

**Konstruktion und Evaluation eines Minicircle-DNA-Systems zum  
nicht viralen Gentransfer in biopharmazeutischen Anwendungen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

**M.Sc. Anja Rischmüller**

Fakultät für Physik  
Universität Bielefeld  
August 2014

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, wurden als solche kenntlich gemacht.

Bielefeld,

(Anja Rischmüller)

**Gutachter**

Prof. Dr. Dario Anselmetti

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....</b>	<b>6</b>
1.1	GENTHERAPIE .....	6
1.1.1	Virale DNA-Vektoren .....	7
1.1.2	Nicht virale DNA-Vektoren .....	9
1.2	MINICIRCLE-DNA .....	11
1.2.1	Der Rekombinationsprozess zur Herstellung von Minicircle-DNA .....	13
1.2.2	Der Herstellungsprozess von Minicircle-DNA .....	17
1.3	ANALYTIK DER MINICIRCLE-DNA .....	24
1.3.1	Kapillargelelektrophorese (CGE) .....	27
1.3.2	Rasterkraftmikroskopie (AFM) .....	30
1.3.3	Kontinuierliche Trennung von DNA mittels Dielektrophorese .....	31
<b>2</b>	<b>METHODEN UND MATERIALIEN .....</b>	<b>36</b>
2.1	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN UND MATERIALIEN .....	36
2.1.1	Stämme .....	36
2.1.2	Plasmide .....	37
2.1.3	Medien und Antibiotika .....	39
2.1.4	Kultivierung von <i>E. coli</i> in Flüssigmedium und auf Festagar .....	40
2.1.5	Bestimmung der optischen Dichte .....	42
2.1.6	Stammhaltung .....	42
2.1.7	Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	42
2.1.8	Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	43
2.2	KULTIVIERUNGEN IM BIOREAKTOR .....	43
2.2.1	Kultivierung zur Gewinnung der Ausgangsparentalplasmid-DNA PP1150 .....	46
2.2.2	Kultivierung zur Gewinnung der Rekombinationsprodukte im Bioreaktor .....	47
2.2.3	Kultivierung zur Gewinnung des Lac-Repressor-Proteins im Bioreaktor .....	48
2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	49
2.3.1	Isolierung von Plasmid- und Minicircle-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen .....	49

2.3.2	Alkalische Lyse und Klärung des alkalischen Lysats.....	49
2.3.3	Anionenaustauscherchromatographie zur Plasmid- und Minicircle-DNA-Reinigung .....	50
2.3.4	Agarosegelelektrophorese (AGE) .....	51
2.3.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	53
2.3.6	Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA .....	54
2.3.7	Ligation von DNA-Fragmenten .....	55
2.3.8	DNA-Fällung.....	55
2.3.9	Bestimmung und Einstellung der DNA-Konzentration.....	56
2.3.10	Sequenzierung der Plasmid-DNA.....	57
2.3.11	Endotoxinbestimmung.....	58
2.3.12	Kapillargelelektrophorese (CGE).....	58
2.4	PROTEINANALYTIK .....	59
2.4.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	59
2.4.2	Western-Blotting und immunologische Detektion .....	60
2.5	AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHE ISOLIERUNG DER MINICIRCLE-DNA .....	61
2.5.1	Beladung der Streptavidin-Magnetpartikel mit Lac-Repressor .....	61
2.5.2	Streptavidin-Magnetpartikel-Affinitätschromatographie .....	62
2.5.3	DNA-Reinigung mittels Anionenaustauscherchromatographie .....	64
2.6	RASTERKRAFTMIKROSKOPIE (AFM).....	64
2.7	KONTINUIERLICHE TRENNUNG VON DNA MITTELS DIELEKTROPHORESE.....	65
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>67</b>
3.1	KONSTRUKTION DER PARENTALPLASMIDE UND DIE DARAUS RESULTIERENDEN MINICIRCLE.....	68
3.2	HERSTELLUNG DER AUSGANGSPARENTALPLASMID-DNA.....	69
3.3	ETABLIERUNG EINES KULTIVIERUNGSSYSTEMS FÜR DEN REKOMBINATIONSPROZESS.....	72
3.3.1	Bestimmung des Induktionszeitpunktes und der Induktorkonzentration.....	72
3.3.2	Bestimmung der Induktionszeitdauer.....	76
3.3.3	Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab .....	80
3.3.4	Kultivierung im Rührkesselbioreaktor .....	91
3.4	AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHE GEWINNUNG VON MINICIRCLE-DNA.....	98

3.4.1	Gewinnung von Lac-Repressor-Protein und Beladung der Magnetpartikel.....	99
3.4.2	Affinitätschromatographische Trennung von Rekombinationsprodukt .....	100
3.5	RASTERKRAFTMIKROSKOPIE.....	104
3.6	ABSCHLIEßENDE ANALYTIK UND QUALITÄTSKONTROLLE DER MINICIRCLE-DNA .....	109
3.7	KONTINUIERLICHE TRENNUNG VON DNA MITTELS DIELEKTROPHORESE.....	117
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>124</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>128</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>141</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>144</b>
7.1	STÄMME .....	144
7.2	PLASMIDE UND MINICIRCLE .....	145
7.3	ABBILDUNGEN DER PLASMIDKARTEN.....	148
7.4	GMP-RICHTLINIEN.....	153
7.5	CPG-MOTIVE.....	153
7.6	GERÄTELISTE.....	154
7.7	CHEMIKALIENLISTE .....	156
<b>8</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>158</b>
8.1	FORSCHUNGSARBEITEN .....	158
8.2	KONFERENZTEILNAHMEN, POSTER UND AUSZEICHNUNGEN .....	158
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>159</b>

# 1 Theoretische Grundlagen

Die hier durchgeführte Forschung hat das Ziel, einen Herstellungsprozess von Minicircle-DNA als nicht viralen DNA-Vektor für den Einsatz in biopharmazeutischen Anwendungen, wie der Gentherapie, weiterzuentwickeln und zu optimieren. Dazu zählen sowohl die Konstruktion geeigneter Parentalplasmid-DNA-Vektoren und die Evaluation von *in vivo* Rekombinationsprozessen als auch die Entwicklung eines produktiven Kultivierungsverfahrens und einer effizienten Reinigungsmethode der gewonnenen Minicircle-DNA im Labor- und industriellen Maßstab.

Dieses Kapitel behandelt die theoretischen Grundlagen der Arbeit und gibt einen Überblick über den aktuellen Forschungs- und Wissensstand bezüglich der Herstellung von nicht viralen Minicircle-DNA-Vektoren und dabei eingesetzte Methodiken.

## 1.1 Gentherapie

Der Begriff Gentherapie umfasst die Einführung eines oder mehrerer funktionstüchtiger Gene in eine Zelle, z.B. eines Säugetieres, mit dem Ziel einen genetischen Defekt zu beheben oder die Expression eines Gens zu ermöglichen, welches der Zelle nicht vorliegt [1],[2]. Es lassen sich zwei Einsatzarten der Gentherapie unterscheiden. Die somatische Gentherapie hat das Ziel eine genetische Veränderung in Körperzellen durchzuführen. Dabei beschränkt sich die Korrektur des genetischen Defektes auf ein bestimmtes Gewebe oder Organ. Bei der Keimbahntherapie hingegen sollen Keimbahnzellen, wie Spermien oder Eizellen genetisch modifiziert werden, so dass alle resultierenden Zellen die intakten Gene enthalten. Die gentherapeutische Manipulation der menschlichen Keimbahn ist in Deutschland nicht erlaubt [3]. Anfänglich konzentrierte sich die Forschung und der Einsatz der Gentherapie auf die Behebung von monogenetischen Defekten zu denen angeborene Immunschwächen zählen [4]. Inzwischen erstreckt sich das Feld der Forschung auch auf die Anwendung der Gentherapie bei Krebserkrankungen, chronische oder progressive Krankheiten wie z.B. Herzversagen und auf neurodegenerative Defekte und Stoffwechselerkrankungen, zu denen auch Morbus Parkinson und Diabetes gehören [5]–[7]. Ein weiterer Bereich der Gentherapie ist die genetische Impfung. Dabei wird das Gen für ein Antigen in die Zielzelle eingeschleust und dort exprimiert. Die so hergestellten Antigene lösen die gewünschte Immunantwort aus, die zur Erzeugung von Antikörpern gegen das Zielprotein führen.

Das Einbringen korrekter Gene in Körperzellen kann *ex vivo* oder *in vivo* erfolgen. Von einem *ex vivo* Gentransfer wird bei der Einschleusung des Genmaterials außerhalb des Körpers gesprochen, an die sich die Rückführung der modifizierten Zellen in den Patienten anschließt. Erfolgt der Gentransfer direkt in den Körper des Patienten, findet ein *in vivo* Gentransfer statt. Dabei wird zwischen einem lokalen und einem systemischen *in vivo* Gentransfer unterschieden. Im Falle des lokalen *in vivo* Gentransfers werden die funktionstüchtigen Gene direkt an diejenige Stelle appliziert, an der auch die Expression der eingebrachten Nukleinsäure erfolgen soll, während bei einem systemischen *in vivo* Gentransfer eine Applikation in die Blutbahn durchgeführt wird [4],[8],[9].

Für den Gentransfer in der Gentherapie werden sogenannte DNA-Vektoren eingesetzt. Dabei handelt es sich um verpackte oder nicht verpackte DNA-Moleküle, welche das gewünschte, funktionstüchtige Gen tragen, das in der Zielzelle exprimiert werden soll. Es wird zwischen viralen und nicht viralen DNA-Vektoren unterschieden (Kapitel 1.1.1 und 1.1.2). Wichtige Kriterien des Gentransfers sind die Effektivität der Einführung der DNA-Vektoren und die stabile Expression der eingebrachten Gene. Neben der Funktionalität der Gentransferverfahren stehen sowohl die Sicherheit der Methode und Nebenwirkungen der Gentherapie als auch die Kosten der Herstellung der DNA-Vektoren und des Verabreichungssystems im Fokus der Forschung.

Bis Januar 2014 wurden weltweit 1989 klinische Studien im Bereich der Gentherapie durchgeführt oder genehmigt [1]. 2012 wurde das erste kommerziell erhältliche Gentherapeutikum, Glybera® als Wirkstoff gegen die Lipoprotein-Lipase-Defizienz (LPLD), in Europa genehmigt [10]–[12].

### 1.1.1 Virale DNA-Vektoren

Viren sind nicht in der Lage sich selbstständig zu replizieren, sondern sind auf den Stoffwechselapparat einer Wirtzelle angewiesen. Aufgrund dessen ist es für Viren notwendig ihr genetisches Material in Wirtszellen einzuschleusen. Diese Fähigkeit der als Transduktion bezeichneten Einschleusung wird sich in der Gentherapie gezielt zu Nutze gemacht. Als virale DNA-Vektoren werden modifizierte Viruspartikel bezeichnet, die zur Transduktion von gewünschten Genen in eine Zielzelle in der Gentherapie eingesetzt werden. In die modifizierten

Viruspartikel wird dabei die gewünschte Gensequenz verpackt, wobei die Größe des DNA-Stranges durch die Kapazität der eingesetzten Virushülle begrenzt ist.

Repräsentanten der viralen DNA-Vektoren sind sowohl retrovirale DNA-Vektoren, zu denen die lentiviralen DNA-Vektoren gehören, und adenovirale DNA-Vektoren als auch adeno-assoziierte DNA-Vektoren. Retrovirale und adeno-assoziierte DNA-Vektoren werden insbesondere für den *ex vivo* Gentransfer eingesetzt [13]–[16]. Sie gehören zu den integrierenden DNA-Vektoren und zeigen eine sehr stabile Gentransduktion in sich teilenden Zellen. Daher sind diese viralen DNA-Vektoren ein geeigneter Ansatz, um monogenetische Erbkrankheiten zu behandeln. Ein *ex vivo* Gentransfer senkt das Risiko der nichtgewünschten Integration an unspezifische Genorten und verringert so die Toxizität durch eine ektopische Genexpression [4]. Retrovirale DNA-Vektoren haben eine Verpackungskapazität von DNA-Strängen bis zu etwa acht Kilobasenpaare. Adeno-assoziierte DNA-Vektoren können hingegen nur bis etwa fünf Kilobasenpaare transferieren. Allerdings verursachen sie im Zielorganismus im Gegensatz zu retroviralen und adenoviralen DNA-Vektoren nur selten virusbedingte Krankheitssymptome, so dass nur eine geringfügige Immunogenität zu erwarten ist [4]. Adenovirale DNA-Vektoren eignen sich vor allem für den *in vivo* Gentransfer, da sie nur eine geringe Neigung besitzen in das Zielgenom zu integrieren. Sie zeigen eine zeitlich begrenzte Aktivität und werden in der Tumorthherapie, bei der nur eine vorübergehende Expression des Zielgens gewünscht ist, eingesetzt. Adenovirale DNA-Vektoren können stark immunogen wirken [17]–[20]. Sie besitzen eine sehr hohe Verpackungskapazität von bis zu dreißig Kilobasenpaaren. Die Transduktionseffizienz ist für alle viralen DNA-Vektoren sehr hoch.

Die integrierenden viralen DNA-Vektoren haben den Vorteil, dass sie die eingebrachten Gene dauerhaft in das Zellgenom einbauen. Allerdings kann es durch die Insertion zur Expression benachbarter Gene, z.B. Protoonkogene, kommen, so dass eine Auslösung von unkontrolliertem Zellwachstum möglich ist. Dieser als Insertionsmutagenese bezeichnete Prozess ist ein großer Nachteil der viralen DNA-Vektoren. Ein weiterer Nachteil des Einsatzes von viralen DNA-Vektoren ist deren Immunogenität. Freie Vektorpartikel, genetisch modifizierte Zellen oder das eingeführte Genprodukt können vom Immunsystem als fremd eingestuft und abgestoßen werden. Auch die Stilllegung von Genen, das sogenannten *Silencing* mittels Methylierung kann durch das Einbringen von Fremd-DNA durch virale DNA-Vektoren ausgelöst werden [4]. Ein weiterer Nachteil der viralen DNA-Vektoren ist deren geringe Kapazität für die Aufnahme von



exogener DNA. Obwohl inzwischen sorgfältig ausgearbeitete Methoden zur Verfügung stehen, mit denen die Immunogenität der virale DNA-Vektoren abgeschwächt oder vermieden werden kann und virale DNA-Vektoren in klinische Studien erfolgreich eingesetzt wurden ohne unspezifisch in das Zielgenom zu integrieren, besteht ein erhebliches Risiko beim Einsatz der viralen DNA-Vektoren als Therapeutikum in der Gentherapie [21],[22]. Eine Alternative zu den viralen DNA-Vektoren stellt der Einsatz von nicht viralen DNA-Vektoren für den Gentransfer in biopharmazeutischen Anwendungen dar.

### 1.1.2 Nicht virale DNA-Vektoren

Der Einsatz von viralen DNA-Vektoren in der Gentherapie ruft, in Anbetracht des Risikos einer starken Immunogenität und der Gefahr der Insertionsmutagenese, Sicherheitsbedenken hervor, welche beim Einsatz von nicht virale DNA-Vektoren entfallen [23],[24]. Zu den nicht viralen DNA-Vektoren gehören nicht verpackte, „nackte“ Nukleinsäuren, wie z.B. lineare, synthetische Oligonukleotide, RNA und zirkuläre Plasmid-DNA als auch Minicircle-DNA. Die Größe der zu transferierenden DNA-Stränge ist nicht wie bei viralen DNA-Vektoren begrenzt. Für den Gentransfer, die Transfektion, stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Dazu zählen sowohl mechanisch physikalische Methoden wie die Jetinjektion, der Einsatz der *Particle-Gun*, die Elektroporation, die Magnetofektion und die Sonoporation [25]–[31] als auch die chemische Transfektion mit Lipiden, Polymeren und Nanopartikeln [32]–[36]. Insgesamt ist die Effektivität der Gentransfektion durch nicht virale DNA-Vektoren geringer als die durch den Gentransfer mit viralen DNA-Vektoren erreichte. Die genannten Gentransfermethoden erhöhen die geringe Effizienz der Einbringung der nackten DNA [37],[38]. Welche Gentransfermethode eingesetzt wird, ist von der Art und Lokalisation der Zielzellen und vom Expressionssystem der transferierten Gene abhängig [39],[40].

Bei der häufig eingesetzten Plasmid-DNA als nicht viraler DNA-Vektor handelt es sich um kleine ringförmige DNA-Moleküle (meist 1-1000 kbp) [41], welche sich autonom replizieren. Von den seit 1989 durchgeführten oder genehmigten klinischen Studien in der humanen Gentherapie wurden zu etwa 25% nicht virale DNA-Vektoren als Mittel des Gentransfers eingesetzt, 76% dieser nicht viralen DNA-Vektoren waren Plasmid-DNA-Vektoren [1].

Die zirkulären Plasmid-DNA-Vektoren können, im Gegensatz zu viralen DNA-Vektoren, nicht in das Genom der Zielzelle integriert werden. Das Risiko einer Insertionsmutagenese ist damit sehr gering. Aufgebaut sind Plasmid-DNA-Vektoren aus einer Expressionskassette mit dem Gen von Interesse und dem zugehörigen Promotor, als auch aus den bakteriellen Rückgratsequenzen, zu denen der Replikationsursprung und in der Regel eine Selektionsmarkersequenz z.B. ein Antibiotikaresistenzgen gehören. Replikationsursprung und Selektionsmarkergene werden für die bakterielle Vermehrung und Selektion in der Vektorherstellung benötigt und bergen so ein Risiko der unkontrollierten Freisetzung in die Umwelt [42],[43]. Auch enthalten die bakteriellen Rückgratsequenzen CpG-Motive, die aus mittels Phosphodiesterbindung verbundenen benachbarten Nukleinbasen Cytosin und Guanin bestehen (Kapitel 7.5) [44]. Diese Motive sind für den Einsatz des Plasmid-DNA-Vektors in der Gentherapie nachteilig, da CpG-Motive im Zielorganismus unerwünschte Immunantworten, wie Entzündungen sowie unspezifische Mutationen auslösen können [45],[46]. Werden CpG-freie Plasmid-DNA-Vektoren eingesetzt, können diese negativen Effekte vermindert werden [46]–[49].

Eine Forderung der zuständigen Zulassungsbehörden ist es, sowohl den Einsatz von Selektionsmarkergenen und Sequenzelementen wie z.B. den Replikationsursprung als auch unnötige oder CpG-haltige Bereiche in biopharmazeutisch eingesetzten nicht viralen DNA-Vektoren zu vermeiden. Ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung von nicht viralen DNA-Vektoren und der Plasmid-basierten Produktion von viralen DNA-Vektoren ist daher die Entfernung dieser Bestandteile. Ein Ansatz ist die Verwendung von linearen DNA-Vektoren, welche nur die für die eigentliche Wirkung notwendige Information enthalten, wie z.B. der MIDGE<sup>®</sup>-(minimalistische immunologisch definierte Genexpression)-DNA-Vektor. Seine DNA-Struktur ist linear und durch einzelsträngige Haarnadelbereiche an beiden Enden fest geschlossen. Dies führt zu der charakteristischen, geringen Größe des Vektors. MIDGE-Vektoren sind ca. 50-80% kleiner als Plasmid-DNA-Vektoren [50]. Außerdem stehen antibiotikaresistenzgenfreie zirkuläre Plasmid-DNA-Vektoren zur Verfügung, welche alternative Selektionssysteme verwenden. Dazu gehört die Selektion mittels RNA-RNA-Interaktion, das Operator-Repressor-Titrations-(ORT)-System, das protein-basierte Gift/Gegengift-System und die pFAR-Plasmidfamilie, welche die Unterdrückung der *Nonesense*-Mutation nutzt [51]–[58]. Ein weiterer Ansatz nicht virale DNA-Vektoren ohne bakterielle Rückgratsequenzen herzustellen, ist der Einsatz von Minicircle-DNA-Vektor-

Systemen. Die zirkulären Minicircle-DNA-Vektoren bestehen aus der Expressionskassette mit einem Promotor und dem Gen von Interesse sowie einer Rekombinationserkennungssequenz und gegebenenfalls einer Sequenz zur spezifischen Reinigung der DNA [38],[40],[59]–[64].

## 1.2 Minicircle-DNA

Minicircle-DNA repräsentiert ein optimiertes Plasmid-basiertes zirkuläres DNA-Molekül ohne bakterielle Rückgratsequenzen. Minicircle-DNA-Vektoren tragen eine Expressionskassette mit dem gewünschten Gen von Interesse und werden in biopharmazeutische Anwendungen wie der Gentherapie und genetische Impfungen als nicht viraler DNA-Vektor als auch in der Minicircle-basierte Produktion von viralen DNA-Vektoren eingesetzt [38],[59],[61],[64],[65].

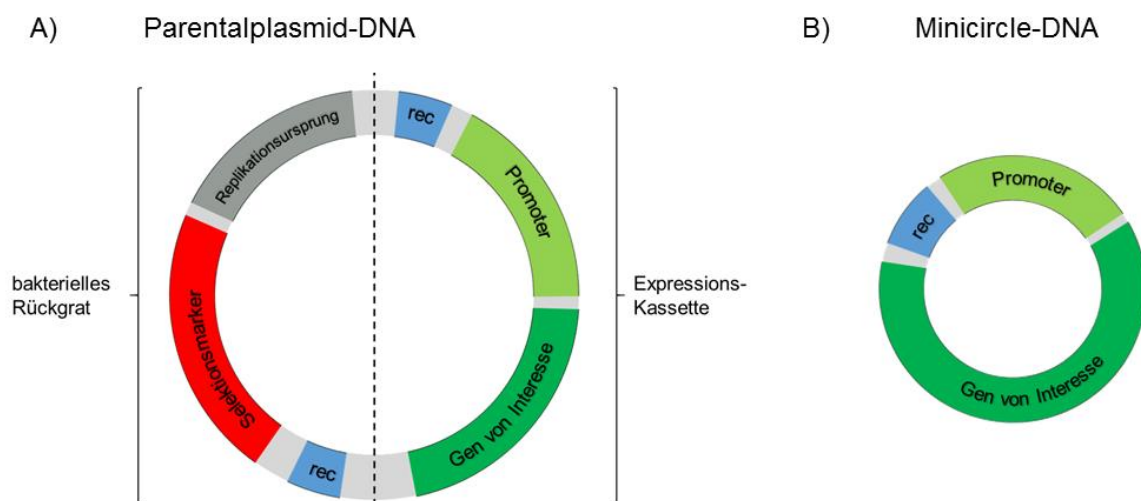


Abbildung 1.2.1 Schematische Darstellungen von Genregionen auf A) Parentalplasmid-DNA und B) Minicircle-DNA. rec: Rekombinationserkennungssequenzen. Die Karten sind nicht maßstabsgetreu.

In der Gentherapie eingesetzte zirkuläre Plasmid-DNA enthält neben der Expressionskassette mit dem Gen von Interesse und dem zugehörigen Promotor einen Replikationsursprung für die autonome Vermehrung im Zellsystem und in der Regel eine Selektionsmarkersequenz, z.B. ein Antibiotikaresistenzgen. Zur Herstellung von Minicircle-DNA benötigt die Plasmid-DNA zusätzlich zwei Rekombinationserkennungssequenzen, die eine Rekombination der dann als

Parentalplasmid-DNA bezeichneten Plasmid-DNA ermöglicht (Kapitel 1.2.1). In Abbildung 1.2.1 ist die Karte einer Parentalplasmid-DNA schematisch dargestellt.

Eine Weiterentwicklung der Plasmid-DNA-Vektoren sind die Minicircle-DNA-Vektoren. Diese bestehen neben dem Gen von Interesse aus einem geeigneten Promotor und einer Rekombinationserkennungssequenz (Abbildung 1.2.1). Replikationsursprung und Antibiotikaresistenzgene wurden ebenso entfernt wie die CpG-Motive, die im bakteriellen Rückgrat enthalten sind. Das Fehlen dieser Gene und Bereiche ist vorteilhaft, da diese in biopharmazeutischen Anwendungen unerwünscht sind (Kapitel 1.1.2). Ein weiterer Vorteil der Minicircle-DNA-Vektoren ist die reduzierte Größe im Vergleich zu den korrespondierenden Parentalplasmid-DNA-Vektoren. So kann eine höhere Anzahl an DNA-Molekülen in die Zielzelle eingebracht werden und die Effizienz des Transfers wird erhöht. Auch liegen die Minicircle-DNA-Vektoren in der natürlichen superspiralisierten *ccc-(covalently closed circle DNA)*-Konformation vor, welche die Wirksamkeit in der Zielzelle erhöht [65].

Vergleichende Studien mit Plasmid-DNA- und Minicircle-DNA-Vektoren zeigen das hohe Potential der Minicircle-DNA-Vektoren sowohl im *in vivo* als auch *in vitro* Gentransfer. So erzielte der Gentransfer von nackter Minicircle-DNA mittels intraperitonealer Injektion eine hohe Expressionsrate in den verwendeten HEK-293-(*Human Embryonic Kidney*)- und MEF-(*Mouse embryonic fibroblasts*)-Zellen, welche durch einen Poly( $\beta$ -Aminoester)-Nanopartikel-vermittelten Gentransfer noch verdoppelt wurde [66]. Auch der Gentransfer von Minicircle-DNA-Vektoren mittels Lipofektion oder Elektroporation in humane maligne Melanomzellen als auch in kolorektalen Karzinomzellen zeigte für die eingesetzten Minicircle-DNA-Vektoren, welche das *GFP*-, *lacZ*- bzw. *Luziferase*-Gen trugen, eine erhöhte Expression im Vergleich zu den korrespondierenden Parentalplasmid-DNA-Vektoren [67]. Die GFP- und *lacZ*-Minicircle-DNA-Vektoren wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt (Kapitel 2.1.2 und 7.2). Die gesteigerte Expression wurde dabei nicht durch einer höhere Kopienzahl der Minicircle-DNA-Vektoren bedingt, sondern durch eine von den Minicircle-DNA-Vektoren verursachten verstärkte transgene mRNA-Transkription im Vergleich zur Parentalplasmid-DNA-Vektor vermittelten. Die Durchflusszytometrie zeigte eine deutlich erhöhte Anzahl an GFP-positiven Zellen nach Minicircle-DNA-Vektor-Gentransfer als nach einem Gentransfer von Parentalplasmid-DNA-Vektoren. Die Effizienz des Transfers wird durch die geringere molekulare Masse der Minicircle-DNA-Vektoren im Vergleich zu den entsprechenden

Plasmid-DNA-Vektoren erhöht [67]–[69]. Auch der *in vivo* Gentransfer mittels Jetinjektion führte zu einem verbesserten Expressionserfolg von Minicircle-DNA-Vektoren im Vergleich zu Plasmid-DNA-Vektoren [67].

Der verbesserte Gentransfer und das effiziente Expressionsverhalten von Minicircle-DNA-Vektoren im Vergleich zu den korrespondierenden Plasmid-DNA-Vektoren bieten neue Möglichkeiten für den nicht viralen Gentransfer in der therapeutische Gentherapie. Minicircle-DNA-Vektoren stellen ein vielversprechendes Werkzeug in der Gentherapie da, mit dem sowohl eine bessere therapeutische Wirksamkeit erzielt als auch die regulatorischen Anforderungen der Zulassungsbehörden erfüllt werden können.

### 1.2.1 Der Rekombinationsprozess zur Herstellung von Minicircle-DNA

Hergestellt wird die Minicircle-DNA durch einen ortsspezifischen Rekombinationsprozess. Eine Plasmid-DNA, welche die für die Minicircle-DNA bestimmte Expressionskassette enthält, wird zusätzlich mit zwei Rekombinationsstellen ausgestattet. Nach der Kultivierung zur Replizierung dieser Plasmid-DNA wird der DNA-Ring mit Hilfe geeigneter Rekombinationsenzyme so gespalten und neuverknüpft, dass die zirkuläre Minicircle-DNA resultiert. Rekombinasen sind Enzyme, die die genetische Rekombination, die Neuordnung von DNA-Sequenzabschnitten, katalysieren. Dies geschieht durch Spaltung und Neuverknüpfung von DNA zwischen spezifischen Sequenzabschnitten. Diese ortsspezifischen Rekombinationen erfolgen über kurze Erkennungsstellen, den Rekombinationserkennungssequenzen, in der DNA-Sequenz. Im Herstellungsprozess von Minicircle-DNA wird diese gezielte Rekombination der DNA-Sequenz genutzt, um einen gewünschten DNA-Sequenzabschnitt aus einer Plasmid-DNA herauszutrennen und zirkulär vorliegen zu haben.

Die zirkuläre Parentalplasmid-DNA besitzt einen Replikationsursprung, ein Selektionsmarkergen z.B. eine Antibiotikaresistenzgensequenz, die Expressionskassette mit dem Gen von Interesse und zwei Rekombinationssequenzen, welche die Expressionskassette umschließen (Abbildung 1.2.1). Mittels eines enzymvermittelten Rekombinationsprozesses werden die Expressionskassette und eine Rekombinationssequenz von dem bakteriellen Rückgrat der Parentalplasmid-DNA getrennt. Es entstehen dabei zwei zirkuläre DNA-

Moleküle, welche als Rekombinationsprodukt definiert werden. Das eine Molekül wird als Minicircle-DNA bezeichnet und enthält die Expressionskassette und eine der Rekombinationssequenzen (Abbildung 1.2.1), das andere Molekül heißt Miniplasmid-DNA und besteht aus dem bakteriellen Teil der Parentalplasmid-DNA, nämlich dem Replikationsursprung, dem Selektionsmarkergen und der zweiten Rekombinationssequenz. Sowohl Parentalplasmid-DNA als auch die resultierende Minicircle- und Miniplasmid-DNA liegen aufgrund der enzymvermittelten Rekombination in superspiralisierter *ccc*-Konformation vor. In Abbildung 1.2.2 ist dieser Rekombinationsprozess schematisch dargestellt. Die Replikation der Parentalplasmid-DNA und der Rekombinationsprozess finden in einem Bakterien-basierten Kultivierungssystem statt.

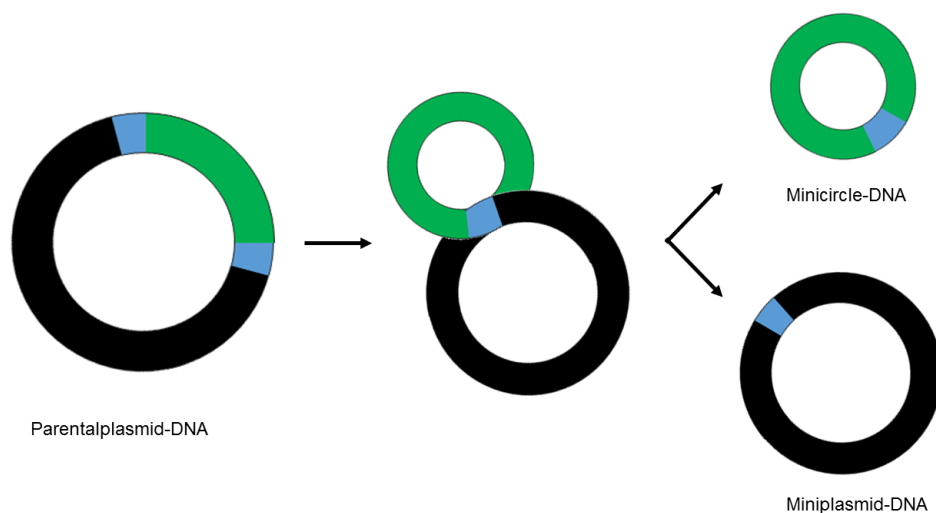


Abbildung 1.2.2 Schematische Darstellung des intramolekularen Rekombinationsprozesses der Parentalplasmid-DNA über spezifische Rekombinationssequenzen in zirkuläre Minicircle-DNA und zirkuläre Miniplasmid-DNA (verändert nach PlasmidFactory GmbH Co. KG).

Zwei Rekombinationsenzymfamilien sind in der Lage eine ortsspezifische intramolekulare Rekombination durchzuführen. Dazu gehören die Tyrosin-Rekombinasen und die Serin-Rekombinasen. Zu den Tyrosin-Rekombinasen zählen die Integrase des Bakteriophagen  $\lambda$ , die Cre-Rekombinase (*cyclization recombinase*) aus dem Bakteriophagen P1 und die Flp-Rekombinase (*flippase*) des Hefepiasmids 2- $\mu$ m-Ring. Den Serin-Rekombinasen gehören die  $\phi$ C31-Integrase des  $\phi$ C31-Bakteriophagen und die ParA-Resolvase aus den Plasmiden RK2 und

RP4 an [61],[65]. In Tabelle 1.2.1 ist ein Überblick der Rekombinationsenzyme zusammengestellt. Die genannten Rekombinationsenzymen und ihre zugehörigen Rekombinationserkennungssequenzen werden in verschiedenen Minicircle-Systemen eingesetzt [40],[62],[63],[70],[71].

Tabelle 1.2.1 Zusammenfassung verschiedener Rekombinationsenzyme und den Bezeichnungen der zugehörigen Rekombinationssequenzen.

Enzymfamilie	Enzym	Rekombinationssequenzen	Referenz
Tyrosin-Rekombinasen	$\lambda$ -Integrase	attP + attB	Darquet <i>et al.</i> , 1997 [62]
	Cre-Rekombinase	loxP	Bigger <i>et al.</i> , 2001 [40]
	Flp-Rekombinase	FRT	Nehlsen <i>et al.</i> , 2006 [72]
Serin-Rekombinasen	$\phi$ C31-Integrase	attP + attB	Chen <i>et al.</i> , 2003 [63]
	ParA-Resolvase	rec	Mayrhofer <i>et al.</i> , 2009 [38]

Legende: attB: *attachment site B*, attP: *attachment site P*, Cre: *cyclization recombinase*, Flp: *flippase*, FRT: *Flp-recombinase target*, loxP: *locus of crossingover of P1 phage*, ParA: *Partitioning Arabidopsis*, rec: *recombinationsequence*

Sowohl der Rekombinationsprozess des Cre/loxP- als auch der Rekombinationsprozess des Flp/FRT-Systems finden bidirektional statt und sind somit vollständig reversibel [73]–[75]. Außerdem sind Rekombinationen zwischen verschiedenen Molekülen möglich. Diese Rekombinationsprozesse der Cre- und der Flp-Rekombinase führen jeweils zu identischen oder beinahe identischen DNA-Sequenzen. Aufgrund der intra- und intermolekularen Rekombination werden zusätzlich zu der Parentalplasmid-, Miniplasmid- und Minicircle-DNA verschiedene Multimere dieser Produkte gebildet, die im weiteren Herstellungsprozess der Minicircle-DNA wieder entfernt werden müssen [76],[77]. Die Einführung einer loxP-Sequenz mit Mutation führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts des Rekombinationsprozesses in die unidirektionale Richtung, so dass vermehrt monomere Minicircle-DNA gebildet werden. Der Anteil an Konkatemeren ist allerdings weiterhin hoch [70]. Der Rekombinationsprozess mittels  $\lambda$ -Integrase findet zwischen der attB- und der attP-Sequenz statt [76],[78]. In der Abwesenheit von Xis-Protein verläuft der Rekombinationsprozess überwiegend unidirektional. Allerdings liegt noch etwas 30% der Minicircle-DNA als Dimer vor [79]. Eine Rekombination

mittels  $\phi$ C31-Integrase findet ausschließlich unidirektional statt. So besteht einen hoher Anteil an Rekombinationsprodukt aus monomerer Minicircle-DNA und nur wenig Konkatermer wird gebildet [63]. Auch der Rekombinationsprozess der ParA-Resolvase ist unidirektional. Außerdem verläuft die Rekombination mittels pAR-Resolvase ausschließlich intramolekular. So dass der Anteil an Multimeren und anderen Konkatermen gering ist [71],[80]–[82].

Um eine vorzeitige, nicht induzierte Rekombination der Parentalplasmid-DNA zu verhindern, ist die gezielte Steuerung des Rekombinationsprozesses notwendig. Dies wird erreicht, indem die jeweilige Rekombinaseaktivität mittels geeigneter Promotoren angeschaltet wird [65]. Eine vorzeitige Rekombination der Parentalplasmid-DNA führt zu großen Miniplasmid-DNA-Anteilen im Endrekombinationsprodukt, da die Miniplasmid-DNA aufgrund des enthaltenen Replikationsursprunges während der Kultivierung repliziert wird [65]. Als Promotoren kommen der temperatursensitive  $\lambda$ pR-Promotor und der BAD-Promotor, welche mittels araC-Arabinose-Expressionssystem kontrolliert werden [40],[62],[63],[70]–[72],[83] zum Einsatz. So kann der Rekombinationsprozess der Parentalplasmid-DNA gezielt zu einem gewünschten Zeitpunkt während der Kultivierung gestartet werden. Es resultieren Minicircle- und Miniplasmid-DNA.

Das in dieser Arbeit verwendete Minicircle-DNA-System beruht auf dem Einsatz der ParA-Resolvase und den rec-Rekombinationserkennungsstellen [38]. Die Parentalplasmid-DNA enthält den Replikationsursprung und ein Kanamycinresistenzgen ( $Kan^R$ ) welches als Selektionsmarker dient. Außerdem finden sich eine Erkennungssequenz für die spätere chromatographische Reinigung der Minicircle-DNA und die Expressionskassette mit dem Gen von Interesse (*gene of interest*) auf der Parentalplasmid-DNA. Die Expressionskassette und die Reinigungssequenz werden von den rec-Rekombinationserkennungsstellen flankiert, so dass diese sich nach der erfolgten Rekombination auf der Minicircle-DNA befinden.

Mittels des ParA-Resolvase basierten Minicircle-DNA-System kann eine Rekombination der gesamten Parentalplasmid-DNA in *Minicircle*- und Miniplasmid-DNA erreicht werden [71]. Die hohe Effizienz des vorgestellten Minicircle-DNA-Systems ist begründet in der Tatsache, dass die ParA-Resolvase eine unidirektionale Enzymreaktion vermittelt, bei der weder die reverse Bildung von Parentalplasmid-DNA noch die Entstehung diverser multimerer Variationen erfolgen. Durch die Positionierung der ParA-Resolvase auf der Parentalplasmid-DNA wird eine große Menge der Rekombinase gebildet. Ein hohes Verhältnis von ParA-



Resolvase zu Parentalplasmid-DNA ist notwendig, um eine fast 100%ige Rekombination zu erreichen. Die Gensequenz für die *parR*-Resolvase ist auf der Parentalplasmid-DNA kodiert und wird mittels Arabinose-induzierbaren BAD-Promotor ( $P_{BAD}$ ) reguliert und exprimiert. In Abwesenheit von Arabinose fungiert das Regulatorprotein (*araC*) unter Ausbildung einer DNA-Schleife als Repressor der  $P_{BAD}$ -kontrollierten *parR*-Resolvase-Gens und es wird keine *parA*-Resolvase exprimiert. Die Regulatorprotein-Sequenz (*araC*) und die Genexpressionsverstärker-Sequenz (*ara gene enhancer*) werden mittels *araC*-Promotor kontrolliert.

Als Erkennungssequenz für die spezifische Reinigung der Minicircle-DNA kommt die für den Lac-Repressor kodierende Gensequenz (*lacO*) zum Einsatz. Der Lac-Repressor ist ein DNA-bindendes Protein, welches gekoppelt an ein Trägermaterial eine Affinitätschromatographische Trennung von Miniplasmid- und Minicircle-DNA ermöglicht. Nach der intramolekularen Rekombination findet sich diese *lac*-Operator-Sequenz (*lacO*) auf der Minicircle-DNA, mit welcher diese Affinitätschromatographisch gereinigt werden kann. Auf der Miniplasmid-DNA befindet sich keine *lacO*-Erkennungssequenz.

### 1.2.2 Der Herstellungsprozess von Minicircle-DNA

Ziel ist die Herstellung von Minicircle-DNA im industriellen Maßstab. Dabei soll die Minicircle-DNA in einer Qualität gewonnen werden, die die Anwendung als aktiver pharmazeutischer Wirkstoff zum nicht viralen Gentransfer in der Gentherapie erlaubt. Um diese Voraussetzungen zu erfüllen, ist es notwendig während des gesamten Herstellungsprozesses die *good manufacturing practice guidelines* (GMP-Richtlinien) und Vorschriften der Gesundheitsbehörden einzuhalten (Kapitel 7.4) [84].

Zunächst wird der Herstellungsprozess von Minicircle-DNA im Labormaßstab entwickelt und optimiert. Anschließend erfolgt eine Maßstabvergrößerung. Um den Anforderungen einer wirtschaftlichen Herstellung im industriellen Maßstab gerecht zu werden, ist es Voraussetzung Minicircle-DNA in einem hinreichenden Maßstab in einer adäquaten Qualität herzustellen. Dem Prozess der Maßstabvergrößerung (*Scale up*) kommt daher eine besondere Bedeutung zu.

Der Herstellungsprozess von Minicircle-DNA gliedert sich in drei aufeinanderfolgende Schritte:

1. Konstruktion einer Parentalplasmid-DNA, welche die Expressionskassette mit dem Gen von Interesse enthält.
2. Kultivierungsverfahren und induzierbarer *in vivo* Rekombinationsprozess der Parentalplasmid-DNA resultierend in Miniplasmid- und Minicircle-DNA.
3. Effiziente Trennmethode von Miniplasmid- und Minicircle-DNA, um reine Minicircle-DNA zu gewinnen.

Sowohl die Charakteristika der Parentalplasmid-DNA als auch der induzierbare *in vivo* Rekombinationsprozess wurden in Kapitel 1.2.1 ausführlich erläutert. In diesem Kapitel werden nun sowohl die Konstruktion der Parentalplasmid-DNA, das eingesetzte Kultivierungsverfahren der Herstellung von Parentalplasmid-DNA, die Reinigung des Rekombinationsproduktes bestehend aus Miniplasmid- und Minicircle-DNA als auch die Trennmethode von Miniplasmid- und Minicircle-DNA erklärt.

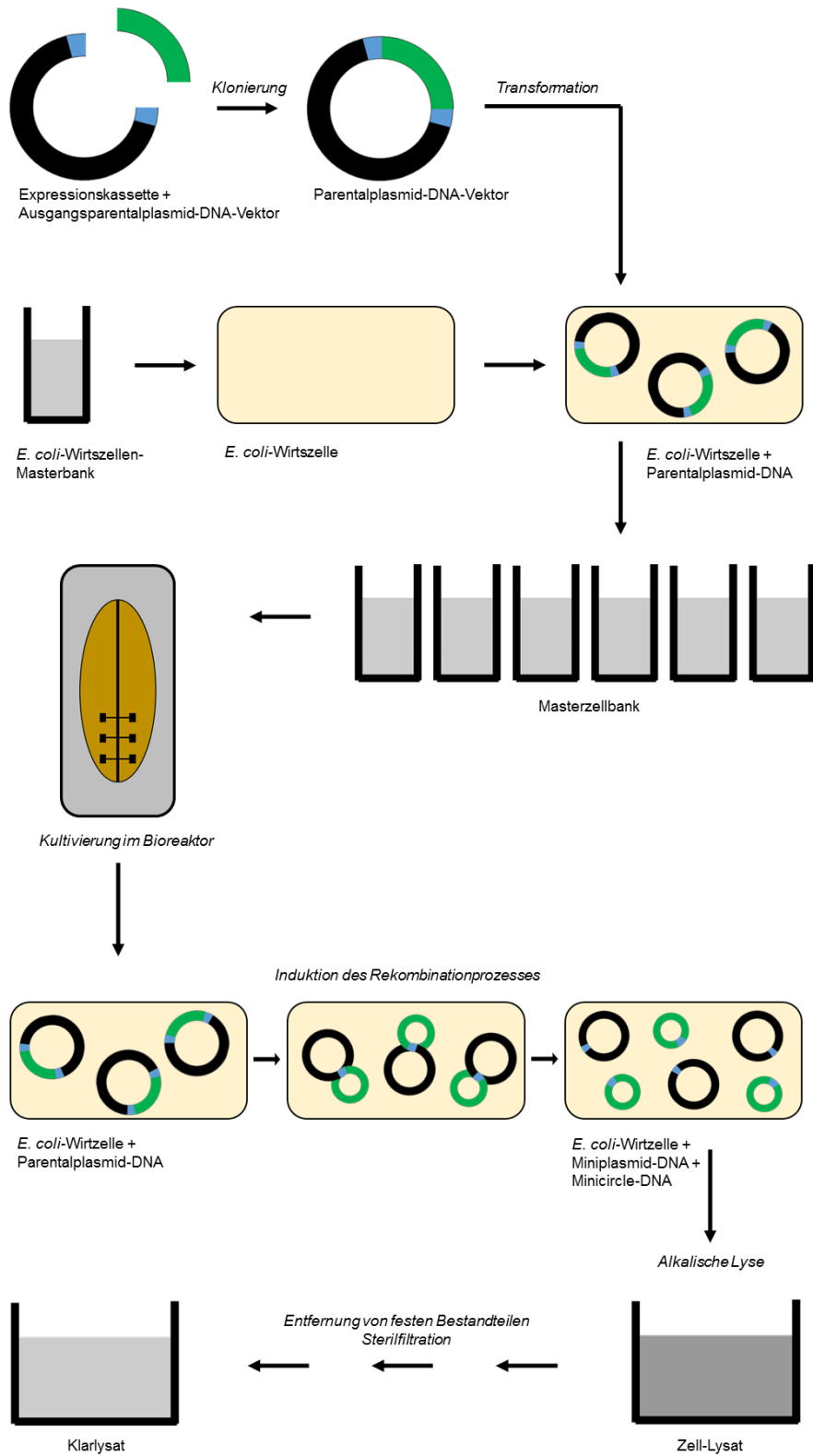


Abbildung 1.2.3 Schematische Darstellung der Kultivierung und Gewinnung von Minicircle-DNA (verändert nach Rischmüller *et al.* [64]).

Zu Beginn des Herstellungsprozesses von Minicircle-DNA für biopharmazeutische Anwendungen steht die Konstruktion der Parentalplasmid-DNA. Dazu wird ein Parentalplasmid-DNA-Klonierungsvektor, der Ausgangsparentalplasmid-DNA-Vektor, eingesetzt. Dieser liegt in zirkulärer Form vor und enthält einen Replikationsursprung, ein Antibiotikaresistenzgen als Selektionsmarker, eine spezifische Sequenz zur chromatographischen Reinigung und zwei Erkennungsstellen für die Rekombinationsenzyme [61],[85]. Zwischen denen für den Replikationsprozess essentiellen Replikationserkennungssequenzen befindet sich eine Region mit einer hohen Anzahl an Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen. Dieser als *multiple cloning site (MCS)* bezeichneter Bereich dient dem Einbringen von fremden DNA-Sequenzen mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Auch ist der wiederholte Einbau der Fremd-DNA an derselben oder nahezu selben Stelle möglich [85]. In diese *multiple cloning site* wird die Expressionskassette mit dem für die Minicircle-DNA gewünschten Gen von Interesse und dem zugehörigen Promotor eingebracht. Dieser Prozess wird als Klonierung bezeichnet (Abbildung 1.2.3). Außerdem sollte der Ausgangsparentalplasmid-DNA-Vektor in einer hohen Kopienzahl in *E. coli*-Zellen vorkommen, da das Ziel des Prozesses die Herstellung einer großen Menge der Parentalplasmid-DNA ist. Verwendet wird daher ein pUC-Replikationsursprung. Die bakteriellen pUC-Plasmide gehören zu den sogenannten *high copy number*-Plasmide die in einer besonders hohen Kopienzahl pro Bakterienzelle vorliegen [86].

Nach Verifizierung der korrekten Basenpaarsequenz mittels Doppelstrang-Sequenzierung wird die fertige, das gewünschte Gen von Interesse tragende, Parentalplasmid-DNA in einen geeigneten *E. coli*-Wirtsstamm transformiert. In diesem findet die Kultivierung und Replikation der Parentalplasmid-DNA statt. Als *E. coli*-Wirtsstämme werden Abkömmlinge des *E. coli*-Stammes K-12 eingesetzt, da dieser sich zur Vermehrung von Plasmid-DNA besonders gut eignet und Daten über Charakteristika dieser Stammvariationen vorliegen [87],[88]. Der *E. coli*-Wirtsstamm, welcher die Parentalplasmid-DNA trägt, wird hinsichtlich der erwarteten Charakteristika untersucht, bevor eine Masterzellbank dieses Stammes angelegt wird. Die Masterzellbank dient der Sicherstellung der Reproduzierbarkeit aller folgenden Kultivierungen. Die Herstellung der Minicircle-DNA wird zunächst im Labormaßstab durchgeführt. Schon zu diesem Zeitpunkt sollten Methoden und Laborumgebungen gewählt werden, die den *GMP*-Richtlinien und den Anforderungen der Gesundheitsbehörden entsprechen und unter diesen Voraussetzungen eine Herstellung im Industriemaßstab erlauben. Die Anpassung eines

Kultivierungsprozesses an einen größeren Maßstab (*scale up*) erfordert die Betrachtung mehrerer Parameter [89],[90]. Sowohl die Einstellungen der Temperatur und des pH-Wertes als auch die Regulation des Sauerstoffeintrags müssen während der Kultivierung im Bioreaktor zeitnah angepasst werden. Dabei können in großen Volumina Transportprobleme auftauchen, die im Labormaßstab nicht beobachtet oder vernachlässigt werden können, nun aber prozesslimitierend sind. Um dies zu vermeiden ist eine korrekte Maßstabsübertragung notwendig. Realisiert werden kann diese mittels Ähnlichkeitstheorie, welche dimensionslose Kennzahlen zur Beschreibung eines physikalischen Sachverhaltes verwendet. Dabei werden die Kennzahlen bei der Übertragung auf einen anderen Maßstab im Zahlenwert beibehalten und so die physikalischen Ähnlichkeit erhalten [89]–[91].

Für die Herstellung von Plasmid- bzw. Minicircle-DNA werden *Batch*- oder *Fed-Batch*-Verfahren eingesetzt. Im *Batch*-Verfahren werden zu Beginn der Kultivierung Wachstumsmedium und Bakterienzellen in das Kultivierungssystem, Schüttelkolben oder Bioreaktor gegeben und unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Die Zellen durchlaufen dabei die typischen Wachstumsphasen: Latenzphase, exponentielle Wachstumsphase, stationäre Phase und Absterbephase. Aufgrund der systembedingten Beschränkungen durch Nährstofflimitierung und Anreicherung von toxischen Stoffwechselprodukten sind die zu erreichenden Zelldichten und Produktkonzentrationen limitiert [92]. Mit dem *Fed-Batch*-Verfahren ist eine gezielte Zufütterung von Nährstoffen und somit eine kontrollierte Kulturführung möglich. So lässt sich eine Verlängerung der Kultivierungszeit mit höheren Zelldichten und höheren Produktkonzentrationen erzielen [92]. In Abhängigkeit der verwendeten Parameter ist die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen und die Gewinnung von Plasmid-DNA ein schneller Prozess [93]. Hier kann, im Gegensatz zu anderen Bakterienstämmen, schon die Kultivierung über Nacht (ca. 16-20 h) zu einem ausreichenden Anteil an Plasmid-DNA in der gewonnenen Biofeuchtmasse führen, so dass eine Kultivierung im *Batch*-Verfahren gut geeignet ist.

Hinsichtlich des Einsatzes der gewonnenen Plasmid- bzw. Minicircle-DNA in der medizinischen Forschung und Gentherapie sollte für die Kultivierungen ein tierproduktfreies Wachstumsmedium eingesetzt werden, welches den *GMP*-Richtlinien entspricht. Daher werden oftmals Sojapepton und Hefeextrakt verwendet [65],[93]–[95]. Es besteht außerdem die Möglichkeit synthetische Wachstumsmedien zu nutzen, welche zu vergleichbar hohen

Zelldichten in der Plasmid-DNA-Herstellung führen [96]. Eine hohe Produktivität des Kultivierungsprozesses zeichnet sich durch hohe Biofeuchtmasskonzentrationen mit einem hohen Anteil an Plasmid-DNA aus. Im Prozess der Herstellung von Minicircle-DNA wird die im *E. coli*-Kultivierungssystem gewonnene Parentalplasmid-DNA *in vivo* rekombiniert, so dass Miniplasmid- und Minicircle-DNA gebildet werden (Kapitel 1.2.1). Ein weiterer wichtiger Aspekt der Kultivierung zur Herstellung von Minicircle-DNA ist die Homogenität der Parentalplasmid-DNA während des Kultivierungsprozesses. Hierbei ist es Ziel die Parentalplasmid-DNA als superspiralisierte *ccc*-DNA (*covalently closed circle* DNA) zu gewinnen, um im Anschluss an den Rekombinationsprozess superspiralisierte Miniplasmid- und superspiralisierte Minicircle-DNA vorliegen zu haben. Die superspiralisierte Konformation der DNA-Moleküle ist biologisch aktiv und so für biopharmazeutische Anwendungen geeignet. Andere Konformationen, wie lineare oder *oc*-DNA (*open circle* DNA) müssen vom Zielprodukt *ccc*-Minicircle-DNA abgetrennt werden. [93]. Ein Kultivierungs- und Rekombinationsprozess sollte mindestens dreimal mit gleichbleibenden Ergebnis durchgeführt werden, um eine konstante Qualität der gewonnenen Biofeuchtmasse und der enthaltenden Plasmid- bzw. Minicircle-DNA sicherzustellen [61].

Im Anschluss an die Kultivierung und Rekombination der Parentalplasmid-DNA zur Gewinnung von Minicircle-DNA erfolgen die Zellernte und das Aufbrechen der Bakterienzellen. Mittels alkalischer Lyse wird Miniplasmid- und Minicircle-DNA aus den Bakterienzellen entlassen. Lysat aus *E. coli*-Zellen enthält in etwa 55% Proteine, 21% RNA, 3% chromosomale DNA, 3% Lipopolysaccharide, 3% Plasmid-DNA bzw. Rekombinationsprodukt und 15% andere Bestandteile [97]–[99]. Diese Bestandteile müssen von der Plasmid- und Minicircle-DNA getrennt werden. Insbesondere bei der Herstellung CpG-freier Plasmid und Minicircle-DNA ist die Entfernung von chromosomaler DNA wichtig, da diese viele CpG-Motive enthält [46]. Um möglichst wenig chromosomale DNA im Zelllysate vorliegen zu haben, sollten die Bedingungen der Kultivierung der Parentalplasmid-DNA so gewählt werden, dass nur wenig chromosomale DNA in den Zellen gebildet wird [61]. So kann eine aufwendige Entfernung der chromosomalen DNA erleichtert werden. RNA kann mittels Gabe von RNase abgebaut werden. Auch hier darf keine RNase tierischen Ursprungs eingesetzt werden.

Für die Trennung der Miniplasmid- und der Minicircle-DNA von anderen Bestandteilen des Lysates kommt hinsichtlich der *GMP*-Richtlinien ausschließlich eine chromatographische Trennung der Komponenten in Frage. Dabei beruht das gewählte Chromatographieverfahren auf der erforderlichen Reinheit der gewünschten Plasmid- und Minicircle-DNA. Zur Reinigung von Plasmid-DNA wird bevorzugt eine Anionenaustauscherchromatographie eingesetzt [100]–[104]. Auch für die Reinigung von Rekombinationsprodukten eignet sich die Anionenaustauscherchromatographie.

Im letzten Schritt des Minicircle-DNA-Herstellungsprozesses muss die Minicircle-DNA von der Miniplasmid-DNA und eventuellen Resten von Parentalplasmid-DNA getrennt werden [65]. Diese Aufgabe kann mit Hilfe verschiedener Methoden erfüllt werden. Miniplasmid- und Parentalplasmid-DNA können mit einer Restriktionsspaltung linearisiert werden, so dass die zirkuläre Minicircle-DNA mittels Ultrazentrifugation in Cäsiumchlorid abgetrennt werden kann [70]. Dabei entstehen bei geringen Ausbeuten allerdings hohe Kosten. Ein weiterer Ansatz ist der enzymatische Abbau von linearisierter Miniplasmid- und Parentalplasmid-DNA *in vivo*. Dabei wird die eingesetzte Endonuklease, welche die linearisierte DNA abbaut, zusammen mit der  $\phi$ C31-Integrase als mRNA exprimiert. Nach der Induktion der Rekombination und Bildung von Minicircle- und Miniplasmid-DNA erkennt die exprimierte Endonuklease eine spezifische DNA-Sequenz im Parentalplasmid-DNA-Rückgrat, welche sich auch in der Miniplasmid-DNA wiederfindet. So werden Parentalplasmid- und Miniplasmid-DNA innerhalb der Bakterienzellen linearisiert und von den *E. coli*-eigenen Exonukleasen abgebaut. Allerdings bleibt hier ein Restanteil von etwa 3% von Miniplasmid- und Parentalplasmid-DNA nachweisbar [105]. Auch eine Linearisierung der im gereinigten Rekombinationsprodukt vorliegenden Miniplasmid-DNA und ein anschließender Abbau mittels Exonukleasen *in vitro* ist denkbar. Eine weitere Möglichkeit der Gewinnung von Minicircle-DNA aus dem Rekombinationsprodukt ist eine affinitätschromatographische Reinigung der Minicircle-DNA. Dafür wird eine spezifische *tag*-Sequenz (*target minicircle identification sequenz*) auf der Minicircle-DNA eingesetzt, welche gezielt von einem an ein Chromatographiematerial gekoppeltes DNA-bindendes Protein gebunden werden kann [64].

