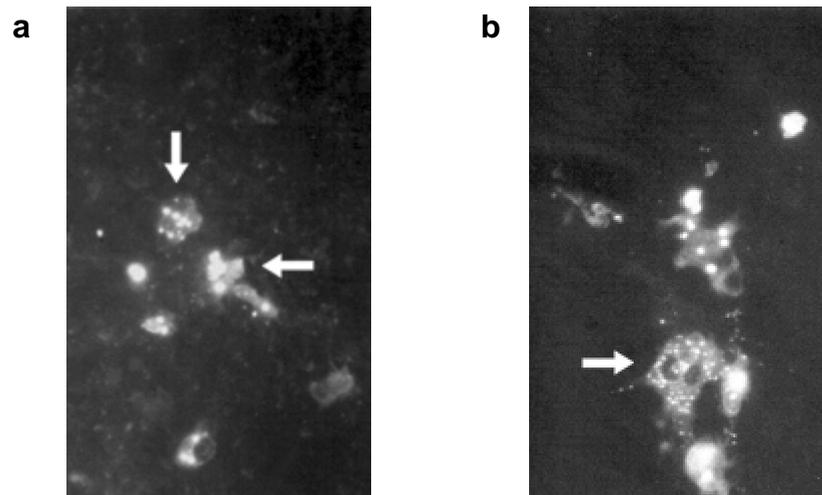
### 3.4.3. VP22-GFTS

Mit pcVP22-GFTS transfizierte Zellen wiesen im Vergleich zu VP22-EGFP exprimierenden Zellen ein diskret unterschiedliches Verteilungsmuster der Proteine auf (s. Abbildung 3-7, Abbildung 3-8, Abbildung 3-9). Die granulären fluoreszierenden Partikel erschienen hier in feinere, kleinere Splitter aufgelöst und das Zytoplasma der Zellen zeigte eine schwächere Fluoreszenz, sodass diese Zellen insgesamt einen besseren Kontrast aufwiesen. Einige wenige Zellen wiesen die gleiche filamentöse Verteilung der Fluoreszenz auf wie die entsprechenden VP22-EGFP exprimierenden Zellen. Die in Mitose befindlichen Zellen fluoreszierten ebenfalls überwiegend nukleär. Auch in den nativen, mit pcVP22-GFTS transfizierten Zellen konnte keine interzelluläre Translokation des Proteins mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.



**Abbildung 3-8:** Direkte Fluoreszenzmikroskopie von VP22-EGFP und VP22-GFTS exprimierenden Zellen im Vergleich unter 20facher Vergrößerung

48h nach Transfektion mit 200ng pcVP22-EGFP bzw. pcVP22-GFTS wurden COS-7 Zellen durch direkte Fluoreszenzmikroskopie untersucht. **a:** VP22-EGFP exprimierende Zellen zeigen eine grobe Granulierung des Zytoplasmas, **b:** VP22-GFTS exprimierende Zellen zeigen eine deutlich feineres Granulationsmuster



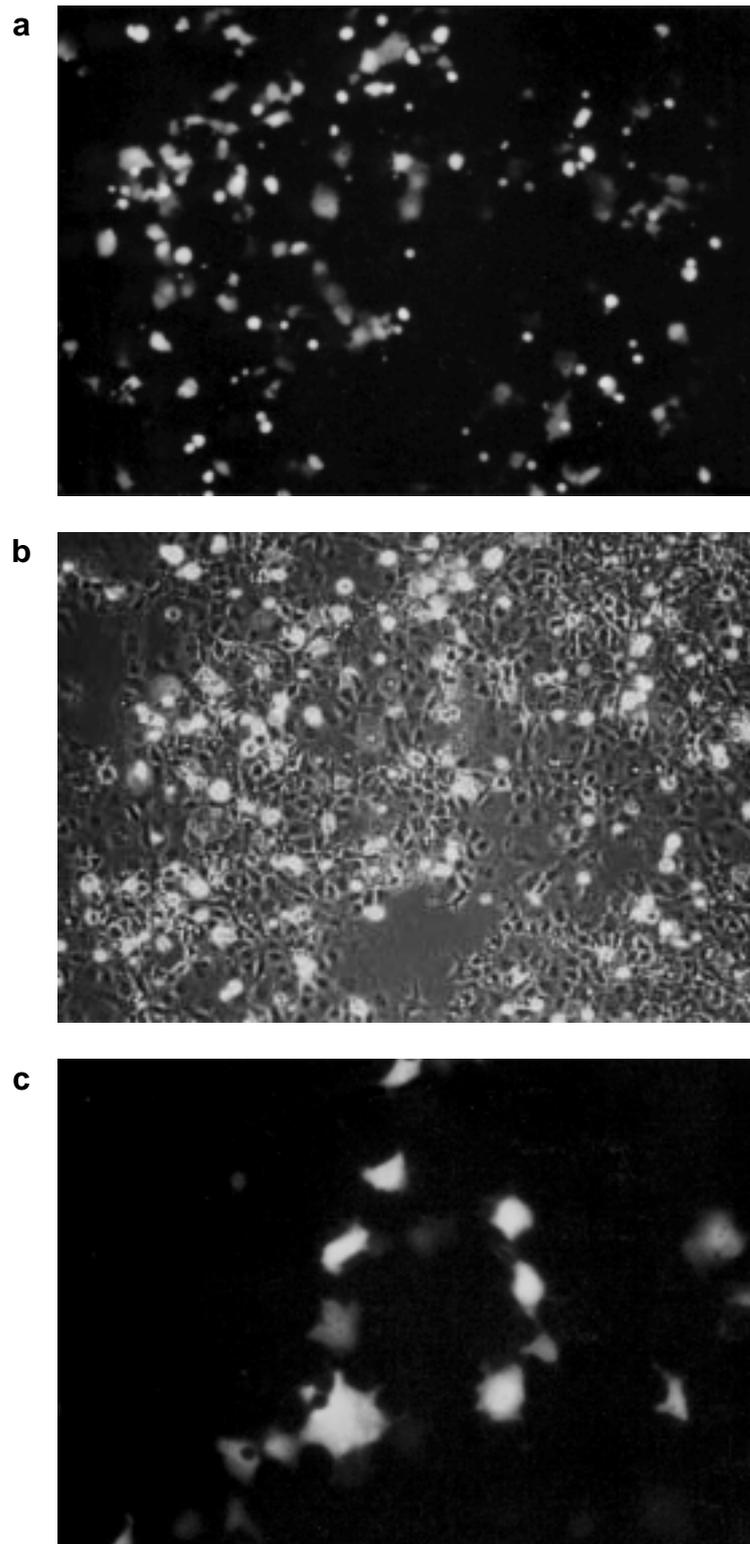
**Abbildung 3-9:** Direkte Fluoreszenzmikroskopie von VP22-EGFP und VP22-GFTS exprimierenden Zellen im Vergleich unter 40facher Vergrößerung

48h nach Transfektion mit 200ng pcVP22-EGFP bzw. pcVP22-GFTS wurden COS-7 Zellen durch direkte Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

**a:** das Zytoplasma der VP22-EGFP exprimierenden Zellen weist ein grobes Granulationsmuster auf, **b:** VP22-GFTS exprimierende Zellen erscheinen feiner granuliert

#### 3.4.4. GFTS

Zellen, die das GFTS-Protein exprimierten, zeigten eine homogene, zytoplasmatische und nukleäre Fluoreszenz (s. Abbildung 3-10). Hinsichtlich des Erscheinungsbildes waren sie kaum von EGFP-exprimierenden Zellen zu unterscheiden. Lediglich die Intensität dieser Fluoreszenz war stets niedriger als die der mit dem pcEGFP-Vektor transfizierten Zellen. Eine Translokation des Proteins in benachbarte Zellen konnte auch für dieses Protein mikroskopisch nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 3-10:** Direkte Fluoreszenzmikroskopie von GFTS exprimierenden Zellen

48h nach Transfektion mit 200ng pcGFTS wurden COS-7 Zellen durch direkte Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

**a:** Unter 20facher Vergrößerung zeigt sich eine gleichmäßige zytoplasmatische Färbung der GFTS exprimierenden Zellen, **b:** Durchlichtaufnahme der vorangegangenen Abbildung, **c:** 40fache Vergrößerung

### **3.5. Mikroskopischer Nachweis der Transduktion nach Fixation der Zellen in 100% Methanol**

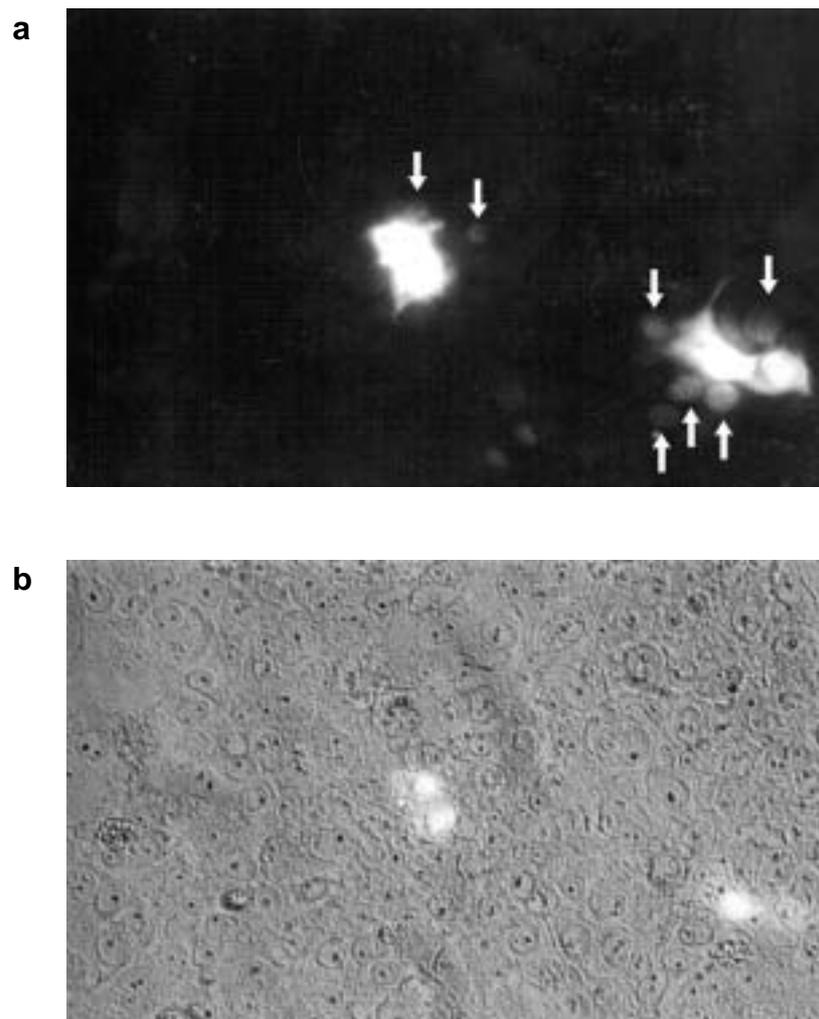
Nachdem durch die direkte Fluoreszenzmikroskopie der transfizierten Zellen kein Nachweis einer Transduktion erbracht werden konnte, wurden weitere mikroskopische Untersuchungen nach Fixation der Zellen in 100% Methanol für 15 Minuten durchgeführt. In der Literatur konnte erst nach dieser Maßnahme eine Transduktion der Fusionsproteine mikroskopisch gezeigt werden (Elliot et al., 1999). Nach dem Fixationsschritt verloren die Zellen, die mit pcEGFP bzw. pcGFTS transfiziert worden waren, ihre Fluoreszenz fast vollständig. Die Zellen, die jedoch Fusionsproteine mit einem Anteil von VP22 exprimierten, behielten ihre Fluoreszenz bei. Zusätzlich war um diese transfizierten Zellen, die das charakteristische zytoplasmatische Verteilungsmuster aufwiesen, einige ausschließlich nukleär gefärbte Zellen nachweisbar (siehe Abbildung 3-11, Abbildung 3-12). Die Intensität dieser nukleären Fluoreszenz war jedoch außerordentlich gering und nur in 40facher Vergrößerung zu erkennen. Dadurch war es zusätzlich notwendig, die Zellen auf Glas-Objektträgern zu kultivieren, da Streueffekte in Plastik Kulturschalen die Mikroskopie in dieser Vergrößerung praktisch unmöglich machten. Auch die Auswahl der Fluoreszenz-Filter beeinflusste das Ergebnis der Mikroskopie erheblich. Optimale Resultate lieferte ein Anregungsfilter mit einer zentralen Wellenlänge von 470nm bei einer Bandbreite von 40nm in Kombination mit einem Sperrfilter mit einer zentralen Wellenlänge von 525nm und einer Bandbreite von 50nm (HQ-Filterset für EGFP, AHF, F44-017).

