

# **Plasmid basierte DNA-Vektor-Systeme; Aktivierung der angeborenen Immunität durch Modulationen im Vektor-Rückgrat und Einsatz in der Gentherapie**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR.RER.NAT.) DER  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III -BIOLOGIE UND  
VORKLINISCHE MEDIZIN- DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von  
**Denijal Kosovac**

Februar 2008

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen Juli 2004 und Februar 2008 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 20. Februar 2008

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Ralf Wagner

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. G. Hauska

Prüfungsausschuß: Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer

Prof. Dr. R. Wagner

Prof. Dr. R. Warth

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig, ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

.....

Denijal Kosovac

**U sjećanje na Taška /  
In Gedenken an meinen Vater**

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>1</b>
<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 DNA-basierte Immunisierung und (Gen)Therapie.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 pDNA Vektor-Systeme.....</b>	<b>7</b>
1.2.1 pDNA für die genetische Immunisierung.....	9
1.2.2 pDNA in der Gentherapie.....	10
1.2.3 Limitierungen pDNA-basierter Vektoren und diesbezügliche Optimierungsstrategien.....	11
<b>1.3 CpG-Dinukleotide.....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Bedeutung der CpG-Dinukleotide.....	13
1.3.2 Einfluss von CpG-Dinukleotiden auf die Genexpression.....	14
1.3.3 CpG-Motive – Aktivatoren des Immunsystems.....	15
1.3.4 Zelluläre Immunologie der CpG-DNA.....	16
1.3.5 Mechanismen der Aktivierung des Immunsystems durch CpG-DNA.....	18
1.3.6 Therapeutische Anwendung von CpG-DNA.....	19
<b>1.4 Angeborenes Immunsystem.....</b>	<b>20</b>
1.4.1 Toll-like Rezeptoren (TLR).....	21
1.4.2 Dendritische Zellen (DC).....	23
1.4.3 Interferone.....	24
1.4.4 Th1 und Th2 Cytokinprofil.....	26
<b>1.5 Erythropoietin als Modell-Transgen für pDNA-basierte Gentherapie.....</b>	<b>27</b>
1.5.1 Eigenschaften und biologische Funktion.....	27
1.5.2 Therapeutische Anwendung von EPO.....	28
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>29</b>
<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Gentechnische Arbeitsmethoden.....</b>	<b>31</b>
2.1.1 Bakterienstämme und Nährmedien.....	31
2.1.2 Reagenzien.....	32

# Inhaltsverzeichnis

2.1.3	Plasmidvektoren .....	33
2.1.4	Oligonukleotide .....	33
2.1.5	Synthetische Erythropoietin (EPO)- Gene .....	33
2.1.6	Restriktionsenzyme .....	34
2.1.7	Präparation von mEPO-Expressionsvektoren .....	34
2.1.8	Standardisierte DNA-Klonierungstechniken .....	34
2.1.9	Spezialisierte DNA-Klonierungstechniken .....	35
2.1.10	<i>QuickChange</i> Mutagenese .....	35
2.1.11	Primer <i>Annealing</i> .....	36
<b>2.2</b>	<b>Biochemische und Zellkultur-Methoden .....</b>	<b>36</b>
2.2.1	Allgemeine Zellkulturtechniken .....	36
2.2.2	Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen .....	37
2.2.3	MVA-T7 Infektion von permissiven Zellen .....	37
2.2.4	Analyse der transienten Proteinexpression .....	38
2.2.4.1	Ernte und Aufschluss der Zellen .....	38
2.2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot .....	38
2.2.4.3	Quantifizierung der mEPO Expression durch ELISA .....	39
<b>2.3</b>	<b>RNA-Methoden .....</b>	<b>39</b>
2.3.1	Allgemeine Arbeitstechniken .....	39
2.3.2	Aufreinigung der RNA .....	40
2.3.3	RNA-Aufreinigung mit RNAeasy-Protokoll .....	40
2.3.4	RNA-Aufreinigung mit Tri-Reagent .....	40
2.3.5	Northern Blot .....	41
2.3.6	<i>In vitro</i> Transkription zur Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden .....	42
2.3.7	Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR) und RNA-Quantifizierung mit <i>Realtime</i> -PCR .....	43
2.3.8	Nuclear Run-On Assay .....	44
<b>2.4</b>	<b>Tierexperimentelle Arbeitstechniken .....</b>	<b>44</b>
2.4.1	Versuchstiere und Haltung .....	44
2.4.2	Präparation Endotoxin-freier Plasmid-DNA .....	45
2.4.3	<i>In vivo</i> Elektrogentransfer .....	45
2.4.4	Serumgewinnung .....	45
<b>2.5</b>	<b>Hämatologische Methoden .....</b>	<b>46</b>
2.5.1	Bestimmung des Hämatokritwertes .....	46
2.5.2	Bestimmung des Hämoglobin-Wertes .....	46
<b>2.6</b>	<b>Immunologische Methoden .....</b>	<b>46</b>
2.6.1	Präparation von Milzen und Isolierung muriner Splenozyten .....	46
2.6.2	Aufreinigung humaner PMBCs .....	47
2.6.3	Isolierung und Kultivierung humaner plasmazytoider Dendriten (pDCs) .....	48

## Inhaltsverzeichnis

2.6.4	<i>In vitro</i> Re-Stimulierung isolierter Zellpopulationen .....	48
2.6.5	Quantifizierung von sezernierten Cytokine im ELISA.....	49
2.6.6	Erstellung eines Cytokin-Profiles mittels Luminex-Assay.....	49
2.6.7	ELISPOT-Assay; Quantifizierung IFN $\gamma$ -sezernierender Zellen.....	50
2.6.8	Depletion distinkter Zellpopulationen aus murinen-Splenozyten.....	51
2.6.9	Reinheitsbestimmung und Zellquantifizierung durch FACS-Analyse .....	52
<b>ERGEBNISSE .....</b>		<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Ausgangsüberlegungen.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2</b>	<b>Beitrag von CpG-Motiven im Rückgrat von Plasmidvektoren hinsichtlich der Aktivierung der angeborenen Immunantwort.....</b>	<b>55</b>
3.2.1	Herstellung einer CpG-reduzierten Vektor-Plattform.....	55
3.2.2	Untersuchung der immunogenen Eigenschaften von CpG-modulierten pDNAs im murinen System .....	57
3.2.2.1	Einfluss der CpG-Modifikationen auf die Induktion proinflammatorischer Cytokine .....	58
3.2.2.2	Quantifizierung IFN $\gamma$ -produzierender Zellen.....	59
3.2.2.3	Erstellung eines Cytokin-Profiles.....	61
3.2.3	Einfluss weiterer Sequenz-Veränderungen im Vektor-Rückgrat sowie der 110 bp-Region im <i>pUCori</i> auf die Immunogenität .....	63
3.2.3.1	Herstellung der p $\Delta$ S $\Delta$ C (p $\Delta$ S)-und p $\Delta$ S110 <sup>+</sup> (p $\Delta$ S110 <sup>-</sup> )-Mutanten .....	63
3.2.3.2	Erstellung des Cytokin-Profiles nach Stimulierung mit p $\Delta$ S- und p $\Delta$ S110 <sup>-</sup> Varianten.....	64
3.2.3.3	Generierung von 110 bp-Mutanten.....	66
3.2.3.4	Einfluss der Lokalisierung, Orientierung und des CpG-Gehaltes der 110 bp auf seine immunstimulatorischen Eigenschaften .....	67
3.2.3.5	Zusammenfassung 1 .....	69
3.2.4	Einfluss von TLR9 auf die Aktivierung der angeborenen Immunität nach Stimulierung mit pDNA .....	70
3.2.4.1	Beteiligung von TLR9 an der Induktion von Th1-Cytokinen .....	71
3.2.5	Beteiligung einzelner Zellpopulationen des Immunsystems an der IFN $\gamma$ -Sekretion .....	72
3.2.5.1	Rolle der TLR9-exprimierenden Zellen bei der IFN $\gamma$ -Sekretion nach Stimulierung mit pDNA .....	73
3.2.5.2	Einfluss von T-Zellen und NK-Zellen auf die pDNA-abhängige IFN $\gamma$ -Produktion .....	74
3.2.6	Untersuchungen der immunogenen Eigenschaften CpG-modulierter pDNA-Vektoren im humanen System .....	76
3.2.6.1	Induktion der Interferon $\alpha$ (IFN $\alpha$ )-Sekretion nach Stimulierung humaner PBMC mit pDNA .....	76
3.2.6.2	Induktion der Cytokin-Sekretion nach Stimulierung humaner pDCs mit pDNA .....	77
3.2.7	Zusammenfassung 2 .....	79

<b>3.3</b>	<b>Einfluss von CpG-Dinukleotiden innerhalb der kodierenden Region auf die <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Expression des murinen Erythropoietin-Gens (mEPO)</b>	<b>80</b>
3.3.1	Design und Optimierung der mEPO-Gene	80
3.3.2	Herstellung der mEPO-Expressionsvektoren	82
3.3.3	Einfluss von Genmodifizierungen auf die transiente <i>in vitro</i> Expression von mEPO	83
3.3.3.1	Transiente <i>in vitro</i> mEPO Expression durch einen CpG-reduzierten Vektor	85
3.3.4	Untersuchungen der molekularen Hintergründe der Expression modifizierter mEPO-Gene	87
3.3.4.1	Einfluss von Genmodifizierungen auf die Translationseffizienz	87
3.3.4.2	Qualitativer Nachweis mEPO-spezifischer mRNA	88
3.3.4.3	Relative Quantifizierung der mEPO-RNA Expression durch <i>realtime</i> PCR	90
3.3.4.4	Bestimmung der relativen Transkriptionsrate der mEPO-spezifischen RNAs	91
3.3.5	Untersuchungen der <i>in vivo</i> Expression modifizierter mEPO-Gene	92
3.3.5.1	Einfluss von Genmodifizierungen auf die <i>in vivo</i> Expression von mEPO	93
3.3.5.2	Einfluss von Genmodifizierungen auf den Langzeit Hämatokrit-Wert	94
3.3.5.3	Einfluss von mEPO Genmodifizierungen auf den Hämoglobin-Wert	96
3.3.6	Zusammenfassung 3	97
<b>DISKUSSION</b>		<b>98</b>
<b>4.1</b>	<b>Beitrag von CpG-Motiven im Rückgrat von Plasmidvektoren hinsichtlich der Aktivierung der angeborenen Immunantwort</b>	<b>98</b>
4.1.1	Konstruktion einer CpG-reduzierten Vektorplattform	98
4.1.2	Veränderungen der CpG-Balance im Vektorrückgrat resultieren in der Generierung eines immunstimulatorischen pDNA-Vektors	99
4.1.3	Die 110-bp Sequenz im <i>pUCori</i> beeinflusst entscheidend die immunogenen Eigenschaften des $\Delta$ S Vektors	101
4.1.4	TLR9-abhängige Aktivierung der angeborenen Immunität durch pDNA	103
4.1.5	CpG-abhängige Induktion der IFN $\gamma$ -Sekretion in B-Lymphozyten	105
4.1.6	Induktion der Typ I Interferon (IFN $\alpha$ )-Sekretion nach Stimulierung humaner Immunzellen mit pDNA	107
4.1.7	Ausblick 1- pDNA für die genetische Immunisierung	108
<b>4.2</b>	<b>Einfluss von intragenischen CpG-Dinukleotiden auf die <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Expression des murinen Erythropoietin-Gens (mEPO)</b>	<b>110</b>
4.2.1	CpG-modifizierte und Kodonwahl-optimierte mEPO-Gene	110
4.2.2	Der intragenische CpG-Gehalt von mEPO korreliert mit der transienten <i>in vitro</i> Genexpression	111
4.2.3	CpG-Modifizierungen beeinflussen die mEPO RNA-Expression aber nicht die Translationseffizienz	113
4.2.4	Dauerhafte <i>in vivo</i> Expression der CpG-modifizierten und Kodonoptimierten mEPO-Gene	115



## Inhaltsverzeichnis

---

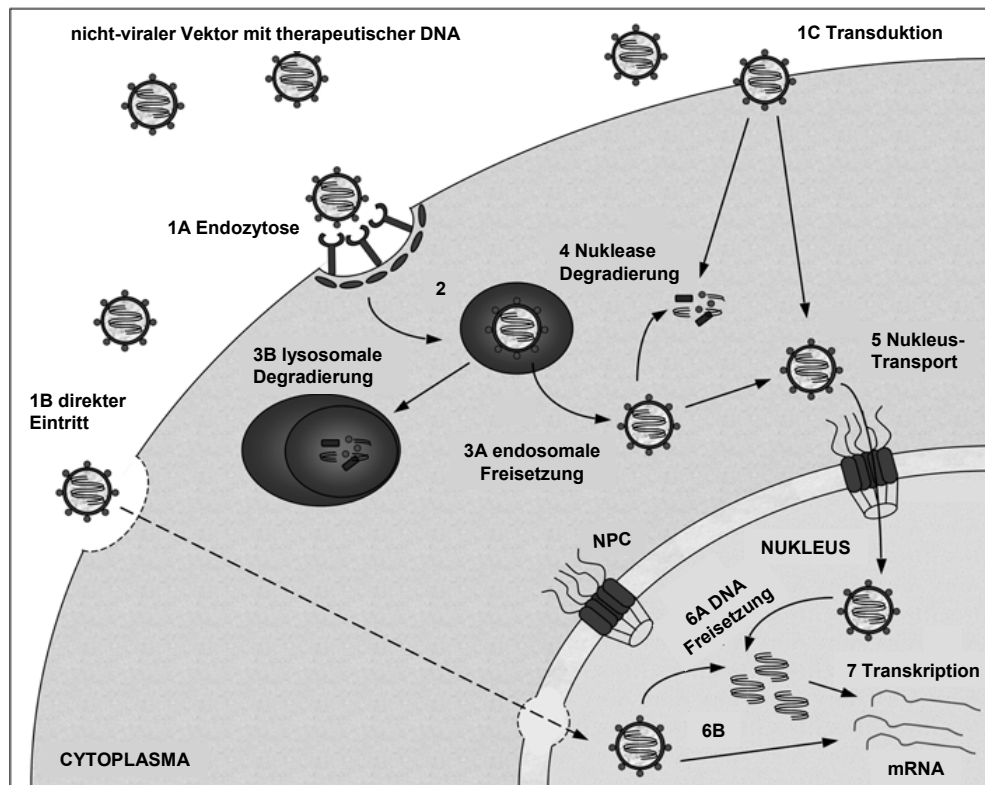
4.2.5	Einfluss von mEPO-Genmodifizierungen auf den Verlauf hämatologischer Parameter .	117
4.2.6	Ausblick 2 – pDNA in der Gentherapie .....	118
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>		<b>120</b>
<b>ANHANG .....</b>		<b>122</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>		<b>125</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>		<b>139</b>
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>		<b>144</b>
<b>PUBLIKATIONEN/ MANUSKRIPTE .....</b>		<b>147</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>		<b>149</b>

# Einleitung

## 1.1 DNA-basierte Immunisierung und (Gen)Therapie

Nukleinsäuren gelten aufgrund ihrer gespeicherten Erbinformation als elementare Bausteine des Lebens. In den letzten Jahrzehnten haben die Deoxyribonukleinsäure (DNA) sowie Ribonukleinsäure (RNA) hinsichtlich potentieller Behandlungsmöglichkeiten bei diversen Krankheiten zusätzliche Bedeutung gewonnen. Aufgrund ihrer Eigenschaften ist es möglich, die DNA und RNA als Basis für die Entwicklung neuer Therapeutika einzusetzen [1]. Inzwischen wurden zahlreiche Nukleinsäure-basierte Therapeutika wie synthetische Oligonukleotide (ODN), Ribozyme, DNAzyme, Aptamere sowie *small interfering RNAs* (siRNAs) entwickelt und in klinischen Studien getestet [2,3]. Einer der wichtigsten Vorteile solcher Therapeutika gegenüber klassischen pharmazeutischen Mitteln ist ihre selektive Wirkung auf Zielmoleküle und somit hohe Spezifität. Dadurch können die für klassische Medikamente charakteristischen unerwünschten Nebenwirkungen vermieden werden. Eine klinische Zulassung erhielten bisher jedoch nur zwei DNA-basierte Therapeutika [1].

Durch den Einsatz von Plasmid DNA (pDNA)-Vektoren mit kodierendem Transgen ist das Anwendungsspektrum von DNA wesentlich erweitert. pDNA-Vektoren können sowohl prophylaktisch für die genetische Immunisierung als auch im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf in der Gentherapie eingesetzt werden [4,5]. Anders als pDNAs werden synthetische ODN ausschließlich gentherapeutisch für die „Abschaltung“ des in die Krankheit einbezogenen Proteins entwickelt [6]. Nach der Aufnahme in die Zelle binden die *antisense* ODN an die prä-mRNA des Zielgens und blockieren somit seine Expression [7]. Auf diesem Prinzip beruht das in der Klinik zugelassene *antisense* ODN Formivirsen, das für die Behandlung der Cytomegalievirus-bedingten Retinitis bei AIDS-Patienten eingesetzt wird [8]. Außerdem werden in den letzten Jahren synthetische CpG-ODN aufgrund ihrer immunogenen Eigenschaften als Adjuvans zur DNA-Vakzinierung, aber auch in der Tumorthherapie eingesetzt (vgl. 1.3.6).



**Abb. 1-1: Aufnahme-Mechanismen und Barrieren bei der Anwendung DNA-basierter Therapeutika**

Ein nicht-viraler Vektor kann die Plasma-Membran über Rezeptor-vermittelte Endozytose (1A), direkten physikalischen Eintritt (Elektroporation) (1B) oder Protein-Transduktion (1C) passieren. Nach der Aufnahme des DNA-Vektors in das Endosom (2) kommt es entweder zu seiner Freisetzung (3A) oder zur lysosomalen Degradierung (3B). Freigesetzte DNA wird entweder durch Endonukleasen degradiert (4) oder über den Nukleus-Poren-Komplex (NPC) in den Nukleus transportiert (5). In Abhängigkeit vom DNA-Vektor kommt es im Nukleus zur DNA-Freisetzung (6A, 6B) und zur Transkription (7). Modifiziert nach Wagstaff et al.

Alle DNA-basierten Therapeutika werden überwiegend endozytotisch in die Zelle aufgenommen, was in einer hohen DNA-Degradationsrate und dadurch verminderten Wirkung resultiert (Abb. 1-1). Die Erhöhung der Stabilität durch diverse Vektorrückgrat-Modifikationen ist aufgrund der Aktivierung von unerwünschten Immunreaktionen eingeschränkt [9]. Ein weiterer Nachteil von DNA-Therapeutika ist die schlechte Aufnahme in die Zielzellen und im Fall von pDNA der ineffiziente Transport in den Nukleus [10].

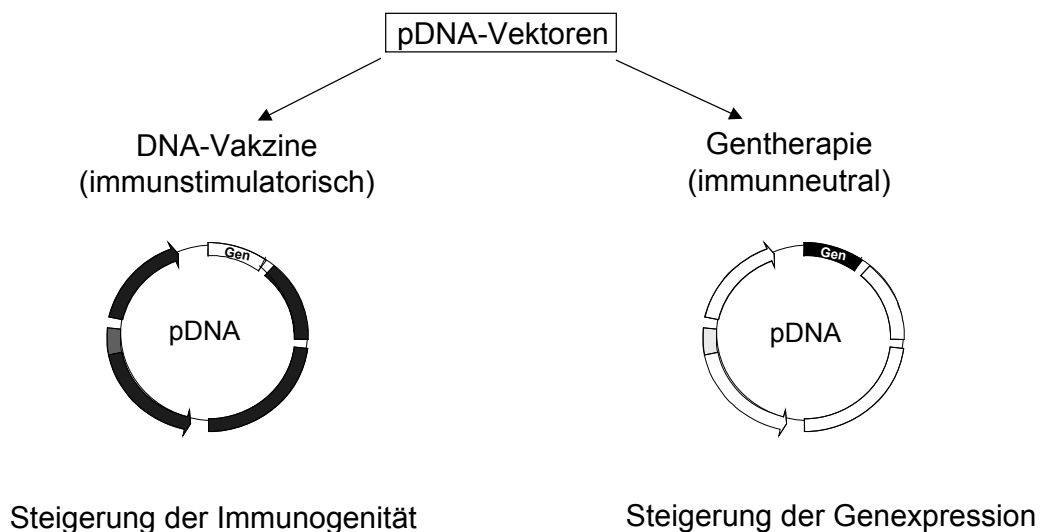
Die schlechte Überwindung intrazellulärer Barrieren sowie die hohe DNA-Degradationsrate sind die Hauptgründe dafür, warum die meisten DNA-basierten Therapeutika trotz zahlreicher Vorteile gegenüber klassischen pharmazeutischen Mitteln immer noch in der frühen Phase klinischer Studien stecken.

## 1.2 pDNA Vektor-Systeme

Die Basis für pDNA-Vektoren sind bakterielle, doppelsträngige Plasmide. Sie werden aus zwei Einheiten zusammengesetzt – der eukaryontischen Expressions- und einer bakteriellen

Replikations-Kassette. Unabhängig vom inserierten Gen weisen pDNA-Moleküle eine Größe zwischen 2 und 12 Kilobasen (kb) auf. Obwohl sie in mehreren Isoformen vorliegen können, ist die therapeutisch interessante Form die monomere supercoil-pDNA [11]. Als Voraussetzung für eine effiziente Transgenexpression müssen die pDNA-Vektoren mit entsprechenden cis-aktiven Sequenzelementen für die Transkription und Translation in Säugerzellen ausgestattet sein [12].

Im Gegensatz zu anderen DNA-basierten Therapeutika können pDNA Vektor-Systeme sowohl prophylaktisch für die genetische Immunisierung als auch therapeutisch in der Gentherapie eingesetzt werden [4,5]. Während man beim gentherapeutischen Einsatz die Expression des defizienten Proteins in der Zelle zu induzieren versucht, ist die Aktivierung der Antigen-spezifischen Immunantwort die Hauptanforderung bei der pDNA-basierten Vakzinierung [13,14]. Dieses breite Einsatzfeld erfordert beim Vektor-Design zwei komplementäre Entwicklungsstrategien, wobei diverse molekularbiologische und immunologische Prozesse je nach Ansatz, abgestimmt werden müssen [15] (Abb. 1-2).



**Abb. 1-2: Strategien bei der Entwicklung von pDNA-Vektoren für die Vakzinierung bzw. den Einsatz in der Gentherapie**

Prinzipiell muss eine gentherapeutisch eingesetzte pDNA weitgehend immunneutral sein, während bei der Vakzinierung eine Immunstimulation von Vorteil ist [16]. Anders als früher gedacht, spielt dabei neben dem kodierten Transgen (Antigen) auch die Vektor-Rückgrat-Sequenz eine wichtige Rolle. So ist es möglich, durch Sequenz-Modulationen sowie durch Einfügen zusätzlicher Sequenz-Elemente in das Vektor-Rückgrat sowohl die Sicherheit als auch die Kinetik und Dauer der Transgen-Expression zu beeinflussen [17,18].

Der Einsatz von pDNA-Vektoren ermöglicht somit sowohl für die Anwendung in der genetischen Immunisierung als auch in der Gentherapie die *in vivo* Expression des

erwünschten Transgens, ohne Vektor-spezifische neutralisierende Antikörper zu induzieren [16].

### 1.2.1 pDNA für die genetische Immunisierung

Seitdem zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass in einen Plasmid-Vektor „verpackte“ transgene DNA in Myozyten von Mäusen exprimiert wird [19], nimmt die Bedeutung der DNA-Immunisierung stetig zu. Das Prinzip der DNA-Vakzinierung beinhaltet das Integrieren Antigen-kodierender DNA in einen Plasmid-Vektor, welche nach geeigneter Verabreichung und Transfektion von Wirtszellen eine Antigen-spezifische Immunantwort hervorrufen soll. Das exprimierte Antigen wird durch Prozessierung in 9-11 Aminosäure umfassende Peptide überführt und über MHC-Klasse I Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert. Demzufolge wird eine effiziente CD8+-spezifische zelluläre Immunantwort induziert [20]. Vornehmlich membranständige oder sezernierte Antigene werden auch von B-Lymphozyten erkannt, was in ihrer Differenzierung, Antikörperbildung und somit Induktion einer humoralen Immunantwort resultiert [16]. Die Vorteile von DNA-Vakzinen gegenüber anderen Impfstrategien liegen in der Tatsache, dass nur durch den immunologisch interessanten Teil des Erregergenoms die humorale und zelluläre Immunantwort im Wirtsorganismus ausgelöst wird [20].

Die protektive Wirkung einer genetischen Immunisierung konnte in verschiedenen Versuchstiermodellen und gegen ein breites Erreger-Spektrum gezeigt werden. So wurde beispielsweise nach einer DNA-Immunisierung eine effektive humorale und zelluläre Immunantwort gegen das HIV-1 Hüllprotein gp160 und dessen Spaltprodukt gp120 in Mäusen sowie Makaken induziert [21-23]. Weiterhin konnte nach der Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit dem pDNA-kodierten HBV-Kern Antigen (HBc 18-27) eine starke Expansion protektiver CD8+ T-Zellen hervorgerufen werden [24]. Desweiteren bewirkte eine DNA-Vakzine gegen Tuberkulose durch eine induzierte Th1-Polarisierung eine verbesserte Infektionskontrolle in (neonatalen)-Mäusen [25]. Die Vielfalt der genetischen Immunisierung wurde z.B. durch die DNA-Injektion der inaktivierten S1-Einheit des *B. pertussis* Toxins gezeigt, bei der die immunisierten Mäuse das Toxin schneller aus der Lunge eliminieren konnten als die nicht-immunisierten Mäuse [26].

Trotz zahlreicher Erfolge wurde bis heute kein DNA-basierter Impfstoff oder Immuntherapeutikum für Menschen zugelassen. Die meisten Studien befinden sich noch in der vorklinischen oder klinischen Phase [5]. In den letzten Jahren wurden jedoch zwei nicht-humane DNA-Impfstoffe zugelassen: einer gegen das West Nile Virus bei Pferden [27] und ein anderer gegen das Hämatopoetische Nekrosis Virus bei Lachsen [28].

Im Fokus unserer Arbeitsgruppe steht die Entwicklung eines HIV-Impfstoffes. Eine der Strategien bei der Impfstoff-Entwicklung basiert auf DNA-Basis alleine oder in Kombination

mit viralen Vektoren, wie dem New York Vakzina Virus (NYVAC) oder Equine-Herpes Virus (EHV). Nach erfolgreichen vorklinischen Tests wurde unter Verwendung von pDNA und NYVAC die erste Phase I klinische Studie in Lausanne und London durchgeführt. Dabei wurde die Immunogenität der Gag/Pol/Nef und Env Vakzine-Kandidaten mit NYVAC sowie einem DNA/NYVAC „*Prime/Boost*“ Verfahren getestet. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass die Grundimmunisierung mit DNA in Kombination mit einer NYVAC-Auffrischimpfung in Hinsicht auf die (i) Anzahl der Responder, (ii) Anzahl der erkannten Epitope, (iii) Breite der induzierten Cytokine und (iv) Menge der Cytokin-produzierenden T-Zellen effizienter ist als NYVAC alleine. Die Erfahrungen aus zahlreichen Immunisierungs- und klinischen Studien zeigen dennoch, dass die effiziente und möglichst andauernde Expression des DNA-kodierten Antigens eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine effiziente DNA-basierte genetische Immunisierung ist.

Darüber hinaus liefern die neuen Erkenntnisse über die Nukleinsäure-bedingte Aktivierung des angeborenen Immunsystems sowie die dadurch beeinflusste adaptive Immunantwort neue Ansätze für die Entwicklung Plasmid-basierter DNA-Impfstoffe. Durch eine Reihe von Vorteilen öffnet die genetische Immunisierung neue Wege auf dem Feld der Impfstoffentwicklung und bietet eine Alternative zu anderen Impfstrategien.

### 1.2.2 pDNA in der Gentherapie

In der Gentherapie wird den somatischen Zellen eines Individuums die korrekte „Kopie“ eines defekten oder neuen Gens zugefügt. Das Transgen wird mit Hilfe verschiedener Vektor-Systeme in die Zelle eingebracht und mittels der zellulären Expressions-Maschinerie exprimiert. Neben pDNA-Vektoren werden auch virale- oder Virus-assoziierte Vektor-Systeme für den Gen-Transfer in die Zellen eingesetzt. Die wichtigste Anforderung an einen Vektor in der Gentherapie ist eine persistierende Transgen-Expression auf hohem Niveau mit minimalen toxischen und immunologischen Nebenwirkungen.

Anders als bei der genetischen Immunisierung ist in gentherapeutischen Einsätzen eine Vektor-Immunität unerwünscht. Durch eine proinflammatorische Immunantwort wird die Höhe und die Dauer der Expression des therapeutischen Proteins reduziert [1,18]. Ein weiteres unerwünschtes Phänomen ist die Induktion Transgen- und/oder Vektor-spezifischer Antikörper. Vor kurzem wurde berichtet, dass eine Erythropoietin (EPO)-Gentherapie mit dem Adeno-Virus assoziierten Vektor (AAV) EPO-spezifische Antikörper induziert und zu einer autoimmunen Anämie in Makaken führt [29]. Demzufolge ist eine fehlende Induktion von neutralisierenden Antikörpern ein entscheidender Vorteil von pDNA-Vektoren gegenüber AAV Vektor-Systemen.

Die wichtigsten Punkte für die Effizienz einer pDNA-basierten Gentherapie spielen sind (i) die Zielzell-Spezifität des Gentransfers, (ii) die Effizienz, (iii) die Dauer der Genexpression

und (iv) die Zahl der transfizierten Zellen nach der Anwendung [4]. Diese Eigenschaften werden von dem verwendeten Vektor ebenso bestimmt, wie von der Administrationsroute, Biodistribution und der Interaktion mit biologischen Komponenten. Anders als bei viralen Vektoren wird durch pDNA-Vektoren eine niedrigere *in vivo* Transfektionsrate und somit schlechtere Transgenexpression erreicht. Eine der Hauptursachen hierfür ist, dass die pDNA zwei zelluläre Barrieren überwinden muss, bevor das kodierende Gen transkribiert werden kann (Abb. 1-1) [30]. Andererseits werden cytoplasmatische und nukleäre Membranen von Viren sehr effizient passiert. Zudem ist pDNA im Cytoplasma Nukleasen ausgesetzt; dies führt dazu, dass aufgrund der hohen Degradationsrate nur etwa 1% der von der Zelle aufgenommenen DNA im Nukleus transkribiert wird [10].

In den letzten Jahren konnte dennoch eine Reihe erfolgreicher Gentransfers in verschiedensten Geweben mittels pDNA-Vektoren gezeigt werden. So wurde beispielsweise mit Hilfe der Elektroporation eine das EPO-Gen enthaltende pDNA in Muskelzellen von Nagetieren und höheren Primaten transferiert und das therapeutische Protein über mehrere Monate exprimiert [31-34]. pDNA-basierte Gentherapie wurde auch in humanen klinischen Studien mit vielversprechenden Ergebnissen getestet. So wurde beispielsweise eine Allovectin-7 pDNA-Injektion zur Behandlung von Melanom Metastasen in einer Phase II klinischen Studie appliziert [35]. Andererseits konnte im Rahmen einer Phase I klinischen Studie der DNA kodierte Fibroblasten Wachstumsfaktor Typ I zur Behandlung der Muskel Ischämie mit guter Verträglichkeit erfolgreich getestet werden [36]. Weitere Kandidaten für pDNA-basierte Gentherapien sind therapeutische Proteine wie Faktor IX, Dystrophin und Insulin, wobei sich diesbezügliche Studien noch in der präklinischen Phase bzw. deren Vorbereitung befinden [37].

Durch die niedrigere Vektor-Immunogenität und Toxizität sowie die einfachere Aufbereitung gegenüber viralen Vektoren ist der Einsatz von pDNA in der Gentherapie vielversprechend und erfordert weitere Entwicklungen.

### **1.2.3 Limitierungen pDNA-basierter Vektoren und diesbezügliche Optimierungsstrategien**

Trotz zahlreicher Vorteile gegenüber anderen Vektor-Systemen ist der Einsatz von pDNA-Vektoren sowohl in der Gentherapie als auch für die genetische Immunisierung limitiert. Eine schlechte *in vivo* Transfektionsrate sowie kurze Expressionsdauer des kodierten Transgens/Antigens ist der größte Nachteil von pDNA-Vektoren.

Auf dem Weg in den Zellkern ist die pDNA zahlreichen Hindernissen ausgesetzt. Diesbezüglich steht die Verbesserung der pDNA-Stabilität sowie des Transports im Mittelpunkt der meisten Optimierungsstrategien. Im Folgenden werden einige der vielen Verbesserungsansätze dargestellt. Eine der ersten Barrieren nach pDNA-Verabreichung

stellt die Aufnahme in die Zielzellen dar. Das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der DNA ist der primäre Grund für eine uneffiziente Aufnahme. Durch die pDNA-Bindung an die Liposomen und die Formation kationischer Komplexe ist es möglich, die Aufnahme-Effizienz zu verbessern [38]. Ein weiterer Verbesserungsansatz beinhaltet z.B. die pDNA-Bindung an Stoffe wie Polyethylenimine (PEI), welche die Azidierung in Endosomen reduziert und somit die pDNA-Freisetzung in das Cytoplasma beschleunigt [39,40]. Aufgrund vorhandener hydrolytischer Endo- und Exonukleasen beträgt die pDNA-Halbwertszeit im Cytoplasma jedoch zwischen 50 und 90 Minuten [41]. Durch die Administration von pDNA in Form stabiler Plasmid-Lipid-Partikel konnte beispielsweise die Halbwertszeit auf 6 Stunden verlängert werden [42]. Um transkribiert zu werden, muss pDNA aus dem Cytoplasma in den Nukleus gelangen. Dies geschieht entweder durch Kernporen-Transport oder während der Mitose [43,44]. Der nukleäre Transport der pDNA konnte durch ihre Bindung an Signalpeptide, Transkriptionsfaktoren (GAL4, SV-40 und SMGA) und Histone verbessert werden [14,45].

Um die endosomale pDNA-Degradation zu verhindern, werden auch physikalische und elektrische Applikations-Methoden angewendet. So konnte durch das „Beschiessen“ (*gene gun approach*) von zugänglichen Zellen an der Körperoberfläche mit DNA-beschichteten Goldpartikeln eine *in vivo* Transfektion von Dendritischen Zellen (DC) und Langerhans Zellen erreicht werden [46]. In den letzten Jahren hat sich die *in vivo* Elektroporation als vielversprechende pDNA-Administrationsroute etabliert. Die elektrischen Impulse nach intramuskulärer (i.m.) pDNA-Injektion bewirken eine reversible Perforation der cytoplasmatischen Membran, wodurch die pDNA-Moleküle direkt in das Cytoplasma gelangen können [47-49]. Durch Modulation der Stärke und Dauer der Impulse ist es möglich, sowohl die Höhe als auch die Dauer der Transgen-Expression zu beeinflussen [48]. Dadurch konnte eine bis zu 100fache Steigerung der *in vivo* Expression von verschiedenen therapeutischen Proteinen erreicht werden [31,33,50].

Die Dauer der Transgen-Expression wird entweder durch die Abschaltung von Promotoren oder durch induzierte Immunreaktionen limitiert [4]. In der Regel werden in pDNA-Vektoren starke virale Promotoren wie der CMV- oder SV-40-Promotor verwendet [1]. Es wurde jedoch berichtet, dass der CMV-Promotor in Hepatozyten oder transgenen Mäusen mit der Zeit abgeschaltet wird [51,52]. Die Induktion von proinflammatorischen Cytokinen wie Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und Tumor-Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) durch pDNA hat ebenso einen negativen Einfluss auf die Effizienz und Dauer der Transgen-Expression.

Anders als in der Gentherapie ist beim Einsatz von pDNA für die genetische Immunisierung die Aktivierung einer Antigen-spezifischen Immunantwort erwünscht. Trotz der erfolgreichen Induktion einer zellulären und humoralen Immunantwort in Kleintiermodellen ist die schlechte Immunogenität in höheren Primaten der größte Nachteil von DNA-Vakzinen [53].



Entsprechend dem Einsatz in der Gentherapie sind eine effiziente Transfektion von Wirtszellen und verbesserte Antigen-Expression wichtige Anforderungen an eine DNA-Vakzine. Potentielle Ansatzpunkte für die Immunogenitäts-Steigerung einer DNA-Vakzine sind eine erhöhte Antigen-Präsentation, die Induktion ko-stimulatorischer Faktoren und eine gesteigerte Expansion von T-Zellen.

Immunstimulatorische Sequenzen (ISS) im Rückgrat eines pDNA-Vektors sind in der Lage, das angeborene Immunsystem zu aktivieren [54]. Dadurch wird sowohl die Antigen-Prozessierung als auch ihre Präsentation positiv beeinflusst [55,56].

Eine weitere Strategie für die Verbesserung der Effizienz von DNA-Vakzinen ist der Einsatz Gen-basierter Adjuvanzen wie Cytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren oder Enzymen [5]. Durch die parallele Expression verschiedener Cytokine haben einige Gruppen die induzierte Immunantwort verstärken können [53,57-59].

Das Verständnis von molekularbiologischen Prozessen und aktivierten Signalkaskaden inklusive der anschließenden Immunreaktion sind die wichtigsten Voraussetzungen für die Entwicklung eines pDNA-basierten Vektors, sowohl für die genetische Immunisierung als auch für den Einsatz in der Gentherapie.

## 1.3 CpG-Dinukleotide

### 1.3.1 Bedeutung der CpG-Dinukleotide

Neben ihrer Funktion bei der Kodierung genetischer Informationen spielen die DNA-Basen Cytosin und Guanin beim Vorliegen als CpG-Dinukleotide eine wichtige Rolle bei verschiedenen Prozessen im Organismus. So wird über den Einfluss von CpG-Dinukleotiden bei der Protein-Expression, vor allem im Promotorbereich eines Gens, diskutiert [60]. Das Vorkommen von CpG-Dinukleotiden in einem besonderen Basenkontext übt zudem eine intensive Wirkung auf einige Zellen des Immunsystems aus und beeinflusst deren Aktivitätszustand.

Während CpG-Dinukleotide in bakterieller und viraler DNA unmethyliert auftreten, sind die Cytosine in CpG-Dinukleotiden in Vertebraten-DNA meist methyliert. Das ist ein wichtiger Punkt bei der Erkennung von Fremd-DNA durch das Immunsystem. Berichten zufolge beeinflusst die Methylierung von CpG-Motiven im Promotorbereich eines Gens dessen Expression. Neben transkriptionsaktiven GC-Boxen besitzen ca. 50% aller Gene im Promotorbereich sogenannte CpG-Inseln. CpG-Inseln könnten zusätzliche Hilfe bei der Anlagerung verschiedener Transkriptionsfaktoren leisten und dadurch die Genexpression verstärken.

Prokaryontische und Vertebraten-DNA unterscheiden sich nicht nur durch ihre Methylierungsmuster, sondern auch durch die Frequenz, mit der CpG-Dinukleotide auftreten. Während CpG-Dinukleotide bei Bakterien und Viren in einer Häufigkeit von 1 zu 16 vorkommen, ist die Frequenz in der Vertebraten-DNA supprimiert und beträgt ca. 1 zu 60. Das ermöglicht dem Immunsystem, neben dem Methylierungsmuster zwischen eigener und „fremder“ DNA zu unterscheiden.

### 1.3.2 Einfluss von CpG-Dinukleotiden auf die Genexpression

Neben der kontinuierlichen Expression von Transaktivator- oder Transkriptionssuppressor-Proteinen tragen u.a. auch Kontrollmechanismen wie DNA-Modifizierung zur Regulation der Genexpression bei. So erkennen beispielsweise Methyltransferasen spezifische DNA-Sequenzen und transferieren die Methylgruppe zu der Aminogruppe auf Cytosinen oder Adeninen [61]. Die am Besten charakterisierte Methyltransferase HhaI DNA m5c erkennt die Sequenz 5'-GCGC-3' und verwandelt das interne Cytosin zu Methylcytosin [62]. Die CpG-Methylierung fungiert in Eukaryonten in der Regel als Signal für den Transkriptionsstop [63]. Eine Vielzahl von Studien hat belegt, dass die Methylierung von 5'CpG3' Dinukleotiden (mCpG) einen reprimierenden Effekt auf die Genexpression in Vertebraten und Blütenpflanzen hat [64-69]. Vor allem in der Tumorforschung gibt es zahlreiche Daten, die belegen, dass (i) die Abschaltung der Expression bestimmter Gene, oft Tumorsuppressorgene, durch eine Hypermethylierung von CpGs verursacht wird [70-72] aber auch (ii) die unkontrollierte Expression anderer Gene mit einer Hypomethylierung assoziiert ist [73,74].

Die Methylierung von 5'CpG3' Dinukleotiden innerhalb von Genen schafft eine potentielle Bindestelle für Proteinkomplexe (primär aus der Familie der MeCP und MBD Proteine), welche methylierte CpG-DNA Sequenzen binden und gleichzeitig mit Histon-Deacetylasen (MBD-HDAC) und transkriptionellen Repressorproteinen (HDACs) assoziieren [75,76]. Diese Komplexe ziehen in der Regel eine Umstrukturierung des Chromatins nach sich, die zu einer Abschaltung der Transkriptionsaktivität führt [77]. Die Methylierung in Promotorregionen kann auch direkt zu einer Abschaltung der Genexpression führen, indem die Bindung von essentiellen Transkriptionsfaktoren verhindert wird [78]. Jahrelang wurde die Meinung vertreten, dass die CpG-Methylierung nicht mit der Elongation der Transkription in Säugerzellen zusammenhängt [79,80]. Dennoch konnten Lorincz *et al.* zeigen, dass die Methylierung von intragenischer DNA die Chromatin-Struktur verändert, was in einer reduzierten Elongationseffizienz der Polymerase II resultiert [81].

Die mit der Methylierung von CpG-Dinukleotiden verbundene Abschaltung der Genexpression hat einen entgegenwirkenden Mechanismus in der Form sogenannter CpG Inseln. Im Genom von Vertebraten liegen etwa 60-90% der Cytosine in CpG-Dinukleotiden

methyliert vor und diese methylierten Cytosine werden häufig durch Deaminierung zu Thyminen modifiziert [82]. Dieser Prozess führt dazu, dass die Frequenz an Cytosinen und Guanosinen unter der zu erwartenden statistischen Verteilung bei etwa 40% liegt und der Anteil an CpG-Dinukleotiden sogar nur etwa 20% der zu erwartenden Häufigkeit aufweist [83,84]. CpG Inseln bilden zu dieser ungewöhnlichen Verteilung von CpG-Dinukleotiden eine Ausnahme [85]. CpG-Inseln sind meistens in der Nähe von Promotoren angesiedelt und können in die transkribierte Region hereinreichen oder sogar innerhalb von Exons liegen. Sie sind gekennzeichnet durch eine etwa zehnfach höhere CpG-Häufigkeit (ca. 60-70% C+G Gehalt) im Vergleich zu durchschnittlichen Genregionen und vor allem dadurch, dass sie in der Regel nicht-methylierte CpGs enthalten [86]. Etwa 60% aller humanen Gene, vor allem alle Haushaltsgene und ungefähr die Hälfte der gewebespezifischen Gene, sind mit CpG-Inseln assoziiert [87,88]. Die oben beschriebene Deregulation der Expression in Tumorzellen wird im Allgemeinen mit einer Änderung des Methylierungszustandes in solchen CpG-Inseln in Zusammenhang gebracht.

### 1.3.3 CpG-Motive – Aktivatoren des Immunsystems

Nachdem vor ca. zwanzig Jahren gezeigt werden konnte, dass bakterielle DNA im Gegensatz zu Vertebraten-DNA die Produktion von IFN $\gamma$  und die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in Mäusen bewirkt, hat das Interesse an CpG-haltigen Sequenzmotiven stark zugenommen [89-91]. Verantwortlich für diesen immunstimulatorischen Effekt nicht-methylierter DNA sind besondere DNA-Basensequenzen, CpG-Motive genannt [92]. Nur CpG-Dinukleotide, die im Kontext eines definierten CpG-Motivs auftreten, werden von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und können deren Proliferation bewirken. Vor zehn Jahren wurde zum ersten Mal von Krieg *et al.* der Aufbau der Kernsequenz eines immunstimulatorischen CpG-Motivs in der Maus vorgeschlagen [93]. Nicht-methyliertes Cytosin wird hierbei von zwei Purin-Basen (GpA oder ApA) am 5'-Ende und zwei Pyrimidin-Basen (TpC oder TpT) am 3'-Ende flankiert. Die Hypomethylierung von CpGs sowie ihre hohe Frequenz in bakterieller und viraler DNA sind die Hauptkennungsmerkmale durch das Säuger-Immunsystem [92].

Die Wirkung immunstimulatorischer CpG-DNAs bakteriellen Ursprungs kann durch synthetische Oligodinukleotide (ODN) nachgeahmt werden. CpG-ODN beinhalten zwei bis drei Abfolgen bekannter immunstimulatorischer CpG-Motive. Die CpG-ODN Stabilität gegenüber Endonukleasen wird durch ein Phosphothioat-Rückgrat gewährleistet. Murine B-Zellen werden nach Stimulierung mit synthetischen CpG-ODN zur *in vitro* und *in vivo* Proliferation und Antikörperproduktion angeregt [94]. Durch die CpG-ODN wird in humanen plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs) die Produktion von hohen Mengen an Type I Interferonen (IFN $\alpha$ ) induziert [95]. Die Fähigkeit von CpG-ODNs, das Immunsystem zu

aktivieren, ist in hohem Maße Speziesabhängig. Das immunstimulatorische Maus-CpG-Motiv 5'-GACCGTT-3' ist beispielsweise im humanen System unwirksam [93]. Auf der anderen Seite aktiviert die Sequenz 5'-GTCGTT-3' nur humane Zellen und keine Mauszellen [96].

Die immunstimulatorischen CpG-ODNs werden in drei Klassen unterteilt [97]:

Typ A: sind CpG-ODN, die pDCs stimulieren, wodurch diese mit der Sezernierung von  $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{TNF}\alpha$  und Interleukin 12p70 (IL-12p70) beginnen. Die ausgeschütteten Cytokine induzieren die Proliferation von T-Zellen oder NK-Zellen. Typ A CpG-ODN sind kombiniert aus einem Phosphothioat- und Phosphodiester-Rückgrat aufgebaut.

Typ B: sind CpG-ODN, die die Aktivierung von B-Zellen bewirken, was in der Sekretion von IL-6, IL-10 und Immunglobulin M (IgM)-Produktion resultiert. Typ B CpG-ODN haben ausschließlich ein Phosphothioat-Rückgrat.

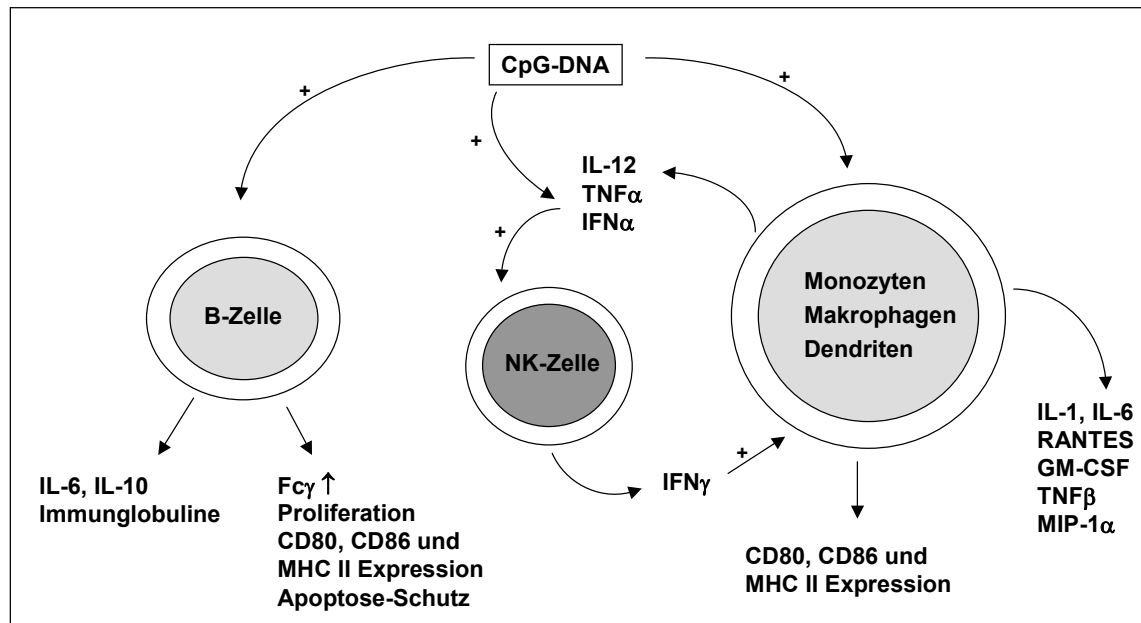
Typ C: sind CpG-ODN, die beide Zellarten des angeborenen Immunsystems aktivieren. Sie besitzen wie die Typ-B CpG-ODN ein Phosphothioat-Rückgrat, jedoch ist der Umfang ihrer stimulatorischen Wirkung noch nicht klar definiert und wird weiter untersucht.

Die Wirkung von CpG-Dinukleotiden auf das Immunsystem ist nicht nur stimulatorisch. Das Vorkommen vieler unmethylierter CpGs in CpG-Inseln von Säuger-DNA löst keine proinflammatorische Immunreaktion aus [94]. Dies suggeriert das Vorhandensein von DNA-Sequenzen, die die immunstimulatorische Wirkung von CpG-Motiven aufheben können [98]. Poly-G-Sequenzen stehen beispielsweise als CpG-antagonistische Sequenzmotive, die effektiv die Fähigkeit immunstimulatorischer CpG-Motive, NF- $\kappa$ B zu aktivieren, blockieren [99,100].

### 1.3.4 Zelluläre Immunologie der CpG-DNA

Unmethylierte CpG-DNA aktiviert auf direktem Weg Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie Monozyten, Makrophagen, DC und B-Zellen, die daraufhin mit der Cytokin-Sekretion beginnen. Als Folge werden NK-Zellen und naive T-Zellen aktiviert [92,101].

Sowohl bakterielle CpG-DNA als auch Typ-B CpG-ODN aktivieren B-Zellen zum Übergang in die G1-Phase des Zellzyklus (Proliferation) und zur Sekretion von IL-6 und IL-10 [102-104] (Abb. 1-3). Während IL-6 die Sekretion von IgM unterstützt, agiert IL-10 als regulatorischer Antagonist zu den Th-1 Cytokinen IL-12p70 und  $\text{IFN}\gamma$  [104] (vgl. 1.4.4). Neben der Cytokin- und Ig-Sekretion wird in den CpG-stimulierten B-Lymphozyten auch die Expression des Fc $\gamma$ -Rezeptors, der kostimulatorischen Moleküle MHC-Klasse II, CD80 sowie CD86 induziert [94]. Außerdem wurde von einer CpG-bedingten Hochregulation von CD40 und CD54 in humanen B-Zellen berichtet [96]. Weiterhin verleihen CpG-ODN B-Lymphozyten einen Schutz vor Apoptose, bedingt durch eine Steigerung der NF- $\kappa$ B Aktivität [94,105].



**Abb. 1-3: Wirkung der CpG DNA auf die Immunzellen**

CpG DNA aktiviert direkt B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Dendriten sowie NK-Zellen indirekt über sezernierte Cytokine. Nähere Erläuterungen im Text

Unmethylierte CpG-DNA wird durch den Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) erkannt. Die distinkten Subpopulationen muriner und humaner DCs weisen unterschiedliche Expressionsmuster an TLRs und somit die Fähigkeit, durch CpG-DNA aktiviert zu werden, auf. Im Menschen sind pDCs die einzige DC-Subpopulation, welche durch CpG-DNA aktiviert wird. Neben der verstärkten Expression von MHC Klasse II-Molekülen, ICAM-1 sowie CD40-, CD54-, CD80- und CD86- Ko-Rezeptoren beginnen aktivierte pDCs mit der Sekretion von IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$  und IL-12p70 Cytokinen, sowie IL-8, IP-10 und GM-CSF Chemokinen [105-109]. Sezernierte Cytokine aktivieren NK-Zellen, die daraufhin IFN $\gamma$  produzieren und eine Th1-Polarisierung bewirken (1.4.4) (Abb. 1-3). Zusammen mit den von pDCs sezernierten Cytokinen wirkt IFN $\gamma$  auf die Aktivierung von T-Zellen und die Induktion Th1-charakteristischer IgG2a-Isotypen [110,111].

Anders als im humanen System exprimieren in der Maus auch myeloide Dendriten (mDCs) sowie Langerhans Zellen TLR9 und können somit durch CpG-DNA aktiviert werden [94]. Die Injektion von CpGs in eine Maus induziert zusätzlich zu dem von humanen pDCs bekannten Expressionsmuster innerhalb weniger Stunden die Migration von Langerhans Zellen von der Hautoberfläche, sowie 48h nach Injektion die Migration von Splenozyten-DCs aus der Marginalzone in die T-Zell reichen Regionen des sekundären lymphatischen Gewebes [112]. Abgesehen von B-Zellen und DCs wirkt CpG-DNA in der Maus direkt auf Monozyten und Makrophagen. Als Folge dessen kommt es zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung, zu erhöhter Sekretion von IL-12p70, IL-6 und TNF $\alpha$  sowie zur gesteigerten Expression von Ko-

Rezeptoren wie beispielsweise MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II- Molekülen, was schließlich in einer verstärkten zellulären Immunantwort resultiert [111,113].

### 1.3.5 Mechanismen der Aktivierung des Immunsystems durch CpG-DNA

Die molekularen Mechanismen der Aktivierung von Immunzellen durch unmethylierte CpG-DNA wurden lange Zeit nicht verstanden. Frühe Experimente mit CpG-ODNs zeigten, dass für die Aufnahme in die Zellen die Bindung an Oberflächen-Rezeptoren notwendig ist, aber für immunstimulatorische Effekte die Interaktion mit intrazellulären oder endosomalen Rezeptoren essentiell ist [114]. Ende der neunziger Jahre wurden humane Homologe des Toll-Proteins, das bei *Drosophila* eine Immunantwort induziert, beschrieben, die sogenannten Toll-*like* Rezeptoren (TLR) [115] (vgl. 1.4.1). TLR9 ist der erste molekulare Faktor bei der Erkennung „fremder“ CpG-DNA sowohl bei Mäusen als auch im humanen Organismus [116,117]. TLR9 agiert oberhalb des Adapter-Proteins MyD88 als Mittler zwischen CpG-Erkennung und der TLR/IL-1R Signal-Kaskade [94].

Die Bindung von CpG an TLR9 bewirkt die Aktivierung des Adapter-Proteins MyD88, der IL-1 Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK1), *interferon regulatory factor 7* (IRF7) und *tumour-necrosis factor 6* (TRAF6) [102]. Dies führt zu Phosphorylierung von MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*) und endet schließlich mit der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, ATF-1, CREB, NF- $\kappa$ B u.a.. Die NF- $\kappa$ B Aktivierung durch CpG-DNA wird einerseits durch die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$ , andererseits durch die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) induziert [96,105]. Als Folge davon wird die Genexpression in der betroffenen Zelle erhöht und die Sekretion von Cytokinen induziert [118]. CpG-DNA hat potentielle transkriptionsaktivierende Effekte auf Makrophagen, DCs und B-Zellen, welche in einer gesteigerten Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, Type I Interferonen und diversen ko-stimulatorischen und Antigen-präsentierenden Molekülen wie MHC-Klasse II, CD80, CD86, CCR7 und CD40 resultiert [94]. Bis heute sind keine CpG-Bindungsdomänen auf TLR9 nachgewiesen worden, aber für die Interaktion zwischen TLR9 und CpG-ODN müssen die CpGs in die Endosomen aufgenommen werden, wo die Interaktion erfolgt [118]. Es wird vermutet, dass TLR9 im endoplasmatischen Retikulum (ER) exprimiert wird und erst nach der Aufnahme von mikrobieller CpG-DNA in die Endolysosomen wandert, wo die spezifische Erkennung erfolgt [119,120]. Die Interaktion ist Sequenz- und pH-abhängig und erfolgt optimal bei einem pH-Wert von 5,0-6,5 [121,122]. Mit der Zugabe von Chloroquin und Quinacrin kann die Interaktion und somit CpG-abhängige NF- $\kappa$ B Aktivierung blockiert werden [121].

TLR9 wird im humanen System nur in pDCs und B-Zellen exprimiert. In der Maus ist TLR9 neben DCs und B-Zellen auch in Monozyten und Makrophagen lokalisiert. Die Unterschiede

in der Lokalisierung führen auch zu Unterschieden bei der Aktivierung des Immunsystems in diesen beiden Systemen.

### 1.3.6 Therapeutische Anwendung von CpG-DNA

Die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems durch unmethylierte CpG-DNA und die anschließende Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen sowie Type I Interferonen diene als Basis für die Entwicklung der CpG-DNA-basierten Immuntherapie. Die therapeutische Anwendung von CpG-DNA beschränkt sich bislang auf die Applikation von synthetischen CpG-ODNs. Ein anderer Einsatz von CpG-DNA beinhaltet die Erhöhung der Immunogenität pDNA-basierter Vektoren durch die Modulation von ISS innerhalb des Plasmids.

