

# Gentechnische Verfahren zur Erzeugung und Selektion von hochproduzierenden CHO-Zellen

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Kerstin Sautter**

geboren in Ulm/Donau

Würzburg 2003

Eingereicht am: 07.08.2003

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Gross (Prodekan)

Gutachter : Prof. Dr. Erich Buchner

Gutachter: Prof. Dr. Rolf G. Werner

Tag des Promotionskolloquiums: 07.04.2004

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1 Heterologe Genexpression in Säugerzellen zur biopharmazeutischen Proteinherstellung	1
1.2 Aptamere	4
1.3 Neomycin-Phosphotransferase (NPT) – ein Selektionsmarker	6
1.4 Cis- und trans-wirkende DNA-Elemente der Transkription	10
1.5 Zielsetzung	15

## 2. Material

2.1 Organismen	17
2.1.1 Zelllinie	17
2.1.2 Bakterienstämme	17
2.2 DNA-Material	17
2.2.1 Plasmide	17
2.2.2 Oligonukleotide	18
2.3 Kulturmedien	19
2.4 Puffer und Lösungen	19
2.5 Chemikalien und Reagenzien	21
2.6 Größenmarker	22
2.7 Enzyme	22
2.8 Antikörper	23
2.9 Kits	23
2.10 Geräte	23
2.11 Sonstiges Material	24

## 3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden	25
3.1.1 Bakterienkultur und –lagerung	25
3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	25
3.1.3 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebekulturzellen	25
3.1.4 Aufreinigung von DNA	25
3.1.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebekulturzellen	25
3.1.6 Modifikation von DNA-Molekülen	26
3.1.7 Gelelektrophorese	26
3.1.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	26

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten	27
3.1.10 Herstellung kompetenter Zellen	27
3.1.11 Transformation	27
3.1.12 Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)	28
3.1.13 RT-PCR (Reverse Transkription-PCR)	28
3.1.14 Sequenzierung	29
3.1.15 Southern Blot (Alkalischer Transfer)	29
3.1.16 Northern Blot	29
3.1.17 Dot Blot	29
3.1.18 Nicht-radioaktive Markierung einer Hybridisierungssonde	29
3.1.19 Nicht-radioaktive Hybridisierung	30
3.2 Zellbiologische Methoden	30
3.2.1 Zellkultur	30
3.2.2 Transfektion von Eukaryotenzellen	30
3.2.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	31
3.3 Proteinchemische Methoden	31
3.3.1 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	31
3.3.2 Proteinquantifizierung nach Bradford	32
3.3.3 Bestimmung der Luciferase-Aktivität	32
3.3.4 Bestimmung der NPT-Aktivität	32
<b>4. Ergebnisse</b>	
4.1 Translationshemmung durch Aptamere	33
4.1.1 Einfluss verschiedener Promotoren	34
4.1.2 Einfluss verschiedener Liganden	38
4.1.3 Einfluss verschiedener Spacer	39
4.1.4 Einfluss mehrerer Aptamere	41
4.1.5 Zusammenfassung	42
4.2 Beeinträchtigung der Enzymfunktion des Selektionsmarkers Neomycin durch Punktmutationen	44
4.2.1 Generierung der Punktmutationen im <i>npt2</i> -Gen	46
4.2.2 Effekt von NPT-Mutanten auf die Selektion von rekombinanten MCP1- produzierenden Zellen	47
4.2.3 Effekt von NPT-Mutanten auf die Selektion von rekombinanten mAK-2- produzierenden Zellen	51
4.2.4 G418-Titration	61
4.2.5 Enzymfunktion	62

4.2.6 Genkopieneffekt	65
4.2.7 Transkriptionsrate	67
4.2.8 Zusammenfassung	69
4.3. Cis-wirkende Elemente	70
4.3.1 Klonierung der Expressionsvektoren	70
4.3.2 Einfluss des CHO-TE-Elements auf die Expression des Produkts mAk-1	72
4.3.3 Genkopienzahl	75
<b>5. Diskussion</b>	
5.1 Translationshemmung durch Aptamere	77
5.2 Anreicherung von Hochproduzenten durch NPT-Mutanten	81
5.3 Erhöhung der Expression durch ein cis-wirkendes Element	91
5.4 Ausblick	95
<b>6. Zusammenfassung und Summary</b>	98/100
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	102
<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b>	107
<b>9. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen</b>	110
<b>10. Anhang</b>	111

## 1. Einleitung

### 1.1 Heterologe Genexpression in Säugerzellen zur biopharmazeutischen Proteinherstellung

Viele komplexe, therapeutische Proteine, z. B. monoklonale Antikörper, Cytokine, Enzyme oder Fusionsproteine, werden heutzutage in Säugerzellen produziert. Die biopharmazeutische Produktion in Bakterienzellen ermöglicht zwar in der Regel höhere Expressionsraten und ist kostengünstiger, es fehlen jedoch posttranslationale Modifikationen des Produkts wie z. B. Glykosylierungen. Diese stellen den größten Vorteil von Säugerzellkulturen dar. Die säugerspezifischen Glykosylierungen und Phosphorylierungen des Produkts sind sowohl in funktionaler als auch in pharmakokinetischer Hinsicht in hohem Maße humankompatibel und nicht immunogen. Kommerziell relevante Zellen sind Hybridoma-, Myeloma-, Baby Hamster Kidney (BHK)- und Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen. Letztere finden immer mehr Verbreitung auf Grund ihrer guten Adaptationsfähigkeit an serum- und proteinfreie Medien. Außerdem stoßen sie bei regulatorischen Behörden auf große Akzeptanz, denn sie gelten als sichere Produktionszelle, weil sie nicht anfällig für Humanpathogene sind. Die biopharmazeutische Produktion in Säugerzellen wird kontinuierlich weiterentwickelt, um die Produktivität zu steigern, die Ausbeuten zu erhöhen und die immer höheren Sicherheitsanforderung zu erfüllen. Ansatzpunkte zur Steigerung der Produktausbeute sind die Zelllinienentwicklung, die Upstream-Prozessentwicklung und die Downstream-Prozessentwicklung. Letztere umfasst die Zellernte, die Aufreinigung des Produkts und dessen Formulierung. In der Upstream-Entwicklung geht es vor allem um die Akkumulation der Biomasse bei Aufrechterhalten der Produktqualität. Dies erreicht man mit einer Verbesserung der Kulturbedingungen, die man durch die Zusammensetzung der Medien und durch die Wahl des Fermentationsprozesses beeinflussen kann. Auch der Bereich Upscaling (Expandieren des Kulturvolumens vom kleinen Maßstab bis zu 12000 Litern) ist ein wichtiger Schritt in der Etablierung eines Produktionsprozesses. Am Anfang eines jeden Prozesses steht jedoch die Entwicklung einer geeigneten hochproduzierenden Zelllinie. Hier kommt es zum einen darauf an, die entsprechenden Expressionsvektoren durch neue genetische Elemente weiter zu verbessern. Zum anderen werden die Selektionsverfahren zur Auswahl des geeigneten hochproduzierenden Zellklons optimiert. Das Resultat aller dieser Maßnahmen sind Zellkultur-Prozesse, die Titer von bis zu 1 - 2 g/L Antikörper erreichen (Chadd and Chamow 2001).

Eine große Herausforderung der Zelllinienentwicklung ist die Gewinnung eines stabilen, hochproduzierenden Zellklons. Das zu exprimierende, rekombinante Gen ist mit einem

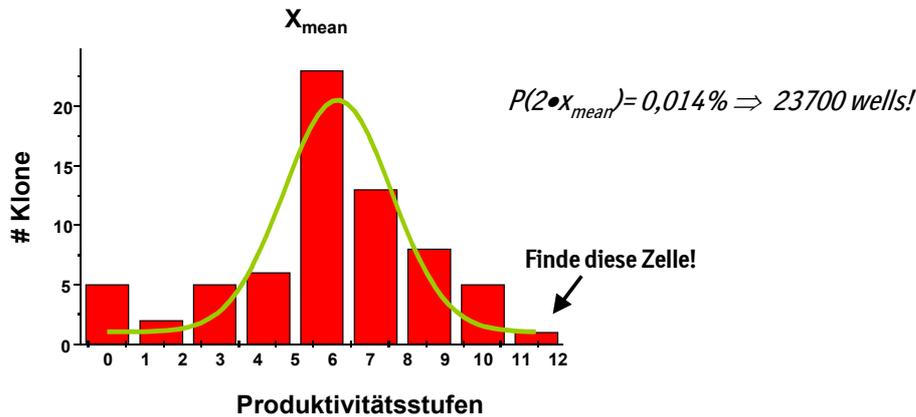
Resistenzmarker gekoppelt. Dadurch ist eine Selektion auf exprimierende Zellklone möglich. Bei anhaltendem Selektionsdruck wird die Fremd-DNA weitestgehend nach dem Zufallsprinzip in das Wirtszellgenom integriert und stabil exprimiert. Die Expressionsstärke des rekombinanten Gens in der Wirtszelle wird nun durch eine Vielzahl an Parametern beeinflusst. Zunächst hängt sie von der Konstruktion des Expressionsvektors ab. Neben prokaryotischen Elementen, die die Replikation und Selektion des Vektors in *E. coli* ermöglichen, sind vor allem die Elemente entscheidend, die die Transkriptionsinitiation (Promotor) und –termination (polyA) des Produktgens in der Wirtszelle erlauben. Zusätzlich wird ein eukaryotischer Selektionsmarker benötigt. Außerdem kommen meist weitere Elemente zum Einsatz, um die Transkriptionseffizienz zu steigern (z. B. Enhancer), und/oder posttranskriptionelle Prozesse, Replikation, spezifische Integration und Genamplifikation zu beeinflussen.

Jedoch hängt eine effiziente Genexpression nicht nur von den Vektorelementen ab. Auch die chromosomale Umgebung des transfizierten Gens hat einen sehr großen Einfluss (siehe auch Kapitel 1.4). Intrinsische cis-wirkende Elemente wie Promotoren, Enhancer, Silencer, Locus Control Regions und Scaffold/Matrix Attachment Regions können die effiziente Transkription der Fremd-DNA stören oder positiv beeinflussen. Wichtige Aspekte der genomischen Transkription sind außerdem die Ableserichtung der benachbarten Sequenzen, die Chromatinstruktur am Integrationsort, der Methylierungszustand der DNA und der Acetylierungszustand der Histone. Schließlich spielt auch die Anzahl der integrierten Genkopien eine Rolle. Außer der Transkriptionsregulation sind die Ebenen der RNA-Prozessierung und des RNA-Transports wichtige Stationen der Genexpression. Je länger eine RNA zur Translation zur Verfügung steht, desto mehr Produkt kann erzeugt werden. Die RNA-Stabilität wird vor allem vom 5'-Capping und der 3'-Poly-Adenylierung beeinflusst. Auch das korrekte Splicen und der effiziente Transport der RNA ins Cytoplasma fördern eine hohe Produktausbeute. Auf der Ebene der Translation spielen Faktoren wie die Sekundärstruktur der RNA und des entstehenden Proteins, das Vorhandensein des 5'-Caps und Modifikationen an Translationsfaktoren eine Rolle. Weiterhin wichtig für eine effiziente Translation sind auch der 5'-untranslatierte Bereich einer mRNA und deren Kontext am Startkodons AUG. Sind Repressorproteine an die mRNA gebunden oder liegen Antisense-RNAs vor, wirkt sich dies negativ auf die Genexpression aus. Ungenau ablesen und damit häufig notwendiges Korrekturlesen verlangsamen ebenfalls die Entstehung des Proteins. Schließlich sollte der allgemeine Translationsstatus einer Zelle die Genexpression günstig beeinflussen. Wurde genügend Produkt synthetisiert, ist auch dessen Stabilität letztlich von großer Wichtigkeit. Hier kommt dem Ubiquitinierungssystem eine große Rolle zu. Es erkennt anhand von N-terminalen und internen Aminosäuresequenzen, ob ein Protein abgebaut werden soll oder nicht (Hauser and Wagner 1997).

Die Expression des Produktes hängt zudem von der Zelllinie ab. Es scheint, als verpackten manche Zelllinien die Fremd-DNA in eine Chromatinform, die Transkription fördert (Euchromatin), während andere Zellarten die Fremd-DNA in stille Genombereiche integrieren (Heterochromatin). Eine andere Erklärung für die variable Expressionsstärke verschiedener Zellarten ist, dass sie typische „Hot Integration Spots“ aufweisen, die in unterschiedlich aktiven Genomregionen liegen.

Aus mehreren Gründen werden Einzelzellklone für die Produktion bevorzugt und auch von den regulatorischen Behörden gefordert. Ein Pool aus mehreren Klonen ist nicht homogen was die Wachstumseigenschaften, Expressionslevel und in manchen Fällen auch die Produktqualität anbelangt. Oft wird beobachtet, dass nichtproduzierende Zellen die hochproduzierenden Klone überwachsen, da eine hohe Produktexpression häufig längere Generationszyklen hervorruft. Wünschenswert sind daher Einzelzellklone mit stabiler und hoher Produktexpression. Um die Anforderungen der Behörden zu erfüllen, muss der Produktionsklon genetisch stabil sein, ein konsistentes Fermentationsverhalten aufweisen, identische Wachstumsparameter und vergleichbare Produktqualitäten zeigen und konstante Titer produzieren.

Bei der Etablierung solcher Zellklone stellt die Varianz des Integrationsortes eines der größten Probleme dar. Die Insertion von Fremd-DNA ins Genom der Wirtszelle erfolgt zufällig an transkriptionsaktiven und -inaktiven Loci. Dies macht die Selektion auf Hochproduzenten sehr aufwändig. Eine Vielzahl an Klonen muss gescreent werden, um die Zelle mit der höchsten Produktivität und der erforderlichen Produktqualität zu finden (Abb. 1). Verschiedene Screening-Methoden werden angewandt, z. B. ELISA für sezernierte Produkte, die direkt im Überstand gemessen werden können. Intrazelluläre oder membrangebundene Proteine können mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden. Es wird dafür ein Ligand, Substrat-Analogen oder Antikörper benötigt, der spezifisch mit dem zu ermittelnden Protein interagiert und an den ein fluoreszierendes Agens (z. B. FITC) gekoppelt ist. Eine dritte Möglichkeit bieten bicistronische (oder auch multicistronische) Expressionsvektoren. Zwei (oder mehr) offene Leseraster (ORFs) werden von einem gemeinsamen Promotor reguliert und sind durch eine Internal Ribosome Entry Site (IRES) verknüpft. Das erste Cistron kodiert für das Produkt, das zweite Cistron für ein Reporterprotein, z. B. Green Fluorescent Protein (GFP). Dies kann wiederum durchflusszytometrisch quantifiziert werden und korreliert im Expressionslevel mit dem Produkt.



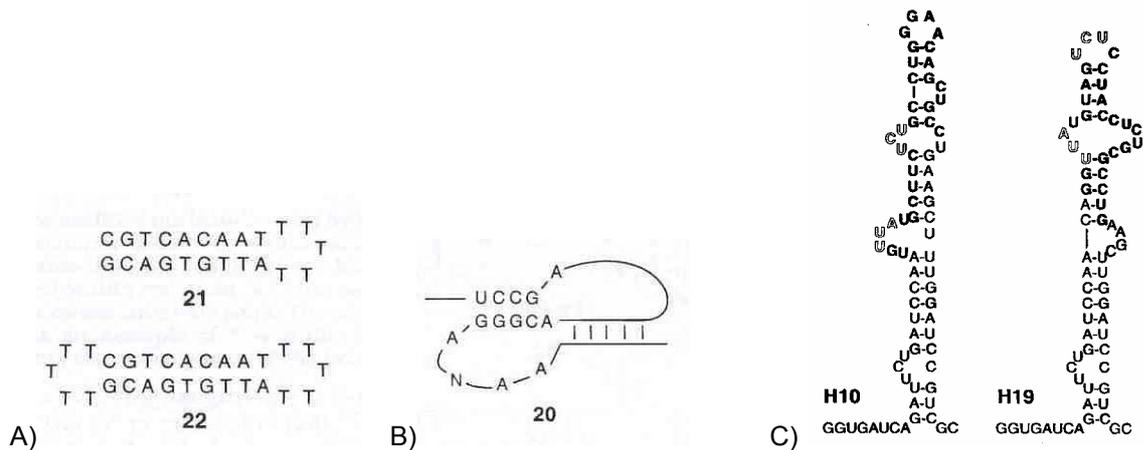
### Abb. 1: Produktionsstufen transfizierter Zellen

Die Produktivität der nach der Transfektion erhaltenen Zellklone folgt der Gauß'schen Normalverteilung. Die Wahrscheinlichkeit  $P$ , einen Klon zu finden, der doppelt so viel produziert wie der Durchschnittsklon  $X_{\text{mean}}$ , liegt bei 0,014%. Dies wird von einem aus 23700 Klonen erfüllt.

Die in diesem Abschnitt aufgezeigten Faktoren, die bei der Etablierung einer geeigneten Produktionszelle eine Rolle spielen, zeigen, dass es zahlreiche Ansatzpunkte für Verbesserungen gibt. Diese Arbeit befasst sich auf verschiedenen Ebenen mit manchen davon.

## 1.2 Aptamere

Aptamere sind kurze Sequenzen aus RNA, DNA oder modifizierten Nucleinsäuren, die Sekundärstrukturen verschiedenster Art ausbilden: haarnadel- und hantelförmige Strukturen, Hammerkopf-Strukturen, Pseudoknots oder Stem-Loop-Strukturen (Abb. 2). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie mit einer Vielzahl niedermolekularer Liganden, z. B. organischen Farbstoffen, Antibiotika, Aminosäuren, Nucleotiden oder Kofaktoren interagieren können (Famulok 1999), aber auch mit Proteinen hochspezifische Komplexe bilden (Gold 1995; Osborne and Ellington 1997; Uphoff et al 1996). Kristallographische bzw. NMR-spektroskopische Strukturdaten von Aptamer/Ligand-Komplexen zeigen, dass Aptamere die Fähigkeit besitzen, mit Oberflächencharakteristika von Proteinen zu verschmelzen oder in Spalten und Einstülpungen zu passen (Osborne and Ellington 1997). Flache, aromatische Liganden legen sich z. B. mit Hilfe von Wasserstoffbrückenbindungen stapelartig in eine Tasche des Aptamers (Hermann and Patel 2000).



### Abb. 2: Sekundärstrukturen verschiedener Aptamere

A) Haarnadel-Struktur (21) und Hantel-Struktur (22). B) Pseudoknot (20). Aus (Osborne and Ellington 1997). C) Stem-Loop-Struktur. Aus (Werstuck and Green 1998).

Die Identifikation solcher Nukleinsäure-Targets erfolgt durch die Auswahl aus riesigen Bibliotheken, die zufällige, einzelsträngige Oligonukleotidsequenzen enthalten. Selektioniert werden diese komplexen, dreidimensional strukturierten Nukleinsäurefragmente mittels SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Ellington and Szostak 1990; Tuerk and Gold 1990). Diese kombinatorisch-chemische Technologie ermöglicht ein Hochdurchsatz-Screening von umfassenden Oligonukleotid-Bibliotheken auf spezifische Sequenzen mit passenden Bindungsaffinitäten und -spezifitäten für beliebige Zielmoleküle (Gold 1995). Durch die Kombination von rationalem Wirkstoffdesign und konventionellem Screening können so neue Zielproteine für Therapeutik, Forschung und Diagnostik gefunden werden, die für die pharmazeutische Industrie von großem Nutzen sind. Sowohl in der Diagnostik als auch in der Forschung stellen Aptamere eine Alternative zu Antikörpern dar. Einsatzmöglichkeiten bieten sich z. B. in intrazellulären Lokalisierungsexperimenten oder in der Affinitätsaufreinigung von Proteinen. Eine weitere Anwendung ist das sogenannte *genomic* SELEX. Es handelt sich hierbei um die Identifizierung von biologisch relevanten regulatorischen DNA- und RNA-Loops als *in vivo*-Targets für nukleinsäurebindende Proteine wie z. B. den Lac-Repressor oder Transkriptionsfaktoren. Auch in der Therapie zeigen Aptamere ein breites Anwendungsspektrum bezüglich der Blockade von Enzymaktivitäten und regulatorischen Proteinen. In der Onkologie können die Oligonukleotide als Antagonisten eingesetzt werden, um die Angiogenese in Tumorgewebe zu verhindern (Gold 1995). Ein weiteres Beispiel ist die funktionelle Hemmung extrazellulärer Cytokine. Durch die Interaktion des Aptamers mit einem Wachstumsfaktor verhindert es dessen Bindung an Zelloberflächenrezeptoren (Jellinek et al 1993). Anti-Thrombin-Aptamere hemmen die Blutgerinnung und helfen so, den Wiederverschluss von Blutgefäßen zu verhindern (Li et al 1994). Schließlich kann ein spezifisches Aptamer auch die virale Replikation z. B. des Rous-Sarcoma-Virus verhindern (Pan et al 1995). Desweiteren

isolierten Yamamoto und Mitarbeiter ein RNA-Aptamer, welches eine sehr hohe Affinität zum Tat-Protein von HIV aufweist. Diese Aptamer-Tat-Affinität ist 133 Mal größer als die Affinität zwischen Tat-Protein und TAR-RNA (Trans-Activation Response Region) von HIV. Die Interaktion zwischen Aptamer und Tat verhindert, dass Tat durch die Interaktion mit TAR die virale Transkription aktiviert (Yamamoto et al 2000).

Weitere regulatorische Anwendungsmöglichkeiten der Aptamere zeigten Werstuck und Green (Werstuck and Green 1998) in verschiedenen *in vivo*-Experimenten. Aminoglykosidische Antibiotika wie Kanamycin und Tobramycin blockieren in Bakterien die Ribosomen und somit die Proteinbiosynthese und das Wachstum. Die Autoren exprimierten in Bakterien Aptamere, die spezifisch mit solchen Antibiotika interagierten. Im Falle einer solchen Interaktion hatten die Antibiotika keine negativen Auswirkungen auf das bakterielle Wachstum, während in Kontrollkulturen ohne Aptamereexpression das Wachstum durch die Antibiotikagabe verhindert wurde. Es konnte außerdem ein Titrationseffekt festgestellt werden. Je mehr Aptamer-RNA exprimiert wurde, desto besser war das Wachstum. Folglich resultierte die spezifische Interaktion zwischen Aptamer und Ligand (hier: Antibiotikum) *in vivo* in einem antibiotikaresistenten Phänotyp.

Die gleiche Publikation befasste sich auch mit dem Einsatz von Aptameren zur translationsabhängigen Kontrolle der Genexpression in Eukaryoten. Bei der Translationsinitiation wird der Bereich zwischen dem 5'-Cap und dem Startkodon vom Ribosom abgetastet. Ist in diesem Bereich ein Protein an die RNA gebunden, kann dies die Initiation der Translation behindern. Werstuck und Green zeigten in Experimenten mit CHO-K1-Zellen, bei denen sie die Aptamere H10 und H19 (Abb. 2C) und die Liganden H33258 und H33342 (Abb. 6) einsetzten, dass Aptamere im 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) durch Interaktion mit ihrem spezifischen Liganden ebenfalls die Translation beeinträchtigten. Die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase als Reportergen war durch die Aptamer/Liganden-Interaktion um mehr als 90% dosisabhängig reduziert (Werstuck and Green 1998).

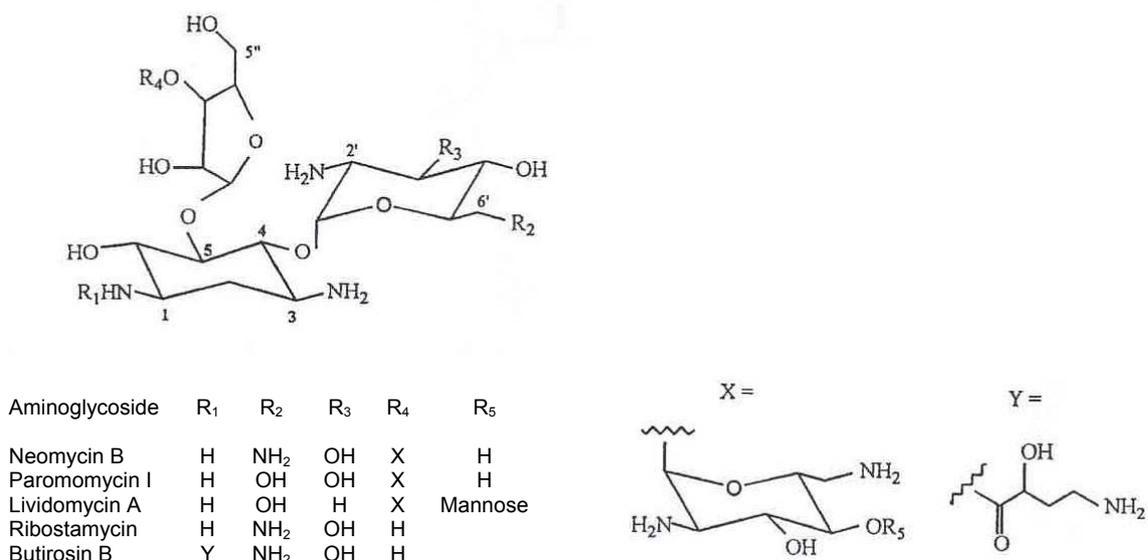
### **1.3 Neomycin-Phosphotransferase (NPT) – ein Selektionsmarker**

Durch Transfektion kann exogene DNA in Form eines nicht-viralen Vektorsystems in Empfängerzellen eingebracht werden, sodass instabile oder stabile Linien entstehen. Instabile oder transiente Transfektanten entstehen, wenn die transfizierte DNA in der Empfängerzelle in extrachromosomaler Form verbleibt. Stabile Linien erhält man, wenn die exogene DNA in das Wirtszellgenom integriert wird. Allerdings nimmt nur ein kleiner Teil der behandelten Zellen die Fremd-DNA tatsächlich auf. Wird mit der Fremd-DNA ein genetischer Marker mit in die Zellen eingebracht, ermöglicht dies eine anschließende Selektion der

erfolgreich transfizierten Zellen. Sowohl der Marker als auch die kotransfizierte DNA werden stabil exprimiert.

Als Marker werden vor allem Antibiotikaresistenzgene eingesetzt. Durch deren Expression erlangen die Zellen eine Resistenz gegenüber dem spezifischen Antibiotikum. Alle klinisch eingesetzten Antibiotika hemmen die Proteinsynthese von Prokaryoten, indem sie an die 30S Untereinheit von Ribosomen binden. In höheren Konzentrationen (> 25 µg/mL) beeinflussen sie auch die Translation in Eukaryoten. Verschiedene Mechanismen können zu einer Resistenz gegenüber Antibiotika führen. Eine Möglichkeit ist die Veränderung der Antibiotika-Bindungsstelle an den Ribosomenuntereinheiten. Eine unspezifische Resistenz gegenüber allen Antibiotika tritt auf, wenn die Aufnahme des Antibiotikums in die Zelle oder die Akkumulation in der Zelle gestört ist. Ersteres ist meist eine Folge der Impermeabilisierung der Zellmembran, die wiederum aus einer Veränderung von Membranproteinen resultiert. Die Resistenz ist eher moderat und nur von vorübergehender Natur. So verhält es sich auch mit Resistenzen, die auf eine reduzierte Antibiotika-Akkumulation in der Zelle zurückzuführen sind. Dies kann durch einen erhöhten Efflux aus der Zelle hervorgerufen werden.

Die Resistenz, die man zur Selektion von transfizierten Zellen einsetzt, wird allerdings durch spezielle Enzyme verliehen, die spezifische, kovalente Veränderungen funktioneller Amino- oder Hydroxylgruppen des Antibiotikums katalysieren. Das Resultat ist ein chemisch modifizierter Stoff, der kaum noch an die Ribosomen binden kann. Dadurch sind die Zellen meist in hohem Maße resistent gegenüber dem Antibiotikum.



**Abb. 3: Strukturformel verschiedener Aminoglykoside**  
aus Mingeot-Leclercq, Glupczynski, and Tulkens 1999

Eines dieser resistenzverleihenden Enzyme ist die Neomycin-Phosphotransferase (NPT, EC2.7.1.95), die häufig als Selektionsmarker benutzt wird. Durch die Expression von NPT

erlangen die Zellen eine Resistenz gegenüber dem Cytotoxin G418. Es gehört zur Gruppe der aminoglykosidischen Antibiotika. G418 besitzt im Vergleich zu anderen Aminoglykosiden (Abb. 3) eine 6'-OH-Gruppe anstelle einer Aminogruppe. Dies verleiht der Substanz die Fähigkeit, direkt an den eukaryotischen 80S-Ribosomenkomplex zu binden. Somit stellt G418 einen sehr effektiven Inhibitor der eukaryotischen Proteinsynthese dar (Mingeot-Leclercq et al 1999). Als Selektionssystem ist die Kombination von G418 mit NPT eine der wenigen, die für den Einsatz in Eukaryoten geeignet ist.

Bei den aminoglykosidmodifizierenden Enzymen muss man zwischen Enzymen unterscheiden, die Acetyl-CoA als Donor verwenden und funktionelle Aminogruppen angreifen (*N*-Acetyltransferasen, AAC) und solchen, die ATP als Donor verwenden und Hydroxylgruppen in ihrer Funktion stören (*O*-Nukleotidyltransferasen, ANT und *O*-Phosphotransferasen, APH). Die Neomycin-Phosphotransferase wird durch die allgemeingültige Nomenklatur als APH(3')IIa bezeichnet, wobei die Ziffer 3' für die Position der Modifikation steht und die Ziffer II für die Substratspezifität. Die Einzigartigkeit des Proteins wird letztendlich durch den Zusatz „a“ festgelegt, da es verschiedene Proteine mit demselben Resistenzprofil gibt. Spezifische Substrate für APH(3')IIa sind Kanamycin, Neomycin, Paromomycin, Ribostamycin, Butirosin, Gentamicin B (Shaw et al 1993) und G418. Deren Inaktivierung erfolgt durch die Übertragung des terminalen Phosphats von ATP auf die 3'-Hydroxylgruppe des Aminohexoserings I. Das *aph(3')II*-Gen ist in *E. coli* Transposon 5-assoziert.

Die Proteinfamilie der Aminoglykosid-Phosphotransferasen weist mehrere konservierte funktionelle Domänen auf. In der hochkonservierten C-terminalen Region des Proteins (60-70% Homologie) liegen drei Motive, welchen spezielle Funktionen zugeschrieben werden. Sie wurden in zahlreichen Studien *in vitro*, in Bakterien oder in Pflanzenzellen genauer untersucht. Für Säugerzellen liegen darüber jedoch kaum Informationen vor.

Das Motiv 1 mit der Sequenz V -- HGD ---- N wurde schon in anderen Proteinen mit ATPase-Aktivität entdeckt und könnte am Transfer des terminalen Phosphats von ATP beteiligt sein (Shaw, Rather, Hare, and Miller 1993). Der Histidinrest ist dabei möglicherweise der Phosphatakzeptor (Martin et al 1988). Wird His188 durch andere Aminosäuren substituiert (z. B. Tyr, Ser, Leu) ist das Resultat ein kanamycinsensitiver Phänotyp (Blazquez et al 1991). Dieselben Auswirkungen hatte ein Austausch von Gly189 gegen Asparaginsäure (Blazquez, Davies, and Moreno 1991). Eine Mutation von Asp190, die zu Gly190 führte, reduzierte die Aktivität des veränderten Enzyms und damit einhergehend das Maß der Resistenz (Kocabiyyik and Perlin 1992b). Dass Veränderungen dieses konservierten Motivs

zu drastischen Einbußen in der Enzymfunktion führten, zeigt klar die Wichtigkeit des Motivs auf.

In einigen GTP- und ATP-bindenden Proteinen wurden glycinreiche, flexible Loops als Teil der Nukleotidbindungsstelle beschrieben. Motiv 2 der APH(3')II (G -- D – GR – G) könnte einem solchen Loop entsprechen (Shaw, Rather, Hare, and Miller 1993).  $Mg^{2+}$ -ATP bindet an einen Teil dieser Sequenz und bildet so einen ternären Komplex mit dem Enzym. In verschiedenen Studien wurden einige Enzyme untersucht, die Mutationen im Motiv 2 zeigten. Alle angeführten Substitutionen (Arg211Gly, Asp208Gly, Gly210Asp, Arg211Gln, Asp216Gly und Asp220Gly) führten zu einem nicht oder wenig funktionellen Enzym. Sowohl das Maß an Phosphorylierung von Kanamycin als auch die Resistenz gegenüber Aminoglykosiden waren drastisch reduziert. Eine besonders wichtige Funktion nimmt hier wahrscheinlich Arg211 ein. Die positive Ladung des Aminosäurerests scheint essentiell für die Affinität zum Nukleotidsubstrat zu sein. Sie kommt in analoger Position in Form von Lysin auch bei cAMP-abhängigen Proteinkinasen vor (Blazquez, Davies, and Moreno 1991; Kocabiyyik and Perlin 1992b). Eine Mutation in Nachbarschaft des konservierten Motivs 2 (Asp227Gly) wirkte sich wesentlich weniger drastisch auf die Enzymaktivität aus. Wurde im Motiv 2 Tyr218 gegen Serin oder Asparaginsäure ersetzt, führte dies zu einer deutlich verbesserten Resistenz gegenüber Amikazin. Dahingegen reduzierte ein Austausch von Tyr218 zu Phenylalanin die Resistenz gegenüber allen getesteten Aminoglykosiden außer Amikazin. Mit der Mutation an dieser Stelle wurde also eine veränderte Aminoglykosidspezifität erreicht. Die Erwartung war jedoch, dass die vermutete Funktion des Motivs 2 gestört würde, also die Bindung von  $Mg^{2+}$ -ATP an das Enzym. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist eine Veränderung der Zugänglichkeit oder der Orientierung der reaktiven Gruppen innerhalb der Substratbindungsstelle durch die Mutation (Kocabiyyik and Perlin 1992a; Shaw, Rather, Hare, and Miller 1993).

Die Deletion der letzten 24 Aminosäuren von APH(3')IIa führte zum Verlust der Kanamycin-Resistenz (Beck et al 1982). Die Mutation Asp261Asn im hinteren C-Terminus resultierte ebenfalls in einem nicht-funktionellen Enzym (Blazquez, Davies, and Moreno 1991). Auch hier war wieder eine konservierte Region betroffen, die für die Enzymfunktion essentiell ist: Motiv 3: D -- R/K -- F/Y --- LDE. Dessen Aufgabe ist möglicherweise die ATP-Hydrolyse und/oder die Konformationsänderung des Enzym-Aminoglykosid-Komplexes (Shaw, Rather, Hare, and Miller 1993).

Auch außerhalb der konservierten Motive zeigen Mutationen Auswirkungen auf die Enzymfunktion. Tauscht man Val36 gegen Met aus, geht die Resistenz gegenüber

Aminoglykosiden zwar nicht komplett verloren, ist jedoch um das 20-fache reduziert. Val36 ist also ebenfalls wichtig für die korrekte Enzymfunktion. Es gehört auch zu einer konservierten Gruppe von Aminosäuren (Ile, Leu und Val), die in 18 von 20 APHs an dieser Position vorkommen (Blazquez, Davies, and Moreno 1991). Für die Mutante Glu182Asp wurde ein retardiertes Wachstum bei Zugabe von Kanamycin gezeigt. G418 wirkt sich auf Pflanzenzellen und Bakterien, die diese veränderte Form der APH(3')IIa exprimieren, sogar letal aus (Yenofsky et al 1990).

Diese Fülle an Studien mit Mutanten der APHs, die zumeist *in vitro*, in Bakterien oder in Pflanzenzellen durchgeführt wurden, zeigen deutlich, wie dramatisch sich der Austausch von einzelnen Aminosäuren auf die Enzymfunktion und das Substratspektrum auswirken kann. Es ist allerdings sehr schwierig, einzelne Aminosäuren bestimmten Resistenzprofilen zuzuordnen, da innerhalb der APH-Proteinfamilie sehr diverse Phänotypen auftreten. Außerdem liegen sehr wenig Informationen über Untersuchungen zu Enzymwirkung und Einfluss von Enzymmutanten in Eukaryoten und speziell in Säugerzellen vor.

#### **1.4 Cis- und trans-wirkende DNA-Elemente der Transkription**

Die Transkription eukaryotischer Gene wird durch eine Vielzahl cis- und trans-wirkender Elemente reguliert. Am besten charakterisiert sind Promotoren und Enhancer. Promotoren sind DNA-Sequenzen, die der kodierenden Genregion direkt vorangehen. Sie umfassen mehrere Bindungsstellen für trans-wirkende Transkriptionsfaktoren, welche den basalen Transkriptionsapparat bilden. Am Promotor erfolgt die Initiation der Transkription. Enhancer setzen sich ebenfalls aus mehreren Bindungsstellen für trans-wirkende Transkriptionsfaktoren zusammen. Allerdings können diese Elemente auch in größerem Abstand zur kodierenden Region liegen und befinden sich nicht zwingend im 5'-Bereich des transkribierten Gens. Enhancer können auch innerhalb von Introns oder in 3'-Richtung der kodierenden Region liegen. Außerdem wirken sie unabhängig von ihrer Orientierung. Die Aktivitäten von Promotoren und Enhancern können in transienten Expressionsstudien untersucht werden und gewebe- und entwicklungspezifisch agieren, müssen dies aber nicht. Setzt man diese Elemente für Studien in stabilen Zelllinien oder transgenen Tieren ein, unterliegen sie Positionseffekten (US 6,027,915). Dieses Phänomen beruht auf dem Einfluss der Chromatinstruktur und/oder dem Vorhandensein intrinsischer regulatorischer Elemente am Integrationsort der Fremd-DNA. Dies führt zu variablen Expressionsleveln (Zahn-Zabal et al 2001).

Zu einer anderen Kategorie cis-wirkender Elemente gehören solche, die die Chromatinstruktur beeinflussen. Dazu zählt man Locus Control Regions (LCRs),

Scaffold/Matrix Attachment Regions (S/MARs), Isolatoren oder Grenzelemente (Boundary Elements), CpG-methylierte Inseln, sogenannte Facilitator Elements (Ortiz et al 1999) und andere transkriptionserhöhende Elemente wie EASE (Expression Augmenting Sequence Elements) (US 6,027,915, US 6,309,851) und UCOEs (Ubiquitous Chromatin Opening Elements) (WO 02/081677). Diese Elemente können ihre Wirkung über weite Distanzen (mehrere Kilobasen) hinweg entfalten. Ihre Effekte auf die Genexpression sind jedoch nur bei einer Integration im Genom nachweisbar, also in stabil transfizierten Zelllinien oder transgenen Tieren (Morris, Lee, and Thomas 2000; Zahn-Zabal, Kobr, Girod, Imhof, Chatellard, De Jesus, Wurm, and Mermod 2001).

Locus Control Regions (LCRs) sind regulatorische DNA-Elemente, die eine hohe, gewebespezifische Expression eines gekoppelten Transgens im Chromatin verursachen, die sich durch Positionsunabhängigkeit und Kopienzahlabhängigkeit auszeichnet. Diese Eigenschaften deuten darauf hin, dass LCRs fähig sind, in ihrem nativen Gewebe Chromatin zu öffnen (Ortiz et al 1997). Es gibt verschiedene Formen von  $\beta$ -Thalassämie, bei denen der  $\beta$ -Globin-Lokus intakt ist aber nicht exprimiert wird. Der Grund für die fehlende Expression ist eine große Deletion in 5'-Richtung der  $\beta$ -Globingene. Die Deletion dieser  $\beta$ -Globin-LCR führt zu einer geschlossenen Chromatinkonformation, die sich über den ganzen Locus erstreckt und zu einer Unterdrückung der Genexpression führt (Li et al 2002). LCRs kolokalisieren mit DNase I-hypersensitiven Stellen (HS) im Chromatin exprimierender Zellen. Das Vorkommen von HS deutet ebenfalls auf offenes Chromatin hin. Die HS enthalten eine Reihe verschiedener allgemeiner und gewebespezifischer Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Durch die Interaktion der Transkriptionsfaktoren mit der DNA entsteht die offene Chromatinstruktur der HS (Li, Peterson, Fang, and Stamatoyannopoulos 2002). Von manchen LCRs ist bekannt, dass sie sich aus mehreren HS zusammensetzen, deren Funktionen mehr oder weniger voneinander abgegrenzt werden können. Das  $TCR\alpha$ -Gen zum Beispiel wird unter endogener Kontrolle nur in T-Zellgewebe exprimiert. Der Locus existiert je nach Gewebe und Expressionsstatus in verschiedenen Chromatinmodi. Er besitzt im 3'-Bereich eine Locus Control Region, die acht HS aufweist. HS 2 - 6, ein 6 kb großes Teilfragment der LCR, wirkt chromatinöffnend und ist nicht gewebespezifisch. Die Gewebespezifität wird der T-zellspezifischen Expression im Thymus durch die HS 7, 8 und 1 (3 kb) verliehen. Nur in der vollständigen Kombination aller HS ist die  $TCR\alpha$ LCR funktionell komplett (Ortiz, Cado, Chen, Diaz, and Winoto 1997). Eine genauere Unterteilung und Spezifikation der einzelnen HS-Funktionen der  $TCR\alpha$ LCR ist in Ortiz, Cado, and Winoto 1999 nachzulesen. Dieses Beispiel zeigt, dass LCRs funktionell sehr komplex sind und sich aus verschiedenen Kontrollelementen wie Enhancern, Silencern und Isolatoren zusammensetzen können. Weitere Beispiele für eine Aufteilung der LCR-Funktionen auf

verschiedene Domänen sind der TCR $\gamma$ -Lokus und der  $\beta$ -Globin-Lokus. Ersterer setzt sich aus der DNase I-hypersensitiven Stelle HsA und dem Enhancer 3'E $_{C\gamma 1}$  zusammen. Der TCR $\gamma$ -LCR wird außer den üblichen Aufgaben noch eine Rolle bei der Rekombination der TCR $\gamma$ -Gene zugeschrieben (Baker et al 1999). Der  $\beta$ -Globin-Lokus weist fünf HS mit unterscheidbaren Funktionen auf, die für ihr vollständiges Funktionieren außerdem den gewebespezifischen Promotor benötigen. Eine weitere wichtige Rolle könnten LCRs bei der gewebespezifischen Demethylierung der DNA spielen, da DNA-Methylierung eine geschlossene Chromatinstruktur und die Stilllegung von Genen verursacht. Möglich wäre auch ein Wirkmechanismus, der durch eine erhöhte Histonacetylierung die Genexpression aktiviert (Li, Peterson, Fang, and Stamatoyannopoulos 2002).

Scaffold/Matrix Attachment Regions (S/MARs) sind DNA-Sequenzen, die mit hoher Affinität *in vitro* an Bestandteile der Matrix oder des Gerüsts des Zellkerns binden. Sie bilden die strukturellen und möglicherweise auch funktionellen Grenzen von Chromatindomänen (Zahn-Zabal, Kobr, Girod, Imhof, Chatellard, De Jesus, Wurm, and Mermod 2001). S/MARs sind fähig, mit Enhancern zu interagieren, die Zugänglichkeit der DNA im Chromatin lokal zu erhöhen und so die Expression stabil integrierter, heterologer Gene in Zelllinien, transgenen Tieren und Pflanzen zu steigern (Jenuwein et al 1997; Klehr et al 1991; Stief et al 1989; Zahn-Zabal, Kobr, Girod, Imhof, Chatellard, De Jesus, Wurm, and Mermod 2001). Sie können allerdings einen chromosomalen Locus nicht vollständig von naheliegenden Elementen abschirmen, um eine positionsunabhängige Expression zu ermöglichen (Poljak et al 1994). Der Effekt der MARs kann dazu genutzt werden, den Anteil (hoch-) exprimierender Zellklone bzw. transgener Tiere in einem Transfektionsexperiment zu erhöhen (McKnight et al 1992; Zahn-Zabal, Kobr, Girod, Imhof, Chatellard, De Jesus, Wurm, and Mermod 2001). Es wurde jedoch auch von MARs berichtet, die keine Hochexpression vermitteln, aber eine wichtige Rolle in der korrekten Regulierung entwicklungspezifischer Gene spielen (McKnight, Shamay, Sankaran, Wall, and Hennighausen 1992).

Isolatoren sind definiert als neutrale Grenze zwischen sich gegenseitig beeinflussenden Nachbarregionen, z. B. zwischen aktivem und inaktivem Chromatin (Grenzelemente). Sie können die Wirkung von Enhancern abgrenzen bzw. ganze DNA-Domänen dagegen isolieren und stabil transfizierte Reportergene gegen Positionseffekte abschirmen (Bell and Felsenfeld 1999; Udvardy 1999). So verleihen diese Elemente eine Unabhängigkeit von der genomischen Position. Außerdem können sie das Silencing von Transgenen bei Abwesenheit von Selektionsdruck verhindern (Pikaart et al 1998). Eine weitere vermutete Funktion von Isolatoren ist die Abgrenzung von Replikationsterritorien (Bell and Felsenfeld 1999). Die ersten Isolatoren, die beschrieben wurden, sind *scs* und *scs'* aus *Drosophila*. Sie

stellen die Grenze für die *hsp70* Hitzeschockgene dar und unterdrücken Positionseffekte (Udvardy et al 1985).

Als ein weiteres Element mit isolierender Funktion wurde ein GC-reiches Fragment aus dem *dhfr*-Gen (Chinesischer Hamster) gefunden, das CpG-Inseln enthält (Poljak, Seum, Mattioni, and Laemmli 1994). Das Fragment allein zeigte keinerlei Einfluss auf die Reportergenexpression. Zwischen einem expressionsfördernden SAR und dem Reportergen gelegen, konnte das Fragment jedoch den anregenden Effekt des SAR weitestgehend verhindern. Möglicherweise blockiert dieses GC-reiche Fragment den chromatinöffnenden Mechanismus des SAR und fungiert folglich als Isolator. Elemente mit ausgedehnten CpG-Inseln werden mit einer höheren Wahrscheinlichkeit methyliert, da sie von einer DNA-Methyltransferase erkannt werden, die Cytosin zu 5-Methylcytosin umwandelt. Als Folge wird inaktives Chromatin gebildet (Poljak, Seum, Mattioni, and Laemmli 1994).

Aronow und Mitarbeiter definierten im ersten Intron des humanen ADA-Gens (Adenosindeaminase) ein neues regulatorisches Element, das wesentlich zur genkopienzahlabhängigen und positionsunabhängigen Expression beiträgt (Aronow et al 1995). Allerdings hatte das sogenannte Facilitator Element keinen Einfluss auf die Enhanceraktivität bezüglich der Transkriptionsstärke. Das Element ist bis zu 1 kb groß und nur funktionell, wenn es einen 200 bp großen T-zellspezifischen Enhancer flankiert. Ist nur eines der beiden Segmente vorhanden oder sind die Segmente bezüglich der Reihenfolge und Orientierung falsch angeordnet, ist das Element funktionslos. Dies führt zu Positionseffekten und verhindert die Bildung von DNase I-hypersensitiven Stellen am Enhancer.

