

Frederik Marmé  
Dr. med.

## **Funktionelle Untersuchung der Proteintransduktionseffizienz mit Hilfe „zellpermeabler“ Tetrazyklin-regulierter Transaktivatoren und Silencer**

Geboren am 19.08.1974 in Freiburg im Breisgau  
Staatsexamen am 03.05.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: molekulare Virologie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. H.-G. Kräusslich

Die impermeable Natur der Zellmembran gegenüber hydrophilen Makromolekülen hat bisher den Einsatz von Proteinen mit intrazellulärem Wirkort in Medizin und Grundlagenforschung limitiert. In den letzten Jahren wurde jedoch eine Klasse von kurzen Peptiden beschrieben, die eine Rezeptor- und Energie-unabhängige Aufnahme von Proteinen (und anderen Makromolekülen) in Zellen praktisch jeden Typs vermitteln sollen. Zu diesen gehören eine Reihe viraler Proteine mit stark basischen Domänen (HIV-1 TAT, HSV VP22 etc.) sowie nicht virale, Nukleinsäure-bindende Proteine (APHD, Cre, Hox, c-Jun etc.). Sowohl die Effizienz als auch der Aufnahmemechanismus selbst sind jedoch umstritten. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme dieser so genannten zellpermeablen Peptide bzw. deren Fusionsproteine haben sich als äußerst artefaktanfällig erwiesen und ermöglichen keine Aussage über die biologische Aktivität der internalisierten Proteine. Gut quantifizierbare funktionelle Analysen fehlten bisher. In der vorliegenden Arbeit wurde die Effizienz dieser, als Proteintransduktion bezeichneten, Internalisierung mit Hilfe des Tet-Systems funktionell untersucht.

Das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Tet-System erlaubt eine stringente Kontrolle der Genexpression in Säugerzellen und Mäusen. Es basiert auf den Kontrollelementen des Tetrazyklin-Resistenzoperons *Tn10* aus *E. coli*. Durch die Fusion der Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus-Proteins VP 16 mit dem Tet-Repressor (TetR) konnte unter Erhaltung der DNA-Bindungs- und Induktionseigenschaften ein Tetrazyklin-kontrollierbarer Transaktivator (tTA) erzeugt werden. Dieser bindet in Abwesenheit von Tetrazyklin als Dimer an *tet*-Operatorsequenzen und stimuliert die Transkription eines stromabwärts positionierten RNA-Polymerase II-Minimalpromotors. Die Zugabe von Tetrazyklin hebt diese Bindung auf und deaktiviert das System.

Zunächst wurden durch Fusion des Tet-kontrollierten Transaktivators an verschiedene Proteintransduktionsdomänen (TAT, VP22, APHD, 9Arg) putativ zellpermeable, Tet-kontrollierbare Transaktivatoren konstruiert und in klassischen Transfektionsexperimenten auf ihre Funktion untersucht. Die N-terminalen Fusionen der PTDs an tTA wiesen ein dem tTA selbst vergleichbares DNA-Bindungs- und Induktionsverhalten auf, wohingegen Fusionen, die die PTDs in einer internen Lokalisation zwischen dem TetR- und dem VP16-Anteil von tTA beherbergen, kaum in der Lage waren, die Transkription des Luziferasereportergens unter Kontrolle des Tet-kontrollierbaren Promotors zu aktivieren.

Die Fusionsproteine mit erhaltener Funktionalität wurden daraufhin in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierbei gelang es ausreichende Mengen der rekombinanten Proteine in hoher Reinheit herzustellen. Im Anschluss an die Aufreinigung wurde die Fähigkeit dieser rekombinanten Proteine untersucht, nach Zugabe zum Zellkulturmedium, in HeLa X1/6 Zellen die Transkription des Luziferasereportergens vom Tet-regulierbaren Promotor aus zu induzieren, um so die Effizienz dieses

Proteintransduktion genannten Vorganges zu untersuchen. Dabei zeigte sich eine nur äußerst geringe, jedoch Konzentrations- und Zeit-abhängige Transaktivierung, die sich durch die Zugabe von Doxizylin aufheben lässt, also einer spezifischen Transaktivierung des Promotors entspricht. Im Vergleich zu der durch klassische Transfektion erreichbaren Aktivierung des Luziferasegens in dieser Zelllinie blieb die durch Proteintransduktion erreichbare Luziferaseaktivität trotz extrem hoher Konzentrationen im Zellkulturmedium (bis 20  $\mu\text{M}$ ) um drei bis vier Größenordnungen zurück. Eine weitere Steigerung der Konzentration der rekombinanten Proteine führte zu toxischen Effekten in der Zellkultur. Diese Beobachtungen gelten gleichermaßen für die PTD-tTA Fusionsproteine wie auch für das tTA Kontrollprotein ohne spezialisierte Proteintransduktionsdomäne.