### 1.3 Analytik der Minicircle-DNA

Aktive pharmazeutische Wirkstoffe (*APIs*), wie die in der Gentherapie eingesetzten DNA-Vektoren, müssen den *GMP*-Richtlinien entsprechen [84]. Der Herstellungsprozess von Minicircle-DNA mit dem Ziel einer biopharmazeutischen Anwendung als DNA-Vektor muss so ausgelegt sein, dass Qualitäts- und Sicherheitsansprüche erfüllt werden. Die Entwicklung eines Herstellungsprozesses muss daher von einer umfassenden Kontrolle der Prozessschritte und erzielten Ergebnisse begleitet werden, um auswertbare und vergleichbare Daten zu generieren. Dabei werden während des Herstellungsprozesses (*in process control*) Daten gesammelt und analysiert [65],[94]. Dieser Sachverhalt trifft für die Herstellung von Plasmid-DNA für biopharmazeutische Anwendungen ebenso zu wie für das Herstellungsverfahren von Minicircle-DNA. Während des Minicircle-DNA-Herstellungsprozesses werden Proben zu aussagekräftigen Zeitpunkten gewonnen und ausgewertet, um die Qualität der DNA zu gewährleisten. So erfolgen Analysen der konstruierten Parentalplasmid-DNA nach der Klonierung und Transformation in geeignete Zielzellen, als auch Kontrollen der durch Kultivierung und Rekombination der Parentalplasmide hergestellten Rekombinationsprodukte, welche aus Minicircle- und Miniplasmid-DNA bestehen. Die Trennung von Minicircle- und Miniplasmid-DNA und der Erfolg der anschließenden Reinigung der gewonnenen Minicircle-DNA werden ausgewertet. Für die Kontrollen stehen mehrere analytische Methoden zur Verfügung mittels denen die Parentalplasmid- und die hergestellte Minicircle-DNA untersucht werden. Diese analytischen Methoden gelten sowohl für den Herstellungsprozess von Plasmid- als auch Minicircle-DNA und sind in Tabelle 1.3.1 zusammengefasst.

Zur Bestimmung der Minicircle-DNA-Konzentration wird die Absorption der DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die DNA-Konzentration wird dabei durch die Relation  $\rho_{\text{dsDNA}} = A_{260 \text{ nm}} \cdot 50 \text{ [mg L}^{-1}\text{]}$  berechnet. Eine visuelle Begutachtung des Minicircle-DNA-Pellets nach der Fällung gibt erste Auskunft über die DNA-Güte. Mittels Rasterkraftmikroskopie können einzelne Minicircle-DNA-Moleküle abgebildet werden (Kapitel 1.3.2). Eine Bestimmung der Identität der hergestellten Minicircle-DNA ist von besonderer Wichtigkeit. Die agarosegelelektrophoretische Trennung der Produkte einer Restriktionsspaltung der Minicircle-DNA muss ein spezifisches Bandenmuster aufweisen. Eine genaue Bestimmung der Basenabfolge der Minicircle-DNA erfolgt mittels DNA-Sequenzierung des Doppelstranges.



Tabelle 1.3.1 Übersicht über die Bewertungskriterien der Qualität von Plasmid- und Minicircle-DNA und die zugehörigen analytischen Methoden (ergänzt nach Schlee *et al.* [65]).

<b>Kriterium</b>	<b>Analytische Methode</b>
DNA-Konzentration [mg mL <sup>-1</sup> ]	UV-Absorption bei 260 nm
Optisches Erscheinungsbild	Visuelle Begutachtung Rasterkraftmikroskopie ( <i>AFM</i> )
DNA-Identität	Restriktionsspaltung und agarosegelelektrophoretische Trennung ( <i>AGE</i> ) DNA-Sequenzierung
DNA-Konformation	Densiometrische Auswertung nach agarosegelelektrophoretischer Trennung ( <i>AGE</i> ) Kapillargelelektrophorese ( <i>CGE</i> )
DNA-Reinheit	UV-Absorptionsscan von 220 nm bis 320 nm
Verunreinigung durch RNA	Visuelle Begutachtung nach agarosegelelektrophoretischer Trennung ( <i>AGE</i> )
Verunreinigung durch chromosomale DNA	Visuelle Begutachtung nach agarosegelelektrophoretischer Trennung ( <i>AGE</i> ) Quantitative Polymerasekettenreaktion ( <i>PCR</i> )
Verunreinigung durch Proteine	UV-Absorptionsverhältnis $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$
Verunreinigung durch Endotoxine	Limulus-Amöbocyten-Lysat-Test ( <i>LAL-Test</i> )
Verunreinigung durch bakterielle und pilzartige Bestandteile	Bioburden-Untersuchung
Verunreinigung durch Parentalplasmid- und/oder Minicircle-DNA	Kontinuierliche Trennung von DNA mittels Dielektrophorese

Aus *E. coli*-Zellen isolierte Plasmid- und Minicircle-DNA mit identischer Nukleotidsequenz kann in verschiedenen Konformationen vorliegen [106]. Dabei werden die superspiralisierte *ccc*-Konformation (*covalently closed circle*), die *oc*-Konformation (*open circle*) und die lineare Konformation unterschieden. Außerdem können Oligomere der genannten Konformationen auftreten. Während des Minicircle-DNA-Herstellungsprozesses ist ein Vorkommen aller genannten Konformationen möglich. Für den Einsatz von Minicircle-DNA in biopharmazeutischen Anwendungen ist das Vorliegen von reiner superspiralisierter *ccc*-Minicircle-DNA vorgesehen, da diese das geringste Risiko der chromosomalen Integration besitzt und als intaktes Moleküle potentiell vollständig und effizient exprimiert wird [65]. Einen ersten Eindruck über die Konformationsverteilung der Minicircle-DNA wird über die

densitometrische Auswertung der agaroselektrophoretischen Trennung der DNA gewonnen. Die Kapillargelelektrophorese (CGE) ermöglicht eine sensitive Auftrennung und Bestimmung der vorliegenden DNA-Konformationen während des Herstellungsverfahrens (Kapitel 1.3.1). Der *ccc*-DNA-Anteil der hergestellten Minicircle-DNA soll einen Anteil von mindestens 90% erreichen, so dass von einer Homogenität der Minicircle-DNA gesprochen werden kann.

Die Untersuchung der Reinheit einer Minicircle-DNA-Lösung erfolgt mittels UV-Absorptionsscan von 220 nm bis 320 nm. Dabei muss das Maximum der Absorption bei einer Wellenlänge von 258 nm liegen. Verunreinigungen der Minicircle-DNA-Lösung durch RNA und chromosomale Bakterien-DNA werden durch visuelle Begutachtung nach agaroselektrophoretischer Trennung erkannt. Außerdem kann chromosomale Bakterien-DNA durch eine Polymerasekettenreaktion mit spezifischen Primern quantitativ bestimmt werden. Verunreinigungen der Minicircle-DNA durch Proteine werden mittels des Quotienten der Absorptionen bei  $\lambda=260$  nm und  $\lambda=280$  nm bestimmt. DNA absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 258-260 nm, Proteine bei 280 nm. Für reine DNA-Lösungen liegt der Wert für das Absorptionsverhältnisses  $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$  bei 1,8 bis 2,0 [107]. Bei Endotoxinen handelt es sich um Bestandteile der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien, z.B. *E.coli*-Zellen. Es sind Lipopolysaccharide, die aus einem lipophilen Lipidrest und einem hydrophilen Polysaccharidrest bestehen. Sie sind sehr stabil und können mittels Hitzesterilisation nicht zerstört werden. Endotoxine zählen zu den Pyrogenen und können in Säugetieren Fieber und andere physiologische Reaktionen wie Immunantworten hervorrufen [108],[109]. Mittels Limulus-Amöbocyten-Lysat-Test kann der Endotoxingehalt bestimmt werden. Für Minicircle-DNA-Lösungen darf der Endotoxingehalt  $100\text{ EU mL}^{-1}$  nicht überschritten werden. Die Bioburden-Untersuchung dient der Bestimmung der Population lebensfähiger Mikroorganismen in der Minicircle-DNA-Lösung. Um die Anwesenheit von Restparentalplasmid- und/oder Miniplasmid-DNA in der hergestellten Minicircle-DNA-Lösung auszuschließen, kann eine kontinuierliche Trennung von der DNA mittels Dielektrophorese erfolgen (Kapitel 1.3.3).

### 1.3.1 Kapillargelelektrophorese (CGE)

Plasmid- und Minicircle-DNA kann in drei verschiedenen Konformationen vorliegen [110],[111]. Die natürlich vorkommende und aktive Konformation ist die superspiralisierte (*covalently closed circular*) *ccc*-Konformation, bei der die um sich selbstgewundene DNA-Doppelhelix aufgrund der Torsionsspannung im geschlossenen DNA-Ring um sich selbstgekrümmt ist. In der offenkettigen (*open circle*) *oc*-Konformation ist einer der beiden DNA-Stränge gebrochen, und der offene Strang kann sich frei um den geschlossenen drehen. In der linearen Form liegt ein Doppelstrangbruch in der DNA vor, und die Ringstruktur ist aufgehoben. Zusätzlich können im Herstellungsverfahren von Plasmid- und Minicircle-DNA-Produktionsprozess oligomere Formen der DNA auftreten, welche auch die genannten Konformationen besitzen (Abbildung 1.3.1). Aufgrund der verschieden stark ausgeprägten Knäuelbildung besitzen die DNA-Konformationen eine unterschiedliche räumliche Größe und damit unterschiedliche elektrophoretische Mobilitäten. Die DNA-Konformationen können mittels Elektronen- und Rasterkraftmikroskop abgebildet werden (Kapitel 1.3.2 und 3.5).

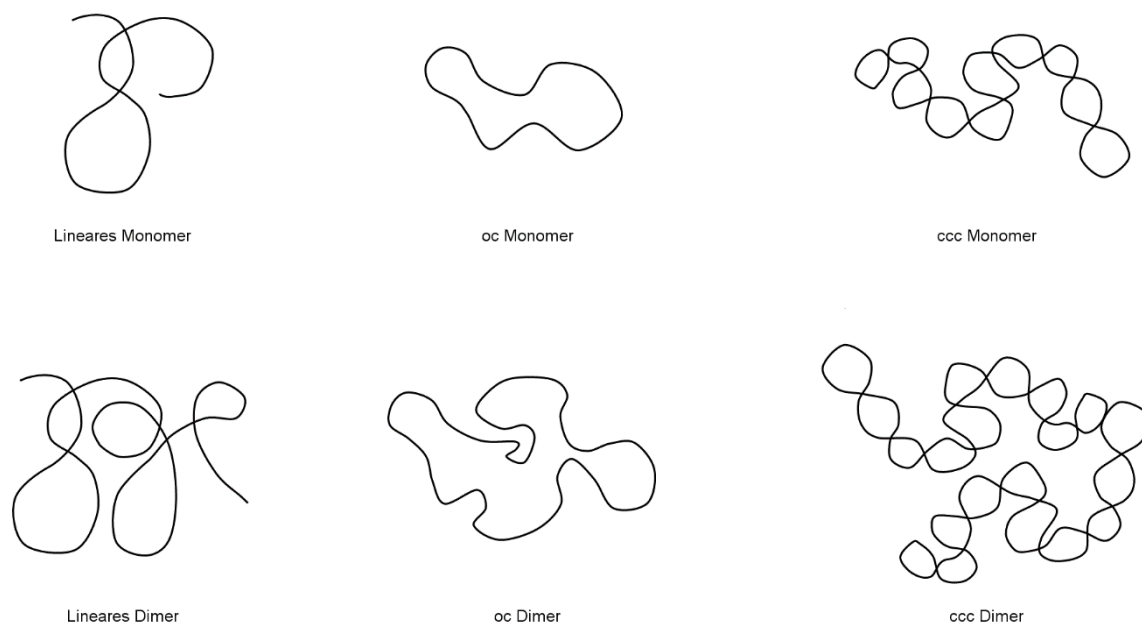


Abbildung 1.3.1 Schematische Darstellung der DNA-Konformationen.

Für den Einsatz von Plasmid- und Minicircle-DNA in der Gentherapie und biopharmazeutischen Anwendungen im Allgemeinen ist der Einsatz der *ccc*-Plasmid- bzw. Minicircle-DNA in reiner Form gefordert, da diese das geringste Risiko der chromosomalen Integration besitzt und als intaktes Molekül potentiell vollständig und effizient exprimiert wird [97],[112]. Die Plasmid- bzw. Minicircle-DNA-Homogenität ist aus pharmazeutischer Sicht daher ein wesentlicher Faktor. Zur Bestimmung der DNA-Konformationsverteilung wird die Kapillargelelektrophorese (*capillary gel electrophoresis, CGE*) eingesetzt, mit welcher die DNA-Konformationen sensitiv getrennt und bestimmt werden können. Die Trennung der DNA-Konformationen erfolgt aufgrund der elektrophoretischen Mobilität der DNA-Moleküle und des elektroosmotischen Flusses, welcher vom pH-Wert abhängig ist. Um die DNA-Moleküle detektieren zu können, werden diese mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie z.B. YOYO oder TOTO markiert.

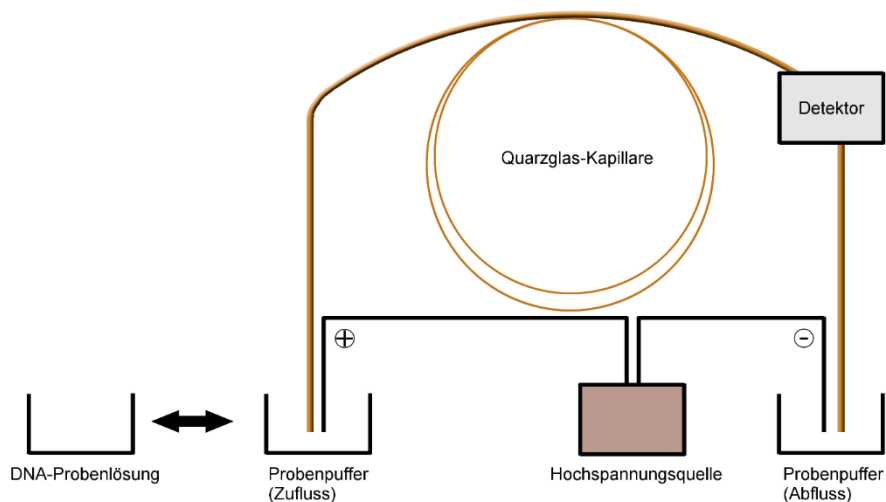


Abbildung 1.3.2 Schematischer Aufbau einer Kapillargelelektrophoresisapparatur.

Die Kapillargelelektrophorese ist in Bezug auf die erforderlichen Bauelemente eine einfache Technik, die aus einer mit Elektrolyt befüllten Kapillare, einer Hochspannungsversorgung und zwei Elektroden, zwei Pufferreservoirs und einem Detektor besteht (Abbildung 1.3.2.) Beim Kapillarmaterial handelt es sich meist um eine Kapillare aus amorphen Quarz. Es wird ein geringer Innendurchmesser der Kapillare gewählt, um eine effiziente Wärmeableitung zu

gewährleisten, so dass eine hohe Trennleistung erzielt werden kann. Die üblicherweise verwendeten Kapillaren haben einen Innendurchmesser von 50 – 100  $\mu\text{m}$ . Die Trennung findet bei einer elektrischen Feldstärke von mehreren hundert Volt pro Zentimeter statt. Der Strom, der durch die Kapillare fließt, ist aber aufgrund des kleinen Innendurchmessers gering und liegt bei etwa 100  $\mu\text{A}$ . Das Injektionsvolumen in der Kapillargelelektrophorese muss gering sein, um einen signifikanten Betrag zur Bandenverbreiterung zu vermeiden, und liegt bei etwa 10 nL.

Zusätzlich zur elektrophoretischen Geschwindigkeit der Ionen, ist in der Kapillargelelektrophorese der elektroosmotische Fluss (EOF) zu berücksichtigen. Die Gesamtgeschwindigkeit der Analytionen setzt sich aus der vektoriellen Summe der elektrophoretischen und elektroosmotischen Geschwindigkeit zusammen. Bei einem basischen pH-Wert ist der elektroosmotische Fluss üblicherweise höher als die Wanderungsgeschwindigkeit der Analytionen, bei einem sauren pH-Wert dagegen geringer (Abbildung 1.3.3). Daher werden bei einem basischen pH-Wert auch Anionen, wie die DNA-Analyte, durch den elektroosmotischen Fluss zur Kathode transportiert.

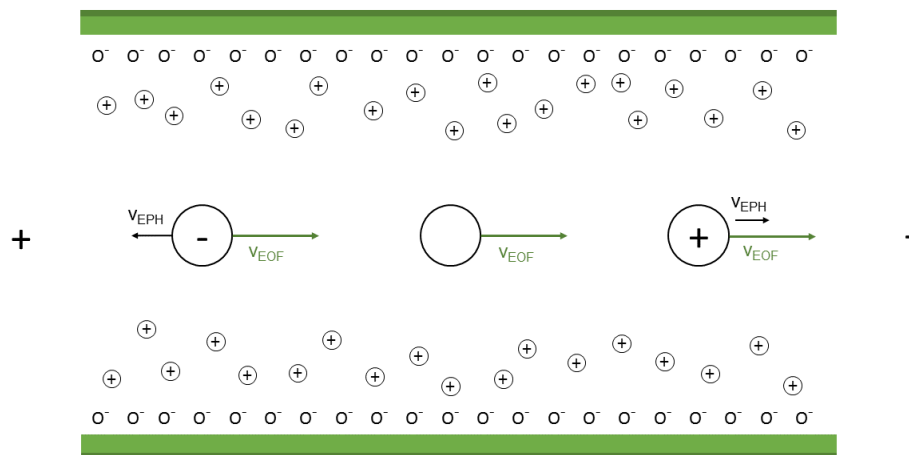


Abbildung 1.3.3 Schematische Darstellung der Wanderung von Ionen und Neutralteilchen in einer Kapillare mit elektroosmotischen Fluss ( $v_{EPH}$ : elektrophoretische Geschwindigkeit,  $v_{EOF}$ : elektroosmotische Geschwindigkeit) (verändert nach Lottspeich [113]).

Die Detektion der Analyte, in diesem Fall der fluoreszenzmarkierten DNA-Konformationen, erfolgt durch Messung der Fluoreszenz mittels laserinduziertem Fluoreszenz (LIF-)Detektor

direkt in der Kapillare nach etwa 20 -40 min. Die Signalintensität ist dabei direkt proportional der Intensität der eingestrahlten Anregungsenergie. Das Detektorfenster ist in der Regel deutlich schmaler als die Breite der Analytzone, um eine hohe Auflösung zu gewährleisten.

Die Vorteile der Kapillargelelektrophorese liegen in dem minimalen Probenvolumen, der geringen Zeitdauer und der hohen Auflösung. Die in der Analytlösung vorliegenden DNA-Konformationen werden sensitiv aufgetrennt und quantifiziert. Die Homogenität der durch das in dieser Arbeit vorgestellte Produktionssystem der Minicircle-DNA besitzt typischerweise einen *ccc*-DNA-Anteil von >90%.

### 1.3.2 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

DNA-Moleküle können mittels Rasterkraftmikroskopie abgebildet werden. Das Rasterkraftmikroskop (*atomic force microscope, AFM*) ist ein Gerät, mit dem Oberflächenstrukturen mit hoher Auflösung und Genauigkeit im Nanometermaßstab aufgezeichnet und atomare Bindungskräfte gemessen werden können [114]–[116]. Dabei wird eine scharfe Messspitze (*tip*), die an einer elastisch biegsamen Blattfeder (*cantilever*) sitzt, mittels piezoelektrischen Scanner über die Probenoberfläche geführt. Die Wechselwirkung zwischen Probenoberfläche und Messspitze führt positionsabhängig zu einer Verbiegung des *Cantilevers*. Diese Auslenkung der Spitze ist ein Maß für die zwischen Spitze und Probenoberfläche wirkenden atomaren Kräfte, zu denen die anziehenden Van-der-Waals- und Kapillarkräfte als auch die stark abstoßenden Kräfte aufgrund des Pauli-Prinzips und die Coulomb-Abstoßung der Kernladung gehören. Mit optischen Sensoren wird die Auslenkung hochauflösend gemessen, indem ein Laserstrahl auf das Ende des *Cantilevers* gerichtet und der reflektierte Strahl mit einem Vier-Quadranten-Detektor aufgefangen wird [117]. Auf diese Weise kann eine Topographie der Probenoberfläche erstellt werden.

Das Rasterkraftmikroskop kann in verschiedenen Betriebsmodi eingesetzt werden. Abhängig von der Wechselwirkung zwischen Messspitze und Probenoberfläche werden Kontakt-Modus und die dynamischen Anregungsmodi Nicht-Kontakt- und intermittierenden Modus (*intermittent contact mode* bzw. *tapping mode*) unterschieden. Bei der Kontakt-Messmethode steht die Spitze in direktem mechanischem Kontakt mit der zu vermessenden Oberfläche. Bei der Nicht-Kontakt-Methode wird die Blattfeder durch eine externe periodische Kraft zu

Schwingungen angeregt. Eine Veränderung der zwischen der Spitze und Oberfläche auftretenden Kräfte führt zur Frequenzverschiebung der Resonanzfrequenz des Schwingkreises und dient als Regelsignal. Im intermittierenden Modus wird die Blattfeder extern zu Schwingungen bei einer festen Frequenz nahe der Resonanzfrequenz angeregt. Diese verändert sich aufgrund von Wechselwirkungskräften zwischen Messspitze und der Probenoberfläche und führt zur Verschiebung der Schwingungsamplitude, welche als Regelsignal genutzt wird. Der intermittierende Modus kann bei Umgebungsbedingungen oder in Flüssigkeiten eingesetzt werden. Die Analyse der Oberflächenstruktur von DNA-Molekülen, wie Plasmid- und Minicircle-DNA, wird im intermittierenden Modus durchgeführt.

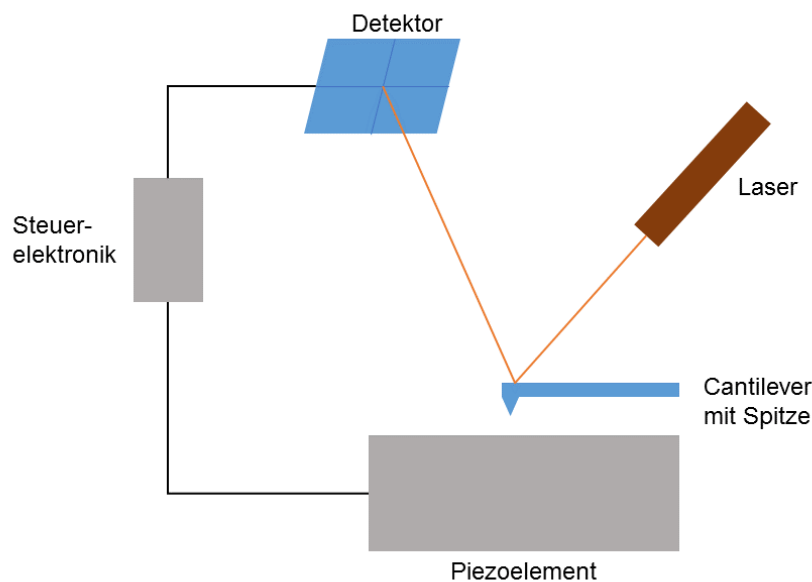


Abbildung 1.3.4 Schematische Darstellung des Aufbaus eines Rasterkraftmikroskops. Das Rasterkraftmikroskop besteht aus einem Scanner mit piezokeramischen Stellelementen, welche den Sensor bewegen, einer optischen Detektionseinheit zur Bestimmung der *Cantilever*-Auslenkung und einer Elektronik zur Datenaufnahme und Regelung. Die Veränderung der Auslenkung des *Cantilevers* beim Abtasten der Oberflächenstruktur ist ein Maß für die zwischen Spitze und Probenoberfläche wirkenden atomaren Kräfte. Diese Auslenkung wird mit optischen Sensoren hochauflösend gemessen, indem ein auf die Spitze gerichtet Laserstrahl reflektiert und mit einem Vier-Quadranten-Detektor aufgefangen wird.

### 1.3.3 Kontinuierliche Trennung von DNA mittels Dielektrophorese

Die intramolekulare Rekombination der Parentalplasmid-DNA ergibt die zwei zirkuläre DNA-Moleküle Minicircle- und Miniplasmid-DNA. Vor der Induktion der Rekombination ist

ausschließlich Parentalplasmid-DNA vorhanden. Unter optimalen Bedingungen wird die Parentalplasmid-DNA vollständig in Minicircle- und Miniplasmid-DNA getrennt (Kapitel 1.2.1). Mittels Agarosegelelektrophorese und Kapillargelelektrophorese (Kapitel 1.3.1) lassen sich Aussagen über Größe und Konformation der analysierten DNA-Moleküle treffen. Die kontinuierliche Trennung von DNA-Molekülen mittels Dielektrophorese in Mikrofluidikkanälen ermöglicht die Separation verschieden großer DNA-Moleküle als auch die Durchführung von Messungen kleiner Analytmengen und weitere nachfolgende Untersuchungen [64],[118]–[120]. Dabei können während der kontinuierlichen Trennung mittels Dielektrophorese bereits während einer laufenden Messung Aussagen über das Trennverhalten der Probelösung gemacht werden. Mikrofluidikkanäle zur Trennung von DNA-Molekülen besitzen eine Höhe von ca. 5,5  $\mu\text{m}$  und eine Breite von ca. 100  $\mu\text{m}$ . Dies entspricht in etwa dem Durchmesser eines Haares.

Als Dielektrophorese wird die Migration eines elektrisch polarisierbaren Teilchens innerhalb eines inhomogenen elektrischen Feldes bezeichnet [121]. Die dielektrophoretische Kraft bezeichnet die Kraft auf einen Dipol und wird mit der folgenden Formel ausgedrückt [121].

$$\vec{F} = \alpha(\vec{E} \cdot \nabla)\vec{E}$$

Es gibt zwei grundlegende Möglichkeiten das inhomogene Feld zu erzeugen. Zum einen kann das Feld mittels Mikroelektroden innerhalb des Mikrofluidikkanals erzeugt werden oder mittels einer nicht leitenden Kanalverengung z.B. in Form einer bogenförmigen Barriere (Abbildung 1.3.5) [122]. Diese zum Kanal querverlaufende, bogenförmige Barrierestruktur ermöglicht die kontinuierliche Auftrennung [81],[118],[123]. Die Barrieren haben eine Breite von ca. 10  $\mu\text{m}$  und bilden einen Nanospalt mit einer Höhe von 180 nm.

Die Dielektrophorese beruht auf der Polarisierbarkeit von Molekülen. Beim Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes verschieben sich positive Ladungen relativ zu negativen Ladungen des Moleküls. So wird ein elektrisches Dipolmoment induziert und das Molekül wird polarisiert [124]. Für das Dipolmoment  $\vec{p}$  in einem elektrischen Feld  $\vec{E}$  mit der frequenzabhängigen Polarisierbarkeit  $\alpha(\omega)$  gilt die folgende Formel.

$$\vec{p} = \alpha(\omega) \cdot \vec{E}$$



Das dielektrophoretische Potential  $W_{DEP}$  wird mit der Formel  $W_{DEP} = -\vec{p}\vec{E}$  definiert. Bei Anliegen eines elektrischen Wechselfeldes  $\vec{E}(t) = \sin(\omega t)\vec{E}$  und unter Berücksichtigung der Formel  $\vec{p} = \alpha(\omega) \cdot \vec{E}$  kann das über die Zeit gemittelte dielektrophoretische Potential mit der nachfolgenden Formel geschrieben werden.

$$W_{DEP} = -\alpha(\omega)\vec{E}^2$$

Die dielektrophoretische Kraft [125] wird mit folgenden Formel wiedergegeben.

$$\vec{F}_{DEP} = \vec{p}\nabla\vec{E}$$

Dabei wird angenommen, dass das polarisierte Teilchen eine homogene Dielektrizitätskonstante besitzt und eine sphärische Form aufweist. Für DNA-Moleküle treffen diese Voraussetzungen nicht zu, da es sich bei DNA um lineare Moleküle handelt, die in Flüssigkeit ein unregelmäßiges Knäuel bilden [126].

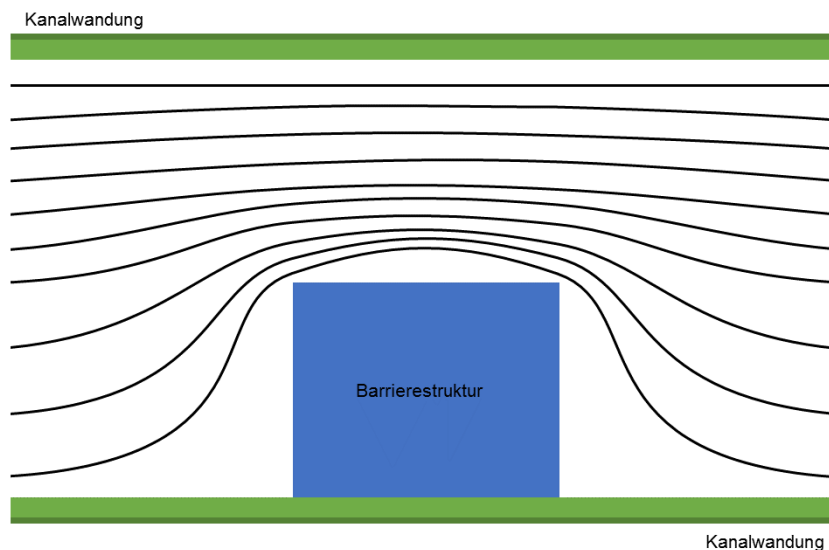


Abbildung 1.3.5 Schematische Darstellung der Erzeugung von elektrischen Feldlinien mittels einer nicht leitenden Kanalverengung (Aufsicht). Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

DNA-Moleküle bestehen aus einer Verknüpfung von Nukleotiden, welche jeweils aus einer Nukleinbase (Adenin, Guanin, Thymin oder Cytosin), einer Desoxyribosegruppe und einer

Phosphatgruppe aufgebaut sind und ein Nukleinsäurepolymer bilden. Die Nukleinsäuren sind in der Regel in einer Doppelhelix organisiert und besitzen ein Rückgrat aus alternierenden Desoxyribose- und Phosphatsäuregruppen, welche negativ geladen sind [127]. Die Polarisierbarkeit von DNA-Molekülen ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings wird davon ausgegangen, dass die Polarisierbarkeit auf einer Ionenwolke beruht, die die negativen Ladungen des DNA-Moleküls abschirmt und bei Anlegen eines elektrischen Felds verschoben wird [128],[129]. Dadurch wird eine räumliche Ladungstrennung erreicht (Abbildung 1.3.6).

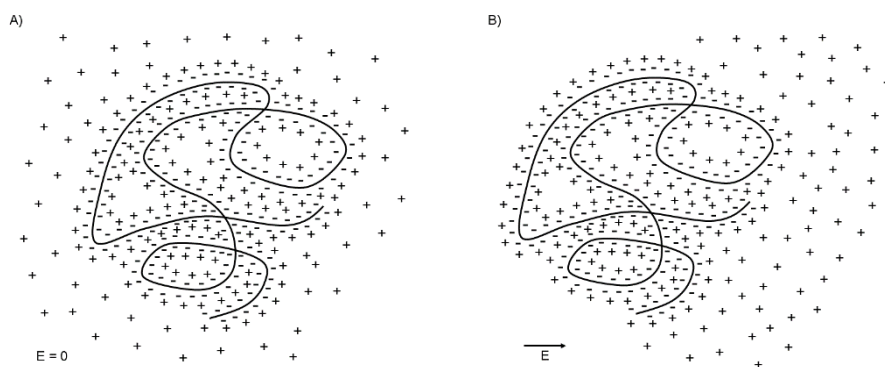


Abbildung 1.3.6 Schematische Darstellung der Polarisierbarkeit von DNA. A) negativ geladene DNA wird in Lösung von einer beweglichen Wolke aus Gegenionen gleichmäßig umgeben, so dass eine homogene Ladungsverteilung besteht. B) Die Gegenionwolke verschiebt sich bei Anlegen eines elektrischen Feldes und eine dielektrophoretische Kraft wirkt auf die DNA.

Für die Trennung von DNA-Molekülen verschiedener Größe werden diese mittels Elektrophorese durch elektrische Gleichspannungen durch den Kanal bewegt. Durch eine überlagerte Wechselspannung wird ein dielektrophoretisches Potential an der Barriere erzeugt. Die DNA-Moleküle können gefangen werden, wenn die dielektrophoretische Kraft an der Barriere über die elektrophoretische Kraft und die Brown'sche molekulare Bewegung überwiegt. Die Potentialtiefe ist unter anderem abhängig von der Polarisierbarkeit der Teilchen und damit auch von der Teilchengröße, so dass unterschiedlich große DNA-Moleküle voneinander getrennt werden können. Für die kontinuierliche Trennung steht eine Komponente der wirkenden Kraft senkrecht zur Flussrichtung, so dass es zur räumlichen Trennung kommt und bei erfolgter Separation die beiden Komponenten nebeneinander herfließen (Abbildung 1.3.7).

Im Gegensatz dazu wirkt bei der Gelelektrophorese oder Chromatographie die selektive Kraft in Flussrichtung, so dass die aufgetrennten Komponenten hintereinander herlaufen. Aufgrund der Abmessungen der Mikrofluidikkanäle zur Trennung von DNA-Molekülen (Breite ca. 100  $\mu\text{m}$ , Höhe ca. 5,5  $\mu\text{m}$ ) haben flächendominierende Effekte und die Viskosität eine große Bedeutung. Gravitation und Massenträgheit können vernachlässigt werden [130],[131].

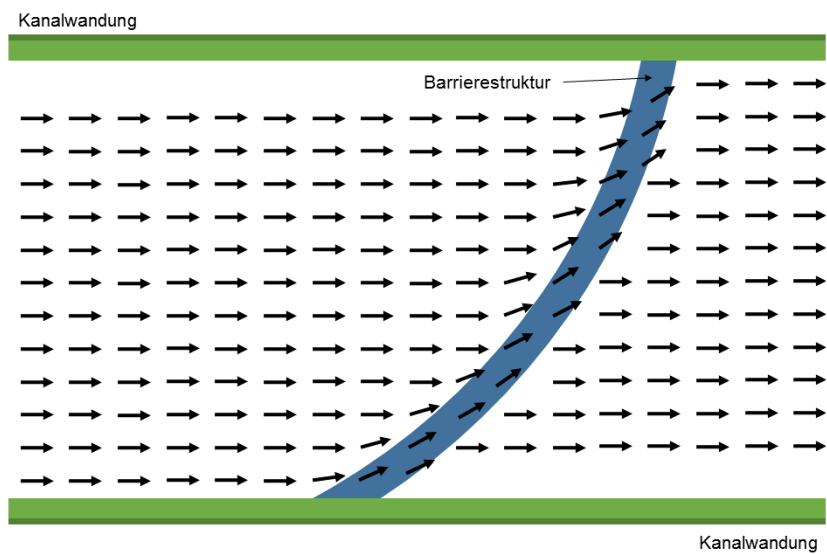


Abbildung 1.3.7 Schematische Darstellung der elektrischen Feldlinien in einem Mikrofluidikkanal mit nicht leitender Barrierestruktur (Aufsicht).

Die Vorteile der Separation im Mikrofluidikkanals liegen insbesondere in der Reduktion der Analytmenge und der Verkürzung von Separationszeiten. So kann schon nach wenigen Minuten analysiert werden, ob die Rekombination der Parentalplasmid-DNA vollständig war. Die Mikrofluidik ist eine Methode, mit der der Ansatz vom *Lab-on-the-chip* realisiert werden kann [132]–[134].

## 2 Methoden und Materialien

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Methoden und die verwendeten Materialien aufgeführt. Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Sigma-Aldrich und VWR bezogen. Wenn nicht anders angegeben wurden Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p.a. und zweifach destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet. Antikörper, Enzyme, und Komplettanwendungen sind im Text benannt. Listen der verwendeten Chemikalien und Geräte finden sich im Anhang.

### 2.1 Mikrobiologische Methoden und Materialien

#### 2.1.1 Stämme

In dieser Arbeit wurde mit den *Escherichia coli* (*E. coli*) K12-Stämmen DH5 $\alpha$ , ER2566 und TB1 gearbeitet. Die Stämme und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 2.1.1 dargestellt.

Tabelle 2.1.1 Verwendete *E.coli*-Stämme und deren Genotypen.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 $\alpha$	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80dLacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (LacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), $\lambda$ -	Hanahan 1985 [135],[136] Taylor 1993 [137]
ER2566	F- $\lambda$ - fhuA2 [lon] ompT LacZ::T7 gene 1 gal sulA11 $\Delta$ (mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10) (TetS) endA1 [dcm]	Fa. NEB, USA
TB1	F- $\Delta$ (Lac-proAB) [ $\Phi$ 80dLac $\Delta$ (LacZ)M15] rpsL(StrR) thi hsdR	Johnston 1986 [138] Yanisch-Perron 1985 [139]

Legende: siehe Anhang

Der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  besitzt eine Mutation im *recA1*-Gen. Das *recA1*-Gen ist für die Rekombination von DNA verantwortlich. Für die Klonierung von Genen, insbesondere Gene mit direkten Sequenzwiederholungen, ist das Fehlen des *recA1*-Gens sinnvoll, weil es so nicht zu unerwünschten Rekombinationsprozessen kommt. Daher wurde für die molekulare

Klonierungen der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  eingesetzt. Der Rekombinationsprozess der Parentalplasmid-DNA in Miniplasmid- und Minicircle-DNA ist von der Mutation im *recA1*-Gen nicht betroffen, da die *parA*-Resolvase, welche für die Rekombination der Parentalplasmid-DNA sorgt direkt auf dem Parentalplasmid kodiert ist (Kapitel 2.1.2). Neben den *E. coli*-Stämmen ER2566 und TB1, wurde hauptsächlich DH5 $\alpha$  zur Rekombination der Parentalplasmid-DNA in Minicircle- und Miniplasmid-DNA eingesetzt. Die Kultivierung im Schüttelkolben- und Bioreaktormaßstab, der in dieser Arbeit klonierten Parentalplasmide fanden in diesen drei *E. coli*-Stämmen statt. Dabei wurden die Rekombinationserfolge zunächst in DH5 $\alpha$  untersucht. Eine Transformation in ER2566 oder TB1 erfolgte nur, wenn das Ergebnis der Rekombination in DH5 $\alpha$  nicht zufriedenstellend war. Die Ausgangsparentalplasmid-DNA PP1150 wurde in TB1-Zellen hergestellt, die Ausgangsparentalplasmid-DNA PP0899 ER2566 wurde von der PlasmidFactory GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt.

### 2.1.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Parentalplasmide wurden aus den Ausgangsparentalplasmiden PP0899 bzw. PP1150 und den jeweiligen Plasmiden, die die gewünschte Genkassette enthielten, konstruiert. Alle während dieser Arbeit verwendeten Plasmide und die ausführlichen Klonierungsstrategien finden sich im Anhang (Kapitel 7.2). Die relevanten Eigenschaften der verwendeten Plasmid sind in Tabelle 2.1.2 aufgeführt. Außerdem wurde das Plasmid P0671, welches die Gensequenz zur Expression des Lac-Repressors besitzt, eingesetzt.

Die Parentalplasmid-DNA besitzt zwei Rekombinationssequenzen (*rec*), welche mit Hilfe der Rekombinase *parA*-Resolvase in einer spezifischen Weise intramolekular rekombinieren, so dass jeweils die Sequenzbereiche zwischen den Rekombinationssequenzen zu je einem Ring, nämlich Miniplasmid- und Minicircle-DNA, zusammen geschlossen werden (Kapitel 1.2.1). Die Gensequenz für die *parR*-Resolvase (*parR*) liegt direkt auf den jeweiligen Parentalplasmiden und wird mittels Arabinose-induzierbaren BAD-Promotor ( $P_{BAD}$ ) reguliert und exprimiert. In Abwesenheit von Arabinose fungiert das Regulatorprotein (*araC*) unter Ausbildung einer DNA-Schleife als Repressor der  $P_{BAD}$ -kontrollierten *parR*-Resolvase-Gene und es wird keine *parA*-Resolvase exprimiert. Die Regulatorprotein-Sequenz (*araC*) und die Genexpressionsverstärker-Sequenz (*ara gene enhancer*) werden mittels *araC*-Promotor kontrolliert. Außerdem findet sich die Erkennungssequenz (*lacO*), für das DNA-bindende

Protein Lac-Repressor auf der Parentalplasmid-DNA. Nach der intramolekularen Rekombination findet sich diese lac-Operator-Sequenz (*lacO*) auf der Minicircle-DNA, mit welcher diese spezifisch gereinigt werden kann (Kapitel 2.5). Als Selektionsmarker dient das Kanamycin-Resistenzgen (*Kan<sup>R</sup>*).

Tabelle 2.1.2 Plasmide und deren relevante Eigenschaften.

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
P0671	<i>Amp<sup>R</sup>; araC, lacI</i>	Fa. PlasmidFactory, DE
PP0899	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, lacO</i>	Fa. PlasmidFactory, DE
PP0904	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, lacO, SV40PolyA, gfp, P<sub>CMV</sub></i>	Fa. PlasmidFactory, DE
PP0962	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, E4, *E3*, E2A, VA, P<sub>RSV</sub>, cap, rep, MMTV-LTR</i>	Diese Arbeit
PP1150	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO</i>	Diese Arbeit
PP1239	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, n/a</i>	Diese Arbeit
PP1291	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, P<sub>H1</sub>, siGFP</i>	Diese Arbeit
PP1331	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, HBV1.6</i>	Diese Arbeit
PP1472	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, ITR, P<sub>TK</sub>, Hm<sup>R</sup>, TKPolyA, SV40PolyA, eGFP, P<sub>CMV</sub>, ITR, lacO,</i>	Diese Arbeit
PP1564	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, FVIII-A, C-FVIII-HA,</i>	Fa. PlasmidFactory, DE

Legende: siehe Anhang

### 2.1.3 Medien und Antibiotika

Nachfolgend sind die Zusammensetzungen und Herstellungsverfahren der in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien und Antibiotika aufgeführt.

Tabelle 2.1.3 Zusammensetzung der LB-Medien, LB+Glukose-Medien<sup>a</sup> und LB-Festagars.

Komponente	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	
	LB	LB1/2
Casein Pepton/Trypton	10	10
Hefeextrakt	5	5
NaCl	10	5
Agar-Agar <sup>b</sup>	15	15

<sup>a</sup>10fach Glukose [10 g L<sup>-1</sup>] separat autoklavieren, Zugabe nur bei LB+Glukose-Medium.

<sup>b</sup> Zugabe nur bei Festagar.

Tabelle 2.1.4 Zusammensetzung des HSG-Mediums und HSG+Glukose-Mediums<sup>a</sup>.

Komponente	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]
Casein Pepton/Trypton	13,5
Hefeextrakt	7
Glycerin (99%)	14,9
NaCl	2,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,14

<sup>a</sup> 10fach Glukose [10 g L<sup>-1</sup>] separat autoklavieren, Zugabe nur bei HSG+Glukose-Medium.

Tabelle 2.1.5 Zusammensetzung des SOC-Mediums.

Komponente	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]
Casein Pepton/Trypton	20
Hefeextrakt	5
NaCl	0,6
KCl	0,2
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	2
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,4
Glukose <sup>a</sup>	4

<sup>a</sup> 10 g L<sup>-1</sup> Glukose separat autoklavieren.

*E. coli*-Zellen wurden in sterilem LB-Medium, LB1/2-Medium oder HSG-Medium mit und ohne Glukosezusatz kultiviert. Nach Lösen der Medienbestandteile in destilliertem Wasser wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und das Medium durch Autoklavieren (25 min, 121°C) sterilisiert. Zur Herstellung des Transformationsmediums SOC wurden die Medienbestandteile abgewogen, in destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert (25 min, 121°C). Glukose (5,6 mM) wurde immer separat abgewogen, in destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert (25 min, 121°C). Die Flüssigmedien wurden bei Raumtemperatur, der Festagar bei 4°C und das SOC-Medium bei -20°C gelagert.

Je nach Antibiotikaresistenz auf der Plasmid-DNA wurden den sterilisierten Medien, die in Tabelle 2.1.6 aufgelisteten Antibiotikakonzentrationen zugefügt.

Tabelle 2.1.6 Verwendete Antibiotikakonzentrationen.

Antibiotikum	Konzentration [mg L <sup>-1</sup> ]
Ampicillin	200
Kanamycin	150

#### 2.1.4 Kultivierung von *E. coli* in Flüssigmedium und auf Festagar

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme (Kapitel 2.1.1) erfolgte immer unter sterilen Bedingungen bei 30°C oder 37°C. Für die Kultivierungen in LB-, LB1/2- und HSG-Flüssigmedien wurden Kulturröhrchen und Schüttelkolben mit den Volumina 14 mL, 30 mL, 300 mL, 500 mL und 1 L verwendet. Die Kultivierungen wurden ausschließlich in Schüttelkolben mit Schikanen (Fa. Schott Duran, Deutschland; Fa. Corning, Deutschland) und Silikonstopfen durchgeführt. Kultivierungen in größeren Volumina von 500 mL bis 25 L fanden in Bioreaktoren (Kapitel 2.2) statt. Kulturröhrchen (Fa. Greiner Bio-One, Deutschland) wurden für die Bereitstellung von Kultur für die Plasmidisolierung und die Herstellung von Glycerindauerkulturen eingesetzt. Schüttelkolbenkulturen wurden für die Herstellung kompetenter Zellen als auch für die Bereitstellung von Kultur für die Plasmidisolierung verwendet. Außerdem wurden Schüttelkolbenkultivierungen genutzt, um charakteristische Wachstumskurven für verschiedene Parentalplasmide, *E. coli*-Stämme und Kultivierungsmedien und Temperaturen aufzunehmen. Dazu wurden zu definierten Zeitpunkten Proben der Kulturbrühe entnommen und die optische Dichte gemessen. Die Kultivierung auf LB1/2-Festagarplatten erfolgte nach der Transformation der *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA und zur kurzfristigen Lagerung.



Kultivierungen im Kulturröhrchen wurden mit 5 mL Kultur in einem Kulturröhrchenschüttler (IKA KS 130, Fa. IKA®-Werke, Deutschland) bei 400 min<sup>-1</sup> bei einem Schüttelhub von 4 mm durchgeführt. Die Schüttelkolbenkultivierungen fanden auf einem Rotationsschüttler (IKA KS 4000, Fa. IKA®-Werke, Deutschland) bei einer Schüttelfrequenz von 120 min<sup>-1</sup> und einem Schüttelhub von 20 mm statt. Die Füllmenge lag in der Regel bei 10%. Bei Vorkulturen, sowie bei Kulturen für die Herstellung kompetenter Zellen, betrug der Füllgrad bis zu 25%. Übernachtskulturen wurden mit Glycerindauerkulturen oder mit Einzelkolonien von Festagarplatten beimpft. Bei der Kultivierung zur Herstellung von Rekombinationsprodukt im Schüttelkolbenmaßstab erfolgte die Induktion des P<sub>BAD</sub>-Promotors durch unsterile Zugabe von 10 g L<sup>-1</sup> L(+)-Arabinose (99%, Fa. Roth, Deutschland) während der exponentiellen Wachstumsphase. Vor und nach Zugabe der Arabinose wurden jeweils Proben für die Analytik gezogen. Die Kultivierung wurde nach Zugabe der Arabinose noch für einen Zeitraum von 30-60 min fortgesetzt, bevor die Kulturbrühe abgeerntet wurde. In Tabelle 2.1.7 findet sich eine Übersicht der Kultivierungsarten und ihrer Bedingungen.

Tabelle 2.1.7 Übersicht der Kultivierungsarten mit ihren Medien und zugehörigen Kultivierungsbedingungen.

Kultivierung	Stämme	Medium	Temperatur	Volumina	Dauer	
Gewinnung von Plasmid-DNA PP1150	VK <sup>a</sup>	TB1	LB1/2+Glu <sup>c</sup>	30°C	30 mL	6 h
	HK <sup>b</sup>	TB1	HSG	30°C	500 mL	über Nacht <sup>d</sup>
Gewinnung von Rekombinationsprodukt	VK <sup>a</sup>	DH5α	LB1/2+Glu <sup>c</sup>	30°C	30-100 mL	über Nacht <sup>d</sup>
		ER2566	HSG+Glu <sup>c</sup>			
		TB1				
	HK <sup>b</sup>	DH5α	LB1/2	37°C	0,1-25 L	2-6 h
		ER2566	HSG			
		TB1				
Gewinnung von Lac-Repressor-Protein	VK <sup>a</sup>	ER2566	LB1/2+Glu <sup>c</sup>	37°C	100 mL	4-6 h
	HK <sup>b</sup>	ER2566	LB1/2	37°C	10 L	über Nacht <sup>d</sup>

<sup>a</sup> VK=Vorkultur, <sup>b</sup> HK=Hauptkultur, <sup>c</sup> Glu=Glukose, <sup>d</sup> über Nacht beschreibt einen Zeitraum vom Nachmittag bis zum nächsten Morgen (ca. 16-20 h).

### 2.1.5 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte von *E. coli*-Kulturen erfolgt bei einer Wellenlänge von  $\lambda=600$  nm ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) in einem Photometer (Uvmini-1240, Fa. Shimadzu, Deutschland). Die Messungen erfolgten gegen ddH<sub>2</sub>O als Referenz. Für die Arbeit in einem linearen Bereich werden die Kulturen bei  $0,1 > OD_{600\text{ nm}} < 0,9$  nach entsprechender Verdünnung vermessen. Bei *E. coli* entspricht  $OD_{600\text{ nm}}=1$  ca.  $1 \times 10^9$  Zellen pro Milliliter.

### 2.1.6 Stammhaltung

Die kurzfristige Stammhaltung erfolgte für die *E. coli*-Zellen auf LB- bzw. LB1/2-Agar bei 4°C. Für die längerfristige Lagerung von *E. coli* wurden Glycerindauerkulturen angelegt, indem Flüssigkulturen steril mit 15 % Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert wurden.

### 2.1.7 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurden zwei 1 L Schüttelkolben mit jeweils 250 mL LB-Medium mit Übernachtskultur auf eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von ca. 0,1 angeimpft und bis zu einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von ca. 0,7 inkubiert. Es folgte eine Abkühlung der Zellen auf Eis für 15 min und anschließend ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4000g und 4°C. Das Pellet wurde mit eiskaltem ddH<sub>2</sub>O gespült und in 150 mL eiskaltem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die beiden Ansätze wurden vereinigt und für 15 min bei 4000g und 4°C abzentrifugiert. Nach Resuspension in 50 mL Glycerinlösung ( $150\text{ g L}^{-1}$ ) wurden die Zellen erneut wie zuvor abzentrifugiert und in 5 mL Glycerinlösung ( $100\text{ g L}^{-1}$ ) durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Anschließend wurden die kompetenten Zellen in 100  $\mu\text{L}$  Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden 50  $\mu\text{L}$  elektrokompetente *E. coli*-Zellen mit 2  $\mu\text{L}$  ionenfreier Plasmidlösung (100-300 ng) versetzt und 60 s auf Eis in einer vorgekühlten Küvette (0,1 cm Schichtdicke, Fa. BioRad, Deutschland) inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation in einem Bio-Rad Gene Pulser II mit Bio-Rad Pulse Controller Plus (Fa. Bio-Rad, USA) bei 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$  und 1,8 kV für 4-8 s. Direkt im Anschluss wurden die Zellen in 900  $\mu\text{L}$  vorgewärmtes SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. 50-100  $\mu\text{L}$

der Zellen wurden auf LB- bzw. LB1/2-Festagar mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

### 2.1.8 Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen wurden je zweimal 250 mL LB-Medium in 1 L-Schüttelkolben mit Übernachtskultur auf eine OD<sub>600 nm</sub> von ca. 0,2 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von ca. 0,8 inkubiert. Es folgte eine Abkühlung der Zellen auf Eis für 15 min und anschließend ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4000g und 4°C. Das Pellet wurde in 10 mL eiskaltem Puffer Nr. 1 (2 mM Tris-HCl [pH 7,4]; 0,1 M CaCl<sub>2</sub>) durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Die beiden Ansätze wurden vereinigt und für 15 min bei 4000g und 4°C abzentrifugiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4000g und 4°C wurde das Zellpellet in 10 mL eiskaltem Puffer Nr. 2 (2 mM Tris-HCl [pH 7,4]; 0,1 M CaCl<sub>2</sub>; 100 g L<sup>-1</sup> Glycerin) vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die kompetenten Zellen in 100 µL Aliquoten bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden 100 µL chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen mit 1 µL isolierten, superspiralisierten Plasmiden oder mit Ligationsansätzen (100-200 ng) versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die DNA-Aufnahme erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42°C für 30 s mit einer anschließenden Inkubation auf Eis für 30 min. Nach Zugabe von 900 µL SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. 100 µL der Zellen wurden auf LB- bzw. LB1/2-Festagar mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

## 2.2 Kultivierungen im Bioreaktor

Die Bioreaktorkultivierungen von *E. coli*-Zellen erfolgte in 2 L- (Infors Minireaktoren, Typ 8175088, Fa. Infors, Schweiz), 15 L- (ES10, B. Braun+Diessel Biotech, Deutschland), 42 L- (D1381, Fa. Bioengineering, Schweiz) und 30 L-Rührkesselbioreaktoren (D3021, Fa. Bioengineering, Schweiz mit BioSCADA Lab NLF Software zur Datenaufzeichnung) unter kontrollierten Bedingungen im *Batch*-Verfahren. Die Reinigung und Sterilisation der 2 L-Bioreaktoren erfolgte extern im Autoklaven (25 min, 121°C). Die 15 L-, 30 L und 42 L-

Bioreaktoren waren *in situ* sterilisier- und reinigbar. Die Bioreaktoren entsprachen in Abmessung und Aufbau den DECHEMA-Empfehlungen für Bioreaktoren (DECHEMA, 1991) und besaßen ein Höhe-Durchmesser-Verhältnis von 3 zu 1.

Der 15 L-, 30 L- und der 42 L-Rührkesselreaktor bestanden aus durchgehenden doppelwandigen Stahlgefäßen mit Ansatzstutzen für Messsonden. Die 2 L-Rührkesselreaktoren bestanden aus Glaszylindern. Die Deckel aller Bioreaktoren waren aus Edelstahl gefertigt und enthielten Durchgänge für die Zuluftleitung, die Abluftkühlung sowie verschiedene Stutzen zum Anschluss von Messsonden bzw. zur Ankoppelung von Vorlagegefäßen zur Dosierung von Säure, Base und Antischaummittel. Seitlich enthielten die Bioreaktoren jeweils vier Strombrecher und drei 6-Blatt-Scheibenrührer.

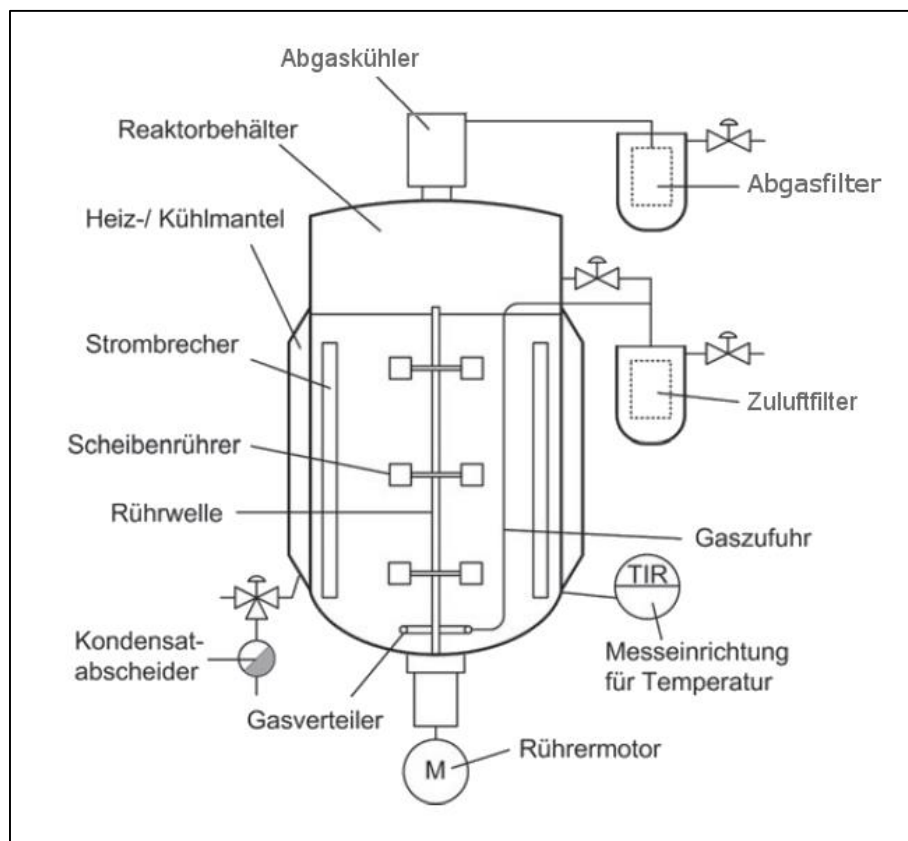


Abbildung 2.2.1 Schematischer Aufbau eines Rührkesselreaktors (verändert nach Sternad [92]).

Über einen Begasungsring am Boden wurde kontinuierlich mit einem konstanten Volumenstrom mit Luft begast. Die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium wurde durch polarographische O<sub>2</sub>-Sensoren bestimmt und über die Rührerdrehfrequenz geregelt. Die

Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Konzentration erfolgte in der Reaktorabluft. Die Temperierung der Bioreaktoren fand über die Doppelmäntel durch das geregelte Einleiten von Kühlwasser oder Heizwasser über eine elektrische Heizung statt. Der pH-Wert wurde durch pH-Einstabmessketten bestimmt und durch die geregelte Zugabe von 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> bzw. 2 M NaOH eingestellt. Eine konduktometrische Sonde diente zur Überwachung der Schaumbildung und löste ggf. die geregelte Zugabe von Antischaummittel (Pluronic® PE-8100, Fa. BASF, Deutschland) aus. Über dampfsterilisierbare Probenahmeventile im Deckel (2 L) und im Boden (15 L-, 30 L und 42 L) der Rührkesselreaktoren konnten Proben manuell entnommen werden.