Die Firma Cobra Therapeutics beschreibt im Patent WO 02/081677 ein weiteres chromatinbeeinflussendes Element. Die Ubiquitous Chromatin Opening Elements (UCOEs) sind verantwortlich für eine offene Chromatinstruktur in chromosomalen Regionen mit konstitutiv exprimierten Haushaltsgenen. Alle diese Gene besitzen CpG-reiche Inseln, die verhältnismäßig schwach methyliert sind. Die fehlende Methylierung von CpG-Inseln deutet darauf hin, dass es sich an dieser Stelle um aktives Chromatin handelt. Bei bestimmten Loki, die im o. g. Patent beschrieben sind, ist dies der Fall. Die UCOEs verhelfen zu einer Expressionsstärke, die von der genomischen Umgebung und von der Zell- oder Gewebeart unabhängig ist.

Auch die Firma Immunex hat sich in zwei Patenten die Rechte an DNA-Sequenzen gesichert, die eine Erhöhung der Expression bewirken (US 6,027,915, US 6,309,851). Das als Expression Augmenting Sequence Element (EASE) bezeichnete Element fördert eine

hohe Expression von rekombinanten Proteinen in Säugerzellen in kurzer Zeit, ist in transienten Expressionssystemen nicht aktiv und besitzt nicht die typischen Sequenzeigenschaften wie sie in LCRs und S/MARs gefunden wurden. Es handelt sich auch nicht um eine Sequenz, die für ein trans-aktivierendes Protein kodiert, da sie kein offenes Leseraster enthält. Das Fragment ist 14,5 kb groß, stammt aus der genomischen DNA von CHO-Zellen und kann die Expression eines stabil integrierten Reportergens achtfach steigern. Über 50% der Aktivität des Elements sind auf ein 1,8 kb großes Segment begrenzt, wobei die ersten 600 Basenpaare dieses Segments für die korrekte Funktion unentbehrlich sind. Eine zusätzliche Eigenschaft von Sequenzabschnitten mit hoher EASE-Aktivität ist das Vorhandensein von mehreren HMG-I(Y)-Bindungsstellen. HMG-I(Y)-Proteine gehören zur Familie der High Mobility Group Nicht-Histon-Chromatin-Proteine. Sie werden auch als „architektonische Transkriptionsfaktoren“ bezeichnet und bilden eine neue Kategorie der Trans-Regulatoren von Säurgerenen. HMG-I(Y)-Proteine erkennen AT-reiche Sequenzen und binden mit ihren sogenannten AT-Haken (DNA-bindende Domänen) in der kleinen DNA-Furche. Das kann zu lokalen Veränderungen der DNA-Topologie und in Folge dessen zu einer veränderten Genexpression führen. Die Autoren des Patents US 6,309,841 vermuten, dass die Auswirkungen von EASE mit der MTX-induzierten Amplifikation des integrierten Plasmids in Verbindung stehen. Bei der MTX-induzierten Gen-Amplifikation kommt es zu sogenannten Breakage-Fusion-Bridge-Zyklen, bei denen das *dhfr*-tragende Chromosom auf der distalen Seite des *dhfr*-Gens bricht. Nach der Replikation führt dieser Bruch zur Fusion der telomerlosen Schwesterchromatiden. Bei der Chromosomensegregation in der Anaphase entsteht zwischen den Centromeren des fusionierten, dizentrischen Chromatids eine Brücke. Dieser große Inverted Repeat bricht wiederum und erzeugt in einer Tochterzelle erneut ein telomerloses Chromatid, das nach der Replikation wieder fusioniert, usw. (Coquelle et al 1997). Bei diesen Zyklen ist eine Rolle der HMG-I(Y)-Proteine bei den strukturellen Veränderung der DNA, die zur Entstehung und Behebung der DNA-Brüche führen, gut vorstellbar. Es ist auch nicht auszuschließen, dass das genomische 14,5 kb-Fragment zwei mögliche MARs enthält, für die jedoch keine EASE-Aktivität gezeigt werden konnte.

Es gibt also außer den klassischen Promotoren und Enhancern eine Fülle an cis- und trans-regulatorischen Elementen, die auf der Ebene der Chromatinstruktur die Genexpression beeinflussen. Sie können auf Grund gewisser Gemeinsamkeiten zum Teil verschiedenen Gruppen zugeordnet werden. Allerdings weisen die Elemente innerhalb einer Gruppierung einige funktionelle Unterschiede auf. Die Wirkmechanismen sind letztlich trotz verschiedener Modellvorstellungen noch weitestgehend unklar.

## 1.5 Zielsetzung

Bei der Entwicklung einer stabilen, hochexprimierenden Zelllinie gibt es viele Ansatzpunkte zur Optimierung (siehe Kapitel 1.1). Eine der größten Hürden ist der hohe Zeit- und Arbeitsaufwand bei der Selektion des geeigneten Klons. Dies liegt vor allem an der Zufälligkeit des Integrationsortes, wie bereits oben dargelegt wurde (Abb. 1).

Optimierungen zielen deshalb darauf ab, durch geeignete Selektionsstrategien den Anteil an Hochproduzenten in der transfizierten Zellpopulation zu erhöhen und somit den Aufwand bei der Klonidentifizierung zu reduzieren. In der vorliegenden Arbeit sollen zwei alternative Strategien untersucht werden, die beide auf der Beeinträchtigung des Selektionsmarkers beruhen. Nur die Klone mit hoher Expression des gewünschten rekombinanten Proteins (Hochproduzenten) sollen die Selektion überleben. Produzenten mit geringer oder fehlender Expression des rekombinanten Proteins (Niedrig- bzw. Nichtproduzenten) sollen hingegen in der Selektionsphase absterben. Die Kurve in Abbildung 1 ist in diesem Fall nach rechts verschoben und die Menge an ineffizienten Klonen, die einer genaueren Untersuchung unterzogen werden müssen, ist verringert. Zum Absterben der Niedrigproduzenten kommt es, wenn das transfizierte Plasmid, das den beeinträchtigten Selektionsmarker gekoppelt mit dem Produktgen enthält, in einer inaktiven oder wenig aktiven DNA-Region (Silent Site) des Wirtszellgenoms (CHO-Zellen) integriert. In diesem Fall wird nichts oder sehr wenig vom beeinträchtigten Selektionsmarker und dem Produktgen exprimiert. Die Kombination von wenig und beeinträchtigtem Selektionsmarker führt zu einem sehr starken Selektionsdruck auf die Zelle, und die Zelle stirbt ab. Erfolgt die Integration des Plasmids jedoch in einer Active Site mit hoher Ablestrate, ist die Genexpression sehr hoch. Die große Menge an Selektionsmarker kann dessen Beeinträchtigung kompensieren. Die Zelle überlebt und exprimiert gleichzeitig viel Produkt. So könnte die Beeinträchtigung des Selektionsmarkers zu einer Anreicherung von Hochproduzenten im transfizierten Zellpool führen. In der ersten Strategie sollte die Beeinträchtigung durch Aptamere auf der Ebene der Translation erfolgen (siehe Kapitel 1.2), in der zweiten Strategie durch eine Mutation im Selektionsmarker, die dessen Enzymfunktion beeinträchtigt (siehe Kapitel 1.3).

Ein weiteres wichtiges Ziel in der Zelllinienentwicklung ist es, die effektive Produktivität transgener Zellen zu erhöhen. Hierfür können cis-wirkende DNA-Elemente eingesetzt werden, die nicht eindeutig als Promotor oder Enhancer deklariert werden können, aber dennoch eine Steigerung der Expression bewirken (siehe Kapitel 1.4). Ein Element, von dem eine derartige transkriptionsfördernde Wirkung vermutet wird, wurde in der vorliegenden Arbeit in stabil transfizierten CHO-Zellpools getestet.

Beide Ansätze sollen letztendlich zu einer effizienteren Zelllinienentwicklung führen. Dadurch könnten in kürzerer Zeit mehr und höher produzierende Zelllinien etabliert werden und somit Arbeitsaufwand und Kosten eingespart werden.

## 2. Material

### 2.1 Organismen

#### 2.1.1 Zelllinie

CHO-DG44 (Chinese Hamster Ovary) (Urlaub et al 1986)

#### 2.1.2 Bakterienstämme

*E. coli* Top10      Invitrogen      F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 deoR*  
*recA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1*  
*nupG1*

*E. coli* DH5α      Invitrogen      F<sup>-</sup> φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1*  
*hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1*

### 2.2 DNA-Material

#### 2.2.1 Plasmide

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Plasmide innerhalb der vorliegenden Arbeit kloniert.  
Nähere Angaben zur Zusammensetzung und Klonierung im Kapitel 4 (Ergebnisse).

- Basisplasmide:  
Karten im Anhang

pNeo-CMV2	pBI-16/LC 1	
pNeo2-CENUb2B	pBI-1	
pNeo2-CENUb2B/LC 2	pBI-1/HC 2	
pAD-CMV1/MCP-1	pLuc	Uni Würzburg, J. Duschl
pAD-CENUb2B	pCMVtkLuc	Uni Würzburg, J. Duschl
pAD-CENUb2B/HC 1	pBE812	
pBI-13/HC 1	pBE157	
pBI-15/LC 1	pBIND	Promega

- Plasmide mit Aptameren:

pBE830	pKS-6d	pKS-11
pBE820	pKS-7	pKS-12a
pKS-1	pKS-8a	pKS-12b
pKS-2	pKS-8b	pKS-12d
pKS-3	pKS-8c	pKS-13
pKS-4	pKS-8d	pKS-14a
pKS-5	pKS-9	pKS-14b
pKS-6a	pKS-10a	pKS-14d
pKS-6b	pKS-10b	pKS-15
pKS-6c	pKS-10d	

- Plasmide mit TE-Element aus CHO:

pBE31	pKS-18/HC 1	pKS-21/HC 1
pKS-16/LC 1	pKS-19/HC 1	pKS-22/LC 1
pKS-17/LC 1	pKS-20/HC 1	pKS-23/LC 1

- Plasmide mit Neomycinmutanten:

pKS-N1	pKS-N7	pBIN-1/LC 2
pKS-N2	pKS-N7/LC 2	pBIN-2/LC 2
pKS-N3	pKS-N7/MCP-1	pBIN-3/LC 2
pKS-N4	pKS-N8	pBIN-4/LC 2
pKS-N5	pKS-N8/LC 2	pBIN-5/LC 2
pKS-N5/LC 2	pKS-N8/MCP-1	pBIN-6/LC 2
pKS-N5/MCP-1	pKS-N9/MCP-1	pBIN-7/LC 2
pKS-N6	pKS-N10/MCP-1	pBIN-8/LC 2
pKS-N6/LC 2	pKS-N11/MCP-1	
pKS-N6/MCP-1	pKS-N12/MCP-1	

### 2.2.2 Oligonukleotide

- Sequenzierprimer in folgenden Vektorelementen:

Neomycin/Kanamycin-Resistenz-Gen  
 Ampicillin-Resistenz-Gen  
 CMV-Enhancer  
 CMV-Promotor  
 BGH Poly A  
 CHO-Promotor  
 EGFP  
 HC 1  
 SV40 Late Poly A  
 MCP-1  
 Luciferase

- Primer zur Synthese eines DNA-Fragments (5'→3'):

Neo for 5	TTCCAGAAGTAGTGAGGAGGC
Neo rev 5	ATGGCAGGTTGGGCGTCGC
Neo for2	GAAGTGTTCGCCAGGCTCAAG
IC49	CGGCAAAATCCCTTATAAATCA
Neo D190G for	CATGGCGGTGCCTGCTTGC
Neo D190G rev	GCAAGCAGGCACCGCCATG
Neo E182D for	GACGGCGATGATCTCGTCGT
Neo E182D rev	ACGACGAGATCATGGCCGTC
Neo D208G for	GATTCATCGGCTGTGGCCG
Neo D208G rev	CGGCCACAGCCGATGAATC
Neo D227G for	CTACCCGTGGTATTGCTGAAG
Neo D227G rev	CTTCAGCAATACCACGGGTAG
D227A for	CTACCCGTGCTATTGCTGAAG
D227A rev	CTTCAGCAATAGCACGGGTAG
D227V for	CTACCCGTGTTATTGCTGAAG
D227V rev	CTTCAGCAATAACACGGGTAG
D261G for	GCCTTCTTGGCGAGTTCTTCTGAG
D261G rev	CTCAGAAGAAGTTCGCAAGAAGGC
D261N for	GCCTTCTTAACGAGTTCTTCTGAG
D261N rev	CTCAGAAGAAGTTCGTTAAGAAGGC
E182G for	GACGGCGGGGATCTCGTCGT
E182G rev	ACGACGAGATCCCCGCCGTC
F240I for	GGCTGACCGCATCCTCGTGCTT
F240I rev	AAGCACGAGGATGCGGTGAGCC
V198G for	CCGAATATCATGGGGGAAAATGGC
V198G rev	GCCATTTTCCCCATGATATTCCG
W91A for	GGGAAGGGACGCGCTGCTATTGG
W91A rev	CCAATAGCAGCGCTCCCTTCCC
AvrH19	ACATTCCTAGGGCGACGGATCCAAGCTTCAG

BstXfor1	CATGGCCATTGATATGGC
BstXfor2	CATGGATCACCATTGATATGGATTGC
BstXI-H10f	TGCATACCATTGATATGGGGTGATCAGATTCTGATCCAATG
BstXI-H19r	ACATTCCATATCAATGGGCGACGGATCCAAGCTTCAG
BstXrev1	CATGGCCATATCAATGGC
BstXrev2	CATGGCAATCCATATCAATGGTGATC
SfiH10	TGCATAGGCCGCTCGGCCGGTGATCAGATTCTGATCCAATG

### 2.3 Kulturmedien

#### Bakterienkultur:

LB-Medium:	20 g LB Broth Base (Gibco BRL), ad 1 L dH <sub>2</sub> O, einstellen auf pH 7,5, autoklavieren
LB-Amp/Kan-Medium	LB-Medium nach dem Autoklavieren auf 50°C abkühlen lassen und mit Ampicillin (f.c. 100 µg/mL) bzw. Kanamycin (f.c. 50 µg/mL) versetzen
LB-Plattenmedium	analog zu LB-Medium, vor dem Autoklavieren 15 g Bacto-Agar je Liter Medium einwiegen, nach dem Autoklavieren auf 50°C abkühlen lassen, nach Bedarf Antibiotikum zusetzen (Konzentrationen s.o.), gießen, aushärten lassen.
Medium für Glycerinstocks	62,5% Glycerin in LB-Medium, autoklavieren
Ampicillin-Lösung (100mg/mL)	5g Ampicillin-Natrium-Salz ad 50 mL dH <sub>2</sub> O, sterilfiltrieren, aliquotieren, bei -20°C lagern

#### Zellkultur:

CHO-S-SFM II	Vollständiges, serumfreies Medium mit niedrigem Proteingehalt (< 100 µg/mL (Invitrogen/Gibco).
HT (50x)	Hypoxanthin/Thymidin-Supplement (Invitrogen/Gibco)
Opti-MEM I	Serumreduziertes Medium (Invitrogen/Gibco)
MEM Eagle	Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen und GlutaMAX I (Invitrogen/Gibco)
FCS	Fötale Kälberserum (Sigma)
Einfriermedium	7,5% DMSO, 46,25% frisches Kulturmedium, 46,25% konditioniertes Kulturmedium
G418-Lösung (100mg/mL)	Pulver in autoklaviertem, sterilfiltriertem dH <sub>2</sub> O lösen; dabei ist die biologische Wirksamkeit der Charge (Potency) zu beachten, man benötigt z.B. 70 mL dH <sub>2</sub> O bei einer Potency von 700 µg/mg; Lösung nochmals sterilfiltrieren und aliquotieren.

### 2.4 Puffer und Lösungen

Für Puffer und Lösungen aus Kits siehe entsprechende Handbücher und Gebrauchsanweisungen.

#### Kompetente Zellen:

Tfb 1	30 mM KAc 100 mM RbCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 50 mM MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O 15% Glycerin mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren
Tfb 2	10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 10 mM RbCl 15% Glycerin mit KOH auf pH 6,5 einstellen, sterilfiltrieren
<u>DNA-Isolierung:</u>	
Agarose-Gel (DNA) 1%	0,5 g (2,5 g) Agarose (high melting point) 50 mL (250 mL) dH <sub>2</sub> O aufkochen, abkühlen lassen, gießen, aushärten lassen
8mM NaOH	
10 mM Tris-HCl, pH 8,5	mit HCl auf pH 8,5 einstellen
50x TAE-Puffer pH 7,8	2 M Tris-Base

Probenauftragspuffer1	50 mM EDTA pH 7,8 (Essigsäure) 0,2 mL 50x TAE-Puffer 9,8 mL dH <sub>2</sub> O 80 mL Glycerin (87%)
Probenauftragspuffer2	0,2 g Bromphenolblau 15% Ficoll 0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylencyanol
3 M Natriumacetat pH 5,0 10 mM EDTA, pH 8,0	mit Essigsäure pH 5,0 einstellen mit NaOH auf pH 8,0 einstellen
<u>Northern Blot</u>	
DEPC-Wasser	1 mL DEPC auf 1 L dH <sub>2</sub> O über Nacht inkubieren, autoklavieren
0,1 M Phosphatpuffer pH 7	3,9% 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 6,1% 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> DEPC-Behandlung (s.o.)
Glyoxal	10 mL Glyoxal 1 Spatel Amberlite, 30-60 min schütteln pH > 5, Aliquots bei -20°C lagern
Proben-Lösungspuffer	5,4 µL 6 M Glyoxal 16,0 µL DMSO 3,0 µL 0,1 M Phosphatpuffer
Glycerol-DMSO-Gel Loading Buffer	50% Glycerol 10 mM Phosphatpuffer 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
Agarose-Gel (1,2%)	1,2% High Gelling Agarose (Sigma) 10 mM Phosphatpuffer pH 7
20x SSC	0,3 M Na <sub>3</sub> Citrat 3 M NaCl pH 7,0 (HCl/NaOH)
0,05 M NaOH 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20 mM Tris-HCl, pH 8	mit HCl auf pH 8 einstellen
<u>Southern Blot</u>	
Gel-Vorbehandlung	0,25 M HCl 0,4 N NaOH
2x SSC	20x SSC 1:10 mit dH <sub>2</sub> O
<u>Dot Blot</u>	
1,25 % NaOH 3 M Ammoniumacetat, pH 5,5	
<u>Nicht-radioaktive Hybridisierung</u>	
Hybridisierungspuffer	5x SSC 0,1% SDS 5% Dextransulfat 1/20 Liquid Block (Kitkomponente Gene Images CDP-Star Detection Module) ad 1 L dH <sub>2</sub> O
Waschpuffer 1	0,2x SSC 0,2% SDS
Waschpuffer 2	0,1x SSC 0,2% SDS
Puffer A (10x)	100 mM Tris Base 300 mM NaCl pH 9,5 mit HCl
Blocking-Lösung	1/10 Liquid Block (Kitkomponente Gene Images CDP-Star Detection Module)

Antikörper-Lösung	1x Puffer A 0,5% BSA 1/5000 Anti-Fluorescein-AP-Konjugat (Kitkomponente Gene Images CDP-Star Detection Module)
Waschpuffer 3	1x Puffer A 0,3% Tween 20 1x Puffer A
<u>ELISA</u>	
Beschichtungspuffer	0,05 M Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 9,5 (Sigma C3041)
Waschpuffer	5 PBS-Tabletten/L dH <sub>2</sub> O (= pH 7,4) 0,15% Tween 20
Blocking Puffer	5 PBS-Tabletten/L dH <sub>2</sub> O (= pH 7,4) 1% BSA
Konjugat-Verdünnungspuffer	5 PBS-Tabletten/L dH <sub>2</sub> O (= pH 7,4) 0,5% BSA 0,01% Tween 80
<u>NPT-Aktivitätsassay</u>	
Extraktionspuffer	0,135 M Tris-HCl pH 6,8 20% Glycerin 4 mM Dithiothreitol
Assaypuffer	67 mM Tris-HCl pH 7,1 42 mM MgCl <sub>2</sub> 400 mM NH <sub>4</sub> Cl 40 µg Km-SO <sub>4</sub> /mL 2,5-10 µCi [ $\gamma$ - <sup>33</sup> P]-ATP/mL

## 2.5 Chemikalien und Reagenzien

[ $\gamma$ - <sup>33</sup> P]-ATP	NEN, Hartmann Analytics
Acrylamid/Bisacrylamid	BioRad
Agarose (high melting point)	Sigma, Promega
Alconox Detergenz	Alconox
Amberlite	Fluka
Ammoniumacetat	Riedel de Haën
Ammoniumchlorid	Sigma
Ammoniumpersulfat	Kodak
Ampicillin-Natrium-Salz	Sigma
Bacto-Agar	Difco
Bovines Serum Albumin (BSA), Fraktion V	Serva
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma
Carbonat-Bicarbonat-Puffer	Sigma
Chloroform	Merck
Coulter Clenz	Beckman Coulter
DEPC	Sigma
Dextran	Sigma
Dextransulfat	Amersham Pharmacia Biotech
Dithiothreitol	Serva
DMSO	Merck/Sigma
DNAzol	Gibco BRL
dNTPs	Amersham Pharmacia
EDTA	Sigma
Entwickler	Adefo-Chemie
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Ficoll	Serva
Fixierer	Tetenal
Formamid	Sigma/Merck

G418	Invitrogen
Glycerin	Merck
Glyoxal	Merck
H33342 und H33258 (Bisbenzimidide)	Fluka
Hygromycin B	Invitrogen
Isopropanol	Riedel-de Haën
Isoton II	Beckman Coulter
Kaliumacetat (KAc)	Merck
Kanamycin-Sulfat Km-SO <sub>4</sub> (50 mg/mL)	Sigma
LB Broth Base	Gibco BRL
Lipofectamine Plus	Invitrogen
Magnesiumchlorid	Merck, Promega
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Sigma
MOPS	Sigma
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Fluka
Na <sub>3</sub> -Citrat	Merck
NaCl	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Serva
Natriumacetat	Serva
Natronlauge	Merck
PBS	Gibco BRL
PBS-Tabletten	Sigma
Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio Rad
Puromycin	Sigma
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma
Salzsäure HCl	Merck
SDS	Bio Rad
SIGMA FASTp-Nitrophenyl Phosphate Tablet Set	Sigma
TEMED	Merck
TMB Substrat A und B	Pharmingen
Tris Base	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Trizol	Invitrogen
Trypsin-EDTA	Sigma
Tween 20 und Tween 80	Serva
Wasserstoffperoxid	Riedel-de Haën
Xylencyanol	Serva

## 2.6 Größenmarker

1 kb DNA Plus Ladder (Invitrogen)  
 1 kb Extension Ladder (Invitrogen)  
 100 bp DNA Ladder (Invitrogen)  
 0,24-9,5 kb RNA Ladder (Invitrogen)  
 0,16-1,77 kb RNA Ladder (Invitrogen)

## 2.7 Enzyme

Verschiedene Restriktionsendonukleasen (v. a. New England Biolabs, Roche Diagnostics: Asp718I)  
 Ampli-Taq (Perkin Elmer)  
 Avidin-horseradish Peroxidasekonjugat (Kit OptEIA Human MCP-1 Set, Pharmingen)  
 Calf Intestinal Phosphatase, CIP (New England Biolabs)  
 DNase I (Invitrogen)  
 Elongase (Invitrogen/Gibco)  
 Klenow-DNA Polymerase (New England Biolabs)  
 Quick T4-DNA-Ligase (New England Biolabs)  
 RNase (Boehringer Mannheim)  
 T4-DNA-Ligase (New England Biolabs)  
 T4-DNA-Polymerase (New England Biolabs)  
 T4-Polynukleotid Kinase, PNK (New England Biolabs)  
 Taq-DNA-Polymerase (Promega)

## 2.8 Antikörper

Goat Anti Human IgG Fc Fragment (2,4 mg/mL, Jackson Immuno Research Laboratories)  
 Goat Anti Human Kappa Light Chain Alkalische Phosphatase-Konjugat (Sigma A3813)  
 Weitere Antikörper sind in den verwendeten Kits enthalten (s. u.)

## 2.9 Kits

- 3'-Oligolabelling System (Amersham Bioscience)
- Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems)
- Big Dye Terminator Kit v.3.0 und v.3.1(Applied Biosystems)
- DNA Isolation Kit für Zellen und Gewebe (Roche)
- Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)
- Gene Images CDP-Star Detection Module (Amersham Bioscience)
- Gene Images Random Prime Labelling Module (Amersham Bioscience)
- Great EscAPE™ SEAP Reporter System 3 (Clontech)
- Kit OptEIA Human MCP-1 Set (Pharmingen)
- pCR2.1-TopoTA Cloning Kit (Invitrogen)
- Qiafilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
- Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)
- Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen)
- SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum-Taq (Invitrogen)

## 2.10 Geräte

ABI 3100 Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems
ABI Prism 373A Sequencer	Applied Biosystems
Autoklaven	Sauter
Brutschränke	WTB Binder, Heraeus
Coulter Epics Altra (Durchflusscytometer)	Beckman Coulter
Coulter Epics XL-MCL (Durchflusscytometer)	Beckman Coulter
Eismaschine	Scotsman
Gelkammern Blue Marine	Serva
Hybridisierungsöfen	Techne
Image Master VDS-CL	Amersham Biosciences
Kühl-, Gefrierschränke	Liebherr
Laminar Flow	BDK
Magnetrührer	Janke + Kunkel
Megafuge 2.0 R	Heraeus
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Finnpipette
Mikroskop	Olympus CK2
Mikrowelle	Sharp
Minifuge RF	Heraeus
Netzgeräte	LKB Bromma
Partikelzähler Z2	Coulter
PCR-Maschinen	Perkin Elmer (ABI), Bio Rad
pH-Meter	WTW
Phosphorimager	Molecular Dynamics
Phosphorimager FLA-3000	Fuji Film
Photometer Ultraspec 3100pro	Amersham Biosciences
Pipetten (0,1-1000 µL )	Eppendorf, Roth, Finnpipette, Gilson
Plate Washer	TECAN
Rotoren SS34, GS 3	Sorvall
Schüttelinkubator	Infors
Spectra-Fluor Plus	TECAN
Speed Vac Concentrator	Bachofer
Spülmaschine	BHT
Stepper	Eppendorf
Taumler	Edmund Bühler, New Brunswick Scientific
Thermoblöcke und -mixer	Eppendorf
Tischzentrifugen	Heraeus, Eppendorf

UV-Transilluminator (312 nm)  
Vortex  
Waagen  
Wasserbad  
Zentrifuge RC5C

Janke + Kunkel  
Sartorius, Mettler Toledo  
B. Braun  
Sorvall

## 2.11 Sonstiges Material

6-, 12-, 24-, 48-, 96-Well Platten  
Aluminiumfolie  
Aufbewahrungsboxen  
CentriSep-Säulen  
Cryotubes  
Dispensette  
Einfrierboxen -70°C  
Einweghandschuhe, Nitril  
Elisa-Platten  
Exponierkammern, Dr. Goos  
Faltenfilter  
Filterpapier  
Frischhaltefolie  
Gewebekulturflaschen  
Glaswaren  
Hyperfilm ECL  
Kimwipes  
Mikrotiterplatten  
Neubauer-Zählkammer  
Nylonmembranen  
Parafilm  
Petrischalen  
Phosphocellulose P81  
Plastikpipettenspitzen  
Plastikreaktionsgefäße  
Plate Sealers  
Probengefäße Zellzählung  
Quarzküvetten  
Röntgenfilme  
Saranfolie  
Scott Kosmetiktücher  
Sterilfilter  
Stratacooler (-20°C)  
Zentrifugenbecher  
Zentrifugenröhrchen

Greiner, Nunc  
Haushaltsware  
Roth  
Princeton Separations  
Nunc  
Brand  
Stratagene  
Ansell  
Greiner  
DuPont  
Schleicher und Schüll  
Whatman  
Haushaltsware  
Geiner  
Schott  
Amersham Pharmacia Biotech  
Kimberly-Clark  
Nunc  
Marienfeld  
Amersham, Roche  
American National Can  
Greiner  
Whatman  
Eppendorf, Roth  
Eppendorf, Sarstedt  
Dynex Technologies  
Beckman Coulter  
Hellma, Amersham Pharmacia  
Kodak  
Dow Chemical Company  
Kimberly-Clark  
Schleicher und Schüll  
Stratagene  
Sorvall  
Greiner, Nunc

## 3. Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

Wenn nicht anders angegeben, stammen die Methoden gegebenenfalls modifiziert aus Sambrook et al 1989 oder Ausubel et al 1994 updated. Bei der Verwendung von Kits wurden die Angaben des Herstellers befolgt.

#### 3.1.1 Bakterienkultur und –lagerung

Bakterien (DH5 $\alpha$ , TopTen) können bei 37°C auf Agarplatten oder in Flüssigmedium (unter Schütteln) kultiviert werden. Für die vorliegende Arbeit wurde ausschließlich LB-Medium, z. T. mit verschiedenen Antibiotika wie Kanamycin und Ampicillin, verwendet.

Um eine Bakterienkultur länger aufzubewahren, wird ein Glycerinstock angelegt. Dafür mischt man 700  $\mu$ L Bakterienkultur mit 300  $\mu$ L Glycerinstockmedium und lagert den Stock bei –20°C bzw. –70°C ein.

#### 3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-DNA aus Bakterien wird mittels eines Qiagen Kits isoliert. Je nach Maßstab verwendet man den QIAprep Spin Miniprep Kit (bis 20  $\mu$ g DNA) oder den QIAfilter Plasmid Maxi Kit (bis 500  $\mu$ g DNA). Beide Methoden beruhen auf demselben Prinzip: Die Bakterien werden alkalisch lysiert. Durch das Auftragen auf eine Säule adsorbiert die Plasmid-DNA selektiv an eine Silicium-Gel-Membran und kann durch einen salzarmen Puffer wieder eluiert werden (siehe Qiagen Handbücher).

#### 3.1.3 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebekulturzellen

Genomische DNA aus Gewebekulturzellen wurde mit verschiedenen Methoden isoliert. DNAzol Reagenz (Gibco/Invitrogen) ermöglicht eine sehr schnelle Aufreinigung. 1 bis  $3 \times 10^7$  Zellen werden in 1 mL DNAzol Reagenz aufgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgt durch ein Guanidin-Detergens. Das Reagenz ist außerdem salzhaltig und erlaubt die selektive Fällung der genomischen DNA durch Zugabe von  $\frac{1}{2}$  Volumen 100% Ethanol. Nach zwei Waschschrritten mit 75% Ethanol löst man die DNA in 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Eine alternative, aber zeitaufwändigere Methode bietet der DNA-Isolierungskit für Zellen und Gewebe von Roche. Es werden 1 bis  $5 \times 10^7$  Zellen eingesetzt. Die Zelllyse beruht hier auf einem starken anionischen Detergens und einer zweistündigen Proteinase K-Behandlung. Die genomische DNA wird außerdem durch eine RNase-Behandlung von RNA gereinigt. Es folgt ein Proteinfällungsschritt mit anschließender Zentrifugation. Die DNA im Überstand wird mittels Isopropanol gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird in 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 gelöst. Die Ausbeute liegt bei ca. 100  $\mu$ g genomischer DNA pro  $1 \times 10^7$  Zellen.

#### 3.1.4 Aufreinigung von DNA

Um Plasmid-DNA aus Agarose-Gelen aufzureinigen, wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Plasmid-DNA in Lösungen wurde über den QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Sequenzierprodukte wurden vor der Analyse über CentriSep-Säulen (Princeton Separations) aufgereinigt.

#### 3.1.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebekulturzellen

Gesamt-RNA aus Gewebekulturzellen kann einfach und schnell mit Trizol (Invitrogen) isoliert werden. Trizol ist eine Ein-Phasen-Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Die Integrität der RNA bleibt erhalten, während die Zellen aufgeschlossen und andere Zellkomponenten aufgelöst werden. Durch Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation werden die organischen Komponenten von den wässrigen getrennt. Somit kann die RNA, die sich ausschließlich in der wässrigen Phase befindet, von den übrigen Zellkomponenten in der organischen Phase abgetrennt werden. Auch die genomische DNA bleibt in der Interphase zurück. Die Fällung mit Isopropanol und Waschen mit 75 - 80% Ethanol ermöglichen die saubere Rückgewinnung der RNA aus dem wässrigen Überstand. Für  $1 \times 10^7$  Zellen wird etwa 1 mL Trizol eingesetzt. Der Ertrag an RNA für

Suspensionszellkultur liegt bei mindestens  $10 \mu\text{g}/1 \times 10^6$  Zellen (Durchführung nach Angaben des Herstellers).

### 3.1.6 Modifikation von DNA- Molekülen

**Restriktionsendonukleasen** hydrolysieren die DNA sequenzspezifisch. An kurzen, meist palindromischen Erkennungssequenzen (4 - 8 bp) entstehen überhängende (sticky) oder stumpfe Enden (blunt ends). Es werden ca. 1 - 3 Units des Enzyms pro  $\mu\text{g}$  DNA mit dem entsprechenden Puffer (Angaben laut Hersteller) eingesetzt und der Reaktionsansatz für etwa 1 - 2 Stunden bei der empfohlenen Temperatur inkubiert.

Das Enzym **CIP (Calf Intestinal Phosphatase)** dephosphoryliert freie DNA-Enden (hydrolysierte DNA). Die Reaktion findet in einer Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  statt und verhindert später die ungewollte Re-Ligation des DNA-Moleküls mit sich selbst. Durch Zugabe von EDTA und Inkubation bei  $65^\circ\text{C}$  wird die CIP inaktiviert oder sie wird durch Gelelektrophorese von der DNA abgetrennt.

Die entgegengesetzte Reaktion – die Phosphorylierung von DNA-Fragmenten – erfolgt durch die **T4-Polynukleotid Kinase (PNK)**. Das Enzym benötigt hierfür eine Reaktionstemperatur von  $37^\circ\text{C}$  (30 min) und ATP, dessen  $\gamma$ -Phosphat an das 5'-Hydroxyl-Ende des Polynukleotids angehängt wird. Synthetische Oligonukleotide müssen phosphoryliert werden, um ligiert werden zu können. Außerdem kommt die PNK bei der radioaktiven Markierung von DNA zum Einsatz.

Zum Auffüllen von 5'-überhängenden, kohäsiven DNA-Enden wird die **Klenow-DNA-Polymerase** verwendet. Das große Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) besitzt noch die Fähigkeiten zur Polymerisation an 5'-Überhängen und die 3'-5'-Exonukleaseaktivität, hat aber die 5'-3'-Exonukleaseaktivität verloren. Zu  $1 \mu\text{g}$  DNA gibt man 1 Unit Klenow-Fragment und inkubiert 15 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ . Die Reaktion stoppt man durch Zugabe von 10mM EDTA (f. c.) und eine 20-minütige Inkubation bei  $72^\circ\text{C}$ .

Um „blunt ends“ an 3'-Überhängen zu generieren, wird die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der **T4-DNA-Polymerase** genutzt. Dieses Enzym kann außerdem in 5'-3'-Richtung auffüllen. Der Abbau erfolgt bei  $12^\circ\text{C}$  (1 Unit/ $\mu\text{g}$  DNA, 15 min). Gestoppt wird durch Zugabe von EDTA (f. c. 10 mM) und eine 20-minütige Inkubation bei  $75^\circ\text{C}$ .

**DNase I** ist eine Endonuklease, die doppelsträngige DNA degradiert. In Gegenwart von  $\text{Mn}^{2+}$  führt sie zu Doppelstrangbrüchen, mit  $\text{Mg}^{2+}$  zu Einzelstrangbrüchen im Doppelstrang. Die Reaktionszeit beträgt 15 min bei  $37^\circ\text{C}$ . Abgestoppt wird durch Zugabe von EDTA und 10-minütige Inkubation bei  $65^\circ\text{C}$ . Zum Entfernen genomischer DNA-Kontaminationen in aufgereinigter zellulärer Gesamt-RNA empfiehlt es sich, RNase-freie DNase I zu verwenden.

### 3.1.7 Gelelektrophorese

DNA-Fragmente werden in 0,8 - 1% (w/v) TAE-Agarose-Gelen bei einer Spannung von ca. 6 - 8 V/cm ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Agarose-Gel enthält Ethidiumbromid (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), um die DNA anschließend bei UV-Anregung sichtbar zu machen. Glycerin bzw. Ficoll und Bromphenolblau/Xylencyanol im Probenauftragspuffer ermöglichen das Absinken der Proben in die Geltaschen und die Visualisierung der Lauffront.

Die Auftrennung von RNA erfolgt in einem Agarose-Gel in 0,01 M Phosphatpuffer. Der Probenauftragspuffer enthält zusätzlich Glyoxal und DMSO, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Für alle Lösungen wird RNase-freies DEPC-Wasser verwendet. Die angelegte Spannung beträgt 3 - 4 V/cm. Durch permanentes Rühren wird der pH-Wert des Laufpuffers (0,01 M Phosphatpuffer) konstant bei 7 gehalten. RNA-Gele werden i. d. R. nach dem Gellauf in EtBr-Lösung (ca. 0,5 - 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) gefärbt.

### 3.1.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung einer DNA-Konzentration von 10 - 200 ng kann ein Aliquot einer Probe neben Standard-DNA-Lösungen mit bekannter Konzentration auf ein Gel aufgetragen werden. Nach etwa 5 - 10 min bei einer Spannung von ca. 6 - 8 V/cm lässt sich die Konzentration der Probe durch optischen Vergleich der Bandenintensitäten abschätzen.

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung wird mittels eines Spektralphotometers das Absorptionsspektrum der Probe im Wellenlängenbereich 220 - 360 nm gemessen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Der bei dieser Wellenlänge gemessene Wert dient zur rechnerischen Ermittlung der Konzentration c:

$$c = \text{OD}_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{nmol}/A_{260}$$

Dabei steht  $\text{nmol}/A_{260}$  für den OD-Wert der jeweiligen Nukleinsäure. Allgemein gilt:

1  $\text{OD}_{260}$  entspricht:                    50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dsDNA  
    40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNA  
    33  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ssDNA

### 3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Will man ein bestimmtes DNA-Fragment in einen Vektor einfügen, bedient man sich der DNA-Ligase. Diese fügt spezifisch hydrolysierte Fragmente an passenden Enden („sticky ends“ oder „blunt ends“) zusammen (Ligation). Das Enzym verknüpft zwei DNA-Moleküle über eine Phosphodiester-Bindung, wenn das 3'-Ende eine OH-Gruppe und das 5'-Ende eine Phosphatgruppe trägt. Der Vorgang benötigt ATP als Energiequelle. Für die Reaktion werden ca. 100 ng des Vektors und die 3 – 5-fache äquimolare Menge des Inserts in einem 20  $\mu\text{L}$ -Ansatz eingesetzt.

Der Reaktionsansatz besteht i. A. aus folgenden Komponenten:

- linearisierter Vektor
- DNA-Insert
- 1x Ligationspuffer (enthält ATP)
- 1 Unit T4-DNA-Ligase

Die Ligation kann entweder 3 h bei RT oder über Nacht bei 15°C erfolgen.

Bei der Verwendung des pCR2.1-TopoTA Cloning Kits (Invitrogen) macht man sich die Eigenschaft der DNA-Polymerase zu Nutze, an die Enden eines PCR-Produkts ein Adenin anzuhängen (Template-unabhängige terminale Transferase-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase). Der im Kit enthaltene Klonierungsvektor pCR2.1 liegt linear vor und weist an den Enden ein überhängendes Thymidin auf. So kann jedes beliebige PCR-Produkt in die „Multiple Cloning Site“ (DNA-Bereich mit mehreren singulären Restriktionsschnittstellen) eingefügt werden (Durchführung nach Angaben des Herstellers).

### 3.1.10 Herstellung kompetenter Zellen

Um Plasmid-DNA in Bakterien einschleusen zu können (= Transformation), müssen die Bakterien kompetent (d. h. aufnahmefähig) sein. Dies erreicht man mit einer Prozedur, die das wiederholte Abzentrifugieren und Resuspendieren der Zellen in speziellen Puffern bei 4°C umfasst. Zuvor muss die Bakterienkultur zu einer Optischen Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) von ca. 0,5 - 0,7 heranwachsen. Die Bakterien sind dann in der exponentiellen Wachstumsphase. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt (8 min, 6000 x g, 4°C) wird das Zellpellet in 150 mL Puffer Tfb 1 aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert, nach dem zweiten Zentrifugationsschritt (8 min, 6000x g, 4°C) in 15 mL Puffer Tfb 2 aufnehmen und 15 min auf Eis inkubieren. Es ist darauf zu achten, dass die Zentrifugation bei 4°C durchgeführt wird und die Zellsuspension immer auf Eis aufbewahrt wird. Das Aliquotieren (100  $\mu\text{L}/\text{Gefäß}$ ) erfolgt bei 4°C in eisgekühlte Gefäße, die sofort schockgefroren werden (Trockeneis/Ethanolbad oder flüssiger Stickstoff). Gelagert werden die kompetenten Zellen bei -70°C.

#### 3.1.11 Transformation

Als Transformation bezeichnet man das Einschleusen von Plasmid-DNA in Bakterien. Dies kann über Elektroporation oder Hitzeschock-Transformation erfolgen. Eine wichtige Voraussetzung für eine Transformation ist die Kompetenz der Bakterien (siehe 3.1.10).

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich durch Hitzeschock transformiert. Ein Aliquot der kompetenten Zellen wird auf Eis aufgetaut. Es wird maximal 1/10 Volumen des Bakterienaliquots an DNA-Lösung aus dem Ligationsansatz hinzupipettiert (ca. 100 ng), leicht vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die DNA-Aufnahme erfolgt durch kurzzeitige Erhöhung der Temperatur (90 sec) auf 42°C. Dann wird der Ansatz wieder für 1 min auf Eis gestellt, mit antibiotikafreiem Medium auf 1 mL Gesamtvolumen aufgefüllt und abermals 5 min auf Eis inkubiert. Darauf folgt eine ca. 45-minütige Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler. Anschließend werden die Zellen kurz abzentrifugiert (max. 20 sec), ca. 800  $\mu\text{L}$  des Überstandes verworfen, das Pellet resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert. Bei der Retransformation eines fertigen Vektors reichen geringere Mengen an DNA aus (10 pg – 1 ng für die Transformation). Außerdem werden nur 10  $\mu\text{L}$  der transformierten Zellen ausplattiert, um zu verhindern, dass die Platte zu dicht bewachsen wird.

### 3.1.12 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifikation spezifischer Abschnitte einer DNA. Der gewünschte Abschnitt wird upstream (5'-Ende) und downstream (3'-Ende) durch einzelsträngige Oligomere (Primer) begrenzt, die mit der komplementären DNA-Sequenz hybridisieren und eine nahezu gleiche Schmelztemperatur besitzen. Sie dienen als Ansatzstelle für die DNA-Polymerase, welche die DNA als Matrize benutzt, um einen komplementären Strang zu synthetisieren. Durch wiederholte Denaturierungs-, Hybridisierungs- (bzw. Annealing-) und Elongationszyklen mit jeweils spezifischen Temperaturen wird so der Abschnitt zwischen den Primern amplifiziert. Die Polymerase muss dabei hitzestabil sein. Deshalb verwendet man die Taq-DNA-Polymerase aus dem hitzebeständigen Mikroorganismus *Thermophilus aquaticus*. Das Annealing ist der entscheidende Schritt für die PCR und wird von der Temperatur und der Magnesiumchloridkonzentration beeinflusst. Über diese Parameter wird die Spezifität und Effizienz der Primerbindung bestimmt und die PCR optimiert.

Ein Standardansatz enthält:

0,2 mM	dNTPs
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
1x	PCR-Puffer
0,04 Units/μL	Taq-DNA-Polymerase
0,2 pmol/μL	Primer forward
0,2 pmol/μL	Primer reverse
	Matrizen-DNA

Ist die Matrizen-DNA ein Plasmid, setzt man etwa 10 pg – 1 ng DNA ein. Erfolgt die PCR mit genomischer DNA als Matrize, verwendet man etwa 0,2 – 1 μg DNA.

Ein allgemeines PCR-Programm setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

Denaturierung:	94°C	bis zu 1:00 min	} 25-35 Zyklen
	94°C	0:05 - 0:15 min	
Annealing:	50 - 65°C	0:05 - 0:15 min	
Elongation:	68°C/72°C	ca. 1:00 min	
	68°C/72°C	7:00 min	

Der erste Denaturierungsschritt ist bei Plasmid-DNA oder kurzen DNA-Fragmenten als Matrize nicht zwingend notwendig. Vor allem bei PCRs mit genomischer DNA als Matrize ist eine längere initiale Denaturierung erforderlich, um die DNA weitestgehend zu Einzelsträngen zu denaturieren. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und der gewünschten Stringenz der PCR-Reaktion. Die Elongation findet je nach DNA-Polymerase bei 68°C (Elongase) oder 72°C (Taq-DNA-Polymerase) statt. Die Dauer dieses Schritts hängt von der Länge des gebildeten Produkts ab. Ein finaler Elongationsschritt ist empfehlenswert, um begonnene Fragmente zu vervollständigen. Die Anzahl der Zyklen kann bis zu 35 erhöht werden, wenn davon ausgegangen werden muss, dass die Matrize in geringer Menge vorliegt. Unter Umständen muss man eine „nested PCR“ anschließen. Dazu wird ein Teil der ersten Reaktion als Matrize eingesetzt und ein neuer Ansatz pipettiert, wobei die Primer innerhalb des gebildeten Fragments liegen. Dies ist vor allem empfehlenswert, wenn man geringste DNA-Mengen nachweisen möchte.

Ein häufig verwendetes PCR-Programm ist folgendes zur Überprüfung von transformierten Bakterienstämmen. Als Matrize wird ein transformierter Klon gepickt, in Wasser resuspendiert und direkt mit o. g. Standardansatz unter folgenden Reaktionsbedingungen eingesetzt:

Denaturierung:	94°C	0:30 min	} 30 Zyklen
	94°C	0:10 min	
Annealing:	55°C	0:10 min	
Elongation:	72°C	1:00 min	
	72°C	7:00 min	

### 3.1.13 RT-PCR (Reverse Transkription-PCR)

Zur Herstellung von DNA aus RNA wird das Enzym Reverse Transkriptase verwendet. Sie arbeitet als RNA-abhängige DNA-Polymerase. Meist dient eine „messenger RNA“ (mRNA) als Template. Die Reverse Transkriptase synthetisiert ausgehend von einem Primer eine cDNA („complementary DNA“). Eine zusätzliche Funktion ist die RNase H-Aktivität. Dabei baut die Reverse Transkriptase wie eine

Exonuklease den RNA-Strang eines hybriden RNA:DNA-Doppelstrangs ab. Dies kann sowohl vom 5'-Ende als auch vom 3'-Ende aus geschehen. Es resultieren einzelsträngige cDNAs, die wiederum als Matrize für eine DNA-abhängige DNA-Polymerase dienen. Der RT/Platinum Taq Mix aus dem SuperScript One-Step RT-PCR-Kit von Invitrogen enthält sowohl die Reverse Transkriptase als auch eine Taq-DNA-Polymerase. Ein Abstoppen der cDNA-Synthese als Zwischenschritt vor der PCR-Amplifikation ist nicht notwendig. Die nötigen Nukleotide, Kationen und sonstigen Reaktionsbedingungen werden vom entsprechenden Reaktionspuffer geliefert. Die cDNA-Synthese erfolgt in einem anfänglichen 30-minütigen Schritt bei 50°C. Daraufhin werden die Hybrid-Doppelstränge für 2 min bei 94°C denaturiert. Anschließend folgt eine PCR-Amplifikation mit den üblichen drei Schritten über mehrere Zyklen (35x) und einer finalen Elongation über mehrere Minuten. Es empfiehlt sich, vor der RT-PCR die eingesetzte RNA mit DNase I (RNase-frei) zu behandeln. So kann man falsche Signale ausschließen, die von genomischen DNA-Kontaminationen der RNA-Präparation herrühren.