Die protektive Wirkung von CpG-ODN konnte bereits in vielen Studien gegen ein breites Erregerspektrum gezeigt werden [123-126]. Der therapeutische Effekt von CpG-ODN ist nicht so effektiv wie in der Prophylaxe. Es wurden jedoch einige Beispiele für einen erfolgreichen Einsatz von CpG-ODN im fortgeschrittenen Infektionsstadium präsentiert. So wurde die durch *Leishmania major* induzierte Th2-Immunantwort nach Gabe von CpG-ODN in Th1-Richtung verschoben, was zum Therapieerfolg in Nagetieren und Rhesus-Makaken führte [127,128]. Die Behandlung von 60 HCV-infizierten Patienten mit C-Typ CpG-ODN im Rahmen einer klinischen Studie resultierte in einer dosisabhängigen Reduktion der Virus-Last im Blut [129]. Dieser Effekt wurde als Folge einer TLR9-abhängigen IFN $\alpha$ -Sekretion und Aktivierung von NK-Zellen diskutiert.

Die guten Adjuvans-Eigenschaften von CpG-ODN konnten für ein breites Antigenspektrum in Form von Peptid- oder Protein-Antigenen, lebenden oder abgetöteten Viren, DC-Vakzinen, autologen zellulären Vakzinen und Polysaccharid-Konjugaten in zahlreichen Tiermodellen gezeigt werden [102]. Außerdem wurden CpG-ODN auch als mukosale Adjuvantien erfolgreich eingesetzt [130-132].

Nach einer Vakzinierung gegen das Hepatitis B Virus (HBV) mit CpG-ODN als Adjuvans wurde in Mäusen und Orang-Utans eine gesteigerte Antikörperproduktion und eine stärkere CTL-Aktivität gezeigt [133,134]. In einer klinischen Studie zum kommerziellen HBV Impfstoff Engerix B wurde an gesunden Probanden in Kombination mit herkömmlichen Aluminium-Adjuvantien der Effekt des B-Typ ODN CpG 7909 untersucht. Während man einen schützenden Antikörpertiter (Anti-HBsAg) nach der Engerix B Immunisierung erst nach der Auffrischimpfung induziert, konnte man bei Probanden, die CpG-7909 als Adjuvans bekamen, die schützenden Antikörper schon zwei Wochen nach Grundimmunisierung nachweisen [135].

Die therapeutische Nutzung von CpG-ODN wird, abgesehen von der Vakzinierung und Behandlung von infektiösen Krankheiten, auch in anderen klinischen Ansätzen untersucht.

So konnte die antitumorale Wirkung von CpG-ODN in Kombination mit anderen Behandlungsmethoden (monoklonale Antikörper, Radio- und Chemotherapie) gezeigt werden. Dabei wurde durch die Induktion von Th1-Cytokinen und die Aktivierung bzw. Reifung von DCs eine Unterstützung des Immunsystems gegen tumorspezifische Antigene erreicht [136,137].

Ein anderes Anwendungsgebiet von CpG-DNA ist die Erhöhung der Immunogenität (Mitogenität) von DNA-Vakzinen durch Einfügen von CpG-spezifischen ISS. So wurde beispielsweise durch zusätzliche Multi-CpG-Motive im HIV-1 pDNA-Vektor-Rückgrat die Expression von diversen ko-stimulatorischen Molekülen (MHC-Klasse II, CD40, CD86 u.a.) hochreguliert [138]. Coban *et al.* konnten durch gezielte Insertion immunstimulatorischer CpG-Sequenzen eine Hochregulierung von ko-stimulatorischen Molekülen und eine signifikante Erhöhung der IFN $\alpha$ - und IL-6-Sekretion in humanen PBMC induzieren [54]. Darüber hinaus eröffnen die immer noch unbekannten Mechanismen der Aufnahme von pDNA in die Zelle sowie das Vorhandensein kürzlich beschriebener stimulatorischer DNA-Sequenzen, die nicht auf CpG-Motiven beruhen, weitere Entwicklungspotentiale.

Zusammenfassend ist in den letzten Jahren deutlich geworden, dass Cytosin und Guanin nicht nur der Kodierung genetischer Information dienen, sondern beim Auftreten in bestimmten Sequenzmotiven eine beachtliche Wirkung auf das Immunsystem ausüben, was wiederum für therapeutische und/oder präventive Zwecke genutzt werden kann.

## 1.4 Angeborenes Immunsystem

Die Bedeutung des angeborenen Immunsystems bei der Generierung einer effizienten Immunreaktion wurde lange Zeit unterschätzt. Die Generierung einer Immunantwort und effiziente Bekämpfung von Pathogenen wurde hauptsächlich den Zellen des spezifischen Immunsystems zugeschrieben. Erst die Entdeckung von TLR hat den Schwerpunkt des immunologischen Interesses auf das angeborene Immunsystem gelegt. Das darauffolgende Verständnis über die Funktion von *NOD-like receptors* (NLR) sowie die Beschreibung von *RIG-like receptors* (RLR) - RNA-Helikasen, die RNA von Pathogenen erkennen - hat die entscheidende Bedeutung des angeborenen Immunsystems bei der Generierung einer Immunantwort bekräftigt. Heute wird das spezifische Immunsystem als ein Arm des angeborenen Immunsystems betrachtet, wobei dessen Wirkkraft entscheidend von der effizienten Aktivierung der angeborenen Immunität abhängt.

Das angeborene Immunsystem muss vier fundamentale Aufgaben erfüllen. Erstens muss es sehr schnell ein Pathogen erkennen und unterscheiden, ob es sich um ein Virus, ein Bakterium, einen Pilz oder Parasiten handelt. Zweites muss es erkennen, ob das Pathogen extrazellulär oder intrazellulär lokalisiert ist. Drittens muss das angeborene Immunsystem,

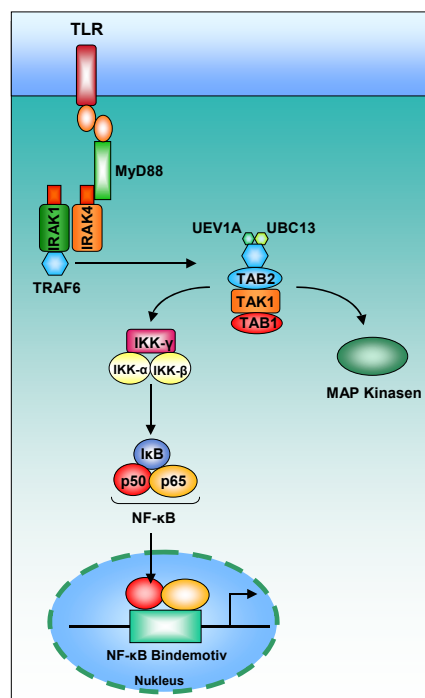


abhängig vom Pathogentyp, eine entsprechende Reaktion durch Sekretion proinflammatorischer oder virusneutralisierender Cytokine einleiten. Viertens muss das angeborene Immunsystem eine entsprechende spezifische Immunantwort mit dem Ziel der Eliminierung des Pathogens und der Prävention einer Re-Infektion vermitteln.

Das angeborene Immunsystem stellt einen breiten und komplexen Bereich des Säuger-Organismus dar. Daher werden im Folgenden nur diejenigen Komponenten beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit besondere Bedeutung hatten.

### 1.4.1 Toll-*like* Rezeptoren (TLR)

TLR gehören zur Gruppe der *pathogen recognition receptors* (PRR) des Säuger-Immunsystems mit der Hauptaufgabe der Erkennung von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) und der Einleitung einer unspezifischen Immunreaktion. Das Toll-Gen wurde zum ersten Mal in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert, wo es eine essentielle Rolle bei der Determinierung der dorso-ventralen Achse in der Embryonalentwicklung spielt [118]. Als Typ I Transmembranrezeptor in der adulten Fliege ist der Toll-Rezeptor zuständig für die Erkennung von mikrobiellen Erregern und die Induktion einer Immunantwort. TLR sind evolutionär konserviert und Homologa wurden in Insekten, Pflanzen und Säugern gefunden. Inzwischen wurden dreizehn TLR im Säugersystem identifiziert, davon zehn beim Menschen und zwölf bei der Maus, wobei die TLR 1-9 jeweils homolog sind [118,139,140].



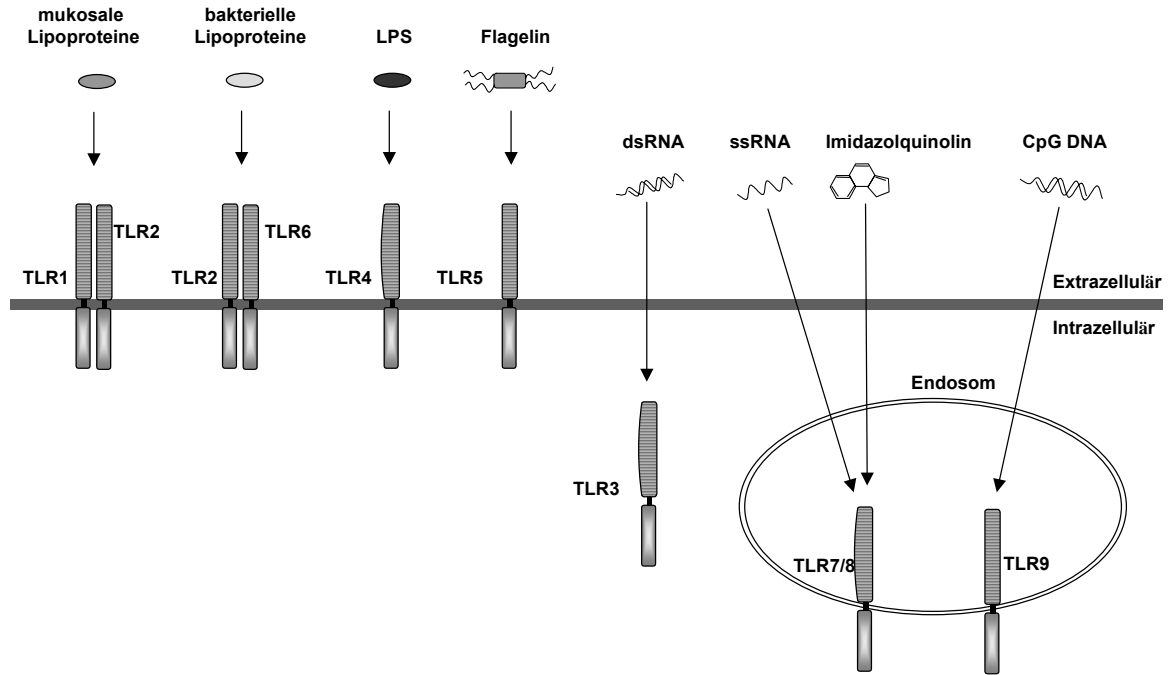
**Abb. 1-4: TLR Signalkaskade**

Nähere Erläuterungen im Text. Modifiziert nach Akira et al. (2004).

Als Transmembranproteine werden TLR an der Zelloberfläche (TLR 1/2/4/5/6), aber auch im Cytoplasma (TLR3) bzw. Endosomen (TLR 7/8/9) der Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert (Abb. 1-5). Dies ermöglicht die Erkennung sowohl von extrazellulären als auch intrazellulären PAMP.

Die extrazelluläre N-terminale Domäne der TLR besteht aus Leucin-reichen Wiederholungen (*leucine rich repeats*, LRR), die durch einen kurzen, Cystein-reichen Anteil in die transmembrane Domäne übergehen [141]. Der intrazelluläre Bereich weist eine starke Homologie zum IL-1-Rezeptor auf und wird daher als Toll/IL-1R homologe Region (TIR) bezeichnet. Die TIR-Domäne beinhaltet drei hochkonservierte Boxen, welche für die Signalkaskade entscheidend sind. Nach der Liganden-Bindung kommt es zur Konformationsänderung und Dimerisierung von TLR, was in der Aktivierung der abwärts-liegenden Adapter-Moleküle MyD88, IRAK, TGF $\beta$ , TAK1, TAB1, TAB2 und TRAF6 resultiert [141] (Abb. 1-4). Das Adapterprotein MyD88 assoziiert mit der cytoplasmatischen TIR-Domäne und vermittelt dadurch die Rekrutierung von IRAK-1 (*IL-1R associated kinase*) zum Rezeptor. Die Hyperphosphorylierung von IRAK1 bewirkt die Bindung von TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*). Der IRAK1-TRAF6 Komplex dissoziiert vom Rezeptor und reagiert mit dem bereits formierten *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Komplex TAK1-TAB1-TAB2. Aktiviertes TAK1 phosphoryliert den Inhibitor- $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK), was zu seiner Degradation führt, woraufhin der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*) freigesetzt wird und vom Cytoplasma in den Zellkern transloziert. Im Nukleus induziert NF- $\kappa$ B die Transkription proinflammatorischer Cytokine, wie z.B. von IFN $\gamma$ , IL-6, oder TNF $\alpha$ .

Die an der Zelloberfläche lokalisierten TLR (TLR 1/2/4/5/6) erkennen vorwiegend bakterielle Oberflächen-Komponenten wie Peptidoglykan, Lipoteichonsäure, Lipopeptide und Flagellin [118,142] (Abb. 1-5). TLR4 wurde 1997 als erstes Toll-Homolog von Medzhitov beschrieben [115]. Er ist ein essentieller Rezeptor für LPS, einem charakteristischen Bestandteil der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien und sehr potentem Immunaktivator [143].



**Abb. 1-5: Schematische Darstellung der Toll-like Rezeptoren (TLR) mit ihren wichtigsten Liganden**  
*LPS: Lipopolysaccharid, ds: doppelsträngig, ss: einzelsträngig*

Diejenigen TLR, welche Nukleinsäuren von Pathogenen erkennen, werden nicht an der Zelloberfläche, sondern im Cytoplasma und in Endosomen von Immunzellen exprimiert (Abb. 1-5). Außerdem werden chemische Verbindungen wie Imidazolquinolin durch endosomale TLR detektiert [144]. Wie unter 1.3.5 beschrieben ist TLR9, als einer der best charakterisierten TLR, der spezifische zelluläre Rezeptor für unmethylierte CpG-DNA.

## 1.4.2 Dendritische Zellen (DC)

In den siebziger Jahren wurden zum ersten Mal Zellen im peripheren lymphatischen Gewebe beschrieben, die konstitutiv MHC-Klasse I und MHC-Klasse II Moleküle exprimierten und effektiver als jede bis dahin beschriebene Antigen-präsentierende Zellen (APC) naive  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen stimulieren konnten [145]. Als heterogene Zellgruppe unterscheiden sich einzelne Subtypen von DC in der anatomischen Lokalisierung, der Expression von Oberflächenproteinen und ihrer spezifischen Funktion. Folgende Eigenschaften sind jedoch allen DC gemeinsam [146]: (i) generiert aus  $CD34^+$  Knochenmark-Stammzellen wandern DC-Vorläufer über das Blut in die peripheren Gewebe, (ii) unreife DC nehmen Antigene auf, die nach der endosomalen Degradation und Prozessierung an MHC-Moleküle gebunden werden, (iii) aktivierte DC reifen und wandern in lymphatische Gewebe, wo sie über Antigen-beladene MHC-Klasse II Molekülen mit dem T-Zell Rezeptor (TCR) der  $CD4^+$  Zellen reagieren und eine spezifische Immunreaktion auslösen, (iv) aktivierte DC produzieren

Cytokine und Chemokine und beeinflussen damit den Aktivierungszustand anderer Immunzellen.

DC erkennen eine Reihe von mikrobiellen Produkten wie z.B. unmethylierte CpG-DNA, ds virale RNA, LPS, Hitzeschock-Proteine u.a. [113,147]. Die Erkennung diverser Stimuli erfolgt durch zahlreiche Rezeptoren wie Scavenger- und Mannose Rezeptoren, C-Typ Lektin-Rezeptoren (CLR), TLR, RLR und NLR [107,148,149].

Im humanen peripheren Blut werden zwei prominente DC-Subpopulationen unterschieden:  $CD4^+$ ,  $CD11c^+$ ,  $CD13^+$ ,  $CCR5^+$  und  $CD123^-$  myeloide DC (mDC) und  $CD4^+$ ,  $CD11c^-$ ,  $CD13^-$ ,  $CXCR3^+$  und  $CD123^+$  plasmazytoide DC (pDC) [95,150]. Neben unterschiedlichen Vorläufern (myeloid und/oder lymphoid) und Oberflächenmarkern unterscheiden sich mDC und pDC auch in der Expression von TLR und der Sekretion bestimmter Cytokine und Chemokine [150]. Anders als mDC exprimieren pDC kein TLR2/3/4/5 auf ihrer Oberfläche sondern nur die endosomalen TLR7/8/9 [151]. Das auffällige TLR-Expressionsmuster liefert eine Erklärung, warum pDC keine bakteriellen Produkte wie LPS oder Peptidoglykan erkennen, sondern überwiegend durch virale Nukleinsäuren aktiviert werden [95]. Aufgrund ihrer Fähigkeit, ein Antigen durch Makropinozytose und/oder Endozytose effizient aufnehmen zu können, werden mDC unter den DC-Subpopulationen als professionelle APC betrachtet. pDC dagegen produzieren hohe Mengen von Typ I Interferonen ( $IFN-\alpha,\beta$ ) und erfüllen somit hauptsächlich antivirale und regulatorische Funktionen.

Obwohl sie nur bedingt Antigene präsentieren können, stellen pDC aufgrund der Produktion diverser Chemokine und Typ I IFN eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem dar [149]. Durch die hohe Sekretion von Typ I IFN durch pDC (daher auch als *interferon producing cells*, IPC bezeichnet) wird in NK-Zellen sowohl die zytolytische Aktivität als auch die Produktion von  $IFN\gamma$  und somit Th1-Polarisierung induziert [95]. Ein wichtiger Aspekt der pDC-vermittelten Regulation der adaptiven Immunität ist die Fähigkeit, durch sezernierte Typ I IFN und IL-6 die Differenzierung von B-Zellen und die Immunoglobulin-Produktion zu induzieren [152,153]. Desweiteren fördern sezernierte Typ I IFN auch die Differenzierung und Reifung anderer DC-Subpopulationen [154].

Zusammenfassend haben DC als Zellen des angeborenen Immunsystems einerseits durch die Antigen-Aufnahme und Präsentation, andererseits durch die regulatorische Auswirkung auf andere Immunzellen, eine Schlüsselrolle bei der Generierung einer Immunreaktion.

### 1.4.3 Interferone

Interferone gehören zu einer Cytokin-Familie, die nur in Vertebraten gefunden wurde. Trotz großer Heterogenität können die IFN zusammenfassend als Induktoren antiviraler und antitumoraler Aktivität sowie als immunmodulierende Effektoren betrachtet werden [155]. Nach der Bindung an spezifische Rezeptoren aktivieren IFN JAK-STAT-Signalkaskaden,

was in der Hochregulierung und Expression in der Regel antiviraler Gene resultiert. Die IFN-vermittelte Aktivierung zahlreicher antiviraler Effektorgene stellt eine der Hauptbarrieren der Virus-Ausbreitung bei einer Infektion im Wirtsorganismus dar [156]. Die IFN-Familie wird in Typ I, Typ II und Typ III IFN unterteilt.

Typ I IFN beinhalten acht Subtypen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ,  $\tau$  und  $\xi$ ), wobei die biologische Aktivität am besten bei IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  untersucht wurde [155,157]. Die Hochregulierung der IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  Genexpression erfolgt nach der Bindung viraler PAMPs (dsRNA) an spezifische Rezeptoren wie TLR, RIG-I und/oder MDA5 [158-160]. Die induzierte JAK-STAT-Signalkaskade bewirkt die Aktivierung von IRF3 und IRF7, zweier Schlüsselproteine bei der Induktion der IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  Sekretion. Sezernierte IFN induzieren wiederum die Expression zahlreicher Proteine, wie z.B. Protein-Kinase R, Oligoadenylat-Synthetase und Adenosin-Deaminase 1, die starke antivirale Aktivität aufweisen [161]. Eine Virusinfektion wird unter anderem durch die Inhibierung der viralen mRNA-Translation oder durch die RNase L-bedingte Degradation viraler mRNA unterdrückt. Neben ihrer antiviralen Aktivität üben Typ I IFN auch immunmodulierende Effekte auf DC, NK-Zellen und Makrophagen aus [162,163]. Über TLR aktivierte humane pDC produzieren hohe Mengen an IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  und IFN $\omega$  und beeinflussen somit das Aktivierungsstadium anderer Immunzellen [164]. Takaoka und Taniguchi konnten zeigen, dass bereits ein schwaches IFN $\alpha$  oder IFN $\beta$  Signal eine starke IFN $\gamma$ - und IL-6-Sekretion induzieren kann [155,165]. Typ I IFN erfüllen somit neben ihrer essenziell antiviralen Funktion auch eine wichtige Rolle als Mediator zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität.

IFN $\gamma$  ist der alleinige Vertreter der Typ II IFN-Familie. Trotz abweichender struktureller Eigenschaften und der Bindung an einen anderen Rezeptor, weist IFN $\gamma$  analog zu Typ I IFN eine starke antivirale Aktivität auf. Dennoch ist die Immunregulation und Aktivierung distinkter Immunzellen Hauptaufgabe von IFN $\gamma$ . Anders als Typ I IFN wird IFN $\gamma$  nicht von virusinfizierten Zellen, sondern überwiegend durch aktivierte CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie NK-Zellen produziert [155]. In den letzten Jahren wurde jedoch mehrfach berichtet, dass auch B-Lymphozyten, NKT-Zellen und APC in der Lage sind, IFN $\gamma$  zu sezernieren [166-168]. Es wird vermutet, dass durch DC und/oder Makrophagen produziertes IFN $\gamma$  für die Selbst-Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems benötigt wird [167,169]. Andererseits spielt die IFN $\gamma$ -Sekretion durch T-Zellen eine wichtige Rolle für die Regulation der adaptiven Immunantwort [167]. Zusammen mit IL-12 bewirkt IFN $\gamma$  außerdem die Th1-Polarisierung einer Immunreaktion (vgl. 1.4.4).

Die IFN $\gamma$ -Produktion wird durch die Sekretion anderer Cytokine wie IL-12 oder IL-18 durch APC induziert. Durch Makrophagen sezerniertes IL-12 und MIP-1 $\alpha$  locken NK-Zellen zum primären Ort der Infektion, wobei IL-12 die IFN $\gamma$ -Expression in NK-Zellen induziert [170,171].

Die negative Regulierung der IFN $\gamma$ -Expression erfolgt vorwiegend durch die Th2-Cytokine IL-10 und IL-4 sowie *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ ) [172-174].

### 1.4.4 Th1 und Th2 Cytokinprofil

Neben der Antigen-Präsentierung über MHC-Moleküle durch APC werden naive CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen (Th0-Zellen) auch zur Differenzierung in Th1- oder Th2-Effektor Zellen angeregt [175-177]. Während die Sekretion von IL-12 und IFN $\gamma$  zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet und zur Th1-Polarisierung führt [178], aktiviert IL-4 den Transkriptionsfaktor GATA-3 und die Th2-Polarisierung naiver Th0-Zellen [179,180]. Als Folge reagiert jede der Subklassen mit der Induktion eines anderen Cytokinprofils und der Einleitung einer spezifischen Immunantwort.

Th1-Zellen induzieren eine proinflammatorische und zelluläre Immunreaktion. Sie führen zur Sekretion von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-6 und IL-12 und aktivieren APC, wie Makrophagen, sowie zytotoxische T-Zellen (CTL) [181,182]. Außerdem können Th1-Zellen B-Lymphozyten zur Sekretion von Immunglobulinen (IgG2) anregen. Eine besondere Rolle unter den Th1-Cytokinen hat IFN $\gamma$  (vgl. 1.4.3). Neben seinen zahlreichen Aktivitäten stimuliert IFN $\gamma$  die Sekretion von TNF $\alpha$ , das ebenfalls an der Immunregulation und der Abwehr gegen virale und bakterielle Infektionen beteiligt ist. Zusammen mit IL-12 aktiviert TNF $\alpha$  die zytolytische Aktivität von NK-Zellen und induziert die Proliferation von T-Lymphozyten. In Th1-Zellen fördert IL-12 die Bildung von IL-2 und IFN $\gamma$ , während es in Th2-Zellen die Synthese von IL-4, IL-5 und IL-10 hemmt.

IL-6 ist eines der wenigen Cytokine, welches sowohl in Th1- als auch in Th2-Zellen gebildet wird. Neben der Beteiligung an lokalen Entzündungsreaktionen bewirkt IL-6 die terminale Differenzierung von B-Lymphozyten und stimuliert die IgM- und IgG-Synthese. Außerdem wirkt IL-6, neben IL-1 und TNF $\alpha$ , auch als endogenes Pyrogen.

Ein zentraler Regulator der Immunantwort mit meist autokriner Wirkung ist IL-2. Es regt T-Lymphozyten zur Proliferation an, bewirkt eine verstärkte Produktion anderer Cytokine (TNF, IFN) und stimuliert die Differenzierung von T-Zellklonen in Suppressor-, Helfer- und zytotoxische T-Zellen.

Th2-Zellen vermitteln vorwiegend die Abwehr gegen extrazellulärer Erreger, wie Parasiten, und regulieren autoimmune Erkrankungen [180,183]. Sie aktivieren den humoralen Arm des Immunsystems durch die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, welche die humorale Immunantwort stimulieren und die zelluläre Immunantwort supprimieren. IL-4 und IL-5 induzieren die Proliferation von B-Lymphozyten und ihre Differenzierung zu Plasmazellen. Desweiteren wird durch Th2-Cytokine der IgM/IgG Isotypen *switch* eingeleitet. IL-10, als wichtiger Th2-Mediator und IFN $\gamma$ -Antagonist, besitzt eine ausgeprägte regulatorische

Wirkung als Immunsuppressor und verhindert unkontrollierte Entzündungsreaktionen, die von den proinflammatorischen Cytokinen (IFN $\gamma$  u.a.) ausgelöst werden können.

## 1.5 Erythropoietin als Modell-Transgen für pDNA-basierte Gentherapie

### 1.5.1 Eigenschaften und biologische Funktion

Erythropoietin (EPO) ist ein 30,4 kDa großes Glykoprotein, das phylogenetisch zur Klasse I der Cytokinfamilie gehört [184,185]. In Abhängigkeit vom Glykosylierungsstatus besitzt EPO ein Molekulargewicht zwischen 27 kDa und 38 kDa. Hauptproduktionsort von EPO sind im Menschen die peritubulären interstitiellen Nierenzellen, wo 85-90% des Proteins gebildet werden [37]. Im Fötus wird EPO vorwiegend in den Hepatozyten produziert. Nach der Geburt und dem Produktionswechsel in die Nieren werden in Hepatozyten anteilig nur noch 10-15% EPO synthetisiert.

Das Hauptsignal für die EPO-Synthese ist Sauerstoffmangel (Hypoxie), wodurch *hypoxia-inducible transcription factors* (HIF) aktiviert werden und die EPO Genexpression induziert wird [186]. Während HIF-1 und HIF-2 aktivierend wirken, wird durch HIF-3 und NF- $\kappa$ B die Expression des EPO-Gens inhibiert. Sezerniertes EPO erfüllt im Organismus hauptsächlich hormonelle Aufgaben und wirkt als Schlüsselhormon bei der Erythrozytenbildung während der Erythropoese. Dabei bindet EPO im Knochenmark an den transmembranen EPO-Rezeptor auf erythroiden Vorläuferzellen und fördert deren Proliferation, Differenzierung und Ausreifung zu Erythrozyten [187-189]. Außerdem wirkt EPO als Apoptosehemmer und verzögert den genetisch programmierten Zelltod erythroider Stammzellen.

Der EPO-Rezeptor wurde auch auf anderen somatischen Zellen wie Astrozyten, Neuronen, Mikroglia- und Herzmuskelzellen nachgewiesen [190]. Demzufolge konnte auch eine Beteiligung von EPO in vielen nicht-blutbildenden Prozessen gezeigt werden. EPO fördert unter anderem die Differenzierung von Neuronen und vermittelt deren Schutz vor Apoptose, fängt zerstörerische Radikale aus dem Blut ab und wirkt entzündungshemmend ([www.dpc-akademie.de/reviews\\_epo.htm](http://www.dpc-akademie.de/reviews_epo.htm)).

Biochemisch ist EPO ein hydrophobes, Temperatur- und pH-stabiles Protein, welches aus 165 Aminosäure-Monomeren aufgebaut ist [186]. Der 40%ige Kohlenhydratanteil besteht aus drei N-glykosidisch (an Asparagin 24, 38 und 83) und einem O-glykosidisch (an Serin 126) gebundenen Oligosaccharid. Während die N-Glykosylierung die EPO Stabilität im Blutkreislauf unterstützt, ist die biologische Funktion der O-Glykosylierung bisher unbekannt [191,192]. Die Bedeutung der N-Glykosylierung von EPO spiegelt sich auch durch die variable Anzahl der endständigen N-Acetylneuraminsäuren (Sialinsäuren) wider. Sowohl die

biologische Aktivität als auch die Halbwertszeit des Hormons im Blutserum hängen entscheidend vom Sialyierungsgrad ab [193].

Die EPO Konzentration wird traditionell in *units* (U) angegeben. 1 U EPO induziert im Tiermodell die gleiche Erythropoiese-Effizienz wie 5  $\mu\text{mol}$  Cobalt-Chlorid [186]. Die normale Serumkonzentration des Hormons beträgt im gesunden Menschen bis zu 19 mU/ml. Der Abbau-Mechanismus der EPO-Moleküle ist noch unbekannt, wobei die EPO-Bindung an EPO-Rezeptor-exprimierende Zellen und die dadurch eingeleitete Endozytose und der lysosomale Abbau vermutlich eine wichtige Rolle spielen [194].

### 1.5.2 Therapeutische Anwendung von EPO

Rekombinantes humanes EPO (rHu-EPO) wird in der Klinik zur Behandlung diverser Anämien unterschiedlicher Ätiologie eingesetzt. So wird durch rHuEPO die Erythrozyten-Bildung bei Patienten mit renaler Anämie, Tumoranämien, Chemotherapie, bei AIDS-Patienten sowie Patienten mit autoimmunen Krankheiten initiiert und/oder unterstützt [186,195]. Als Wachstumsfaktor mit dem gegenwärtig größten Indikationsspektrum ist rHu-EPO eines der meistverkauften pharmazeutischen Mittel heutzutage [186]. Neben der Anwendung bei Anämien wird rHu-EPO in Kombination mit Radio- und Chemotherapie auch zur Behandlung von hypoxischen Tumoren in klinischen Studien eingesetzt. Desweiteren machen die neuroprotektiven Effekte EPO zu einem potentiellen Kandidaten für die Behandlung von neurodegenerativen und neurologischen Erkrankungen [196].

Als Alternative zur sehr kostenintensiven Behandlung mit rHu-EPO wird in den letzten Jahren über die Anwendung von EPO in der Gentherapie diskutiert [31,32,34,37]. Dabei werden überwiegend zwei Vektor-Systeme für den Gentransfer untersucht; virale und/oder Virus-assoziierte Vektor-Systeme sowie nicht-virale pDNA-basierte EPO-Administration. Trotz ihrer hohen Effizienz im Tiermodell werden Virus-assoziierte Vektor-Systeme aufgrund der unerwünschten Nebenwirkungen kaum eine Anwendung im Menschen finden. Die Induktion einer autoimmunen Anämie in Makaken durch EPO-Gentherapie mit einem Adeno-Virus assoziierten Vektor (AAV) war ein schwerer Rückschlag für die Anwendung viraler Vektor-Systeme [29,197].

Im Vergleich zu den viralen Vektor-Systemen hat pDNA eine Reihe von Vorteilen, wie Sicherheit, fehlende Induktion einer zellulären Immunantwort und neutralisierender Antikörper sowie keine Toxizität (vgl. 1.2.2). Dennoch sind eine schlechte *in vivo* Transfektionsrate in höheren Primaten und eine dementsprechend uneffiziente und nicht andauernde Genexpression limitierende Faktoren für die pDNA-Anwendung in der EPO-Gentherapie [31]. Neben einer effizienten und kontinuierlichen EPO-Expression ist die Regulierung der Proteinsekretion ein weiterer wichtiger Aspekt in der EPO-Gentherapie [37]. Daher stand die Reduktion der Nachteile der pDNA-basierten EPO-Gentherapie in den



letzten Jahren im Fokus vieler Optimierungsstudien [198,199]. Dabei wurden verschiedene Strategien, wie die Vorbehandlung mit Hyaluronidase [200], das *GeneSwitch*-System mit *mifepristone*-Liganden [34], die Bildung von EPO-Dimeren [201], die Doxycyclin-Induktion [202] u.a. verfolgt. Ein entscheidender Durchbruch bei der Erhöhung der Effizienz pDNA-basierter EPO-Gentherapievektoren wurde jedoch durch die Anwendung der *in vivo* Elektroporation erzielt (vgl. 1.2.3). Durch den Elektro-Gentransfer (EGT) konnte eine deutliche Steigerung der EPO-Expression gegenüber der pDNA-Injektion ohne EGT in verschiedenen Kleintiermodellen und höheren Primaten erreicht werden [31,32,34,50,203]. In diesen Studien wurde eine kontinuierliche EPO-Expression bis zu sechs Monate nach dem EGT festgestellt. Dennoch reduzierte sich nach einem hohen Niveau im ersten Monat die EPO-Expression konstant bis zum niedrigeren stationären Expressionsniveau.

*In vivo* Expressionsstudien der letzten Jahren haben gezeigt, dass es möglich ist, die Transfektionseffizienz eines pDNA-basierten EPO-Gentherapievektors zu erhöhen. Für seinen Einsatz in klinischen Studien sind jedoch weitere Optimierungen hinsichtlich der Expressionsdauer und Regulation notwendig.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Um den Einsatz von Plasmid-DNA (pDNA) in der Immunprophylaxe und Gentherapie zu ermöglichen, muss deren Nachteil, die sehr hohe Dosis, die erforderlich ist um eine effektive und langanhaltende Wirkung zu erzielen, beseitigt werden. CpG-Dinukleotide stellen in dieser Hinsicht ein geeignetes Werkzeug dar, um (i) die immunogenen Eigenschaften (Immunogenität, Mitogenität), (ii) die Höhe und (iii) die Dauer der Transgenexpression eines pDNA-Vektors modulieren zu können.

Dementsprechend sollte in dieser Arbeit der Beitrag von CpG-Motiven im Rückgrat von Plasmid-Vektoren hinsichtlich der Aktivierung der angeborenen Immunantwort und Bestimmung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen untersucht werden. Dabei sollte zunächst, ausgehend von einem kommerziellen, ausführlich beschriebenen Plasmid, durch sukzessive Entfernung von CpG-Dinukleotiden aus dem Vektor-Rückgrat, eine Reihe an pDNA-Vektoren generiert werden. Die anschließende immunologische Charakterisierung der generierten pDNA-Vektoren sollten Aufschluss über den Einfluss bisher unbekannter CpG-Motive bzw. DNA-Sequenzen hinsichtlich der Aktivierung der angeborenen Immunantwort, sowohl in murinen (*in vitro*) als auch in humanen Zellen (*ex vivo*) liefern.

Es ist bekannt, dass synthetische CpG-Oligonukleotide Zellen des angeborenen Immunsystems aktivieren und die Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen stimulieren. Eines der Ziele dieser Arbeit war deshalb zu untersuchen, ob dieser Adjuvanseffekt auch durch CpGs im Vektor-Rückgrat einer pDNA erzielt werden kann. Ein besonderes

Augenmerk galt dabei der Beteiligung von Toll-*like* Rezeptoren und der Untersuchung der aktivierten Signal-Kaskaden des angeborenen Immunsystems nach der Stimulierung von immunkompetenten Zellen mit pDNA.

Im Rahmen der pDNA-Entwicklung für den gentherapeutischen Einsatz sollte der Einfluss von CpG-Dinukleotiden innerhalb der kodierenden Region eines Gens auf die *in vitro* und *in vivo* Expression untersucht werden. Daher sollte zunächst ein therapeutisch relevantes Gen (Erythropoietin, EPO) mit unterschiedlichem Gehalt an CpG-Dinukleotiden sowie Kodonwahl-Optimierung hergestellt werden. Der Einfluss des intragenischen CpG-Gehaltes auf die Höhe und Dauer der *in vitro* Expression sowie die darin zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind unbekannt und standen daher im Fokus der vorliegenden Arbeit. Eine besondere Bedeutung sollte Untersuchungen der CpG-vermittelten Aktivierung der Transkription sowie der mRNA-Distribution in der Zelle zukommen.

Der Einfluss von CpG-Modifizierungen und der Kodonoptimierung auf die *in vivo* Expression von EPO sollte in Kombination mit der optimalen Applikationsmethode (*in vivo* Elektroporation) im Balb/c Mausmodell untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurden Varianten des EPO Gens in einen zuvor charakterisierten immunneutralen pDNA-Vektor (pRS) kloniert und auf die Höhe und Dauer der *in vivo* Expression getestet.

Die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit hinsichtlich der Aktivierung der angeborenen Immunität durch ein pDNA Vektor-Rückgrat sowie einer verbesserten Transgen-Expression sollen die Grundlagen für die Weiterentwicklung pDNA-basierter HIV-Vakzine Kandidaten der zweiten Generation liefern.

# Material und Methoden

## 2.1 Gentechnische Arbeitsmethoden

### 2.1.1 Bakterienstämme und Nährmedien

Die Klonierungsarbeiten wurden zum Großteil mit dem *Escherichia coli* (*E. coli*) K12-Bakterienstamm DH5 $\alpha$  [204] durchgeführt. Für die Gewinnung der Plasmidvektoren mit einem CpG-freien CMV-Promotor wurde der *E.coli* Bakterienstamm GM2163 verwendet, welcher sich von DH5 $\alpha$  im Wesentlichen durch eine Defizienz in der *dam* und *dcm* Methylierung unterscheidet. Für die Einführung von Punktmutationen mittels *QuickChange* wurde der im *QuickChange*-Kit enthaltene superkompetente Bakterienstamm XL1-Blue eingesetzt. Weiterhin wurde der Bakterienstamm GM169 verwendet.

**DH5 $\alpha$ :** F- ( $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* ( $r_k^-m_k^+$ )*supl*  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen)

**GM2163:** F- *dam-13: Tn9 dcm-6 hsdR2 leuB6 his-4 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 galT22 xyl-5 mtl-1 rpsL136 tonA31 tsc-78 supE44 McrA- McrB-* (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen)

**GM169:** *mutS453 dam-3 thr-1 ara-14 leuB6 del(gpt-proA) 62 lacY1 tsx-33 supE44 galK2 hisG4 metB1 rfbD1 mgl-51 rpsL260 kdgK51 mtl-1 thi-1 deoB16* (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen)

**XL1-Blue:** *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'* *proAB lacI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15 Tn10 (*Tet<sup>r</sup>*)] (Stratagene, Heidelberg)

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in *Luria Bertani* (LB-) oder *Terrific Broth* (TB-) Flüssigmedium bzw. auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37°C. Zur Selektion der positiven Transformanten wurde, dem verwendeten Plasmid entsprechend, Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) zugesetzt.

## Geräte

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsgüter mit den entsprechenden Herstellern sind an den jeweiligen Stellen im Text vermerkt.

### 2.1.2 Reagenzien

Reagenz	Hersteller (Ort)
Agarose	ICN, Biomedicals Inc. (Darmstadt)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	AppliChem (Darmstadt)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	Merck (Darmstadt)
Caseinpepton	Sigma (Deisenhofen)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Ethanol, absolut	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck (Darmstadt)
Fetales Kalbsserum (FKS/FCS)	Pan Biotech (Aidenbach)
Glukose	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin	Pan Biotech (Aidenbach)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Hydrogenperoxid	BD Pharmingen
Ionomycin	Sigma (Deisenhofen)
Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid (IPTG)	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )	Merck (Darmstadt)
3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma (Deisenhofen)
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck (Darmstadt)
NBT/BCIP-Stock Solution	Roche (Mannheim)
Penicillin/Streptomycin	Pan Biotech (Aidenbach)

2-Propanol	Merck (Darmstadt)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	BD Pharmingen
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma (Deisenhofen)
Trypton	Sigma (Deisenhofen)
Tween20	Sigma (Deisenhofen)

### 2.1.3 Plasmidvektoren

Als Ausgangsvektor für die Synthese CpG-reduzierter-synthetischer Vektoren diente der kommerziell erhältliche pcDNA5/FRT Vektor (Invitrogen, Karlsruhe). Für die Subklonierung einzelner, CpG-reduzierter Fragmente oder als Kontrolle bei verschiedenen Expressions- und/oder Immunologischen Tests wurden folgende Vektoren verwendet: pCR-Script™ SK(+)-Plasmid (Amp<sup>r</sup>) (Stratagene, Heidelberg), pUC 19 (New England Biolabs NEB, Schwalbach Taunus), pcDNA5/huGFP.

### 2.1.4 Oligonukleotide

Die im Anhang aufgeführten Oligonukleotide wurden als Startermoleküle (*Primer*) für PCR-Klonierung, PCR-Analyse (PCR-*Screening*), gerichtete Mutagenese oder für Sequenzierungen verwendet. Alle Oligonukleotide waren entsalzt und wurden in lyophilisiertem Zustand von den Firmen Metabion (Martinsried) oder Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

### 2.1.5 Synthetische Erythropoietin (EPO)- Gene

Die verschieden optimierten Erythropoietin-Gene wurden mit dem Programm GeneOptimizer™ unter Verwendung der Genbank-Sequenz durch die Geneart AG, Regensburg hergestellt. Ausgehend von der Wildtypsequenz (mEPOwt) wurde ein CpG-freies EPO-Gen (mEPOΔCpG) synthetisiert. Dabei wurden alle CpG-Dinukleotide aus der kodierenden Sequenz entfernt, ohne dass die Aminosäuresequenz von EPO verändert wurde. Durch Optimierung der Kodonwahl auf das murine Genom wurde mEPOopt hergestellt. Bei der Synthese von mEPOmax wurde die maximale Anzahl an CpG-Dinukleotiden in den Leserahmen eingefügt. Die Sequenzen der jeweiligen mEPO-Gene sind im Anhang aufgeführt.

### 2.1.6 Restriktionsenzyme

Für die Klonierungen wurden Enzyme mit den benötigten Puffern von den Firmen Roche (Mannheim) oder NEB (Schwalbach Taunus) verwendet.

### 2.1.7 Präparation von mEPO-Expressionsvektoren

Ausgehend vom kommerziellen pcDNA5 Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) wurde durch Deletion der FRT/Hygro Kasette ein neuer eukaryontischer Expressionsvektor (pRS) hergestellt (vgl. 3.2.1).

Für die Expressionsstudien wurden die synthetischen EPO-Gene unter Verwendung singulärer Schnittstellen (*Bam* HI/*Hind* III) in den pRS Vektor kloniert. Für die mEPO-RNA-Expression im MVA/T7 System (vgl. 2.2.3) wurden die mEPO Gene in den pCRScript Plasmid kloniert.

### 2.1.8 Standardisierte DNA-Klonierungstechniken

Für Klonierungen und zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden die oben aufgeführten *E.coli* Stämme verwendet. Zur Identifizierung korrekter Subklone wurden die Bakterienkolonien mittels PCR-Amplifikation (Taq PCR Master Mix, Qiagen, Düren) unter Verwendung spezifischer Primer analysiert. Zur Charakterisierung hergestellter Subklone wurde die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse in Gegenwart des Detergenz SDS isoliert [205]. Größere Mengen eukaryontischer Expressionsplasmide für Transfektionsanalysen konnten über Nucleobond-Tip AX100 oder AX500-Säulen nach Angaben des Herstellers gereinigt werden (Macherey und Nagel, Düren). Die für die *in vivo* Studien benötigte Endotoxin-freie DNA wurde unter Verwendung der Mega- (*Qiagen-Tip 2500*)-Säulen und des *EndoFree Kits* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers präpariert (vgl. 2.4.2). Der Endotoxin-Gehalt der DNA-Präparation wurde mit Hilfe des *Limulus Amebocte Lysate Kits* (Bio-Whittaker, Walkersville) nach dem Protokoll des Herstellers quantitativ ermittelt. Die Reinheits- ( $A_{260}/A_{280}$ ) und Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgte durch Messung des Adsorptionsspektrums ( $A_{230}-A_{300}$ ) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ( $1 \text{ OD}_{258} = 47,5 \text{ } \mu\text{g dsDNA/ml}$ ). Für analytische und präparative Zwecke wurde je  $1 \text{ } \mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit 10 U geeigneter Restriktionsendonuklease (Roche, Mannheim; NEB, Schwalbach Taunus) nach Angaben des Herstellers verdaut. Die Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarosegelelektrophorese ( $50 \text{ ng/ml}$  Ethidiumbromid) erfolgte in 1xTAE-Puffer ( $40 \text{ mM Tris-HCl}$ , pH 8,0;  $20 \text{ mM NaAc}$ ;  $2 \text{ mM EDTA}$ ). Die Isolierung definierter DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurde nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des „*QIAquick Gel Extraction*“-Kits, die Aufreinigung von DNA nach Restriktionen und PCR-Amplifikationen mit Hilfe des „*QIAquick Purification*“-Kit (Qiagen) durchgeführt.

Nach dem Einführen von Deletionen in Plasmid-DNA über *Pfu*-PCR und Linearisieren des Plasmides nach *Dpn* I Verdau waren Phosphatgruppen an den 5'-Enden für eine nachfolgende Ligation erforderlich. Da die T4-DNA-Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann, wird durch die Behandlung gespaltener Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase eine Rezirkularisierung des Vektors bei der Ligationsreaktion vermieden, wodurch der Anteil rekombinanter Plasmide im Ligationsansatz steigt. Zur kovalenten Verknüpfung von Vektor - und Insert- DNA wurden diese im Verhältnis 1:3 bis 1:10 (nach Angaben des Herstellers) mit je 10 U T4-Ligase durchgeführt (NEB).

Die Transformation von 1 µg Plasmid-DNA bzw. 10 µl des Ligationsansatzes in transformationskompetente Bakterien, hergestellt nach der RbCl-Methode, erfolgte durch die „Hitze-Schock“ Methode bei 42°C. Die Amplifikation definierter DNA-Fragmente wurde unter Verwendung der *Taq-Precision* mit allgemeinen PCR-Techniken sowie nach Angaben des Herstellers (Stratagene) durchgeführt. Das Enzym besitzt eine 3'-5'Exonuklease Aktivität („*proof-reading*“), wodurch eine fehlerfreie Amplifikation gewährleistet wird. Die Einführung von Sequenzveränderungen in doppelsträngige Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des „*QuickChange SiteDirected Mutagenesis*“- Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Stratagene) (vgl. 2.1.10). Die Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotide sind an entsprechenden Stellen verzeichnet. Alle Klonierungen und eingeführten Mutationen wurden durch Sequenzanalysen nach der Methode von Sanger [206] bei Geneart AG überprüft. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der SeqMan-Software (DNASar). Zur Sequenzierung wurden die Vektor- bzw. Insert- spezifischen Oligonukleotide (siehe Anhang) verwendet.

### 2.1.9 Spezialisierte DNA-Klonierungstechniken

Für die Klonierung sämtlicher CpG-modulierter DNA-Vektoren und sequenzspezifischer Mutanten wurden neben standardisierten auch einige spezialisierte DNA-Klonierungstechniken angewendet.

#### 2.1.10 *QuickChange* Mutagenese

Eine Methode, um Punktmutationen in ds-pDNA einzuführen, ist die *QuickChange* Mutagenese nach dem Protokoll des Stratagene *Site-Directed Mutagenesis* Kit. Dabei werden zwei komplementäre synthetische Oligonukleotide, welche die gewünschte Mutation tragen, durch die *Pfu* Turbo DNA-Polymerase in einer PCR entlang des gesamten Plasmidrückgrates verlängert. Die Inkorporation der Oligonukleotide generiert folglich ein mutiertes Plasmid. Im Folgenden wird der Ansatz mit *Dpn* I (Schnittstelle: 5'-Gm6ATC-3', ebenfalls Sequenz für *dam*-Methylierung) geschnitten, das spezifisch methylierte und

hemimethylierte DNA erkennt und somit das unerwünschte parentale DNA-*template* verdaut. Übrig bleibt die mutierte pDNA, die anschließend in superkompetente XL1-Blue Zellen transformiert wird.

### 2.1.11 Primer Annealing

Zur Herstellung einiger Mutanten wurde das Verfahren des *Primer Annealing* verwendet, indem zwei komplementäre Primer über etwa 35 bp hybridisiert werden. Beiden wurde jeweils am 5'-Ende eine *Bgl* II-Schnittstelle angefügt, mittels derer der kurze Doppelstrang dann in die gewünschte Stelle im Vektorrückgrat kloniert werden konnte.

Der *Annealing*-Ansatz wurde in einem Metallblock eine Minute bei 95°C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Die Überprüfung der Reaktion erfolgte auf einem analytischen Agarosegel.

## 2.2 Biochemische und Zellkultur-Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> und bei einer Temperatur von 37°C kultiviert. Als Standardmedium für adhärente eukaryontische Zellen wurde Dullbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, PAN, Heidenheim), Penicillin (100 U/ml, PAN) und Streptomycin (100 µg/ml, PAN) verwendet. Die eukaryontischen Suspensionszellen wurden in RPMI-1640 Medium (PAN) mit FKS (10%), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) kultiviert. Alle für die Zellkultur verwendeten Chemikalien waren speziell für die Zellkulturen getestet und wurden von Invitrogen (Karlsruhe), BD (Heidelberg) oder SIGMA (Deisenhofen) bezogen. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und deren Beschreibung findet sich in Tabelle 2-1.

Bezeichnung	Herkunft	Beschreibung
H1299	human	P53-negative Lungenkarzinomzellen (Mitsudomi, 1992)
293T	human	Ad5/SV40 (T) transformierte Nierenepithelzellen (Numa, 1995) (ATCC: CRL-11268)
3T3-NIH	murin	murine embryonale Fibroblasten (Westerman, 1996)

**Tabelle 2-1: Verwendete eukaryontische Zelllinien**



### 2.2.2 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen

Zur transienten Expression entsprechender Proteine in eukaryontischen Zellen wurden  $1,5 \times 10^6$  bzw.  $2,5 \times 10^5$  eukaryontischer Zellen in Petrischalen (Fläche: 58,95 cm<sup>2</sup>) bzw. 6-Napf-Schalen (Fläche: 9,6 cm<sup>2</sup>) ausgesät und 24 h später durch Calciumphosphat-Präzipitation (Graham & van der Eb, 1973) mit 45 µg (Petrischalen) bzw. mit 15 µg (6-Napf-Schalen) Plasmid-DNA transfiziert.

Mindestens 1 Std. vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Für die Transfektion der Zellen in einer Petrischale wurden 45 µg gereinigte Plasmid-DNA mit 90 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> in einem Volumen von 900 µl vereint und unter Vortexen tropfenweise zu 900 µl 2 x HeBS (*HEPES buffered saline*)-Puffers (8,2 g NaCl, 5,95 g HEPES, 0,105 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> und pH 7,05) pipettiert. Während des 20-minütigen Inkubationschrittes bei Raumtemperatur (RT) bildete sich das Präzipitat aus, das auf die zu transfizierenden Zellen gegeben wurde. Das Medium wurde nach 8-16 h abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. In der Regel wurden die Zellen bzw. der Zellkulturüberstand 48 h nach Transfektion geerntet. Für Transfektionen in kleineren 6-Napf-Schalen wurden die eingesetzten Mengen entsprechend verringert, z.B. wurde in 6-Napf Zellkulturschalen (Ø 3 cm;  $3 \cdot 10^5$  Zellen/3 ml Medium) ein Drittel des oben beschriebenen Transfektionsansatzes verwendet.

Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen, wurden die 3T3-NIH Zellen 1 h vor der Transfektion mit 25 µM Chloroquin behandelt. MVA/T7-infizierte 293T-Zellen wurden mit Hilfe von *Fugene<sup>TM</sup> 6 Transfection reagent* (Roche) mit 1 µg Plasmid-DNA nach Herstellerangaben transfiziert.

### 2.2.3 MVA-T7 Infektion von permissiven Zellen

Ein hochtitriger *stock* rekombinanter MVA-T7-Vakziniaviren wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Gerd Sutter (Erlangen) zur Verfügung gestellt. Nach MVA-T7-Infektion von permissiven Säugerzellen stellen diese im Zuge der viralen Genexpression rekombinant die T7-Polymerase her.

$4,0 \times 10^5$  293T-Zellen wurden in einer 6-Napf Platte ausgesät und 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml serumfreien Medium mit MVA-T7 MOI 1 infiziert und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurden die MVA-T7-infizierten Zellen mit T7-kodierenden pDNAs mit Hilfe des *Fugene<sup>TM</sup> 6 Transfection reagent* (Roche) nach Herstellerangaben transient transfiziert. Nach 24 h Inkubation (37°C) in serumhaltigem Medium wurden die Zellen geerntet.

## 2.2.4 Analyse der transienten Proteinexpression

### 2.2.4.1 Ernte und Aufschluss der Zellen

Zur Analyse der Genexpression wurden die transfizierten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach mehrmaligem Waschen des Zellrasens mit PBSohne in 1-2 ml PBSohne (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) abgeschabt, abgespült oder mit 0,5 ml Trypsin abgelöst. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation (300 x g; 5 min; 4°C) in 100-400 µl „triple-detergent“ RIPA-Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% SDS (w/v); 1% Nonidet-40 (w/v); 0,5% Na-Deoxycholat (w/v)), der zuvor mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail, Complete™ (Roche, Mannheim), versetzt worden war, resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min (4°C) und anschließender Zentrifugation (20.000 x g, 15 min, 4°C) wurde das Zelllysate in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (Lagerung: -20°C). Die Zellüberstände wurden quantitativ geerntet und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (Lagerung: -20°C). Die Gesamtproteinmenge der Zelllysate und der Überstände wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben bestimmt.

### 2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Zur Analyse der Proteinexpression wurden die Zelllysate und Überstände mit 5 x SDS Probenpuffer (312,5 mM Tris-HCl; pH 6,8; 5% SDS; 25% β-Mercaptoethanol; 2,5 mM EDTA; 25% Glycerin; 0,0125 % Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. I.d.R. wurden gleiche Mengen an Gesamtproteinmengen (z.B. 40 µg) der zu untersuchenden Zelllysate entsprechend ihrem Molekulargewicht über ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) aufgetrennt [207]. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend unter Verwendung einer „SemiDry-Blotting“-Apparatur nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad, München) aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm) (Schleicher & Schuell, Dassel) in Transferpuffer (25 mM Tris; 150 mM Glycin; 10% MeOH; 0,1% SDS) überführt [208]. Zur Kontrolle des Transfers bzw. zum Anzeichnen des Molekulargewichtsstandards (Bio-Rad, München) wurden die Proteine reversibel mit Ponceau S (0,5 g Ponceau S; 25 ml Eisessig auf 500 ml H<sub>2</sub>O) angefärbt. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer (5% Magermilchpulver in TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl)). Anschließend wurden die Proteine spezifisch mit Hilfe in TBS-Puffer verdünnter Primär-Antikörper bzw. Alkalische-Phosphatase (AP)-konjugierter, sekundärer Antikörper (vgl. Tabelle 2-2) nach herkömmlichen Methoden detektiert und analysiert [209]. Die Antikörper-Antigen-Komplexe auf den Membranen wurden über AP-Färbung (Roche, Mannheim) in AP-Färbepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl) nach Herstellerangaben detektiert.

### 2.2.4.3 Quantifizierung der mEPO Expression durch ELISA

Durch den EPO-Immunoassay (Quantikine-Kit, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) kann die EPO-Expression in Zellysaten, Zellkulturüberständen oder im Serum quantifiziert werden. In die mit dem monoklonalen Primärantikörper beschichtete Mikrotiterplatte wurden 100 µl der Standard-, Proben- bzw. Kontrolllösungen in den jeweiligen Verdünnungen in *Calibrator Diluent* (Zellysate und Überstände 1:10000 und 1:50000, Mausseren 1:2) zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei RT (unter Schwenken bei 500 rpm) und anschließendem 5-maligen Waschen wurde 100 µl Epo-Konjugat (vgl. Tabelle 2-2) pro Napf zugegeben, welches wiederum für 2 h bei RT und 500 rpm inkubiert wurde. Nach wiederholtem Waschen (5x) wurden die Antikörper-Protein-Komplexe unter Verwendung von je 100 µl TMB-Substratlösung (BD, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers detektiert. Nach geeigneter Einwirkzeit wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von 100 µl 0,5M Salzsäure unterbrochen. Die Adsorptionsmessung erfolgte im ELISA-Reader (Bio-Rad, München) bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Beschreibung
anti m-EPO	R&D Systems	Kit Komponente, bereits <i>gecoatet</i>	primär, Ziege, monoklonal mEPO, biotinyliert
anti-mouse EPO Konjugat	R&D Systems	Kit Komponente, bereits <i>gecoatet</i>	sekundär, monoklonal mEPO, HRP-konjugiert
Streptavidin-AP Konjugat	Roche	1: 10000	sekundär

**Tabelle 2-2: Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper**

## 2.3 RNA-Methoden

### 2.3.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen wurden beim Arbeiten mit RNA ausschließlich sterile, gestopfte Pipettenspitzen sowie sterile Plastikpipetten verwendet. Alle Apparaturen und Gefäße wurden zuvor mit RNase Away (Invitrogen, Karlsruhe) oder 0,1% SDS-Lösung gründlich gereinigt. Alle Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O hergestellt und durch Autoklavieren oder Filtration sterilisiert. Dazu wurde 1 ml/l DEPC (Sigma, Deisenhofen) zugegeben, mindestens 12 h inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der kanzerogenen Chemikalie autoklaviert. Die meisten Arbeitsschritte,

insbesondere die Gelelektrophorese, wurden aus Sicherheitsgründen unter einem Digestorium durchgeführt.

### 2.3.2 Aufreinigung der RNA

Die zu analysierenden RNAs wurden aus unterschiedlichen Ausgangsmaterialien aufgereinigt. Entsprechend wurden die verschiedenen Isolierungsprotokolle optimiert bzw. angewendet.