Die Hitzesterilisation des mit Kulturmedium befüllten Bioreaktors wurde für 25 min bei 121°C durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte die Sterilisation der Zu- und Abluftstrecke. Nach dem Abkühlen auf die Soll-Temperatur wurden hitzempfindliche Mediumsbestandteile durch Septen sterilfiltriert in den Bioreaktor gegeben. Über ein Septum im Deckel wurde das getrennt autoklavierte Korrekturmittelbesteck mit Säure, Base und Antischaummittel angeschlossen. Vor dem Animpfen wurde die Vorkultur mikroskopisch auf Kontaminationen untersucht und die optische Dichte bestimmt. Sofern nicht anders angegeben betragen die Sollwerte für pH-Wert 7,0, für den relativen Sättigungsgrad des gelösten Sauerstoffs pO<sub>2</sub> 60%, für den Luftvolumenstrom  $V$  5 mL min<sup>-1</sup> und für die Rührerdrehgeschwindigkeit  $n$  200 min<sup>-1</sup>  $\leq n \leq 800$  min<sup>-1</sup>. Der pO<sub>2</sub>-Wert wurde, um eine Sauerstofflimitierung während der Kultivierungen zu vermeiden, durch stufenweise Erhöhung der Rührerdrehfrequenz konstant gehalten. Für Kultivierungen, die unter Sauerstofflimitierung (Kapitel 2.2.2 und 2.2.3) stattfanden, wurde die Rührerdrehgeschwindigkeit  $n$  konstant bei 200 min<sup>-1</sup> belassen und die pO<sub>2</sub>-Regelung ausgeschaltet. Die Kultivierungen fanden bei einer Temperatur  $T$  von 30°C oder 37°C statt. Nach Einstellung und Erreichen der Sollwerte wurde die Kultivierung durch Animpfen mit der Inokulationskultur durch ein Septum gestartet.

Nach beendeter Kultivierung wurde eine fest-flüssig Trennung der Kulturbrühe durch Zentrifugation für 6 min bei 7000 rpm (6K15, Fa. Sartorius, Deutschland) durchgeführt. Für die Bestimmung der DNA-Ausbeute nach einer Plasmidisolierung (Kapitel 2.3.1) wurden 100 µg der Biofeuchtmasse abgenommen und in ein 50 mL Reaktionsgefäß gefüllt. Der Rest der gewonnenen Biofeuchtmasse wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Rührkesselreaktoren wurden mit Hilfe eines alkalischen Reinigungsmittels gesäubert und mehrfach mit Wasser gespült und dann durch Abstellen der Energiezufuhr stillgelegt.

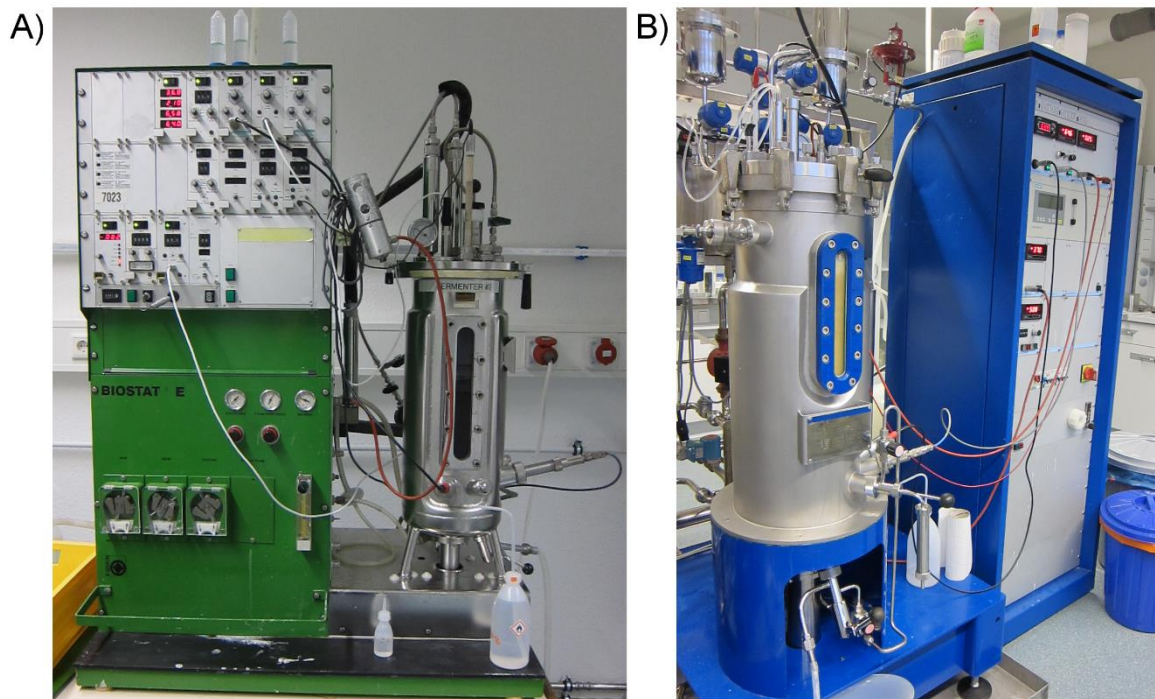


Abbildung 2.2.2 Fotografische Aufnahmen der eingesetzten Rührkesselreaktoren mit ihrer Peripherie. A) 15 L-Bioreaktor ES10, B. Braun+Diessel Biotech und B) 42 L-Bioreaktor D1381, Bioengineering.

### 2.2.1 Kultivierung zur Gewinnung der Ausgangsparentalplasmid-DNA PP1150

Zur Herstellung von Ausgangsparentalplasmid-DNA PP1150 wurde PP1150 Plasmid-DNA im *E. coli*-Stamm TB1 im Bioreaktor im *Batch*-Verfahren kultiviert. Die Vorkultur wurde in einem Volumen von 30 mL LB1/2 –Medium mit Glukose- und Kanamycinzusatz pro 300 mL Schüttelkolben bei 30°C ca. 6 Stunden lang angezogen. Angeimpft wurde die Vorkultur durch Zellen aus einer Glycerindauerkultur. Nach Beendigung der Vorkultur, Probennahme und Bestimmung der optischen Dichte wurden 500 mL Medium im 2 L Rührkesselreaktor (Infors Minireaktoren, Typ 8175088, Fa. Infors, Schweiz) mit 1,5-2,5 mL Kulturbrühe beimpft. Dazu wurde die Vorkultur steril über eine 60 mL Einmalspritze (Norm-Ject, Henke Sass Wolf) aus der Kulturflasche entnommen und dann mittels Kanüle (Braun, Sterican, Durchmesser 0,90x70 mm, 20 G x 2 3/4'') über ein Septum langsam in den Bioreaktor gegeben. Die Kultivierungen fanden bei 37°C in 500 mL HSG-Medium über Nacht bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 4-6 statt. Dann wurde die Kultivierung beendet, der Zeitpunkt notiert und die Kulturbrühe abgeerntet. Von den Proben aus Vorkultur und Biofeuchtmasse der Hauptkultur wurden Isolierungen der Plasmid-

DNA (Kapitel 2.3.1) und Testrestriktionen mit Enzymen, die die Ausgangsparentalplasmid-DNA PP1150 schneiden, durchgeführt (Kapitel 2.3.6). Außerdem wurde eine Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.3.4) durchgeführt und die DNA-Ausbeute bestimmt. Die Biofeuchtmasse wurde mittels alkalischer Lyse aufgearbeitet (Kapitel 2.3.2), das Lysat mittels Anionenaustauscherchromatographie (Kapitel 2.3.3) gereinigt und die DNA gefällt und in WFI resuspendiert (Kapitel 2.3.8 und 2.3.9).

## 2.2.2 Kultivierung zur Gewinnung der Rekombinationsprodukte im Bioreaktor

Zur Herstellung von Rekombinationsprodukt wurde die entsprechende Parentalplasmid-DNA in den *E. coli*-Stämmen DH5alpha, ER2566 und TB1 im Bioreaktor im *Batch*-Verfahren kultiviert. Die Vorkultur wurde in einem Volumen von 100 -200 mL LB1/2-Medium mit Glukose- und Kanamycinzusatz oder HSG-Medium mit Glukose- und Kanamycinzusatz pro 1 L Schüttelkolben bei 30°C über Nacht angezogen. Angeimpft wurde die Vorkultur durch Zellen aus einer Glycerindauerkultur. Nach Bestimmung der optischen Dichte wurde eine Probe der Vorkultur genommen, abzentrifugiert (30 s, 1100g) und bei -20°C gelagert. Der Rührkesselreaktor wurde so beimpft, dass eine Start-OD<sub>600 nm</sub> von 0,5 bis 1,0 gewährleistet war. Das Inokulieren der großen Bioreaktoren (15 L, 30 L und 42 L) erfolgte über sterile Zufütterungsflaschen über einen Stutzen. Die Kultivierungen im Bioreaktor fanden bei 30°C oder 37°C in HSG-Medium 2 bis 6 Stunden lang mit oder für sehr große Parentalplasmide (>20 kb) ohne pO<sub>2</sub>-Regelung statt. Bei der Kultivierung zur Herstellung von Rekombinationsprodukt im Bioreaktor erfolgte die Induktion des P<sub>BAD</sub>-Promotors durch unsterile Zugabe von 10 g L<sup>-1</sup> L-(+)-Arabinose (99%, Fa. Roth, Deutschland) aufgeschwemmt in ddH<sub>2</sub>O während der exponentiellen Wachstumsphase über einen Stutzen. Der Zeitpunkt der Induktion und die zugehörige optische Dichte wurden notiert. Vor und nach Zugabe der Arabinose wurden jeweils Proben für die Analytik gezogen. Die Kultivierung wurde nach Zugabe der Arabinose noch für einen Zeitraum von 30-60 min fortgesetzt, bevor die Kulturbrühe abgeerntet und die Biofeuchtmasse bei -20°C gelagert wurde. Von den Proben „Vorkultur“, „Vor Induktion“ und „Nach Induktion“ wurden Isolierungen der Plasmid-DNA (Kapitel 2.3.1 und 2.3.2) und Testrestriktionen mit Enzymen, die die entstandenen Minicircle- und Miniplasmid-DNA schneiden, durchgeführt (Kapitel 2.3.6). Außerdem wurde eine

Agarosegelelektrophorese und eine Gelauswertung (Kapitel 2.3.4) durchgeführt und die DNA-Ausbeute berechnet.

### 2.2.3 Kultivierung zur Gewinnung des Lac-Repressor-Proteins im Bioreaktor

Zur Herstellung des Lac-Repressor-Proteins wurde die Plasmid-DNA P0671 (pLacOslivb, Fa. PlasmidFactory, Deutschland) im *E.coli*-Stamm ER2566 im Bioreaktor (15 L ES10, B. Braun+Diessel Biotech, Deutschland) im *Batch*-Verfahren kultiviert. P0671 besitzt die Gensequenz für den Lac-Repressor und ein Arabinose-Operon mit der Gensequenz für das Regulatorprotein AraC. Die Expression des Lac-Repressors wird durch Arabinose induziert. Ist keine Glucose vorhanden, bindet das CAP-Protein an die CAP-Bindungsstelle und verhindert die DNA-Schleifenbildung und erleichtert so die Bindung des Regulatorproteins an *araI*. Zur Herstellung eines biotinylierten Lac-Repressors, muss dem Kultivierungsmedium vor Expression des Lac-Repressors D-(+)-Biotin supplementiert werden.

Die Vorkultur wurde in einem Volumen von 100 mL LB1/2+Glukose-Medium und Kanamycinzusatz in 1 L Schüttelkolben über 4-6 h bei 37°C angezogen. Angeimpft wurde die Vorkultur durch Zellen aus einer Glycerindauerkultur. Nach Bestimmung der optischen Dichte wurde eine Probe der Vorkultur genommen, abzentrifugiert (30 s, 1100g) und bei -20°C gelagert. Die Hauptkultur wurde in einem Volumen von 10 L LB1/2-Medium im Bioreaktor bei 37°C und einer konstanten Rührerdrehgeschwindigkeit  $n$  von 300  $\text{min}^{-1}$  und Sauerstofflimitierung kultiviert. Arabinose wurde zu Beginn der Kultivierung zugegeben, indem steril 50 g L-(+)-Arabinose (99%, Fa. VWR, Deutschland) in 250 mL destilliertem Wasser über eine Zufütterungsflasche in den Bioreaktor gegeben wurden. Außerdem wurden 100 mM steriles D-(+)-Biotin (Fa. Roth, Deutschland; Fa. VWR, Deutschland) gelöst in 100 mL Lagerungspuffer (50 mM Tris (pH 8,0), 500 mM NaCl) über eine Spritze mit Kanüle (Norm-Ject, Fa. Henke Sass Wolf, Deutschland; Sterican, Fa. B. Braun, Deutschland) supplementiert. Im Anschluss wurde angeimpft, indem 10-50 mL der Vorkultur steril über eine 20-60 mL Einmalspritze aus der Kulturfläche entnommen und dann mittels Kanüle (Norm-Ject, Fa. Henke Sass Wolf, Deutschland; Sterican, Fa. B. Braun, Deutschland) über ein Septum langsam in den Bioreaktor gegeben wurde. Es wurde über Nacht bis zu einer  $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$  von 5-10 kultiviert. Dann wurde die Kultivierung beendet, der Zeitpunkt notiert und die Kulturbrühe abgeerntet. Die Biofeuchtmasse wurde bei -20°C gelagert. Zur Überprüfung der in der



Kultivierung gewonnenen Lac-Repressor-Proteine wurden sowohl eine SDS-PAGE als auch ein Western-Blot des Gesamtzellproteoms durchgeführt (Kapitele 2.4.1 und 2.4.2).

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Isolierung von Plasmid- und Minicircle-DNA aus *E. coli*-Zellen

Die Isolierung von Plasmid- und Minicircle-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [140] mit anschließender Reinigung der Plasmide über eine Silica-Matrix.

Für die analytische Präparationen der Plasmid- und Minicircle-DNA in kleinen Biofeuchtmasse-Pellets aus Kulturröhrchen- und Schüttelkolbenkultivierungen wurde das NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit (Fa. Macherey-Nagel, Deutschland) bzw. das NucleoBond PC 20 Kit (Fa. Macherey-Nagel, Deutschland) eingesetzt, wobei nach Herstellerangaben vorgegangen wurde. Die Isolierung von Plasmid- bzw. Minicircle-DNA aus größeren Biofeuchtmasse-Pellets, gewonnen durch Kultivierungen in Schüttelkolben, wurde mittels NucleoBond PC 100, PC 500 PC 2000 und PC 10000 Kits (Fa. Macherey-Nagel, Deutschland) durchgeführt, wobei nach Herstellerangaben vorgegangen wurde.

Der Erfolg der Isolierungen wurde immer durch Trennung im Agarosegel überprüft und durch eine Vermessung bei  $\lambda=260$  nm im NanoDrop (Fa. Technologies NanoDrop®, USA) quantifiziert. Die Ausbeute an Plasmid- bzw. Minicircle-DNA wurde nach der folgenden Formel berechnet, wobei  $c_{DNA}$  die DNA-Konzentration der Probe [ $\text{mg mL}^{-1}$ ],  $V_{Resus}$  das Resuspensionsvolumen [mL],  $m_{BFM}$  die Biofeutmasse [mg] und  $Y_{DNA/BFM}$  die Ausbeute [ $\text{mg}_{DNA} \text{mg}_{BFM}^{-1}$ ] ist.

$$Y_{DNA/BFM} = \frac{c_{DNA} \cdot V_{Resus}}{m_{BFM}}$$

### 2.3.2 Alkalische Lyse und Klärung des alkalischen Lysats

Die alkalische Lyse dient der Freisetzung von Plasmid- und Minicircle-DNA aus *E. coli*-Zellen und besteht aus den drei Teilschritten Resuspension, Lyse und Neutralisation. Das Lysat wurde

im Anschluss durch einen Zentrifugationsschritt und Filtrationsschritt geklärt. Das folgende Protokoll wurde durchgeführt, um Plasmid- und Minicircle-DNA aus großen Biofeuchtmasse-Pellets (ab 100 g), gewonnen durch Kultivierungen im Bioreaktor, zu isolieren. Kleinere Biofeuchtmassen wurden mittels Komplettanwendungen (Kapitel 2.3.1) bearbeitet.

Für die alkalische Lyse wurden 100 g Biofeuchtmasse unter Rühren in 1,1 L Resuspensionspuffer (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA [pH 8,0]) resuspendiert. 1 kg der so gewonnenen homogenen Biomassensuspension wurden in eine 5 L Glasflasche überführt und mit 1 L Lysepuffer (0,2 M NaOH, 1% SDS) gemischt. Sobald die Lösung klar und viskos war, wurde für 5 min inkubiert. Anschließend wurde 1 L 10°C kalter Neutralisationspuffer (3 M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub> [pH 5,5]) zu der Suspension hinzugegeben und durch 6-8maliges vorsichtiges Schwenken gemischt. Es kam zur gleichmäßigen Aggregatbildung. Die folgenden Schritte der Lysatklärung fanden bei 2-10°C statt. Die Suspension wurde für 7 min bei 17000g und 2-10°C zentrifugiert (6K15, Fa. Sartorius, Deutschland). Die so gewonnene flüssige Phase, das klare Lysat, wurde in eine 2 L Glasflasche dekantiert und mit 0,5 mL rekombinatenter RNase (Rnase H, Fa. NEB, USA) versetzt. Im Anschluss folgte ein Filtrationsschritt, bei dem das Klarlysat über einen Vorfilter (5 µm Sartopure 300 PP2, Fa. Sartorius, Deutschland) und dann einen Sterilfilter (0,45 µm Sartobran 300 Sterile Capsule, Fa. Sartorius, Deutschland) mittels Schlauchpumpe (ISM1079, Fa. ISMATEC, Deutschland) filtriert wurde. Dabei betrug die Flussgeschwindigkeit zunächst 20 mL min<sup>-1</sup> und nach 5 min 100 mL min<sup>-1</sup>. Das sterilfiltrierte Klarlysat wurde in einer 250 mL Zellkulturflasche (Fa. VWR, Deutschland) bei 4°C über höchstens 4 Tage gelagert.

### 2.3.3 Anionenaustauscherchromatographie zur Plasmid- und Minicircle-DNA-Reinigung

Das durch alkalische Lyse gewonnene sterilfiltrierte Klarlysat (Kapitel 2.3.2) wurde mittels Anionenaustauscherchromatographie gereinigt. Dazu wurde zunächst eine Chromatographiesäule (XK26, Fa. GE Healthcare, Deutschland) mit 10 mL schwachen Anionenaustauschermaterial in 20% Ethanol, Kapazität 1 mg mL<sup>-1</sup>, Fa. Merck, Deutschland) gepackt. Zuvor musste das Säulenmaterial inklusive Schläuche und Verbindungen in HNO<sub>3</sub> für mindestens 1 h gereinigt und dann mit ddH<sub>2</sub>O gespült werden. Das gut durchmischte Anionenaustauschermaterial wurde mittig in die Säule gegossen und der Stempel der Säule bis kurz vor der Matrix eingeführt und festgedreht. Anschließend wurde die Säulenmatrix mit 20%

Ethanol über eine Schlauchpumpe (Minipuls 2, Fa. Gilson USA) mit einer Geschwindigkeit von  $7,5 \text{ mL min}^{-1}$  verdichtet, der Stempel auf den oberen Rand der Säulenmatrix gedreht, so dass alle folgenden Arbeitsschritte luftblasenfrei erfolgen konnten. Die verwendeten Puffer wurden jeweils aus Puffer A (0,5 M NaCl, 100 mM Tris, 10 mM EDTA [pH 7,0], Leitfähigkeit 53mS) und Puffer B (1 M NaCl, 100 mM Tris, 10 mM EDTA [pH 7,0], Leitfähigkeit 53 mS) hergestellt.

Zunächst wurde ein *Cleaning in Proces*-Schritt durchgeführt, bei dem 50 ml 0,5 M NaOH mit einer Geschwindigkeit von  $7,5 \text{ ml min}^{-1}$  über die Säule gegeben wurden. Anschließend wurde die Säulenmatrix mit 50 mL Äquilibrierungspuffer (10% B + 90% A) äquilibriert und dann die maximal 10 mg DNA-Lösung (Kapitel 2.3.2) aufgetragen, da 1 mL Anionenaustauschermaterial etwa 1 mg DNA binden kann. Es folgten zwei Waschschrte mit 50 mL Waschpuffer 1 (10% B + 90% A) bzw. 50 mL Waschpuffer 2 (25% B + 75% A). Daraufhin wurde die DNA in 3-4 Elutionsschritt mit jeweils 20 mL Elutionspuffer (60% B + 40% A) in sterile 50 mL Reaktionsgefäße eluiert. Zwischen den Elutionsschritt lagen jeweils 15 minütige Inkubationspausen. Zum Schluss wurde die Säulenmatrix mit einem weiteren *Cleaning in Proces*-Schritt mit 50 mL 0,5 M NaOH gereinigt. Die Wasch- und Spülschritte wurden bei einer Geschwindigkeit von  $7,5 \text{ mL min}^{-1}$ , die Elutionsschritt bei  $4 \text{ mL min}^{-1}$  durchgeführt.

Das dabei erzielte Plasmid-DNA-Eluat konnte im Anschluss mittels alkoholischer Präzipitation gefällt und eingestellt werden (Kapitel 2.3.8) und stand für die weiteren Qualitätskontrollen zur Verfügung.

#### 2.3.4 Agarosegelelektrophorese (AGE)

Die analytische und präparative Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese (AGE). Je nach Größe der Fragmente wurden  $8\text{-}20 \text{ g L}^{-1}$  Agarosegele in 1fach TAE-Puffer (20 mM Tris [pH 8,0], 2,5 Natriumacetat, 0,5 mM EDTA) verwendet. Die benötigte Agarosemenge wurde dabei in 1fach TAE-Puffer in der Mikrowelle (MW7803, 900 & Grill, Fa. Severin, Deutschland) bis zum Sieden erhitzt, das verdampfte Wasser mit destilliertem Wasser ersetzt und anschließend in die vorgesehenen Gießformen der Elektrophoresesysteme (Mupid-One, Fa. Advance, Japan; RuneOne Electrophoresis, Embi Tec,

USA) gegossen. Vor der Auftragung wurde den DNA-Proben 1/5 Volumen des 6fach konzentrierten Ladepuffers Bromphenolblau (Glycerin (30% v/v), 50 mM EDTA, Bromphenolblau (0,001% w/v)) bzw. des 6fach konzentrierten Ladepuffer Orange (Gel Loading Dye Orange (6x) Fa. NEB, USA), zugefügt. Wenn nicht anders angegeben, wurden 250 ng DNA pro Geltasche pipettiert. Als Größenstandard diente die 1 kbp DNA Ladder (Fa. PlasmidFacotry, Deutschland). Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 100-125 V cm<sup>-1</sup>. Im Anschluss wurden die Gele in 0,5 g L<sup>-1</sup> Ethidiumbromid für ca. 15 min gefärbt, in 1fach TAE-Puffer für ca. 5 min entfärbt und zur Darstellung der DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator (201301-IMB21-008, Fa. INTAS, Deutschland) bei einer Wellenlänge von  $\lambda=312$  nm sichtbar gemacht. Mittels einer CDD-Kamera (201301-IMB21-008, Fa. INTAS, Deutschland) wurden die Gelbilder digitalisiert.

Um die quantitativen Verhältnisse von Parentalplasmid-, Miniplasmid und Minicircle-DNA in agarosegelelektrophoretischen Trennungen zu bestimmen, wurden die Agarosegelbilder densitometrisch ausgewertet. Die Densitometrie ist die quantitative Messung der Farbdichte d.h. der Farbmenge pro Flächeneinheit. Dabei wird die Lichtabsorption in einer Bande im Agarosegel gemessen. Zwischen Farbmenge und optischer Dichte der Bande besteht ein linearer Zusammenhang, so dass eine quantitative Auswertung der Farbintensitäten in verschiedenen Banden des Agarosegels erfolgen kann. Für die densitometrische Auswertung von Agarosegelbildern wurde das Gelauswertungsprogramm *LabImage 1D* (Fa. Kapelan, Deutschland) eingesetzt.

Die Eckhardt-Agarosegelelektrophorese diente der schnellen Charakterisierung von Plasmiden. Dabei wurden mit Ligationsansätzen transformierte *E. coli*-Zellen direkt in der Tasche des Eckhardt-Agarosegels (1% Agarose, 20% SDS in 0,5fach TAE-Puffer) lysiert und die enthaltenen Plasmide durch die Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht getrennt [141]. Die transformierten Zellen wurden zunächst in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl [pH 7,4], 1 mM EDTA [pH 8,0]) resuspendiert und dann in SRL-Lösung (200 g/L Saccharose, 1,5 g/L Lysozym, 0,02 g/L RNase A) aufgenommen und auf das Gel appliziert. Als Größenstandard diente das unligierte Ausgangsplasmid und die 1 kbp DNA Ladder (Fa. PlasmidFacotry, Deutschland). Die Trennung erfolgte bei 50 V für 1 h. Anschließend wurde das Eckhardt-Agarosegel für 30 min in Wasser gewaschen, 30 min in 0,5 g L<sup>-1</sup> Ethidiumbromid gefärbt und 15 min in 1fach TAE-Puffer entfärbt. Unter UV-Licht (201301-IMB21-008, Fa. INTAS,

Deutschland) wurden die DNA-Banden bei einer Wellenlänge von  $\lambda=312$  nm sichtbar gemacht und mittels einer CDD-Kamera (201301-IMB21-008, Fa. INTAS, Deutschland) wurden die Gelbilder digitalisiert.

### 2.3.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von linearen DNA-Fragmenten mit bis zu einer Größe von  $<10000$  bp aus Agarosegelen erfolgte anhand des *NucleoSpin Gel and PCR-Clean-up Kits* (Fa. Macherey-Nagel, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Zuvor wurden die DNA-Fragmente kurzzeitig unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm visualisiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Konzentration der gereinigten DNA wurde mittels NanoDrop-Vermessung quantifiziert.



Abbildung 2.3.1 Fotografie des Versuchsaufbaus der Agarosegelelektrophorese durch eine ANX-Säule zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten  $>10000$  bp.

Die Aufreinigung linearer DNA-Fragmente von  $>10000$  bp wurde mittels Agarosegelelektrophorese durch eine Anionenaustauscher (ANX)-Säule (NucleoBond PC20, Fa. Macherey-Nagel, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurde eine Restriktion durchgeführt, um den gewünschten DNA-Kapitel linear vorliegen zu haben. Der Restriktionsansatz sollte etwa  $5000$  ng enthalten. Im Anschluss wurde eine Agarosegelelektrophorese des Restriktionsansatzes in einer sehr verbreiterten Tasche (ca.  $4$  cm) durchgeführt. Die Wunschbande wurde nach der Trennung ausgeschnitten, so dass ein Quader

von ca. 4 cm x 0,5 cm x 0,5 cm entstand. Dabei sollte der weiterzuverwendende Gelquader nicht mit Ethidiumbromid gefärbt sein. Daher empfahl es sich auf der anderen Seite des Gels einen Teil des Restriktionsansatzes gesondert aufzutragen und zu färben, um zu bestimmen, wie weit die Wunschbande gelaufen war.

Um eine größere Öffnung zu schaffen, wurde die Spitze der ANX-Säule abgeschnitten und die Säule mit 1 mL N2-Puffer (100 mM Tris, 15% Ethanol, 900 mM KCl, 0,15% Triton X-100 [pH 6,3] äquilibriert und mit 1 mL 1fach TAE-Puffer (20 mM Tris [pH 8,0], 2,5 Natriumacetat, 0,5 mM EDTA) gewaschen. Der Gelquader mit der Wunschbande wurde in die ANX-Säule gegeben, in die Gelelektrophoresekammer parallel zur Laufrichtung gelegt und mit 1fach TAE-Puffer beschichtet. Die ANX-Säule musste beschwert werden, so dass sie nicht davontreiben konnte. Die Agarosegelelektrophorese wurde bei 100 V für etwa 5-8 h laufen gelassen. Um eine Überhitzung der Kammer zu vermeiden wurde der TAE-Puffer jede Stunde gegen frischen Puffer ausgetauscht.

Im Anschluss an die Agarosegelelektrophorese wurde ANX-Säule mit Gelquader für 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren, um Flüssigkeitsreste zu entfernen. Der Gelquader wurde entfernt und mit Ethidiumbromid gefärbt, um zu verifizieren, dass die gesamte DNA in die Säule gelangt war. Die mit linearem DNA-Fragment beladene ANX-Säule wurde mit 1 mL 1fach TAE-Puffer gewaschen, dann mit 1 mL N2-Puffer äquilibriert, mit 3 mL N3-Puffer (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1,15 M KCl [pH 6,3]) gewaschen und mit 2x 400 µL auf 70°C erwärmten N5-Puffer (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1 M KCl, [pH 8,5]) eluiert. Anschließend wurde das Eluat mit 600 µL Isopropanol gefällt und 30 min bei 14500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µL 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer Trocknung von 30 min wurde das Pellet 1 h in 30 µL WFI resuspendiert. Die Konzentration der gereinigten DNA wurde mittels NanoDrop-Vermessung quantifiziert.

### 2.3.6 Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA

Der Restriktionsverdau von DNA-Molekülen wurde analytisch zur Charakterisierung oder präparativ zur Vorbereitung von DNA-Fragmenten für die molekulare Klonierung eingesetzt. Es wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II (FA. NEB, Deutschland; Fa. Fisher Scientific, Deutschland) verwendet, wobei die Hydrolyse der Phosphordiesterbindung

spezifisch innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz erfolgte. Die Restriktionsansätze wurden entsprechend der Herstellerangaben zusammengesetzt und enthielten das zugehörige Puffersystem.

Analytische Restriktionsansätze enthielten 100-200 ng DNA und wurden 10-60 min bei 25-37°C in 10 µL Ansätzen inkubiert. Für den präparativen Restriktionsverdau wurden 500-1500 µL DNA eingesetzt und in 30 µL Ansätzen 30-90 min bei 25-37°C inkubiert. Die Religation geschnittener Vektoren wurde durch die Dephosphorylierung der DNA-Fragmente mittels Zusatz von 1 U alkalischer Phosphatase (FastAP, Fa. Fisher Scientific, Deutschland) zu dem präparativen Restriktionsansatz verhindert. Zur Überprüfung des Spaltungserfolges und zur Dokumentation der Spaltungsmuster wurden die Restriktionsansätze durch Agarosegelelektrophorese getrennt. Sollten die DNA-Fragmente aus dem Gel aufgereinigt werden, wurde der gesamte Restriktionsansatz in eine Tasche des Agarosegels pipettiert, um die Gelmenge im Ansatz gering zu halten.

### 2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die molekulare Klonierung wurden die durch Restriktionsverdau gespaltene *Insert*-DNA-Fragmente in die ebenfalls durch Restriktionsverdau gespaltene Vektor-DNA ligiert. Für die Ligationen zwischen Vektor-DNA und *Insert*-DNA wurde ein molares Verhältnis von 1:5 bis 1:10 gewählt. Die Ligationen erfolgten in einem Reaktionsvolumen von 20-40 µL und enthielten neben dem Ligationspuffer 1 U T4 DNA Ligase (Fa NEB, Deutschland; Fa. Fisher Scientific, Deutschland). Die Ligationen wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

### 2.3.8 DNA-Fällung

Ligationsansätze für die Transformation in elektrokompetente *E. coli*-Zellen wurden gefällt, um Salze zu entfernen. Dafür wurden zu 20 µL Ligationsansatz 2 µL 2 M Natriumacetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) und 70 µL 100%iges Ethanol gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach einer Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung der Proben wurden diese in 2-

3  $\mu\text{L}$  nukelasefreiem Wasser resuspendiert. Für die Transformation in chemischkompetente Zellen war keine Bearbeitung des Ligationsansatzes nötig.

Die Isopropanol-DNA-Fällung dient der Reinigung und Konzentrierung von Plasmid-DNA und wurde für die Fällung von Restriktionsansätzen eingesetzt. Dazu wurden zu 1 Volumen Plasmid DNA Lösung 1 Volumen N5 Puffer (Fa. Macherey-Nagel, Deutschland) und 1,5 Volumen Isopropanol gegeben und gemischt. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 14000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$ . Im Anschluss wurde das DNA-Pellet mit 1,5 Volumen Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Resuspension der DNA erfolgte in TE- Puffer oder  $\text{ddH}_2\text{O}$ .

Die DNA-Fällung von Plasmid-DNA-Eluat der Anionenaustauscherchromatographie (Kapitel 2.3.3) und dem Minicircle-DNA-Eluats der DNA-Reinigung mittels Anionenaustauscherchromatographie (Kapitel 2.5.3) wurde präparativ mittels alkoholischer Präzipitation durchgeführt. Dazu sollte die DNA-Konzentration zwischen  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  und  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  liegen. Es wurden 200 mL Eluat in einem sterilen, endotoxinfreien 500 mL Zentrifugenbecher (Fa. Nalgene, USA) gefüllt und mit 50 mL Fällungspuffer (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1.5 M KCl [pH 7,0]) versetzt. Anschließend wurden 180 mL Isopropanol hinzugegeben und kräftig geschüttelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 30 min bei 17000g und  $10^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet 15 min mit 20 mL 70% Ethanol durch leichtes Schwenken gewaschen, so dass sich das DNA-Pellet von der Wandung löste. Das gewaschene DNA-Pellet wurde daraufhin in eine 125 mL Zellkulturflasche (Fa. VWR, Deutschland) überführt und etwa 1 h getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet in einem Volumen WFI bei Raumtemperatur resuspendiert, so dass eine Endkonzentration von über  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  erreicht wurde. Es folgte eine Einstellung der DNA-Konzentration (Kapitel 2.3.9). Außerdem wurde eine Testrestriktion (Kapitel 2.3.6) und eine Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.3.4) durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.9 Bestimmung und Einstellung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA aus Plasmid- und Minicircle-DNA-Isolierungen wurde durch eine NanoDrop-Vermessung bei  $\lambda=260 \text{ nm}$  (NanoDrop<sup>®</sup>, Fa. Technologies, Deutschland) quantifiziert. Dabei wurden 1-2  $\mu\text{L}$  der Nukleinsäurelösung eingesetzt. Die Konzentration wurde durch die Relation  $\rho_{\text{dsDNA}} = A_{260} \cdot 50 [\text{mg L}^{-1}]$  durch die NanoDrop ND-1000-Software



berechnet. Der Quotient der Absorption bei  $\lambda=260$  nm und  $\lambda=280$  nm gibt die Verunreinigung der DNA durch Proteine an. Proben, die einen Wert zwischen 1,8 bis 2,0 besaßen, wurden für die experimentellen Arbeiten genutzt.

Um Plasmid- und Minicircle-DNA in einer definierten DNA-Konzentration vorliegen zu haben, musste die wässrige DNA-Lösung eingestellt werden. Zu einer Lösung mit bekanntem Volumen und bekannter Plasmid- bzw. Minicircle-DNA-Konzentration wurde sich der gewünschten DNA-Konzentration schrittweise durch mehrfache Zugabe von WFI und wiederholtes Messen genähert. Um die geforderte Zielkonzentration zu erreichen, musste in jedem Schritt das hinzuzugebene Volumen an WFI berechnet werden. Vor der erneuten Bestimmung der DNA-Konzentration wurde durch Inkubation für 1 min bis 5 min auf dem Wipptisch, für eine ausreichende Durchmischung gesorgt. War die Zielkonzentration erreicht, wurde die DNA-Lösung bei 4°C gelagert.

Ein Reinheitsscan von Plasmid- und Minicircle-DNA-Endprodukt wurde mittels Einstrahlphotometer (UV mini 1240, Fa. Shimadzu, Japan) im Wellenlängenbereich von 220 nm bis 320 nm gemessen und aufgezeichnet. DNA weist ein Absorptionsmaximum bei 258 nm auf. Vor Durchführung des UV-Scans musste die DNA-Probe so verdünnt werden, dass die maximale Absorption unter dem Wert 1 lag.

#### 2.3.10 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der Sequenz der durch die molekulare Klonierung hergestellten Parentalplasmide wurden DNA-Sequenzierung durch die *Sequencing Core Facility* (CeBiTec, Universität Bielefeld) durchgeführt. Die Daten der Sequenzierungen wurden mit den theoretisch ermittelten Sequenzen anhand der Alignment-Funktion der *Clone Manager Professional Suite Version 8* (Fa. Scientific & Educational Software) verglichen. Die Sequenzen der verwendeten Plasmide finden sich auf der diese Arbeit begleitenden DVD.

### 2.3.11 Endotoxinbestimmung

Der gram-negative bakterielle Endotoxingehalt einer Plasmid- bzw. Minicircle-DNA-Lösung wurde mittels des kinetisch chromogenen Tests Kinetic-QCL<sup>®</sup> Kinetic Chromogenic Assay (Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kinetic-QCL<sup>®</sup> Fa. Lonza, Schweiz) nach Herstellerangaben bestimmt. Der Test weist eine hohe Sensitivität von 0,005 EU mL<sup>-1</sup> bis 10 EU mL<sup>-1</sup> auf. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Eingesetzt wurde das Programm Softmax Pro-Protocol (SoftMax Pro Microplate Data Acquisition & Analysis Software, Fa. Molecular Devices, USA). Für Plasmid- und Minicircle-DNA-Lösungen sollte der Endotoxingehalt unter 50 EU mL<sup>-1</sup> liegen.

### 2.3.12 Kapillargelelektrophorese (CGE)

Mittels kapillarelektrophoretischer Auftrennung (*capillary gel electrophoresis, CGE*) kann die Konformationsverteilung einer Plasmid- oder Minicircle-DNA schnell und zuverlässig bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde die Verteilung der am häufigsten auftretenden Plasmid- bzw. Minicircleformen untersucht. Dazu zählen die Konformationen *covalently closed circle* (ccc) als Monomer und Dimer, *open circle* (oc), und die linearisierte Form.

Die Kapillarelektrophorese fand in dem Gerät Beckman Coulter P/ACE MDQ Carbohydrate System (Fa. Beckman Coulter, Deutschland) mit eingebauter Kapillarkartusche und 488-520 nm laserinduziertem Fluoreszenz (LIF-)Detektor statt. Es wurde eine Kapillare mit einer Länge von 30 cm bis zum Detektorfenster und einem Innendurchmesser von 100 µm eingesetzt. Die Messungen erfolgten dabei nach Angaben des Herstellers und wurden mittels 32 Karat Software ausgewertet.

Zunächst wurden 3 mL 0,2% HPMC-4000 Puffer (Hydroxypropylmethylcellulose Viskosität 4000 cP, Fa. Sigma-Aldrich, USA) mit 3 mL TBE-Puffer (1x TBE; 89 mM TRIS Base, 89 mM Borsäure [pH 8,0], 2 mM EDTA-Na<sub>2</sub>) und 0,4 µL YOYO-1 (1 mM in DMSO, Fa. Invitrogen, USA) zusammengegeben und kräftig geschüttelt, um 0,1% HPMC-4000-Laufpuffer herzustellen. Je 1900 µL HPMC-4000-Laufpuffer wurden luftblasenfrei in HPLC-Schraubverschlussgefäße (Targets Viales, Fa. National Scientific, USA) gefüllt und in das Kapillarelektrophoresegerät eingesetzt. Zur Vorbereitung des Probenpuffers wurden 450 µL WFI und 0,33 µL YOYO-1 in ein Reaktionsgefäß (1,5 mL) pipettiert und kräftig durchmischt.

Außerdem wurde ein *CGE*-Standard ( $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  P0451, Fa. PlasmidFactory, Deutschland) hergestellt. Die zumessenden Proben wurden vorbereitet, indem je  $45 \text{ }\mu\text{L}$  Probenpuffer mit je  $1 \text{ }\mu\text{L}$  *CGE*-Standard oder  $1 \text{ }\mu\text{L}$  DNA-Probe gemischt wurden. Dabei sollten sich jeweils  $50 \text{ ng}$  DNA im Ansatz befinden. Die Ansätze wurden in PCR-Reaktionsgefäße ( $0,5 \text{ mL}$  Safe-Lock PCR-clean, Fa. Eppendorf, Deutschland) überführt und die Kapillargelelektrophorese gestartet.

## 2.4 Proteinanalytik

### 2.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist eine Methode zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Trennung erfolgte in vertikalen Tris-Glycin SDS-Polyacrylamidgelen mit einer Stärke von  $1 \text{ mm}$ , die zur Trennung von Proteinen mit Molmassen zwischen  $10$  und  $100 \text{ kDa}$  eingesetzt werden [142]. In dieser Arbeit wurde die SDS-PAGE eingesetzt, um den Gesamtproteingehalt von P0671-Zelllysat aufzutrennen und mittels Western-Blotting und immunologischer Detektion enthaltenen biotinylierten Lac-Repressor nachzuweisen.

Die verwendeten SDS-Polyacrylamidgele bestanden aus einem  $12,5\%$ igem Trenngel ( $125 \text{ g L}^{-1}$  Polyacrylamid) und einem vorgeschalteten  $5\%$ igem Sammelgel ( $50 \text{ g L}^{-1}$  Polyacrylamid). Dazu wurden zunächst die Komponenten des Trenngels (Tabelle 2.4.1) zusammengesetzt, zwischen die durch Silikondichtungen versiegelte Glasplatten gegossen und mit  $600 \text{ }\mu\text{L}$  2-Propanol überschichtet. Das Trenngel polymerisierte innerhalb von  $30 \text{ min}$  bei  $37^\circ\text{C}$  aus. Anschließend wurde das 2-Propanol durch Spülen mit Wasser entfernt, die Komponenten des Sammelgels auf das Trenngel gegossen und ein Kamm für die Probenfächer eingesetzt. Die Polymerisierung des Sammelgels erfolgte für  $10 \text{ min}$  bei  $37^\circ\text{C}$ .

Nach Entfernen der Käme und der Silikondichtungen wurden die Gele in die Elektrophoreseeinheit (Run One™ Electrophoresis Cell, Fa. Embi Tec, USA) eingesetzt und mit Elektrophoresepuffer ( $25 \text{ mM}$  Tris [pH 8,3],  $192 \text{ mM}$  Glycin,  $1 \text{ g L}^{-1}$ ) befüllt. Die Proteinproben wurden mit 4fach Lämmli-Puffer ( $500 \text{ mM}$  Tris-HCl;  $80\%$  [v/v] Glycerin;  $40\%$  [v/v] 2-Mercapthoethanol;  $160 \text{ g L}^{-1}$  SDS;  $80 \text{ mg L}^{-1}$  Bromphenolblau)  $5 \text{ min}$  auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt und auf die Gele appliziert.  $10 \text{ }\mu\text{g}$  Biofeuchtmasse mit Lac-Repressor (vgl.3.7) wurden in

750  $\mu\text{L}$  1fach Lämmli-Puffer resuspendiert aufgeschlossen. 10-20  $\mu\text{L}$  dieser Probe werden pro Tasche des SDS-Gels aufgetragen. Außerdem wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrolle aufgetragen. Die Größenordnung der Proteine konnte anhand eines Protein-Markers (PageRuler® Prestained Protein Ladder™, Fa. Fisher Scientific, Deutschland) abgeschätzt werden. Die Elektrophorese wurde bei 12 mA, 125 V (Tris-Gly-Pogramm, SE 300-10 A 1.0, MiniVEertical electrophoresis system, Fa. Hoefer, Deutschland) durchgeführt. Um Proteinbanden auf der SDS-PAGE zu visualisieren, wurde das Gel unter Schwenken mit einer Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung (10% [v/v] Essigsäure; 25% [v/v] Isopropanol; 2 g L<sup>-1</sup> Coomassie Brilliant Blau G-250) über Nacht gefärbt. Zum Entfärben des Hintergrunds wurde das Gel mehrmals mit Entfärber (10% Essigsäure, 25% Isopropanol, 65% H<sub>2</sub>O) etwa 1-3 h gewaschen bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Zur Digitalisierung der Gele wurden diese in Plastiktüten laminiert und eingescannt (HP Scanjet 5500c, Fa. Hewlett Packard, USA). Gele, die für den Western-Transfer und eine immunologische Detektion (Kapitel 2.4.2) vorgesehen waren, wurden nicht gefärbt, sondern direkt im Anschluss an die Elektrophorese geblottet.

Tabelle 2.4.1 Zusammensetzung der Tris-Glycin SDS-Polyacrylamidgele.

Sammelgel (5%)		Trenngel (12,5%)	
Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
ddH <sub>2</sub> O	775	ddH <sub>2</sub> O	1500
0,25 M Tris [pH 6,8]	1250	1 M Tris [pH 8,8]	2800
Bis-/Acrylamid (0,8%/30%)	425	Bis-/Acrylamid (0,8%/30%)	3000
5% SDS	50	5% SDS	150
10% Ammoniumperoxiddisulfat	35	10% Ammoniumperoxiddisulfat	60
TEMED	3	TEMED	4

#### 2.4.2 Western-Blotting und immunologische Detektion

Zur spezifischen Identifizierung der durch die SDS-PAGE getrennten Proteine, und des enthaltenen biotinylierten Lac-Repressors, wurden diese auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Roti®-PVDF, Fa. Roth, Deutschland) transferiert und anschließend immunologisch detektiert. Der Aufbau des Blottes bestand aus je einem zugeschnittenen Whatman-Filterpapier (Gel Blot Paper GB004, Fa. Whatman, USA) über und unter der Membran, die direkt auf dem Gel lag, und mehreren Schwämmchen. Die Filter und Schwämmchen wurden in Western-Transferpuffer (25 mM Tris-HCl [pH 8,3], 192 mM Glycin, 20% [v/v] Methanol) getränkt, die

Membran mit Methanol aktiviert und anschließend mit Transferpuffer benetzt. Der Transfer der Proteine auf die Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran (Immun-Blot® PVDF-Membran, Fa. Bio-Rad, USA) erfolgte für 45 min nach dem Prinzip des ElektrobloTTings im Tank-Blot-System (Run One™ Blotting Cell, Fa. Embi Tec, USA) bei einer Stromstärke von 250 mA. Dabei war das Blotmodul mit Western-Transferpuffer befüllt.

Nach dem Transfer wurden unspezifische Bindungen durch Schwenken der Membran in 50 g L<sup>-1</sup> Milchpulver in ddH<sub>2</sub>O für 1 h abgesättigt. Anschließend wurde die Membran 3x für 10 min in TBS-Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl) gewaschen, bevor in 25 mL TBS-Puffer mit 25 µL Alkalische Phosphatase-Streptavidin-Stammlösung (enthält 0,675 g BSA und 0,005 g Natriumazid) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Dabei band das AP-konjugierte Streptavidin an den biotinylierten Lac-Repressor auf der PVDF-Membran. Es wurden drei Waschschrirte mit TBS-Puffer durchgeführt. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte durch die Anlagerung an die alkalische Phosphatase (AP). Das AP-konjugierte Streptavidin wurde mit einer NBT/BCIP-Substratlösung (Fa. Roche, Deutschland) nachgewiesen. Dazu wurden 60 µL NBT (Nitro blue tetrazolium chloride)-Lösung (50 g L<sup>-1</sup> in 70% [v/v] Dimethylformamid (DMF)) mit 33 µL BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)-Lösung (50 g L<sup>-1</sup> in 100% [v/v] DMF), mit 10 mL Western-Färbe-Puffer (100 mM Tris-HCl [pH 9,5], 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) vermischt und auf die Membran gegeben. Die Reaktion resultierte in einer dunkelblauen Präzipitation, und die Membran wurde nach 1-2 min Inkubation mit destilliertem Wasser abgespült. Nach Trocknung der Membran wurde diese mit Hilfe des Scanners (HP Scanjet 5500c, Fa. Hewlett Packard, USA) digitalisiert.

## **2.5 Affinitätschromatographische Isolierung der Minicircle-DNA**

### **2.5.1 Beladung der Streptavidin-Magnetpartikel mit Lac-Repressor**

Als affinitätschromatographisches Matrix wurden paramagnetische SiMAG-Streptavidin-Magnetpartikel (SiMAG-Streptavidin, Fa. Chemicell, Deutschland) mit einem Durchmesser von 1,0 µm und einer Konzentration von 10 mg mL<sup>-1</sup>, die mit Streptavidin beladen waren, eingesetzt. SiMAG-Streptavidin-Magnetpartikel wurden mit dem Lac-Repressor aus der Biofeuchtmasse von P0671 beladen. Dazu wurden 20 g Biofeuchtmasse abgewogen und in vier Falcongefäße zu je 5 g portioniert und mit jeweils 25 mL Lagerungspuffer (50 mM Tris (pH

8,0), 500 mM NaCl) gewaschen (3 min, 5000 rpm). Die gewaschene Biofeuchtmasse wurde in je 25 mL Lagerungspuffer resuspendiert. Anschließend wurde 2,5 mL Lysozym-Stammlösung (55 mg mL<sup>-1</sup> Lysozym) und daraufhin je 200 µL Dnase I-Lösung (10 mg mL<sup>-1</sup>, Fa. NEB, Deutschland; Fa. Thermo Scientific, USA) dazugegeben und 60 min bei Raumtemperatur bei leichtem Schwenken inkubiert. Die erste Probe wurde mit einem Volumen von 20 µL (Gesamtzellaufschluss) genommen, mit 20 µL 2fach Lämmli-Puffer gemischt und bei 4°C gelagert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 30 min bei 20000g und 4°C und die Probe „Überstand nach Zentrifugation“ wurde abgetrennt. Um alle Zellwandbestandteile komplett abzutrennen wurde der Überstand filtriert (Spritzenvorsatzfilter, 0,45 µm, Fa. VWR, Deutschland) und auch vom „Überstand nach Filtration“ eine Probe genommen.

Die 20 mL SiMAG-Streptavidin-Magnetpartikel wurden in eine 250 mL Zellkulturflasche (Fa. VWR, Deutschland) überführt und 2x mit 50 mL Lagerungspuffer (50 mM Tris (pH 8,0), 500 mM NaCl) gewaschen. Die Trennung erfolgte dabei durch einen Magneten. Anschließend wurden die SiMAG-Streptavidin-Partikel mit ca. 100 mL P0671-Zellysat inkubiert. Nach der Trennung durch den Magneten wurde eine Probe (20 µL) „Durchlauf“ genommen. Es wurde wieder 2x mit 50 mL Lagerungspuffer gewaschen. Die nun mit dem biotinylierten Lac-Repressor beladenen Magnetpartikel wurden in 30 mL PBS+NaN<sub>3</sub> bei 4°C kurzfristig gelagert. Vor der Lagerung wurde eine weitere Probe „beladenen SiMAG-Streptavidin-Magnetpartikel“ genommen. Die Überprüfung der Beladung der SiMAG-Streptavidin-Magnetpartikel mit dem biotinylierten Lac-Repressor erfolgte anhand einer SDS-PAGE und eines Western-Blots.

### 2.5.2 Streptavidin-Magnetpartikel-Affinitätschromatographie

Für die Isolierung der Minicircle-DNA aus der Miniplasmid- und Minicircle-DNA-Mischung musste die Rekombinationsproduktlösung mit der Konzentration 1 mg mL<sup>-1</sup> in Bindungspuffer (50 mM Tris (pH 8,0), 400 mM NaCl) vorliegen. Der Bindungspuffer wurde immer frisch aus 1 M Tris (pH 8,0), 4 M NaCl und ddH<sub>2</sub>O angesetzt.

Die Separation der Minicircle-DNA erfolgte über an SiMAG-Straptavidin-Magnetpartikel gekoppeltes DNA-Bindeprotein, dem Lac-Repressor. Dazu wurden die beladene SiMAG-Streptavidin-Magnetpartikel 2x mit 40 mL Bindungspuffer gewaschen und äquilibriert. Anschließend wurde 12 min in 10 mL Rekombinationsprodukt-Ausgangslösung und 30 mL

Bindungspuffer inkubiert. Der anfallende Durchlauf wurde bei 4°C zwischengelagert. Es wurde 1x mit 40 mL Bindungspuffer gewaschen und 2x mit 40 mL Waschpuffer (50 mM Tris (pH 8,0), 1000 mM NaCl). Im Anschluss wurde 10 min mit 40 mL Elutionspuffer (50 mM Tris (pH 8,0), 500 mM NaCl, 5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)) eluiert. Das Eluat wurde bei 4°C zwischenlagern. Vor dem nächsten Lauf wurde wieder 2x mit 40 mL Waschpuffer gewaschen.



Abbildung 2.5.1 Fotografie der Materialien der Streptavidin-Magnetpartikel-Affinitätschromatographie zur Reinigung der Minicircle-DNA. In der Zellkulturflsche befinden sich die mit biotinylierten Lac-Repressor-Protein beladenen Straptavidin-Magnetpartikel, welche mittels der Magnetplatten (Hintergrund) von der flüssigen Pufferphase getrennt werden können.

Es wurden drei Läufe mit den Rekombinationsprodukt-Ausgangslösungen durchgeführt. Die 40 mL Durchlauf- und 40 mL Eluat-Fraktionen wurden 10 min bei 7000 rpm und 4°C abzentrifugiert, um letzte Magnetpartikel zu entfernen. Anschließend wurden jeweils 550 µL Probe „Durchlauf“ und 550 µL Probe „Eluat“ genommen und bei 4°C gelagert. Sollte auch die DNA-Konzentration in den Waschschrinen bestimmt werden, wurden diese aufgefangen und abzentrifugiert. Der Durchlauf aus den drei ersten Läufen konnte in weiteren Minicircle-DNA-Aufreinigungsläufen gereinigt werden. Nachdem alle Läufe abgeschlossen waren, konnten die beladenen SiMAG-Streptavidin-Magnetpartikel in 30 mL PBS+Natriumazid bei 4°C im Kühlraum für 1-2 Nächte gelagert werden.

Die DNA-Konzentrationen in den Proben „Durchlauf“ und „Eluat“ wurden bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch gegen TE-Puffer bestimmt. Dabei entspricht eine DNA-Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  eine  $\text{OD}_{260 \text{ nm}}$  von 0,05. Für die Überprüfung der Aufreinigung wurden die Rekombinationsprodukt-Ausgangslösung, Durchlauf- und Eluat-Fractionen gefällt und 250-500 ng DNA agarosegelelektrophoretisch aufgetrennt, um Miniplasmid-, Minicircle-DNA und eventuell Parentalplasmid-DNA zu unterscheiden und die Mengenverhältnisse abzuschätzen.

### 2.5.3 DNA-Reinigung mittels Anionenaustauscherchromatographie

Im Anschluss an die Magnetpartikel-Affinitätschromatographie (Kapitel 2.5) wurden die Minicircle-DNA-Eluat-Fractionen mittels Anionenaustauscherchromatographie (ANX) gereinigt und die enthaltenen Endotoxine abgereichert. Dieser Schritt wurde von der Fa. PlasmidFactory GmbH & Co. KG durchgeführt. Das dabei erzielte Minicircle-DNA-Eluat konnte anschließend mittels alkoholischer Präzipitation gefällt und eingestellt werden (Kapitel 2.3.9) und stand für die weiteren Qualitätskontrollen zur Verfügung.

## 2.6 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Rasterkraftmikroskopische Abbildungen wurden von der Parentalplasmid-DNA PP0904 und ihrem korrespondierenden Rekombinationsprodukt (MP0904 und MC0904) als auch von der Minicircle-DNA MC1291, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, aufgenommen. Es wurde das Rasterkraftmikroskop *Nanoscope Multimode AFM* (Fa. Veeco Instruments, USA), die *Controlsoftware Nanoscope IIIa* (Version 5.12r2, Fa. Digital Instruments, Italien) und der *Scanning Probe Image Processor* (SPIP) (Symmetric tip shape Version 4.4.3.0, Fa. Image Metrology, Dänemark) eingesetzt. Bei den Cantilevern handelte es sich um aluminiumbeschichtete Blattfedern (Rotated Monolithic silicon probe Tap300Al-G, Fa. Budget Sensors, USA).

Die Messungen wurden auf  $0,5 \text{ cm} \times 0,5 \text{ cm}$  großen Glimmerscheiben (Mica, Fa. Provac, USA) durchgeführt, die frisch mit Klebeband abgezogen und mit Nickelsulfat (Nickel(II)-sulfat, Fa. Roth, Deutschland) beschichtet wurden. Für die Nickelsulfatbeschichtung wurden  $4 \mu\text{L NiSO}_4$



(0,1 M, Fa. Sigma-Aldrich, USA) auf die Glimmerscheibe gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Scheibe vorsichtig mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Es folgte das Aufbringen von 1 µL DNA-Probe (0,1 ng µL<sup>-1</sup> bis 5 ng µL<sup>-1</sup>) und eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur, bevor die Glimmerscheibe nochmals mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und dann vorsichtig mit Stickstoff getrocknet wurde. Die präparierte Glimmerscheibe wurde dann auf einem magnetischen Metallplättchen fixiert und in die *AFM*-Vorrichtung gesetzt.

Für die rasterkraftmikroskopischen Abbildungen der Plasmid- und Minicircle-DNA wurde das Rasterkraftmikroskop (*AFM*) im *Tapping-Mode* betrieben. Der Scanbereich und der Offset des *AFMs* wurden vor der Annäherung an die Probe auf Null gesetzt. Die Messgeschwindigkeiten waren von der Größe des Scanbereichs abhängig, wobei die Messungen in einem 1-10 µm großem Bereich bei einer Geschwindigkeit von 1-2 Zeilen pro Sekunde stattfanden. Die Aufnahmen wurden immer mit 512 Punkten pro Zeile durchgeführt. Um ein größtmögliches Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen, musste die Messgeschwindigkeit und die Parameter des Cantilever während eines Scans optimiert werden. Die Anregungsamplitude betrug 20-100 V und die Frequenz 6 kHz. Die erzielten Aufnahmen wurden gespeichert und mit Hilfe der *Controllsoftware Nanoscope IIIa* und dem Bildbearbeitungsprogramm Gwyddion (GNU General Public License) hinsichtlich eines bestmöglichen Kontrastes bearbeitet.

## **2.7 Kontinuierliche Trennung von DNA mittels Dielektrophorese**

Die kontinuierliche Trennung von zirkulärer Parentalplasmid-DNA und korrespondierender Minicircle-DNA im Mikrofluidiksystem wurde von Dr. Martina Viefhues entwickelt und durchgeführt. Die dabei eingesetzten DNA-Proben wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

Getrennt wurden zirkuläre Parentalplasmid- und Minicircle-DNA. Die in diesem Experiment verwendete Parentalplasmid-DNA (PP0904) hatte eine Größe von 6754 bp und die zugehörige Minicircle-DNA (PP0904) eine Größe von 2257 bp (Fa. PlasmidFactory, Deutschland). Die vorherrschende DNA-Konformation (99%) war *ccc-(covalently closed circular)*-DNA, was mittels Kapilargelelektrophorese verifiziert wurde. Eingesetzt wurden die Parentalplasmid- und Minicircle-DNA in einem Volumenverhältnis von 1:3. Um die Bewegung der DNA-Moleküle verfolgen zu können, wurde sie in allen on-Chip-Messungen mit YOYO-1 (Fa. Invitrogen,

USA) fluoreszent markiert [123]. Die DNA-Stammlösung wurde in 1 mM Phosphatpuffer mit DDM-MC (n-Dodecyl)-D-Maltosid/Methylcellulose) und EDTA 1:100 verdünnt.