Um weiter zu klären, ob eine fehlende biologische Aktivität der rekombinanten Proteine oder eher die mangelnde Aufnahme in die Zellen Grund für die enttäuschende Transaktivierung war, untersuchten wir die Aufnahme der rekombinanten Proteine mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Um Fixierungsartefakte zu vermeiden wurde diese an lebenden, nicht fixierten Zellen durchgeführt. Dazu wurden die rekombinanten Proteine Fluoreszenz-markiert und deren zelluläre Lokalisation nach Zugabe zum Zellkulturmedium betrachtet. Hierbei zeigte sich eine äußerst starke membranständige Fluoreszenz und ein schwaches perimembranäres punktuierendes Verteilungsmuster, das einer endosomalen Verteilung entsprechen könnte, eine zytoplasmatische Lokalisation konnte nicht nachgewiesen werden. Dieses Verteilungsmuster zeigte sich gleichermaßen für TAT-tTA und für tTA selbst. Beide Proteine haben gemeinsam, dass sie stark basische Nukleinsäure-bindende Domänen beinhalten. Unsere Ergebnisse werden von einer Reihe fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen anderer Gruppen gestützt, die eine zytoplasmatische Lokalisation nur nach Fixierung nachweisen konnten. Entgegen den ursprünglich geforderten Modellen einer direkten Translokation durch die Zellmembran oder Bildung inverser Mizellen scheint durch die stark basischen PTDs lediglich eine äußerst starke Bindung an die negativ geladene Zellmembranaußenseite vermittelt zu werden. Von dort folgen sie unspezifisch den zelleigenen endozytotischen Membranbewegungen und gelangen so in endosomale Kompartimente. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine sehr kleine Anzahl von PTD-tTA- und tTA-Molekülen auch in aktiver Form in den Zellkern gelangt. In Anbetracht der extrem hohen Sensitivität des Tet-System handelt es sich hier jedoch um einen derart ineffizienten Vorgang, dass er für eine breite Anwendung in Medizin und Forschung wohl keine Bedeutung erlangen wird. Abgesehen von der enttäuschenden Effizienz des Systems stehen auch die vielen Möglichkeiten, kaum kontrollierbare unspezifische, pleiotrophe, Effekte auszulösen, einer sinnvollen Anwendung im Wege.

Auch eine effiziente interzelluläre Verbreitung solcher PTD-Fusionsproteine, die aufgrund fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen gefordert wurde, konnte mit Hilfe von Ko-Kulturrexperimenten einer Reporter-gen-tragenden und einer, die zellpermeablen Transaktivatoren exprimierenden Zelllinie widerlegt werden.

Das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit war nicht allein, die Effizienz der Proteintransduktion zu untersuchen, sondern diese neue Technologie sinnvoll für das Tet-System zu nutzen. Mit Hilfe zellpermeabler Tet-kontrollierter Silencer (tTS) sollte bei der Etablierung stabiler Zelllinien für Transgene mit schlecht tolerierbaren Genprodukten die transiente Phase überbrückt werden. In dieser Phase kann eine hohe Plasmidkopienzahl sowie die fehlende Chromatinrepression zu einer Hintergrundsaktivität führen, die die Etablierung einer stabilen Zelllinie verhindern kann. Die Tet-kontrollierbaren Silencer enthalten anstelle der Aktivierungsdomäne von tTA eine Repressionsdomäne und führen so zu einer effizienten Repression der Hintergrundsaktivität. Nachteilig hierbei ist nur die Notwendigkeit eines weiteren Transgenes inklusive des erforderlichen Resistenzmarkers. Zellpermeable Silencer könnten durch Zugabe des rekombinanten Proteins während der kritischen Phase die Hintergrundsaktivität unterdrücken, ohne selbst transkribiert werden zu müssen.

Analog den putativ zellpermeablen Tet-kontrollierten Transaktivatoren wurden putativ zellpermeable Tet-kontrollierte Silencer konstruiert. In klassischen Transfektionsexperimenten konnte deren erhaltene Funktion nachgewiesen werden. Auch die anschließende Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli* gelang sehr effizient, jedoch waren die Silencerfusionsproteine wie die ursprünglichen Silencer selbst unter allen Expressionsbedingungen in *E. coli* gänzlich unlöslich. Sämtliche Renaturierungsverfahren (darunter Pulsrenaturierung, saure Extraktion und DNA-abhängige Renaturierung) blieben erfolglos.

Vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit nachgewiesenen extrem geringen Effizienz der Proteintransduktionstechnologie wurde auf weitere Versuche, die rekombinanten Silencer zu renaturieren verzichtet da keine Hoffnung bestand, mit diesen Fusionsproteinen nach Zugabe zum Zellkulturmedium eine für unsere Zwecke ausreichende Repression der Basalexpression zu erreichen.