### 3.1.14 Sequenzierung

In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Proben mittels Cycle Sequencing sequenziert. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Sanger Sequenzierung. Als Terminatoren werden unterschiedlich fluoreszierende Didesoxynukleotide verwendet. Farbterminatoren, dNTPs, DNA-Polymerase und MgCl<sub>2</sub> werden im Big Dye Terminator Kit von Applied Biosystems geliefert. Hinzu kommen 0,5µg Plasmid-DNA oder 3 – 100 ng PCR-Produkt als Matrize und 5 pmol des Primers. Das Temperaturprofil des Sequenzierungsprogramms ist wie folgt:

96°C	0:10 min	} 25 Zyklen
60°C	0:05 min	
60°C	4:00 min	

Das Sequenzierprodukt wird vor der Analyse durch den ABI Prism 373A bzw. den ABI 3100 Avant Genetic Analyzer über Centrisep Spin Columns (Princeton Separations) aufgereinigt.

### 3.1.15 Southern Blot (Alkalischer Transfer)

Durch die Wirkung von Kapillarkräften kann DNA aus dem Agarose-Gel (3.1.7) auf eine Nylonmembran (Hybond N+ von Amersham) übertragen werden. Vor dem Transfer muss im Falle von genomischer DNA diese im Gel mit HCl und NaOH depuriniert und denaturiert werden. Die Kapillarkräfte werden erzeugt, indem man die Nylonmembran auf das vorbehandelte Gel legt und darauf in NaOH getränktes Whatmanpapier und viele Papierhandtücher stapelt. Dieser Stapel wird über Nacht mit einem leichten Gewicht beschwert. Nach erfolgtem Transfer werden die Taschen des Gels auf der Membran markiert. Durch zweiminütige UV-Exposition (312 nm) der Nylonmembran (DNA-Seite in Richtung UV-Quelle) wird die DNA kovalent und irreversibel gebunden.

### 3.1.16 Northern Blot

Zur Übertragung von RNA auf Nylonmembranen (Roche) wird die RNA im Gel (3.1.7) ebenfalls mit NaOH denaturiert und anschließend in 20 x SSC geschwenkt. Der Blotaufbau und die Blottingprozedur werden ansonsten durchgeführt wie in 3.1.15 für Southern Blots beschrieben. Northern und Southern Blots können an der Luft getrocknet für längere Zeit aufbewahrt werden oder sofort zur nicht-radioaktiven Hybridisierung eingesetzt werden.

### 3.1.17 Dot Blot

Mit einem Dot Blot wird die Kopienzahl eines Gens in genomischer DNA bestimmt. Als Konzentrationsstandard dient eine Verdünnungsreihe aus Plasmid-DNA, die das nachzuweisende Gen enthält. Abgestufte Mengen an DNA werden in NaOH-Puffer und Ammoniumacetatlösung aufgenommen, über ein 96-Well-Manifold mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und dadurch auf einer Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) gebunden. Die Detektion erfolgt mittels der nicht-radioaktiven Hybridisierung.

### 3.1.18 Nicht-radioaktive Markierung einer Hybridisierungssonde

Die Markierung erfolgt durch Random Prime Labelling (*Gene Images<sup>TM</sup>* Random Prime Labelling Module von Amersham). Dabei werden Nonamere mit zufälligen Sequenzen als Primer verwendet.

Diese lässt man mit einer genspezifischen, denaturierten DNA-Matrize hybridisieren. Das exonukleasefreie Klenow-Fragment führt dann bei 37°C eine Synthesereaktion durch. Im Nukleotidmix sind die dTTPs zum Teil durch Fluoreszin-11-dUTPs ersetzt, so dass eine fluoreszinmarkierte Sonde generiert wird.

Oligo-Sonden werden durch die Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase mit Fluoreszin-11-dUTPs markiert (3'-Oligolabelling System von Amersham). Das Enzym fügt am 3'-Ende des Oligonukleotids einige fluoreszinmarkierte dUTPs an.

### 3.1.19 Nicht-radioaktive Hybridisierung

Um bestimmte Gene oder Sequenzabschnitte auf einem Blot zu lokalisieren, wird die Nylonmembran mit einer markierten DNA- oder RNA-Sonde (1.16) hybridisiert, die dann spezifisch an ihr komplementäres Gegenstück bindet. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei einer spezifischen Temperatur (z.B. 60 - 65°C für Southern Blots, 65°C für Northern Blots, 50°C mit Oligo-Sonden). Nach unterschiedlich stringenten Waschschrritten (SSC-Konzentrationen und Temperaturen sind je nach Stringenz variabel) folgt ein Blocking-Schritt: Unspezifische Bindungsstellen der Membran werden mit BSA gesättigt. Die fluoreszinmarkierten Hybride werden bei der Inkubation mit einem Anti-Fluoreszin-Antikörper erkannt. An diesen Antikörper ist eine Alkalische Phosphatase gekoppelt. Im nächsten Schritt wird überschüssiges Konjugat abgewaschen. Bei Zugabe eines stabilisierten Dioxetan-Substrats wird dieses durch die sondengebundene Alkalische Phosphatase abgebaut. Diese Reaktion führt zu einer Lichtreaktion, die auf einem Röntgenfilm oder mit dem Image Master VDS-CL (Amersham Bioscience) sichtbar gemacht werden kann (Gene Images CDP-Star Detection Module, Amersham Bioscience).

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

**a) Zelllinien, Medien und Supplemente:** In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich CHO-Zellen der Linie DG44 verwendet (Urlaub, Mitchell, Kas, Chasin, Funanage, Myoda, and Hamlin 1986). Für deren Standardkultivierung wurde das Medium CHO-S-SFMII (Gibco/Invitrogen), supplementiert mit Hypoxanthin (5 mM) und Thymidin (0,8 mM), eingesetzt. Dieses gebrauchsfertige Medium ist serumfrei mit einem niedrigen Proteingehalt (weniger als 100 µg/ml) und optimiert für CHO-Zellen in Suspensionskultur. Die Supplementierung mit Hypoxanthin und Thymidin (HT) ist für CHO-DG44 essentiell auf Grund einer Deletion im *dhfr*-Gen.

In einzelnen Transfektionsexperimenten wurde zur Steigerung der Transfektionseffizienz (laut Hersteller) Opti-MEM I, ein serumreduziertes Medium verwendet. Es ist eine Modifikation von Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), gepuffert mit HEPES und Natriumkarbonat, supplementiert mit HT, Natriumpyruvat, L-Glutamin, Spurenelementen und Wachstumsfaktoren (Gibco/Invitrogen).

**b) Kulturbedingungen:** Alle Zellen wurden in Plastikflaschen oder -schalen in einem CO<sub>2</sub>-begasbaren Brutschrank bei 90% Luftfeuchtigkeit, 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. CHO-Suspensionszellen wurden für die Kultivierung über 2 Tage mit ca. 2x10<sup>5</sup> Zellen pro ml eingesät, über 3 Tage mit 1 - 1,5x10<sup>5</sup> Zellen/ml.

**c) Einfrieren und Auftauen:** Das Einfrieremedium für CHO-DG44-Zellen setzt sich zusammen aus gleichen Mengen an CHO-S-SFMII + HT und konditioniertem CHO-S-SFMII + HT und 7,5 % DMSO. Die Zellen werden in 1 mL-Aliquots mit je 1x10<sup>7</sup> Zellen über Nacht langsam bei -70°C eingefroren. Am nächsten Tag können die Zellen in flüssigem Stickstoff eingelagert werden. Das Auftauen erfolgt möglichst schnell durch Erwärmen in der Hand und sofortiges Resuspendieren in 10 mL kaltem Kulturmedium (CHO-S-SFMII + HT). Die Zellen werden 5 min bei 600 rpm abzentrifugiert und in 25 mL Kulturmedium aufgenommen.

### 3.2.2 Transfektion von Eukaryotenzellen

Sowohl der stabile als auch der transiente Transfer von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen wurde mit kationischen Lipiden (Lipofectamine Plus) der Firma Invitrogen durchgeführt. Bis zu 1,3 µg der gewünschten Plasmid-DNA werden in 100 µL serumfreiem Medium mit 4 µL Lipofectamine und 6 µL Plus-Reagenz inkubiert. Die Transfektion der Zellen erfolgt während 3 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. CHO-DG44-Zellen werden für die Transfektion mit 6x10<sup>5</sup> Zellen pro Well in einer 6-Well Schale eingesät. Nach ca. 48 h Kultivierung in einem Gesamtvolumen von etwa 3 mL können die Zellen geerntet werden (transiente Transfektion) oder einer Selektion unterworfen werden (stabile Transfektion). Im Falle einer Selektion wird das entsprechende Antibiotikum in einer Konzentration zur Zellsuspension gegeben, die zuvor durch Titrationsexperimente an untransfizierten Zellen ermittelt

wurde. Sie liegt leicht über der Mindestkonzentration, bei der im Vorversuch kein Zellwachstum mehr vorhanden war (MIC = Minimum Inhibitory Concentration). Selektioniert man auf DHFR, wird dem Medium lediglich kein HT mehr zugesetzt. Um eine mögliche Kontamination der Zellkultur zu vermeiden, gibt man nach der Transfektion eine Woche lang Gentamycin (50 µg/mL) zum Medium hinzu.

### 3.2.3 Durchflusscytometrie (FACS-Analyse)

In einem FACS-Gerät (Fluorescence Activated Cell Sorter) werden einzelne Zellen oder Partikel hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom angeordnet und einzeln untersucht. Es können verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften gleichzeitig gemessen werden. In weniger als einer Minute werden für mehrere tausend Zellen die relative Zellgröße, Granularität, sowie drei verschiedene Fluoreszenzintensitäten bestimmt (5 Parameter). Dies ermöglicht eine objektive Qualifizierung und Quantifizierung der Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellgröße und –granularität über Vorwärts- und Rechtwinkelstreuung sowie die Fluoreszenz von intrazellulärem GFP (Green Fluorescent Protein) bestimmt. Zur Vorbereitung wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen abzentrifugiert und in 1mL PBS aufgenommen. Zur Messung stand ein Durchflusscytometer der Firma Beckmann Coulter zur Verfügung.

## 3.3 Proteinchemische Methoden

### 3.3.1 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA dient zum spezifischen, quantitativen Nachweis von Antikörpern, löslichen Antigenen oder Zelloberflächen-Antigenen. Um die Menge des Produkts (MCP1 oder ein Immunglobulin G) im Zellkulturüberstand spezifisch zu bestimmen, wurde hier ein Sandwich-ELISA angewandt. Im ersten Schritt wird dabei ein Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Als nächstes werden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Daraufhin inkubiert man die Probe mit dem Antigen in verschiedenen Verdünnungsstufen auf der beschichteten Platte. Dabei erfolgt die spezifische Bindung des Antigens an den Antikörper. Bevor ein zweiter Antikörper zugegeben wird, erfolgt hier – wie auch nach allen vorigen Schritten – eine Waschung. Dieser zweite Antikörper ist ebenfalls spezifisch für das nachzuweisende Antigen und außerdem mit einem Enzym gekoppelt (Alkalische Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase). Bei Zugabe eines Substrats setzt das gekoppelte Enzym dieses um, was wiederum zu einer Farbreaktion führt. Mittels photometrischer Bestimmung der Absorption kann schließlich die Quantifizierung erfolgen.

Die Berechnung des Produkttiters (mg/L) bezieht sich auf eine Standardkurve, für die auf jeder Platte das aufgereinigte, rekombinante Antigen aufgetragen wird. Der ELISA zum Nachweis von MCP1 wird mit Antikörpern und Standard des Kits OptEIA Human MCP1 Set und TMB-Substrat (beides Pharmingen) durchgeführt. Für die Quantifizierung von Immunglobulin G steht ein IgG-Standard (Boehringer Ingelheim) zur Verfügung. Der Beschichtungsantikörper ist ein Goat Anti Human IgG Fc Fragment (Jackson Immuno Research Laboratories), der zweite Antikörper ein Goat Anti Human Kappa Light Chain Alkalische Phosphatase-Konjugat (Sigma). Zum Nachweis der Alkalischen Phosphatase dient das FASTp-Nitrophenyl Phosphat Tablet Set (Sigma).

Zusätzlich zum Produkttiter (mg/L) wird außerdem die Spezifische Produktivität (pg/Zelle x Tag = pg/c\*d) bestimmt. Folgende Formel liegt hier zu Grunde:

$$\left( \frac{\text{tatsächlicher Titer}}{\text{mittlere Zellzahl} \times \text{Kulturzeit}} \right) \times 24 \text{ h} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der tatsächliche Titer bezeichnet den gemessenen Titer abzüglich des Titers, der von der vorigen Passage übertragen wurde. Die mittlere Zellzahl steht annäherungsweise für die Anzahl der Zellen, die im berücksichtigten Zeitraum durch Teilung entstanden sind. Berechnet wird dies mit der Formel:

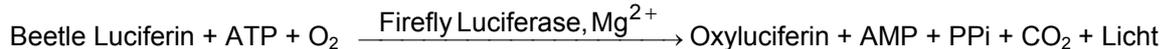
$$\frac{\text{Lebendzellzahl bei Ernte} - \text{Zellzahl bei Einsaat}}{\ln\left(\frac{\text{Lebendzellzahl bei Ernte}}{\text{Zellzahl bei Einsaat}}\right)}$$

### 3.3.2 Protein-Quantifizierung nach Bradford

Der Bradford-Test beruht auf der unspezifischen Bindung des Farbstoffes „Coomassie Brilliant Blue“ (Protein Assay, Bio Rad) an Proteine. Das Absorptionsmaximum, bei dem die photometrische Messung erfolgt, liegt im Bereich von 590 nm. Als Standard zur Quantifizierung dient eine Verdünnungsreihe mit BSA.

### 3.3.3 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Luciferase wird als Reportergen eingesetzt, da das Enzym eine Biolumineszenz-Reaktion auslöst, die einen schnellen, quantitativen und sensitiven Nachweis ermöglicht. Aus Luciferase-exprimierenden Zellen oder Geweben wird ein Lysat hergestellt. Nach Substratzugabe sollte die Lumineszenz möglichst rasch mittels eines Luminometers gemessen werden. Folgende Reaktion findet statt:



Bei einem dualen Assay wird gleich im Anschluss an die Messung der Firefly-Luciferase-Aktivität die Messung der Renilla-Luciferase-Aktivität durchgeführt. Dies dient als interner Standard, z.B. zur Ermittlung der Transfektionseffizienz. Dazu muss neues Substrat zugegeben werden und es kommt zu der Reaktion:



Genauere Angaben zum Protokoll und den nötigen Substanzen finden sich in der Beschreibung zum Dual-Luciferase™ Reporter Assay System von Promega.

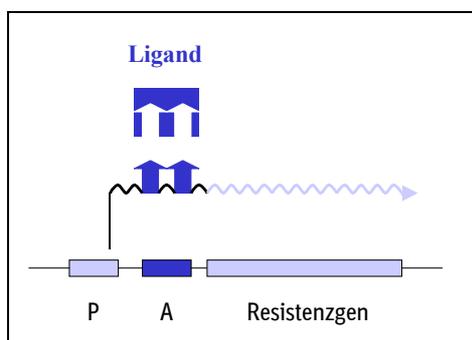
### 3.3.4 Bestimmung der NPT-Aktivität

Das Enzym Neomycin-Phosphotransferase (NPT) verleiht eukaryotischen Zellen Resistenz gegenüber Neomycin bzw. G418, indem es einen Phosphatrest von ATP auf das Zellgift überträgt und dieses damit unschädlich macht. Um die Aktivität der Transferase zu bestimmen, wird zuerst ein Zellextrakt durch wiederholtes Schockgefrieren und Auftauen hergestellt. Ein Bradfordtest (3.3.2) ermöglicht den Einsatz von identischen Proteinmengen für die unterschiedlichen Proben. Der Phosphotransferase-Aktivitäts-Test kann in einer Mikrotiterplatte durchgeführt werden. Von jeder Probe werden zwischen 1,25 und 5 µg Protein eingesetzt und mit einer entsprechenden Proteinmenge aus untransfizierten Zellen auf 5 µg Gesamtprotein aufgefüllt. Das Endvolumen wird mit Extraktionspuffer ausgeglichen. Dazu pipettiert man den Assay-Puffer, der G418 und  $\gamma$ -<sup>33</sup>P-ATP als Substrate enthält. Während der 135-minütigen Inkubation bei 27°C überträgt die Neomycin-Phosphotransferase der Zellextrakte das radioaktiv markierte Phosphat von ATP auf G418. Dann werden alle Ansätze mit einem 96-Well-Manifold durch ein Sandwich aus einer Lage Nitrocellulose, einer Lage P81 Phosphocellulose und einer Lage Whatman Filterpapier 3 MM filtriert. Proteine, die durch intrazelluläre Proteinkinasen mit radioaktivem Phosphat markiert wurden, binden an die erste Schicht aus Nitrocellulose. Markiertes G418-Phosphat passiert die Nitrocellulose und bindet an die zweite Schicht aus Phosphocellulose. Durch das Abfangen der markierten Proteine mittels der Nitrocellulose werden somit falsch positive Signale ausgeschlossen. Die Membranen wäscht man gründlich mit dH<sub>2</sub>O und lässt sie kurz an der Luft trocknen. Im Phosphor Imager kann die Radioaktivität jedes Ansatzes quantifiziert und visualisiert werden (Cabanés-Bastos et al 1989).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Translationshemmung durch Aptamere

Werstuck und Green konnten in transienten Expressionsstudien mit CHO-K1-Zellen zeigen, dass ein Liganden/Aptamer-Komplex innerhalb des 5'-UTRs eines Reportergens zu einer Beeinträchtigung der *in vivo*-Translation führte (Werstuck and Green 1998). Die alleinige Anwesenheit der Aptamere H10 und H19 im 5'-UTR des Reportergens  $\beta$ -Galactosidase hatte keinen Einfluss auf die Expression des Reportergens. Durch Zugabe des spezifischen Liganden H33258 (oder H33342) wurde jedoch die Reporterengenaktivität konzentrationsabhängig um mehr als 90% verringert. Verwendet man die entsprechende Konstruktion als Regulationseinheit vor einem Selektionsmarker (z. B. dem Neomycin-Resistenzgen), kann dies möglicherweise zu einer reduzierten Translation des Resistenzgens führen (Abb. 4). Für die Zellen wäre das Überleben des Selektionsdrucks in einer stabilen Transfektion somit erschwert. Es könnten nur Zellklone überleben, die die reduzierte Translation des Selektionsmarkers ausgleichen können, z.B. mit einer erhöhten Transkription. Eine erhöhte Transkription ist gegeben, wenn die Fremd-DNA in aktivem Chromatin oder in großer Kopienzahl integriert wurde. Auf diese Weise überleben nur Klone mit einer hohen Transkriptionsrate. Die Transkriptionsrate wirkt sich in der Regel auf die gesamte integrierte Fremd-DNA aus, also auch auf das Produktgen. Durch eine solche Selektion werden folglich Hochproduzenten angereichert (Ausnahmen: Rekombinationen innerhalb des Produktgens, des Produktpromotors oder zwischen Produktgen und Selektionsmarker). Nach erfolgter Selektion kann der Ligand wieder aus dem Medium entfernt werden.



**Abb. 4: Prinzip der Translationshemmung**

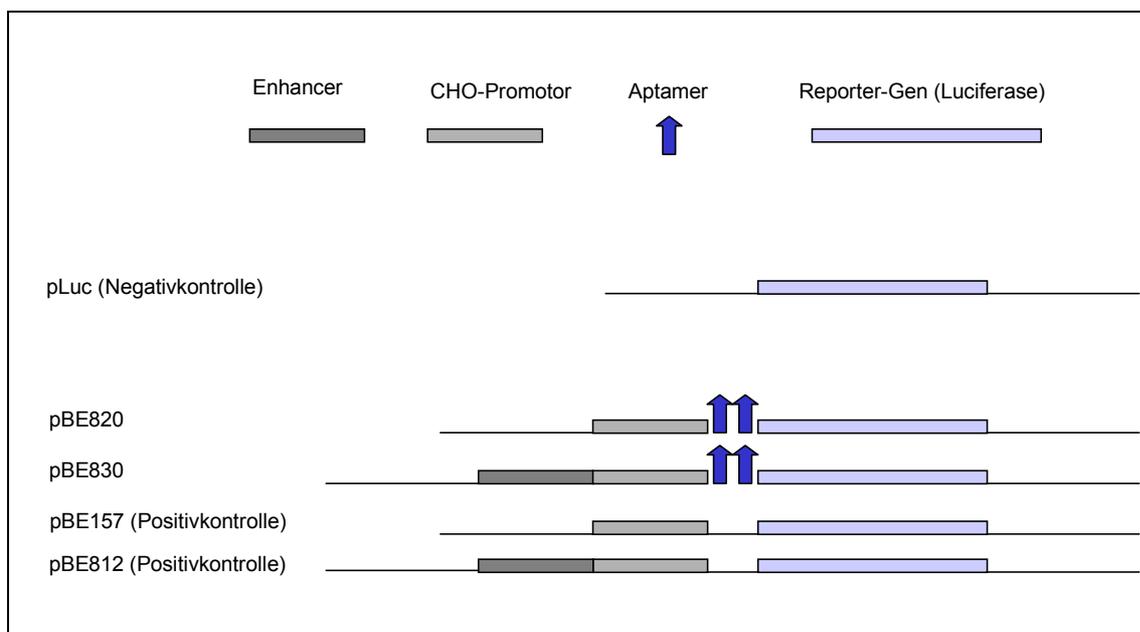
Durch die Interaktion von Aptameren und Liganden im 5'-UTR eines Gens wird die Translation des nachfolgenden Gens (hier: Resistenzgen) beeinträchtigt (Werstuck and Green 1998).

Für ein vorläufiges „Proof of Concept“ wurde das System von Werstuck und Green mit den Aptameren H10 und H19 und den Liganden H33342 und H33258 übernommen und mit

ähnlichen Reporter-genkonstrukten (Luciferase als Reporter-gen) in transienten Assays mit CHO-DG44-Zellen eingesetzt. Für eine spätere Anwendung in stabilen Transfektionen in Verbindung mit einem eukaryotischen Selektionsmarker sollte eine eigene Aptamerselektion mit zellpermeablen, nicht-toxischen Liganden stattfinden.

#### 4.1.1 Einfluss verschiedener Promotoren

Die Aptamersequenzen von H10 und H19 (Abb. 2C) waren mittels synthetischer Oligonukleotide in den 5'-untranslatierten Sequenzbereich (5'-UTR) der Firefly-Luciferase im eukaryotischen Expressionsvektor pLuc einkloniert worden. Daraus entstanden pBE820 und pBE830, die jeweils einen starken CHO-Promotor besitzen, pBE830 zusätzlich einen CMV-Enhancer. Die Kontrollplasmide pBE157 und pBE812 lagen entsprechend ohne Aptamere im 5'-UTR der Luciferase vor (Abb. 5).

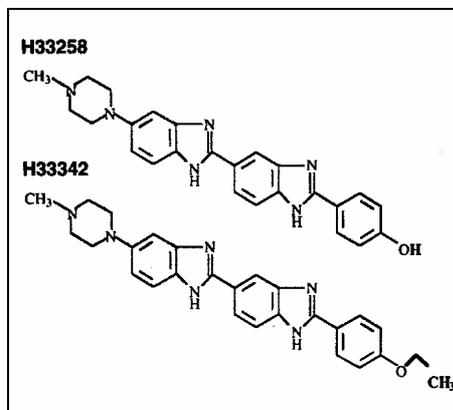


**Abb. 5: Aptamer-Vektoren der ersten Generation**

+/- CMV-Enhancer, +/- CHO-Promotor, +/- Aptamere H10/H19, Luciferase.

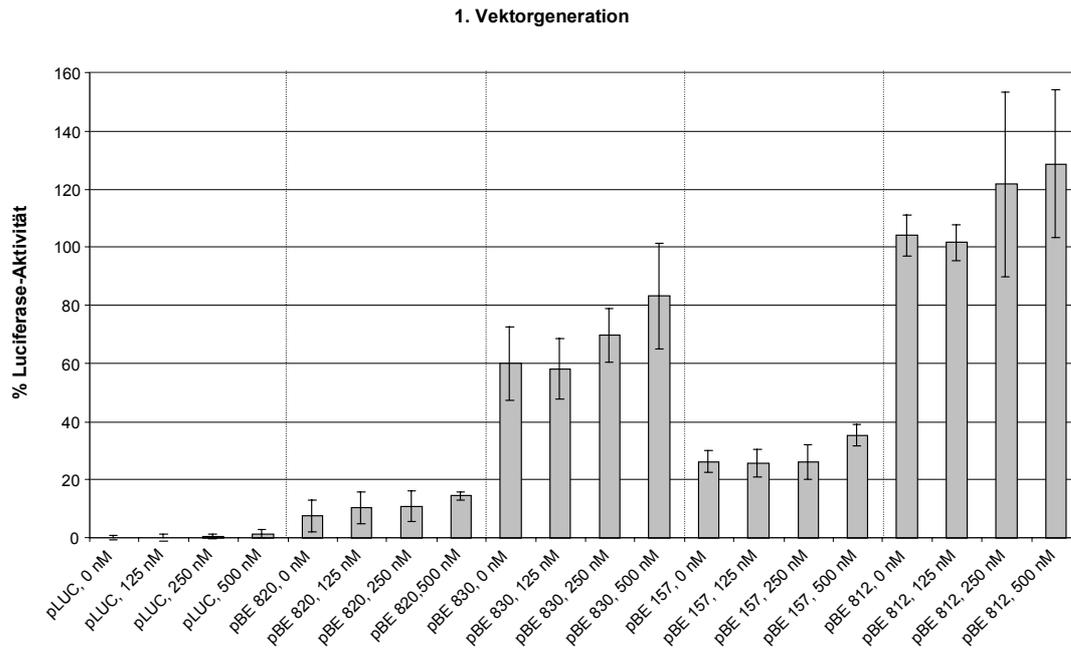
Einen Tag vor der Transfektion wurden CHO-DG44-Zellen in Medium kultiviert, das den spezifischen Liganden enthielt. Die spezifischen Liganden für H10 und H19 sind die Hoechst-Farbstoffe H33258 und H33342 (Abb. 6). Um toxische Effekte der Liganden auf die Zellen zu verhindern, erfolgte im Vorfeld eine Titration zur Ermittlung der geeigneten Ligandenkonzentration. Die Zellen wurden verschiedenen Ligandenkonzentrationen ausgesetzt (0 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM), und es wurde alle zwei bis drei Tage die Zellzahl bestimmt. Mit 500 nM und 1000 nM H33342 zeigte sich bereits an Tag 4 ein Vitalitätseinbruch. Mit 1000 nM H33342 musste der Versuch an Tag 9 abgebrochen

werden, da die Zellen alle abgestorben waren. Mit Konzentrationen von bis zu 500 nM H33342 wurde der Versuch zwei Wochen lang durchgeführt. Das Zellwachstum war lediglich bei einer Konzentration von 500 nM H33342 beeinträchtigt, wohingegen geringere Konzentrationen keinen Einfluss auf das Wachstum zeigten. H33258 beeinträchtigte das Zellwachstum weniger stark, was wahrscheinlich auf dessen schlechtere Zellpermeabilität zurückzuführen ist. Mit 500 nM und 1000 nM H33258 war zwischen Tag 7 und Tag 9 ein leichtes Abflachen der Wachstumskurve zu verzeichnen, das aber nicht zum kompletten Absterben der Zellen führte. Die maximal einsetzbaren Ligandenkonzentrationen, bei denen zwar die Teilungsraten reduziert waren, die Zellen jedoch auf lange Sicht ohne sichtbare Vitalitätseinbußen kultiviert werden konnten, waren folglich 500 nM H33342 und 1000 nM H33258.



**Abb. 6: Hoechst-Farbstoffe H33342 und H33258**

In der Mehrzahl der Experimente wurde der Farbstoff H33342 verwendet, da er die Zellmembran besser permeiert als H33258 (Werstuck and Green 1998) und deshalb vermutlich schon in geringeren Konzentrationen eine Wirkung zeigt. Die Transfektion erfolgte in Medium ohne Hoechst-Farbstoffe. Zusätzlich zu den Expressionsvektoren mit Firefly-Luciferase wurde das Plasmid pBIND im Verhältnis 5:1 kotransfiziert (z. B. 1 µg pBE830 : 0,2 µg pBIND). Es enthielt das Gen für Renilla-Luciferase, die zur Ermittlung der Transfektionseffizienz diente. Diese Werte wurden zur Normierung der Firefly-Luciferase-Expression herangezogen. Nach der dreistündigen Transfektion durch Lipofectamine Plus wurden zu jedem Transfektionsansatz jeweils 2 mL Medium mit der entsprechenden Ligandenkonzentration zugegeben. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, ein Zellextrakt hergestellt und die Expression beider Luciferasen mittels des Dual-Luciferase-Assays bestimmt.

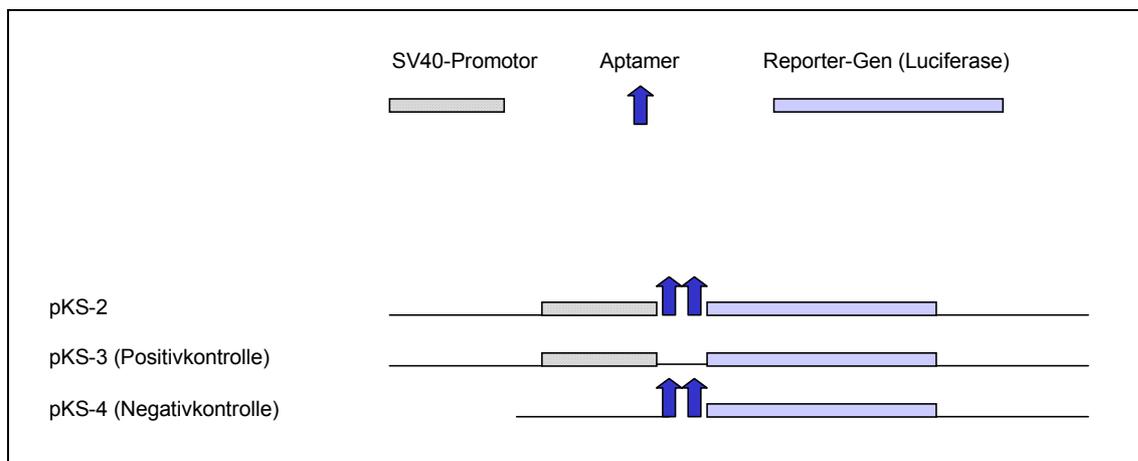


**Abb. 7: Transiente Transfektion mit erster Vektorgeneration**

Transiente Expression von Luciferase in CHO-DG44 mit Aptamer-Vektoren der ersten Generation und in Abhängigkeit von H33342 (0 nM: n=8, 125 nM: n=6, 250 nM: n=8, 500 nM: n=4).

In Abbildung 7 sind vier unabhängige Transfektionsserien (jeweils Doppelbestimmungen) zusammengefasst dargestellt. In jeder Serie wurde ein Pool mit pBE812 ohne H33342 als Positivkontrolle auf 100% Luciferase-Aktivität festgelegt und die anderen Werte relativ dazu berechnet. In den Ansätzen mit pBE820 und pBE830 hätte man bei steigender Ligandenkonzentration ein Absinken der Luciferase-Expression erwartet. Dies konnte jedoch nicht festgestellt werden. Stattdessen ließ sich ein leichter, ansteigender Trend beobachten, der allerdings nicht signifikant war. Ein Vergleich von pBE820 mit pBE157 und pBE830 mit pBE812 jeweils ohne Ligand lässt Rückschlüsse darauf zu, welchen Einfluss die Aptamere allein auf die Luciferase-Expression haben. Offensichtlich beeinträchtigten sie die Expression des nachfolgenden Gens. Dies steht im Gegensatz zur Aussage von Werstuck und Green, wonach die alleinige Sequenz der Aptamere im 5'-UTR keinen negativen Einfluss auf die Expression hat. Es ist allerdings nicht klar, ob bereits der Promotor beeinflusst wird, also die Transkription geschwächt ist oder ob die Aptamere sich erst auf Ebene der Translationsinitiation auswirken. Um die gegenseitige Beeinflussung von Promotor und Aptameren zu klären, wurden die Reportergenkonstrukte hinsichtlich des Promotors und dessen Abstand zu den Aptameren an die Plasmide der zu Grunde liegenden Publikation angepasst. Statt CHO-Promotor und CMV-Enhancer wurde der SV40-Promotor eingesetzt. Die Klonierung dieser Plasmide erfolgte über einen Zwischenschritt (pKS-1). Das PCR-Fragment *Sfi*H10/H19AvrII, das die Aptamere H10 und H19 und an den Enden die angegebenen Restriktionsschnittstellen enthielt, wurde über *Sfi*I-AvrII im Austausch gegen Neo/Kan hinter den SV40-Promotor in pNeo2-CENUb2B einkloniert (pKS-1). Bei der

Klonierung von SVH2 $\beta$ Gal (Werstuck and Green 1998) wurden die Aptamere H10/H19 ebenfalls über *SfiI*-*AvrII* in pSV $\beta$ Gal (Promega) eingefügt. Der Übergang von SV40-Promotor zu den Aptameren war dadurch identisch mit der entsprechenden Sequenz in SVH2 $\beta$ Gal. Das *BamHI*-Luciferase-*SmaI*-Fragment aus pLuc wurde mit komplett aufgefüllten Enden in die *AvrII*-Site von pKS-1 eingesetzt, und so wurde pKS-2 generiert. Das Kontrollplasmid pKS-3 ohne Aptamere entstand wie pKS-2 ohne den vorherigen Zwischenschritt über pKS-1 aus pNeo2-CENUb2B und pLuc (Austausch von Neo/Kan gegen Luciferase). Die Deletion des SV40-Promotors für pKS-4 erfolgte durch einen Verdau mit *SfiI*, gefolgt von einer Exonukleasebehandlung, und *MscI* mit anschließender Religation (Abb. 8).

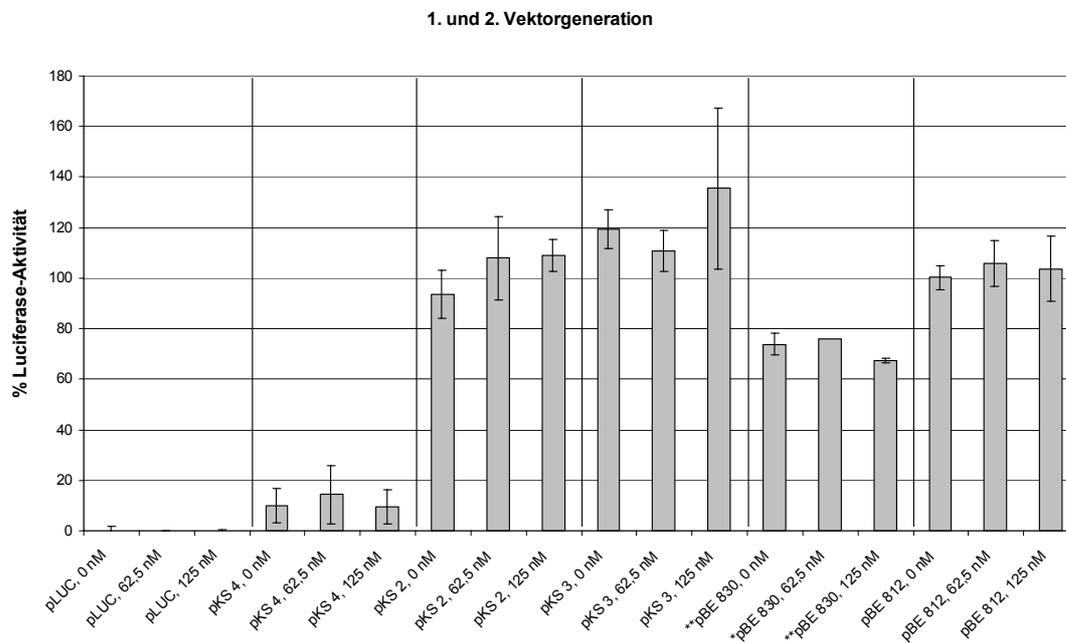


**Abb. 8: Aptamer-Vektoren der zweiten Generation**  
+/- SV40-Promotor, +/- Aptamere, Luciferase

Zum direkten Vergleich von CHO-Promotor und SV40-Promotor wurden in den Transfektionsserien mit der zweiten Vektorgeneration pBE812 und pBE830 wieder mitgeführt. Die maximale Ligandenkonzentration von H33342 war auf 125 nM reduziert, um weitestmöglich auszuschließen, dass die Zellen in ihrer Vitalität beeinträchtigt werden und dies die Expression beeinflusst.

Auch in dieser experimentellen Serie wurde deutlich, dass die Interaktion von Ligand und Aptameren, falls sie stattfand, keine Reduktion der Luciferase-Translation verursachte (pKS-2 in Abb. 9). Allerdings war wiederum zu beobachten, dass die Aptamere alleine – ohne jeden Einfluss des Liganden – die Expression des nachfolgenden Gens leicht abschwächten (vergleiche pKS-2 mit pKS-3 in Abb. 9). CHO-Promotor und SV40-Promotor wirkten sich auf die Aptamer-Liganden-abhängige Expression des Reportergens also nicht unterschiedlich aus. Lediglich die Gesamtexpression war beim SV40-Promotor leicht erhöht im Vergleich zu CMV-Enhancer + CHO-Promotor. Nach Subtraktion der Negativkontrolle pKS-4 von pKS-2 und pKS-3 resultierten die beiden Promotorkombinationen aber in vergleichbaren Expressionsleveln.

Zur besseren Vergleichbarkeit mit der Publikation von Werstuck und Green wurde in allen weiteren Experimenten der SV40-Promotor verwendet.

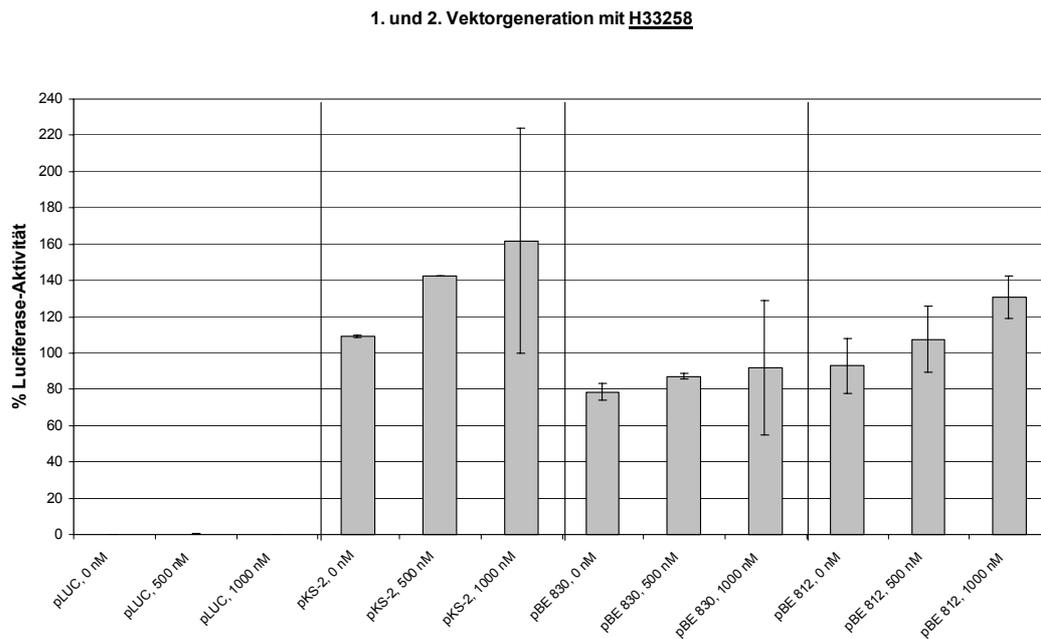


**Abb. 9: Transiente Transfektion mit zweiter Vektorgeneration**

Transiente Expression von Luciferase in CHO-DG44 mit Aptamer-Vektoren der ersten und zweiten Generation und in Abhängigkeit von H33342 (0 nM; 62,5 nM; 125 nM), n=4, \*\* für n=2, \* für n=1)

#### 4.1.2 Einfluss verschiedener Liganden

Ein zweiter spezifischer Ligand für die H10/H19-Aptamere ist H33258. Er ist etwas weniger membranpermeabel und zeigte dementsprechend in Titrationsexperimenten eine geringere Zelltoxizität. Bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M H33258 waren die Zellen im Wachstum zwar leicht beeinträchtigt, zeigten aber noch keine drastischen Letalitätserscheinungen. Dahingegen stagnierte das Zellwachstum mit 1  $\mu$ M H33342 bereits nach 2 Tagen. Am Tag 9 waren mit H33342 keine vitalen Zellen mehr vorhanden. Laut Werstuck und Green hat H33258 auf die aptamerabhängige Translation dieselbe Wirkung wie H33342. Hier hatte H33258 jedoch wie schon H33342 weder auf pKS-2 (SV40-Promotor + Aptamere) noch auf pBE830 (CMV/CHO + Aptamere) einen translationshemmenden Einfluss (Abb. 10). Es erschien eher so, als förderte eine höhere Liganden-Konzentration die Expression, wobei dieser Effekt nicht signifikant war. Auch mit dem Kontrollvektor pBE812 (CMV/CHO ohne Aptamere) stieg die Expression bei zunehmender H33258-Konzentration. Ein wiederkehrender Effekt war die leichte Reduktion der Expression durch die Aptamere allein (vergleiche pBE812 und pBE830).

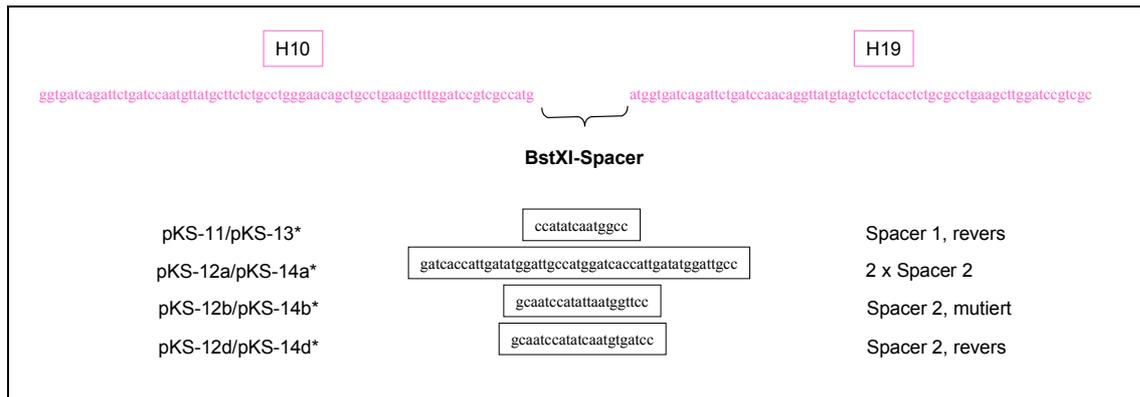


**Abb. 10: Transiente Transfektion mit zweiter Vektorgeneration und H33258**

Transiente Expression von Luciferase in CHO-DG44 mit Aptamer-Vektoren der ersten (pBE812, pBE830) und zweiten (pKS-2) Generation und in Abhängigkeit von H33258 (0 nM; 500 nM; 1000 nM), n=2.

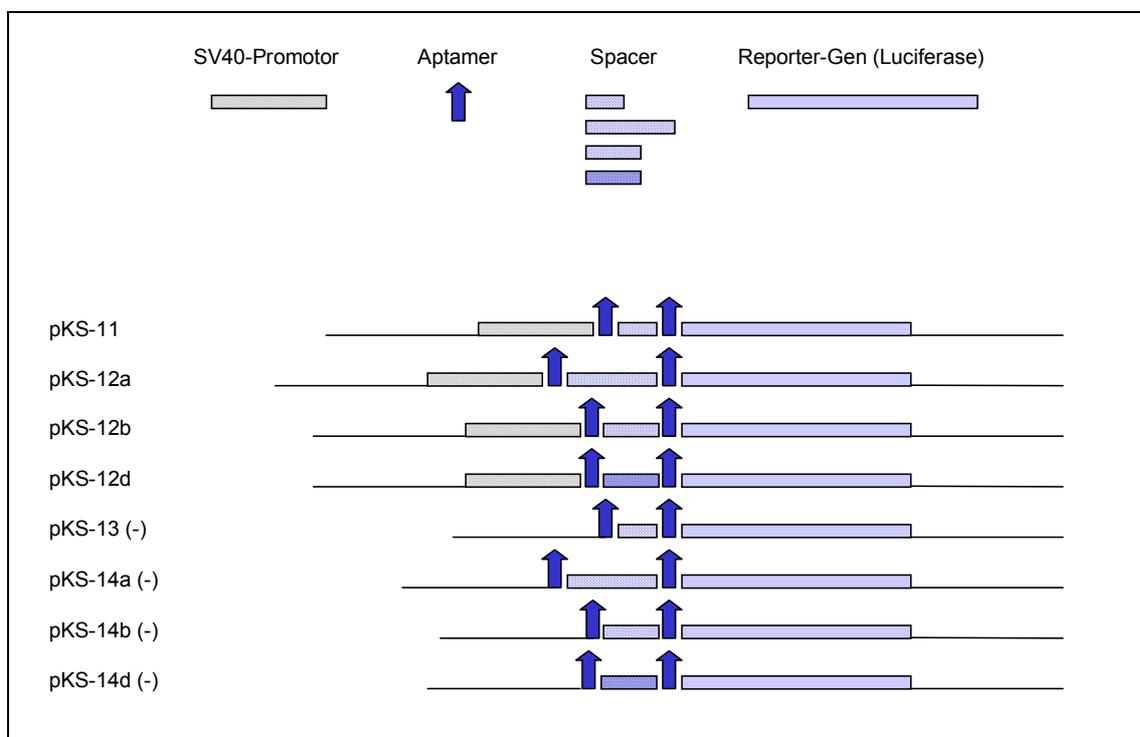
#### 4.1.3 Einfluss verschiedener Spacer

Aus der Publikation von Werstuck und Green geht nicht eindeutig hervor, ob die beiden Aptamere H10 und H19 im Expressionsvektor in direkter Folge stehen. Möglicherweise ist ein gewisser räumlicher Abstand notwendig, damit sich die Sekundär- und Tertiärstrukturen der RNA nicht sterisch behindern und die Einlagerung des Liganden stattfinden kann. In den bisher verwendeten Vektoren befanden sich zwischen H10 und H19 nur drei zusätzliche Nukleotide, wobei weitere zehn, die zu den Aptameren gehören, laut Abb. 2C nicht an der Bildung der Stem-Loop-Struktur beteiligt sind. Um die Frage des Abstandes zu klären, wurden in die Plasmide der zweiten Generation verschiedene „Abstandhalter“ (Spacer) zwischen H10 und H19 eingefügt. Die Länge der Spacer war unterschiedlich (14/20/21/49 Basen, siehe Abb. 11).