Es wurden ein Masterwafer aus Silizium und ein PDMS-Chip eingesetzt, welcher mittels Softlithographie hergestellt wurde. Dazu wurde ein mit Photolack strukturierter Siliziumwafer als Mastervorlage verwendet [143]. Die Kanalstruktur wurde mit DDM-MC beschichtet, um eine Bedingung der DNA an die Oberfläche zu verhindern. Der fertige Chip besaß eine Abmessung von ca. 1 cm x 1,5 cm. Die Kanalstruktur im Chip hatte eine Höhe von 5,5 µm und eine Breite von 100 µm. Die Barriere wurde durch Nanostrukturierung erzeugt und hatte eine Breite von 10 µm und eine Nanaospalthöhe von 180 nm. Befüllt wurde der Chip mit Phosphatpuffer (1 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) und der DNA-Probe über Reservoir 4. Es wurde eine Spannung von -7 V dc und 350 Hz bei 200 V an Elektrode 1, -7 V dc an Elektrode 3 und 2 V dc an Elektrode 4 angelegt. Elektrode 2 war geerdet. Die Messungen wurden auf einem invertierten Mikroskop (Axiovert 200, Fa. Zeiss, Deutschland) mit in xy-Richtung steuerbarer Stage (399S008, Fa. Ludl Electronic Products, USA) und 100-fach Öl-Imersionsobjektiv ausgeführt und wurden mittels Videomikroskopie aufgezeichnet. Die Helligkeit der Bilder wurde mittels ImageJ (Research Services Branch (RSB)) bestimmt. Die Zuordnung der Intensitäten zur Position erfolgte mittels Scangeschwindigkeit und Bildrate der Kamera, die die Verschiebung von Bild zu Bild berechnete. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität als Funktion der y-Position mit Origin (Fa. OriginLab Corporation, USA) aufgetragen [123].

Die Parentalplasmid- und Minicircle-DNA-Mischung wurde kontinuierlich über Reservoir 4 in das Mikrofluidiksystem eingespeist. Jeweils vor und hinter der Barriere wurde die Fluoreszenzintensität der y-Position aufgezeichnet. Die Versuche wurden unter identischen Bedingungen auch mit reinen Parentalplasmid-DNA und reiner Minicircle-DNA durchgeführt, um die DNA-Sorten sicher identifizieren zu können.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Abschnitt werden die erzielten Ergebnisse vorgestellt und diskutiert. Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion und Evaluation eines Minicircle-DNA-Systems zum nicht-viralen Gentransfer in biopharmazeutischen Anwendungen. Abbildung 2.7.1 zeigt eine Übersicht der im Einzelnen durchgeführten Schritte des entwickelten Minicircle-Herstellungssprozesses.



Abbildung 2.7.1 Übersicht des Herstellungsprozesses von Minicircle-DNA.

### 3.1 Konstruktion der Parentalplasmide und die daraus resultierenden Minicircle

Parentalplasmid-DNA besteht aus einem bakteriellen Rückgrat und der Genkassette mit den gewünschten Gensequenzen, die zwischen zwei Rekombinationssequenzen liegt. Durch eine intramolekulare Rekombination der beiden Rekombinationssequenzen wird die Parentalplasmid-DNA in Minicircle- und Miniplasmid-DNA geteilt (Kapitel 1.2.1). Die Minicircle-DNA enthält fast ausschließlich die Sequenzen der gewünschten Genkassette und ist somit frei von bakteriellen Sequenzen wie den Replikationsursprung und Antibiotikaresistenzgene. Die in dieser Arbeit verwendeten Parentalplasmide wurden aus den Ausgangparentalplasmiden PP0899 bzw. PP1150 und den jeweiligen Vektoren, die die gewünschte Genkassette enthielten, konstruiert. In Tabelle 3.1.1 und Tabelle 3.1.2 findet sich jeweils eine Auflistung der Parentalplasmid- und Minicircle-DNA, die im Folgenden beschrieben und diskutiert werden. Eine vollständige Liste aller während dieser Arbeit konstruierten und hergestellten Parentalplasmide, die zugehörigen Klonierungsstrategien und eine Liste der Minicircle sind im Anhang dargestellt. Auch Karten der Parentalplasmide und Minicircle finden sich im Anhang (Kapitel 7.2)

Tabelle 3.1.1 Parentalplasmide und deren relevanten Eigenschaften und Größen.

Parentalplasmid	Relevante Eigenschaften	Größe [bp]
PP0904	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, lacO, SV40PolyA, gfp, P<sub>CMV</sub></i>	6754
PP0962	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, E4, *E3*, E2A, VA, P<sub>RSV</sub>, cap, rep, MMTV-LTR (pDP2r)</i>	26367
PP1150	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO</i>	4698
PP1239	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, n/a</i>	7428
PP1291	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, P<sub>HI</sub>, siGFP</i>	4998
PP1331	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, HBV1.6</i>	8808
PP1472	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, ITR, P<sub>TK</sub>, Hm<sup>R</sup>, TKPolyA, SV40PolyA, eGFP, P<sub>CMV</sub>, ITR, lacO,</i>	8965
PP1564	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, FVIII-A, C-FVIII-HA,</i>	11329

Legende: siehe Anhang

Tabelle 3.1.2 Minicircle und deren relevanten Eigenschaften und Größen.

<b>Minicircle</b>	<b>Relevante Eigenschaften</b>	<b>Größe [bp]</b>
MC0904	rec, <i>lacO</i> , <i>lacO</i> , SV40PolyA, <i>gfp</i> , P <sub>CMV</sub>	2257
MC0962	rec, <i>lacO</i> , <i>E4</i> , * <i>E3</i> *, <i>E2A</i> , <i>VA</i> , P <sub>RSV</sub> , <i>cap</i> , <i>rep</i> , MMTV-LTR	21870
MC1239	rec, <i>lacO</i> , n/a	2931
MC1291	rec, <i>lacO</i> , P <sub>H1</sub> , <i>siGFP</i>	501
MC1331	rec, <i>lacO</i> , <i>HBV1.6</i>	4311
MC1472	rec, ITR, P <sub>TK</sub> , <i>Hm<sup>R</sup></i> , TKPolyA, SV40PolyA, <i>eGFP</i> , P <sub>CMV</sub> , ITR, <i>lacO</i>	4468
MC1564	rec, <i>FVIII-A</i> , <i>C-FVIII-HA</i> ,	6832

Legende: siehe Anhang

### 3.2 Herstellung der Ausgangsparentalplasmid-DNA

Die Ausgangsparentalplasmid-DNA PP1150 stellt als Klonierungsvektor die Grundlage der Konstruktion der Parentalplasmid-DNA zur Herstellung von Minicircle-DNA dar. Der Vektor wird genutzt, um die gewünschte Genkassette durch Klonierung aufzunehmen, zu vermehren und im Anschluss durch gezielte Induktion die Rekombination des Parentalplasmid-DNA-Vektors mit gewünschter Genkassette in Miniplasmid- und Minicircle-DNA zu bewirken (Kapitel 1.2.1 und 2.2.2). Während der Herstellung der Ausgangsparentalplasmid-DNA PP1150 muss eine Rekombination der DNA verhindert werden, da nur reine, stabile PP1150-DNA in der Lage ist Genkassette durch Klonierung aufzunehmen und später in Miniplasmid- und Minicircle-DNA zu rekombinieren. Die Reinheit der Ausgangsparentalplasmid-DNA und die Stabilität dieses Vektors sind daher von besonderer Wichtigkeit. Kultivierungsbedingungen, die eine nicht induzierte Rekombination der Parentalplasmidausgangs-DNA zur Folge haben, sind auch für die spätere Minicircle-DNA-Herstellung zu vermeiden, da diese die verfrühte, nicht induzierte Rekombination des Parentalplasmids mit Genkassette bewirken könnten. Eine nicht induzierte Rekombination in einer frühen Phase der Hauptkultivierung hat geringe Minicircle-DNA-Ausbeuten zur Folge, da die Minicircle-DNA nicht in der Lage ist sich zu replizieren (Kapitel 1.2.1).

Die Kultivierungen zur Herstellung der Ausgangsparentalplasmid-DNA PP1150 wurden im *E.coli*-Stamm TB1 in 500 mL-Volumen in 2 L-Bioreaktor (Infors Minireaktoren, Typ 8175088, Fa. Infors, Schweiz) durchgeführt (Kapitel 2.2.1). Die Kultivierungsdauer betrug 16 bis 18

Stunden. Die Kultivierungen von Ausgangsparentalplasmid-DNA PP1150 fanden in Vorkulturen in LB1/2-Medium mit Glukose- und Kanamycinzusatz bei 30°C und Hauptkulturen ohne Glukosezusatz in a) LB1/2-Medium bei 30°C, b) LB1/2-Medium bei 37°C, c) HSG-Medium bei 30°C und c) HSG-Medium bei 37°C statt. Die Vorkultur enthielt Glukose, da auch in der Vorkultur, die zur Herstellung von Rekombinationsprodukt eingesetzt wurde, ein Glukosezusatz die vorzeitige Expression der parA-Resolvase und damit die vorzeitige Rekombination der Parentalplasmid-DNA ausschließen sollte. Die Anwesenheit von Glukose reprimiert die Expression der parA-Resolvase-Gene, so dass Rekombination des Parentalplasmid-DNA verhindert wird (Kapitel 1.2.1). In der Hauptkultur wurde auf den Glukosezusatz verzichtet, da eine nicht induzierte Rekombination in Miniplasmid- und Minicircle-DNA nicht aktiv unterdrückt werden, sondern Kultivierungsbedingungen festgestellt werden sollten, die die Stabilität der Ausgangsparentalplasmid-DNA aufzeigen. In Abbildung 3.2.1 sind die Ergebnisse der Herstellung von Ausgangsparentalplasmid-DNA dargestellt.

Kultivierungen, deren Hauptkultur in b) LB1/2-Medium bei 37°C stattfand, neigten zur nicht induzierten Rekombination und der Bildung von Miniplasmid-DNA und waren so nicht geeignet. Wurde die Hauptkultur in a) LB1/2-Medium bei 30°C oder in c) und d) in HSG-Medium durchgeführt, wurde reine Ausgangsparentalplasmid-DNA gewonnen. Vor allem in den HSG-Kultivierungen wurden höhere optische Dichten erzielt und größere Mengen Biofeuchtmasse (BFM) hergestellt als in den LB1/2-Kultivierungen bei 30°C. Dabei bestand die produzierte Plasmid-DNA zu 10-20% aus Dimer- und oc-Monomer-DNA. Dieser Anteil war bei Kultivierung in den höheren Temperaturen leicht erhöht im Vergleich zu Kultivierungen bei 30°C. Da Dimer-DNA und oc-Monomer-DNA im agarosegel auf derselben Höhe laufen, ließen sich diese Konformationen mittels Agarosegelelektrophorese nicht unterscheiden. Insgesamt lagen die DNA-Ausbeuten bei HSG-Kultivierungen bei 37°C bei 400-500  $\mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{g}_{\text{BFM}}^{-1}$ , bei HSG-Kultivierungen bei 30°C bei 300-400  $\mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{g}_{\text{BFM}}^{-1}$  und in der LB1/2-Kultivierung bei 30°C bei 100-300  $\mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{g}_{\text{BFM}}^{-1}$ . Der UV-Reinheitsscan aus einer HSG-Kultivierung bei 37°C gewonnenen Ausgangsparentalplasmid-DNA PP1150 zeigte, wie für reine DNA-Lösungen erforderlich, ein Maximum bei 258 nm. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm zu 280 nm lag bei 1,8 und indiziert so eine von Proteinen ausreichend freie DNA-Lösung (Kapitel 2.3.9).

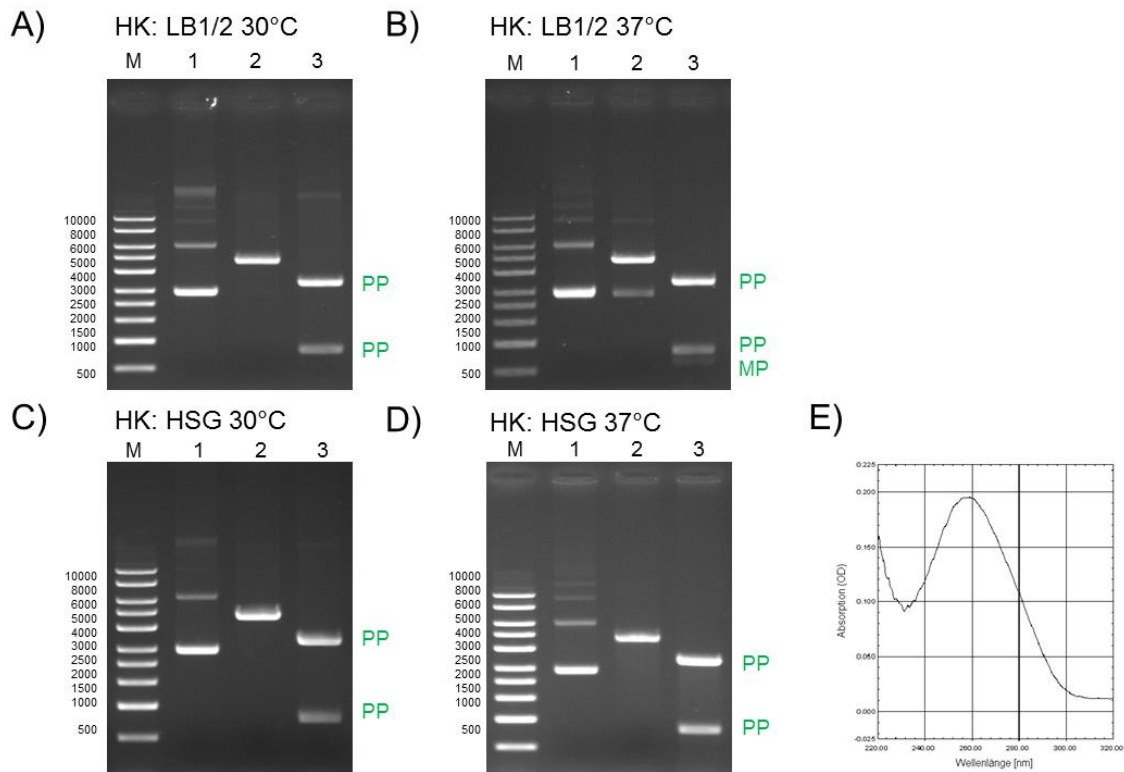


Abbildung 3.2.1 Agarosegelelektrophoretische Trennung von PP1150. PP1150=4698 bp, MP1150=4497 bp. A) HK: LB1/2, 30°C: Spur 1: ungeschnittene DNA (17% PP-Dimer+oc-PP-Monomer, 83% PP-Monomer+MP-Monomer), Spur 2: BglIII-Restriktion, Spur 3: HindIII-Restriktion. B) HK: LB1/2, 37°C: Spur 1: ungeschnittene DNA (20% Dimer+oc-Monomer, 80% Monomer), Spur 2: BglIII-Restriktion, Spur 3: HindIII-Restriktion. C) HK: HSG, 30°C. Spur 1: ungeschnittene DNA (10,8% Dimer+oc-Monomer, 84,2% Monomer), Spur 2: BglIII-Restriktion, Spur 3: HindIII-Restriktion: D) HK: HSG, 37°C. Spur 1: ungeschnittene DNA (20% Dimer+oc-Monomer, 80% Monomer), Spur 2: BglIII-Restriktion, Spur 3: HindIII-Restriktion. BglIII-Restriktion: PP 4698 bp, MP: keine Restriktion, HindIII-Restriktion: PP 1335 bp, 3363 bp, MP: 1134 bp, 3363 bp. HK: Hauptkultur. Es wurden 250 ng DNA pro Spur aufgetragen. M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland). E) UV-Reinheitsscan von PP1150 aus der Hauptkultivierung in HSG-Medium bei 37°C.  $OD_{260\text{ nm}}=0,195$ ,  $OD_{280\text{ nm}}=0,109$ ,  $260\text{ nm}/280\text{ nm}=1,80$ ,  $c_{\text{DNA}}=1,0\text{ mg mL}^{-1}$ .

Die Herstellung von Ausgangsparentalplasmid-DNA PP1150 ist in Kultivierungen in HSG-Medium gut realisierbar. Dabei ist PP1150 ein sehr beständiges Konstrukt, welches in einem weiten Temperaturspektrum stabil vorliegt. Da für Kultivierungen bei 37°C eine etwas höhere DNA-Ausbeute erzielt werden konnte, wurden PP1150-DNA in folgenden Herstellungsverfahren in HSG-Medium bei 37°C hergestellt und für die Klonierung der in Tabelle 3.1.1 genannten Parentalplasmid-DNA eingesetzt. Die genauen Klonierungsstrategien

und die eingesetzten Restriktionsenzyme werden in Tabelle 7.2.3 gezeigt (Kapitel 7.2). Kultivierungen in LB1/2-Medium bei 37°C eignen sich nicht zur PP1150-Herstellung, da hier eine Rekombination des Parentalplasmids wahrscheinlich ist und Miniplasmid-DNA gewonnen wird, welche sich für die Klonierungen nicht eignet.

### **3.3 Etablierung eines Kultivierungssystems für den Rekombinationsprozess**

#### **3.3.1 Bestimmung des Induktionszeitpunktes und der Induktorkonzentration**

Die Rekombination der Parentalplasmid-DNA in Miniplasmid- und Minicircle-DNA im vorgestellten System wird durch die Induktion mit dem Induktor Arabinose gestartet (Kapitel 1.2.1). Im Folgenden wird gezeigt, inwiefern die Induktorkonzentration als auch der Zeitpunkt der Induktion im Kultivierungsverlauf den Erfolg des Rekombinationsprozesses beeinflussen. Für den Herstellungsprozess von Minicircle-DNA in kommerziellen Verfahren ist es von Interesse den Kosten- und Zeitaufwand zu optimieren, so dass eine geringe Induktorkonzentration und eine kurze Induktionszeitdauer bevorzugt werden, ohne den Erfolg des Rekombinationsprozesses zu gefährden. Die Kultivierungen zur Gewinnung des Rekombinationsproduktes werden in HSG-Medium in der Hauptkultur durchgeführt (Kapitel 3.2). Gestartet wurden alle Kultivierungen mit einer optischen Dichte  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,4 bis 0,8.

Am Beispiel der Kultivierungen von PP0904 in HSG-Medium im 10 L-Bioreaktormaßstab wurde der Rekombinationserfolg in Abhängigkeit von den drei Induktorkonzentrationen  $4\text{ g L}^{-1}$ ,  $10\text{ g L}^{-1}$  und  $20\text{ g L}^{-1}$  Arabinose untersucht. Dazu wurden zu drei Zeitpunkten im Wachstumsverlauf der *E. coli*-Zellen steril jeweils 200 mL Kulturbrühe aus den Rührkesselbioreaktoren abgenommen und die Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab fortgesetzt. Dabei konnte davon ausgegangen werden, dass der Rekombinationsprozess im Schüttelkolbenmaßstab sich nicht signifikant von dem Rekombinationsprozess im Bioreaktormaßstab unterscheidet, da die Kultivierungsbedingungen analog gewählt wurden. Die Induktionszeitpunkte lagen in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (Induktion A:  $OD_{600\text{ nm}}=5,4$ ) am Übergang der exponentiellen Phase zur stationären Phase (Induktion B  $OD_{600\text{ nm}}=9,9$ ) und in der stationären Phase (Induktion C:  $OD_{600\text{ nm}}=10,2$ ). Die Induktion der Rekombination mittels Arabinose erfolgte jeweils direkt im Schüttelkolben mit den Arabinosekonzentrationen  $4\text{ g L}^{-1}$ ,  $10\text{ g L}^{-1}$  und  $20\text{ g L}^{-1}$ . In Abbildung 3.3.1 ist die



Wachstumskurve der Bioreaktorkultivierung mit den Zeitpunkten der Induktionen dargestellt. Die Induktionsdauer betrug in allen Fällen 30 min, bevor das Wachstum der Biomasseproben auf Eis gestoppt und die Proben durch Zentrifugation gewonnen wurden. Die Biomasseproben wurden mittels DNA-Isolierung aufgearbeitet, agarosegelelektrophoretisch getrennt und mit der *LabImage 1D*-Software ausgewertet. Die Ergebnisse der agarosegelelektrophoretischen Trennung der DNA findet sich in Abbildung 3.3.2.

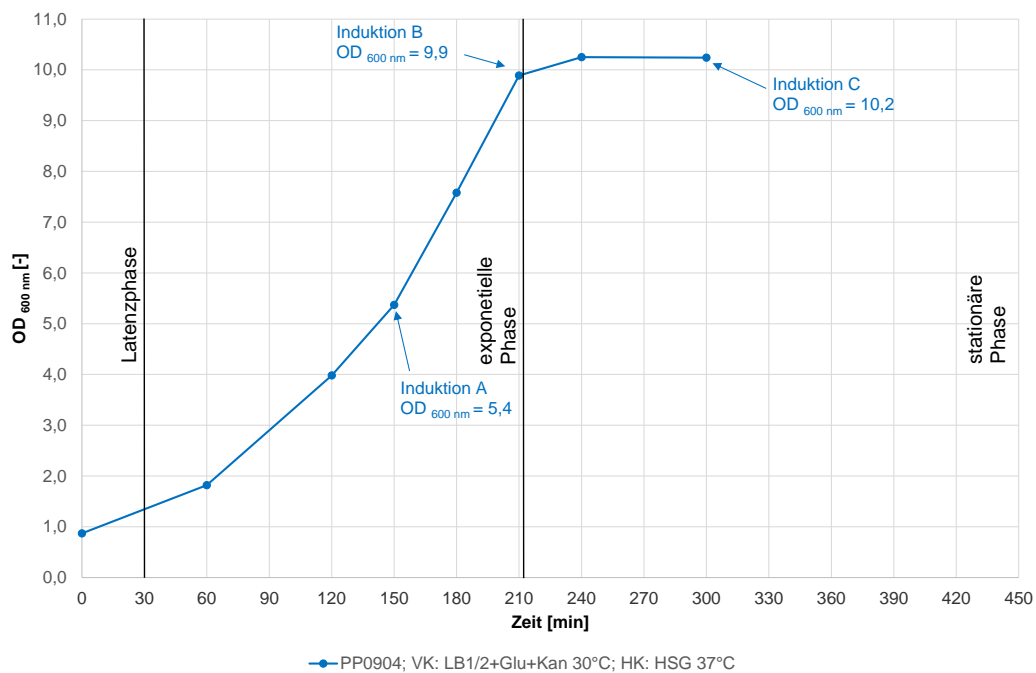


Abbildung 3.3.1 Wachstumskurven der *E.coli*-Zellen PP0904 in einer 10 L-Kultivierung im Bioreaktor in HSG-Medium bei 37°C. Dargestellt ist die optische Dichte OD<sub>600 nm</sub> [-] der Bakterienkulturen im Zeitverlauf [min]. Die Induktion der Rekombination erfolgte in Schüttelkolben zu den Punkten A, B und C durch Zugabe von Arabinose.

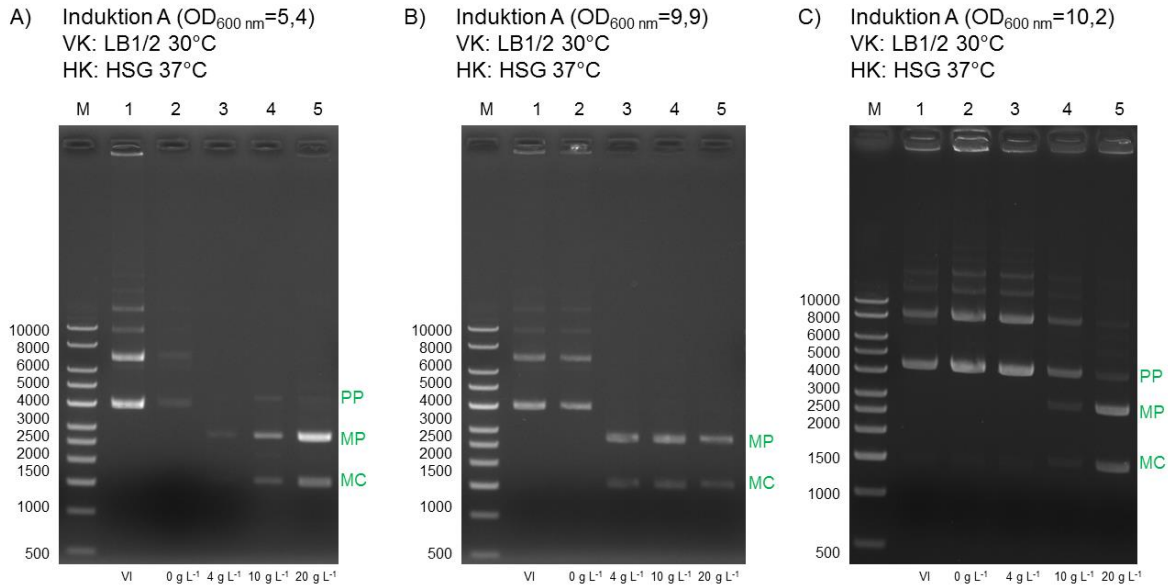


Abbildung 3.3.2 Agarosegelelektrophoretische Trennung von Rekombinationsprodukt-DNA PP0904 aus Kultivierungen im Bioreaktor 30 min nach Induktion mit den Arabinosekonzentrationen 0 g L<sup>-1</sup>, 4 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> und 20 g L<sup>-1</sup>. A) VK: LB1/2+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, Induktion B bei OD<sub>600 nm</sub>=5,4. Spur 1: VI, Spur 2: 0 g L<sup>-1</sup>, Spur 3: 4 g L<sup>-1</sup>, Spur 4: 10 g L<sup>-1</sup>, Spur 5: 20 g L<sup>-1</sup>. B) VK: LB1/2+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, Induktion C bei OD<sub>600 nm</sub>=9,9. Spur 1: VI, Spur 2: 0 g L<sup>-1</sup>, Spur 3: 4 g L<sup>-1</sup>, Spur 4: 10 g L<sup>-1</sup>, Spur 5: 20 g L<sup>-1</sup>. C) VK: LB1/2+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, Induktion C bei OD<sub>600 nm</sub>=10,2. Spur 1: VI, Spur 2: 0 g L<sup>-1</sup>, Spur 3: 4 g L<sup>-1</sup>, Spur 4: 10 g L<sup>-1</sup>, Spur 5: 20 g L<sup>-1</sup>. PP0904=6754 bp, MP0904=4497 bp, MC0904=2257 bp VK: Vorkultur, HK: Hauptkultur, VI: Vor Induktion. Es wurden 250 ng DNA pro Spur aufgetragen. 0,8% Agarosegel, 100 V, 30 min, M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland).

Unter den Kultivierungsbedingungen Induktion A bei OD<sub>600 nm</sub>=5,4 fand sich ein geringer Anteil an Parentalplasmid-DNA bei allen Induktorkonzentrationen. Dieser Anteil verringerte sich bei höheren Arabinosegaben. So lag der Anteil an Parentalplasmid-DNA bei der Induktion mit 4 g L<sup>-1</sup> Arabinose bei 10% PP, der Miniplasmid-DNA-Anteil bei 62% MP und der Minicircle-DNA-Anteil bei 28% MC. Bei einer Induktorkonzentration von 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose wurden 8% PP, 59% MP und 33% MC, bei 20 g L<sup>-1</sup> Arabinose 1% PP, 70% MP und 29% MC festgestellt. Im Vergleich dazu führte die Induktion zum Ende der exponentiellen Phase in HSG-Medium (Induktion B OD<sub>600 nm</sub>=9,9) schon bei einer Induktion mit 4 g L<sup>-1</sup> Arabinose zu einer vollständigen Rekombination der Parentalplasmid-DNA. Hier lag der Parentalplasmid-DNA-Anteil bei 0% PP, der Miniplasmid-DNA-Anteil bei 68% MP und der Minicircle-DNA-Anteil bei 32% MC. Bei einer Induktorkonzentration von 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose wurden 0% PP,

69% MP und 31% MC, bei 20 g L<sup>-1</sup> Arabinose 0% PP, 68% MP und 32% MC festgestellt. Die Probennahme zum Induktionszeitpunkt C (OD<sub>600 nm</sub>=10,2) während der stationären Phase zeigte schon in den Probe „Vor Induktion“ und bei der Kontrollprobe mit 0 g L<sup>-1</sup> Arabinoseinduktion (98,2% PP, 0,7% MP, 0,9% MC) vorhandenes Rekombinationsprodukt. Diese Zusammensetzung ändert sich auch bei der Induktion mit 4 g L<sup>-1</sup> Arabinose nicht wesentlich (98,2% PP, 0,6% MP, 1,2% MC). Bei einer Induktorkonzentration von 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose wurden 82% PP, 10% MP und 8% MC, bei 20 g L<sup>-1</sup> Arabinose 60% PP, 28% MP und 12% MC festgestellt. Der Rekombinationserfolg während der stationären Wachstumsphase ist gering und kann auch durch hohe Induktorkonzentrationen, wie 20 g L<sup>-1</sup> Arabinose, nicht zu einem mit Induktion A oder Induktion B vergleichbaren Minicircle-DNA-Anteil gebracht werden.

Der optimale Zeitpunkt für eine Induktion der Rekombination der Parentalplasmid-DNA in Miniplasmid- und Minicircle-DNA mit einem möglichst geringen Restanteil an Parentalplasmid-DNA ist während der späten exponentiellen Wachstumsphase festzusetzen. Um den zeitlichen Verlauf der Wachstumsphasen für die zu kultivierende Parentalplasmid-DNA zu bestimmen, muss für jede Parentalplasmid-DNA und jede eingesetzte Kultivierungsbedingungen im Vorfeld eine Wachstumskurve aufgenommen werden. Es ist dabei davon auszugehen, dass es trotzdem zu gewissen zeitlichen Schwankungen im Bereich des Überganges von exponentieller Phase zu stationärer Phase kommt. Daher kann nicht in jeder Kultivierung der Zeitpunkt der Induktion genau zum Ende der exponentiellen Phase getroffen werden. Um eine Induktion während der stationären Phase sicher auszuschließen, muss deshalb von einem Induktionszeitpunkt während der späten exponentiellen Phase ausgegangen werden. Eine Induktion mit 20 g L<sup>-1</sup> Arabinose in dieser Wachstumsphase verschob die prozentualen Anteile von Parentalplasmid-, Miniplasmid- und Minicircle-DNA nicht weiter zu Gunsten der Minicircle-DNA, so dass eine Gabe von 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose als ausreichend befunden wurde.

Der Erfolg des Rekombinationsprozesses ist sowohl von der Induktorkonzentration als auch vom Zeitpunkt der Induktion im Kultivierungsverlauf abhängig. Die Induktion des Rekombinationsprozesses sowohl im Schüttelkolbenmaßstab als auch im Bioreaktor erfolgte für alle folgenden Kultivierungen mit 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose während der exponentiellen Wachstumsphase.

### 3.3.2 Bestimmung der Induktionszeitdauer

Zur Bestimmung der optimalen Zeitdauer der Induktion mit Arabinose, wurden Kultivierungen zur Herstellung von Rekombinationsprodukt nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion beendet und die Proben analysiert. Dazu wurden die Kultivierungen im Schüttelkolbenmaßstab bzw. im Bioreaktor durchgeführt (Kapitel 2.2.2). Gestartet wurden alle Kultivierungen mit einer optischen Dichte  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,4 bis 0,8. Die Induktion mit  $10\text{ g L}^{-1}$  Arabinose erfolgte während der exponentiellen Wachstumsphase. Zu den Zeitpunkten 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min und 30 min nach Induktion wurden Biomasseproben genommen, die Kultivierung auf Eis gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation gewonnen. Außerdem wurden stündlich Biomasseproben zu den Zeitpunkten 60 min, 120 min, 180 min und 240 min nach Induktion durch Arabinose genommen. Die Biomasseproben wurden mittels DNA-Isolierung aufgearbeitet, agarosegelelektrophoretisch getrennt und mit der *LabImage ID*-Software ausgewertet.

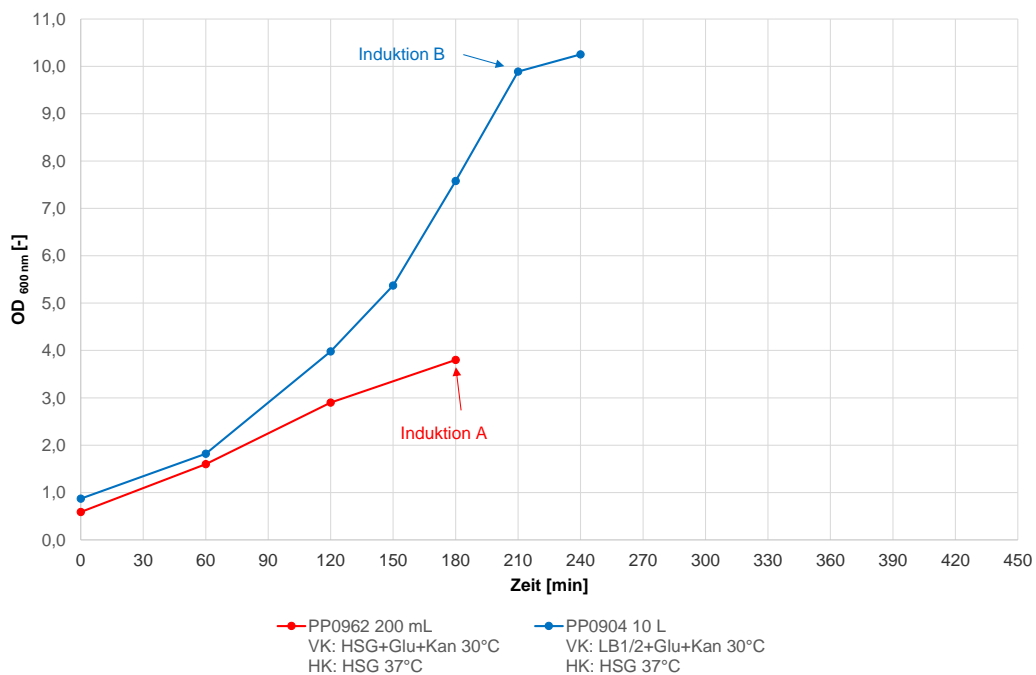
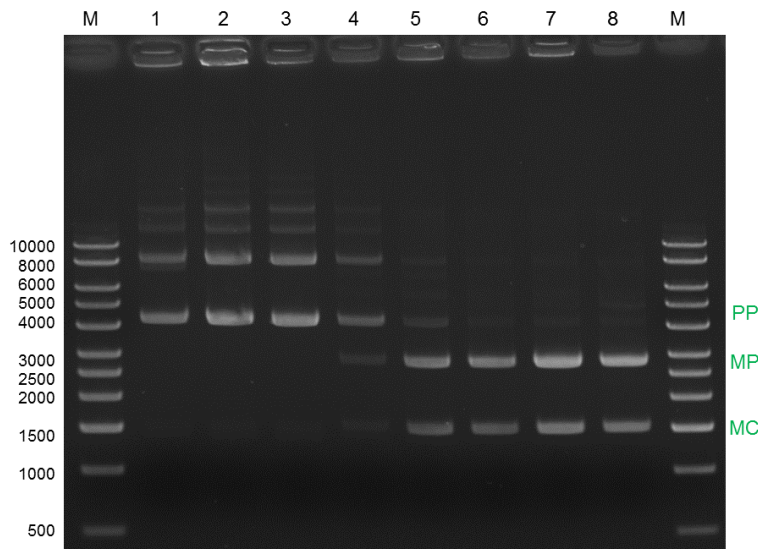


Abbildung 3.3.3 Wachstumskurven der *E.coli*-Zellen PP0904 in einer 10 L-Kultivierung im Bioreaktor (blau) und PP0962 im 200 mL Schüttelkolbenmaßstab (rot) in HSG-Medium bei 37°C. Dargestellt ist die optische Dichte  $OD_{600\text{ nm}}$  [-] der Bakterienkulturen im Zeitverlauf [min]. Die Induktion der Rekombination erfolgte nach 210 min bzw. nach 180 min durch Zugabe von  $10\text{ g L}^{-1}$  Arabinose.

Im Folgenden werden Ergebnisse der Beispiele PP0904 aus einer 10 L-Kultivierung (VK: LB1/2+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, Induktion bei  $OD_{600\text{ nm}}=9,9$ ) im Bioreaktor und

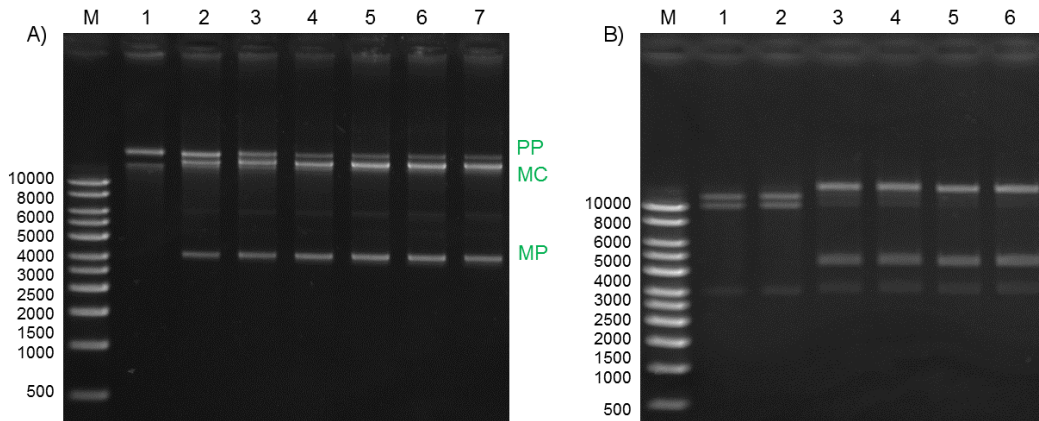
PP0962 aus einer Schüttelkolbenkultivierung (VK: HSG+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, Induktion bei  $OD_{600\text{ nm}}=3,8$ ) vorgestellt (Abbildung 3.3.3).

Abbildung 3.3.4 und Abbildung 3.3.5 zeigen den zeitlichen Verlauf der Bildung von Rekombinationsprodukt der PP0904-Kultivierung im Bioreaktor und der PP0962-Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab für die ersten 30 min nach der Induktion mit Arabinose.



	VI	1 min NI	2 min NI	5 min NI	10 min NI	15 min NI	20 min NI	25 min NI
PP-Dimer [%]	31	38	38	26	0	0	0	0
PP-Monomer [%]	69	62	62	52	8	2	0	0
MP [%]	0	0	0	14	57	62	62	61
MC [%]	0	0	0	7	35	36	38	39

Abbildung 3.3.4 Agarosegelelektrophoretische Trennung von Rekombinationsprodukt-DNA PP0904 aus einer Kultivierung im Bioreaktor (VK: LB1/2+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C) nach Induktion mit  $20\text{ g L}^{-1}$  Arabinose bei  $OD_{600\text{ nm}}=9,9$ . PP0904=6754 bp, MP0904=4497 bp, MC0904=2257 bp. Spur 1: VI, Spur 2: 1 min NI, Spur 3: 2 min NI, Spur 4: 5 min NI, Spur 5: 10 min NI, Spur 6: 15 min NI, Spur 7: 20 min NI, Spur 8: 25 min NI. VI: Vor Induktion, NI: Nach Induktion. Es wurden 250 ng DNA pro Spur aufgetragen. 0,8% Agarosegel, 100 V, 30 min, M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland). Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile an PP-, MP- und MC-DNA in den aufgetragenen Fraktionen (LabImage) wieder.



	VI	1 min NI	2 min NI	5 min NI	10 min NI	20 min NI	30 min NI
PP [%]	100	39	26	16	13	12	12
MC [%]	0	38	45	48	51	52	53
MP [%]	0	23	29	36	36	36	35

Abbildung 3.3.5 Agarosegelelektrophoretische Trennung von Rekombinationsprodukt-DNA PP0962 aus einer Kultivierung im Schüttelkolben (VK: HSG+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C) nach Induktion mit 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose bei OD<sub>600 nm</sub>=3,8. PP0962=26367 bp, MP0962=4497 bp, MC0962=21870 bp. A) ungeschnittene DNA. Spur 1: VI, Spur 2: 1 min NI, Spur 3: 2 min NI, Spur 4: 5 min NI, Spur 5: 10 min NI, Spur 6: 20 min NI, Spur 7: 30 min NI. B) NotI-Restriktion, PP0962: 3017 bp, 10467 bp, 1286 bp, MC0962: 3017 bp, 18854 bp, MP0962: 4474 bp. Spur 1: VK, Spur 2: VI, Spur 3: 1 min NI, Spur 4: 2 min NI, Spur 5: 10 min NI, Spur 6: 30 min NI. VI: Vor Induktion, NI: Nach Induktion. Es wurden 250 ng DNA pro Spur aufgetragen. 0,8% Agarosegel, 100 V, 32 min, M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland). Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile an PP-, MP- und MC-DNA in den aufgetragenen Fraktionen (LabImage) wider.

Die Rekombination der Parentalplasmid-DNA in Miniplasmid- und Minicircle-DNA erfolgte bereits nach 1-5 min. Im Fall des kleinen MC0904 (2257 bp) betrug der Minicircle-DNA-Anteil 5 min nach Induktion 7%, der Miniplasmid-DNA-Anteil 14%. Schon fünf Minuten später zum Zeitpunkt 10 min nach Induktion lagen der Minicircle-DNA-Anteil bei 35% und der Miniplasmid-DNA-Anteil bei 57%. 20 min nach Induktion war keine Parentalplasmid-DNA mehr nachweisbar und damit der Rekombinationsprozess abgeschlossen (Tabelle Abbildung 3.3.4). Die Anteile an Parentalplasmid-, Miniplasmid- und Minicircle-DNA-Anteil zueinander änderten sich ab 15 min nach der Induktion nicht mehr wesentlich zueinander und lagen bei 30 min nach der Induktion bei 0% Parentalplasmid-, 61% Miniplasmid- und 39% Minicircle-DNA.

Der Rekombinationsprozess des großen PP0962 erfolgte lang gezogen. Die Ergebnisse aus im Schüttelkolben gewonnenem Rekombinationsprodukt zeigen, dass auch 30 min nach der Induktion noch Parentalplasmid-DNA vorhanden war (12% Parentalplasmid-, 35% Miniplasmid- und 53% Minicircle-DNA). Die prozentualen Anteile von Parentalplasmid-, Miniplasmid- und Minicircle-DNA zueinander veränderten sich seit dem Zeitpunkt 10 min nach der Induktion allerdings nur noch wenig und lagen 180 min nach Induktion bei 13% Parentalplasmid-, 36% Miniplasmid- und 51% Minicircle-DNA (Tabelle Abbildung 3.3.5). Die Abbildung 3.3.6 zeigt den zeitlichen Verlauf der Bildung von Rekombinationsprodukt der PP0962-Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab für die Zeitpunkte 30 min bis 180 min nach der Induktion mit Arabinose.

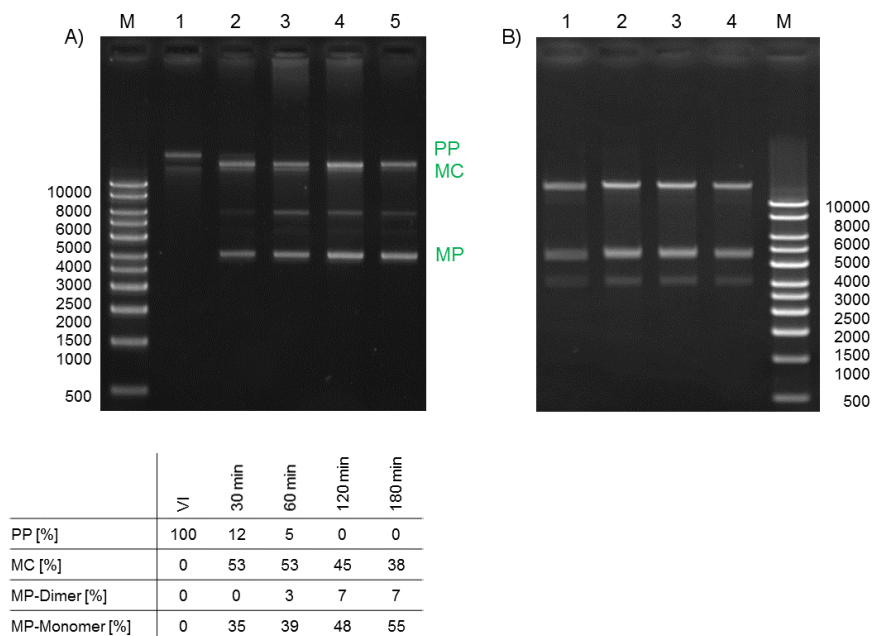


Abbildung 3.3.6 Agarosegelelektrophoretische Trennung von Rekombinationsprodukt-DNA PP0962 aus einer Kultivierung Schüttelkolbenmaßstab (VK: HSG+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C) nach Induktion mit 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose bei OD<sub>600 nm</sub>=3,8. PP0962=26367 bp, MP0962=4497 bp, MC0962=21870 bp. A) ungeschnittene DNA. Spur 1: VI, Spur 2: 30 min NI, Spur 3: 60 min NI, Spur 4: 120 min NI, Spur 5: 180 min NI. B) NotI-Restriktion, PP0962: 3017 bp, 10467 bp, 1286 bp, MC0962: 3017 bp, 18854 bp, MP0962: 4474 bp. Spur 1: 30 min NI, Spur 2: 60 min NI, Spur 3: 120 min NI, Spur 4: 180 min NI. VI: Vor Induktion, NI: Nach Induktion. Es wurden 250 ng DNA pro Spur aufgetragen. 0,8% Agarosegel, 100 V, 32 min, M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland). Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile an PP-, MP- und MC-DNA in den aufgetragenen Fraktionen (LabImage) wider.

Der prozentuale Anteil an Parentalplasmid-DNA nahm nach über 30 min nach der Induktion deutlich ab. Die Werte zeigten 60 min nach Induktion einen Parentalplasmid-DNA-Anteil von 5%, einen Miniplasmid-DNA-Anteil von 42% und einen Minicircle-DNA-Anteil von 53% und 120 min nach Induktion einen Parentalplasmid-DNA-Anteil von 0%, einen Miniplasmid-DNA-Anteil von 55% und einen Minicircle-DNA-Anteil von 45% (Abbildung 3.3.6). So war der Anteil an Parentalplasmid-DNA zwar gesunken, der Anteil an Miniplasmid-DNA, welche repliziert wird, nahm aber wieder zu.

Die optimale Induktionszeitdauer ist nur minimal von der Parentalplasmid-DNA und von der Art der Kultivierung abhängig. Die Ergebnisse zeigten, dass 30 min nach der Induktion maximale prozentuale Anteile an Minicircle-DNA erreicht wurden. Nach diesem Zeitpunkt kommt es zu einer Replikation der Miniplasmid-DNA, währenddessen der absolute Anteil an Minicircle-DNA gleichbleibend ist. Kultivierungen zur Gewinnung von Rekombinationsprodukt sowohl im Schüttelkolbenmaßstab als auch im Bioreaktor wurden für alle folgenden Herstellungsprozesse für eine Induktionszeitdauer von 30 min mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  Arabinose induziert.

### 3.3.3 Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab

Die Gewinnung von Minicircle-DNA erfolgte indirekt über die Vermehrung von Parentalplasmid-DNA mit der gewünschten Genkassette mittels *Batch*-Kultivierung. Zunächst wurde die Parentalplasmid-DNA im *E. coli*-Stamm in einem geeigneten Nährmedium kultiviert und vermehrt. Nach Erreichen der späten exponentiellen Wachstumsphase wurde die Rekombination der Parentalplasmid-DNA induziert. Dabei wurde die Parentalplasmid-DNA intramolekular über die beiden Rekombinationssequenzen so rekombiniert, dass die Miniplasmid-DNA mit den bakteriellen Sequenzen und die Minicircle-DNA, welche die gewünschte Genkassette enthält, resultierten.

Mit der *Batch*-Kultivierung von Parentalplasmid-DNA im Schüttelkolbenmaßstab wurden zwei Ziele verfolgt. Zum einen wurde für jede konstruierte Parentalplasmid-DNA eine charakteristische Wachstumskurve aufgenommen (Kapitel 3.3.1). Anhand dieser konnte der optimale Zeitpunkt der Induktion der Rekombination bestimmt werden. Das zweite Ziel war zum anderen schnelle, materialarme Nachweis, ob die eingesetzte Parentalplasmid-DNA



unter den gewählten Kultivierungsbedingungen in Miniplasmid- und Minicircle-DNA rekombiniert. Zusätzlich konnten der Rekombinationserfolg nach agarosegelelektrophoretischer Trennung densitometrisch im Gel bestimmt und die DNA-Ausbeute der Schüttelkolbenkultivierung berechnet werden. So ließen sich Schlüsse über die zu erwartende Gesamtmasse an Minicircle-DNA ziehen und die Größenordnung der Kultivierung im Bioreaktor in Abhängigkeit der herzustellenden Minicircle-DNA-Masse geplant werden

Kultivierungen, die zur Rekombination der Parentalplasmid-DNA in Miniplasmid- und Minicircle-DNA durchgeführt wurden, wurden in Vorkulturen mit Glukosezusatz inkubiert, so dass eine intramolekulare Rekombination unterdrückt wurde. Die Vorkulturen fanden entweder in LB1/2-Medium oder in HSG-Medium bei 30°C statt. Die Hauptkultivierungen fanden in HSG-Medium ohne Glukosezusatz statt, um eine Rekombination zu ermöglichen. Gestartet wurden alle Kultivierungen mit einer optischen Dichte  $OD_{600 \text{ nm}}$  von 0,4 bis 0,8. Die Rekombination wurde durch Induktion mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  Arabinose während der exponentiellen Wachstumsphase gestartet.

In Abbildung 3.3.7 A) sind die Wachstumskurven der Schüttelkolbenkultivierungen von PP0962 (26367 bp) gezeigt. Dabei erfolgte die Vorkultur der Kultivierung PP0962 zum einen in einer in LB1/2-Medium mit Glukose- und Kanamycinzusatz und zum anderen in HSG-Medium mit Glukose- und Kanamycinzusatz bei 30°C. Die Hauptkulturen fanden in HSG-Medium bei 30°C bzw. 37°C statt. Der Verlauf der Wachstumskurven war für die genannten Fälle unterschiedlich und zeigte vor allem in der Zeitdauer der exponentiellen Phase und der maximal erreichten optischen Dichte Unterschiede zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Dabei wurden in den Kultivierungen, deren Vorkultur in LB1/2-Medium erfolgten, nach etwa 360 min maximale optische Dichten von 4,5 bis 5,5 erreicht, während die Kultivierungen, deren Vorkultur in HSG-Medium stattfanden, nach 390 min maximale optische Dichten von 9,5 erreichten.

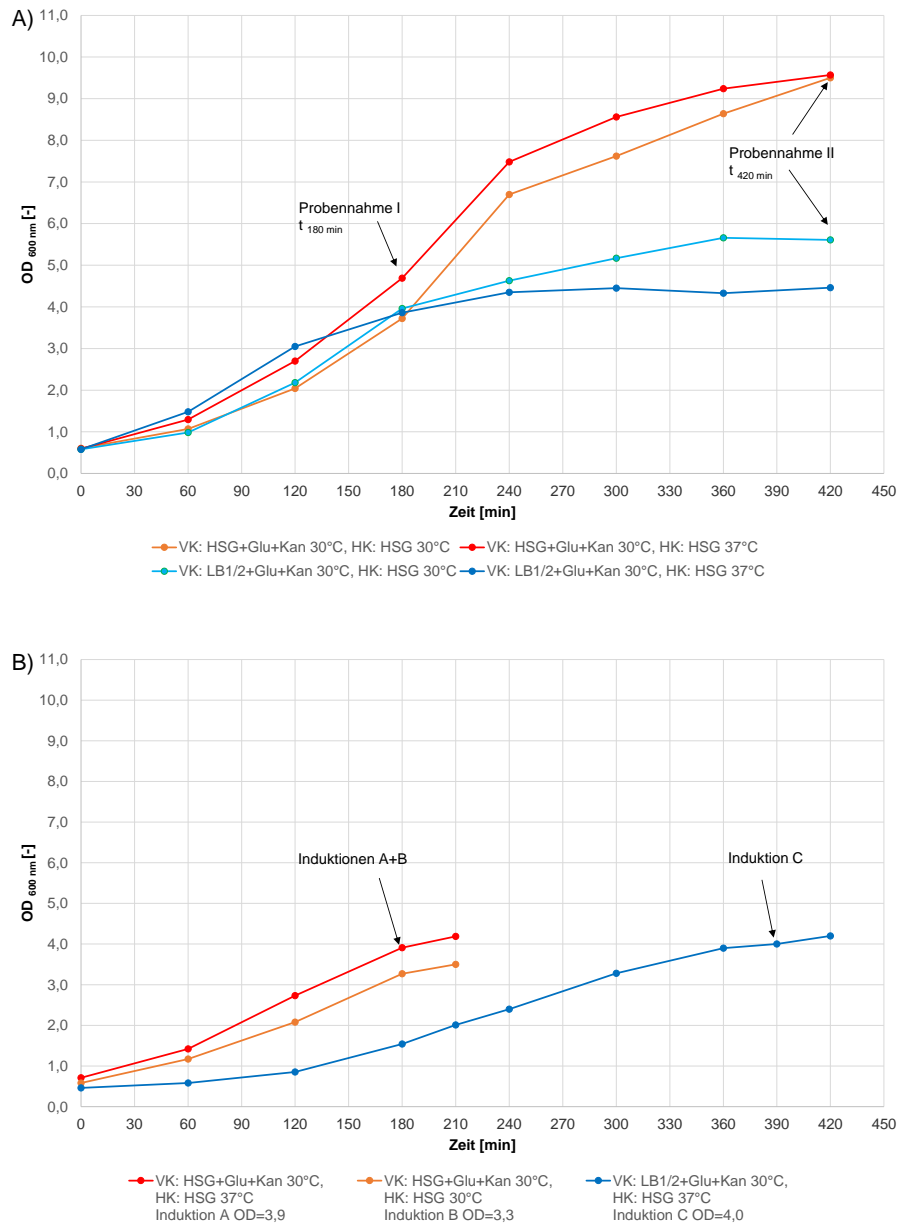


Abbildung 3.3.7 Wachstumskurven der *E.coli*-Zellen PP0962 DH5 $\alpha$  in 200 mL-Schüttelkolbenmaßstab in HSG-Medium bei 30°C bzw. 37°C. Die Vorkulturen wurden jeweils entweder in LB1/2+Glu+Kan oder HSG+Glu+Kan bei 30°C inkubiert. Dargestellt ist die optische Dichte OD<sub>600 nm</sub> [-] der Bakterienkulturen im Zeitverlauf [min]. A) Kultivierung des Parentalplasmids. Die Pfeile (t<sub>180 min</sub> und t<sub>420 min</sub>) geben die Zeitpunkte an, zu denen Bakterienkultur für die Analyse der Plasmid-DNA abgenommen wurde. B) Kultivierung des Parentalplasmids mit Induktion der Rekombination durch 10 g L-1 Arabinose. Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Induktionen (A) t<sub>180 min</sub> HSG+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, (B) t<sub>180 min</sub> HSG+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 30°C und (C) t<sub>390 min</sub> LB1/2+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C an. Probennahmen erfolgten direkt vor der Induktion und 30 min nach der Induktion (Abbildung 3.3.8). Glu: Glukose, Kan: Kanamycin, VK: Vorkultur, HK: Hauptkultur.

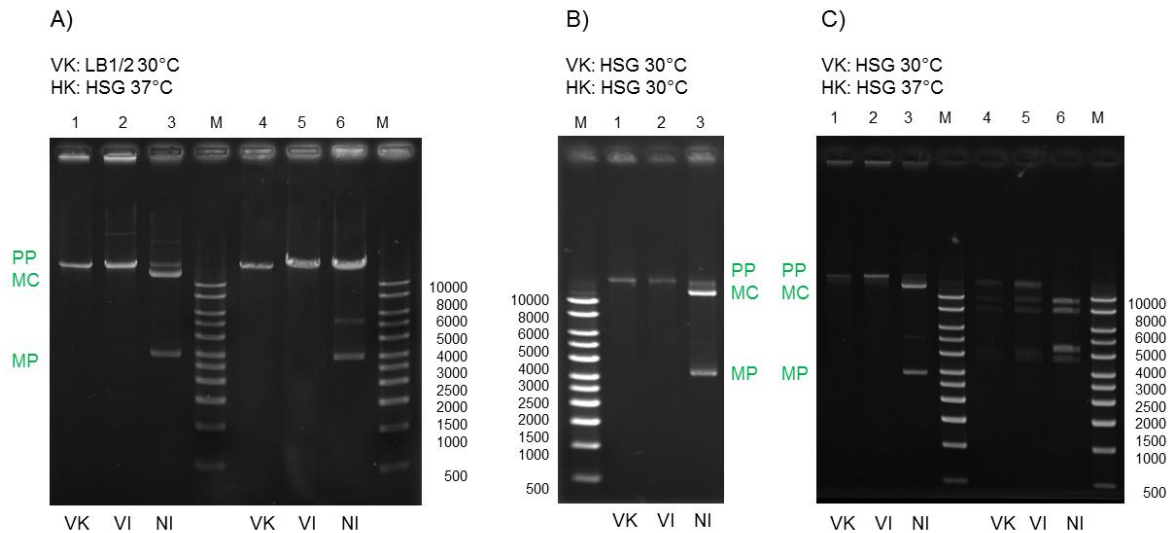


Abbildung 3.3.8 Agarosegelelektrophoretische Trennung von Parentalplasmid PP0962 DH5 $\alpha$  aus Kultivierungen in HSG-Medium bei 30°C und 37°C im Schüttelkolbenmaßstab. PP0962=26367 bp, MP0962=4497 bp, MC0962=21870 bp. Probennahme vor und nach der Induktion. A) VK: LB1/2+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, Spur 1: VK (100% PP), Spur 2: VI (100% PP), Spur 3: NI (15% PP, 59% MC, 26% MP). Spur 4: PmeI-Restriktion VK, Spur 5: PmeI-Restriktion VI, Spur 6: PmeI-Restriktion NI. PmeI-Restriktion: PP, 26367 bp, MC 21870 bp, MP keine Restriktion. B) VK: HSG+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 30°C, Spur 1: VK (100% PP), Spur 2: VI (100% PP), Spur 3: NI (13% PP, 53% MC, 34% MP). C) VK: HSG+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, Spur 1: VK (100% PP), Spur 2: VI (100% PP), Spur 3: NI (8% PP, 63% MC, 29% MP). Spur 4: EcoRI-Restriktion VK, Spur 5: EcoRI-Restriktion VI, Spur 6: EcoRI-Restriktion NI. EcoRI-Restriktion: PP 218 bp, 3798 bp, 4247 bp, 8144 bp, 9960 bp, MC 218 bp, 3798 bp, 8144 bp, 9710 bp, MP 4497 bp. PP: Parentalplasmid, MC: Minicircle, MP: Miniplasmid. VI: vor Induktion, NI: nach Induktion. Es wurden 250 ng DNA pro Spur aufgetragen. 0,8% Agarosegel, 100 V, 30 min, M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland).