Diese zwei Fluoreszenzmuster entsprachen den in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Verteilungsmustern von Hersteller- (zytoplasmatische Färbung) und Empfängerzellen (ausschließlich nukleäre Färbung). Außer durch die Intensität der Fluoreszenz waren die nukleäre Färbung der in der Mitose befindlichen Zellen und die der Empfängerzellen allerdings nicht zu unterscheiden. Die mitotischen Zellen wiesen hierbei eine deutlich stärkere Fluoreszenz auf, ein streng paarweises Auftreten der gefärbten Kerne war bei diesen zu beobachten.

Die Effizienz der Proteintranslokation der Fusionsproteine VP22-EGFP und VP22-GFTS war bei mikroskopischer Analyse nicht zu unterscheiden. Die Addition des MTS-Peptids ergab keine Vorteile hinsichtlich der Anzahl der gefärbten Kerne der Empfängerzellen in der Peripherie der durch die zytoplasmatische Färbung deutlich zu unterscheidenden Herstellerzellen. Beide Fusionsproteine wiesen mit einer

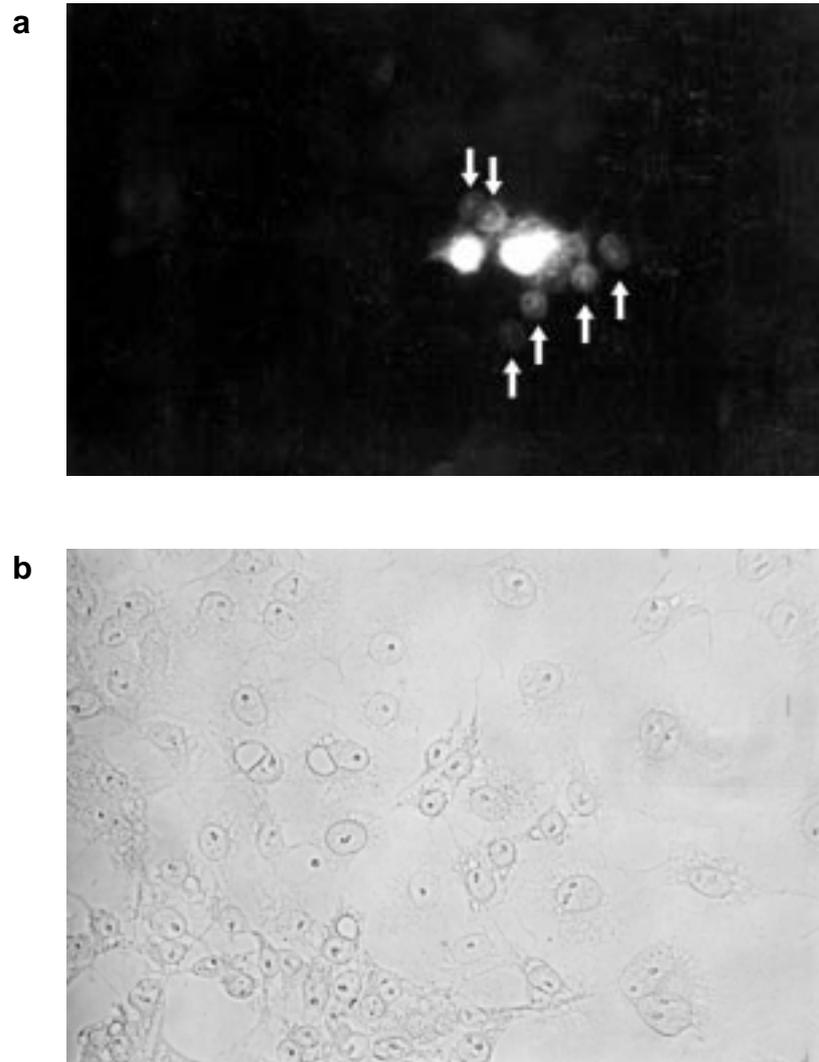
maximalen Anzahl von 5 (VP22-EGFP) bzw. 6 (VP22-GFTS) nukleär angefärbten Nachbarzellen eine ähnliche Effizienz der Verteilung auf. Die in der Literatur beschriebene Verbreitung in praktisch allen Zellen des Monolayers konnte nicht bestätigt werden.

Eine Betrachtung sämtlicher Konstrukte nach Fixation in 100%iger Ethanol-Lösung anstelle der in der Literatur beschriebenen Methanol-Lösung brachte vergleichbare Ergebnisse.



**Abbildung 3-11:** Direkte Fluoreszenzmikroskopie von VP22-EGFP exprimierenden Zellen nach Fixation mit 100%Methanol

COS-7 Zellen wurden mit 200ng pcVP22-EGFP transfiziert und nach 48h in 100% Methanol fixiert. **a:** Unter 40facher Vergrößerung zeigen die das Protein exprimierenden Zellen eine zytomplasmatische Fluoreszenz. Einige an die Herstellerzelle angrenzende Zellen weisen eine deutliche Fluoreszenz der Nuklei auf (mit Pfeil markiert). **b:** Durchlichtaufnahme der vorangehenden Abbildung



**Abbildung 3-12:** Direkte Fluoreszenzmikroskopie von VP22-GFTS exprimierenden Zellen nach Fixation mit 100% Methanol

COS-7 Zellen wurden mit 200ng pcVP22-GFTS transfiziert und nach 48h in 100% Methanol fixiert. **a:** Die Zellen verhalten analog zu VP22-EGFP exprimierenden Zellen. Die das Protein exprimierenden Zellen sind zytoplasmatisch gefärbt, in der Nachbarschaft dieser Zellen ist das Protein in den Nuklei nachweisbar (40fache Vergrößerung) **b:** Durchlichtaufnahme der vorangehenden Abbildung

### 3.6. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Hybridproteine nach Antikörpermarkierung

Mit dem Ziel die Sensitivität der mikroskopischen Analyse zu erhöhen, wurde zusätzlich zur nativen Fluoreszenz auch eine Markierung der exprimierten Proteine mittels fluoreszierenden Antikörpern vor der Untersuchung unter dem Mikroskop durchgeführt. Die Verwendung des in der Literatur von *Aints et al.* beschriebenen polyklonalen anti-GFP-Antikörper der Firma Clontech war jedoch nicht möglich, da dieser durch die Firma nicht mehr vertrieben wird (*Aints et al.*, 1999). Der stattdessen

erhältliche Antikörper (Living Colors Peptid anti-GFP-Antikörper) ermöglichte in den durchgeführten Untersuchungen keine ausreichende Markierung der Proteine. Die in der mikroskopischen Untersuchung im Monolayer zu beobachtende Fluoreszenz lag stets unter der nativen Fluoreszenz der Fusionsproteine. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der durch Antikörper markierten Proteine war nicht geeignet, die Sensitivität des Nachweissystems zu erhöhen.

### **3.7. Quantifikation der Proteintransduktion mit Hilfe der Durchflusszytometrie**

Nach dem qualitativen Nachweis einer Proteintransduktion unter dem Fluoreszenzmikroskop sollte die Effizienz des beobachteten Transports durch durchflusszytometrische Messungen quantifiziert werden. Um statistische Aussagen treffen zu können, wurden in einem Reihenversuch 10 Gruppen von COS-7-Zellen mit der definierten Menge von 2 µg DNA Plasmid pro 60mm-Schale transfiziert. Die Viabilität der Zellen wurde mittels Propidium-Iodid-Essays kontrolliert. Ziel war es, einerseits eine ausreichende Anzahl von Zellen zu transfizieren, die das Protein herstellten, doch andererseits auch genügend Zellen in der Nachbarschaft dieser Zellen untransfiziert zu erhalten, um den Nachweis einer Proteintranslokation aufgrund der Verteilungseigenschaften der Proteine anstelle der direkten Transfektion darstellen zu können. In einem Monolayer sollte die Anzahl der fluoreszierenden Zellen nach Transfektion mit den Fusionsproteinen höher sein als in den mit dem Fluoreszenzprotein alleine transfizierten Zellen.

Jede Gruppe enthielt neben den Konstrukten pcVP22-EGFP, pcVP22-GFTS und pcGFTS als Positivkontrolle das in einen pcDNA3.1-Vektor klonierte unveränderte EGFP-Protein (pcEGFP), sowie als Negativkontrolle einen unveränderten pcDNA3.1-Vektor. Die Größe der Plasmide pcVP22-EGFP und pcVP22-GFTS ist vergleichbar, da sie sich nur um die hinzugefügte Peptidsequenz des MTS-Rests unterscheiden, die Transfektionseffizienz sollte für diese Proteine daher identisch sein.

In jeder Gruppe wurden einerseits die absolute Anzahl an fluoreszierenden Zellen als auch die in Relation zur jeweiligen Positivkontrolle fluoreszierenden Zellen (=relativ positive Zellen) ermittelt.

Sowohl hinsichtlich Anzahl und Intensität der fluoreszierenden Zellen unterschieden sich die untersuchten Proteine erheblich.

### 3.7.1. Anzahl der fluoreszierenden Zellen nach Expression der klonierten Proteine

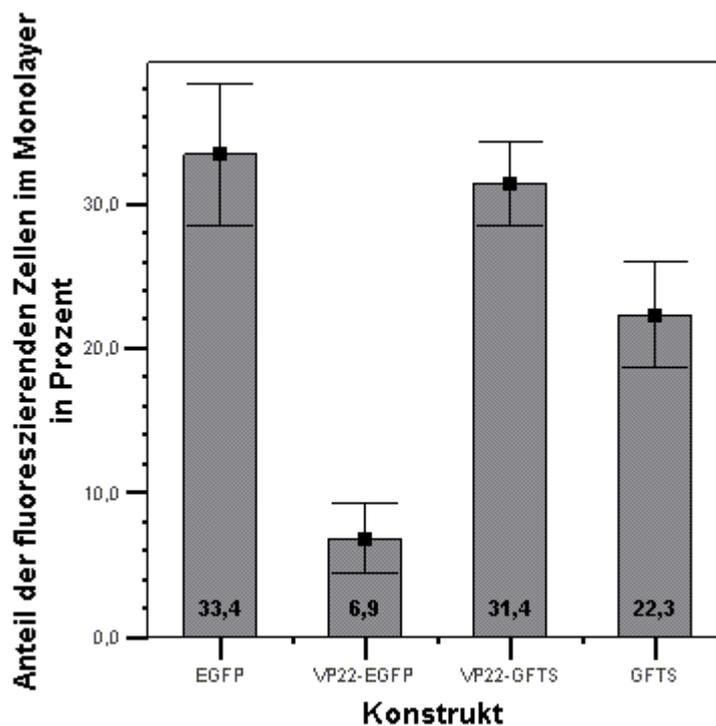
Die mittels der Positivkontrolle pcEGFP ermittelte mittlere Transfektionseffizienz lag bei 33,4%. Überraschenderweise wurden in den Zellpopulationen, die mit den VP22-Hybridproteinen transfiziert worden waren, deutlich weniger fluoreszierende Zellen gezählt als in den Zellen der Positivkontrolle (s. Abbildung 3-13, Tabelle 5). Der Anteil der fluoreszierenden Zellen war mit durchschnittlich 6,9% bei den VP22-EGFP exprimierenden Zellen signifikant niedriger als bei allen anderen Konstrukten. Eine Verteilung der Proteine in die Nachbarzellen hätte eine insgesamt höhere Anzahl an positiven Zellen als in der Positivkontrolle erwarten lassen. Die Ergebnisse der mikroskopischen Versuche, also eine ebensolche Verteilung, konnten mittels der FACS-Analysen nicht nachvollzogen werden. Eine durchflußzytometrische Untersuchung nach Fixation der Zellen analog zur mikroskopischen Analyse ist nicht sinnvoll, da die Zellmembranen durch den Fixationsschritt zerstört werden.