**Abb. 11: BstXI-Spacer zwischen H10 und H19**

\* = ohne Promotor



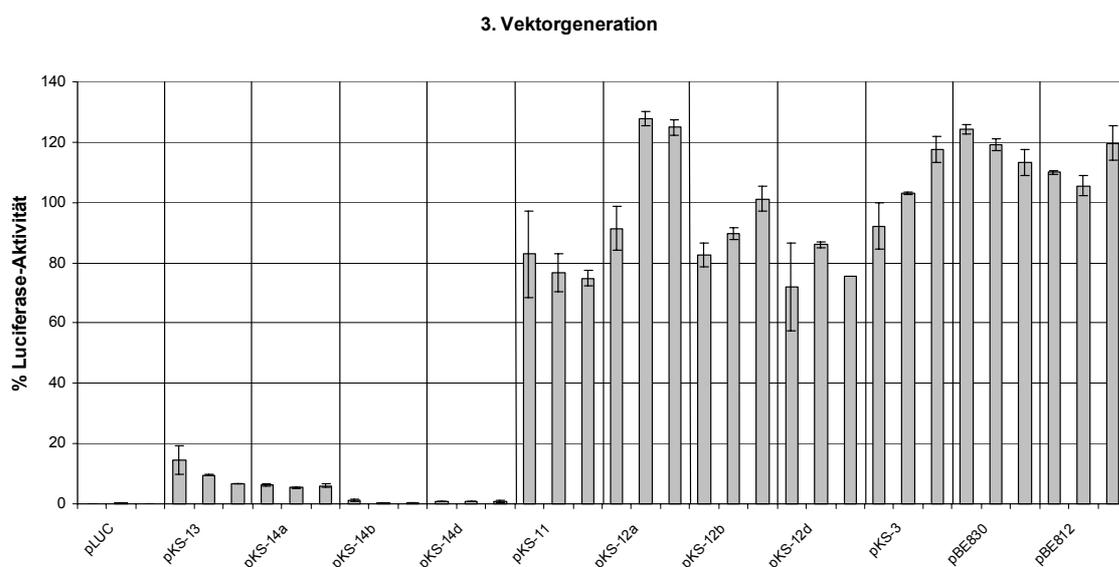
**Abb. 12: Aptamer-Vektoren der dritten Generation**

+/- SV40-Promotor; Aptamere; Spacer 1, 2a, 2b oder 2d; Luciferase.

Synthetische Oligonukleotide unterschiedlicher Länge mit der Erkennungssequenz für *Bst*XI wurden in die *Nco*I-Schnittstelle zwischen H10 und H19 in pBE820 inkloniert. Daraus resultierten vier verschiedene Plasmide: pKS- 5 (Spacer 1, Sequenzorientierung revers), pKS-6a (Spacer 2, doppelt), pKS-6b (Spacer 2, mutiert) und pKS-6d (Spacer 2, Sequenzorientierung revers). Über *Sac*II/*Ppu*MI wurde die Aptamerregion in pBE830 gegen die neuen Aptamer/Spacer-Fragmente ausgetauscht. So entstanden pKS-7 und pKS-8a, -8b und -8d. Die nächsten Klonierungsschritte erfolgten analog zur Vorgehensweise bei pKS-2 bis -4 (Kapitel 4.1.2) über die Zwischenstufen pKS-9, pKS-10a, -10b und -10d. Die endgültigen Testvektoren waren pKS-11, pKS-12a, -12b und -12d mit den jeweiligen promotorlosen Negativkontrollen pKS-13, pKS-14a, -14b und -14d (siehe Abb. 11 und 12).

Die transienten Transfektionen mit den Vektoren der dritten Generation erfolgten nach dem gleichen Protokoll wie die Transfektionsserien zuvor. Als Ligand wurde H33342 eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

Bei keinem der Plasmide mit Spacer war eine Reduktion der Luciferase-Expression in Abhängigkeit von der Liganden-Konzentration festzustellen. Auch hier bestätigte sich wieder, dass die Aptamere im Vergleich zu den Positivkontrollen pKS-3 und pBE812 allein schon die Expression reduzierten. Während die Positivkontrollen zwischen 100% und 120% Luciferase-Aktivität schwankten, lagen die Aptamervektoren pKS-11, -12b und -12d bei ca. 80% - 90%. Eine Ausnahme bildeten hier pKS-12a und pBE830 mit bis zu 120% Aktivität. Mögliche Ursachen werden später noch diskutiert (Kapitel 5.1). Die Negativkontrollen pKS-13 und -14a zeigten eine geringe Restexpression. In den Ansätzen pKS-14b, -14d und pLuc wurde keinerlei Luciferase-Aktivität gemessen.



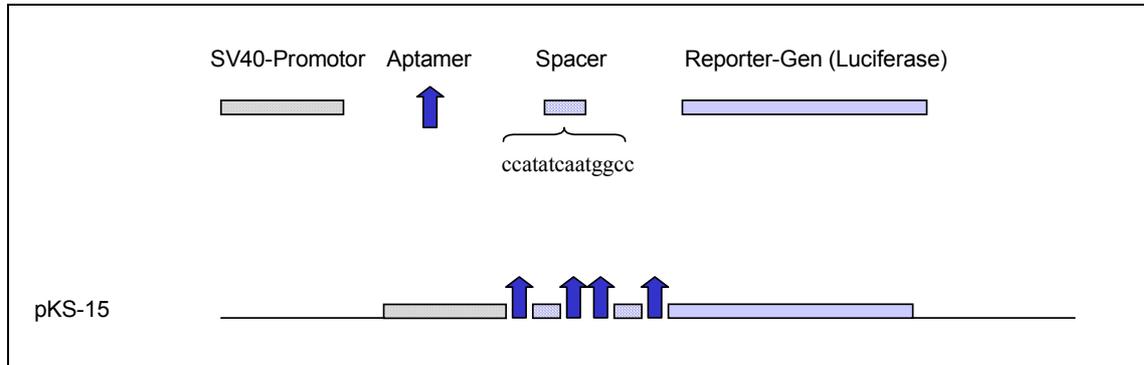
**Abb. 13: Transiente Transfektion mit dritter Vektorgeneration**

Transiente Expression von Luciferase in CHO-DG44 mit Aptamer-Vektoren der dritten Generation in Abhängigkeit von H33342 (0 nM; 125 nM; 250 nM), n=2 (für pKS-12d, 250 nM n=1).

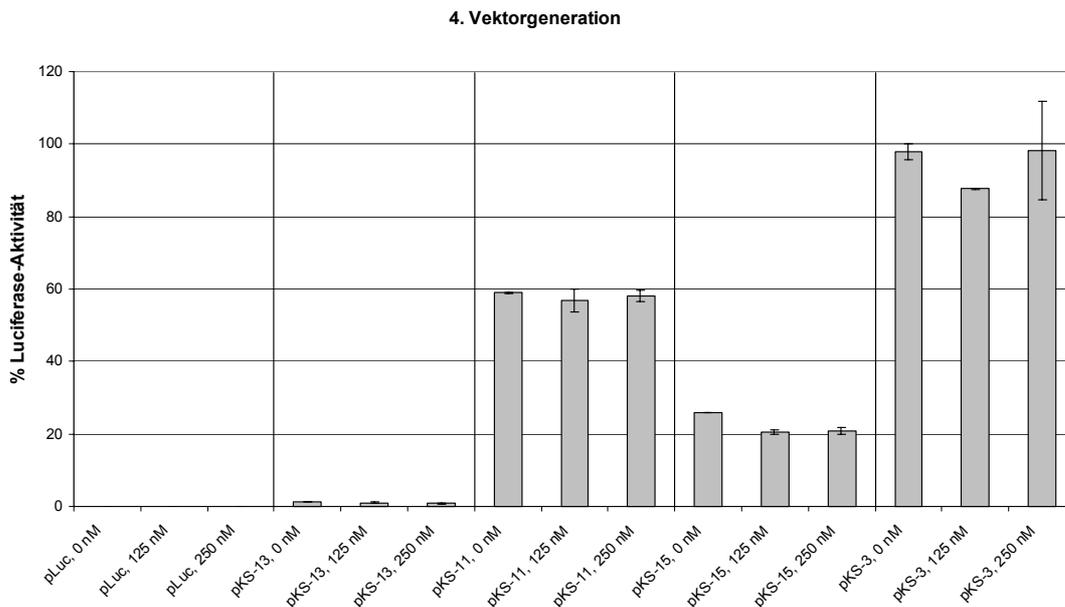
#### 4.1.4 Einfluss mehrerer Aptamere

Laut Werstuck und Green ist der translationshemmende Effekt durch den Einfluss des Liganden umso größer, je mehr Aptamere vorhanden sind. Um diese Aussage zu überprüfen, wurden über die *Bst*XI-Schnittstelle zwei weitere Aptamere in pKS-11 eingefügt. Das Plasmid pKS-15 enthielt dadurch die Aptamerfolge H10-H10-H19-H19 im 5'-Bereich der Luciferase (Abb. 14). In der transienten Expressionsstudie (Abb. 15) zeigte pKS-15 eine noch schwächere Luciferase-Aktivität als das Vorgängerplasmid pKS-11. Die Positivkontrolle

ohne Aptamere (pKS-3) lag bei 90% - 100% Expression für alle drei H33342-Konzentrationen. Im Vergleich dazu war die Luciferase-Aktivität von pKS-11 um ca. 20% - 30% und die von pKS-15 um 70% - 80% reduziert. Eine H33342-Abhängigkeit der Expression war jedoch wiederum bei keinem Plasmid vorhanden.



**Abb. 14: Aptamer-Vektor der vierten Generation**  
SV40-Promotor, vier Aptamere, Spacer, Luciferase



**Abb. 15: Transiente Transfektion mit der vierten Vektorgeneration**

Transiente Expression von Luciferase in CHO-DG44 mit Aptamer-Vektoren der vierten Generation (pKS-15) in Abhängigkeit von H33342 (0 nM; 125 nM; 250 nM), n=2.

#### 4.1.5 Zusammenfassung

Die Expression des Reportergens wurde bereits allein durch den Einsatz der Aptamere reduziert. Dieser Effekt wurde durch zusätzliche Spacer z. T. noch verstärkt. Am stärksten konnte die Genexpression durch mehrere Aptamere in Folge reduziert werden. Sie war dabei

jedoch völlig unabhängig von einer Interaktion der Aptamere mit dem Liganden. Somit konnte in keiner der transienten Transfektionsserien die ligandenkontrollierte Translation des Reportergens erreicht werden. Alle hier ermittelten Ergebnisse standen also im Gegensatz zur zitierten Science-Publikation (Werstuck and Green 1998).

#### 4.2 Beeinträchtigung der Enzymfunktion des Selektionsmarkers Neomycin durch Punktmutationen

In der Literatur wurden verschiedene Mutanten des Neomycin-Phosphotransferase II (*npt2*) - Gens beschrieben, die den hochkonservierten C-terminalen Bereich des Enzyms betreffen. Die Homologie beträgt dort 60 - 70% und es wird vermutet, dass hier die ATP-Bindung und der Transfer des terminalen Phosphats stattfinden. Yenofsky und Mitarbeiter beschrieben die Auswirkungen der Punktmutation Glu182Asp auf das Maß der Resistenz (Yenofsky, Fine, and Pellow 1990). Tabak-Blattscheiben mit dem Wildtyp-Resistenzgen zeigten eine 50%-ige Wachstumshemmung bei einer G418-Konzentration von 30 - 40 µg/mL, während das Wachstum von Blattscheiben mit dem mutierten Resistenzgen bereits bei einer G418-Konzentration von 9 µg/mL halbiert war. Ohne Selektionsmarker lag die kritische G418-Konzentration für das Blattscheibenwachstum bei 3 µg/mL. Sie konnten außerdem zeigen, dass diese Reduktion der Resistenz auf die Beeinträchtigung der Enzymaktivität und nicht auf eine geringere Genexpression zurückzuführen ist. Im Gegenteil, die Expression des *npt2*-Gens war auf RNA-Ebene in den Pflanzen mit dem mutierten Gen sogar höher als in solchen mit unverändertem Gen. Der NPTII-Proteingehalt korrelierte zwar mit der RNA-Menge, zeigte aber eine negative Korrelation zur Enzymaktivität. Dieselben Ergebnisse fanden die Autoren auch in Bakterien (*E. coli*).

Die Tatsache, dass Zellen mit einem beeinträchtigten Selektionsmarker eine höhere Expression der transgenen DNA zeigen, bietet eventuell die Möglichkeit, bereits bei der Selektion hochproduzierende Zellen anzureichern. Die geringere Aktivität des resistenzverleihenden Enzyms müssen die Zellen kompensieren können, um den Selektionsdruck zu überleben. Dies erreichen sie nur, wenn sie das Enzym in größeren Mengen exprimieren. Dazu muss die Fremd-DNA in eine transkriptionsaktive Domäne des Genoms oder in großer Kopienzahl integriert sein. Befindet sich auf dem transfizierten Plasmid außer dem beeinträchtigten Selektionsmarker zusätzlich ein Produktgen, steht dieses ebenfalls unter dem transkriptionsfördernden Einfluss dieser genomischen Region. In diesen Zellen ist also sowohl die Expression des Selektionsmarkers als auch die des Produktgens erhöht. Alternativ zum Integrationsort kann auch ein Genkopieneffekt die Expression erhöhen.

Ob sich diese Hypothese in Produktionszellen (CHO-DG44) bestätigen lässt, wurde in der vorliegenden Arbeit anhand zwölf verschiedener Punktmutationen im *npt2*-Gen im Vergleich zum Wildtyp-*npt*-Gen untersucht. Mutante M1 entspricht der von Yenofsky und Mitarbeitern beschriebenen E182D-Mutante. In der Publikation von Kocabiyik und Perlin (Kocabiyik and

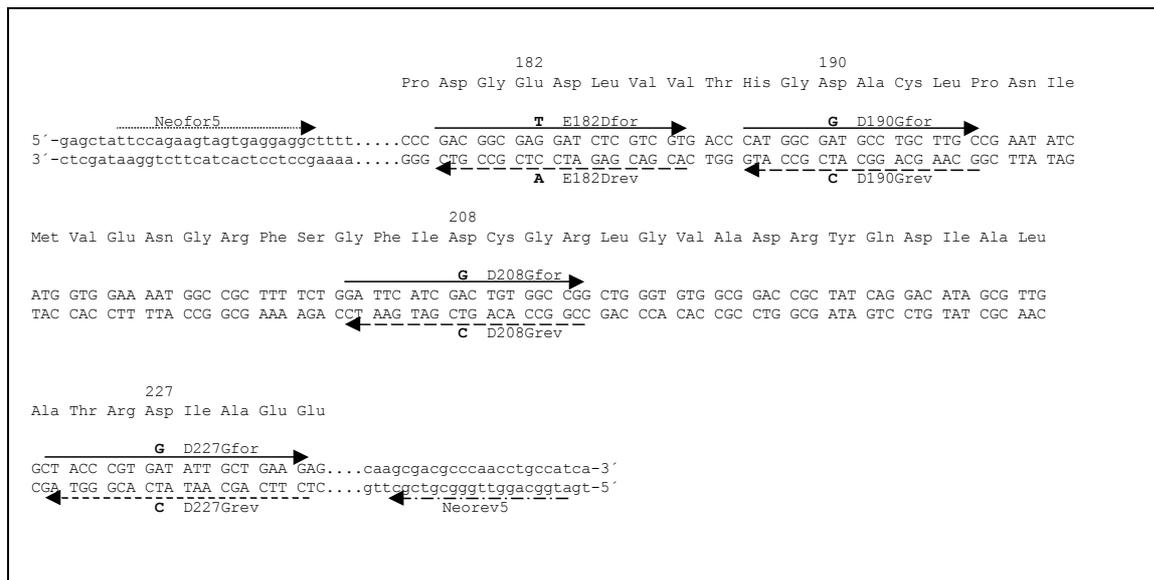
Perlin 1992b) wurden verschiedene NPTII-Mutanten in *E. coli* beschrieben, deren Enzymaktivität reduziert war. Aus diesen Mutanten wurden weitere drei mit unterschiedlicher Restaktivität ausgewählt. Mutante M2 (Asp190Gly) und Mutante M3 (Asp208Gly) waren in ihrer Funktion relativ stark beeinträchtigt. Die maximale Konzentration an G418, bei der noch ein Wachstum zu verzeichnen war, lag für diese Mutanten bei 4 µg/mL. Mit dem normalen Enzym zeigten die *E. colis* noch bis zu einer G418-Konzentration von 64 µg/mL Wachstum. Mutante M2 besaß im Vergleich zum normalen Enzym noch 8% der Aktivität (Kanamycin-Phosphorylierung), Mutante M3 lediglich noch 1,2%. Im Gegensatz dazu war die vierte Mutante, Asp227Gly nicht so stark beeinträchtigt. Es handelte sich hierbei um eine nicht-konservierte Aminosäure, deren Austausch keine Veränderung der Sekundärstruktur auslöste (Kocabyik and Perlin 1992b). Dies stand im Einklang mit einer verbleibenden Aktivität dieser Mutante von 64%. Eine G418-Konzentration von über 8 µg/mL wurde von den Bakterien, die diese Mutante exprimierten, jedoch nicht mehr toleriert. Im Western Blot war für die drei NPTII-Varianten M2, M3 und M4 ein dem normalen Enzym vergleichbares Signal vorhanden. Das heißt, Synthese und Prozessierung dieser Enzyme wurden durch die Punktmutationen nicht beeinflusst. Die weiteren Mutanten wurden nach unterschiedlichen Gesichtspunkten bezüglich ihres Konservierungsgrades ausgewählt. Sie sind in Tabelle 1 aufgeführt und in Kapitel 5.2 genauer erläutert.

Name	Plasmid	Aminosäure-Substitution	Nukleotid-Substitution
WT	pNeo2-CENUb2B		
M1	pKS-N5	E182D	GAG→GAT
M2	pKS-N6	D190G	GAT→GGT
M3	pKS-N7	D208G	GAC→GGC
M4	pKS-N8	D227G	GAT→GGT
N1	pBIN-1	E182G	GAG→GGG
N2	pBIN-2	W91A	ACC→ACA
N3	pBIN-3	V198G	GGT→GGC
N4	pBIN-4	D227A	GAT→GCT
N5	pBIN-5	D227V	GAT→GTT
N6	pBIN-6	D261G	GAC→GGC
N7	pBIN-7	D261N	GAC→AAC
N8	pBIN-8	F240I	TTC→ATC

**Tab. 1: NPTII-Mutanten**

Die erste Spalte gibt die verwendeten Abkürzungen für die NPT-Varianten an. In der zweiten Spalte sind die Plasmide aufgelistet, die die jeweilige Mutation im *npt*-Gen tragen. Der Aminosäureaustausch der Mutationen ist in Spalte 3 angegeben (1-Buchstabencode), der entsprechende Nukleotidaustausch in Spalte 4.

#### 4.2.1 Generierung der Punktmutationen im *npt2*-Gen



**Abb. 16: Sequenzausschnitt aus dem Neomycin-Phosphotransferase II (*npt2*)-Gen**

Die Punktmutationen wurden durch PCR mit mutagenen Primern eingeführt. Großbuchstaben: Nukleotidsequenz der *npt2*-Kodierregion, kleine Buchstaben: flankierende nicht-kodierende Nukleotidsequenzen. Die aus der Nukleotidsequenz vorhergesagte Aminosäuresequenz (3-Buchstabencode) ist oberhalb der kodierenden Nukleotidsequenz angegeben. Pfeile geben die Richtung, Länge und Position der verwendeten Primer an (M1 – M4), wobei Pfeile mit geschlossener Linie die mutagenen Forwardprimer, mit gebrochener Linie die mutagenen Reversprimer, mit gepunkteter Linie den in 5'-Richtung vom *npt*-Gen liegenden Primer Neofor5 und mit Strichpunkt-Linie den in 3'-Richtung vom *npt*-Gen liegenden Primer Neorev5 anzeigen. Die gegenüber der Wildtyp-Sequenz ausgetauschten Nukleotide sind jeweils ober- bzw. unterhalb der Pfeile hervorgehoben.

Abbildung 16 zeigt beispielhaft den Sequenzausschnitt des *npt2*-Gens, in dem durch PCR mit mutagenen Primern die Punktmutationen für M1, M2, M3 und M4 eingeführt wurden. Das Plasmid pNeo-CMV2 diente dabei als Matrize. Mit dem Primer Neofor5 und dem jeweiligen mutagenen Reversprimer wurde ein *npt*-Fragment des 5'-Bereichs, mit dem Primer Neorev5 und dem jeweiligen mutagenen Forwardprimer ein *npt*-Fragment des 3'-Bereichs des Gens generiert. Durch Hybridisieren der überlappenden mittleren Bereiche und anschließender Extension mittels DNA-Polymerase wurden die *npt*-Fragmente des 5'- und des 3'-Bereiches zur kompletten kodierenden Region verbunden. Eine weitere PCR mit Neofor5 und Neorev5 führte zur Amplifikation des kompletten *npt2*-Gens. Die Klonierung von vier der verschiedenen mutagenen *npt*-Fragmente (M1, M2, M3, M4) erfolgte über *StuI/BstBI* in pNeo-CMV2 (siehe Anhang) im Austausch gegen das WT-*npt2*-Gen. So entstanden in einem Zwischenschritt die Vektoren pKS-N1, pKS-N2, pKS-N3 und pKS-N4. Die Plasmide pKS-N5, pKS-N6, pKS-N7 und pKS-N8 erhielten das mutierte *npt*-Fragment durch eine Umklonierung mit *StuI/DraIII* in den Basisvektor pNeo2-CENUb2B (siehe Anhang).

Die für MCP1 kodierende cDNA wurde als Produktgen aus pAD-CMV1/MCP1 (siehe Anhang) über *EcoRI/HindIII* in 3'-Richtung vom CHO-Promotor inkloniert (pKS-N5/MCP1 (M1); pKS-N6/MCP1 (M2); pKS-N7/MCP1 (M3); pKS-N8/MCP1 (M4); siehe Tab. 1). Die

Positivkontrolle entstand auf gleiche Weise durch Einklonieren von MCP1 in pNeo2-CENUb2B (enthält Wildtyp-*npt2*-Gen).

Als zweites Testprodukt wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, im Folgenden als mAk-2 bezeichnet. Die Expression der leichten Kette LC2 erfolgte von demselben Plasmid wie die Expression von MCP1. Dazu wurde die LC2 jeweils über *HindIII/BamHI* aus pNeo2-CENUb2B/LC2 (siehe Anhang) in die Vektoren mit den NPT-Varianten M1 und M4 (pKS-N5 und pKS-N8) einkloniert (pKS-N5/LC2, pKS-N8/LC2). Im Falle der zusätzlichen NPT-Mutanten N1 bis N8 (Tab. 1) wurden die Mutationen wie oben beschrieben mittels PCR-Mutagenese direkt in das *npt2*-Gen eingeführt, wobei diesmal das Plasmid pNeo2-CENUb2B (siehe Anhang) als Matrize eingesetzt wurde. Für N4 bis N8 wurden lediglich die Primer Neofor2 und Ic49 statt Neofor5 und Neorev5 verwendet. Die generierten PCR-Fragmente wurden im Austausch gegen das WT-*npt2*-Gen in den Expressionsvektor pNeo2-CENUb2B/LC2 (siehe Anhang) eingefügt. Zur Klonierung der Plasmide pBIN1/LC2 (N1), pBIN2/LC2 (N2) und pBIN3/LC2 (N3) erfolgte der Austausch des WT-*npt2*-Gens über *StuI/RsrII*, zur Klonierung von pBIN4/LC2 (N4), pBIN5/LC2 (N5), pBIN6/LC2 (N6), pBIN7/LC2 (N7) und pBIN8/LC2 (N8) über *DraIII/RsrII* (siehe Tab. 1). Die schwere Kette HC2 wurde entweder vom Plasmid pBI-1/HC2 (siehe Anhang) oder vom Plasmid pAD-CENUb2B/HC2 (vgl. pAD-CENUb2B/HC1 im Anhang) exprimiert.

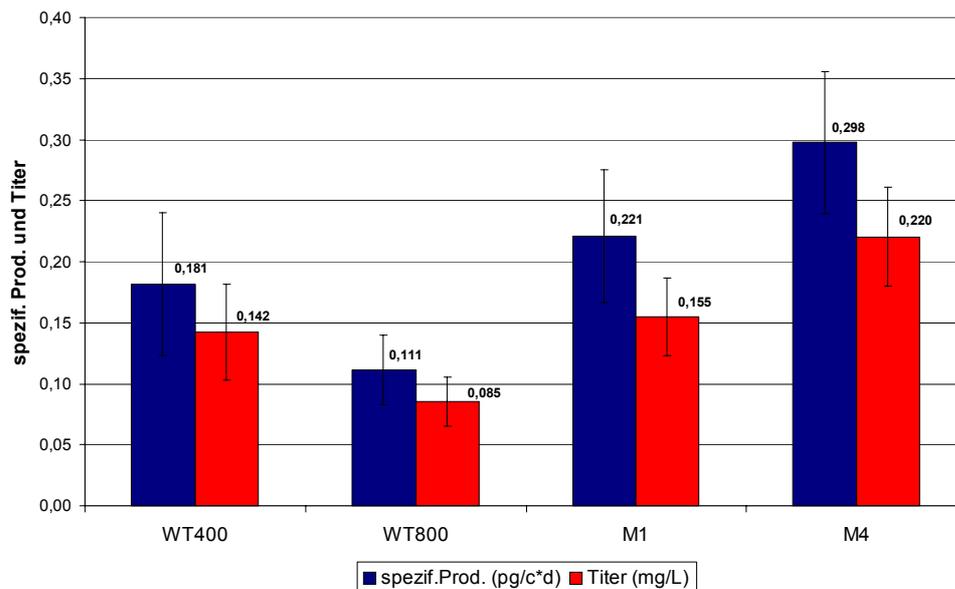
#### **4.2.2 Effekt von NPT-Mutanten auf die Selektion von rekombinanten MCP1-produzierenden Zellen**

Um die Hypothese der Hochproduzentenanreicherung durch Mutationen im Selektionsmarker einer ersten Prüfung zu unterziehen, wurden vorerst die vier NPT-Mutanten M1, M2, M3 und M4 im Vergleich zum WT in stabilen Transfektionsexperimenten getestet (siehe Tab. 1). Als Testprotein diente das einzelkettige Protein MCP1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1). Es besteht aus 99 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 8,6 kDa. MCP1 aktiviert Monozyten, lockt diese mittels Chemotaxis an Endothelgewebe heran und bewirkt die Adhäsion der Monozyten an das Endothel. Als Folge davon wird das kollaterale Gefäßwachstum induziert.

Die stabilen Transfektionen von CHO-DG44-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden erfolgten mit Lipofectamine Plus-Reagenz (siehe Kapitel 3.2.2). Es wurde pro Transfektionsansatz 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt und für jedes Plasmid zwei oder drei Pools angesetzt. Die Parallelansätze wurden später vereinigt und zur Einzelzellklonierung ausgesät (Limited Dilution). Der Ansatz für die Negativkontrolle enthielt keine DNA.

In der ersten stabilen Transfektion ST neo1 wurden die dreifachen Parallelansätze bereits am Tag der Transfektion vereinigt und in 96-Well Platten zur Klonvereinzelnung mit 5000, 4000 und 3000 Zellen pro Well in 100  $\mu$ L Medium ausplattiert. Zwei Tage später wurde Selektionsdruck mit einer G418-Endkonzentration von 400  $\mu$ g/mL ausgeübt. Diese Methode zur Klonselektion erwies sich jedoch als ungeeignet, da sich die Zellen in jedem Well gleich zu Beginn stark vermehrten. Es konnten auf Grund der zu geringen Verdünnung keine Einzelzellklone identifiziert werden. Der Ansatz wurde verworfen.

Bei den weiteren Transfektionsserien wurden nur zwei Parallelpools angesetzt und diese erst zwei Tage nach der Transfektion vereinigt, in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert (Limited Dilution mit 4000, 3000 bzw. 2000 Zellen pro Well) und mit 400  $\mu$ g/mL bzw. im Fall von WT-NPT parallel auch noch mit 800  $\mu$ g/mL G418 selektioniert. Die Nullkontrolle wurde entsprechend im Pool (T-Flask) selektioniert. Nach Abschluss der Selektion wurden die Zellen mit den NPT-Varianten M1, M4 und WT in 24-Well und später in 6-Well Platten und 75  $\text{cm}^2$  T-Flasks überführt. Zellen, die mit M2-NPT und M3-NPT transfiziert worden waren, überlebten die Selektion nicht. Bei M1-, M4- und Wildtyp-NPT war die Transfektionseffizienz zum Teil so hoch, dass die Zellen beim Ausplattieren nicht genug verdünnt wurden, um eine Vereinzelnung der resistenten Klone zu erreichen. Man musste deshalb davon ausgehen, dass die Zellen, die in einem Well hochgewachsen waren, von mehreren Einzelklonen stammten. Dies führte zu sogenannten „Minipools“. Eine weitere Verdünnung der Zellen beim Ausplattieren in der Transfektionsserie ST neo3 (3000/1500/750/375 Zellen pro Well) resultierte bei den Zellen, die mit einer NPT-Mutante selektioniert wurden, in Einzelklonen, wohingegen bei den mit der WT-Variante selektionierten Zellen wiederum nur „Minipools“ erhalten wurden. Deshalb war ein korrekter Vergleich der Varianten innerhalb dieser Serie nicht möglich. Von insgesamt 17 – 18 willkürlich ausgewählten „Minipools“ der Serie ST neo2 wurden über mehrere Passagen hinweg die Zellzahlen bestimmt, der Produkttiter (MCP1) gemessen und die spezifische Produktivität berechnet. Diese Daten sollten zeigen, ob die Erhöhung des Selektionsdrucks hochproduzierende Zellklone begünstigt. Der Selektionsdruck wurde dabei auf zwei verschiedene Weisen verstärkt, zum einen durch eine höhere G418-Konzentration bei der WT-Variante (800  $\mu$ g/mL im Vergleich zu 400  $\mu$ g/mL) und zum anderen durch die Beeinträchtigung des Selektionsmarkers (Punktmutationen im offenen Leseraster). Für jede NPT-Variante wurde der Mittelwert aller betrachteten „Minipools“ ermittelt (Abb. 17).



#### Abb. 17: Stabile Transfektion ST neo2

Mittelwerte für spezifische Produktivität (pg/c\*d) und Titer (mg/L) von 17 bzw. 18 „Minipools“ pro NPT-Variante; Passagierungsrhythmus 2-2-3 Tage in 6-Well Platten, 4 Passagen pro „Minipool“; WT400 = NPT-Wildtyp, Selektion mit 400 µg G418/mL; WT800 = NPT-Wildtyp, Selektion mit 800 µg G418/mL; M1 = NPT-Mutante 1 (E182D), M4 = NPT-Mutante 4 (D227G), Selektion jeweils mit 400 µg G418/mL.

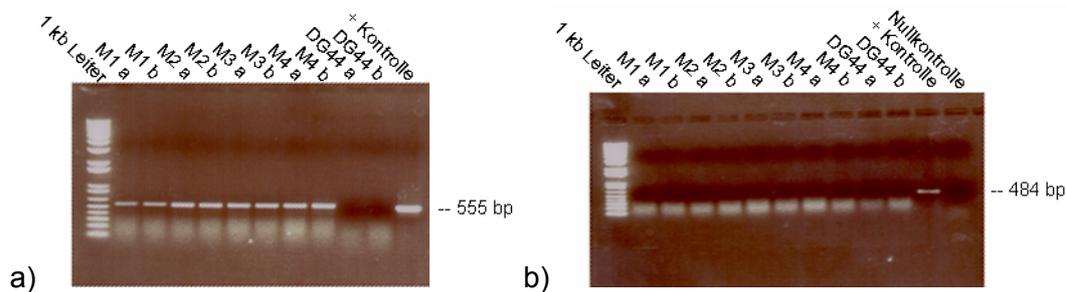
Legt man den durchschnittlichen Titer und die durchschnittliche spezifische Produktivität der mit 400 µg/mL G418 selektierten Zellen mit NPT-WT-Expression (WT<sub>400</sub>-Zellen) jeweils auf 100% fest, ergeben sich für die Zellen mit Expression der NPT-Mutante M1 und NPT-Mutante M4 im Vergleich dazu deutliche Steigerungen. Die Zellen mit NPT-Mutante M4 waren die eindeutigen Spitzenreiter. Sie zeigten im Durchschnitt einen um 55% höheren Titer und eine um 65% höhere spezifische Produktivität als die WT<sub>400</sub>-Zellen. Die Zellen mit NPT-Mutante M1 waren im Vergleich zur Wildtyp<sub>400</sub>-Variante um 9% (Titer) bzw. 22% (spezifische Produktivität) produktiver. Die Zellen, die mit den NPT-Varianten M1 und M4 transfiziert worden waren, zeigten also anhand der Produktivitätsdaten, dass sie das Überleben von Hochproduzenten favorisierten. Selektionierte man jedoch die Zellen mit der Wildtyp-NPT bei einer G418-Konzentration von 800 µg/mL, wurde der Selektionsdruck überraschenderweise nicht derart verstärkt, dass das Wachstum von Hochproduzenten begünstigt wurde. Die erhöhte G418-Konzentration schien eher einen negativen Einfluss auf den durchschnittlichen Titer und die durchschnittliche Produktivität der Zellen zu haben. Die WT<sub>800</sub>-Zellen produzierten im Vergleich zu den WT<sub>400</sub>-Zellen um 40% weniger MCP1 (Titer und spezifische Produktivität). In der Transfektionsserie ST neo2 bestätigte auch die Anzahl der einzelnen „Minipools“, die über einem Schwellenwert von 0,2 pg/c\*d bzw. 0,2 mg/L lagen, die Aussage, dass das Überleben von Hochproduzenten durch die Selektion mit einer NPT-Mutante begünstigt wird. Während mit Mutante M1 zehn Pools (von 17) und mit

Mutante M4 elf Pools (von 18) die Marke von 0,2 pg/c\*d erreichten bzw. überschritten, waren es bei WT<sub>400</sub> nur sieben Pools (von 18) und bei WT<sub>800</sub> nur vier Pools (von 17). Auch beim Titer wurde die 0,2 mg/L-Schwelle von acht M1- bzw. zehn M4-selektionierten Pools erreicht oder überschritten. Bei der Wildtyp-NPT-Variante waren es vier (400 µg/mL) und zwei Pools (800 µg/mL).

In der stabilen Transfektionsserie ST neo2 überlebte keine der Zellen, die mit den NPT-Mutanten M2 und M3 transfiziert wurden, den Selektionsdruck. Um das Absterben der Zellen mit diesen Mutanten in der Selektionsphase zu verhindern, wurde in einer weiteren Serie (ST neo4) der Selektionsdruck durch eine Verringerung der G418-Konzentration auf 200 µg/mL reduziert. Die Einzelzellklonierung erfolgte zwei Tage nach der Transfektion mit fünf Verdünnungsschritten im Verhältnis 1:5 für M2- und M3-transfizierte Zellen und 5 Verdünnungsschritten im Verhältnis 1:5 für WT-transfizierte Zellen. Ein Teil der M2- und M3-exprimierenden Klone starb allerdings bei der Expansion in 24-Well und 6-Well Platten ab. Bei den meisten Klonen hatte auch eine Reduktion der G418-Konzentration auf 100 µg/mL, die vier Wochen nach der Transfektion erfolgte, keinen positiven Einfluss. Für Zellen mit Mutante M2 konnten keinerlei Daten erhoben werden, da es nicht möglich war, die Zellen in regelmäßigen Abständen zu splitten. Wachstum und Vitalität waren auch bei den Zellen mit Mutante M3 sehr eingeschränkt. Nur sieben Klone konnten zur Datenerhebung herangezogen werden. Davon wiesen lediglich zwei Klone Titer auf, die einen Wert von ca. 0,2 mg/L erreichten. Mit der Wildtyp-NPT erreichte nur ein Klon von 24 willkürlich ausgewählten Klonen einen Titer von 0,25 mg/L. Alle anderen Klone, sowohl mit Mutante M3 als auch mit WT-NPT, lagen unter 0,1 mg/L. Die spezifischen Produktivitäten der beiden höchsten M3-Klone waren sehr hoch, wobei allerdings das Zellwachstum sehr eingeschränkt war. Die Vitalität der Zellen war so schlecht, dass nur geringe Zellzahlen erreichen wurden und somit auch ein geringer Produkttiter erzeugt wurde. Als Selektionsmarker zur Selektion von robusten, vitalen Produktionszellen ist die NPT-Mutanten M2 und M3 daher nicht geeignet. Eine Erniedrigung der G418-Konzentration unter 200 µg/mL bereits während der Selektionsphase ist nicht möglich, da solch geringe Konzentrationen an G418 nicht ausreichen, um untransfizierte Zellen komplett zu eliminieren.

Um auszuschließen, dass die Mutationen eine Blockade in der Transkription des *npt*-Gens verursachen, wurde das Vorhandensein der mRNA 48 h nach Transfektion (je zwei Parallelansätze) durch RT-PCR untersucht (Abb. 18). Die RT-PCR zeigte in allen Mutanten ein deutliches Signal für die *npt*-RNA (Abb. 18a). Das bedeutet, dass das *npt*-Gen in allen vier Mutanten transkribiert wurde. Kontaminationen mit genomischer DNA wurden durch einen vorherigen DNase-Verdau ausgeschlossen. Dies wurde zusätzlich durch die negativen

Kontrollansätze mit Primern, die in der nicht-kodierenden, nicht-transkribierten genomischen Region des CHO-Promotors hybridisieren, bestätigt (Abb. 18b).



#### Abb. 18: Nachweis der *npt*-RNA

CHO-DG44-Zellen wurden mit pKS-N5/MCP1 (M1), pKS-N6/MCP1 (M2), pKS-N7/MCP1 (M3) bzw. pKS-N8/MCP1 (M4) transfiziert (je zwei Parallelansätze). Zellernte und RNA-Isolierung nach ca. 48 h. a) Nachweis der *npt*-RNA mittels RT-PCR; Positiv(+)kontrolle: pNeo-CMV1; Primer im offenen Leseraster des *npt*-Gens b) Kontrolle auf genomische Kontamination der RNA; Positiv(+)kontrolle: pBE830; Primer in nicht-kodierender, nicht-transkribierter genomischer Region des CHO-Promotors. Es wurden 500 ng RNA und 1 ng DNA (Positivkontrolle) eingesetzt. Abkürzungen der Mutanten siehe Tab. 1.

Mit diesem Experiment konnte das Vorhandensein der mRNA also eindeutig bewiesen werden. Eine Kontrolle auf Protein-Ebene war nicht möglich, da ein Antikörper für NPT nicht bezogen werden konnte. Eine Blockade der Translation war jedoch eher unwahrscheinlich. Vielmehr handelte es sich beim Absterben der Zellen mit den Mutanten M2 und M3 eher um eine derart starke Beeinträchtigung der Enzymfunktion, dass eine Resistenz nicht mehr vermittelt werden konnte. Dies deckte sich auch mit den oben erwähnten Literaturdaten für diese beiden Mutationen in *E. coli* und mit dem Konservierungsgrad der betroffenen Aminosäuren von 100% (M2) bzw. 80% (M3) (Tab. 10).

#### 4.2.3 Effekt von NPT-Mutanten auf die Selektion von rekombinanten mAk-2-produzierenden Zellen

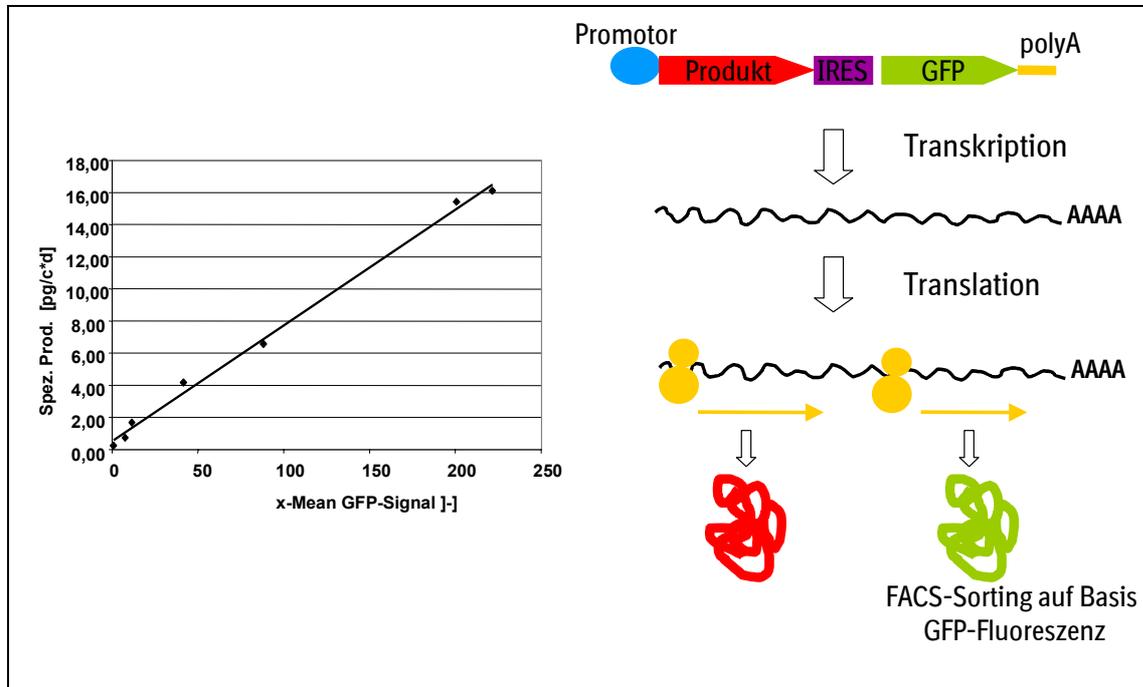
Durch die zufällige Auswahl von Einzelklonen ist immer nur ein kleiner Teil der Gesamtheit der Integrationsereignisse repräsentiert, während in einem transfizierten Pool noch alle Integrationsereignisse vorhanden sind. Um eine statistisch signifikante Aussage über die Anreicherung von Hochproduzenten machen zu können, muss somit nicht unbedingt eine Einzelzellklonierung und eine nachfolgende Untersuchung zahlreicher einzelner Klone durchgeführt werden. Stattdessen kann die Untersuchung auf Anreicherung von Hochproduzenten mit Pools erfolgen, wie es in den weiteren stabilen Transfektionsserien geschah. Um mit einem hohen Durchsatz die Expressionsstärke einzelner Zellen eines Pools messen zu können, wurden fluoreszierende Reporterproteine/-substanzen als leicht

messbare Indikatoren für das Expressionsniveau einbezogen. Dabei wurde entweder ein fluoreszierendes Reporterprotein (GFP) verwendet oder ein Protein (DHFR), dessen Expression durch die Zugabe einer fluoreszenzmarkierten Substanz (F-MTX) indirekt bestimmt wurde. Koppelt man das Reportergen mit dem Produktgen auf einem Plasmid, kann eine indirekte Quantifizierung der Produktivität über den fluoreszierenden Reporter mittels Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting) stattfinden. Dies ermöglicht es, viele Zellen mit hohem Durchsatz zu untersuchen und eine schnelle Vorauswahl der hochexpmierenden Pools oder Klone zu treffen.

Da Antikörper einen großen Anteil der therapeutischen Bioharmazeutika ausmachen, wurde in den weiteren Transfektionsserien ein monoklonaler Antikörper als Testprodukt verwendet, im Folgenden als mAk-2 bezeichnet. Die leichte und die schwere Kette des Antikörpers mAk-2 wurden auf verschiedenen Plasmiden in einer Kotransfektion in CHO-DG44-Zellen eingebracht. Die leichte Kette LC2 des mAk-2 wurde wie bei MCP1 vom Basisvektor pNeo2-CENUb2B bzw. den Vektoren mit den entsprechenden NPT-Varianten exprimiert (Klonierung siehe Kapitel 4.2.1, Vektorkarten siehe Anhang). Die schwere Kette HC2 wurde entweder vom Plasmid pBI-1/HC2 (siehe Anhang) oder vom Plasmid pAD-CENUb2B/HC2 (vgl. pAD-CENUb2B/HC1 im Anhang) exprimiert. Der Selektionsmarker dieser Vektoren war Dihydrofolatreduktase (DHFR). Das Enzym verlieh den *dhfr*-negativen Zellen CHO-DG44 die Fähigkeit, ohne die Supplemente Hypoxanthin und Thymidin zu wachsen. Das Weglassen von Hypoxanthin und Thymidin im Selektionsmedium ließ also nur Zellen überleben, die bei der Transfektion das *dhfr*-tragende Plasmid aufgenommen haben. Desweiteren wurde *dhfr* auch als Reportergen eingesetzt. Die Zugabe von fluoreszierendem MTX (F-MTX) resultierte in der kovalenten Bindung von F-MTX an DHFR. Die Menge an gebundenem F-MTX korrelierte direkt mit der Menge an exprimiertem DHFR und konnte im Durchflusszytometer quantifiziert werden (Kaufman et al 1978; Yoshikawa et al 2001). DHFR war wiederum ein Indikator für die Produktmenge. Bei Kotransfektion der schweren und leichten Kette auf zwei unabhängigen Vektoren erfolgt in der Regel eine Kointegration an der gleichen Position im Genom (Chen and Chasin 1998), sodass beide Ketten annähernd gleich stark exprimiert werden.

Ein weiterer fluoreszierender Reporter neben DHFR/F-MTX ist GFP (Green Fluorescent Protein). Koppelt man GFP über das genetische Element IRES (Internal Ribosome Entry Site) mit dem Produktgen, bekommt man eine sehr gute Titerkorrelation zwischen dem leicht zu detektierenden Fluoreszenzprotein GFP und dem Produkt (Abb. 19) (Hennecke et al 2001; Martinez-Salas 1999). Die stabil transfizierten Zellpools können ebenfalls im Durchflusszytometer (FACS) auf die Höhe der GFP-Expression untersucht werden, analog

zur Messung von DHFR/F-MTX. Eine der Messung vorangehende Inkubation mit dem fluoreszierenden Agens ist jedoch nicht nötig. Die Zellen werden lediglich in PBS aufgenommen und im FACS gemessen.



**Abb. 19: Korrelation von Produkt- und GFP-Expression**

Die Kopplung eines Produktgens mit GFP über IRES (Internal Ribosome Entry Site) stellt eine bicistronische Transkriptionseinheit dar. Durch die Transkription entsteht eine mRNA, die Translation bringt zwei Proteine hervor, deren Menge korreliert (B. Enenkel, J. Fieder, pers. Komm.).