### 2.3.3 RNA-Aufreinigung mit RNAeasy-Protokoll

Die Isolierung von RNA nach transienten Transfektionen eukaryontischer Zellen erfolgte in der Regel mit dem RNAeasy-Protokoll (Qiagen). Die Zellen wurden zunächst in Petrischalen bzw. 6-Napf-Schalen ausgesät und transfiziert. Nach 48 h wurde der Zellrasen nach einmaligem Waschen durch Spülen mit PBS<sub>ohne</sub> abgelöst und zentrifugiert (300 x g; 5 min; 4°C). Das Zellpellet wurde durch Zugabe von 175 µl RLN-Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 140 mM NaCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5% NP-40) partiell lysiert und die lösliche, zytoplasmatische Fraktion wurde durch anschließende Zentrifugation (300 x g; 2 min; 4°C) von der unlöslichen nukleären Fraktion abgetrennt. Die pelletierten Zellkerne wurden nachfolgend durch Zugabe von 350 µl RLT Puffer vollständig lysiert. Die Isolierung und Aufreinigung der RNA aus der zytoplasmatischen (C) bzw. nukleoplasmatischen (N) Fraktion wurden unter Verwendung des „*RNAeasy-Mini Kits*“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die präparierte RNA wurde anschließend in RNase-freiem Wasser (30-50 µl) aufgenommen, und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurde durch Messung des Adsorptionsspektrums (230-300 nm) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt.

### 2.3.4 RNA-Aufreinigung mit Tri-Reagent

Für die Isolierung von Gesamt-RNA mit erwartungsgemäß kleiner Ausbeute (*Nuclear Run-On* Assay, Gewebe-RNA) wurde das Aufreinigungsprotokoll mit Hilfe des Tri-Reagents und Phasenseparation optimiert. Die Zellen wurden zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 1-2 ml Tri-Reagent (Sigma, Taufkirchen) pro 10 cm<sup>2</sup> versetzt und durch wiederholtes Pipettieren homogenisiert. Die Entfernung von Zelltrümmern erfolgte durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 12000 x g. Der Überstand wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Chloroform (ohne Isoamylalkohol) versetzt und kräftig geschüttelt. Nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte die Phasentrennung durch 30-minütige Zentrifugation bei 2600 x g und 4°C. Die wässrige obere Phase wurde in ein Reaktionsgefäß (2 ml oder 15 ml Reaktionsgefäß) überführt, anschließend wurde 2,5 ml Isopropanol dazugegeben und kräftig

geschüttelt. Die RNA-Präzipitation erfolgte entweder nach 10-15 min Inkubation oder am nächsten Tag durch 45-minütige Zentrifugation bei 2600 x g und 4°C. Das RNA-Pellet wurde nach zweimaligem Waschen mit 75% Ethanol in RNase-freiem Wasser (30-50 µl) aufgenommen.

### 2.3.5 Northern Blot

Gleiche Mengen der aus den Zellen und Gewebe isolierten und gereinigten RNA (1-2 µg) wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht, mit 5x RNA-Auftragspuffer (8 mM EDTA; 4x MOPS-Laufpuffer; 2,7% Formaldehyd; 20% Glycerin; 30,8% Formamid; 0,4% Bromphenolblau; 0,2% Xylencyanol) versetzt, aufgekocht (65°C, 10 min) und danach auf Eis (4°C) inkubiert. Anschließend wurde die RNA auf einem 1-1,5%igen Formaldehydgel (1-1,5% Agarose; 1x MOPS-Laufpuffer (0,4 M MOPS; 10 mM EDTA; 0,1 M NaAc; pH 7,0)) elektrophoretisch aufgetrennt (100-150 V, 1-2 h). Als Standard wurden 2 µl eines 0,2-10 kb RNA-Markers (Sigma) aufgetragen. Das Gel wurde darauffolgend 3 x 20 min mit DEPC-Wasser gewaschen, 20 min in 0,05 N NaOH und 45 min in 20x SSC-Puffer (3 M NaCl; 0,3 M Na<sub>3</sub>-Citrat; pH 7,0) inkubiert. Die Übertragung der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne Plus; Pall, Dreieich) erfolgte ÜN (16-20 h) mittels Kapillarkraft (Northern Blot). Als Transferpuffer wurde 20x SSC-Puffer verwendet. Nach dem Transfer wurde die Membran 5 min mit 5x SSC-Puffer gewaschen, bei RT getrocknet (10 min) und die RNA durch UV-Behandlung (1200kj, 1 min) im Stratalinker (Stratagene) auf der Membran fixiert (*cross-linking*). Um hohe Hintergrundsignale zu vermeiden, wurde danach die Membran in DEPC-Wasser eingelegt. Die ribosomale RNA wurde anschließend unspezifisch und reversibel angefärbt (0,3% Methylenblau; 0,03%) NaAc und der Kontrast mit H<sub>2</sub>O verschärft. Anschließend wurde der Standard angezeichnet sowie die Laufhöhe der 18S (1,9 kb) und 28S (4,7-5,0 kb) RNA markiert und die Membran zur internen Kontrolle fotografiert. Zur Detektion spezifischer RNAs wurde die Membran zunächst in speziellen Hybridisierungsgefäßen (Biometra, Göttingen) in 50 ml Prähybridisierungspuffer (20 x SSPE (3 M NaCl; 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O; 20 mM EDTA; pH 7,4); 50% Formamid; 5% 100x Denhardts Reagenz (2% Ficoll-400; 2% Polyvinylpyrrolidon; 2% BSA, steril filtriert); 0,5% SDS; 0,4 mg/ml tRNA (Roche, Mannheim)) 2 h bei 68°C im Überkopfschüttler prä-inkubiert. Im Anschluß wurde der Prähybridisierungspuffer verworfen und durch die gleiche Menge Hybridisierungspuffer mit denaturierter (68°C, 10 min), spezifischer DIG-markierter Sonde ersetzt und im Überkopfschüttler inkubiert (16 h, 68°C). Die Membranen wurden anschließend 2 x nicht stringent (2 x 10 min, 68°C, 2 x SSC; 0,1% SDS) und danach 3 x stringent (3 x 15 min, 68°C, 0,2 x SSC; 0,1% SDS) gewaschen. Die Membran wurde anschließend erst für 2 min (RT) unter Schütteln in Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 0,3% Tween-20), danach für mindestens 30 min (RT) unter Schütteln in Blockierlösung

(0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 1% *Blocking Reagenz* (Roche, Mannheim)) inkubiert. Die Blockierlösung wurde verworfen und die Membran für 30 min (RT) in Antikörperlösung (Anti-DIG-Antikörper AP-konjugiert 1:10000 in Maleinsäurepuffer; 1% *Blocking Reagenz*) geschüttelt. Anschließend wurde die Membran 2 x 15 min mit Waschpuffer gewaschen und in Detektionspuffer (2-5 min) equilibriert. Zur Detektion wurde die Membran in Klarsichtfolie eingelegt, mit Substratlösung (CDP-Star RTU-Lösung, TROPIX, Bedford, MA, USA) beträufelt und 5 min inkubiert. Die spezifische RNA wurde durch Chemolumineszenz detektiert (KODAK Biomax MR, Amersham).

### 2.3.6 *In vitro* Transkription zur Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden

Nichtradioaktive DIG-markierter Sonden wurden durch *in vitro* Transkription unter Verwendung des *Riboprobe in-vitro Transcription Systems* (Promega, Madison, USA) unter Beachtung der Herstellerangaben hergestellt. Mittels PCR wurde DIG-11-dUTPs (Roche, Mannheim) in die Sonde eingebaut. Als *template* wurden jeweils 100 ng des entsprechenden Plasmids eingesetzt (vgl. Tabelle 2-3).

Sonde	Plasmid	~Länge (nt)	Primer (5' → 3')
BGH-poly(A)	pcDNA5/FRT	200	BGH_Pf: CTTAGAGCTCCAGTGTTTAAACCTGTGCCTTCTAGTTGCCAG
			mEPOwt_Pb_T7: TAATACGACTCACTATAGGGGGATCCTCATCACCTGTCCC
			mEPOΔCpG_Pb_T7: TAATACGACTCACTATAGGGGGATCCTCATCACCTGTCCC
			mEPOopt_Pb_T7: TAATACGACTCACTATAGGGGGATCCTCATCATCTGTGCGC
			mEPOmax_Pb_T7: TAATACGACTCACTATAGGGGGATCCTCATCACCGGTCGC
β-Aktin	pGEM <sub>3</sub> -Aktin	500	Pf: TGA CTGGGCACAACAGACAA Pb: ATTCGGCAAGCAGGCATCGC

**Tabelle 2-3: Auflistung der für die Herstellung DIG-markierter Sonden verwendeten Plasmide und Primer.** Ebenfalls angegeben die Länge der hergestellten Sonden.

Nach gelelektrophoretischer Kontrolle der PCR-Produkte wurden diese über „*PCR-purification*“ Säulchen (Qiagen) aufgereinigt und bei -80°C gelagert.

### 2.3.7 Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR) und RNA-Quantifizierung mit Realtime-PCR

Für die Reverse Transkription (RT) wurden 20 µg gereinigte RNA zunächst mit 5 µl (10 U/µl) DNase I (Roche, Mannheim) für 1 h (37°C) verdaut, anschließend wurde die DNase I inaktiviert (95°C, 10 min). 1-2 µg DNA-freie RNA (Kontroll-PCR) wurden für die RT-Reaktion nach Angaben des Herstellers (Roche) eingesetzt.

Die Quantifizierung der revers transkribierten RNA erfolgte durch das „*LightCycler*“ System 1,2 (Roche) unter Verwendung des „*LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I*“ Kits (Roche) oder des DyNAmo™ Capillary SYBR<sup>(R)</sup> Green qPCR Kit (Finnzymes, Vertrieb über NEB, Schwalbach Taunus) nach Herstellerangaben. *Real-time*-PCR Protokolle wurden hinsichtlich der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der mEPO und β-Aktin spezifischen *primer* adaptiert (vgl. Tabelle 2-4). Alle *Realtime*-PCR-Reaktionen wurden für die Auswertung mittels relativer Quantifizierung (Rel. Quant.) entworfen. Die relative Expressionsrate (Ratio) wurde mit der folgenden Formel ermittelt [210]:

$$\text{Ratio} = \frac{[(E_{\text{Probe}})^{\text{CPKontrollgen-CPProbe}}]_{(\text{Zielgen})}}{[(E_{\text{Referenz-Gen}})^{\text{CPKontrollgen-CPProbe}}]_{(\text{Referenz-Gen})}}$$

(E: Effizienz, CP: *crossing point*)

Die RNA-Expression der Zielgene (mEPO<sub>opt</sub>, mEPO<sub>max</sub> and mEPOΔCpG) wurde relativ zum Kontrollgen (mEPO<sub>wt</sub>) quantifiziert und auf das ubiquitinär exprimierenden Haushaltsgen β-Aktin normalisiert.

Primer	Sequenz
LCmEPO <sub>wt</sub> Pf	5'-CTGCGACAGTCGAGTTCTGGAG-3'
LCmEPO <sub>wt</sub> Pb	5'- CTTCTGAGAGCAGGGACAGGCC-3'
LCmEPO <sub>del</sub> CpGPf	5'-CTGTGACAGTAGAGTTCTGGAG-3'
LCmEPO <sub>del</sub> CpGPb	5'-CTTCTGAGAGCAGGGACAGGCC-3'
LCmEPO <sub>opt</sub> Pf	5'-CTGTGACAGCAGGGTGCTGGAG-3'
LCmEPO <sub>opt</sub> Pb	5'-CCTCGGACAGCAGGCTCAGGCC-3'
LCmEPO <sub>max</sub> Pf	5'- CTGTGACAGCCGGGTGCTCGAG-3'
LCmEPO <sub>max</sub> Pb	5'- CCTCGCTCAGGAGCGACAGGCC-3'
β-actinPf	5'- GGTGGGCATGGGCCAGAAGG-3'
β-actinPb	5'- GATGGGCACAGTGTGGGTGAC-3'

**Tabelle 2-4: Die für die Realtime-PCR verwendeten Primersequenzen**

### 2.3.8 Nuclear Run-On Assay

Der „*Nuclear Run On*“-Assay wurde nach dem von Patrone *et al.* beschriebenen Verfahren unter Verwendung Streptavidin-gekoppelter *Dynabeads M-280* (Dynal, Oslo) durchgeführt [211]. Zunächst wurden  $3 \times 10^7$  transient transfizierte 293T-Zellen geerntet und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das resultierende Pellet wurde in 4ml Lysepuffer (0,5% NP-40, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 3 mM  $MgCl_2$ , 10 mM NaCl und 150 mM Succrose) resuspendiert und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Kerne vom Überstand durch Zentrifugation bei 4°C abgetrennt (200 x g, 2 min) und mit Lysepuffer ohne NP-40 gewaschen. Die erneut sedimentierten Kerne (200 x g, 2 min) wurden in 200 µl Glycerinpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.3, 5 mM  $MgCl_2$ , 0.1 mM EDTA, 40% Glycerin) aufgenommen und auf Eis gehalten. Weiter wurden 100 µl präparierten Kerne mit 100 µl Volumen 2 x Transkriptionspuffer (200 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM  $MgCl_2$ , 4mM DTT, je 4 mM ATP, GTP and CTP, 200 mM Succrose und 20% Glycerin) versetzt und 6,25 µl Biotin-16-UTPs eines 10 mM Tetralithiumsalzes (Roche) zu der Mischung gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation des Reaktionsgemisches bei 29°C wurden 6 µl 250 mM  $CaCl_2$  sowie 6 µl RNase-freier DNase I (10 U/µl; Roche) zugegeben (10 min, 29°C), um die Reaktion zu stoppen. Die folgende Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mittels der Tri-Reagent Protokolls (vgl. 2.3.4). Die erhaltene RNA wurde in 50 µl RNase-freiem  $H_2O$  aufgenommen. 50 µl der „*Run on*“-RNA wurden mit dem gleichen Volumen in Bindepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA and 2 M NaCl) gelöster *Dynabeads M-280* (Dynal) versetzt und 20 min bei 42°C sowie 2h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Dynabeads mittels der magnetischen Apparatur (Dynal) separiert und zweimal 15 min mit 500 µl 15% Formamid und 2 x SSC gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 ml 2 x SSC (5 min) wurden die Dynabeads in RNase-freiem  $H_2O$  gelöst. Je 3-5 µl der so erhaltenen RNA wurden nach DNase I-Behandlung als Matrize in eine RT-PCR eingesetzt und die resultierende cDNA durch *Realtime*-PCR relativ quantifiziert (vgl. 2.3.7).

## 2.4 Tierexperimentelle Arbeitstechniken

### 2.4.1 Versuchstiere und Haltung

Sowohl zur Untersuchung der immunogenen Eigenschaften der hergestellten pDNA Konstrukte als auch zur Untersuchung der *in vivo* Expression für gentherapeutische Ansätze wurden weibliche Mäuse (Charles River, Sulzfeld) im Alter von 40-45 Tagen der Inzuchtrassen Balb/cAnNCrl (H-2<sup>d</sup>) verwendet. Männliche TLR9-*knockout*-Mäuse auf Balb/c-Basis wurden von Prof. Dr. Werner Falk (Institut für Innere Medizin I, Universitätsklinik



Regensburg) bezogen. Die Tiere wurden unter Standard Bedingungen in der Tierversuchsanlage H4 des Universitätsklinikums Regensburg gehalten.

### 2.4.2 Präparation Endotoxin-freier Plasmid-DNA

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch immunaktivierende, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) wurde die bakterielle Plasmid-DNA für immunologische *ex vivo*- und gentherapeutische *in vivo*-Studien im Mega-Maßstab unter Verwendung des „*Endotoxin-free DNA preparations*“-Kit nach Angaben des Herstellers präpariert (Qiagen) und in einer Konzentration von 1 µg/µl in sterilem PBS<sub>ohne</sub> aufgenommen. Der Endotoxingehalt der DNA-Präparation wurde mit Hilfe des *Limulus Amebocte Lysate* Kits (Bio-Whittaker, Walkersville) nach dem Protokoll des Herstellers quantitativ ermittelt.

### 2.4.3 *In vivo* Elektrogentransfer

Grundlage des *in vivo* Elektrogentransfers ist die Elektroporation, eine physikalische Methode, um die Zellmembran reversibel permeabel zu machen, um so pDNA in die Zielzellen einzuschleusen [212]. In der vorliegenden Arbeit wurden der Elektroporator: ECM 830 (*Electro Square Porator* BTX, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA) und 2 Nadel-*Array Tips* (MP Biomedicals, Solon, USA) verwendet. Der Elektroporator hat eine Spanne von 5-500 V mit einer Auflösung von 1 V. Die 2 Nadel-*Array Tips* haben einen Abstand von 5 mm und eine Länge von jeweils 1,5 cm.

Zunächst wurden die Tiere mittel des Inhalationsnarkotikums Isoflurane (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether; Abbott, Wiesbaden) betäubt und anschließend an beiden Hinterbeinen rasiert. In jeden *Tibialis anterior* Muskel wurden 50 µl der entsprechend konzentrierten, endotoxinfreien pDNA in PBS injiziert. 30 Sekunden nach der Injektion wurden die Elektroden in longitudinaler Ausrichtung in den Muskel eingeführt, so dass sich die Einstichstelle in der Mitte der Elektroden befand. Es erfolgten 8 *square wave* LWLV-Impulse (LWLV; Low voltage ≤50 V/cm, long width (ms) 50ms) in 1 Sekunden Intervallen, wobei nach vier Impulsen jeweils umgepolt wurde [212].

### 2.4.4 Serumgewinnung

Zur Bestimmung der EPO-Konzentration im Serum (vgl. 2.2.4.3) wurde den Tieren zu den angegebenen Zeiten Blut entnommen. Die Blutentnahmen (100-500 µl) wurden durch Erwärmen der Mäuse mittels einer Rotlichtlampe (5-10 min) erleichtert und erfolgten durch Anritzen der Schwanzvene mit einem sterilen Skalpell. Zur Serumgewinnung wurde das Blut 1 h bei 37°C bzw. 1 h bei 4°C (Agglutination der Blutzellen) inkubiert und der Überstand nach

zweimaliger Zentrifugation (5200 x g; 4°C; 10 min) als Serum gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

## 2.5 Hämatologische Methoden

### 2.5.1 Bestimmung des Hämatokritwertes

Die Bestimmung des Hämatokritwertes im Blut der pDNA-injizierten Tiere erfolgte mittels der Mikrohämatokrit-Zentrifugationsmethode. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mit einem sterilen Skalpell die Mausschwanzvene angeritzt und unmittelbar danach die vorheparinisierten Mikrohämatokrit-Kapillaren (Hermle Labortechnik, Wehingen) mit ca. 60 µl Blut befüllt. Diese wurden mit dem Versiegelungsskit (Hermle) an einer Seite verschlossen und in einer speziellen *high speed* Hämatokrit-Zentrifuge (Haemofuge – Heraeus Sepatech GmbH) abzentrifugiert (10.000 x g, 5 min). Mit Hilfe einer Hämatokrit-Ablese-Harfe konnten die jeweiligen Werte ermittelt werden. Die Hämatokrit-Bestimmung erfolgte in Doppelansätzen, wobei sich die ermittelten Werte für einen signifikanten Hämatokritwert nicht mehr als 3% voneinander unterscheiden dürfen.

### 2.5.2 Bestimmung des Hämoglobin-Wertes

Die Ermittlung der Hämoglobin-Konzentration im Blut der behandelten Tiere erfolgte zu analogen Zeitpunkten wie die Bestimmung der mEPO-Konzentration (vgl. 2.2.4.3) und des Hämatokritwertes (vgl. 2.5.1). Die Mausschwanzvenen wurden mit einem sterilen Skalpell angeritzt und die Spitze der Mikroküvette (HemoCue AB, Sweden) in einen Tropfen Blut eingetaucht. Die Küvette füllt sich automatisch durch Kapillarwirkung mit dem erforderlichen Volumen. Die so gefüllte Küvette wurde dann in den Küvettenhalter des HemoCue Hb201+ Photometers eingelegt und der Hämoglobinwert nach ca. 45 Sekunden abgelesen. Die Präzision der Apparatur wurde durch wiederholte Messungen der Kontrolllösung  $\pm 0,6$  g/dl HemoTrol Normal and HemoTrol High (Eurotrol B.V., The Netherlands) gewährleistet.

## 2.6 Immunologische Methoden

### 2.6.1 Präparation von Milzen und Isolierung muriner Splenozyten

Für Untersuchungen zur Aktivierung der angeborenen Immunantwort durch verschiedene pDNAs wurden isolierte Milzzellen von BALB/c Mäusen benötigt. Die Versuchstiere wurden durch Genickbruch getötet, die Milzen unter sterilen Bedingungen entnommen und in 5 ml/Milz Komplett-Medium (RPMI-1640-Medium, supplementiert mit 5% FKS, 1%

Penicillin/Streptomycin, 50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol und 1% Glutamin) überführt. Zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen wurden die Milze unter möglichst sterilen Bedingungen (Sterilbank) mit Hilfe eines Stempels (5 ml Spritze) vorsichtig durch ein Nygonsieb (Falcon, Heidelberg, 100  $\mu$ m Porengrösse) in eine Petrischale zerrieben. Die Milzzellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon zurückgeführt und bei RT mit 300 x g 5 min in einer Tischzentrifuge pelletiert. Zur Entfernung der Erythrozyten (Hämolyse) wurde das Pellet in Lysepuffer (150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 7,2; 5 ml Puffer/Milz) aufgenommen und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das anschließende dreimalige Waschen in 50 ml PBS/5% FKS diente der Entfernung des freigesetzten Hämoglobins. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Lebendzellzahl durch Anfärbung mit Trypanblau (0,4% Trypanblau/PBS) bestimmt und die Zellzahl durch Zugabe von Komplett-Medium auf  $2 \times 10^7$  /ml eingestellt.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank gehalten. Auf diese Weise wurden je nach Grösse der Milz bis zu  $10^8$  Zellen gewonnen.

### 2.6.2 Aufreinigung humaner PMBCs

Als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung der Zell-Subpopulationen des Immunsystems dienten humane mononukleare Zellen aus peripherem Blut (PBMCs). PBMCs wurden mittels Ficoll-Paque Dichtegradientenzentrifugation [213] aus angereicherten Leukozytenfraktionen (Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg) isoliert. Als Lymphozytentrennmedium wurde eine Ficoll (Pancol) Lösung (Amersham, München) verwendet. Zunächst wurden 15 ml Ficoll (Pancol) Lösung bei RT in einem 50 ml LEUCO SEP (Greiner, Frickenhausen) Röhrchen unter der Trennscheibe abzentrifugiert. Die Leukozytenfraktion wurde mit P2-Puffer (1 x PBS ohne steril, 2% FKS) mindestens 1:1 verdünnt und die LEUCO SEP bis 50 ml befüllt.



**Abb. 2.1: Durchführung der PMBCs-Isolierung mittels Leucosep®**

a: Plasmaschicht, b: PBMCs / Lymphozyten, c: Separationsmedium, d: Trennscheibe, e: Sep. Medium, f: Pellet (Erythrozyten, Granulozyten usw.). Übernommen von Greiner Bio-One (Frickenhausen)

Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei 1000 x g für 30 min ohne Bremse. Granulozyten, Erythrozyten und tote Zellen setzten sich dabei als unterste Schicht ab.

Aufgrund ihrer geringeren Dichte verblieben die Lymphozyten zusammen mit anderen langsam sedimentierenden Partikeln (Monozyten, Thrombozyten) in der Interphase zwischen Plasma- und Ficoll-Schicht (Abb. 2-1). Die abpipettierte PBMCs Schicht wurde in ein neues Röhrchen überführt und zweimal mit P2-Puffer bei 680 x g gewaschen. Der Überstand mit den restlichen Thrombozyten (weiße Schicht) wurde verworfen. Das verbliebene Lymphozytenpellet wurde in PBMC Komplett-Medium (RPMI 1640 mit Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe), 10% FKS, 1 x Pen/Strep) aufgenommen und auf Arbeitskonzentration (Dendriten-Isolierung und ELISA  $2 \times 10^7$ , B-Zellen Isolierung und ELISpot  $2 \times 10^6$ ) eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung (max. 2 Tage) wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank gehalten.

### 2.6.3 Isolierung und Kultivierung humaner plasmazytoider Dendriten (pDCs)

Die Aufreinigung humaner pDCs erfolgte unter Anwendung der magnetische Zellseparation mittels MACS CD304 (BDCA-4) Isolation Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach). Ausgangsmaterial waren die isolierten PBMCs (vgl. 2.6.2).  $1 \times 10^8$  humane PMBCs wurden in 300 µl MACS-Puffer (entgastes PBSohne, 0,5% BSA, 2 mM EDTA, sterilfiltriert) resuspendiert und mit je 100 µl Blockierlösung bzw. an *MicroBeads* gekoppeltem (biotinyliertem)  $\alpha$ -CD304-AK für 10 min bei 5°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit 10-20 Volumen MACS-Puffer wurden diese in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und mit Hilfe des MACS-Separators (Miltenyi) getrennt. Hierbei wurde die Zellsuspension auf den MACS Säulen mehrmals gewaschen, die Säulen vom magnetischen Separator getrennt und CD304-positive Zellen in 1 ml MACS-Puffer eluiert. Die Reinheit der aufgereinigten pDCs konnte durch Gegenfärbung mit  $\alpha$ -CD303-FITC (BDCA2-FITC, Miltenyi) gekoppeltem Antikörper im Durchflußzytometer bestimmt werden. Die durch die magnetische Separation isolierten pDCs wiesen in der Regel eine Reinheit von > 90% auf und konnten für Stimulierungsversuche eingesetzt werden. Isolierte pDCs wurden in 48 oder 96 Napf-Platten ausgesät ( $2 \times 10^4$  Zellen pro Napf) und für 24 h in DC-Medium (RPMI 1640, 10% FKS, 1% Pen/Strep, 1% nicht-essenzielle Aminosäure, 1 mM Natriumpyruvat, 1% Glutamin) mit 20 ng/ml IL-3 kultiviert.

### 2.6.4 *In vitro* Re-Stimulierung isolierter Zellpopulationen

Die unter den Abschnitten 2.6.2. und 2.6.3. aufgeführten isolierten murinen und humanen Zellpopulationen wurden für Untersuchungen zur Aktivierung der angeborenen Immunität durch die hergestellten pDNA-Konstrukte verwendet. Hierfür wurden die Zellen mit unterschiedlichen endotoxinfreien (vgl. 2.4.2) pDNAs sowie den entsprechenden Kontrollen jeweils in Doppel-, oder Dreifachansätzen bei 37 °C stimuliert (Tabelle 2-5).

Zellursprung	Zelltyp	Zellkonzentration	pDNA Konz. (µg)	Stimulierungsdauer (h)	Medium (µl)
murin	Splenozyten	2x10 <sup>6</sup>	20, 50,100	4, 36	1000
human	PBMCs	2 x 10 <sup>6</sup>	1 pmol	24	1000
	pDCs	2 x 10 <sup>4</sup>	50	48	500

**Tabelle 2-5: Übersicht über murine und humane Zellpopulation, die für die Stimulierungsversuche verwendet wurden**

Zur Quantifizierung der sezernierten Cytokine durch ELISA wurden die Überstände geerntet, durch Zentrifugation für 15 min bei 600 x g in einer Tischzentrifuge von Zellen und Zelltrümmern befreit und schließlich bis zur Durchführung der Cytokinbestimmung bei -20°C gelagert.

### 2.6.5 Quantifizierung von sezernierten Cytokine im ELISA

Die Ermittlung sezernierter Cytokine (IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6) erfolgte mit Hilfe kommerzieller Cytokin-ELISA Kits (BD, Heidelberg). Hierfür wurden spezielle 96-Napf-Platten (Maxisorb, Wiesbaden) mit dem jeweiligen Primär-Antikörper (z. B. anti-Maus-IFN $\gamma$ ) über Nacht bei 4°C inkubiert. Pro Napf wurden je 100 µl Zellüberstand bzw. Standard pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBS/0,05% Tween20 wurden in jeden Napf 100 µl des sekundären (Detektions-) Antikörpers zusammen mit *horseradish-peroxidase*-konjugiertem Streptavidin (beide in einer 1:250 Verdünnung) zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 100 µl/Napf TMB-Substratlösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) und Hydrogenperoxid (BD Pharmingen) im Verhältnis 1:1. Nach 10-30 Minuten wurde die Farbreaktion mit 50 µl 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Platte im ELISA-Reader (Biorad) bei 450 nm Wellenlänge vermessen. Die Cytokinkonzentration wurde anhand der Standardkurve ermittelt. Die Quantifizierung von humanem IFN $\alpha$  erfolgte mittels eines kommerziellen Tests (Bender, Wien) nach Angaben des Herstellers.

### 2.6.6 Erstellung eines Cytokin-Profiles mittels Luminex-Assay

Die Erstellung eines Cytokin-Profiles wurde mittels der Luminex® Technologie nach Angaben des Herstellers (Microbionix, Neuried) durchgeführt. Der Assay beruht auf demselben Prinzip wie der ELISA, wobei die absolute Cytokinmenge im Überstand stimulierter Zellen gemessen wird. Die entsprechenden Cytokine wurden spezifisch an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt und anschließend im Laserstrahl detektiert. Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem

ELISA liegt zum einen in der deutlich niedrigeren Menge an benötigtem Zellüberstand, um mehrere Cytokine auf einmal zu vermessen. Zum anderen ist der Aufwand durch die gleichzeitige, maschinelle Abwicklung viel geringer. Mittels Luminex-Assay wurden die Konzentrationen folgender Cytokine bestimmt: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12p40, IL-4, IL-5, IL-10, IL-2 und IL-6.

### 2.6.7 ELISPOT-Assay; Quantifizierung IFN $\gamma$ -sezernierender Zellen

Zur Bestimmung der Anzahl IFN $\gamma$ -sezernierender Zellen nach *in vitro* Stimulation verschiedener Zellpopulationen mit pDNAs wurde zunächst die mit Nitrocellulose beschichtete 96-Napf Kulturplatte MAHA-S45 (Millipore, Eschborn) mit 100  $\mu$ l eines 5-10  $\mu$ g/ml in PBS verdünnten *Capture* Antikörpers R4-6A2 (z.B. anti-Maus IFN $\gamma$ ; 1:1000) (BD, Heidelberg) ÜN (4°C) in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde die Platte nach 4-mehrmaligem, sterilem Waschen mit PBS/ 10% FKS für 1 h bei 37°C mit 200  $\mu$ l PBS/ 10% FKS blockiert. Die anschließende Stimulation wurde direkt in den 96-Napf-Platten durchgeführt. Dabei wurden je 100  $\mu$ l einer entsprechenden Verdünnung der stimulierenden Zellen (vgl. Tab. 2-5) und je 100  $\mu$ l der stimulierenden pDNA; oder als Positivkontrolle 0,1-1  $\mu$ g PMA (1 $\mu$ l/ml) (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma, Deisenhofen) und Iono (1 $\mu$ l/ml) (Ionomycin, Sigma, Deisenhofen) zugegeben und 24 h bei 37°C und 5% CO $_2$  inkubiert. Nach 24-stündiger Stimulation wurden die Zellen durch mehrmaliges Waschen (6x) mit Waschpuffer (PBS/ 0,05% Tween-20) lysiert. Anschließend wurden je 100  $\mu$ l einer auf 1  $\mu$ g/ml in PBS verdünnten Lösung des sekundären, biotinylierten Detektions-IFN $\gamma$ -Antikörpers (vgl. Tab. 2-6) (Biotin-anti-Maus IFN $\gamma$ ; 1:1000) (BD) zugegeben und der Ansatz weitere 2 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde mit Waschpuffer gewaschen (10x) und die Antikörper-Antigen-Komplexe durch Zugabe eines 1:5000 in Verdünnungspuffer verdünntem Streptavidin-AP Konjugats (Roche, Mannheim) detektiert. Nach einer 60-minütigen Inkubation (RT) wurde die Platte wiederum gewaschen (10x) und mit 50  $\mu$ l AP-Färbelösung nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) 15-30 min inkubiert. Um die *Spots* (SFC; „*spot forming cell*“) mit Hilfe eines automatisierten ELISPOT-Lesegerätes (BioSys GmbH, Karben) auszählen zu können, wurde die Platte wiederholt mit Wasser gewaschen und getrocknet (ÜN, RT).

Cytokin	Antikörper-Paar	Klon	Konzentration	Verdünnung
IFN- $\gamma$	anti-Maus IFN- $\gamma$	R4-6A2	1mg/ml	1:100-1:200
	Biotin-anti-Maus IFN- $\gamma$	XMG1.2	0,5mg/ml	1:50-1:100
IL-4	anti-Maus IL-4	BVD4-1D11	0,5 mg/ml	1:50-1:100
	Biotin-anti-Maus IL-4	BVD6-24G2	0,5 mg/ml	1:50-1:100

**Tabelle 2-6: Für ELISpot-Assays verwendete Antikörper (BD, Heidelberg)**

### 2.6.8 Depletion distinkter Zellpopulationen aus murinen-Splenozyten

Um den Einfluss distinkter Zellpopulationen auf die IFN $\gamma$ -Produktion nach Stimulierung zu untersuchen, wurden folgende Zelltypen mittels *Magnetic Beads* einzeln aus der Splenozyten-Gesamtpopulation entfernt: CD8<sup>+</sup> zusammen mit CD4<sup>+</sup> Zellen, Makrophagen, Dendriten, Natürliche Killerzellen und B-Zellen (vgl. Tab. 2-7). Je Depletionsansatz wurden 10<sup>8</sup> Splenozyten eingesetzt, die restlichen Zellen für die nachfolgende Stimulation zurückbehalten. Für die Abreicherung der Zellpopulationen und die anschließende FACS-Färbung wurden folgende Antikörper bzw. Antikörper-markierte *Magnetic Beads* verwendet:

Zellpopulation	<i>Magnetic Beads</i>	Hersteller	FACS-Antikörper	Hersteller
T-Zellen	$\alpha$ -CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	Miltenyi	CD4-FITC- $\alpha$ -mouse CD8a-APC- $\alpha$ -mouse	BD
B-Zellen	$\alpha$ -CD19 <sup>+</sup>	Miltenyi	CD19-PerCP-Cy5.5- $\alpha$ - mouse	BD
Makrophagen	$\alpha$ -CD11b <sup>+</sup>	Miltenyi	CD11b-APC- $\alpha$ -mouse	BD
Dendriten	$\alpha$ -CD11c <sup>+</sup>	Miltenyi	CD11c-APC- $\alpha$ -mouse	BD
NK-Zellen	$\alpha$ -CD49b <sup>+</sup>	Miltenyi	CD49b (DX5) -APC- $\alpha$ - mouse	BD

**Tabelle 2-7: Für die Depletionstudie verwendete Antikörper und Magnetic Beads**

Jeweils 10<sup>8</sup> Zellen je Depletionsansatz wurden 10 min bei 300 x g abzentrifugiert und der Überstand quantitativ entfernt. Bei der Depletion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren. Sowohl der Durchlauf, als auch das Eluat wurden für die

Reinheitsbestimmung per FACS-Analyse und spätere Stimulierung aufbewahrt und die Lebendzellzahl nach bekannter Methode bestimmt.

### **2.6.9 Reinheitsbestimmung und Zellquantifizierung durch FACS-Analyse**

50 µl Zellsuspension je Fraktion wurden in ein steriles FACS-Röhrchen pipettiert und zweimal mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min, 300 x g, 4°C). Die Blockierung der Fc-Rezeptoren erfolgte durch Zugabe von 6 µl CD16/32 Antikörper (BD, Heidelberg) in 30 µl FACS-Puffer je Röhrchen und mindestens 10 minütiger Inkubation bei 4°C. Für die Oberflächenfärbung wurden jeweils 10 µl einer 1:20 Antikörperversdünnung von CD4-FITC, CD8-APC, CD11b-APC, CD11c-APC, CD19-PerCpCy 5.5 bzw. CD49b-FITC (BD, Heidelberg) zu 200 µl Zellen gegeben und für 25 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer konnten die Proben im FACS-Calibur (BD-Pharmingen) analysiert werden. *Gegattet* wurde auf die gesamte Splenozytenpopulation, von denen dann mindestens 25000 Zellen aufgenommen und auf die jeweiligen Oberflächenmarker hin untersucht wurden. Die Auswertung erfolgte mittels WinMDI Software.

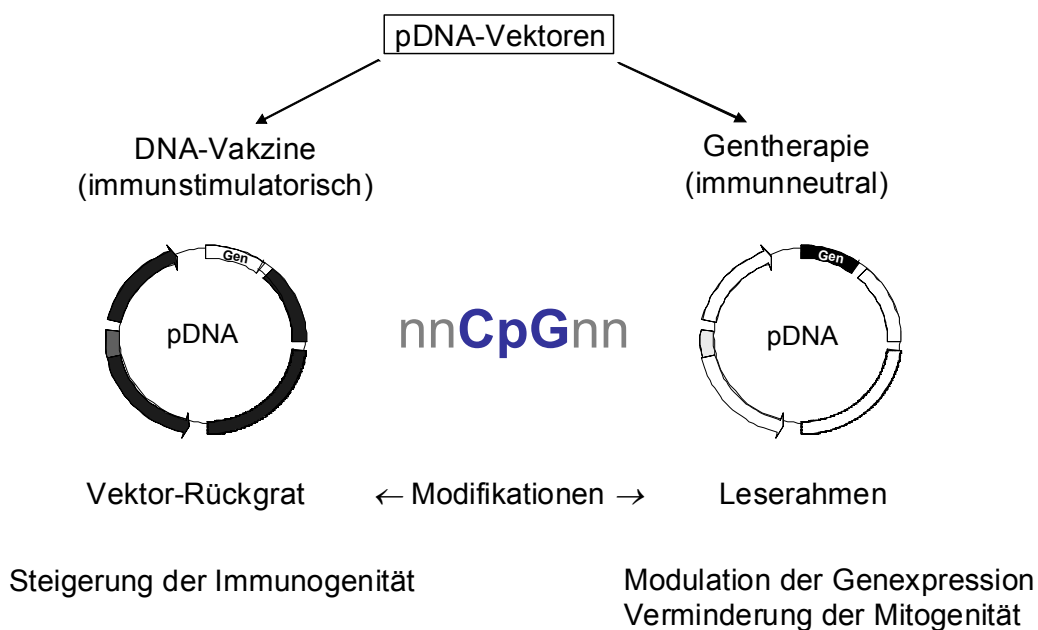


# Ergebnisse

## 3.1 Ausgangsüberlegungen

Um den Einsatz von Plasmid DNA (pDNA) in der Immunprophylaxe und Gentherapie zu ermöglichen, muss deren Nachteil, die sehr hohe Dosis, die erforderlich ist um eine effektive und langanhaltende Wirkung zu erzielen, beseitigt werden. Bisher angewandte Strategien haben zwar vielversprechende Ansätze, aber keine entscheidenden Fortschritte für die Anwendung im humanen System erzielen können [5,53].

Der Einsatz von pDNA in der Gentherapie und zu Immunisierungszwecken erfordert zwei komplementäre Strategien (Abb. 3-1). Während eine gentherapeutisch eingesetzte pDNA weitgehend immunneutral sein muss, ist bei der Vakzinierung eine Immunstimulation von Vorteil [15]. Die konstitutive Expression des kodierenden Transgens ist in beiden Fällen essentiell. CpG-Dinukleotide stellen in dieser Hinsicht ein geeignetes Werkzeug dar, um sowohl die immunogenen Eigenschaften (Immunogenität, Mitogenität) als auch die Transgenexpression eines pDNA-Vektors zu modulieren (Abb. 3-1).



**Abb. 3-1: Strategie zur Entwicklung von pDNA-Vektoren für die Vakzinierung bzw. den Einsatz in der Gentherapie.**

Die immunaktivierende Wirkung der pDNA sollte in dieser Arbeit durch Sequenz-Modulationen im Vektor-Rückgrat erreicht werden. Dabei sollte der Einfluss von bisher unbekannten CpG-Motiven bzw. DNA-Sequenzen hinsichtlich der Aktivierung der angeborenen Immunantwort sowohl in murinen als auch humanen Zellen evaluiert werden. Es ist bekannt, dass synthetische CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN) Zellen des angeborenen Immunsystems aktivieren und die Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen stimulieren. Eines der Ziele dieser Arbeit war deshalb, zu untersuchen, ob dieser Adjuvanzeffekt auch durch CpGs im Vektor-Rückgrat einer pDNA erzielt werden kann. Ein besonderes Augenmerk galt dabei der Beteiligung von Toll-*like* Rezeptoren (TLR) bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems nach der Stimulierung von immunkompetenten Zellen mit pDNA. Als fernes Ziel soll einer der ausgesuchten CpG-modulierten pDNA-Vektoren - im Rahmen der Entwicklung eines HIV-Impfstoffes in der Arbeitsgruppe - mit entsprechenden Antigenen für *in vivo* Studien im Mausmodell eingesetzt werden.

In der Gentherapie haben pDNA-Vektoren aufgrund der fehlenden Vektor-spezifischer Induktion neutralisierender Antikörper und einer zellulären Immunantwort einen entscheidenden Vorteil gegenüber viralen- oder Virus-assoziierten Vektor-Systemen [1,38]. Der Einsatz von immunologisch inerten pDNA ist dabei essentiell. Der größte Nachteil der Anwendung „nackter“ DNA in der Gentherapie - und daher Fokus vieler Optimierungsstrategien - ist eine geringe *in vivo* Transduktionsrate [4]. CpG-Dinukleotide spielen dabei eine wichtige Rolle, da sie neben ihrer immunmodulierenden Wirkung auch eine funktionelle Bedeutung bei der Kontrolle der Genexpression haben [63,214]. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Methylierungen im Promotorbereich und der kodierenden Region eines Gens [63,215]. Zusätzlich fungieren CpGs als Bindestellen für Transkriptionsfaktoren [216,217]. Der Einfluss des intragenischen CpG-Gehaltes auf die Höhe und Dauer der *in vitro* und *in vivo* Expression sowie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind unbekannt und standen daher im Fokus der vorliegenden Arbeit. In diesem Zusammenhang wurden CpG-modulierte Varianten eines therapeutischen Gens (Erythropoietin; EPO) generiert, in einen zuvor charakterisierten immunneutralen pDNA-Vektor (pRS) kloniert und auf die *in vitro*- sowie *in vivo* Expression im Balb/c Mausmodell getestet.

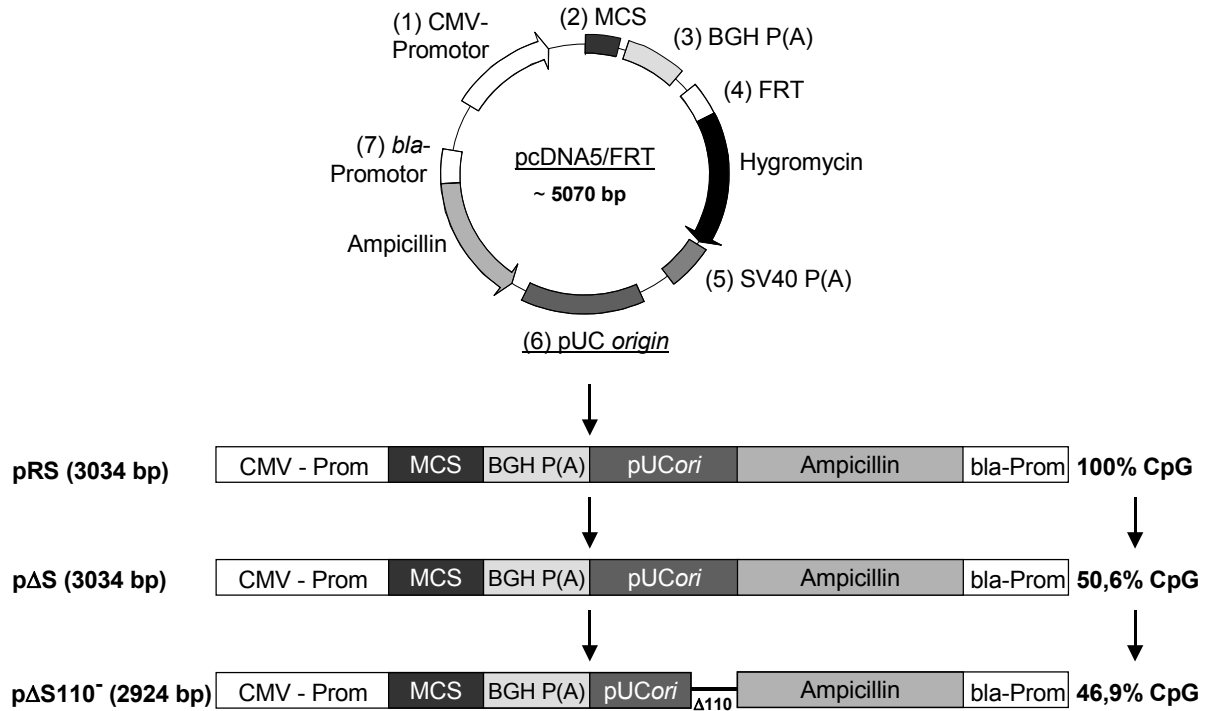
### **3.2 Beitrag von CpG-Motiven im Rückgrat von Plasmidvektoren hinsichtlich der Aktivierung der angeborenen Immunantwort**

Die Beschreibung und Charakterisierung von TLRs, im Besonderen des unmethylierte CpG-Motive erkennenden TLR9 [116,117], hat neue Ansatzpunkte für die Weiterentwicklung von pDNA-Vakzinen hinsichtlich der Aktivierung des angeborenen Immunsystems geliefert. Als mittelfristiges Ziel soll über die Stimulierung des angeborenen Immunsystems auch die erworbene Immunantwort gezielt beeinflusst werden können. Da bisher nur wenige immunstimulatorische CpG-Motive beschrieben sind, werden im Vektor-Rückgrat von pDNA weitere, bisher noch nicht charakterisierte CpG-Motive vermutet, welche einen immunmodulierenden Einfluss aufweisen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, durch Modulation des CpG-Gehaltes im Vektor-Rückgrat die immunogenen Eigenschaften eines pDNA-Vektors positiv zu beeinflussen.

Eine pDNA ist aus funktionsrelevanten Modulen, wie Promotor, *multiple cloning site* (MCS), *polyadenylation site* (Poly A), *origin of replication* (pUCori) und Resistenzgen(en) aufgebaut. Der „modulare“ Aufbau einer pDNA bietet die Möglichkeit, den CpG-Gehalt sukzessiv zu verändern. Sequenzveränderungen einzelner Fragmente gehen oft mit einem allgemeinen Funktionsverlust einher, wodurch Modulationen des CpG-Gehaltes zusätzlich erschwert werden. Die korrekte Transgen-Expression aller in dieser Arbeit generierten und immunologisch charakterisierten pDNA-Vektoren wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe untersucht.

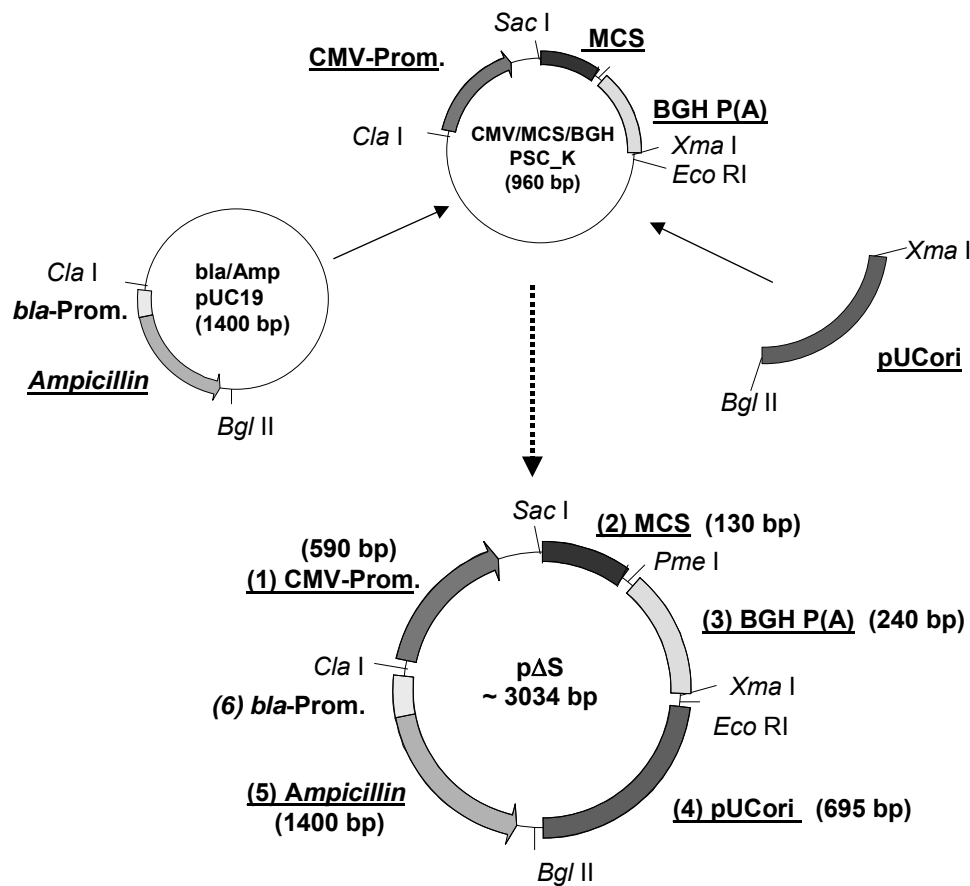
#### **3.2.1 Herstellung einer CpG-reduzierten Vektor-Plattform**

Als Ausgangsplasmid für die Synthese einer CpG-reduzierten Vektor-Plattform diente der kommerzielle eukaryontische pcDNA5/FRT-Vektor (5070 bp) (Invitrogen, Karlsruhe). Um die Größe des Vektors zu minimieren, wurde das für die Etablierung von stabilen Zelllinien notwendige Fragment FRT/Hygromycin unter Verwendung der Oligonukleotide ref\_ori-pf und ref\_BGH\_pb (siehe Anhang) mittels PCR entfernt. Das resultierende Konstrukt hatte einen unveränderten CpG-Gehalt, der daher als 100% gegenüber den nachfolgenden CpG-modifizierten Vektoren gesetzt wurde und als pRS (3034 bp) bezeichnet wurde (Abb. 3-2). Der pRS-Vektor diente als Basis für die im Rahmen der Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hergestellten CpG-freien bzw. CpG-reduzierten Fragmente.



**Abb. 3-2: Schematische Darstellung der Herstellung einer CpG-reduzierten Vektor-Plattform**  
 Basierend auf dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA5/FRT wurden drei pDNA-Vektoren mit abnehmendem CpG-Gehalt hergestellt (100% CpG; 50,6% CpG; 46,9% CpG). Der pRS-Vektor wurde durch Eliminierung der FRT/Hygro-Kassette generiert und hat daher einen unveränderten CpG-Gehalt. Durch Reduzierung des CpG-Gehaltes um etwa 50% wurde der pΔS-Vektor generiert. Im Gegensatz zu pΔS weist der pΔS110<sup>-</sup> Vektor eine 110 bp Deletion im pUCori auf, die keinen Einfluss auf die Vektor-Replikation hat. pUCori = origin of replication.

Die Synthese des pΔS-Vektors erfolgte ausgehend von synthetischen CpG-reduzierten Ampicillin-, CMV/MCS/BGH- und pUCori- Fragment-Modulen unter Verwendung singulärer Restriktionsschnittstellen in einer Mehrfach-Ligationsreaktion (Abb. 3-3). Die Fragmente wurden unter Verwendung der singulären Restriktionsschnittstellen *Cla* I, *Xma* I und *Bgl* II zusammengefügt. Die anschließende Sequenzierung zeigte bei zwei Klonen eine identische Deletion von Nukleotid (Nt) 1537 bis Nt 1647 (im pUCori), wodurch die *Bgl* II Restriktionsschnittstelle zerstört wurde. Die zerstörte *Bgl* II Schnittstelle konnte in einer zielgerichteten Mutagenese-Reaktion (QuickChange „site directed mutagenesis“-Kit, Stratagene) unter Verwendung der Oligonukleotide OriQS1 und OriQS2 (siehe Anhang) wiederhergestellt werden. Nach dem Austausch des pUCori Fragments mit der Deletion gegen einen intakten pUCori wurde der komplette pΔS-Vektor mit entsprechenden singulären Restriktionsschnittstellen fertiggestellt. Analog dem pRS-Vektor ist die transkriptionelle Kontrolle der Transgenexpression in pΔS dem Cytomegalie-Virus Promotor (CMV, early promoter/enhancer) unterstellt. Der generierte pΔS-Vektor hat eine identische Länge wie pRS (3034 bp), jedoch konnte der CpG-Gehalt auf 50,6% reduziert werden (Abb. 3-2).



**Abb. 3-3: Klonierungsstrategie zur Herstellung des pΔS-Vektors**

Der pΔS-Vektor wurde ausgehend von den synthetischen Ampicillin-, CMV/MCS/BGH- und pUCori- Fragmenten unter Verwendung singulärer Restriktionsschnittstellen in einer doppelten Ligationsreaktion hergestellt. pUCori = origin of replication.

Nach Wiederherstellung der Bgl II Schnittstelle wurde ein Konstrukt mit intakten singulären Restriktionsschnittstellen, aber mit einer Deletion (Nt 1537 - 1647) im pUCori, synthetisiert. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass diese Deletion weder Einfluss auf die Funktion von pUCori, noch auf die Transgenexpression hat. Die Wachstumskinetik des neu generierten Vektors blieb trotz Deletion in verschiedenen Bakterienstämmen auf dem Niveau des *high copy* Plasmids pRS. Das Konstrukt wurde als pΔS110<sup>-</sup> bezeichnet und hat gegenüber dem pΔS-Vektor eine reduzierte Länge (2924 bp) sowie einen um fünf CpG-Dinukleotide reduzierten CpG-Gehalt (46,9%) (Abb. 3-2).

### 3.2.2 Untersuchung der immunogenen Eigenschaften von CpG-modulierten pDNAs im murinen System

Virale und bakterielle Nukleotidsequenzen sind für das Immunsystem eines der Hauptkennungsmerkmale nach einer Infektion, wobei die Frequenz und der Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide eine entscheidende Rolle spielen (vgl. 1.3). Der

Verlauf und die Dauer einer Immunreaktion werden entscheidend vom Aktivierungsstatus der Zellen des angeborenen Immunsystems beeinflusst [218]. Die Induktion der Cytokin-Expression ist dabei sowohl für die Reifung Antigen-präsentierender Zellen (APC) als auch für die Aktivierung der Zellen des spezifischen Immunsystems essentiell [181,182]. Unmethylierte CpG-Sequenzen in einem pDNA-Vektor sollten, so die Hypothese, dementsprechend als potentielle Aktivatoren des angeborenen Immunsystems fungieren.

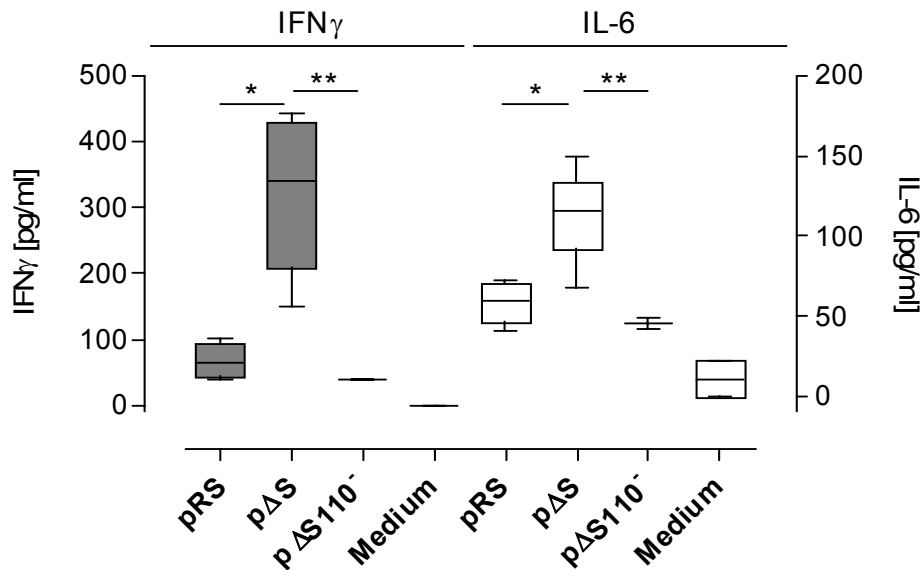
Die immunogenen Eigenschaften CpG-modulierter pDNAs wurden durch die Stimulierung immunkompetenter muriner und humaner Zellpopulationen untersucht. Durch Messung des induzierten Cytokinprofils konnte der Einfluss von Sequenzmodifikationen im Hinblick auf die Art der hervorgerufenen Immunreaktion bestimmt werden. Außerdem wurden die an der Sekretion proinflammatorischer Cytokine nach Stimulierung mit pDNA beteiligten Zellpopulationen untersucht.

Die Hochregulierung der Cytokin-Expression hängt von der induzierten Signalkaskade ab (vgl. 1.4). Die potentielle Beteiligung des CpG-Rezeptors TLR9 an der Induktion der Cytokin-Sekretion nach pDNA-Stimulierung war zur Beginn dieser Arbeit unbekannt und sollte untersucht werden.

