

Aus der Augenklinik und Poliklinik,
Klinikum der Universität Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Siegfried Priglinger

***Untersuchungen zur Immunogenität von
AAV2-Kapsidvarianten für die okuläre Gentherapie
und Impfstoffentwicklung***



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Miranda Petra Martha Vivian Gehrke

aus

München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhild Wildner

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Julia Roider
Prof. Dr. Elfriede Nößner
Prof. Dr. Josef Eberle

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2022

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Virale Gentherapie	1
1.2 Vektoren	2
1.3 Adeno-assoziierte Viren	3
1.3.1 Entdeckung und Einsatz von AAVs als Vektoren in der Gentherapie	3
1.3.2 Systematik/Einordnung der AAVs.....	3
1.3.3 AAV-Serotypen.....	4
1.3.4 Tropismus von AAV2.....	5
1.3.5 Struktureller und funktioneller Aufbau von AAV.....	5
1.3.6 Infektionszyklus	7
1.4 Auge und Immunsystem	8
1.4.1 Okulare Immunreaktionen auf gentherapeutische Vektoren	10
1.4.1.1 Applikationsart	11
1.4.1.2 Vektordosis.....	12
1.4.1.3 Promotoren	12
1.4.1.4 Transgene	12
1.4.1.5 Andere Faktoren.....	13
1.4.2 Strategien zur Unterdrückung einer AAV-induzierten Immunantwort	13
1.5 Weitere Herausforderungen	15
1.6 AAV2-Kapside als Träger für Impfantigene	15
2 Material und Methoden	18
2.1 Humane Blutproben	18
2.2 AAV2-Vektoren	19
2.2.1 Rekombinante AAV-Vektoren für die okulare Gentherapie	19
2.2.2 AAV2-Impfstoff Vektoren mit SARS-CoV2-Spikeprotein-Insertion (HtW2_S1.1/ HtW2_S1.2)	20
2.3 Allgemeine Materialien	20
2.4 Zusammensetzung verwendeter Kulturmedien	24
2.5 Immunchemie	25
2.5.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	25
2.5.1.1 Kapsidmengenbestimmung.....	25
2.5.1.2 Bestimmung der optimalen Bedingungen für den indirekten ELISA zur Testung der AAV2-Seroprävalenz.....	27
2.5.1.3 Indirekter ELISA mit Serum- bzw. Plasmaproben.....	29
2.5.1.4 Bestimmung der Anti-SARS-CoV-2 Spike-Antikörper	30
2.5.2 Neutralisationsassay	30
2.5.2.1 Durchführung des Neutralisationsassays	31
2.5.2.2 Bestimmung HtW2_S1.2 spezifischer neutralisierender Antikörper	34
2.6 Zelluläre Immunität	35

2.6.1	Gewinnung von peripheren Blutmonozyten	35
2.6.2	Lymphozytenstimulation zur Bestimmung von Vitalität und Zytokinsekretion (XTT-Assay, Multiplex-Bead-Analyse).....	36
2.6.3	Lymphozytenstimulation für die Immunfluoreszenzfärbung von Oberflächenmarkern und intrazellulären Zytokinen	37
2.6.4	XTT-Assay zur Bestimmung der zellulären Vitalität nach Lymphozyten-Stimulation	38
2.6.5	Bioplex-Assay zur Bestimmung der Zytokin- und Chemokinsekretion	39
2.6.5.1	Durchführung	39
2.6.6	Intrazelluläre und Oberflächen-Immunfluoreszenzfärbungen	41
2.7	Statistik	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Immunogenität der Kapsidmutanten	44
3.1.1	Bestimmung der Kapsidmenge der verschiedenen Vektor-Präparationen	44
3.1.2	Etablierung des indirekten ELISAs zum Nachweis der Antikörper gegen AAV2-Kapside.....	44
3.1.2.1	Titrationen der ELISA-Platten-Beschichtung und der Nachweis-Antikörper	44
3.1.2.2	Grenzwerte für positive Vektorbindung der Antikörper	45
3.1.2.3	Inter- und Intraassay-Variabilität CV%	46
3.1.3	Vektorspezifische Antikörper der Blutspender	46
3.1.3.1	Vergleich der Antikörper-Bindungen von Serum versus Plasma.....	50
3.1.4	Etablierung des Neutralisationsassays.....	51
3.1.4.1	Titration der Vektoren zur Bestimmung der optimalen Transduktionseffizienz (Multiplizität der Infektion, MOI).....	51
3.1.4.2	Titration der Serum/Plasma Proben zur Bestimmung der optimalen Verdünnungen	53
3.1.4.3	Grenzwerte für positive Vektorbindung der neutralisierenden Antikörper	53
3.1.4.4	Wahl der Nachweismethode für die Transduktionseffizienz	54
3.1.4.5	Berechnung der Kapsidmengen	54
3.1.4.6	Interassay-Variabilität	55
3.1.5	Neutralisierende vektorspezifische Antikörper	55
3.1.6	Vergleich von gesamten und neutralisierenden Antikörpern	59
3.1.7	Altersabhängige Antikörperantworten der Spender	60
3.2	Zelluläre Immunantworten auf AAV2 WT und die Varianten AAV2.GL und AAV2.NN ...	61
3.2.1	Etablierung der Stimulationsassays	61
3.2.1.1	Mediumzusätze	62
3.2.1.2	Zellzahl der Lymphozyten und Vektordosis.....	62
3.2.1.3	Stimulationsdauer	62
3.2.2	Stimulation von PBMCs mit den AAV2-Kapsiden - XTT-Assay	63
3.2.3	Sekretion von Zytokinen und Chemokinen der stimulierten Lymphozytenkulturen.....	64
3.2.4	Immunfluoreszenzanalyse von Zellpopulationen nach Vektorstimulation	66
3.3	AAV2-Kapsidvarianten mit Expression der Rezeptorbindungsstelle von SARS-CoV2 (HtW2_S1.1 und HtW2_S1)	69
3.3.1	Zelluläre Antwort nach Impfung mit Comirnaty	71
3.3.2	Zytokin- und Chemokinsekretion nach Stimulation mit HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2	72
3.3.3	Populationen der angeborenen Immunantwort: Monozyten, dendritische Zellen und ihre Produktion von IFN- β und IL-1 β	76
3.3.4	NK und NK-T-Zellen und Zellen der erworbenen Immunantwort: B-Zellen, T-Helfer und zytotoxische T-Zellen.....	78
3.3.5	Aktivierte Leukozyten: CD69 ⁺ Zellen.....	80
4	Diskussion.....	83

4.1	Immunogenität der neuartigen Kapsidmutanten AAV2.GL und AAV2.NN	83
4.2	Immunreaktionen auf AAV2-Kapside mit Expression von SARS-CoV2-Spike-Epitopen ..	89
5	Zusammenfassung	95
6	Literaturverzeichnis	97
7	Danksagung	109
8	Affidavit	111
9	Veröffentlichungen	112

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: AAV-Lebenszyklus nach (Daya und Berns 2008)	8
Abbildung 2: Modellierung der Kapsid epitope von AAV2.WT und der Varianten AAV2.GL und AAV2.NN .	14
Abbildung 3: Sars-CoV-2-Virion und Spike-Protein.....	16
Abbildung 4: Prinzip des Sandwich-ELISAs.....	26
Abbildung 5: Plattenschema zur Etablierung des indirekten Anti-AAV ELISAs.....	29
Abbildung 6: Prinzip des indirekten ELISA	29
Abbildung 7: Prinzip des Antikörper-Neutralisationsassays mit HeLa-Zellen.....	32
Abbildung 8: Beispiel der Abgrenzung zwischen GFP-Fluoreszenz-positiven und -negativen Zellen: Darstellung als Histogramm-Plot nach FACS-Analyse.....	34
Abbildung 9: Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer.....	36
Abbildung 10: Prinzip des XTT-Assays.....	38
Abbildung 11: Prinzip des Bioplex-Assays.....	40
Abbildung 12: Prinzip der Immunfluoreszenzfärbungen von PBMCs.....	42
Abbildung 13: Eingrenzung der Leukozytenpopulation.....	43
Abbildung 14: Etablierung des indirekten Kapsid-ELISAs	45
Abbildung 15: Titrationskurven der getesteten Serum- und Plasma-Proben auf Antikörper gegen AAV2.WT (blau), AAV2.GL (grün) und AAV2.NN (rot).....	49
Abbildung 16: Gesamt-Antikörperantwort auf den AAV2 Wildtyp sowie die Mutanten AAV2.GL und AAV2.NN	50
Abbildung 17: Vergleich von Serum und Plasma des Spenders H1	51
Abbildung 18: MOI-Testung von AAV2 WT und HeLa-Zellen.....	52
Abbildung 19: MOIs der verschiedenen Vektoren für den Einsatz im Neutralisationsassay.....	52
Abbildung 20: Beispiele für Neutralisation des AAV2 WT durch die Seren U13 (wenig Neutralisation) und H2 (gute Neutralisation)	53
Abbildung 21: Vergleich der Messung GFP-positiver Zellen in der Countess und im FACS.....	54
Abbildung 22: Darstellung von eGFP+ HeLa Zellen nach Transduktion mit AAV2 WT, AAV2. GL, AAV2. NN und Inkubation mit Serum U 103 als Dot-Plot im FACS.....	56
Abbildung 23: Vektorspezifitäten neutralisierender Antikörper	58
Abbildung 24: Gesamte anti-AAV2 Antikörper im Vergleich zu den neutralisierenden Antikörpern	60
Abbildung 25: Altersverteilung der gesamten anti-AAV-Antikörperantworten	61
Abbildung 26: Altersverteilung der neutralisierenden Antikörperantworten.....	61
Abbildung 27: Etablierung der Stimulationsdauer der Lymphozyten mit Spender H7.....	63
Abbildung 28: XTT-Assay nach PBMC-Stimulation mit AAV2.WT, AAV2.GL und AAV2.NN	64
Abbildung 29: Zytokin- und Chemokinsekretion nach in vitro-Stimulation mit AAV2-Vektoren (AAV2.GL, AAV2.NN und AAV2.WT) und Kontrollen.....	66
Abbildung 30: Zellpopulationen nach in-vitro Stimulation für 24h mit AAV2-Kapsiden und LPS	69
Abbildung 31: Anti-SARS-CoV2 (Spike-Protein)-IgG Titer	71
Abbildung 32: Monokin- und Chemokinsekretion nach Stimulation mit HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2, AAV2 WT und LPS im Vergleich zum Medium.....	74
Abbildung 33: Zytokinsekretion nach Stimulation mit HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2, AAV2 WT und LPS im Vergleich zum Medium.....	75
Abbildung 34: Immunfluoreszenzanalyse der Zellen des angeborenen Immunsystems nach in vitro- Stimulation mit den Spike Mutanten HtW2_S1.1 sowie HtW2_S1.2: CD11c ⁺ DC, CD14 ⁺ Monozyten und CD11c ⁺ /CD14 ⁺ monozytäre DC	77
Abbildung 35: Immunfluoreszenzanalyse der Zellen des erworbenen Immunsystems nach in vitro- Stimulation mit den Spike-Varianten HtW2_S1.1 sowie HtW2_S1.2	79
Abbildung 36: Immunfluoreszenzanalyse von CD69 ⁺ Zellpopulationen nach in vitro-Stimulation mit den Kapsiden HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: AAV Serotypen: Rezeptoren und Tropismus (Verdera et al. 2020).....	5
Tabelle 2: Blutspenderkollektiv mit Auflistung der spenderspezifischen Besonderheiten	18
Tabelle 3: Verwendete Kapsid-Mutanten.....	19
Tabelle 4: Vektorpräparationen.....	20
Tabelle 5: Steriles Einmalmaterial	20
Tabelle 6: Laborgeräte	21
Tabelle 7: Reagenzien, Puffer und Medien.....	22
Tabelle 8: Kommerzielle Kits.....	23
Tabelle 9: Antikörper für ELISA	23
Tabelle 10: Fluoreszenzmarkierte Antikörper (monoklonale Maus-anti-human-Antikörper) für Oberflächen/Intrazelluläre Färbung	23
Tabelle 11: Isotypkontrollen	24
Tabelle 12: Antikörpercocktails für Immunfluoreszenzfärbungen	24
Tabelle 13: Software	24
Tabelle 14: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	25
Tabelle 15: Verdünnung V1 der AAV Vektoren	27
Tabelle 16: Verwendete Vektoren für die Bestimmung der Gesamtantikörper	29
Tabelle 17: Verwendete Vektoren für die Bestimmung der neutralisierenden Antikörper	30
Tabelle 18: Finale Konzentration der im Neutralisationsassay eingesetzten Vektoren	33
Tabelle 19: Verwendete Vektoren für die Lymphozytenstimulation zur Bestimmung von Vitalität und Zytokinsekretion	36
Tabelle 20: Verwendete Vektoren für die Immunfluoreszenzfärbung.....	37
Tabelle 21: Titer und Genomgehalt der Chargen	44
Tabelle 22: Inter-/Intraassay Variabilität ELISA	46
Tabelle 23: Auflistung der Serumverdünnungen für 50% Transduktion der HeLa-Zellen mit den Vektoren AAV2.WT, AAV2.GL und AAV2.NN	57

Abkürzungsverzeichnis

(H)CMV	(Humanes) Cytomegalovirus	EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
(H)FGFR1	(Humaner) Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1	ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
AA	Aminosäure	FACS	Fluorescence-activated cell sorting
AAV	Adeno-assoziiertes-Virus	FC-Rezeptor	Fragment crystallizable Rezeptor
ACAID	Vorderkammer-Immunprivileg	FDA	Food and Drug Administration
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym	FKS	Fetales Kälberserum
AG	Arbeitsgruppe	FSC	Vorwärtsstreuung/foreward scatter
APC	Antigen präsentierende Zelle	G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
ASSB	Assaypuffer	GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ATP	Adenosintriphosphat	GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
BasicFGF	Basis Fibroblasten Wachstumsfaktor	Gro-α	Growth regulated oncogene alpha
Best1	Bestrophin-1	h	Stunde
CAG	Chicken beta-actin Promoter	HGF	Hepatocyte growth factor
Cap	Kapsid-Proteine	HHV6	Humanes Herpesvirus 6
CAR	Cone Arrestin	HP	Humanserumpool
CD	Clusters of Differentiation	HPV	Humanes Papilloma Virus
cGAS	Cyclic GMP-AMP Synthase	HRP	Meerrettichperoxidase
c-MET	Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor	HS	Humanserum
Covid	Coronavirus-Krankheit	HSPG	Heparan Sulfat Proteoglykan
CTACK	Cutaneous T-cell-attracting chemokine	HSV	Herpes-simplex-Virus
CTL	Cytotoxische T-Zelle	IFN	Interferon
CV%	Variationskoeffizient	IL	Interleukin
CXCL10	CXC-Motiv Chemokin 10	IP10	10 kDa interferon gamma-induced protein
DAMP	Damage-associated molecular pattern	ITR	Inverted terminal repeats
DC	Dendritische Zelle	kB	kiloBase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	LCA	Lebersche Kongenitale Amaurose
DNS	Desoxyribonukleinsäure	LHON	Lebersche Optikusatrophie
EGF2	Epidermaler Wachstumsfaktor 2	LIF	Leukemia inhibitory factor

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München	RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I
LPS	Lipopolysaccharid	RK	Rhodopsin-Kinase
MCP	Monocyte chemoattractant protein	RPE	Retinales Pigmentepithel
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor	RT	Raumtemperatur
MEM	Minimal Essential Medium	SARS	Schweres-akutes-Atemwegssyndrom
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex	sc	self-complementary
MHH	Medizinische Hochschule Hannover	SCF	Stem cell factor
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor	SCGF-β	Stem cell growth factor-beta
MIG	Monokine induced by Gamma-Interferon	SCID	Severe combined immunodeficiency
MIP	Macrophage Inflammatory Protein	SD	Standardabweichung
moDC	von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen	SDF-1α	Stromal cell-derived factor-1alpha
MOI	Multiplizität der Infektion	SI	Sekretionsindex
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure	ss	single-strand
nAB	neutralisierende Antikörper	SSC	Seitenstreuung/side scatter
NK	natürliche Killer Zellen	STING	Stimulator of Interferon genes
OD	Optische Dichte	Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
ORF	offener Leserahmen	TLR	Toll-like-Rezeptor
P	Pellet	TNF	Tumornekrosefaktor
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
PDGFR	Thrombozytenwachstumsfaktor-Rezeptor	Trim- 21	Tripartite motif-containing protein 21
PFA	Paraformaldehyd	TT	Tetanus Toxoid
PPD	Tuberkulin/purified protein derivat	UbiC	Ubiquitin C-Promotor
Präp	Präparation	ÜS	Überstand
PRR	Pattern Recognition Rezeptor	VCAID	Vitreous cavity-associated immune deviation
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted	VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
RBD	Rezeptor-bindende Domäne	vg	Vektorgenom
RedO	Red Opsin	VP	virales Protein
Rep	Regulatorisches Protein	XTT	Triphenyltetrazoliumchlorid
Rho	Rhodopsin	β-NGF	Nerve growth factor-β

1 Einleitung

1.1 Virale Gentherapie

Für viele genetisch bedingte Augenerkrankungen bietet die intraokulare Gentherapie erstmals eine Behandlungsmöglichkeit. Das Konzept der Gentherapie wurde in den 1960er und 1970er Jahren entwickelt. Im Jahr 1972 berichteten erstmals Theodore Friedmann und Richard Roblin über die Möglichkeit „good DNA“ zu verwenden, um „defective DNA“ zu ersetzen (Friedmann und Roblin 1972). Mit dem Aufkommen rekombinanter DNS, also Kombination der DNS verschiedener Organismen, war es möglich, Gene zu klonieren. Klonierte Gene, also identische Kopien von DNS-Fragmenten, wurden in das Genom von Viren integriert, die man als Transportmittel (Vektor) für das intakte Gen in die jeweiligen Zielzellen eingesetzt hat (Schamhart und Westerhof 1999). Im Jahr 1990 führten French Anderson und Michael Blaese die erste von der Food and Drug Administration (FDA) genehmigte Gentherapie sowie die erste direkte Insertion menschlicher DNA in das Genom von Patienten mittels eines retroviralen Vektors durch. Die an dem schweren kombinierten Immundefekt (SCID) leidenden Patienten sollten, durch Bereitstellung der Adenosindeaminase in den defizienten T-Lymphozyten, behandelt werden. Allerdings bestand durch die Fähigkeit der retroviralen Vektoren, die ihr Genom in das der Patienten integrieren können, das Risiko, Onkogene in der Nähe ihres Integrationsortes zu aktivieren und somit Tumore zu induzieren (McCormack und Rabbitts 2004).