Dieses Prinzip wurde in den stabilen Transfektioserien ST neo8, neo9 und neo11 verwendet (Tab. 2). Die Vektoren mit der leichten Kette LC2 und den NPT-Varianten wurden dabei jeweils mit dem Plasmid pBI-1/HC2 kombiniert. Es enthält die schwere Kette HC2, die unter der Kontrolle eines CHO-Promotors steht und über IRES an GFP gekoppelt ist, und DHFR als Selektionsmarker (Plasmidkarten siehe Anhang). In drei anderen Transfektionsserien (ST neo5, ST neo6 und ST neo7) wurde die Expressionsstärke in den einzelnen Pools über die Interaktion von exprimiertem DHFR mit F-MTX im Durchflusszytometer quantifiziert (Tab. 2). Dazu wurden jeweils  $5 \cdot 10^5$  Zellen/mL mit einer F-MTX-Endkonzentration von 500 nM oder 200 nM in 24-Well oder 6-Well Platten angesetzt. Die FACS-Messung erfolgte ca. 20 - 24 Stunden später.

In allen Serien wurde 1 µg Gesamt-DNA transfiziert, wobei LC- und HC-Plasmid im Verhältnis 1:1 eingesetzt wurden. Die Selektion erfolgte am Tag 2 nach der Transfektion mit einer G418-Konzentration von 400 µg/mL (Ausnahme ST neo9, siehe Kapitel 4.2.4). Jede FACS-Messung berücksichtigte 20000 Zellen.

Die FACS-Messung der transfizierten Pools lieferte ein Ergebnis, das in etwa mit der in Abbildung 1 dargestellten Gauß-Kurve vergleichbar ist (Abb. 20). Auf der Ordinate ist die

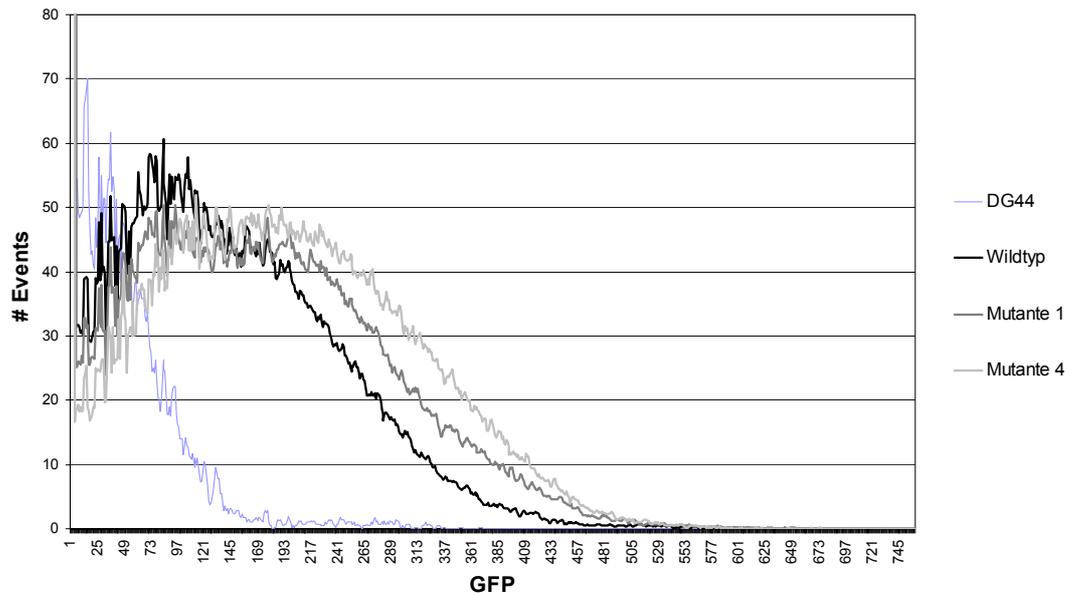
Fluoreszenzintensität (Produktivitätsstufen) aufgetragen, die Abszisse repräsentiert die Anzahl der Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität. Für die Mutanten wurde erwartet, dass die Gauß-Kurve im Vergleich zum Wildtyp leicht nach rechts – hin zu einer höheren Produktivität - verschoben wäre.

	<b>Reporter (HC-Plasmid)</b>	<b>NPT-Varianten</b>	<b># Pools pro Variante</b>	<b># Passagen</b>
<b>ST neo5</b>	DHFR/F-MTX (pAD-CENUb2B/HC2)	WT, M1, M4	6	8
<b>ST neo6</b>	DHFR/F-MTX (pAD-CENUb2B/HC2)	WT, M1, M4	6	8
<b>ST neo7</b>	DHFR/F-MTX (pAD-CENUb2B/HC2)	WT, M1, M4	6	8
<b>ST neo8</b>	GFP (pBI-1/HC2)	WT, M1, M4	6	8
<b>ST neo9</b>	GFP (pBI-1/HC2)	WT, M1, M4	9	6
<b>ST neo11</b>	GFP (pBI-1/HC2)	WT, M1, M4, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8	5	6

**Tab. 2: Transfektionsserien und Vektoren mit mAk-2 als Testprodukt**

Zusammenstellung der stabilen Transfektionsserien mit verschiedenen NPT-Mutanten und mAk-2 als Testprodukt, Anzahl der Pools und Passagen. Abkürzungen der Mutanten siehe Tab. 1.

Zum Vergleich wurden bei jeder Messung untransfizierte Zellen mitgeführt, da die Zellen eine geringe Eigenfluoreszenz aufwiesen. Fluoreszenzsignale, die darüber hinausgingen, waren der DHFR bzw. GFP-Expression zuzuschreiben. In einer Übereinanderlagerung der FACS-Kurven (Plot-Overlay) war deutlich zu erkennen, dass in Pools mit NPT-Mutanten mehr Zellen eine stärkere Fluoreszenz aufwiesen als in Pools mit der WT-NPT-Variante. Abbildung 20 zeigt eine Darstellung, in der beispielhaft alle Pools der Transfektionsserie ST neo9 berücksichtigt wurden. Aus den neun Pools jeder NPT-Variante wurde ein Mittelwert berechnet, d. h. die Zellzahl jedes FACS-Kanals wurde gemittelt. So ergab sich für jede NPT-Variante eine Kurve.



**Abb. 20: NPT-abhängige GFP-Expression in der Transfektionsserie ST neo9**

Jeder Graph, mit Ausnahme der als Negativkontrolle dienenden nicht-transfizierten CHO-DG44 Zellen, stellt den Mittelwert der GFP-Fluoreszenz aus jeweils neun Pools der stabilen Transfektionsserie ST neo9 dar. Abkürzung der Mutanten siehe Tab. 1. Zur besseren Übersicht wurden die oberen Bereiche der Achsen nicht dargestellt.

Die Übereinanderlagerung der Kurven in Abbildung 20 veranschaulicht, dass die Fluoreszenz der transfizierten Zellen (schwarze und graue Kurve) deutlich über der Eigenfluoreszenz der untransfizierten DG44-Zellen (hellblaue Kurve) lagen. Außerdem exprimierten die mit den mutierten NPT-Varianten selektierten Zellen im Durchschnitt mehr GFP als die mit der Wildtyp-NPT-Variante selektierten Zellen. Bei den Pools mit Mutanten M1 und M4 wurden deutlich mehr Zellen höheren Kanälen zugeordnet, d. h. sie fluoreszierten stärker als Zellen, die mit WT-NPT selektiert wurden. Dabei war in Zellen mit M4 im Vergleich zu Zellen mit M1 noch eine zusätzliche Steigerung der Fluoreszenz zu beobachten. Durch die Mutanten konnten also wie erwartet Hochproduzenten angereichert werden. Außerdem zeigt diese Darstellung der Mittelwerte aus je neun Pools, dass die Anhäufung von Hochproduzenten kein Zufallsereignis war, das sich in einzelnen Pools abspielte. Die Anreicherung kann vielmehr als direkte Auswirkung des mutierten Selektionsmarkers betrachtet werden, die Nichtproduzenten absterben ließ und dadurch die Anreicherung von Hochproduzenten begünstigte.

Um diese Aussage zu untermauern, wurde für Zellen, die mit den NPT-Varianten M1, M4 und WT selektiert worden waren, die Expression des Produkts (mAk-2) in insgesamt 38 Pools und sechs unabhängigen Transfektionsserien (ST neo5, neo6, neo7, neo8, neo9 und neo11) über sechs bis acht Passagen hinweg ermittelt.

In Tabelle 3 ist die Verteilung der Pools für die drei NPT-Varianten M1, M4 und WT bezüglich des Antikörper-Titers und der spezifischen Produktivität zusammengefasst. Die Pools mit

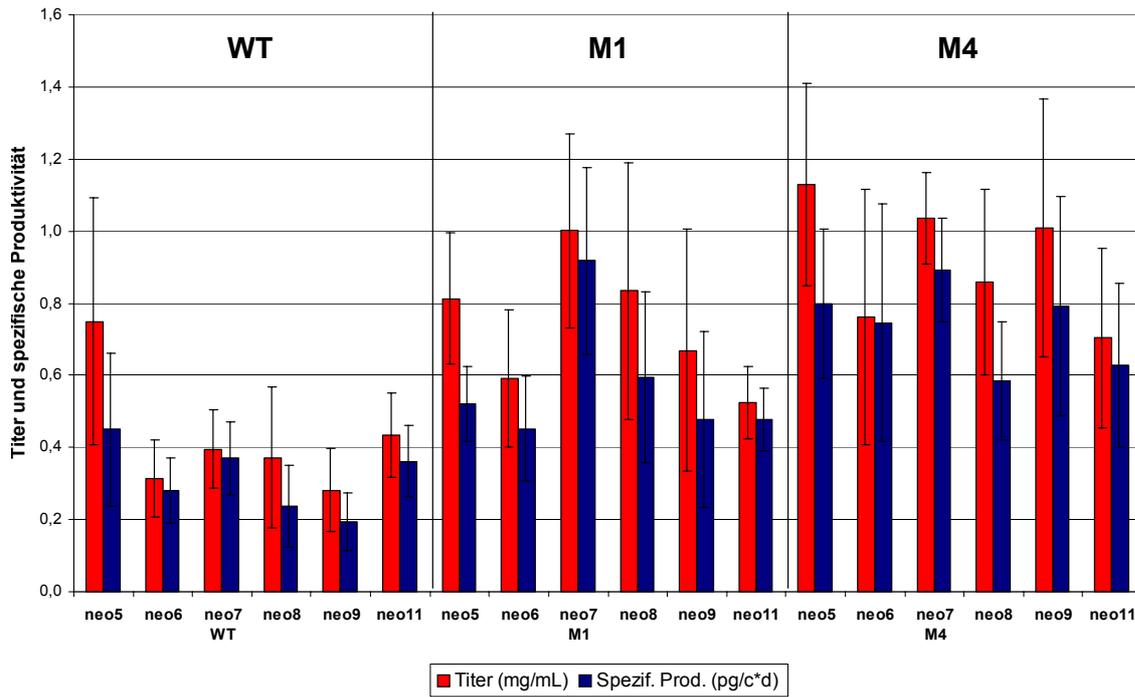
Wildtyp-NPT erreichten nur in drei Ausnahmefällen einen mAk-2-Titer von über 0,8 mg/L und nur in einem Fall eine spezifische Produktivität von über 0,8 pg/c\*d. Dagegen überstiegen mit Mutante M1 selektionierte Pools des öfteren die Grenze von 0,8, sowohl beim Produkttiter (14 Pools von 38) als auch bei der spezifischen Produktivität (8 Pools von 38). Mit der Verwendung von Mutante M4 als Selektionsmarker lagen sogar fast alle Pools bei oder über einem Titer von 0,8 mg/L (27 von 38) bzw. einer spezifischen Produktivität von 0,6 pg/c\*d (30 von 38). Nur acht (Titer) bzw. neun (spezif. Prod.) Pools lagen unter der Marke von 0,6 mg/L bzw. pg/c\*d. Sehr viele erreichten sogar einen Antikörper-Titer zwischen 1,0 mg/L und 1,6 mg/L (15 Pools).

		mg/L oder pg/c*d	≥ 0,8	≥ 0,6 < 0,8	≥ 0,4 < 0,6	≥ 0,2 < 0,4	< 0,2
<b>Wildtyp-NPT</b>	Titer		3	2	9	21	3
	spezif. Prod.		1	0	7	21	9
<b>Mutante M1</b>	Titer		14	10	9	5	0
	spezif. Prod.		8	5	17	7	1
<b>Mutante M4</b>	Titer		27	3	7	1	0
	spezif. Prod.		15	14	6	3	0

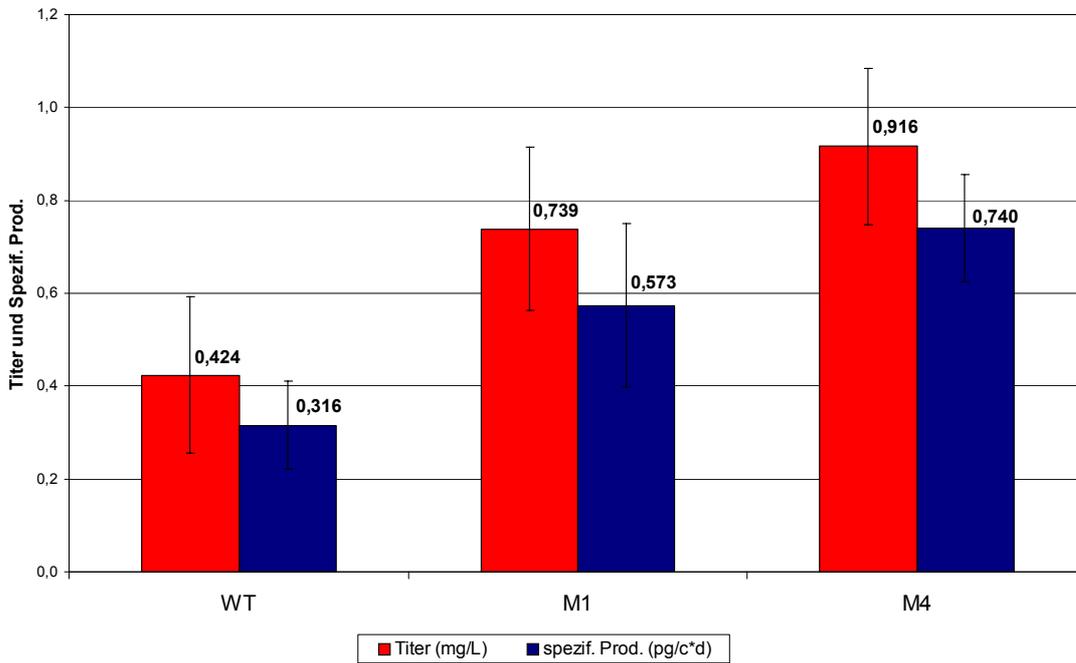
**Tab. 3: Verteilung der Pools nach Antikörpertiter und spezifischer Produktivität**

Es gingen insgesamt 38 Pools pro NPT-Variante aus den sechs stabilen Transfektionsserien ST neo5, neo6, neo7, neo8, neo9 und neo11 in die Aufstellung ein. Abkürzung der Mutanten siehe Tab. 1.

In Abbildung 21 ist die durchschnittliche mAk-2-Produktion von M1-, M4- und WT-NPT-selektierten Zellpools dargestellt. In jeder der sechs Serien brachte die Selektion mit Mutante M4 die besten Produzenten hervor. Aber auch bei einer Selektion mit Mutante M1 zeigten die Zellen im Vergleich zur Selektion mit der WT-NPT eine erhöhte mAk-2-Expression. Die Produktivität der Pools mit Wildtyp-NPT lag im Schnitt deutlich unter jener der Mutanten. Die Mittelwerte aller Pools und Transfektionsserien zusammengenommen zeigten eindeutig die Abstufung von Wildtyp-selektierten Zellen über M1- bis zu M4-selektierten Zellen bezüglich Antikörper-Titer und -Produktivität wie sie auch in den einzelnen Serien klar auftrat (Abb. 21 B). Mit NPT-Mutante M4 erreichten die Zellpools durchschnittlich einen mAk-2-Titer von fast 1 mg/L in unamplifizierten Zellen und T-Flasks. Bezogen auf Zellzahl und Kultivierungsdauer erhielt man durchschnittlich eine spezifische Produktivität von 0,740 pg/c\*d (Abb. 21 B). Diese Zahlen entsprechen einem 2,2- bis 2,3-fachen Erhöhung von Produkttiter und spezifischer Produktivität verglichen mit der mAk-2-Produktion, die mit dem herkömmlichen Selektionsmarker NPT-Wildtyp erreicht wurde. Auch die Selektion mit der NPT-Mutante M1 führte zu besseren Produzenten. Produkttiter und spezifische Produktivität waren im Vergleich zu WT-selektierten Pools in etwa um den Faktor 1,7 - 1,8 gesteigert (Abb. 21 B).



A)



B)

**Abb. 21: Antikörperproduktion von M1-, M4- und WT-NPT-selektionierten Zellpools**

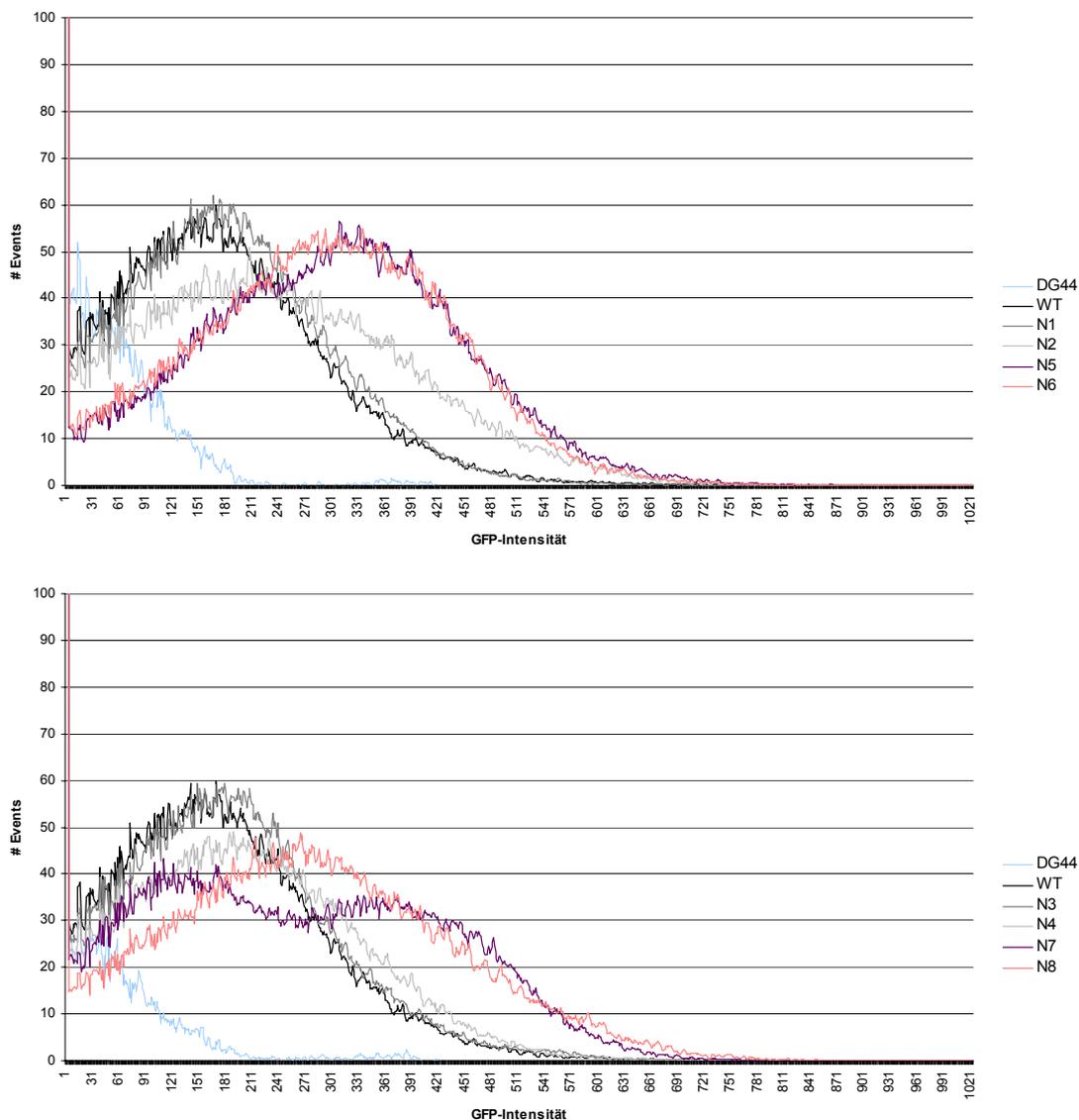
In A) sind die Mittelwerte von mAk-2-Titer und spezifischer Produktivität aus den sechs einzelnen Transfektionsserien ST neo5 (n = 6 Pools), ST neo6 (n = 6 Pools), ST neo7 (n = 6 Pools), ST neo8 (n = 6 Pools), ST neo9 (n = 9 Pools) und ST neo11 (n = 5 Pools) dargestellt. B) zeigt den Durchschnitt aus den Mittelwerten in A) (n = 6 Serien). Die Kultivierung der Pools erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> T-Flasks mit einem Passagierungsrhythmus von 2-2-3 Tagen über sechs oder acht Passagen. Die Abkürzungen der Mutanten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem beobachteten Effekt der erhöhten Produktivität um ein Phänomen handelte, das sich ausschließlich mit M1 und M4 erzielen lässt oder ob andere Mutanten des Selektionsmarker NPT ebenfalls zu einer Anreicherung von Hochproduzenten führen können und womöglich noch größere Produktsteigerungen verursachen, wurden acht weitere Mutanten (N1 bis N8, siehe Tab. 1) auf die gleiche Weise getestet (ST neo11). Die Auswahl der Mutationen erfolgte an mehr oder weniger stark konservierten Bereichen der NPTII (Abb. 32). Die Transfektion wurde wie oben beschrieben mit 1 µg DNA und einem LC- zu HC-Plasmid-Verhältnis von 1:1 mit je fünf Ansätzen pro NPT-Variante durchgeführt (Tab. 2). Am Tag zwei nach der Transfektion wurde Selektionsdruck durch Zugabe von 400 µg/mL G418 ausgeübt. In dieser Serie konnte deutlich beobachtet werden, dass die Pools mancher Mutanten zwei bzw. sieben Tage länger benötigten, bis sie die Selektionsphase überstanden hatten. Während die Pools mit den NPT-Varianten WT, M1, N1 und N3 bereits nach den üblichen zwei Wochen das erste Mal passagiert werden konnten, war dies bei M4 und N4 erst zwei Tage später möglich. Die Mutanten N2, N5, N6, N7 und N8 wurden erst drei Wochen nach der Transfektion passagiert. Dies zeigt, dass in den Pools mit den entsprechend mutierten Selektionsmarkern weniger Zellen die Selektion überlebten. Die wenigen Überlebenden, bei denen es sich um Hochproduzenten handelte, benötigten folglich einige Zellzyklen mehr, bis sie auf dieselben Zellzahlen herangewachsen waren wie die Pools mit den NPT-Varianten WT, M1, N1 und N3. Viele Pools mit den Mutationen N2, N5 und N6 zeigten durchgehend ein schlechtes Zellwachstum. Es wurden nicht die üblichen Zellzahlen von bis zu  $9 \times 10^5$  bis  $12 \times 10^5$  Zellen/mL (nach zwei Tagen in T-Flasks ausgehend von  $2 \times 10^5$  Zellen/mL) erreicht. Außerdem wiesen manche dieser Pools eine starke Verklumpung der Zellen auf.

Sobald die Selektionsphase überstanden war, wurde die GFP-Expression im Durchflusszytometer bestimmt. Durch die Kopplung von GFP mit dem Produktgen über IRES spiegelte die GFP-Expression die Produktmenge wider. Dies ermöglichte die Bestimmung des Expressionsniveaus abhängig von der verwendeten Selektionsmarkervariante. In den Diagrammen der Abbildung 22 wurden die mit NPT-Mutanten transfizierten Zellen jeweils mit den untransfizierten DG44-Zellen und den WT-NPT-transfizierten Zellen verglichen. Außerdem wurden der Antikörper-Titer und die spezifische Produktivität ermittelt (Abb. 23).

Die durchschnittliche GFP-Expression war in allen Pools, die mit einer mutierten NPT selektioniert worden waren, höher als in den Pools, die mit der WT-NPT selektioniert worden waren (Abb. 22). Mit den Mutanten N1 und N3 (jeweils dunkelgraue Kurve) zeigte sich nur ein sehr kleiner Effekt, mit den Mutanten N2 und N4 (jeweils hellgraue Kurve) war das Expressionsniveau bereits deutlich gesteigert, während mit N7, N8 (violette und rosa Kurve,

unten) und vor allem mit N5 und N6 (violette und rosa Kurve, oben) eine sehr starke Verschiebung der Kurve nach rechts zu beobachten war (Abb. 22).

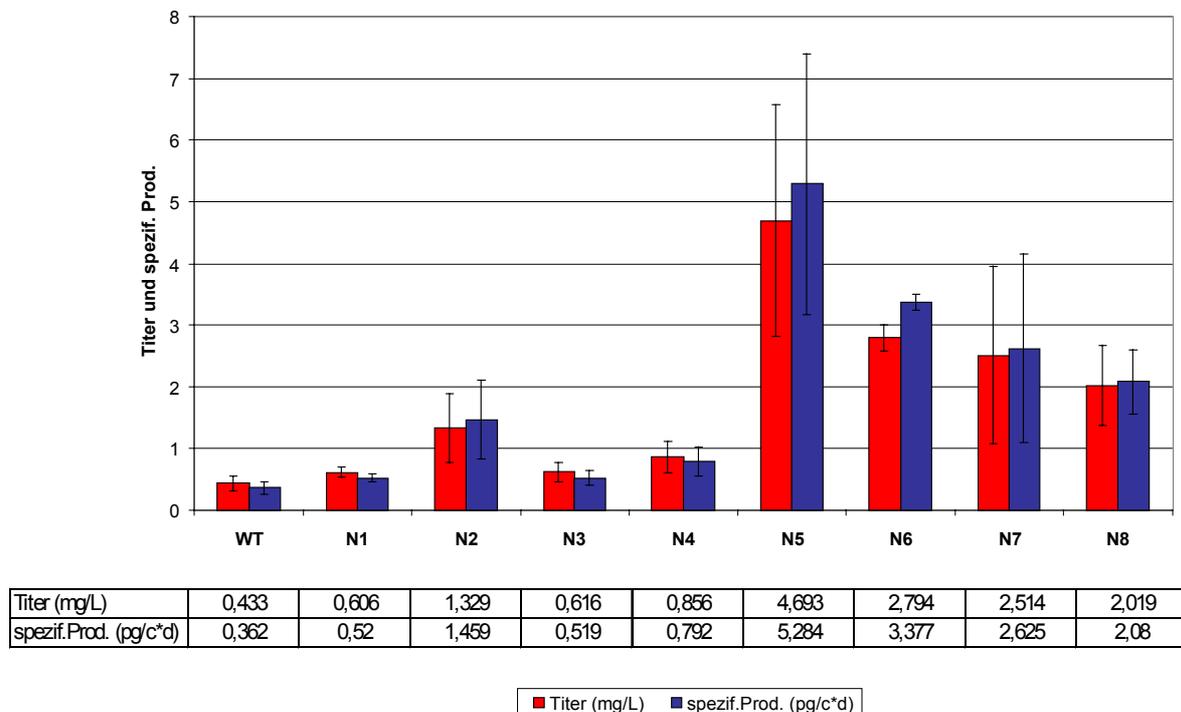


#### Abb. 22: NPT-abhängige GFP-Expression in der Transfektionsserie ST neo11

Jeder Graph, mit Ausnahme der als Negativkontrolle dienenden, nicht-transfizierten CHO-DG44 Zellen, stellt den Mittelwert der GFP-Fluoreszenz aus jeweils 4-5 Pools der stabilen Transfektionsserie ST neo11 dar. Pro Pool wurden 20000 Zellen berücksichtigt. DG44 = untransfizierte Zellen, WT = Wildtyp-NPT, N1 bis N8 = NPT-Mutanten (siehe Tab. 1).

Die durchschnittliche mAk-2-Produktion der mit den NPT-Varianten transfizierten Pools stimmte mit den FACS-Daten überein. Alle Pools, die mit einer mutierten NPT-Variante selektioniert worden waren, wiesen eine höhere Antikörperexpression auf als die Pools, die mit der WT-Variante selektioniert worden waren (Abb. 23). Die mit den Mutanten N5, N6, N7 und N8 transfizierten Zellen zeigten das höchste Expressionsniveau. Ihre Titer waren im Vergleich zu den WT-transfizierten Zellen um das Fünf- bis Zehnfache und ihre spezifischen

Produktivitäten um das Sechs- bis 14-fache höher (Tab. 4). Auch die Expressionslevel von N2- und N4-transfizierten Zellen waren deutlich gesteigert. Sie brachten es auf eine zwei- bis vierfache Steigerung in mAk-2-Titer und spezifischer Produktivität (Tab. 4). Die mit N1 und N3 transfizierten Pools wiesen ebenfalls einen leichten Anstieg des Produktlevels auf (1,4-fach), der in etwa mit dem von M1-transfizierten Zellen zu vergleichen ist (1,8-fach).



**Abb. 23: NPT-abhängige Antikörperproduktion von Zellpools der Serie ST neo11**

Es sind die Mittelwerte für mAk-2 Titer und spezifische Produktivität aus je 4-5 Pools der stabilen Transfektionsserie ST neo11 dargestellt. Die Kultivierung der Pools erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> T-Flasks über sechs Passagen mit einem Passagierensrhythmus von 2-2-3 Tagen. Die Abkürzungen der Mutanten sind in Tab. 1 aufgelistet.

	WT	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8
Titer (rel.)	1	1,4	3,1	1,4	2,0	10,8	6,5	5,8	4,7
spezif. Prod. (rel.)	1	1,4	4,0	1,4	2,2	14,6	9,3	7,3	5,7

**Tab. 4: Relative Steigerung von mAk-2-Titer und spezifischer Produktivität in der Serie ST neo11**

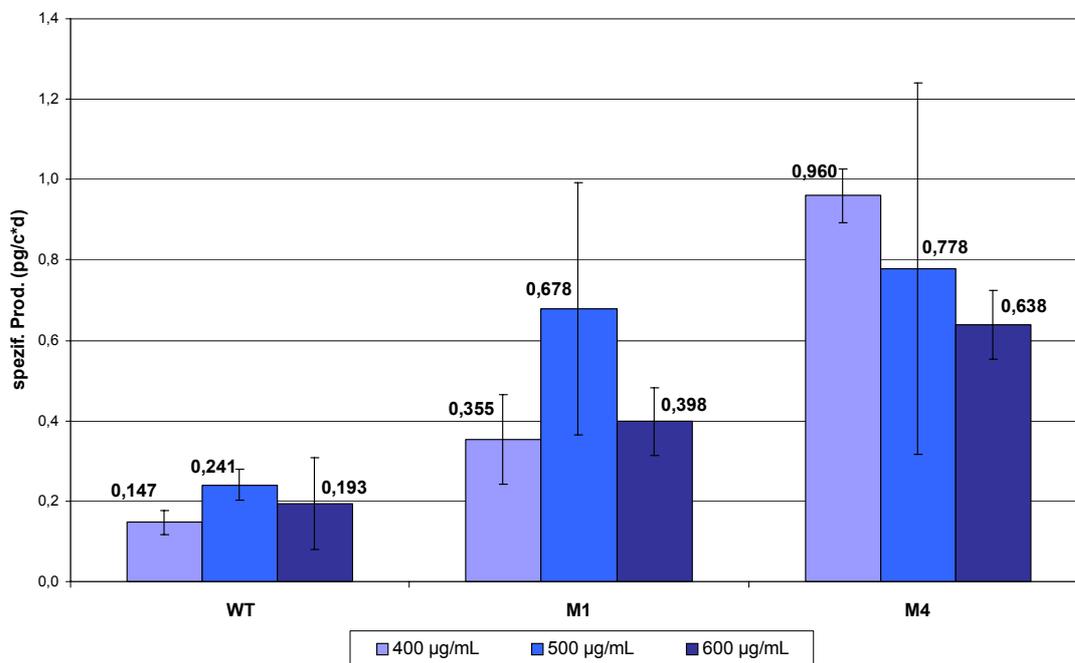
Titer und spezifische Produktivität von WT-NPT-selektionierten Zellen wurde mit 1 festgesetzt und die Werte der mit Mutanten selektionierten Zellen relativ dazu berechnet. Die Abkürzungen der Mutanten sind in Tab. 1 aufgelistet.

In jeder der sechs unabhängigen Transfektionsserien ST neo5, neo6, neo7, neo8, neo9 und neo11 zeigte sich deutlich, dass Zellpools, die mit einem der darin verwendeten mutierten Selektionsmarkern transfiziert wurden, mehr Zellen mit besserer Produktivität hervorbrachten als Zellpools, die mit der WT-Variante selektioniert wurden. Folglich unterstützten diese Experimente die Hypothese, dass bei reduzierter Resistenz durch eine Mutation im Gen für

die Neomycin-Phosphotransferase das Überleben von Klonen favorisiert wird, die eine höhere Transkriptionsrate der integrierten DNA aufweisen.

#### 4.2.4 G418-Titration

Die stabile Transfektionsserie ST neo9 sollte zusätzlich klären, ob eine Erhöhung der G418-Konzentration bei der Selektion in Verbindung mit den mutierten Selektionsmarkern noch zu einer weiteren Titersteigerung führen kann. Pro NPT-Variante (WT, M1, M4) wurden neun Pools angesetzt, von denen jeweils drei mit einer G418-Konzentration von 400 µg/mL, 500 µg/mL bzw. 600 µg/mL selektioniert wurden.



**Abb. 24: Antikörperproduktion in Abhängigkeit von der G418-Konzentration**

Es sind die Mittelwerte für die spezifische Produktivität aus je drei Pools der Transfektionsserie ST neo9 dargestellt. Die Kultivierung der Pools erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> T-Flasks über jeweils sechs Passagen mit einem Passagierensrhythmus von 2-2-3 Tagen. Am Tag 2 nach der Transfektion wurde die Selektion der Pools mit drei verschiedenen G418-Konzentrationen gestartet (400, 500 und 600 µg/mL). Die Abkürzungen der Mutanten sind in Tab. 1 aufgelistet.

Für die WT-NPT wurde schon weiter oben gezeigt, dass eine erhöhte G418-Konzentration bei der Selektion (800 µg/mL statt 400 µg/mL) keine positiven Auswirkungen auf die Selektion von produktiveren Zellen hat. Das bestätigte auch dieses Experiment (Abb. 24). Die spezifische Produktivität lag unabhängig von der G418-Konzentration bei allen WT-Pools zwischen 0,1 und 0,4 pg/c\*d. Die höheren G418-Konzentrationen bei der Selektion führten mit den mutierten NPT-Varianten ebenfalls nicht zu einer zusätzlichen Steigerung der mAk-2-Produktion. Bis auf eine Ausnahme produzierten die M1-Pools zwischen 0,2 und 0,6 pg/c\*d [M1-Pool 5 (500 µg/mL): 1,1 pg/c\*d]. Dieser Ausnahmepool verursacht die relativ

hohe mittlere Produktivität der drei Pools, die bei 500 µg/mL G418 und mit NPT-Variante M1 selektiert wurden. Die M4-Pools exprimierten mAk-2 im Bereich zwischen 0,5 und 1,4 pg/c\*d. Auch hier war Pool 5 (500 µg/mL) die Ausnahme mit nur 0,25 pg/c\*d. Wenn auch die Erhöhung der G418-Konzentration keine Auswirkungen auf die Produktexpression hatte, bestätigte diese Transfektionsserie wiederum den Effekt der Mutanten. Die Pools mit Mutante M1 und Mutante M4 wiesen abgesehen von einer Ausnahme (M4-Pool 5) höhere Titer und spezifische Produktivitäten auf als die Pools mit der WT-NPT. Auch die Abstufung zwischen M1 und M4 trat wie bisher wieder auf.

#### 4.2.5 Enzymfunktion

Der durchgehend beobachtete Effekt der erhöhten Produktexpression bei den Mutanten warf die Frage auf, ob diese tatsächlich in kausalem Zusammenhang mit einer reduzierten Enzymaktivität der Neomycin-Phosphotransferase steht. Klären ließ sich diese Frage mit einem Enzym-Aktivitätsassay. Dazu wurden für jede Variante exemplarisch zwei Pools ausgewählt, die bezüglich der Antikörperproduktion in etwa dem Durchschnitt der jeweiligen NPT-Variante entsprachen. Zur Poolauswahl für die NPT-Varianten M1, M4 und WT(1), WT(2) wurden die Transfektionsserien ST neo5, ST neo6, ST neo7, ST neo8 und ST neo9 herangezogen, zur Poolauswahl für die NPT-Varianten N1 bis N8 und WT(3), WT(4) die Serie ST neo11. Von allen diesen Pools wurden Zellextrakte hergestellt und über eine definierte Zeitspanne hinweg (ca. 135 min) mit radioaktiv markiertem [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-ATP als Phosphatdonor und G418 als Phosphatakzeptor inkubiert (siehe Kapitel 3.3.4). Die im Zellextrakt enthaltene Neomycin-Phosphotransferase ließ in Abhängigkeit von ihrer Aktivität verschiedene Mengen an radioaktivem G418-Phosphat entstehen. Dieses konnte an Phosphocellulose gebunden und im Phosphorimager detektiert und quantifiziert werden. Proteine wurden während der Filtration durch eine Nitrocellulosemembran abgefangen, sodass die Proteine, welche durch Proteinkinasen mit <sup>33</sup>P phosphoryliert wurden, das Signal für das G418-Phosphat nicht beeinflussten. Der Phosphorimager lieferte von dem an die Phosphocellulose gebundenen G418-Phosphat die Abbildung eines Dot Blots wie in Abbildung 25 beispielhaft dargestellt ist. Jeder Punkt wurde vom Phosphorimager hinsichtlich der Signalintensität quantifiziert. Zur Ermittlung der relativen Enzymaktivitäten wurden die Werte mit 5 µg eingesetztem Extrakt herangezogen und die Probe mit dem stärksten Signal als 100% Enzymaktivität definiert. In Abbildung 25 war dies für den Pool WT(1) der Fall. Die Signale der anderen Proben wurden zu diesem Signal in Relation gesetzt. Für jeden Pool ergab sich also eine Enzymaktivität relativ zur Aktivität eines WT-NPT-transfizierten Pools

$\gamma$ - <sup>33</sup> P-ATP	+	+	+	+	-
$\mu$ g Extrakt	5	2,5	1,25	5	5
G418	+	+	+	-	+
WT(1)					
WT(2)					
M1(1)					
M1(2)					
M4(1)					
M4(2)					
DG 44					
Puffer					

### Abb. 25: NPT-Enzym-Aktivitätsassay

Der Dot Blot zeigt die Enzymaktivitäten von NPT-Mutante M1 und NPT-Mutante M4 im Vergleich zur WT-NPT-Variante. Von jedem Pool wurden drei verschiedene Proteinmengen eingesetzt (5  $\mu$ g, 2,5  $\mu$ g, 1,25  $\mu$ g mit Doppelbestimmungen) und jeweils Ansätze ohne ATP bzw. ohne G418 mitgeführt. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte CHO-DG44-Zellen und Ansätze ohne jeglichen Zellextrakt (Puffer). Die Abkürzungen der Mutanten sind in Tab. 1 aufgelistet.

Im Vergleich zur normalen Variante der Neomycin-Phosphotransferase [WT(1) - WT(4)] war die Enzymaktivität der mutierten Varianten deutlich reduziert (Abb. 25, Tab. 5). Eine Quantifizierung des entstandenen G418-Phosphats durch den Phosphorimager ergab im Durchschnitt eine verbleibende Enzymaktivität von 23% für Mutante M1 und 47% für Mutante M4, wenn man von einer 100%igen Enzymaktivität der Wildtyp-Variante [WT(1)] ausgeht. Derselbe Versuch ergab für die ausgewählten Pools WT(3), WT(4) und die Mutanten N1 bis N8 aus der Transfektionsserie ST neo11 ebenfalls reduzierte Enzymaktivitäten in unterschiedlichen Abstufungen (Tab. 5). Die geringsten Enzymaktivitäten wiesen die Mutanten N6 und N7 mit nur 1 - 4% im Vergleich zur normalen Neomycin-Phosphotransferase auf. Dennoch schien eine höhere Genexpression diese starke Beeinträchtigung der Enzyme kompensiert zu haben, sodass die Zellen, die diese Variante exprimierten, den Selektionsdruck überlebten. Die meisten Mutanten zeigten Restaktivitäten zwischen 10 und 30% (N1, N4, N5, N8, M1). Eine eher gemäßigte Einschränkung der Enzymaktivität liegt bei M4, N2 und N3 vor (46 - 55%).

NPT-Variante	Mutation	% Aktivität (Pool)	Mittel Aktivität (%)
WT		100 (1) 86 (2)	93
M1	E182D	24 (1) 22 (2)	23
M2	D190G	n.d.	n.d.
M3	D208G	n.d.	n.d.
M4	D227G	61 (1) 33 (2)	47
WT'		75 (3) 100 (4)	87,5
N1	E182G	29 (1) 16 (2)	22,5
N2	W91A	47 (1) 46 (2)	46,5
N3	V198G	55 (1) 53 (2)	54
N4	D227A	23 (1) 20 (2)	21,5
N5	D227V	11 (1) 18 (2)	14,5
N6	D261G	4 (1) 2 (2)	3
N7	D261N	1 (1) 2 (2)	1,5
N8	F240I	24 (1) 17 (2)	20,5

**Tab. 5: NPT-Enzymaktivität verschiedener Mutanten**

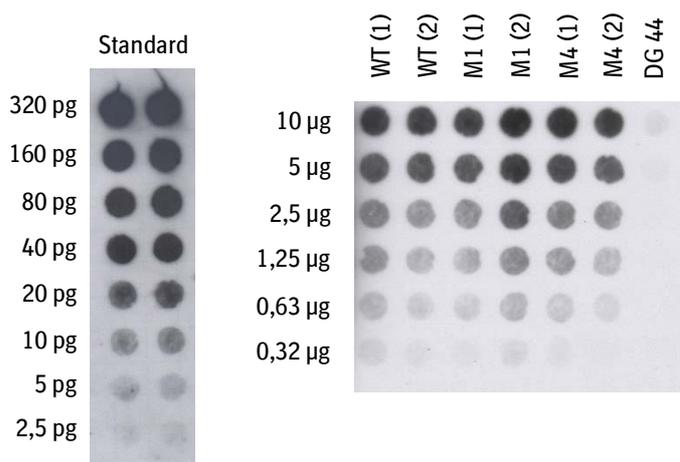
Für jeden Pool wurde die Enzymaktivität relativ zum höchsten Wert der jeweiligen WT-Variante berechnet [WT(1) bzw. WT(4)]. In der letzten Spalte sind für jede NPT-Variante die Aktivitäten der zwei untersuchten Pools gemittelt.

Da eindeutig gezeigt werden konnte, dass die durchschnittliche Antikörper-Produktivität von Zellen, die mit einer NPT-Mutante selektioniert worden waren, erhöht war, lag der Schluss nahe, dass die Steigerung der Expression in ihrem Maß von der Einschränkung der Enzymaktivität abhängig ist. Bei einem Vergleich dieser beiden Parameter, fiel jedoch auf, dass sie sich nicht streng proportional zueinander verhielten. Zellen, die mit den Mutanten M1, M4, N1, N3 und N4 selektioniert wurden, zeigten eine leicht gesteigerte Antikörperproduktion im Vergleich zu WT-NPT-selektionierten Zellen. Von ihnen wiesen aber nur die Enzymvarianten N3 und M4 eine noch relativ hohe Restaktivität von 54% bzw. 47% auf, während M1, N1 und N4 nur noch zu ca. 22% aktiv waren. Die vergleichsweise höheren mAk-2-Produzenten mit N2, N5, N6, N7 und N8 waren nicht alle stark in ihrer Enzymaktivität beeinträchtigt. Nur die sehr hohe Expression von N6- und N7-transfizierten Zellen ging mit einer sehr stark reduzierten Enzymaktivität (1,5 – 3%) einher. Die Enzymaktivität von N5 und N8 war zwar auch eher gering (14,5% bzw. 20,5%), aber sie war doch nicht so gering wie die von N6 und N7, obwohl die mAk-2-Produktion von N5- und N8-transfizierten Zellen ähnlich (N8) bzw. sogar höher (N5) war als mit N6- und N7-transfizierten Zellen. Die Enzymmutante

N2 war in ihrer Restaktivität (46,5%) vergleichbar mit M4 (47%). Allerdings produzierten die mit N2 selektionierten Zellen etwa doppelt so viel wie die mit M4 selektionierten Zellen. Zwischen der restlichen Enzymaktivität und der Antikörperproduktion von entsprechend selektionierten Zellen besteht also eher eine grobe Korrelation. Bildete man anhand der Expressionsdaten zwei unterschiedliche Gruppen mit WT, M1, M4, N1, N2, N3 und N4 unter einer spezifischen Produktivität von 2 pg/c\*d und N5, N6, N7 und N8 über einer spezifischen Produktivität von 2 pg/c\*d, so konnte man eine gewisse Korrelation mit der Enzymaktivität feststellen. Während die Selektionsmarker der weniger guten bis mittleren Produzenten in der Mehrzahl eine Enzymaktivität von 20% und darüber zeigten, lagen die Enzymaktivitäten von höheren Produzenten eher unter dieser Schwelle.

#### 4.2.6 Genkopieneffekt

Die höhere Produktexpression von Pools, die mit einer mutierten NPT selektioniert worden sind, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann der Transkriptionsstatus der genomischen Umgebung, also der Integrationsort, die Transkription der integrierten Fremd-DNA beeinflussen. Zum anderen spielt auch die Anzahl der integrierten Genkopien eine Rolle. Um festzustellen, ob die hohe Expression in den Mutanten durch einen Genkopieneffekt verursacht wurde, erfolgte eine Bestimmung der *npt*-Genkopienzahl mittels Dot Blot (Abb. 26 und 27). In diesem Experiment wurden dieselben Pools berücksichtigt wie bei der Bestimmung der Enzymaktivität.



**Abb. 26: Bestimmung der *npt*-Genkopienzahl**

Der Dot Blot stellt die Bestimmung der *npt*-Genkopienzahl von ausgewählten Pools der NPT-Varianten WT, M1 und M4 dar. Für den Standard wurde das Plasmid pNeo2-CENUb2B/LC2 in den angegebenen Verdünnungsschritten eingesetzt (320 pg – 2,5 pg). Von der genomischen DNA der Proben wurden ebenfalls verschiedene Mengen aufgetragen (10 µg – 0,32 µg). Die Sonde wurde wie in Kapitel 3.1.18 beschrieben hergestellt. Das dafür eingesetzte 800 bp lange PCR-Fragment stammte aus dem *npt*-WT-Gen. Abkürzung der Mutanten siehe Tab. 1.