Die Zellen, die jedoch das VP22-GFTS-Protein, also die VP22-Variante mit dem zusätzlichen MTS-Peptid herstellten, waren mit durchschnittlich 31,4% um ein Vielfaches häufiger fluoreszenzpositiv als die mit pcVP22-EGFP transfizierten Zellen. Die Gruppe mit dem pcGFTS-Plasmid lag mit einem durchschnittlich positiven Anteil von 22,3% zwischen den beiden anderen Konstrukten. Sowohl hinsichtlich des absoluten als auch des zu pcEGFP relativen Anteils waren die Unterschiede in der Zahl der fluoreszierenden Zellen für die einzelnen Proteine statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

### 3.7.2. Durchflußzytometrisch bestimmte Fluoreszenzintensität der Zellen nach Expression der Fusionsproteine

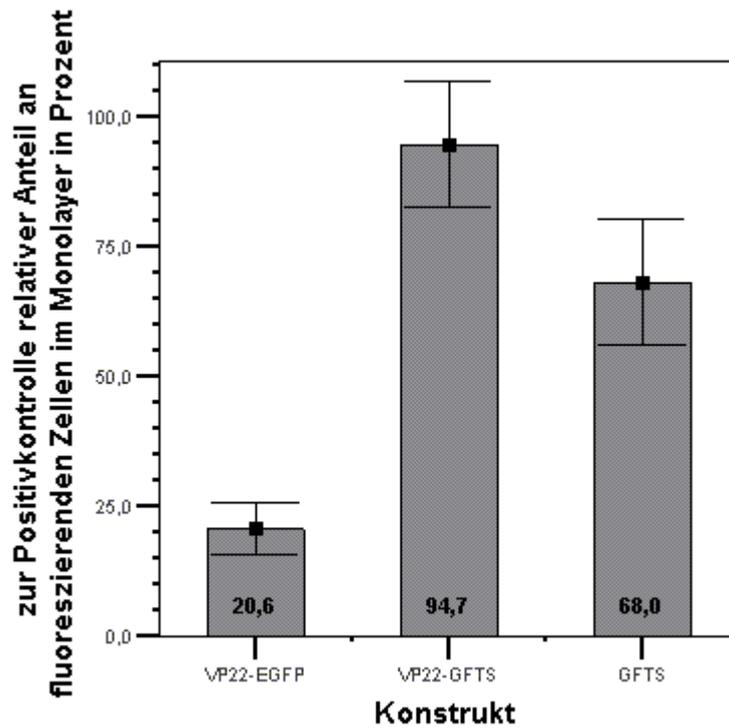
Neben der Gesamtanzahl an fluoreszierenden Zellen war zusätzlich die unterschiedliche Verteilung hinsichtlich der Intensität der Fluoreszenz der Zellen als Hinweis auf die Menge an akkumuliertem Protein von Interesse. Jedes der Konstrukte wies bei der durchflußzytometrischen Messung eine charakteristische Verteilung der fluoreszenzpositiven Zellen auf, die in den Gruppen regelmäßig reproduzierbar war. Zur genaueren Charakterisierung wurde die Intensität der Fluoreszenz in drei Bereiche, nämlich einen niedrig-, einen mittel- und einen hochfluoreszenten Bereich eingeteilt (s. Kapitel 2.1.4). Die deutlich höchsten Intensitäten wurden mit den pcEGFP-Vektoren erreicht. Ein großer Teil der Zellen

wurde dabei am Rand des dargestellten Bereichs dargestellt. Das FACS-Gerät wurde allerdings bewusst dementsprechend eingestellt, da die Fluoreszenz der Zellen, die die VP22-Hybridproteine durch Translokation aufnehmen sollten, nach den Erfahrungen bei der mikroskopischen Untersuchung deutlich weniger intensiv zu erwarten wäre.



**Abbildung 3-13:** Anteil der fluoreszenzpositiven Zellen im Monolayer an der Gesamtzahl nach Transfektion mit den vier Plasmiden pcEGFP, pcVP22-EGFP, pcVP22-GFTS und pcGFTS (Mittelwerte der durchflusszytometrischen Analyse)

Zellen, die das VP22-EGFP-Protein kodierten, fluoreszierten in einer signifikant niedrigeren Anzahl als die anderen Konstrukte. Die Fehlerbalken zeigen 95% Konfidenzintervalle des Mittelwerts



**Abbildung 3-14:** Anteil der fluoreszierenden Zellen im Monolayer relativ zur Positivkontrolle nach Expression der Fusionsproteine (Mittelwerte der durchflusszytometrischen Analyse)

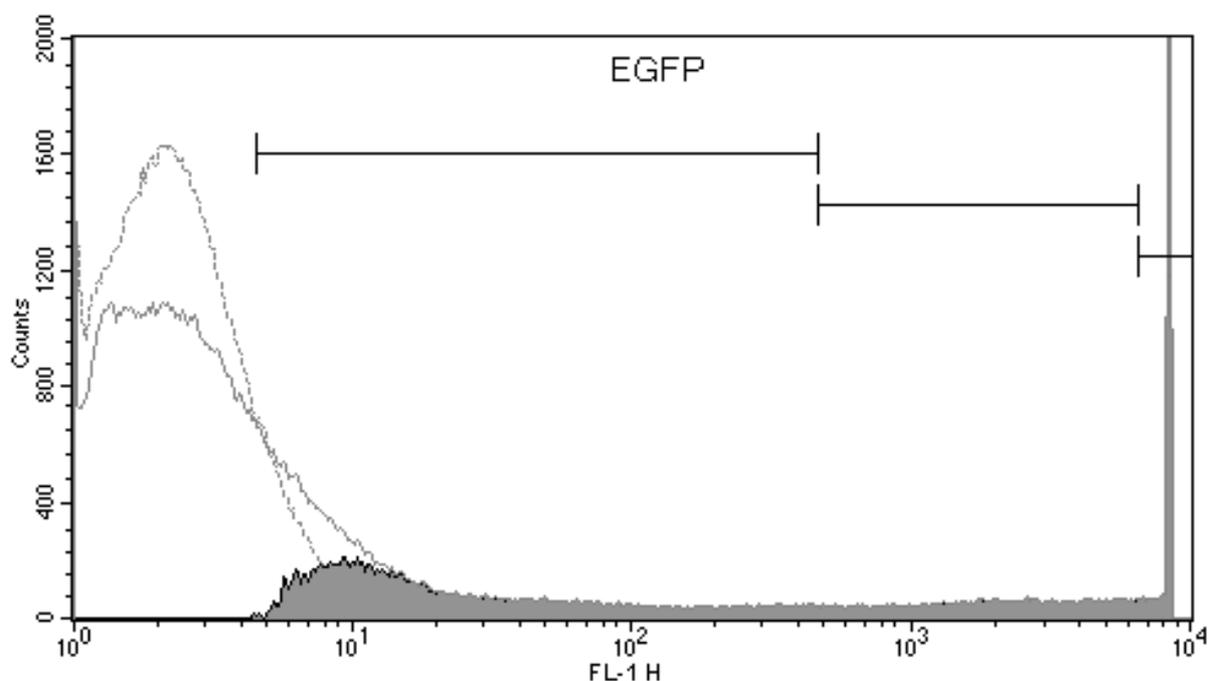
Alle neu klonierten Proteine sind in weniger Zellen nachweisbar als die Positivkontrolle. Die Fehlerbalken zeigen 95% Konfidenzintervalle des Mittelwerts

Protein	fluoreszenz-positive Zellen	zu EGFP relativ positive Zellen
EGFP	33,4	
VP22-EGFP	6,9	20,6
VP22-GFTS	31,4	94,7
GFTS	22,3	68,0

**Tabelle 5:** Anteil der fluoreszierenden Zellen jeweils 48h nach Transfektion mit 2µg DNA absolut bzw. relativ zur Positivkontrolle (Mittelwerte der durchflusszytometrischen Analyse)

### 3.7.2.1. Zellen, die EGFP exprimieren weisen im Vergleich die höchste Fluoreszenzintensität auf

Die Intensität der Fluoreszenz der Positivkontrolle (pcEGFP) war höher als die der VP22-haltigen Konstrukte und ebenfalls höher als in den GFTS exprimierenden Zellen. Ein deutlicher Ausschlag jenseits einer FL1-Fluoreszenz von 7000 war hier nachweisbar. Ein großer Teil der positiven Zellen (im Mittel 19,5%) lag damit am Rand des dargestellten Spektrums. Auf den niedrigfluoreszenten bzw. mittleren Bereich entfielen 62,9% bzw. 17,7%. Abweichungen in der Summe ergaben sich durch Rundungsfehler. (s. Abbildung 3-15, Tabelle 6)



**Abbildung 3-15:** Fluoreszenzspektrum EGFP exprimierender Zellen in der Durchflusszytometrie

Durchflußzytometrische Analyse von COS-7 Zellen 48h nach Transfektion mit pcEGFP. Ein großer Anteil der Zellen ist am stark fluoreszierenden, rechten Rand des dargestellten Spektrums abgebildet. Die Balken markieren den definierten niedrigen, mittleren und hohen Fluoreszenzbereich. Angedeutet sind die Messungen der Negativkontrolle und der transfizierten Zellen, aus denen sich die grau unterlegte Kurve der fluoreszenzpositiven Zellen ermittelte.

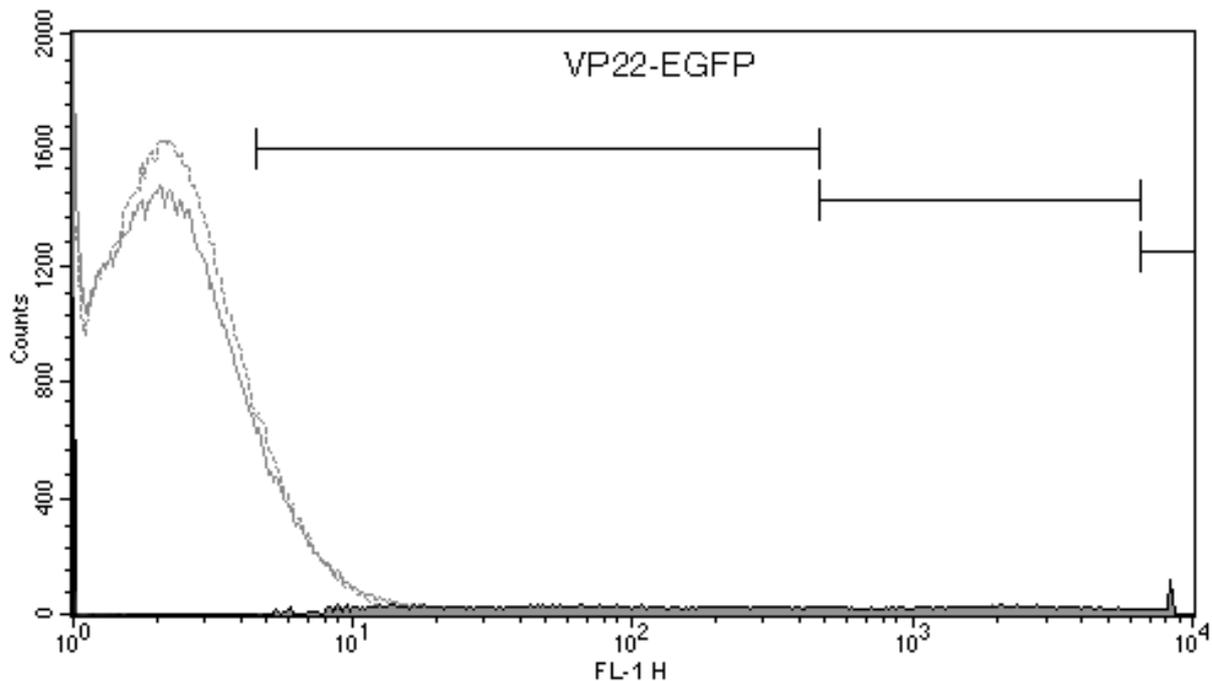
	Mittelwert
niedrig fluoreszierender Anteil	62,9
mittel fluoreszierender Anteil	17,6
hoch fluoreszierender Anteil	19,5

**Tabelle 6:** Verteilung der Fluoreszenzintensität der EGFP exprimierenden Zellen 48h nach Transfektion mit 2µg DNA des Plasmids pcEGFP (Angaben in Prozent)

Ein großer Anteil der Zellen findet sich im intensiv fluoreszierenden Bereich.