Das virale Genom beinhaltet normalerweise alle notwendigen Gene für die virale Vermehrung. Auch solche, die für die Konstruktion der Kapside kodieren und somit die Verpackung des amplifizierten Virusgenoms als auch die Ausschleusung sowie Verbreitung neuer Viruspartikel ermöglichen. Da die Amplifizierung von Viren bei der Gentherapie nicht erwünscht ist, wird nur das Viruskapsid mit seiner Spezifität für bestimmte Zelltypen verwendet und mit einem Plasmid bestückt. Dieses enthält neben dem therapeutischen Gen, nur die wichtigsten genetischen Informationen für eine effiziente Replikation, aber nicht den Bauplan für das Kapsid. Solche therapeutischen Vektoren werden *in vitro* in Zellen hergestellt, die sowohl mit der genetischen Information für das Kapsid als auch mit dem rekombinanten Plasmid für die Gentherapie transduziert werden. Die Zellen produzieren dann die viralen Kapside und bestücken diese ausschließlich mit der rekombinanten DNA oder RNA des therapeutischen Gens (El Andari und Grimm 2021; Daya und Berns 2008). Die so gebildeten Vektoren sind

"Einmalprodukte" und in der Zielzelle des Patienten nicht mehr vermehrungsfähig. Sie enthalten im Idealfall jeweils eine therapeutische Genkopie, die das defekte Gen der Zelle kompensieren soll.

Mittlerweile werden als Vektoren für die Gentherapie vor allem Adeno-assoziierte Viren (AAV) verwendet, mit denen eine effiziente Korrektur des Phänotyps bei geringer Integration und schwacher Immunogenität möglich ist (Srivastava 2020; Dismuke et al. 2013). AAV sind nicht pathogen und haben ein relativ simples Kapsid, das sich leicht modifizieren lässt. Durch Modifikation des AAV-Kapsid ist es inzwischen möglich, effizientere Gentransfervektoren mit besserem Tropismus für die jeweiligen Zielzellen zu entwickeln und somit die Gentherapie zu optimieren (Büning et al. 2015; Büning et al. 2008; Büning und Srivastava 2019).

1.2 Vektoren

Bislang werden meist virale Vektoren als Vehikel verwendet, um therapeutisch wirksame Gene in die jeweiligen Zielzellen einzubringen. Um die unkontrollierte Vermehrung des Virus zu verhindern, muss das virale Genom nicht nur hinsichtlich des therapeutischen Gens modifiziert werden (Chira et al. 2015), wie auch schon in 1.1 erwähnt. Auch andere Methoden des Gentransfers, wie chemische beziehungsweise physikalische, sind möglich. Physikalischer Gentransfer beruht auf dem Prinzip, eine vorübergehende Diskontinuität der Zellmembran durch mechanische, elektrische, hydrodynamische, ultraschall- oder laserbasierte Energie zu schaffen (Nayerossadat et al. 2012), woraufhin die Übertragung therapeutischer DNS in die Zielzelle möglich wird. Beim "Particle Bombardement" bzw. der "Gene Gun" werden DNS-beschichtete Partikel (Wolfram oder Gold) verwendet, die auf eine ausreichende Geschwindigkeit beschleunigt werden, um in die Zielzellen einzudringen (Matthews und Keating 1996). Chemische Methoden werden häufiger eingesetzt als physikalische und beruhen im Allgemeinen auf Liposom-basierten Nanomeren, zu denen die kationischen Liposomen/Mizellen- oder Polymervektoren gehören. Vektor, chemische und physikalische Methoden haben alle das Ziel, durch Transduktion der jeweiligen Zielzelle die fehlende Funktion durch das eingebrachte Gen bereitzustellen (Nayerossadat et al. 2012). Unter all diesen Methoden hat sich als gentherapeutischer Vektor insbesondere das AAV bewährt (Büning et al. 2008).

1.3 Adeno-assoziierte Viren

1.3.1 Entdeckung und Einsatz von AAVs als Vektoren in der Gentherapie

Adeno-assoziierte Viren wurden erstmals Mitte der 1960er Jahre zufällig in adenoviralen Präparationen entdeckt ([ATCHISON et al. 1965](#)). Aufgrund der vielen Vorteile wie ihrer apathogenen Natur, unterschiedlichem Zelltropismus, sowie teilende als auch nicht teilende Zellen zu transduzieren, wurden AAVs das beliebteste Werkzeug in der Gentherapie ([Rivière et al. 2006](#); [Daya und Berns 2008](#)). Zur Vermehrung benötigen AAVs die Koinfektion mit einem Helfervirus, z.B. einem Adenovirus. In der latenten Phase liegt die AAV-DNS dagegen im Wirtsgenom integriert vor, und zwar an einer spezifischen Stelle im Chromosom 19 ([Hamilton et al. 2004](#)).

Rekombinante Vektoren integrieren nur äußerst selten in das Genom der Zielzelle, die therapeutische DNS persistiert extrachromosomal, trotzdem wird eine langfristige Genexpression ermöglicht. So ist ein Kontrollverlust der zellulären Regulation durch zufällige Integration in mutationstreibende Bereiche eher unwahrscheinlich ([McCormack und Rabbitts 2004](#); [Le Bec und Douar 2006](#); [Daya und Berns 2008](#)). In den letzten Jahren sind bereits Zulassungen von gentherapeutischen Vektoren erfolgt, zum einen die Zulassung von Voretigen Neparvovec (Luxturna, Novartis), einem AAV-Serotyp 2-basierten Vektor zur Behandlung der Leber'schen hereditären kongenitalen Amaurose (LCA), einer zur Erblindung führenden Erkrankung des retinalen Pigmentepithels ([Darrow 2019](#)), wie auch die Zulassung von Zolgensma, einem AAV8-basierten Vektor zur Therapie der spinalen Muskelatrophie ([Urquhart 2019](#)).

1.3.2 Systematik/Einordnung der AAVs

AAV ist ein kleines (20 bis 25 nm Durchmesser), unbehülltes, einzelsträngiges (ss) DNS-Virus der Parvoviridae Familie ([Daya und Berns 2008](#); [K.I. Berns und C. Giraud 1996](#)). Innerhalb der Parvoviridae werden drei Unterfamilien, je nach deren Wirt beschrieben. Diese Unterfamilien umfassen die Densovirinae, die Hamaparvovirinae und Parvovirinae. Die Parvovirinae infizieren Wirbeltiere, Densovirinae Wirbellose Lebewesen, Hamaparvovirinae können hingegen beide Gruppen infizieren. Die Parvovirinae bilden 10 Genera, darunter das Erythroparvovirus und Dependovirus, zu der die Adeno-assoziierten Viren zählen ([Pénzes et al. 2020](#)). AAV-Kapside sind ikosaedrisch und bestehen aus den viralen Proteinen VP1, VP2, VP3 ([Daya und Berns 2008](#)). Die Durchseuchung mit AAV ist hoch, etwa 50% bis 90% der Population ist seropositiv ([Bucher et al. 2020](#); [Liu et al. 2014](#)). Bisher gibt es keinen eindeutigen Hinweis für eine Pathogenität ([Srivastava 2020](#); [Salmon et al. 2014](#)). Allerdings wurde deren Vorhandensein im

menschlichen Genitaltrakt nachgewiesen und mit Spontanaborten assoziiert (Tenenbaum et al. 2003). In der Gruppe der Parvovirinae wurde einzig das Parvovirus B-19, zum Genus der Erythroparvoviren zählend, bisher als humanpathogen beschrieben. Dieses kann bei einer Infektion im Kindesalter zum Krankheitsbild des Erythema infectiosum führen, bei einer Infektion während der Schwangerschaft einen Hydrops fetalis des ungeborenen Kindes verursachen, sowie zu Arthralgien und Arthritiden, zu chronischen Anämien bei immunsupprimierten Patienten und einer aplastischen Anämie bei Patienten mit Blutbildungsstörungen führen (Heegaard und Brown 2002).

1.3.3 AAV-Serotypen

Bisher wurden zwölf verschiedene AAV-Serotypen aus Menschen (AAV1 - AAV12) und über 100 aus anderen Spezies isoliert (Daya und Berns 2008). Diese zeichnen sich vor allem durch eine unterschiedliche Seroprävalenz als auch neutralisierende Antikörper, ihren Gewebetropismus und ihre Transduktionseffizienz aus (Verdera et al. 2020) (s. **Tabelle 1**).

AAV1 bis 4 und AAV6 wurden dabei als Kontaminationen von Adenoviruspräparationen entdeckt (Wu et al. 2006; ATCHISON et al. 1965). AAV5 wurde aus penilen humanen Kondylomen isoliert (Bantel-Schaal und zur Hausen 1984) und AAV6 entstand vermutlich durch Rekombination der Genome von AAV1 und AAV2, was aus Homologie zu diesen beiden Serotypen geschlossen wurde (Gao et al. 2005). AAV7 und AAV8 wurden aus Gewebe von Rhesusaffen mittels PCR isoliert (Gao et al. 2002). Generell sind AAVs weit verbreitet und wurden in verschiedensten menschlichen oder nichtmenschlichen Gewebetypen gefunden.

AAV2 wurde von allen Serotypen am besten charakterisiert und wird häufig als Vektor in der Gentherapie eingesetzt. Jedoch zeigen im Vergleich auch andere Serotypen ein hohes Transduktionspotential, die in der Transduktion bestimmter Gewebe sogar effizienter sind als AAV2 (Srivastava 2016; Gao et al. 2005; Asokan et al. 2012).

Tabelle 1: AAV Serotypen: Rezeptoren und Tropismus (Verdera et al. 2020)

Serotyp	Primär-Rezeptor	Tropismus
AAV1	N-glykosidisch-geb. Sialinsäure	Skelett Muskel, Lunge, ZNS, Retina, Pankreas
AAV2	HSPG	Glatter Muskel, Skelett Muskel, ZNS, Leber, Niere
AAV3	HSPG	Skelett Muskel, Inneres Ohr
AAV4	O-glykosidisch-geb. Sialinsäure	ZNS, Retina
AAV5	N-glykosidisch-geb. Sialinsäure	Skelett Muskel, Lunge, ZNS, Retina, Leber
AAV6	N-glykosidisch-geb. Sialinsäure	Skelett Muskel, Herz, Lunge, Knochenmark
AAV7	unbekannt	Skelett Muskel, ZNS, Retina
AAV8	unbekannt	Leber, Skelett Muskel, ZNS, Retina, Herz
AAV9	N-glykosidisch-geb. Sialinsäure	Leber, Herz, Gehirn, Skelett Muskel, Lunge, Pankreas, Niere
AAV10	unbekannt	Leber, Muskel

1.3.4 Tropismus von AAV2

AAV Typ 2 hat sich bei der Transduktion von Netzhautzellen, Neuronen, Skelettmuskeln, vasculären/glatten Muskelzellen und Hepatozyten als effizient erwiesen. Das Virus dockt über Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) an die Zielzellen an und nutzt Korezeptoren wie $\alpha 5$ -Integrin und den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-1 (FGFR-1) (Srivastava 2016; Verdera et al. 2020; Zengel und Carette 2020).

1.3.5 Struktureller und funktioneller Aufbau von AAV

AAV ist ein unbehülltes Parvovirus mit einem ikosaedrischen Kapsid (Durchmesser 25 nm), das eine einzelsträngige (ss) DNA enthält. Das virale Genom besteht aus zwei offenen Leserahmen, Rep und Cap, flankiert von zwei 145 Basenpaare umfassenden invertierten, terminalen Wiederholungen (inverted terminal repeats, ITR). Dessen Genom beinhaltet 4675 Nukleotide (K.I. Berns und C. Giraud 1996; Daya und Berns 2008; Srivastava et al. 1983). Die ersten 125 Nukleotide der ITR bilden eine palindromische Sequenz und werden als T-förmige Haarnadel bezeichnet. ITRs sind für die Replikation des Genoms relevant und daher in therapeutischen Vektoren konserviert (Wang et al. 2019; Daya und Berns 2008; Wilmott et al. 2019). In Wildtyp-AAVs fungieren die ITRs zusätzlich bei der Integration in das Genom der Wirtszelle und spielen eine Rolle bei der Freisetzung der Viren aus den infizierten Zellen (Wilmott et al. 2019; Berns 2020).

Die vier regulatorischen Proteine (Rep) werden durch den am 5'-Ende des Genoms liegenden offenen Leserahmen (ORF) kodiert und werden je nach ihrer jeweiligen Molekularmasse als Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40 bezeichnet. Rep78 und Rep68 sind für jede Phase des Lebenszyklus von AAV von Bedeutung (Daya und Berns 2008). Sie sind an der DNS-Replikation, Regulation der Genexpression (Zunahme/Abnahme) und der gezielten Integration beteiligt, zusätzlich besitzen sie Endonuklease-Aktivität (Daya und Berns 2008; K.I. Berns und C. Giraud 1996). Rep52 und Rep40 werden für die Akkumulation viraler DNS und den Zusammenbau des Virus benötigt (Daya und Berns 2008). Alle Rep-Proteine besitzen Helikase- und ATPase-Aktivität (Daya und Berns 2008; Collaco et al. 2003).

Der am 3'-Ende des Genoms liegende offene Leserahmen kodiert für die drei Kapsid-Proteine (Cap) VP1 (87kD), VP2 (72kD) und VP3 (62kD) (Daya und Berns 2008), die die Hülle des Virus bilden. Die Kapsidproteine bestimmen sowohl die Rezeptorbindung, also den Zelltropismus, als auch den Serotyp des Virus, da viele Antikörper gegen Kapsidproteine gerichtet sind. Es besteht die Möglichkeit, durch Aminosäure-Insertionen bestimmte Kapsidbereiche zu verändern und so Vektoren zu schaffen, die einen erhöhten Tropismus für bestimmte Zelltypen haben und/oder geringere Immunogenität zeigen (Huttner et al. 2003; Büning und Srivastava 2019).

Der primäre Rezeptor für AAV2 sowie weitere Serotypen (AAV3 und AAV6) ist Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG). Für AAV 1, 4, 5 und 6 ist Sialinsäure und für AAV9 N-Galaktose von besonderer Bedeutung für die Bindung an die Zielzellen. Korezeptoren für AAV2 sind sowohl der Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (c-MET), der humane Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-1 (hFGFR1), der Laminin Rezeptor und $\alpha\beta 5$ Integrin. Der Platelet-Derived Growth Factor-Rezeptor (PDGFR) fungiert als Korezeptor für AAV5 und der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) als Korezeptor für AAV6 (Zengel und Carette 2020).

Die Gene für Rep, die für die Replikation benötigt werden und Cap, die für Kapsidstrukturproteine kodieren, werden in therapeutischen Vektoren durch das jeweilige intakte Gen ersetzt, das in den Zielzellen exprimiert wird und das defekte Gen kompensieren soll (Lu 2004).