### **3.2.2.1 Einfluss der CpG-Modifikationen auf die Induktion proinflammatorischer Cytokine**

Als frühe Reaktion des angeborenen Immunsystems auf eine Infektion oder nach Stimulierung mit CpG-DNA werden die proinflammatorischen Cytokine IFN $\gamma$ - und IL-6 sezerniert [94]. Die Induktion der IFN $\gamma$ - und IL-6-Sekretion nach Stimulierung mit einem pDNA-Vektor dient als Nachweis seiner Immunogenität (Mitogenität). Die Untersuchung der mitogenen Eigenschaften neu-synthetisierter, CpG-modulierter pDNA-Vektoren erfolgte durch *in vitro* Stimulierung naiver muriner Splenozyten, Zellen des sekundären lymphatischen Gewebes mit einem hohen Anteil an Lymphozyten. Die Überstände der stimulierten Zellen wurden nach 48 h geerntet und die Sekretion von IFN $\gamma$ - und IL-6 mittels ELISA bestimmt (vgl. 2.6.4 und 2.6.5).

Im Gegensatz zu pRS (~67 pg/ml) induziert der p $\Delta$ S-Vektor eine 4,7-fache signifikante Steigerung der IFN $\gamma$ -Sekretion (~319 pg/ml) (Abb. 3-4). Die signifikante 2-fache Steigerung der Sekretionsrate nach Stimulierung mit dem p $\Delta$ S-Vektor (~112 pg/ml) im Vergleich zu pRS (~57 pg/ml) konnte auch am Beispiel von IL-6 festgestellt werden. Überraschenderweise wirkte sich die 110 bp-Deletion im *pUCori* (vgl. 3.2.1) entscheidend auf die Immunogenität des p $\Delta$ S110-Vektors aus. Verglichen mit dem „parentalen Vektor“ p $\Delta$ S wurde durch p $\Delta$ S110 eine signifikant niedrigere IFN $\gamma$ - bzw. IL-6-Sekretion (39 pg/ml bzw. 45 pg/ml) induziert. Der Cytokinspiegel war sogar geringer als der des pRS-Vektors (IFN $\gamma$ : 67 pg/ml, IL-6: 57 pg/ml).



**Abb. 3-4: Induktion der proinflammatorischen Cytokine IFN $\gamma$  und IL-6 nach Stimulierung muriner Splenozyten mit CpG-modulierten pDNAs**

Naive murine Splenozyten wurden mit jeweils 50  $\mu$ g der angegebenen pDNAs stimuliert. 48 h später wurden die Überstände der stimulierten Zellen quantitativ geerntet und die Menge der sezernierten proinflammatorischen Cytokine IFN $\gamma$  und IL-6 mittels ELISA ermittelt. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten dar. \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,005$  (Student t-test).

Ein vergleichbares Muster der Induktion von IFN $\gamma$ - und IL-6, ohne deutliche Unterschiede in der Konzentration der sezernierten Cytokine, wurde auch nach der Stimulierung mit einer niedrigeren pDNA-Dosis (20  $\mu$ g) festgestellt (Daten nicht gezeigt).

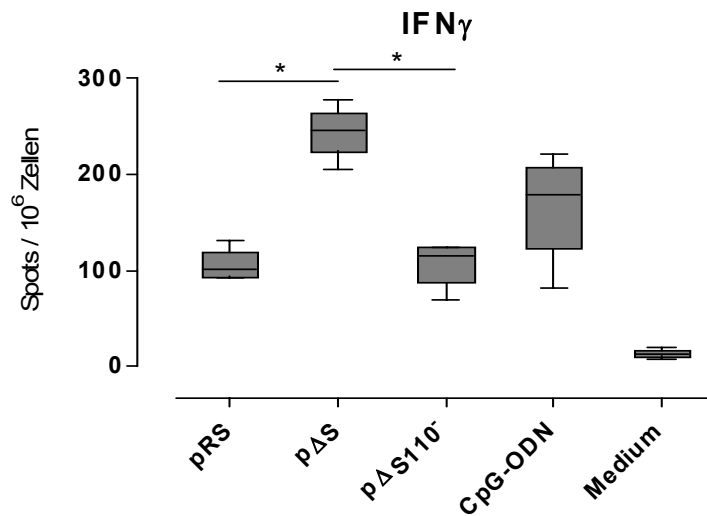
Der neu hergestellte p $\Delta$ S-Vektor ist somit im Vergleich zu pRS und p $\Delta$ S110 $^{-}$  in der Lage, eine starke und signifikant höhere Sekretion der proinflammatorischen Cytokine IFN $\gamma$ - und IL-6 nach Stimulierung muriner Splenozyten zu induzieren.

### 3.2.2.2 Quantifizierung IFN $\gamma$ -produzierender Zellen

Eine wichtige Information nach Stimulierung mit pDNA ist, ob alle Immunzellen gleichermaßen mit einer Cytokin-Produktion reagieren, oder ob die Sekretion auf distinkte Zellpopulationen zurückzuführen ist. Um dies zu untersuchen, wurde die Anzahl IFN $\gamma$ -sezernierender Zellen 24 h nach der Stimulierung muriner Splenozyten mit pDNAs mittels ELISpot-Assay bestimmt.

Analog zur absoluten Cytokinmenge (vgl. 3.2.2.1) induzierte der p $\Delta$ S-Vektor im Vergleich zu pRS bei einer signifikant höheren Zahl von Zellen die Sekretion von IFN $\gamma$  (p $\Delta$ S: 244; pRS: 106 Spots/ $10^6$  Zellen) (Abb. 3-5). Die Deletion eines 110 bp Fragments im p $\Delta$ S110 $^{-}$ -Vektor resultierte in einer signifikanten Abnahme der IFN $\gamma$ -Spots (105), die damit auf dem Niveau des pRS-Vektors blieben. Die Stimulierung mit CpG-ODN induzierte zwar bei mehr Zellen

(164) eine  $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion als die Stimulierung mit pRS und p $\Delta$ S110<sup>-</sup>, deren Anzahl war aber deutlich niedriger als im Fall von p $\Delta$ S-DNA.

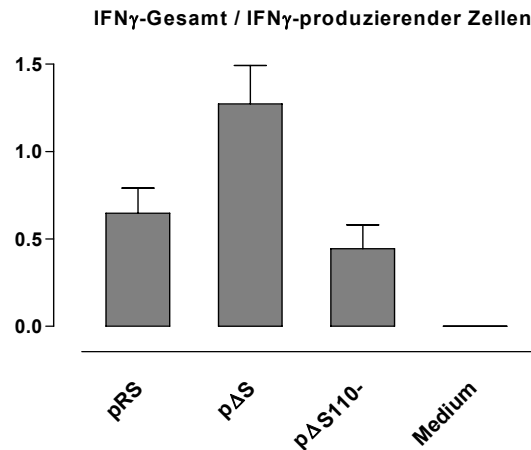


**Abb. 3-5: Induktion  $\text{IFN}\gamma$ -produzierender muriner Splenozyten nach Stimulierung mit CpG-modulierten pDNAs**

Naive murine Splenozyten wurden mit 50  $\mu\text{g}$  der angegebenen pDNAs stimuliert. Die Anzahl  $\text{IFN}\gamma$ -produzierender Zellen wurde 24 h später mittels ELISpot-Assay bestimmt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 3 pmol immunstimulatorischen, synthetischen CpG-Oligodinukleotiden vom B-Typ (CpG-ODN 1826) stimuliert. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen dar. \*  $p < 0,005$  (Student t-test).

Aus den Abbildungen 3-4 und 3-5 wird ersichtlich, dass der Unterschied zwischen p $\Delta$ S und pRS bzw. p $\Delta$ S110<sup>-</sup> sich stärker in der Menge des sezernierten  $\text{IFN}\gamma$  manifestiert als allein an der Anzahl an  $\text{IFN}\gamma$ -sezernierenden Zellen liegt. Während die ELISpot-Daten zwischen p $\Delta$ S und pRS bzw. p $\Delta$ S110<sup>-</sup> eine Differenz der Zellzahlen ca. um den Faktor 2 zeigen, lässt sich für die Menge an freigesetztem Cytokin aus den ELISA-Ergebnissen dagegen ein Faktor von 7-8 errechnen. Auch das Verhältnis der Gesamtmenge an  $\text{IFN}\gamma$  zur Zahl der  $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Zellen zeigt bei p $\Delta$ S den höchsten Wert (Abb. 3-6).





**Abb. 3-6: Verhältnis: IFN $\gamma$ -Gesamt / IFN $\gamma$ -produzierende murine Splenozyten**

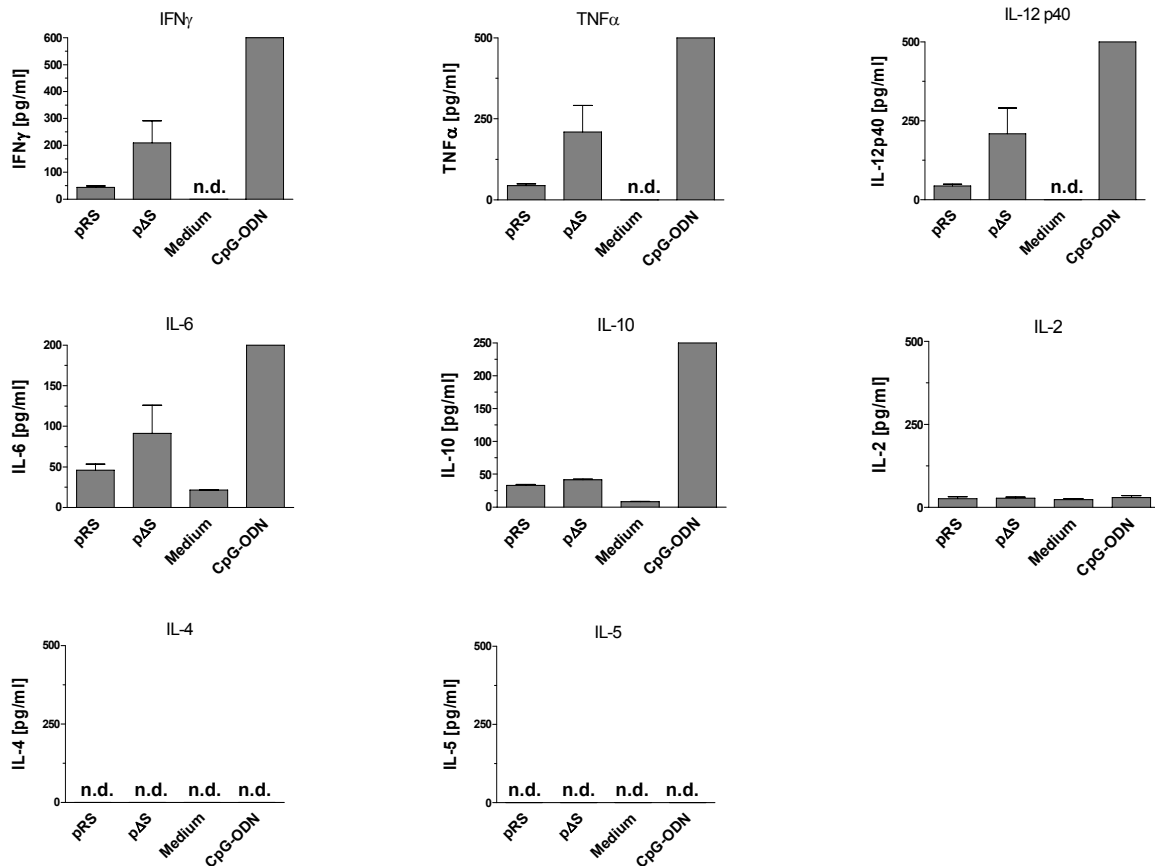
Die Gesamtmenge an sezerniertem IFN $\gamma$  wurde ins Verhältnis zur Anzahl der IFN $\gamma$ -produzierenden Splenozyten gestellt. Die errechneten Verhältnisse stellen Mittelwerte aus jeweils vier unabhängigen Werten aus den Abbildungen 3-4 und 3-5 dar.

Der p $\Delta$ S-Vektor induziert nach Stimulierung muriner Splenozyten gegenüber pRS bzw. p $\Delta$ S110<sup>-</sup> nicht nur eine stärkere Sekretion proinflammatorischer Cytokine, auch die Menge IFN $\gamma$ -produzierender Zellen ist überproportional erhöht. Einen weiteren Hinweis auf die starke Immunogenität des p $\Delta$ S-Vektors liefert die Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender Zellen nach Stimulierung muriner Splenozyten, die sogar noch über der nach Stimulierung mit CpG-ODN liegt.

### 3.2.2.3 Erstellung eines Cytokin-Profiles

Die Induktion der IFN $\gamma$ - und IL-6 Cytokine lieferte ein erstes Indiz hinsichtlich der proinflammatorischen Art der Immunreaktion nach Stimulierung mit dem CpG-modulierten p $\Delta$ S-Vektor (vgl. 3.2.2.1). Ob es sich dabei um eine Th1- bzw. Th2 polarisierende Reaktion handelt, lässt sich jedoch erst durch die Bestimmung mehrerer Cytokine feststellen. Zu diesem Zweck wurden murine Splenozyten mit pDNAs stimuliert und - analog zum ELISA - die absoluten Cytokinmengen im Überstand mittels Luminex-Technologie gemessen. Ermittelt wurden die Mengen der Th1-Cytokine IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-12p40, der Th2-Cytokine IL-4, IL-5 und IL-10 sowie der proinflammatorischen Cytokine IL-6 und IL-2.

## Ergebnisse



**Abb. 3-7: Induziertes Cytokin-Profil nach Stimulierung muriner Splenozyten mit CpG-modulierten pDNAs**

Naive murine Splenozyten wurden mit jeweils 50  $\mu$ g der angegebenen pDNAs stimuliert. 48 h später wurden die Überstände der stimulierten Zellen quantitativ geerntet und die absoluten Mengen an Th1-Cytokinen (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12p40), Th2-Cytokinen (IL-4, IL-5, IL-10) sowie der proinflammatorischen Cytokine IL-6 und IL-2 mittels Luminex-Technologie bestimmt. Als Positivkontrolle für die Induktion von Th1-Cytokinen wurden die Zellen mit 3 pmol synthetischen CpG-Oligodinukleotiden B-Typ (CpG-ODN 1826) stimuliert. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Proben eines repräsentativen Versuches dar. n.d.: nicht detektierbar

Wie in Abbildung 3-7 dargestellt, wurden nach Stimulierung muriner Splenozyten mit dem pΔS-Vektor vor allem für die Th1-Immunantwort charakteristische Cytokine sezerniert. Das induzierte Cytokinprofil entspricht tendenziell dem nach Stimulierung mit CpG-ODN. Ein auffälliger Unterschied war jedoch die minimale Sekretion des Th1-antagonistischen Cytokins IL-10. Die Sekretion von Th2-Cytokinen konnte durch keines der Stimulanzien induziert werden. Die zuvor gezeigten immunneutralen Eigenschaften des pRS-Vektors wurden durch die Luminex-Analysen bestätigt.

Durch die Reduktion des CpG-Gehaltes von 100% (pRS) auf 50,6% (pΔS) wurde die Balance zwischen immunbeeinflussenden CpG-Sequenzen deutlich zu Gunsten immunstimulatorischer Motive verschoben und resultierte in der Generierung eines Vektors (pΔS) mit deutlich erhöhtem mitogenen Potential. Durch die Deletion von 110 Nukleotiden im pUCori (pΔS110<sup>-</sup>) fiel die Mitogenität des Vektors auf das Ausgangsniveau zurück, was auf

das Vorhandensein bisher unbekannter stimulatorischer Motive und/oder cis-aktiver Sequenzen in diesem Bereich hindeutete.

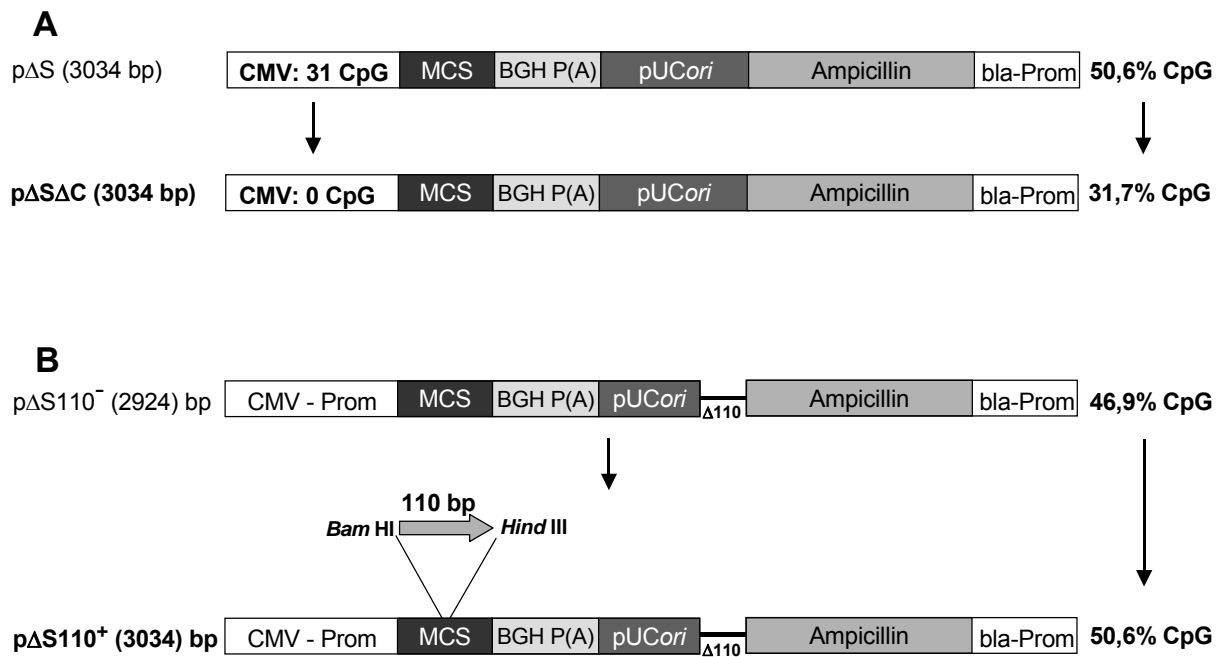
### **3.2.3 Einfluss weiterer Sequenz-Veränderungen im Vektor-Rückgrat sowie der 110 bp-Region im *pUCori* auf die Immunogenität**

Unter 3.2.2 konnte gezeigt werden, dass die von uns durchgeführten Veränderung des CpG-Gehaltes im Rückgrat eines kommerziellen pDNA-Vektors in der Steigerung seiner immunogenen Eigenschaften resultiert. Dabei spielte die 110 bp-Region im *pUCori* eine wichtige Rolle. Die verminderte Fähigkeit des pRS-Vektors, proinflammatorische Cytokine zu induzieren, zeigt ebenso, dass die immunogene Wirkung der 110 bp-Region auch vom CpG-Gehalt im Vektorrückgrat abhängt.

Die nachfolgenden Versuche sollten im Hinblick auf die Aktivierung der angeborenen Immunität einerseits Aufschluss über den Einfluss einer weiteren Reduzierung des CpG-Gehaltes im p $\Delta$ S-Vektor geben und andererseits die Rolle der 110 bp-Region genauer aufklären. Unter diesem Aspekt wurden zunächst Varianten der p $\Delta$ S- und p $\Delta$ S110<sup>-</sup>-Vektoren generiert und immunologisch charakterisiert. Die immunogene Wirkung der 110 bp bzw. der darin enthaltenden CpG-Dinukleotide wurde durch die Klonierung von 110 bp-Mutanten und der anschließenden Stimulierung muriner Splenozyten mit den Varianten näher untersucht.

#### **3.2.3.1 Herstellung der p $\Delta$ S $\Delta$ C (p $\Delta$ S)-und p $\Delta$ S110<sup>+</sup> (p $\Delta$ S110<sup>-</sup>)-Mutanten**

Die gezielte Synthese des p $\Delta$ S-Vektors mit singulären Restriktionsschnittstellen an den Enden jedes Fragments ermöglichte deren einfachen Austausch. Um den CpG-Gehalt im Vektor-Rückgrat des p $\Delta$ S-Vektors weiter zu reduzieren, wurde unter Verwendung der singulären Schnittstellen *Cla* I und *Sac* I der vorhandene CMV-Promotor gegen einen CpG-freien CMV-Promotor ausgetauscht (Abb. 3-8 A). Bei der Synthese des CpG-freien CMV-Promotors wurden alle CpG-Dinukleotide durch TpG-Dinukleotide ersetzt [17]. Die resultierende Mutante wies eine weitere Reduktion des CpG-Gehaltes (31,7%) auf und wurde als p $\Delta$ S $\Delta$ C bezeichnet.



**Abb. 3-8: Schematische Darstellung der pΔSΔC (pΔS)-und pΔS110<sup>+</sup> (pΔS110<sup>-</sup>)-Mutanten**

(A) Der pΔSΔC Expressionsvektor wurde durch Eliminierung aller CpG-Dinukleotide aus dem CMV-Promotor von pΔS hergestellt. Dadurch wurde der CpG-Gehalt auf 31,7% reduziert. (B) Die „deletierte“ 110 bp-Region im pΔS110<sup>-</sup> Vektor wurde aus dem pΔS-Vektor amplifiziert und über Bam HI und Hind III Schnittstellen in die MCS des pΔS110<sup>-</sup> Vektors eingefügt (pΔS110<sup>+</sup>). CMV: Cytomegalie Virus, MCS: multiple cloning site.

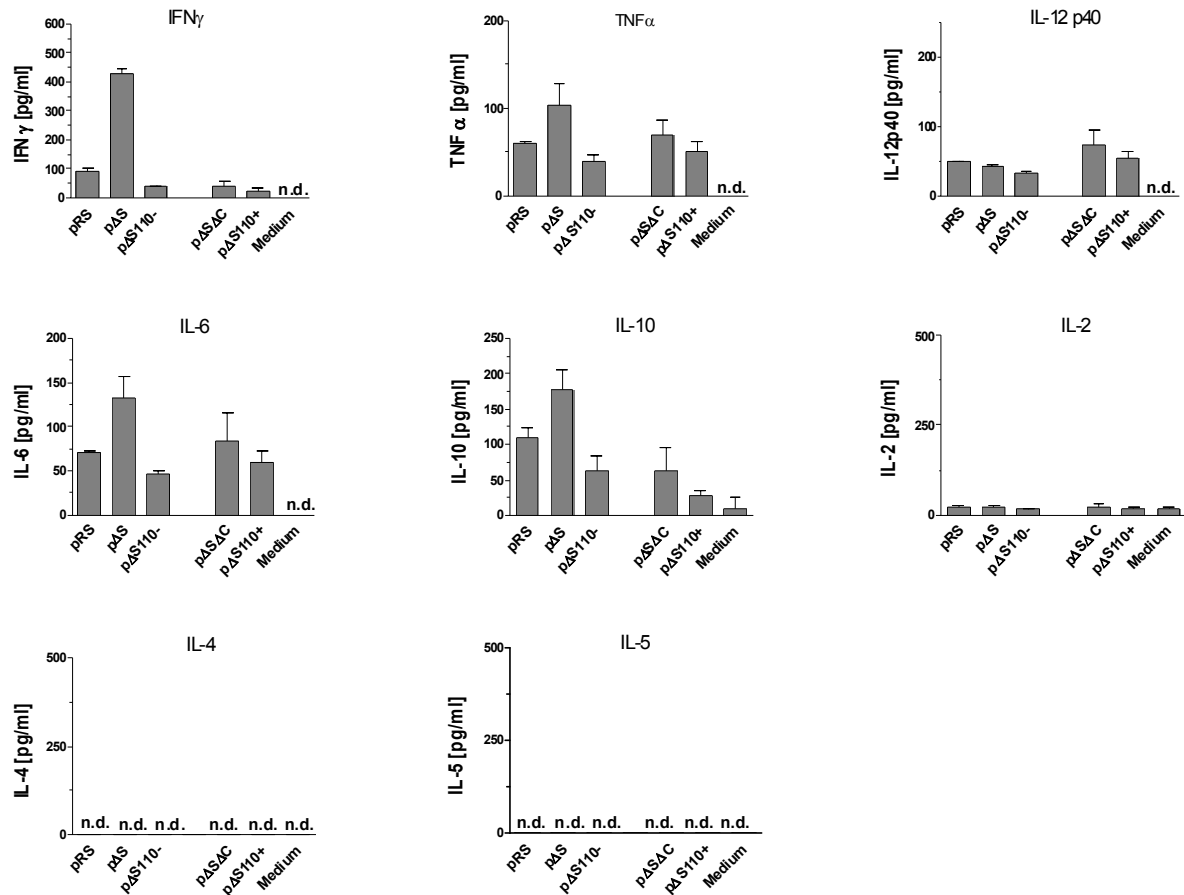
Um die Abhängigkeit der immunogenen Wirkung von der Lokalisierung der 110 bp zu untersuchen, wurde zunächst eine Mutante des pΔS110<sup>-</sup>-Vektors kloniert. Dabei wurden die „deletierten“ 110 bp unter Verwendung der Oligonukleotide 110\_MCS\_Pf und 110\_MCS\_Pb (siehe Anhang) aus dem pΔS-Vektor amplifiziert und über Bam HI und Hind III Restriktionsschnittstellen in die *multiple cloning site* des pΔS110<sup>-</sup>-Vektors eingefügt (Abb. 3-8 B). Die Länge (3034 bp) und der CpG-Gehalt (50,6%) des neu synthetisierten pΔS110<sup>+</sup>-Vektors entsprachen denen von pΔS, beide Vektoren unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Lokalisierung der 110 bp und der Deletion im pΔS110<sup>+</sup>.

### 3.2.3.2 Erstellung des Cytokin-Profiles nach Stimulierung mit pΔS- und pΔS110<sup>+</sup>-Varianten

Wie unter 3.2.2.3 gezeigt werden konnte, aktiviert der pΔS-Vektor in murinen Splenozyten eine Signalkaskade, die in einer starken Sekretion von Th1-Cytokinen resultiert. Im Gegensatz dazu wurden nur geringe Konzentrationen der Th1-Cytokine nach Stimulierung mit dem pΔS110<sup>-</sup>-Vektor festgestellt. Der Einfluss der weiteren Reduzierung des CpG-Gehaltes (pΔSΔC), sowie der an eine andere Stelle im Vektor versetzten 110 bp (pΔS110<sup>+</sup>) auf das induzierte Cytokin-Profil, wurde nach Stimulierung naiver muriner Splenozyten durch die Quantifizierung sezernierter Cytokine mittels Luminex-Technologie untersucht.

## Ergebnisse

Außerdem sollten die immunogenen Eigenschaften der zuvor charakterisierten pRS, pΔS und pΔS110<sup>-</sup> Vektoren evaluiert werden. Gemessen wurden die Mengen der Th1-Cytokine IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-12p40, die Th2-Cytokine IL-4, IL-5 und IL-10 sowie die proinflammatorischen Cytokine IL-6 und IL-2.



**Abb. 3-9: Einfluss weiterer Mutationen im pΔS und pΔS110<sup>-</sup> Vektor auf das induzierte Cytokin-Profil nach Stimulierung muriner Splenozyten**

Naive murine Splenozyten wurden mit jeweils 50  $\mu$ g der angegebenen pDNAs stimuliert. 48 h später wurden die Überstände der stimulierten Zellen quantitativ geerntet und die absoluten Mengen an Th1-Cytokinen (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12p40), Th2-Cytokinen (IL-4, IL-5, IL-10) sowie der proinflammatorischen Cytokine IL-6 und IL-2 mittels Luminex-Technologie bestimmt. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Proben eines repräsentativen Versuches dar. n.d.: nicht detektierbar

Das induzierte Cytokin-Profil (Abb. 3-9) nach Stimulierung muriner Splenozyten mit den pRS, pΔS und pΔS110<sup>-</sup> Vektoren entspricht weitgehend dem in Abb. 3-7 dargestellten Cytokin-Muster. Unterschiede zeigten sich lediglich im moderaten Nachweis des Th1-antagonistischen Cytokins IL-10 sowie in der fehlenden Sekretion des IL-12p40 Cytokins nach Stimulierung mit pΔS.

Die generierten Mutanten pΔSΔC und pΔS110<sup>+</sup> wiesen ein ähnlich gering-immunogenes Verhalten wie die pRS und pΔS110<sup>-</sup> Vektoren auf. Durch den Austausch des CMV-Promotors

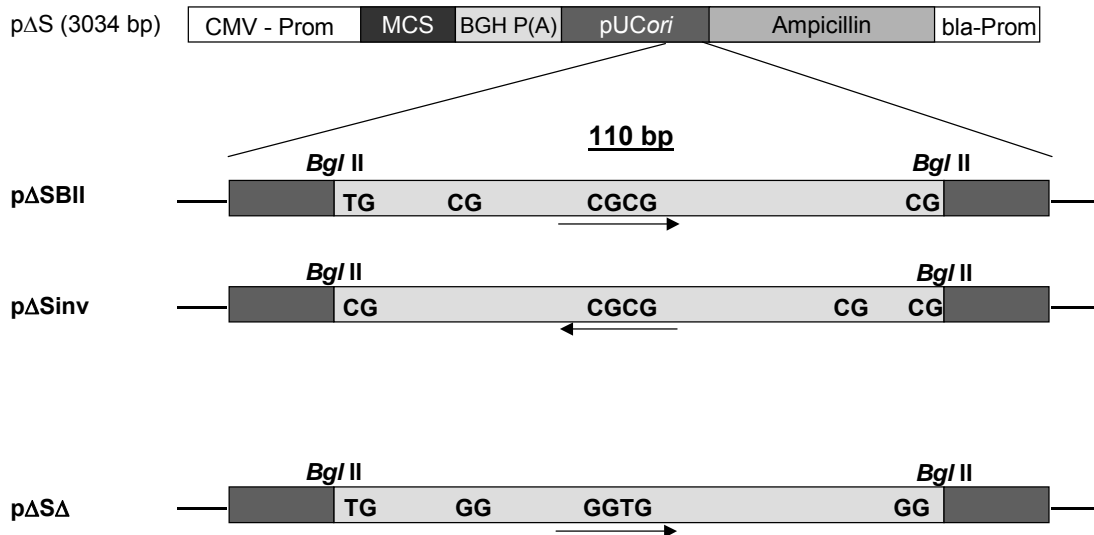
gegen einen CpG-freien Promotor im p $\Delta$ S-Vektor wurden die immunogenen Eigenschaften des parentalen p $\Delta$ S-Vektors deutlich negativ beeinflusst. Die negative Wirkung zeigte sich am deutlichsten bei der IFN $\gamma$ -Sekretion (Abb. 3-9). Das „Versetzen“ der immunogenen 110 bp in eine andere Region des p $\Delta$ S110<sup>-</sup>-Vektors (p $\Delta$ S110<sup>+</sup>) bewirkte nicht die Wiederherstellung der Immunogenität, was die dem p $\Delta$ S110<sup>-</sup>-Vektor entsprechenden Sekretionsraten von IFN $\gamma$  belegen. Dies deutet auf die Lokalisierungsabhängigkeit der 110 bp innerhalb des Vektors auf die Induktion proinflammatorischer Cytokine. Die Sekretion der Th2-Cytokine konnte, abgesehen von IL-10, nicht nachgewiesen werden. Das immunisierte Verhalten von p $\Delta$ S $\Delta$ C und p $\Delta$ S110<sup>+</sup> wurde in mehreren Stimulierungsversuchen und Cytokinbestimmungen festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten bestätigen wiederum die Fähigkeit des p $\Delta$ S-Vektors, eine Th1-polarisierende Immunantwort zu induzieren und weisen auf die Balance sowie Lokalisierungsabhängigkeit immunstimulierender bzw. immunsuppressiver Sequenzen hin.

### 3.2.3.3 Generierung von 110 bp-Mutanten

In den bisherigen Ergebnissen wurde gezeigt, dass mit der 110 bp-Deletion im *pUCori* des p $\Delta$ S110<sup>-</sup>-Vektors die Fähigkeit, nach Stimulierung naiver Maus-Splenozyten, eine starke IFN $\gamma$ -Sekretion zu induzieren, verloren geht (vgl. 3.2.2.1). Um den immunstimulatorischen Einfluss dieser 110 bp näher zu charakterisieren, wurde eine Reihe von Mutanten mit Fokus auf die Lokalisierung, Orientierung und den CpG-Gehalt hergestellt. Der erste Schritt bei der Generierung der 110 bp-Mutanten war aus Klonierungs-technischen Gründen das Einfügen einer zweiten *Bgl* II Restriktionsschnittstelle in das 5'-Ende der 110 bp mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide *Bgl* II Pf und *Bgl* II Pb (siehe Anhang). Dabei konnte gleichzeitig eines der fünf CpG-Dinukleotide (Position 1534) innerhalb der 110 bp-Region in TpG umgewandelt werden. Die mit zwei *Bgl* II Schnittstellen versehenen 110 bp wurden in einer Ligationreaktion in den p $\Delta$ S110<sup>-</sup>-Vektor eingefügt. Da sich durch die Klonierungsstrategie mit zwei *Bgl* II-Schnittstellen nicht festlegen ließ, in welcher Richtung die 110 bp mit dem geöffneten Vektor ligieren, konnten zwei Vektoren mit unterschiedlicher Orientierung generiert werden (Abb. 3-10). Der p $\Delta$ SBII-Vektor enthält die 110 bp Region in seiner ursprünglichen- und der p $\Delta$ Sinv-Vektor in umgekehrter Ausrichtung. Beide Vektoren sind mit zwei *Bgl* II Restriktionsschnittstellen bzw. der p $\Delta$ SBII mit vier und der p $\Delta$ Sinv-Vektor aufgrund der Orientierung mit fünf CpG-Dinukleotiden innerhalb der 110 bp ausgestattet.

## Ergebnisse



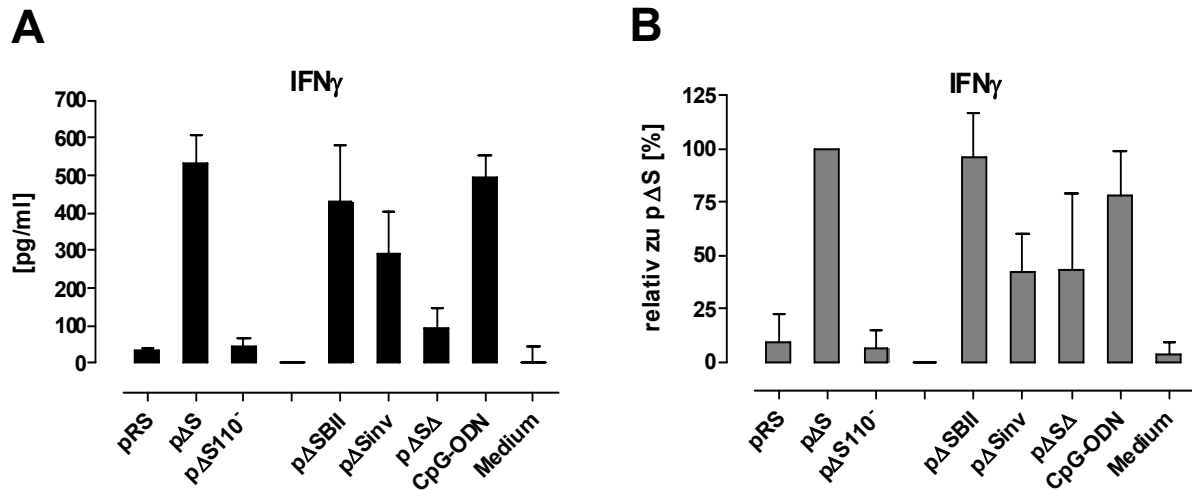
**Abb. 3-10: Schematische Darstellung der pΔSBII-, pΔSinv- und pΔSA-Vektoren (110 bp-Mutanten)**

Durch unterschiedliche Wiedereinführung der „fehlenden“ 110 bp in den pΔS110<sup>-</sup>-Vektor wurden die 110 bp-Mutanten pΔSBII (110 bp in Sinnrichtung) und pΔSinv (110 bp in Gegenrichtung) generiert. Die Herstellung des pΔSA-Vektors erfolgte durch Eliminierung von vier CpG-Dinukleotiden innerhalb der 110 bp-Region des pΔSBII-Vektors. Die flankierenden Bgl II-Restriktionsschnittstellen sowie die vorhandenen bzw. punktmultierten CpG-Dinukleotide sind hervorgehoben.

Unter Vorbehalt, dass die fünf CpG-Dinukleotide innerhalb der 110 bp keinem bisher bekannten immunstimulatorischen Motiv entsprechen, liegt es nahe, dass die Ursache der Immunstimulation durch die 110 bp auf eines der CpGs zurückzuführen ist. Eines der CpGs konnte bei der Herstellung des pΔSBII zu TpG umgewandelt werden. Die restlichen vier CpG-Dinukleotide wurden durch eine ortsspezifische Mutagenese (vgl. 2.1.10) in GpG bzw. TpG geändert. Der resultierende Vektor wurde als pΔSA bezeichnet und enthält keine CpG-Dinukleotide innerhalb der 110 bp Region (Abb. 3-10).

### 3.2.3.4 Einfluss der Lokalisierung, Orientierung und des CpG-Gehaltes der 110 bp auf seine immunstimulatorischen Eigenschaften

Die immunogene Wirkung der 110 bp innerhalb des pUCori konnte nach dem Einfügen in eine andere Vektor-Region nicht wiederhergestellt werden (vgl. 3.2.3.2). In den folgenden Versuchen sollte der Einfluss dieser Region hinsichtlich der Orientierung sowie der darin enthaltenen CpG-Dinukleotide auf die Induktion der IFN $\gamma$ -Sekretion getestet werden. Hierfür wurden die 110 bp-Mutanten in Stimulierungsversuchen naiver muriner Splenozyten untersucht. Die Überstände wurden 48 h nach Stimulierung geerntet und die Sekretion von IFN $\gamma$  mittels ELISA bestimmt. Als interne Stimulierungskontrolle dienten die zuvor gut charakterisierten pRS, pΔS und pΔS110<sup>-</sup> Konstrukte.



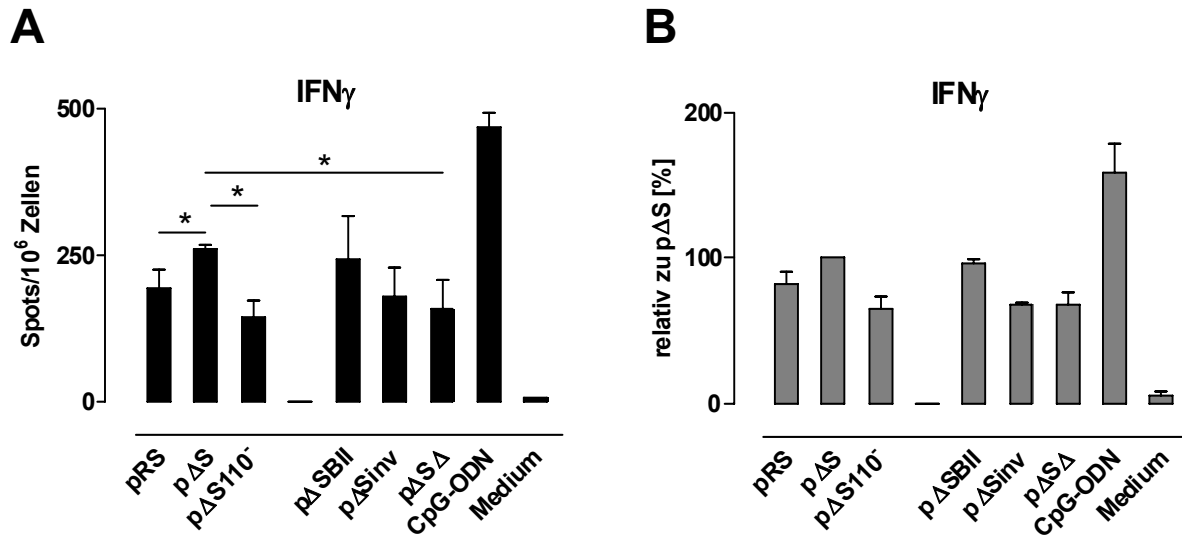
**Abb. 3-11: Induktion der IFN $\gamma$ -Sekretion nach Stimulierung muriner Splenozyten mit 110 bp-Mutanten**

Naive murine Splenozyten wurden mit den angegebenen pDNAs stimuliert. 48 h später wurden die Zellüberstände geerntet und die Sekretion des Th1 Cytokins IFN $\gamma$  mittels ELISA quantitativ bestimmt. Die abgebildeten Werte zeigen: **(A)** Mittelwerte aus zwei unabhängigen Proben eines repräsentativen Versuches, **(B)** relativ auf pΔS bezogene Werte aus zwei unabhängigen Experimenten. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 3 pmol synthetischen CpG-Oligodinukleotiden B-Typ (CpG-ODN 1826) stimuliert.

Wie in Abb. 3-11 dargestellt, konnte durch Wiedereinführung der 110 bp in Sinnrichtung in den pΔS110<sup>-</sup>-Vektor (pΔSBII) die Fähigkeit, IFN $\gamma$ -Sekretion zu induzieren, wiederhergestellt werden. Die Konzentration des proinflammatorischen Cytokins war nach Stimulierung mit pΔSBII auf dem gleichen Niveau wie bei pΔS und CpG-ODN. Durch pΔSinv konnte eine deutlich höhere IFN $\gamma$ -Produktion induziert werden als durch die pRS und pΔS110<sup>-</sup> Konstrukte, jedoch deutlich weniger als nach Stimulierung mit den pΔS und pΔSBII Vektoren. Die Eliminierung von CpG-Dinukleotiden aus der 110 bp-Region (pΔSΔ) bewirkte ebenso einen deutlichen Rückgang der IFN $\gamma$ -Sekretion.

Der Einfluss der Mutationen in der 110 bp-Region auf die Aktivierung IFN $\gamma$ -sezernierender Zellen wurde 24 h nach der Stimulierung mittels ELISpot-Assay bestimmt.





**Abb. 3-12: Induktion IFN $\gamma$ -produzierender muriner Splenozyten nach Stimulierung mit 110 bp-Mutanten**  
Naive murine Splenozyten wurden mit den angegebenen pDNAs stimuliert. Die IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen wurden 24 h später mittels ELISpot-Assay bestimmt. Die abgebildeten Werte zeigen: **(A)** Mittelwerte aus drei unabhängigen Proben eines repräsentativen Versuches, **(B)** relativ auf pΔS bezogene Werte aus zwei unabhängigen Experimenten. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit synthetischen CpG-Oligodinukleotiden B-Typ (CpG-ODN 1826) stimuliert. \*  $p < 0,005$  (Student t-test).

Wie aus Abb. 3-12 ersichtlich, konnte nach Stimulierung mit den 110 bp-Mutanten ein ähnliches Muster IFN $\gamma$ -sezernierender Splenozyten wie bei der Bestimmung der Gesamtmenge des proinflammatorischen Cytokins bestimmt werden. Während pΔSBII ungefähr die gleiche Anzahl an Spots wie der pΔS-Vektor induzierte, blieben pΔSinv und pΔSΔ auf dem Niveau der pRS und pΔS110<sup>-</sup>-Vektoren. Anders als bei der Menge an sezerniertem IFN $\gamma$  (Abb. 3-11) war die hohe Anzahl an IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen nach Stimulierung mit synthetischen B-Typ CpG-ODN auffällig.

Analog zu 3.2.2.2 konnte bestätigt werden, dass Modifikationen im CpG-Gehalt des Vektorrückgrats keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Anzahl der IFN $\gamma$ -sezernierenden Zellen haben, vielmehr jedoch auf die Menge der produzierten proinflammatorischen Cytokine wirken.

### 3.2.3.5 Zusammenfassung 1

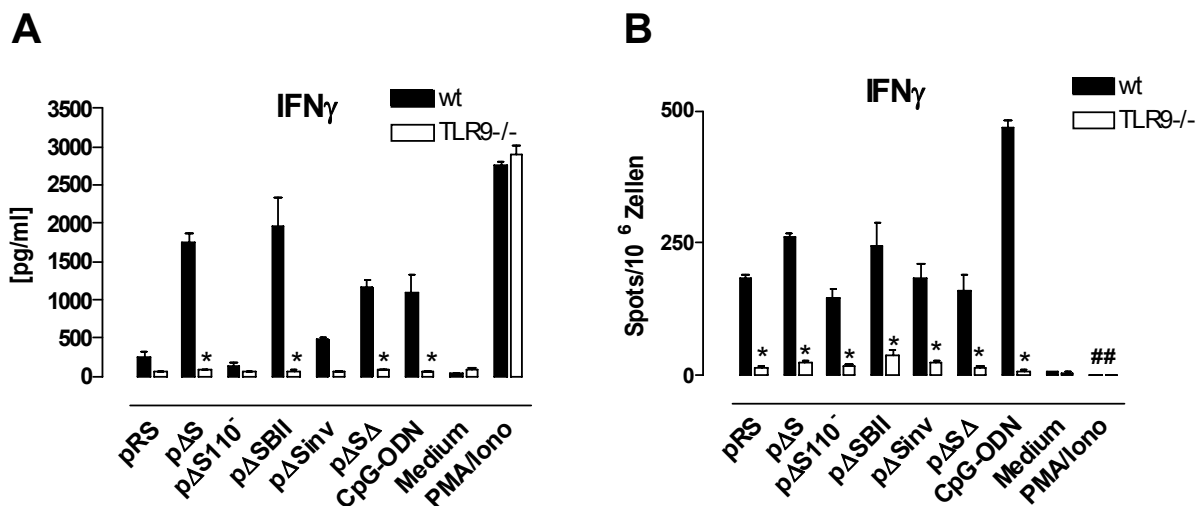
Durch die Reduktion des CpG-Gehaltes von 100% (pRS) auf 50,6% (pΔS) wurde die Balance zwischen immunbeeinflussenden CpG-Sequenzen deutlich zu Gunsten immunstimulatorischer Motive verschoben und resultierte in der Generierung eines Vektors (pΔS) mit deutlich erhöhtem mitogenen Potential. Die Deletion der 110 bp im *pUCori* des pΔS-Vektors hatte negative Auswirkungen hinsichtlich seiner immunogenen Eigenschaften. Die immunstimulatorische Fähigkeit der 110 bp ist Lokalisierungs- und

Orientierungsabhängig, wobei die fünf darin enthaltenden CpG-Dinukleotide eine beachtliche immunstimulatorische Rolle spielen.

### 3.2.4 Einfluss von TLR9 auf die Aktivierung der angeborenen Immunität nach Stimulierung mit pDNA

TLR9 ist als zellulärer endosomaler Rezeptor für die Erkennung unmethylierter CpG-Dinukleotide verantwortlich [116]. Die daraus resultierende Aktivierung der MyD88-abhängigen Signal-Kaskade und Hochregulierung der Expression proinflammatorischer Cytokine (IFN $\gamma$ -, IL-12p70 u.a.) ist eine der ersten Reaktionen des angeborenen Immunsystems als Antwort auf Infektionen [94]. Unmethylierte CpGs innerhalb einer pDNA fungieren somit als potentielle Induktoren der IFN $\gamma$ -Sekretion nach der Stimulierung immunkompetenter Zellen.

Um den TLR9-abhängigen Beitrag von CpGs bei der Aktivierung der IFN $\gamma$ -Produktion zu messen, wurden Splenozyten aus Wildtyp (wt) und TLR9-defizienten (TLR9<sup>-/-</sup>) Mäusen mit CpG-modulierten pDNAs stimuliert. 48 h später wurden die Zellüberstände geerntet und die Gesamtmenge an IFN $\gamma$  mittels ELISA bestimmt (Abb. 3-13 A). Die Anzahl IFN $\gamma$ -sezernierender Zellen konnte 24 h nach Stimulierung mittels ELISpot analysiert werden (Abb. 3-13 B).

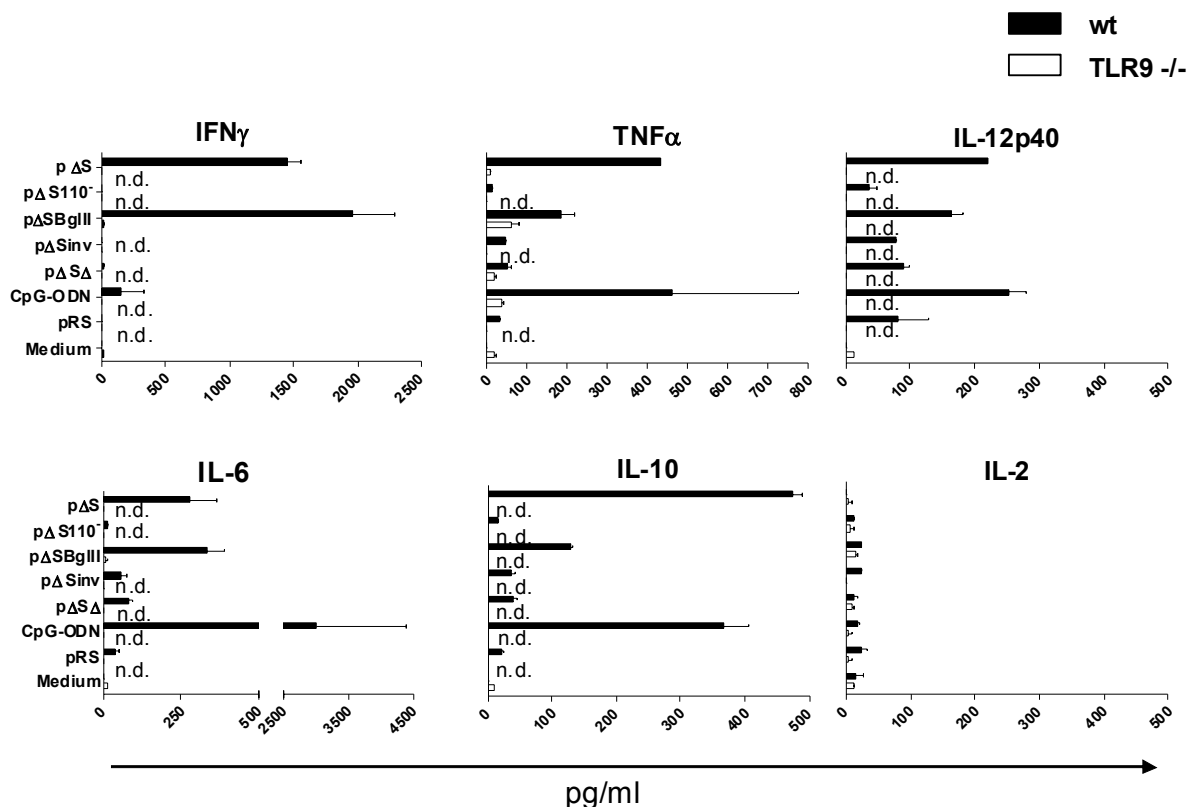


**Abb. 3-13: Einfluss von TLR9 auf die Aktivierung der angeborenen Immunität nach Stimulierung mit pDNA** Naive murine Splenozyten aus Wildtyp (wt)- und TLR9<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden mit den angegebenen pDNAs stimuliert. **(A)** 48 h später wurden die Überstände der stimulierten Zellen quantitativ geerntet und die Menge des Th1-Cytokins IFN $\gamma$  mittels ELISA ermittelt. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Proben eines repräsentativen Versuches dar. **(B)** Die Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender Zellen wurden 24 h später mittels ELISpot-Assay bestimmt. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Proben eines repräsentativen Versuches dar. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 3 pmol synthetischen CpG-Oligodinukleotiden B-Typ (CpG-ODN 1826) stimuliert. Die Stimulierung mit PMA/Iono diente als interne Assay-Kontrolle. ## = nicht auszählbar, TLR = Toll like receptor, PMA = Phorbol 12-myristate 13-acetate, Iono = Ionomycin. \*  $p < 0,01$  (wt vs. TLR9<sup>-/-</sup>; Student t-test).

Die Abhängigkeit der IFN $\gamma$ -Sekretion von TLR9 nach Stimulierung muriner Splenozyten mit pDNA ist in Abb. 3-13 deutlich zu erkennen. Analog zu den bisherigen Daten zeigten die CpG-modulierten pDNAs nach Stimulierung von wt-Splenozyten das bekannte Stimulierungsprofil hinsichtlich der freigesetzten Menge an IFN $\gamma$  und der Anzahl an IFN $\gamma$ -sezernierenden Zellen. Nach der Stimulierung TLR9-defizienter Splenozyten konnte weder durch verschiedene pDNA-Vektoren noch mit CpG-ODN eine IFN $\gamma$ -Sekretion induziert werden. Die Stimulierung mit PMA/Iono als interne Versuchskontrolle zeigte, dass die TLR9 $^{-/-}$  Splenozyten in der Lage waren, IFN $\gamma$  TLR9-unabhängig zu sezernieren.

## 3.2.4.1 Beteiligung von TLR9 an der Induktion von Th1-Cytokinen

Unter 3.2.4 wurde die Abhängigkeit der IFN $\gamma$ -Sekretion von TLR9 nach Stimulierung von Maus-Splenozyten mit pDNA gezeigt. Um den Einfluss von TLR9 auf die Induktion prominenter Th1- und Th2-Cytokine nach Aufnahme der pDNA in die Zelle zu untersuchen, wurde das Cytokin-Profil nach Stimulierung muriner wt und TLR9 $^{-/-}$  Splenozyten mittels Luminex-Technologie bestimmt.



**Abb. 3-14: Beteiligung von TLR9 an der Cytokin-Induktion**

Naive murine Splenozyten aus Wildtyp (wt)- und TLR9 $^{-/-}$ -Mäusen wurden mit den angegebenen pDNAs stimuliert. 48 h später wurden die Überstände der stimulierten Zellen quantitativ geerntet und die absoluten Mengen an Th1-Cytokinen (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12p40), Th2-Cytokin (IL-10) sowie der proinflammatorischen Cytokine IL-6 und IL-2 mittels Luminex-Technologie bestimmt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit synthetischen CpG-Oligodinukleotiden B-Typ (CpG-ODN 1826) stimuliert. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Proben eines repräsentativen Versuches dar. n.d.: nicht detektierbar

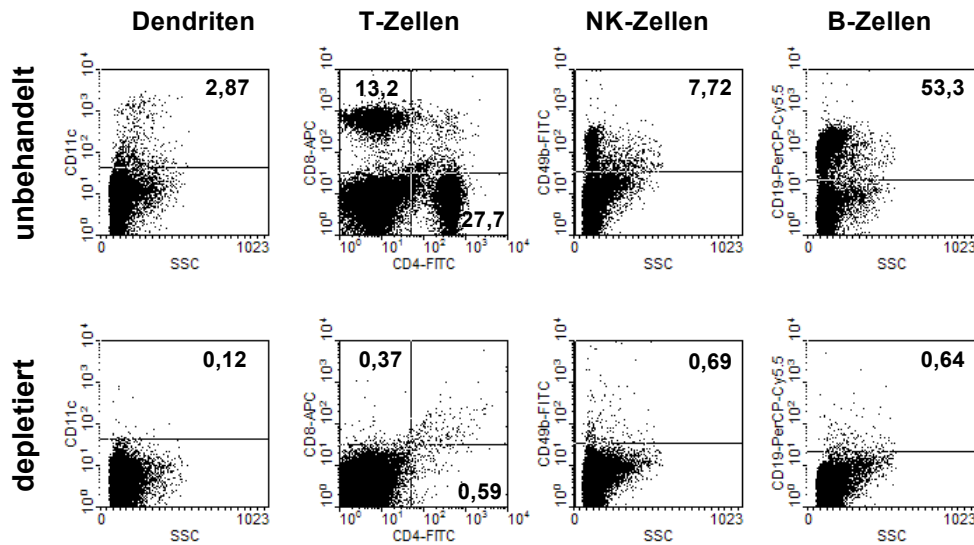
Ermittelt wurden die sezernierten Mengen der Th1-Cytokine IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-12p40, des Th2-Cytokins IL-10 sowie der proinflammatorischen Cytokine IL-6 und IL-2. Analog zur IFN $\gamma$ -Messung (Abb. 3-13) konnte nach der *in vitro* Stimulierung TLR9-defizienter Maus-Splenozyten auch keine Sekretion von anderen proinflammatorischen sowie Th1-Cytokinen im Zellüberstand gemessen werden (Abb. 3-14). Wie in den bisherigen Luminex Versuchen (vgl. 3.2.2.3 und 3.2.3.2) wurde die Fähigkeit zur Induktion Th1-polarisierender Cytokine durch die Vektoren p $\Delta$ S und p $\Delta$ SBII nach der Stimulierung muriner wt-Splenozyten bestätigt. Die Sekretion Th2-charakteristischer Cytokine (IL-4 und IL-5) konnte weder nach Stimulierung von wt- noch TLR9<sup>-/-</sup>-Splenozyten induziert werden (Daten nicht gezeigt). CpG-ODN zeigten ein ähnliches Cytokin-Profil wie das p $\Delta$ S-Konstrukt. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass unmethylierte CpGs in pDNAs, in Abhängigkeit von TLR9, entscheidend zur Induktion von proinflammatorischen und Th1-Cytokinen nach Stimulierung von murinen Splenozyten beitragen.

### **3.2.5 Beteiligung einzelner Zellpopulationen des Immunsystems an der IFN $\gamma$ -Sekretion**

Unter 3.2.2 und 3.2.3 konnte gezeigt werden, dass der CpG-modulierte pDNA-Vektor p $\Delta$ S in der Lage ist, naive murine Splenozyten zur Sekretion proinflammatorischer und Th1-Cytokine anzuregen. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die durch den TLR9 erkannten CpG-Sequenzen (vgl. 3.2.4). Da TLR9 nicht auf allen Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert wird [94], wurde in folgenden Versuchen die Beteiligung einzelner Zellpopulationen an der Aktivierung der angeborenen Immunität nach Stimulierung mit dem pRS-, p $\Delta$ S- und p $\Delta$ S 110<sup>-</sup>-Vektoren untersucht.