Die Induktion der Rekombination von PP0962 in den Hauptkulturen erfolgte in den exponentiellen Wachstumsphasen nach 180 min bis 360 min mit 10 g L-1 Arabinose (Abbildung 3.3.7). Proben der Plasmid-DNA wurden vor und 30 min nach der Induktion agarosegelelektrophoretisch getrennt. In Abbildung 3.3.8 sind die Ergebnisse dargestellt. Bei keiner der Kultivierungsarten kam es zu einer vorzeitigen Rekombination der Parentalplasmid-DNA (Abbildung 3.3.8). Es wurde deutlich, dass in den Kultivierungen, deren Hauptkultur bei 37°C stattfand, höhere Minicircle-DNA-Anteile erzielt wurden als in einer Kultivierung bei 30°C. Außerdem ließ sich feststellen, dass der höchste Minicircle-DNA-Anteil in der Hauptkultur in HSG-Medium bei 37°C erreicht wurde. So lagen der Minicircle-DNA-Anteil in der Kultivierung mit der Vorkultur in HSG-Medium und der Hauptkultur in HSG-Medium bei

37°C bei 63%, der Miniplasmid-DNA-Anteil bei 29% und der Parentalplasmid-DNA-Restanteil bei 8%. Für die Kultivierung mit einer Vorkultur in HSG-Medium und der Hauptkultur in HSG-Medium bei 30°C verteilten sich die DNA-Anteile wie folgt: 53% Minicircle-DNA, 34% Miniplasmid-DNA und 13% Parentalplasmid-DNA. Für die Kultivierung mit einer Vorkultur in LB1/2-Medium und der Hauptkultur in HSG-Medium bei 37°C lagen der Minicircle-DNA-Anteil bei 59%, der Miniplasmid-DNA-Anteil bei 26% und der Parentalplasmid-DNA-Anteil bei 15%. Die Gesamt-DNA-Ausbeute lag für alle Kultivierungen bei lediglich  $200 \mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{g}_{\text{BFM}}^{-1}$ , so dass kein Unterschied festzuhalten war. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3.3.1 dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wahl des Medium der Vorkultur einen Einfluss auf die Kultivierung von PP0962 und die Gewinnung von MC0962 in der Hauptkultur hat. Allerdings ist sowohl in einer Vorkultur von LB1/2-Medium als auch in einer Vorkultur von HSG-Medium die Gewinnung von Rekombinationsprodukten in der Hauptkultur möglich. Einen höheren Minicircle-DNA-Anteil wurde in Hauptkulturen bei 37°C erzielt. Insbesondere in einer Hauptkultur in HSG-Medium bei 37°C konnten hohe Minicircle-DNA-Anteile erreicht werden, so, dass diese Kultivierungsbedingungen für weitere Kultivierungen gewählt wurden.

In einer weiteren Versuchsanordnung wurden das Wachstums- und Rekombinationsverhalten von *E. coli*-Zellen mit PP0904-Parentalplasmid-DNA verglichen. In Abbildung 3.3.9 A) sind die Wachstumskurven der Schüttelkolbenkultivierungen von PP0904 gezeigt. Dabei erfolgte die Vorkultur der Kultivierung PP0904 zum einen in einer in LB1/2-Medium mit Glukose- und Kanamycinzusatz und zum anderen in HSG-Medium mit Glukose- und Kanamycinzusatz bei 30°C. Die Hauptkultur fand jeweils in HSG-Medium bei 37°C statt. Der Verlauf der Wachstumskurven ist für alle Fälle ähnlich und zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Auch kam es bei beiden Kultivierungsarten nicht zu einer vorzeitigen Rekombination der Parentalplasmid-DNA. Dies zeigen die agarosegelelektrophoretischen Trennungen der zu zwei Zeitpunkten ( $t_{180 \text{ min}}$  und  $t_{360 \text{ min}}$ ) im Kultivierungsverlauf gewonnenen Plasmid-DNA-Proben (Abbildung 3.3.10 1)). Die Induktion der Rekombination von PP0904 in den Hauptkulturen erfolgte in den exponentiellen Wachstumsphasen nach 180 min bis 240 min mit 10 g L-1 Arabinose (Abbildung 3.3.9 B)). Proben der Plasmid-DNA wurden vor und 30 min nach der Induktion agarosegelelektrophoretisch getrennt.

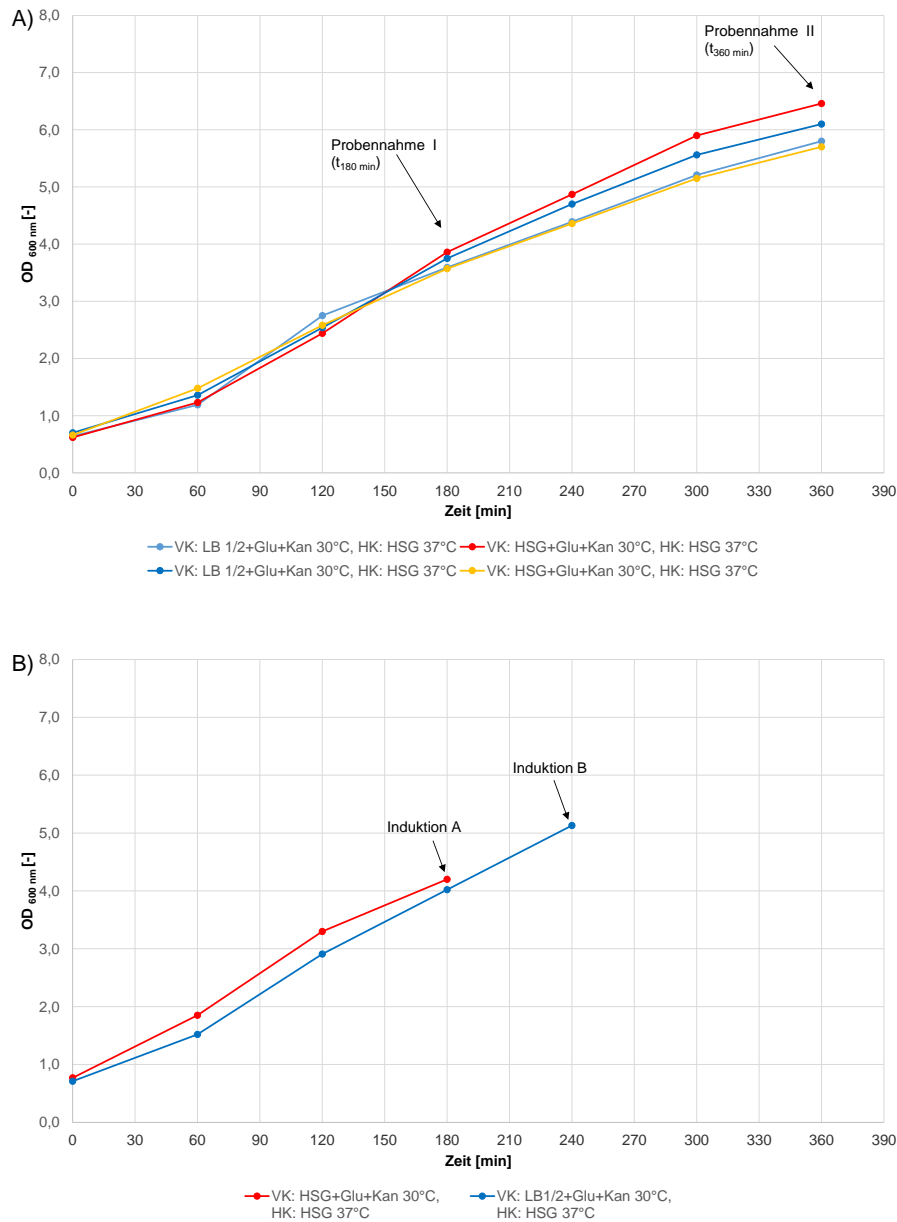


Abbildung 3.3.9 Wachstumskurven der *E.coli*-Zellen PP0904 in 200 mL-Schüttelkolbenmaßstab in HSG-Medium bei 37°C. Die Vorkulturen wurden jeweils entweder in LB1/2+Glu+Kan oder HSG+Glu+Kan bei 30°C inkubiert. Dargestellt ist die optische Dichte OD<sub>600 nm</sub> [-] der Bakterienkulturen im Zeitverlauf [min]. A) Kultivierung der Parentalplasmid-DNA. Die Pfeile (t<sub>180 min</sub> und t<sub>360 min</sub>) geben die Zeitpunkte an, zu denen Bakterienkultur für die Analyse der Plasmid-DNA abgenommen wurde (Abbildung 3.3.10). B) Kultivierung der Parentalplasmid-DNA mit Induktion der Rekombination durch 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose. Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Induktion an A t<sub>180 min</sub> (VK: HSG+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C) und B t<sub>240 min</sub> (VK: LB1/2+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C). Probennahmen erfolgten direkt vor der Induktion und 30 min nach der Induktion (Abbildung 3.3.10). Glu: Glukose, Kan: Kanamycin, VK: Vorkultur, HK: Hauptkultur.

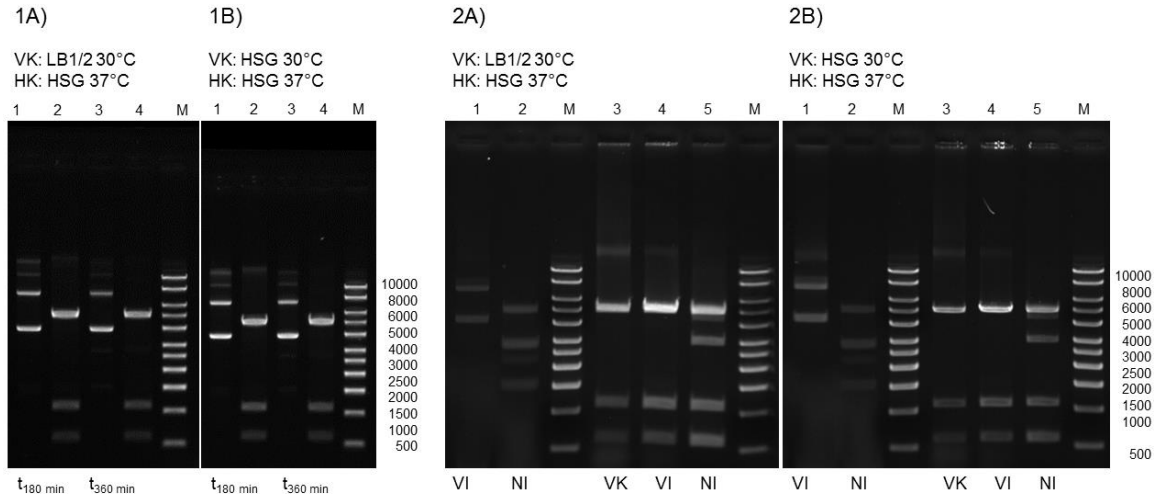


Abbildung 3.3.10 Agarosegelelektrophoretische Trennung von Parentalplasmid PP0904 aus Kultivierungen in HSG-Medium bei 37°C im Schüttelkolbenmaßstab. PP0904=6754 bp, MP0904=4497 bp, MC0904=2257 bp. 1) Probennahme nach  $t_{180 \text{ min}}$  und  $t_{360 \text{ min}}$ . A) VK: LB1/2+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, Spur 1:  $t_{180 \text{ min}}$ , Spur 2:  $t_{180 \text{ min}}$ , SpeI-Restriktion, Spur 3:  $t_{360 \text{ min}}$ , Spur 4:  $t_{360 \text{ min}}$  SpeI-Restriktion, B) VK: HSG+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, Spur 1:  $t_{180 \text{ min}}$ , Spur 2:  $t_{180 \text{ min}}$ , SpeI-Restriktion, Spur 3:  $t_{360 \text{ min}}$ , Spur 4:  $t_{360 \text{ min}}$  SpeI-Restriktion. 2) Probennahme vor und nach der Induktion. A) VK: LB1/2+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, Spur 1: VI, Spur 2: NI. SpeI-Restriktion: Spur 3: VK, Spur 4: VI, Spur 5: NI. B) VK: HSG+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, Spur 1: VI, Spur 2: NI. SpeI-Restriktion: Spur 3: VK, Spur 4: VI, Spur 5: NI. SpeI-Restriktion PP: 591 bp, 1097 bp, 5066 bp, MC: 569 bp, 591 bp, 1097 bp, MP: keine Restriktion. Glu: Glukose, Kan: Kanamycin, PP: Parentalplasmid, MC: Minicircle, MP: Miniplasmid. VI: vor Induktion, NI: nach Induktion. Es wurden 250 ng DNA pro Spur aufgetragen. 0,8% Agarosegel, 100 V, 30 min, M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland).

In Abbildung 3.3.10 2) sind die Ergebnisse dargestellt. Dabei wurde deutlich, dass sowohl in der Kultivierung, deren Vorkultur in LB1/2-Medium stattfand, als auch in der Kultivierung mit einer Vorkultur in HSG-Medium die Verhältnisse von Minicircle-DNA- zu Miniplasmid-DNA-Anteil nahezu identisch waren. Es wurden für die Kultivierung mit der Vorkultur in LB1/2-Medium 31% Miniplasmid-DNA-Dimer, 37% Miniplasmid-DNA-Monomer, 9% Minicircle-DNA-Dimer und 23% Minicircle-DNA-Monomer gewonnen. Für die Kultivierung mit einer Vorkultur in HSG-Medium verteilten sich die DNA-Konformations-Anteile wie folgt: 29% Miniplasmid-DNA-Dimer, 39% Miniplasmid-DNA-Monomer, 9% Minicircle-DNA-Dimer und 23% Minicircle-DNA-Monomer. Die Gesamt-DNA-Ausbeute lag für die Kultivierung, deren Vorkultur in LB1/2-Medium erfolgte, zwischen  $600 \text{ und } 700 \mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{ g}_{\text{BFM}}^{-1}$ , für die

Kultivierung, deren Vorkultur in HSG-Medium stattfand, bei 650 bis 750  $\mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{g}_{\text{BFM}}^{-1}$ , so dass kein Unterschied festzuhalten war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kultivierung von PP0904 und die Gewinnung von MC0904 sowohl in einer Vorkultur von LB1/2-Medium als auch in einer Vorkultur von HSG-Medium möglich sind und zu gleich guten Ergebnissen führten.

In Abbildung 3.3.11 1) sind die Wachstumskurven der Schüttelkolbenkultivierungen von PP1291 gezeigt. Dabei erfolgte die Vorkultur der Kultivierung PP1291 zum einen in einer in LB1/2-Medium mit Glukose- und Kanamycinzusatz und zum anderen in HSG-Medium mit Glukose- und Kanamycinzusatz bei 30°C. Die Hauptkulturen fanden in HSG-Medium bei 37°C statt. Der Verlauf der Wachstumskurven ist für die genannten Fälle unterschiedlich und zeigt vor allem in der Zeitdauer der Latenzphase und der exponentiellen Phase Unterschiede zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Während das Wachstum der in einer Vorkultur von LB1/2-Medium inkubierten *E. coli*-Zellen in der Hauptkultur eine nahezu lineares Wachstum zeigten, benötigten die *E. coli*-Zellen aus der HSG-Medium-Vorkultur 120 min bevor das exponentielle Wachstum begann.

Die Induktion der Rekombination von PP1291 in den Hauptkulturen erfolgte nach 210 min mit 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose (Abbildung 3.3.11 2)). Proben der Plasmid-DNA wurden vor und 30 min nach der Induktion agarosegelelektrophoretisch getrennt. In Abbildung 3.3.11 sind die Ergebnisse dargestellt. Bei keiner der beiden Kultivierungsarten kam es zu einer vorzeitigen Rekombination der Parentalplasmid-DNA. Sowohl in der Kultivierung, deren Vorkultur in LB1/2-Medium stattfand, als auch in der Kultivierung mit einer Vorkultur in HSG-Medium waren die Anteile von Minicircle-DNA gleich hoch. Es wurden für die Kultivierung mit der Vorkultur in HSG-Medium 5% Minicircle-DNA und 95% Miniplasmid-DNA gewonnen. Allerdings ergaben sich hier densitometrisch messbare Dimer-Anteile. Für die Kultivierung mit einer Vorkultur in LB1/2-Medium verteilten sich die DNA-Anteile wie folgt: 5% Minicircle-DNA, 89% Miniplasmid-DNA und 6% Parentalplasmid-DNA. Die Gesamt-DNA-Ausbeute lag für die Kultivierung, deren Vorkultur in LB1/2-Medium stattfand, bei 400  $\mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{g}_{\text{BFM}}^{-1}$ , für die Kultivierung, deren Vorkultur in HSG-Medium stattfand, bei 200  $\mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{g}_{\text{BFM}}^{-1}$ .

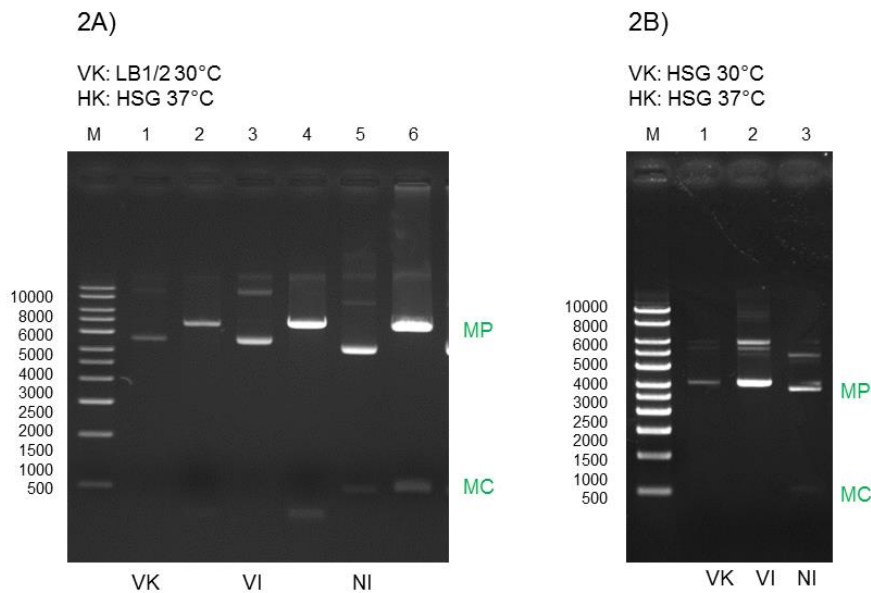
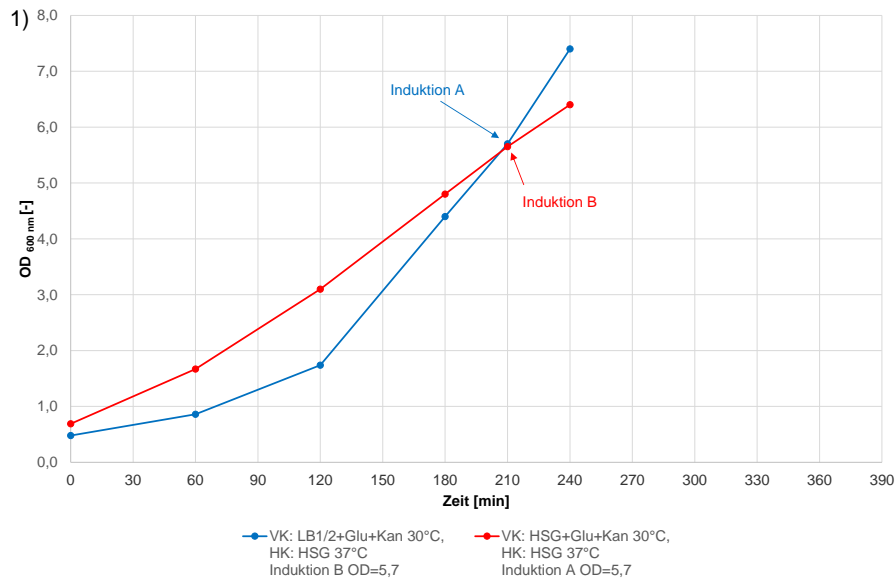


Abbildung 3.3.11 1) Wachstumskurven der *E.coli*-Zellen PP1291 TB1 im 200 mL- bzw. 100 mL-Kultivierung in HSG-Medium bei 37°C. Die Vorkulturen wurden jeweils entweder in LB1/2+Glu+Kan oder HSG+Glu+Kan bei 30°C inkubiert. Dargestellt ist die optische Dichte  $OD_{600\text{ nm}}$  [-] der Bakterienkulturen im Zeitverlauf [min]. Kultivierung der Parentalplasmid-DNA mit Induktion der Rekombination durch 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose. Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Induktion an A und B  $t_{210\text{ min}}$ . Probennahmen erfolgten direkt vor der Induktion und 30 min nach der Induktion. VK: Vorkultur, HK: Hauptkultur. 2) Agarosegelelektrophoretische Trennung von Parentalplasmid PP1291 TB1 in 200 mL bzw. 100 mL-Schüttelkolbenmaßstab in HSG-Medium bei 37°C. PP1291=4998 bp, MP1291=4497 bp, MC1291=501 bp. Probennahme vor und nach der Induktion. A) VK: LB1/2+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, Spur 1: VK, Spur 2: VK PacI-Restriktion, Spur 3: VI, Spur 4: VI PacI-Restriktion, Spur 5: NI, Spur 6: NI SwaI-Restriktion. PacI-Restriktion: PP: 300 bp, 4698 bp, MP keine Restriktion,



MC: 201 bp, 300 bp, SwaI-Restriktion: PP: 501 bp, 4497 bp, MP: 4497 bp, MC: 501 bp. Es wurden 500-1000 ng DNA pro Spur aufgetragen. 1,2% Agarosegel, 100 V, 30 min. B) VK: HSG+Glu+Kan, 30°C, HK: HSG, 37°C, Spur 1: VK, Spur 2: VI, Spur 3: NI. Glu: Glukose, Kan: Kanamycin, PP: Parentalplasmid, MC: Minicircle, MP: Miniplasmid. VI: vor Induktion, NI: nach Induktion. Es wurden 250 ng DNA pro Spur aufgetragen. 0,8% Agarosegel, 100 V, 30 min, M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kultivierung von PP1291 und die Gewinnung von MC1291 sowohl in einer Vorkultur von LB1/2-Medium als auch in einer Vorkultur von HSG-Medium möglich sind, wobei die gleich hohe Minicircle-DNA-Anteil in beiden Kultivierungsarten erzielt wurden. Obwohl die Kultivierung der LB1/2-Vorkultur einen geringen Restanteil an Parentalplasmid-DNA aufwies, wurden diese Kultivierungsbedingungen für weitere Kultivierungen gewählt, da in diesen eine höhere Gesamt-DNA-Ausbeute erreicht wurde und der Dimer-Anteil am Produkt geringer war.

Tabelle 3.3.1 Zusammenfassung der gewonnen DNA-Anteile und Gesamt-Plasmid/Minicircle-DNA-Ausbeuten bei Rekombination unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolbenmaßstab.

	Kultivierungsbedingungen	DNA-Anteile		DNA-Ausbeute [ $\mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{g}_{\text{BFM}}^{-1}$ ]
		Vor Induktion	Nach Induktion	
<b>PP0962</b> (26367 bp)	VK: LB1/2+Glu+Kan, 30°C HK: HSG, 37°C	100% PP	15% PP, <u>59% MC</u> , 26% MP	200
	VK: HSG+Glu+Kan, 30°C HK: HSG, 30°C	100% PP	13% PP, <u>53% MC</u> , 34% MP	200
	VK: HSG+Glu+Kan, 30°C HK: HSG, 37°C	100% PP	8% PP, <u>63% MC</u> , 29% MP	200
<b>PP0904</b> (6754 bp)	VK: LB1/2+Glu+Kan, 30°C HK: HSG, 37°C	100% PP	0% PP, <u>32% MC</u> , 86% MP (Dimer-Anteile)	600-700
	VK: HSG+Glu+Kan, 30°C HK: HSG, 37°C	100% PP	0% PP, <u>32% MC</u> , 86% MP (Dimer-Anteile)	650-750
<b>PP1291</b> (4998 bp)	VK: LB1/2+Glu+Kan, 30°C HK: HSG, 37°C	100% PP	6% PP, <u>5% MC</u> , 89% MP	400
	VK: HSG+Glu+Kan, 30°C HK: HSG, 37°C	100% PP	0% PP, <u>5% MC</u> , 95% MP (Dimer-Anteile)	200

Legende: MC: Minicircle, MP: Miniplasmid, PP: Parentalplasmid, VK: Vorkultur, HK: Hauptkultur, Glu: Glukose, Kan: Kanamycin

In Tabelle 3.3.1 sind die Ergebnisse der aufgezeigten Schüttelkolbenkultivierungen und Rekombinationen der Parentalplasmid-DNA zusammenfassend dargestellt. Es wurden die Wachstumskurven und Rekombinationserfolge von drei Parentalplasmide in *E. coli*-Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten Kultivierungsbedingungen für Vorkultur und Hauptkultur miteinander verglichen. In den vorgestellten Beispielen kommt es zu einem Wechsel von LB1/2-Medium bei 30°C zu HSG-Medium bei 37°C. Die in LB1/2-Medium vorhandenen Komponenten finden sich auch im HSG-Medium ergänzt durch Glycerin und einige Salze (Kapitel 2.1.3). Dieser Wechsel des Kulturmediums kann aufgrund einer verlängerten Latenzphase zu einer Verzögerung in der Replikationsgeschwindigkeit der *E. coli*-Zellen führen. Zu einer langen Latenzphase kommt es, wenn die angeimpften Zellen aus einer Kultur stammen, die aufgrund von Nährstoffmangel ihr Wachstum eingestellt und sich damit in der stationären Phase befunden haben. Diese Zellen benötigen Zeit, um sich auf das neue Kulturmedium einzustellen. Während der Latenzphase werden, die im Kulturmedium zur Verfügung stehenden Nährstoffe von der Bakterienzelle analysiert und der Stoffwechsel auf die Bedingungen eingestellt. Die Zeitdauer dieses Prozesses ist von der Art der Veränderungen in den Kultivierungsbedingungen und der Zeitdauer, die die Zellen im Vorkulturmedium in der stationären Phase verbracht haben, abhängig.

Die Adaption an neuen Kultivierungsbedingungen unterscheidet sich für die *E. coli*-Zellen mit den verschiedenen Parentalplasmiden PP0962, PP0904 und PP1291. Dies zeigt sich anhand der unterschiedlichen Verläufe der Wachstumskurven als auch an den Ergebnissen der Rekombinationserfolge. Bei der Parentalplasmid-DNA PP0962 (26367 bp) unterscheiden sich die Latenzphasen zwischen den Kultivierungen nach unterschiedlichen Vorkulturmedien kaum (Abbildung 3.3.7). Allerdings erfolgt der Übergang in die stationäre Phase bei den Kultivierungen, deren Vorkultur in LB1/2-Medium stattfand früher, und bei deutlich geringeren optischen Dichten als bei den Kultivierungen, deren Vorkultur in HSG-Medium stattfand. Die Gesamt-Biofeuchtmasse ist daher für die in Vor- und Hauptkultur in HSG-Medium inkubierten *E. coli*-Zellen mit PP0962 höher als für die Kulturen mit einem Wechsel der Bedingungen zwischen Vor- und Hauptkultur. Die DNA-Ausbeuten sind für beide Fälle etwa gleich hoch, während der Anteil an Minicircle-DNA im Rekombinationsprodukt in der Kultivierung von Vor- und Hauptkultur- in HSG-Medium bei 37°C am höchsten ist. Daher werden für folgende Kultivierungen und Rekombinationsprozesse von PP0962 die Vorkulturen und die Hauptkulturen in HSG-Medium inkubiert. Im Gegensatz dazu zeigen die Wachstumsverläufe

der *E. coli*-Zellen mit der Parentalplasmid-DNA PP0904 (6754 bp) keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit der eingesetzten Vorkulturmedien (Abbildung 3.3.9). Auch die Anteile an Minicircle- und Miniplasmid-DNA in den erzielten Rekombinationsprodukten und die erreichten Ausbeuten sind nahezu gleich hoch. Für den Rekombinationserfolg von PP0904 ist die Wahl des Vorkulturmediums unerheblich. Die Verläufe der Wachstumskurven von PP1291 (4998 bp) in *E. coli*-Zellen dagegen unterschieden sich in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen der Vorkultur. So dauerte die Latenzphase für den Fall der Vorkultur in LB1/2-Medium etwa doppelt so lange wie für die Kultivierungen, deren Vorkultur in HSG-Medium stattfand (Abbildung 3.3.11). Allerdings erfolgt der Übergang von der exponentiellen Phase zur stationären Phase für den Fall der Vorkultur in HSG-Medium früher und insgesamt werden geringere Biofeuchtmassen und DNA-Ausbeuten erzielt als für die Kultivierung, deren Vorkultur in LB1/2-Medium stattfand. Außerdem ist der Dimer-Anteil im Rekombinationsprodukt in der densitometrischen Auswertung der agarosegelelektrophoretischen Trennung höher als im Rekombinationsprodukt, der Vorkultur in HSG-Medium (Abbildung 3.3.11). Die Minicircle-Anteile in den Rekombinationsprodukten unterscheiden sich für die beiden Kultivierungsarten nicht. Für weitere Kultivierungen von *E. coli*-Zellen mit PP1291 werden Vorkulturen in LB1/2-Medium eingesetzt. Festzuhalten ist, dass unabhängig von der Wahl des Vorkulturmediums für alle drei genannten Parentalplasmide PP0962, PP0904 und PP1291 keine vorzeitige, nicht induzierte Rekombination erfolgte.

Der Wechsel des Kulturmediums von Vor- zur Hauptkultur wirkt sich in Abhängigkeit der eingesetzten *E. coli*-Zellen und darin enthaltenden Parentalplasmide unterschiedlich aus. So kann die Veränderung der Kultivierungsbedingungen zu einer Verzögerung in der Replikationsgeschwindigkeit und einem frühen Eintritt in die stationäre Phase führen, keine Auswirkungen haben oder nach einer verlängerten Latenzphase eine erhöhte Replikationsgeschwindigkeit aufweisen. Die Kultivierungsbedingungen, die optimale DNA-Ausbeuten und hohe Minicircle-DNA-Anteile im Rekombinationsprodukt bewirken, müssen für jede neu eingesetzte Parentalplasmid-DNA separat erfasst werden.

### 3.3.4 Kultivierung im Rührkesselbioreaktor

Nachdem mittels *Batch*-Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab Kultivierungsbedingungen optimiert und der Zeitpunkt der Induktion ermittelt wurden, kann eine Minicircle-DNA im

Rührkesselbioreaktor in einem großen Maßstab hergestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *Batch*-Kultivierungen in bis zu 25 L-Volumina durchgeführt. Dabei wurden die Parameter der Kultivierung analog zu denen schon im Schüttelkolbemaßstab eingesetzten Kultivierungsbedingungen gewählt (*Scale Up*). Die Hauptkulturen fanden in HSG-Medium ohne Glukosezusatz statt. Gestartet wurden alle Kultivierungen mit einer optischen Dichte  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,4 bis 0,8. Die Rekombination wurde durch Induktion mit 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose während der exponentiellen Wachstumsphase gestartet.

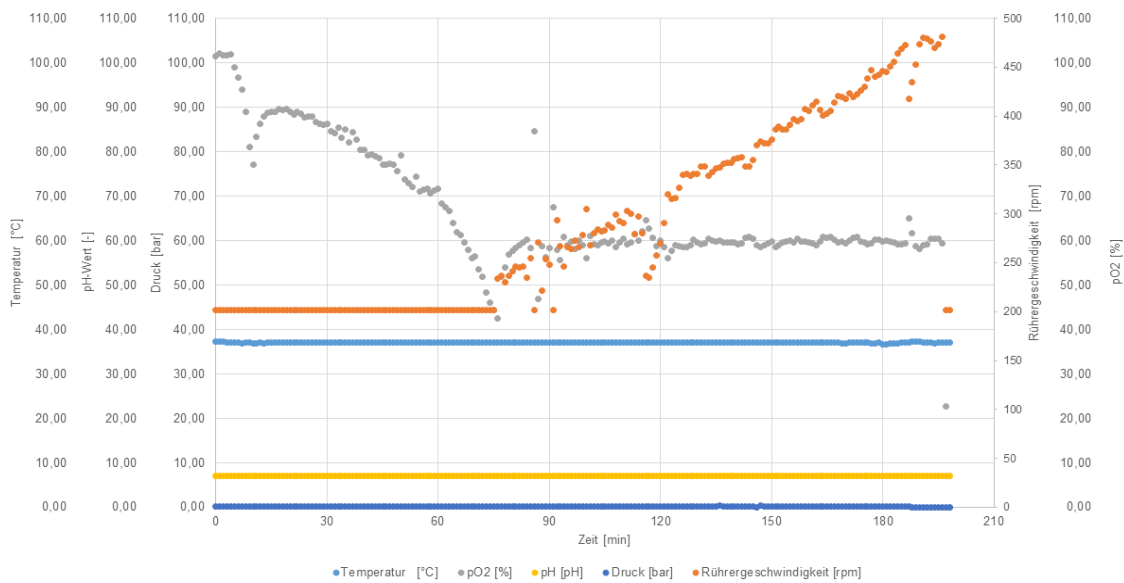


Abbildung 3.3.12 Darstellung von Druck, pH-Wert, Temperatur, pO<sub>2</sub>-Wert und Rührerdrehgeschwindigkeit im Zeitverlauf der Kultivierung von PP1564 im Rührkesselreaktor. Der Zeitpunkt der Inokulation fand zu  $t_{0\text{ min}}$ , der der Induktion zu  $t_{167\text{ min}}$  und der der Beendigung der Kultivierung zu  $t_{197\text{ min}}$  statt.

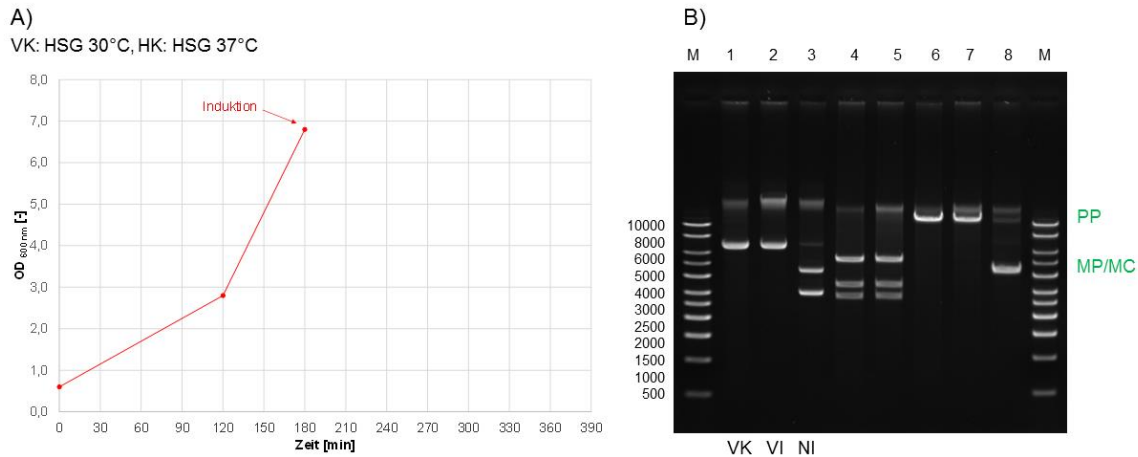


Abbildung 3.3.13 A) Wachstumskurven der *E.coli*-Zellen PP1564 in einer 18 L-Kultivierung im Bioreaktor in HSG-Medium bei 37°C. Die Vorkultur wurde in HSG+Glu+Kan bei 30°C inkubiert. Dargestellt ist die optische Dichte  $OD_{600\text{ nm}}$  [-] der Bakterienkulturen im Zeitverlauf [min]. Der Pfeil gibt den Zeitpunkten der Induktion  $t_{180\text{ min}}$  durch 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose an. Probennahmen erfolgten direkt vor der Induktion und 30 min nach der Induktion. B) Agarosegelelektrophoretische Trennung von PP1564. PP1564=11329 bp, MP1564=4497 bp, MC1564=6832 bp. Spur 1 VK, Spur 2 VI, Spur 3 NI, Spur 4 VK HindIII-Restriktion, Spur 5 VI HindIII-Restriktion, Spur 6 VK SmaI-Restriktion, Spur 7 VI SmaI-Restriktion, Spur 8 NI SmaI-Restriktion. HindIII-Restriktion: PP 2763 bp, 3363 bp, 5203 bp, MP 3363 bp, 1134 bp, MC 6832 bp; SmaI-Restriktion: PP 11329 bp, MP 4497 bp, MC keine Restriktion. Glu: Glukose, Kan: Kanamycin, HK: Hauptkultur, VK: Vorkultur, VI: Vor Induktion, NI: Nach Induktion. M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland).

Am Beispiel der PP1564-Kultivierung in HSG-Medium im 18 L-Rührkesselreaktormaßstab (30 L D-3021, Fa. Bioengineering, Schweiz) wurden mittels BioSCADA Lab NLF Software (NLF 6.6, Analyse 4.5, Fa. Bioengineering, Schweiz) die Werte für Druck [bar], pH-Wert [-], Temperatur [°C], pO<sub>2</sub>-Wert [%] und die Rührerdrehgeschwindigkeit [rpm] im Laufe der Kultivierung aufgezeichnet. Die Kultivierung fand unter pO<sub>2</sub>-Regelung bei einer Sauerstoffsättigung von 60% statt. Die Temperatur betrug 37°C, der pH-Wert 7 und der Luftvolumenstrom lag bei 10 mL min<sup>-1</sup>. Gestartet wurde die Kultivierung durch Inokulation mit einer Schüttelkolbenkultur auf eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,5. Die Vorkultur wurde über Nacht in HSG-Medium mit 100 g L<sup>-1</sup> Glukose und Kanamycin bei 30°C inkubiert. Induziert wurde bei einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von 7 mit 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose. Die Beendigung der Kultivierung erfolgte 30 min nach der Induktion (Kapitel 3.3.2).

Abbildung 3.3.12 stellt die Werte von Druck, pH-Wert, Temperatur, pO<sub>2</sub>-Wert und Rührerdrehgeschwindigkeit im Zeitverlauf der Kultivierung von PP1564 im Rührkesselreaktor

dar. Die Sauerstoffsättigung (pO<sub>2</sub>-Wert) lag zu Beginn der Kultivierung bei 100% und nahm im Laufe der ersten 90 min ab. Nach Unterschreitung der Sauerstoffsättigung unter 60% wurde die Rührerdrehgeschwindigkeit erhöht, um den Sauerstoffeintrag zu erhöhen. Der pO<sub>2</sub>-Wert wurde auf 60% reguliert. Auch Druck, pH-Wert und Temperatur wurden während der Kultivierung konstant gehalten. In Abbildung 3.3.13 A) ist die Wachstumskurve der Bioreaktorkultivierung von PP1564 (11329 bp) bis zum Zeitpunkt der Induktion der Rekombination nach 180 min Kultivierungsdauer dargestellt. Die agarosegelelektrophoretische Trennung der Proben aus der Vorkultur Probe vor der Induktion zeigt, dass keine vorzeitige Rekombination stattfand (Abbildung 3.3.13 B)). Nach der Induktion stellte sich das Rekombinationsprodukt aus 5% Parentalplasmid-DNA, 41% Minicircle-DNA und 54% Miniplasmid-DNA zusammen. Die Gesamt-DNA-Ausbeute lag bei 1300 µgDNA g<sub>BFM</sub><sup>-1</sup>.

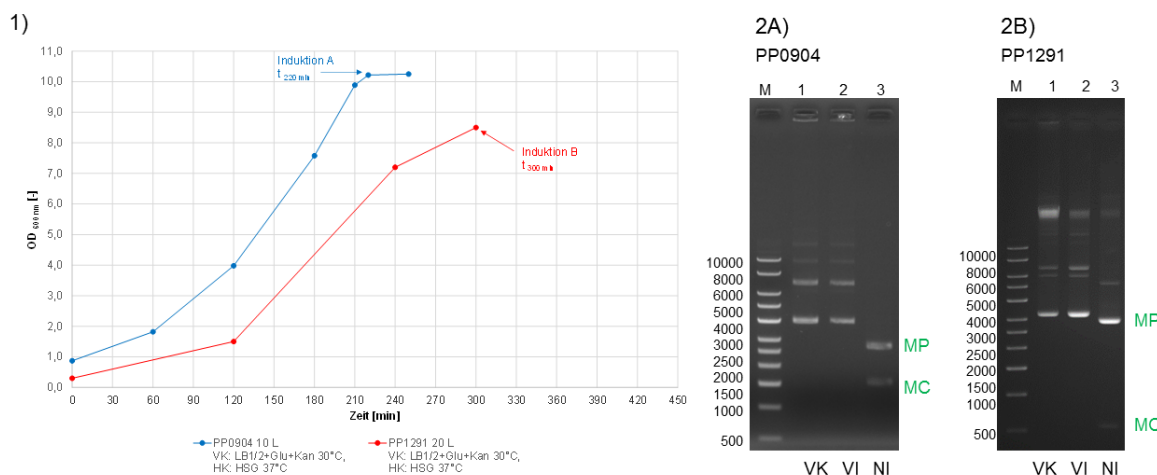
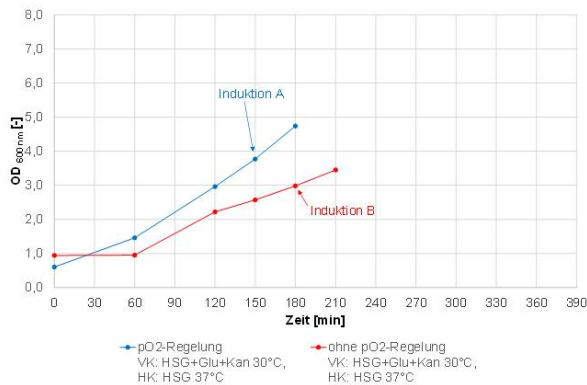


Abbildung 3.3.14 1) Wachstumskurven der *E. coli*-Zellen PP0904 in einer 10 L-Kultivierung und PP1291 in einer 20 L-Kultivierung im Bioreaktor in HSG-Medium bei 37°C. Die Vorkulturen wurden in LB1/2+Glu+Kan bei 30°C inkubiert. Dargestellt ist die optische Dichte OD<sub>600 nm</sub> [-] der Bakterienkulturen im Zeitverlauf [min]. Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Induktion A t<sub>220 min</sub> und B t<sub>300 min</sub> durch 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose an. Probennahmen erfolgten direkt vor der Induktion und 30 min nach der Induktion. 2) Agarosegelelektrophoretische Trennung A) PP0904. PP0904=6754 bp, MP0904=4497 bp, MC0904=2257 bp. Spur 1 VK, Spur 2 VI, Spur 3 NI. B) PP1291. PP1291=4998 bp, MP1291=4497 bp, MC1291=501 bp. Spur 1: VK, Spur 2: VI, Spur 3: NI. Glu: Glukose, Kan: Kanamycin, HK: Hauptkultur, VK: Vorkultur, VI: Vor Induktion, NI: Nach Induktion. M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland).

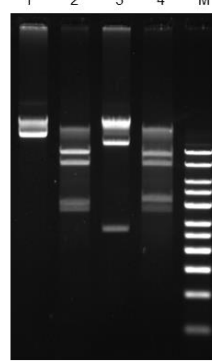
Die Kultivierungen von PP0904 im 10 L- und von PP1291 im 20 L-Rührkesselbioreaktormaßstab fanden in HSG-Medium statt. Beide Kultivierungen wurden unter  $pO_2$ -Regelung bei einer Sauerstoffsättigung von 60% durchgeführt. Die Temperatur betrug  $37^\circ C$ , der pH-Wert 7 und der Luftvolumenstrom lag bei  $5 \text{ mL min}^{-1}$ . Gestartet wurden die Kultivierungen durch Inokulation mit Schüttelkolbenkulturen auf eine  $OD_{600 \text{ nm}}$  zwischen 0,4 und 0,8. Die Vorkulturen wurden über Nacht in LB1/2-Medium mit  $100 \text{ g L}^{-1}$  Glukose und Kanamycin bei  $30^\circ C$  inkubiert (Kapitel 3.3.3). Induziert wurde jeweils in der späten exponentiellen Phase mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  Arabinose. Die Beendigung der Kultivierungen erfolgte 30 min nach der Induktion (Kapitel 3.3.2). In Abbildung 3.3.14 1) sind die Wachstumskurven der Bioreaktorkultivierungen von PP0904 (6754 bp) und PP1291 (4998 bp) gezeigt. Die agarosegelelektrophoretische Trennungen der Proben aus den Vorkulturen und Proben von vor den Induktionen zeigen für beide Parentalplasmide, dass keine vorzeitige Rekombination stattfand (Abbildung 3.3.14 2)). Für PP0904 ergab sich eine Zusammensetzung des Rekombinationsproduktes nach der Induktion von 32% Minicircle-DNA und 68% Miniplasmid-DNA. Diesem Ergebnis entsprachen genau die im Schüttelkolben erzielten Minicircle- und Miniplasmid-DNA-Anteile (Kapitel 3.3.3). Die Gesamt-DNA-Ausbeute erreichte im Bioreaktormaßstab  $1550 \mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{ g}_{\text{BFM}}^{-1}$  und war damit mehr als doppelt so hoch wie die im Schüttelkolbenmaßstab erreichten Werte. Nach der Induktion ergab sich für PP1291 Anteile von 6% Minicircle-DNA und 94% Miniplasmid-DNA im Rekombinationsprodukt. Diese Werte spiegeln die im schüttelkolbenmaßstab erzielte Zusammensetzung des Rekombinationsproduktes wider. Die Gesamt-DNA-Ausbeute lag für PP1291 im Bioreaktormaßstab bei  $600 \mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{ g}_{\text{BFM}}^{-1}$  und war somit etwas um 50% höher als im Schüttelkolben (Kapitel 3.3.3).

1)



2A)

mit pO<sub>2</sub>-Regelung



2B)

ohne pO<sub>2</sub>-Regelung

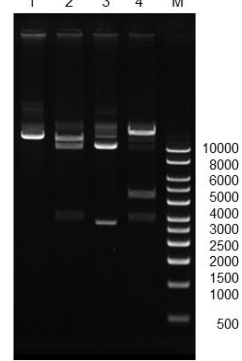


Abbildung 3.3.15 *E.coli*-Zellen PP0962 in 10 L-Kultivierungen im Bioreaktor in HSG-Medium bei 37°C. 1) Wachstumskurven: Die Vorkulturen wurden in HSG+Glu+Kan bei 30°C inkubiert. Dargestellt ist die optische Dichte OD<sub>600 nm</sub> [-] der Bakterienkulturen im Zeitverlauf [min]. Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Induktion A t<sub>150 min</sub> und B t<sub>180 min</sub> durch 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose an. Probennahmen erfolgten direkt vor der Induktion und 30 min nach der Induktion. 2) Agarosegelelektrophoretische Trennung: PP0962=26367 bp, MP0962=4497 bp, MC0962=21870 bp. A) mit pO<sub>2</sub>-Regelung: Spur 1: VI, Spur 2: VI EcoRI-Restriktion, Spur 3: NI, Spur 4: NI EcoRI-Restriktion. EcoRI-Restriktion, PP0962: 218 bp, 3798 bp, 4247 bp, 8144 bp, 9937 bp, MC0962: 218 bp, 3798 bp, 8144 bp, 9711 bp, MP0962: 4474 bp. B) ohne pO<sub>2</sub>-Regelung: Spur 1: VI, Spur 2: VI NotI-Restriktion, Spur 3: NI, Spur 4: NI NotI-Restriktion, NotI-Restriktion, PP0962: 3017 bp, 10490 bp, 12860 bp, MC0962: 3017 bp, 18853 bp, MP0962: 4474 bp. Glu: Glukose, Kan:Kanamycin, HK: Hauptkultur, VK: Vorkultur, VI: Vor Induktion, NI: Nach Induktion. Es wurden 250 ng DNA pro Spur aufgetragen. 0,8% Agarosegel, 100 V, 32 min, M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland).

Die Parentalplasmid-DNA PP0962 wurde im 10 L-Rührkesselbioreaktormaßstab in HSG-Medium kultiviert. Eine Kultivierung fand unter pO<sub>2</sub>-Regelung statt, eine andere ohne pO<sub>2</sub>-Regelung mit einer konstanten Rührerdrehgeschwindigkeit von 200 rpm. Beide Kultivierungen wurden bei 37°C, einem pH-Wert von 7 und einem Luftvolumenstrom von 5 mL min<sup>-1</sup> durchgeführt. Gestartet wurden die Kultivierungen durch Inokulation mit Schüttelkolbenkulturen auf eine OD<sub>600 nm</sub> zwischen 0,4 und 0,8. Die Vorkulturen wurden über Nacht in HSG-Medium mit 100 g L<sup>-1</sup> Glukose und Kanamycin bei 30°C inkubiert (Kapitel 3.3.3). Induziert wurde nach 150 min bzw. 180 min mit jeweils 10 g L<sup>-1</sup> Arabinose. Die Beendigung der Kultivierungen erfolgte 30 min nach der Induktion (Kapitel 3.3.2). In Abbildung 3.3.15 sind die Wachstumskurven der Bioreaktorkultivierungen von PP0962 (26367 bp) mit und ohne pO<sub>2</sub>-Regelung gezeigt. Die agarosegelelektrophoretische Trennungen der Proben aus den Vorkulturen und Proben von vor den Induktionen zeigen für



beide Kultivierungsbedingungen keine vorzeitige Rekombination. Allerdings lag hier der Dimer-Anteil der Parentalplasmid-DNA in der Kultivierung mit pO<sub>2</sub>-Regelung deutlich höher als in der Kultivierung ohne pO<sub>2</sub>-Regelung (Abbildung 3.3.15). Zusammensetzungen der Rekombinationsprodukte nach den Induktionen sind in Tabelle 3.3.2 zusammengefasst. Für das Rekombinationsprodukt aus der Kultivierung mit pO<sub>2</sub>-Regelung ergab sich ein Anteil an Parentalplasmid-DNA-Monomer von 4%, 30% Minicircle-DNA-Monomer und 13% Miniplasmid-DNA-Monomer. Außerdem verteilen sich 53% auf Parentalplasmid- und Minicircle-DNA-Dimer. Diese beiden Anteile lassen sich aufgrund ihrer ähnlichen molekularen Größe agarosegelelektrophoretisch nicht densitometrisch getrennt auswerten. Für die Kultivierung ohne pO<sub>2</sub>-Regelung ergab sich eine Zusammensetzung des Rekombinationsproduktes nach der Induktion von 6% Parentalplasmid-DNA-Monomer, 59% Minicircle-DNA-Monomer und 22% Miniplasmid-DNA-Monomer. Außerdem verteilen sich 13% auf Parentalplasmid- und Minicircle-DNA-Dimer. Die Gesamt-DNA-Ausbeute erreichte im Bioreaktormaßstab 200 µg<sub>DNA</sub> g<sub>BFM</sub><sup>-1</sup> für die Kultivierung mit pO<sub>2</sub>-Regelung, 150-200 µg<sub>DNA</sub> g<sub>BFM</sub><sup>-1</sup> für die Kultivierung ohne pO<sub>2</sub>-Regelung. Diese Werte unterscheiden sich kaum und entsprechen den im Schüttelkolbenmaßstab erzielten Ausbeuten (3.3.3).

Tabelle 3.3.2 Zusammenfassung der gewonnen DNA-Anteile und Gesamt-Plasmid/Minicircle-DNA-Ausbeuten bei Rekombination von PP0962 mit und ohne pO<sub>2</sub>-Regelung im Bioreaktormaßstab.

PP0962 Kultivierung	DNA-Anteile		DNA-Ausbeute [µg <sub>DNA</sub> g <sub>BFM</sub> <sup>-1</sup> ]
	Vor Induktion	Nach Induktion	
<b>mit pO<sub>2</sub>-Regelung</b>	47% PP-Dimer, 53% PP-Monomer	53% PP+MC-Dimer, 4% PP-Monomer, <u>30% MC-Monomer</u> , 13% MP-Monomer	200
<b>ohne pO<sub>2</sub>-Regelung</b>	10% PP-Dimer, 90% PP-Monomer	13% PP+MC-Dimer, 6% PP-Monomer, <u>59% MC-Monomer</u> , 22% MP-Monomer	150-200

Legende: PP: Parentalplasmid, MP: Miniplasmid, MC: Minicircle

Die Kultivierung ohne pO<sub>2</sub>-Regelung hat aufgrund der Sauerstofflimitierung eine reduzierte Replikationsgeschwindigkeit im Kultivierungsverlauf zur Folge. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Kultivierung der relativ großen Parentalplasmid-DNA PP0962 ohne pO<sub>2</sub>-Regelung den Anteil an Dimer-DNA in der Parentalplasmid-DNA als auch im Rekombinationsprodukt im Vergleich zu einer Kultivierung mit guter Sauerstoffversorgung verringert.

### 3.4 Affinitätschromatographische Gewinnung von Minicircle-DNA

Die Minicircle-DNA aus dem durch Kultivierung im Bioreaktor gewonnenen Rekombinationsprodukt (Kapitel 2.2.2) wurde affinitätschromatographisch gereinigt. Die Isolierung der Minicircle-DNA erfolgte dabei über eine spezifische Basensequenz, der *lacO*-Gensequenz, die im Bereich der Minicircle-DNA liegt. Bei der *lacO*-Gensequenz handelt es sich um eine umgekehrte Sequenzwiederholung (*inverted repeat*), die mit dem Lac-Repressor-Protein interagiert. Eingesetzt wurde ein magnetpartikelbasiertes Chromatographiematerial, die Streptavidin gekoppelten SiMAG-Magnetpartikel, an welches das biotinylierte Lac-Repressor-Protein gebunden wurde. Der biotinylierte Lac-Repressor wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt (Kapitel 2.2.3). Der schematische Aufbau des eingesetzten affinitätschromatographischen Trägermaterials wird in Abbildung 3.4.1 dargestellt. Streptavidin ist ein Protein mit einer Größe von etwa 60 kDa, welches unspezifisch an die Magnetpartikel gebunden ist. Es besteht aus vier identischen Untereinheiten von denen jede mit sehr hoher Affinität  $10^{15} \text{ L mol}^{-1}$  jeweils ein Molekül Biotin (244 Da) binden kann [144]. Diese Streptavidin-Biotin-Bindung ist eine der stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen. Das so an die Magnetpartikel gekoppelte biotinylierte Lac-Repressor-Protein bindet spezifisch die *lacO*-Gensequenz der Minicircle-DNA. Das biotinylierte Lac-Repressor-Protein besitzt eine Größe von ca. 40 kDa und ist aus einer großen Protein-Domäne und einer DNA-bindenden Domäne, die sich entlang des Phosphatrückgrats und der großen Furche des DNA-Strangs sequenzspezifisch anlagert, aufgebaut. Die Miniplasmid-DNA besitzt die *lacO*-Gensequenz nicht und wird daher nicht gebunden. Somit erlaubt die affinitätschromatographische Aufreinigung eine sehr gute Trennung von Miniplasmid- und Minicircle-DNA im Millilitermaßstab.

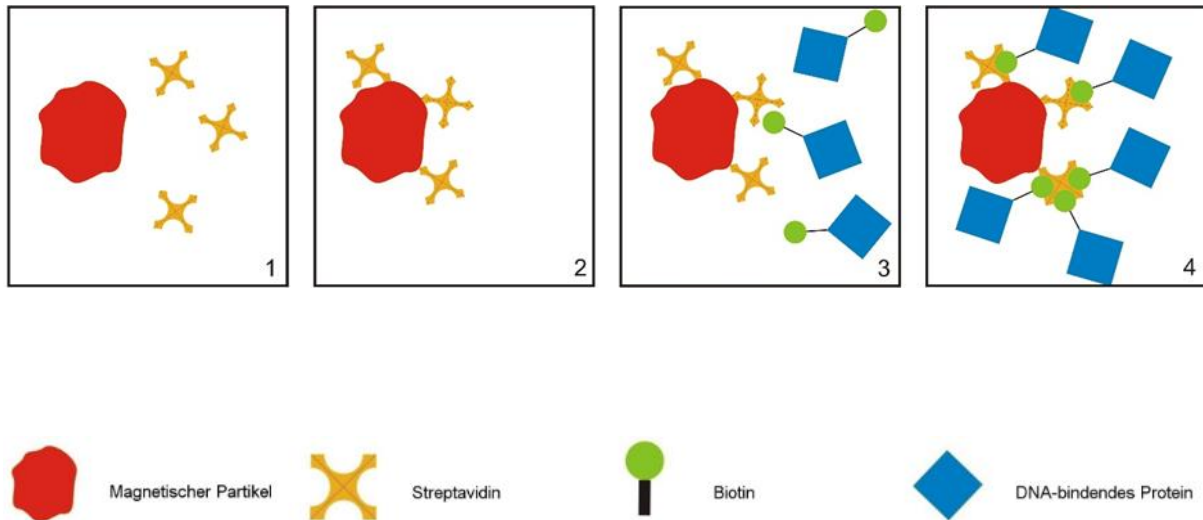


Abbildung 3.4.1 Schematische Darstellung des Beladens der Streptavidin-Magnetpartikel mit biotinylierten Lac-Repressor-Protein. (1) Magnetpartikel und freie Streptavidinmoleküle, (2) Streptavidin bindet unspezifisch an den Magnetpartikel, (3) mit Streptavidin beladene Magnetpartikel und biotinyliertes DNA Bindepotein (Lac-Repressor), (4) der Biotinrest des DNA-bindenden Proteins bindet spezifisch an eine Untereinheit des an den Magnetpartikel gebundenen Streptavidins. (PlasmidFactory GmbH & Co KG.)