Das einzelsträngige DNS-Genom der Wildtyp-AAVs wird in den Zellen schneller eliminiert als eine Doppelstrang-DNS, daher hat man therapeutische Viren mit doppelsträngigem Genom konstruiert (selbst-komplementierende AAV (scAAV)), die allerdings aus Kapsid-Kapazitätsgründen nur die Hälfte des Genoms umfassen können. Solche scAAV können besser in der

Zelle persistieren und schneller repliziert und translatiert werden als ssAAV (McCarty et al. 2001).

1.3.6 Infektionszyklus

Eine Infektion durchläuft mehrere Stufen (s. **Abbildung 1**) und beginnt mit der Bindung des Virus an die Zelloberfläche, mit Hilfe der Primär- und Co- Rezeptoren. Das $\alpha V\beta 5$ -Integrin wird für die Endozytose sowie den intrazellulären Transport benötigt (Lu 2004; Zengel und Carette 2020). Nach der Endozytose wird das Virus durch Mikrofilamente und Mikrotubuli zum Zellkern transportiert. Bei Erniedrigung des endosomalen pH-Werts kann AAV aus dem Endosom entkommen und lagert sich dann perinukleär an (Büning et al. 2008). Obwohl AAV theoretisch klein genug ist, um als intaktes Teilchen die Kernporen zu passagieren, können für AAV2 nur vereinzelt Kapside, aber vermehrt virales Genom im Zellkern nachgewiesen werden. Möglich ist auch ein Kerntransport unabhängig des Kernporen-Komplexes (Büning et al. 2008; Daya und Berns 2008; Johnson und Samulski 2009).

In Anwesenheit eines Helfervirus kann die Replikation und die Freisetzung der Viren aus den infizierten Zellen starten (Büning et al. 2008; Flotte und Berns 2005). Sowohl Adenoviren als auch das Herpes simplex-Virus (HSV), das humane Herpes Virus Typ 6 (HHV6), das humane Papillom-Virus (HPV), das humane Zytomegalie-Virus (HCMV) und das Vakzinia-Virus können als Helferviren für AAV fungieren (Flotte und Berns 2005; Schlehofer et al. 1986).

Bei Abwesenheit eines Helfervirus erfolgt eine latente Infektion durch AAV2 und die, mit Hilfe von Rep68 und Rep78 stattfindende, Integration in das Zellgenom im Chromosom 19 (Daya und Berns 2008; Büning et al. 2008; Flotte und Berns 2005).

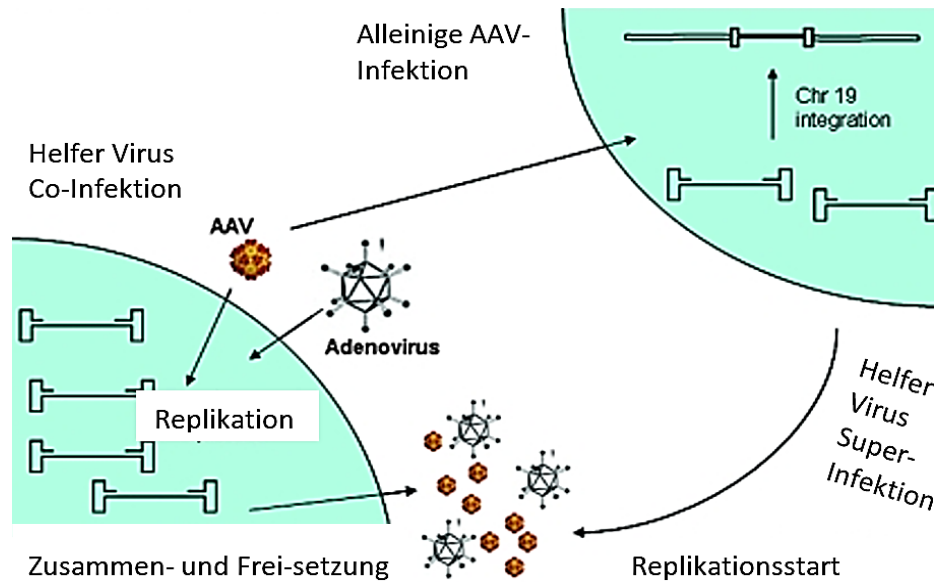


Abbildung 1: AAV-Lebenszyklus nach (Daya und Berns 2008)

In Gegenwart eines Helfervirus z.B. Adenovirus (Ko- oder Super-Infektion) findet die Genexpression, Replikation und Vermehrung als Teil einer aktiven Infektion, statt. In Abwesenheit integriert AAV in Chromosom 19 (Daya und Berns 2008).

1.4 Auge und Immunsystem

Das Auge ist ein immunprivilegiertes Organ, das über eine Vielzahl an anatomischen und immunologischen Mechanismen verfügt, um den Zugang nicht-aktivierter Zellen des Immunsystems und das Eindringen immunologisch aktiver Moleküle (z. B. Antikörper, Komplementfaktoren) in intraokulare Gewebe zu verhindern.

Dies betrifft insbesondere die Vorderkammer, die Glaskörperhöhle und den subretinalen Raum. Dieses Immunprivileg ist komplex und wird durch verschiedene Mechanismen aufrechterhalten. Beteiligt sind die äußere und innere Blut-Retina-Schranke, die Blut-Kammerwasserschranke und ein immunsuppressives Mikromilieu der Vorderkammer (ACAID) sowie des Glaskörpers (VCAID) (Cunha-Vaz et al. 2011; Sonoda et al. 2005; Shechter et al. 2013).

Trotz des Immunprivilegs werden eindringende Erreger wie Bakterien oder Viren auch im Auge abgewehrt. Eindringende Erreger werden von Zellen des angeborenen Immunsystems wie dendritische Zellen (DC), Monozyten/Makrophagen oder Granulozyten über sog. "Pattern Recognition Rezeptoren" (PRR) anhand bestimmter, erregertypischer Moleküle erkannt (Hensley und Amalfitano 2007). Dies hat primär eine Entzündungsreaktion und sekundär eine Aktivierung der erworbenen Immunantwort (B-, T-Zellen) zur Folge. Viruskapside können über Toll-like-Rezeptor 2 (TLR 2) auf der Oberfläche von Monozyten und DCs erkannt werden

(Oliveira-Nascimento et al. 2012). TLR 2 erkennen repetitive Protein-Untereinheiten, die auch auf viralen Kapsiden präsentiert werden (Shepardson et al. 2017).

RPE Zellen exprimieren PRRs wie TLR 1 – TLR 10 (Kumar et al. 2004; Detrick und Hooks 2010; Bucher et al. 2020), auch Mikroglia, Müller-Gliazellen, Photorezeptoren, Ganglienzellen und retinale Astrozyten sind an der Abwehr der Netzhaut beteiligt und exprimieren ebenfalls PRRs (Lin et al. 2013; Singh und Kumar 2015; Jiang et al. 2009). TLR 2 wird von Mikroglia, Müller-Zellen und retinalen Pigmentepithelzellen exprimiert, die somit Erreger im Auge erkennen und entsprechende Abwehrreaktionen induzieren können (Rodríguez-Martínez et al. 2005).

Auch auf Zellschädigung, etwa durch bakterielle Toxine, lytische Viren oder Traumata (hier z. B. nach Injektion therapeutischer Vektoren bei der okularen Gentherapie) reagiert das angeborene Immunsystem. Geschädigte Zellen exprimieren ein verändertes Muster von Oberflächenmolekülen (death-associated molecular pattern, DAMP), wodurch sie sich von gesunden Zellen unterscheiden (Roh und Sohn 2018).

Eine durch den AAV2-Vektor verursachte Entzündung tritt bei zirka 25 % bis 35 %, in manchen Studien sogar bei über 90 % der behandelten Patienten auf und präsentiert sich als Uveitis anterior mit mononuklearer Zellinfiltration, Vitritis oder Chorioretinitis (Chan et al. 2021; Bucher et al. 2020; Tummala et al. 2021; Newman et al. 2021).

Die Abwehrmechanismen des erworbenen (adaptiven) Immunsystems umfassen die von B-Zellen produzierten Antikörper, zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und die T-Helfer-Zell-Antworten, die sowohl die B-Zellen als auch die CTL in ihrer Funktion unterstützen. AV Vektoren können sowohl eine zytotoxische als auch humorale Immunantwort hervorrufen (Abbas et al. 2016).

Neutralisierende Antikörper binden die therapeutischen Vektoren so, dass eine Rezeptorbindung an der Zielzelle, ein Entkommen der Viren aus den Endosomen oder das "uncoating", die intrazelluläre Entfernung des Kapsids und somit die Freisetzung des viralen Genoms, verhindert wird (Smith 2001). Neutralisierende Antikörper können somit die Effizienz einer Gentherapie massiv reduzieren. Dies gilt vor allem für systemische Gentherapien. Im immunprivilegierten Auge verhindern normalerweise die Blut-Augen-Schranken den Eintritt von Antikörpern aus dem Serum, somit würden bei der okularen Gentherapie neutralisierende Antikörper keine besondere Rolle spielen. Da aber durch den Gendefekt eine Schädigung retinaler Zellen verursacht wird, aus der auch eine Schrankenstörung resultieren könnte, kann ein negativer

Effekt neutralisierender Antikörper auch bei okularer Gentherapie nicht ganz ausgeschlossen werden. Generell ist die Durchseuchung mit AAV in der Bevölkerung sehr hoch. Bis zu 90% der Bevölkerung sind seropositiv für AAV2, wobei es regionale Unterschiede gibt. Diese Prävalenz betrifft die gesamte Antikörperantwort, lässt allerdings keine Rückschlüsse auf die Neutralisationskapazität zu (Moskalenko et al. 2000).

Durch zytotoxische T-Zellantworten, welche gegen transduzierte Zellen gerichtet sind, können transduzierte Zellen geschädigt werden und dadurch der Erfolg der Gentherapie reduziert werden, oder es kann zu fatalen Nebenwirkungen kommen, wie beispielsweise dem Tod von drei Kindern durch Lebertoxizität und systemischer Sepsis nach Gentherapie für Myotubuläre Myopathie (Shieh et al. 2020).

Um solchen negativen Effekten durch unerwünschte Immunreaktionen vorzubeugen, wird inzwischen eine systemische Steroidtherapie vor und nach der Behandlung durchgeführt (Bucher et al. 2020; Büning und Srivastava 2019; Verdera et al. 2020; Bouquet et al. 2019; Chan et al. 2021).

1.4.1 Okulare Immunreaktionen auf gentherapeutische Vektoren

Nachdem die oben erwähnten retinalen Zellen über ihre Oberflächen-PRR, vor allem TLR 2, die therapeutischen Vektoren erkannt haben, werden auch intrazelluläre PRR wie TLR 9, RIG-I, cGAS, STING und Trim-21 hochreguliert, welche virale DNS erkennen (Bucher et al. 2020; Hensley und Amalfitano 2007; Kumar et al. 2004; Detrick und Hooks 2010; Lin et al. 2013; Singh und Kumar 2015; Jiang et al. 2009; Hareendran et al. 2013; Hösel et al. 2012; Mingozi und Büning 2015). Dies führt zur Induktion und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie Interleukin(IL-1)- α/β , IL-6, IL-8, Interferon (IFN) Typ I, IFN- γ , Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α und CXC-Motiv Chemokin 10 (CXCL10) (Hösel et al. 2012; Rogers et al. 2011; McPhee et al. 2006; Chandler et al. 2019; Zhu et al. 2009). Es kommt zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Augen-Schranken und zur Rekrutierung von Immunzellen, vor allem von Makrophagen und Neutrophilen in die Netzhaut (Chandler et al. 2019; Reichel et al. 2017). Parallel zur Induktion der angeborenen Immunantwort wird auch eine erworbene okulare Immunantwort aktiviert (Reichel et al. 2017). AAV Vektoren können sowohl eine zytotoxische als auch humorale Immunantwort hervorrufen. Dies kann ein bis mehrere Monate nach subretinaler beziehungsweise intravitrealer Gabe beobachtet werden (Chan et al. 2021; Bucher et al. 2020).

Nach einer okularen Applikation folgt die lymphozytäre Infiltration aller Netzhautschichten (Liu et al. 2020; Ramachandran et al. 2017; Reichel et al. 2017) mit CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ (oder CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺) T-Zellen, CD20⁺ B-Zellen und Plasmazellen (Boyd et al. 2016; Ertl 2021; Liu et al. 2020; Reichel et al. 2017).

Antigenpräsentierende Zellen der Retina u.a. RPE- (Kumar et al. 2004) und Mikroglia-Zellen (Okunuki et al. 2019) aktivieren CD4⁺ T-Helfer-Zellen über MHC-II-Präsentation von Virus-kapsid- und/oder Peptiden des therapeutischen Wildtyp-Proteins, das dem Immunsystem des Patienten zumindest partiell unbekannt ist (Reichel et al. 2017; Kumar et al. 2004). CD8⁺ Zytotoxische T-Zellen dagegen, erkennen virale (hier: Kapsid-) Peptide oder auch Peptide des Wildtyp-Proteins, präsentiert auf MHC-I. Plasmazellen produzieren lokal Antikörper (Bucher et al. 2020).

CD4⁺ T-Helferzellen spielen durch die Bereitstellung kostimulatorischer Signale und Zytokine bei der Aktivierung von CD8⁺ Zellen eine zentrale Rolle (Ertl 2021; Luckheeram et al. 2012). Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen sind in der Lage, virusinfizierte oder vektortransduzierte Zellen durch direkte Lyse mittels Perforin und Granzym zu zerstören, zusätzlich werden antivirale Zytokine wie Interferon (IFN)- γ sezerniert (Ertl 2021; Li et al. 2007). Zytotoxische T-Zellen können sowohl transgenspezifisch als auch kapsidspezifisch (Boyd et al. 2016) sein.

Eine erworbene Immunantwort kann vor allem bei intravitrealer Gentherapie ausgelöst werden. Beobachtet wird diese auch bei zuvor seronegativen Patienten, da AAV-Vektoren nach Applikation durch den Schlemm-Kanal in das Blut entweichen können und eine systemische Immunaktivierung induzieren (Chan et al. 2021; Bucher et al. 2020; Ross und Ofri 2021). Dies ist dosisabhängig und könnte durch eine Applikation geringerer Vektormengen und/oder erhöhten Tropismus der Vektoren für die jeweiligen Zielzellen reduziert oder sogar verhindert werden.

Die Intensität und Häufigkeit einer Immunantwort nach okulärer Gentherapie ist sowohl abhängig von der Dosis als auch von der Art der Applikation (intravitreal > subretinal) (Bucher et al. 2020; Verdera et al. 2020).

1.4.1.1 Applikationsart

Für die okuläre Gentherapie werden die Vektoren je nach Lage der retinalen Zielzellen entweder intravitreal oder subretinal injiziert. Insbesondere die intravitreale Gabe zur Transduktion von Ganglienzellen verursacht häufig eine intraokulare Entzündung (Uveitis), sowohl in

behandelten als auch in unbehandelten Partneraugen, trotz des Immunprivilegs (Li et al. 2008; Chan et al. 2021). Bei intravitrealer Gabe können die AAV-Vektoren über den Glaskörper in das Kammerwasser der vorderen Augenkammer und dann durch den Schlemm-Kanal in das Blut entweichen und zu einer Induktion des adaptiven Immunsystems mit einem Anstieg neutralisierender Antikörper im Serum und beider Augen führen sowie einer T-Zell-Antwort (Bucher et al. 2020). Im Gegensatz dazu ist die subretinale Gabe mit einer schwachen intraokularen Entzündung assoziiert (Chan et al. 2021), erhöht jedoch das Risiko einer unkontrollierten Netzhautablösung oder Blutung (Ramachandran et al. 2017). Die Applikationsart beeinflusst auch die Gentherapie des zweiten Auges. So können durch intravitreale Therapie induzierte neutralisierende Antikörper die Transgenexpression nach intravitrealer Injektion, nicht jedoch nach subretinaler Injektion von AAV, beeinträchtigen (Kotterman et al. 2015; Li et al. 2008).

1.4.1.2 Vektordosis

Angeborene und erworbene Immunantworten auf AAV sind dosisabhängig. Vor allem Dosen von mehr als 1×10^{11} Vektorgenomen (vg)/Auge induzieren okuläre Immunreaktionen (Ramachandran et al. 2017). Auch das Verhältnis von Vektor DNS und Kapsidmenge der Chargen, etwa wenn die Präparationen Kapsidfragmente enthalten oder Kapside nur zum Teil ein Genom enthalten und für eine effiziente Transduktion entsprechend höhere Kapsiddosen verabreicht werden müssen, hat einen Einfluss auf die Transduktion und Induktion von Entzündung (Timmers et al. 2020).

1.4.1.3 Promotoren

Promotoren wie der Cytomegalovirus immediate-early promoter (CMV), der humane Ubiquitin C-Promotor (UbiC), der Chicken beta actin promoter (CAG) und der RPE-spezifische Promotor des Bestrophin 1 -Gens können zu retinaler Toxizität und Mikroglia-Aktivierung führen. AAV-Vektoren mit den Photorezeptor-spezifischen Promotoren wie Human Rhodopsin (Rho), Human Rhodopsin-Kinase (RK) und Mouse Cone Arrestin (CAR), human Red Opsin (RedO) induzieren bisher keine Toxizität (Xiong et al. 2019).