### 3.7.2.2. VP22-EGFP fluoresziert nur schwach in wenigen Zellen – ein interzellulärer Transport lässt sich nicht nachweisen

Das charakteristische Verteilungsmuster der VP22-EGFP exprimierenden Zellen wies kaum Zellen im hochfluoreszenten Bereich auf (durchschnittlich 2,1%). Dafür waren im niedrigen Bereich 67,9% im mittleren Bereich 30% der positiven Zellen zu finden. (s. Abbildung 3-16, Tabelle 7).



**Abbildung 3-16:** Typische Verteilung der mit pcVP22-EGFP transfizierten Zellen in der Durchflußzytometrie

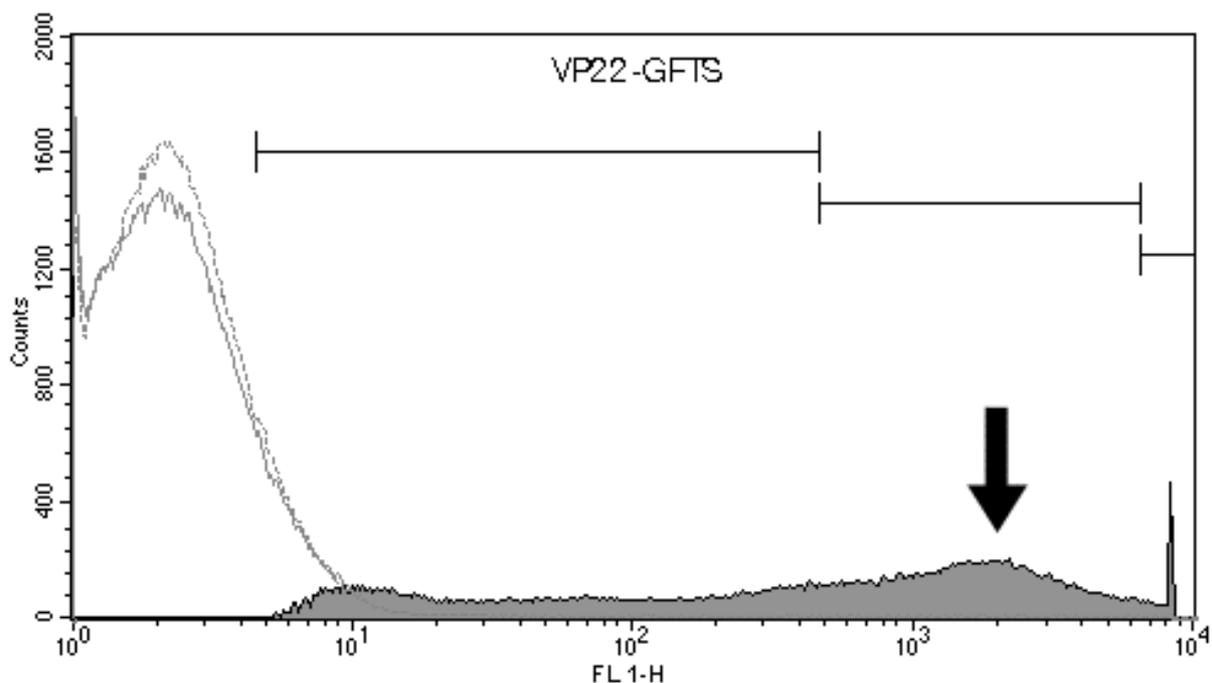
Durchflußzytometrische Analyse von COS-7 Zellen 48h nach Transfektion mit pcVP22-EGFP. Deutlich weniger Zellen als bei den anderen Konstrukten sind fluoreszenzpositiv. Die Balken markieren den niedrigen, mittleren und hohen Fluoreszenzbereich. Angedeutet sind die Messungen der Negativkontrolle und der transfizierten Zellen, aus denen sich die grau unterlegte Kurve der fluoreszenzpositiven Zellen ermittelte.

	Mittelwert
relativer niedriger Anteil	67,9
relativer mittlerer Anteil	30,0
relativer hoher Anteil	2,1

**Tabelle 7:** Verteilung der Fluoreszenzintensität der VP22-EGFP exprimierenden Zellen 48h nach Transfektion mit 2µg DNA des Plasmids pcVP22-EGFP (Angaben in Prozent)

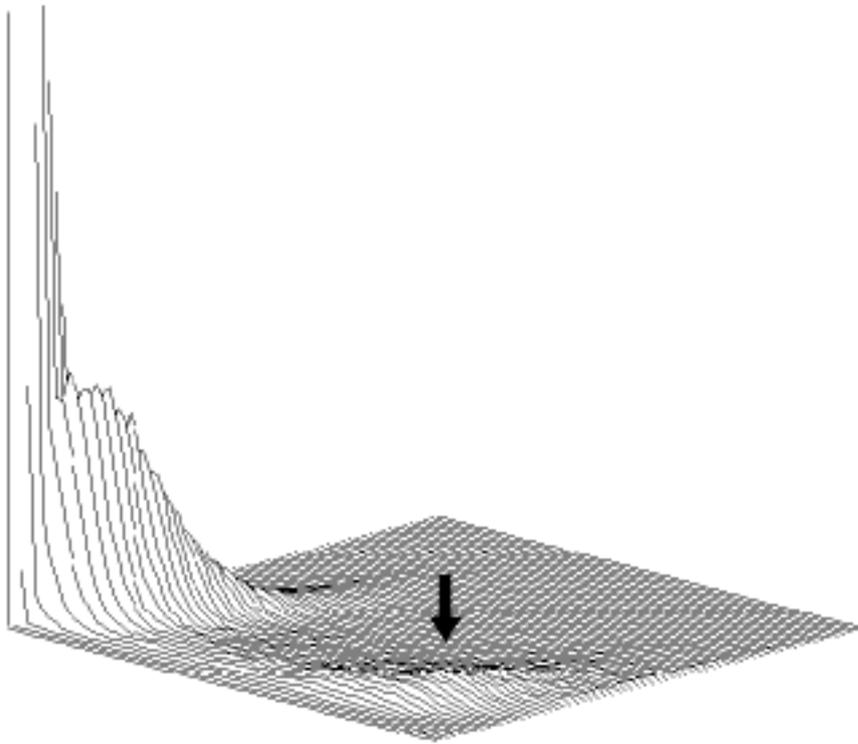
### 3.7.2.3. VP22-GFTS exprimierende Zellen zeigen eine neue Zellpopulation höherer Fluoreszenzintensität

Die mit VP22-GFTS transfizierten Zellen wiesen wie die Gruppe der VP22-EGFP produzierenden Zellen nur einen geringeren Anteil an positiven Zellen im hochfluoreszenten Bereich auf (2,1%). Auffällig war hier jedoch eine neu aufgetretene Population von Zellen mit annähernd gaußförmiger Verteilung im Bereich der mittleren Fluoreszenz (Anteil 46,5%). Diese neue Population rekrutierte sich im Vergleich zur VP22-EGFP-Gruppe aus den Zellen des niederen Bereichs (hier nur ein relativer Anteil von 51,5%). Es ergab sich also durch das Hinzufügen der MTS-Fragmentes nicht nur eine Zunahme der Gesamtanzahl an positiven Zellen, sondern auch eine Verlagerung von Zellen von einem weniger intensiven in einen intensiveren Fluoreszenzbereich (s. Abbildung 3.17, Tabelle 8).



**Abbildung 3-17:** Typische Verteilung der mit pcVP22-GFTS transfizierten Zellen in der Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrische Analyse von COS-7 Zellen 48h nach Transfektion mit pcVP22-GFTS. Es zeigt sich eine neu auftretende Zellpopulation im mittleren Fluoreszenzbereich (Pfeil). Die Balken markieren den niedrigen, mittleren und hohen Fluoreszenzbereich. Angedeutet sind die Messungen der Negativkontrolle und der transfizierten Zellen, aus denen sich die grau unterlegte Kurve der fluoreszenzpositiven Zellen ermittelte.



**Abbildung 3-18:** Die neuauftretende Zellpopulation der VP22-GFTS-Konstrukte im 3D-Plot  
 Durchflußzytometrische Analyse von COS-7 Zellen 48h nach Transfektion mit pcVP22-GFTS. X-  
 Achse: Fluoreszenz (FL1-H), Y-Achse: Anzahl counts, Z-Achse: side scatter (SSC)

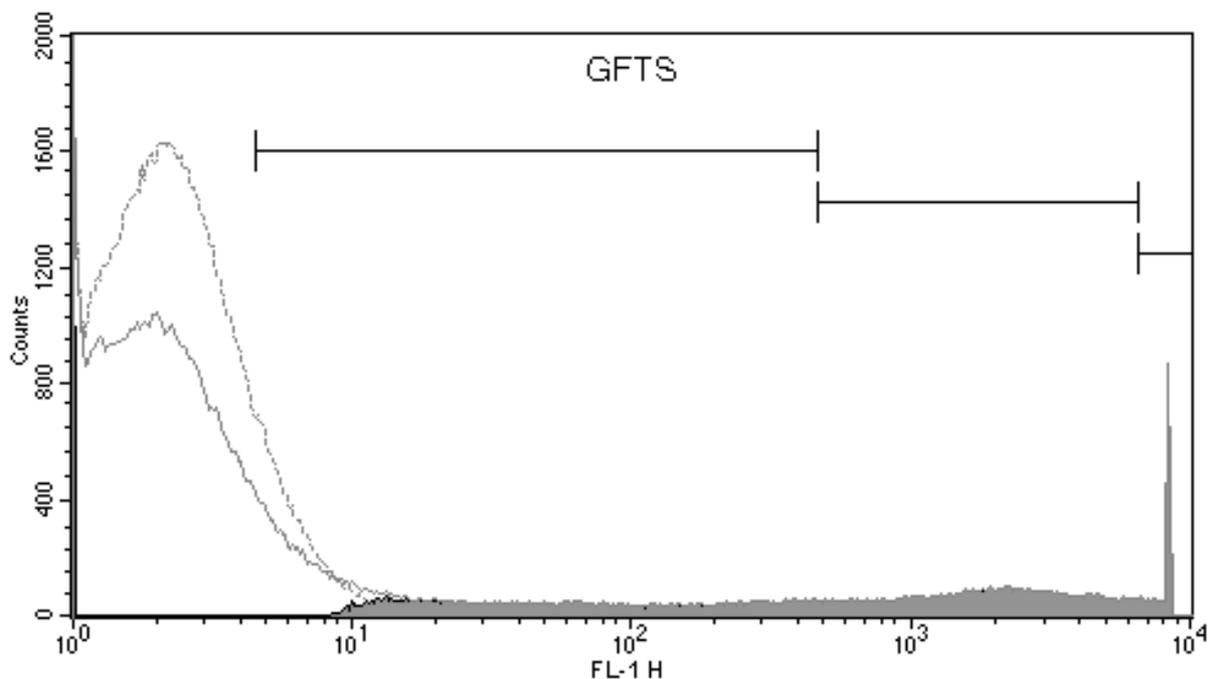
	Mittelwert
relativer niedriger Anteil	51,5
relativer mittlerer Anteil	46,5
relativer hoher Anteil	2,6

**Tabelle 8:** Verteilung der Fluoreszenzintensität der VP22-GFTS exprimierenden Zellen 48h nach  
 Transfektion mit 2µg DNA des Plasmids pcVP22-GFTS (Angaben in Prozent)

### 3.7.2.4. GFTS exprimierende Zellen fluoreszieren in hoher Intensität, zeigen jedoch keinen interzellulären Transport

Wie bereits bei der Anzahl der fluoreszierenden Zellen, nahm die Gruppe der GFTS exprimierenden Zellen auch bei der Verteilung der Fluoreszenzintensität eine Mittelstellung ein. Der Anteil der fluoreszierenden Zellen lag im hochfluoreszierenden Bereich mit 7,3% zwischen dem der Positivkontrolle und dem der VP22-Proteine. Der niedrigfluoreszente Anteil lag bei 59,1% (s. Abbildung 3-19, Tabelle 9).