### 3.4.1 Gewinnung von Lac-Repressor-Protein und Beladung der Magnetpartikel

Zunächst wurde das DNA-bindende Protein, der biotinylierte Lac-Repressor durch Kultivierung des P0671 besitzenden *E. coli*-Stamms ER2566 (Kapitel 2.2.3) hergestellt. Das Plasmid P0671 beinhaltet die Genkassette, welche für die Arabinose-induzierte Expression des biotinylierten Lac-Repressor-Proteins nötig ist. Zur Überprüfung der Plasmid-DNA P0671 wurde DNA einer Plasmid-DNA-Isolierung der Vorkultur agarosegelelektrophoretisch getrennt (Abbildung 3.4.2). Nach einem Zellaufschluss wurde das Gesamtproteom gereinigt, eine Probe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Der gereinigte biotinylierte Lac-Repressor wurde an die Streptavidin-Magnetpartikel gekoppelt. Eine Probe dieser einsatzbereiten Magnetpartikel wurde ebenfalls mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Detektion des biotinylierten Lac-Repressor-Proteins erfolgte immunochemisch über ein alkalisches Phosphatase-Streptavidin-Konjugat. Die Ergebnisse sind exemplarisch in Abbildung 3.4.1 zu sehen. Die prominenten Banden in Höhe von 40 kDa entsprechen dabei dem biotinylierten Lac-Repressor-Protein und den mit biotinylierten Lac-Repressor beladenen Magnetpartikeln.

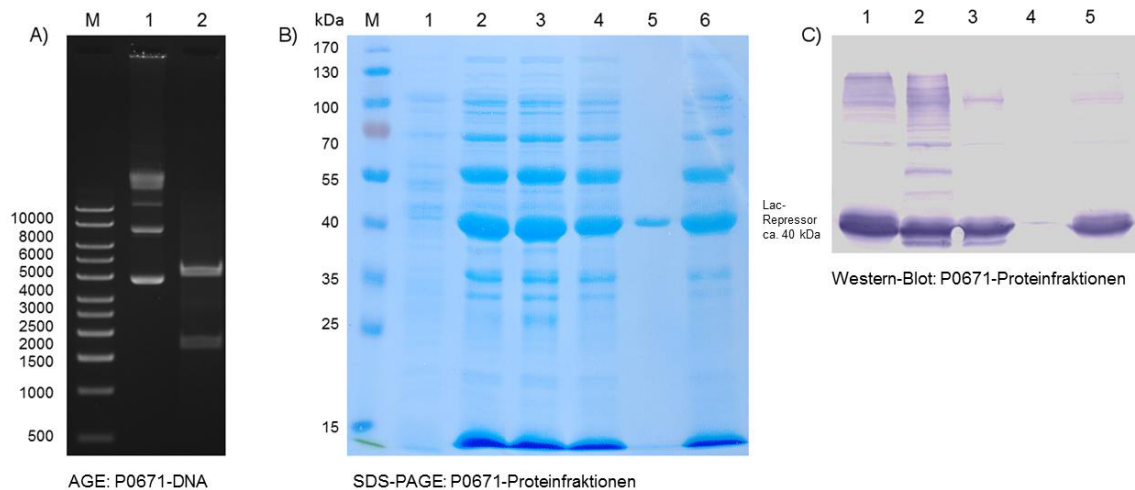


Abbildung 3.4.2 A) Agarosegelelektrophoretische Trennung der Plasmid-DNA P0671 aus einer Plasmid-DNA-Isolierung der Vorkultur. P0671=6008 bp. Spur 1 P0671 ungeschnitten, Spur 2 EcoRV-Restriktion: 4271 bp und 1737 bp. M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland). B) SDS-PAGE der Aufreinigungsfractionen der Gewinnung des Lac-Repressor-Proteins aus der Biofeuchtmasse und die mit Lac-Repressor-Protein beladenen Streptavidin-Magentpartikel. Spur 1 Negativkontrolle: Cytoplasmafraktion der Vorkultur, Spur 2: „Überstand nach Zentrifugation“, Spur 3: Überstand nach Filtration“, Spur 4: „Durchlauf 1“, Spur 5: „beladene Magnetpartikel“, Spur 6: „Durchlauf 2“ Es wurden jeweils 10  $\mu$ L der Fractionen aufgetragen. M: PageRuler® (Prestained Protein Ladder™, Fa. Fisher Scientific, Deutschland). C) Western-Blot mit immunochemische Detektion des Lac-Repressors auf einer PVDF-Membran. Spur 2: „Überstand nach Zentrifugation“, Spur 3: Überstand nach Filtration“, Spur 4: „Durchlauf 1“, Spur 5: „beladene Magnetpartikel“, Spur 6: „Durchlauf 2“ Es wurden jeweils 20  $\mu$ L der Fractionen aufgetragen.

### 3.4.2 Affinitätschromatographische Trennung von Rekombinationsprodukt

Trennung des Rekombinationsproduktes, welches aus Miniplasmid- und Minicircle-DNA besteht erfolgte affinitätschromatographisch. Die Bindung zwischen *lacO*-Gensequenz der Minicircle-DNA und dem biotinylierten Lac-Repressor-Protein ist reversibel und konzentrationsabhängig, so dass die Minicircle-DNA bei bestimmter Pufferkonzentration wieder eluiert werden. Die Miniplasmid-DNA wurde nicht gebunden und kann durch Waschschriffe vollständig entfernt werden. Eventuelle Reste von Parentalplasmid-DNA wurden auf Grund der enthaltenden *lacO*-Gensequenz gebunden und damit auch aufgereinigt. Dieser Parentalplasmid-DNA-Anteil war in der Regel sehr gering (Kapitel 3.3.2) und wurde im anschließenden Schritt, der Anionenaustauscherchromatographie, erfolgreich abgereichert. Das

Eluat enthielt daher schlussendlich reine Minicircle-DNA. In Abbildung 3.4.3 wird schematisch die Affinitätschromatographische Trennung von Minicircle- und Miniplasmid-DNA dargestellt.

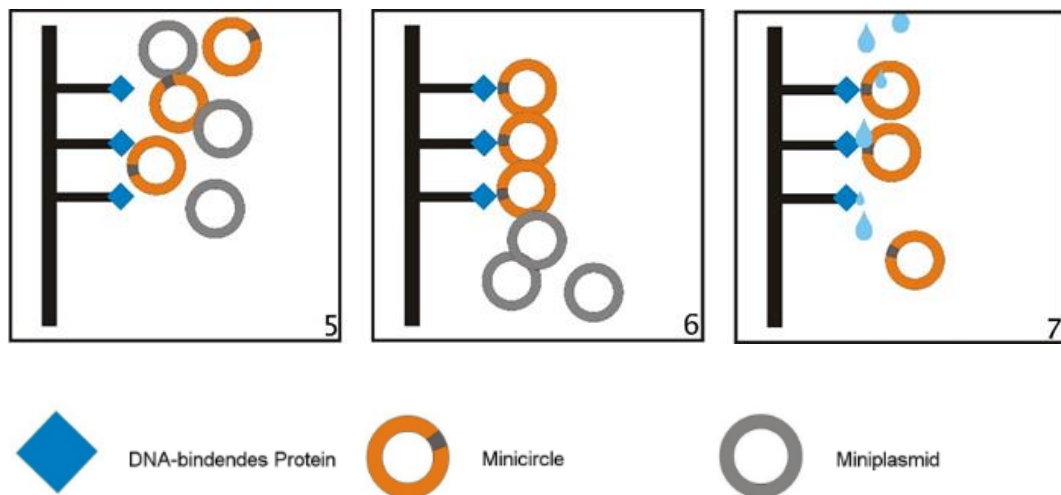
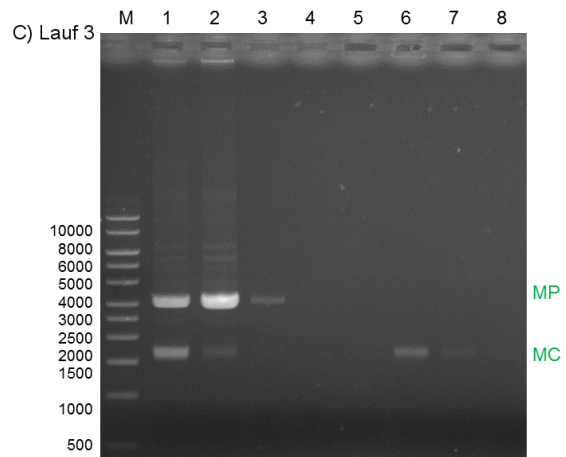
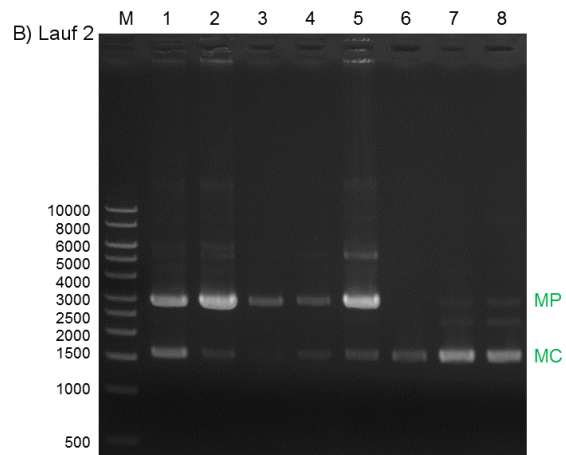
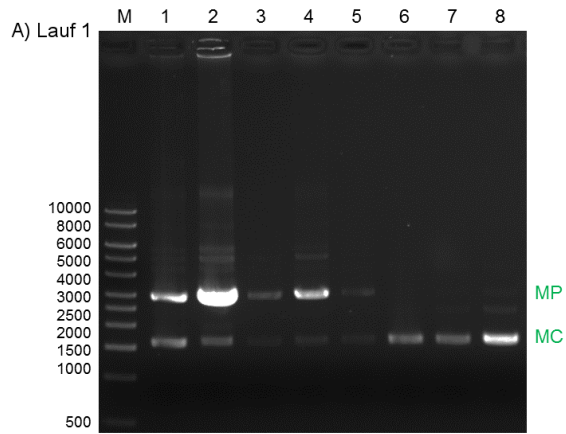


Abbildung 3.4.3 Schematische Darstellung der Affinitätschromatographischen Trennung von Minicircle- und Miniplasmid-DNA. (5) Rekombinationsprodukt, bestehend aus Minicircle- und Miniplasmid-DNA und das mit DNA-bindenden Protein (Lac-Repressor-Protein) beladene Chromatographiematerial, (6) Minicircle-DNA bindet spezifisch über die *lacO*-Gensequenz an den Lac-Repressor, die Miniplasmid-DNA bindet nicht, (7) mittels IPTG-haltigem Puffer wird die Biotin-*lacO*-Sequenz-Bindung gelöst und die Minicircle-DNA eluiert. (PlasmidFactory GmbH & Co KG.)

Der Erfolg der Affinitätschromatographischen Trennung von Miniplasmid- und Minicircle-DNA wurde durch die Agarosegelelektrophoretische Auftrennung der DNA der vorliegenden Fraktionen der Aufreinigungsschritte überprüft. Die Abbildung 3.4.4 und Abbildung 3.4.5 zeigen den Reinigungserfolg anhand des Rekombinationsproduktes MP0904/MC0904. In der Rekombinationsprodukt-Ausgangslösung aus dem Lysat der Kultivierung im Bioreaktor lagen sowohl Miniplasmid- als auch Minicircle-DNA vor. Nach Aufgabe auf das Chromatographiematerial befand sich hauptsächlich Miniplasmid-DNA in der Durchlauf-Fraktion, da die Minicircle-DNA über die *lacO*-Gensequenz an das DNA-bindende Lac-Repressor-Protein gebunden wurde. Nach weiteren Waschschrritten wurde die gesamte Miniplasmid-DNA entfernt und eine reine Minicircle-DNA-Lösung erhalten. In der Regel wurden drei Läufe mit frischer Rekombinationsprodukt-Ausgangslösung pro Volumen Magnetpartikel durchgeführt. Auch die Durchlauf-Fraktionen wurden, da sie noch einen messbaren Anteil an Minicircle-DNA beinhalten, für erneute Läufe eingesetzt.



Schritt		Rekombinationsprodukt-Ausgangslösung	Durchlauf	Waschschnitt*	Waschschnitt 1	Waschschnitt 2	Eluat	Waschschnitt 3	Waschschnitt 4
Lauf 1	MP [%]	63	87	84	91	58	0	1	2
	MC [%]	37	14	16	9	43	100	99	98
Lauf 2	MP [%]	67	94	97	72	88	0	3	6
	MC [%]	33	6	3	28	13	100	97	94
Lauf 3	MP [%]	63	95	100	0	0	0	0	0
	MC [%]	38	5	0	0	0	100	100	100

Abbildung 3.4.4 Agarosegelelektrophoretische Trennung des affinitätschromatographisch gereinigten Rekombinationsprodukt PP0904. PP0904=6754 bp, MP0904= 4497 bp, MC0904=2257 bp. A) Lauf 1, B) Lauf 2, C) Lauf 3. Spur 1: Rekombinationsprodukt-Ausgangslösung, Spur 2: Durchlauf, Spur 3: Waschschrift\* (\*Waschschrift 0), Spur 4: Waschschrift 1, Spur 5: Waschschrift 2, Spur 6: Eluat, Spur 7: Waschschrift 3, Spur 8: Waschschrift 4. Es wurden jeweils 10 µL der einzelnen Fraktionen aufgetragen. M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland). D) prozentuale Anteile an MP- und MC-DNA in den aufgetragenen Fraktionen (LabImage).

### Affinitätschromatographische Aufreinigung von MC0904

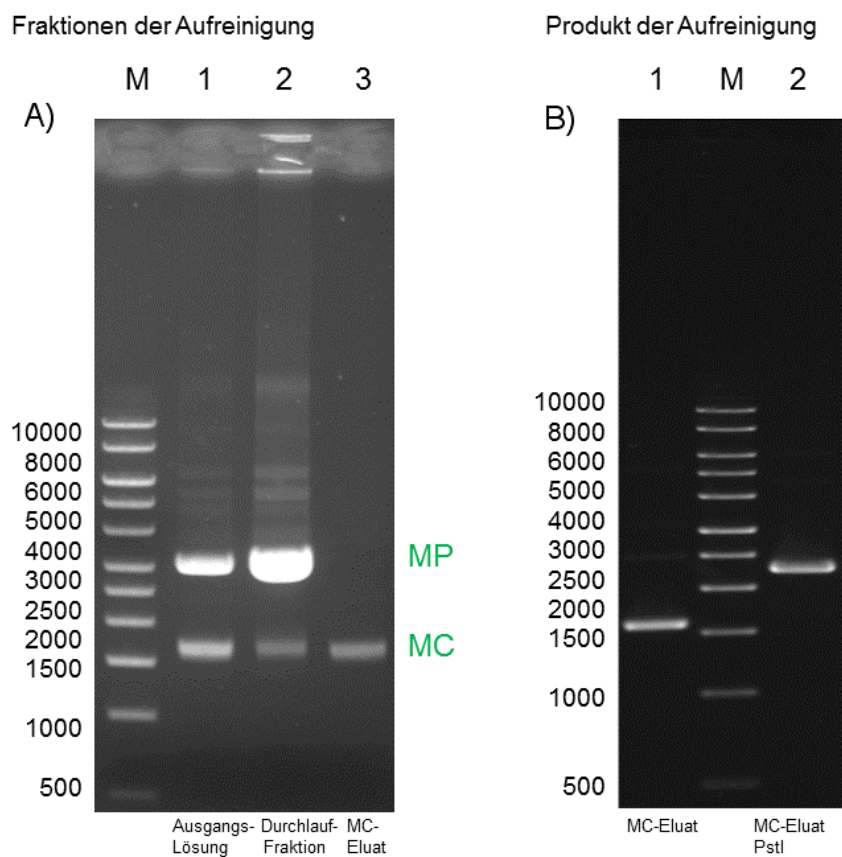


Abbildung 3.4.5 Agarosegelelektrophoretische Trennung von PP0904. PP0904=6754 bp, MP0904= 4497 bp, MC0904=2257 bp. A) affinitätschromatographisch gereinigtes Rekombinationsprodukt PP0904. Spur 1: Rekombinationsprodukt-Ausgangslösung (61,5% MP-DNA, 38,5% MC-DNA), Spur 2: Durchlauf (88,4% MP-DNA, 11,6 MC-DNA), Spur 3: Eluat (100,0% MC-DNA). Es wurden jeweils 10 µL der einzelnen Fraktionen aufgetragen. B) MC0904-Eluat-DNA Spur1: ungeschnitten, Spur 2: PstI-Restriktion 2257 bp. M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland).

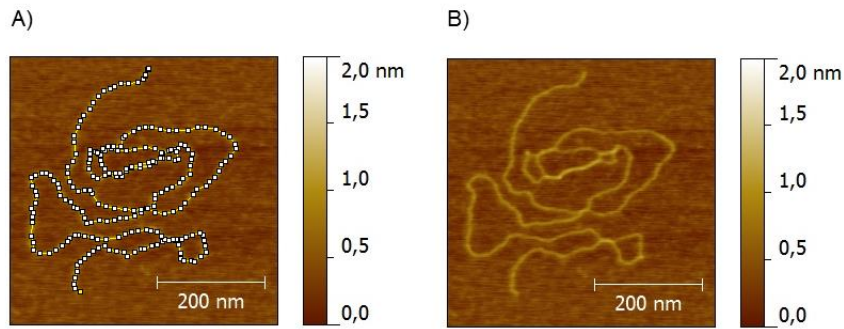
Nach erfolgreicher affinitätschromatischer Gewinnung der Minicircle-DNA wurde das Minicircle-DNA-Eluat mittels Anionenaustauscherchromatographie von Endotoxinen befreit und gereinigt, wobei auch eventuelle Reste von Parentalplasmid-DNA abgereichert wurden (Kapitel 3.6). Der Endotoxinwert eines ungeladenen Streptavidin-Magnetpartikelüberstandes wurde mittels LAL-Test bestimmt und lag bei  $13,2 \text{ EU mL}^{-1}$ . Der Endotoxingehalt der finalen Minicircle-DNA-Lösung sollte  $100 \text{ EU mL}^{-1}$  nicht überschreiten. Das endotoxinfreie Minicircle-DNA-Eluat aus der Anionenaustauscherchromatographie wurde gefällt, in WFI resuspendiert und auf eine Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  eingestellt. Im Anschluss erfolgte eine Qualitätskontrolle, die in den nächsten Kapiteln (Kapitel 3.5 und 3.6) dargestellt wird.

### **3.5 Rasterkraftmikroskopie**

DNA-Moleküle können mittels Rasterkraftmikroskopie abgebildet werden (Kapitel 1.3.2 und 2.6). Aufgrund der Präparationsmethodik der DNA vor der Rasterkraftmikroskopie, lagen die DNA-Proben in einer Mischung verschiedener Konformationen vor. Darunter kam insbesondere die *oc*-(*open circle*) und die lineare Konformation vor. Auch DNA-Moleküle in *ccc*-(*covalently closed circular*)-Konformation ließen sich abbilden. Der DNA-Doppelstrang besitzt einen Durchmesser von ca. 2 nm und die Länge eines Nukleotides beträgt 0,34 nm [127]. Die DNA-Moleküle besitzen auf Grund ihrer Basenpaaranzahl (Tabelle 3.1.1/Tabelle 3.1.2) die folgenden DNA-Strang-Längen PP0904: 2300 nm, MP0904: 1500 nm, MC0904: 770 nm und MC1291: 170 nm. Um die Länge der DNA-Stränge schrittweise zu vermessen, wurde die Analysesoftware *ImageJ* eingesetzt (Research Services Branch (RSB)). In den Abbildung 3.5.1 bis Abbildung 3.5.6 werden Parentalplasmid-, Miniplasmid- und Minicircle-DNA des PP0904, in den Abbildung 3.5.7 bis Abbildung 3.5.9 Konformationen der bisher kleinsten hergestellten Minicircle-DNA MC1291 gezeigt.



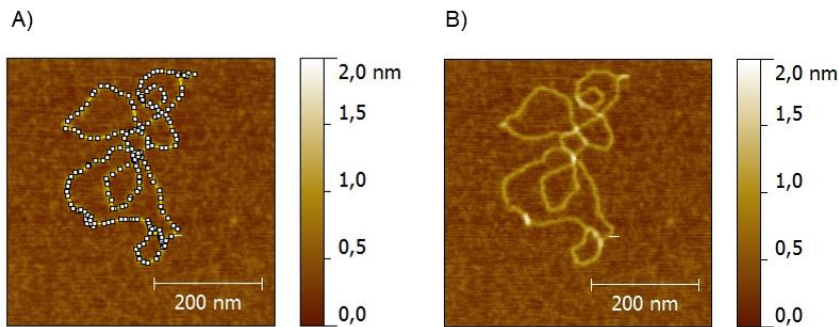
### Lineare Form Parentalplasmid-DNA



DNA-Strang-Länge: ca. 2300 nm

Abbildung 3.5.1 Rasterkraftmikroskopische Abbildungen der linearen Konformation der Parentalplasmid-DNA PP0904. A) ImageJ-Längen-Vermessung ca. 2300 nm, B) Topographie (5 ng DNA, 0,1 M Nickelsulfat, Mica; *AFM tapping mode*). Rechtsseitig ist die Höhenauflösung in nm gezeigt.

### oc-Form Parentalplasmid-DNA



DNA-Strang-Länge: ca. 2300 nm

Abbildung 3.5.2 Rasterkraftmikroskopische Abbildungen der oc-Konformation der Parentalplasmid-DNA PP0904. A) ImageJ-Längen-Vermessung ca. 2300 nm, B) Topographie (5 ng DNA, 0,1 M Nickelsulfat, Mica; *AFM tapping mode*). Rechtsseitig ist die Höhenauflösung in nm gezeigt.

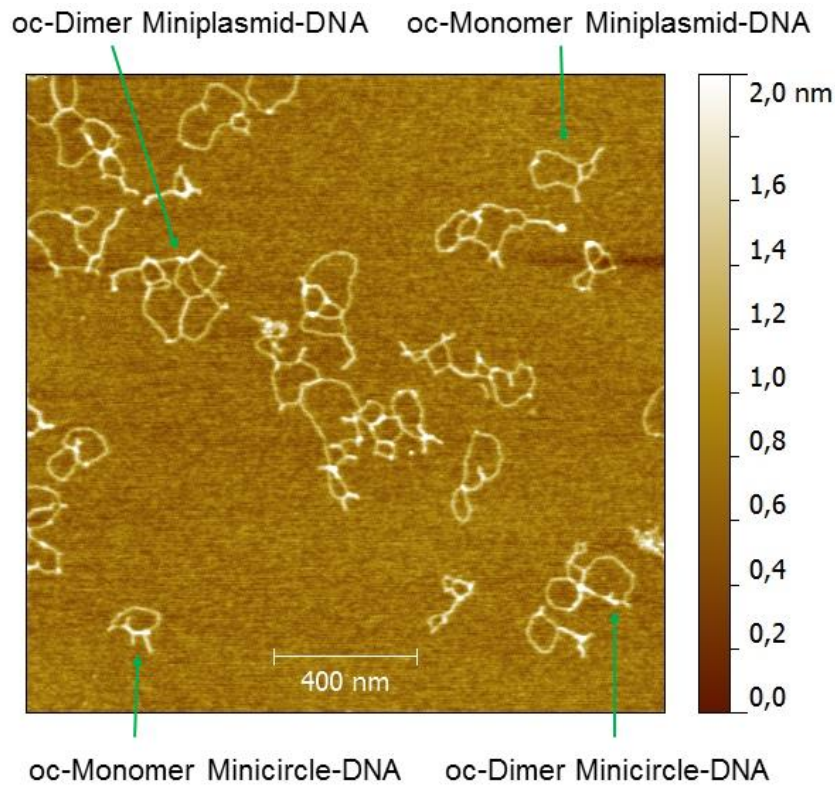
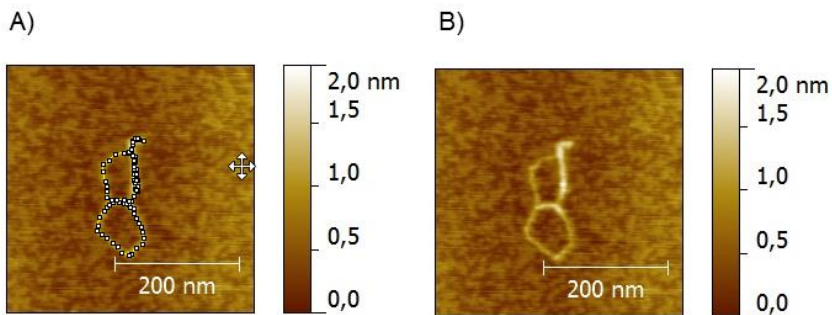


Abbildung 3.5.3 Rasterkraftmikroskopische Übersichtabbildungen der Topographien des Rekombinationsproduktes P0904 mit Miniplasmid-DNA MP0904, Länge 1500 nm und Minicircle-DNA MC0904, Länge: 770 nm, (3 ng DNA, 0,1 M Nickelsulfat, Mica; *AFM tapping mode*). Es liegen Miniplasmid- und Minicircle-DNA jeweils in *oc*-Monomer und *oc*-Dimer-Konformation vor. Rechtsseitig ist die Höhenauflösung in nm gezeigt.

oc-Form Minicircle-DNA

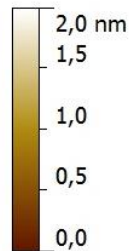
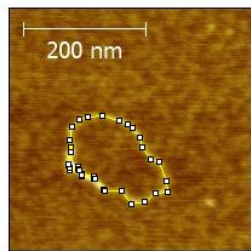


DNA-Strang-Länge: ca. 770 nm

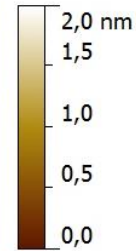
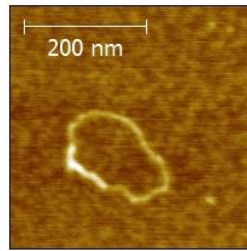
Abbildung 3.5.4 Rasterkraftmikroskopische Abbildungen der Topographie der *oc*-Konformation der Minicircle-DNA MC0904, Länge 800 nm. A) ImageJ-Längen-Vermessung ca. 800 nm, B) Topographie (3 ng DNA, 0,1 M Nickelsulfat, Mica; *AFM tapping mode*). Rechtsseitig ist die Höhenauflösung in nm gezeigt.

oc-Form Minicircle-DNA

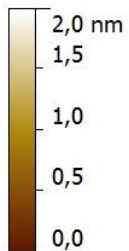
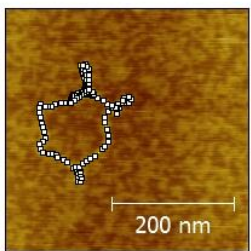
1A)



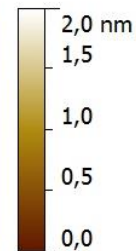
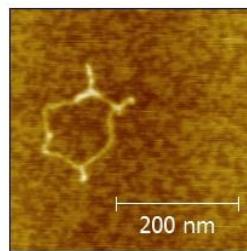
1B)



2A)



2B)

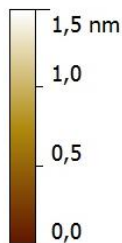
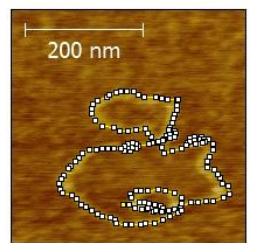


DNA-Strang-Länge: ca. 770 nm

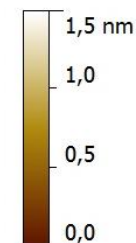
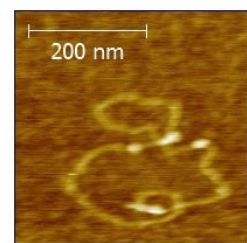
Abbildung 3.5.5 Rasterkraftmikroskopische Abbildungen der Topographie der oc-Konformation der Minicircle-DNA MC0904, Länge 800 nm. A) ImageJ-Längen-Vermessung ca. 800 nm, B) Topographie (3 ng DNA, 0,1 M Nickelsulfat, Mica; *AFM tapping mode*). Rechtsseitig ist die Höhenauflösung in nm gezeigt.

oc-Form Miniplasmid-DNA

A)



B)



DNA-Strang-Länge: ca. 1500 nm

Abbildung 3.5.6 Rasterkraftmikroskopische Abbildungen der Topographie der oc-Konformation der Miniplasmid-DNA MC0904, Länge 1500 nm. A) ImageJ-Längen-Vermessung ca. 1500 nm, B) Topographie (3 ng DNA, 0,1 M Nickelsulfat, Mica; *AFM tapping mode*). Rechtsseitig ist die Höhenauflösung in nm gezeigt.

### ccc-Form Minicircle-DNA

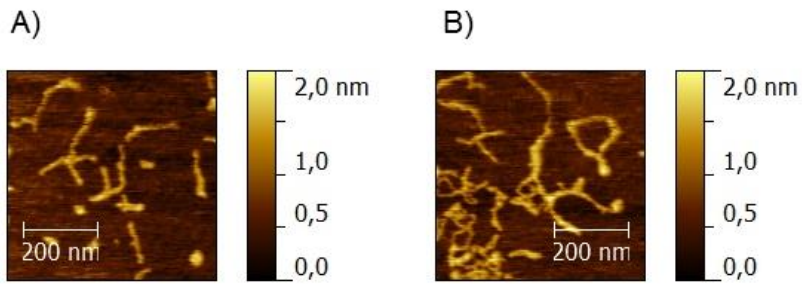
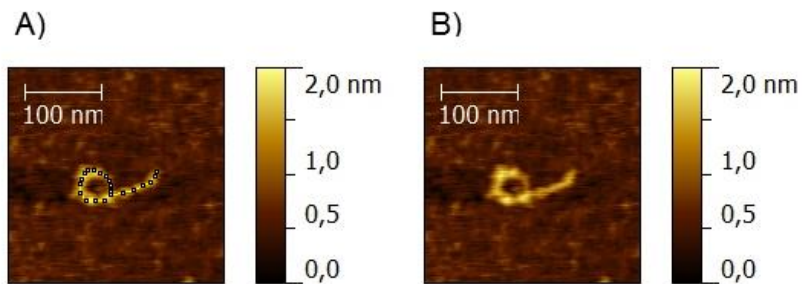


Abbildung 3.5.7 Rasterkraftmikroskopische Abbildungen der Topographie der ccc-Konformation der Minicircle-DNA MC1291, Länge 170 nm. A) + B) Topographien (1 ng DNA, 0,1 M Nickelsulfat, Mica; *AFM tapping mode*). Rechtsseitig ist die Höhenauflösung in nm gezeigt.

### Lineare Form Minicircle-DNA



DNA-Strang-Länge: ca. 170 nm

Abbildung 3.5.8 Rasterkraftmikroskopische Abbildungen der Topographie der linearen Konformation der Minicircle-DNA MC1291, Länge 170 nm. A) ImageJ-Längen-Vermessung ca. 170 nm B) Topographien (1 ng DNA, 0,1 M Nickelsulfat, Mica; *AFM tapping mode*). Rechtsseitig ist die Höhenauflösung in nm gezeigt.

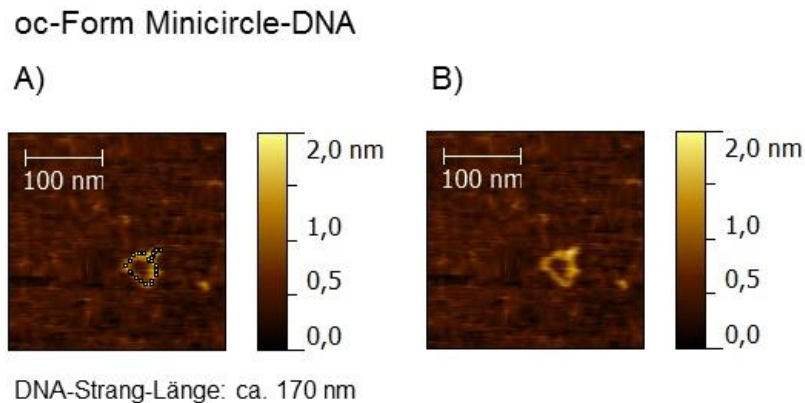


Abbildung 3.5.9 Rasterkraftmikroskopische Abbildungen der Topographie der oc-Konformation der Minicircle-DNA MC1291, Länge 170 nm. A) ImageJ-Längen-Vermessung ca. 170 nm B) Topographien (1 ng DNA, 0,1 M Nickelsulfat, Mica; *AFM tapping mode*). Rechtsseitig ist die Höhenauflösung in nm gezeigt.

### 3.6 Abschließende Analytik und Qualitätskontrolle der Minicircle-DNA

Der Herstellungsprozess von Minicircle-DNA für den Einsatz als nicht-virale Vektoren in biopharmazeutischen Anwendungen erfordert eine nachhaltige Planung der Konstruktion der Parentalplasmide-DNA, des Kultivierungssystems und der Aufarbeitung und Gewinnung reiner Minicircle-DNA. Die erzielten Ergebnisse müssen sorgfältig und reproduzierbar an verschiedenen Orientierungspunkten im Herstellungsprozess begutachtet und ausgewertet werden. Daher werden während des gesamten Minicircle-DNA-Herstellungsprozesses mehrere analytische Proben genommen, so dass die Qualität der hergestellten DNA sichergestellt ist. Zu dieser *in-process control (IPC)* gehören die Agarosegelelektrophorese, die Kapillargelelektrophorese und die kontinuierliche Trennung von DNA mittels Dielektrophorese.

Mittels Agarosegelelektrophorese wurden DNA-Proben verschiedener Zeitpunkte des Herstellungsprozesses und ihre Restriktionsverdauung aufgetrennt (Abbildung 3.6.1 bis Abbildung 3.6.4). Vorhandensein und Zusammensetzung der DNA-Konformationen in den einzelnen Fraktionen wurden bestimmt sowie Verunreinigungen, wie genomische DNA und RNA-Spuren. Densiometrische Auswertungen, mit welchen die Farbdichte in Agarosegelen quantitativ gemessen wurde, lieferten zusätzlich Ergebnisse zu Monomer- und Dimer-Anteilen.



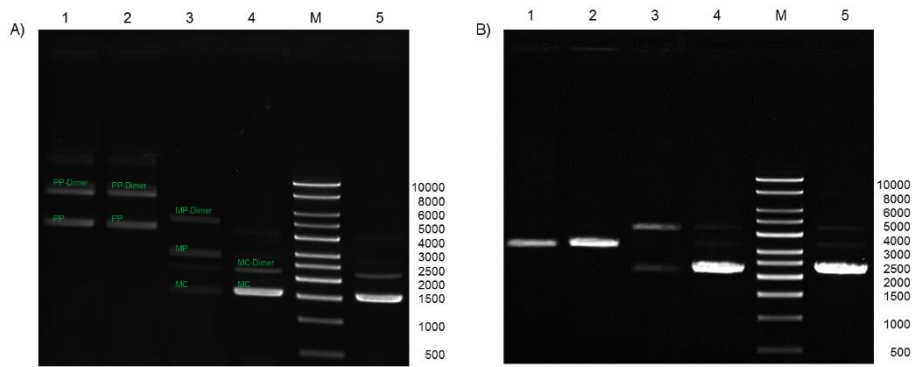


Abbildung 3.6.1 Agarosegelelektrophoretische Trennung von PP0904. PP0904=6754 bp, MP0904=4497 bp, MC0904=2257 bp. A) ungeschnittene DNA von VK, VI, NI und gereinigte Minicircle-DNA, LabImage-Auswertung: VK: 46,7% PP-Dimer, 53,3% PP; VI: 48,7% PP-Dimer, 51,3% PP; NI: 30,3% MP-Dimer, 38,3% MP, 8,5% MC-Dimer, 22,9% MC, gereinigter MC: 14,8% MC-Dimer, 85,5% MC. B) XmnI-geschnittene DNA von VK, VI, NI und gereinigte Minicircle-DNA. PP: 3402 bp, 3352 bp; MP: 4497 bp; MC: 2257 bp. 0,8% Agarosegel, 100 V, 32 min, VK: Vorkultur, VI: Vor Induktion, NI: Nach Induktion. M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland).

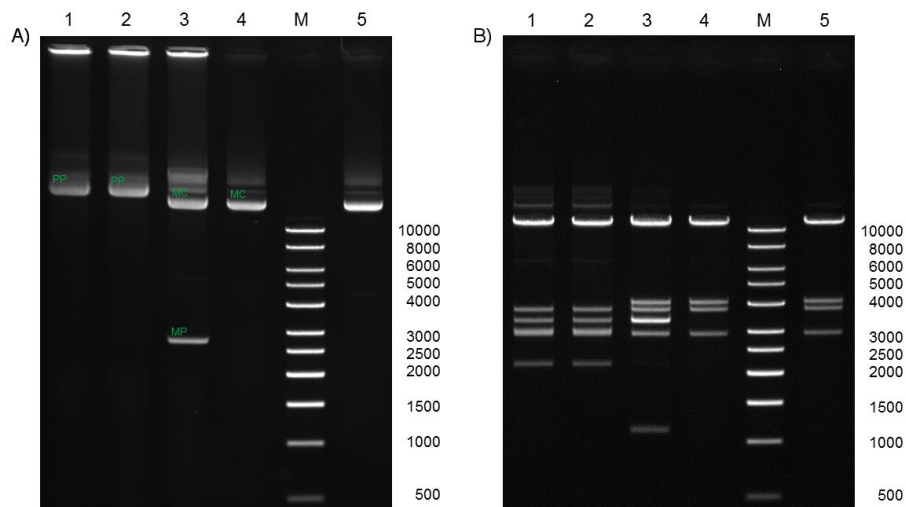


Abbildung 3.6.2 Agarosegelelektrophoretische Trennung von PP0962. PP0962=26367 bp, MP0962=4497 bp, MC0962=21870 bp. A) ungeschnittene DNA von VK, VI, NI und gereinigte Minicircle-DNA, LabImage-Auswertung: VK: 100,0% PP, VI: 100,0% PP, NI: 64,2% MC, 35,8% MP (Dimer-Banden nicht auswertbar), gereinigter MC: 100,0% MC (Dimer-Bande nicht auswertbar) B) HindIII-geschnittene DNA von VK, VI, NI und gereinigte Minicircle-DNA. PP: 11042 bp, 3787 bp, 3363 bp, 3050 bp, 2937 bp, 2188 bp; MP: 3363 bp, 1134 bp; MC: 11042 bp, 4104 bp, 3787 bp, 2937 bp. 0,8% Agarosegel, 100 V, 32 min, VK: Vorkultur, VI: Vor Induktion, NI: Nach Induktion. M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland).

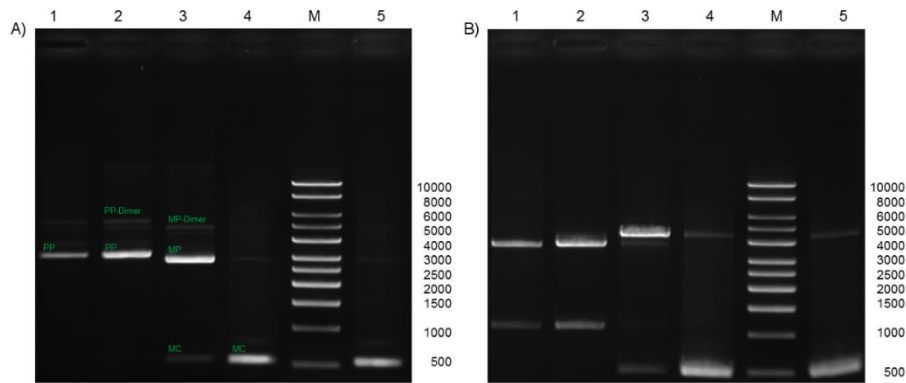


Abbildung 3.6.3 Agarosegelelektrophoretische Trennung von PP1291. PP1291=4998 bp, MP1291=4497 bp, MC1291=501 bp. A) ungeschnittene DNA von VK, VI, NI und gereinigte Minicircle-DNA. LabImage-Auswertung: VK: 9,0% PP-Dimer, 91,0% PP; VI: 9,3% PP-Dimer, 90,7% PP; NI: 7,0 MP-Dimer, 80,3% MP, 12,7% MC (MC-Dimer-Bande nicht auswertbar), gereinigter MC: 6,9% MC-Dimer, 93,1% MC. B) AseI-geschnittene DNA von VK, VI, NI und gereinigte Minicircle-DNA. PP: 3898 bp, 1100 bp; MP: 4497 bp; MC: 501 bp. 0,8% Agarosegel, 100 V, 32 min, VK: Vorkultur, VI: Vor Induktion, NI: Nach Induktion. M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland).

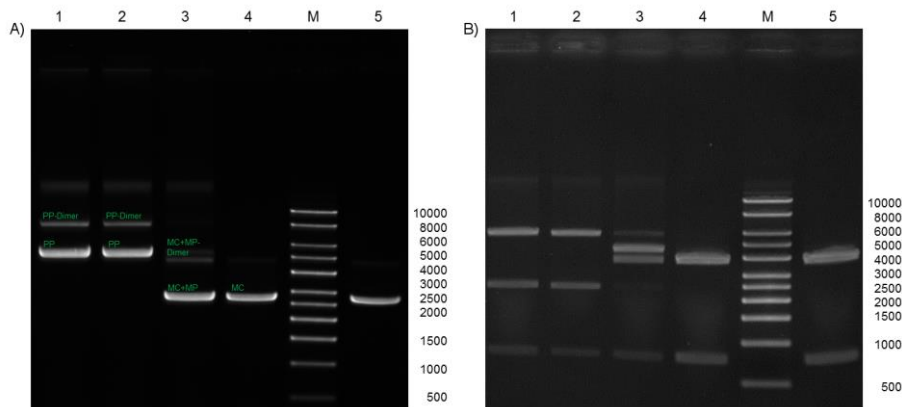


Abbildung 3.6.4 Agarosegelelektrophoretische Trennung von PP1472. PP1472=8965 bp, MP1472=4497 bp, MC1472=4468 bp. A) ungeschnittene DNA von VK, VI, NI und gereinigte Minicircle-DNA. LabImage-Auswertung: VK: 25,4% PP-Dimer, 74,6% PP; VI: 24,5% PP-Dimer, 5,5% PP; 9,0 PP, 16,7% MC/MP-Dimer, 74,3% MC/MP (PP-Dimer-Bande nicht auswertbar); gereinigter MC: 7,5% MC-Dimer, 92,5% MC. B) BamHI-geschnittene DNA von VK, VI, NI und gereinigte Minicircle-DNA. PP: 5708 bp, 2492 bp, 765 bp; MP: 4497 bp; MC: 3703 bp, 765 bp. 0,8% Agarosegel, 100 V, 32 min, VK: Vorkultur, VI: Vor Induktion, NI: Nach Induktion. M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland).

Die Kapillargelelektrophorese (*CGE*) ermöglicht eine sensitive Auftrennung und Bestimmung der vorliegenden DNA-Konformationen während des Herstellungsverfahrens. Es liegen vorwiegend die DNA-Konformationen *ccc*-Monomer und *ccc*-Dimer als auch *oc*-DNA vor. Der Anteil jeder DNA-Konformation wird über eine standardisierte Fläche unter der Kurve, welche proportional zur Menge der DNA-Sorte ist, berechnet. In biopharmazeutischen Anwendungen muss zwingend *ccc*-Minicircle-DNA in reiner Form eingesetzt werden, da diese das geringste Risiko der chromosomalen Integration besitzt und als intaktes Moleküle potentiell vollständig und effizient exprimiert wird [61],[65],[93]. Die durch das vorgestellte System hergestellte Minicircle-DNA besitzt typischerweise einen *ccc*-DNA-Anteil von >90%. Die Reinheit der Minicircle-DNA wird zusätzlich mittels UV-Scan über den Wellenlängenbereich von 220 nm bis 320 nm sichergestellt. In den Abbildung 3.6.5 bis Abbildung 3.6.11 werden *CGE*-Elektrogramme und UV-Scans von hergestellten Minicircle-DNAs dargestellt. Die Abbildung 3.6.12 zeigt die zugehörigen agarosegelelektrophoretischen Trennungen der reinen finalen Minicircle-DNA-Fraktion.

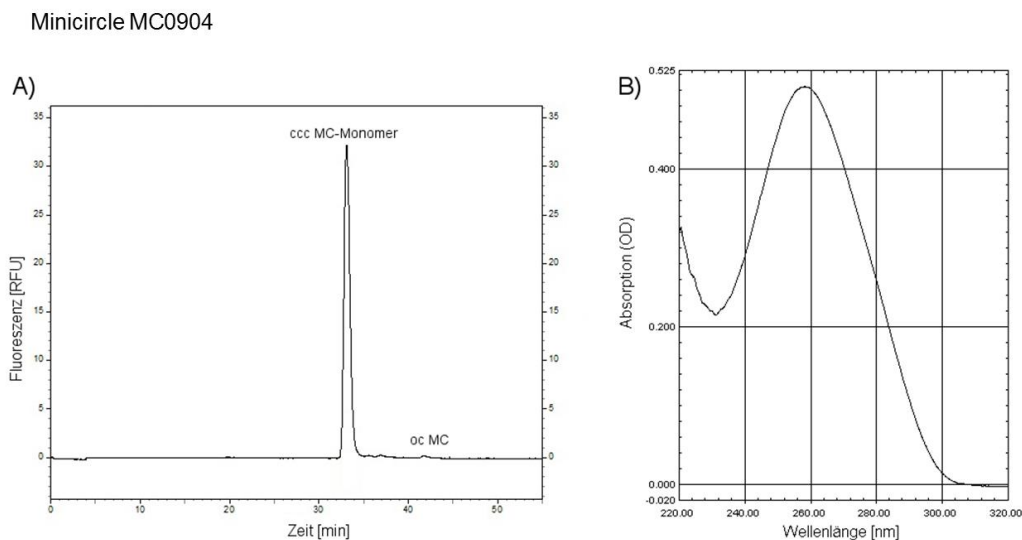


Abbildung 3.6.5 A) *CGE*-Elektropherogramm von MC0904. Migrationszeit: *ccc* MC-DNA 33,21 min, *oc* MC-DNA: 41,52 min; Fläche unter der Kurve: *ccc* MC-DNA- 99,2%, *oc* MC-DNA: 0,8%. YOYO-fluoreszenzmarkierte DNA 30 cm *CGE*-Kapillare, 55 min, 6,5 kV, 2,5 s, 0,4 psi. B) UV-Reinheitsscan von MC0904.  $OD_{260\text{ nm}}=0,499$ ,  $OD_{280\text{ nm}}=0,258$ ,  $260\text{ nm}/280\text{ nm}=1,93$ ,  $c_{\text{DNA}}=2,5\text{ mg mL}^{-1}$ .



Minicircle MC0962

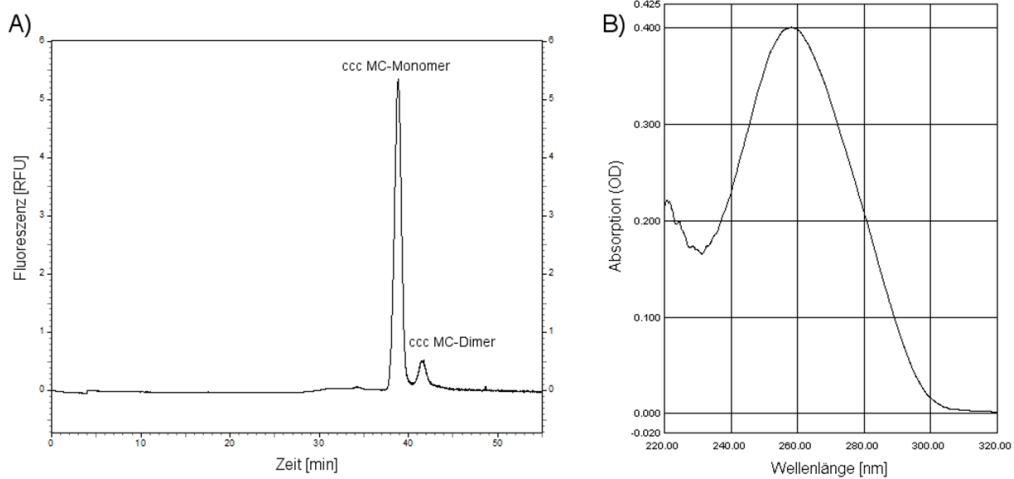


Abbildung 3.6.6A) *CGE*-Elektropherogramm von MC0962. Migrationszeit: ccc MC-Monomer-DNA 38,83 min, ccc MC-Dimer-DNA: 41,70 min; Fläche unter der Kurve: ccc MC-Monomer-DNA- 90,5%, ccc MC-Dimer-DNA: 9,5%. YOYO-fluoreszenzmarkierte DNA 30 cm *CGE*-Kapillare, 55 min, 6,5 kV, 2,5 s, 0,4 psi. B) UV-Reinheitsscan von MC0962.  $OD_{260\text{ nm}}=0,401$ ,  $OD_{280\text{ nm}}=0,221$ ,  $260\text{ nm}/280\text{ nm}=1,81$ ,  $c_{\text{DNA}}=1,0\text{ mg mL}^{-1}$ .

Minicircle MC1239

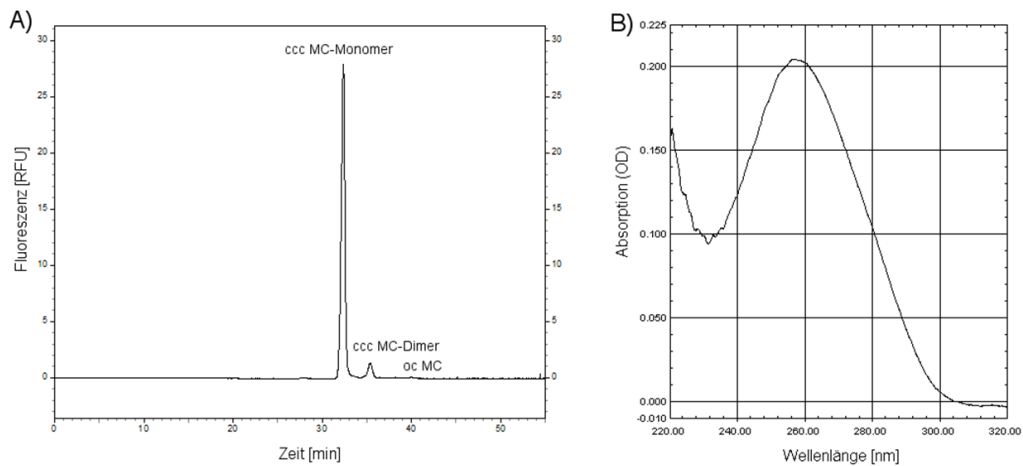


Abbildung 3.6.7 A) *CGE*-Elektropherogramm von MC1239. Migrationszeit: ccc MC-Monomer-DNA 32,36 min, ccc MC-Dimer-DNA: 35,39 min, oc MC-DNA: 39,91 min; Fläche unter der Kurve: ccc MC-Monomer-DNA: 94,2%, ccc MC-Dimer-DNA: 5,4%, oc MC-DNA: 0,4%. YOYO-fluoreszenzmarkierte DNA 30 cm *CGE*-Kapillare, 55 min, 6,5 kV, 2,5 s, 0,4 psi. B) UV-Reinheitsscan von MC1239.  $OD_{260\text{ nm}}=0,201$ ,  $OD_{280\text{ nm}}=0,104$ ,  $260\text{ nm}/280\text{ nm}=1,94$ ,  $c_{\text{DNA}}=1,0\text{ mg mL}^{-1}$ .

Minicircle MC1291

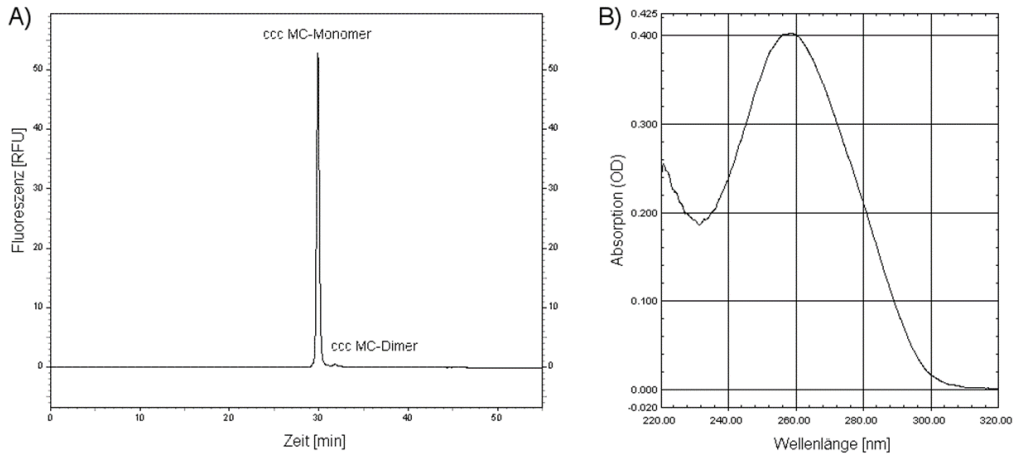


Abbildung 3.6.8 A) *CGE*-Elektropherogramm von MC1291. Migrationszeit: ccc MC-DNA 29,92 min, ccc MC-Dimer-DNA: 31,85 min; Fläche unter der Kurve: ccc MC-Monomer-DNA- 98,8%, ccc MC-Dimer-DNA: 1,2%. YOYO-fluoreszenzmarkierte DNA 30 cm *CGE*-Kapillare, 55 min, 6,5 kV, 2,5 s, 0,4 psi. B) UV-Reinheitsscan von MC1291.  $OD_{260\text{ nm}}=0,401$ ,  $OD_{280\text{ nm}}=0,211$ ,  $260\text{ nm}/280\text{ nm}=1,90$ ,  $c_{\text{DNA}}=1,0\text{ mg mL}^{-1}$ .

Minicircle MC1331

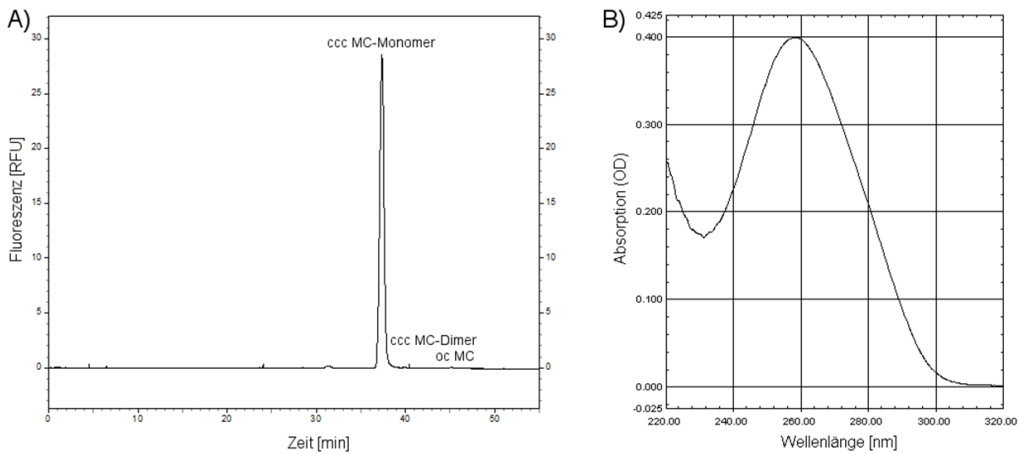


Abbildung 3.6.9 A) *CGE*-Elektropherogramm von MC1331. Migrationszeit: ccc MC-Monomer-DNA 37,37 min, ccc MC-Dimer-DNA: 39,78 min, oc MC-DNA: 45,16 min; Fläche unter der Kurve: ccc MC-Monomer-DNA- 99,4%, ccc MC-Dimer-DNA: 0,3%, oc MC-DNA: 0,3%. YOYO-fluoreszenzmarkierte DNA 30 cm *CGE*-Kapillare, 55 min, 6,5 kV, 2,5 s, 0,4 psi. B) UV-Reinheitsscan von MC1331.  $OD_{260\text{ nm}}=0,398$ ,  $OD_{280\text{ nm}}=0,209$ ,  $260\text{ nm}/280\text{ nm}=1,90$ ,  $c_{\text{DNA}}=1,0\text{ mg mL}^{-1}$ .

### Minicircle MC1472

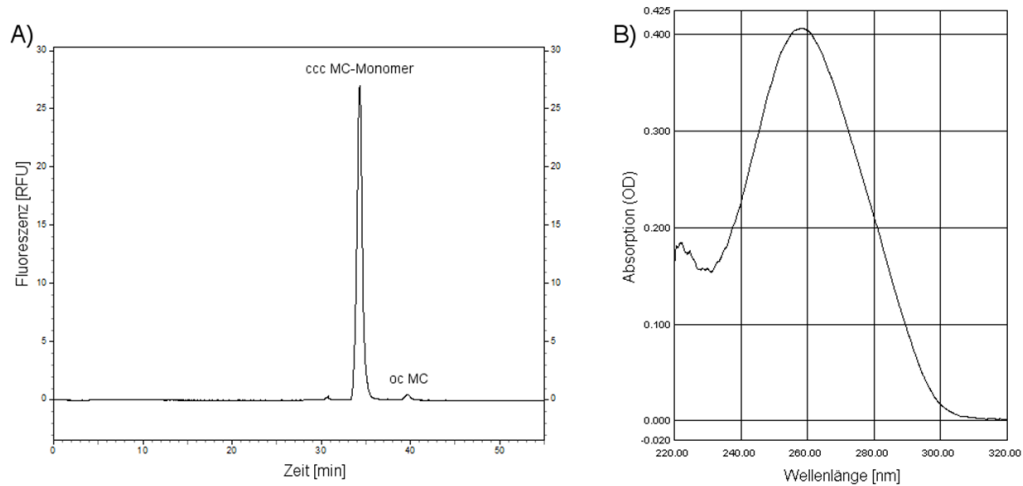


Abbildung 3.6.10 A) *CGE*-Elektropherogramm von MC1472. Migrationszeit: ccc MC-DNA 34,30 min, oc MC-DNA: 39,65 min; Fläche unter der Kurve: ccc MC-DNA: 98,4%, oc MC-DNA: 1,6%. YOYO-fluoreszenzmarkierte DNA 30 cm *CGE*-Kapillare, 55 min, 6,5 kV, 2,5 s, 0,4 psi. B) UV-Reinheitsscan von MC1472.  $OD_{260\text{ nm}}=0,407$ ,  $OD_{280\text{ nm}}=0,213$ ,  $260\text{ nm}/280\text{ nm}=1,91$ ,  $c_{\text{DNA}}=1,0\text{ mg mL}^{-1}$ .