1.4.1.4 Transgene

Das Transgenprodukt, also das therapeutische Protein, kann ebenfalls zu Netzhauttoxizität und einer Entzündung führen. Schädlicher sind dabei Proteine, die normalerweise nicht in der Netzhaut produziert werden, wie das Markerprotein Green Fluorescent Protein (GFP), was

aber nur in präklinischen Studien eingesetzt wird ([Herzog 2019](#); [Martino und Markusic 2020](#); [Bucher et al. 2020](#)).

1.4.1.5 Andere Faktoren

Die durch die Gentherapie induzierte Toxizität führt zusätzlich zu einem Verlust der Zielzellen. Die Infektion der Zelle wirkt toxisch, indem das endoplasmatische Retikulum mit entfalteten oder falsch gefalteten Proteinen überladen wird. Folglich kommt es zur Aggregation und Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen intra- oder extra- zellulär ([Bucher et al. 2020](#)).

1.4.2 Strategien zur Unterdrückung einer AAV-induzierten Immunantwort

Um intraokulare Entzündungen nach Gentherapie zu vermeiden, wird versucht, weniger immunogene Vektoren zu entwickeln, was chemische und genetische Modifikationen von Kapsiden umfasst. Diese Vektoren sollen der Immunantwort des Wirts entgehen und gleichzeitig den Gewebetropismus und die Transduktionseffizienz verbessern ([Büning et al. 2015](#); [Büning und Srivastava 2019](#); [Chan et al. 2021](#); [Hareendran et al. 2013](#); [Mével et al. 2020](#); [Pavlou et al. 2021](#)). Solche Mutationen könnten bei AAV-Vektoren eine Resistenz gegen neutralisierende Antikörperbindung und verringerte T-Zellerkennung im Vergleich zu Wildtyp-Vektoren aufweisen ([Huttner et al. 2003](#); [Hareendran et al. 2013](#)).

Mit dem Ziel, den zellulären Tropismus im Auge zu verbessern und eine intravitreale Gabe, statt der sonst erforderlichen subretinalen Applikation, mit dem Risiko der Induktion einer Netzhautablösung, zu ermöglichen, wurde das AAV2-Kapsid gentechnisch modifiziert (s. **Abbildung 2**). Bei einer der drei variablen Regionen des AAV-Kapsids (VR-V3) wurden zwischen den Aminosäurepositionen N (Asparagin)587 und R (Arginin)588 des AAV-2 WT kurze Peptidsequenzen eingefügt. Die VR-V3-Region ist die Heparin-Bindungsstelle des Virus, die die Transduktion jeglicher Zellen ermöglicht. Die neuen Kapsidvarianten haben im Unterschied zum WT Insertionen von je 12-Aminosäuren, eine Kernsequenz von jeweils 7 Aminosäuren, flankiert von 3 Alaninen N-terminal und 2 Alaninen am C-Terminus an Position I-587 (zwischen N587 und R588) des AAV2- Kapsids. Insertionen an Aminosäureposition I-587 separieren die Arginine an Aminosäurepositionen R585 und R588, die beiden wichtigen Hauptreste des Heparansulfat-Proteoglykan-Bindungsmotivs, das für die Zellanheftung notwendig ist.

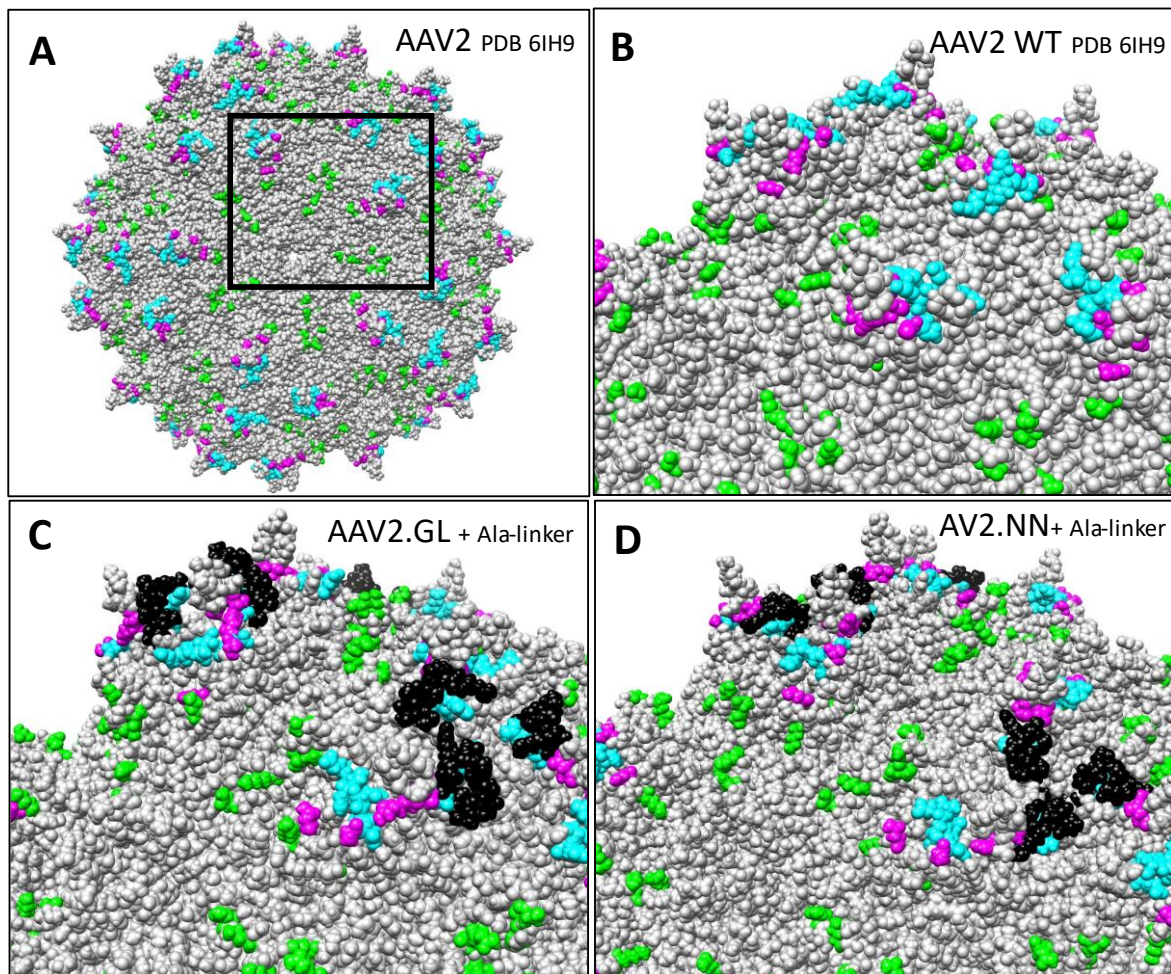


Abbildung 2: Modellierung der Kapsidepitope von AAV2.WT und der Varianten AAV2.GL und AAV2.NN

A, B) AAV2.WT Epitope der monoklonalen Antikörper A20 (grün) und C37-B (cyan) sowie weitere Epitope für neutralisierende Antikörper von Mensch und Kaninchen (magenta) sind markiert. **B - D):** Ausschnittvergrößerungen der Epitope auf der Oberfläche des AAV2-Kapsids. **C)** AAV2.GL und **D)** AAV2.NN unterscheiden sich von AAV2.WT durch Peptidinsertionen an 1-587 (schwarz). Einige Epitope des WT-Kapsids werden von den Insertionen verdeckt und könnten so die Bindung neutralisierender Antikörper behindern. Diese 3D-Modelle wurden mit dem RoseTTAfold deep learning algorithm (Baek et al. 2021) von Jacqueline Bogedein entwickelt (<https://rosetta.bakerlab.org/>) und mit der UCSF Chimera software visualisiert (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (Gehrke et al. 2022).

Die beiden Vektorvarianten haben entsprechend der veränderten Aminosäuresequenz die Bezeichnungen rAAV2NN.CMV.eGFP (AAV2.NN, Insertion NNPTSR) und rAAV2GL.CMV.eGFP (AAV2.GL, Insertion GLSPPTR), im Folgenden AAV2.GL und AAV2.NN genannt.

Mit diesen Mutanten wurde ein verbesserter Tropismus für bestimmte Photorezeptorzellen erzielt, Variante AAV2.GL transduziert effizient Photorezeptor-Zapfen und AAV2.NN

transduziert hauptsächlich Stäbchen, sogar bei intravitrealer statt subretinaler Injektion (Pavlou et al. 2021; Verdera et al. 2020; Tseng und Agbandje-McKenna 2014).

Um die virale Transduktion in den Zielzellen nachverfolgen zu können, enthalten die hier untersuchten AA-Viren ein Gen für das fluoreszierende Protein GFP (Pavlou et al. 2021). Durch die Nähe der Modifikationen zum Heparansulfat-Proteoglykan-(HSPG) Rezeptor wurde eine verringerte Bindung neutralisierender Antikörper erhofft (Tseng und Agbandje-McKenna 2014; Pavlou et al. 2021).

1.5 Weitere Herausforderungen

Neben der Immunogenität gilt es einige weitere Probleme zu lösen. Zum einen ist AAV ein sehr kleines Virus und kann lediglich Gene bis zu 4,8 kB (Kilobasen) transportieren (Colella et al. 2018), andererseits ist zwar der Tropismus von AAV sehr breit, jedoch auch wenig spezifisch. Diese Probleme sind jedoch nicht unüberwindbar. Mittlerweile wird an Ansätzen geforscht, auch große Gene mit AAV zu transportieren (Colella et al. 2018). Durch Modifikation des Kapsids kann der Tropismus von AAV verändert und somit zellspezifischer werden (Pavlou et al. 2021; Colella et al. 2018; Huttner et al. 2003). Weiterhin bleibt jedoch die Frage, ob nach einmaliger Gentherapie eines Auges bereits eine Immunität gegen den Vektor induziert wird und so ein eventueller Vorteil der Mutanten bei wiederholter Gentherapie zunichte gemacht wird.

1.6 AAV2-Kapside als Träger für Impfantigene

Da sich AAV-Kapside auch ohne Vektorgenom zusammenfügen und außerdem leicht gentechnisch modifizieren lassen, könnte man "leere" AAV-Kapside als Träger neuer antigener Epitope generieren und als Proteinimpfstoff verwenden (Nieto und Salvetti 2014). In diesem Fall wäre eine erhöhte Immunogenität wünschenswert.

Das Schwere-akute-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2 (SARS-CoV-2) ist eine neue, hochpathogene Variante aus der Familie der Coronaviren, welches erstmals Anfang Dezember 2019 in Wuhan, China entdeckt wurde und innerhalb kurzer Zeit eine weltweite Pandemie von Covid (Coronavirus-induced disease) induzierte. Die Verbreitung der Viren erfolgt über Aerosole oder durch Oberflächenkontakt. Das SARS-CoV-2 gehört zur Familie der Coronaviridae, einer Familie von umhüllten RNA-Viren (s. **Abbildung 3**).

Das Spike-Glykoprotein, auf der Oberfläche des Coronavirus fungiert als Ligand für den Rezeptor des Angiotensin-Converting-Enzyms-2, ein auf vielen Zellen exprimiertes Oberflächenprotein (Pedersen und Ho 2020). Das Spike Protein besteht aus einer N-terminalen S1-Untereinheit und einer C-terminalen S2-Untereinheit (Guruprasad 2021).

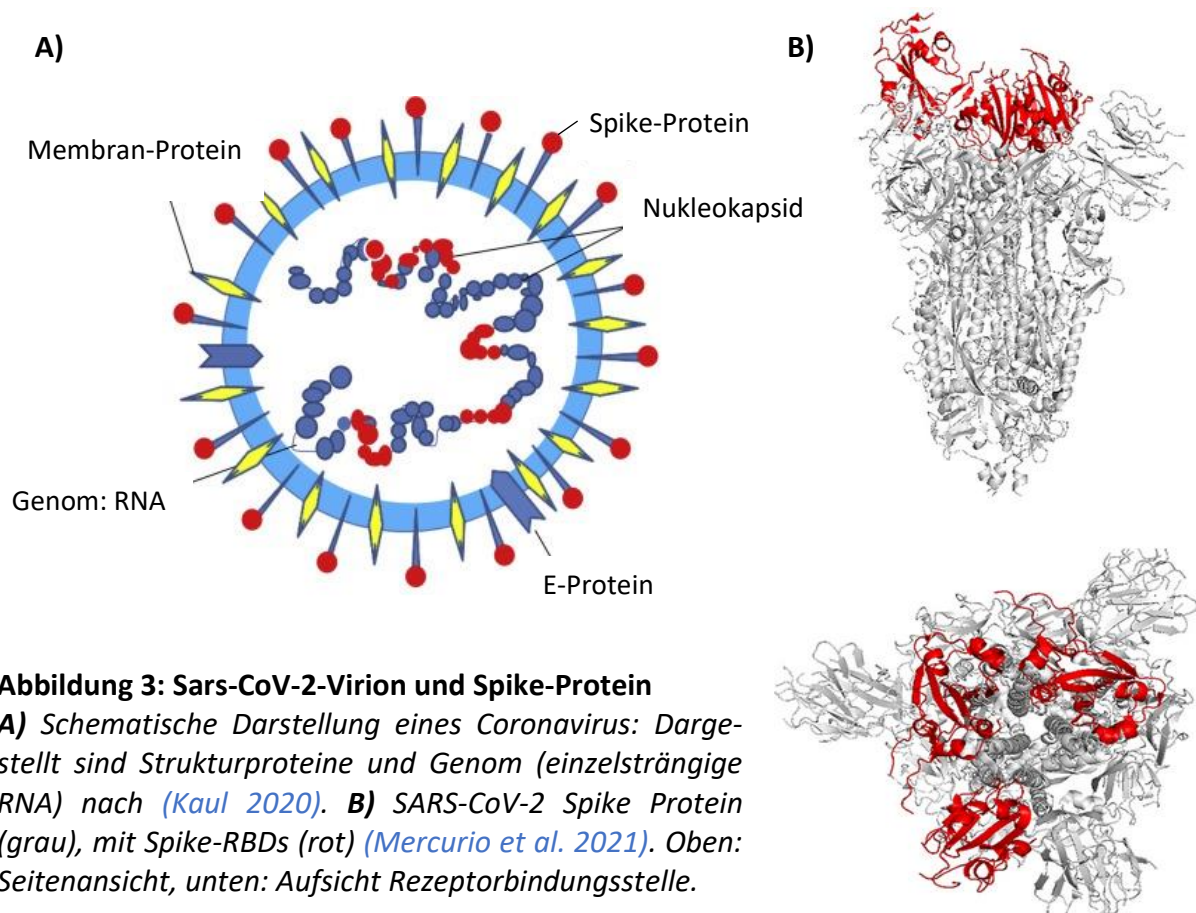


Abbildung 3: Sars-CoV-2-Virion und Spike-Protein

A) Schematische Darstellung eines Coronavirus: Dargestellt sind Strukturproteine und Genom (einzelnsträngige RNA) nach (Kaul 2020). **B)** SARS-CoV-2 Spike Protein (grau), mit Spike-RBDs (rot) (Mercurio et al. 2021). Oben: Seitenansicht, unten: Aufsicht Rezeptorbindungsstelle.

Die Arbeitsgruppe von Prof. S. Michalak (Sabrina Babutzka, Augenklinik, Klinikum der LMU München) hat zwei AAV2-Kapsidvarianten konstruiert, die überlappende Bereiche der Rezeptorbindungsdomäne (RBD) des SARS-CoV-2-Spikeproteins ebenfalls zwischen N587 und R588 des VP1 exprimieren (HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2). Mit einer Länge der Insertionen von 197 (HtW2_S1.1) und 206 Aminosäuren (HtW2_S1.2) werden je 60 dieser RBD-Epitope pro AAV2-Kapsid exprimiert. Um die Integrität des AAV2-Kapsids zu erhalten, ist es nicht möglich, das komplette Spike-Protein oder die gesamte Rezeptorbindungsregion in das AAV2-Kapsid zu integrieren (J. Bogedien et al., Manuskript in Vorbereitung).