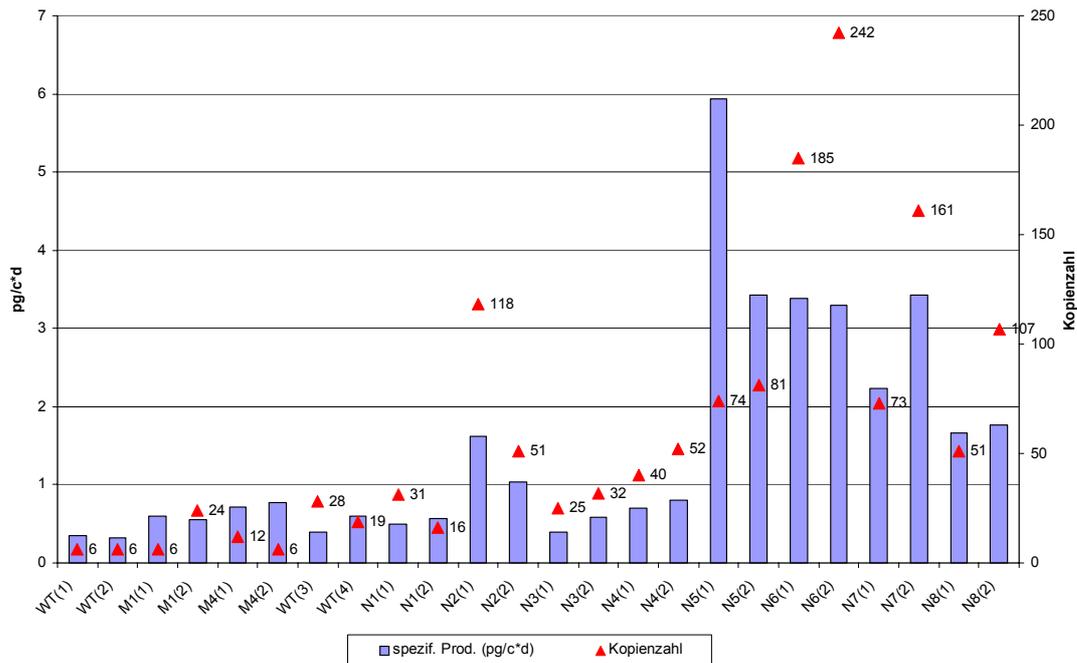
Pool	Kopienzahl/Zelle
WT(1)	6
WT(2)	6
M1(1)	6
M1(2)	24
M4(1)	12
M4(2)	6
WT(3)	28
WT(4)	19
N1(1)	31
N1(2)	16
N2(1)	118
N2(2)	51

Pool	Kopienzahl/Zelle
N3(1)	25
N3(2)	32
N4(1)	40
N4(2)	52
N5(1)	74
N5(2)	81
N6(1)	185
N6(2)	242
N7(1)	73
N7(2)	161
N8(1)	51
N8(2)	107

**Tab. 6: Durchschnittliche Kopienzahlen des *npt*-Gens in ausgewählten Pools**

Der Dot Blot zeigt die Kopienzahlen von Pools, die mit WT-NPT, M1, M4 oder N1 bis N8 selektioniert wurden (Dot Blot siehe Kapitel 3.1.17). In Abbildung 26 ist ein Beispiel-Blot dargestellt. Abkürzungen der Mutanten siehe Tab. 1.

Für die ausgewählten Pools erfolgte eine quantitative Bestimmung der *npt*-Genkopienzahl anhand einer Standardreihe mit pNeo2-CENUb2B/LC2 (Abb. 26). Die daraus resultierenden Kopienzahlen pro Zelle (Tab. 6) ließen erkennen, dass oft eine Korrelation zwischen höheren Kopienzahlen und höheren spezifischen Produktivitäten vorlag (Abb. 27). Manche Pools mit einer vergleichsweise geringen spezifischen Produktivität besaßen weniger *npt*-Genkopien (WT(1) – (4), M1-, M4-, N1-, N3, N4-Pools). Dahingegen wiesen hochproduzierende Pools wie N2(1), N6(1) und (2), N7(2) und N8(2) sehr viele Genkopien auf. Die Produktanstiege in M1(2) im Vergleich zu WT(1) und (2) und in N4(1) und (2) im Vergleich zu WT(3) und (4) gingen ebenfalls mit einer Erhöhung der Kopienanzahl einher. In allen diesen Fällen beruhte die hohe Produktexpression auf einer großen Anzahl integrierter Genkopien. In den Pools M1(1), M4(1) und (2), N5(1) und (2), N7(1) sowie N8(1) waren die Kopienzahlen im Vergleich zur relativ hohen spezifischen Produktivität jedoch eher gering. Die Mehrzahl der Genkopien musste also eine hohe Expressionsrate aufweisen, damit eine solch hohe Gesamtexpression zustande kommen konnte. Hier spielte also der Einfluss des Chromatins eine wichtige Rolle, während die höhere Expression in den anderen Fällen auf einem Genkopieneffekt beruhte.



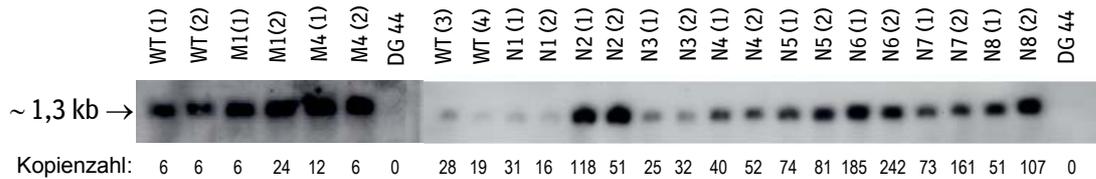
**Abb. 27: Vergleich von spezifischer Produktivität (mAk-2) und *npt*-Genkopienzahl**

Die ausgewählten Pools entsprechen denen, die im Enzymaktivitätsassay eingesetzt wurden (Kapitel 4.2.5). Abkürzungen der Mutanten siehe Tab. 1.

Zusammengefasst ließen die bisherigen Daten die Schlussfolgerung zu, dass die Mutationen im *npt*-Gen die Selektion von Hochproduzenten begünstigten. Die hohe Produktion der Zellen konnte, musste jedoch nicht zwingend, auf einer Integration in besonders expressionsaktivem Chromatin beruhen. Auch eine größere Anzahl an Genkopien konnte die Expression des Selektionsmarkers (und des gekoppelten Produktgens) derart steigern, dass dessen Beeinträchtigung ausgeglichen werden konnte. Ob diese unterschiedlichen Ursachen der Hochexpression ein spezifisches Phänomen spezieller Mutanten waren, ob man also die Genorte den NPT-Varianten M1, M4 und N5 und den Kopieneffekt den anderen Varianten zuordnen kann, ließen diese Daten jedoch nicht zwingend folgern. Um eine gesicherte Aussage dieser Art machen zu können, müsste eine statistisch ausreichende Menge an Klonen für jede Variante untersucht werden.

#### 4.2.7 Transkriptionsrate

Eine Untersuchung der *npt*-Expression auf RNA-Ebene ermöglichte eine genauere Aussage darüber, in welchen Pools die Expression vorrangig von der Genkopienzahl abhing und in welchen Pools vom Integrationsort. Korreliert der *npt*-mRNA-Level mit der Kopienzahl, kann man von einem Genkopieneffekt ausgehen. Lassen jedoch die Kopienzahl und der *npt*-mRNA-Level keinen Zusammenhang erkennen, wird die *npt*-Expression vorrangig vom Integrationsort beeinflusst. Der Northern Blot in Abbildung 28 zeigt das Expressionsniveau des *npt*-Gens in den ausgewählten Pools.



### Abb. 28: Nachweis der *npt*-Transkriptionsrate

Northern Blot mit ausgewählten Pools (siehe Enzymaktivitätsnachweis). Durchführung des Northern Blots mit 30 µg RNA/Probe (siehe Kapitel 3.1.16). Als Sonde wurde ein 800 bp langes PCR-Fragment aus dem offenen Leseraster des *npt*-WT-Gens eingesetzt. Abkürzung der Mutanten siehe Tab. 1.

Die Kopienzahl des *npt*-Gens korrelierte in den meisten Pools in etwa mit dem *npt*-mRNA-Level (Abb. 28). Die vergleichsweise geringe Transkription bei WT(1) bis (4), N1, N3 und N4 hing mit Genkopienzahlen von sechs Kopien [WT(1) und (2)] bzw. 16 bis 52 Kopien zusammen. Die meisten höher exprimierenden Pools wiesen entsprechend höhere Genkopienzahlen auf (M1(2), M4(1), N2(1), N5, N6, N7, N8). Vergleich man jedoch die Pools N2(2) und N8(1) mit dem Pool N4(2), so besaßen sie die gleiche Anzahl an Genkopien (51 - 52), wiesen jedoch deutlich größere *npt*-mRNA-Mengen auf. N2(2) und N8(1) exprimierten wesentlich mehr *npt*-RNA als man auf Grund der *npt*-Genkopienzahl erwartet hätte. Dagegen fielen N6(2) und N7(2) mit relativ hohen Kopienzahlen von 242 und 161 auf, während die RNA-Menge eher im mittleren Bereich lag. In manchen Fällen war also die Genexpression eine Funktion der Kopienzahl, in anderen Fällen hatte der Integrationsort einen größeren Einfluss auf die Transkription.

Der RNA-Level war in den meisten Pools der Mutanten höher als in den Pools mit dem WT-*npt*-Gen. Dieses Ergebnis steht in etwa in Einklang mit den erhöhten Produktivitäten von Zellen, die mit mutierten NPT-Varianten selektiert worden waren. Von WT(1) und (2) zu den Mutanten M1 und M4 war eine Abstufung der Bandenintensität zu sehen, entsprechend der Abstufung in der mAk-2- bzw. MCP1-Produktmenge. Die mit den NPT-Varianten WT (Pools 3 und 4), N1, N3 und N4 transfizierten Zellen waren, sowohl was das Expressionsniveau auf mRNA-Ebene als auch auf Produkt- und GFP-Ebene anbelangt, deutlich abzugrenzen von den Mutanten N5, N6, N7 und N8. Die NPT-Variante N2 ließ sich schlecht einordnen. Sie wies auf RNA-Ebene die höchste Expression auf, lag jedoch mit der Produktivität eher im Bereich zwischen den Niedrig- und Hochproduzenten.

Eine genaue Zuordnung von Kopienzahl, mRNA-Expression und Produktlevel ist kompliziert, da es sich um Pools handelt und es auch eine Mischung aus verschiedenen Phänomenen (Genkopieneffekt oder Integrationsort) unterschiedlichen Ausmaßes geben kann (siehe Kapitel 5.2).

#### 4.2.8 Zusammenfassung

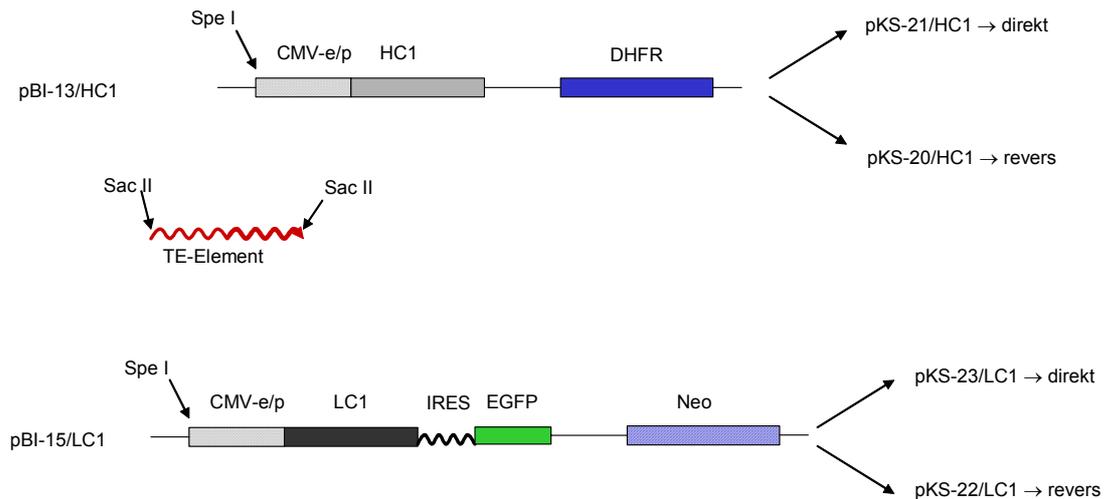
Wurde eine mutierte NPT-Variante in einer stabilen Transfektion von CHO-DG44 Zellen als Selektionsmarker verwendet, führte die Beeinträchtigung des Selektionsmarkers zu einem frühzeitigen Absterben der Klone, welche die Reduktion der Enzymaktivität nicht mit einer höheren Expression kompensieren konnten. Hochproduzenten wurden dadurch angereichert. Als Folge davon waren Produkttiter und spezifische Produktivität der Zellpopulation um den Faktor zwei bis zehn erhöht (Abb. 21 und 23). Die Ursache hierfür war eine Steigerung der Transkriptionsrate. Dafür verantwortlich waren die Anzahl der integrierten Genkopien und/oder der Integrationsort in aktivem Chromatin. NPT-Mutante M4 wurde bereits mit Erfolg für die Entwicklung einer Produktionszelllinie eingesetzt. In weiteren Experimenten haben sich zudem die Mutanten N5, N6, N7 und N8 für die Selektion von Hochproduzenten empfohlen. Das Maß der Produktivitätssteigerung hing bis zu einem gewissen Grade davon ab, wie stark die Reduktion der Enzymaktivität ausgeprägt war. Diese wurde vom Konservierungsgrad der ausgetauschten Aminosäure und von der Art des Aminosäureaustausches bestimmt.

### 4.3 Cis-wirkende Elemente

Die Höhe der Expression eines Transgens ist stark abhängig von cis-wirkenden Elementen. Für die biopharmazeutische Produktion sind hohe Produkttiter notwendig. Daher werden die Expressionsvektoren für Produktionszellen mit starken, meist konstitutiv exprimierenden Promotoren und Enhancern wie beispielsweise CMV-Enhancer und –Promotor ausgestattet. Es gibt jedoch auch andere genetische Elemente, die die Transkription eines stabil integrierten Transgens steigern können, z.B. Locus Control Regions, Scaffold/Matrix Attachment Regions, Isolatoren u.a. (siehe Kapitel 1.4). Manche dieser Elemente schirmen bestimmte Gene gegen Einflüsse des umliegenden Chromatins ab. Andere zeigen eine ähnliche Wirkung wie Enhancer, wobei deren Wirkung jedoch auf stabil integrierte Konstrukte beschränkt ist. Wieder andere Elemente vereinen mehrere dieser Funktionen in sich. Oft ist die genaue Zuordnung zu einer bestimmten Gruppierung nicht eindeutig möglich. Zu Beginn dieser Arbeit lag ein DNA-Element vor, das aus dem CHO-Genom isoliert worden war und von dem man vermutete, dass es eine regulatorische Funktion erfüllt. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die vermutete Funktion des Elements in einer erhöhten Expression des gekoppelten Transgens auswirkt. Deshalb wurde das CHO-Fragment TE-Element (Transcription Enhancing Element) genannt.

#### 4.3.1 Klonierung der Expressionsvektoren

Das TE-Element aus dem CHO-Genom lag im Plasmid pBE31 vor (siehe Anhang). Ein Restriktionsverdau mit *SacII* generierte ein 2243 bp großes Fragment (= TE-Element). Durch 3'-5'-Exonukleasebehandlung wurden die Überhänge entfernt. Die Akzeptorvektoren waren pBI-13/HC1 und pBI-15/LC1 (Abb. 29), die für die schwere bzw. leichte Kette des Antikörpers mAk-1 kodieren. Sie wurden am 5'-Ende des CMV-Enhancer/Promotor-Elements mit *SpeI* linearisiert und die kohäsiven Enden mittels Klenow-DNA-Polymerase aufgefüllt („blunt ends“). Die Insertion des TE-Fragments in direkter Orientierung ergab die Plasmide pKS-21/HC1 und pKS-23/LC1, die Insertion in reverser Orientierung führte zu pKS-20/HC1 und pKS-22/LC1 (Abb. 29).



### Abb. 29: Klonierung der Expressionsvektoren mit einem CHO-TE-Element

Das TE-Element aus dem CHO-Genom lag im Plasmid pBE31 vor (siehe Anhang). Ein Restriktionsverdau mit *SacII* generierte ein 2243 bp großes Fragment (= TE-Element). Durch 3'-5'-Exonukleasebehandlung wurden die Überhänge entfernt. Die Akzeptorvektoren waren pBI-13/HC1 und pBI-15/LC1, die für die schwere (HC1) bzw. leichte Kette (LC1) des Antikörpers mAk-1 kodieren. Sie wurden am 5'-Ende des CMV-Enhancer/Promotor-Elements (CMV-e/p) mit *SpeI* linearisiert und die kohäsiven Enden mittels Klenow-DNA-Polymerase aufgefüllt („blunt ends“). Die Insertion des TE-Fragments in direkter Orientierung ergab die Plasmide pKS-21/HC1 und pKS-23/LC1, die Insertion in reverser Orientierung führte zu pKS-20/HC1 und pKS-22/LC1. DHFR = Dihydrofolatreduktase, IRES = Internal Ribosome Entry Site; EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein, Neo = Neomycin-Resistenz (NPT).

Es wurden zusätzlich Vektoren kloniert, die statt des CMV-Enhancer/Promotor-Elements den CMV-Enhancer in Kombination mit einem starken, konstitutiv exprimierenden CHO-Promotor trugen. Der sonstige Aufbau der Plasmide war identisch. Für die Vektoren, die HC1 exprimierten, erfolgte die Klonierung über *HindIII/SnaBI*. Mit diesen Enzymen wurde aus pBI-16/LC ein 618 bp-Fragment isoliert, das den CHO-Promotor enthielt, und in pKS-20/HC1 bzw. pKS-21/HC1 eingefügt. So entstanden die Plasmide pKS-18/HC1 und pKS-19/HC1. Die Vektoren pKS-22/LC1 und pKS-23/LC1 erhielten den CHO-Promotor über ein 5676 bp-Fragment mit den Enzymen *SnaBI/Scal* aus pBI-16/LC1. Die resultierenden Plasmide wurden pKS-16/LC1 und pKS-17/LC1 genannt. In Tabelle 7 sind die acht entstandenen Plasmide und die entsprechenden Negativkontrollen mit den wichtigsten Elementen aufgelistet.

Variante	Plasmid	TE-Element	Enh./Prom.	Produktgen	Sonstiges	Selektionsmarker
K	pBI-16/LC1		CMV/CHO	LC1	IRES-EGFP	Neo
	pAD-CENUb2B/HC1		CMV/CHO	HC1		DHFR
R	pKS-16/LC1	revers	CMV/CHO	LC1	IRES-EGFP	Neo
	pKS-18/HC1	revers	CMV/CHO	HC1		DHFR
D	pKS-17/LC1	direkt	CMV/CHO	LC1	IRES-EGFP	Neo
	pKS-19/HC1	direkt	CMV/CHO	HC1		DHFR
K	pBI-15/LC1		CMV/CMV	LC1	IRES-EGFP	Neo
	pBI-13/HC1		CMV/CMV	HC1		DHFR
R	pKS-22/LC1	revers	CMV/CMV	LC1	IRES-EGFP	Neo
	pKS-20/HC1	revers	CMV/CMV	HC1		DHFR
D	pKS-23/LC1	direkt	CMV/CMV	LC1	IRES-EGFP	Neo
	pKS-21/HC1	direkt	CMV/CMV	HC1		DHFR

**Tab. 7: Übersicht der Expressionsvektoren mit und ohne CHO-TE-Element**

K = Kontrolle ohne TE-Element, R = TE-Element in reverser Orientierung, D = TE-Element in direkter Orientierung; LC1 = leichte Kette (light chain) des mAk-1, HC1 = schwere Kette (heavy chain) des mAk-1, DHFR = Dihydrofolatreduktase, IRES = Internal Ribosome Entry Site; EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein, Neo = Neomycin-Resistenz

#### 4.3.2 Einfluss des CHO-TE-Elements auf die Expression des Produkts mAk-1

Die Wirkung des CHO-TE-Elements wurde in drei unabhängigen stabilen Transfektionsserien mit CHO-DG44-Zellpools im Vergleich zur Expression ohne das CHO-TE-Element betrachtet. Eine der Serien wurde mit jeweils vier Pools pro TE-Variante (R bzw. D) und Kontrolle (K) durchgeführt, wobei die CMV-Enhancer/Promotor-Kombination zur Expression des Antikörpers verwendet wurde. Zwei weitere Serien enthielten die Vektoren mit der CMV-Enhancer/CHO-Promotor-Kombination, einmal mit vier Pools pro Variante (K, R, D) das andere Mal mit zehn Pools pro Variante. Insgesamt konnten 18 Pools pro Variante aus drei unabhängigen Transfektionsserien zur Auswertung herangezogen werden. Das Verhältnis von HC-Plasmid zu LC-Plasmid war in allen drei Serien 1:1. In zwei der Serien betrug die Gesamt-DNA-Menge, die für die Transfektion eingesetzt wurde, 1 µg der Kontrollplasmide (ohne TE-Element) und 1,3 µg der TE-Plasmide. Dieser Unterschied resultierte aus den unterschiedlichen Plasmidgrößen. Da die TE-Plasmide um den Faktor 1,3 größer waren als die Kontrollplasmide, war ein Ausgleich der Kopienzahl notwendig, indem von den TE-Plasmiden 1,3-mal mehr DNA eingesetzt wurde. Da die eingesetzte DNA-Menge im Transfektionsmix einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz haben kann, wurde in der dritten Transfektionsserie (zehn Pools/Variante) die Gesamt-DNA-Menge mit 300 ng Mock-DNA (pKS-15) ausgeglichen, so dass im Ansatz mit den Kontrollplasmiden in Summe

ebenfalls 1,3 µg DNA enthalten waren. Die Daten der Transfektionsserien sind nochmals in Tabelle 8 zusammengefasst.

	<b>Serie 1</b>	<b>Serie 2</b>	<b>Serie 3</b>
Enhancer/Promotor-Kombination	CMV/CMV	CMV/CHO	CMV/CHO
Plasmidkombinationen der Varianten	<b>K:</b> pBI-13/HC1 + pBI-15/LC1 <b>R:</b> pKS-20/HC1 + pKS-22/LC1 <b>D:</b> pKS-21/HC1 + pKS-23/LC1	<b>K:</b> pAD-CENUb2B/HC1 + pBI-16/LC1 <b>R:</b> pKS-18/HC1 + pKS-16/LC1 <b>D:</b> pKS-19/HC1 + pKS-17/LC1	<b>K:</b> pAD-CENUb2B/HC1 + pBI-16/LC1 <b>R:</b> pKS-18/HC1 + pKS-16/LC1 <b>D:</b> pKS-19/HC1 + pKS-17/LC1
Anzahl der Pools/Variante	4	4	10
Verhältnis HC:LC	1:1	1:1	1:1
Gesamt-DNA-Menge	TE: 1,3 µg Kontrolle: 1,0 µg	TE: 1,3 µg Kontrolle: 1,0 µg	TE: 1,3 µg Kontrolle: 1,3 µg

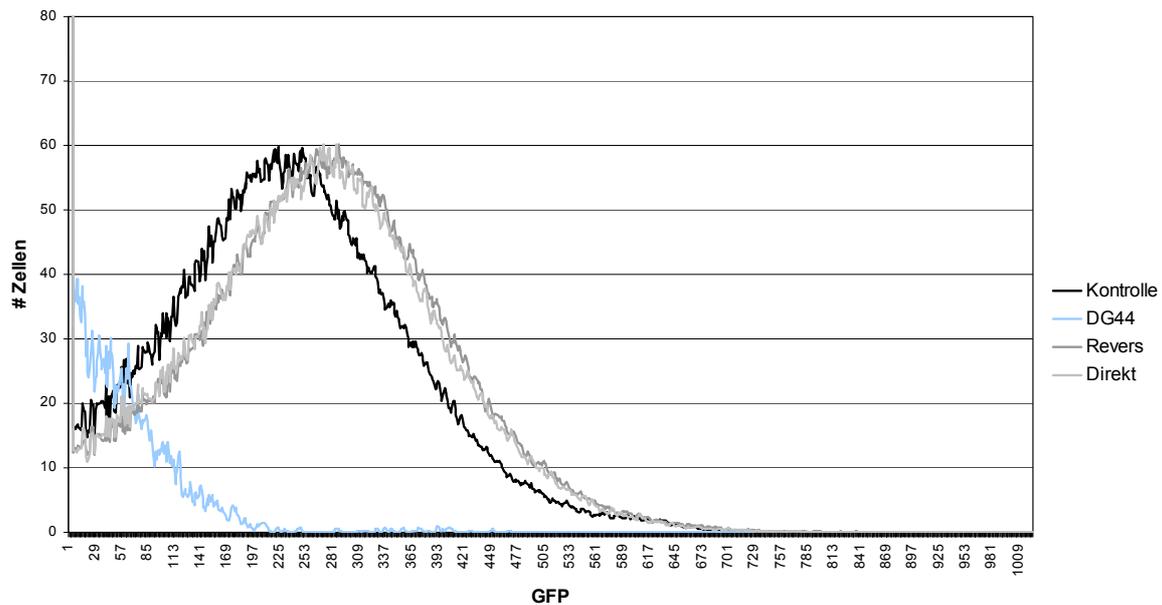
**Tab. 8: Zusammenstellung der Daten der Transfektionsserien**

Plasmide siehe Abb. 29, Tab. 7 und im Anhang. K = Kontrolle (ohne TE-Element), R = TE-Element in reverser Orientierung, D = TE-Element in direkter Orientierung

Als Negativkontrolle wurde bei jeder Transfektionsserie ein Mock-transfizierter Pool mitgeführt, d. h. gleich behandelt, aber keine DNA zugegeben. Die Selektion stabil transfizierter Zellen erfolgte zwei Tage nach der Transfektion mit –HT/+G418 (400 µg/mL). In Serie 1 und Serie 3 hatten die Pools mit dem TE-Element die Selektion zwei Tage vor den Pools mit den Kontrollplasmiden überstanden, d. h. sie zeigten eine Vitalität von über 80% und konnten mindestens im Verhältnis 1:4 gesplittet werden. Das unter Selektionsdruck verzögerte Wachstum bei den Pools ohne TE-Element im Vergleich zu den Pools mit TE-Element deutete bereits darauf hin, dass das TE-Element ein höheres Expressionsniveau vermittelte, wodurch auch die Mengen an Selektionsmarker (DHFR und Neomycin<sup>R</sup>) erhöht wurden. Dadurch kam die Resistenz schneller zum Tragen und es überlebten pro Ansatz mehr Klone die Selektion, sodass in diesen Ansätzen eine bestimmte Zellzahl in kürzerer Zeit erreicht wurde.

Hatten die Pools das Stadium der Selektion überstanden, wurde im FACS die Menge an exprimiertem GFP bestimmt. Durch die Kopplung von GFP und LC1 über IRES korrelierte die GFP-Menge mit der Menge an exprimiertem LC1. Da man davon ausgehen konnte, dass HC1 und LC1 kointegrierten (Chen and Chasin 1998), spiegelte GFP annähernd die Menge an gebildetem mA<sub>k</sub>-1 wider. Zusätzlich wurden auch Titer und spezifische Produktivität der einzelnen Pools über einen Zeitraum von sechs bis acht Passagen ermittelt.

Der Vergleich der Varianten im Plot-Overlay (Abb. 30) ergab entsprechend in allen drei Transfektionsserien, dass die Pools mit TE-Element mehr GFP exprimierten als die Kontrollpools. In Serie 1 schien das TE-Element in direkter Orientierung etwas besser zu sein als in reverser Orientierung. In den anderen beiden Serien konnte jedoch kein deutlicher Unterschied festgestellt werden.

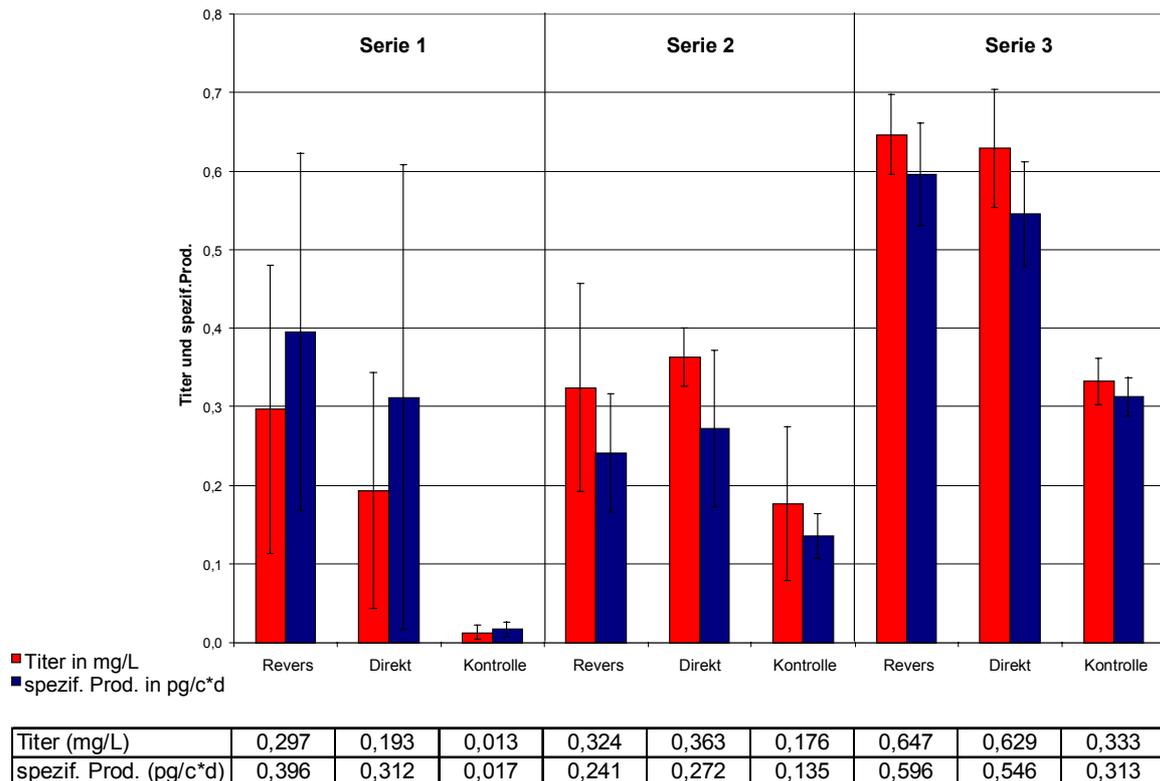


### Abb. 30: TE-Element-abhängige GFP-Expression

Jeder Graph, mit Ausnahme der als Negativkontrolle dienenden, nicht-transfizierten CHO-DG44 Zellen, stellt den Mittelwert der GFP-Fluoreszenz aus jeweils zehn Pools der Transfektionsserie 3 dar. Pro Pool wurden 20000 Zellen berücksichtigt. DG44 = untransfizierte Zellen, Varianten siehe Tab. 7 und 9.

Auch die Erhebung von Produkttiter und spezifischer Produktivität ergab, dass die Zellpools mit dem TE-Element im Durchschnitt mehr exprimierten als die Zellpools ohne TE-Element (Abb. 31). In Serie 2 und 3 konnte man von einer Verdopplung der Produktivität durch das Vorhandensein des TE-Elements sprechen, wobei es keine Rolle spielte, in welcher Orientierung das Element im Expressionsvektor inkloniert wurde. Die Kontrollpools in Serie 1 wiesen ein sehr niedriges Expressionsniveau auf, wodurch die relative Erhöhung der Produktivität durch das TE-Element hier außerordentlich groß ausfiel.

Sowohl der Expressionslevel von GFP als auch die Produktexpression von mAk-1 zeigten, dass das CHO-TE-Element unabhängig von der Orientierung transkriptionsfördernd wirkte. Titer und spezifische Produktivität konnten durch das TE-Element verdoppelt werden.



**Abb. 31: Antikörperproduktion von Zellpools mit und ohne TE-Element**

Revers = reverse Orientierung des TE-Elements, Direkt = direkte Orientierung des TE-Elements, Kontrolle = kein TE-Element, Kultivierung in 75 cm<sup>2</sup> T-Flasks, Passagierungsrythmus 2-2-3 Tage; Serie 1: je 4 Pools über 1 Passage; Serie 2: Revers und Direkt je 4 Pools, Kontrolle 3 Pools, jeweils über 8 Passagen; Serie 3: je 10 Pools über 6 Passagen. Plasmidkombinationen siehe Tab. 7.

### 4.3.3 Genkopienzahl

Die Ermittlung der Genkopienzahl sollte Aufschluss darüber geben, ob die erhöhte Expression in den Pools, die das TE-Element enthielten, tatsächlich durch die cis-wirkende Funktion des Elements hervorgerufen wurde, oder ob sie auf einen Gendosiseffekt zurückzuführen war.

Die Genkopien von LC1 und HC1 von je drei ausgewählten Pools pro Variante wurden in Dot Blots durch eine quantitative Bestimmung der Signalintensität und einen Vergleich mit einer Standardkurve (pBI-16/LC1 bzw. pAD-CENUb2B/HC1) ermittelt (siehe Kapitel 3.1.17 und 4.2.5.). Die Auswahl der Pools erfolgte anhand ihrer Produkttiter (mAk-1) und spezifischen Produktivitäten, die dem Durchschnitt aller Pools der jeweiligen Variante entsprechen sollten. Die Kopienzahl der Antikörperketten LC1 und HC1 (Tab. 9) war in allen untersuchten Pools vergleichbar. Die Schwankungen lagen im Rahmen der Testgenauigkeit. Da die höhere Expression der R- und D-Pools also nicht die Folge einer höheren Genkopienzahl war, kann man davon ausgehen, dass das TE-Element eine transkriptionssteigernde Wirkung hatte.

Pools	Kopien/Zelle LC1	Kopien/Zelle HC1
R1	17	11
R2	17	12
R3	15	11
D1	10	11
D2	12	11
D4	17	12
K2	12	11
K4	14	11
K6	13	11

**Tab. 9: LC1- und HC1- Kopienzahlen in ausgewählten TE-Pools**

Die Kopienzahlbestimmung erfolgte für ausgewählte Pools aus der Serie 3 mit und ohne TE-Element. R steht für eine reverse Orientierung des TE-Elements, D für eine direkte Orientierung und K bedeutet Kontrolle, also kein TE-Element. Für den Standard wurden die Plasmide pBI-16/LC1 bzw. pAD-CENUb2B/HC1 eingesetzt. Die Sonden wurden wie in Kapitel 3.1.18 beschrieben hergestellt. Die dafür eingesetzten DNA-Fragmente stammen aus den Leserastern des LC1- bzw. des HC1-Gens und sind 736 bp (*HindIII/EcoRI*) bzw. 1410 bp (*BamHI/HindIII*) lang.

## 5. Diskussion

Eine der größten Hürden bei der Entwicklung einer stabilen, hochexprimierenden Zelllinie ist der hohe Zeit- und Arbeitsaufwand bei der Selektion des geeigneten Klons. Optimierungen zielen deshalb darauf ab, durch Selektionsstrategien den Anteil von Hochproduzenten in der transfizierten Zellpopulation zu erhöhen und somit den Aufwand bei der Klonidentifizierung zu reduzieren. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei alternative Strategien untersucht, die beide auf der Beeinträchtigung des Selektionsmarkers beruhen.

Ein weiteres wichtiges Ziel in der Zelllinienentwicklung ist, die effektive Produktivität transgener Zellen zu erhöhen. Um dies zu erreichen, wurde in stabil transfizierten CHO-Zellpools ein genetisches Element getestet, von dem eine transkriptionsfördernde Wirkung auf Chromatinebene vermutet wurde.

### 5.1 Translationshemmung durch Aptamere

Das Ziel war, durch den Einsatz von Aptameren und deren spezifischen Liganden ein effizientes Selektionssystem für hochproduzierende CHO-Zellen zu entwickeln. Durch Interaktion der Aptamere mit ihrem Liganden im 5'-untranslatierten Bereich sollte die Expression eines Selektionsmarkers so abgeschwächt werden, dass nur Zellklone selektioniert werden, die die Fremd-DNA in hochaktiven genomischen Bereichen integriert haben. Eine Integration in inaktivem Chromatin würde zu einer zusätzlichen Reduktion der Expression führen. Klone mit einer derart geringen Menge an Selektionsmarker könnten die Selektion nicht überleben. So entfielen sowohl das Screening der Nicht-Produzenten als auch die Problematik, dass produzierende Klone oft von nicht-produzierenden überwachsen werden.

Werstuck und Green zeigten bereits, dass Aptamere als Regulationseinheit der Translation fungieren können (Werstuck and Green 1998). Dieses System sollte in einem ersten „Proof of Concept“ mit CHO-DG44-Zellen evaluiert werden. In einem zweiten Schritt war vorgesehen, diese Liganden/Aptamer-Kombination in stabilen Transfektionen auf die Anreicherung von Hochproduzenten hin zu testen. Nach dem erfolgreichen Abschluss dieser Schritte hätte das Screening einer Aptamerbibliothek stattfinden können, um ein eigenes Aptamer/Liganden-System zu entwickeln.

Als erster Schritt des „Proof of Concept“ wurde in transienten Transfektionsstudien der regulierende Einfluss der Interaktion zwischen den Aptameren H10 und H19 und den Liganden H33342 und H33258 auf die Expression des in 3'-Richtung gelegenen Reportergens Luciferase getestet. Dafür wurden verschiedene Vektoren verwendet. In der

ersten Vektorgeneration wurde ein CHO-Promotor mit und ohne CMV-Enhancer zur Steuerung der Aptamer/Liganden-abhängigen Expression eingesetzt. Die Vektoren der zweiten Generation enthielten den SV40-Promotor anstatt des CHO-Promotors, wurden in dieser Hinsicht also den Konstrukten von Werstuck und Green angepasst. In diese Vektoren wurden als weitere Modifikationen unterschiedliche Spacer zwischen das H10- und das H19-Aptamer eingefügt (dritte Vektorgeneration). In der vierten Generation wurde ein Vektor getestet, der insgesamt vier Aptamere enthielt. In allen Transfektionsserien wurden zwei unerwartete Effekte beobachtet. Zum einen konnte die Expression des Reportergens durch keinen der Liganden H33342 oder H33258 beeinflusst werden. Sie wurden in verschiedenen subletalen Konzentrationen zugegeben, reduzierten die Luciferaseexpression jedoch nicht. Zum anderen war die Expression des Reportergens allein durch die Anwesenheit der Aptamere ohne Zugabe eines Liganden um bis zu 72% reduziert. Eine Liganden/Aptamer-abhängige Kontrolle der Reporterexpression wie bei Werstuck und Green konnte hier also nicht erzielt werden.

Mit den Vektoren der ersten Generation führte die Zugabe eines Liganden in unterschiedlichen Konzentrationen nicht zu einer Reduktion der Reporterexpression. Nach der Anpassung der Vektoren an das Konstrukt von Werstuck und Green bezüglich des Promotors und dessen Abstand zu den Aptameren konnte die gewünschte Wirkung ebenfalls nicht erzielt werden. Experimente mit größeren Abständen zwischen den Aptameren und mehreren Aptameren in Folge führten im Hinblick auf die Liganden/Aptamer-abhängige Regulation auch nicht zum Erfolg. Geringe Schwankungen, die innerhalb der Standardabweichung lagen, lassen sich durch unterschiedliche Zellzyklen der Pools und Ungenauigkeiten des biologischen Assays erklären. In der Transfektionsserie mit der dritten Vektorgeneration fiel jedoch bei vier Vektoren auf, dass die Expression durch den Einfluss des Liganden signifikant erhöht war (Abb. 13). Bei den betroffenen Vektoren handelte es sich um zwei Plasmide mit Aptameren und Spacern (pKS-12a und pKS-12b) und zwei ohne Aptamere mit unterschiedlichen Promotoren (pBE 812, pKS-3). Dabei war bemerkenswert, dass diese Liganden-vermittelte Erhöhung von der Anwesenheit der Aptamere und der Art des Promotors unabhängig war. In anderen Transfektionsserien mit den Vektoren ohne Aptamere trat dieses Phänomen jedoch nicht auf. Möglicherweise handelte es sich hierbei also um einen unspezifischen Effekt des Liganden auf die Expression des Reportergens. Die verwendeten Hoechstfarbstoffe zeigen bekanntermaßen auch eine allgemeine, unspezifische Interaktion mit doppelsträngiger DNA (Kim et al 1988; Labarca and Paigen 1980; Lydon et al 1980).

Ein weiteres unerwartetes Ergebnis waren die Auswirkungen, die die Aptamere ohne Zugabe des Liganden auf die Expression des nachfolgenden Reportergens hatten. Sie reduzierten die Expression um bis zu 72%. Eine derart starke Reduktion wurde mit dem Vektor der vierten Generation erzielt, der vier Aptamere enthielt (Abb.15). Mit den Vektoren der anderen Generationen, die nur zwei Aptamere enthielten, schwankte das Ausmaß der Reduktion. Die Vektoren mit dem CHO-Promotor zeigten einen Aptamer-bedingten Unterschied der Reportergenexpression von ca. 18% (Abb. 7, pBE820 und pBE157). In Verbindung mit dem CMV-Enhancer und dem CHO-Promotor lag die Beeinträchtigung durch die Aptamere bei 27% (Abb. 9) bzw. bei 44% (Abb. 7) (pBE830 und pBE812). Allerdings gab es mit diesen Vektoren auch Fälle, bei denen die Reduktion durch die Aptamere von ca. 14% nicht signifikant war (Abb. 10) bzw. eine Erhöhung der Expression um ca. 14% stattfand (Abb. 13). Die Daten der ersten Vektorgeneration in Abbildung 7 waren jedoch fundierter, da in jeden Datenpunkt acht Ansätze aus vier unabhängigen Transfektionsserien eingingen, während es sich in den anderen Fällen (Abb. 10 und 13) jeweils nur um eine einzelne Serie mit je zwei Ansätzen handelte. Der SV40-Vektor mit zwei Aptameren (pKS-2) verursachte im Vergleich zur aptamerlosen Kontrolle (pKS-3) eine Senkung der Expression um ca. 26% (Abb. 9). Die Abnahme, die durch die Aptamere mit Spacern hervorgerufen wurde, lag zwischen 1% und 20%, war aber in den meisten Fällen nicht signifikant (Abb. 13, pKS-11, -12a, -12b, -12d). Den geringsten Einfluss auf die Expression hatten dabei die Aptamere mit dem längsten Spacer (pKS-12a). Nur mit dem kürzesten Spacer (pKS-11) war in der in Abbildung 15 dargestellten Serie eine signifikante Reduktion von ca. 40% festzustellen.

In Summe ließen diese Daten den Schluss zu, dass die Sekundärstruktur der Aptamere die korrekte Translation behinderten. Dies steht im Einklang mit dem Scanning-Modell der Translationsinitiation, bei dem die 40S-Ribosomenuntereinheit die 5'-Capstruktur erkennt und an der mRNA „entlangwandert“. Sekundärstrukturen der mRNA können diesen Vorgang behindern (Koloteva et al 1997; Kozak 1989). Die 40S-Untereinheit ist in der Lage, beim „Entlangwandern“ Haarnadelstrukturen mit einer Stabilität von bis zu -30 Kilokalorien aufzuschmelzen. Stabilere Haarnadelstrukturen beeinträchtigen oder verhindern die Fortbewegung (Hershey 1991; Lewin 1998). Möglicherweise besitzt die Sekundärstruktur der Aptamere eine derart hohe Stabilität, dass ein Fortschreiten der 40S-Untereinheit entlang der mRNA und folglich auch die Translationsinitiation verhindert wird. Ein solches Phänomen wurde auch von Suess und Mitarbeitern beschrieben (Suess et al 2003). Die Autoren verzeichneten ebenfalls eine Reduktion der Expression durch die Anwesenheit von Tetracyclin-Aptameren in Hefe. Mutationen eines Aptamers und damit einhergehende Veränderungen der Aptamerstabilität verursachten im Falle einer Stabilisierung eine stärkere und im Falle einer Destabilisierung eine weniger starke Reduktion der Translation. Möglicherweise führten die hier eingesetzten Spacer ebenfalls zu einer geringeren

Aptamerstabilität, was die geringe, nicht signifikante Senkung der Expression erklären würde. Gleichzeitig führten mehrere Aptamere in Folge eventuell zu einer stabileren Sekundärstruktur, wodurch die Expression sehr stark gesenkt wurde.

Die Ursache der Widersprüche zwischen den hier gewonnenen Daten und denen von Werstuck und Green konnte nicht geklärt werden. Die wesentlichen Unterschiede zwischen diesem System und der Publikation bestanden letztendlich in der Zelllinie (CHO-DG44 contra CHO-K1) und im Reportergen (Luciferase contra  $\beta$ -Galactosidase). Die Unterschiede in den Zelllinien sind vor allem hinsichtlich der Kultivierungsmethode relevant. Hier wurde eine suspensionsadaptierte CHO-DG44-Zelllinie verwendet, die in serumfreiem Medium kultiviert wurde, während es sich bei der in der Publikation verwendeten CHO-K1 um eine adhärenz, in Serum kultivierte Zelle handelte.

Die Klonierung war bezüglich des Promotors und der Aptamere – soweit bekannt – möglichst dem Konstrukt von Werstuck und Green angepasst. Die Verknüpfung des SV40-Promotors mit den Aptameren erfolgte in identischer Weise. Die Position der Aptamere zum 5'-Cap unterschied sich folglich nicht. Allerdings war die Sequenz zwischen den Aptameren möglicherweise verschieden. Sie wurde in der Publikation nicht genau beschrieben. Ein weiterer Unterschied auf Sequenzebene ergab sich durch die unterschiedlichen 5'-UTR-Bereiche von Luciferase und  $\beta$ -Galactosidase. Zwischen dem Ende von H19 und dem Start-Codon der Luciferase befanden sich 59 Nukleotide, während es ab dem Ende von H19 bis zum ersten Startcodon der  $\beta$ -Galactosidase 102 Nukleotide waren. Allerdings ging aus mehreren Publikationen hervor, dass in Säugerzellen die Translationsinitiation eher von der Nähe der Sekundärstruktur zum 5'-Cap als zum Startcodon abhängt (Koloteva, Muller, and McCarthy 1997; Kozak 1989; Suess, Hanson, Berens, Fink, Schroeder, and Hillen 2003). Laut dieser Aussage sollte also der unterschiedliche Abstand der Aptamere vom Startcodon keine widersprüchlichen Auswirkungen haben.

Da RNA-Sekundärstrukturen sequenzabhängig und sehr empfindlich sind, könnten sich die unterschiedlichen Reportergene eventuell auch auf dieser Ebene ausgewirkt haben. Möglicherweise enthielt die mRNA der Luciferase Sequenzen, welche mit den Aptamersequenzen interferierten. Die Stem/Loop-Struktur der Aptamere wurde in den Luciferasevektoren somit gestört, während die mRNA der  $\beta$ -Galactosidase keine Auswirkungen auf die RNA-Faltung der Aptamere hatte. Diese Aussage ist jedoch rein spekulativ. Wenn dies aber zutreffen würde, wäre dieses „Proof of Concept“ mit einem Reportergen nicht sehr aussagekräftig im Hinblick auf den vorgesehenen Einsatz der Aptamere. Hätte die Sequenz des nachfolgenden Gens tatsächlich einen solch störenden Einfluss auf die Aptamerstruktur, könnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Sequenz

des später vorgesehenen Selektionsmarkers nicht ebenfalls in die Bildung der Aptamere eingreifen würde.