Die isolierten Maus-Splenozyten bestehen zu 50-60% aus B-Lymphozyten, zu etwa 30-35% CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie zu 10% aus Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen (DC). Der Rest setzt sich aus neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen und Fibroblasten zusammen. Zur Untersuchung der Bedeutung dieser Zellpopulationen wurden die entsprechenden Zellen mit Hilfe spezifischer magnetischer Partikel aus der Gesamtpopulation depletiert (vgl. 2.6.8). B-Zellen wurden durch ihren Oberflächenmarker CD19 charakterisiert, T-Zellen durch CD4 bzw. CD8, DC über CD11c und NK-Zellen über CD49b. Aus technischen Gründen war es zum damaligen Zeitpunkt nicht möglich, die Monozyten/Makrophagen-Population aus den Maus-Splenozyten zu entfernen.

Die nachfolgenden Stimulierungen der Splenozyten-Fractionen mit den jeweils aussortierten Zellpopulationen sollten auf die Rolle der einzelnen Immunzellen bei der Generierung einer Immunreaktion nach Stimulierung mit CpG-modulierten pDNA hinweisen.



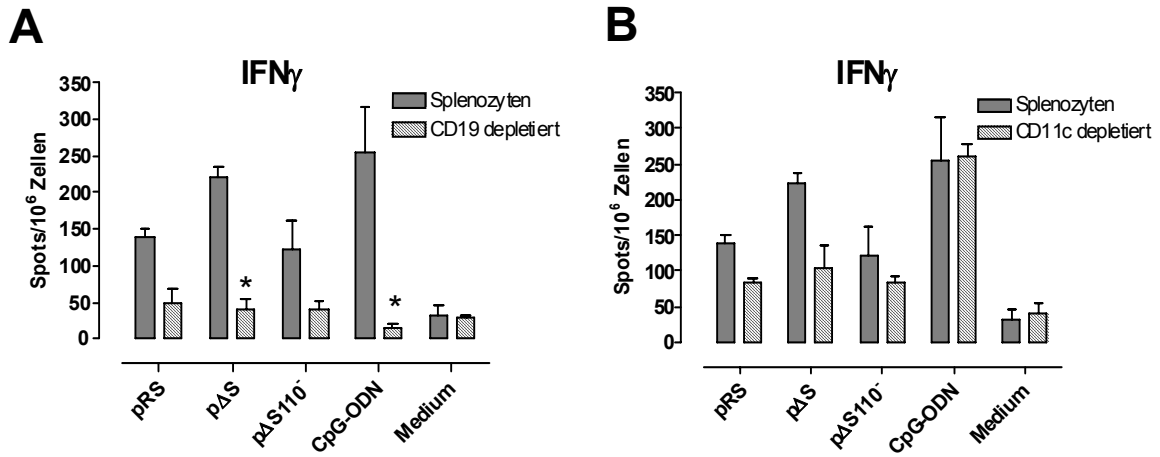
**Abb. 3-15: FACS-Analyse der Depletion einzelner Zellpopulationen des Immunsystems**

In der oberen Reihe sind die prozentualen Anteile der jeweiligen Immunzellen an der Gesamt-Splenozytenpopulation dargestellt (unbehandelt). Der prozentuale Anteil einzelner Zelltypen nach der Depletion ist in der unteren Reihe gezeigt (depletiert). Für die Depletion sowie den durchflußzytometrischen Nachweis distinkter Zellpopulationen wurden folgende Oberflächenmarker verwendet: CD11c (Dendriten), CD4 und CD8 (T-Zellen), CD 49b (NK-Zellen) und CD19 (B-Zellen). SSC = side scatter.

Die Überprüfung der Depletion einzelner Zellpopulationen erfolgte mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analyse. Hierbei wurde die Gesamtpopulation der Splenozyten bzw. die jeweilige Restpopulation mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper „gefärbt“, welcher an den selben Oberflächenmarker bindet wie die zur Depletion verwendeten *beads*. Wie in Abb. 3-15 dargestellt, konnten die CD19-positiven B-Zellen zu mindestens 98% aussortiert werden, die CD49b-positiven NK-Zellen zu über 90%. CD4- und CD8-positive T-Zellen wurden zu über 97% abgereichert, die DCs mit dem Oberflächenmarker CD11c zu mindestens 95%.

### 3.2.5.1 Rolle der TLR9-exprimierenden Zellen bei der IFN $\gamma$ -Sekretion nach Stimulierung mit pDNA

TLR9 wird in murinen Zellen nur in B-Lymphozyten, DCs und Monozyten exprimiert [94]. Als Reaktion auf die Stimulierung mit CpG-DNA sind die B-Zellen in der Lage, hohe Mengen an IFN $\gamma$  zu produzieren [168,219]. Um den Einfluss von B-Zellen und DCs in der Gesamtheit der Maus-Lymphozyten auf die IFN $\gamma$ -Sekretion zu untersuchen, wurden murine Splenozyten jeweils nach Depletion der B-Zellen oder DCs mit den pRS, p $\Delta$ S und p $\Delta$ S110<sup>-</sup>-Vektoren, sowie CpG-ODN stimuliert. Der Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender Zellen wurde 24 h später mittels ELISpot bestimmt.



**Abb. 3-16: Rolle der TLR9-exprimierenden Zellen bei der IFN $\gamma$ -Sekretion nach Stimulierung mit pDNA**

Naive murine Splenozyten (grau) sowie naive CD19-depletierte ((A), schraffiert) und CD11c-depletierte ((B), schraffiert) murine Splenozyten wurden mit den angegebenen pDNAs stimuliert. IFN $\gamma$ -produzierende Zellen wurden 24 h später mittels ELISpot bestimmt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit synthetischen CpG-Oligodinukleotiden B-Typ (CpG-ODN 1826) stimuliert. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Proben eines repräsentativen Versuches dar. \*  $p < 0,01$  (Splenozyten vs. CD19-depletiert; Student t-test).

Das induzierte IFN $\gamma$ -ELISpot Muster nicht-depletierter Zellen stimmte nach Stimulierung unbehandelter Splenozyten mit den bisher ermittelten Daten überein (vgl. 3.2.2.2). Durch pΔS konnten äquivalente Mengen IFN $\gamma$ -produzierender Splenozyten detektiert werden wie nach Stimulierung mit CpG-ODN (Abb. 3-16). Im Vergleich dazu konnten durch die pRS- und pΔS110<sup>-</sup>-Vektoren nur etwa 60% der Anzahl an IFN $\gamma$ -Spots nachgewiesen werden. Die Depletion von B-Lymphozyten aus der Gesamt-Splenozyten-Population hatte einen signifikanten Rückgang der Menge IFN $\gamma$ -sezernierender Zellen zur Folge (Abb. 3-16 A). Dabei wurde die Zahl der IFN $\gamma$ -Spots bei allen Konstrukten auf unter 17% reduziert. Besonders auffällig ist der starke Abfall nach Stimulation mit CpG-ODN. Im Gegensatz dazu war die Abnahme der Zahl an IFN $\gamma$ -Spots nach Depletion CD11c-positiver DCs weniger eindeutig (Abb. 3-16 B). Obwohl nach Stimulierung mit pΔS ca. 50% weniger IFN $\gamma$ -produzierende Zellen induziert wurden, hatte die Depletion von DCs keinen Einfluss auf die IFN $\gamma$ -Sekretion nach Behandlung mit CpG-ODN.

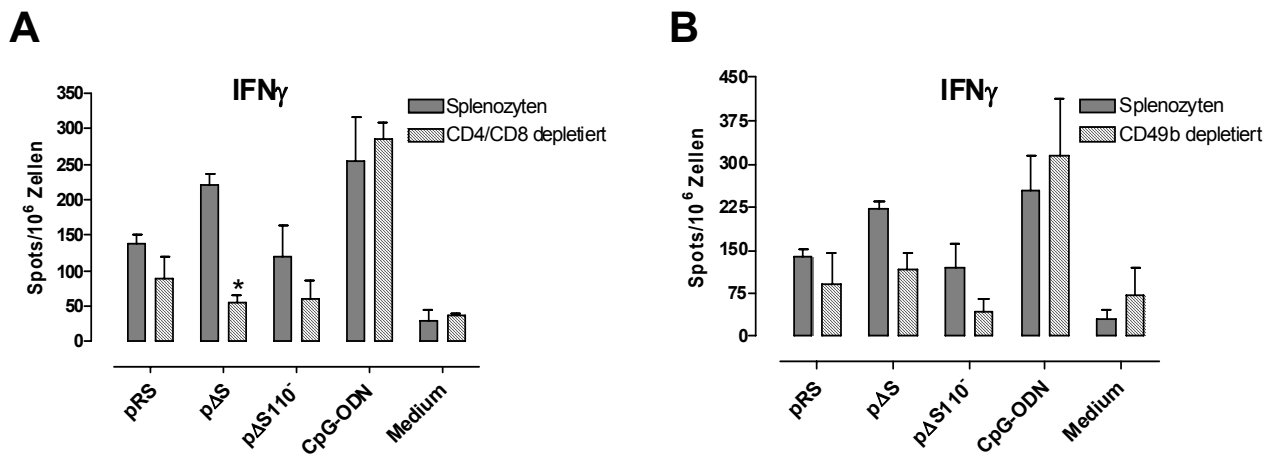
Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass B-Lymphozyten die potentiell verantwortliche Zellpopulation für die Produktion von IFN $\gamma$  nach Stimulierung muriner Splenozyten mit CpG-modulierten pDNA-Vektoren sind.

### 3.2.5.2 Einfluss von T-Zellen und NK-Zellen auf die pDNA-abhängige IFN $\gamma$ -Produktion

Im Rahmen einer proinflammatorischen Reaktion des Immunsystems fungieren NK-Zellen und T-Zellen als wichtige IFN $\gamma$ -Produzenten (vgl. 1.4.3). Durch die Messung der IFN $\gamma$ -

Konzentration wurde gezeigt, dass der CpG-modulierte p $\Delta$ S-Vektor nach Stimulierung muriner Splenozyten eine stark Th1-polarisierte Immunreaktion hervorruft (vgl. 3.2.2.3).

Im Folgenden soll der Beitrag prominenter IFN $\gamma$ -produzierender Zellpopulationen nach pDNA-Stimulierung determiniert werden. Hierfür wurden Maus-Splenozyten mit jeweils depletierten NK-Zellen oder T-Zellen mit den pRS, p $\Delta$ S und p $\Delta$ S110<sup>-</sup>-Vektoren sowie CpG-ODN stimuliert und die Anzahl IFN $\gamma$ -sezernierender Zellen nach 24 h mittels ELISpot bestimmt.



**Abb. 3-17: Einfluss von T-Zellen und NK-Zellen auf die IFN $\gamma$ -Sekretion**

Naive murine Splenozyten (grau) sowie naive CD4/CD8-depletierte ((A), schraffiert) und CD49b-depletierte ((B), schraffiert) murine Splenozyten wurden mit den angegebenen pDNAs stimuliert. IFN $\gamma$ -produzierende Zellen wurden 24 h später mittels ELISpot Assay bestimmt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit synthetischen CpG-Oligonukleotiden B-Typ (CpG-ODN 1826) stimuliert. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Proben eines repräsentativen Versuches dar.

Analog zu der Depletion von DCs (vgl. 3.2.5.1) wurde nach Stimulierung CD4/CD8- und CD49b-depletierter Splenozyten mit CpG-modulierten pDNA-Vektoren eine geringe Abnahme der Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender Zellen determiniert. Die einzige Ausnahme in Form einer signifikanten Reduktion der Anzahl an IFN $\gamma$ -Spots stellen CD4/CD8-defiziente Splenozyten nach der Stimulierung mit dem p $\Delta$ S-Vektor dar (Abb. 3-17 A). Erwartungsgemäß hatte die Depletion der NK- und T-Zellen aus der Gesamt-Splenozytenpopulation keinen Einfluss auf die CpG-ODN-bedingte IFN $\gamma$ -Produktion. Dies deutet darauf hin, dass die CpG-vermittelte IFN $\gamma$ -Sekretion durch NK- und T-Zellen eher auf indirektem Weg durch aktivierte APC zustande kommt. Demzufolge ist der festgestellte Rückgang der Anzahl an IFN $\gamma$ -sezernierenden Zellen nach Depletion von NK- und T-Zellen eher auf Nicht-CpG stimulatorische Sequenzen zurückzuführen.

Zusammengefasst geben die Daten der Depletionsstudien einen Hinweis auf die TLR9-unabhängige Hochregulation der IFN $\gamma$ -Produktion in murinen Splenozyten nach Stimulierung mit pDNA.

### **3.2.6 Untersuchungen der immunogenen Eigenschaften CpG-modulierter pDNA-Vektoren im humanen System**

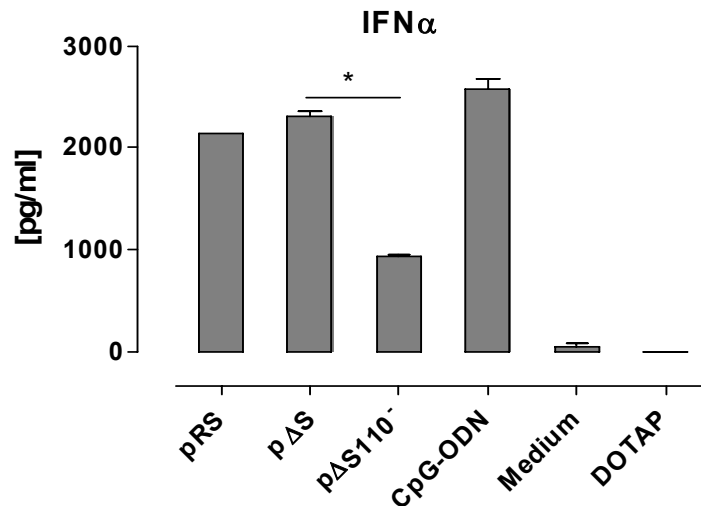
Wie die bisherigen Ergebnisse zeigen, wurde durch die Modulation des CpG-Gehaltes im Rückgrat einer kommerziellen pDNA ein immunaktivierender pDNA-Vektor (p $\Delta$ S) generiert. Die gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass seine Mitogenität durch die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen immunstimulatorischen und immuninhibitorischen Sequenzen zustande kommt.

Der potentielle Einsatz von p $\Delta$ S als DNA-Vakzine-Vektor erfordert eine ausführliche Charakterisierung seiner immunogenen Eigenschaften im humanen System. Außerdem sollte die Sequenz-abhängige Aktivierung der angeborenen Immunität mit Fokus auf die 110 bp Region nach Stimulierung immunkompetenter humaner Zellen untersucht werden.

#### **3.2.6.1 Induktion der Interferon $\alpha$ (IFN $\alpha$ )-Sekretion nach Stimulierung humaner PBMC mit pDNA**

Als Vertreter der Typ-I Cytokine wird IFN $\alpha$  nach einer viralen Infektion oder nach Stimulierung mit synthetischen CpG-ODN durch immunkompetente Zellen produziert [164]. Neben seiner antiviralen Aktivität spielt IFN $\alpha$  eine entscheidende Rolle bei vielen immunregulatorischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Aktivierung verschiedener Zellen des Immunsystems [164]. Um die Fähigkeit der CpG-modulierten pDNAs, eine Induktion der IFN $\alpha$ -Sekretion hervorzurufen, zu untersuchen, wurden humane PBMC mit den pRS, p $\Delta$ S und p $\Delta$ S110 $\bar{}$ -Vektoren stimuliert und die IFN $\alpha$ -Konzentration nach 24-stündiger Inkubation in Überständen der stimulierten Zellen mittels ELISA quantitativ bestimmt. Zur effizienten pDNA-Aufnahme in die Zellen wurden die pDNAs im Komplex mit DOTAP auf die PBMCs gegeben.





**Abb. 3-18: Induktion der IFN $\alpha$ -Sekretion nach Stimulierung humaner PBMCs mit pDNAs**

$2 \times 10^6$  humane PBMCs wurden mit 1 pmol/ml der angegebenen pDNAs im Komplex mit DOTAP stimuliert. Die Sekretion des Typ-I Cytokins IFN $\alpha$  wurde 24 h später in Zell-Überständen mittels ELISA quantifiziert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 2 pmol synthetischen CpG-Oligodinukleotiden -Typ A (CpG-ODN-A) stimuliert. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Proben eines repräsentativen Versuches dar. PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell. \*  $p < 0,005$  (Student t-test).

Wie aus Abb. 3-18 ersichtlich, konnte durch den p $\Delta$ S-Vektor eine starke IFN $\alpha$ -Sekretion (2300 pg/ml) induziert werden. Die Konzentration des Typ-I Interferon entsprach der ermittelten Konzentration nach Stimulierung mit Typ-A CpG-ODN (2578 pg/ml).

Während gegenüber dem pRS-Konstrukt (2140 pg/ml) keine deutliche Steigerung der IFN $\alpha$ -Sekretion nach Stimulierung humaner PBMCs mit dem p $\Delta$ S-Vektor nachgewiesen werden konnte, resultierte die Deletion der 110 bp im *pUCori* in einem signifikanten Rückgang der IFN $\alpha$ -Sekretion (942 pg/ml).

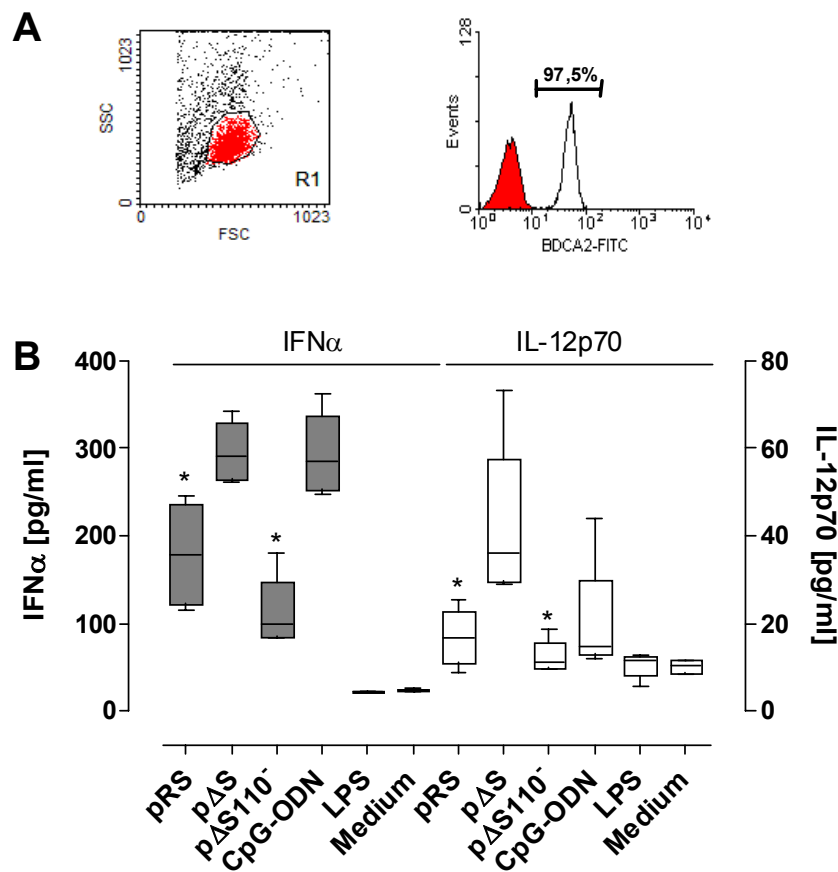
### 3.2.6.2 Induktion der Cytokin-Sekretion nach Stimulierung humaner pDCs mit pDNA

DCs als professionelle APC stellen eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und spezifischen Immunsystem dar [149]. Aufgrund phänotypischer Merkmale sowie des induzierten Cytokin-Profiles nach einer Infektion werden DCs in zwei Subpopulationen, die myeloiden (mDCs) und plasmazytoiden (pDCs) Dendriten unterteilt [95,150]. Als Hauptproduzenten des Typ-I Interferons IFN $\alpha$  beeinflussen pDCs den Aktivierungszustand von NK-Zellen, B-Lymphozyten sowie T-Zellen und tragen somit zur Generierung der humoralen und zellulären Immunantwort bei [95]. Im Gegensatz zu mDCs exprimieren pDCs TLR9 und können durch CpG-ODN zur Produktion hoher Mengen IFN $\alpha$  angeregt werden [164].

Die Fähigkeit von pDNA in humanen pDCs IFN $\alpha$ -Sekretion zu induzieren wurde in Stimulierungsversuchen untersucht. Außerdem sollte aufgeklärt werden, ob CpG-

Modulationen im Vektor-Rückgrat, analog zur  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion im murinen System, die  $\text{IFN}\alpha$ -Sekretion beeinflussen.

pDCs wurden durch positive Selektion aus humanen PBMCs unterschiedlicher Spender isoliert (vgl. 2.6.3), anschließend 24 h mit IL-3 als Maturierungsfaktor kultiviert und mit CpG-modulierten pDNAs sowie CpG-ODN und LPS stimuliert. Neben der Sekretion von  $\text{IFN}\alpha$  wurde nach 24-stündiger Inkubation in den Überständen stimulierter Zellen auch die Konzentration des Th1-Cytokins IL-12p70 quantitativ bestimmt.



**Abb. 3-19: Induktion der Sekretion von  $\text{IFN}\alpha$  und IL-12p70 nach Stimulierung humaner pDCs mit pDNAs**  
**(A)** Reinheitskontrolle der pDCs durch Anfärbung des spezifischen Oberflächenmarkers BDCA2 (CD303) mit anschließender Analyse im FACS. pDCs konnten mit einer Reinheit von 97,5% aufgereinigt werden. Dot-Plot: gegatete Zellen = Lebendzellpopulation, Histogramm: ausgefüllte Fläche = ungefärbte Zellen; nicht ausgefüllte Fläche = BDCA2-gefärbte Zellen. **(B)**  $2 \times 10^4$  pDCs wurden mit 50  $\mu\text{g}$  der angegebenen pDNAs stimuliert. Die Sekretion der Typ-I ( $\text{IFN}\alpha$ ) und Th1 (IL-12p70) Cytokine wurde nach 24-stündiger Inkubation in Zell-Überständen mittels ELISA quantitativ ermittelt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 2 pmol CpG-Oligodinukleotiden-Typ A (CpG-ODN-A) stimuliert. Diese Abbildung ist repräsentativ für 2 Spender aus 2 unabhängigen Experimenten. pDCs: plasmazytoide Dendritische Zellen, SSC: side scatter, FSC: forward scatter, LPS: Lipopolysaccharid.  
 \*  $p < 0,01$  (vs. pAS; Student t-test).

Die Reinheitskontrolle isolierter pDCs erfolgte durch Anfärbung des spezifischen Oberflächenmarkers BDCA2 (CD303). Die anschließende FACS-Analyse der angefärbten Zellen zeigte, dass die isolierte Zellpopulation zu 97,5% aus BDCA2-positiven pDCs bestand

(Abb. 3-19 A). Die angegebene Prozentzahl bezieht sich auf den pDCs-Anteil der immunologisch relevanten Lebendzellpopulationen.

Wie in Abb. 3-19 B dargestellt, wurde die höchste IFN $\alpha$ -Sekretion nach Stimulierung humaner pDCs mit dem p $\Delta$ S-Vektor (296 pg/ml) und mit CpG-ODN (295 pg/ml) induziert. Dagegen konnte nach pRS-Stimulierung etwa 40% weniger IFN $\alpha$  gemessen werden (179 pg/ml). Analog zu den Stimulierungsdaten und der Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen im Mausmodell hatte die Deletion der 110 bp im *pUCori* eine enorme Verminderung der Fähigkeit, IFN $\alpha$  zu induzieren, zur Folge. Die Auswirkung der 110 bp-Sequenz auf die Vektor-Immunogenität wurde durch die minimale Konzentration des sezernierten Th1-Cytokins IL-12p70 (13 pg/ml) bestätigt. Der p $\Delta$ S-Vektor hingegen war als einziges Stimulans in der Lage, humane pDCs zur nennenswerten Produktion von IL-12p70 anzuregen (38 pg/ml). Die Stimulierung humaner pDCs mit hochimmunogenem LPS hatte weder zu IFN $\alpha$ - noch zu IL-12p70-Sekretion geführt.

Die starke Induktion der Sekretion von Typ-I Interferon (IFN $\alpha$ ) und Th1-Cytokin (IL-12p70) nach der Stimulierung von pDCs aus verschiedenen Spendern zeigt die Fähigkeit des p $\Delta$ S-Vektors, auch in humanen Zellen die Produktion immunregulatorischer Cytokine zu aktivieren.

### 3.2.7 Zusammenfassung 2

Um den Einfluss von Sequenz-Modifikationen im Vektor-Rückgrat auf die Aktivierung der angeborenen Immunität zu untersuchen, wurden CpG-modulierte pDNA-Konstrukte generiert. Die anschließenden immunologischen Charakterisierungen zeigten, dass der p $\Delta$ S-Vektor gegenüber den anderen Vektoren in der Lage ist sowohl naive murine Splenozyten zur Sekretion hoher Mengen proinflammatorischer Cytokine anzuregen als auch in humanen pDCs die Produktion von IFN $\alpha$  zu induzieren. Dabei konnte anhand der Messung des Cytokin-Profiles eine Th1-polarisierende Immunantwort nach Stimulierung mit dem p $\Delta$ S-Vektor nachgewiesen werden. Diese Eigenschaften machen den p $\Delta$ S-Vektor zu einem Kandidaten für Vakzinierungszwecke. Die 110 bp-Region in *pUCori* hat abhängig von der Lokalisierung, der angrenzenden Sequenzen und des CpG-Gehaltes eine entscheidende Rolle für die immunogenen Eigenschaften der hergestellten CpG-modifizierten pDNA. Der pDNA-Vektor mit fehlender 110 bp-Region (p $\Delta$ S110<sup>-</sup>) besitzt demzufolge eine sehr geringe Mitogenität, was ihn zu einem interessanten Kandidaten für die pDNA-basierte Gentherapie macht. Die induzierte Sekretion Th1-polarisierender Cytokine nach Stimulierung muriner Splenozyten mit pDNA ist abhängig von der Expression des TLR9. Die Depletionsstudie hat erste Hinweise auf die B-Lymphozyten, als verantwortliche Zellpopulation für die IFN $\gamma$ -Sekretion nach pDNA-Stimulierung, gegeben.

### **3.3 Einfluss von CpG-Dinukleotiden innerhalb der kodierenden Region auf die *in vitro* und *in vivo* Expression des murinen Erythropoietin-Gens (mEPO)**

Die Basis für einen effizienten pDNA-basierten Gentherapievektor ist eine gute und langandauernde Expression des kodierten Transgens. Eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Genexpression spielen im Promotorbereich und Leserahmen eines Gens enthaltenden CpG-Dinukleotide. Einerseits können Methylierungen dieser CpGs zu einer Verminderung oder sogar zur Abschaltung der Expression der Gene führen [70,71,214,220], andererseits fungieren intragenische CpG-Dinukleotide als Bindestellen für Transkriptions-aktivierende Faktoren [221].

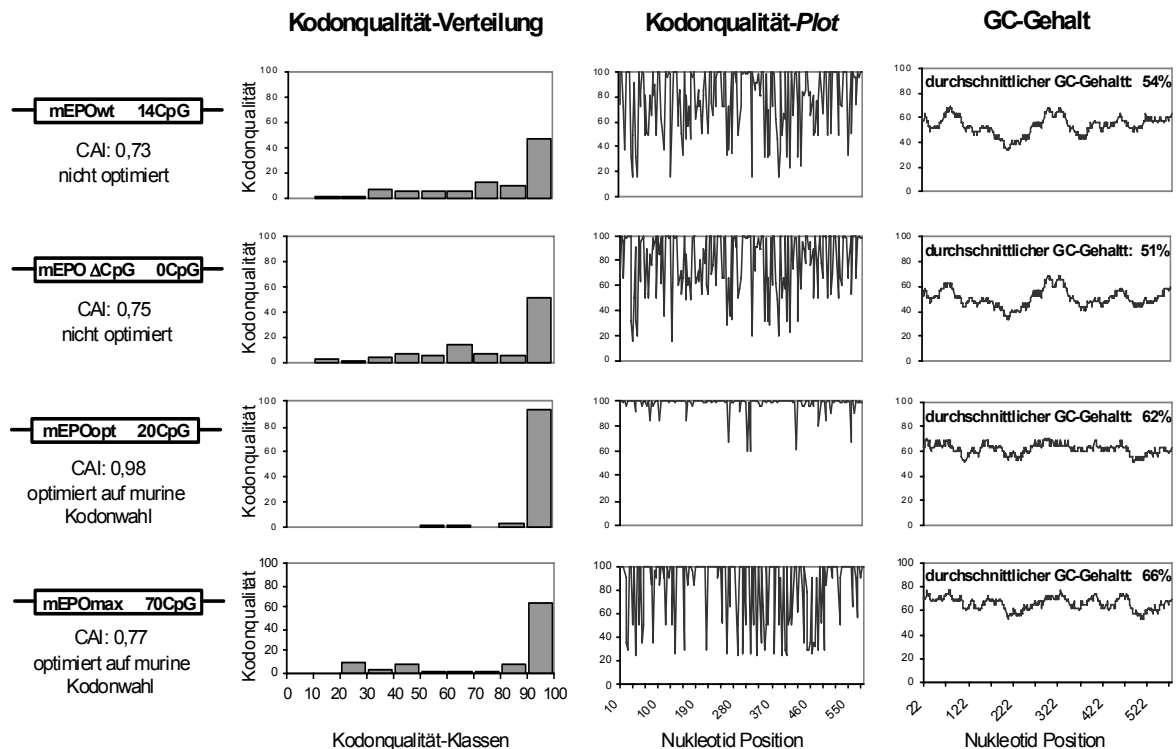
Als Modell-Transgen für die Untersuchungen der *in vitro* und *in vivo* Expression wurde mEPO verwendet. Humanes EPO, als Schlüsselhormon bei der Erythrozytenbildung, wird in der Klinik zur Behandlung diverser Anämien unterschiedlicher Ätiologie eingesetzt und ist gegenwärtig einer der meistverkauften pharmazeutischen Produkte weltweit. Als Alternative zur kostenintensiven Therapie mit rHu-EPO wird in den letzten Jahren die EPO-Gentherapie diskutiert. Neben den Virus-assoziierten Vektoren werden dabei auch pDNA-basierte EPO-Gentherapie-Vektoren entwickelt. Um die Transfektions- bzw. Expressionseffizienz einer pDNA erhöhen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss des CpG-Gehaltes in der kodierenden Sequenz von mEPO auf die Höhe und Dauer der *in vitro* und *in vivo* Expression untersucht. In diesem Zusammenhang wurden CpG-modulierte sowie Kodonoptimierte Varianten des mEPO-Gens generiert und in Expressionsanalysen näher charakterisiert. Neben der *in vitro* Proteinexpression wurde der Einfluss von CpG-Modifikationen auf die Expression mEPO-spezifischer RNA untersucht. Zur Untersuchung der *in vivo* Expression der mEPO-Varianten wurden zudem unterschiedliche Konzentrationen mEPO-kodierender pDNA in Balb/c Mäuse appliziert und zu verschiedenen Zeitpunkten die mEPO-spezifischen Expressionsparameter gemessen.

#### **3.3.1 Design und Optimierung der mEPO-Gene**

Als Grundlage für die Synthese der verschiedenen Varianten des mEPO-Gens diente die Degenerierung des genetischen Kodes mit der Möglichkeit zur Änderung der dritten Position im Kodon, ohne dabei die kodierende Aminosäuresequenz zu beeinflussen [222]. Ausgehend vom mEPO Wildtyp-Gen (mEPOwt) wurden drei Genvarianten mit Fokus auf die Modifikation des CpG-Gehaltes sowie die Kodonwahl-Optimierung generiert (Abb 3-20). Analog zu mEPOwt (14 CpGs) weist das mEPO $\Delta$ CpG-Gen keine Kodonwahloptimierung, jedoch eine vollständige Eliminierung aller CpGs auf. Interessanterweise wurde die

## Ergebnisse

Kodonqualität, welche sich im *codon adaptation index* (CAI) widerspiegelt, dadurch nicht negativ beeinflusst (mEPOwt: CAI 0,73; mEPO $\Delta$ CpG: CAI 0,75).



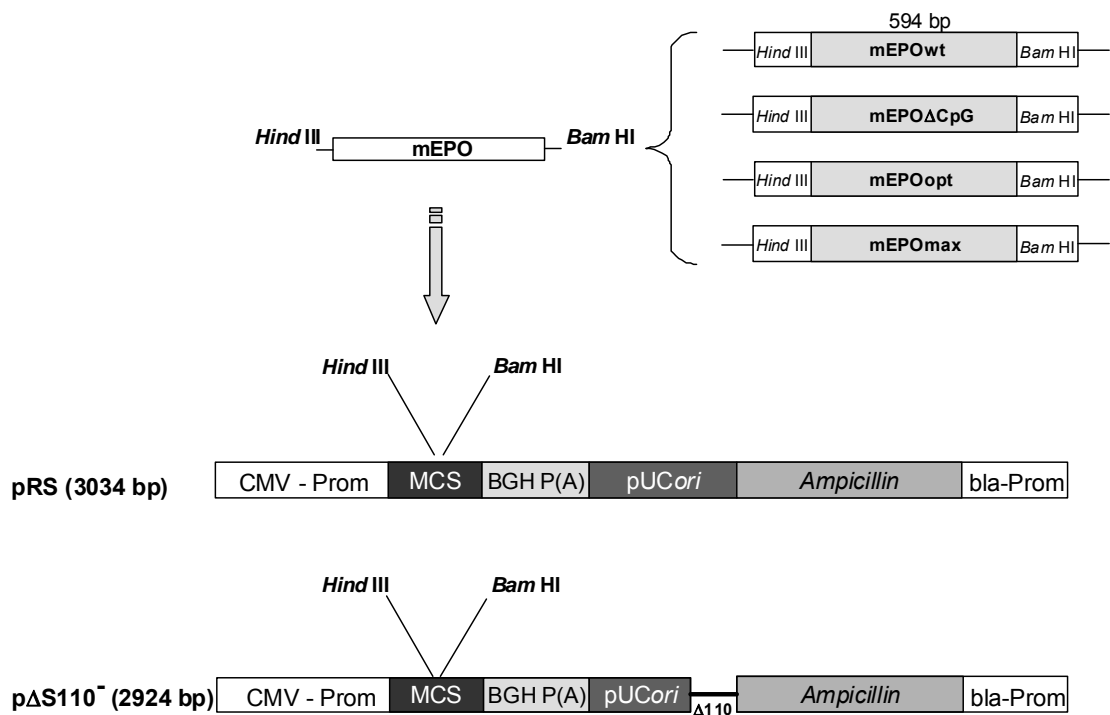
**Abb. 3-20: Schematische Darstellung der generierten mEPO Gene hinsichtlich der Kodonwahl-Optimierung und des CpG-Gehalts**

Die Kodonwahl des murinen EPO-Wildtyp Gens (mEPOwt) und des CpG-freien Gens (mEPO $\Delta$ CpG) wurde nicht optimiert. Zusätzlich wurden ein Kodonwahl-optimiertes (mEPOopt) und ein CpG-reiches (mEPOmax) murines Gen hergestellt. Die **Kodonqualität-Verteilung** zeigt den Prozentsatz der Kodonsequenz in den jeweiligen Kodonqualität-Klassen. Das Qualitätsniveau der am häufigsten verwendeten Kodons ist dabei auf 100 gesetzt, die Einteilung der Klassen erfolgt dementsprechend. Der **Kodonqualität-Blot** zeigt die Qualität der verwendeten Kodons an der entsprechenden Position innerhalb der Sequenz. Der durchschnittliche **GC-Gehalt** der generierten mEPO-Gene ist jeweils rechts gezeigt. CAI = codon adaptation index.

Erwartungsgemäß resultierte die Optimierung der mEPOwt Sequenz auf das im murinen System am häufigsten verwendete Kodon (mEPOopt) in einer Steigerung des CAI-Wertes auf 0,98 (Abb. 3-20). Der CpG-Gehalt erhöhte sich dabei auf 20. Basierend auf dem mEPOopt-Gen wurde ein ebenso Kodonwahl-optimiertes, diesmal aber mit maximal möglicher Zahl an CpG-Dinukleotiden ausgestattetes Gen generiert (mEPOmax, 70 CpG). Erstaunlicherweise bewirkte die Maximierung des CpG-Gehaltes eine Reduktion der Kodonqualität (mEPOmax, CAI 0,77) auf das Niveau der mEPOwt (0,73) und mEPO $\Delta$ CpG (0,75) Gene. Im Gegensatz dazu war der GC-Gehalt in den Kodonwahl-optimierten mEPO-Genen (mEPOopt: 62% und mEPOmax: 66%) deutlich höher als in mEPOwt (54%) oder mEPO $\Delta$ CpG (51%).

### 3.3.2 Herstellung der mEPO-Expressionsvektoren

Für die nachfolgenden *in vitro* und *in vivo* Expressionsstudien war es notwendig, die unter 3.3.1 generierten mEPO-Gene in einen eukaryontischen Expressionsvektor zu klonieren. Die Grundvoraussetzung für die gentherapeutische Anwendung pDNA-basierter Vektoren ist, neben der konstitutiven Transgen-Expression, die fehlende Induktion proinflammatorischer Immunreaktionen [15]. Aus diesem Grund wurden die CpG-modifizierten mEPO-Gene in die zuvor charakterisierten immunneutralen pRS und p $\Delta$ S110<sup>-</sup>-Vektoren kloniert (Abb. 3-21).



**Abb. 3-21: Schematische Darstellung der Klonierung muriner EPO-Gene (mEPO) in Expressionsvektoren**  
Die murinen EPO Gene (wt,  $\Delta$ CpG, opt und max) wurden unter Verwendung singulärer Schnittstellen (*Bam* HI und *Hind* III) in die Expressionsvektoren pRS und p $\Delta$ S110<sup>-</sup> kloniert.

Die mEPOwt, mEPO $\Delta$ CpG, mEPOopt und mEPOmax Gene wurden bei ihrer Generierung mit flankierenden *Hind* III bzw. *Bam* HI Restriktionsschnittstellen versehen und konnten in einer Ligationsreaktion in die pRS- und p $\Delta$ S110<sup>-</sup>-Vektoren (sub)kloniert werden. Dadurch wurden acht mEPO-Expressionsvektoren mit unterschiedlichem Vektor-Rückgrat sowie CpG-Gehalt und Kodonwahl-Optimierung des jeweiligen Gens hergestellt (vgl. Tabelle 3-1).

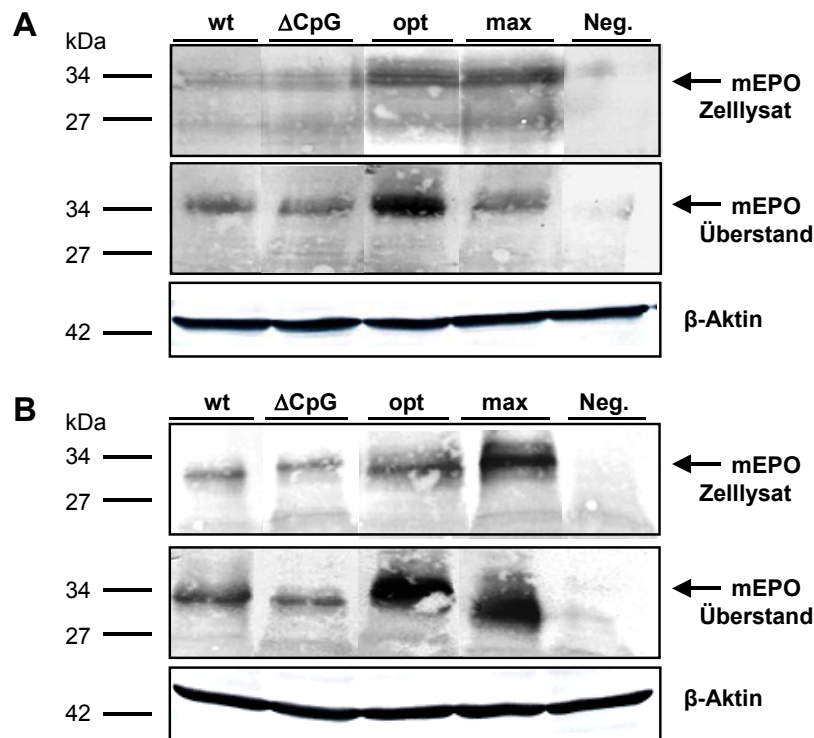
mEPO Gen	CpG-Gehalt	Kodonwahl Optimierung	Vektor Rückgrat	Expressionsvektor
wt	14	nein	pRS	pRSmEPOwt
			pΔS110 <sup>-</sup>	pΔS110 <sup>-</sup> mEPOwt
ΔCpG	0	nein	pRS	pRSmEPOΔCpG
			pΔS110 <sup>-</sup>	pΔS110 <sup>-</sup> mEPOΔCpG
opt	20	ja	pRS	pRSmEPOopt
			pΔS110 <sup>-</sup>	pΔS110 <sup>-</sup> mEPOopt
max	70	ja	pRS	pRSmEPOmax
			pΔS110 <sup>-</sup>	pΔS110 <sup>-</sup> mEPOmax

**Tabelle 3-1: Generierte mEPO-Expressionsvektoren mit Angabe des CpG-Gehalts sowie der Kodonwahl-Optimierung des jeweiligen mEPO-Gens**

### 3.3.3 Einfluss von Genmodifizierungen auf die transiente *in vitro* Expression von mEPO

Zur Untersuchung des Einflusses der eingebrachten Sequenz-Modifizierungen auf die *in vitro* Expression wurden humane 293T- und murine 3T3-NIH Zellen mit mEPO-kodierenden pDNAs transient transfiziert. Die verwendeten mEPO-Varianten standen dabei im immunneutralen pRS-Vektor unter Kontrolle des CMV-Promotors. Der qualitative Nachweis des synthetisierten Proteins in den Zelllysaten und Überständen der transfizierten Zellen erfolgte 48 h später durch Western Blot unter Verwendung eines mEPO-spezifischen Antikörpers (Abb. 3-22). Die quantitative Analyse der mEPO-Expression wurde analog 48 h nach Transfektion mittels mEPO-ELISA durchgeführt (Abb. 3-23).

In transfizierten humanen 293T-Zellen wurden in den Zelllysaten zwei mEPO-spezifische Banden detektiert (Abb. 3-22 A). Die stärkeren 34 kDa Banden repräsentieren glykosyliertes mEPO, und die schwächeren 27 kDa Banden sind charakteristisch für die nicht-glykosylierte Form von mEPO. Nach Transfektion mit den Expressionskonstrukten mEPOopt und mEPOmax wurde in den Zelllysaten erheblich mehr spezifisches mEPO nachgewiesen, als dies nach Verwendung der Konstrukte mEPOwt und mEPOΔCpG der Fall war. Dabei waren die Differenzen bei der glykosylierten EPO-Variante wesentlich stärker als bei der nicht glykosylierten. In den Zellüberständen wurde bemerkenswerterweise die stärkste mEPO-Bande nach Transfektion mit dem mEPOopt-Konstrukt detektiert. Erwartungsgemäß konnten in den Überständen der transfizierten 293T-Zellen keine nicht-glykosylierten mEPO-Signale nachgewiesen werden.



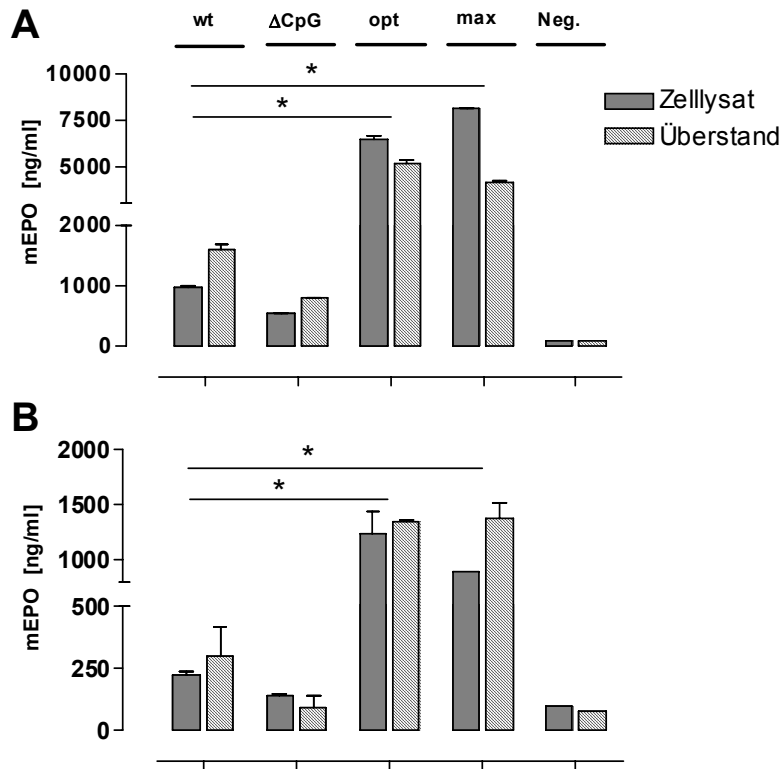
**Abb. 3-22: Transiente *in vitro* Expression der mEPO-Gene in Säugerzellen**

(A) Humane 293T- und (B) murine 3T3-NIH Zellen wurden mit 15  $\mu$ g der jeweils angegebenen mEPO-kodierenden pDNA transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zelllysate und Überstände geerntet. Jeweils 40  $\mu$ g des Gesamtproteins wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe eines mEPO-spezifischen Antikörpers im Western-Blot detektiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Ein ähnliches mEPO-Expressionsmuster wurde nach transienter Transfektion muriner Fibroblasten (3T3-NIH) festgestellt, mit dem Unterschied, dass die nicht-glykosylierte Form von mEPO bei allen Konstrukten sehr schwach oder nicht detektierbar war (Abb. 3-22 B). Desweiteren konnten in den Überständen der transfizierten 3T3-NIH Zellen vergleichbare Mengen an mEPO<sub>opt</sub> und mEPO<sub>max</sub> nachgewiesen werden.

Die Quantifizierung der mEPO-Expression mittels ELISA bestätigte die Western Blot Daten (Abb. 3-23). Die Eliminierung aller CpG-Dinukleotide aus dem Leserahmen (mEPO $\Delta$ CpG) resultierte sowohl in humanen 293T- als auch in murinen 3T3-NIH-Zellen in einer Reduktion der mEPO-Produktion. Durch die Optimierung der Kodonwahl (mEPO<sub>opt</sub>) konnte hingegen eine signifikante Steigerung (6-7fach) der mEPO-Expression in beiden Säuger-Zelllinien erreicht werden. Obwohl die Anreicherung von CpGs in einer Verminderung der Kodonqualität resultiert (vgl. 3.3.1), wurde analog zu mEPO<sub>opt</sub> interessanterweise eine vergleichbare mEPO<sub>max</sub>-vermittelte Expression gemessen.





**Abb. 3-23: Quantifizierung der mEPO *in vitro* Expression**

(A) Humane 293T- und (B) murine 3T3-NIH Zellen wurden mit 15 µg der angegebenen mEPO pDNA transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zelllysate und Überstände geerntet. Die Quantifizierung der mEPO Expression in den Zelllysaten und Überständen erfolgte anschließend aus der gleichen Menge an Gesamtprotein (2 µg) mittels mEPO-ELISA. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Proben eines repräsentativen Versuches dar. \*  $p < 0,005$  für Zelllysate und Überstände (Student t-test).

Wie in Abb. 3-23 gezeigt, korrelieren die produzierten mEPO-Mengen exklusive mEPOmax in den Zelllysaten und Überständen der transfizierten Zellen. Die Sekretion des mEPOmax-induzierten Proteins ist in murinen 3T3-NIH-Zellen effektiver als in humanen 293T-Zellen. Außerdem ist eine insgesamt schwächere Expression der mEPO Gene in 3T3-NIH Zellen gegenüber den 293T-Zellen festzustellen, die wohl auf die schlechtere Transfektionseffizienz der murinen Zellen zurückzuführen ist.

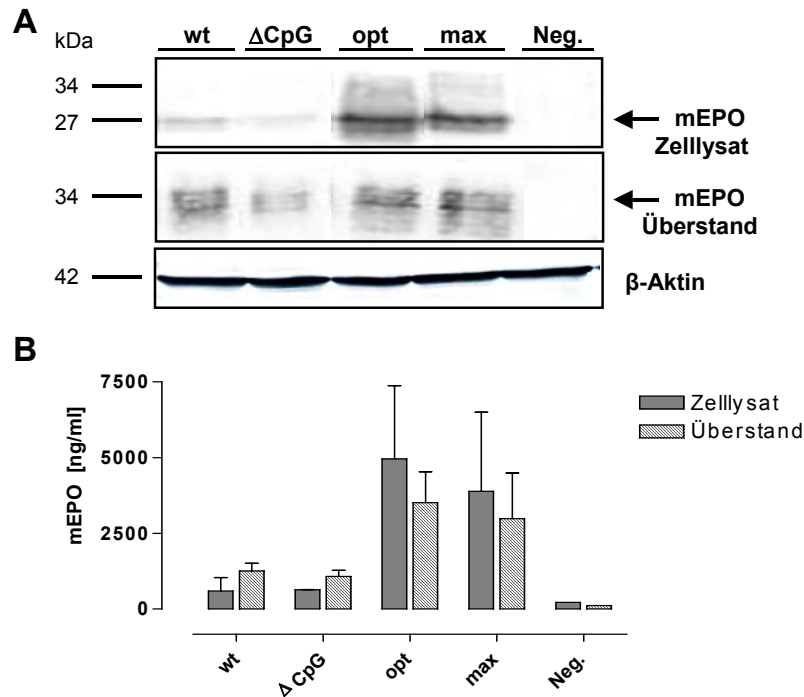
Zusammengefasst zeigen die *in vitro* Expressionsdaten, dass sowohl die Optimierung der Kodonwahl als auch die Steigerung des intragenischen CpG-Gehaltes unabhängig in einer signifikanten Erhöhung der transienten Expressionseffizienz in humanen und murinen Zellen resultieren. Dagegen führt die Eliminierung von CpGs aus dem Leserahmen von mEPOwt zur deutlichen Verminderung der Genexpression *in vitro*.

### 3.3.3.1 Transiente *in vitro* mEPO Expression durch einen CpG-reduzierten Vektor

Wie unter 3.2.1 ausführlich beschrieben, wurde neben dem pRS-Vektor ein weiterer immunneutraler pDNA-Vektor mit ca. 53% reduziertem CpG-Gehalt generiert (pΔS110<sup>-</sup>). Es ist unbekannt, ob der pΔS110<sup>-</sup> Vektor in der Lage ist, Transgene zu exprimieren. Um dies zu

## Ergebnisse

prüfen, wurden mEPO-Genvarianten in den p $\Delta$ S110<sup>-</sup> Vektor kloniert und in einer weiteren *in vitro* Expressionsstudie untersucht. Hierfür wurden murine 3T3-NIH-Zellen mit jeweils 15  $\mu$ g des mEPO-kodierenden p $\Delta$ S110<sup>-</sup> Vektors transient transfiziert, 48 h später wurde die mEPO-Produktion qualitativ im Western Blot sowie quantitativ mittels mEPO-ELISA analysiert (Abb. 3-24).



**Abb. 3-24: Transiente *in vitro* mEPO-Expression durch den CpG-reduzierten Vektor p $\Delta$ 110<sup>-</sup>**

Murine 3T3-NIH Zellen wurden mit 15  $\mu$ g der angegebenen mEPO pDNA transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zelllysate und Überstände geerntet. (A) Jeweils 40  $\mu$ g des Gesamtproteins wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe eines mEPO-spezifischen Antikörpers im Western-Blot detektiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Die Quantifizierung der mEPO-Expression in Zelllysaten und Überständen erfolgte aus der gleichen Menge an Gesamtprotein (2  $\mu$ g) mittels ELISA. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Proben eines repräsentativen Versuches dar.

Die Expression der modifizierten mEPO-Gene durch einen CpG-reduzierten pDNA-Vektor nach Transfektion muriner 3T3-NIH-Zellen zeigte ein ähnliches Muster wie durch den pRS-Vektor (vgl. 3.3.3), jedoch mit einigen auffälligen Unterschieden. Während in den Zelllysaten nur nicht-glykosylierte mEPO-Banden detektiert werden konnten, war in den Überständen der transfizierten Zellen erwartungsgemäß nur glykosyliertes mEPO nachweisbar (Abb. 3-24 A). Analog zum pRS-Vektor wurden die stärksten mEPO-Banden bei mEPOopt und mEPOmax nachgewiesen.

Die positiven Auswirkungen der Optimierung der Kodonwahl sowie der Erhöhung des CpG-Gehaltes auf die *in vitro* Expression von mEPO konnten somit auch in einem CpG-reduzierten Vektor-Rückgrat nachgewiesen werden. Demgegenüber hatte die Entfernung

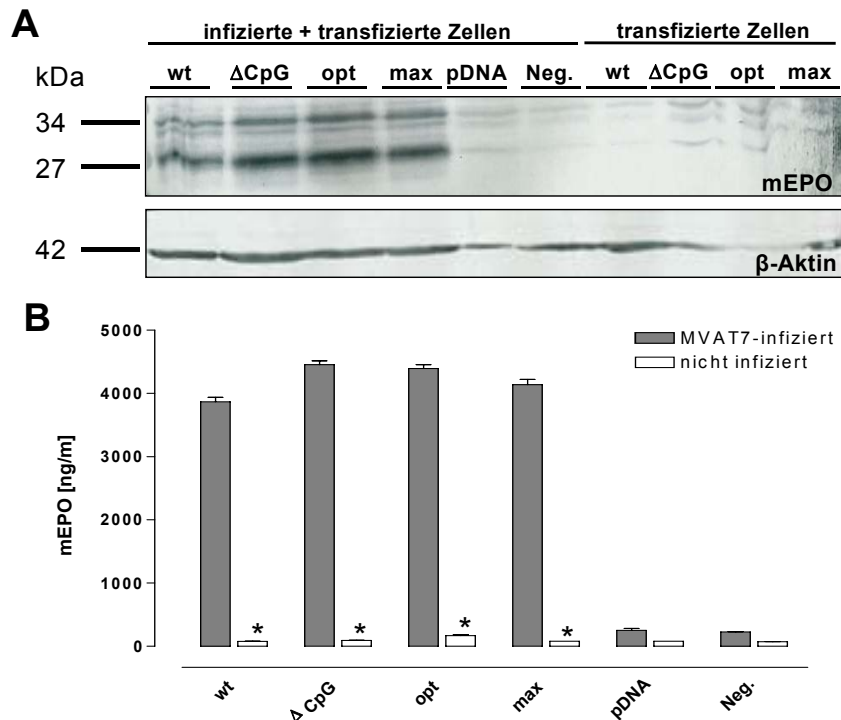
aller intragenischen CpGs keine deutliche Verminderung der *in vitro* mEPO-Expression zur Folge.

### **3.3.4 Untersuchungen der molekularen Hintergründe der Expression modifizierter mEPO-Gene**

Die *in vitro* Expressionsstudien zeigten deutlich, dass die Optimierung der Kodonwahl sowie die Erhöhung der CpG-Zahl im Leserahmen des mEPO-Gens zu einer signifikanten Steigerung der Protein-Expression führen (vgl. 3.3.3). Vergleichbare Mengen an produziertem Protein nach Transfektion mit den mEPOopt (CAI 0,98; 20CpGs) und mEPOmax (CAI 0,77; 70 CpGs) Konstrukten weisen darauf hin, dass neben der Kodonwahl auch CpG-Dinukleotide eine wichtige Rolle bei der Genexpression spielen. Aus diesem Grund wurden molekularbiologische Analysen mit Fokus auf die Untersuchung der Auswirkungen von Genmodifizierungen auf die Mengen an exprimierten mEPO-spezifischen RNAs durchgeführt. Zudem sollten die Untersuchungen der molekularen Hintergründe zum Verständnis der Transkription sowie Translation der modifizierten mEPO-Gene beitragen.

#### **3.3.4.1 Einfluss von Genmodifizierungen auf die Translationseffizienz**

Um zu untersuchen, ob die Modifizierung des CpG-Gehaltes sowie die Optimierung der Kodonwahl die Translationseffizienz beeinflussen, wurde ein *in vitro* Translations-Assay durchgeführt. Hierfür wurden MVA/T7 Virus-infizierte 293T-Zellen mit mEPO Genvarianten in einem pDNA-Vektor unter Kontrolle des T7-Promotors (pCRSkript) transfiziert [223]. Durch die MVA/T7 RNA-Polymerase kommt es im Cytoplasma von infizierten und pDNA-transfizierten 293T-Zellen zur cytoplasmatischen Transkription und anschließenden Translation unter Umgehung des nukleären Kompartiments. 24 h später wurde die mEPO-Produktion qualitativ im Western Blot sowie quantitativ mittels mEPO-ELISA analysiert (Abb. 3-25).



**Abb. 3-25: Einfluss von Genmodifizierungen auf die Translationseffizienz**

Humane 293T-Zellen wurden mit rekombinantem MVA/T7-Virus infiziert und anschließend mit den angegebenen mEPO pDNAs transfiziert. Als Assay-Kontrolle dienten transfizierte, nicht infizierte Zellen. **(A)** Nach 24 h wurden die Zelllysate geerntet und 40 µg des Gesamtproteins im Western Blot mit Hilfe eines mEPO-spezifischen Antikörpers analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. **(B)** Die Quantifizierung der mEPO-Expression in Zelllysaten erfolgte aus jeweils 1 µg Gesamtprotein mittels ELISA. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Proben eines repräsentativen Versuches dar. \*  $p < 0,005$  (MVA/T7-infiziert vs. nicht infiziert; Student t-test), MVA = modified vaccinia Ankara Virus.