Die exprimierten Epitope des Spike Proteins enthalten Peptide, die von verschiedenen MHC-Molekülen präsentiert werden können und somit potenzielle T-Zell-Epitope darstellen als

auch gut geeignet sind eine Antikörperantwort zu induzieren. Schließlich wurden diese Peptide gewählt, da sie einerseits viele potentielle T-Zell-Epitope enthalten und andererseits neutralisierende Antikörper induzieren könnten, die das Andocken von SARS-CoV2 an den ACE-Rezeptor blockieren. Zur Immunisierung sollen nukleinsäurefreie Kapside als reiner proteinbasierter Antigenimpfstoff verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zellulären Immunantworten von Blutspendern vor und nach der ersten sowie der zweiten Impfung mit dem anti-SARS-CoV2-RNA-Impfstoff Comirnaty (Biontech/Pfizer) untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Humane Blutproben

Die 24 Serum- beziehungsweise Plasmaproben wurden im Zeitraum von 1997 bis 2019 an der Augenklinik der LMU München gesammelt (s. **Tabelle 2**). Das Alter der Spender zum Zeitpunkt der Abnahme lag zwischen 11 und 61 Jahren (Durchschnitt: 41 Jahre). Ein Ethikvotum der Ethikkommission der LMU (Nr. 227/03) (Frau Prof. Dr. Gerhild Wildner, AG Immunbiologie, Augenklinik München) lag vor. Alle Probanden wurden jeweils über die Risiken sowie den Zweck der Blutentnahme aufgeklärt.

Tabelle 2: Blutspendekollektiv mit Auflistung der spenderspezifischen Besonderheiten

Nr.	Proband	Geschlecht	Alter bei Abnahme	Art der Probe
1.	C1	männlich	31	Plasma, PBMCs
2.	HH	weiblich	50	Serum
3.	H1	weiblich	60	Serum, Plasma, PBMCs
4.	H2	weiblich	41	Serum, Plasma, PBMCs
5.	H3	männlich	43	Plasma, PBMCs
6.	H4	weiblich	28	Plasma, PBMCs
7.	H5	weiblich	60	Plasma, PBMCs
8.	H6	männlich	45	Serum, Plasma, PBMCs
9.	H7	männlich	60	Serum, Plasma, PBMCs
10.	HP	männl. Serumpool	ca. 24	Serum
11.	N1	weiblich	58	Serum
12.	N2	männlich	57	Serum
13.	N3	weiblich	49	Serum
14.	N4	weiblich	61	Serum
15.	U1	männlich	36	Serum
16.	U11	männlich	47	Serum
17.	U13	männlich	37	Serum
18.	U34	männlich	27	Serum
19.	U43	weiblich	30	Serum
20.	U45	weiblich	29	Serum
21.	U49	männlich	33	Serum
22.	U51	männlich	25	Serum
23.	U73	weiblich	11	Plasma
24.	U100	männlich	44	Serum
25.	U103	weiblich	21	Serum

Zur Gewinnung von Serum, wurde Vollblut aus der Armvene mit Monovetten von Sarstedt entnommen und nach der Gerinnung bei 2000 g für 10 min zentrifugiert. Lymphozyten und Plasma wurden aus 20-30 ml heparinisiertem Blut gewonnen, zur Plasmagewinnung für 15 min bei 1500 g zentrifugiert, der Plasma-Überstand abgenommen und aus der unteren Phase die Lymphozyten separiert.

Serum- beziehungsweise Plasmaproben der Spender wurden in Aliquots von 1 ml bis 2 ml bei -20° C tiefgefroren aufbewahrt. Überstände der stimulierten Lymphozytenkulturen wurden bei -80° C gelagert.

2.2 AAV2-Vektoren

Die in **Tabelle 3** und **Tabelle 4** aufgelisteten AAV-Mutanten (Kapsidmutanten) wurden von Herrn Prof. Dr. Stylianos Michalakis (Augenklinik und Poliklinik, Genetik und Gentherapie, LMU Klinikum, München) in Kollaboration mit Frau Prof. Dr. Hildegard Büning (Labor für Infektionsbiologie & Gentransfer, Institut für Experimentelle Hämatologie, MHH, Hannover) entwickelt und für dieses Projekt bereitgestellt. Die gentechnisch modifizierten Kapsidvarianten tragen entsprechend der veränderten Aminosäuresequenz die Bezeichnung rAAV2NN.CMV.eGFP (GFP.**NN**) und rAAV2NN.CMV.eGFP (GFP.**GL**). Um die Transduktion durch die Vektoren experimentell nachweisen zu können, kodieren die Vektoren für die fluoreszierenden Proteine enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) oder E2-Crimson unter CMV-Promotor-Kontrolle. Bei den AAV-Präparationen wurden primär nur die Genomäquivalente über PCR bestimmt. Da für die immunologischen Assays jedoch die Protein- bzw. Kapsidkonzentration entscheidend war, wurden alle AAV-Präparationen vor der Verwendung mit einem kommerziellen ELISA-Kit (AAV2 Titration ELISA/Progen) auf den Gehalt von AAV2-Kapsiden quantifiziert. Die Vektoren wurden nach der Verdünnung aliquotiert und bei -80° gelagert.

2.2.1 Rekombinante AAV-Vektoren für die okuläre Gentherapie

Tabelle 3: Verwendete Kapsid-Mutanten

Eingefügte Sequenz	Position	Bezeichnung des Vektors
AA NN PTPSRAA	N587	rAAV2 NN .CMV.eGFP
AA GL SPPTRAA	N587	rAAV2 GL .CMV.eGFP und rAAV2 GL .CMV.scCrimson

2.2.2 AAV2-Impfstoff Vektoren mit SARS-CoV2-Spikeprotein-Insertion (HtW2_S1.1/ HtW2_S1.2)

Mit dem Ziel, von AAV-abgeleitete Proteinimpfstoffe gegen SARS-CoV2 zu entwickeln, wurde das Kapsid von AAV2 mit den Mutationen HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2 an gleicher Position wie die bereits beschriebenen Mutanten AAV2.GL/AAV2.NN modifiziert. Auch HtW2 exprimiert Insertionen in seinem Kapsidprotein zwischen Aminosäureposition N587 und R588. HtW2_S1.1 197 Aminosäuren (AS 333-529) der Rezeptor-Bindestelle (RBD) des Spike Proteins von SARS-CoV2, die Variante HtW2_S1.2 206 Aminosäuren (AS 300-505) des SARS-CoV2-RBD. Die Kapside sind auch ohne Genom stabil und sollen als leere Kapside zur Impfung verwendet werden. Hier wurden aber Kapside mit Genom untersucht, das wie oben beschrieben, für eGFP kodiert.

Tabelle 4: Vektorpräparationen

Nr.	Bezeichnung des Herstellers	Kodiert für	DNS	Kapsidtyp	Charge	Titer (vg/μl)
1.	scCrimson	Crimson	sc	AAV2.GL	VP 03/17	–
2.	GFP/GL nd	eGFP	sc	AAV2.GL	VP 67/18	1,76 x 10 ⁸
3.	GFP/NN Fr. 2 nd	eGFP	sc	AAV2.NN	VP 68/18	2,46 x 10 ⁹
4.	GFP/AAV2 WT ssOva	eGFP	ss	AAV2 WT	V-AF10/17 2	5,70 x 10 ⁸
5.	pAAV_sc-CMV_eGFP	eGFP	sc	AAV2.GL	51/18	2,48 x 10 ⁹
6.	pAAV_sc-CMV_eGFP	eGFP	sc	AAV2.NN	50/18	2,75 x 10 ⁹
7.	pAAV_sc-CMV_eGFP	eGFP	sc	AAV2 WT	05/19	9,98 x 10 ⁹
8.	pAAV2.1_sc-CMV_eGFP	eGFP	sc	AAV2.GL	25/20	4,00 x 10 ⁹
9.	pAAV2.1_sc-CMV_eGFP	eGFP	sc	AAV2.NN	26/20	8,00 x 10 ⁹
10.	pAAV2.1_sc-CMV_eGFP	eGFP	sc	HtW2_S1.1	70/20	9,90 x 10 ⁷
11.	pAAV2.1_sc-CMV_eGFP	eGFP	sc	AAV2 WT	69/20	3,50 x 10 ¹⁰
12.	kein Genom	–	–	AAV2 WT	54/20	0
13.	pAAV2.1_sc-CMV_eGFP	eGFP	sc	HtW2_S1.2	74/20; 82/20	1,5x10 ¹⁰

2.3 Allgemeine Materialien

Tabelle 5: Steriles Einmalmaterial

Bezeichnung	Volumen	Firma	Firmensitz
Einmalpipetten	10, 5, 2, 1 ml	Corning/Costar	USA-Corning
Flachboden Platten CELLSTAR® 12 Kavitäten	6,5 ml/Kavität	Greiner	AT-Kremsmünster
Flachboden Platten, 24 Kavitäten	3,29 ml/Kavität	TPP	CH-Trasadingen

Fortsetzung Tabelle 5 siehe nächste Seite

Flachboden Platten, 96 Kavitäten	340 µl/Kavität	TPP	CH-Trasadingen
Flachboden Platten, 96 Kavitäten Nunc MaxiSorp™	400 µl/Kavität	ThermoFisher	USA-Waltham
Glasröhrchen, Rundboden, Falcon™	5 ml	Corning/Costar	USA-Corning
Multifly®-Kanüle 21G		Sarstedt AG	D-Nümbrecht
Objektträger, Menzel-Gläser		ThermoFisher	USA-Waltham
Reaktionsgefäße	1,5/2,0 ml	Eppendorf	D-Hamburg
Rundboden Platten, 96 Kavitäten	300µl/Kavität	Sigma/Merck	USA-St. Louis/D-Darmstadt
Rundboden Platten, 96 Kavitäten	310 µl/Kavität	TPP	CH-Trasadingen
Rundbodenröhrchen Falcon™	5 ml	Corning	USA-Corning
Serum-Gel Monovette		Sarstedt AG	D-Nümbrecht
Spritzen	50 ml	B. Braun	D-Melsungen
Zellkulturflasche, 2µm Lüftungskappe	75cm ²	Corning	USA-Corning
Zellschaber		TPP	CH-Trasadingen
Zentrifugenröhrchen, Konisch Falcon™	15 ml	Corning	USA-Corning
Zentrifugenröhrchen, Konisch Falcon™	50 ml	Corning	USA-Corning

Tabelle 6: Laborgeräte

Bezeichnung	Pipettiervolumen	Firma	Firmensitz
Bioplex 3D Lesegerät		BIO-RAD	USA-Hercules
Dispenser Modell 8100		Nichiryo	JP-Tokyo
FACScalibur		BD	D-Heidelberg
Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACScan), CytoFlex S		Beckman Coulter GmbH	D-Krefeld
Inkubator		Heraeus	D-Hanau
Mehrkanal Pipette	25µl – 200 µl	SLG, CAPP	D-Nordhausen
Mikropipette Discovery Comfort (DV 200)	20 – 200 µl	Laboratoires Humeau	FR-La Chapelle-sur-Erdre
Mikropipette Discovery Comfort (DV1000)	250 – 1000 µl	Laboratoires Humeau	FR-La Chapelle-sur-Erdre
Mikropipette Discovery Comfort (DV20)	2 – 20 µl	Laboratoires Humeau	FR-La Chapelle-sur-Erdre
Mikropipette PIPETMAN Classic P10	1 – 10 µl	Gilson	D- Limburg
Mikroplatten-Photometer imark™		BIO-RAD	USA-Hercules
Mikroskop Invertoscope ID 03		Carl Zeiss AG	D-Oberkochen
Mikroskop und Bilder EVOS XL Core		ThermoFisher	USA-Waltham
Pipettierhilfe PIPETBOY acu 2		INTEGRA	D-Ratingen
Vortex-Schüttler MS2 mini		IKA	D-Staufen
Vortex-Schüttler VF2		IKA	D-Staufen
Wasserbad GFL 1083		GFL	D-Burgwedel
Zellzähler Countess II FL		ThermoFisher	USA-Waltham
Zentrifuge Heraeus labofuge-200		ThermoFisher	USA-Waltham
Zentrifuge Heraeus multifuge-1s-r		ThermoFisher	USA-Waltham

Tabelle 7: Reagenzien, Puffer und Medien

Bezeichnung	Firma	Firmensitz
Blocking Lösung	CANDOR	D-Wangen
Brefeldin A	Sigma/Merck	D-Darmstadt
Coating Puffer 10x, PBS-Basis, pH 7,4	CANDOR	D-Wangen
DMEM, Glukose (hoch), ohne Phenolrot	Sigma/Merck	D-Darmstadt
DMEM, Glukose (hoch), Phenolrot	Sigma/Merck	D-Darmstadt
DMEM, Glukose (niedrig), GlutaMAX™	Sigma/Merck	D-Darmstadt
DMSO (Dimethyl-Sulfoxid)	Sigma/Merck	D-Darmstadt
Dulbeccos Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma/Merck	D-Darmstadt
eBioscience Fixations/Permeabilisierungs-Diluent	Thermo Fisher	USA-Waltham
eBioscience Fixations/Permeabilisierungs-Konzentrat	Thermo Fisher	USA-Waltham
eBioscience Permeabilisierungs Wasch-Puffer	Thermo Fisher	USA-Waltham
FKS (Fötales Kälberserum) Superior	Sigma/Merck	D-Darmstadt
Hautdesinfektion OCTENIDERM	Schülke	D-Norderstedt
Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm	D-Ulm
HRP Protektor	CANDOR	D-Wangen
L-Asparagin, Stock 3,6 g /lL	Sigma/Merck	D-Darmstadt
L-Glutamin 200 mM	Sigma/Merck	D-Darmstadt
LowCross-Puffer	CANDOR	D-Wangen
Lymphozyten-Separationsmedien	Sigma/Merck oder BIORAD	D-Darmstadt
MEM Aminosäuren 50 x	Sigma/Merck	D-Darmstadt
MEM Nichtessentielle Aminosäuren 100 x	Sigma/Merck	D-Darmstadt
Natriumpyruvat 100 mM	PAN-Biotech	D-Aidenbach
Panexin CD	PAN-Biotech	D-Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma/Merck	D-Darmstadt
Penicillin (50 U)/Streptomycin (50 mg)	Sigma/Merck	D-Darmstadt
Poly-HRP Verdünnungspuffer	ThermoFisher	USA-Waltham
Poly-HRP-Streptavidin	ThermoFisher	USA-Waltham
Purified Protein Derivate (PPD) 10 µg/ml	Aventis	D-Marburg
TACS XTT Aktivator	R&D Systems	USA-Minneapolis
TACS XTT Reagenz	R&D Systems	USA-Minneapolis
Tetanus Toxoid (TT) 10 µg/ml	Aventis	D-Marburg
Tris Wasch-Puffer 10x	CANDOR	D-Wangen
Trypanblau	Sigma/Merck	D-Darmstadt
Trypsin-EDTA (0.05%)	ThermoFisher	USA-Waltham
Turbo TRMB-ELISA Substrat Lösung	ThermoFisher	USA-Waltham

Tabelle 8: Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Firma	Firmensitz
AAV2 Titration ELISA Kit	PROGEN	D-Heidelberg
AAV2 Titration ELISA 2.0R Kit	PROGEN	D-Heidelberg
Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel, 48-Plex	BIO-RAD	USA-Hercules

Tabelle 9: Antikörper für ELISA

Bezeichnung	Isotyp	Konzentration	Besonderheit
Maus anti-AAV2, A20, gereinigt	IgG3 (monoklonal)	50 µg/ml	
Ziege anti-Human	IgG, IgM, IgA (H+L)	1,4 mg/ml	Biotinyliert
Ziege anti-Maus	IgG (H+L)	1,5 mg/ml	Biotinyliert

Tabelle 10: Fluoreszenzmarkierte Antikörper (monoklonale Maus-anti-human-Antikörper) für Oberflächen/Intrazelluläre Färbung

Spezif.	Isotyp	Fluoreszenz	Klon	Konzentration*	Expression	Firma	Firmensitz
CD3	IgG2a/k	APC	OKT-3	0,05 mg/ml	T-Zellen, TCR-Komplex	Biolegend	USA-San Diego
CD4	IgG1/k	FITC	RPA-T4	0,4 mg/ml	Helferzellen	Biolegend	USA-San Diego
CD8a	IgG1/k	PE	RPA-T8	0,05 mg/ml	Killerzellen	Biolegend	USA-San Diego
CD11c	IgG1/k	PE	3.9	0,2 mg/ml	Dendritische Zellen	Biolegend	USA-San Diego
CD14	IgG1/k	PerCp/Cy5.5	63D3	0,4 mg/ml	Makrophagen	Biolegend	USA-San Diego
CD19	IgG1/k	PE	4G7	0,2 mg/ml	B-Zellen	Biolegend	USA-San Diego
CD56	IgG1/k	FITC	5.1H11	0,2 mg/ml	Natürliche Killer (NK) - Zellen	Biolegend	USA-San Diego
CD69	IgG1/k	PerCP/Cy5.5	FN50	0,2 mg/ml	Aktivierungsmarker	Biolegend	USA-San Diego
IFN-β	IgG1	FITC	MMHB-3	0,05 mg/ml	virusinfizierte Zellen	Biotechnie	USA-Minneapolis
IL-1β	IgG1	APC	8516	0,01 mg/ml	aktivierte Makrophagen	Antikörper online	DE-Aachen

Tabelle 11: Isotypkontrollen

Isotyp	Fluoreszenz	Klon	Konzentration*	Firma	Firmensitz
IgG1/κ	APC	MOPC-21	0,2 mg/ml	Biolegend	USA-San Diego
IgG2a/κ	APC	MOPC-173	0,2 mg/ml	Biolegend	USA-San Diego
IgG1/κ	FITC	MOPC-21	0,5 mg/ml	Biolegend	USA-San Diego
IgG1/κ	PE	MOPC-21	0,2 mg/ml	Biolegend	USA-San Diego
IgG1/κ	PerCP/Cy5.5	MOPC-21	0,2 mg/ml	Biolegend	USA-San Diego

*Konzentration der Antikörperstammlösung

Tabelle 12: Antikörpercocktails für Immunfluoreszenzfärbungen

Je Kavität (mit 50 µl Zellsuspension) wurden 50µl des Antikörpercocktails, bestehend aus je 2µl des Antikörpers (entspricht der jeweiligen Angabe des Herstellers) verdünnt mit 42µl PBS mit 1% FCS pipettiert.