Ähnlich wie beim VP22-GFTS-Hybrid wiesen die Zellen des GFTS-Konstrukts allerdings eine entsprechende Anhäufung von positiven Zellen im mittleren Fluoreszenzbereich auf. Da die Intensität der Fluoreszenz bei der mikroskopischen Untersuchung der GFTS-Proteine deutlich schwächer war als bei den unveränderten EGFP-Proteinen, ist anzunehmen, dass die Zellen durch Einführung des MTS-Peptides vom stärker fluoreszenten in den weniger fluoreszenten Bereich abwanderten.



**Abbildung 3-19:** Typische Verteilung der fluoreszenzpositiven mit GFTS exprimierenden Zellen in der Durchflußzytometrie

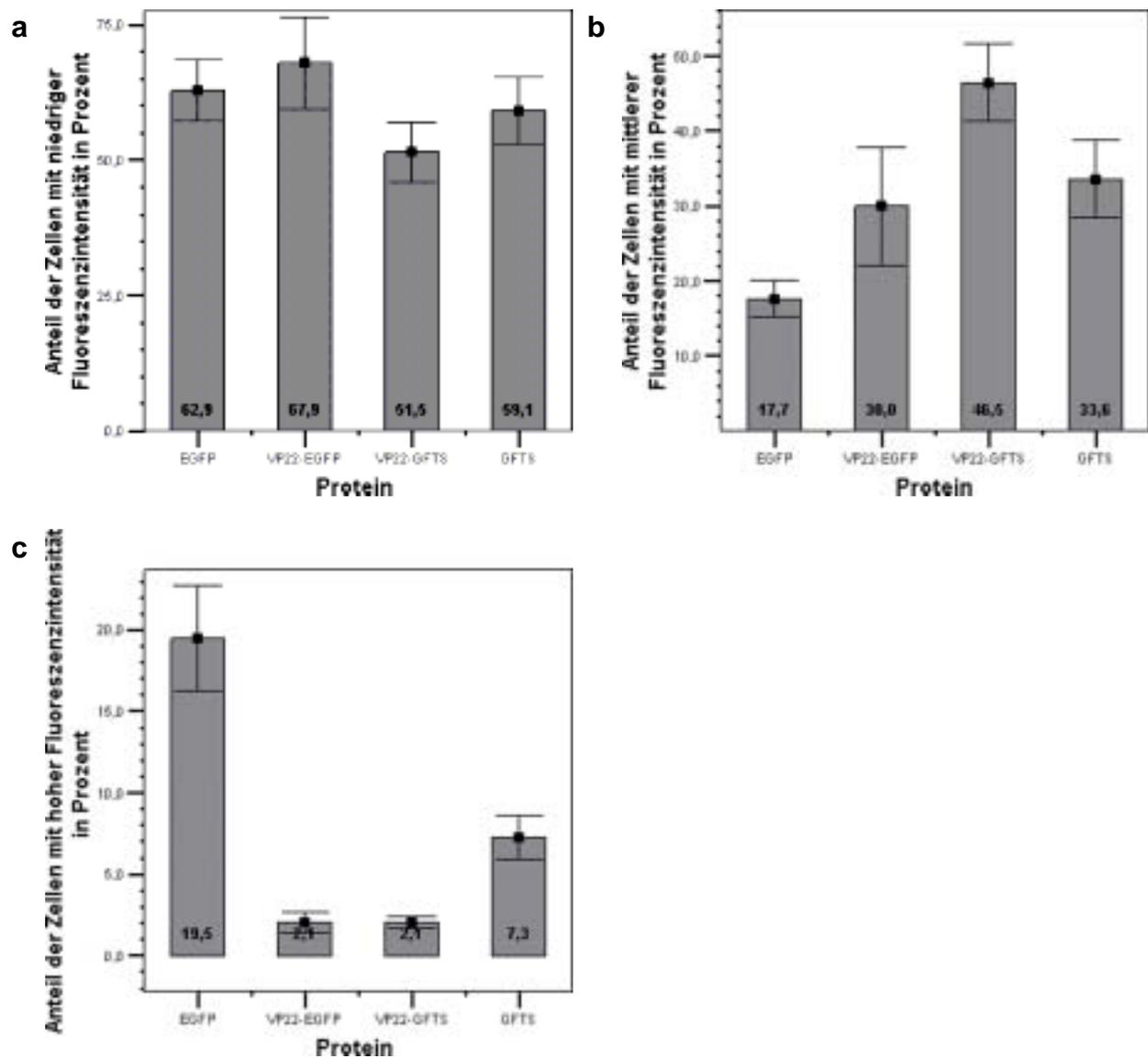
Durchflußzytometrische Analyse von COS-7 Zellen 48h nach Transfektion mit pcGFTS. Die bei VP22-GFTS exprimierenden Zellen auftretende Zellpopulation im mittleren Fluoreszenzbereich ist auch hier, wenn auch weniger ausgeprägt, nachweisbar. Die Balken markieren den niedrigen, mittleren und hohen Fluoreszenzbereich. Angedeutet sind die Messungen der Negativkontrolle und der transfizierten Zellen, aus denen sich die grau unterlegte Kurve der fluoreszenzpositiven Zellen ermittelte.

	Mittelwert
relativer niedriger Anteil	59,1
relativer mittlerer Anteil	33,6
relativer hoher Anteil	7,3

**Tabelle 9:** Verteilung der Fluoreszenzintensität der GFTS exprimierenden Zellen 48h nach Transfektion mit 2µg DNA des Plasmids pcGFTS (Angaben in Prozent)

### 3.7.3. Vergleich der Fluoreszenzintensitäten

Im niederen Fluoreszenzbereich lag der Anteil an fluoreszierenden Zellen bei allen Proteinen nahe beieinander, VP22-EGFP exprimierende Zellen waren in diesem Fluoreszenzbereich jedoch signifikant häufiger zu finden als VP22-GFTS exprimierende Zellen. Im mittleren Fluoreszenzbereich wies das Protein VP22-GFTS einen signifikant höheren Anteil an Zellen auf als alle anderen Konstrukte ( $p < 0,05$ ). Die beiden anderen Fusionsproteine waren wiederum signifikant ( $p < 0,05$ ) häufiger in diesem Bereich vertreten als die Positivkontrolle. Der signifikant höchste Anteil im hohen Fluoreszenzbereich wurde von den EGFP exprimierenden Zellen erreicht. Abbildung 3-20 gibt einen Überblick über die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten.



**Abbildung 3-20:** Anteil der Zellen mit niedriger (a), mittlerer (b) und hoher (c) Fluoreszenzintensität an der Gesamtzahl der fluoreszierenden Zellen

48h nach Transfektion wurde der Anteil der niedrig fluoreszierenden Zellen an der Gesamtzahl der fluoreszenzpositiven Zellen für die vier Proteine EGFP, VP22-EGFP, VP22-GFTS und GFTS verglichen.

**a:** Im Vergleich der Proteine VP22-EGFP und VP22-GFTS findet sich ein signifikant höherer Anteil an Zellen im schwach fluoreszierenden Bereich, die VP22-EGFP exprimieren

**b:** Zellen, die VP22-GFTS exprimieren finden sich im Bereich mit mittlerer Fluoreszenzintensität signifikant häufiger

**c:** EGFP exprimierende Zellen fluoreszierenden deutlich intensiver als die übrigen Zellen. Zahlenwerte innerhalb des Balkens geben die Mittelwerte an, Fehlerbalken zeigen 95% Konfidenzintervalle des Mittelwerts

## 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den durch die Proteintransduktionsdomänen VP22 und MTS vermittelten Transport von Peptiden zu quantifizieren. Die durchgeführten Experimente zeigten jedoch, dass das fluoreszierende Markerprotein EGFP in der vorliegenden Form als Nachweissystem für derartige Untersuchungen trotz seiner weiten Verbreitung nicht geeignet ist. Zunächst gelang es nicht, Zelllinien zu selektionieren, die das Markerprotein bzw. die Fusionsproteine stabil exprimierten. Der interzelluläre Proteintransport durch VP22 ließ sich in der direkten Fluoreszenzmikroskopie bei Verwendung von EGFP wie in der Literatur beschrieben lediglich nach Fixation der Zellen in 100% nachweisen, für MTS gelang der Nachweis auch nach diesem zusätzlichen Arbeitsschritt nicht. Durch Verwendung eines Antikörpers gegen die fluoreszierenden Proteine ließ sich die Sensitivität des Nachweissystems nicht erhöhen. Auch in der durchflußzytometrischen Analyse ergab sich für keines der untersuchten Proteine ein Hinweis auf einen interzellulären Transport. Die Untersuchungen zur Kombination der beiden Proteintransduktionsdomänen in einem einzigen Peptid zeigten, dass die intrazelluläre Verteilung des Proteins zwar verändert und die Expression gesteigert wird, unter Verwendung von EGFP ist jedoch auch hier ein quantitativer Vergleich der Transduktionseffizienz nicht zu beurteilen.

### 4.1. EGFP ist als Nachweissystem zur Quantifizierung von Proteintransduktion nicht geeignet

Die Verwendung von EGFP zur Markierung der zu untersuchenden Proteine erwies sich in der vorliegenden Arbeit als problematisch.

So gelang es nicht, Zelllinien zu selektionieren, die EGFP oder dessen Fusionsproteine stabil exprimierten. Die Fluoreszenz der unter Selektion mit Neomycin stehenden Zellen nahm in allen untersuchten Zelllinien stetig ab, bis sie bereits nach wenigen Tagen verschwunden war, wobei fluoreszenznegative Kolonien bestehen blieben. Die am stärksten fluoreszierenden Zellen schienen dabei bevorzugt zugrunde zu gehen. Da hierbei alle fluoreszierenden Zellen mit und ohne Fusion an VP22 oder MTS ein identisches Verhalten aufwiesen, ist die Ursache in einer möglichen Toxizität des fluoreszierenden EGFP-Anteils zu suchen. Diese Erfahrung deckt sich mit Berichten von *Hanazono* und *Liu*, die die Induktion von Apoptose und Genarrangements durch GFP und dessen Varianten beschreiben

(Hanazono et al., 1997; Liu et al., 1999). Das Problem der Toxizität von EGFP und seiner Varianten wird durch andere Autoren allerdings unterschiedlich beurteilt (Zimmer, 2002, p. 770). So gelang einigen Gruppen die Herstellung stabiler Zellklone ohne Probleme (Wahlfors et al., 2001).