### Minicircle MC1564

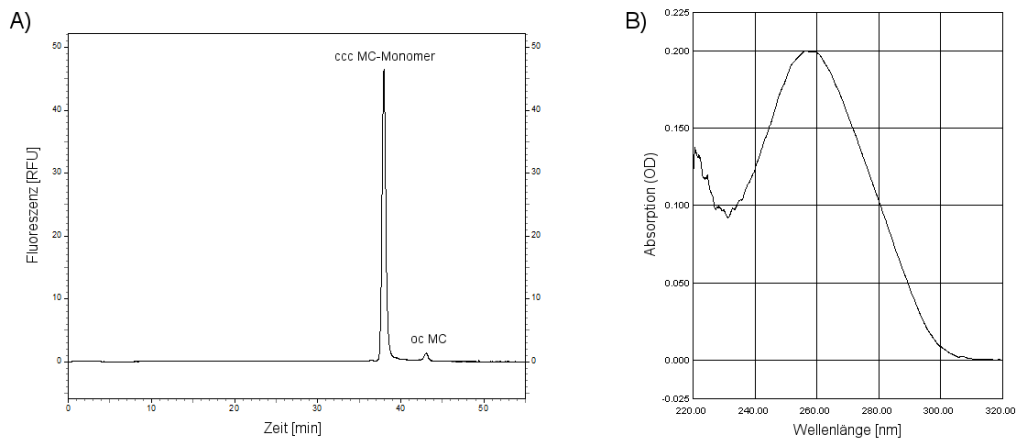


Abbildung 3.6.11 A) *CGE*-Elektropherogramm von MC1564. Migrationszeit: ccc MC-DNA 37,98 min, oc MC-DNA: 43,07 min; Fläche unter der Kurve: ccc MC-DNA: 97,4%, oc MC-DNA: 2,6%. YOYO-fluoreszenzmarkierte DNA 30 cm *CGE*-Kapillare, 55 min, 6,5 kV, 2,5 s, 0,4 psi. B) UV-Reinheitsscan von MC1564.  $OD_{260\text{ nm}}=0,199$ ,  $OD_{280\text{ nm}}=0,104$ ,  $260\text{ nm}/280\text{ nm}=1,91$ ,  $c_{\text{DNA}}=1,0\text{ mg mL}^{-1}$ .

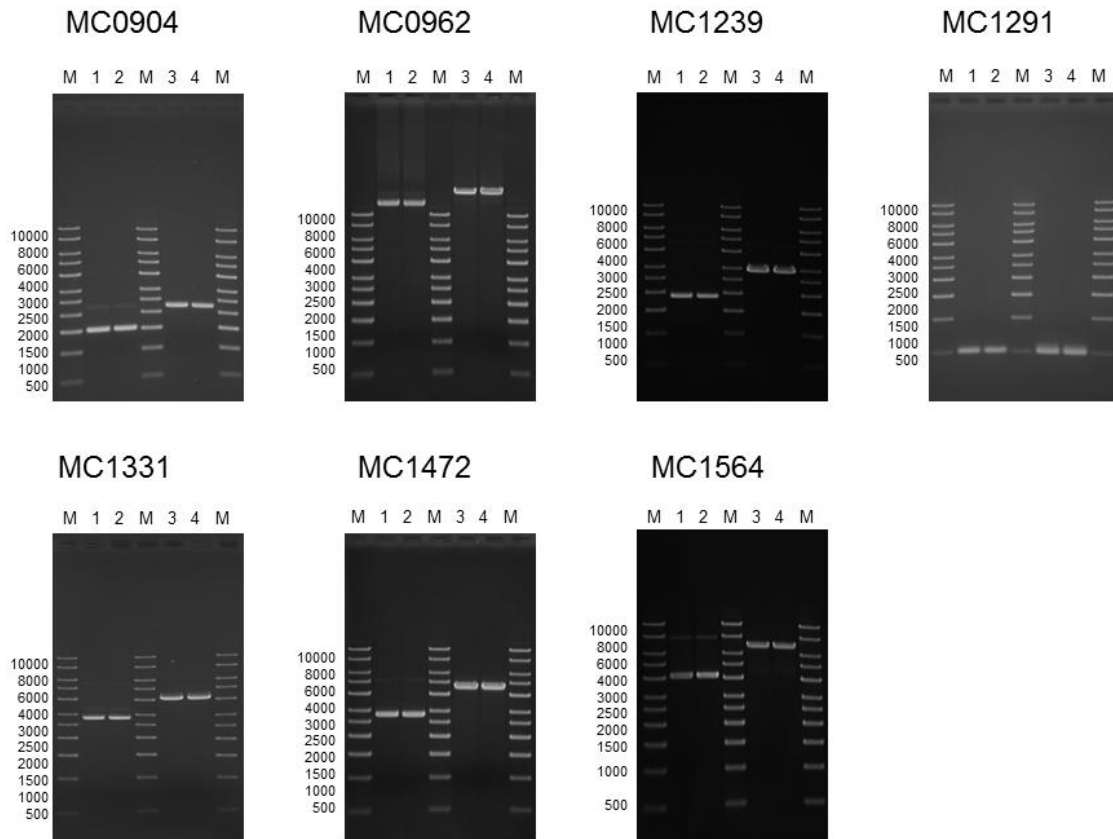


Abbildung 3.6.12 Agarosegelelektrophoretische Trennung von gereiner Minicircle-DNA: MC0904=2257 bp. Spuren 1+2 ungeschnittene MC-DNA, Spuren 3+4 PstI-Restriktion: MC: 2257 bp. MC0962=21870 bp. Spuren 1+2 ungeschnittene MC-DNA, Spuren 3+4 PmeI-Restriktion: MC: 21870 bp. MC1239=2931 bp. Spuren 1+2 ungeschnittene MC-DNA, Spuren 3+4 SwaI-Restriktion: MC: 2931 bp. MC1291=501 bp. Spuren 1+2 ungeschnittene MC-DNA, Spuren 3+4 BglII-Restriktion: MC: 501 bp. MC1331=4311 bp. Spuren 1+2 ungeschnittene MC-DNA, Spuren 3+4 PacI-Restriktion: MC: 201 bp, 4110 bp MC1472-DNA. MC1472=4468 bp. Spuren 1+2 ungeschnittene MC-DNA, Spuren 3+4 PacI-Restriktion: MC: 4468 bp. MC1564-DNA. MC1564=6832 bp. Spuren 1+2 ungeschnittene MC-DNA, Spuren 3+4 EcoRV-Restriktion: MC: 6832 bp. 0,8% Agarosegel, 100 V, 60 min, M=1 kbp DNA-Ladder (Fa. PlasmidFactory, Deutschland).

In Tabelle 3.6.1 sind die mittels Kapillargelelektrophorese ermittelten Anteile der DNA-Konformationen und die Ergebnisse der UV-Reinheitsscans, der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Minicircle zusammengefasst. Das Absorptionsverhältnis  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  lag für alle Minicircle-DNA-Lösungen zwischen 1,8 und 2,0 womit nachgewiesen ist, dass die hergestellten Minicircle-DNA-Lösungen frei von Proteinen sind ( $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  1,98

entspricht einem Proteinanteil von 10%) [107]. Abschließend kann festgehalten werden, dass der Großteil, nämlich 90,5% bis 99,4%, der hergestellten Mincircle-DNA in *ccc*-Konformation vorliegt. Der kleine Restanteil der Mincircle-DNA kommt in *ccc*-Dimer und/oder in *oc*-Monomer-Konformation vor. Dies konnte durch die Trennung der Konformationen mittels Kapillargelelektrophorese gezeigt werden.

Tabelle 3.6.1 Darstellung der Ergebnisse der Kapillargelelektrophorese (CGE), des UV-Reinheitsscans und der Agarosegelelektrophorese (AGE) für Mincircle-DNA in der abschließenden Qualitätskontrolle.

Mincircle	CGE-Elektropherogramm			UV-Reinheitsscan	AGE	
	ccc-Monomer [%]	ccc-Dimer [%]	oc-Monomer [%]	OD <sub>260 nm</sub> /OD <sub>280 nm</sub>	Größe [bp]	Restriktionsendonuklease
MC0904	99,2	0,0	0,8	1,93	2257	PstI
MC0962	90,5	9,5	0,0	1,81	21870	PmeI
MC1239	94,2	5,4	0,4	1,94	2931	SwaI
MC1291	98,8	1,2	0,0	1,90	501	BglII
MC1331	99,4	0,3	0,3	1,90	4311	PacI
MC1472	98,4	0,0	1,6	1,91	4468	PacI
MC1564	97,4	0,0	2,6	1,91	6832	EcoRV

### 3.7 Kontinuierliche Trennung von DNA mittels Dielektrophorese

Für die Mincircle-DNA-Herstellung ist es von besonderer Wichtigkeit, dass der Rekombinationsprozess in Miniplasmid- und Mincircle-DNA nicht vorzeitig beginnt, da dies nach der eigentlichen Induktion der Rekombinations zu nachteiligen Miniplasmid- zu Mincircle-DNA-Verhältnissen führt und vor allem Miniplasmid-DNA vorliegt (Kapitel 3.3.1). Da schon früh im Kultivierungsprozess Miniplasmid-DNA gebildet werden könnte, käme es zu einer starken Zunahme der Miniplasmid-DNA durch Replikation, während die Menge an vorzeitig gebildeter Mincircle-DNA nicht zu nimmt und so die Ausbeute an Mincircle-DNA gering bleibt. Die Zuverlässigkeit des vorgestellten Mincircle-DNA-Systems kein Rekombinationsprodukt frühzeitig während der Kultivierung zu bilden, wurde im Mikrofluidiksystem mittels kontinuierlicher Trennung durch Dielektrophorese gezeigt.

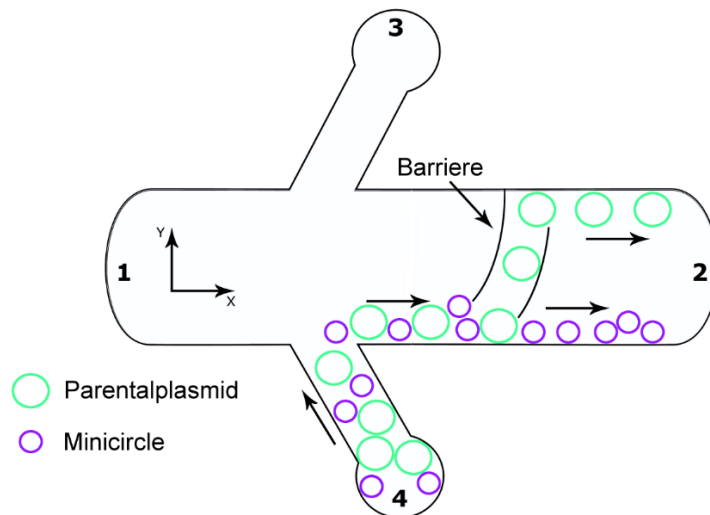


Abbildung 3.7.1 Schematische Darstellung der Konstruktion für die kontinuierliche Trennung von Parentalplasmid- und Minicircle-DNA mittels Dielektrophorese. An die Elektroden in den Reservoirs 1, 3 und 4 liegt eine Wechselspannung an. Reservoir 2 ist geerdet. Die Parentalplasmid- und Minicircle-DNA-Mischung wird kontinuierlich über Reservoir 4 eingespeist. Die DNA-Molekültrajektorien sind mit Pfeilen dargestellt. Die Fluoreszenzintensität entlang der y-Position wird vor und hinter den Barrieren aufgezeichnet.

Getrennt wurden zirkuläre Parentalplasmid- und Minicircle-DNA. Die in diesem Experiment verwendete Parentalplasmid-DNA (PP0904) hatte eine Größe von 6754 bp und die zugehörige Minicircle-DNA (MC0904) eine Größe von 2257 bp und wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die vorherrschende DNA-Konformation ist *ccc*-(*covalently closed circular*)-DNA, welches mittels Kapillargelelektrophorese verifiziert wurde. Abbildung 3.7.1 zeigt eine schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Die Parentalplasmid- und Minicircle-DNA-Mischung wurde kontinuierlich über Reservoir 4 in das Mikrofluidiksystem eingespeist. Die Fluoreszenzintensität der y-Position wurde vor und hinter der Barriere, die den Nanospalt bildet, aufgezeichnet.

Das Gemisch aus *ccc*-Parentalplasmid-DNA und *ccc*-Minicircle-DNA wurden dielektrophoretisch im kontinuierlichen Mikrofluidiksystem unter denselben Bedingungen getrennt, die auch für die Ablenkung der Parentalplasmid-DNA am Nanospalt angelegt wurden. So wurde die größere Parentalplasmid-DNA bei einer Wechselspannung von 200 V und einer Frequenz von 350 Hz gefangen und abgelenkt (Abbildung 3.7.2).

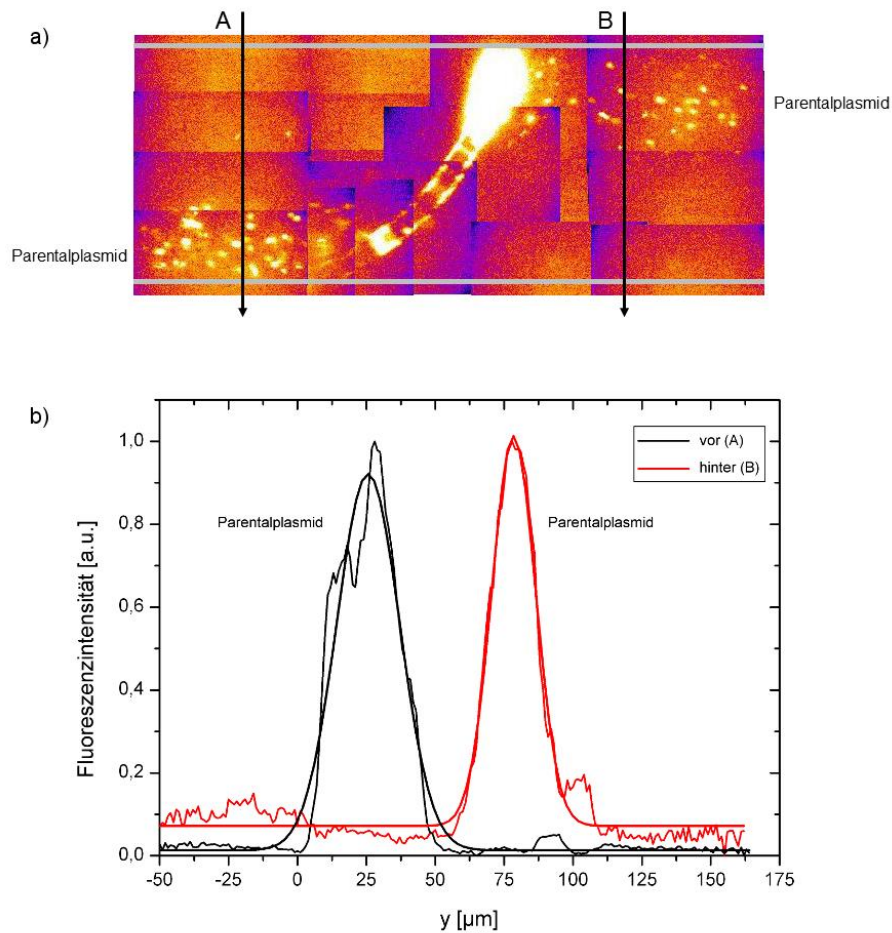


Abbildung 3.7.2 a) Bilderkollage der fluoreszenzmikroskopischen Bilder in Falschfarben (Aufsicht). Die Parentalplasmid-DNA wird auf einer gebogenen Barriere gefangen und abgelenkt (100  $\mu\text{m}$  Kanalbreite und 180 nm Nanospalthöhe,  $U_{ac}=200 \text{ V}$  bei  $\omega=350 \text{ Hz}$ ). Die gelben Punkte stellen jeweils ein fluoreszenzmarkiertes DNA-Molekül da. Flussrichtung von links nach rechts. Es liegt eine Spannung von -7 V dc und 350 Hz bei 200 V an Elektrode 1, -7 V dc an Elektrode 3 und 2 V dc an Elektrode 4 an. Elektrode 2 ist geerdet. b) Blot der Fluoreszenzintensität entlang der  $y$ -Achse. Ablenkung von Parentalplasmid-DNA. Die gemittelte Fluoreszenzintensität wird gegen die  $y$ -Position vor und nach der Barriere aufgetragen. Für die reine Parentalplasmid-DNA tritt sowohl vor der Barriere nur ein Peak auf (schwarz) als auch hinter der Barriere (rot). Die Parentalplasmid-DNA wird an der Barriere abgelenkt und entlang dieser transportiert.

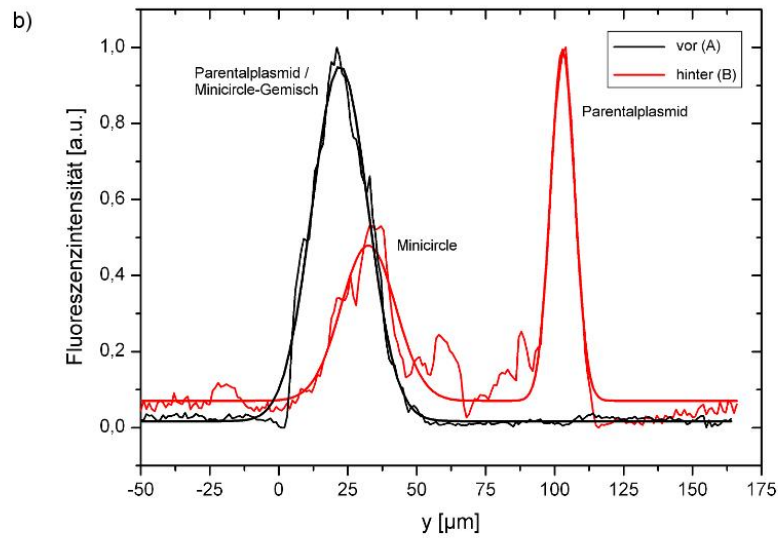
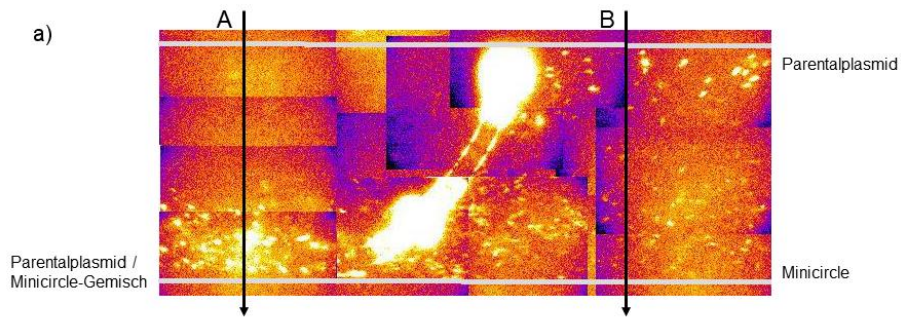


Abbildung 3.7.3 a) Bilderkollage der fluoreszenzmikroskopischen Bilder in Falschfarben (Aufsicht). Trennung des Parentalplasmid-Minicircle-DNA-Gemisches. Die Parentalplasmid-DNA wird auf der gebogenen Barriere gefangen und abgelenkt, während die Minicircle-DNA ungehindert den Nanospalt (100  $\mu\text{m}$  Kanalbreite und 180 nm Nanospalthöhe,  $U_{ac}=200\text{ V}$  bei  $\omega=350\text{ Hz}$ ) passiert. Die gelben Punkte stellen jeweils ein fluoreszenzmarkiertes DNA-Molekül da. Flussrichtung von links nach rechts. Es liegt eine Spannung von  $-7\text{ V dc}$  und  $350\text{ Hz}$  bei  $200\text{ V}$  an Elektrode 1,  $-7\text{ V dc}$  an Elektrode 3 und  $2\text{ V dc}$  an Elektrode 4 an. Elektrode 2 ist geerdet. b) Blot der Fluoreszenzintensität entlang der y-Achse. Trennung von Parentalplasmid-DNA und Minicircle-DNA. Die gemittelte Fluoreszenzintensität wird gegen die y-Position vor und nach der Barriere aufgetragen. Die Parentalplasmid-DNA wird an der Barriere abgelenkt, während die Minicircle-DNA den Nanospalt ungehindert passiert. Die Trennung des Parentalplasmid/Minicircle-DNA-Gemisch erfolgt am Nanospalt. Vor diesem tritt ein Peak auf (schwarz), während hinter dem Nanospalt zwei distinkte Peaks zu sehen sind (rot), die als Parentalplasmid-DNA beziehungsweise Minicircle-DNA identifiziert werden können. Es handelte sich um eine basislinien-aufgelöste Trennung. Die Auflösung für die gaußgefitteten Peaks der beiden DNA-Sorten beträgt  $R_{\text{peak}}=1,24$ . [118].



Die Trennung des Parentalplasmid-/Minicircle-DNA-Gemisches erfolgte anschließend unter denselben Bedingungen (200 V Wechselstrom, 350 Hz). Die Parentalplasmid-DNA wurde auf der Barriere transportiert, während die kleinere Minicircle-DNA ungehindert den Nanospalt passierte (Abbildung 3.7.3). Die Intensitätenverteilungen über den Kanal wurden für die Ablenkung des Parentalplasmid-/Minicircle-DNA-Gemisches in Abbildung 3.7.3 dargestellt. Die Auswertung der Verteilungen der Parentplasmid-/Minicircle-DNA-Trennung zeigte, dass am Nanospalt eine basislinien-aufgelöste Trennung erreicht wurde. Die Auflösung für die gaußgefitteten Peaks der beiden DNA-Sorten betrug  $R_{\text{peak}}=1,24$ . In dieser Versuchsanordnung wurde eine vollständige Trennung von Parentalplasmid- und Minicircle-DNA mit einer sehr hohen Trenneffizienz erreicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kontinuierliche Trennung von DNA-Molekülen mittels Dielektrophorese den schnellen Nachweis von Parentalplasmid-DNA und Minicircle-DNA in kleinen Volumina ermöglichte. Die Analyse mittels Agarosegelelektrophorese oder mittels PCR dauert im Vergleich mehrere Stunden. Im Mikrofluidikkanal begann die Trennung der DNA-Sorten sobald die DNA-Moleküle die Barriere wenige Sekunden nach Injektion des DNA-Molekül-Gemisches erreichten. Die ersten Ergebnisse ließen sich so schon nach weniger als einer Minute gewinnen und gaben Auskunft über die Güte der Rekombination des Parentalplasmids. Die kontinuierliche Trennweise und die Möglichkeit, die einzelnen DNA-Sorten in zwei separaten Zielreservoirs aufzufangen, lassen die DNA-Sorten gezielt für weitere Anwendungen wie z.B. eine Qualitätskontrolle zur Verfügung stehen. Somit ist dieser Trennmechanismus als Teil eines *Lab-on-a-Chip*-Systems geeignet.

In einer weiterführenden Konstruktion wurden Parentalplasmid-DNA (6754 bp), Minicircle-DNA (2257 bp) und Miniplasmid-DNA (4497 bp) erfolgreich voneinander getrennt und in drei verschiedene Reservoirs gelenkt [118],[145]. In Abbildung 3.7.4 ist eine schematische Darstellung der entwickelten Konstruktion gezeigt. Dabei wurde die Mischung der drei DNA-Sorten über ein Reservoir eingespeist und dann iterativ entlang der Barrierestrukturen I und II getrennt. An jeder der Barrierestrukturen wurde eine der DNA-Sorten entfernt und in einem separaten Kanal gesammelt. Der Erfolg der Trennung konnte durch eine Erhöhung der Entfernung zwischen den beiden Barrierestrukturen noch erhöht werden, so dass eine basislinien-aufgelöste Trennung erreicht werden konnte [145].

Diese neue Technik ermöglicht eine sehr schnelle qualitative Kontrolle der Zusammensetzung von hergestelltem Rekombinationsprodukt, welches aus Miniplasmid- und Minicircle-DNA besteht und einer Feststellung von Parentalplasmid-DNA-Restanteilen in weniger als zwei Minuten. Ein weiterer Vorteil neben der Geschwindigkeit dieser Trennungsmethode ist der geringe Probenverbrauch [145]. Für die funktionierende Trennung der drei DNA-Sorten ist keine Fluoreszenzmarkierung nötig. Da die vorgestellte Trennungsmethode zudem frei von toxischen und mutagenen Reagenzien ist, entspricht sie den GMP-Richtlinien und Anforderungen der Gesundheitsbehörden. Dies ermöglicht eine schnelle Reinigung von Minicircle-DNA direkt aus dem gereinigten Klarlysat des Rekombinationsproduktes, so dass reine Minicircle-DNA im kleinen Maßstab nach nur wenigen Reinigungsschritten gewonnen werden kann und als nicht viraler DNA-Vektor für biopharmazeutische Anwendungen zur Verfügung steht [145].

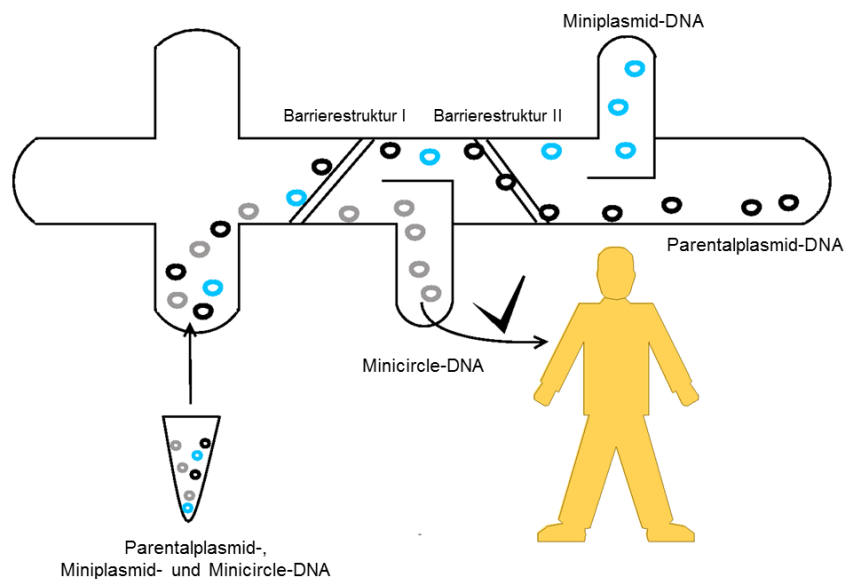


Abbildung 3.7.4 Schematische Darstellung der Konstruktion für die kontinuierliche Trennung von Parentalplasmid-, Miniplasmid- und Minicircle-DNA mittels Dielektrophorese. Die DNA-Mischung wird kontinuierlich über Reservoir 4 eingespeist und dann iterativ entlang der Barrierestrukturen I und II getrennt. (verändert nach Viefhues *et al.* [145]).

Diese neue Technik der dreifachen Trennung ermöglicht eine sehr schnelle qualitative Kontrolle der Zusammensetzung von hergestelltem Rekombinationsprodukt, welches aus Miniplasmid- und Minicircle-DNA besteht und einer Feststellung von Parentalplasmid-DNA-

Restanteilen in weniger als zwei Minuten. Ein weiterer Vorteil neben der Geschwindigkeit dieser Trennungsmethode ist der geringe Probenverbrauch [145]. Für die funktionierende Trennung der drei DNA-Sorten ist keine Fluoreszenzmarkierung nötig. Da die vorgestellte Trennungsmethode zudem frei von toxischen und mutagenen Reagenzien ist, entspricht sie den GMP-Richtlinien und Anforderungen der Gesundheitsbehörden. Dies ermöglicht eine schnelle Reinigung von Minicircle-DNA direkt aus dem gereinigten Klarlysat des Rekombinationsproduktes, so dass reine Minicircle-DNA im kleinen Maßstab nach nur wenigen Reinigungsschritten gewonnen werden kann und als nicht viraler DNA-Vektor für biopharmazeutische Anwendungen zur Verfügung steht [145].

## 4 Zusammenfassung

Ziel der durchgeführten Forschung war die Weiterentwicklung und Optimierung eines Herstellungsprozesses von Minicircle-DNA als nicht viralen DNA-Vektor für den Einsatz in biopharmazeutischen Anwendungen, wie der Gentherapie. Im Rahmen dieser Arbeit wurden geeignete Parentalplasmid-DNA-Vektoren konstruiert und der *in vivo* Rekombinationsprozess der Parentalplasmid-DNA in Miniplasmid- und Minicircle-DNA evaluiert, um der Erfolg der Rekombination zu maximieren. Außerdem wurde ein produktives Kultivierungsverfahren mit reproduzierbaren Kultivierungsbedingungen sowohl für den Schüttelkolbenmaßstab als auch für den Bioreaktormaßstab entwickelt. Für die Reinigung der gewonnenen Minicircle-DNA wurden zwei Methoden vorgestellt, die eine effiziente Trennung von Miniplasmid- und Minicircle-DNA ermöglichen. Dabei handelte es sich um eine affinitätschromatographische Trennung über eine Protein-bindende spezifische DNA-Sequenz und die kontinuierliche Trennung im Mikrofluidikanal mittels Dielektrophorese.

Minicircle-DNA-Vektoren bestehen neben dem Gen von Interesse aus einem geeigneten Promotor und einer Rekombinationserkennungssequenz. Replikationsursprung und Antibiotikaresistenzgene werden ebenso entfernt wie die CpG-Motive, die im bakteriellen Rückgrat enthalten sind. Das Fehlen dieser Gene und Bereiche ist vorteilhaft, da diese in biopharmazeutischen Anwendungen unerwünscht sind. Hergestellt wird die Minicircle-DNA durch einen ortsspezifischen Rekombinationsprozess, bei dem die Parentalplasmid-DNA mit Hilfe geeigneter Rekombinationenzyme so gespalten und neuverknüpft wird, dass die zirkuläre Minicircle-DNA resultierte. Im Herstellungsprozess von Minicircle-DNA wird diese gezielte Rekombination der DNA-Sequenz genutzt, um einen gewünschten DNA-Sequenzabschnitt aus einer Plasmid-DNA herauszutrennen und zirkulär vorliegen zu haben [64]. Der Konstruktion der Ausgangsparentalplasmid-DNA, in die die gewünschte Expressionskassette eingebracht wurde, kommt besondere Bedeutung zu, da diese für den Erfolg des Rekombinationsprozesses grundlegend ist. Der Erfolg der Rekombination ist gekennzeichnet durch einen sehr geringen Restanteil an Parentalplasmid-DNA, welcher vorzugsweise bei null oder nur wenigen Prozent liegen sollte, und einem hohen Anteil an Minicircle-Monomer in superspiralierter *ccc*-Konformation. Die in dieser Arbeit eingesetzte Ausgangsparentalplasmid-DNA ist ein sehr beständiges Konstrukt, welches in einem weiten Temperaturspektrum stabil vorliegt und nicht zu einer vorzeitigen, nicht induzierten

Rekombination neigt. Der Zeitpunkt und die Zeitdauer der Induktion der Rekombination als auch die eingesetzte Induktorkonzentration haben einen Einfluss auf den Rekombinationserfolg. Der optimale Zeitpunkt für eine Induktion der Rekombination der Parentalplasmid-DNA in Miniplasmid- und Minicircle-DNA mit einem möglichst geringen Restanteil an Parentalplasmid-DNA ist während der späten exponentiellen Wachstumsphase festzusetzen. Daher muss für jede Parentalplasmid-DNA und jede eingesetzte Kultivierungsbedingungen im Vorfeld eine Wachstumskurve aufgenommen werden, um den zeitlichen Verlauf der Wachstumsphasen für die zu kultivierende Parentalplasmid-DNA zu bestimmen. Eine Induktion während der stationären Phase sollte sicher ausgeschlossen werden, da zu diesem Zeitpunkt ein sehr hoher Parentalplasmid-DNA-Restanteil verbleibt. Eine Induktion mit  $20 \text{ g L}^{-1}$  Arabinose in der exponentiellen Wachstumsphase verschiebt die prozentualen Anteile von Parentalplasmid-, Miniplasmid- und Minicircle-DNA nicht weiter zu Gunsten der Minicircle-DNA, so dass eine Gabe von  $10 \text{ g L}^{-1}$  Arabinose als ausreichend befunden wird. Die optimale Induktionszeitdauer ist nur minimal von der Parentalplasmid-DNA und von der Art der Kultivierung abhängig. Die Ergebnisse zeigen, dass 30 min nach der Induktion maximale prozentuale Anteile an Minicircle-DNA erreicht werden. Nach diesem Zeitpunkt kommt es zu einer Replikation der Miniplasmid-DNA, währenddessen der absolute Anteil an Minicircle-DNA gleichbleibend ist. Die Ausbeute an Parentalplasmid- bzw. Minicircle-DNA kann durch die Wahl der Kultivierungsmedien beeinflusst werden. Ein Wechsel des Kulturmediums von Vor- zur Hauptkultur wirkt sich in Abhängigkeit der eingesetzten *E. coli*-Zellen und darin enthaltenden Parentalplasmide unterschiedlich aus. So kann die Veränderung der Kultivierungsbedingungen zu einer Verzögerung in der Replikationsgeschwindigkeit und einem frühen Eintritt in die stationäre Phase führen, keine Auswirkungen haben oder nach einer verlängerten Latenzphase eine erhöhte Replikationsgeschwindigkeit aufweisen. Die Kultivierungsbedingungen, die optimale DNA-Ausbeuten und hohe Minicircle-DNA-Anteile im Rekombinationsprodukt bewirken, müssen für jede neu eingesetzte Parentalplasmid-DNA separat erfasst werden. Bei besonders großen Parentalplasmiden ( $>20 \text{ kbp}$ ) hat eine Kultivierung ohne  $\text{pO}_2$ -Regelung aufgrund der Sauerstofflimitierung eine reduzierte Replikationsgeschwindigkeit im Kultivierungsverlauf zur Folge, so dass der Anteil an Dimer-DNA in der Parentalplasmid-DNA als auch im Rekombinationsprodukt im Vergleich zu einer Kultivierung mit guter Sauerstoffversorgung verringert wird. Die Reinigung der gewonnenen Minicircle-DNA aus dem Rekombinationsprodukt ist mittels affinitätschromatographischer Trennung erfolgreich. Die

Miniplasmid-DNA kann vollständig entfernt werden, allerdings kommt es auch zu Verlust von Minicircle-DNA. Die Qualität der gewonnenen Minicircle-DNA lässt sich durch die vorgestellten Verfahren, Agarosegelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese, UV-Absorptionsscan, LAL-Test und kontinuierliche Trennung von DNA mittels Dielektrophorese bewerten. Die durch das vorgestellte System hergestellte Minicircle-DNA besitzt typischerweise einen *ccc*-DNA-Anteil von 90,5% bis 99,4% und ein Absorptionsverhältnis  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  zwischen 1,8 und 2,0, womit nachgewiesen ist, dass die hergestellten Minicircle-DNA-Lösungen frei von Proteinen sind. Die Reinheit der Minicircle-DNA wird zusätzlich mittels UV-Scan über den Wellenlängenbereich von 220 nm bis 320 nm sichergestellt. Der Endotoxinwert liegt unter  $100\text{ EU mL}^{-1}$ . Außerdem können die DNA-Sorten Parentalplasmid-, Miniplasmid- und Minicircle-DNA mittel Rasterkraftmikroskopie abgebildet werden. Die Zuverlässigkeit des vorgestellten Minicircle-DNA-Systems kein Rekombinationsprodukt frühzeitig während der Kultivierung zu bilden, wurde im Mikrofluidikkanal mittels kontinuierlicher zweifach-Trennung von Parentalplasmid- und Minicircle-DNA durch Dielektrophorese gezeigt [64]. Die dreifach-Trennung von Parentalplasmid- Miniplasmid- und Minicircle-DNA ermöglicht eine sehr schnelle qualitative Kontrolle der Zusammensetzung von hergestelltem Rekombinationsprodukt, welches aus Miniplasmid- und Minicircle-DNA besteht und einer Feststellung von Parentalplasmid-DNA-Restanteilen in weniger als zwei Minuten [145]. Die vorgestellte Trennungsmethode ist frei von toxischen und mutagenen Reagenzien und entspricht den GMP-Richtlinien und Anforderungen der Gesundheitsbehörden [145]. Dies ermöglicht eine schnelle Reinigung von Minicircle-DNA direkt aus dem gereinigten Klarlysat des Rekombinationsproduktes, so dass reine Minicircle-DNA im kleinen Maßstab nach nur wenigen Reinigungsschritten gewonnen werden kann und als nicht viraler DNA-Vektor für biopharmazeutische Anwendungen zur Verfügung steht.

Vergleichende Studien mit Plasmid-DNA- und Minicircle-DNA-Vektoren zeigen das hohe Potential der Minicircle-DNA-Vektoren sowohl im *in vivo* als auch *in vitro* Gentransfer. Die Effizienz des Transfers wird durch die geringere molekulare Masse der Minicircle-DNA-Vektoren im Vergleich zu den entsprechenden Plasmid-DNA-Vektoren erhöht [50],[67]–[69]. Die Minicircle-DNA-Vektoren liegen in der natürlichen superspiralisierten *ccc*-(*covalently closed circle DNA*)-Konformation vor, welche die Wirksamkeit in der Zielzelle verbessert [64],[67]–[69]. Auch die in dem Rahmen dieser Arbeit hergestellten MC-DNA-Vektoren mit dem *lacZ* – bzw. dem *GFP*-Gen (PP903 und PP904) zeigen eine effiziente Expression in den

Zielzellen [67]. Die gesteigerte Expression wurde dabei nicht durch einer höhere Kopienzahl der Minicircle-DNA-Vektoren bedingt, sondern durch eine von den Minicircle-DNA-Vektoren verursachten verstärkte transgene mRNA-Transkription im Vergleich zur Parentalplasmid-DNA-Vektor vermittelten [67].

Der verbesserte Gentransfer und das effiziente Expressionsverhalten von Minicircle-DNA-Vektoren im Vergleich zu den korrespondierenden Plasmid-DNA-Vektoren bieten neue Möglichkeiten für den nicht viralen Gentransfer in der therapeutische Gentherapie. Minicircle-DNA-Vektoren stellen ein vielversprechendes Werkzeug in der Gentherapie da, mit dem sowohl eine bessere therapeutische Wirksamkeit erzielt als auch die regulatorischen Anforderungen der Zulassungsbehörden erfüllt werden können.

## 5 Literaturverzeichnis

1. *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*, <<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>>.
2. D. Wicke und Daniel Wicke - dw-websites, *DG-GT - Deutsche Gesellschaft für Genterapie e. V.*, <<http://www.dg-gt.de/willkommensgruss.html>>.
3. *Gesetz zum Schutz von Embryonen. (Embryonenschutzgesetz - ESchG)* (zuletzt geändert durch Art. 1 G v. 2011 I 2228).
4. K. B. Kaufmann, H. Büning, A. Galy, A. Schambach, und M. Grez, Gene therapy on the move, *EMBO Mol Med* 5, 1642–1661 (2013).
5. P. A. LeWitt, A. R. Rezai, M. A. Leehey, S. G. Ojemann, A. W. Flaherty, E. N. Eskandar, S. K. Kostyk, K. Thomas, A. Sarkar, M. S. Siddiqui, S. B. Tatter, J. M. Schwalb, K. L. Poston, J. M. Henderson, R. M. Kurlan, I. H. Richard, L. van Meter, C. V. Sapan, M. J. Doring, M. G. Kaplitt, und A. Feigin, AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial, *The Lancet Neurology* 10, 309–319 (2011).
6. M. Jessup, B. Greenberg, D. Mancini, T. Cappola, D. F. Pauly, B. Jaski, A. Yaroshinsky, K. M. Zsebo, H. Dittrich, und R. J. Hajjar, Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in patients with advanced heart failure, *Circulation* 124, 304–313 (2011).
7. M. Elsner, T. Terbish, A. Jörns, O. Naujok, D. Wedekind, H.-J. Hedrich, und S. Lenzen, Reversal of diabetes through gene therapy of diabetic rats by hepatic insulin expression via lentiviral transduction, *Mol. Ther.* 20, 918–926 (2012).
8. H. Büning, Gene therapy enters the pharma market: the short story of a long journey, *EMBO Mol Med* 5, 1–3 (2013).
9. N. K. Schuhmann, O. Pozzoli, J. Sallach, A. Huber, D. Avitabile, L. Perabo, G. Rappl, M. C. Capogrossi, M. Hallek, M. Pesce, und H. Büning, Gene transfer into human cord blood-derived CD34(+) cells by adeno-associated viral vectors, *Exp. Hematol.* 38, 707–717 (2010).



10. F. Salmon, K. Grosios, und H. Petry, Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: focus on alipogene tiparvovec (Glybera®), *Expert Rev Clin Pharmacol* 7, 53–65 (2014).
11. N. Miller, Glybera and the future of gene therapy in the European Union, *Nat Rev Drug Discov* 11, 419 (2012).
12. S. Ylä-Herttuala, Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union, *Mol. Ther.* 20, 1831–1832 (2012).
13. M. Blaese, T. Blankenstein, M. Brenner, O. Cohen-Haguenaer, B. Gansbacher, S. Russell, B. Sorrentino, und T. Velu, Vectors in cancer therapy: how will they deliver?, *Cancer Gene Ther.* 2, 291–297 (1995).
14. A. Aiuti, Advances in gene therapy for ADA-deficient SCID, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4, 515–522 (2002).
15. A. Aiuti, G. Cossu, P. de Felipe, M. C. Galli, G. Narayanan, M. Renner, A. Stahlbom, C. K. Schneider, und C. Voltz-Girolto, The committee for advanced therapies' of the European Medicines Agency reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional mutagenesis, *Hum Gene Ther Clin Dev* 24, 47–54 (2013).
16. M. Kalos, Biomarkers in T cell therapy clinical trials, *J Transl Med* 9, 138 (2011).
17. J. M. Wilson, Adenovirus-mediated gene transfer to liver, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 205–209 (2001).
18. E. Yao, Z. Feng, und Y. Zheng, [The construction of a general adeno-associated virus vector], *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 12, 147–150 (1998).
19. L. M. Bryant, D. M. Christopher, A. R. Giles, C. Hinderer, J. L. Rodriguez, J. B. Smith, E. A. Traxler, J. Tycko, A. P. Wojno, und J. M. Wilson, Lessons learned from the clinical development and market authorization of Glybera, *Hum Gene Ther Clin Dev* 24, 55–64 (2013).
20. Bainbridge, James W B, A. J. Smith, S. S. Barker, S. Robbie, R. Henderson, K. Balaggan, A. Viswanathan, G. E. Holder, A. Stockman, N. Tyler, S. Petersen-Jones, S. S. Bhattacharya, A. J. Thrasher, F. W. Fitzke, B. J. Carter, G. S. Rubin, A. T. Moore, und R. R. Ali, Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis, *N. Engl. J. Med.* 358, 2231–2239 (2008).

21. R. Cattaneo, T. Miest, E. V. Shashkova, und M. A. Barry, Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded, *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 529–540 (2008).
22. S. J. Russell, K.-W. Peng, und J. C. Bell, Oncolytic virotherapy, *Nat. Biotechnol.* 30, 658–670 (2012).
23. D. J. Bharali, I. Klejbor, E. K. Stachowiak, P. Dutta, I. Roy, N. Kaur, E. J. Bergey, P. N. Prasad, und M. K. Stachowiak, Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11539–11544 (2005).
24. C. C. Conwell und L. Huang, Recent Advances in Non-viral Gene Delivery,, in *Non-Viral Vectors for Gene Therapy, Second Edition: Part 1* (Elsevier, 2005), Vol. 53, pp. 1–18.
25. L. Deelman und K. Sharma, Mechanisms of kidney fibrosis and the role of antifibrotic therapies, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 18, 85–90 (2009).
26. S. Mehier-Humbert und R. H. Guy, Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 733–753 (2005).
27. D. H. Fuller, P. Loudon, und C. Schmaljohn, Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases, *Methods* 40, 86–97 (2006).
28. Y. S. Li, E. Davidson, C. N. Reid, und A. P. McHale, Optimising ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) in vitro and prolonged expression of a transgene in vivo: potential applications for gene therapy of cancer, *Cancer Lett.* 273, 62–69 (2009).
29. W. Walther, U. Stein, I. Fichtner, C. Voss, T. Schmidt, M. Schleef, T. Nellessen, und P. M. Schlag, Intratumoral low-volume jet-injection for efficient nonviral gene transfer, *Mol. Biotechnol.* 21, 105–115 (2002).
30. K. E. Steele, K. Stabler, und L. VanderZanden, Cutaneous DNA vaccination against Ebola virus by particle bombardment: histopathology and alteration of CD3-positive dendritic epidermal cells, *Vet. Pathol.* 38, 203–215 (2001).
31. F. Scherer, M. Anton, U. Schillinger, J. Henke, C. Bergemann, A. Krüger, B. Gänsbacher, und C. Plank, Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo, *Gene Ther.* 9, 102–109 (2002).
32. L. Wasungu und D. Hoekstra, Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes, *J Control Release* 116, 255–264 (2006).

33. I. S. Zuhorn, Engberts, Jan B F N, und D. Hoekstra, Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers, *Eur. Biophys. J.* 36, 349–362 (2007).
34. J. Kloeckner, E. Wagner, und M. Ogris, Degradable gene carriers based on oligomerized polyamines, *Eur J Pharm Sci* 29, 414–425 (2006).
35. J. R. Lakkakula und Maçedo Krause, Rui Werner, A vision for cyclodextrin nanoparticles in drug delivery systems and pharmaceutical applications, *Nanomedicine (Lond)* 9, 877–894 (2014).
36. S. M. Dizaj, S. Jafari, und A. Y. Khosroushahi, A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors, *Nanoscale Res Lett* 9, 252 (2014).
37. T. Niidome und L. Huang, Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors, *Gene Ther.* 9, 1647–1652 (2002).
38. P. Mayrhofer, M. Schleeß, und W. Jechlinger, Use of minicircle plasmids for gene therapy, *Methods Mol. Biol.* 542, 87–104 (2009).
39. Y. Lu, Transcriptionally regulated, prostate-targeted gene therapy for prostate cancer, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 572–588 (2009).
40. B. Bigger und C. Coutelle, Perspectives on gene therapy for cystic fibrosis airway disease, *BioDrugs* 15, 615–634 (2001).
41. J. M. Berg, L. Stryer, und J. L. Tymoczko, *Biochemie*, 6. Aufl (Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.], 2007).
42. E. Riu, D. Grimm, Z. Huang, und M. A. Kay, Increased maintenance and persistence of transgenes by excision of expression cassettes from plasmid sequences in vivo, *Hum. Gene Ther.* 16, 558–570 (2005).
43. Z.-Y. Chen, E. Riu, C.-Y. He, H. Xu, und M. A. Kay, Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation, *Mol. Ther.* 16, 548–556 (2008).
44. A. M. Krieg, A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, und D. M. Klinman, CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation, *Nature* 374, 546–549 (1995).

45. E. Lesina, P. Dames, A. Flemmer, K. Hajek, T. Kirchner, I. Bittmann, und C. Rudolph, CpG-free plasmid DNA prevents deterioration of pulmonary function in mice, *Eur J Pharm Biopharm* 74, 427–434 (2010).
46. S. C. Hyde, I. A. Pringle, S. Abdullah, A. E. Lawton, L. A. Davies, A. Varathalingam, G. Nunez-Alonso, A.-M. Green, R. P. Bazzani, S. G. Sumner-Jones, M. Chan, H. Li, N. S. Yew, S. H. Cheng, A. C. Boyd, J. C. Davies, U. Griesenbach, D. J. Porteous, D. N. Sheppard, F. M. Munkonge, Alton, Eric W F W, und D. R. Gill, CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression, *Nat. Biotechnol.* 26, 549–551 (2008).
47. I. A. Pringle, S. C. Hyde, M. M. Connolly, A. E. Lawton, B. Xu, G. Nunez-Alonso, L. A. Davies, S. G. Sumner-Jones, und D. R. Gill, CpG-free plasmid expression cassettes for cystic fibrosis gene therapy, *Biomaterials* 33, 6833–6842 (2012).
48. L. A. Davies, S. C. Hyde, G. Nunez-Alonso, R. P. Bazzani, R. Harding-Smith, I. A. Pringle, A. E. Lawton, S. Abdullah, T. C. Roberts, D. McCormick, S. G. Sumner-Jones, und D. R. Gill, The use of CpG-free plasmids to mediate persistent gene expression following repeated aerosol delivery of pDNA/PEI complexes, *Biomaterials* 33, 5618–5627 (2012).
49. E. Lesina, P. Dames, und C. Rudolph, The effect of CpG motifs on gene expression and clearance kinetics of aerosol administered polyethylenimine (PEI)-plasmid DNA complexes in the lung, *J Control Release* 143, 243–250 (2010).
50. D. Kobelt, J. Aumann, M. Schmidt, B. Wittig, I. Fichtner, D. Behrens, M. Lemm, G. Freundt, P. M. Schlag, und W. Walther, Preclinical study on combined chemo- and nonviral gene therapy for sensitization of melanoma using a human TNF-alpha expressing MIDGE DNA vector, *Mol Oncol* 8, 609–619 (2014).
51. J. Mairhofer, M. Cserjan-Puschmann, G. Striedner, K. Nöbauer, E. Razzazi-Fazeli, und R. Grabherr, Marker-free plasmids for gene therapeutic applications--lack of antibiotic resistance gene substantially improves the manufacturing process, *J. Biotechnol.* 146, 130–137 (2010).
52. J. Mairhofer, I. Pfaffenzeller, D. Merz, und R. Grabherr, A novel antibiotic free plasmid selection system: advances in safe and efficient DNA therapy, *Biotechnol J* 3, 83–89 (2008).

53. R. M. Cranenburgh, K. S. Lewis, and Hanak, Julian A J, Effect of plasmid copy number and lac operator sequence on antibiotic-free plasmid selection by operator-repressor titration in *Escherichia coli*, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7, 197–203 (2004).
54. T. Hanke, A. J. McMichael, R. V. Samuel, Powell, L A J, L. McLoughlin, S. J. Crome, and A. Edlin, Lack of toxicity and persistence in the mouse associated with administration of candidate DNA- and modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based HIV vaccines for Kenya, *Vaccine* 21, 108–114 (2002).
55. J. Guglielmini, C. Szpirer, and M. C. Milinkovitch, Automated discovery and phylogenetic analysis of new toxin-antitoxin systems, *BMC Microbiol.* 8, 104 (2008).
56. C. Y. Szpirer und M. C. Milinkovitch, Separate-component-stabilization system for protein and DNA production without the use of antibiotics, *BioTechniques* 38, 775–781 (2005).
57. C. Marie, G. Vandermeulen, M. Quiviger, M. Richard, V. Pr eat, und D. Scherman, pFARs, plasmids free of antibiotic resistance markers, display high-level transgene expression in muscle, skin and tumour cells, *J Gene Med* 12, 323–332 (2010).
58. G. Vandermeulen, C. Marie, D. Scherman, und V. Pr eat, New generation of plasmid backbones devoid of antibiotic resistance marker for gene therapy trials, *Mol. Ther.* 19, 1942–1949 (2011).
59. M. Schleef, *Minicircle and miniplasmid DNA vectors. The future of non-viral and viral gene transfer* (Wiley-Blackwell, Weinheim, 2013).
60. P. Mayrhofer, M. Blaesen, M. Schleef, und W. Jechlinger, Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein-DNA interaction chromatography, *J Gene Med* 10, 1253–1269 (2008).
61. M. Schleef und M. Schmeer, Minicircle--Die n achste Generation nicht-viraler Gentherapie-Vektoren. Zirkul re, superspiralisierte Expressionskassetten ersetzen Plasmid-DNA, *Pharm Unserer Zeit* 40, 220–224 (2011).
62. A. M. Darquet, B. Cameron, P. Wils, D. Scherman, und J. Crouzet, A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle, *Gene Ther.* 4, 1341–1349 (1997).
63. Z.-Y. Chen, C.-Y. He, A. Ehrhardt, und M. A. Kay, Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo, *Mol. Ther.* 8, 495–500 (2003).

64. A. Rischmüller, M. Viefhues, M. Dieding, M. Blaesen, M. Schmeer, R. Baier, D. Anselmetti, und M. Schleef, Analytical Tools in Minicircle Production., in *Minicircle and Miniplasmid DNA Vectors*, edited by M. Schleef (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2013), pp. 71–91.
65. M. Schleef, M. Blaesen, M. Schmeer, R. Baier, C. Marie, G. Dickson, und D. Scherman, Production of non viral DNA vectors, *Curr Gene Ther* 10, 487–507 (2010).
66. M. Keeney, S.-G. Ong, A. Padilla, Z. Yao, S. Goodman, J. C. Wu, und F. Yang, Development of poly( $\beta$ -amino ester)-based biodegradable nanoparticles for nonviral delivery of minicircle DNA, *ACS Nano* 7, 7241–7250 (2013).
67. D. Kobelt, M. Schleef, M. Schmeer, J. Aumann, P. M. Schlag, und W. Walther, Performance of high quality minicircle DNA for in vitro and in vivo gene transfer, *Mol. Biotechnol.* 53, 80–89 (2013).
68. A. M. Darquet, R. Rangara, P. Kreiss, B. Schwartz, S. Naimi, P. Delaère, J. Crouzet, und D. Scherman, Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer, *Gene Ther.* 6, 209–218 (1999).
69. S. Ribeiro, J. Mairhofer, C. Madeira, M. M. Diogo, Lobato da Silva, Cláudia, G. Monteiro, R. Grabherr, und J. M. Cabral, Plasmid DNA size does affect nonviral gene delivery efficiency in stem cells, *Cell Reprogram* 14, 130–137 (2012).
70. B. W. Bigger, O. Tolmachov, J. M. Collombet, M. Fragkos, I. Palaszewski, und C. Coutelle, An araC-controlled bacterial cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy, *J. Biol. Chem.* 276, 23018–23027 (2001).
71. W. Jechlinger, C. Azimpour Tabrizi, W. Lubitz, und P. Mayrhofer, Minicircle DNA immobilized in bacterial ghosts: in vivo production of safe non-viral DNA delivery vehicles, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8, 222–231 (2004).
72. K. Nehlsen, R. Schucht, L. da Gama-Norton, W. Krömer, A. Baer, A. Cayli, H. Hauser, und D. Wirth, Recombinant protein expression by targeting pre-selected chromosomal loci, *BMC Biotechnol.* 9, 100 (2009).
73. D. Metzger und P. Chambon, Site- and time-specific gene targeting in the mouse, *Methods* 24, 71–80 (2001).

74. T. Schlake und J. Bode, Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci, *Biochemistry* 33, 12746–12751 (1994).
75. S. Turan und J. Bode, Site-specific recombinases: from tag-and-target- to tag-and-exchange-based genomic modifications, *FASEB J.* 25, 4088–4107 (2011).
76. P. Sadowski, Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist, *J. Bacteriol.* 165, 341–347 (1986).
77. L. Gilbertson, Cre-lox recombination: Cre-ative tools for plant biotechnology, *Trends Biotechnol.* 21, 550–555 (2003).
78. A. C. Groth und M. P. Calos, Phage integrases: biology and applications, *J. Mol. Biol.* 335, 667–678 (2004).
79. P. Kreiss, B. Cameron, A. M. Darquet, D. Scherman, und J. Crouzet, Production of a new DNA vehicle for gene transfer using site-specific recombination, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 560–567 (1998).
80. L. Eberl, C. S. Kristensen, M. Givskov, E. Grohmann, M. Gerlitz, und H. Schwab, Analysis of the multimer resolution system encoded by the parCBA operon of broad-host-range plasmid RP4, *Mol Microbiol* 12, 131–141 (1994).
81. Smith, Margaret C M und H. M. Thorpe, Diversity in the serine recombinases, *Mol. Microbiol.* 44, 299–307 (2002).
82. J. G. Thomson und D. W. Ow, Site-specific recombination systems for the genetic manipulation of eukaryotic genomes, *Genesis* 44, 465–476 (2006).
83. M. Glinkowska, J. Majka, W. Messer, und G. Wegrzyn, The mechanism of regulation of bacteriophage lambda pR promoter activity by Escherichia coli DnaA protein, *J. Biol. Chem.* 278, 22250–22256 (2003).
84. *Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines .*
85. A. Preston, Choosing a cloning vector, *Methods Mol. Biol.* 235, 19–26 (2003).
86. J. Vieira und J. Messing, The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers, *Gene* 19, 259–268 (1982).
87. E. L. Tatum und J. Lederberg, Gene Recombination in the Bacterium Escherichia coli, *J. Bacteriol.* 53, 673–684 (1947).