Antikörpercocktail 1 (Oberflächenfärbung)	αCD3-APC (2µl/100µl)	αCD8-PE (2µl/100µl)	αCD4-FITC (2µl/100µl)	αCD69-PerCP/Cy5.5 (2µl/100µl)
Antikörpercocktail 2 (Oberflächenfärbung)	αCD3-APC (2µl/100µl)	αCD56-FITC (2µl/100µl)	αCD19-PE (2µl/100µl)	αCD69-PERCP/Cy5.5 (2µl/100µl)
Antikörpercocktail 3 (Oberflächen- und intrazelluläre Färbung)	αCD14-PerCP/Cy5.5 (2µl/100µl)	αCD11c-PE (2µl/100µl)	αIFN-β-FITC (0,3µl/100µl)	αIL-1β-APC (4µl/100µl)
Isotyp-Kontrollen (Oberflächen- und intrazelluläre Färbung)	mIgG1,kappa-FITC (1µl/100µl)	mIgG1,kappa-PE (1µl/100µl)	mIgG1,kappa-PerCP/Cy5.5 (1µl/100µl)	mIgG2a,kappa-APC (1µl/100µl)

α = anti

Tabelle 13: Software

Bezeichnung	Firma	Firmensitz
Bioplex Manager Software	BIO-RAD	USA-Hercules
FlowJo/BD	BD	USA-Ashland

2.4 Zusammensetzung verwendeter Kulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose wurde für die Lymphozytenkulturen und -stimulationen verwendet, das gleiche Medium ohne Phenolrot für die Durchführung des XTT-Assays. Um optimale Kulturbedingungen zu schaffen, ist das Medium mit den in **Tabelle 14** aufgelisteten Zusätzen versehen worden.

DMEM mit GlutaMAX™ Supplement wurde für die Kultivierung und Neutralisationsassays der HeLa-Zellen verwendet.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

a) Medium für PBMC-Stimulation
DMEM, 4500 mg/L Glukose, mit/ohne Phenolrot
4 mM L-Glutamin (Stock 200 mM)
1 U/ml Penicillin/1mg/ml Streptomycin
36 µg/ml L-Asparagin
2 % MEM AA (Stammlösung 50 X)
1 % MEM nichtessentielle Aminosäuren (Stammlösung 100 X)
1 mM Natriumpyruvat
5 % Panexin (Serumersatz) oder 5 % FKS bzw. Humanserum(pool)
b) Medium für HeLa-Zellen
DMEM, Glukose (niedrig), GlutaMAX™ Zusatz
1 U/ml Penicillin/1mg/ml Streptomycin
10 % FKS

2.5 Immunchemie

2.5.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

2.5.1.1 Kapsidmengenbestimmung

Die Bestimmung des Vektorgenomtitors mittels PCR wurde durch die AG Michalakis bzw. die AG Büning vorgenommen.

Die Kapsidkonzentrationen wurden mit Hilfe des AAV2 Titrations ELISA-Kits von PROGEN gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt. Bei diesem Assay handelt es sich um einen Sandwich-ELISA, wobei AAV2-spezifische monoklonale Antikörper auf den Boden der Platte ge-coatet sind (Platte wird bereits beschichtet und geblockt geliefert). Diese Antikörper erkennen auch die Kapsidvarianten (s. **Abbildung 4**). Die zu testenden Kapsidproben wurden in aufsteigenden Verdünnungen (Titration) auf die Platten gegeben. Die Bindung der Kapside wurde durch Zugabe eines ebenfalls AAV2-spezifischen, biotinylierten Antikörpers (100 µl/ Kavität), gefolgt von der Zugabe von Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppeltem Steptavidin (100 µl/ Kavität), (bindet an Biotin), und des entsprechenden Substrats (100 µl/ Kavität) der HRP

detektiert. Die enzymatische Farbumsetzung des Substrats durch die Peroxidase wurde nach einer Reaktionszeit von 15 min bei RT durch Schwefelsäure gestoppt.

Die optische Dichte (OD) der Substratlösung wurde mittels Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450nm bestimmt. Die Farbreaktion ist direkt proportional zur Antikörperbindung, die Menge der jeweiligen Kapsidpräparationen konnte über die Eichkurve des Teststandards bestimmt werden.

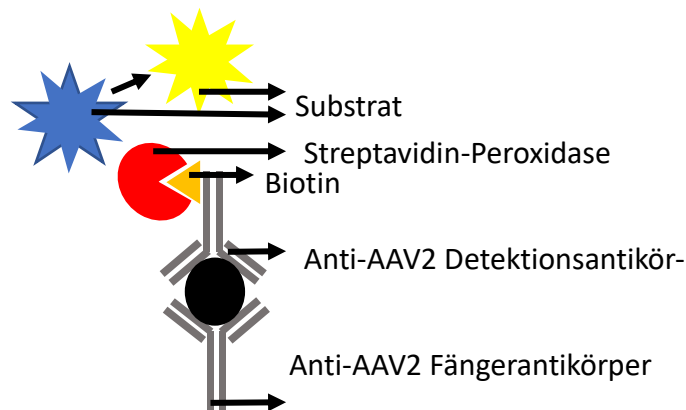


Abbildung 4: Prinzip des Sandwich-ELISAs

Das namensgebende „Sandwich“ entsteht durch einen an den Boden der Platte gebundenen, kapsidspezifischen und einem zweiten ebenfalls kapsidspezifischen, biotinylierten Detektionsantikörper, dazwischen wird das AAV2-Kapsid gebunden. Nach Zugabe von HRP-gekoppeltem Streptavidin und dessen Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers kann die Farbreaktion des Substrats erfolgen.

Die Kitkontrolle (KC, Standard), wurde gemäß Vorschrift in Schritten von 1:2 seriell verdünnt (1:2 bis 1:64). Die zu testenden Vektorchargen wurden anhand der Angaben über den Vektorgenomgehalt vorverdünnt (V1), unter der Annahme, dass die verschiedenen Präparationen ähnliche Füllungsverhältnisse mit Vektorgenom aufweisen. Je nach Chargen wurden unterschiedliche Vorverdünnungen V1 (s. **Tabelle 15**) eingesetzt. Dies war notwendig, um bei verschieden stark konzentrierten Präparationen im Bereich des Messbaren zu liegen und um vergleichbare optimale Titrationskurven, ähnlich der der Kitkontrolle, zu erhalten. Von Verdünnung V1 ausgehend wurden weitere Verdünnungsreihen von 1:2 bis 1:64 mit einer Mehrkanalpipette in einer 96 Well U-Boden Platte seriell vorbereitet und danach auf die Testplatte übertragen.

Über die bekannte Anzahl der Vektorgenome sowie der mittels ELISA-Kit bestimmten Kapsidmenge lässt sich die prozentuale Befüllung der Kapside mit Genom berechnen.

Tabelle 15: Verdünnung V1 der AAV Vektoren

Nr.	Charge	Verdünnung V1
8.	25/20 (AAV2.GL)	1: 2.000
10.	70/20 (HtWS_1.1)	1: 49,5
9.	26/20 (AAV2.NN)	1: 4.000
11., 12.	69/20 und 54/20 (AAV2.WT)	1: 17.500
7., 5., 6.	05/19 (AAV2.WT), 51/18 (AAV2.GL), 50/18 (AAV2.NN)	1: 7.000
4., 1., 2., 3.	V-AF10/17 2 (AAV2.WT), VP 03/17 (AAV2.GL), VP 67/18 (AAV2.GL), VP 68/18 (AAV2.NN)	1: 100

2.5.1.2 Bestimmung der optimalen Bedingungen für den indirekten ELISA zur Testung der AAV2-Seroprävalenz

Um die optimale Kapsidkonzentration für die ELISA-Plattenbeschichtung „Coat“ zu bestimmen, wurde zunächst nur der Vektor rAAV2GL.CMV.scCrimson (Charge: VP 03/17) in verschiedenen Konzentrationen getestet. Die Ausgangskonzentration des Vektors war eine Kapsidmenge von $2,74 \times 10^8 / \mu\text{l}$. Jede Kavität wurde mit einem Volumen von 100 μl bestückt. Als Primärantikörper wurde der gereinigte Maus-monoklonale anti-AAV2-Antikörper A20 verwendet, der garantiert an die Kapside der Plattenbeschichtung bindet und dessen Konzentration bekannt war. Zum Bindungsnachweis wurde ein Ziege-anti-Maus-Ig-spezifischer, biotinylierter Sekundärantikörper verwendet. Der hier verwendete Enzym-Substratkomplex wurde dann auch für die Testung der humanen Seren in gleicher Konzentration eingesetzt (s. **Abbildung 6**).

Verwendet wurde eine ELISA-Platte (Maxi Sorp von ThermoFisher aus Polystyren, mit flachem Boden und 96 Vertiefungen), die während aller Schritte mit einer 12 Kanal Pipette bestückt wurde. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen des Vektors „scCrimson“ C1) $7,9 \times 10^7$ Kapside/Vertiefung, C2) $3,95 \times 10^7$ Kapside/Vertiefung und C3) $1,98 \times 10^7$ Kapside/Vertiefung getestet (s. **Abbildung 5**). Dabei wurde der Vektor mit Coating Puffer (Candor) verdünnt und anschließend die Platte mit jeweils 100 μl /Vertiefung beschichtet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.

Um unspezifische Bindungen an der Platte zu verhindern, wurden verbliebene Bindungsstellen mit der auf Casein basierenden Blocklösung gesättigt. Hierfür wurden 200 μl je Kavität pipetiert und für 2- 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Blocken wurden verbliebene Reste der Kapsidbeschichtung und der Blocklösung durch "Waschen" entfernt: jede Vertiefung

wurde mit 200 µl Waschpuffer von Candor befüllt und nach kurzer Inkubationszeit wieder entfernt. Der Waschvorgang wurde jeweils dreimal durchgeführt.

Anschließend wurden die zu testenden Verdünnungen des Mausantikörpers als Triplikate eingesetzt. Um unspezifische Bindungen zu verringern, wurden die Mausantikörper (1:10, 1:100 und 1:1000) mit LowCross-Puffer von Candor verdünnt und jeweils 100 µl jeder Verdünnung dreifach auf jeden der drei verschiedenen Kapsid-"Coats" aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (s. **Abbildung 5**). Nach Zugabe des Primären Antikörpers wurde erneut dreimal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen.

Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Ziegenantikörper gegen Maus IgG (Thermo Fisher) verwendet. Dieser wurde in Orientierung an die Herstellerangaben in Verdünnungen von 1:2000 und 1:20000 in LowCross-Puffer zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden je 100 µl Poly-HRP Streptavidin-Komplex in zwei Verdünnungen (1:2000 und 1:20000 in Poly-HRP Verdünnungspuffer von ThermoFisher) zu allen Kombinationen von Kapsidbeschichtung und Primärantikörper pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (s. **Abbildung 5**).

Nach erneutem Waschen der Platte mit je 200 µl Waschpuffer pro Vertiefung wurde das Substrat zugegeben (1-Step Turbo TRMB, 100 µl/well) und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, durch Zugabe von 100µl 1M Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt und die OD der Substratfärbung 450 nm gemessen. Die Antikörperbindung verhält sich proportional zur optischen Dichte. Als Negativkontrolle wurde jeweils lediglich LowCross-Puffer von Candor eingesetzt.

Kavität	1, 2, 3	4, 5, 6	7, 8, 9	10, 11, 12
1	C1+P1+S1	C1+P2+S1	C1+P3+S1	1. Ab S1
2	C1+P1+S2	C1+P2+S2	C1+P3+S2	1. Ab S2
3	C2+P1+S1	C2+P2+S1	C2+P3+S1	1. Ab S1
4	C2+P1+S2	C2+P2+S2	C2+P3+S2	1. Ab S2
5	C3+P1+S1	C3+P2+S1	C3+P3+S1	1. Ab S1
6	C3+P1+S2	C3+P2+S2	C3+P3+S2	1. Ab S2
7	3. ohne Coat	3. ohne Coat	3. ohne Coat	2. Puffer
8	4. Nur C1+Substrat	4. Nur C2+Substrat	4. Nur C3+Substrat	2. Puffer

Legende zur Abbildung 5 siehe nächste Seite

Abbildung 5: Plattenschema zur Etablierung des indirekten Anti-AAV ELISAs

Die Konzentrationen der Kapside für die Plattenbeschichtung ("Coat", C), des primären (P) und des sekundären Antikörpers (S) wurden wie folgt austitriert. Der **Coat (C)** wurde mit C1) $7,9 \times 10^7$, C2) $3,95 \times 10^7$ Kapside/Vertiefung und C3) $1,98 \times 10^7$ Kapside/Vertiefung getestet. Der **primäre Mausantikörper (P)** wurde in Verdünnungen von P1) 1:10, P2) 1:100 und P3) 1:1000, der **sekundäre anti-Maus-IgG-Antikörper (S)** in Verdünnungen von S1) 1:2000 und S2) 1:20000 getestet. Um unspezifische Bindung zu testen, wurden für **Kontrolle 1** alle Schritte ohne Coating und Blocken mit S1 oder S2 durchgeführt. Für **Kontrolle 2** wurde statt der Primär und Sekundär-Antikörper Puffer eingesetzt. Für **Kontrolle 3** wurden alle Schritte des ELISAs ohne Coat (nur mit Smart Block) durchgeführt. Für **Kontrolle 4** wurden lediglich die Kapsidverdünnungen C1, C2, C3, mit dem Substrat eingesetzt.

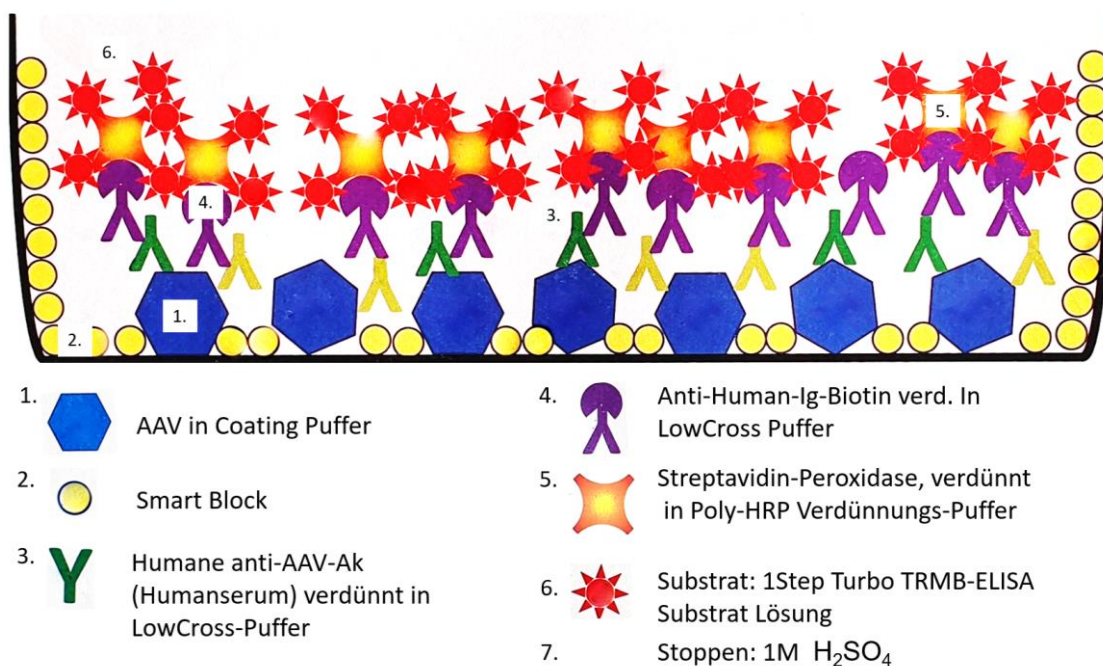


Abbildung 6: Prinzip des indirekten ELISA

1. Zuerst wird die Mikrotiterplatte mit Antigen beschichtet (AAV in Coating Puffer). 2. Anschließend werden alle ungebundenen Stellen abgesättigt (Smart Block). 3. Das zu testende Serum mit Antikörpern, die das an die Platte gebundene Antigen erkennen sollen, wird zugegeben. 4. Der Biotin-gekoppelte Human-Ig-Antikörper, bindet an den primär Antikörper und 5. die Streptavidin-HRP. 6. Durch Zugabe des Substrats findet die Farbreaktion statt, die 7. durch Zugabe von 1M H₂SO₄ gestoppt wird.