Letztendlich war bereits der erste Schritt im „Proof of Concept“ der Aptamere für die Entwicklung eines effizienten Klonselktionssystems ohne Erfolg. Weitere Schritte wurden deshalb nicht durchgeführt.

## 5.2 Anreicherung von Hochproduzenten durch NPT-Mutanten

In einem zweiten Ansatz zur Entwicklung eines Selektionsverfahrens, bei dem hochproduzierende Zellen angereichert werden sollten, wurde die Funktion des Resistenzmarkers beeinträchtigt. Punktmutationen in mehr oder weniger stark konservierten Domänen des Neomycin-Resistenzgens (*npt*) sollten die Enzymaktivität reduzieren und bei der Selektion das Überleben von hochproduzierenden Zellklonen favorisieren. Die Punktmutationen im *npt*-Gen sollten das Enzym nur bis zu einem gewissen Grad beeinträchtigen, sodass trotzdem eine Selektion von rekombinanten, stabilen und robusten Produktionszellen möglich ist. Deshalb wurden die Punktmutationen M1 (E182D), M2 (D190G), M3 (D208G) und M4 (D227G) auf Grund von Literaturdaten ausgewählt, die besagen, dass diese Mutanten in *E. coli* noch eine Restaktivität besitzen, wobei für M1 und M4 weniger starke Beeinträchtigungen der Enzymaktivität berichtet wurden als für M2 und M3 (Kocabiyik and Perlin 1992b; Yenofsky, Fine, and Pellow 1990). Die weiteren Mutanten N1 bis N8 wurden aus verschiedenen Gründen ausgewählt. Die Mutation N1 (E182G) betrifft dieselbe Aminosäure wie M1 (E182D), aber die Glutaminsäure (E) wird im Fall von N1 gegen ein neutrales, polares Glycin (G) statt gegen eine andere Säure (Asparaginsäure D, M1) ausgetauscht. Auch die bei M4 betroffene Position 227 wurde noch mit anderen Aminosäuren substituiert. Statt wie bei M4 eine neutrale, polare Aminosäure (Glycin, G) wurden bei N4 (D227A) und N5 (D227V) neutrale, hydrophobe Aminosäuren für die Asparaginsäure eingesetzt. Die Positionen für die Mutationen N2 (W91A) und N3 (V198G) wurden ausgewählt, weil sie wie M1 beide an der Grenze zu einem konservierten Motiv liegen. Die Überlegung war, dass dadurch das entsprechende Motiv in seiner Funktion nur wenig beeinflusst wird und es nicht zu einem kompletten Funktionsverlust des Enzyms kommt. Aus diesem Grund wurde im Falle von N2 die Aminosäure W91 (Tryptophan) gegen eine andere (Alanin) mit gleicher chemischer Natur ausgetauscht (beide hydrophob), die sich dafür aber in der Größe der Seitenruppe stark unterscheiden. Dahingegen wurde im Falle von N3 ein polares Glycin für das hydrophobe Valin eingesetzt, wobei der Größenunterschied dieser Aminosäuren nicht so stark ist. Die Mutante N6 (D261G) wurde

bereits in einer Publikation als geeigneter Selektionsmarker aufgeführt (Blazquez, Davies, and Moreno 1991). Deshalb wurde sie und zusätzlich ein weiterer Austausch an dieser Position (N7, D261N) ebenfalls in die Versuchsreihe mit aufgenommen. Der Aminosäureaustausch F240I (N8) betrifft eine in geringem Maße konservierte Aminosäure und befindet sich wie M4 weder innerhalb noch in der Nähe eines konservierten Motivs.

Um die Auswirkungen dieser mutierten NPT-Selektionsmarker zu untersuchen, wurden CHO-DG44-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die die verschiedenen Punktmutationen im Neomycin-Resistenzgen trugen und zusätzlich für ein Testprotein kodierten. Ein Teil der stabilen Transfektionen wurde mit dem einzelkettigen Testprotein MCP1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) durchgeführt (ST neo1, ST neo2, STneo3, ST neo4), ein anderer Teil der Transfektionen mit einem monoklonalen Antikörper mAk-2 (ST neo5, ST neo6, ST neo7, ST neo8, ST neo9 und ST neo11). Im Falle des Antikörpers erfolgte eine Kotransfektion der leichten Kette mit NPT als Selektionsmarker und der schweren Kette mit DHFR als Selektionsmarker. Nach einer Selektion mit G418 und im Falle der Kotransfektion zusätzlich mit HT-freiem Medium wurden Produkttiter und spezifische Produktivität der stabilen Pools über mehrere Passagen hinweg ermittelt.

Mit beiden Testproteinen konnte festgestellt werden, dass Produkttiter und spezifische Produktivität in Pools, die mit einer mutierten NPT selektioniert worden waren, im Vergleich zu WT-NPT selektionierten Pools je nach Mutante um den Faktor 1,4 bis 14,6 erhöht waren (Tab. 4). Den stärksten Effekt auf die Produktivität hatten die Mutationen N5, N6, N7 und N8 (5 – 10-fache Erhöhung), während der Effekt bei N2 mittel (3 – 4-fach) und bei N1, N3, N4, M1 und M4 weniger stark (1,5 – 2-fach) ausgeprägt war. Die in Abbildung 21 B) gezeigten Mittelwerte für Titer und spezifische Produktivität von Zellen mit den NPT-Varianten WT, M1 und M4 wurden statistisch ausgewertet (Auswertungsnummer 0039, Biometrie). Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% verwendet. Die Varianzanalyse ergab signifikante Unterschiede zwischen WT, M1 und M4. Im Bartlett-Test konnte gezeigt werden, dass die zugehörigen Varianzen homogen sind. Im Dunnett-Test (Many-to-one-Vergleich) waren die Mittelwerte für M1- und M4-transfizierte Zellen gegen WT-transfizierte Zellen signifikant, wohingegen M1- und M4-transfizierte Zellen im Tukey-Kramer-Test (Many-to-many-Vergleich) nicht voneinander verschieden waren. Die in den Abbildungen 17, 21 A), 23 und 24 dargestellten Balken für Titer und spezifische Produktivität zeigen die Mittelwerte aus den Pools einer Transfektionsserie. Die Standardabweichungen kamen unter anderem dadurch zustande, dass es sich bei den einzelnen Pools um getrennte Ansätze handelte. Das Transfektionsreagenz wurde zwar in einem Ansatz hergestellt, aber einzeln zu den Pools hinzupipettiert und die Pools unabhängig voneinander selektioniert. Dadurch konnte

die Transfektionseffizienz von Pool zu Pool leicht variieren. In verschiedenen Transfektionsserien schwankte die Transfektionseffizienz wesentlich stärker und verursachte deshalb zum Teil noch größere Unterschiede als zwischen Pools innerhalb einer Serie. Die Transfektionseffizienz wird von verschiedenen Parametern beeinflusst. Die hier relevanten Parameter waren Vitalität, das Alter der Zellen und der Zellzyklus. Außerdem spielte bei den hier eingesetzten kationischen Lipiden (Lipofectamine Plus) auch die Mischung der Liposomen im Transfektionsreagenz und evtl. dessen Charge eine Rolle.

Ein weiterer Grund für Schwankungen der spezifischen Produktivität zwischen Pools und auch innerhalb desselben Pools ist die Varianz des Integrationsortes. Pools setzen sich aus Zellen mit unterschiedlichen Integrationsorten zusammen, sie sind also polyklonal. Jeder Klon in einem Pool verhält sich bezüglich Wachstumsverhalten und Produktivität anders. Im Zeitraum der Probenahmen (4 - 8 Passagen = 2 - 3 Wochen) unterliegen diese polyklonalen Pools unterschiedlichen Dynamiken. Klone mit hoher Teilungsrate überwachsen z. B. Klone mit geringerer Teilungsrate. In zahlreichen Zelllinienentwicklungen konnte beobachtet werden, dass schnell und gut wachsende Klone oft weniger produktiv waren, wohingegen Hochproduzenten eine langsamere Zellteilungsrate besaßen. In einem Pool aus verschiedenen Klonen kann es also vorkommen, dass im Laufe der Zeit die weniger guten Produzenten die Hochproduzenten überwachsen. Desweiteren hat sich gezeigt, dass der Titer mit zunehmender Passagenzahl noch leicht anstieg und sich auf einem Niveau einpendelte. Möglicherweise befand sich der komplette Zellstoffwechsel kurz nach der Selektion noch in einer Verzögerungsphase, oder die längeren Teilungsraten der Hochproduzenten im Vergleich zu den schlechteren Produzenten waren verantwortlich für den anfänglich geringeren Titer im Zellpool.

Der Produkttiter, also die Produktkonzentration im Medium, unterlag größeren Schwankungen als die spezifische Produktivität. Dies lag vor allem daran, dass weder die Zellzahl noch die Kultivierungsdauer in die Berechnung mit eingingen. Die Probennahme und das Passagieren der Zellen erfolgten im 2-2-3-Rhythmus. Das heißt, dass ein Teil der Proben den Titer widerspiegelte, der in zwei Tagen produziert wurde und der andere Teil der Proben zeigte den Titer aus drei Tagen Kultivierungsdauer. Für die Höhe des Titers spielte auch die Vitalität und das Wachstumsverhalten des jeweiligen Klons bzw. Pools eine Rolle. Bei geringer Vitalität und/oder langsamer Zellteilung blieb die erreichbare Lebendzellzahl auch nach längeren Passagen klein und es wurden selten hohe Titer erreicht. Aggregierten die Zellen, ging in die Bestimmung der Zellzahl ein Fehler ein, der sich in der spezifischen Produktivität niederschlug. Aggregierte Zellen täuschten eine zu geringe Zellzahl vor und ließen so die spezifische Produktivität ansteigen. Auch der Titer stieg dadurch, denn es wurden bei der nächsten Passage mehr Zellen eingesät als angenommen, die folglich einen höheren Produkttiter hervorbrachten (z. B. N5-Pool 1 und N6-Pool 4).

Manchmal traten Pools mit einer stark abweichenden Produktivität auf. In der Serie ST neo11 produzierte Pool 2 der Mutante N6 gar nichts und in vielen Serien kam es vor, dass ein Pool ein Vielfaches der restlichen Pools produzierte (z. B. ST neo3, WT-Pool 22 und ST neo5, WT-Pool 2). Für beide Arten von Ausreißern war die Ursache höchstwahrscheinlich im Integrationsereignis zu finden, wobei die betroffenen Klone in den jeweiligen Pools zudem einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Klonen des Pools besitzen mussten. Im ersten Fall (keine mAk-2-Produktion) fand die Rekombination bei der Integration ins zelluläre Genom möglicherweise innerhalb des Produktgens (LC oder HC) oder zwischen Promotor und Produktgen statt. So wurde zwar die essentielle Expressionskassette des Produktgens zerstört, aber die Expression des Selektionsmarkers war weiterhin gegeben, da er unter der Kontrolle eines separaten Promotors stand. Im zweiten Fall (überdurchschnittlich hohe mAk-2-Produktion) konnte die Integration der Fremd-DNA zufällig in besonders transkriptionsaktiven Genomregionen erfolgt sein oder ein Gendosisseffekt bzw. eine Mischung aus beiden Effekten vorliegen.

Die Höhe der Expression in den Pools wurde außer durch die durchschnittliche Produktivität des Testproteins zusätzlich über die Expression eines fluoreszierenden Reporters (z. B. GFP) bestimmt, die auf Grund eines hohen Durchsatzes im FACS in jeder Zelle einzeln ermittelt werden konnte. In den Transfektionsserien ST neo5, 6, und 7 diente die indirekte Bestimmung des DHFR-Expressionslevels durch die Bindung von F-MTX als Reporter (Yoshikawa, Nakanishi, Ogura, Oi, Omasa, Katakura, Kishimoto, and Suga 2001), in den Serien ST neo8, 9 und 11 wurde GFP als Reporter über IRES an die schwere Antikörperkette (HC2) des Produkts gekoppelt. Der Vergleich der FACS-Diagramme ergab in Zellpools mit einer NPT-Mutante eine durchschnittlich höhere Reporter-Expression als in den Zellpools mit der Wildtyp-NPT. Die FACS-Daten stimmten in der Relation  $WT < M1, N1, N3 < M4, N4 < N2 < N7, N8 < N5, N6$  mit den Produktivitäts-Daten überein. Allerdings wies beispielsweise N5 eine deutlich höhere spezifische mAk-2-Produktivität auf als N6, während die entsprechenden GFP-Kurven fast aufeinanderlagen. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die ermittelte mAk-2-Produktivität mancher N5-Pools auf Grund der oben erwähnten Probleme bei der Zellzahlbestimmung nicht exakt war. Im Gegensatz dazu wurde bei der GFP-Messung das Signal jeder einzelnen Zelle bestimmt. Zum anderen könnte es in manchen Klonen eines Pools auch vorgekommen sein, dass das *gfp*-Gen durch die Rekombination bei der Integration von Enhancer, Promotor und HC2-Gen getrennt wurde und *gfp* somit im Gegensatz zu HC2 nicht mehr transkribiert wurde.

Bei manchen Mutanten konnte nach der Transfektion eine verlängerte Selektionsphase der damit transfizierten Zellen beobachtet werden. N2-, N5- und N6-transfizierte Zellpools



$\mu\text{g/mL}$  G418) und ließen sich dann selbst mit  $100 \mu\text{g/mL}$  G418 nur bedingt kultivieren. Man kann sich dies damit erklären, dass durch die Mutationen stark konservierte Aminosäuren in wichtigen funktionellen Domänen der NPT ausgetauscht wurden. Bei M2 (D190G) wurde in Position 190 die Asparaginsäure gegen Glycin ausgetauscht. Die Asparaginsäure ist in 100% aller Aminoglycosid-Phosphotransferasen (APHs) konserviert und ist Bestandteil der Sequenz –HGD– in Motiv 1 des Enzyms (Abb. 32). Diesem Motiv wird die ATPase-Aktivität des Enzyms zugeschrieben (Martin, Jullien, and Courvalin 1988; Shaw, Rather, Hare, and Miller 1993). In der Publikation von Kocabiyik und Perlin (Kocabiyik and Perlin 1992b) wurde diese Mutante in *E. coli* beschrieben und es wurde von einer relativ stark beeinträchtigten Enzymfunktion berichtet. Die Asparaginsäure 208, die in M3 gegen ein Glycin ausgetauscht wurde, ist in 70% aller APHs konserviert (Abb. 32). Sie liegt innerhalb des Motivs 2, das vermutlich die ATP-Bindungsstelle der NPT darstellt. Auch diese Mutante wurde in *E. coli* als stark beeinträchtigt beschrieben (Kocabiyik and Perlin 1992b).

Transfektionsansätze mit höheren Konzentrationen an G418 (ST neo2 und ST neo9) führten nicht zu einer Anreicherung von Hochproduzenten (Abb. 17 und Abb. 24). Eine Erhöhung der G418-Konzentration auf  $800 \mu\text{g/mL}$  in Verbindung mit der NPT-WT-Variante ( $\text{WT}_{800}$ ) hatte sogar eine reduzierte durchschnittliche Produktivität zur Folge (Abb. 17). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass mit einer G418-Konzentration von  $800 \mu\text{g/mL}$  eine Stufe erreicht wurde, bei der die Proteinsynthese der Zelle eventuell derartig gestört war, dass es zu einem allgemein niedrigen Expressionsniveau kam. Davon betroffen waren folglich auch das Produkt und die NPT selbst, wodurch letztere wiederum in zu geringen Mengen vorlag, um das vorhandene G418 komplett zu inaktivieren. So blieb die aktive G418-Konzentration hoch und das Expressionsniveau niedrig. Wurde, wie in ST neo9, zusätzlich zu einer Mutation im Resistenzgen der Selektionsdruck durch eine höhere G418-Konzentration gesteigert, konnte ebenfalls keine weitere Erhöhung der durchschnittlichen Produktivität erzielt werden (Abb. 24). Entweder waren G418-Konzentrationen von  $500 \mu\text{g/mL}$  und  $600 \mu\text{g/mL}$  zu gering, um einen wesentlich höheren Selektionsdruck für die Zellen darzustellen, oder es handelte sich um den Effekt, der bereits für  $\text{WT}_{800}$  diskutiert wurde. Eine durch den Integrationsort und/oder die Kopienzahl bedingte erhöhte Transkription konnte sich demnach nicht ausprägen, weil die allgemeine Proteinsynthese durch eine hohe G418-Konzentration beeinträchtigt war. Die großen Standardabweichungen bei M1 ( $500 \mu\text{g/mL}$ ) und M4 ( $500 \mu\text{g/mL}$ ) kamen durch jeweils einen Pool mit stark abweichenden Werten zustande. Bei dem M1-selektionierten Ausreißer handelte es sich um einen außerordentlich hohen Produzenten, der vermutlich Integrationsereignisse in sehr aktiven Genorten und/oder eine hohe Kopienzahl des Produktgens aufwies. Der M4-selektionierte Ausreißer zeigte hingegen eine

sehr schlechte Produktivität, die möglicherweise auf eine Entkopplung von Produktgen und Selektionsmarkergen bei der Integration zurückzuführen war.

Ein Enzymaktivitätsassay klärte die Frage, ob der beobachtete produktsteigernde Effekt bei Zellpools, die mit mutierter NPT II selektioniert wurden, in kausalem Zusammenhang mit der Enzymaktivität stand. Es zeigte sich, dass alle untersuchten Mutationen in der Neomycin-Phosphotransferase zu einer mehr oder weniger starken Beeinträchtigung der Enzymaktivität führten. In Tabelle 10 ist eine Auflistung der Aktivitäten der Mutanten im Vergleich zum Konservierungsgrad der betroffenen Aminosäuren dargestellt.

Die Unterschiede im Maß der Beeinträchtigung kamen daher, dass die Mutationen in mehr oder weniger stark konservierten Regionen des Enzyms lagen (Abb. 32, Tab. 10). Meistens verhielt sich die Restaktivität des Enzyms umgekehrt proportional zum Konservierungsgrad. In der Regel gilt, je konservierter eine Domäne ist, desto wichtiger ist ihre Rolle in der grundlegenden Enzymfunktion. Eine Mutation in einer hochkonservierten Domäne (M2, M3, N6, N7, N8) wirkte sich somit weit drastischer auf die Gesamtfunktion des Enzyms aus als eine Mutation, die in wenig konservierten Bereichen lokalisiert war (M1, M4, N1, N2, N4, N4). Dahingehend kann man die meisten Mutanten in drei Gruppen unterteilen:

1. Mutanten mit hoher Restaktivität (ca. 50%) und geringem Konservierungsgrad (10 - 30%): M4, N2, N3
2. Mutanten mit mittlerer Restaktivität (20 - 25%) und mittlerem Konservierungsgrad (40 - 45%): M1, N1, N8
3. Mutanten mit geringer Restaktivität (0 - 3%) und hohem Konservierungsgrad (65 - 100%): M2, M3, N6, N7

Von M2 und M3 wurden zwar keine Enzymaktivitäten bestimmt, aber sie wurden bezüglich ihrer Aktivitäten als sehr gering eingestuft, da M2- und M3-transfizierte Zellen die Selektion kaum überlebten.

Die Mutanten N4 und N5 konnten nicht in dieses Schema eingeordnet werden. Bei beiden Mutanten war dieselbe Aminosäure wie bei M4 (D227) substituiert. Diese Asparaginsäure weist einen eher niedrigen Konservierungsgrad auf (10%). Die Restaktivitäten von N4 und N5 waren jedoch nicht entsprechend hoch sondern bewegten sich im unteren bis mittleren Bereich (15 - 22%). Hier spielte vermutlich nicht nur die Position eine Rolle sondern auch die Art der eingetauschten Aminosäure. Sowohl die natürlich vorkommende Asparaginsäure als auch das eingetauschte Glycin der Mutante M4 waren polare Aminosäuren. Das Enzym M4 behielt folglich eine relativ hohe Restaktivität von 47%. In den Mutanten N4 und N5 wurde die Asparaginsäure (D) jedoch gegen hydrophobe Aminosäuren ausgetauscht (Alanin und

Valin). Dadurch konnte es zu größeren Konformationsänderungen im Enzym kommen, die dessen Aktivität stärker beeinflussten als bei M4 beobachtet wurde.

Die Bewertung von N3 hinsichtlich des Konservierungsgrades ist auch nicht ganz eindeutig. An Position 198 ist das Valin zwar nur in 25% der APHs konserviert, aber nach der Bewertung von Shaw et al. besitzen mindestens 14 von 20 APHs an dieser Position sehr ähnliche Aminosäuren (Shaw, Rather, Hare, and Miller 1993).

NPT-Variante	% Aktivität (Pool)	Mittel Aktivität (%)	Mutation	Konservierung (%)	Motiv	Ø spezif. Prod. (pg/c*d)
WT	100 (1) 86 (2)	93				0,305
M1	24 (1) 22 (2)	23	E182D	8/20, (40)	vor M1	0,568
M2	n.d.	n.d.	D190G	20/20, (100)	M1	-
M3	n.d.	n.d.	D208G	16/20, (80)	M2	-
M4	61 (1) 33 (2)	47	D227G	2/20, (10)	-	0,747
WT'	75 (3) 100 (4)	87,5				0,362
N1	29 (1) 16 (2)	22,5	E182G	8/20, (40)	vor M1	0,520
N2	47 (1) 46 (2)	46,5	W91A	6/20, (30)	vor M	1,459
N3	55 (1) 53 (2)	54	V198G	5/20, (25)	nach M1	0,519
N4	23 (1) 20 (2)	21,5	D227A	2/20, (10)	-	0,792
N5	11 (1) 18 (2)	14,5	D227V	2/20, (10)	-	5,284
N6	4 (1) 2 (2)	3	D261G	13/20, (65)	M3	3,377
N7	1 (1) 2 (2)	1,5	D261N	13/20, (65)	M3	2,625
N8	24 (1) 17 (2)	20,5	F240I	9/20, (45)	-	2,080

**Tab. 10: Vergleich der Mutanten bezüglich Enzymaktivität und Konservierungsgrad der ausgetauschten Aminosäuren**

Die Enzymaktivität wurde relativ zum höchsten Wert der jeweiligen WT-Variante berechnet (WT(1) bzw. WT(4)). Konservierung bedeutet die Anzahl der Aminoglycosid-Phosphotransferasen mit derselben Aminosäure an dieser Position (von 20 insgesamt). Die Rubrik "Motiv" gibt an, ob die betroffene Aminosäure innerhalb oder in der Nähe eines konservierten Motivs (M) liegt, nach Shaw, Rather, Hare, and Miller 1993. Die angegebenen Werte für die spezifische Produktivität beziehen sich auf den Mittelwert aus allen getesteten Pools.

Es kam vor, dass die Aktivitäten der Enzyme in den Parallelpools etwas schwankten, vor allem die des Wildtyp-Enzyms. Dies könnte daran liegen, dass die Enzymaktivität möglicherweise vom physiologischen Zustand der Zelle zum Zeitpunkt der Extrakterstellung abhing. Doppelbestimmungen jeder Probe zeigten, dass Schwankungen, die durch die Assayungenauigkeit und Probenauftragung entstanden, sehr gering waren.

Wenn man die NPT-Enzymaktivitäten (Tab. 5) mit dem Erfolg beim Anreichern von Hochproduzenten verglich (Abb. 20 und 22), konnte man keine strenge Antiproportionalität feststellen. Es zeigte sich jedoch deutlich, dass keine der NPT-Varianten mit einer relativ hohen Enzymaktivität (WT, M4, N2, N3) zur Spitzengruppe der Hochproduzentenreicherer (N5, N6, N7, N8) gehörte. Anders betrachtet war die Enzymaktivität derjenigen Mutanten, die die meisten Hochproduzenten hervorbrachten, sehr stark (N6, N7) bis mittelstark beeinträchtigt (N5, N8), aber nie nur mäßig beeinträchtigt. Ein Ausnahmefall war die Mutante N2, die eine relativ gute Hochproduzentenanreicherung bewirkte und gleichzeitig eine hohe Enzymrestaktivität besaß. N2 war auch bezüglich des *npt*-RNA-Levels eine Ausnahme (s.u.). In der Regel hing also die Anreicherung von Hochproduzenten vom Maß der Beeinträchtigung des NPT-Selektionmarkers ab.

Die Untersuchung der Genkopienzahl von *npt* sollte Aufschluss darüber geben, ob die erhöhte durchschnittliche Produktivität durch mehrere Genkopien oder durch die Integration des heterologen Gens in transkriptionsaktive Genloki bedingt war. Der Vergleich der spezifischen Produktivitäten und der *npt*-Genkopienzahlen in Abbildung 28 führte zu dem Ergebnis, dass in der Regel die höhere Produktivität durch einen Genkopieneffekt erzielt wurde. Ausnahmen waren Pool M1(1), die M4- und die N5-Pools. In den Pools N2(1), N6(1) und N6(2) ging eine hohe *npt*-Kopienzahl mit einer relativ geringeren Produktivität einher. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass das HC-Plasmid in geringerer Kopienzahl integriert wurde als das LC-Plasmid, dessen Kopienzahl durch das *npt*-Gen bestimmt wurde. Eine kleinere HC-Menge hätte folglich die Menge an gebildetem Antikörper limitieren können. Alternativ könnten auch „Silencing“-Effekte der genomischen Umgebung eine Erklärung für die relativ geringere Antikörperproduktivität im Vergleich zur Kopienzahl sein. Im umgekehrten Fall (wenig *npt*-Kopien, hohe Antikörper-Produktivität) wurde die Genexpression wahrscheinlich durch transkriptionell aktive Integrationsloki beeinflusst (z. B. N5(1), N5(2)).

Die Bestimmung des *npt*-mRNA-Levels zeigte, dass fast alle Pools, die mit NPT-Mutanten selektiert wurden, eine höhere Transkriptionsrate des *npt*-Gens aufwiesen als WT-selektierte Pools. Lediglich Pools mit Mutante N1 exprimierten etwa die gleiche Menge *npt*-mRNA wie die Pools mit WT-NPT. In vielen Fällen war die höhere Expression auf RNA-Ebene eine Funktion der Genkopienzahl, in manchen verhielt es sich jedoch anders. Es gab Pools mit verhältnismäßig wenig Genkopien, aber hohem mRNA-Level (N2(2), N8(1)). Hierfür war vermutlich die transkriptionsaktive genomische Umgebung des Integrationsortes verantwortlich. Andere Pools zeigten den umgekehrten Effekt: Die Genkopienzahl war hoch,

aber der mRNA-Level vergleichsweise niedrig (N6(2), N7(2)). Ein Grund dafür könnten "Silencing"-Effekte der genomischen Umgebung gewesen sein.

Die *npt*-mRNA-Level von den WT-, N1-, N3-, N4-, M1- und M4-selektionierten Pools standen im gleichen Verhältnis zueinander wie deren Produktlevel (mAk-2/MCP1). Der Northern Blot (Abb. 28) zeigte auch, dass Pools mit den Mutanten N2, N5, N6, N7 und N8 mehr *npt*-mRNA aufwiesen als Pools mit WT(3 + 4), N1, N3 und N4 und die Pools mit M1 und M4 mehr als Pools mit WT(1 + 2). Dies konnte auf Proteinebene für die Produktexpression (mAk-2/MCP1) ebenfalls gezeigt werden. Allerdings stimmten bei den höher exprimierenden Mutanten die Relationen zwischen den *npt*-mRNAs und den Produktivitäten nicht genau überein. Vor allem bei Pools mit N2 wichen *npt*-mRNA-Expression und mAk-2-Expression stark voneinander ab. Die N2-Pools exprimierten im Vergleich zu den Pools mit anderen Mutanten verhältnismäßig mehr *npt*-mRNA als mAk-2-Protein. Dahingegen war bei Pools mit N5 der *npt*-mRNA-Level relativ zum mAk-2-Level niedriger. Ein Unterschied zwischen N7- und N8-selektionierten Pools war zwar vorhanden, aber nicht so gravierend. Für diese unterschiedlichen Relationen kann es mehrere Gründe geben. Zum einen könnten alle Aspekte eine Rolle spielen, die bei der Ermittlung von Titer und spezifischer Produktivität die Genauigkeit der Werte beeinträchtigen konnten (s. o.). Nicht zu vernachlässigen ist die Tatsache, dass es sich bei mRNA- und Produktivitätsbestimmung um drei verschiedene Gene bzw. RNAs handelte (*npt*, LC2 und HC2), die in zwei verschiedenen Proteinen resultierten (NPT und mAk-2). Jedes für sich könnte bei der Integration ins Genom inaktiviert werden. Auch ein Missverhältnis der LC- und HC-Kopienzahl könnte der limitierende Faktor in der Produktivität sein. So lässt sich möglicherweise der extreme Unterschied zwischen der großen *npt*-RNA-Menge und der relativ geringen mAk-2-Produktivität bei den N2-Pools erklären. Der umgekehrte Effekt (hohe mAk-2-Expression, relativ weniger *npt*-mRNA), wie er bei den N5-Pools auftrat, beruhte möglicherweise darauf, dass bei der Titerbestimmung auf Grund von Zellaggregaten ein Fehler durch die Zellzahlbestimmung mit einging. Zudem kann es auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Mutationen im *npt*-Gen negative (oder positive) Auswirkungen auf die Transkriptionseffizienz des Gens oder die Stabilität der mRNA ausübten und so den mRNA-Level beeinflussten. Schließlich wäre die Ebene der Translation eine weitere Möglichkeit unterschiedlicher Regulation, und auch die Stabilität der mutierten Proteine könnte variieren.

Um ein klareres Bild über die Zusammenhänge zwischen Kopienanzahl, Integrationsort, RNA-Level und Protein-Level zu bekommen, sollten mögliche weitere Experimente wie Southern Blots zur Untersuchung des genomischen Integrationsortes und des Rekombinationsortes im Plasmid, Kopienzahlbestimmung der Produktgene, mRNA-

Nachweis der Produktgene und Messung der NPT-Proteinmenge in Klonen statt in Pools durchgeführt werden.

Die NPT-Variante M4 wurde bereits erfolgreich in der Entwicklung neuer Produktionsszelllinien eingesetzt. In den nächsten Entwicklungen kommen die NPT-Varianten N5, N6, N7 und N8 zum Einsatz. Für alle NPT-Mutanten und deren Effekt auf die Selektion von Hochproduzenten erfolgten zwei Patentanmeldungen.

### **5.3 Erhöhung der Expression durch ein cis-wirkendes Element**

Um die Expression des Produktgens zu steigern und möglicherweise auch gegen Einflüsse des umliegenden Chromatins abzuschirmen, wurde ein bestimmtes Sequenzelement aus dem CHO-Genom getestet (Transcription Enhancing TE-Element). In drei unabhängigen Transfektionsserien wurden Pools mit TE-Element in direkter Orientierung, reverser Orientierung und ohne TE-Element auf die Expression des Testantikörpers mAk-1 hin untersucht. Das 2,2 kb große TE-Fragment lag in allen eingesetzten Plasmiden in 5'-Richtung der Expressionskassette mit Enhancer, Promotor und Produktgen(en). Die Expression des Testantikörpers mAk-1 erfolgte durch eine Kotransfektion der leichten Kette mit NPT als Selektionsmarker und der schweren Kette mit DHFR als Selektionsmarker. Die leichte Kette wurde zusätzlich in einer bicistronischen Expressionskassette über IRES mit GFP gekoppelt. So konnte die Höhe der Expression sowohl über den Produkttiter und die spezifische Produktivität als auch über die GFP-Expression bestimmt werden. In der ersten Transfektionsserie wurde die Expression der Antikörperketten und des GFPs durch ein CMV-Enhancer/Promotor-Element reguliert, in der zweiten und dritten Serie durch eine Kombination aus CMV-Enhancer und CHO-Promotor.

In allen drei Serien waren die Produktivitäten der Pools mit TE-Element, unabhängig von dessen Orientierung, knapp doppelt so hoch wie in den Pools ohne dieses Element. In der Serie 1 fiel auf, dass der Unterschied zwischen TE-Pools und Kontrollpools um einiges größer war als in den anderen Serien. Die geringe Expression in diesen Kontrollpools lag möglicherweise am fehlenden CHO-Element. Sie enthielten weder das CHO-TE-Element noch den CHO-Promotor, der in Verbindung mit dem CVM-Enhancer stärker ist als die CMV-Enhancer/CMV-Promotor-Kombination. Außerdem wurden in Serie 1 nur die Werte einer Passage ermittelt. Wie bereits im vorigen Kapitel (5.2) diskutiert wurde, hat die Erfahrung gezeigt, dass der Titer mit zunehmender Passagenzahl noch leicht ansteigen kann und sich

auf einem Niveau einpendelt bzw. in manchen Fällen erst nach längerer Zeit in Kultur wieder sinkt.

Die Standardabweichungen der Mittelwerte von Produkttiter und spezifischer Produktivität in Serie 1 und 2 waren sehr groß. Die Gründe dafür sind zum einen darin zu finden, dass es sich um Pools statt um Klone handelte. Die Problematik von polyklonalen Pools wurde bereits in Kapitel 5.2 ausführlich diskutiert. Zum anderen wurden jeweils nur vier Parallelpools angesetzt, was für eine statistische Auswertung wenig war. Die Ergebnisse konnten also nur als Tendenz gesehen werden. Bei Serie 1 kam noch hinzu, dass auch die Werte der einzelnen Pools statistisch gesehen ungenau waren, da nur Werte aus einer Passage ermittelt wurden. Serie 3 hingegen umfasste jeweils zehn Parallelpools. Entsprechend kleiner waren die Standardabweichungen. Hier konnte die Verdopplung der Produktivität durch das TE-Element als signifikant betrachtet werden. Dass in dieser Serie die Werte für die Produktivitäten in allen Pools höher waren als in den anderen Serien, lag vermutlich an einer besseren Transfektionseffizienz. Beeinflussende Parameter wurden bereits in Kapitel 5.2 diskutiert.

Zusätzlich zu den Produktivitätserhebungen anhand des Testprodukts mA<sub>k</sub>-1 wurde die durchschnittliche GFP-Expression der Pools durch FACS-Messungen ermittelt. Die GFP-Daten zeigten ebenfalls einen deutlichen expressionssteigernden Effekt des TE-Elements (Abb. 30). Wenn man diese FACS-Daten mit denen der NPT-Varianten WT und M4 (Abb. 20) im Hinblick auf eine Quantifizierung des Effekts verglich, konnte festgestellt werden, dass die Kurven der TE-Element-Ansätze und die Kurven der M4-selektionierten Zellen in Relation zu ihren Kontrollen in gleichem Maße hin zu einer höheren Fluoreszenz verschoben waren. So verhielt es sich auch mit der Produktexpression, die sowohl durch das TE-Element als auch durch die Selektion mit der NPT-Variante M4 um den Faktor zwei erhöht war. Die FACS-Daten korrelierten also auch quantitativ mit den Produktivitätsdaten.

Die Selektionsphasen der Pools mit TE-Element waren in Serie 1 und Serie 3 jeweils zwei Tage kürzer als bei den Pools ohne TE-Element, d. h. die TE-Pools wurden nach der Selektion jeweils zwei Tage früher gesplittet als die Pools ohne TE-Element. Der Grund hierfür könnte sein, dass sich das erhöhte Expressionsniveau, welches das TE-Element vermittelte, nicht nur auf die Expression des Produkts auswirkte sondern auch auf die der Selektionsmarker (DHFR und Neo<sup>R</sup>). Somit konnte die Resistenz in den TE-Element-Pools früher zum Tragen kommen und es wurde schneller eine größere Zellzahl erreicht. In Serie 2 trat dieses Phänomen nicht auf. Möglicherweise war hier die Transfektionseffizienz in den Kontrollpools (ohne TE-Element) höher, weil weniger Gesamt-DNA eingesetzt worden war als in den TE-Pools, und glich damit das langsamere Hochwachsen der resistenten Klone

ohne TE-Element wieder aus. In den Serien 1 und 3 waren die DNA-Mengen in allen Ansätzen ausgewogen, weshalb sich die TE-Element-bedingten Unterschiede in der Dauer der Selektionsphase bemerkbar machten.

Die Genkopienzahlbestimmung der leichten und schweren Antikörperkette in Pools, die nach einer durchschnittlichen Produktivität ausgewählt worden waren, ergab, unabhängig von der Produktivität, für alle Pools ein gleichmäßiges Bild. Dies zeigte, dass die erhöhte Produktivität in den TE-Pools nicht durch einen Genkopieneffekt verursacht wurde. Vielmehr unterstützte dies die Aussage, dass das TE-Element für die Steigerung der Produktivität verantwortlich war. Die leichten Unterschiede in den Kopienzahlen waren nicht signifikant. Sie konnten der Testungenauigkeit zugeschrieben werden, die sich z. B. aus der Genauigkeit, mit der die genomische DNA pipettiert wurde, der Bindungskapazität der Nylonmembran und der Verteilung des Nachweisreagenz auf der Membran ergaben.

In der Einleitung zum Thema cis- und trans-wirkende DNA-Elemente (Kapitel 1.4) wurden verschiedene genetische Elemente vorgestellt, die die Transkription heterologer Gene steuern. Im Folgenden wird die Zuordnung des hier untersuchten TE-Elements zu einer der Gruppierungen diskutiert.

Dass das TE-Element seine expressionssteigernde Wirkung in stabil transfizierten Zellen unabhängig von seiner Orientierung ausübte, spricht für eine Funktion als Enhancer. Allerdings konnte in früheren transienten Transfektionsstudien mit CHO-Zellen ausgeschlossen werden, dass das TE-Element aus dem konstitutiv hochexprimierten CHO-Gen eine Enhancerfunktion ausübt (B. Enenkel, pers. Komm.). Die Anwesenheit des TE-Elements führte nicht zu einer Verstärkung der Reporterexpression.

Ebenfalls sehr unwahrscheinlich ist, dass das hier untersuchte Element eine Locus Control Region ist. Diese Elemente sind sehr komplex und erstrecken sich meist über mehrere Kilobasen. Um das TE-Element dieser Gruppe zuordnen zu können, muss es Eigenschaften wie positionsunabhängige und kopienzahlabhängige Expression und DNase I-Hypersensitivität aufweisen. Die starken Schwankungen zwischen den Parallelpools wiesen eher auf eine Positionsabhängigkeit der Expression hin. Da die Kopienzahlen in den Pools einheitlich waren, konnte nicht festgestellt werden, ob eine extrem hohe Kopienzahl die Expression in TE-Pools entsprechend steigern würde. Es wäre jedoch besser, diese Aspekte in Zellklonen zu untersuchen anstatt in Zellpools.

Um herauszufinden, ob das TE-Element eine chromatinöffnende Wirkung im Sinne der LCRs besitzt, können Zellklone mit einem Integrationsort in Heterochromatin untersucht werden.

Die Auswahl von solchen Klonen kann auf Grund einer Kolo­kalisierung des Produktgens mit Heterochromatin erfolgen. Eine Lokalisierung bestimmter Gene und Chromosomenabschitte ist durch in situ-Hybridisierung und Chromosomenbanding (C-Banden = Heterochromatin) bzw. Chromosomenpainting von Chromosomenpräparaten möglich (Hennig 1995).

Desweiteren steht für die Einordnung als LCR die Untersuchung auf die Bildung von DNase I-hypersensitiven Chromatinstellen aus. Die Lokalisierung dieser hypersensitiven Stellen ist mit Hilfe der DNase I-Footprint Analyse möglich. Die Methode beruht darauf, dass DNA-Abschnitte, an die Proteine gebunden sind, vor einem DNase I-Abbau geschützt, frei zugängliche Abschnitte aber DNase I-sensitiv sind (Ausubel et al 1994 updated, Lewin 1998).

Das Vorhandensein von DNase I-hypersensitiven Stellen wäre auch ein Hinweis auf eine Matrix/Scaffold Attachment Region (S/MAR). S/MARs besitzen wie die LCRs die Eigenschaft, Chromatin zu öffnen und so die Transkription des betroffenen Genlokus zu fördern. Auch sie vermitteln eine positionsunabhängige Expression.

Desweiteren ist es möglich, dass die Expression von chromosomal integrierter Fremd-DNA durch Isolatoren erhöht wird. Diese Elemente schirmen die Fremd-DNA von expressionsunterdrückenden DNA-Strukturen (z. B. Heterochromatin) ab. Ein Enhancer-Block-Experiment könnte Aufschluss darüber geben, ob es sich bei dem TE-Element um einen Isolator handelt. Dabei wird untersucht, ob die Gegenwart des hypothetischen Isolators zwischen einem Enhancer und einem zu exprimierenden Gen die Transkription des Gens verhindert oder abschwächt. Ein Hinweis auf eine mögliche Funktion als Isolator bietet eine GC-reiche Insel im TE-Element, wie sie auch im *dhfr*-Gen von CHO-Zellen gefunden und untersucht wurde (Poljak, Seum, Mattioni, and Laemmli 1994).

Eine Einordnung als Facilitator Element (Aronow, Ebert, Valerius, Potter, Wiginton, Witte, and Hutton 1995) scheidet für das TE-Element aus, da es eine eindeutige enhancerähnliche Aktivität gezeigt hat (Expressionssteigerung), die den Facilitator Elementen nicht zugeschrieben wird.

Möglicherweise ist die CpG-Insel des TE-Elements nicht so stark methyliert, wie es bei Isolatoren vorkommt (Poljak, Seum, Mattioni, and Laemmli 1994). Es kann sich auch um eine untermethylierte CpG-Insel, also um aktives Chromatin, handeln. In diesem Fall ist das TE-Element als UCOE (Ubiquitous Chromatin Opening Element) einzuordnen (WO 02/081677). Dafür spricht auch, dass die Sequenz aus einem konstitutiv exprimierten Genlokus stammt. Eine Untersuchung des Methylierungsgrades könnte diese Hypothese

absichern. Die Verteilung von CpG-Methylgruppen in der DNA lässt sich mit Hilfe von isoschizomeren Restriktionsenzymen untersuchen. Solche Enzyme schneiden die gleiche Zielsequenz, reagieren aber anders auf deren Methylierungsgrad. Ein Beispiel für Isoschizomere sind die Enzyme *HpaII* und *MspI* (Lewin 1998).

Schließlich besitzt das TE-Element auch sehr viele AT-reiche Sequenzabschnitte. Zusammen mit dem Ergebnis der stabilen Expressionsstudien, ist deshalb eine Funktion als EASE (Expression Augmenting Sequence Element) sehr wahrscheinlich (US 6,027,915, US 6,309,851). An die AT-reichen Sequenzen dieser DNA-Elemente binden die AT-Haken der HMG-I(Y)-Proteine, was zu lokalen Veränderungen der DNA-Topologie und folglich zu einer veränderten Genexpression führt. Die Isolierung von CHO HMG Proteinen und ein „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) mit den entsprechenden AT-reichen DNA-Fragmenten aus dem TE-Element könnten Aufschluss über mögliche HMG-I(Y)-Bindungsstellen geben (US 6,309,851).

In weiteren Experimenten kann untersucht werden, ob die Verwendung je eines TE-Elements an beiden Seiten des Produktgens eine zusätzliche Steigerung der Expression verursacht. Damit das Plasmid dadurch nicht zu groß wird, ist eine genauere Analyse des TE-Elements und eine Eingrenzung des für die Funktion relevanten Bereichs notwendig. Schließlich kann überprüft werden, ob durch die Kombination des TE-Elements mit einer anderen NPT-Variante (z. B. M4, N5, N6, N7 oder N8) eine weitere Produktivitätssteigerung möglich ist.

## 5.4 Ausblick

Außer den in dieser Arbeit gezeigten verbesserten Selektionsverfahren und expressionssteigernden genetischen Elementen, gibt es auf gentechnischer Ebene weitere Möglichkeiten die rekombinante Glykoproteinproduktion in Säugierzellen zu optimieren. Um eine hohe Genexpression zu erreichen, werden v. a. starke zelluläre oder virale Promotoren (z. B. CMV) eingesetzt. Für bestimmte Zwecke wie die Expression von wachstumshemmenden Produkten sind jedoch regulierbare Promotoren nützlich, die beispielsweise auf Mediumzusätze reagieren (Fussenegger et al., 1999; Gossen et al., 1995; Gossen and Bujard, 1992).

Viele Strategien zielen darauf ab, die Probleme zu umgehen, die von der umgebenden chromosomalen DNA ausgehen. Eine Möglichkeit, den Einfluss der genomischen Umgebung

auf das integrierte Produktgen abzuschirmen, bieten z. B. S/MARs (Klehr et al., 1991; Schubeler et al., 1996; Bode et al., 1996).

Das Problem der willkürlichen Integration in Säugerchromosomen kann mit einer gezielten Integration in zwei Schritten gelöst werden. Im ersten Schritt handelt es sich um eine klassische Transfektion mit anschließender Auswahl eines geeigneten Produktionsklons, der spezifische Rekombinationsstellen enthält. Über diese kann im zweiten Schritt gezielt ein gewünschtes Produktgen eingefügt werden. Geeignete Rekombinationssysteme sind z.B. Flp/FRT (Schubeler et al., 1998; Seibler et al., 1998) und Cre/loxP (Fukushige and Sauer, 1992).

Eine Beeinträchtigung des genetischen Hintergrundes der Wirtszelle durch eine Integration im Genom kann verhindert werden, wenn das Produkt transient (Fussenegger et al., 1999; Jordan et al., 1996) oder von einem artifiziellen Chromosom aus (Cooke, 2001) exprimiert wird.

Eine Verbesserung der Klonauswahlprozedur kann durch multicistronische Expressionsvektoren erfolgen (Fussenegger et al., 1999 und darin enthaltene Referenzen), wie sie bereits auch in dieser Arbeit z. T. verwendet wurden. Es ist auch möglich, die Produktmenge direkt zu bestimmen und einer einzelnen Zelle zuzuordnen, indem das Produkt mit der Zelle assoziiert gehalten wird (Fussenegger et al., 1999 und darin enthaltene Referenzen). Die Selektion von hochproduzierenden Klonen kann auch durch zwei Selektionsmarker, eine mutierte Translationsinitiationsstelle oder einen schwachen Resistenzgen-Promotor (Niwa et al., 1991; Fussenegger et al., 1999 und darin enthaltene Referenzen) forciert werden.

Wichtig ist außerdem die Stabilität der hohen Expression, die bei niedriger Kopienzahl des integrierten Produktgens eher gegeben ist. Für Einzelkopieintegrationen werden deshalb retrovirale Vektoren eingesetzt (Fussenegger et al., 1999).

Als weiteres Mittel zur quantitativ und qualitativ hochwertigen Produktion von Glykoproteinen kann die Proliferationskontrolle eingesetzt werden. Hierzu lässt man die Zellen zuerst schnell zu einer großen Zellzahl vermehren. Daraufhin folgt eine Produktionsphase ohne Proliferation, sodass sich der Metabolismus der Zelle voll und ganz auf die Herstellung des Produkts konzentrieren kann, die Nährstoffe nicht durch die Proliferation verbraucht werden und das Medium nicht durch Zellabfälle verunreinigt wird. Eine Proliferationskontrolle kann z. B. durch einen induzierbaren Promotor erfolgen (Fussenegger et al., 1999 und darin enthaltene Referenzen).