88. N. Casali, Escherichia coli host strains, *Methods Mol. Biol.* 235, 27–48 (2003).
89. M. Zlokarnik, Dimensional analysis and scale-up in theory and industrial application 1 \*, *J Liposome Res* 11, 269–307 (2001).
90. M. Zlokarnik, Scale-up. Modellübertragung in der Verfahrenstechnik, *Scale-up* (2005).
91. J. Pawlowski, *Die Ähnlichkeitstheorie in der physikalisch -technischen forschung. Grundlagen und anwendung* (Springer, [S.l.], 2012).
92. H. Chmiel, *Bioprozesstechnik. Einführung in die Bioverfahrenstechnik, 2., neu bearb. Aufl* (Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, 2006).
93. M. Schleef und T. Schmidt, Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications, *J Gene Med* 6 Suppl 1, S45-53 (2004).
94. M. Schleef und M. Blaesen, Production of plasmid DNA as a pharmaceutical, *Methods Mol. Biol.* 542, 471–495 (2009).
95. M. Blaesen, K. Friehs, und E. Flaschel, Recycling of bacterial biomass in a process of L-threonine production by means of a recombinant strain of Escherichia coli, *J. Biotechnol.* 132, 431–437 (2007).
96. J. Urthaler, W. Buchinger, und R. Necina, Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy, *Acta Biochim. Pol.* 52, 703–711 (2005).
97. M. Schleef, T. Schmidt, und E. Flaschel, Plasmid DNA for pharmaceutical applications, *Dev Biol (Basel)* 104, 25–31 (2000).
98. M. Schleef und J. Schorr, Plasmid DNA for clinical phase I and II studies. Large-scale cGMP manufacturing and quality assurance, *Adv. Exp. Med. Biol.* 451, 481–486 (1998).
99. M. Schleef, Issues of Large-Scale Plasmid DNA Manufacturing,, in *Biotechnology Set*, edited by H.-J. Rehm and G. Reed (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2001), pp. 443–469.
100. M. Schleef, *Plasmids for therapy and vaccination* (Wiley-VCH, Weinheim, New York, 2001).
101. M. Schleef, *DNA pharmaceuticals. Formulation and delivery in gene therapy, DNA vaccination, and immunotherapy* (Wiley-VCH, Weinheim, 2005).



102. M. Schleef, ed., *Minicircle and Miniplasmid DNA vectors*. The future of nonviral and viral gene transfer (Wiley-Blackwell, Weinheim, 2013).
103. Metin Colpan, Joachim Schorr, Peter Moritz, *Patent WO1995021177A1 - Process for producing endotoxin-free or endotoxin-poor nucleic acids and/or oligonucleotides for gene therapy*, <<http://www.google.com/patents/WO1995021177A1?cl=en>>.
104. J. Schorr, P. Moritz, und M. Schleef, Production of Plasmid DNA in Industrial Quantities According to cGMP Guidelines, *Methods Mol. Med.* 29, 11–21 (2000).
105. Z.-Y. Chen, C.-Y. He, und M. A. Kay, Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo, *Hum. Gene Ther.* 16, 126–131 (2005).
106. T. Schmidt, K. Friehs, M. Schleef, C. Voss, und E. Flaschel, Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis, *Anal. Biochem.* 274, 235–240 (1999).
107. J. A. Glasel, Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios, *BioTechniques* 18, 62–63 (1995).
108. E. T. Rietschel, T. Kirikae, F. U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A. J. Ulmer, U. Zähringer, U. Seydel, und F. Di Padova, Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function, *FASEB J.* 8, 217–225 (1994).
109. Raetz, Christian R H und C. Whitfield, Lipopolysaccharide endotoxins, *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635–700 (2002).
110. W. Walther, M. Schmeer, D. Kobelt, R. Baier, A. Harder, V. Walhorn, D. Anselmetti, J. Aumann, I. Fichtner, und M. Schleef, A seven-year storage report of good manufacturing practice-grade naked plasmid DNA: stability, topology, and in vitro/in vivo functional analysis, *Hum Gene Ther Clin Dev* 24, 147–153 (2013).
111. J. B. Schwartzman, M.-L. Martínez-Robles, P. Hernández, und D. B. Krimer, Plasmid DNA topology assayed by two-dimensional agarose gel electrophoresis, *Methods Mol. Biol.* 1054, 121–132 (2013).
112. C. Maucksch, A. Bohla, F. Hoffmann, M. Schleef, M. K. Aneja, M. Elfinger, D. Hartl, und C. Rudolph, Transgene expression of transfected supercoiled plasmid DNA concatemers in mammalian cells, *J Gene Med* 11, 444–453 (2009).

113. F. Lottspeich, *Bioanalytik*, 3. Aufl (Spektrum, Heidelberg, 2012).
114. Janshoff A, Neitzert M, Oberdörfer Y, Fuchs H., Force Spectroscopy of Molecular Systems-Single Molecule Spectroscopy of Polymers and Biomolecules., *Angew Chem Int Ed Engl. Sep 15;39(18):3212-3237*. 39, 3212–3237 (2000).
115. Binnig, Quate, und Gerber, Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.* 56, 930–933 (1986).
116. B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisenhorn, S. A. Gould, T. R. Albrecht, C. F. Quate, D. S. Cannell, H. G. Hansma, und P. K. Hansma, Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope, *Science* 243, 1586–1589 (1989).
117. G. Meyer und N. M. Amer, Novel optical approach to atomic force microscopy, *Appl. Phys. Lett.* 53, 1045 (1988).
118. M. Viefhues, J. Regtmeier, und D. Anselmetti, Fast and continuous-flow separation of DNA-complexes and topological DNA variants in microfluidic chip format, *Analyst* 138, 186–196 (2013).
119. J. Fu, R. B. Schoch, A. L. Stevens, S. R. Tannenbaum, und J. Han, A patterned anisotropic nanofluidic sieving structure for continuous-flow separation of DNA and proteins, *Nat Nanotechnol* 2, 121–128 (2007).
120. L. R. Huang, J. O. Tegenfeldt, J. J. Kraeft, J. C. Sturm, R. H. Austin, und E. C. Cox, A DNA prism for high-speed continuous fractionation of large DNA molecules, *Nat. Biotechnol.* 20, 1048–1051 (2002).
121. H. Bruus, Acoustofluidics 1: Governing equations in microfluidics, *Lab Chip* 11, 3742–3751 (2011).
122. J. Regtmeier, R. Eichhorn, M. Viefhues, L. Bogunovic, und D. Anselmetti, Electrodeless dielectrophoresis for bioanalysis: theory, devices and applications, *Electrophoresis* 32, 2253–2273 (2011).
123. M. Viefhues, R. Eichhorn, E. Fredrich, J. Regtmeier, und D. Anselmetti, Continuous and reversible mixing or demixing of nanoparticles by dielectrophoresis, *Lab Chip* 12, 485–494 (2012).
124. W. Demtröder, *Experimentalphysik 2. Elektrizität und Optik*, 6., überarb. u. akt. Aufl. 2013 (Springer, Berlin, 2013).

125. H. Zhou, M. A. Preston, R. D. Tilton, and L. R. White, Calculation of the dynamic impedance of the double layer on a planar electrode by the theory of electrokinetics, *J Colloid Interface Sci* 292, 277–289 (2005).
126. R. Kuhn und S. Hoffstetter-Kuhn, *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1993).
127. Francis Crick and James D. Watson, Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature*, 737–738 (1953).
128. M. Yamada und M. Seki, Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics, *Lab Chip* 5, 1233–1239 (2005).
129. G. D. Chen, F. Fachin, E. Colombini, B. L. Wardle, und M. Toner, Nanoporous microelement arrays for particle interception in microfluidic cell separation, *Lab Chip* 12, 3159–3167 (2012).
130. D. R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, und A. Manz, Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology, *Anal. Chem.* 74, 2623–2636 (2002).
131. T. Vilker, D. Janasek, und A. Manz, Micro total analysis systems. Recent developments, *Anal. Chem.* 76, 3373–3385 (2004).
132. J. Khandurina und A. Guttman, Microchip-based high-throughput screening analysis of combinatorial libraries, *Curr Opin Chem Biol* 6, 359–366 (2002).
133. J. Khandurina und A. Guttman, Microscale separation and analysis, *Curr Opin Chem Biol* 7, 595–602 (2003).
134. P.-A. Auroux, D. Iossifidis, D. R. Reyes, und A. Manz, Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications, *Anal. Chem.* 74, 2637–2652 (2002).
135. D. Hanahan, Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes, *Nature* 315, 115–122 (1985).
136. D. J. Hanahan, S. T. Weintraub, S. J. Friedberg, A. Tokumura, und D. E. Ayer, A novel approach to structure proof of glyceryl ether-containing glycerophospholipids. Base-catalyzed methanolysis of platelet-activating factor (AGEPC) at 60 degrees C, *J. Lipid Res.* 26, 1345–1355 (1985).

137. R. G. Taylor, D. C. Walker, and R. R. McInnes, *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing, *Nucleic Acids Res.* 21, 1677–1678 (1993).
138. T. C. Johnston, R. B. Thompson, and T. O. Baldwin, Nucleotide sequence of the *luxB* gene of *Vibrio harveyi* and the complete amino acid sequence of the beta subunit of bacterial luciferase, *J. Biol. Chem.* 261, 4805–4811 (1986).
139. C. Yanisch-Perron, J. Vieira, and J. Messing, Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* 33, 103–119 (1985).
140. H. C. Birnboim und J. Doly, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523 (1979).
141. T. Eckhardt, A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria, *Plasmid* 1, 584–588 (1978).
142. U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680–685 (1970).
143. M. Viefhues, S. Manchanda, T.-C. Chao, D. Anselmetti, J. Regtmeier, und A. Ros, Physisorbed surface coatings for poly(dimethylsiloxane) and quartz microfluidic devices, *Anal Bioanal Chem* 401, 2113–2122 (2011).
144. E. P. Diamandis und T. K. Christopoulos, The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology, *Clin. Chem.* 37, 625–636 (1991).
145. M. Viefhues, S. Wegener, A. Rischmüller, M. Schleef, und D. Anselmetti, Dielectrophoresis based continuous-flow nano sorter: fast quality control of gene vaccines, *Lab Chip* 13, 3111 (2013).
146. D. Takai und P. A. Jones, Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3740–3745 (2002).
147. P. A. Jones und P. W. Laird, Cancer epigenetics comes of age, *Nat. Genet.* 21, 163–167 (1999).

## 6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
A	Absorption
a. u.	Absorbance unit (optische Dichte)
Abb.	Abbildung
ac	alternating current (Wechselstrom)
ANX	anion exchanger (Anionenaustauscher)
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
Aufl.	Auflage
BAD	Bcl-2-associated death
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BFM	Befeuchtmasse
bp	basepairs
bzw.	beziehungsweise
<i>ccc</i>	covalently closed circle
CDD	charge-coupled device (dt. ‚ladungsgekoppeltes Bauteil‘)
<i>CGE</i>	Capillary gel electrophoresis (Kapillargelelektrophorese)
CMV	Cytomegalovirus
dc	direct current (Gleichstrom)
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
DDM-MC	D-Dodecyl-Maltosid Methyl-Zellulose
DMF	Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DVD	Digital Versatile Disc
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Endotoxinfrei
EOF	elektroosmotischer Fluss
<i>et. al.</i>	Et alii, et aliae: ‚und andere‘
Fa.	Firma
FG	Fraktogel
FLD	Formaldehyddehydrogenase
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
Glu	Glukose
h	Stunde
HCl	Hydrogenchlorid (Salzsäure)
HK	Hauptkultur
Hm	Hygromycin

Fortsetzung Abkürzungsverzeichnis

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
Inc.	Incorporated
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilo Dalton
L	Liter
Lac-Repressor	Repressor, welcher das Laktose-Operon blockiert
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LB	Luria broth
LC	Liquid Chromatography
LTR	long terminal repeats
M	Molar
MC	Minicircle-DNA
MCS	Multiple cloning site
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MMTV	Maus-Mammatumovirus
MP	Miniplasmid-DNA
MS	Massenspektrometrie
N	Normal
n/a	Nicht verfügbar (Not available)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
NI	Nach Induktion
nm	Nanometer
<i>oc</i>	open circle
OD	Optische Dichte
Ori	Origin of replication (Replikationsursprung)
P	Poise [1 P = 0,1 Pa s], dynamische Viskosität
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDMS	Polydimethylsiloxan
P-DNA	Plasmid-DNA
pH	potentia Hydrogenii
PP	Parentalplasmid-DNA
psi	Pound-force per square inch
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rec	Recombination site (Rekombinationssequenz)

## Fortsetzung Abkürzungsverzeichnis

RFU	relative fluorescence units
RI	Infrarot
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Revolutions per minute
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	Small hairpin RNA
siDNA	Signal interfering DNA
SRL	Saccharose-RNAse-Lysozym
SV40	Simian virus 40
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	Tris buffering systeme
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TK	Thymidinkinase
USA	United States of America
vgl.	vergleich
VI	Vor Induktion
VK	Vorkultur
vvm	Volumendurchfluss (1vvm=5 mL min <sup>-1</sup> )
W	Watt
WFI	Water for Injection
z.B.	zum Beispiel

## 7 Anhang

### 7.1 Stämme

In dieser Arbeit wurde mit den *Escherichia coli* (*E. coli*) K12-Stämmen DH5 $\alpha$ , ER2566 und TB1 gearbeitet. Die Stämme und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 2.1.1 dargestellt.

Tabelle 7.1.1 Verwendete *E.coli*-Stämme und deren Genotypen.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 $\alpha$	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80dLacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (LacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), $\lambda$ -	Hanahan 1985 [135],[136] Taylor 1993 [137]
ER2566	F- $\lambda$ - fhuA2 [lon] ompT LacZ::T7 gene 1 gal sulA11 $\Delta$ (mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10) (TetS) endA1 [dcm]	Fa. NEB, USA
TB1	F- $\Delta$ (Lac-proAB) [ $\Phi$ 80dLac $\Delta$ (LacZ)M15] rpsL(StrR) thi hsdR	Johnston 1986 [138] Yanisch-Perron 1985 [139]

**Legende:** argF: Ornithine carbamoyltransferase mutation blocks ability to use arginine; dcm: Abolishes endogenous adenine methylation at GATC sequences (dam) or cytosine methylation at CCWGG sequences (dcm). Used to propagate DNA for cleavage with certain restriction enzymes (e.g. Ava II, Bcl I); deoR: regulatory gene that allows constitutive expression of deoxyribose synthesis genes; permits uptake of large plasmids; endA1: For cleaner preparations of DNA and better results in downstream applications due to the elimination of non-specific digestion by Endonuclease I; F-: Does not carry the F plasmid; fhuA2: putative ferrichrome-iron TonB-dependent receptor; Gal: galE = mutations are associated with high competence, increased resistance to phage P1 infection, and 2-deoxygalactose resistance. galE mutations block the production of UDP-galactose, resulting in truncation of LPS glycans to the minimal, "inner core". The exceptional competence of DH10B/TOP10 is thought to be a result of a reduced interference from LPS in the binding and/or uptake of transforming DNA. galk = mutants cannot metabolize galactose and are resistant to 2-deoxygalactose. galkK16 is an IS2 insertion ~170bp downstream of the galk start codon. galU = mutants cannot metabolize galactose; glnV44: suppression of amber (UAG) stop codons by insertion of glutamine; required for some phage growth; gyrA96: mutation in DNA gyrase; conveys nalidixic acid resistance; hsdR: For efficient transformation of cloned unmethylated DNA from PCR amplifications; lon: lon protease; mcrA, mcrBC, mrr: Mutations that allow methylated DNA to not be recognized as foreign; this genotype is necessary when cloning genomic DNA or methylated cDNA; nupG: same as deoR; ompT: mutation in outer membrane protein protease VII, reducing proteolysis of expressed proteins; proA/B: requires proline; recA1: For reduced occurrence of unwanted recombination in cloned DNA; cells UV sensitive, deficient in DNA repair; relA1: relaxed phenotype; permits RNA synthesis in absence of protein synthesis; rpsL(StrR): mutation in ribosomal protein S12 conveying streptomycin resistance; also called strA, rpsL135(strR), strA135: thi: requires thiamine;  $\Delta$ : preceding a gene name means the gene is deleted;  $\lambda$ -: lambda lysogen deletion. (<http://openwetware.org>, <http://www.lifetechnologies.com>).



## 7.2 Plasmide und Minicircle

Tabelle 7.2.1 führt die verwendeten Plasmide und Parentalplasmide und deren zentrale Eigenschaften auf. Die hergestellten Minicircle und ihrer relevanten Eigenschaften werden in Tabelle 7.2.2 aufgelistet. Kapitel 7.3 zeigt schematische Karten der wichtigsten Plasmide, Parentalplasmide und ihrer korrespondierenden Minicircle.

Tabelle 7.2.1 Überblick aller verwendeten und konstruierten Plasmide

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
P0402	<i>Amp<sup>R</sup>, E4, *E3*, E2A, VA, P<sub>RSV</sub>, cap, rep, MMTV-LTR (pDP2r)</i>	Fa. PlasmidFactory, DE
P0421	<i>Amp<sup>R</sup>, MMTV-LTR, rep, cap, , VA, E2A, *E3*, E4 (pDG)</i>	Fa. PlasmidFactory, DE
P0462	<i>Amp<sup>R</sup>, , P<sub>CMV</sub>, lacZ, SV40PolyA</i>	Fa. PlasmidFactory, DE
P0463	<i>Amp<sup>R</sup>, P<sub>CMV</sub>, GFP, SV40PolyA</i>	Fa. PlasmidFactory, DE
P0671	<i>Amp<sup>R</sup>; araC, lacI</i>	Fa. PlasmidFactory, DE
PP0899	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, lacO</i>	Fa. PlasmidFactory, DE
PP0903	<i>rec, araC, ara gene enhancer ParaC: P<sub>BAD</sub>; parA; Kan<sup>R</sup>; rec; lacO, lacO, SV40PolyA lacZ, P<sub>CMV</sub></i>	Diese Arbeit
PP0904	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, lacO, SV40PolyA, gfp, P<sub>CMV</sub></i>	Fa. PlasmidFactory, DE
PP0962	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, E4, *E3*, E2A, VA, P<sub>RSV</sub>, cap, rep, MMTV-LTR (pDP2r)</i>	Diese Arbeit
PP0981	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, MMTV-LTR, rep, cap, , VA, E2A, *E3*, E4 (pDG)</i>	Diese Arbeit
P1130	<i>Amp<sup>R</sup>, lacO</i>	Fa. PlasmidFactory, DE
P1139	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, n/a</i>	Fa. PlasmidFactory, DE
PP1150	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO</i>	Diese Arbeit
P1195	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, HBV1.6</i>	Fa. PlasmidFactory, DE
P1234	<i>Amp<sup>R</sup>, P<sub>HI</sub>, siGFP</i>	Fa. PlasmidFactory, DE

Fortsetzung Tabelle Überblick aller verwendeten und konstruierten Plasmide.

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
PP1239	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO n/a</i>	Diese Arbeit
PP1291	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, P<sub>H1</sub>, siGFP</i>	Diese Arbeit
PP1292	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, siGFP, P<sub>H1</sub></i>	Diese Arbeit
PP1331	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, HBV1.6</i>	Diese Arbeit
PP1332	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, lacO, HBV1.6</i>	Diese Arbeit
P1451	<i>Amp<sup>R</sup>, ITR, P<sub>CMV</sub>, eGFP, SV40PolyA, TKPolyA, Hm<sup>R</sup>, P<sub>TK</sub>, ITR</i>	Fa. PlasmidFactory, DE
PP1471	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, ITR, P<sub>CMV</sub>, eGFP, SV40PolyA, TKPolyA, Hm<sup>R</sup>, P<sub>TK</sub>, ITR, lacO</i>	Diese Arbeit
PP1472	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, ITR, P<sub>TK</sub>, Hm<sup>R</sup>, TKPolyA, SV40PolyA, eGFP, P<sub>CMV</sub>, ITR, lacO,</i>	Diese Arbeit
P1562	<i>Amp<sup>R</sup>, FVIII-A, C-FVIII-HA</i>	Fa. PlasmidFactory, DE
PP1564	<i>rec, araC, ara gene enhancer, P<sub>araC</sub>, P<sub>BAD</sub>, parA, Kan<sup>R</sup>, rec, FVIII-A, C-FVIII-HA,</i>	Fa. PlasmidFactory, DE

Legende: \*E3\* early genes (AAV), *amp<sup>r</sup>* Ampicillinresistenz-Gen, *ara gene enhancer* ara Genexpressionsverstärker, *araC* Regulatorprotein-Gen, *cap* cap-Sequenz, C-FVIII-HA Gerinnungsfaktor VIII Hämophilie-A-Gen, *E2A* early genes (AAV), *E4* early genes (AAV), *eGFP* enhanced GFP-Gen, *FVIII-A* Gerinnungsfaktor VIII-Gen Serinproteasegen, *GFP* Grün fluoreszierendes Protein-Gen, *Hm<sup>r</sup>* Hygromycinresistenz-Gen, ITR *inverted terminal repeats*, *kan<sup>r</sup>* Kanamycinresistenz-Gen, *lacA* Transacetylase-Gen, *lacI* Lac-Repressor-Protein-Gen, *lacO* lac-Operator-Sequenz, *lacZ* beta-Galaktosidase-Gen, MMTV-LTR Maus-Mammatumovirus-Long-terminal-repeat-Sequenz, P Plasmid, PP Parentalplasmid, *parA* ParA Resolvase-Gen, P<sub>araC</sub> Promotor für araC, P<sub>BAD</sub> BAD-Promotor, P<sub>CMV</sub> CMV-Promotor, P<sub>H1</sub> H1-Promotor, P<sub>lac</sub> lac-Promotor, P<sub>RSV</sub> RSV-Promotor, P<sub>TK</sub> Thymidinkinase-Promotor, pUCori Replikationsursprung pUC, *rec* Rekombinations-Sequenz, *rep* rep-Sequenz, *siGFP* *Signal interfering* GFP-Gen, SV40-PolyA Simianvirus-40-PolyA-Sequenz, *TK* Thymidinkinase-Gen, TK-PolyA Thymidinkinase-PolyA-Sequenz, VA viral associated (VA) RNA Gene (AAV).

Tabelle 7.2.2 Überblick aller hergestellten Minicircle.

Minicircle	Relevante Eigenschaften	Größe [bp]
MC0903	rec; <i>lacO</i> , <i>lacO</i> , SV40PolyA <i>lacZ</i> , P <sub>CMV</sub>	4943
MC0904	rec, <i>lacO</i> , <i>lacO</i> , SV40PolyA, <i>gfp</i> , P <sub>CMV</sub>	2257
MC0962	rec, <i>lacO</i> , <i>E4</i> , * <i>E3</i> *, <i>E2A</i> , <i>VA</i> , P <sub>RSV</sub> , <i>cap</i> , <i>rep</i> , MMTV-LTR	21870
MC0981	rec, <i>lacO</i> , MMTV-LTR, <i>rep</i> , <i>cap</i> , , <i>VA</i> , <i>E2A</i> , * <i>E3</i> *, <i>E4</i>	20039
MC1239	rec, <i>lacO</i> , n/a	2931
MC1291	rec, <i>lacO</i> , P <sub>HI</sub> , <i>siGFP</i>	501
MC1292	rec, <i>lacO</i> , <i>siGFP</i> , P <sub>HI</sub>	501
MC1331	rec, <i>lacO</i> , <i>HBV1.6</i>	4311
MC1332	rec, <i>lacO</i> , <i>HBV1.6</i>	4311
MC1471	rec, ITR, P <sub>CMV</sub> , <i>eGFP</i> , SV40PolyA, TKPolyA, <i>Hm<sup>R</sup></i> , P <sub>TK</sub> , ITR, <i>lacO</i>	4468
MC1472	rec, ITR, P <sub>TK</sub> , <i>Hm<sup>R</sup></i> , TKPolyA, SV40PolyA, <i>eGFP</i> , P <sub>CMV</sub> , ITR, <i>lacO</i> ,	4468
MC1564	rec, <i>FVIII-A</i> , <i>C-FVIII-HA</i> ,	6832

Tabelle 7.2.3 Konstruktion der Parentalplasmide.

Parentalplasmid	Vektor	Schnittstellen <sup>a</sup>	Insert
PP0903	PF0899	PstI	PstI-P <sub>CMV</sub> - <i>lacZ</i> -PstI aus PF0462
PP0904	PF0899	PmlI/PstI	DraI- <i>GFP</i> -P <sub>CMV</sub> -NsiI aus PF0463
PP0962	PF1150	PacI	PacI- <i>E4</i> -* <i>E3</i> *- <i>E2A</i> - <i>VA</i> -P <sub>RSV</sub> - <i>cap</i> - <i>rep</i> -MMTV-LTR-PacI aus PF0402
PP0981	PF1150	PacI	PacI-MMTV-LTR- <i>rep</i> - <i>cap</i> - <i>VA</i> - <i>E2A</i> -* <i>E3</i> *- <i>E4</i> -PacI aus PF0421
PP1150	PF0899	PstI/BglII	PstI- <i>lacO</i> -BglII aus PF1130
PP1239	PF1150	PmeI	PmlI-n/a-PmlI aus PF1139
PP1291	PF1150	PacI	PacI-P <sub>HI</sub> - <i>siGFP</i> -PacI aus PF1234
PP1292	PF1150	PacI	PacI- <i>siGFP</i> -P <sub>HI</sub> -PacI aus PF1234
PP1331	PF1150	PacI	PacI-HBV1.6-PacI aus PF1195

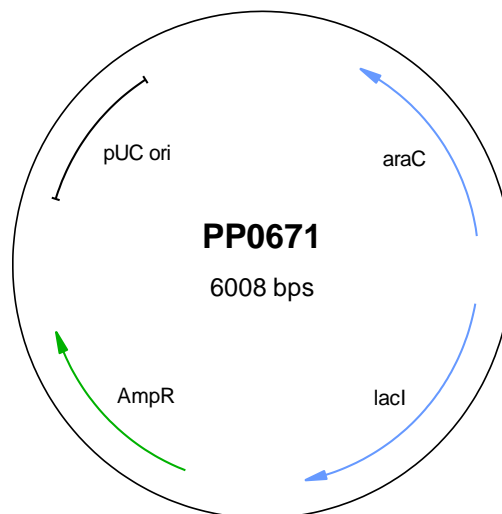
Fortsetzung Tabelle Konstruktion der Parentalplasmide.

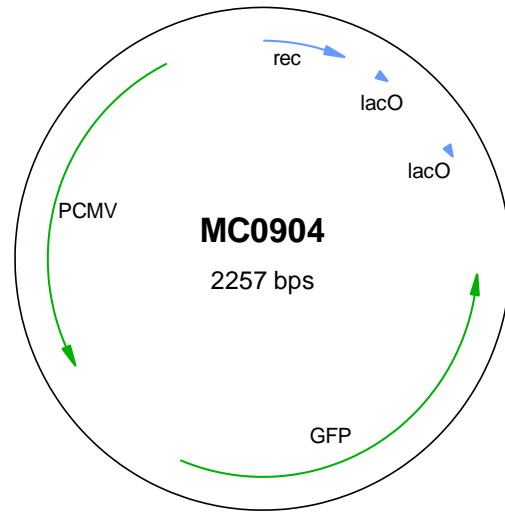
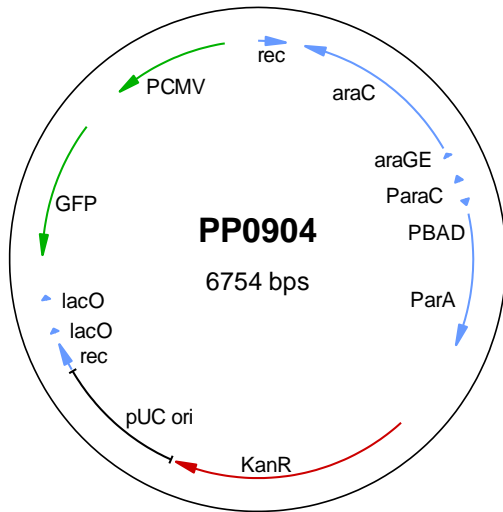
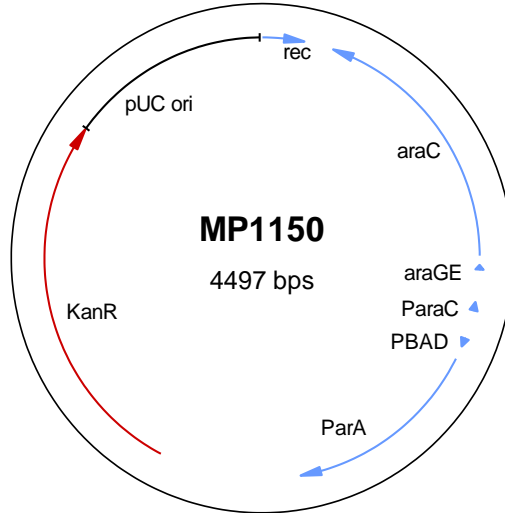
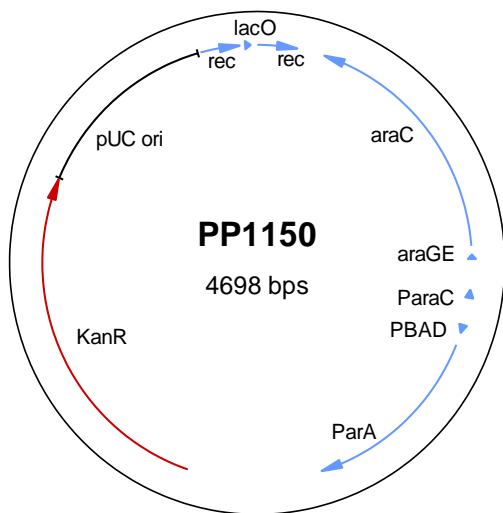
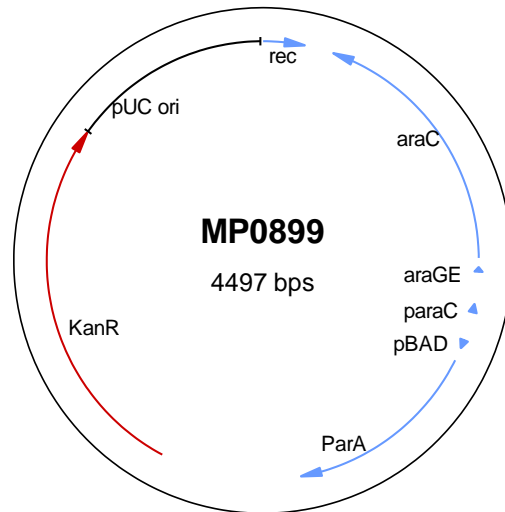
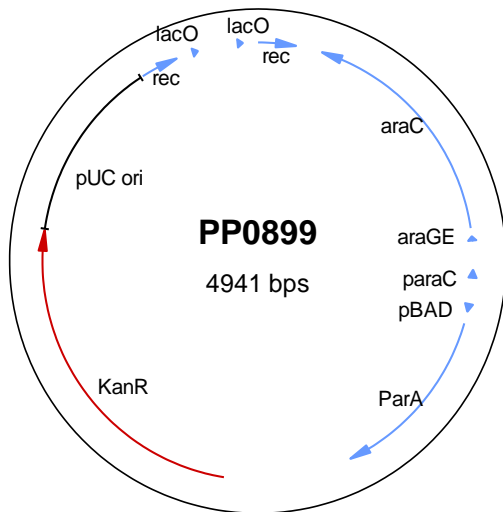
Parentalplasmid	Vektor	Schnittstellen <sup>a</sup>	Insert
PP1332	PF1150	PacI	PacI-HBV1.6-PacI aus PF1195
PP1471	PF1150	PmeI	PvuII-ITR- <i>P<sub>CMV</sub>-eGFP-SV40PolyA-TKPolyA-Hm<sup>R</sup>-P<sub>TK</sub></i> -ITR-PvuII aus PF1451
PP1472	PF1150	PmeI	PvuII-ITR- <i>P<sub>TK</sub>-Hm<sup>R</sup>-TKPolyA-SV40PolyA-eGFP-PCMV</i> -ITR-PvuII aus PF1451
PP1564	PF1150	PmeI/PstI	NruI- <i>FVIII-A-C-FVIII-HA-NsiI</i>

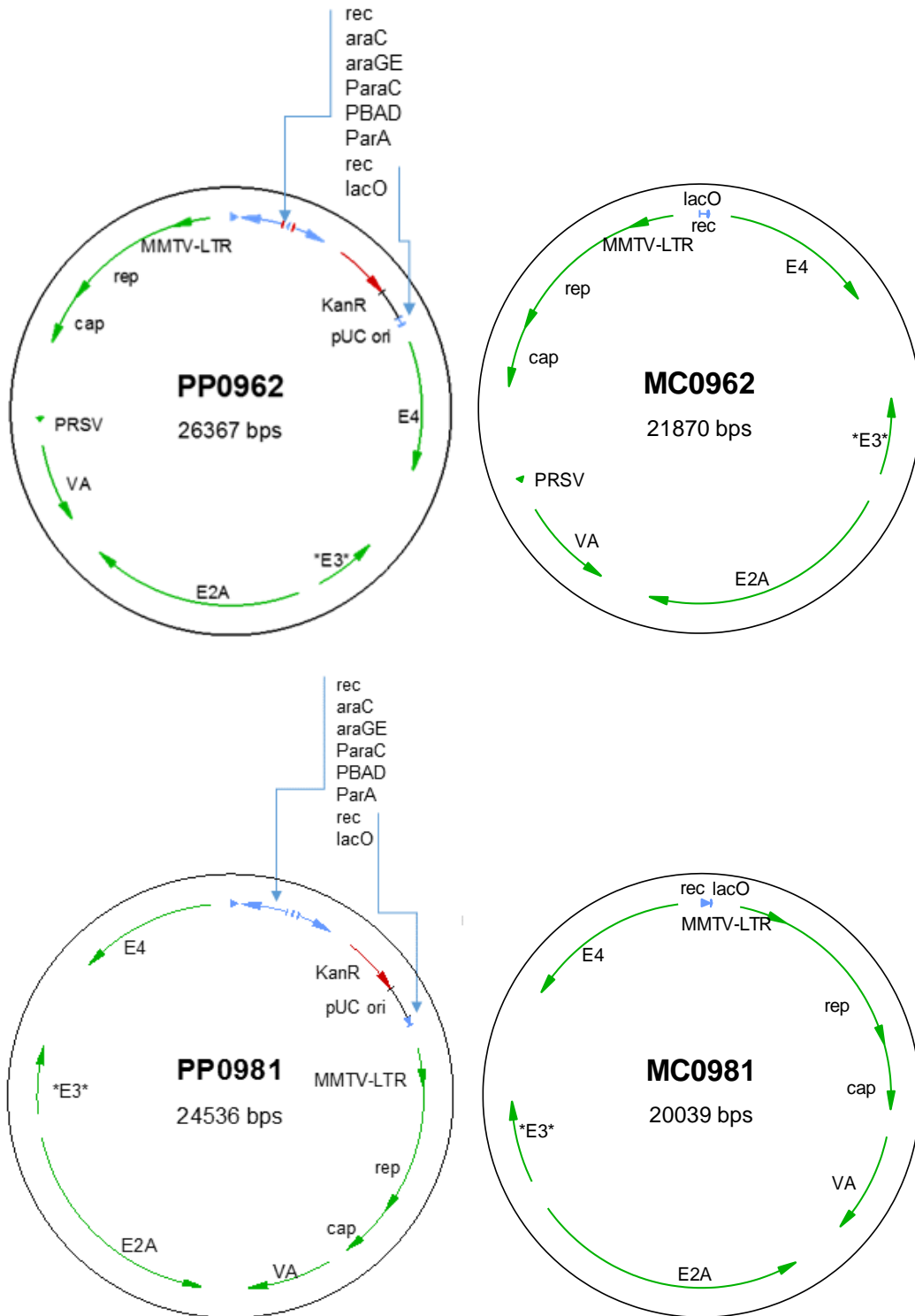
<sup>a</sup> Schnittstellen des Vektors, die zur Klonierung genutzt wurden.

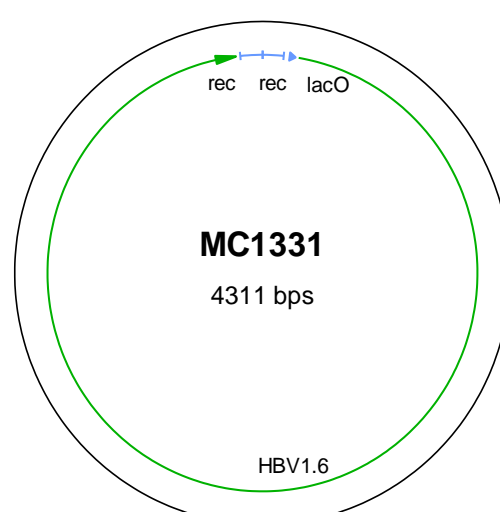
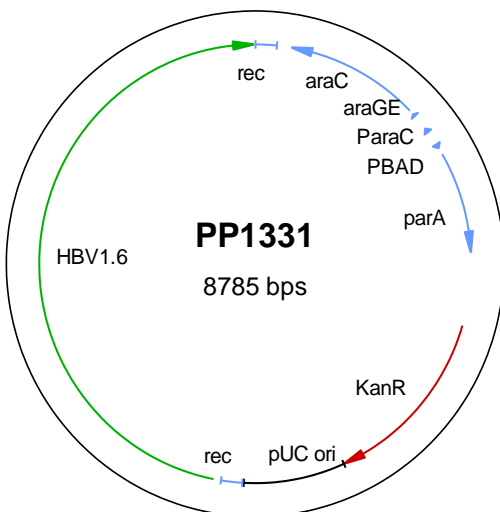
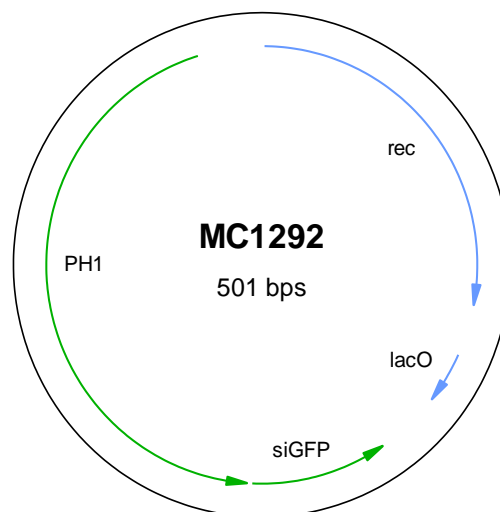
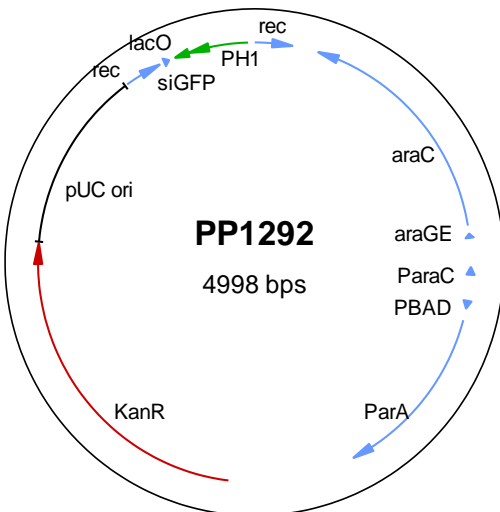
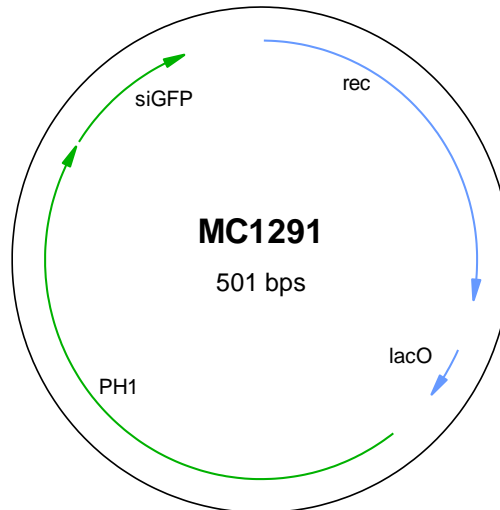
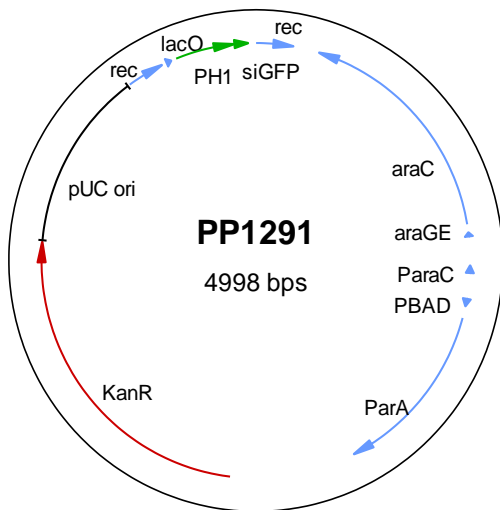
### 7.3 Abbildungen der Plasmidkarten

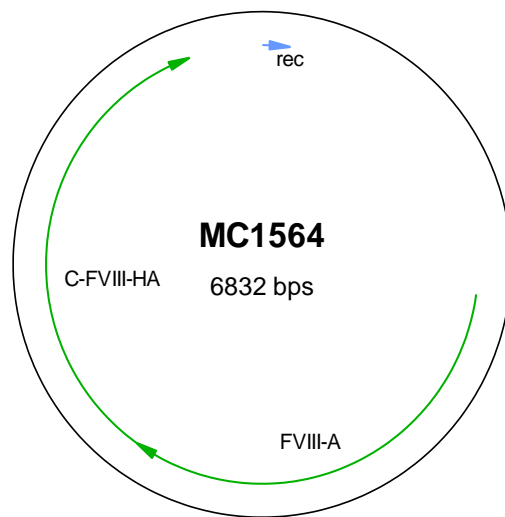
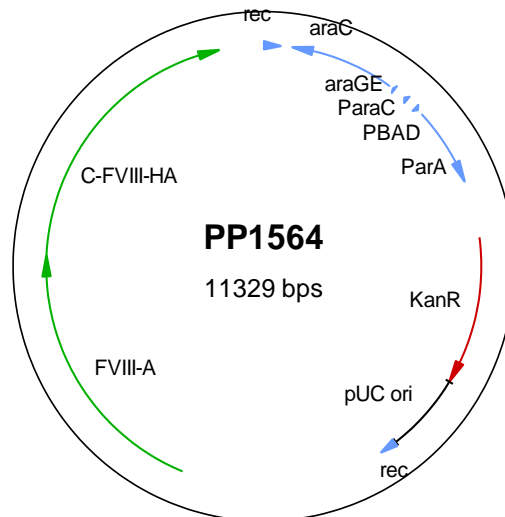
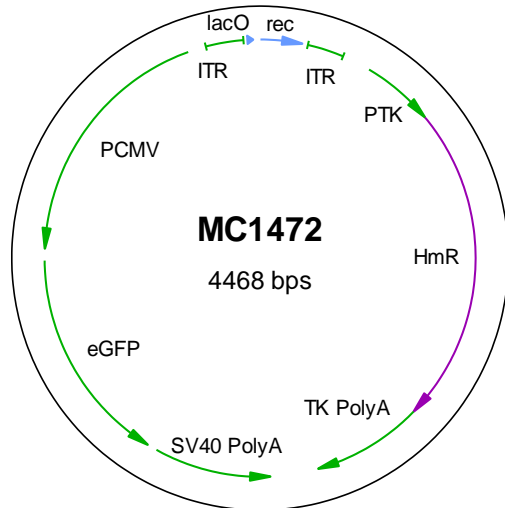
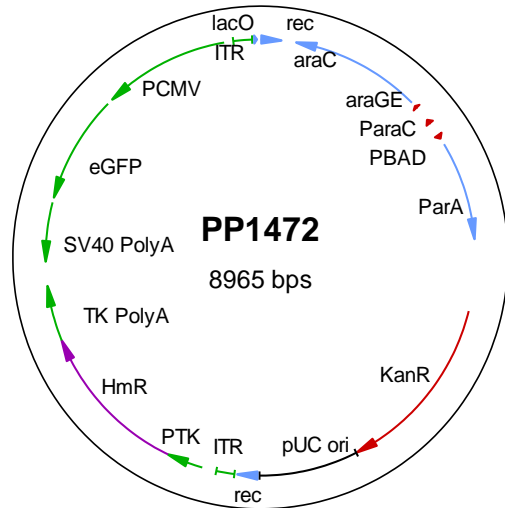
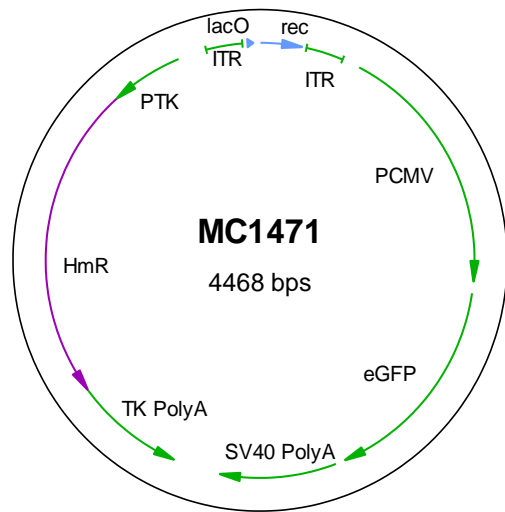
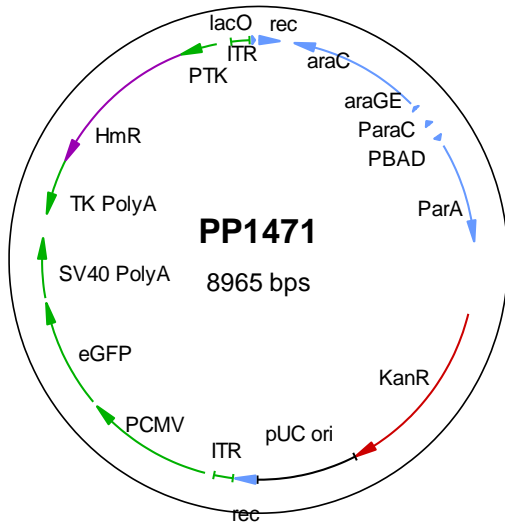
Legende siehe Tabelle 7.2.1 Überblick aller verwendeten und konstruierten Plasmide.











Die Plasmidkarten sind nicht maßstabgetreu.



## 7.4 GMP-Richtlinien

DNA-Vektoren, die in der Gentherapie am Menschen eingesetzt werden, müssen den *good manufacturing practice guidelines* (GMP-Richtlinien), der guten Herstellungspraxis, entsprechen. Unter GMP-Richtlinien sind die Anforderungen zur Qualitätssicherung von Herstellungsabläufen und -umgebung in der Herstellung von Arzneimitteln und Wirkstoffen zusammengefasst. Die Richtlinien dienen der Gewährleistung der Produktqualität und der Erfüllung der Anforderungen für Vertrieb und Anwendung der Gesundheitsbehörden. Insbesondere in der pharmazeutischen und biopharmazeutischen Herstellung ist die Qualitätssicherung von besonderer Wichtigkeit, da die hergestellten Produkte als aktive pharmazeutische Wirkstoffe (*active pharmaceutical ingredient (API)*), wie z.B. DNA-Vektoren, direkt am Menschen angewandt und so einen zentralen Einfluss auf die Gesundheit des Anwenders haben. Zusammengefasst werden die GMP-Richtlinien von der Europäischen Kommission 2014 in den *Commission Directives 91/356/EEC* [84].

## 7.5 CpG-Motive

Ein CpG-Dinukleotid besteht aus den in der DNA-Sequenz in 5'-3'-Leserichtung benachbarten Nucleinbasen Cytosin und Guanin, welche mittels Phosphodiesterbindung verbunden sind. Kommt in einer Region des DNA-Stranges ein erhöhter Anteil an CpG-Motiven vor, wird von CpG-Inseln gesprochen. Diese sind in der Genregulation wichtig. Etwa 40–45 % aller menschlichen Gene haben CpG-Inseln in ihren Promotorbereichen. Anders als die CpG-Motive in der kodierenden Region eines Gens, sind CpG-Motive innerhalb einer CpG-Insel im Promotorbereich nicht methyliert, wenn die Gene exprimiert werden. Eine Methylierung der CpG-Motive verhindert die Expression von Genen und spielt so bei der Entstehung von Krebs durch Abschalten von Tumorsuppressorgenen eine Rolle [146],[147]. Sind CpG-Motive auf als Vektoren eingesetzten Plasmid-DNA enthalten, können diese im Zielorganismus unerwünschte Immunantworten, wie Entzündungen sowie unspezifische Mutationen auslösen [45],[46]. Werden CpG-freie Plasmid-DNA-Vektoren eingesetzt können diese negativen Effekte vermindert werden [46]–[49].

## 7.6 Geräteliste

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller Ident-Nr.</b>
Abzug	Unilab	AZ12	200253
Analysewaage	Sartorius	CPA64	26206556
Aqua Purificator	Miele	G7795	00/53078300
Autoklav	H+P Labortechnik	Varioklav 135S	90970601
Autoklav	H+P Labortechnik	Varioklav 135S	90980601
Autoklav	H+P Labortechnik	Varioklav 135S	91480702
Bioreaktor 15 L	B Braun	ES 10	385
pH Elektrode	Metler Toledo		
pO <sub>2</sub> Elektrode	Metler Toledo	5220116	1133464
Schaltschrank Fermenter	B Braun	880263/7	275
Bioreaktor 15 L	B Braun	ES 10	389
pH Elektrode	Metler Toledo		
pO <sub>2</sub> Elektrode	Ingold		322756701/73521
Schaltschrank Fermenter	B Braun	880263/7	271
Bioreaktor 30 L	Bioengineering		D3021
MSR Schrank	Bioengineering	10 L	14660
pH Elektrode	Metler Toledo		
pO <sub>2</sub> Elektrode	Ingold		325903000/74955
Bioreaktor 42 L	Bioengineering		D1381
MSR Schrank	Bioengineering	30 L	12924
pH Elektrode	Metler Toledo		
pO <sub>2</sub> Elektrode	Metler Toledo		3400231
Computer <i>CGE</i>	IBM	8143-34U	LMBTY9N
Computer Intas	Dell	Optiplex745	47636445461
Dampferzeuger	Veit	2365/2	123651001M
Drucker	EPSON	EPL-6200	L427A
Drucker	HP	2300L	CNCDD36887
Elec. Power Supply	Consort	EV243	83782
Eppifuge	Eppendorf	mini Spin	5453 14472
Eppifuge	Heraeus	Biofuge pico	272565
Eppifuge	Sigma	1-14	137921
Etikettendrucker	NWL	LetraTAG xr	29029853
Folienschweißgerät	Fischbein	CD300-220	CD090703
Folienschweißgerät	Fischbein	CD300-220	CD112131
Gefahrstoffschränk	Düperthal	FWF90	2091201191751
Gefrierschränk	Bosch	GS 5D 14	GSD1434/01
Gefrierschränk	Liebherr	GN 4113	29.314.738.3
Geldokumentation	INTAS		201301-IMB21-008
Gelelektrophorese	Beckmann Coulter	P/ACE MDQ	3062919
Gelkammer	Advance	Mupid-One	070504
Gelkammer	Advance	Mupid-One	072293
Gelkammer	Advance	Mupid-One	072294

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller Ident-Nr.</b>
Gelkammer	PEQLAB	40-0911	020402
Gelkammer	PEQLAB	40-0911	021002
Inkubator	IKA	KS4000 ic	07.261981
Inkubator	IKA	KS4000 ic	07.261985
Kühl-/Gefrierkombination	Liebherr	CNP 3513	29.667.433.6
Kühlschrank	AEG	S17TK5	42440043
Kühlschrank	Foron	KT1372D815	808000700
Kühlschrank	Liebherr	FKS 5000	9982525-06
Laborspülmaschine	Miele	G7783	16/18341720
Laborspülmaschine	Miele	G7783	16/53075337
Laborspülmaschine	Miele	G7783	16/53078795
Laborwaage	Sartorius	LP16000S	12306079
Laborwaage	Sartorius	LP16000S	12306081
Laborwaage	Sartorius	LP34000P	12306088
Laborwaage	VWR	SE 622	IT1102723
Laminiergerät	Genie	LA 402	CN 352012
Laser Module	Beckmann Coulter	LIF Laser	232348
Magnetrührer	2mag	Mix 1	1315011
Magnetrührer	2mag	Mix 1XL	1324005
Magnetrührer	2mag	Mix 1XL	1333003
Magnetrührer	Heidolph	MR mini	50360
Magnetrührer	IKA	color squid	01.765957
Mikroskop	Zeiss	Primo Star	3124001944
Mikrowelle	Severin	900 & Grill	MW7803
Mixing Block	BIOER	MB-102	BYQ6008E-1409
Mixing Block	BIOER	MB-102	BYQ6008E-1552
Nanodrop	Thermo	2000C	D985
PCR Cycler	PEQLAB	Primus 25	13872-01 U 00033
Photometer	Shimadzu	UVmini-1240	A10934537626
Photometer	Shimadzu	UVmini-1240	A10934835635CS
Pipette	Brand	2-20 µL	Transferpette
Pipette	Brand	20-200 µL	Transferpette
Pipette	Brand	100-1000 µL	Transferpette
Pipette	Eppendorf	0,1-2,5 µL	Reference
Pipette	Eppendorf	2,5-10 µL	Reference
Pipette	Thermoscientific	0,5-5 mL	Finnpipette F1
Reagenzglasschüttler	IKA	KS 130 B	01.782340
Schlauchpumpe	Bioengineering	Alitea XV	50778.1
Schlauchpumpe	Bioengineering	Alitea XV	50778.1
Schlauchpumpe	Bioengineering	Alitea XV	50778.1
Schlauchpumpe	Bioengineering	Alitea XV	50778.1
Schlauchpumpe	Bioengineering	Alitea XV	50778.1
Schlauchpumpe	Bioengineering	Watson Marlow	2254
Schlauchpumpe	ISMATEC	ISM1079	14234-00306

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller Ident-Nr.</b>
Schlauchpumpe	Watson Marlow	313	036.4642.000
Schüttler	Heidolph	Polymax 1040	051307389
Spektramax	Molecular DEVICES	340 PC	L02377
Sterilwerkbank	Baker Company	SG 603DIN	68397
Sterilwerkbank	Thermo	S2010	306110778
Thermoschrank	Memmert	U 40	831973
Thermostatschrank	Liebherr	ET618-4	0911/14477
Thermostatschrank	Liebherr	ET618-4	0911/14479
UFO Zentrifuge	Biozym	Sprout	HSA 18682
UFO Zentrifuge	VWR	Ministar	1302 0584
VE Anlage	Millipore	Elix 70	F3DA70454 A
Vortexer	neoLab	VM300	000627
Vortexer	Scientific Industries	G560E	2-96713
Vortexer	Scientific Industries	G560E	2E-168446
Vortexer	Scientific Industries	G560E	2E-187418
Vortexer	VWR	VM-3000	0311
Waschmaschine	Miele	W918	
Wasserbad	Huber	MPC E	124249
Wasserbad	Memmert	W 350	920760
Zentrifuge	Sartorius	6-16K	138669
Zentrifuge	Sartorius	6K15	101521
Zentrifuge	Sartorius	6K15	116566

## 7.7 Chemikalienliste

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
2-Mercaptoethanol	Merck
2-Propanol	J. T. Baker
Acetonitril	Roth
Acrylamid/ Bis- (30%; 0,8%)	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Biozym
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth
Alpha-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure	Sigma
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth/VWR
Ammoniumperoxodisulfat	Roth/VWR
Ampicillin Natriumsalz	Roth/VWR
Ampuwa Water for Injection	Fresenius Kabi
Biotin	Roth
Bromphenol Blau	Merck
Casein Pepton/Trypton	Roth
Coomassie Brilliantblau G 250	Merck

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
D-Glucose	VWR
di-Kaliumhydrogenphosphat	VWR
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Roth
EDTA Dihydrat	Roth
Endotoxinfreies Wasser	Macherey-Nagel
Essigsäure (100%)	Roth
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Roth
Glycerin (99,5%)	Emery
Hefeextrakt	Ohly GmbH Hamburg
Histidin	Senn Chemicals AG
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth/VWR
Kaliumhydrogenphosphat	Roth/VWR
Kaliumhydroxid	Roth/VWR
Kanamycinsulfat	Roth/VWR
L(+)-Arabinose	Roth
LAL Reagenzwasser	Lonza
Magensiumsulfat Heptahydrat	Roth
Magnesiumdichlorid Hexahydrat	Roth
Meliseptol rapid	B Braun
Methanol	VWR
Natriumacetat	Roth/VWR
Natriumcarbonat	Roth/VWR
Natriumchlorid	Roth/VWR
Natriumhydrogencarbonat	Roth/VWR
Nukleasefreies Wasser	Promega
Phenol	Roth
Phosphorsäure (85%)	Roth
RNaseA	Sigma
Saccharose	Roth/VWR
Salzsäure	VWR
Sodiumdodecylsulfate	Roth
Sojapepton	UD Chemie GmbH (Warrstadt)
Sorbitol	Roth
Tetracyclin	Fluka
Trifluoressigsäure	Roth
Tris(hydroxymethyl)aminoethan (Tris)	Roth
Tris-Hydrogenchlorid	Roth
Trypsin	Roche
Tween 20	Roth

## 8 Publikationen

### 8.1 Forschungsarbeiten

Viefhues M., Wegener S., **Rischmüller A.**, Schleef M., Anselmetti D. (2013). *Dielectrophoresis based continuous-flow nano sorter: fast quality control of gene vaccines*. Lab Chip. 7;13(15):3111-8.

**Rischmüller A.**, Viefhues M., Dieding M., Schmeer, M., Baier R., Anselmetti D., Schleef M. (2013). *Analytical tools in minicircle production*. Wiley-VCH Verlag GmbH. Weinheim

### 8.2 Konferenzteilnahmen, Poster und Auszeichnungen

**Rischmüller A.** (2013). *Minicircle DNA - how small is "mini?"*, Poster, ESGCT, Madrid, ES

**Rischmüller A.**, Viefhues M., Dieding M., Schmeer M., Baier R., Anselmetti D., Schleef M., (2012). *Analytical tools in minicircle production.*, Poster, ESGCT, Versailles, FR

**Rischmüller A.**, Schmeer M., Schleef M., (2011). *Minicircle DNA – from construction to performance testing.*, ESGCT, Brighton, GB

DPG Summerschool (2011). Physikzentrum Bad Honnef, DE

**Herzig A.**, Delzor A., (2010). CliniGene Young Investigator Award

CliniGene, European network for the advancement of clinical gene transfer and therapy (2010), Annecy, FR

## **9 Danksagung**