Abgesehen von diesem Nachteil konnten die Vorteile des EGFP-Systems, nämlich die Möglichkeit einer direkten Beobachtung der Fusionsproteine in lebenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgrund der notwendigen Fixation der Zellkultur zum Translokationsnachweis (siehe p.47) nur teilweise genutzt werden. Bei Verzicht auf Fixation und Antikörpermarkierung stellt ein Nachweissystem mit fluoreszierenden Markerproteinen jedoch die einzig praktikable Methode zur durchflusszytometrischen Analyse intrazellulärer Proteine in lebenden Zellen dar, sodass in diesem Rahmen auf den Einsatz dieser Proteine nicht verzichtet werden kann.

Hilfreich könnte in diesem Zusammenhang die Entwicklung neuer Varianten der Fluoreszenzproteine sein. Neben Proteinen, die andere Spektren und stärkere Fluoreszenz aufweisen, gibt es auch Varianten aus anderen Organismen, etwa *Renilla reniformis*, die weniger toxisch sein sollen. Hierzu existieren im Moment allerdings nur wenige Daten.

Zu berücksichtigen ist ebenfalls die Abhängigkeit der Fluoreszenzstärke von der Konformation des Markerproteins. Zum Transport durch eine Membran mit Hilfe des TAT-Proteins muss das Peptid zunächst entfaltet werden (Bonifaci et al., 1995). Inwieweit dies für VP22 oder MTS zutrifft, ist nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass Proteine zum Membrantransport zunächst entfaltet und dann in der Zielzelle wieder in die richtige Konformation gebracht werden müssen. Säugetierzellen scheinen dabei nicht in der Lage zu sein, EGFP wieder in seine aktive Form zu bringen (Schwarze et al., 2000, p. 290). Zum Nachweis dieses speziellen Transportvorgangs ist das EGFP-System daher trotz anderslautender Berichte nach den vorliegenden Ergebnissen nicht optimal (Aints et al., 1999, p. 278).

Für den mikroskopischen Nachweis ergibt sich hieraus die Frage nach alternativ verwendbaren Nachweissystemen. Das lacZ-Gen stellt eines der am häufigsten verwendeten Reporter Gene dar und kodiert die aus *E.coli* isolierte  $\beta$ -Galaktosidase (Silhavy und Beckwith, 1985). Da es sich hierbei um ein enzymbasiertes System handelt, ist es zwar sensitiver als das EGFP-System, zur Auswertung des Essays z.B. durch Zugabe von 5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal)

müssen die zu analysierenden Zellen in der Regel allerdings ebenfalls fixiert werden. Bei Verwendung des Invitrogen-TOPO-Vektor-Kits ist der Einsatz zudem limitiert, da die in den Vektor zu inserierende Sequenz vorher durch PCR unter der Verwendung der Taq-Polymerase vervielfältigt werden muss. Da sich diese Polymerase durch eine verminderte Fähigkeit zur Fehlerkorrektur auszeichnet, weist ihr Einsatz bei langen Sequenzen wie auch dem lacZ-Gen das Risiko einer fehlerhaften Vervielfältigung der Ausgangs-DNA auf. Dieses Problem könnte durch Subklonierung des VP22-Vektors ohne den vorgefertigten Kit umgangen werden.

Eine weitere Variante zum Nachweis der VP22-Translokation wurde vor kurzem von *Bennet* publiziert (Bennett und Dalby, 2002). Hierbei wird das VP22-Peptid mit Flp-Rekombinase fusioniert. Die zu untersuchenden Zellen werden vor dem Translokationsversuch mit einem speziellen lacZ-Vektor transfiziert, der zwischen Promoter und lacZ-Gen ein die Transkription blockierendes DNA-Segment aufweist. Im Falle einer Translokation des Fusionsproteins wird diese interponierte Sequenz durch die Rekombinaseaktivität entfernt und die durch das lacZ-Gen kodierte  $\beta$ -Galaktosidase kann exprimiert werden. Dieses System stellt sicherlich eine interessante, sensitive Alternative zur Verwendung von fluoreszierenden Markerproteinen dar, löst das Problem der notwendigen Fixation aber nicht.

#### **4.2. Ist die Proteintransduktion durch VP22 ein Fixationsartefakt?**

In der vorliegenden Arbeit erwies sich der Nachweis der Translokation von VP22-Hybridproteinen unter Verwendung von EGFP aufgrund der eventuell geringen Effizienz des Transports bei geringer Sensitivität des Reportersystems als schwierig. Dies deckt sich jedoch mit den Erfahrungen in allen vergleichbaren Arbeiten über das VP22-Protein und dessen Hybride. Einige Autoren stellen aus diesem Grund die Transporteigenschaften des Proteins grundsätzlich in Frage. Auch die vorliegende Arbeit kann bestehende Zweifel an der Funktionalität der Proteintransduktion durch VP22 nicht ausräumen.

Während *Fang* die Proteintranslokation durch VP22 mit Hilfe des EGFP-Systems in lebenden Zellen nicht nachweisen konnte und daher generell anzweifelte, so gilt mittlerweile als Konsens, dass der Nachweis der VP22-EGFP-Fusion in Empfängerzellen nur nach Fixation der Zellkulturen gelingt (Fang et al., 1998; Aints et al., 1999; Elliott und O'Hare, 1999; Wybranietz et al., 1999, p.268; Brewis et al., 2000). Diese Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt, wobei sich der

mikroskopische Nachweis selbst mit diesem Wissen als äußerst schwierig erwies, da zusätzlich zur Fixation auch die Optimierung des Trägermediums und der Fluoreszenzfilter sowie die Verwendung von hohen Vergrößerungen im Mikroskop von erheblicher Bedeutung war. Die Interpretationen der Notwendigkeit des Fixationsschrittes sind in der Literatur unterschiedlich. *Brewis et al.* vermuten einen Konzentrationseffekt durch die Fixation (Brewis et al., 2000). *Lundberg* hingegen bezweifelt aufgrund dieses Umstandes die Fähigkeit des VP22-Peptids zum Transport heterologer Peptide grundsätzlich und wirft die Frage auf, ob der Nachweis der nukleären Fluoreszenz in den Nachbarzellen nicht ein Fixationsartefakt darstellt (Lundberg und Johansson, 2001). Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich der VP22-Komplex zunächst an der Zellmembran anheftet und erst nach Fixation eine nukleäre Verteilung zeigt (Lundberg und Johansson, 2002). Auch ein durch die Translokation des Diphtherie Toxin A-Fragments induzierter Zelltod konnte nicht nachgewiesen werden (Falnes et al., 2001). Dies ist bemerkenswert, da bereits ein einziges Molekül zum Tod der Zelle führen kann.

Demgegenüber stehen allerdings Berichte von signifikanten Verbesserungen der Funktion von VP22-Fusionsproteinen gegenüber den ursprünglichen funktionellen Peptiden ohne den Translokationsanteil. *Dilber* berichtet, dass durch Ganciclovir ein Zelltod durch VP22-TK-Hybride auch in Kulturen mit Neuroblastomzellen ohne gap-junctions induziert werden kann, der bei Verwendung von TK-Konstrukten ohne PTD-Anteil nicht zu beobachten ist (Dilber et al., 1999). *Phelan* zeigt die Induktion von Apoptose in p53-negativen Osteoblastomzellen durch ein VP22-p53-Fusionsprotein, nicht aber durch das p53-Protein alleine (Phelan et al., 1998). Auch die Präsentation von Tumorantigenen kann durch die Verwendung von Fusionsproteinen anstelle der alleinigen Antigene verbessert werden. Es wurde gezeigt, dass die Fusion des Humanen Papillomavirus Typ 16 E7 Antigen mit dem VP22-Protein eine 50fach höhere Anzahl an spezifischen CD8(+) T-Vorläuferzellen induziert als das Antigen alleine (Cheng et al., 2001; Hung et al., 2001). *Bennet* zeigt einen Anstieg der Luziferaseaktivität bei Inkubation von Zellen mit einem purifizierten VP22-T7-RNA-Polymerase-Fusionsprotein (Bennett und Dalby, 2002).

In einer weiteren Arbeit konnte der Transport eines Komplexes aus der C-terminalen Hälfte des VP22-Peptids und kurzen, fluoreszierend markierten Oligonukleotiden mit Hilfe von Zeitraffermikroskopie auch in lebenden Zellen ohne Fixation nachgewiesen

werden (Normand et al., 2001). Dies entspricht allerdings nicht dem klassischen VP22-System.

Für die Proteintranslokation durch VP22 existieren daher eine Reihe ernstzunehmender Indizien, auch wenn der mikroskopische Nachweis im Monolayer durch direkte Fluoreszenzmikroskopie nach wie vor aussteht.

Auch mit Hilfe der durchflußzytometrischen Analyse konnte in der vorliegenden Arbeit kein Beweis einer interzellulären Verteilung des Proteins erbracht werden. Die VP22-Konstrukte zeigten im Vergleich zu den mit nativem EGFP transfizierten Zellen insgesamt eine deutlich niedrigere Fluoreszenz in einer sogar wesentlich geringeren Anzahl von Zellen.

Die niedrigere Intensität der Fluoreszenz korreliert dabei mit der Assoziation der Fusionsproteine an subzelluläre Strukturen in der mikroskopischen Kontrolle. Dass die gleichmäßig zytoplasmatisch fluoreszierenden Zellen der EGFP-transfizierten Zellen eine höhere Intensität erzeugen, scheint nachvollziehbar.

Die Anzahl der fluoreszenzpositiven Zellen war in der FACS-Analyse für die VP22-EGFP-Fusionsproteine signifikant niedriger als für das native EGFP-Protein. Dies scheint auf den ersten Blick verwunderlich, sollte die Zahl der positiven Zellen durch eine zusätzliche Translokation in die Umgebung deutlich höher ausfallen. Dies könnte jedoch auf die nur geringe Fluoreszenz der Empfängerzellen zurückzuführen sein.

Im Gegensatz zur Kultur der mit nativen EGFP transfizierten Zellen liegen in den mit VP22-Fusionsproteinen transfizierten Kulturzellen nicht nur zwei, sondern drei verschiedene Populationen vor, nämlich die der Herstellerzellen, die der Empfängerzellen und die der übrigen Zellen. Dabei ist die um ein Vielfaches geringere Fluoreszenz der Empfängerzellen im Vergleich zu den Herstellerzellen zu berücksichtigen. Es ist daher wahrscheinlich, dass sich die Population der Empfängerzellen der FACS-Analyse nicht eindeutig von der Population der fluoreszenznegativen Zellen abgrenzen lässt, die ja ihrerseits eine nicht zu vernachlässigende Eigenfluoreszenz zeigen. Daher ist fraglich, ob die Empfindlichkeit der Durchflußzytometrie ausreichend ist, um den Effekt der Translokation durch VP22 darzustellen.

In der gesamten Literatur über das VP22-Protein sind trotz des relativ geringen Aufwands der Methode nur zwei Arbeiten publiziert, die den Versuch eines Translokationsnachweises durch eine durchflußzytometrische Analyse beschreiben.

Bei *Fang* findet sich keine signifikante Differenz zwischen mit VP22-EGFP und EGFP transfizierten Zellen (Fang et al., 1998, p. 1422). Im Gegensatz hierzu berichtet *Wybranietz* von einer signifikant höheren Anzahl an fluoreszenzpositiver Zellen (50,5% gegenüber 12,3%) für das VP22-EGFP-Konstrukt im Vergleich zu EGFP alleine (Wybranietz et al., 1999, p. 271). Das VP22-EGFP-Plasmid weist im publizierten Diagramm zusätzlich eine höhere Fluoreszenz auf als die Positivkontrolle. Dieses Ergebnis ist mit dem allgemein akzeptierten, schwierigen Nachweis der VP22-Translokation unter Verwendung einer Markierung mit EGFP nicht in Einklang zu bringen und die Resultate dieser durchflußzytometrischen Analyse sind nur schwer nachvollziehbar.