2.5.1.3 Indirekter ELISA mit Serum- bzw. Plasmaproben

Tabelle 16: Verwendete Vektoren für die Bestimmung der Gesamtantikörper

Nr.	Charge	Kapsid	kodiert für	DNS	Vektorgenom/μl	Kapside/μl
2.	VP 67/18	AAV2.GL	eGFP	sc	$1,76 \times 10^8$	$2,91 \times 10^8$
3.	VP 68/18	AAV2.NN	eGFP	sc	$2,46 \times 10^9$	$1,02 \times 10^{10}$
4.	V-AF10/17 2	AAV2.WT	ssOva	ss	$5,70 \times 10^8$	$7,13 \times 10^9$

Als optimale Beschichtung der ELISA-Platten stellte sich eine Kapsidkonzentration von $6,9 \times 10^7$ je Kavität ($100 \mu\text{l}$) heraus und wurde für alle drei Kapside (AAV2.WT, AAV2.NN, AAV2.GL) als Plattenbeschichtung verwendet. Die 24 Serum/Plasmaproben wurden in Duplikaten eingesetzt und dafür in einer Platte mit 96 Rundboden-Mikrovertiefungen seriell vorverdünnt, die fertigen Verdünnungen wurden dann mit einer Mehrkanalpipette unverzüglich auf die ELISA-Platte übertragen, um gleiche Inkubationszeiten einzuhalten.

Alle anschließenden Wasch- und Pipettierschritte des Assays wurden ebenfalls mit einer 12er-Mehrkanalpipette durchgeführt. Die einzelnen Schritte des Assays erfolgten wie zuvor beschrieben (s. **Abbildung 6**). Serum- bzw. Plasmaproben wurden in Verdünnungen von 1:20, 1:200 und 1:2000 als Duplikate in die Platten gegeben. Der Sekundärantikörper (Ziege anti-Human IgM/IgG/IgA-Biotin) wurde 1:20.000 verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Streptavidin-HRP (1:2000) wurde für 30 Min. bei RT zugegeben, die Substratreaktion nach 15 Min. gestoppt und die OD bei 450 nm gemessen. Als Positivkontrolle des Assays wurde die Probe H2 einer Spenderin mit bekanntem, hohem AAV2-Titer verwendet. Es wurden diejenigen Seren als positiv definiert, die bei einer Verdünnung von 1:400 vergleichbare oder höhere ODs hatten als Probe H2 bei derselben Verdünnung.

2.5.1.4 Bestimmung der Anti-SARS-CoV-2 Spike-Antikörper

Nach der Blutentnahme wurden Plasma/Serum der Spender H1, H6 und H7 separiert und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die anti-SARS-CoV2-Spike-Antikörper wurden mit dem Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG II Quant Chemilumineszenz-Mikropartikel-Immunoassay (Abbott) bestimmt (durchgeführt im Max von Pettenkofer-Institut, Dr. Andreas Osterman). Die Anti-SARS-CoV2-Spike-Antikörpermengen wurden in beliebigen Einheiten pro ml (arbitrary units, AU/ml) angegeben.

2.5.2 Neutralisationsassay

Tabelle 17: Verwendete Vektoren für die Bestimmung der neutralisierenden Antikörper

Nr.	Charge	Kapsid	kodiert für	DNS	Vektorgenom/ μl	Kapside/ μl
5.	51/18	AAV2.GL	eGFP	sc	$2,48 \times 10^9$	$1,74 \times 10^{10}$
6.	50/18	AAV2.NN	eGFP	sc	$2,75 \times 10^9$	$1,80 \times 10^{10}$
7.	05/19	AAV2.WT	eGFP	sc	$9,98 \times 10^9$	$1,05 \times 10^{11}$

Alle verwendeten Vektorpräparationen enthielten ein einzelsträngiges Genom, das für GFP kodiert. Um die neutralisierenden Antikörper (nAbs) der humanen Seren zu bestimmen wurden die Seren mit den AAV2.WT, AAV2.GL und AAV2.NN-Vektoren präinkubiert, anschließend zu HeLa-Zellkulturen gegeben und danach die Anzahl vektortransduzierter und somit GFP-positiver HeLa-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen zu bestimmen. Als Negativkontrolle wurde ohne Serum präinkubiert (=> keine Neutralisation, daher maximale Transduktion und maximale Anzahl GFP-positiver Zellen), als Positivkontrolle wurden stark neutralisierende Seren verwendet, die die Transduktion und somit auch die GFP-Expression der Zellen effizient hemmen konnten.

2.5.2.1 Durchführung des Neutralisationsassays

HeLa-Zellen wurden in DMEM mit GlutaMAX™ Zusatz von Thermo Fisher Scientific bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert, bis der Zellrasen eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht hatte. Die adhären wachsenden HeLa-Kulturen wurden dann in der Kulturflasche mit PBS gespült, um das serumhaltige Kulturmedium zu entfernen, dann wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA (37°C) von der Kulturflasche abgelöst, das Trypsin danach sofort durch Zugabe von Kulturmedium mit 10% FKS inaktiviert, die Zellen in der Suspension in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und abzentrifugiert. Anschließend wurden die HeLa-Zellen in einer Dichte von 5 x 10⁴ Zellen/1ml auf einer 12-Well-Platte ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung zum Adhären der Zellen wurde das Neutralisationsassay durchgeführt, indem die für 1 Std. 10 Min mit den verschiedenen Serumverdünnungen vorinkubierten Vektoren zugegeben wurden (s. **Abbildung 7**). Zur Kontrolle wurden Vektoren ohne Serum appliziert, als Positivkontrollen dienten das Serum HH und H2 von Personen, die unabhängig von einer Gentherapie, über längere Zeit häufig AAV2-Exposition hatten. Die Transduktion der HeLa-Zellen wurde über 48 h durchgeführt, anschließend wurden die Zellen geerntet und die GFP-Fluoreszenz zur Bestimmung der Transduktionseffizienz bzw. der Neutralisation im FACS gemessen.

Zunächst musste die Transduktionseffizienz der verschiedenen Vektorpräparationen bestimmt werden. Dies erfolgte sowohl unter Berücksichtigung der Menge der Kapside, an die die Antikörper binden, als auch der Anzahl der Vektorgenome, die für die GFP-Fluoreszenz der transduzierten Zellen kodieren und so dem Nachweis der Transduktion dienen. Da nur 10% - 16% (AAV2. WT 9,47%; AAV2.GL 14,25%; AAV2.NN 15,27%) der Kapside ein Genom enthielten und somit eine GFP-Fluoreszenz in der Zielzelle induzieren konnten, musste der prozentuale

Vektorgenomgehalt beim Einsatz der Kapside zusammen mit der Kapsidmenge berücksichtigt werden. Für eine gleiche maximale Transduktion der HeLa-Zellen durch die verschiedenen Kapside wurden die Vektoren AAV2.WT (Präp 05/19), AAV2.GL (Präp 51/18) und AAV2.NN (Präp 50/18) unterschiedlich stark verdünnt. Nach dem Austesten einer Multiplizität der Infektion (MOI; Vielfaches der HeLa-Zellzahl), von 100, 1000, 10000 wurde das WT-Kapsid mit einer MOI von 20, der Vektor AAV2.GL mit einer MOI von 200 und der Vektor AAV2.NN mit einer MOI von 250 eingesetzt.

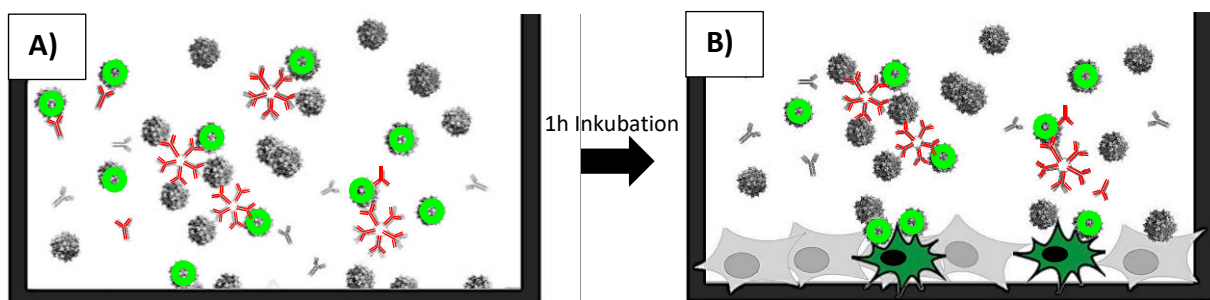


Abbildung 7: Prinzip des Antikörper-Neutralisationsassays mit HeLa-Zellen

A) Die für eGFP kodierenden Vektoren (hellgrün) wurden mit (neutralisierenden) Antikörpern (rot) präinkubiert. **B)** Nach 1h wurde das Gemisch aus Antikörpern und Vektoren für 48h mit HeLa Zellen inkubiert. An die Vektoren gebundene, neutralisierende Antikörper verhindern die Transduktion von HeLa-Zellen. Eine erfolgreiche Transduktion von HeLa-Zellen zeigt sich in der grünen Fluoreszenz (GFP) der Zellen (dunkelgrüne Zellen), die durch neutralisierende Antikörper (rot) verhindert werden kann. Die Anzahl und Intensität GFP-positiver HeLa-Zellen kann im FACS quantifiziert werden.

Um den optimalen Konzentrationsbereich für die Neutralisation zu bestimmen, wurden unterschiedliche Titrations mit den Seren HH, H1 und H6 getestet. Die Proben von HH und H6 wurden in Verdünnungen von 1:20, 1: 250; 1: 500; 1: 1000; 1: 1500; 1: 2000; 1:3000; 1:4000; H1 in Verdünnungen von 1:20, 1: 50; 1: 100; 1: 250; 1: 500; 1: 1000; 1:2000, getestet. Für die Untersuchung aller Plasma-/Serumproben wurden dann Verdünnungen von 1:20; 1:200; 1:2000 eingesetzt, aufgrund der hohen Neutralisationskapazität des Spenders H2 Verdünnungen von 1:1000; 1:5000; 1:25000; 1: 125000 verwendet.

Im nächsten Schritt wurden jeweils 500 µl der Serum/Plasmaverdünnung (2x) zu 500 µl der Vektorverdünnung (2x) gegeben (Endverdünnung: 1:2). Die damit erreichten Endkonzentrationen der Vektoren sind in **Tabelle 18** dargestellt.

Tabelle 18: Finale Konzentration der im Neutralisationsassay eingesetzten Vektoren

Nr.	Vektor	Charge	MOI	Entspricht bei 5×10^4 HeLa Zellen/well	
5.	AAV2.GL	51/18	200	1×10^6 vg/ml	$70,18 \times 10^6$ Kapside/ml
6.	AAV2.NN	50/18	250	$12,5 \times 10^6$ vg/ml	$81,86 \times 10^6$ Kapside/ml
7.	AAV2.WT	05/19	20	1×10^5 vg/ml	$10,53 \times 10^6$ Kapside/ml

Als Negativkontrolle wurde den HeLa-Zellen nur 1 ml Medium ohne Vektor zugesetzt, als Positivkontrolle nur Vektor mit Medium, ohne neutralisierendes Serum. Die stark neutralisierenden Kontrollseren HH und H2 wurden in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Die Präinkubation von Seren und Vektoren erfolgte jeweils für 1 Stunde und 10 Minuten bei RT. Anschließend wurde das Kulturmedium der HeLa-Zellen durch die Serum-Vektormischungen bzw. die Kontrollen ersetzt und für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die GFP⁺ Zellen mit dem Evos-Mikroskop (Fluoreszenz, Einstellungen: transmitted 70 % GFP) fotografiert und danach mit 100 µl/Kavität Trypsin-EDTA (37°C) abgelöst. Das Trypsin wurde mit 100 µl Medium/5 % FCS inaktiviert, die HeLa-Zellen mit PBS/1% Paraformaldehyd fixiert und die GFP-Fluoreszenzintensität im FACS ermittelt. Die fixierten Zellen sind bei 4°C bis zu 1 Monat lagerbar.

Die Transduktion des Virus wurde über die GFP-Expression, die Fluoreszenz der HeLa-Zellen über FACS-Analyse bestimmt und mit dem Programm FlowJo ausgewertet. Dabei wurde die Abgrenzung von GFP⁺ und GFP⁻ Zellen so gewählt, dass die (nicht-fluoreszierenden) Zellen der Negativkontrolle ausgeschlossen wurden (s. **Abbildung 8**). Die positiven Zellen befinden sich rechts außerhalb der Abgrenzung und zeichnen sich durch höhere Fluoreszenzintensität aus (x-Achse). Der Titer der neutralisierenden Antikörper wurde als die höchste Serumverdünnung definiert, bei der eine halbmaximale GFP-Expression (50% der Positivkontrolle) gemessen wurde. Eine Serum-/Plasma-Verdünnung > 1:40 wurde, als positiv erachtet, da stärker konzentrierte Proben eine unspezifische Hemmung der Vektortransduktion verursachen können.

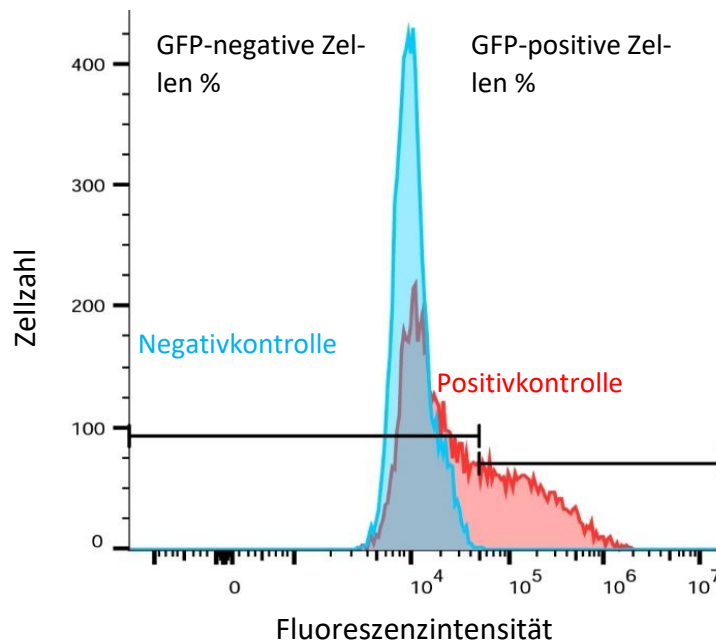


Abbildung 8: Beispiel der Abgrenzung zwischen GFP-Fluoreszenz-positiven und -negativen Zellen: Darstellung als Histogramm-Plot nach FACS-Analyse

Die Markierung trennt GFP-positive (rechte Markierung, hohe Fluoreszenzintensität) von GFP-negativen Zellen (links, niedrige Fluoreszenzintensität, Hintergrund-Fluoreszenz). Die Begrenzung wird nach der maximalen Fluoreszenzintensität einer entsprechenden Negativkontrolle festgesetzt. Der prozentuale Anteil der Zellen mit einer Fluoreszenz im positiven Bereich des Histogramms wird mit FowJo berechnet.

2.5.2.2 Bestimmung HtW2_S1.2 spezifischer neutralisierender Antikörper

Die Bindung neutralisierender Antikörper gegen das SARS-CoV2-Spike-Protein von Personen, die mit dem mRNA-Impfstoff Comirnaty geimpft waren, an die AAV2-Variante HtW2_S1.2 wurde durch die Arbeitsgruppe Michalakos von Sabrina Babutzka bestimmt. Analog zu dem hier beschriebenen Neutralisationsassay wurden der AAV2.WT sowie die Variante HtW2_S1.2 mit Serum des Spenders H1, vor beziehungsweise nach der ersten und zweiten Impfung, in Verdünnungen von 1:50, 1:500, 1:1000 für 1h vorinkubiert. Danach wurde das Serum/Vektor-Gemisch zu den HeLa Zellen gegeben und für 48h bei 37°C und 10 % CO₂ inkubiert. Die transduzierten, GFP-exprimierenden Zellen wurden mittels eines automatisierten Zellzählers (Countess; ThermoFisher) bestimmt.