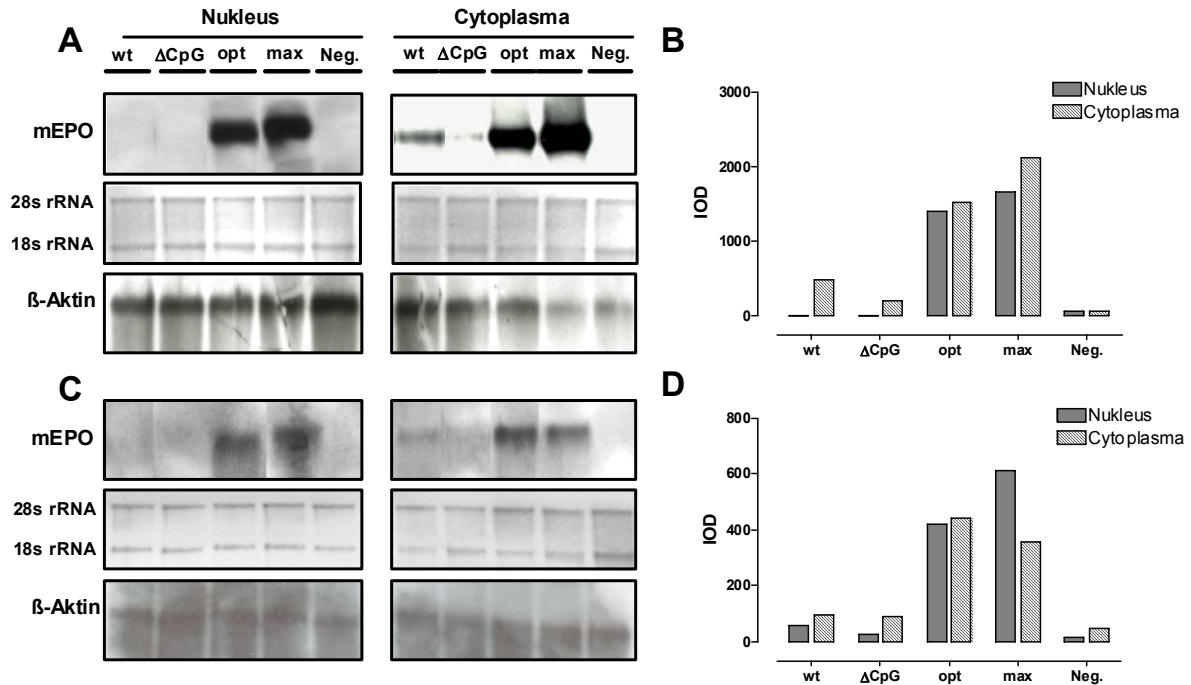
In MVA/T7 infizierten und anschließend mit mEPO-kodierenden pDNA transfizierten 293T-Zellen konnten - unabhängig von den mEPO-Genvarianten - vergleichbare Mengen an exprimiertem Protein detektiert werden. Analog zur transienten Transfektion (vgl. 3.3.3) wurden zwei mEPO-spezifische Banden nachgewiesen, wobei die nicht-glykosylierten (~27 kDa) mEPO-Banden deutlich stärker waren als die glykosylierten (~34 kDa) Formen (Abb. 3-25 A). In nur MVA/T7-infizierten- oder nur pDNA-transfizierten Kontrollen konnte keine mEPO-Expression detektiert werden. Das cytoplasmatische mEPO-Expressionsmuster wurde durch mEPO-ELISA bestätigt (Abb. 3-25 B).

Die vergleichbare Expression aller mEPO-Genvarianten im MVA/T7 System zeigt, dass die Unterschiede in den Proteinkonzentrationen nach der transienten Expression nicht durch unterschiedliche Translationseffizienzen zustande kommen.

### 3.3.4.2 Qualitativer Nachweis mEPO-spezifischer mRNA

Im nächsten Schritt wurde analysiert, inwieweit sich die Modifizierungen der mEPO-Sequenz auf den zellulären RNA-Gehalt auswirken. Hierfür wurden humane 293T- und murine 3T3-NIH Zellen mit gleichen Konzentrationen mEPO-kodierender pDNAs transient transfiziert und

die nukleären sowie cytoplasmatischen mRNAs 48 h später isoliert. Der qualitative Nachweis mEPO-spezifischer mRNA in beiden Fraktionen erfolgte durch Northern Blot Analyse mit Hilfe einer BGH-spezifischen Sonde (Abb. 3-26).



**Abb. 3-26: Qualitativer Nachweis mEPO-spezifischer mRNA**

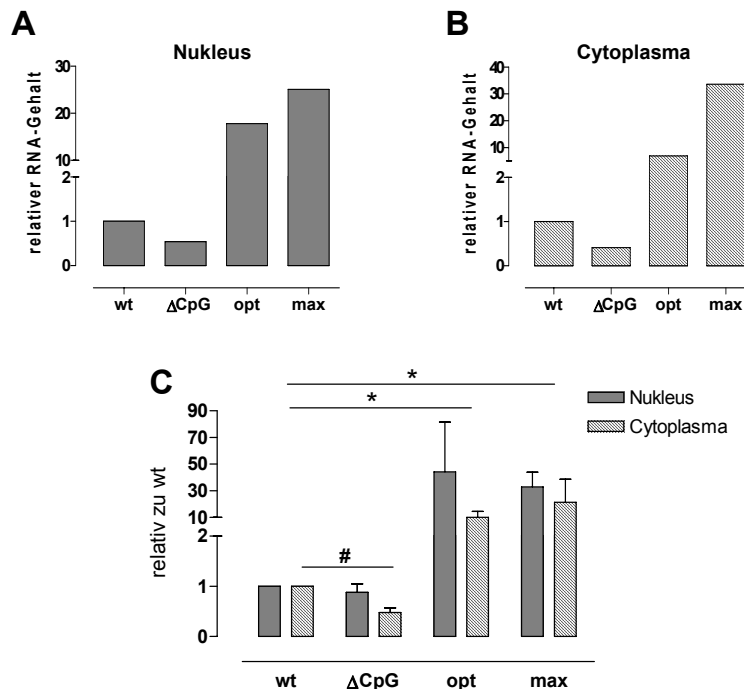
Northern Blot-Analyse mEPO-spezifischer RNA-Transkripte im Nukleus bzw. exportierter mRNA im Cytoplasma von 293T- und 3T3-NIH Zellen, die mit den angegebenen mEPO-pDNAs transfiziert wurden. (A) Je 2 µg Gesamt-RNA aus 293T-Zellen und (C) 5 µg Gesamt-RNA aus 3T3-NIH Zellen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die mEPO-spezifischen mRNAs mit einer DIG-markierten RNA-Sonde detektiert. Die RNA-Banden der 293T-Zellen (B) und 3T3-NIH Zellen (D) wurden densitometrisch quantifiziert. Die mittleren- (rRNA) bzw. unteren (β-Aktin) Banden zeigen die Ladekontrolle. IOD = integrated optical density

Analog zu den ermittelten mEPO-Proteinkonzentrationen (Abb. 3-23) konnten sowohl in humanen 293T- als auch in murinen 3T3-NIH-Zellen die stärksten mEPO-spezifischen RNA-Signale nach Transfektion mit mEPOmax und mEPOopt pDNA detektiert werden (Abb. 3-26 A und C). Während in 293T-Zellen sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma mehr mEPOmax-spezifische RNA nachgewiesen werden konnte, wurden in 3T3-NIH-Zellen vergleichbare RNA-Mengen im Nukleus, jedoch mit einer auffallenden Steigerung bei mEPOopt-spezifischer RNA im Cytoplasma festgestellt. Demgegenüber wurden in den cytoplasmatischen Fraktionen beider Zelllinien deutlich geringere Mengen der mEPOwt- und mEPOΔCpG-spezifischen RNA-Transkripte detektiert. In den Nuklei der mEPOwt- und mEPOΔCpG-transfizierten Zellen konnten nahezu keine mEPO-RNAs nachgewiesen werden. Die densitometrische Analyse der mEPO-spezifischen Signale konnte die hohen Mengen an mEPOmax und mEPOopt mRNA im Vergleich zu den mEPOwt und mEPOΔCpG Genen bestätigen (Abb. 3-26 B und D).

Die Northern Blot Daten zeigen, dass das unterschiedliche Expressionsmuster der mEPO-Genvarianten bereits auf RNA-Ebene ausgeprägt ist. Während in humanen und murinen Zellen deutlich mehr mEPOmax-spezifische RNA gegenüber mEPOopt gebildet wird, deutet die deutliche Abnahme der mEPOmax-RNA im Cytoplasma muriner 3T3-NIH-Zellen auf eine instabile mEPOmax-RNA hin.

## 3.3.4.3 Relative Quantifizierung der mEPO-RNA Expression durch *realtime* PCR

Die Quantifizierung der mEPO-RNA Transkription erfolgte durch *realtime* PCR mit Hilfe der *light cycler* Technologie. Da die *light cycler* Technik den Nachweis geringer RNA-Mengen ermöglicht, konnten dadurch auch die schwach exprimierten mEPOwt- und mEPO $\Delta$ CpG-spezifischen RNAs nachgewiesen und anschließend im Verhältnis zu mEPOopt und mEPOmax quantifiziert werden. Die Analyse der ermittelten mEPO-spezifischen RNAs erfolgte durch relative Quantifizierung (rel. Quant.), wobei das mEPOwt-Gen als Kontrollgen diente [210]. Für die korrekte Kalkulation des RNA-Gehaltes wurde die RNA-Expression der mEPO-Genvarianten mit dem endogenen Standard  $\beta$ -Aktin normalisiert. Die cytoplasmatischen und nukleären RNA-Fractionen wurden, nach der Transfektion humaner 293T-Zellen mit gleichen Mengen an mEPO-kodierender pDNA, isoliert.



**Abb. 3-27: Relative Quantifizierung der mEPO RNA-Expression durch realtime PCR**

Zur Quantifizierung der mEPO RNA-Expression wurden je 1  $\mu$ g der nukleären (A) und cytoplasmatischen (B) RNA-Fractionen aus 293T-Zellen revers transkribiert und mittels *light cycler* analysiert. Die Expressionsrate wurde mit der Relativen-Quantifizierungs-Software ausgewertet, wobei die Expression der Zielgene (mEPO) mit einem endogenen Standard ( $\beta$ -Aktin) normalisiert wurde. Die Werte dreier Proben wurden gemittelt; der erhaltene absolute Mittelwert wurde für die relative Quantifizierung verwendet. (C) Relativ zu mEPOwt bezogene Werte aus drei unabhängigen realtime PCR-Versuchen. \*  $p < 0,05$  für nukleäre und cytoplasmatische RNA-Fraktion. #  $p < 0,005$  für cytoplasmatische RNA-Fraktion (Student t-test).

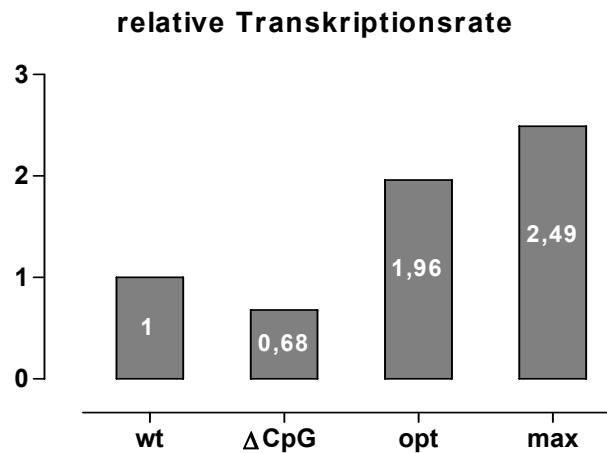
Entsprechend den mEPO-ELISA Daten (Abb. 3-23) resultierte die Eliminierung der intragenischen CpG-Dinukleotide in einer 2-fachen Verminderung des mEPO mRNA-Gehaltes im Vergleich zum wt-Gen, sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma transfizierter 293T-Zellen (Abb. 3-27 A-B). Im Vergleich zu mEPO<sub>wt</sub> zeigten mEPO<sub>opt</sub> transfizierte Zellen eine ~17-fache Steigerung des mRNA-Gehaltes im Zellkern, sowie eine ~7-fache Erhöhung der mRNA-Menge im Cytoplasma. Der höchste RNA-Gehalt konnte durch mEPO<sub>max</sub> erreicht werden. So wurde im Vergleich zu mEPO<sub>wt</sub> nach Transfektion mit mEPO<sub>max</sub>-kodierender pDNA 25mal mehr mEPO-spezifische mRNA im Nukleus (Abb. 3-27 A) und 30mal mehr im Cytoplasma (Abb. 3-27 B) detektiert. Die zusammenfassende Darstellung der drei unabhängigen *realtime* PCR Versuche bestätigte die ermittelten Verhältnisse (Abb. 3-27 C). Auffällig war der unerwartet hohe mRNA-Gehalt im Nukleus der mEPO<sub>opt</sub>-transfizierten 293T-Zellen.

Die Quantifizierung des mEPO-spezifischen RNA-Gehaltes der mEPO $\Delta$ CpG- und mEPO<sub>opt</sub>-Konstrukte zeigte eine Korrelation zu den im mEPO-ELISA ermittelten Proteinkonzentrationen nach *in vitro* Transfektion humaner 293T-Zellen. Dagegen resultierte die Höhe des mEPO<sub>max</sub> mRNA-Niveaus nicht in entsprechend hohen Protein-Mengen.

### 3.3.4.4 Bestimmung der relativen Transkriptionsrate der mEPO-spezifischen RNAs

Wie unter 3.3.4.2 gezeigt werden konnte, waren die Unterschiede im Expressionsmuster von mEPO hinsichtlich der Kodonwahl-Optimierung sowie der Modifizierung des CpG-Gehaltes bereits auf mRNA-Ebene erkennbar. Demzufolge sollte im Folgenden der Einfluss von Gen-Modifizierungen auf die Transkriptionseffizienz untersucht werden. Die *de novo* Synthese mEPO-spezifischer RNA wurde in einem Nuklear-*Run-On* Assay mit Hilfe Biotin-16-UTP markierter RNA und anschließender *realtime* PCR determiniert. Die Transkriptionsrate der mEPO-RNAs konnte mittels relativer Quantifizierung analysiert werden. Für die korrekte Kalkulation wurden die ermittelten Werte für die mEPO-Syntheseraten mit einem endogenen Standard ( $\beta$ -Aktin) normalisiert.

Wie in Abb. 3-28 dargestellt, spiegelt die *de novo* Syntheserate der mEPO-Transkripte den bereits in Abb. 3-27 dargestellten nukleären mRNA-Gehalt (Abb. 3-27 A) wider. Durch Kodonwahl-Optimierung (opt) konnte die Transkriptionsrate von mEPO verdoppelt werden. Abhängig vom CpG-Gehalt wurde eine ~150% gesteigerte Transkriptionsrate für mEPO<sub>max</sub> sowie die um ~30% reduzierte *de novo* Synthese der mEPO-spezifischen RNA für mEPO $\Delta$ CpG nachgewiesen.



**Abb. 3-28: De novo-Synthese mEPO-spezifischer RNAs**

Die Transkriptionsrate der mEPO-spezifischen RNA wurde mittels Nuklear-Run-On-Assay ermittelt. Humane 293T-Zellen wurden mit den angegebenen mEPO pDNAs transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und daraus Kerne präpariert. Nach Inkubation der Kerne mit Biotin-markierten Nukleotiden wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe magnetischer Streptavidin-Beads aufgereinigt. Zur Quantifizierung der de novo mEPO RNA-Synthese wurden gleiche Mengen der markierten RNA-Fractionen revers transkribiert und im light cycler analysiert. Die Syntheseraten wurden mit der Relativen Quantifizierungs-Software ausgewertet, wobei die ermittelten Werte der Zielgene (mEPO) mit dem endogenen Standard ( $\beta$ -Aktin) normalisiert wurden. Die Werte dreier Proben wurden gemittelt; der erhaltene absolute Mittelwert wurde für die relative Quantifizierung verwendet.

Zusammen mit dem Nachweis und der Quantifizierung des mEPO-spezifischen RNA-Gehaltes in den nukleären und cytoplasmatischen Fraktionen zeigen die ermittelten *de novo* Syntheseraten, dass die CpG-spezifischen Sequenz-Modifizierungen einen deutlichen Einfluss auf die Transkriptionsrate und die Höhe des mRNA-Gehaltes der mEPO-Genvarianten haben.

### 3.3.5 Untersuchungen der *in vivo* Expression modifizierter mEPO-Gene

Die Untersuchungen der *in vitro* Protein-Expression (3.3.3) haben deutlich gezeigt, dass die Optimierung der Kodonwahl auf das am häufigsten verwendete Kodon im murinen System (mEPOopt) in einer signifikant gesteigerten mEPO-Produktion resultiert. Außerdem wurde dargelegt, dass der intragenische CpG-Gehalt des mEPO-Gens mit der Effizienz der *in vitro* Genexpression assoziiert ist. Der Einfluss von Sequenz-Modifizierungen auf die *in vivo* Expression eines therapeutischen Gens wie mEPO wurde im Balb/c Mausmodell untersucht. Andere Gruppen konnten bereits zeigen, dass die Kodonwahl-Optimierung zu einer erhöhten, aber nicht dauerhaften mEPO-Expression in Balb/c Mäusen führt [31,33]. Als potentieller Grund für den Rückgang der Expression wird unter anderem die CpG-bedingte Abschaltung des Promotors diskutiert [37,224,225].

Um zu untersuchen, in welchem Umfang die Modifizierungen des CpG-Gehaltes und die Optimierung der Kodonwahl von mEPO die Effizienz einer dauerhaften *in vivo* Expression beeinflussen, wurden sechs Wochen alten Balb/c Mäusen 5  $\mu$ g bzw. 15  $\mu$ g der jeweiligen



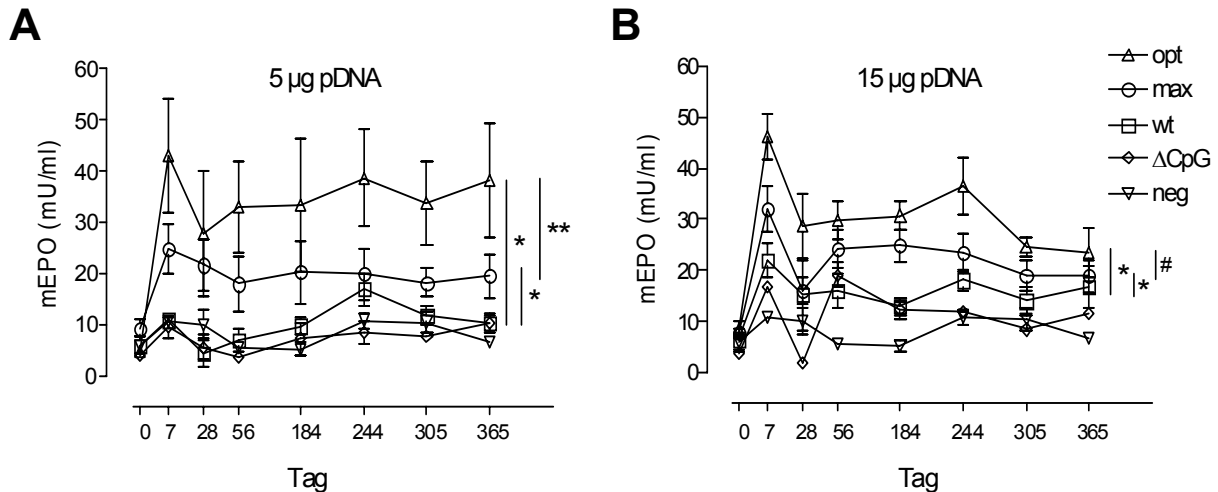
mEPO-kodierenden pDNA (mEPOwt, mEPO $\Delta$ CpG, mEPOopt und mEPOmax) intramuskulär injiziert und anschließend die Muskelzellen elektroporiert. Als Negativkontrolle und „indirekter“ Marker der endogenen mEPO-Produktion wurde den Mäusen der pRS-Vektor appliziert. Die Bestimmung der mEPO-Konzentration sowie der EPO-abhängigen hämatologischen Parameter Hämatokrit und Hämoglobin erfolgte in regelmäßigen Zeitabständen über ein Jahr nach der Applikation.

### **3.3.5.1 Einfluss von Genmodifizierungen auf die *in vivo* Expression von mEPO**

Für die *in vivo* Expressionsstudie wurden sechs Mäusen pro Gruppe 5  $\mu$ g bzw. 15  $\mu$ g der jeweiligen mEPO-kodierenden pDNA injiziert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Applikation wurde den Mäusen aus der Schwanzvene Blut entnommen und daraus Serum gewonnen. Die Bestimmung der mEPO-Konzentration erfolgte mittels kommerzieller ELISA-Tests.

Nach Applikation von 15  $\mu$ g mEPOwt-kodierender pDNA konnte ein deutlicher Anstieg der mEPO-Konzentration in den Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (neg.; endogenes mEPO) über die gesamte Dauer der Studie beobachtet werden (Abb. 3-29 B). Hingegen hatte die Injektion einer niedrigeren mEPOwt pDNA-Dosis (5  $\mu$ g) keine deutliche Steigerung der mEPO-Expression zur Folge (Abb. 3-29 A). Es wurde lediglich eine leichte Erhöhung der mEPO-Konzentration zwischen Tag 184 und Tag 305 festgestellt. Entsprechend den *in vitro* Expressionsdaten hatte die Eliminierung der intragenischen CpGs einen negativen Effekt auf die *in vivo* Expression von mEPO. Die gemessenen mEPO-Konzentrationen nach Applikation von 5  $\mu$ g mEPO $\Delta$ CpG pDNA waren deutlich geringer als in den mEPOwt-injizierten Mäusen und entsprachen dem Niveau des endogenen mEPO (Abb. 3-29 A). Mit Steigerung der pDNA-Dosis (15  $\mu$ g) wurden die Unterschiede zwischen mEPOwt vs. mEPO $\Delta$ CpG deutlicher (Abb. 3-29 B). Die Dosisabhängigkeit des negativen Expressionseffektes nach CpG-Eliminierung konnte in einer weiteren Studie mit 50  $\mu$ g der pDNAs bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Wie in Abb. 3-29 gezeigt, wurde sowohl durch die Optimierung der Kodonwahl (mEPOopt) als auch durch die Anreicherung des intragenischen CpG-Gehaltes (mEPOmax) unabhängig von der pDNA-Dosierung eine signifikante Steigerung der mEPO-Expression gegenüber mEPOwt erreicht.



**Abb. 3-29: Einfluss von Genmodifizierungen auf die mEPO in vivo Expression im Balb/c Maus-Modell**

Balb/c Mäusen wurden **(A)** 5 µg bzw. **(B)** 15 µg der angegebenen mEPO-kodierenden pDNA (mEPOwt, mEPOΔCpG, mEPOopt und mEPOmax) intramuskulär injiziert und anschließend die Muskelzellen elektroporiert. Als Negativkontrolle (neg) wurde den Mäusen der pRS-Vektor appliziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Mäusen aus der Schwanzvene Blut entnommen und daraus Serum gewonnen. Die EPO-Konzentrationsmessung erfolgte mittels ELISA. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte von sechs Mäusen pro Gruppe dar. mU = Milliunits. \*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$  (univariate Varianzanalyse)

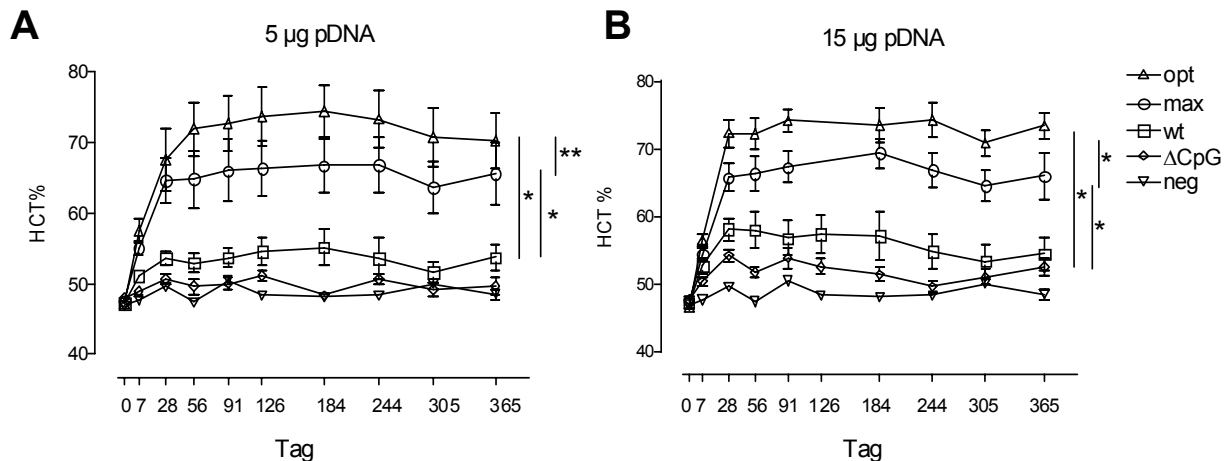
Überraschenderweise und anders als in den *in vitro* Expressionsstudien zeigte die Applikation des mEPOopt Gens eine deutlich höhere *in vivo* Expressionseffizienz als die des mEPOmax Gens. Die Unterschiede zwischen mEPOopt und mEPOmax waren bei beiden Applikationsdosen (5 µg und 15 µg pDNA) signifikant (Abb. 3-29). Eine Woche nach der Injektion von mEPOmax stieg die mEPO-Konzentration von ~5 mU/ml auf ~27 mU/ml und blieb ein Jahr konstant bei ~22 mU/ml. Die höchste mEPO-Expression mit einer dauerhaft konstanten mEPO-Konzentration ~37 mU/ml wurde durch mEPOopt induziert. Die behandelten Mäuse zeigten während des Studienverlaufs keine Auffälligkeiten.

Die erhöhte und dauerhafte mEPO-Expression nach dem Elektro-Gentransfer (EGT) der modifizierten mEPO-Genvarianten deutet darauf hin, dass keine mEPO-spezifischen Antikörper induziert wurden. Zudem zeigen die präsentierten Daten, dass eine kontinuierliche mEPO-Expression für 12 Monate nach dem EGT von CpG-modifizierten und Kodonwahl-optimierten Genen erreicht werden kann.

### 3.3.5.2 Einfluss von Genmodifizierungen auf den Langzeit Hämatokrit-Wert

Die Behandlung von Anämie-Patienten mit rekombinantem Erythropoietin (rHuEPO) resultiert in einer Erhöhung des Hämatokrit-Wertes (HCT) [37,194]. Desweiteren wurde berichtet, dass die kontinuierliche Expression von EPO als wichtigster regulatorischer Faktor von hämatologischen Parametern im Blut (HCT und Hämoglobin) fungiert [37,47]. Normalerweise, bewirkt die Steigerung der EPO-Konzentration im Serum eine zeitlich verzögerte Erhöhung des HCT-Wertes.

Um zu untersuchen, inwieweit die Sequenz-Modifizierungen von mEPO einen Einfluss auf den HCT-Wert haben, wurden in regelmäßigen Zeitabständen nach dem EGT von mEPO Genvarianten die HCT-Niveaus bestimmt. Die HCT-Werte wurden im Mausblut mittels Mikrokapillar-Zentrifugation bestimmt.



**Abb. 3-30: Einfluss von mEPO-Genoptimierungen auf den Langzeit Hämatokrit-Wert**

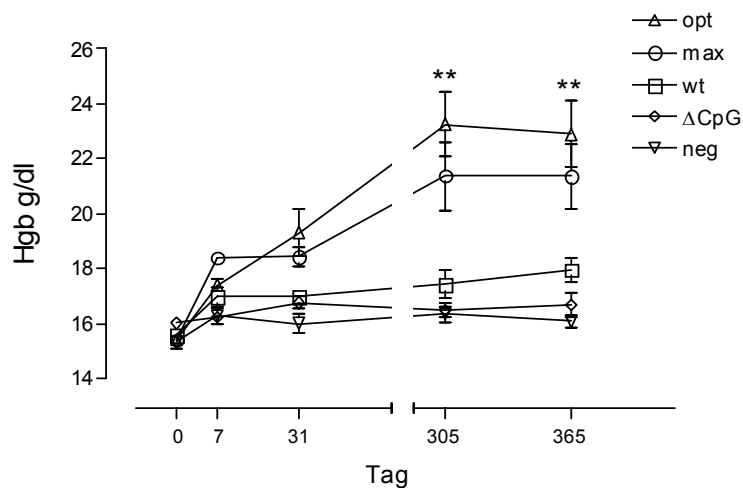
Balb/c Mäusen wurden **(A)** 5 µg bzw. **(B)** 15 µg der angegebenen mEPO-kodierenden pDNAs (mEPOwt, mEPOΔCpG, mEPOopt und mEPOmax) intramuskulär injiziert und anschließend die Muskelzellen elektroporiert. Als Negativkontrolle (neg) wurde den Mäusen der pRS-Vektor appliziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Mäusen aus der Schwanzvene Blut entnommen und in eine heparinisierte Mikrokapillare überführt. Die Bestimmung des Hämatokrit-Wertes erfolgte mittels high speed Zentrifugation. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte von sechs Mäusen pro Gruppe dar. HCT: Hämatokrit. \* p < 0,001, \*\* p < 0,01 (univariate Varianzanalyse)

Analog zu den mEPO-Konzentrationen im Serum (Abb. 3-29) konnte - unabhängig von der pDNA-Dosis - eine signifikante Erhöhung des HCT-Wertes nach der Injektion von mEPOopt- und mEPOmax kodierender pDNA gegenüber unbehandelten und mEPOwt-injizierten Mäusen festgestellt werden (Abb. 3-30). Acht Wochen nach Applikation von 5 µg mEPOopt-kodierender pDNA wurde der höchste HCT-Wert mit ~72% erreicht, der kontinuierlich bis zum Ende der Studie auf dem hohen Niveau (~68%) blieb (Abb. 3-30 A). In den Mäusen, denen mEPOmax injiziert wurde, konnte ein HCT-Peak von ~63% gemessen werden. Analog zu mEPOopt- blieb der mEPOmax-induzierte HCT-Wert über ein Jahr lang nach Applikation auf dem erhöhten Niveau. Hingegen konnte nach dem EGT von 5 µg mEPOwt pDNA ein leichter HCT-Anstieg von ~46% auf ~53% beobachtet werden. Die Injektion des CpG-freien mEPO-Gens (mEPOΔCpG) resultierte in keiner Steigerung des HCT-Wertes. Die parallele *in vivo* Studie mit 15 µg applizierter pDNA zeigte, dass eine Erhöhung der pDNA-Dosis keine weitere Steigerung des HCT-Niveaus bewirkt (Abb. 3-30 B). Dennoch wurde der gleiche HCT-Verlauf in Abhängigkeit von den injizierten mEPO-Genvarianten ermittelt.

Zusammenfassend wurde nach einer Einzelinjektion von Kodonwahl-optimierten und CpG-modifizierten mEPO-Genen eine signifikante Erhöhung des HCT-Wertes über ein Jahr hinweg induziert.

### 3.3.5.3 Einfluss von mEPO Genmodifizierungen auf den Hämoglobin-Wert

Neben dem HCT hängt auch der Hämoglobin-Wert (Hgb) als wichtiger hämatologischer Parameter von der Erythropoietin-Konzentration ab [37,47]. Demzufolge ist es möglich, über die Messung des Hgb-Wertes indirekt auf die EPO-Konzentration im Serum zu schließen. Die Hgb-Bestimmung erfolgte zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation von 5 µg mEPO-kodierender pDNA. Den Mäusen wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen, in eine Hemocue-Kuvette überführt und der Hgb-Wert mit Hilfe des Hemocue 201+ Gerätes ermittelt (Abb. 3-31).



**Abb. 3-31: Einfluss von mEPO-Genoptimierungen auf den Hämoglobin-Wert**

Balb/c Mäusen wurden 5 µg der angegebenen mEPO-kodierenden pDNA (mEPOwt, mEPOΔCpG, mEPOopt und mEPOmax) intramuskulär injiziert und anschließend die Muskelzellen elektroporiert. Als Negativkontrolle (neg) wurde den Mäusen der pRS-Vektor appliziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Mäusen aus der Schwanzvene Blut entnommen und in die Hemocue-Kuvette überführt. Die Bestimmung des Hämoglobin-Wertes erfolgte mit Hilfe des Hemocue 201+ Gerätes. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte von sechs Mäusen pro Gruppe dar. Hgb: Hämoglobin. \*\*  $p < 0,01$  (Student t-Test)

Wie in Abb. 3-31 dargestellt, zeigte die Messung des Hgb-Wertes den gleichen Trend wie die Analyse des HCT-Wertes (3.3.5.2). Während die Applikation des mEPOwt-Gens zu einer leichten Hgb-Erhöhung führte, hatte die Eliminierung von intragenischen CpGs (mEPOΔCpG) eine negative Auswirkung auf den Hgb-Wert. Signifikant erhöhte Hgb-Werte wurden wiederum durch die mEPOopt und mEPOmax-Gene induziert, wobei die Kodowahl-Optimierung höhere Hgb-Werte zur Folge hatte. Überraschenderweise konnten ein Jahr nach der Einzelinjektion von mEPOopt (22,9 g/dl) und mEPOmax (21,4 g/dl) sehr hohe Hgb-Niveaus gemessen werden.

Entsprechend der mEPO-Konzentration im Serum und den HCT-Werten wurden nach dem EGT niedriger pDNA-Mengen Kodonwahl-optimierter und CpG-modifizierter mEPO-Gene hohe Hgb-Werte in behandelten Mäusen induziert, ohne dass dabei negative Veränderungen bei den Mäusen beobachtet werden konnten.

### 3.3.6 Zusammenfassung 3

Mit dem Ziel, die Expressionseffizienz eines pDNA-basierten Vektors für gentherapeutische Ansätze zu verbessern, wurde der Einfluss von Sequenzmodifizierungen von mEPO auf die *in vitro* und *in vivo* Expression untersucht. In dieser Hinsicht wurden vier mEPO-Genvarianten mit Fokus auf die Variation des CpG-Gehaltes und Kodonwahl-Optimierung generiert. Während die Eliminierung der intragenischen CpGs zu einer verminderten *in vitro* Expression führte, resultierte die Optimierung der Kodonwahl sowie die Anreicherung des CpG-Gehaltes in einer signifikanten Steigerung der transienten *in vitro* Expression von mEPO in humanen und murinen Zellen. Ein ähnliches Expressionsmuster der mEPO-spezifischen mRNAs wies darauf hin, dass die mEPO Proteinmengen mit dem Gehalt an mEPO-spezifischen mRNAs korrelieren.

Im Vergleich zu den nicht-optimierten mEPO-Genvarianten resultierte der EGT der Kodonwahl-optimierten (mEPOopt) und CpG-maximierten (mEPOmax) mEPO-Gene in einer signifikanten Erhöhung der *in vivo* Expression sowie der HCT- und Hgb-Werte.

# Diskussion

## 4.1 Beitrag von CpG-Motiven im Rückgrat von Plasmidvektoren hinsichtlich der Aktivierung der angeborenen Immunantwort

### 4.1.1 Konstruktion einer CpG-reduzierten Vektorplattform

CpG-Dinukleotide beeinflussen einerseits die Genexpression, andererseits aktivieren sie beim Vorliegen in einem besonderen Basenkontext (CpG-Motive) Zellen des angeborenen Immunsystems [92]. Demzufolge fungieren unmethylierte CpGs im Rückgrat einer pDNA als Hauptinduktoren einer proinflammatorischen Immunreaktion [94]. Um den immunbeeinflussenden Beitrag von CpG-Dinukleotiden im Vektor-Rückgrat zu untersuchen, wurden durch sukzessive Entfernung möglichst vieler CpGs aus funktionellen Modulen einer kommerziellen pDNA mehrere CpG-reduzierte Vektoren generiert. Die Degenerierung des genetischen Kodes erlaubt dabei den Austausch einzelner Nukleotide in der DNA-Sequenz ohne Veränderung der Aminosäure (AS)-Sequenz. Auf diese Weise wurden synthetische DNA-Fragmente mit maximal reduziertem CpG-Gehalt generiert. Durch das Zusammenfügen der Fragmente konnte ein funktioneller, CpG-reduzierter DNA-Vektor (p $\Delta$ S) synthetisiert werden. Der CpG-Gehalt wurde um 50% gegenüber dem Ausgangsvektor (pRS) vermindert. Das entscheidende Plasmid-Element für die Replikation in bakteriellen Stämmen ist der *origin of replication*. In den CpG-reduzierten Vektoren ist der am häufigsten verwendete *origin of replication*, Co1E1, ein Derivat der pUC-Familie (*pUCori*), enthalten. Die Veränderungen in der Nukleotidsequenz im *pUCori* beeinträchtigen in der Regel, trotz unveränderter AS-Sequenz, entscheidend seine Funktion. Obwohl gezeigt werden konnte, dass durch gezielte Mutationen im *pUCori* die Plasmid-Ausbeute verdoppelt werden kann, ist die Entfernung von CpG-Dinukleotiden aus dem *pUCori* oft mit einem Funktionsverlust verbunden [15]. Bei der Synthese des p $\Delta$ S-Vektors wurde ein analoger Vektor mit einer 110-Nukleotide umfassenden Deletion im *pUCori* generiert (p $\Delta$ S110<sup>-</sup>-Vektor). Die Kinetik-Assays in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Deletion keinen negativen, sondern eher einen vorteilhaften Einfluss auf das Wachstum der transformierten *E.coli* Stämme (DH5 $\alpha$ , GM169, GM2163) hatte. Durch die Deletion im *pUCori* wurde der CpG-Gehalt im p $\Delta$ S110<sup>-</sup>-Vektor auf 46,9% reduziert. Die weiteren Untersuchungen zeigten, dass sich durch die

Deletion keine Veränderungen im Expressionsmuster der kodierten Transgene ergaben, diese aber einen entscheidenden Einfluss auf die immunogenen Eigenschaften der generierten pDNAs hatte. Die fünf dabei entfernten CpG-Dinukleotide spielten eine wichtige Rolle.

Das wichtigste regulatorische Element in einem pDNA-Vektor, hinsichtlich der Stärke und Dauer der Transgen-Expression, ist der Promotor. Als Plasmid-Region mit Bindestellen für transkriptionsregulatorische Faktoren (z.B. RNA-Polymerasen, Transaktivatoren) ist der Promotorbereich sensitiv für Veränderungen in der Nukleotidsequenz. In den CpG-reduzierten Vektoren wurde der starke, gewebeunspezifische CMV-Promotor verwendet. Analog zum *pUCori* resultiert die Entfernung der CpG-Dinukleotide aus dem CMV-Promotor oft in dessen Funktionsverlust. Mit der Synthese eines CpG-freien CMV-Promotors konnten analog zu Yew *et al.* alle CpG-Dinukleotide ohne Funktionsverlust durch TpG-Dinukleotide ersetzt werden [17]. Dadurch konnte der CpG-Gehalt ohne negativen Einfluss auf die Transgenexpression auf 31,7% reduziert werden. Da die Abschaltung der Funktion des CMV-Promotors oft mit der *in vivo* Methylierung zusammenhängt [37,226], wurden durch die Generierung des CpG-freien Promotors auch potentielle Methylierungsstellen entfernt.

Durch die Generierung modular aufgebauter pDNA-Vektoren wurde eine technologische Plattform für ihre weitere Entwicklung, durch z.B. einfachen Austausch einzelner Fragmente über singuläre Restriktionsschnittstellen, geschaffen.

### **4.1.2 Veränderungen der CpG-Balance im Vektor-Rückgrat resultieren in der Generierung eines immunstimulatorischen pDNA-Vektors**

Eine der elementaren Anforderungen an einen pDNA-Vektor für die genetische Immunisierung sind die Induktion neutralisierender Antikörper sowie einer CD4<sup>+</sup>- sowie CD8<sup>+</sup>-T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen das kodierte Antigen. Dabei wird die Stärke der Immunreaktion in der Regel vom Antigentyp und seiner Expressionseffizienz beeinflusst. In den letzten Jahren wurde auf die entscheidende Bedeutung der Aktivierung des angeborenen Immunsystems für die Generierung einer effizienten humoralen und zellulären Immunantwort hingewiesen [227,228]. Als frühe Reaktion des angeborenen Immunsystems auf diverse Stimulantien, z.B. unmethylierte CpG-Sequenzen in einem pDNA-Vektor, werden proinflammatorische Cytokine (z.B. IFN $\gamma$  und IL-6) sezerniert [94]. Sezernierte Cytokine spielen bei der Aktivierung von T-Lymphozyten und B-Zellen eine wichtige regulatorische Rolle (vgl. 1.4.4). Die Fähigkeit, die Cytokin-Sekretion durch „nackte“ DNA im Rückgrat eines pDNA-Vektors zu induzieren, wird als seine Mitogenität oder Immunogenität bezeichnet. Bei den immunologischen Charakterisierungen der generierten CpG-reduzierten pDNA-Vektoren wurden *in vitro* bedeutende Unterschiede zwischen den einzelnen Konstrukte bezüglich ihrer Mitogenität festgestellt. Während die

meisten Vektoren nur eine sehr schwache Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen ( $\text{IFN}\gamma$ , IL-6) induzierten, wurde diese in starkem Masse beim p $\Delta$ S-Vektor nach 48 Stunden Inkubation mit murinen Splenozyten nachgewiesen. Die starke Immunogenität des p $\Delta$ S-Vektors wurde auch durch die Induktion einer hohen Anzahl  $\text{IFN}\gamma$ -produzierender Zellen belegt. Überraschenderweise konnten durch den p $\Delta$ S-Vektor mehr murine Splenozyten zur  $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion angeregt werden als durch synthetische immunstimulatorische CpG-ODN.

Zelenay *et al.* konnten in diesem Kontext ebenso zeigen, dass die Stimulierung muriner Splenozyten mit pDNA und CpG-ODN in der Induktion unterschiedlicher Cytokin-Profile resultiert [94,229]. Während doppelsträngige pDNA eine starke  $\text{IFN}\gamma$ - und moderate IL-6 Sekretion induzierte, bewirkten einzelsträngige CpG-ODN eine entgegengesetzte Cytokin-Aktivierung. Als mögliche Gründe für die Induktion der unterschiedlichen Cytokin-Profile wurden verschiedene Rezeptoren für pDNA und CpG-ODN und somit die Aktivierung verschiedener Signal-Kaskaden diskutiert. Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit durch ein ähnliches Cytokin-Profil nach Stimulierung muriner Splenozyten mit dem p $\Delta$ S-Vektor größtenteils bestätigt werden. Die Stimulierungseffizienz der unmethylierten CpG-DNA im Plasmid-Rückgrat ist abhängig von der endosomalen Azidierung und DNA-Degradation [230]. Die Konzentration der aufgenommenen pDNA ist dabei entscheidend für die „Freisetzung“ immunstimulatorischer Sequenzen (ISS) und ihrer Bindung an TLR9 [231]. Die relativ hohe Stimulierungsdosis der p $\Delta$ S-DNA (50  $\mu\text{g}$ ) im Vergleich zu 9  $\mu\text{g}$  bei Zelenay *et al.* liefert eine mögliche Erklärung für das nicht vollständig übereinstimmende Cytokin-Profil nach Stimulierung mit pDNA und CpG-ODN.

Im Vergleich zu p $\Delta$ S konnte durch keinen anderen CpG-reduzierten Vektor eine entsprechend hohe  $\text{IFN}\gamma$ - und IL-6-Sekretion induziert werden. Neben ihren immunstimulatorischen Effekten können CpG-Dinukleotide in einem besonderen Basenkontext auch inhibitorisch auf das Immunsystem wirken [98,232,233]. Durch Reduzierung des CpG-Gehaltes um 50% im p $\Delta$ S-Vektor (gegenüber dem pRS-Vektor) wurden möglicherweise überwiegend inhibitorisch wirkende CpG-Motive entfernt. Demzufolge ist die gesteigerte Immunogenität der p $\Delta$ S-DNA möglicherweise auf die Verschiebung des Verhältnisses zwischen stimulatorischen und inhibitorischen CpG-Motiven zu Gunsten der stimulatorischen Motive zurückzuführen.

Abgesehen von gut beschriebenen CpG-Motiven werden weitere immunbeeinflussende Elemente vermutet; so konnte kürzlich der cytosolische Rezeptor für doppelsträngige DNA (DAI) - zuständig für die CpG-unabhängige Aktivierung der angeborenen Immunität durch pDNA - nachgewiesen werden [234].

Der p $\Delta$ S110-Vektor zeigt eine etwa um den Faktor 10 schlechtere Fähigkeit, die  $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion zu induzieren, als der p $\Delta$ S-Vektor. Da sich die beiden Vektoren lediglich durch die Deletion im *pUCori* unterscheiden, lässt sich die enorme Immunogenitäts-Differenz auf



die 110 bp zurückführen. Die fünf durch die Deletion verlorenen CpG-Dinukleotide wurden bisher noch nicht in einem CpG-Motiv-Kontext charakterisiert [101]. Dennoch müssen diese 110 bp folglich ein oder mehrere Sequenzmotive beinhalten, welche die Induktion einer Immunantwort unterstützen und/oder deutlich verstärken. Die Bedeutung der 110 bp-Region auf die Induktion proinflammatorischer Cytokine wird im folgenden Kapitel näher diskutiert. Der p $\Delta$ S-Vektor hat, im Gegensatz zum p $\Delta$ S110- und p $\Delta$ S $\Delta$ C-Vektor, einen „CpG-intakten“ Promotor bzw. *pUCori*. Seine starken mitogenen Eigenschaften könnten durch die quantitative Einwirkung aller immunstimulatorischen CpG-Motive sowie aus einer Verschiebung der Balance von immuninhibierenden zu immunstimulatorischen Motiven resultieren.

Die Fähigkeit zur Induktion einer starken Sekretion proinflammatorischer Cytokine machen den p $\Delta$ S-Vektor zu einem interessanten Kandidaten für den Einsatz als DNA-Vakzine. Die sezernierten Cytokine wirken aktivierend auf die Zellen des adaptiven Immunsystems und tragen dadurch zur verbesserten Effizienz der DNA-Vakzine bei (vgl. 1.4.4). Eine der bereits untersuchten Strategien zur Verbesserung der Nachteile der pDNA-basierten Immunisierungen ist die Modifizierung des Vektor-Rückgrats [5,53]. Neben der Ko-Administration DNA-kodierter Cytokine [16,53,57,59] wurde außerdem gezeigt, dass die Wirksamkeit der DNA-Vakzine im Tiermodell auch durch den Einbau zusätzlicher ISS in das Vektor-Rückgrat verstärkt werden kann [138,229,235]. Auch im humanen System konnte eine gesteigerte IFN $\gamma$ , IL-6 und IFN $\alpha$  Sekretion nach Stimulierung humaner PBMCs mit CpG-Motiven angereicherter pDNA gezeigt werden [54]. Der p $\Delta$ S-Vektor ist in der Lage, eine starke Sekretion von Th1-Cytokinen ohne Einbau zusätzlicher ISS zu induzieren. Die Mitogenität des p $\Delta$ S-Vektors konnte auch im humanen System gezeigt werden, worüber in den nächsten Kapiteln ausführlicher diskutiert wird.

Dennoch ist, um den p $\Delta$ S-Vektor den (vor)klinischen Studien näher zu bringen, seine *in vivo* Charakterisierung mit entsprechenden Antigenen notwendig. In diesem Zusammenhang sollen im Rahmen der Entwicklung von HIV-Impfstoff Kandidaten der zweiten Generation in unserer Arbeitsgruppe die bereits in klinischen Studien getesteten Gag/Pol/Nef sowie Env-Antigene in weiterführenden Experimenten in den p $\Delta$ S-Vektor kloniert und anschließend zunächst im Mausmodell die induzierten humoralen und zellulären Immunantworten untersucht werden.

### **4.1.3 Die 110-bp Sequenz im *pUCori* beeinflusst entscheidend die immunogenen Eigenschaften des p $\Delta$ S Vektors**

Der Verlust der immunstimulatorischen Fähigkeit des p $\Delta$ S-Vektors nach der Deletion der 110 bp am 3'-Ende des *pUCori* weist auf das Vorhandensein stark immunbeeinflussender Sequenzen in diesem Bereich hin. Das Auftreten von fünf CpG-Dinukleotiden, die zu

keinem bisher charakterisierten stimulatorischen CpG-Motiv gehören, bietet die plausibelste Erklärung. Dennoch resultierte die Klonierung der 110 bp in die ca. 1000 bp-entfernte MCS des p $\Delta$ S110<sup>-</sup> Vektors nicht in der Wiederherstellung der Vektor-Mitogenität (p $\Delta$ S110<sup>+</sup>-Vektor). Es wurde berichtet, dass nicht nur die Anzahl der unmethylierten CpGs, sondern auch ihre Lokalisierung innerhalb einer größeren Sequenz einen Einfluss auf ihren immunogenen Effekt haben [96,101]. Obwohl sich diese Beobachtungen auf synthetische CpG-ODN beziehen, wird ein ähnlicher Aktivierungsmechanismus des CpG-Rezeptors TLR9 durch CpG-haltige pDNA postuliert. Tatsächlich konnte durch Wieder-Einfügen der „fehlenden“ 110 bp in das 3'-Ende des *pUCori* Bereiches (p $\Delta$ SBII-Vektor) die Fähigkeit, proinflammatorische und Th1-Cytokine zu sezernieren, analog zum p $\Delta$ S-Vektor wiederhergestellt werden. Das bedeutet, dass die Lage der 110 bp innerhalb des Vektors essentiell für die immunstimulatorischen Eigenschaften von p $\Delta$ S ist. Die Orientierungsabhängigkeit sollte durch die Generierung eines weiteren Vektors, dessen 110 bp-Sequenz in invertierter Ausrichtung vorliegt (p $\Delta$ Sinv), untersucht werden. Die Stimulierungsversuche zeigten, dass das Vorhandensein der invertierten 110 bp an korrekter Stelle im Vektor diesen zwar befähigte, eine im Vergleich zu p $\Delta$ S110<sup>-</sup> und p $\Delta$ S110<sup>+</sup> größere Anzahl von Zellen zur IFN $\gamma$ -Sekretion anzuregen, welche jedoch weit unter dem Niveau der p $\Delta$ S- und p $\Delta$ SBII-Vektoren lag. Daraus lässt sich folgern, dass an der immunstimulatorischen Fähigkeit der 110 bp unter anderem auch weitere cis-aktive Sequenzelemente in der näheren Umgebung beteiligt sind. Diese regulatorischen Sequenzen müssen nicht unbedingt CpG-haltig sein; möglicherweise unterstützen sie die Wirkung eines stimulatorischen CpG-Motives, beispielsweise durch verbesserte Bindung an TLR9.

Der erste Beweis für die direkte Bindung von unmethylierter CpG-DNA an TLR9 wurde von Cornélie *et al.* erbracht [122]. Sie zeigten, dass die CpG-Bindung an TLR9 Sequenzabhängig und für die Aktivierung der NF- $\kappa$ B Signal-Kaskade in murinen TLR9-exprimierenden Zellen ausreichend ist. Für die Bindung genügen bereits sechs unmethylierte Basen eines CpG-Motivs [236]. Die Bindungsregion auf dem TLR9 ist dennoch bisher unbekannt. Die Möglichkeit einer Beteiligung weiterer unterstützender Proteine wird vermutet [237,238]. Bandholtz *et al.* konnten nachweisen, dass das Hitzeschock-Protein 90 (Hsp90) an der TLR9-abhängigen Erkennung von CpG-DNA beteiligt ist [239]. Sie postulierten, dass Hsp90, unabhängig vom Methylierungsstatus der DNA, als Transfer-Ligand zwischen CpG-DNA und TLR9 fungiert. Da die Bindestellen für solche Hilfsproteine nicht unbedingt CpG-haltig sein müssen, könnten sie außerhalb der 110 bp-Region liegen und durch die Deletion zerstört sein. Eine weitere Erklärung für die mögliche Entstehung Nicht-CpG-cis-aktiver Elemente außerhalb des 110 bp-Bereichs ist die ursprüngliche Entfernung möglichst vieler CpG-Dinukleotide aus dem pRS-Vektor. Interessanterweise befindet sich im p $\Delta$ S-Vektor

beiderseits der 110 bp im Abstand von etwa 10 Basen eine komplementäre Sequenz aus fünf Basen (5'-AGAGT-3'), die am 3'-Ende der 110 bp als Folge der CpG-Reduzierung entstanden ist. Angenommen, die vollständige cis-aktive Sequenz besteht aus mehr als fünf Nukleotiden, könnten die angrenzenden, nicht mehr übereinstimmenden Nukleotide für die deutliche Abnahme der Mitogenität des p $\Delta$ Sinv-Vektors und Verlust der immunstimulatorischen Eigenschaften des p $\Delta$ S110<sup>-</sup> Vektors verantwortlich sein. Diese Hypothese wird durch den Nachweis unterstützt, dass für die TLR9-vermittelte Stimulierung die Länge der CpG-DNA Sequenz entscheidend ist [240].

Obwohl die im 110 bp-Bereich vorkommenden fünf CpG-Dinukleotide zu keinem bekannten CpG-Motiv gehören und in einer anderen Vektor-Region keine immunstimulatorische Wirkung haben, besteht die Möglichkeit, dass sie zusammen mit bereits diskutierten cis-aktiven Elementen außerhalb der 110 bp ein stimulatorisches CpG-Motiv bilden. Bei der Generierung des p $\Delta$ SBII-Vektors konnte das CpG-Dinukleotid am 5'-Ende der 110 bp in TpG umgewandelt werden. Da der p $\Delta$ SBII-Vektor nahezu gleiche immunogene Eigenschaften wie der p $\Delta$ S-Vektor zeigt, wird die stimulatorische Beteiligung dieses CpG-Dinukleotids ausgeschlossen. Der Vektor p $\Delta$ S $\Delta$  war durch die Eliminierung der vier verbliebenen CpG-Dinukleotide darauf ausgelegt, die mögliche Existenz immunmodulatorischer CpG-Motive zu klären. Die signifikante Abnahme der immunstimulatorischen Wirkung des p $\Delta$ S $\Delta$ -Vektors im Vergleich zu p $\Delta$ S beweist eine starke Beteiligung von einem oder mehreren CpGs. Als potentieller Kandidat wird das CpG-Dinukleotid am 3'-Ende der 110 bp vermutet, dass erst im Zusammenhang mit den in näherer Umgebung befindlichen cis-aktiven Sequenzelementen zum immunstimulatorischen CpG-Motiv wird. Wie in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt, benötigt dieses putative CpG-Motiv möglicherweise zusätzliche synergistische Elemente, um eine relevante Wirkung zu entwickeln. Solche gegenseitig verstärkenden Effekte konnten auf Proteinebene bereits für TLR9 und NOD2 gezeigt werden [241].

#### **4.1.4 TLR9-abhängige Aktivierung der angeborenen Immunität durch pDNA**

Bauer *et al.* konnten 2001 zum ersten Mal eine Spezies-spezifische Interaktion zwischen TLR9 und bakterieller CpG-DNA zeigen [117]. Seitdem wurde die direkte Bindung unmethylierter CpGs an TLR9 als Startsignal für die Sekretion proinflammatorischer Cytokine und Chemokine mehrfach nachgewiesen [119,121,122]. Folglich werden Zellen des angeborenen Immunsystems, wie DCs und/oder B-Lymphozyten, aktiviert, und es wird eine spezifische Immunreaktion eingeleitet (vgl. 1.3.4). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen eine absolute Abhängigkeit der Induktion proinflammatorischer Cytokine nach Stimulierung mit pDNA von TLR9. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Splenozyten konnten die TLR9-defizienten Zellen durch keinen der pDNA-Vektoren und auch nicht durch CpG-ODN zur

Sekretion von IFN $\gamma$  angeregt werden. Die Stimulierung mit PMA/Iono zeigte, dass die TLR9<sup>-/-</sup> Splenozyten prinzipiell in der Lage waren, IFN $\gamma$  TLR9-unabhängig zu sezernieren.

Die Abhängigkeit der pDNA-Stimulierung von TLR9 deutet darauf hin, dass die immunstimulatorische Wirkung vorwiegend auf die unmethylierten CpG-Motive zurückzuführen ist. Diese Annahme wird durch einige andere Arbeiten unterstützt, in denen die Autoren zeigten, dass durch den Einbau zusätzlicher immunstimulatorischer CpG-Motive in das Rückgrat einer pDNA die Sekretion der Cytokine IFN $\gamma$ , IL-6, IL-12, TNF $\alpha$  und IFN $\alpha$  deutlich gesteigert werden kann [54,235]. Wie bereits in Kapitel 4.1.3 diskutiert, hatte die Deletion von nur vier CpG-Dinukleotiden, die zu keinem bisher beschriebenen stimulatorischen CpG-Motiv gehören, aus der 110 bp-Region des p $\Delta$ S-Vektors einen negativen Einfluss auf dessen Immunogenität.

Abgesehen davon werden im Rückgrat einer pDNA weitere CpG-unabhängige immunstimulatorische Sequenzen vermutet. Am Beispiel von ODN wurden einige solcher Sequenzen beschrieben, die eine Immunreaktion TLR9-abhängig [242] oder TLR9-unabhängig [243] induzieren können. Außerdem induziert der kürzlich charakterisierte cytosolische DAI-Rezeptor nach der Bindung von dsDNA auch eine TLR9-unabhängige, aber IRF3-abhängige Immunantwort [234]. Demzufolge stellt sich die Frage, warum in der vorliegenden Arbeit TLR9-defiziente Splenozyten nicht zur CpG-unabhängigen Sekretion proinflammatorischer Cytokine angeregt werden konnten.