Ein unerwünschter Effekt in biotechnologischen Prozessen ist die Apoptose. Hier gibt es verschiedene Verbesserungsansätze, wobei aus gentechnischer Sicht v. a. die antiapoptotischen „Überlebensgene“ wie bcl-2/bcl-xL relevant sind (Meents et al., 2002).

Was neben den Anstrengungen zur Erhöhung des Produktlevels nicht außer Acht gelassen werden darf, ist die Produktqualität. Im Hinblick darauf sind v. a. posttranslationale Glykosylierungsmuster von großer Wichtigkeit. Auch auf diesem Gebiet kann die rekombinante DNA-Technologie eingesetzt werden, z. B. durch die Aktivierung oder das Einführen von Genen, die für Kohlenhydrat-synthetisierende Enzyme kodieren oder durch das Ausschalten unerwünschter Glykosylierungen mittels Antisense-Technik (Fussenegger et al., 1999 und darin enthaltene Referenzen). Zudem können mögliche zellphysiologische Nadelöhre aufgedeckt werden, die die Produktionsrate limitieren, und die entsprechenden Gene nach oben reguliert werden (Grillari et al., 2001).

Es stehen also zahlreiche genetische Werkzeuge für die Weiterentwicklung und Verbesserung der biopharmazeutischen Produktion in Säugerzellen zur Verfügung.

## 6. Zusammenfassung

Säugerzellen sind die bevorzugten Wirtszellen zur Produktion komplexer biopharmazeutischer Proteine, da die post-translational durchgeführten Modifikationen sowohl in funktionaler als auch in pharmakokinetischer Hinsicht humankompatibel sind. Ein großes Problem bei der Etablierung von Zelllinien mit hoher Expression des gewünschten Proteins ergibt sich aus der willkürlichen und ungerichteten Integration des rekombinanten Vektors in transkriptionsaktive oder -inaktive Loci des Wirtszellgenoms. Dadurch erhält man eine Population von Zellen, die völlig unterschiedliche Expressionsraten des heterologen Gens aufweist, wobei die Produktivität der Zellen in der Regel einer Normalverteilung folgt. Zur Identifizierung von Zellklonen, die eine sehr hohe Expression des heterologen Produktgens aufweisen, muss deshalb eine Vielzahl von Klonen überprüft und getestet werden, resultierend in einem hohen Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwand. Optimierungen des zur Transfektion eingesetzten Vektorsystems zielen deshalb darauf ab, durch geeignete Selektionsstrategien den Anteil von Hochproduzenten in der transfizierten Zellpopulation zu erhöhen und somit den Aufwand in der Klonidentifizierung zu reduzieren. Die Entwicklung eines derartigen Expressionssystems ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Zwei alternative Strategien, die beide auf der Beeinträchtigung des Selektionsmarkers basieren, wurden untersucht. Die Beeinträchtigung des Selektionsmarkers sollte bewirken, dass Klone mit einer Integration in transkriptionsinaktiven Genloki die Selektion nicht überstehen und absterben, während Klone mit einer Integration in transkriptionsaktiven Genloki die Beeinträchtigung des Selektionsmarkers durch eine erhöhte Expression kompensieren können. Diese Klone sollten überleben und gleichzeitig eine hohe Produktexpression aufweisen.

Die erste Strategie zielte darauf ab, die Expression des Selektionsmarkers auf Translationsebene reversibel zu hemmen. Dabei stützte man sich auf die Entdeckung, dass Aptamere (= Rezeptoren aus Nukleinsäuren) im 5'-UTR eines Gens durch die Interaktion mit einem spezifischen Liganden die Translation des nachfolgenden Gens abschwächen können (Werstuck and Green 1998). Dieser Effekt konnte in dieser Arbeit in einem „Proof of Concept“ jedoch nicht reproduziert werden, weshalb diese Strategie für die Verbesserung des Selektionsverfahrens nicht weiter verfolgt wurde.

Die zweite Strategie basierte auf der Beeinträchtigung der Enzymfunktion des Selektionsmarkers, indem Mutationen im offenen Leseraster des Enzyms eingefügt wurden. Zwölf einzelne Punktmutationen in mehr oder weniger stark konservierten Domänen des Resistenzgens Neomycin-Phosphotransferase (NPT) bewirkten eine Reduktion der

Enzymaktivität. Die Effizienz, mit der die NPT Phosphat auf das Antibiotikum G418 übertrug, war in den verschiedenen Mutanten unterschiedlich stark reduziert, je nach Konservierungsgrad und Art des Aminosäureaustausches. Zwei Mutanten waren so stark beeinträchtigt, dass die damit transfizierten Zellen die Selektion nicht überlebten. In anderen Fällen war die Selektionsphase verlängert und das Zellwachstum beeinträchtigt. Jedoch zeigten alle überlebende Zellpools mit mutiertem NPT-Selektionsmarker im Vergleich zu Zellpools mit Wildtyp-NPT sowohl erhöhte spezifische Produktivitäten und höhere Produkttiter als auch einen höheren *npt*-RNA-Level. Außerdem war der Anteil hochproduzierender Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl in den mit einer Mutante selektionierten Pools größer als in den mit der Wildtyp-NPT selektionierten Pools. Verantwortlich für die höhere Produktivität war in manchen Fällen eine höhere Genkopienzahl und in anderen Fällen ein Integrationsort in aktivem Chromatin oder eine Kombination aus beiden Effekten. Der Einsatz von mutierten NPT-Varianten als Selektionsmarker in CHO-DG44-Zellen eignet sich also zur Anreicherung von Hochproduzenten, da eine derartige Beeinträchtigung der Resistenz nur durch eine höhere Expression kompensiert werden kann. Gleichzeitig werden Zellen, die eine geringere Expression aufweisen und somit die Beeinträchtigung des Selektionsmarkers nicht kompensieren können, eliminiert.

Eine weitere Möglichkeit, die Expressionsrate eines stabil integrierten Produktgens zu erhöhen, ist der Einsatz von cis- und transwirkenden genetischen Elementen. Hierzu zählen Enhancer und Promotoren, aber auch Elemente, die ausschließlich auf Chromatinebene wirken, z. B. Locus Control Regions (LCRs), Scaffold/Matrix Attachment Regions (S/MARs), Isolatoren, Ubiquitous Chromatin Opening Elements (UCOEs) und Expression Augmenting Sequence Elements (EASE). Sie können die transgene DNA von transkriptionshemmenden Positionseffekten im Genom abschirmen, indem sie beispielsweise die Chromatinstruktur auflockern. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Sequenz aus dem Genom von CHO-Zellen auf mögliche expressionssteigernde Wirkung hin untersucht (Transcription Enhancing TE-Element).

Es konnte gezeigt werden, dass dieses TE-Element die Expression eines rekombinanten Antikörpers in stabil transfizierten CHO-DG44-Zellpools verdoppelt. Die höhere Produktivität beruht nicht auf einer höheren Genkopienzahl in den betroffenen Pools. Um welche Art eines transkriptionssteigernden Elements es sich handelt, bleibt noch zu klären.

## Summary

Mammalian cells are the preferred host for the production of most complex protein therapeutics, as functionally and pharmacokinetically relevant post-translational modifications are highly human-compatible. A major problem when establishing cell lines with high expression rates of the protein of interest results from the random integration of the recombinant vector in transcription-active and -inactive loci of the host cell genome. As a consequence, a population of cells is obtained, which shows completely diverse expression rates of the heterologous gene, while in general, the productivity of the cells follows a normal distribution. Therefore, a multitude of clones has to be investigated in order to identify cell clones with high expression of the heterologous gene of interest, requiring a lot of time, capacities and being costly. Thus, optimizations of the vector system used for transfection aim on appropriate selection strategies to elevate the proportion of high producers in the transfected cell population and consequently reduce the effort in clone identification. The development of such an expression system is the subject of this thesis.

Two alternative strategies, both based on the impairment of the selection marker, were investigated. The reduced activity of the selection marker should result in the death of clones with a silent site integration. At the same time, clones with an active site integration can compensate the impairment of the selection marker by a higher expression. These clones should survive and simultaneously show a higher product expression.

The first strategy aimed on the reversibly reduced expression of the selection marker on the level of translation. This idea was supported by the finding, that aptamers (i. e. receptors consisting of nucleic acids) placed in the 5'-untranslated region (5'-UTR) of a gene can weaken the translation of the following gene by interacting with their specific ligand (Werstuck and Green 1998). In a proof of concept, this effect could not be reproduced in this thesis. Therefore, the aptamer-based strategy for improving the selection procedure was dismissed.

The second strategy was based on the impairment of the selection marker's enzyme function by introducing mutations into the enzyme's open reading frame. Twelve single point mutations in more or less conserved domains of the resistance marker gene neomycin-phosphotransferase (NPT) gave rise to a reduced enzyme activity. The efficiency of NPT in transferring phosphate on G418 was reduced to different degrees in the various mutants, depending on the amino acid conservation and the kind of amino acid exchange. Two mutants were impaired so strongly, that the cells transfected with these did not survive the selection procedure. In other cases, the period of selection was prolonged and the cell

growth was impaired. Anyway, all selected pools surviving the selection with a mutant NPT showed, in comparison to wildtype NPT selected pools, increased specific productivity and higher titers of the product as well as a higher *npt*-RNA-level. Furthermore, the portion of high producing cells in relation to the total amount of cells was larger in pools selected with mutant NPT than in pools selected with wildtype NPT. In some cases, a higher gene copy number was responsible for the elevated productivity, in other cases, it was the integration in active chromatin sites or a combination of both effects. Thus, the use of mutated NPT-variants as selection marker in CHO-DG44 cells is suitable for the accumulation of high producers, since such an impairment of the resistance marker can be compensated by a higher expression, while cells with moderate expression cannot compensate the impairment. As a consequence, these cells do not survive the selection.

Another possibility to raise the expression rate of a stably integrated product gene is the use of cis- and trans-acting genetic elements. There are enhancers and promoters, but also elements, which exclusively act on the level of chromatin, e. g. locus control regions (LCRs), scaffold/matrix attachment regions (S/MARs), insulators, ubiquitous chromatin opening elements (UCOEs) and expression augmenting sequence elements (EASE). They can protect the transgenic DNA from transcription inhibiting position effects in the genome, for example by decondensing the chromatin structure. In this thesis, a sequence from the CHO genome was investigated with regard to a possible expression augmenting effect (transcription enhancing TE-element).

It has been demonstrated, that this TE-element doubled the expression of a recombinant antibody in stably transfected CHO-DG44 cell pools. The higher productivity is not a result of a higher gene copy number in the affected pools. What kind of transcription augmenting element class the TE-element belongs to remains to be clarified.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aronow,B.J., Ebert,C.A., Valerius,M.T., Potter,S.S., Wiginton,D.A., Witte,D.P., Hutton,J.J., 1995. Dissecting a locus control region: facilitation of enhancer function by extended enhancer-flanking sequences. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1123-1135.
- Ausubel,F.M., Brent,R., Kingston,R.E., Moore,D.D., Seidman,J.G., Smith,J.A., Struhl,K., 1994 updated. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc..
- Baker,J.E., Kang,J., Xiong,N., Chen,T., Cado,D., Raulet,D.H., 1999. A novel element upstream of the Vgamma2 gene in the murine T cell receptor gamma locus cooperates with the 3' enhancer to act as a locus control region. *Journal of Experimental Medicine*. 190, 669-679.
- Beck,E., Ludwig,G., Auerswald,E.A., Reiss,B., Schaller,H., 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*. 19, 327-336.
- Bell,A.C., Felsenfeld,G., 1999. Stopped at the border: boundaries and insulators. *Current Opinion in Genetics & Development* 9, 191-198.
- Blazquez,J., Davies,J., Moreno,F., 1991. Mutations in the aphA-2 gene of transposon Tn5 mapping within the regions highly conserved in aminoglycoside-phosphotransferases strongly reduce aminoglycoside resistance. *Molecular Microbiology*. 5, 1511-1518.
- Bode,J., Stengert-Iber,M., Kay,V., Schlake,T., and Dietz-Pfeilstetter,A. (1996). Scaffold/matrix-attached regions: topological switches with multiple regulatory functions. [Review] [135 refs]. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 6, 115-138.
- Cabanes-Bastos,E., Day,A.G., Lichtenstein,C.P., 1989. A sensitive and simple assay for neomycin phosphotransferase II activity in transgenic tissue. *Gene*. 77, 169-176.
- Chadd,H.E., Chamow,S.M., 2001. Therapeutic antibody expression technology. *Current Opinion in Biotechnology*. 12, 188-194.
- Chen,C., Chasin,L.A., 1998. Cointegration of DNA molecules introduced into mammalian cells by electroporation.[erratum appears in *Somat Cell Mol Genet* 1998 Sep;24(5):313]. *Somatic Cell & Molecular Genetics*. 24, 249-256.
- Cooke,H. (2001). Mammalian artificial chromosomes as vectors: progress and prospects. [Review] [41 refs]. *Cloning & Stem Cells*. 3, 243-249.
- Coquelle,A., Pipiras,E., Toledo,F., Buttin,G., Debatisse,M., 1997. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell*. 89, 215-225.
- Ellington,A.D., Szostak,J.W., 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 346, 818-822.
- Famulok,M., 1999. Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. [Review] [75 refs]. *Current Opinion in Structural Biology*. 9, 324-329.
- Fukushige,S. and Sauer,B. (1992). Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89, 7905-7909.
- Fukushige,S. and Sauer,B. (1992). Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89, 7905-7909.

- Gold,L., 1995. Oligonucleotides as Research, Diagnostic, and Therapeutic Agents. *J. Biol. Chem.* 270, 13581.
- Gossen,M. and Bujard,H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 89, 5547-5551.
- Gossen,M., Freundlieb,S., Bender,G., Muller,G., Hillen,W., and Bujard,H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science.* 268, 1766-1769.
- Grillari,J., Fortschegger,K., Grabherr,R.M., Hohenwarter,O., Kunert,R., and Katinger,H. (2001). Analysis of alterations in gene expression after amplification of recombinant genes in CHO cells. *Journal of Biotechnology.* 87, 59-65.
- Hauser,H., Wagner,R., 1997. *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production.* Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Hennecke,M., Kwissa,M., Metzger,K., Oumard,A., Kroger,A., Schirmbeck,R., Reimann,J., Hauser,H., 2001. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Research.* 29, 3327-3334.
- Hennig,W., 1995. *Genetik.* Springer.
- Hermann,T., Patel,D.J., 2000. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. [Review] [73 refs]. *Science.* 287, 820-825.
- Hershey,J.W., 1991. Translational control in mammalian cells. [Review] [245 refs]. *Annual Review of Biochemistry.* 60, 717-755.
- Jellinek,D., Lynott,C.K., Rifkin,D.B., Janjic,N., 1993. High-affinity RNA ligands to basic fibroblast growth factor inhibit receptor binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 90, 11227-11231.
- Jenuwein,T., Forrester,W.C., Fernandez-Herrero,L.A., Laible,G., Dull,M., Grosschedl,R., 1997. Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature.* 385, 269-272.
- Jordan,M., Schallhorn,A., and Wurm,F.M. (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Research.* 24, 596-601.
- Kaufman,R.J., Bertino,J.R., Schimke,R.T., 1978. Quantitation of dihydrofolate reductase in individual parental and methotrexate-resistant murine cells. Use of a fluorescence activated cell sorter. *Journal of Biological Chemistry.* 253, 5852-5860.
- Kim,Y.J., Sah,R.L., Doong,J.Y., Grodzinsky,A.J., 1988. Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258. *Analytical Biochemistry.* 174, 168-176.
- Klehr,D., Maass,K., Bode,J., 1991. Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry.* 30, 1264-1270.
- Kocabiyik,S., Perlin,M.H., 1992a. Altered substrate specificity by substitutions at Tyr218 in bacterial aminoglycoside 3'-phosphotransferase-II. *FEMS Microbiology Letters.* 72, 199-202.
- Kocabiyik,S., Perlin,M.H., 1992b. Site-specific mutations of conserved C-terminal residues in aminoglycoside 3'-phosphotransferase II: phenotypic and structural analysis of mutant enzymes. *Biochemical & Biophysical Research Communications.* 185, 925-931.
- Koloteva,N., Muller,P.P., McCarthy,J.E., 1997. The position dependence of translational regulation via RNA-RNA and RNA-protein interactions in the 5'-untranslated region of eukaryotic mRNA is a

- function of the thermodynamic competence of 40 S ribosomes in translational initiation. *Journal of Biological Chemistry*. 272, 16531-16539.
- Kozak, M., 1989. Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Molecular & Cellular Biology*. 9, 5073-5080.
- Labarca, C., Paigen, K., 1980. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Analytical Biochemistry*. 102, 344-352.
- Lewin, B., 1998. *Molekularbiologie der Gene*, 6 edition. Spektrum Akademischer Verlag.
- Li, Q., Peterson, K.R., Fang, X., Stamatoyannopoulos, G., 2002. Locus control regions. *Blood* 100, 3077-3086.
- Li, W.X., Kaplan, A.V., Grant, G.W., Toole, J.J., Leung, L.L., 1994. A novel nucleotide-based thrombin inhibitor inhibits clot-bound thrombin and reduces arterial platelet thrombus formation. *Blood*. 83, 677-682.
- Lydon, M.J., Keeler, K.D., Thomas, D.B., 1980. Vital DNA staining and cell sorting by flow microfluorometry. *Journal of Cellular Physiology*. 102, 175-181.
- Martin, P., Jullien, E., Courvalin, P., 1988. Nucleotide sequence of *Acinetobacter baumannii* aphA-6 gene: evolutionary and functional implications of sequence homologies with nucleotide-binding proteins, kinases and other aminoglycoside-modifying enzymes. *Molecular Microbiology*. 2, 615-625.
- Martinez-Salas, E., 1999. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. [Review] [66 refs]. *Current Opinion in Biotechnology*. 10, 458-464.
- McKnight, R.A., Shamay, A., Sankaran, L., Wall, R.J., Hennighausen, L., 1992. Matrix-Attachment Regions Can Impart Position-Independent Regulation of a Tissue-Specific Gene in Transgenic Mice. *PNAS* 89, 6943-6947.
- Meents, H., Enenkel, B., Eppenberger, H.M., Werner, R.G., and Fussenegger, M. (2002). Impact of coexpression and coamplification of siCAM and antiapoptosis determinants bcl-2/bcl-x(L) on productivity, cell survival, and mitochondria number in CHO-DG44 grown in suspension and serum-free media. *Biotechnology & Bioengineering*. 80, 706-716.
- Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y., Tulkens, P.M., 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. [Review] [117 refs]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 43, 727-737.
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*. 108, 193-199.
- Ortiz, B.D., Cado, D., Winoto, A., 1999. A new element within the T-cell receptor alpha locus required for tissue-specific locus control region activity. *Molecular & Cellular Biology*. 19, 1901-1909.
- Ortiz, B.D., Cado, D., Chen, V., Diaz, P.W., Winoto, A., 1997. Adjacent DNA elements dominantly restrict the ubiquitous activity of a novel chromatin-opening region to specific tissues. *EMBO J*. 16, 5037-5045.
- Osborne, S.E., Ellington, A.D., 1997. Nucleic Acid Selection and the Challenge of Combinatorial Chemistry. *Chemical Reviews* 97, 349-370.
- Pan, W., Craven, R.C., Qiu, Q., Wilson, C.B., Wills, J.W., Golovine, S., Wang, J.F., 1995. Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 11509-11513.
- Pikaart, M.J., Recillas-Targa, F., Felsenfeld, G., 1998. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev*. 12, 2852-2862.

- Poljak,L., Seum,C., Mattioni,T., Laemml,U.K., 1994. SARs stimulate but do not confer position independent gene expression. *Nucl. Acids. Res.* 22, 4386-4394.
- Sambrook,J., Fritsch,d.F., Maniatis,T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schubeler,D., Maass,K., and Bode,J. (1998). Retargeting of retroviral integration sites for the predictable expression of transgenes and the analysis of cis-acting sequences. *Biochemistry.* 37, 11907-11914.
- Schubeler,D., Mielke,C., Maass,K., and Bode,J. (1996). Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context-dependent manner. *Biochemistry.* 35, 11160-11169.
- Seibler,J., Schubeler,D., Fiering,S., Groudine,M., and Bode,J. (1998). DNA cassette exchange in ES cells mediated by Flp recombinase: an efficient strategy for repeated modification of tagged loci by marker-free constructs. *Biochemistry.* 37, 6229-6234.
- Shaw,K.J., Rather,P.N., Hare,R.S., Miller,G.H., 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. [Review] [112 refs]. *Microbiological Reviews.* 57, 138-163.
- Stief,A., Winter,D.M., Stratling,W.H., Sippel,A.E., 1989. A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature.* 341, 343-345.
- Suess,B., Hanson,S., Berens,C., Fink,B., Schroeder,R., Hillen,W., 2003. Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucleic Acids Research.* 31, 1853-1858.
- Tuerk,C., Gold,L., 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 249, 505-510.
- Udvardy,A., Maine,E., Schedl,P., 1985. The 87A7 chromomere. Identification of novel chromatin structures flanking the heat shock locus that may define the boundaries of higher order domains. *Journal of Molecular Biology.* 185, 341-358.
- Udvardy,A., 1999. Dividing the empire: boundary chromatin elements delimit the territory of enhancers. *EMBO J.* 18, 1-8.
- Uphoff,K.W., Bell,S.D., Ellington,A.D., 1996. In vitro selection of aptamers: the dearth of pure reason. [Review] [51 refs]. *Current Opinion in Structural Biology.* 6, 281-288.
- Urlaub,G., Mitchell,P.J., Kas,E., Chasin,L.A., Funanage,V.L., Myoda,T.T., Hamlin,J., 1986. Effect of gamma rays at the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions. *Somatic Cell & Molecular Genetics.* 12, 555-566.
- US 6,027,915
- US 6,309,851
- Werstuck,G., Green,M.R., 1998. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science.* 282, 296-298.
- WO 02/081677
- Yamamoto,R., Katahira,M., Nishikawa,S., Baba,T., Taira,K., Kumar,P.K., 2000. A novel RNA motif that binds efficiently and specifically to the Ttat protein of HIV and inhibits the trans-activation by Tat of transcription in vitro and in vivo. *Genes to Cells.* 5, 371-388.
- Yenofsky,R.L., Fine,M., Pellow,J.W., 1990. A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 87, 3435-3439.

- Yoshikawa,T., Nakanishi,F., Ogura,Y., Oi,D., Omasa,T., Katakura,Y., Kishimoto,M., Suga,K.I., 2001. Flow cytometry: an improved method for the selection of highly productive gene-amplified CHO cells using flow cytometry. *Biotechnology & Bioengineering*. 74, 435-442.
- Zahn-Zabal,M., Kobr,M., Girod,P.A., Imhof,M., Chatellard,P., De Jesus,M., Wurm,F., Mermod,N., 2001. Development of stable cell lines for production or regulated expression using matrix attachment regions. *Journal of Biotechnology*. 87, 29-42.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
5'-UTR	5'-Untranslated Region
A	Adenin oder Adsorption
Abb.	Abbildung
ADA	Adenosindeaminase
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APH	Aminoglykosid-Phosphotransferase
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BGH	Bovin Growth Hormon
BHK	Baby Hamster Kidney
BI	Boehringer Ingelheim
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Konzentration
ca.	Circa
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d. h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dUTP	Deoxyuraciltriphosphat
E. coli	Escherichia coli
e. g.	for example
EASE	Expression Augmenting Sequence Element
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EtBr	Ethidiumbromid
f. c.	Endkonzentration
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
g	Gramm
G	Guanin
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
HC	Heavy Chain
HCl	Salzsäure
HIV	Human Immunodeficient Virus

HMG	High Mobility Group
HS	DNAse I-hypersensitive Stelle
hsp70	Heat Shock Protein 70
HT	Hypoxanthin/Thymidin
i. A.	im Allgemeinen
i. d. R.	in der Regel
i. e.	that is
IgG	Immunglobulin G
IRES	Internal Ribosome Entry Site
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
Km-SO <sub>4</sub>	Kanamycinsulfat
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
LC	Light Chain
LCR	Locus Control Region
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Na <sub>3</sub> Citrat	Trinatriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NPT	Neomycin-Phosphotransferase
o. g.	oben genannt
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pers. Komm.	persönliche Kommunikation
pg	Pikogramm
pg/c*d	Pikogramm pro Zelle und Tag
pH	pH-Wert
pmol	Pikomol
PNK	Polynukleotid Kinase
polyA	Poly-Adenylierungssignal
RbCl	Rubidiumchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur <i>oder</i> Reverse Transkription
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
scs	Specialized Chromatin Structure

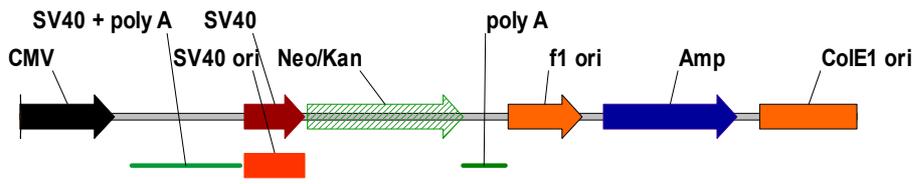
---

SDS	Natriumdedecylsulfat
sec	Sekunden
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
spez./spezif. Prod.	spezifische Produktivität
ss	einzelsträngig
SV40	Semian Virus 40
T	Thymin
TAR	Trans-Activation Response Region
TCR	T-Cell Receptor
TE	Transcription Enhancing
U	Uracil
UCOE	Ubiquitous Chromatin Opening Element
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
w/v	Weight/Volume
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

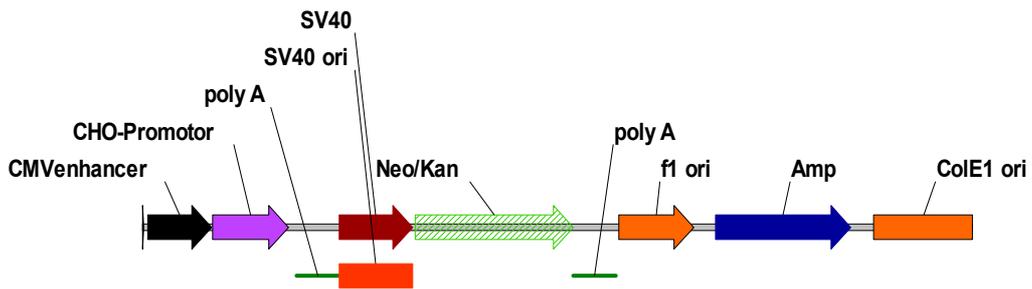
## 9. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tab. 1	NPT II-Mutanten
Tab. 2	Transfektionsserien und Vektoren mit mAk-2 als Testprodukt
Tab. 3	Verteilung der Pools nach Antikörpertiter und spezifischer Produktivität
Tab. 4	Relative Steigerung von mAk-2-Titer und spezifischer Produktivität in der Serie ST neo11
Tab. 5	NPT-Enzymaktivität verschiedener Mutanten
Tab. 6	Durchschnittliche Kopienzahlen des <i>npt</i> -Gens in ausgewählten Pools
Tab. 7	Übersicht der Expressionsvektoren mit und ohne CHO-TE-Element
Tab. 8	Zusammenstellung der Daten der Transfektionsserien
Tab. 9	LC1- und HC1- Kopienzahlen in ausgewählten TE-Pools
Tab. 10	Vergleich der Mutanten bezüglich Enzymaktivität und Konservierungsgrad der ausgetauschten Aminosäuren
Abb. 1	Produktionsstufen transfizierter Zellen
Abb. 2	Sekundärstrukturen verschiedener Aptamere
Abb. 3	Strukturformel verschiedener Aminoglykoside
Abb. 4	Prinzip der Translationshemmung
Abb. 5	Aptamer-Vektoren der ersten Generation
Abb. 6	Hoechst-Farbstoffe H33342 und H33258
Abb. 7	Transiente Transfektion mit erster Vektorgeneration
Abb. 8	Aptamer-Vektoren der zweiten Generation
Abb. 9	Transiente Transfektion mit zweiter Vektorgeneration
Abb. 10	Transiente Transfektion mit zweiter Vektorgeneration und H33258
Abb. 11	BstXI-Spacer zwischen H10 und H19
Abb. 12	Aptamer-Vektoren der dritten Generation
Abb. 13	Transiente Transfektion mit dritter Vektorgeneration
Abb. 14	Aptamer-Vektor der vierten Generation
Abb. 15	Transiente Transfektion mit der vierten Vektorgeneration
Abb. 16	Sequenzausschnitt aus dem Neomycin-Phosphotransferase II ( <i>npt2</i> )-Gen
Abb. 17	Stabile Transfektion ST neo2
Abb. 18	Nachweis der <i>npt</i> -RNA
Abb. 19	Korrelation von Produkt- und GFP-Expression
Abb. 20	NPT-abhängige GFP-Expression in der Transfektionsserie ST neo9
Abb. 21	Antikörperproduktion von M1-, M4- und WT-NPT-selektionierten Zellpools
Abb. 22	NPT-abhängige GFP-Expression in der Transfektionsserie ST neo11
Abb. 23	NPT-abhängige Antikörperproduktion von Zellpools der Serie ST neo11
Abb. 24	Antikörperproduktion in Abhängigkeit von der G418-Konzentration
Abb. 25	NPT-Enzym-Aktivitätsassay
Abb. 26	Bestimmung der <i>npt</i> -Genkopienzahl
Abb. 27	Vergleich von spezifischer Produktivität (mAk-2) und <i>npt</i> -Genkopienzahl
Abb. 28	Nachweis der <i>npt</i> -Transkriptionsrate
Abb. 29	Klonierung der Expressionsvektoren mit einem CHO-TE-Element
Abb. 30	TE-Element-abhängige GFP-Expression
Abb. 31	Antikörperproduktion von Zellpools mit und ohne TE-Element
Abb. 32	Proteinsequenz der Neomycin-Phosphotransferase

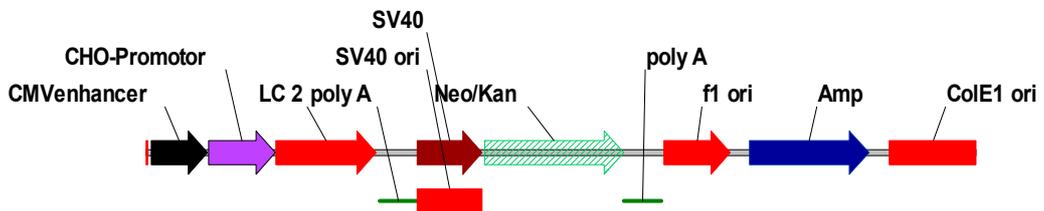
10. Anhang



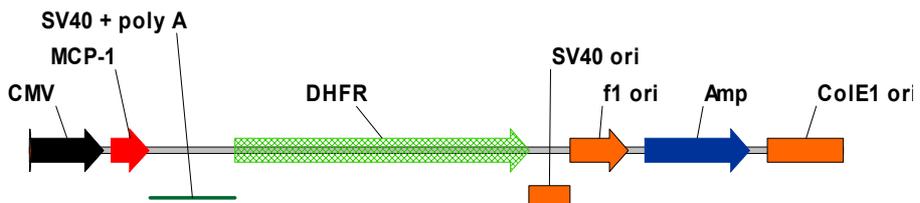
**pNeo-CMV2**  
5389 bp



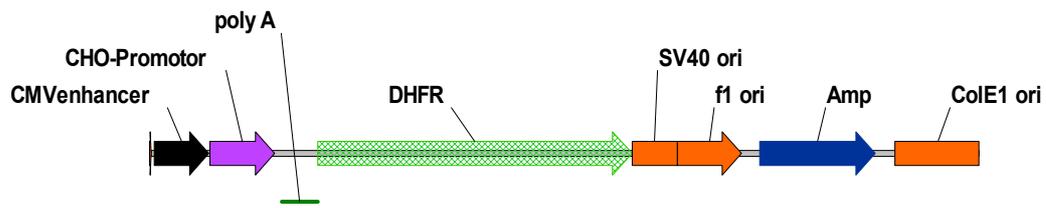
**pNeo2-CENub2B**  
5271 bp



**pNeo2-CENub2B/LC 2**  
5972 bp

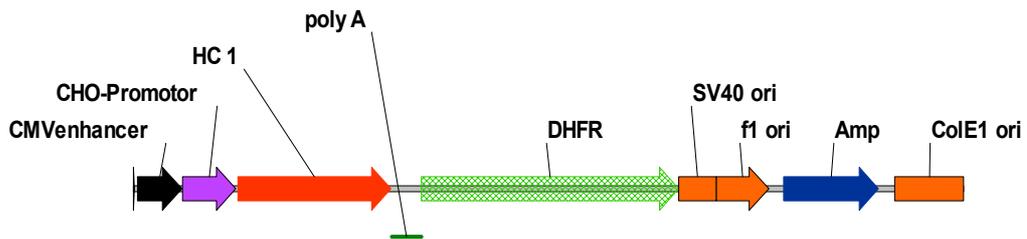


**pAD-CMV1/MCP-1**  
6687 bp



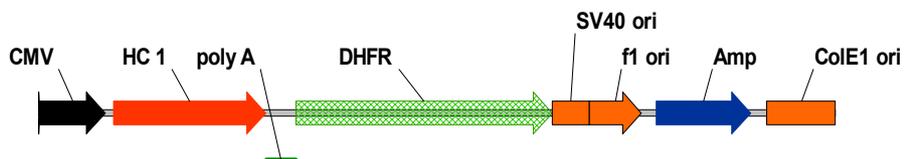
**pAD-CENUb2B**

6175 bp



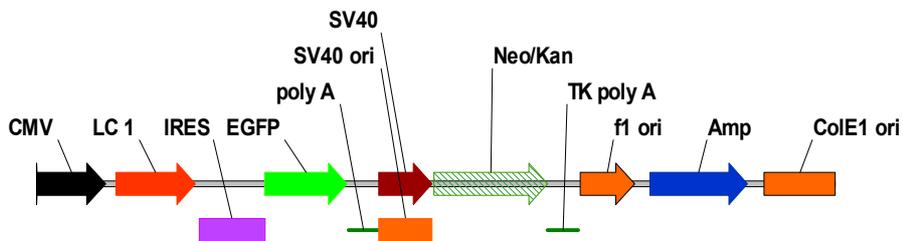
**pAD-CENUb2B/HC 1**

7541 bp



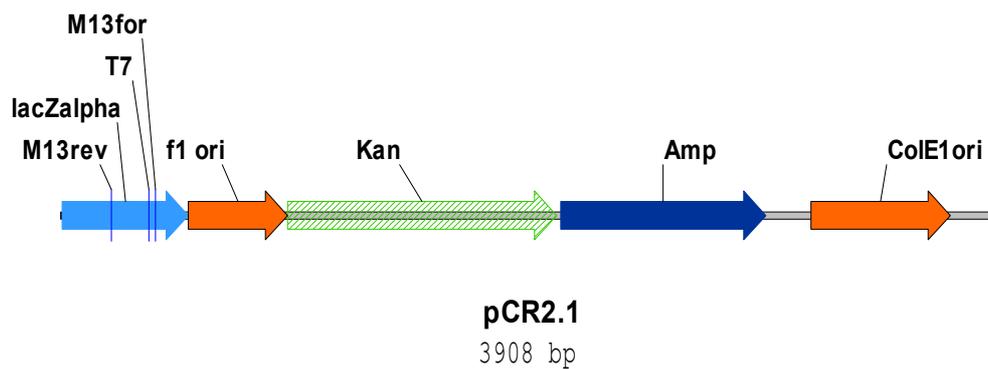
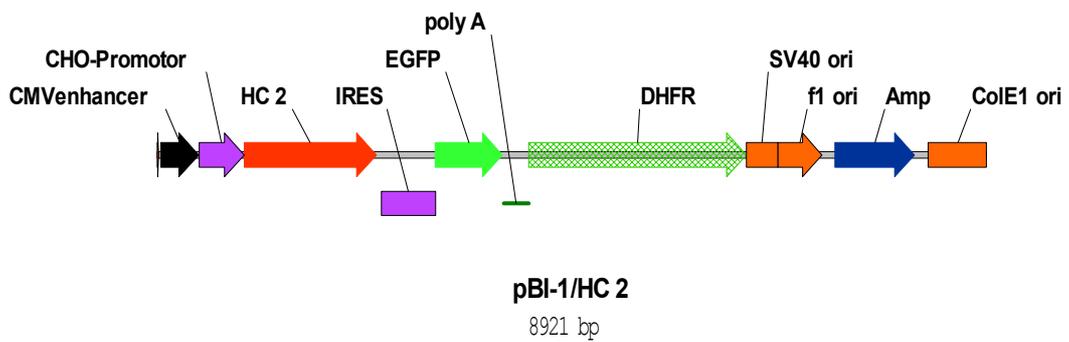
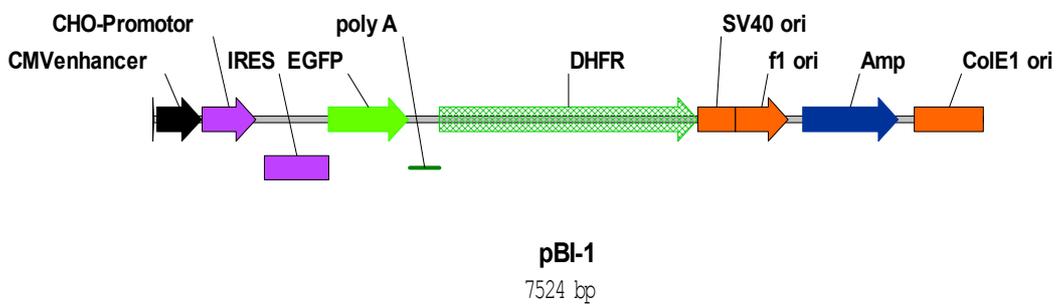
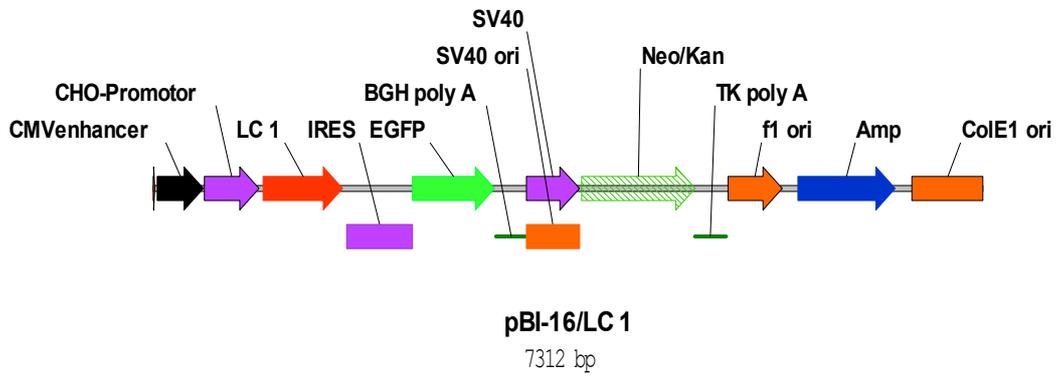
**pBI-13/HC 1**

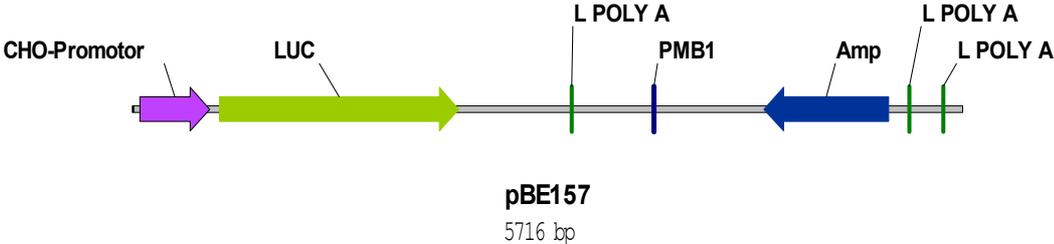
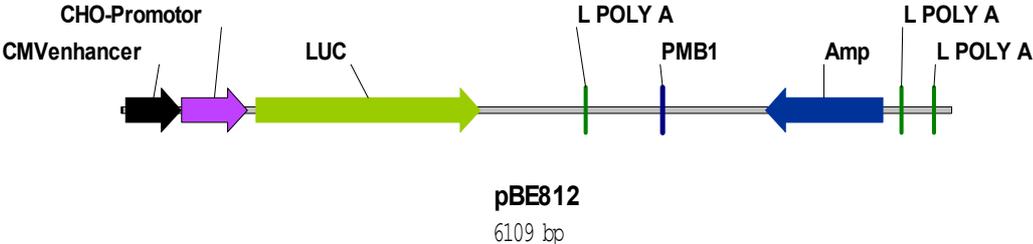
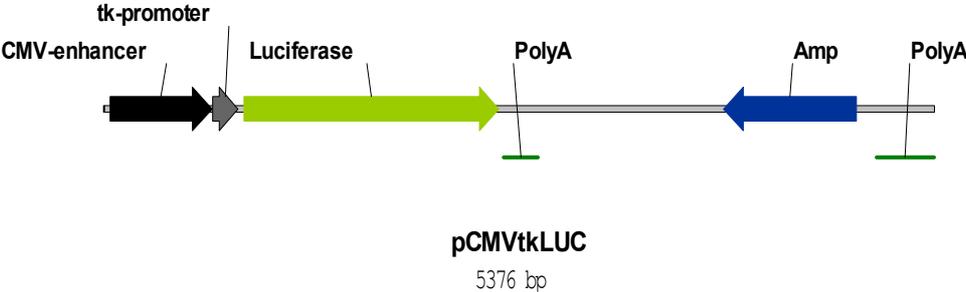
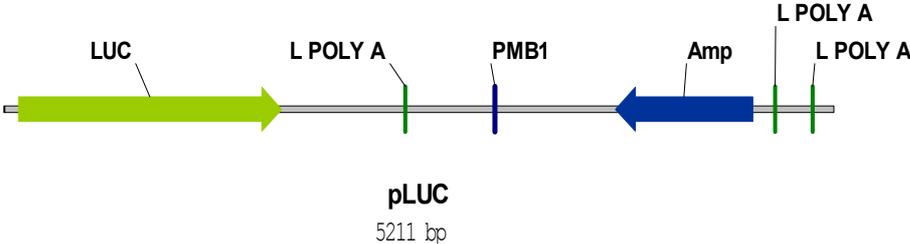
7274 bp

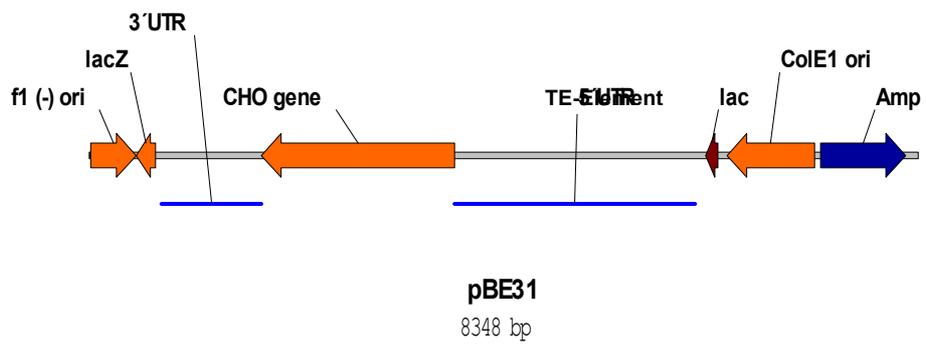
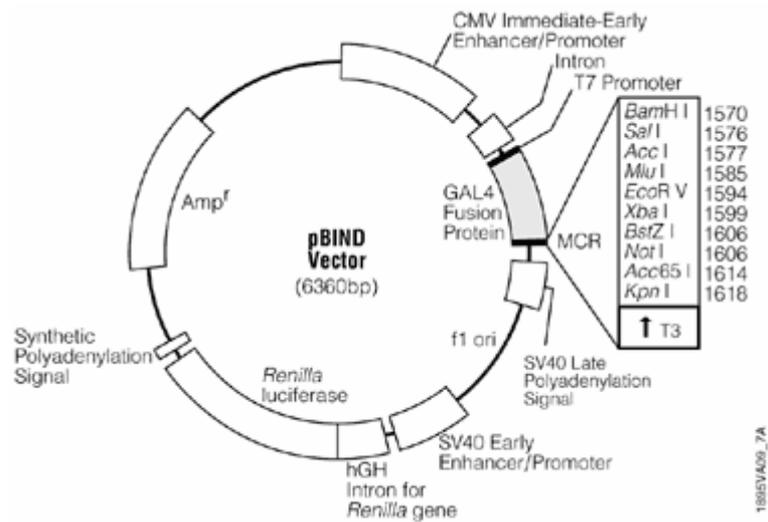


**pBI-15/LC 1**

7045 bp







## Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Gruppe Verfahrensentwicklung des Geschäftsbereichs Biopharmazeutika der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG durchgeführt.

Für die Übernahme des Erstgutachtens und Betreuung seitens der Universität Würzburg möchte ich Herrn Prof. Dr. Erich Buchner, Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie, herzlich danken. Das Zweitgutachten seitens der Firma Boehringer Ingelheim übernahm Herr Prof. Dr. Rolf G. Werner. Auch bei ihm bedanke ich mich herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Barbara Enenkel, Leiterin des Labors Expressionssysteme und Genomcharakterisierung, für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Desweiteren vielen Dank an meine lieben Kolleginnen und Kollegen aus dem P108 für die Überlassung eines großzügigen Arbeitsplatzes, die freundschaftliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft, die meine Arbeit unterstützt haben. Besonders danken möchte ich an dieser Stelle Ursula Bauknecht, die meine Dissertation sehr gewissenhaft korrigiert hat. Außerdem wurde ich tatkräftig unterstützt von Gabi Krattenmacher, Jürgen Rapp und Gaby Veit.

Ich danke ausdrücklich Herrn Jürgen Fieder und Herrn Thomas Krieg aus dem Labor Zellbiologie für die Bereitstellung des FACS-Geräts und die Unterstützung bei den FACS-Messungen und Herrn Dr. Joachim Theinhardt aus der Biometrie für die statistische Auswertung.

Schließlich möchte ich mich besonders bei meinen Eltern und meinen Freunden für den privaten Rückhalt bedanken.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Name: Kerstin Sautter  
Geboren: am 22. Juli 1975 in Ulm/Donau  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

---

1982-1995 Grundschole und Gymnasium in Ulm-Wiblingen  
1995 Abitur

## Hochschulausbildung

---

1995-1997 Biologiestudium an der Universität Ulm, Vordiplom  
1997-1999 Biologiestudium an der Universität Würzburg  
1999-2000 Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität Würzburg („Analyse von temperatursensitiven *csp*- und *icicle*-Mutanten bei *Drosophila melanogaster*“)  
2000-2003 Promotion bei Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG im Bereich Biopharmazeutika, Verfahrensentwicklung („Gentechnische Verfahren zur Erzeugung und Selektion von hochproduzierenden CHO-Zellen“)

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst und für ihre Fertigstellung keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Biberach/Riss, August 2003