Letztendlich ist zu beachten, dass selbst eine tatsächlich größere Anzahl von fluoreszierenden Zellen nicht zwangsläufig beweisend für die tatsächliche Aufnahme der Proteine in die Zellen wäre, da sich die von *Lundberg* beschriebene Assoziation des VP22-Proteins mit der Zellmembran ohne eine tatsächliche Aufnahme des Proteins in das Innere der Zelle in der FACS-Analyse identisch darstellen würde (Lundberg und Johansson, 2002). Die durchflußzytometrische Analyse alleine ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit daher nicht geeignet, den Transport durch VP22 oder ein anderes Hybridprotein in das Innere der Zellen zu beweisen.

### **4.3. Vergleich des Verhaltens von VP22-EGFP, VP22-GFTS und MTS in der mikroskopischen und durchflußzytometrischen Analyse**

#### **4.3.1. Das MTS-Peptid verändert die intrazelluläre Proteinverteilung des VP22-EGFP-Proteins**

Das Hinzufügen des MTS-Peptids führte zu deutlichen Veränderungen der Verteilung der Fusionsproteine in den Herstellerzellen. Die Assoziation zu subzellulären Strukturen schien durch das MTS-Peptid gelockert, sodass die Herstellerzellen der unterschiedlichen Konstrukte bereits durch ihre Morphologie unterscheidbar waren. Leider ergab sich daraus bei mikroskopischer Untersuchung der Effizienz der Translokation kein signifikanter Vorteil hinsichtlich der Anzahl der nukleär fluoreszenzpositiven Empfängerzellen in der Nachbarschaft der Herstellerzellen. Ob diese Ergebnisse durch ein sensitiveres Reportersystem beeinflusst werden könnten, bleibt Spekulation. Der mikroskopische Nachweis kann durch Hinzufügen des MTS-Peptids an EGFP nicht wesentlich vereinfacht werden, ein Fixationsschritt bleibt in jedem Fall notwendig.

#### **4.3.2. Eine Translokation durch MTS kann weder mikroskopisch noch durchflußzytometrisch bewiesen werden**

Eine Translokation konnte für das GFTS-Protein alleine nicht nachgewiesen werden. Da auch in der Literatur bis jetzt keine Translokation durch eine vergleichbare membranpermeable Sequenz mit Hilfe von Fluoreszenzproteinen beschrieben wurde, könnte das Nachweissystem aufgrund der zu geringen Sensitivität für diese Peptide ungeeignet sein. Denkbar wäre zudem ein Verlust der Fluoreszenz durch die oben beschriebene Konformationsänderung des Fusionsproteins (s. p.61): Die Größe des EGFP-Proteins sollte für den Transport durch die MTS-Sequenz kein Hindernis darstellen, da ein Transport bereits für Peptide bis zu einer Größe von 45kDa gezeigt werden konnte (Rojas et al., 1998, p.374).

#### **4.3.3. Unterschiede der Fusionsproteine in der durchflußzytometrischen Analyse**

Deutliche Unterschiede ergaben sich beim Vergleich der untersuchten Proteine in den FACS-Analysen sowohl hinsichtlich der Anzahl der fluoreszenzpositiven Zellen als auch in deren Verteilung.

Alle klonierten Konstrukte wiesen eine geringere Anzahl an fluoreszenzpositiven Zellen auf als die Positivkontrolle. Da der Nachweis der interzellulären Verteilung mit Hilfe der FACS-Analyse fraglich ist (siehe p. 63), war für diese Unterschiede möglicherweise eine unterschiedliche Expression der Konstrukte verantwortlich. Besonders deutlich war der Unterschied beim Vergleich von VP22-EGFP und VP22-GFTS. Das MTS-Peptid könnte in diesem Fall als Expressionsverstärker wirksam werden. Da beide Vektoren mit Hilfe des gleichen Kits kloniert wurden, sind Einflüsse außerhalb der inserierten Gene unwahrscheinlich.

Bei gleichen Expressionsstärken könnte andererseits eine geringe Anzahl an lebenden fluoreszenzpositiven sekundär aus toxischen Effekten des VP22-Peptids resultieren. MTS könnte daher auch einen protektiven Effekt auf die das Fusionsprotein exprimierenden Zellen ausüben. Über eine mögliche Toxizität von VP22 existieren im Moment allerdings keine Daten.

Gegen beide Hypothesen spricht die geringe Anzahl fluoreszenzpositiver Zellen nach Transfektion mit GFTS im Vergleich zum nativen EGFP-Protein. In beiden Fällen sollte das GFTS-Peptid keine geringere Fluoreszenzintensität als EGFP aufweisen.

Dennoch deuten sich hier positive Effekte durch die Kombination der VP22-EGFP-Fusion mit dem MTS-Peptid an, auch wenn der genaue Wirkmechanismus noch unklar ist.

Bei Wiederholung der Versuche sollte auf ein anderes Reportersystem ausgewichen werden, das die Herstellung stabiler Zelllinien erlaubt. Dadurch wären präzisere, quantitative Vergleiche der Konstrukte möglich.

Die zusätzliche Kombination des VP22-EGFP-Vektors mit dem MTS-Peptid resultiert in der durchflusszytometrischen-Analyse in einer deutlich unterschiedlichen Verteilung der fluoreszenzpositiven Zellen hinsichtlich ihrer Intensität.

Die höchsten Fluoreszenzwerte wurden, wie bereits die mikroskopische Analyse vermuten ließ, für die Positivkontrolle gemessen.

Während sich die relative Anzahl der Zellen im hochfluoreszenten Bereich für VP22-EGFP und VP-GFTS nicht unterschied (jeweils 2,1%), wurden die Effekte des MTS-Peptids vor allem im unteren und mittleren Fluoreszenzbereich deutlich. Bemerkenswert war hier die neu auftretende Population im mittleren Intensitätsbereich für das VP22-GFTS-Konstrukt. Im Vergleich zum VP22-EGFP-Protein rekrutierten sich die Zellen hierfür aus dem niedrigfluoreszenten Bereich. Das MTS-Peptid führte dementsprechend zu einer Verstärkung der Fluoreszenz. Ob dies durch interzelluläre Transporteffekte oder durch ein unterschiedliches intrazelluläres Verhalten der Proteine in den Herstellerzellen verursacht wurde, ließ sich anhand der mikroskopischen Kontrolle nicht nachvollziehen, da hier für die neu auftretende Population kein eindeutiges morphologisches Korrelat gefunden werden konnte.

#### **4.3.4. Mögliche Synergieeffekte zwischen MTS und VP22**

Der Mechanismus für den interzellulären Transport des VP22-Proteins ist nach wie vor unklar. Lediglich das System der Aktin-Filamente muss zum Nachweis der Translokation intakt sein (Elliott und O'Hare, 1997, p. 228). Nachgewiesen ist jedoch eine starke Assoziation des positiv geladenen VP22-Komplexes an die negative Oberfläche der Plasmamembran der Zelle, die selbst durch intensive Waschvorgänge nicht aufgehoben werden kann (Lundberg und Johansson, 2002, p.368). Für das TAT-Protein konnte eine endosomale Endozytose nach Absorption mit der Membran gezeigt werden (Mann und Frankel, 1991). Vielleicht ist dies ein Hinweis auf den noch zu erforschenden Mechanismus des VP22-Transports, wobei

allerdings nicht klar ist, ob TAT und VP22 ähnliche Mechanismen verwenden (Schwarze et al., 2000, p. 290).

Auch die kürzeren membranpermeablen Peptide wie MTS integrieren sich zunächst mit ihrer hydrophoben Region in die Zellmembran der Zellen, in die sie später aufgenommen werden. Diese gemeinsame Eigenschaft der sonst unterschiedlichen Peptide könnte daher zu positiven Synergieeffekten bei Proteinen führen, die beide Peptide tragen. Die Zunahme der Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie könnte daher einen Hinweis auf die stärkere Bindung der Fusionsproteine an die Zellmembran darstellen.

Umgekehrt wäre allerdings auch eine Behinderung des VP22-Peptids beim Verlassen der Herstellerzelle durch eine verstärkte Assoziation mit der Plasmamembran denkbar. Demgegenüber steht allerdings die um ein Vielfaches höhere Anzahl an fluoreszenzpositiven Zellen des VP22-GFTS-Konstrukts.

#### **4.4. Ausblick**

Gerade im Hinblick auf die noch zu lösenden Probleme der „klassischen“ Gentherapie stellt die Proteintransduktion eine vielversprechende Alternative zum Transport therapeutischer Proteine dar. Die potentiellen Eigenschaften machen VP22 zu einem interessanten und vielseitig einsetzbaren Kandidaten für ein neues Übertragungssystem. Neben der Übertragung von Proteinen und anderen Makromolekülen ist etwa auch der Transport von DNA und Chemotherapeutika denkbar und auch bereits Gegenstand experimenteller Protokolle (Rousselle et al., 2000).

So attraktiv das Konzept von Peptiden, die als Transportsystem eingesetzt werden können, auch erscheint, so müssen auch die noch zu klärenden Widersprüche gerade bei der Charakterisierung des VP22-Peptids berücksichtigt werden. Die publizierten Daten reichen hier von einer berichteten Transduktion aus einer Zelle in bis zu 200 Nachbarzellen bis zu einer nicht nachweisbaren Aufnahme eines einzigen Toxin-Moleküls (Elliott und O'Hare, 1997, p. 231; Falnes et al., 2001, p. 4356). Die Effizienz des postulierten Transports bleibt also Gegenstand der Forschung. Eine genauere Berücksichtigung sollte dabei nach den vorliegenden Daten auch das bisher kaum berücksichtigte Verhalten der Proteinfaltung während der Transportvorgänge finden.

Vordringlich scheint nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die Suche nach einem sensitiveren Nachweissystem, sei es ein weiter modifiziertes Fluoreszenzprotein oder auch ein neues, eventuell enzymbasiertes Reportersystem. Das im Moment etablierte EGFP erwies sich im vorliegenden Fall als nicht geeignet, die Fragestellung zufriedenstellend zu beantworten.

Das Anfügen einer kurzen membranpermeablen Sequenz bleibt eine interessante Alternative zur Verbesserung der Translokationseffizienz des VP22-Systems, auch wenn die Effekte einer derartigen Kombination anhand der vorliegenden Daten nur schwer zu charakterisieren waren. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die noch ausstehende Klärung des Transportmechanismus des VP22-Proteins. Eine gezielte Steigerung der Effizienz des Transports wäre dann unter Umständen möglich.

Unabhängig hiervon ist die Pharmakologie gerade der *in-vivo* Proteintransduktion nur unzureichend erforscht, sodass bis zur endgültigen praktischen Bewertung dieses Therapieansatzes sicherlich noch einige Zeit vergehen wird.

## 5. Zusammenfassung

Die Therapie durch Übertragung von Proteinen anstelle der für diese kodierenden Gene stellt eine Alternative zur klassischen Gentherapie dar. Verschiedene Peptidsequenzen (Proteintransduktionsdomänen, PTDs) besitzen die Eigenschaft, die normalerweise impermeable Zellmembran zu überwinden und ohne spezielle Transportersysteme oder Kanäle in Zellen einzudringen (Proteintransduktion). Durch Fusion mit diesen Sequenzen können andere, normalerweise für die Membran nicht permeable, funktionelle Peptide in beliebige Zellen eingeschleust und dadurch therapeutisch genutzt werden. Die Effizienz dieses Transports wird für die einzelnen PTDs in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, die Effizienz dieses interzellulären Transports der beiden PTDs VP22 und MTS durch durchflusszytometrische Analysen zu quantifizieren. Zudem sollte untersucht werden, ob sich die Effizienz des Transports durch Kombination dieser beiden PTDs innerhalb eines einzigen Peptids (VP22-MTS) verbessern lässt.