Eine mögliche Erklärung kann im Aufnahmemechanismus von pDNA in die Zelle liegen. Auch wenn Rezeptor-vermittelte Endozytose der wahrscheinlichste und wichtigste Vorgang der pDNA-Aufnahme in die Zelle darstellt, ist ein exakter Mechanismus noch immer unbekannt [244]. Verschiedene Studien zeigen jedoch, dass die Aktivierung der TLR9 Signal-Kaskade und Sekretion proinflammatorischer Cytokine von der aufgenommenen DNA-Menge abhängen. Kindrachuk *et al.* schlagen einen 2-Schritt Mechanismus der TLR9-Aktivierung durch Nukleinsäuren vor [231]. Im ersten Sequenz-abhängigen Schritt wird der Rezeptor durch Liganden-Bindung (CpG) aktiviert. Die Regulation des aktivierten TLR9-Dimers ist Sequenzunabhängig, wird aber entscheidend im zweiten Schritt von der absoluten DNA-Konzentration in den Endosomen beeinflusst. Bei TLR9-defizienten Zellen kann somit der erste Schritt nicht erfolgen, was demzufolge zu keiner Sekretion von Cytokinen führt.

In aktuellen Publikationen anderer Arbeitsgruppen konnte ein Stimulierungseffekt der pDNA erst durch die Bindung an Aufnahmeeffiziente DNA/DOTAP-Komplexe erzielt werden [242,245]. Bei der Stimulierung muriner Splenozyten wurden in der vorliegenden Arbeit keine Lipokomplexe für die effiziente pDNA-Aufnahme verwendet, wodurch die konstante pDNA-Konzentration im Endosom nicht erreicht werden konnte. Die Nicht-CpG Stimulierungssequenzen weisen möglicherweise keine hohe Sensitivität auf und werden erst in höheren Konzentrationen aktiv. Beim Fehlen von TLR9 kann pDNA auch nach der

Bindung an DAI im Cytoplasma eine Cytokin-Sekretion induzieren [234]. Auf dem Weg über die Endosomen in das Cytoplasma ist die DNA einem starken Degradationsprozess durch Endonukleasen ausgesetzt [10]. Daraus wird ersichtlich, dass eine effiziente Aufnahme in die Zelle, wie sie z.B. im Fall von Bakterien und Viren erfolgt, eine wichtige Voraussetzung für die TLR9-abhängige, aber auch TLR9-unabhängige Aktivierung der angeborenen Immunität durch pDNA ist. In dieser Hinsicht können weitere Stimulierungsversuche mit liposomalen pDNA/DOTAP Komplexen eine mögliche Aufklärung bringen.

Analog zur TLR9<sup>-/-</sup> Stimulierungsstudie der vorliegenden Arbeit konnten Zhou *et al.* zeigen, dass durch Elektroporation (EP) verabreichte pDNA den endosomalen Aufnahmeweg umgeht und dementsprechend eine minimale TLR9-vermittelte proinflammatorische Immunantwort induziert [245].

Eine weitere denkbare Erklärung für die fehlende TLR9-unabhängige Induktion proinflammatorischer Cytokine könnte die mögliche Synergie zwischen TLR9 und DAI liefern. Anders als die restlichen TLRs wird TLR9 weder auf der Zelloberfläche noch im Endosom exprimiert. Erst nach der Aufnahme der CpG-DNA in die Zelle wandert TLR9 aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in das Endosom, wo die Bindung des Liganden stattfindet [119]. Eine exakte Lokalisierung von DAI im Cytoplasma ist nicht bekannt. Dennoch wäre eine Interaktion zwischen beiden Rezeptoren in der frühen Aktivierungsphase möglich und könnte entscheidend die Erkennung von DNA beeinflussen. Diese Hypothese kann durch weiterführende Versuche abgeklärt werden.

### **4.1.5 CpG-abhängige Induktion der IFN $\gamma$ -Sekretion in B-Lymphozyten**

Als alleiniger Vertreter der Typ II IFN-Familie besitzt IFN $\gamma$  eine wichtige regulatorische Funktion im angeborenen und adaptiven Immunsystem (vgl. 1.4.3). Die Hauptproduzenten von IFN $\gamma$  sind aktivierte CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie NK-Zellen [155], obwohl auch berichtet wurde, dass B-Lymphozyten, NKT-Zellen und APC in der Lage sind, IFN $\gamma$  zu sezernieren [166-168]. Im Kapitel 4.1.2 wurde über den starken Einfluss von CpG-haltigen aber auch Nicht-CpG-Elementen im Rückgrat einer pDNA auf die Sekretion proinflammatorischer Cytokine, unter anderem auch IFN $\gamma$ , diskutiert. Es ist jedoch bekannt, dass der CpG-Rezeptor TLR9 nicht von allen Immunzellen exprimiert wird, sondern nur in DC und B-Zellen im humanen System sowie von Monozyten/Makrophagen in der Maus [94]. Über diese Zellen werden NK-Zellen und T-Lymphozyten indirekt durch CpG-Motive zur Sekretion von IFN $\gamma$  angeregt [170,171].

In dieser Arbeit wurde die Rolle der einzelnen Immunzellen bei der IFN $\gamma$ -Sekretion nach Stimulierung mit CpG-modulierter pDNA untersucht. Dazu wurden in mehreren Ansätzen jeweils die einzelnen Populationen von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, DC oder NK-Zellen aus der Gesamtpopulation der murinen Splenozyten depletiert und anschließend die

Restzellen mit den Basiskonstrukten pRS, pΔS, pΔS110<sup>-</sup> und den CpG-ODN stimuliert. Die erhaltenen Daten zeigen den deutlichen Trend, dass die B-Lymphozyten die verantwortliche Zellpopulation für die direkte IFN $\gamma$ -Sekretion nach Stimulierung mit pDNAs sind. Im Gegensatz dazu hatte die Depletion anderer Immunzellen keinen signifikanten Rückgang der Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender Zellen zur Folge. Aufgrund der geringen Spezifität des Makrophagen-Oberflächenmarkers CD11b war es zum Versuchszeitpunkt nicht möglich, diese Zellpopulation effizient zu depletieren. Dementsprechend ist eine klare Aussage hinsichtlich der Makrophagen-Population nicht möglich. Die Daten geben dennoch einen starken Hinweis darauf, dass die IFN $\gamma$ -Produktion in B-Lymphozyten durch stimulatorische CpG-Motive induziert wird. Im Gegensatz zu anderen Zellpopulationen resultierte nur die Stimulierung B-Zell-defizienter Splenozyten mit CpG-ODN in einem signifikanten Rückgang der Anzahl an IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen.

Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen anderer Gruppen überein - so konnten Krieg *et al.* bereits 1996 eine direkte Stimulierung von B-Lymphozyten durch bakterielle DNA nachweisen [92]. Weiterhin stimulierten mit CpG-ODN beladene *Virus-like particles* (VLP) B-Zellen direkt zum TLR9-abhängigen Isotypen-switch sowie Induktion von IgG2a [246].

Die IFN $\gamma$ -Produktion in B-Zellen ist abhängig von der Expression des T-Box Transkriptionsfaktors (T-bet) [168]. Die Sekretion der Th1-Cytokine IL-12 und IL-18 ist dabei entscheidend für die Aktivierung von T-bet. CpG-modifizierte pDNA-Vektoren, vor allem pΔS, waren in der Lage eine starke Sekretion von Th1-Cytokinen zu induzieren, wodurch die CpG-abhängige IFN $\gamma$ -Produktion durch B-Zellen im Selbstaktivierungs-Prozess unterstützt/induziert werden könnte.

Abgesehen von B-Zellen führte die Stimulierung der Splenozyten ohne T-Lymphozyten im Vergleich zu DC und NK-Zellen nach der Depletion zu deutlich weniger IFN $\gamma$ -sezernierenden Zellen. Im Gegensatz zu B-Zellen ist die direkte Aktivierung von T-Zellen durch CpG-DNA nicht bekannt. Dennoch werden durch CpG-DNA aktivierte DC, Makrophagen und B-Zellen Signale für die IFN $\gamma$ -Produktion an die T-Zellen weitergegeben [170,171]. Der Hinweis auf eine direkte IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen nach Stimulierung mit einem mitogenem pDNA-Vektor (pΔS) kann eher auf die Nicht-CpG stimulatorischen DNA-Sequenzen zurückgeführt werden. Dementsprechend werden möglicherweise TLR9-defiziente Zellen, wie T-Zellen und NK-Zellen, mit dsDNA direkt zur IFN $\gamma$ -Sekretion stimuliert.

Diese Daten liefern interessante Hinweise auf die verantwortlichen Zellpopulationen für die CpG-abhängige aber auch CpG-unabhängige IFN $\gamma$ -Sekretion, jedoch ist die Abklärung der Rolle von Makrophagen sowie die direkte Stimulierung distinkter oder Zellmischpopulationen mit pDNA essentiell, um genauere Aussagen treffen zu können.

#### 4.1.6 Induktion der Typ I Interferon (IFN $\alpha$ )-Sekretion nach Stimulierung humaner Immunzellen mit pDNA

Der Einsatz von pDNA-Vektoren in der genetischen Immunisierung setzt eine ausführliche Charakterisierung der immunogenen Eigenschaften der Vektor-Kandidaten im humanen System voraus. Da im Gegensatz zu diversen Tiermodellen keine humanen *in vivo* Untersuchungen möglich sind, sind in der Regel Untersuchungen bezüglich immunogener Effekte von pDNA-Vektoren auf *ex vivo* Studien isolierter humaner Zellen bzw. Zelllinien beschränkt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Fähigkeit CpG-modulierter pDNA, in humanen PBMC und pDC eine IFN $\alpha$ -Sekretion zu induzieren, untersucht. Als Vertreter der Typ I Interferone wird IFN $\alpha$  vorwiegend von pDCs produziert [164]. Neben seiner antiviralen Aktivität beeinflusst IFN $\alpha$  das Aktivierungsstadium anderer Immunzellen und spielt damit eine wichtige Rolle als Mediator zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort [165,247,248]. Anders als früher gedacht gab es in den letzten Jahren mehrere Beweise, dass pDCs als Teil des angeborenen Immunsystems und starke IFN $\alpha$ -Produzenten nicht nur antivirale und regulatorische Aufgaben haben, sondern auch in der Lage sind, T-Zellen ein Antigen präsentieren zu können [151]. Dementsprechend ist die Aktivierung von pDCs eine wichtige Anforderung an einen pDNA-basierten Vektor für die genetische Immunisierung im Menschen.

Die Stimulierungen humaner PBMC und pDCs zeigten, dass CpG-modifizierte pDNA-Vektoren im humanen *ex vivo* Modell nahezu identische immunogene Eigenschaften wie im murinen System besitzen. Im Gegensatz zu den pRS- und p $\Delta$ S110-Vektoren ist der p $\Delta$ S-Vektor in der Lage, eine starke und signifikant höhere IFN $\alpha$ -Sekretion in humanen pDCs zu induzieren. Die Konzentration an sezerniertem IFN $\alpha$  lag auf dem gleichen Niveau wie nach einer Stimulierung mit Typ A CpG-ODN (ODN 2216). Aufgrund ihrer Fähigkeit, die Proliferation von B-Zellen und pDCs direkt zu induzieren, wurden CpG-ODN in mehreren klinischen Studien als Adjuvantien zu herkömmlichen Impfstoffen erfolgreich getestet [135,249]. Auch als Adjuvant zur HBV-DNA-Vakzine bewirkten CpG-ODN eine gesteigerte Antikörperproduktion und stärkere CTL-Aktivität in nicht-humanen Primaten [134]. Der p $\Delta$ S-Vektor induzierte in pDCs aus verschiedenen Spendern jeweils die entsprechende IFN $\alpha$ - und deutlich höhere IL-12p70 Sekretion als CpG-ODN. Diese Eigenschaften des p $\Delta$ S-Vektors können entscheidend zur Steigerung der Effizienz der DNA-Vakzine beitragen.

Coban *et al.* versuchten die Immunogenität der DNA-Vakzine gegen Malaria durch den Einbau zusätzlicher immunstimulatorischer CpG-Motive zu steigern [54]. Sie konnten dadurch eine stärkere Sekretion von IL-6, IFN $\gamma$  und IFN $\alpha$  nach Stimulierung humaner PBMC erreichen. Außerdem belegten sie, dass die Anwesenheit von pDCs in der PBMC-Mischpopulation entscheidend für die IFN $\alpha$ -Sekretion ist. Allerdings konnten sie das unterschiedliche Cytokin-Muster nach Stimulierung mit CpG-ODN alleine oder eingebaut in

ein pDNA-Rückgrat nicht erklären. Wie in Kapitel 4.1.2 bereits erläutert und übereinstimmend mit Zelenay *et al.* lassen sich die Unterschiede vermutlich durch cytosolische Rezeptoren für dsDNA (z.B. DAI), die nicht durch einzelsträngige CpG-ODN aktiviert werden können, erklären [229,234]. Unmethylierte CpG-DNA aus dem pDNA-Rückgrat aktiviert nach der endosomalen Degradation den TLR9-Signalweg und zusätzlich, im Gegensatz zu CpG-ODN, nach der Bindung an DAI im Cytoplasma die TBK-1 Signal-Kaskade. Dadurch werden weitere Transkriptionsfaktoren wie IRF3 aktiviert und dementsprechend die Cytokin-Sekretion beeinflusst. Der exakte Regulationsmechanismus der induzierten Cytokine ist noch unbekannt.

Anders als die Sekretion von IFN $\gamma$  im murinen System, sowie IFN $\alpha$  nach Stimulierung humaner PBMCs bei Coban *et al.*, hatte die Stimulierung humaner pDCs mit CpG-ODN und dem p $\Delta$ S-Vektor eine nahezu identische Sekretion von IFN $\alpha$  zur Folge. Die Transkription von IFN $\alpha$  wird über IRF3 und IRF7 reguliert [250]. Beide Transkriptionsfaktoren können TLR9-abhängig (durch CpG-DNA) und TLR9-unabhängig (durch dsDNA) aktiviert werden. Dies liefert eine Erklärung für die analoge Fähigkeit von CpG-ODN und p $\Delta$ S-DNA IFN $\alpha$ -Sekretion in humanen pDCs zu induzieren. Außerdem wird dadurch wiederum die bedeutende Rolle von CpG-Motiven im Rückgrat des p $\Delta$ S-Vektors belegt. Als einzige humane Zellpopulation neben den B-Lymphozyten, die TLR9 exprimiert, können pDCs durch CpG-DNA aktiviert werden [95,151]. Die Stimulierungsdaten von pDCs werden durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigte hohe Aufreinigungseffizienz (~97,5%) sowie entsprechende Kontrollen bekräftigt. So konnte keine IFN $\alpha$ -Sekretion nach Stimulierung mit hoch-pathogenem bakteriellen LPS induziert werden. Im Gegensatz zu mDCs exprimieren pDCs auf ihrer Oberfläche keine LPS-Rezeptoren (CD14 und TLR4) und können demnach normalerweise nicht durch LPS aktiviert werden.

Zusammengefasst basieren die immunstimulatorischen Eigenschaften des p $\Delta$ S-Vektors einerseits auf seiner Fähigkeit, über unmethylierte CpG-Motive TLR9 zu aktivieren, und andererseits an den cytosolischen dsDNA-Rezeptor (DAI) zu binden und eine TLR9-unabhängige Immunantwort zu induzieren.

### 4.1.7 Ausblick 1- pDNA für die genetische Immunisierung

CpG-Dinukleotide im Vektor-Rückgrat stellen ein geeignetes Werkzeug dar, um die immunogenen Eigenschaften einer pDNA zu verändern. Durch Sequenz-Modifizierungen konnten in der vorliegenden Arbeit zwei pDNA-Vektoren mit immunologisch entgegengesetzten Eigenschaften generiert werden: der immunstimulatorische p $\Delta$ S-Vektor als Kandidat für die genetische Immunisierung und der immunneutrale p $\Delta$ S110<sup>-</sup>-Vektor als Kandidat für den Einsatz in der Gentherapie. Dennoch ist, um den p $\Delta$ S-Vektor den



(vor)klinischen Studien näher zu bringen, seine *in vivo* Charakterisierung mit entsprechenden Antigenen notwendig. Neben der Etablierung eines potentiellen pDNA-Vakzine Kandidaten liefert die vorliegende Arbeit die Grundlage für die weiterführende Forschungen den Mechanismen der Aktivierung der angeborenen Immunität durch eine pDNA-Sequenz. In zukünftigen Experimenten soll zunächst als wichtiger Schritt bei der pDNA-basierten Stimulierung der Mechanismus der pDNA-Aufnahme *in vitro* untersucht werden. Dabei kann die Aufnahme-Effizienz durch Bindung von pDNA an DOTAP und/oder Polyethylenimine (PEI) gesteigert werden und der mögliche Einfluss einer verstärkten pDNA-Aufnahme in die Zelle auf die Aktivierung von Signalkaskaden untersucht werden. Die für die Aktivierung von Signalkaskaden entscheidende Lokalisierung der aufgenommenen pDNA in der Zelle soll in nachfolgenden Versuchen durch immunfluoreszente Markierung der pDNA (z.B. mit TOTO-1) determiniert werden. In einem analogen Ansatz ist es weiterhin möglich, die Kinetik der pDNA-Aufnahme bzw. Verteilung in der Zelle zu verfolgen. Desweiteren soll die Beteiligung von DNA-Rezeptoren bei der Induktion der Sekretion proinflammatorischer Cytokine nach pDNA-Stimulierung geklärt werden. Neben TLR9 soll auch ein besonderes Augenmerk auf den kürzlich beschriebenen Rezeptor für dsDNA, DAI, gelegt werden. Dabei ist es wichtig, den Beitrag des jeweiligen Rezeptors sowie mögliche Interaktionen beider Rezeptoren nach pDNA-Stimulierung zu untersuchen. Dies kann einerseits auf RNA-Ebene durch RT-PCR und/oder *real-time* PCR erfolgen, andererseits ist es möglich durch Stimulierung bestimmter Zellpopulationen mit entsprechenden Kontrollen über das induzierte Cytokinprofil auf die Beteiligung DNA-spezifischer Rezeptoren rückzuschließen.

Die gewonnenen Erkenntnisse können für die *ex vivo* Stimulierung humaner Immunzellen angewendet werden. Neben der Identifizierung der für die Cytokinproduktion nach pDNA-Stimulierung verantwortlichen Zellpopulationen (z.B. B-Lymphozyten und NK-Zellen) ist hierbei auch die Untersuchung des induzierten Cytokin-Profiles nach Stimulierung von Mischpopulationen (z.B. B-Zellen/Makrophagen und/oder pDCs/NK-Zellen) bedeutend. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der p $\Delta$ S-Vektor eine Th1-polarisierende Immunantwort unterstützt. Die Aktivierung der für die Antigenpräsentation benötigten kostimulatorischen Faktoren, z.B. CD80, CD86, CD40 und MHC-Moleküle, durch den p $\Delta$ S-Vektor ist noch unbekannt und soll in nachfolgenden *ex vivo* Stimulierungen humaner Immunzellen durch z.B. FACS-Färbungen untersucht werden.

In weiterführenden *in vivo* Studien soll versucht werden, die erhöhte Mitogenität des Vakzine-Kandidaten p $\Delta$ S für die Generierung einer effizienten erworbenen Immunantwort zu nutzen. Um die immunmodulierenden Effekte des p $\Delta$ S-Vektors *in vivo* nachweisen zu können, ist die Wahl des Antigens und/oder pDNA-Dosis entscheidend. Mit einem starken Antigen wäre möglicherweise die Mitogenität des p $\Delta$ S-Vektors bei der Generierung einer humoralen und zellulären Immunantwort nicht so ausgeprägt wie bei einem schwachem

Antigen. In diesem Zusammenhang ist die Wahl eines schwachen Antigens, wie z.B. Ovalbumin, und eine möglichst niedrige Dosierung der eingesetzten pDNA-Menge von entscheidender Bedeutung. Neben der Messung der induzierten Immunantwort ist es zusätzlich möglich, die RNA aus dem Blut der injizierten Tiere zu isolieren und mittels *real-time* PCR die mRNA-Aktivierung von beteiligten Cytokinen und Chemokinen zu untersuchen.

## **4.2 Einfluss von intragenischen CpG-Dinukleotiden auf die *in vitro* und *in vivo* Expression des murinen Erythropoietin-Gens (mEPO)**

### **4.2.1 CpG-modifizierte und Kodonwahl-optimierte mEPO-Gene**

Eine lang andauernde Expression des kodierten Transgens sowie keine Vektor- bzw. Transgen-spezifische Immunogenität sind die wichtigsten Anforderungen an einen pDNA-basierten Gentherapievektor. CpG-Dinukleotide spielen dabei eine Schlüsselrolle, da sie entweder durch die Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort oder über Methyl-CpG-Bindeproteine zur chronischen Suppression der Transgenexpression führen können [70,71,94]. Andererseits fungieren intragenische CpGs als Bindestellen für Transkriptionsaktivierende Faktoren und können somit zur Steigerung der Genexpression beitragen [251]. Dennoch ist der genaue Einfluss des CpG-Gehaltes im Leserahmen eines Gens auf die Transkriptionseffizienz und somit auf die Höhe und Dauer der Genexpression unbekannt und wurde in dieser Arbeit untersucht. Als Modellprotein bzw. Modellgen diente das murine Erythropoietin (mEPO). In diesem Zusammenhang wurden für die nachfolgenden Expressionsanalysen, ausgehend vom Wildtyp (wt)-Gen, CpG-modulierte und kodonoptimierte Varianten des mEPO-Gens generiert. Im Gegensatz zum CpG-Gehalt ist der positive Einfluss der Kodonwahl-Optimierung auf die Höhe der Genexpression bekannt [252-254]. Mehrere Gruppen konnten zeigen, dass die Immunogenität pDNA-basierter Vakzine durch Kodonoptimierung, aufgrund der gesteigerten Antigen-Expression, verbessert werden kann [255,256]. Auch am Beispiel von EPO wurde der positive Effekt der Kodonoptimierung dargelegt, jedoch nur auf die *in vitro* Expression [257].

Die Basis für die Kodonoptimierung und CpG-Modifizierung der mEPO-Gene lieferte die Degenerierung des genetischen Kodes mit der Möglichkeit zur Änderung der Gensequenz ohne Veränderung der kodierenden Aminosäure-Sequenz. So konnten aus der wt-Sequenz des mEPO-Gens alle 14 CpG-Dinukleotide entfernt und somit ein CpG-freies mEPO-Gen (mEPO $\Delta$ CpG) hergestellt werden. Die Kodonqualität der neu generierten mEPO-Gene ist im *codon adaptation index* (CAI) widerspiegelt. Bemerkenswerterweise resultierte die Eliminierung intragenischer CpGs nicht in einer Reduktion, sondern im Gegenteil in einer

leichten Erhöhung des CAI. Stark exprimierte Gene im Säuger-Genom, wie die „Haushaltsgene“, nutzen „optimale Kodons“, was in der Anreicherung von tRNA und verstärkter Translationseffizienz resultiert [258]. Die Erhöhung des CAI durch CpG-Eliminierung weist darauf hin, dass im mEPOwt-Gen kein „optimales Kodon“ vorhanden ist bzw. genutzt wird. Die CpG-Eliminierung hatte auch eine Reduktion des GC-Gehaltes zur Folge. Daraus lässt sich folgern, dass der GC-Gehalt im murinen Genom bedeutender ist als die Verwendung des „optimalen Kodons“. Diese Annahme wird durch die Qualität bzw. den GC-Gehalt der kodonoptimierten mEPO-Gene (mEPOopt und mEPOmax) unterstützt. Nur durch die Optimierung der Kodonwahl (mEPOopt) wurde bei nahezu optimalem CAI auch der GC-Gehalt deutlich erhöht. Erwartungsgemäß wurde der GC-Gehalt nach zusätzlicher Maximierung des CpG-Gehaltes (mEPOmax) weiter gesteigert. Die Erhöhung auf die maximal mögliche Anzahl an CpG-Dinukleotiden im mEPO-Gen wirkte sich dramatisch negativ auf den CAI aus, der dadurch bei mEPOmax fast auf das Niveau von mEPOwt und mEPO $\Delta$ CpG fiel.

Somit wurden durch die Kodonoptimierung und Modifizierung des CpG-Gehaltes von mEPO vier Genvarianten generiert, die einerseits auf den Einfluss von intragenischen CpG-Dinukleotiden und andererseits auf Effekte der Kodonoptimierung hinsichtlich der *in vitro* und *in vivo* Expression untersucht werden können.

### **4.2.2 Der intragenische CpG-Gehalt von mEPO korreliert mit der transienten *in vitro* Genexpression**

Zur Untersuchung der *in vitro* und *in vivo* Expression wurden mEPO-Genvarianten in die zuvor charakterisierten immunneutralen Expressionsvektoren pRS und p $\Delta$ S110<sup>-</sup> kloniert. Abgesehen von den vorausgesetzten immunneutralen Eigenschaften hat die Wahl des Expressionsvektors auch eine wichtige Bedeutung hinsichtlich der Expressionsdauer des Transgens [52]. In diesem Zusammenhang konnten Yew *et al.* zeigen, dass die Reduzierung des CpG-Gehaltes im Vektor-Rückgrat um 80% in einer Steigerung der Effizienz und Dauer der Transgenexpression resultiert [17]. Dies korreliert mit Ergebnissen vorangegangener Arbeiten unserer Arbeitsgruppe. Die vorliegende Arbeit sollte deshalb Aufschluss über den Einfluss von Modifizierungen im Leserahmen von mEPO auf die (Gen)Expression bringen. Hierfür wurden mEPO Genvarianten in den Basis-Vektor mit unverändertem Rückgrat kloniert (pRS) und die *in vitro* Expression nach der transienten Transfektion muriner 3T3-NIH- und humaner 293T-Zellen untersucht. Parallel wurde auch das Expressionsmuster der mEPO-Varianten analysiert, die in den CpG-reduzierten p $\Delta$ S110<sup>-</sup> Vektor kloniert wurden.

Die *in vitro* Expressionsdaten zeigen, dass die Erhöhung des CpG-Gehaltes und Optimierung des Kodongebrauchs des mEPO Gens in einer signifikant verstärkten transienten Expression in humanen und murinen Zellen resultiert, während die Entfernung

intragenischer CpGs eine Reduktion des Expressionsniveaus bewirkt. Die Unterschiede waren sowohl in den Zelllysaten als auch in den Überständen der transfizierten Zellen nachweisbar. Auffällig war das Auftreten mEPO-spezifischer Doppelbanden in den Lysaten der 293T-Zellen. Da EPO zur Klasse der Glykoproteine gehört, sind posttranslationale Modifizierungen, vor allem N-Glykosylierungen für seine biologische Funktion essentiell [186]. Demnach entsprechen die niedermolekularen 27 kDa Banden der nicht-glykosylierten Form von EPO und die höher molekularen 34 kDa Banden dem glykosylierten Protein. Im Gegensatz zu humanen 293T-Zellen, konnte in murinen 3T3-NIH Zellen nahezu keine nicht-glykosylierte mEPO-Form nachgewiesen werden. Der Grund dafür liegt möglicherweise im unterschiedlichen mEPO-Glykosylierungsmuster, welches von den verwendeten Zelllinien abhängt. Murine Zellen sind jedoch im Vergleich zu humanen Zellen besser in der Lage posttranslationale Modifikationen an murinen Proteinen durchzuführen. In diesem Zusammenhang könnte z.B. eine erschwerte Aufnahme des murinen Proteins in den humanen Golgi-Apparat eine Rolle spielen. Die genauen Hintergründe bedürfen einer genaueren Analyse und könnten beispielsweise durch die Lokalisierung von EPO mittels Immunfluoreszenz untersucht werden. Desweiteren ist die unterschiedliche Effizienz der posttranslationalen Modifikationen an mEPO eine naheliegende Erklärung für die stärkere Sekretion des exprimierten Proteins in murinen gegenüber humanen Zellen. Die beiden auf den murinen Kodongebrauch optimierten Gene mEPOopt und mEPOmax konnten im Vergleich zu 293T-Zellen, nach der Synthese in 3T3-NIH Zellen wirkungsvoller aus der Zelle freigesetzt werden. Ferner besteht die Möglichkeit, dass der spezifische anti-mEPO Antikörper nicht mehr in der Lage ist, die veränderte Proteinstruktur nach der Modifizierung im humanen Golgi-Apparat effizient zu detektieren.

Die Eliminierung intragenischer CpG-Dinukleotide hatte, neben dem pRS Vektor, auch eine negative Auswirkung auf die mEPO *in vitro* Expression im CpG-reduzierten pΔS110-Expressionsvektor. Die Erhöhung des CpG-Gehaltes und Kodonoptimierung hatten hier analog eine Steigerung der *in vitro* Expression zur Folge. In keinem der Expressionsvektoren konnten deutliche Unterschiede zwischen mEPOopt und mEPOmax detektiert werden. Obwohl die Maximierung des CpG-Gehaltes eine Verschlechterung des CAI bewirkte, zeigte mEPOmax eine ebenwürdige *in vitro* Expressionseffizienz wie mEPOopt, was auf einen bedeutenden Einfluss intragenischer CpG-Dinukleotide zurückzuführen ist. Die Abhängigkeit der *in vitro* Expressionsrate von intragenischen CpGs und der Kodonoptimierung konnte in Parallelarbeiten der Arbeitsgruppe für das HIV-III<sub>B</sub>-syn-p24-Protein, das *green fluorescent protein* (GFP) und das Chemokin MIP-1 $\alpha$  gezeigt werden, was auf ein Gen-unspezifisches Phänomen deutet.

Die nachgewiesene starke Expression CpG-modifizierter und kodonoptimierter mEPO-Gene könnte auch für entsprechende biotechnologische Anwendungen genutzt werden. Die

rekombinanten rHuEPO-Präparate *epoetin alpha* und *epoetin beta* werden beispielsweise nach der Transfektion humaner EPO-Gene in *Chinese hamster ovary* (CHO) Zellen produziert. Analog zum endogenen EPO sind auch beim rHuEPO sowohl die Bindung an EPO-spezifische Rezeptoren, als auch die Stabilität im Blutkreislauf abhängig vom Glykosylierungsgrad [186,191,192]. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Modifizierungen des mEPO-Gens eine signifikante Erhöhung der *in vitro* Expression bei unbeeinträchtigter Fähigkeit zu posttranslationellen Modifikationen, wie Glykosylierung, in artgleichen Zellen, bewirken. In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten analog zu mEPO CpG-modifizierte und kodonoptimierte Varianten des humanen EPO (hEPO) generiert werden. Die ausführlichen Untersuchungen der Expressionseigenschaften dieser hEPO-Gene sollten nach transienter Transfektion von CHO-Zellen (und auch anderen Zellen) sowie durch Generierung stabiler hEPO-Zelllinien zeigen, ob man durch diese Veränderungen eine biotechnologische Verbesserung bei der Herstellung von rHuEPO erreichen kann.

### **4.2.3 CpG-Modifizierungen beeinflussen die mEPO RNA-Expression aber nicht die Translationseffizienz**

CpG-Dinukleotide im Promotorbereich und Leserahmen eines Gens werden in der Regel mit Methylierung(en) und Abschaltung der Genexpression in Zusammenhang gebracht [81,214]. Auch wenn es Hinweise gibt, dass CpGs eine Plattform für die Bindung Transkriptions-aktivierender Proteine darstellen [251] und somit positiv auf die Genexpression wirken, sind die dahinter stehenden Zusammenhänge und Mechanismen noch weitgehend unbekannt. Die *in vitro* Expressionsstudien zeigten deutlich, dass neben der Kodonwahl auch CpG-Dinukleotide eine wichtige Rolle bei der Transgen-Expression spielen. Die Effizienz der Genexpression ist von multiplen Faktoren, wie z.B. Transkriptions- und Translationseffizienz, sowie mRNA-Transport und mRNA-Stabilität abhängig [4]. Es ist jedoch nicht bekannt, welcher Expressionsschritt durch intragenische CpG-Dinukleotide beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden molekularbiologische Analysen durchgeführt, mit dem Ziel, die molekularen Hintergründe der Transkription sowie Translation der CpG-modifizierten und kodonoptimierten mEPO-Gene aufzuklären. Die umfangreichen Untersuchungen zeigten, dass das unterschiedliche Expressionsmuster der mEPO-Genvarianten bereits auf RNA-Ebene ausgeprägt ist und nicht durch unterschiedliche Translationseffizienzen zustande kommt.

Mit Hilfe des MVA/T7 RNA-Polymerase Systems [223] konnte gezeigt werden, dass die Modifizierungen des mEPO-Gens keinen signifikanten Einfluss auf die Translationseffizienz haben. Obwohl „die Verwendung“ des optimalen Kodons in tRNA-Akkumulation und Steigerung der Translationseffizienz resultiert [258], wurde bei keinem der kodonoptimierten

mEPO-Gene eine erhöhte cytoplasmatische Transkription und anschließende Translation festgestellt. Jedoch ist es im artifiziellen System (MVA/T7) schwierig, native Bedingungen nachzuahmen und entsprechende Aussagen bezüglich der *in vivo* Mechanismen zu treffen. Nichtsdestotrotz erlaubt das MVA/T7 RNA-Polymerase System die Translation eines Gens ohne nukleäre Einflüsse zu betrachten und Aussagen hinsichtlich des direkten Einflusses des Gendesigns auf die Translationseffizienz zu treffen. Die vergleichbare Expression aller mEPO-Genvarianten im MVA/T7 System deutet darauf hin, dass die Genmodifizierungen eher die mRNA-Stabilität und/oder Transkriptionseffizienz beeinflussen. In der Tat zeigten qualitative sowie quantitative Analysen der mEPO-spezifischen mRNA, dass analog zu den Proteindaten die Transfektion mit den CpG-maximierten und kodonoptimierten mEPO-Genen in einer signifikanten Steigerung der mRNA-Expression resultiert. Die Effekte sind Zelltyp-unspezifisch, was durch das analoge mRNA-Expressionsmuster in murinen und humanen Zellen nachgewiesen wurde. Dennoch waren die Unterschiede in den murinen 3T3-NIH Zellen nicht so deutlich wie in den humanen 293T-Zellen, was auf die enorm schwierigen Transfektionsbedingungen bei den 3T3-NIH-Zellen zurückzuführen ist.

Vergleichbare Mengen mEPO-spezifischer mRNA im Nukleus und Cytoplasma zeigen, dass die Modifizierungen der mEPO-Gensequenz keinen Einfluss auf den mRNA-Transport vom Nukleus in das Cytoplasma haben. Graf *et al.* berichteten, dass die Generierung kodonoptimierter synthetischer Gene die mRNA-Stabilität positiv beeinflusst, welches der Hauptgrund für die verstärkte Expression in Säugerzellen ist [259]. Die Daten der vorliegenden Arbeit können diese Theorie hinsichtlich der Kodonoptimierung bestätigen. Die höhere mRNA-Menge bei mEPOMax gegenüber mEPOopt bei vergleichbarer Proteinkonzentration bedeutet, dass die intragenischen CpGs möglicherweise die Stabilität bzw. den mRNA-Export beeinflussen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch die hohen mEPOMax mRNA-Mengen eine Sättigung erreicht wird, nach der keine weitere Steigerung der (*in vivo*) Translation möglich ist. Die Abklärung dieser Hypothesen verlangt zusätzliche Untersuchungen mit Blick auf die mRNA-Stabilität.

Abgesehen von der mRNA-Stabilität wurde durch die Analyse der *de novo* Synthese mEPO-spezifischer RNA gezeigt, dass die CpG-Sequenz-Modifizierungen einen deutlichen Einfluss auf die Transkriptionsrate von mEPO haben. Sowohl CpG-maximierte (70 CpG) als auch Kodonoptimierte (20 CpG) mEPO-Gene zeigten eine höhere Transkriptionsrate gegenüber dem Wildtyp (14 CpG) und CpG-freien mEPO-Gen. Bemerkenswerterweise korreliert die relative Transkriptionsrate mit der Anzahl an intragenischen CpG-Dinukleotiden. Aufgrund der vorliegenden Daten und entsprechenden parallelen Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe wird deutlich, dass die CpG-Modifizierungen eines Gens bereits seine Transfektionsrate beeinflussen, was sich entsprechend auf die Höhe des mRNA-Gehaltes auswirkt.

#### 4.2.4 Dauerhafte *in vivo* Expression der CpG-modifizierten und Kodonoptimierten mEPO-Gene

Um den Einsatz pDNA-basierter Vektor-Systeme in der Gentherapie zu ermöglichen, muss einer ihrer Hauptnachteile, die schlechte *in vivo* Transfektionsrate, verbessert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde am Beispiel des mEPO-Gens der Einfluss von CpG-Modifizierungen und Kodonoptimierung auf die *in vivo* Expression im Balb/c Mausmodell untersucht. Andere Gruppen haben bereits gezeigt, dass die Optimierung des Kodongebrauchs zu einer erhöhten, aber nicht dauerhaften mEPO-Expression führt [31,33]. Als potentieller Grund für den Rückgang der Expression wird unter anderem die CpG-bedingte *in vivo* Methylierung und Abschaltung des Promotors diskutiert [37,224,225]. Die *in vivo* Expressionsdaten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch Kodonoptimierung sowie CpG-Modifizierung des mEPO-Gens eine erhöhte und kontinuierliche Expression des therapeutischen Proteins über ein Jahr nach der Applikation in Balb/c Mäusen erreicht werden kann. Außerdem, hatte die Eliminierung intragenischer CpGs analog zu den *in vitro* Daten einen reprimierenden Effekt auf die *in vivo* Expression von mEPO.

Anders als bei der *in vitro* Expression, wurde die höchste *in vivo* Konzentration von mEPO nicht mit mEPOmax, sondern nach Applikation des mEPOopt Gens erreicht. Obwohl die mEPOmax-vermittelte Protein-Expression während der ganzen Studie auf dem hohen Niveau persistierte, waren die mEPO-Konzentrationen signifikant niedriger als nach der mEPOopt-Injektion. Dies suggeriert, dass im Vergleich zur *in vitro* Expression, wo Methylierungen keine Rolle spielen, die *in vivo* Methylierung der möglicherweise entscheidende Faktor für die reduzierte Expression von mEPOmax ist. Diese Annahme korreliert mit Arbeiten von Chevalier *et al.*, in denen die Dichte der CpG-Sequenzen innerhalb des Leserahmens eines Gens entscheidend zur Suppression der Transkription beiträgt [225]. Ungeklärt bleibt aber, ob die intragenischen CpGs von mEPOmax und/oder benachbarte, Promotor-assoziierte CpGs nur partiell methyliert werden und es dadurch nicht zur Abschaltung, sondern zur Reduktion der mEPO-Expression *in vivo* kommt. Die Aufklärung des Einflusses von *in vivo* Methylierungen in den generierten mEPO-Varianten auf die Langzeitexpression soll im Fokus weiterführender Untersuchungen stehen.

Hodges *et al.* postulierten, dass die CpG-Methylierungen innerhalb eines pDNA-Vektor-Rückgrats und die dadurch induzierte epigenetische (Gen)Abschaltung die größte Barriere für eine dauerhafte Expression therapeutischer Gene darstellen [260]. In diesem Zusammenhang schlagen sie die Eliminierung von CpG-Dinukleotiden aus den Gentherapie-Vektoren vor. Für die *in vivo* Expressionsstudie in der vorliegenden Arbeit wurden mEPO-Genvarianten im kommerziellen, CpG-unveränderten pDNA-Vektor (pRS) verwendet. Interessanterweise konnte, im Gegensatz zu Hodges *et al.* trotz unverändertem CpG-Gehalt im Vektor-Rückgrat eine verstärkte und dauerhafte *in vivo* Expression von mEPO erreicht werden. Abgesehen vom Vektor-Rückgrat und der kodierenden Region eines Gens wurde

mehrfach gezeigt, dass die Abschaltung der Genexpression mit CpG-Methylierungen im Promotor-Bereich zusammenhängt [71,220]. In dieser Hinsicht wird die Verwendung des „Methylierungs-sensitiven“ CMV-Promotors in Gentherapie-Vektoren kontrovers diskutiert [226]. Kürzlich berichteten Sebestyén *et al.*, dass der CMV-Promotor keine dauerhafte *in vivo* Expression gewährleisten kann und demnach nicht für die EPO-Gentherapie geeignet ist [37]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine stabile Langzeit-Expression von mEPO-Genvarianten *in vivo*, unter Kontrolle des Wild-Typ CMV-Promotors, gezeigt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Gruppen überein, die eine dauerhafte EPO-Expression in Primaten nach intramuskulärer Applikation des Adenovirus-assoziierten CMV-Vektors (AAV-CMV) belegen konnten [201].

Der vielversprechende Einsatz von AAV hatte in den letzten Jahren sowohl in der Gentherapie als auch für die genetische Immunisierung bittere Rückschläge hinsichtlich seiner Sicherheit erlitten. So zeigten verschiedene Publikationen, dass eine AAV-basierte EPO-Gentherapie aufgrund der Induktion neutralisierender EPO-Antikörper zu einer autoimmunen Anämie führen kann [29,197]. Das Risiko beim Einsatz von AAV-Vektoren im Menschen wurde wiederum in einer ernüchternden Merck-Studie gegen HIV belegt [261]. Dabei wurde nach der Vakzinierung die Zahl an HIV-Neuinfektionen bei Probanden, die den AAV-basierten Impfstoff bekommen haben, höher (43 Neuinfektionen) als bei der Kontrollgruppe (32 Neuinfektionen), was möglicherweise auf die persistierende Adenovirus-Infektion zurückzuführen ist. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die gesteigerte Expressionseffizienz sicherer Vektor-Alternativen wie pDNA, durch CpG-Modifizierung und Kodonoptimierung erreicht werden kann. Die erhöhte und dauerhafte mEPO-Expression nach dem Elektro-Gentransfer (EGT) der modifizierten mEPO-Genvarianten weist darauf hin, dass keine mEPO-spezifische Antikörper induziert wurden.

Eine weitere wichtige Anforderung an die pDNA-basierte Gentherapie ist das Erreichen therapeutisch-relevanter Effekte mit einer niedrigen pDNA-Dosis. Dementsprechend wurden in dieser Arbeit unabhängige *in vivo* Studien mit verschiedenen Konzentrationen mEPO-kodierter pDNA durchgeführt. Die positiven Expressionseffekte der Gen-Modifizierungen konnten vor allem bei niedrigeren pDNA-Dosen (5 µg und 15 µg) nachgewiesen werden. Demgegenüber wurde der negative Einfluss der Eliminierung intragenischer CpGs auf die mEPO-Expression mit steigender pDNA-Dosis deutlich. Die Menge der injizierten pDNA hat außerdem eine Bedeutung im Hinblick auf die Toxizität und Sicherheit. EGT hoher Mengen an pDNA kann zu Muskelschäden und zur Infiltration inflammatorischer Zellen führen [262,263]. Außerdem wurde berichtet, dass applizierte DNA-Mengen > 5 µg aufgrund lokaler Toxizität eine verminderte Transgen-Expression bewirken können [47]. Die Applikation geringer pDNA-Mengen in der Gentherapie ist auch im Hinblick auf das Vorhandensein CpG-abhängiger sowie CpG-unabhängiger immunstimulatorischer Sequenzen im Vektor-Rückrat



wichtig [94,234]. Die dadurch induzierte Sekretion proinflammatorischer Cytokine führt unter anderem zur Suppression der Transgen-Expression [1,18]. In diesem Zusammenhang stellt die Induktion einer dauerhaften, hohen mEPO-Expression nach Applikation niedriger pDNA-Dosen (2,5 µg pro Muskel) eine beachtliche Verbesserung für die pDNA-basierte Gentherapie dar.

Der Nachweis therapeutisch relevanter mEPO-Konzentrationen im Blutkreislauf der injizierten Balb/c-Mäuse über ein Jahr nach dem EGT von mEPO-kodierter pDNA ist der erste direkte Beweis für die stabile und dauerhafte *in vivo* Expression von mEPO. Diese vielversprechenden Ergebnisse konnten allerdings nur in Kombination mit Elektroporation (EP) erzielt werden. Entgegengesetzt ursprünglicher Dogmen findet die *in vivo* EP als geeignete Methode für eine effiziente Applikation von pDNA-Vektoren immer häufiger und inzwischen auch in prä-klinischen und klinischen Studien Anwendung [212].

### **4.2.5 Einfluss von mEPO-Genmodifizierungen auf den Verlauf hämatologischer Parameter**

Sezerniertes EPO erfüllt im Organismus hauptsächlich hormonelle Aufgaben und wirkt als Schlüsselhormon bei der Erythrozytenbildung während der Erythropoiese. Demzufolge fungiert die kontinuierliche Expression von EPO als wichtigster regulatorischer Faktor von hämatologischen Parametern im Blut wie Hämatokrit (HCT) und Hämoglobin (Hgb) [37,47]. Entsprechend den ermittelten mEPO-Konzentrationen im Serum bewirkte die Einzelinjektion niedriger pDNA-Mengen kodonoptimierter und CpG-modifizierter mEPO-Gene eine signifikante Erhöhung der HCT- und Hgb-Werte über ein Jahr hinweg nach der Applikation, ohne dass dabei Nebenwirkungen in den behandelten Mäusen beobachtet werden konnten. Die dauerhafte Steigerung der HCT-Werte nach pDNA-Applikation wurde bereits von Muramatsu *et al.* beschrieben und wird gegenwärtig von verschiedenen Autoren als Nachweis für die Langzeit EPO-Expression zitiert [33]. Um die beschriebenen Effekte zu erreichen, injizierten Muramatsu *et al.* den Mäusen 50 µg mEPO-kodierender pDNA pro Muskel mit anschließender EP. In der vorliegenden Arbeit konnte eine direkte Langzeit-mEPO-Expression (vgl. 3.3.5.1) und infolgedessen dauerhaft erhöhte HCT- und Hgb-Niveaus mit 20fach weniger mEPO-kodierender pDNA gezeigt werden. Die vergleichbaren HCT-Werte nach Applikation unterschiedlicher pDNA-Mengen deuten auf eine Dosis-unabhängige Erhöhung der Blutparameter hin. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit der in der Literatur beschriebenen Dosis-abhängigen Steigerung des HCT-Wertes [34]. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass es mit kodonoptimierten und CpG-modifizierten synthetischen mEPO-Genen möglich ist, mit niedriger pDNA-Dosis den EPO-Sättigungswert bei der Erythropoiese zu erreichen.

Bei der Behandlung anämischer Patienten werden therapeutisch relevante Effekte erst ab einer Erhöhung des HCT-Wertes um mindestens 10% erzielt [37]. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Einzelinjektion der mEPOopt- und mEPOmax-Gene, im Vergleich zu mEPOwt, eine Erhöhung des HCT-Wertes um ~ 38% bzw. ~ 51% bewirkt. Demgegenüber resultierte die Applikation des CpG-freien mEPO-Gens in keiner Steigerung des HCT-Wertes. Entsprechend dem HCT-Verlauf wurden durch Kodonoptimierung sowie CpG-Modifizierung auch unterschiedliche Hgb-Niveaus erreicht, wobei die mEPOopt- und mEPOmax-Gene deutlich höhere Hgb-Werte gegenüber dem nicht-modifizierten mEPO-Gen (mEPOwt) induzierten. Der intragenische CpG-Gehalt sowie Kodon-Gebrauch stellen diesen Ergebnissen nach eine Möglichkeit zur Regulierung hämatologischer Parameter durch entsprechendes Gendesign dar. Das Ziel bei der Behandlung anämischer Patienten ist keine unkontrollierte Steigerung von Blutparametern sondern, je nach Erkrankung, ihre feine Regulierung [37,47]. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene regulatorische Elemente bzw. Strategien untersucht [37,47]. Die Induktion unterschiedlicher EPO-Konzentrationen im Serum, aufgrund von Modifizierungen des intragenischen CpG-Gehaltes, liefert die Basis für weitere Studien mit Fokus auf die Regulierung der EPO-Expression *in vivo*.

Als fernes Ziel können kodonoptimierte und CpG-modifizierte mEPO-Gene in Kombination mit adäquaten Applikationsmethoden wie *in vivo* Elektroporation, eine Alternative zur kostenintensiven Therapie mit rHuEPO darstellen. Nichtzuletzt wird der Einsatz von pDNA in der Gentherapie, durch EGT und „gezielte“ Gen-Optimierungen konkurrenzfähiger gegenüber aktuellen gentherapeutischen Methoden.

### 4.2.6 Ausblick 2 – pDNA in der Gentherapie

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CpG-Dinukleotiden innerhalb der kodierenden Region von mEPO auf die *in vitro* und *in vivo* Expression im Rahmen der Entwicklung Plasmid-basierter Kandidaten für den gentherapeutischen Einsatz untersucht. Dabei konnte einer der größten Nachteile pDNA-basierter Vektoren in der Gentherapie - die schlechte *in vivo* Expressionseffizienz - durch Maximierung des CpG-Gehaltes sowie Kodonoptimierung deutlich verbessert werden. Obwohl dadurch eine starke mEPO-Expression *in vivo* nach Applikation einer deutlich reduzierten Menge an pDNA erreicht werden konnte, sollte in weiteren Studien angestrebt werden, die eingesetzte pDNA-Menge weiter zu senken. Dies könnte möglicherweise durch einen Elektro-Gentransfer (EGT) der modifizierten mEPO-Gene mit verfeinerten Applikationsmethoden [31] erreicht werden.

Die Expressions-Studien zeigen, dass die Kodon-Optimierung sowie die Erhöhung des CpG-Gehaltes in einer signifikant gesteigerten *in vitro* und *in vivo* Expression resultieren. Anders als in den *in vitro* Studien zeigte der EGT des mEPOopt Gens eine deutlich höhere *in vivo*

Expressionseffizienz als die des mEPOmax Gens. Als mögliche Ursache für die Reduktion der mEPOmax-vermittelten *in vivo* Expression wurde die partielle Methylierung diskutiert (vgl. 4.2.4). In weiterführenden Studien soll deshalb das Methylierungsmuster der applizierten mEPO-Gene als möglicher Grund für die unterschiedliche *in vivo* Expressionseffizienz untersucht werden. In diesem Zusammenhang soll zu verschiedenen Zeitpunkten die genomische DNA aus den Mausmuskeln, in die die mEPO-kodierten pDNAs injiziert wurden, isoliert und das Methylierungsmuster in geeigneten PCR-Reaktionen analysiert werden.

Anders als in anderen Studien konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine kontinuierliche Langzeit-Expression der mEPO-Gene nach EGT von mEPO-kodierten pDNAs in Balb/c Mäusen über ein Jahr nach der Applikation erreicht werden. Einer der möglichen Gründe für die dauerhafte *in vivo* Expression ist die stabile Integration der mEPO-Gene in das Genom ausdifferenzierter Myozyten. Diese Hypothese soll in nachfolgenden Studien näher untersucht werden. Dabei soll die Gesamt-RNA aus den applizierten- sowie Kontroll-Muskeln zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert und das Verhältnis der jeweiligen mEPO-Varianten mittels *real-time* PCR bestimmt werden. Die eventuelle Minimierung der endogenen mEPO-Expression in den Nieren bzw. der Leber soll durch entsprechende RNA-Kontrollen aus diesen Organen analysiert werden.

Ein weiterer Schritt für den Einsatz der modifizierten EPO-Gene in klinischen Studien wäre die Evaluierung der im Mausmodell etablierten Effekte auch in Ratten und/oder nicht-humanen Primaten.

Mittels bereits generierten humanen EPO (hEPO)-Genen soll durch Untersuchungen der Expressionseigenschaften nach der transienten Transfektion von CHO-Zellen sowie durch Generierung stabiler hEPO-Zelllinien bestimmt werden, ob man durch die Modulierung des CpG-Gehaltes aus biotechnologischer Sicht eine Verbesserung der Herstellung von rHuEPO erreichen kann. Die Wirksamkeit des rHuEPO ist unter anderem abhängig vom Glykosylierungsmuster [37]. Demzufolge soll die Untersuchung des Glykosylierungsmusters nach der transienten Transfektion sowie in stabilen Zelllinien im Fokus nachfolgender *in vitro* Expressionsstudien stehen.

## Zusammenfassung

Plasmid DNA (pDNA) basierte Vektorsysteme stellen auf Grund ihres hohen Sicherheitspotentials sowie der fehlenden Induktion einer Vektor-spezifischen Immunantwort eine vielversprechende Alternative zu viralen- bzw. Virus-assoziierten Vektorsystemen dar. Trotz dieser Vorteile ist der Einsatz von pDNA-Vektoren sowohl für die genetische Immunisierung als auch in der Gentherapie vor allem durch die Notwendigkeit der Verabreichung sehr hoher DNA-Mengen sowie zeitlich begrenzter Transgen-Expression limitiert. Im Hinblick auf das rationale Design von pDNA-Vektoren ist bislang zudem wenig hinsichtlich deren Aktivierung des angeborenen Immunsystems über CpG-Motive im Vektorrückgrat bekannt – im Falle eines Immunisierungsvektors wäre diese Aktivierung von Vorteil, während ein in der Gentherapie eingesetztes Plasmid immunologisch neutral sein sollte.

Im ersten Teil der Arbeit wurde daher der Einfluss des Gehaltes und des Kontextes von CpG-Sequenzen im Vektorrückgrat auf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems untersucht. Die Reduktion des CpG-Gehaltes des immunologisch neutralen Ausgangsvektors pRS auf 50,6% (p $\Delta$ S) führte nach Stimulierung naiver Maus-Splenozyten zu einer starken Sekretion proinflammatorischer Cytokine mit einem klaren Th1-Profil. Das erhöhte mitogene Potential des p $\Delta$ S-Vektors liess sich auch nach Stimulierung humaner plasmazytoider Dendritischer Zellen durch die starke Freisetzung von IFN $\alpha$  nachweisen. Die zufällige Deletion eines 110 bp Fragments im *pUCori* des p $\Delta$ S-Vektors führte zu einem Verlust seiner mitogenen Eigenschaften. Anhand diverser Mutanten konnte gezeigt werden, dass immunstimulatorische Eigenschaften der 110 bp-Region von der Lokalisierung und dem Sequenzkontext der im Fragment enthaltenden CpGs abhängig sind. Durch vergleichende Studien konnte zudem anhand von *knockout* Mäusen gezeigt werden, dass die immunstimulatorischen Eigenschaften TLR9-abhängig sind. Die Generierung eines mitogenen pDNA-Vektors (p $\Delta$ S) liefert – im Rahmen der Entwicklung eines HIV-Impfstoffes der Arbeitsgruppe – die Grundlage für das Design eines HIV-Impfstoffes der zweiten Generation.

Der Einsatz von pDNA-basierten Vektoren in der Gentherapie setzt eine hohe Expression des eingebrachten Transgens voraus. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher am Beispiel von murinem Erythropoietin (mEPO) der Einfluss des Gehaltes an intragenischen CpG-Sequenzen sowie von Kodonvariationen auf die *in vitro* und *in vivo* Expression eines Transgens evaluiert. Die Eliminierung aller intragenen CpGs resultierte in einer verminderten

*in vitro* Expression, die Kodon-Optimierung sowie die Erhöhung des CpG-Gehaltes hingegen in einer Expressionssteigerung. Das unterschiedliche Expressionsmuster der mEPO-Genvarianten war bereits auf mRNA-Ebene ausgeprägt und ist kein Resultat unterschiedlicher Translationseffizienzen. *In vivo* konnte in Balb/c Mäusen im Falle Kodon-optimierter und CpG-modifizierter Gene über einen Zeitraum von über einem Jahr eine stark erhöhte mEPO-Expression gezeigt werden. Nach *in vivo* Elektroporation der modifizierten mEPO-Gene war zudem bereits bei niedrigen pDNA-Dosen eine dauerhafte und signifikante Erhöhung der von mEPO regulierten Hämatokrit- und Hämoglobin-Werte nachweisbar, ohne dass dabei Nebenwirkungen beobachtet werden konnten.

Die Daten zeigen, dass durch CpG-Sequenzmodifizierungen im pDNA-Vektorrückgrat gezielt Einfluss auf die Induktion des angeborenen Immunsystems genommen werden kann. Zudem haben, wie am Beispiel von mEPO gezeigt, die Erhöhung des intragenischen CpG-Gehaltes sowie Kodon-Optimierungen eine stark erhöhte Expression und somit auch Wirksamkeit eines therapeutisch eingesetzten Gens zur Folge.

# Anhang

## Nukleotidsequenzen der generierten murinen EPO-Gene

### mEPOwt

```

1      AAGCTTATGG GGGTGCCCGA ACGTCCCACC CTGCTGCTTT TACTCTCCTT GCTACTGATT
61     CCTCTGGGCC TCCCAGTCCT CTGTGCTCCC CCACGCCTCA TCTGCGACAG TCGAGTTCTG
121    GAGAGGTACA TCTTAGAGGC CAAGGAGGCA GAAAATGTCA CGATGGGTTG TGCAGAAGGT
181    CCCAGACTGA GTGAAAATAT TACAGTCCCA GATACCAAAG TCAACTTCTA TGCTTGAAAA
241    AGAATGGAGG TGGAAGAACA GGCCATAGAA GTTTGGCAAG GCCTGTCCCT GCTCTCAGAA
301    GCCATCCTGC AGGCCCAGGC CCTGCTAGCC AATTCTCTCC AGCCACCAGA GACCCCTCAG
361    CTTCATATAG ACAAAGCCAT CAGTGGTCTA CGTAGCCTCA CTTCACTGCT TCGGGTACTG
421    GGAGCTCAGA AGGAATTGAT GTCGCCTCCA GATACCACCC CACCTGCTCC ACTCCGAACA
481    CTCACAGTGG ATACTTTCTG CAAGCTCTTC CGGGTCTACG CCAACTTCCT CCGGGGGAAA
541    CTGAAGCTGT ACACGGGAGA GGTCTGCAGG AGAGGGGACA GGTGATGAGG ATCC

```

### mEPOΔCpG

```

1      AAGCTTATGG GGGTGCCTGA AAGACCCACC CTGCTGCTTT TACTCTCCTT GCTACTGATT
61     CCTCTGGGCC TCCCAGTCCT CTGTGCTCCC CCAAGACTCA TCTGTGACAG TAGAGTTCTG
121    GAGAGGTACA TCTTAGAGGC CAAGGAGGCA GAAAATGTCA CTATGGGTTG TGCAGAAGGT
181    CCCAGACTGA GTGAAAATAT TACAGTCCCA GATACCAAAG TCAACTTCTA TGCTTGAAAA
241    AGAATGGAGG TGGAAGAACA GGCCATAGAA GTTTGGCAAG GCCTGTCCCT GCTCTCAGAA
301    GCCATCCTGC AGGCCCAGGC CCTGCTAGCC AATTCTCTCC AGCCACCAGA GACCCCTCAG
361    CTTCATATAG ACAAAGCCAT CAGTGGTCTA AGAAGCCTCA CTTCACTGCT TAGAGTACTG
421    GGAGCTCAGA AGGAATTGAT GTCACCTCCA GATACCACCC CACCTGCTCC ACTCAGAACA
481    CTCACAGTGG ATACTTTCTG CAAGCTCTTC AGAGTCTATG CCAACTTCCT CAGAGGGAAA
541    CTGAAGCTGT ACACTGGAGA GGTCTGCAGG AGAGGGGACA GGTGATGAGG ATCC

```

### mEPOopt

```

1      AAGCTTATGG GCGTGCCCGA GAGACCTACC CTGCTGCTGC TGCTGTCCCT GCTGCTGATC
61     CCTCTGGGCC TGCCTGTGCT GTGTGCCCCCT CCCAGACTGA TCTGTGACAG CAGGGTGTCTG
121    GAGAGATACA TCCTGGAGGC CAAGGAGGCC GAGAACGTGA CCATGGGCTG TGCCGAGGGC
181    CCTAGACTGA GCGAGAACAT CACCGTGCCC GACACCAAGG TGAACCTCTA CGCCTGGAAG

```

## Anhang

---

241	AGGATGGAGG	TGGAGGAGCA	GGCCATCGAA	GTGTGGCAGG	GCCTGAGCCT	GCTGTCCGAG
301	GCCATCCTGC	AGGCACAGGC	ACTGCTGGCC	AACAGCAGCC	AGCCTCCTGA	GACCCTGCAG
361	CTGCACATCG	ACAAGGCCAT	CAGCGGCCTG	AGAAGCCTGA	CCAGCCTGCT	GAGAGTGCTG
421	GGCGCCCAGA	AAGAGCTGAT	GAGCCCTCCT	GACACCACCC	CTCCTGCCCC	TCTGAGAACC
481	CTGACAGTGG	ACACCTTCTG	TAAGCTGTTC	CGGGTGTACG	CCAACTTCCT	GAGGGGCAAG
541	CTGAAGCTGT	ACACCGGCGA	AGTGTGCCGG	AGAGGCGACA	GATGATGAGG	ATCC

### mEPOmax

1	AAGCTTATGG	GCGTGCCCGA	GCGGCCGACG	CTGCTGCTGC	TCCTGTCGCT	GCTGCTCATC
61	CCGCTCGGCC	TGCCCCTGCT	GTGTGCCCCG	CCTCGGCTGA	TCTGTGACAG	CCGGGTGCTC
121	GAGCGGTACA	TCCTCGAGGC	GAAGGAGGCC	GAGAACGTGA	CGATGGGCTG	TGCCGAGGGC
181	CCTCGCCTGA	GCGAGAACAT	CACCGTGCCC	GACACGAAGG	TGAACTTCTA	CGCCTGGAAG
241	CGGATGGAGG	TCGAGGAGCA	GGCGATCGAA	GTGTGGCAGG	GCCTGTCGCT	CCTGAGCGAG
301	GCGATCCTCC	AGGCCCAGGC	GCTGCTCGCC	AACTCGAGCC	AGCCGCCCCA	AACGCTCCAG
361	CTCCACATCG	ACAAGGCGAT	CAGCGGCCTC	CGGTCGCTGA	CGTCGCTGCT	CCGAGTGCTC
421	GGCGCCCAGA	AAGAGCTGAT	GTCTCCGCCC	GATACGACGC	CGCCAGCGCC	GCTTCGGACG
481	CTGACCGTCG	ACACGTTCTG	TAAGCTGTTC	CGGGTGTACG	CCAACTTCCT	CCGGGGCAAG
541	CTGAAGCTGT	ACACCGGCGA	AGTGTGCCGG	CGAGGCGACC	GGTATGAGG	ATCC

### 110 bp-Region im pUCori mit jeweils angrenzenden Sequenzen

5' GAGTTGGTAGCTCTGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCAGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCG  
CAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGAGATCTGTCTGACTCTCAGTGGAACC-3'

## Oligonukleotide

### Oligonukleotide für die Generierung CpG-reduzierte Vektoren bzw. Mutanten

Name	Sequenz 5' → 3'
Ori QS1	GTTGGTAGCTCTAGATCTGTCTGAC
Ori QS2	GTCAGACAGATCTAGAGCTACCAAC
ref_ori_pf	TCAGATGCATCCGTACGTTAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCA
ref_BGH_pb	AGTCATGCATCCATAGAGCCCACCGCATCCCCA
Bgl II Pf	GATCAGATCTCGGCAAACAAACCACC
Bgl II Pb	ACTGAGATCTCCCGTAGAAAAG
110_MCS_Pf	GATCAAGCTTCGGCAAACAAACCACCGCTG
110_MCS_Pb	TAGTGGATCCAGATCTCCCGTAGAAAAGATC
X/EpUCori_p.f.	GTCACCCGGGTAGTGAATTCATGTGAGCAAAA
pUCori/BC_p.b.	AGCTATCGATTGACAGATCTCCCGTAGAAAAGATC

### Sequenzierungsoligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'
CMV for	CAAAGGTACCGTTAATCGATGTTGACATTGATTATTGACTAG
CMV rev	GAATGAGCTCTGCTTATATAGACC
MCS pf	GAACGAGCTCTCTGGCTAACT
MCS pb	TTGGGGTACCTACAGTTTAACTGGA
X/EpUCori_pf	GTCACCCGGGTAGTGAATTCATGTGAGCAAAA
pUCoriB/C_pb	AGCTATCGATTGACAGATCTCCCGTAGAAAAGATC
774A-pf	CTTAGAGCTCGTCCATCGATTA
774C-pb	GTTTGGTACCTTACTAGATCTGTCTG



## Literaturverzeichnis

1. Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J* 2005; **7**: E61-E77.
2. Crooke ST. An overview of progress in antisense therapeutics. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1998; **8**: 115-122.
3. Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. Anionic liposomal delivery system for DNA transfection. *AAPS J* 2004; **6**: e29.
4. Nishikawa M, Hashida M. Nonviral approaches satisfying various requirements for effective in vivo gene therapy. *Biol Pharm Bull* 2002; **25**: 275-283.
5. Liu MA, Wahren B, Karlsson Hedestam GB. DNA vaccines: recent developments and future possibilities. *Hum Gene Ther* 2006; **17**: 1051-1061.
6. Akhtar S, Hughes MD, Khan A, Bibby M, Hussain M, Nawaz Q, Double J, Sayyed P. The delivery of antisense therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; **44**: 3-21.
7. Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1489**: 31-44.
8. Crooke ST. Vitravene--another piece in the mosaic. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1998; **8**: vii-viii.
9. Hartmann G, Krug A, Waller-Fontaine K, Endres S. Oligodeoxynucleotides enhance lipopolysaccharide-stimulated synthesis of tumor necrosis factor: dependence on phosphorothioate modification and reversal by heparin. *Mol Med* 1996; **2**: 429-438.
10. Wagstaff KM, Jans DA. Nucleocytoplasmic transport of DNA: enhancing non-viral gene transfer. *Biochem J* 2007; **406**: 185-202.
11. Prazeres DM, Monteiro GA, Ferreira GN, Diogo MM, Ribeiro SC, Cabral JM. Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnol Annu Rev* 2001; **7**: 1-30.
12. Herrera AM, Rodriguez EG, Hernandez T, Sandez B, Duarte CA. A family of compact plasmid vectors for DNA immunization in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **279**: 548-551.
13. Johnston SA, Talaat AM, McGuire MJ. Genetic immunization: what's in a name? *Arch Med Res* 2002; **33**: 325-329.
14. Uhrek C, Wels W. DNA-carrier proteins for targeted gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; **44**: 153-166.
15. Rodriguez EG. Nonviral DNA vectors for immunization and therapy: design and methods for their obtention. *J Mol Med* 2004; **82**: 500-509.
16. Gurnathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization\*. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 927-974.
17. Yew NS, Zhao H, Przybylska M, Wu IH, Tousignant JD, Scheule RK, Cheng SH. CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo. *Mol Ther* 2002; **5**: 731-738.
18. Yew NS. Controlling the kinetics of transgene expression by plasmid design. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; **57**: 769-780.

19. Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1992; **1**: 363-369.
20. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 617-648.
21. Fuller DH, Haynes JR. A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120-specific cytotoxic cellular and humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; **10**: 1433-1441.
22. Lu S, Santoro JC, Fuller DH, Haynes JR, Robinson HL. Use of DNAs expressing HIV-1 Env and noninfectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice. *Virology* 1995; **209**: 147-154.
23. Wang B, Boyer JD, Ugen KE, Srikantan V, Ayyaroo V, Agadjanyan MG, Williams WV, Newman M, Coney L, Carrano R, . Nucleic acid-based immunization against HIV-I: induction of protective in vivo immune responses. *AIDS* 1995; **9 Suppl A**: S159-S170.
24. Xu W, Chu Y, Zhang R, Xu H, Wang Y, Xiong S. Endoplasmic reticulum targeting sequence enhances HBV-specific cytotoxic T lymphocytes induced by a CTL epitope-based DNA vaccine. *Virology* 2005; **334**: 255-263.
25. Pelizon AC, Martins DR, Zorzella SF, Trombone AP, Lorenzi JC, Carvalho RF, Brandao IT, Coelho-Castelo AA, Silva CL, Sartori A. Genetic vaccine for tuberculosis (pVAXhsp65) primes neonate mice for a strong immune response at the adult stage. *Genet Vaccines Ther* 2007; **5**: 12.
26. Fry SR, Chen AY, Daggard G, Mukkur TK. Parenteral immunization of mice with a genetically inactivated pertussis toxin DNA vaccine induces cell-mediated immunity and protection. *J Med Microbiol* 2008; **57**: 28-35.
27. Powell K. DNA vaccines--back in the saddle again? *Nat Biotechnol* 2004; **22**: 799-801.
28. Lorenzen N, LaPatra SE. DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev Sci Tech* 2005; **24**: 201-213.
29. Gao G, Lebherz C, Weiner DJ, Grant R, Calcedo R, McCullough B, Bagg A, Zhang Y, Wilson JM. Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood* 2004; **103**: 3300-3302.
30. Vaughan EE, DeGiulio JV, Dean DA. Intracellular trafficking of plasmids for gene therapy: mechanisms of cytoplasmic movement and nuclear import. *Curr Gene Ther* 2006; **6**: 671-681.
31. Fattori E, Cappelletti M, Zampaglione I, Mennuni C, Calvaruso F, Arcuri M, Rizzuto G, Costa P, Perretta G, Ciliberto G, La Monica N. Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-human primates. *J Gene Med* 2005; **7**: 228-236.
32. Maruyama H, Ataka K, Gejyo F, Higuchi N, Ito Y, Hirahara H, Imazeki I, Hirata M, Ichikawa F, Neichi T, Kikuchi H, Sugawa M, Miyazaki J. Long-term production of erythropoietin after electroporation-mediated transfer of plasmid DNA into the muscles of normal and uremic rats. *Gene Ther* 2001; **8**: 461-468.
33. Muramatsu T, Arakawa S, Fukazawa K, Fujiwara Y, Yoshida T, Sasaki R, Masuda S, Park HM. In vivo gene electroporation in skeletal muscle with special reference to the duration of gene expression. *Int J Mol Med* 2001; **7**: 37-42.
34. Terada Y, Tanaka H, Okado T, Shimamura H, Inoshita S, Kuwahara M, Akiba T, Sasaki S. Ligand-regulatable erythropoietin production by plasmid injection and in vivo electroporation. *Kidney Int* 2002; **62**: 1966-1976.
35. Gonzalez R, Hutchins L, Nemunaitis J, Atkins M, Schwarzenberger PO. Phase 2 trial of Allovectin-7 in advanced metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2006; **16**: 521-526.
36. Comerota AJ, Throm RC, Miller KA, Henry T, Chronos N, Laird J, Sequeira R, Kent CK, Bacchetta M, Goldman C, Salenius JP, Schmieder FA, Pilsudski R. Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J Vasc Surg* 2002; **35**: 930-936.
37. Sebestyen MG, Hegge JO, Noble MA, Lewis DL, Herweijer H, Wolff JA. Progress toward a nonviral gene therapy protocol for the treatment of anemia. *Hum Gene Ther* 2007; **18**: 269-285.

38. Liu F, Shollenberger LM, Huang L. Non-immunostimulatory nonviral vectors. *FASEB J* 2004; **18**: 1779-1781.
39. Putnam D, Gentry CA, Pack DW, Langer R. Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 1200-1205.
40. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 7297-7301.
41. Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, Joshi PB, Monck M, Graham RW, Beatty B, Squire J, O'Brodovich H, Lukacs GL. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* 1999; **6**: 482-497.
42. Tam P, Monck M, Lee D, Ludkovski O, Leng EC, Clow K, Stark H, Scherrer P, Graham RW, Cullis PR. Stabilized plasmid-lipid particles for systemic gene therapy. *Gene Ther* 2000; **7**: 1867-1874.
43. Brown MD, Schatzlein AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm* 2001; **229**: 1-21.
44. Luo D, Saltzman WM. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 2000; **18**: 33-37.
45. Kamiya H, Tsuchiya H, Yamazaki J, Harashima H. Intracellular trafficking and transgene expression of viral and non-viral gene vectors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; **52**: 153-164.
46. Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD, Jr. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med* 1996; **2**: 1122-1128.
47. Hojman P, Gissel H, Gehl J. Sensitive and precise regulation of haemoglobin after gene transfer of erythropoietin to muscle tissue using electroporation. *Gene Ther* 2007; **14**: 950-959.
48. Heller R. Overview of electroporation. *Technol Cancer Res Treat* 2002; **1**: 317-318.
49. Bigey P, Bureau MF, Scherman D. In vivo plasmid DNA electrotransfer. *Curr Opin Biotechnol* 2002; **13**: 443-447.
50. Rizzuto G, Cappelletti M, Maione D, Savino R, Lazzaro D, Costa P, Mathiesen I, Cortese R, Ciliberto G, Laufer R, La Monica N, Fattori E. Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 6417-6422.
51. Loser P, Jennings GS, Strauss M, Sandig V. Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB. *J Virol* 1998; **72**: 180-190.
52. Herweijer H, Wolff JA. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* 2003; **10**: 453-458.
53. Barouch DH. Rational design of gene-based vaccines. *J Pathol* 2006; **208**: 283-289.
54. Coban C, Ishii KJ, Gursel M, Klinman DM, Kumar N. Effect of plasmid backbone modification by different human CpG motifs on the immunogenicity of DNA vaccine vectors. *J Leukoc Biol* 2005; **78**: 647-655.
55. Ma X, Forns X, Gutierrez R, Mushahwar IK, Wu T, Payette PJ, Bukh J, Purcell RH, Davis HL. DNA-based vaccination against hepatitis C virus (HCV): effect of expressing different forms of HCV E2 protein and use of CpG-optimized vectors in mice. *Vaccine* 2002; **20**: 3263-3271.
56. Stan AC, Casares S, Brumeanu TD, Klinman DM, Bona CA. CpG motifs of DNA vaccines induce the expression of chemokines and MHC class II molecules on myocytes. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 301-310.
57. Stevenson FK. DNA vaccines and adjuvants. *Immunol Rev* 2004; **199**: 5-8.
58. Reyes-Sandoval A, Ertl HC. DNA vaccines. *Curr Mol Med* 2001; **1**: 217-243.
59. Barouch DH, Letvin NL, Seder RA. The role of cytokine DNAs as vaccine adjuvants for optimizing cellular immune responses. *Immunol Rev* 2004; **202**: 266-274.

60. Deng G, Chen A, Pong E, Kim YS. Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene* 2001; **20**: 7120-7127.
61. Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61**: 2571-2587.
62. Youngblood B, Buller F, Reich NO. Determinants of sequence-specific DNA methylation: target recognition and catalysis are coupled in M.HhaI. *Biochemistry* 2006; **45**: 15563-15572.
63. Wade PA. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* 2001; **23**: 1131-1137.
64. Hsieh CL. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 5487-5494.
65. Kudo S. Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 5492-5499.
66. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; **19**: 187-191.
67. Deng G, Chen A, Pong E, Kim YS. Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene* 2001; **20**: 7120-7127.
68. Hisano M, Ohta H, Nishimune Y, Nozaki M. Methylation of CpG dinucleotides in the open reading frame of a testicular germ cell-specific intronless gene, Tact1/Act17b, represses its expression in somatic cells. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 4797-4804.
69. Li QL, Kim HR, Kim WJ, Choi JK, Lee YH, Kim HM, Li LS, Kim H, Chang J, Ito Y, Youl LK, Bae SC. Transcriptional silencing of the RUNX3 gene by CpG hypermethylation is associated with lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **314**: 223-228.
70. Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 2004; **202**: 233-240.
71. Li QL, Kim HR, Kim WJ, Choi JK, Lee YH, Kim HM, Li LS, Kim H, Chang J, Ito Y, Youl LK, Bae SC. Transcriptional silencing of the RUNX3 gene by CpG hypermethylation is associated with lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **314**: 223-228.
72. Ivanova T, Vinokurova S, Petrenko A, Eshilev E, Solovyova N, Kisseljov F, Kisseljova N. Frequent hypermethylation of 5' flanking region of TIMP-2 gene in cervical cancer. *Int J Cancer* 2004; **108**: 882-886.
73. Akiyama Y, Maesawa C, Ogasawara S, Terashima M, Masuda T. Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells. *Am J Pathol* 2003; **163**: 1911-1919.
74. Yoshida M, Nosaka K, Yasunaga JI, Nishikata I, Morishita K, Matsuoka M. Aberrant expression of the MEL1S gene identified in association with hypomethylation in adult T-cell leukemia cells. *Blood* 2003.
75. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; **19**: 187-191.
76. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; **393**: 386-389.
77. Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; **23**: 62-66.
78. Deng G, Chen A, Pong E, Kim YS. Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene* 2001; **20**: 7120-7127.

79. Gonzalgo ML, Hayashida T, Bender CM, Pao MM, Tsai YC, Gonzales FA, Nguyen HD, Nguyen TT, Jones PA. The role of DNA methylation in expression of the p19/p16 locus in human bladder cancer cell lines. *Cancer Res* 1998; **58**: 1245-1252.
80. Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet* 1999; **15**: 34-37.
81. Lorincz MC, Dickerson DR, Schmitt M, Groudine M. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 2004; **11**: 1068-1075.
82. Shen JC, Rideout WM, III, Jones PA. The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 972-976.
83. Sved J, Bird A. The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrate genomes under a mutation model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**: 4692-4696.
84. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 3740-3745.
85. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 11995-11999.
86. Wise TL, Pravtcheva DD. The undermethylated state of a CpG island region in igf2 transgenes is dependent on the H19 enhancers. *Genomics* 1999; **60**: 258-271.
87. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 11995-11999.
88. Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 1992; **13**: 1095-1107.
89. Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* 1992; **36**: 983-997.
90. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, . Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; **72**: 955-962.
91. Krieg AM, Gause WC, Gourley MF, Steinberg AD. A role for endogenous retroviral sequences in the regulation of lymphocyte activation. *J Immunol* 1989; **143**: 2448-2451.
92. Krieg AM. An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J Lab Clin Med* 1996; **128**: 128-133.
93. Krieg AM, Yi AK, Schorr J, Davis HL. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol* 1998; **6**: 23-27.
94. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; **20**: 709-760.
95. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004; **5**: 1219-1226.
96. Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000; **164**: 944-953.
97. Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, Wader T, Tluk S, Liu M, Davis HL, Krieg AM. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 251-262.
98. Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 12631-12636.

99. Lenert P, Stunz L, Yi AK, Krieg AM, Ashman RF. CpG stimulation of primary mouse B cells is blocked by inhibitory oligodeoxyribonucleotides at a site proximal to NF-kappaB activation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2001; **11**: 247-256.
100. Zhang Z, Guo K, Schluesener HJ. The immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides on microglial N9 cells is affected by a polyguanosine motif. *J Neuroimmunol* 2005; **161**: 68-77.
101. Klinman DM, Currie D, Gursel I, Verthelyi D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* 2004; **199**: 201-216.
102. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**: 471-484.
103. Redford TW, Yi AK, Ward CT, Krieg AM. Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1998; **161**: 3930-3935.
104. Yi AK, Klinman DM, Martin TL, Matson S, Krieg AM. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J Immunol* 1996; **157**: 5394-5402.
105. Yi AK, Krieg AM. CpG DNA rescue from anti-IgM-induced WEHI-231 B lymphoma apoptosis via modulation of I kappa B alpha and I kappa B beta and sustained activation of nuclear factor-kappa B/c-Rel. *J Immunol* 1998; **160**: 1240-1245.
106. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 3026-3037.
107. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; **194**: 863-869.
108. Kadowaki N, Antonenko S, Liu YJ. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *J Immunol* 2001; **166**: 2291-2295.
109. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 9305-9310.
110. Lipford GB, Sparwasser T, Bauer M, Zimmermann S, Koch ES, Heeg K, Wagner H. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 3420-3426.
111. Stacey KJ, Sester DP, Sweet MJ, Hume DA. Macrophage activation by immunostimulatory DNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; **247**: 41-58.
112. Behboudi S, Chao D, Klenerman P, Austyn J. The effects of DNA containing CpG motif on dendritic cells. *Immunology* 2000; **99**: 361-366.
113. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 2045-2054.
114. Manzel L, Macfarlane DE. Lack of immune stimulation by immobilized CpG-oligodeoxynucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1999; **9**: 459-464.
115. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; **388**: 394-397.
116. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; **408**: 740-745.
117. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 9237-9242.

118. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003; **85**: 85-95.
119. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; **5**: 190-198.
120. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 2006; **7**: 49-56.
121. Rutz M, Metzger J, Gellert T, Luppa P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 2541-2550.
122. Cornelie S, Hoebeke J, Schacht AM, Bertin B, Vicogne J, Capron M, Riveau G. Direct evidence that toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by specific cytosine-phosphate-guanine motif recognition. *J Biol Chem* 2004; **279**: 15124-15129.
123. Deng JC, Moore TA, Newstead MW, Zeng X, Krieg AM, Standiford TJ. CpG oligodeoxynucleotides stimulate protective innate immunity against pulmonary Klebsiella infection. *J Immunol* 2004; **173**: 5148-5155.
124. Juffermans NP, Leemans JC, Florquin S, Verbon A, Kolk AH, Speelman P, van Deventer SJ, van der PT. CpG oligodeoxynucleotides enhance host defense during murine tuberculosis. *Infect Immun* 2002; **70**: 147-152.
125. Ray NB, Krieg AM. Oral pretreatment of mice with CpG DNA reduces susceptibility to oral or intraperitoneal challenge with virulent *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 2003; **71**: 4398-4404.
126. Rees DG, Gates AJ, Green M, Eastaugh L, Lukaszewski RA, Griffin KF, Krieg AM, Titball RW. CpG-DNA protects against a lethal orthopoxvirus infection in a murine model. *Antiviral Res* 2005; **65**: 87-95.
127. Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, Lipford GB, Rocken M, Wagner H, Heeg K. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 1998; **160**: 3627-3630.
128. Verthelyi D, Gursel M, Kenney RT, Lifson JD, Liu S, Mican J, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides protect normal and SIV-infected macaques from *Leishmania* infection. *J Immunol* 2003; **170**: 4717-4723.
129. McHutchison JG, Patel K, Pockros P, Nyberg L, Pianko S, Yu RZ, Dorr FA, Kwoh TJ. A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2006; **44**: 88-96.
130. Dong JL, Liang BG, Jin YS, Zhang WJ, Wang T. Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* 2005; **339**: 153-163.
131. Kwant A, Rosenthal KL. Intravaginal immunization with viral subunit protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protective immunity against HSV-2. *Vaccine* 2004; **22**: 3098-3104.
132. McCluskie MJ, Davis HL. Oral, intrarectal and intranasal immunizations using CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Vaccine* 2000; **19**: 413-422.
133. Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 1998; **160**: 870-876.
134. Davis HL, Suparto II, Weeratna RR, Jumintarto, Iskandriati DD, Chamzah SS, Ma'ruf AA, Nente CC, Pawitri DD, Krieg AM, Heriyanto, Smits W, Sajuthi DD. CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* 2000; **18**: 1920-1924.
135. Cooper CL, Davis HL, Morris ML, Efler SM, Adhami MA, Krieg AM, Cameron DW, Heathcote J. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol* 2004; **24**: 693-701.

136. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B, Giese T, Gires O, Endres S, Hartmann G. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 2003; **63**: 6478-6487.
137. Liu HM, Newbrough SE, Bhatia SK, Dahle CE, Krieg AM, Weiner GJ. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides enhance the immune response to vaccine strategies involving granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; **92**: 3730-3736.
138. Kojima Y, Xin KQ, Ooki T, Hamajima K, Oikawa T, Shinoda K, Ozaki T, Hoshino Y, Jounai N, Nakazawa M, Klinman D, Okuda K. Adjuvant effect of multi-CpG motifs on an HIV-1 DNA vaccine. *Vaccine* 2002; **20**: 2857-2865.
139. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 588-593.
140. Chuang TH, Ulevitch RJ. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 2000; **11**: 372-378.
141. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 499-511.
142. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001; **13**: 933-940.
143. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; **282**: 2085-2088.
144. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; **3**: 196-200.
145. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; **137**: 1142-1162.
146. Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002; **82**: 97-130.
147. Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 2211-2215.
148. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000; **173**: 89-97.
149. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, Di Pucchio T, Connolly J, Fay JW, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007; **219**: 118-142.
150. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 3388-3393.
151. Zhang Z, Wang FS. Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Immunol* 2005; **2**: 411-417.
152. Jegou G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003; **19**: 225-234.
153. Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* 2004; **103**: 3058-3064.



154. Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, Belardelli F. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 2000; **191**: 1777-1788.
155. Takaoka A, Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 2006; **8**: 907-922.
156. Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 15623-15628.
157. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004; **202**: 8-32.
158. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 2005; **175**: 5260-5268.
159. Kato H, Takeuchi O, Akira S. [Cell type specific involvement of RIG-I in antiviral responses]. *Nippon Rinsho* 2006; **64**: 1244-1247.
160. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, Stark GR. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 2007; **6**: 975-990.
161. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**: 778-809, table.
162. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 307-336.
163. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**: 189-220.
164. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 275-306.
165. Takaoka A, Taniguchi T. New aspects of IFN-alpha/beta signalling in immunity, oncogenesis and bone metabolism. *Cancer Sci* 2003; **94**: 405-411.
166. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* 1999; **163**: 4647-4650.
167. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 2001; **22**: 556-560.
168. Harris DP, Goodrich S, Gerth AJ, Peng SL, Lund FE. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. *J Immunol* 2005; **174**: 6781-6790.
169. Gessani S, Belardelli F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; **9**: 117-123.
170. Pien GC, Satoskar AR, Takeda K, Akira S, Biron CA. Cutting edge: selective IL-18 requirements for induction of compartmental IFN-gamma responses during viral infection. *J Immunol* 2000; **165**: 4787-4791.
171. Salazar-Mather TP, Hamilton TA, Biron CA. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J Clin Invest* 2000; **105**: 985-993.
172. Fukao T, Matsuda S, Koyasu S. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J Immunol* 2000; **164**: 64-71.
173. Fukao T, Frucht DM, Yap G, Gadina M, O'Shea JJ, Koyasu S. Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J Immunol* 2001; **166**: 4446-4455.
174. Schindler H, Lutz MB, Rollinghoff M, Bogdan C. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol* 2001; **166**: 3075-3082.

175. Mazzoni A, Young HA, Spitzer JH, Visintin A, Segal DM. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1865-1873.
176. Kikuchi K, Yanagawa Y, Aranami T, Iwabuchi C, Iwabuchi K, Onoe K. Tumour necrosis factor-alpha but not lipopolysaccharide enhances preference of murine dendritic cells for Th2 differentiation. *Immunology* 2003; **108**: 42-49.
177. Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, Maliszewski C, Akira S, Pulendran B. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* 2004; **172**: 4733-4743.
178. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995; **154**: 5071-5079.
179. Yoshimoto T, Bendelac A, Hu-Li J, Paul WE. Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 11931-11934.
180. Hochrein H, O'Keeffe M, Luft T, Vandenabeele S, Grumont RJ, Maraskovsky E, Shortman K. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J Exp Med* 2000; **192**: 823-833.
181. Onoe K, Yanagawa Y, Minami K, Iijima N, Iwabuchi K. Th1 or Th2 balance regulated by interaction between dendritic cells and NKT cells. *Immunol Res* 2007; **38**: 319-332.
182. Wilson MT, Singh AK, Van Kaer L. Immunotherapy with ligands of natural killer T cells. *Trends Mol Med* 2002; **8**: 225-231.
183. Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 2001; **413**: 531-534.
184. Elliott S, Lorenzini T, Chang D, Barzilay J, Delorme E. Mapping of the active site of recombinant human erythropoietin. *Blood* 1997; **89**: 493-502.
185. Wen D, Boissel JP, Showers M, Ruch BC, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J Biol Chem* 1994; **269**: 22839-22846.
186. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004; **43**: 649-659.
187. Shanks JH, Hill CM, Lappin TR, Maxwell AP. Localization of erythropoietin gene expression in proximal renal tubular cells detected by digoxigenin-labelled oligonucleotide probes. *J Pathol* 1996; **179**: 283-287.
188. Noe G, Riedel W, Kubanek B, Rich IN. An ELISA specific for murine erythropoietin. *Br J Haematol* 1999; **104**: 838-840.
189. Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 1990; **248**: 378-381.
190. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; **60**: 386-392.
191. Misaizu T, Matsuki S, Strickland TW, Takeuchi M, Kobata A, Takasaki S. Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood* 1995; **86**: 4097-4104.
192. Wasley LC, Timony G, Murtha P, Stoudemire J, Dorner AJ, Caro J, Krieger M, Kaufman RJ. The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin. *Blood* 1991; **77**: 2624-2632.
193. Weikert S, Papac D, Briggs J, Cowfer D, Tom S, Gawlitzek M, Lofgren J, Mehta S, Chisholm V, Modi N, Eppler S, Carroll K, Chamow S, Peers D, Berman P, Krummen L. Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins. *Nat Biotechnol* 1999; **17**: 1116-1121.

194. Jelkmann W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEpo and NESP. *Eur J Haematol* 2002; **69**: 265-274.
195. Adamson JW, Eschbach JW. The use of recombinant human erythropoietin (rHuEpo) in humans. *Cancer Surv* 1990; **9**: 157-167.
196. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 4635-4640.
197. Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE, Provost N, Cherel Y, Casadevall N, Samulski RJ, Moullier P. Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* 2004; **103**: 3303-3304.
198. Glover DJ, Lipps HJ, Jans DA. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet* 2005; **6**: 299-310.
199. Walther W, Minow T, Martin R, Fichtner I, Schlag PM, Stein U. Uptake, biodistribution, and time course of naked plasmid DNA trafficking after intratumoral in vivo jet injection. *Hum Gene Ther* 2006; **17**: 611-624.
200. Mennuni C, Calvaruso F, Zampaglione I, Rizzuto G, Rinaudo D, Dammassa E, Ciliberto G, Fattori E, La Monica N. Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 355-365.
201. Rivera VM, Gao GP, Grant RL, Schnell MA, Zoltick PW, Rozamus LW, Clackson T, Wilson JM. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 2005; **105**: 1424-1430.
202. Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE, Provost N, Joussemet B, Bujard H, Samulski RJ, Favre D, Moullier P. Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther* 2004; **9**: 410-418.
203. Kreiss P, Bettan M, Crouzet J, Scherman D. Erythropoietin secretion and physiological effect in mouse after intramuscular plasmid DNA electrotransfer. *J Gene Med* 1999; **1**: 245-250.
204. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983; **166**: 557-580.
205. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; **7**: 1513-1523.
206. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**: 5463-5467.
207. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.
208. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 4350-4354.
209. Sambrook J, Gething MJ. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 1989; **342**: 224-225.
210. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: e36.
211. Patrone G, Puppo F, Cusano R, Scaranari M, Ceccherini I, Puliti A, Ravazzolo R. Nuclear run-on assay using biotin labeling, magnetic bead capture and analysis by fluorescence-based RT-PCR. *Biotechniques* 2000; **29**: 1012-1017.
212. Heller LC, Heller R. In vivo electroporation for gene therapy. *Hum Gene Ther* 2006; **17**: 890-897.
213. BOYUM A. SEPARATION OF WHITE BLOOD CELLS. *Nature* 1964; **204**: 793-794.
214. Deng G, Chen A, Pong E, Kim YS. Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene* 2001; **20**: 7120-7127.

215. Yoshida M, Nosaka K, Yasunaga J, Nishikata I, Morishita K, Matsuoka M. Aberrant expression of the MEL1S gene identified in association with hypomethylation in adult T-cell leukemia cells. *Blood* 2004; **103**: 2753-2760.
216. Voo KS, Carlone DL, Jacobsen BM, Flodin A, Skalnik DG. Cloning of a mammalian transcriptional activator that binds unmethylated CpG motifs and shares a CXXC domain with DNA methyltransferase, human trithorax, and methyl-CpG binding domain protein 1. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 2108-2121.
217. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; **393**: 386-389.
218. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 2004; **40**: 845-859.
219. Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 2005; **438**: 364-368.
220. Hisano M, Ohta H, Nishimune Y, Nozaki M. Methylation of CpG dinucleotides in the open reading frame of a testicular germ cell-specific intronless gene, Tact1/Actl7b, represses its expression in somatic cells. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 4797-4804.
221. Voo KS, Carlone DL, Jacobsen BM, Flodin A, Skalnik DG. Cloning of a mammalian transcriptional activator that binds unmethylated CpG motifs and shares a CXXC domain with DNA methyltransferase, human trithorax, and methyl-CpG binding domain protein 1. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 2108-2121.
222. Sharp PM, Li WH. The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* 1987; **15**: 1281-1295.
223. Wyatt LS, Moss B, Rozenblatt S. Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology* 1995; **210**: 202-205.
224. Dalle B, Rubin JE, Alkan O, Sukonnik T, Pasceri P, Yao S, Pawliuk R, Leboulch P, Ellis J. eGFP reporter genes silence LCRbeta-globin transgene expression via CpG dinucleotides. *Mol Ther* 2005; **11**: 591-599.
225. Chevalier-Mariette C, Henry I, Montfort L, Capgras S, Forlani S, Muschler J, Nicolas JF. CpG content affects gene silencing in mice: evidence from novel transgenes. *Genome Biol* 2003; **4**: R53.
226. Brooks AR, Harkins RN, Wang P, Qian HS, Liu P, Rubanyi GM. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 2004; **6**: 395-404.
227. Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 2005; **125**: 629-637.
228. Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2004; **5**: 971-974.
229. Zelenay S, Elias F, Flo J. Immunostimulatory effects of plasmid DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol* 2003; **33**: 1382-1392.
230. Krieg AM. The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**: 35-43.
231. Kindrachuk J, Potter JE, Brownlie R, Ficzyz AD, Griebel PJ, Mookherjee N, Mutwiri GK, Babiuk LA, Napper S. Nucleic acids exert a sequence-independent cooperative effect on sequence-dependent activation of Toll-like receptor 9. *J Biol Chem* 2007; **282**: 13944-13953.
232. Chen Y, Lenert P, Weeratna R, McCluskie M, Wu T, Davis HL, Krieg AM. Identification of methylated CpG motifs as inhibitors of the immune stimulatory CpG motifs. *Gene Ther* 2001; **8**: 1024-1032.
233. Gursel I, Gursel M, Yamada H, Ishii KJ, Takeshita F, Klinman DM. Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *J Immunol* 2003; **171**: 1393-1400.
234. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 2007; **448**: 501-505.

235. Shoda LK, Kegerreis KA, Suarez CE, Mwangi W, Knowles DP, Brown WC. Immunostimulatory CpG-modified plasmid DNA enhances IL-12, TNF-alpha, and NO production by bovine macrophages. *J Leukoc Biol* 2001; **70**: 103-112.
236. Sen G, Flora M, Chattopadhyay G, Klinman DM, Lees A, Mond JJ, Snapper CM. The critical DNA flanking sequences of a CpG oligodeoxynucleotide, but not the 6 base CpG motif, can be replaced with RNA without quantitative or qualitative changes in Toll-like receptor 9-mediated activity. *Cell Immunol* 2004; **232**: 64-74.
237. Bauer S, Wagner H. Bacterial CpG-DNA licenses TLR9. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; **270**: 145-154.
238. Ivanov S, Dragoi AM, Wang X, Dallacosta C, Louten J, Musco G, Sitia G, Yap GS, Wan Y, Biron CA, Bianchi ME, Wang H, Chu WM. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood* 2007; **110**: 1970-1981.
239. Bandholtz L, Guo Y, Palmberg C, Mattsson K, Ohlsson B, High A, Shabanowitz J, Hunt DF, Jornvall H, Wigzell H, Agerberth B, Gudmundsson GH. Hsp90 binds CpG oligonucleotides directly: implications for hsp90 as a missing link in CpG signaling and recognition. *Cell Mol Life Sci* 2003; **60**: 422-429.
240. Roberts TL, Dunn JA, Terry TD, Jennings MP, Hume DA, Sweet MJ, Stacey KJ. Differences in macrophage activation by bacterial DNA and CpG-containing oligonucleotides. *J Immunol* 2005; **175**: 3569-3576.
241. van Heel DA, Ghosh S, Hunt KA, Mathew CG, Forbes A, Jewell DP, Playford RJ. Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease. *Gut* 2005; **54**: 1553-1557.
242. Yasuda K, Yu P, Kirschning CJ, Schlatter B, Schmitz F, Heit A, Bauer S, Hochrein H, Wagner H. Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 2005; **174**: 6129-6136.
243. Senn JJ, Burel S, Henry SP. Non-CpG-containing antisense 2'-methoxyethyl oligonucleotides activate a proinflammatory response independent of Toll-like receptor 9 or myeloid differentiation factor 88. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **314**: 972-979.
244. Budker V, Budker T, Zhang G, Subbotin V, Loomis A, Wolff JA. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J Gene Med* 2000; **2**: 76-88.
245. Zhou R, Norton JE, Zhang N, Dean DA. Electroporation-mediated transfer of plasmids to the lung results in reduced TLR9 signaling and inflammation. *Gene Ther* 2007; **14**: 775-780.
246. Jegerlehner A, Maurer P, Bessa J, Hinton HJ, Kopf M, Bachmann MF. TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a. *J Immunol* 2007; **178**: 2415-2420.
247. Taniguchi T, Takaoka A. A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 378-386.
248. Taniguchi T, Takaoka A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol* 2002; **14**: 111-116.
249. Cooper CL, Davis HL, Angel JB, Morris ML, Elfer SM, Seguin I, Krieg AM, Cameron DW. CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults. *AIDS* 2005; **19**: 1473-1479.
250. Perry AK, Chen G, Zheng D, Tang H, Cheng G. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res* 2005; **15**: 407-422.
251. Voo KS, Carlone DL, Jacobsen BM, Flodin A, Skalnik DG. Cloning of a mammalian transcriptional activator that binds unmethylated CpG motifs and shares a CXXC domain with DNA methyltransferase, human trithorax, and methyl-CpG binding domain protein 1. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 2108-2121.
252. Barrett JW, Sun Y, Nazarian SH, Belsito TA, Brunetti CR, McFadden G. Optimization of codon usage of poxvirus genes allows for improved transient expression in mammalian cells. *Virus Genes* 2006; **33**: 15-26.

253. Jana S, Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; **67**: 289-298.
254. Satya RV, Mukherjee A, Ranga U. A pattern matching algorithm for codon optimization and CpG motif-engineering in DNA expression vectors. *Proc IEEE Comput Soc Bioinform Conf* 2003; **2**: 294-305.
255. Stratford R, Douce G, Zhang-Barber L, Fairweather N, Eskola J, Dougan G. Influence of codon usage on the immunogenicity of a DNA vaccine against tetanus. *Vaccine* 2000; **19**: 810-815.
256. Uchijima M, Yoshida A, Nagata T, Koide Y. Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *J Immunol* 1998; **161**: 5594-5599.
257. Kim CH, Oh Y, Lee TH. Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells. *Gene* 1997; **199**: 293-301.
258. Ren L, Gao G, Zhao D, Ding M, Luo J, Deng H. Developmental stage related patterns of codon usage and genomic GC content: searching for evolutionary fingerprints with models of stem cell differentiation. *Genome Biol* 2007; **8**: R35.
259. Graf M, Deml L, Wagner R. Codon-optimized genes that enable increased heterologous expression in mammalian cells and elicit efficient immune responses in mice after vaccination of naked DNA. *Methods Mol Med* 2004; **94**: 197-210.
260. Hodges BL, Taylor KM, Joseph MF, Bourgeois SA, Scheule RK. Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides. *Mol Ther* 2004; **10**: 269-278.
261. Cohen J. AIDS research. Promising AIDS vaccine's failure leaves field reeling. *Science* 2007; **318**: 28-29.
262. Durieux AC, Bonnefoy R, Busso T, Freyssenet D. In vivo gene electrotransfer into skeletal muscle: effects of plasmid DNA on the occurrence and extent of muscle damage. *J Gene Med* 2004; **6**: 809-816.
263. Hartikka J, Sukhu L, Buchner C, Hazard D, Bozoukova V, Margalith M, Nishioka WK, Wheeler CJ, Manthorp M, Sawdey M. Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol Ther* 2001; **4**: 407-415.

## Abkürzungsverzeichnis

μ mikro (10<sup>-6</sup>)  
 -/- *knockout*

### A

AAV Adeno-Virus Vektor  
 Abb Abbildung  
 AIDS erworbenes Immundefizienz-Syndrom (*aquired immunodeficiency syndrome*)  
 Amp Ampicillin  
 AP Alkalische Phosphatase  
 AP-1 *activating protein-1*  
 APC Antigen-präsentierende Zelle

### B

BGH *bovine growth hormone*  
 bla Betalaktamasen  
 bp Basenpaar  
 BSA Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*)  
 bzw. beziehungsweise

### C

°C Grad Celsius  
 ca. circa  
 CAI *codon adaptation index*  
 CD *cluster of determination*  
 CHO *chinese hamster ovary*  
 CLR C-Typ Lektin-Rezeptoren  
 CMV Cytomegalie Virus  
 CP *crossing point*  
 CpG Cytosin-Phosphat-Guanin  
 CTL cytotoxische T-Lymphozyten (*cytotoxic T-lymphocytes*)

### D

Da Dalton  
*dam* dam-Methylase (Methylierungsdefekt in *E. coli*)  
*dcm* dcm-Methylase (Methylierungsdefekt in *E. coli*)  
 DC dendritische Zellen  
 DIG Digoxigenin  
 DMEM *Dulbecco's Mod Eagle Medium*  
 DNA Desoxyribonukleinsäure (DNS)  
 ds *double stranded* (doppelsträngig)  
 DTT Dithiothreitol  
 dUTP 2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat

### E

E Effizienz

## Abkürzungsverzeichnis

---

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Titriplex III)
EGT	Elektro-Gentransfer
ELISA	<i>enzym-linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme Linked Immuno Spot</i> Technik
EP	Elektroporation
EPO	Erythropoietin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EtBr	Ethidiumbromid
<b>F</b>	
FACS	<i>fluorescence activating cell sorting/scanning</i>
FCS/FKS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRT	<i>Flp Recombination Target site</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
<b>G</b>	
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GC	Guanin-Cytosin
g/dl	Gramm pro Deziliter
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
gp	Glykoprotein
<b>H</b>	
h	Stunde
HBsAg	Hepatitis B <i>surface antigen</i>
HBV	Hepatitis B Virus
HCT	Hämatokrit
HCV	Hepatitis C Virus
HDAC	Histon-Deacetylasen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hgb	Hämoglobin
HIF	<i>hypoxia-inducible transcription factors</i>
HIV	Humanes Immunschwäche-Virus
hu	human
<b>I</b>	
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobuline
IκB	<i>inhibitor of nuclear factor- κB</i>
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
IP-10	inducible protein-10
IPC	<i>interferon producing cells</i>
IRAK	IL-1 Rezeptor assoziierten Kinase
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISS	Immunstimulatorische Sequenzen
<b>J</b>	
JAK	Janus Kinase



## Abkürzungsverzeichnis

---

### K

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

### L

l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>leucine rich repeats</i>

### M

m	milli, Meter
M	Molar (Mol pro Liter)
MACS	magnetische Zellseparation ( <i>magnetic cell separation</i> )
mCpG	methylierte CpG
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Polylinker)
MDA5	<i>Melanoma differentiation associated protein 5</i>
mDC	myeloide dendritische Zelle
MeCP, MCP	<i>Methyl-CpG-binding protein 2</i>
mEPO	murines Erythropoietin
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex ( <i>major-histocompatibility complex</i> )
min	Minute
mol	molar
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger</i> )
mU	Milli-Units
MVA-T7	<i>modified vaccinia virus strain Ankara encoding bacteriophage T7</i>

### N

n	nano ( $10^{-9}$ )
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen
NLR	<i>NOD (Nucleotide-binding and oligomerization domain)-like receptors</i>
NPC	Nukleus-Poren-Komplex
nt bzw. NT	Nukleotid

### O

ODN	Oligodesoxynukleotide
<i>ori</i>	<i>origin of replication</i>

### P

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
Pb	<i>Primer backward</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
pDNA	Plasmid-DNA
Pen	Penicillin
Pf	<i>Primer forward</i>
pg	Picogramm
pH	pH-Wert (Konzentration der H <sup>+</sup> -Ionen in einer Lösung)
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
poly(A)	Kurzbezeichnung für polyadenyliertes 3'-Ende von RNA-Transkripten

## Abkürzungsverzeichnis

---

PRR PAMP *recognition receptor*

### R

rHu-EPO rekombinantes humanes Erythropoietin  
RLR RIG (*retinoic acid inducible gene*)-like receptors  
RNA Ribonukleinsäure  
ROS reaktive Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*)  
RT Raumtemperatur  
RT-PCR Reverse Transkriptase-PCR

### S

s Sekunde  
SDS Natrium Dodecylsulfat (*sodiumdodecyl sulfate*)  
siRNA *small interfering RNAs*  
ss *single stranded* (einzelnsträngig)  
SSC *side scatter*  
STAT Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription  
Strep Streptomycin  
SV40 Simian Virus

### T

Tab. Tabelle  
TAB TAK-1 bindendes Protein  
TAK TGF- $\beta$  activated kinase  
Taq DNA-abhängige DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*  
TBS Tris-gepufferte Kochsalzlösung (*Tris Buffered Saline*)  
TCR T-Zellrezeptor  
TGF- $\beta$  *transforming growth factor*  $\beta$   
Th T-Helferzellen  
TIR Toll/IL-1 Rezeptor  
TLR Toll-like Rezeptor  
Tm Schmelztemperatur  
TNF Tumor Nekrose Faktor  
TRAF6 TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6  
Tris Tris(hydroxymethyl)-aminoethan

### U

U *Units* (Enzymeinheit)  
u.a. unter anderem  
ÜN über Nacht  
usw. und so weiter  
UV Ultraviolett

### V

vgl. vergleiche  
VLP Virus-ähnliches Partikel (*virus-like particle*)

### W

wt Wildtyp

### Z

z. B. zum Beispiel

### DNA-BASEN

<b>A</b>	<b>Adenin</b>
<b>C</b>	<b>Cytosin</b>
<b>G</b>	<b>Guanin</b>
<b>T</b>	<b>Thymin</b>

# Curriculum Vitae

## Angaben zur Person

Vorname/Nachname Denijal Kosovac  
Geburtsdatum 09.09.1972  
Geburtsort Jajce / Bosnien und Herzegowina  
Staatsangehörigkeit kroatisch  
Familienstand ledig

## Promotion

Juli 2004 – Februar 2008 Dissertation zum Thema „Plasmid basierte DNA-Vektor-Systeme; Aktivierung der angeborenen Immunität durch Modulationen im Vektor-*backbone* und Einsatz in der Gentherapie“ am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Ralf Wagner

## Studium

Juni 2003 – Juni 2004 Diplomarbeit zum Thema „Immunmodulierende Eigenschaften Plasmid basierter DNA-Impfstoffe“ am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Ralf Wagner

Oktober 2001 – Mai 2003 Hauptstudium, Universität Regensburg: Diplomprüfung im Hauptfach Medizinische Mikrobiologie und den Nebenfächern Genetik und Organische Chemie

Oktober 1999 – Oktober 2001 Biologie Grundstudium und Vordiplom, Regensburg

Mai 1993 Einwanderung nach Deutschland

April 1992                      Unterbrechung des Biologiestudiums auf Grund des Krieges  
in Bosnien und Herzegowina

September 1991              Beginn des Biologiestudiums an der Naturwissenschaftlichen  
Fakultät in Sarajevo (Bosnien und Herzegowina)

## **Schulbildung**

Juni 1991                      Abitur an der Medizinschule/Gymnasium in Banja-Luka  
(damals Jugoslawien), begleitend Ausbildung zum  
Krankenpfleger

## **Beruflicher Werdegang**

September 1993 – Dezember 2007

Vollzeitbeschäftigung als Krankenpfleger im Dialysezentrum  
(Dres. Wiese-Schwarz-Gruber-Lückhoff) in Landshut (seit  
September 1999 studienbegleitend als  
Teilzeitbeschäftigung)

## **Fortbildung**

September 2003              Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter gentechnischer  
Arbeiten und Beauftragte für Biologische Sicherheit nach §§15  
und 17 Gentechnik-sicherheitsverordnung

## Angeleitete Diplomarbeiten / Studentenbetreuung

2005 / 2006	Cand. Dipl. Biol. (Uni) Verena Lütschg “CpG-haltige Sequenzmotive innerhalb Plasmid-basierter DNA-Impfstoffe: Immunmodulatorische Eigenschaften einer 110 bp Sequenz am 3'-Ende von pUCori“
2005 / 2006	Cand. Dipl. Biotech. (FH) Susanne Meisner „Optimierung der <i>in vivo</i> Proteinexpression durch Modulation des CpG-Gehaltes innerhalb der kodierenden Region von <i>Erythropoietin</i> “
WS 2006	Physik Grundpraktikum für Biologen drittes Semester
SS 2007	Physik Grundpraktikum für Mediziner zweites Semester

## Publikationen/ Manuskripte

- Denijal Kosovac, Jens Wild, Susanne Meisner, Christine Ludwig and Ralf Wagner  
Impact of CpG-amount of the coding region on the *in vitro* and *in vivo* expression of erythropoietin in a plasmid DNA approach for gene therapy (Manuskript fertig zur Einreichung)
- Denijal Kosovac, Jens Wild, Verena Lütischg and Ralf Wagner  
Sequence dependent activation of innate immune system by plasmid DNA in a TLR9 dependent and independent manner (in Vorbereitung)

## Poster

- Denijal Kosovac, Verena Lütischg, Jens Wild and Ralf Wagner (2008)  
Sequence dependent activation of innate immune system by plasmid DNA in a TLR9 dependent manner  
Poster Präsentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Heidelberg, 05.-08.03.2008
- Denijal Kosovac, Susanne Meisner, Jens Wild and Ralf Wagner (2007)  
CpGs and codon usage; an excellent tool for improved and prolonged *in vivo* gene expression  
Poster Präsentation; European society of gene and cell therapy, Rotterdam 27.-30.10.2007
- Denijal Kosovac, Verena Lütischg, Jens Wild and Ralf Wagner (2007)  
Sequence dependent activation of innate immune system by plasmid DNA in a TLR9 dependent and independent manner  
Poster Präsentation; European society of gene and cell therapy, Rotterdam 27.-30.10.2007
- Denijal Kosovac, Verena Lütischg, Jens Wild and Ralf Wagner (2007)  
Sequence dependent activation of innate immune system by plasmid DNA in a TLR9 dependent and independent manner  
Poster Präsentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Nürnberg, 01.-05.09.2007
- Denijal Kosovac, Verena Lütischg, Jens Wild and Ralf Wagner (2007)  
Sequence dependent activation of innate immune system by plasmid DNA in a TLR9 dependent and independent manner  
Poster Präsentation; Deutsche Gesellschaft für Gentherapie, Heidelberg 18.-20.07.2007
- Denijal Kosovac, Susanne Meisner, Jens Wild and Ralf Wagner (2007)

Impact of CpG-amount of the coding region on the *in vivo* expression of Erythropoietin in a plasmid DNA approach for gene therapy  
Poster Präsentation; Deutsche Gesellschaft für Gentherapie, Heidelberg 18.-20.07.2007

- Denijal Kosovac, Verena Lütischg, Jens Wild and Ralf Wagner (2007)  
Sequence dependent activation of innate immune system by plasmid DNA in a TLR9 dependent and independent manner  
Poster Präsentation; Deutsch Österreichischer AIDS Kongress, Frankfurt 27.-30.06.2007
- Denijal Kosovac, Verena Lütischg, Jens Wild and Ralf Wagner (2007)  
Sequence dependent activation of innate immune system by plasmid DNA in a TLR9 dependent and independent manner  
Poster Präsentation; DNA Vaccine, Malaga 23.05.-25.05.2007
- Denijal Kosovac, Verena Lütischg, Jens Wild and Ralf Wagner (2006)  
Improvement of innate properties of DNA vaccines and bridging innate and adaptive immune responses by sequence modifications of the plasmid backbone  
Poster Präsentation; AIDS vaccine Conference, Amsterdam 29.08.-01.09.2006
- Denijal Kosovac, Susanne Meisner, Jens Wild and Ralf Wagner (2006)  
Impact of CpG-amount of the coding region on the *in vivo* expression of Erythropoietin in a plasmid DNA approach for gene therapy  
Poster Präsentation; Deutsche Gesellschaft für Gentherapie, Düsseldorf Juli 2006
- Denijal Kosovac, Verena Lütischg, Jens Wild, Doris Leikam and Ralf Wagner (2006)  
Improvement of innate properties of the DNA vaccine and thus to bridge innate and adaptive immune responses by sequence modifications of the plasmid backbone  
Poster Präsentation; Deutsche Gesellschaft für Gentherapie, Düsseldorf 12.-14.07.2006
- Denijal Kosovac, Verena Lütischg, Jens Wild, Doris Leikam and Ralf Wagner (2006)  
Improvement of innate properties of the DNA vaccine and thus to bridge innate and adaptive immune responses by sequence modifications of the plasmid backbone  
Poster Präsentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München 15.-18.03.2006
- Denijal Kosovac, Jens Wild, Doris Leikam, Frank Notka and Ralf Wagner (2005)  
Improvement of DNA vaccine immunogenicity by modifications of CpG amount in vector backbone and coding region  
Poster Präsentation; Forimmun, Feldkirchen-Westerham, 03.-05.10.2005
- Denijal Kosovac, Doris Leikam, Jens Wild, Frank Notka and Ralf Wagner (2005)  
Improvement of DNA vaccine immunogenicity by modifications of CpG amount in vector backbone and coding region  
Poster Präsentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Hannover 30.09.-01.10.2005
- Frank Notka, Markus Graf, Doris Leikam, Asli Bauer, Denijal Kosovac and Ralf Wagner (2004)  
Modifying the coding region of genes for enhanced protein production  
Poster Präsentation; European society of gene therapy, Tampere 04.11.-07.11.2004



## Danksagung

Bei Prof. Dr. Ralf Wagner möchte ich mich für die Überlassung des Themas sowie für die Finanzierung und Betreuung dieser Arbeit bedanken. Außerdem danke ich für die Unterstützung in für mich schweren privaten Momenten und das gezeigte Fingerspitzengefühl.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg.

Für die Einführung in die Welt der Immunologie sowie die zahlreichen Diskussionen und wissenschaftlichen Tipps, von der Versuchsplanung bis zum Korrekturlesen, bedanke ich mich bei meinem vermeintlichen Kinopartner Dr. Jens Wild. Hvala.

Verena Lütschg und Susann Meisner danke ich für die elanvolle Unterstützung im Rahmen ihrer Diplomarbeiten.

Danke auch an alle aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Wagner und an alle Mitarbeiter des Instituts für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Hervorheben möchte ich Dr. Christine Ludwig die einen besonderen Dank für Ihre breitgefächerte Unterstützung verdient.

Ein grosses Dankeschön gilt meinen einmaligen 80er Laborkolleginnen Kathi, Diana, Helga und Silke für das wunderbare Arbeitsklima und die netten Unternehmungen außerhalb des Labors. Diana danke ich außerdem für das Korrekturlesen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei den Ärzten des Dialysezentrums in Landshut und beim ganzen Dialyseteam für die indirekte, aber wichtige Unterstützung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Heide und Dr. Jürgen Wiese bedanken. Seit meinem Ankommen in Deutschland bis zur Abgabe meiner Dissertation waren sie immer für mich da. Vielen Dank.

Ein lieber Dank geht an meine Mutter und meine Schwester. Ihr habt immer an mich geglaubt und mich die ganze Zeit, aber vor allem in den schweren Monaten im Herbst 2007 unterstützt. Hvala.

Liebe Katrin, ich danke Dir für Deine Liebe und unermüdliche Unterstützung während der ganzen Doktorarbeit. Ohne Deine Hilfe hätte ich diese Arbeit nie in diesem Zeitrahmen beenden können.