Zur Untersuchung der Peptide VP22, MTS und VP22-MTS wurden Fusionsproteine aus dem fluoreszierenden Markerprotein enhanced green fluorescent protein (EGFP) und den zu testenden PTDs kloniert.

48h nach Transfektion definierter Mengen DNA der zu untersuchenden Proteine in COS-7-Affennierzellen konnte in der direkten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Zellen ein interzellulärer Transport nur für die PTDs VP22 und VP22-MTS gezeigt werden, nicht jedoch für MTS alleine. Durch Hinzufügen des MTS-Peptids zu VP22 wurde dessen intrazelluläre Verteilung verändert. Das Fusionsprotein VP22-MTS war bei der durchflusszytometrischen Analyse in einer signifikant ( $p < 0,05$ ) größeren Anzahl von Zellen bei höherer Fluoreszenzintensität nachweisbar als die beiden einzelnen Transportproteine. Im Vergleich zur Positivkontrolle konnte jedoch für keines der untersuchten Peptide ein signifikanter interzellulärer Transport nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das in der Erforschung der Proteintransduktion verbreitete fluoreszierende Markerprotein EGFP zur Quantifizierung dieses Transportvorgangs ungeeignet ist. Durch Kombination der PTDs VP22 und MTS lässt sich die Effizienz der Expression deutlich steigern, zur Verbesserung der Transporteigenschaften können jedoch keine Aussagen getroffen werden. Zur Quantifikation der Proteintransduktion ist daher die Etablierung neuer Nachweissysteme notwendig.

## 6. Literaturverzeichnis

Aints,A., Dilber,M.S., Smith,C.I.  
Intercellular spread of GFP-VP22  
*J. Gene Med.* 1 (1999) 275-279

Aints,A., Guven,H., Gahrton,G., Smith,C.I., Dilber,M.S.  
Mapping of herpes simplex virus-1 VP22 functional domains for inter- and subcellular protein targeting  
*Gene Ther.* 8 (2001) 1051-1056

Bennett,R.P., Dalby,B.  
Protein delivery using VP22  
*Nat. Biotechnol.* 20 (2002) 20

Biondi,R.M., Baehler,P.J., Reymond,C.D., Veron,M.  
Random insertion of GFP into the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit from *Dictyostelium discoideum*  
*Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 4946-4952

Bonifaci,N., Sitia,R., Rubartelli,A.  
Nuclear translocation of an exogenous fusion protein containing HIV Tat requires unfolding  
*AIDS* 9 (1995) 995-1000

Brewis,N., Phelan,A., Webb,J., Drew,J., Elliott,G., O'Hare,P.  
Evaluation of VP22 spread in tissue culture  
*J. Virol.* 74 (2000) 1051-1056

Chan,A.W., Chong,K.Y., Martinovich,C., Simerly,C., Schatten,G.  
Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes  
*Science* 291 (2001) 309-312

Cheng,W.F., Hung,C.H., Chai,C.Y., Hsu,K.F., He,L., Ling,M., Wu,T.C.  
Enhancement of sindbis virus self-replicating RNA vaccine potency by linkage of herpes simplex virus type 1 VP22 protein to antigen  
*J. Virol.* 75 (2001) 2368-2376

Derer,W., Easwaran,H.P., Knopf,C.W., Leonhardt,H., Cardoso,M.C.  
Direct protein transfer to terminally differentiated muscle cells  
*J. Mol. Med.* 77 (1999) 609-613

Derossi,D., Calvet,S., Trembleau,A., Brunissen,A., Chassaing,G., Prochiantz,A.  
Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent  
*J. Biol. Chem.* 271 (1996) 18188-18193

Derossi,D., Joliot,A.H., Chassaing,G., Prochiantz,A.  
The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes  
*J. Biol. Chem.* 269 (1994) 10444-10450

Dilber, M.S., Phelan, A., Aints, A., Mohamed, A.J., Elliott, G., Smith, C.I., O'Hare, P.  
Intercellular delivery of thymidine kinase prodrug activating enzyme by the herpes  
simplex virus protein, VP22  
*Gene Ther.* 6 (1999) 12-21

Du, C., Yao, S., Rojas, M., Lin, Y.Z.  
Conformational and topological requirements of cell-permeable peptide function  
*J. Pept. Res.* 51 (1998) 235-243

Elliott, G., O'Hare, P.  
Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein  
*Cell* 88 (1997) 223-233

Elliott, G., O'Hare, P.  
Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins  
*Gene Ther.* 6 (1999) 149-151

Elliott, G.D., Meredith, D.M.  
The herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is encoded by gene UL49  
*J. Gen. Virol.* 73 (1992) 723-726

Falnes, P.O., Wesche, J., Olsnes, S.  
Ability of the Tat basic domain and VP22 to mediate cell binding, but not membrane  
translocation of the diphtheria toxin A-fragment  
*Biochemistry* 40 (2001) 4349-4358

Fang, B., Xu, B., Koch, P., Roth, J.A.  
Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins is not observed in cultured  
mammalian cells  
*Gene Ther.* 5 (1998) 1420-1424

Frankel, A.D., Pabo, C.O.  
Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus  
*Cell* 55 (1988) 1189-1193

Gibson, W., Roizman, B.  
Proteins specified by herpes simplex virus. Staining and radiolabeling properties of B  
capsid and virion proteins in polyacrylamide gels  
*J. Virol.* 13 (1974) 155-165

Green, M., Loewenstein, P.M.  
Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency  
virus tat trans-activator protein  
*Cell* 55 (1988) 1179-1188

Hanazono, Y., Yu, J.M., Dunbar, C.E., Emmons, R.V.  
Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination  
frequency suggest a selective disadvantage  
*Hum. Gene Ther.* 8 (1997) 1313-1319

Hawiger, J.  
Noninvasive intracellular delivery of functional peptides and proteins  
*Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (1999) 89-94

Hink, M.A., Griep, R.A., Borst, J.W., van Hoek, A., Eppink, M.H., Schots, A., Visser, A.J.  
Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain  
Fv protein

J. Biol. Chem. 275 (2000) 17556-17560

Hoyt, D.W., Gierasch, L.M.

Hydrophobic content and lipid interactions of wild-type and mutant OmpA signal  
peptides correlate with their in vivo function

Biochemistry 30 (1991) 10155-10163

Hung, C.F., Cheng, W.F., Chai, C.Y., Hsu, K.F., He, L., Ling, M., Wu, T.C.

Improving vaccine potency through intercellular spreading and enhanced MHC class  
I presentation of antigen

J. Immunol. 166 (2001) 5733-5740

Knopf, K.W., Kaerner, H.C.

Virus-specific basic phosphoproteins associated with herpes simplex virus type a  
(HSV-1) particles and the chromatin of HSV-1-infected cells

J. Gen. Virol. 46 (1980) 405-414

Kobayashi, N., Fujiwara, T., Westerman, K.A., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Noguchi, H.,  
Miyazaki, M., Cai, J., Tanaka, N., Fox, I.J., Leboulch, P.

Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human  
hepatocytes

Science 287 (2000) 1258-1262

Lin, Y.Z., Yao, S.Y., Veach, R.A., Torgerson, T.R., Hawiger, J.

Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic  
peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization  
sequence

J. Biol. Chem. 270 (1995) 14255-14258

Lindgren, M., Hallbrink, M., Prochiantz, A., Langel, U.

Cell-penetrating peptides

Trends Pharmacol. Sci. 21 (2000) 99-103

Liu, H.S., Jan, M.S., Chou, C.K., Chen, P.H., Ke, N.J.

Is green fluorescent protein toxic to the living cells?

Biochem. Biophys. Res. Commun. 260 (1999) 712-717

Luft, F.C.

Can VP22 resurrect gene therapy?

J. Mol. Med. 77 (1999) 575-576

Lundberg, M., Johansson, M.

Is VP22 nuclear homing an artifact?

Nat. Biotechnol. 19 (2001) 713-714

Lundberg, M., Johansson, M.

Positively Charged DNA-Binding Proteins Cause Apparent Cell Membrane  
Translocation

Biochem. Biophys. Res. Commun. 291 (2002) 367-371

- Mann,D.A., Frankel,A.D.  
Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein  
*EMBO J.* 10 (1991) 1733-1739
- Margolin,W.  
Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial cells  
*Methods* 20 (2000) 62-72
- Mattila,P., Korpela,J., Tenkanen,T., Pitkanen,K.  
Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase--an extremely heat stable enzyme with proofreading activity  
*Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 4967-4973
- Normand,N., van Leeuwen,H., O'Hare,P.  
Particle formation by a conserved domain of the herpes simplex virus protein VP22 facilitating protein and nucleic acid delivery  
*J. Biol. Chem.* 276 (2001) 15042-15050
- Phelan,A., Elliott,G., and O'Hare,P.  
Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22  
*Nat. Biotechnol.* 16 (1998) 440-443
- Rojas,M., Donahue,J.P., Tan,Z., Lin,Y.Z.  
Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability  
*Nat. Biotechnol.* 16 (1998) 370-375
- Rousselle,C., Clair,P., Lefauconnier,J.M., Kaczorek,M., Scherrmann,J.M., Tamsamani,J.  
New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy  
*Mol. Pharmacol.* 57 (2000) 679-686
- Schwarze,S.R., Hruska,K.A., Dowdy,S.F.  
Protein transduction: unrestricted delivery into all cells?  
*Trends Cell Biol.* 10 (2000) 290-295
- Silhavy,T.J., Beckwith,J.R.  
Uses of lac fusions for the study of biological problems  
*Microbiol. Rev.* 49 (1985) 398-418
- Torgerson,T.R., Colosia,A.D., Donahue,J.P., Lin,Y.Z., Hawiger,J.  
Regulation of NF-kappa B, AP-1, NFAT, and STAT1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF-kappa B p50  
*J. Immunol.* 161 (1998) 6084-6092
- Vives,E., Brodin,P., Lebleu,B.  
A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus  
*J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16010-16017

- Wahlfors,J., Loimas,S., Pasanen,T., Hakkarainen,T.  
Green fluorescent protein (GFP) fusion constructs in gene therapy research  
*Histochem. Cell Biol.* 115 (2001) 59-65
- Wybranietz,W.A., Prinz,F., Spiegel,M., Schenk,A., Bitzer,M., Gregor,M., Lauer,U.M.  
Quantification of VP22-GFP spread by direct fluorescence in 15 commonly used cell lines  
*J. Gene Med.* 1 (1999) 265-274
- Zhang,L., Torgerson,T.R., Liu,X.Y., Timmons,S., Colosia,A.D., Hawiger,J., Tam,J.P.  
Preparation of functionally active cell-permeable peptides by single-step ligation of two peptide modules  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95 (1998) 9184-9189
- Zimmer,M.  
Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior  
*Chem. Rev.* 102 (2002) 759-781

## 7. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei allen, die diese Doktorarbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

An erster Stelle gilt der Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher für die Vergabe des Themas. Er ermöglichte mir die Durchführung der Arbeit am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung und gewährte mir dabei Unterstützung in jeglicher Hinsicht auch über den Rahmen der Doktorarbeit hinaus.

PD Dr. Achim Krüger möchte ich für die stets verfügbare, kompetente und geduldige Beratung und Betreuung sowie zahlreiche konzeptionelle Anregungen während der gesamten Arbeit danken.

Dr. Petros Hantzopoulos half mir, die ersten Schwierigkeiten zu Beginn der Arbeit zu überwinden.

Kompetente Ansprechpartner bei der Durchführung der Experimente fand ich bei allen Mitarbeitern des Instituts. Die freundliche Aufnahme und stets kollegiale Arbeitsatmosphäre haben entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Mein besonderer Danke gilt Frau Edelburga Hammerschmitt, Eva Schmalzl und Katja Honert für die allzeit freundliche und sachkundige Beratung und tatkräftige Hilfe bei den Experimenten.

Dagmar Funke danke ich dafür, dass sie immer für mich da ist.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern und Großeltern möchte ich für die materielle und moralische Unterstützung während der letzten Jahre danken.