2.6 Zelluläre Immunität

Um zelluläre Immunantworten auf AAV-WT und AAV-Mutanten zu untersuchen, wurden von 7 Spendern die peripheren Blutlymphozyten isoliert und mit den AAV-Kapsiden sowie Kontrollen stimuliert. Nach der Stimulation wurden Stoffwechselaktivität und Proliferation mittels XTT Assay, Zytokin/Chemokin-Ausschüttung im Multiplexassay und Expansion bestimmter Zellpopulationen bzw. erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern und Monokinen durch Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt. Alle Schritte wurden nach der Blutabnahme unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.6.1 Gewinnung von peripheren Blutmonozyten

Heparinblut von den Spendern H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 und C1 wurde mit DMEM -Medium 1:2 verdünnt und über Nacht bei RT in einer aufrechtstehenden Kulturflasche (T75) gelagert. Am nächsten Tag wurden die Lymphozyten über einen Ficoll-Dichtegradienten von den Erythrozyten, Thrombo- und Granulozyten separiert. Dabei ist es wichtig, dass Ficoll und Blut gleiche (Raum)Temperatur haben, um die entsprechende Dichte für eine optimale Separation zu gewährleisten. Hier wurde die Ficoll-Phase mit dem verdünnten Blut überschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde bei 900 g für 35 min bei Raumtemperatur durchgeführt (Zentrifugation ungebremst). Nach der Zentrifugation sind die Lymphozyten von den übrigen Blutbestandteilen getrennt, liegen als weiße Schicht (Interphase) auf der Ficollphase und können mit einer Pipette abgenommen werden. Nach zweimaligem Waschen mit DMEM -Medium bei RT (1. Waschen 10 Min. bei 600g, 2. Waschen für 6 Min. bei 400g) werden die Zellen in einem definierten Volumen an Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer durch Auszählung am Mikroskop bestimmt (s. **Abbildung 9**). Um nur lebende Zellen bei der Zählung zu berücksichtigen, wurde die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau versetzt, wodurch tote Zellen blau gefärbt werden. Der Verdünnungsfaktor durch die Trypanblau-Zugabe sollte bei der Zellzahlermittlung berücksichtigt werden. Die Zellzahl berechnet sich wie folgt:

Gesamtzellzahl = Zellzahl aus 16 Feldern $\times 10^4/\text{ml}$ $\times 2$ (Verdünnungsfaktor Trypanblau)
 $\times \text{ml Volumen der Zellsuspension}$

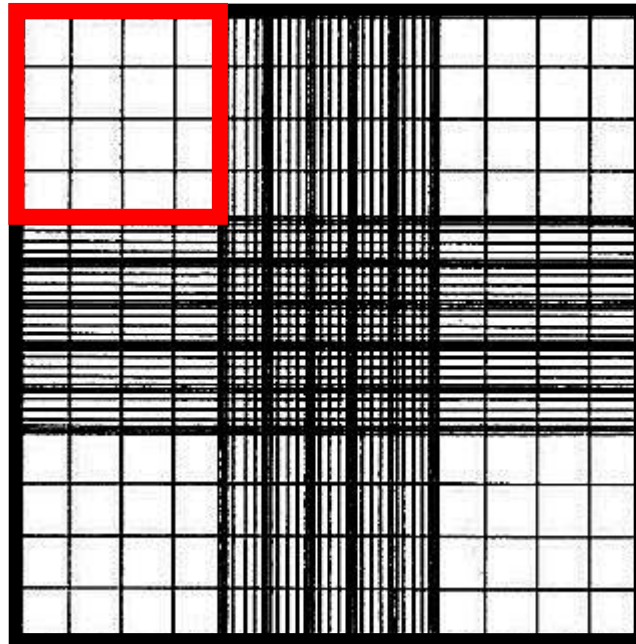


Abbildung 9: Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer

Es werden die einzelnen Zellen innerhalb des rot markierten Quadrats ausgezählt, bei geringer Zelldichte zählt man die Zellen in allen 4 Eckquadraten und berechnet den Mittelwert. Die Fläche eines Eckquadrats ist 1mm^2 , die Kammertiefe $0,1\text{mm}$, was einem Volumen von $0,1\text{mm}^3 (= 0,1\mu\text{l})$ entspricht. Durch Multiplikation der Zellzahl eines Felds mit 10^4 ergibt sich die Zellzahl pro ml ($10^4 \times 0,1\mu\text{l} = 1\text{ml}$)

2.6.2 Lymphozytenstimulation zur Bestimmung von Vitalität und Zytokinsekretion (XTT-Assay, Multiplex-Bead-Analyse)

Tabelle 19: Verwendete Vektoren für die Lymphozytenstimulation zur Bestimmung von Vitalität und Zytokinsekretion

Nr.	Charge	Kapsid	kodiert für	DNS	Titer (vg/ μl)	Kapside/ μl
2.	VP 67/18	AAV2.GL	eGFP	sc	$1,76 \times 10^8$	$2,91 \times 10^8$
3.	VP 68/18	AAV2.NN	eGFP	sc	$2,46 \times 10^9$	$1,02 \times 10^{10}$
4.	V-AF10/17 2	AAV2 WT	ssOva	ss	$5,70 \times 10^8$	$7,13 \times 10^9$

Für die Kultivierung und Stimulation der Lymphozyten wurde zunächst humanes Serum verwendet. Die Stimulationen wurden als Triplikate auf je zwei identisch mit Antigen bestückten Platten mit 96 Vertiefungen getestet, einer Flachboden-Platte für das XTT-Assay ($100\mu\text{l}/\text{well}$) zur finalen Messung der OD im ELISA-Reader und einer U-Boden-Platte für die Gewinnung der Kulturüberstände für den Test auf Zytokinsekretion im Multiplex Bead Assay. Die Lymphozytenstimulationen mit AAV2.WT und den Kapsidvarianten AAV2.GL und AAV2.NN wurden in 5% autologem Serum bzw. parallel mit 5% Humanserumpool angesetzt, um eine mögliche Neutralisierung der Kapside durch Antikörper zu umgehen. Zu diesem Zeitpunkt waren die

Ergebnisse der Antikörperneutralisation noch nicht bekannt, für die späteren Assays wurde auf die Verwendung von Humanserum verzichtet und stattdessen der Serumersatz Panexin eingesetzt.

Alle Vektoren wurden für die Stimulation von einer Ausgangs-Kapsiddosis von $2,74 \times 10^{11}$ /ml in 3 Konzentrationen von $2,74 \times 10^8$; $2,74 \times 10^7$ und $2,74 \times 10^6$ (Verdünnungen von 1:1.000, 1:10.000; 1:100.000), für die Assays, eingesetzt. Für die Messung der Viabilität mittels XTT Reagenz wurden die Lymphozytenkulturen in einem Volumen von 100 μ l Medium ohne Phenolrot je Kavität, für die Messung der Zyto und Chemokinsekretion in 200 μ l inkubiert. Es wurden, je nach Ausbeute der isolierten Lymphozyten jeweils 2×10^5 - 8×10^5 PBMCs/Kavität eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen, nur mit Medium kultiviert. Als Positivkontrolle wurden je 1% PPD (10 μ g/ml) und 1% Tetanus Toxoid (10 μ g/ml) verwendet. Um die optimale Stimulationsdauer zu bestimmen, wurden Spenderzellen zunächst 3, 4 und 5 Tage in vitro stimuliert und nach jedem Zeitpunkt im XTT-Assay getestet. Für die Stimulation mit den Varianten AAV2.GL und AAV2.NN stellte sich eine Stimulation von 4 Tagen als optimal heraus.

2.6.3 Lymphozytenstimulation für die Immunfluoreszenzfärbung von Oberflächenmarkern und intrazellulären Zytokinen

Tabelle 20: Verwendete Vektoren für die Immunfluoreszenzfärbung

Nr.	Charge	Kapsid	kodiert für	DNS	Titer(vg/ μ l)	Kapside/ μ l
8.	25/20	AAV2.GL	eGFP	sc	$4,00 \times 10^9$	$2,57 \times 10^{10}$
9.	26/20	AAV2.NN	eGFP	sc	$8,00 \times 10^9$	$4,72 \times 10^{10}$
10.	70/20	HtW2_S1.1	eGFP	sc	$9,90 \times 10^7$	$6,10 \times 10^8$
11.	69/20	AAV2.WT	eGFP	sc	$3,50 \times 10^{10}$	$2,38 \times 10^{11}$
12.	54/20	AAV2.WT	–	keine	–	$1,34 \times 10^{10}$
13.	74/20; 82/20	HtW2_S1.2	eGFP	sc	$1,5 \times 10^{10}$	–

Während die Stimulationen der Lymphozyten mit den Vektoren AAV2.GL und AAV2.NN nur im XTT-Assay und auf Zytokinsekretion untersucht wurden, erfolgte später eine weitere Serie von Experimenten mit Lymphozytenstimulation mit AAV2 WT, den Gentherapie-Vektoren AAV2.GL und AAV2.NN sowie neuen Varianten mit Kapsidexpression von SARS-CoV2-Spike-RBD, HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2. Hier wurden die gleichen Spender H1 bis H7 wie zuvor untersucht. Nur die Spender H1, H6 und H7 wurden nach ein- bzw. zweimaliger Impfung mit der mRNA-Vakzine Comirnaty (Biontech/Pfizer), die eine Immunantwort gegen SARS-CoV2-

Spikeprotein induziert, wiederholt auf zelluläre Reaktionen auf HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2 im Vergleich zum AAV2 WT getestet.

Die Kultivierung der Lymphozyten ($1,5 \times 10^6$ PBMCs/1ml – $4,0 \times 10^6$ PBMCs/1ml) erfolgte in Platten mit 24 Vertiefungen und dem Serumersatz Panexin. Sowohl die SARS-CoV2-Spike-RBD Kapside HtW2_1.1 und _1.2 als auch AAV2.GL und AAV2.NN wurden in einer Konzentration von $1,0 \times 10^9$ vg/1 ml ($\approx 6 \times 10^9$ Kapside/ 1ml) eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde hier Lipopolysaccharid (LPS) verwendet (stimuliert v. a. Zellen des angeborenen Immunsystems), als Negativkontrolle dienten ebenfalls unstimulierte Kulturen. Die Stimulationsdauer von AAV2.GL und AAV2.NN betrug 24h beziehungsweise 4 Tage, für die Lymphozytenstimulation von Geimpften mit den AAV2-Kapsidvarianten HtW2_S1.1 und S1.2 wurde nach der 2. Impfung die Kulturdauer von 4 Tagen auf 3 Tage verkürzt.

2.6.4 XTT-Assay zur Bestimmung der zellulären Vitalität nach Lymphozyten-Stimulation

Mittels XTT-Assay wurde die Viabilität und Stimulation (Stoffwechselaktivität) der stimulierten Zellen bestimmt. Am Ende der jeweiligen Stimulationsperiode wurde das XTT durch Mischen von XTT-Reagenz plus 2 % Aktivator vorbereitet. Hiervon wurden mit einer 12-Kanal-Pipette je 50 μ l zu jeder Mikrokultur (100 μ l) gegeben. Anschließend wurde nach 3 h und 6 h die Umsetzung des XTTs zum farbigen Formazan als OD bei einer Wellenlänge von 490 nm im ELISA-Reader gemessen (Bio-RAD) (s. **Abbildung 10**). Die Viabilität der Zellen wurde durch den Vergleich der OD, der Antigen-stimulierten Kulturen mit der OD der Mediumkontrolle bestimmt.

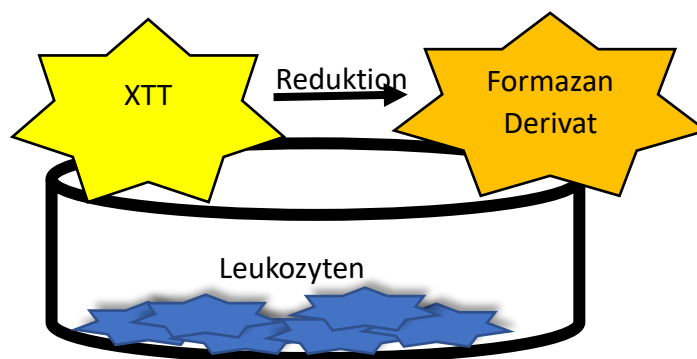


Abbildung 10: Prinzip des XTT-Assays

Das XTT-Assay basiert auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes XTT (Triphenyltetrazoliumchlorid) unter Bildung eines orangefarbenen, wasserlöslichen Formazan-Derivats, umgesetzt durch die mitochondriale Dehydrogenase. Eine Stimulation der Zellen führt zu einer Steigerung des Metabolismus und somit zur Zunahme der Dehydrogenasen-Aktivität, die mit der Umsetzung des XTT in Formazan korreliert.

2.6.5 Bioplex-Assay zur Bestimmung der Zytokin- und Chemokinsekretion

Für die Bestimmung der Zytokin- und Chemokinsekretion wurden nach 24, 48, 72 oder 96 Stunden (bei 4-tägiger Kultur) je 25µl Überstand/Kultur abgenommen, in eine U-Boden-Platte transferiert und sofort bei -80°C eingefroren, um eine Degradation der Zytokine zu vermeiden. Erst kurz vor dem Zytokinassay wurden die Kulturüberstände wieder aufgetaut und zu gleichen Teilen gepoolt verwendet, um sowohl früh als auch spät nach der Stimulation produzierte Zytokine zu erfassen. Die gepoolten Überstände der täglichen Abnahmen wurden im Bioplex-Assay quantitativ analysiert. Getestet wurde auf CTACK, Eotaxin, BasicFGF, G-CSF, GM-CSF, Gro- α , HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-12 (p40), IL-13, IL -15, IL-16, IL-17, IL-18, IP10, LIF, MCP-1, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , β -NGF, PDGF-BB, RANTES, SCF, SCGF- β , SDF-1 α , TNF- α , TNF- β , TRAIL, VEGF.

Das Bioplex-Zytokinassay ist ein Sandwich-Immunoassay, mit dem in derselben Probe eine Vielzahl an sezernierten Zytokinen und Chemokinen nachgewiesen werden kann. Die Fänger-Antikörper sind dabei kovalent an magnetische Beads mit unterschiedlicher Fluoreszenz gebunden, jedem Fänger-Antikörper sind Beads einer bestimmten Fluoreszenz zugeordnet, um bei der Analyse die Zytokine unterscheiden zu können. Die Beads werden in Mikrotiterplatten verteilt, in die zuvor die Kulturüberstände pipettiert wurden. Die Mikrotiterplatte wird zum Waschen in eine magnetische Unterlagen-Platte gestellt, die die magnetischen Beads am Boden der Vertiefungen während der Waschschriffe fixiert. Die gebundenen Zytokine werden jeweils mit einem biotinylierten Antikörper, der dasselbe Zytokin erkennt, detektiert. Streptavidin-Phycoerythrin visualisiert die spezifische Antikörperbindung, die Zytokinspezifität wird in Kombination mit der Fluoreszenz des jeweiligen Beads bestimmt.

2.6.5.1 Durchführung

Zuerst wurden 50 µl pro Vertiefung der eben erwähnten Antikörper-Beads (entweder bereits gemischt, oder die einzelnen Analyte mussten erst als Pool vereinigt werden) in die Multiplex-Assayplatte gegeben und zweimal mit 100µl Waschpuffer (aus dem Kit) /Vertiefung gewaschen.

Anschließend wurden die gepoolten Proben (50µl/Vertiefung) zugegeben und für 30 min bei RT auf einem Horizontalschüttler bei 850rpm inkubiert, um ein Verklumpen der Beads während der Zytokin-Antikörperbindung zu verhindern. Anschließend wurde dreimal mit 100 µl

Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen, bevor je 25 µl der biotinylierten Detektionsantikörper zugegeben wurden. Nach erneuter Inkubation wie oben beschrieben werden die Beads erneut dreimal gewaschen und mit je 50 µl Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) für 10 Min bei 850rpm und RT inkubiert (s. **Abbildung 11**). Anschließend wurden die Beads wieder gewaschen, mit 125 µl Waschpuffer resuspendiert und die Fluoreszenzintensitäten im Bioplex Reader gemessen und quantifiziert.

Als positiv Kontrolle dienten die Überstände der PPD- beziehungsweise TT-stimulierten Kulturen, als Negativkontrolle das Kulturmedium mit dem entsprechenden verwendeten Serum.

Die Daten wurden als der Mittelwert der Kapsidverdünnungen ($2,74 \times 10^8$ Kapside/µl) von 1:1.000, 1:10.000; 1:100.000 dargestellt. Aus diesen Werten wurde der Sekretionsindex berechnet, dieser stellt den Quotienten aus der Sekretion der AAV-Vektor-stimulierten Kulturen und der Basissekretion im Kontrollmedium dar. Ein Sekretionsindex von größer zwei gilt dabei als relevant.

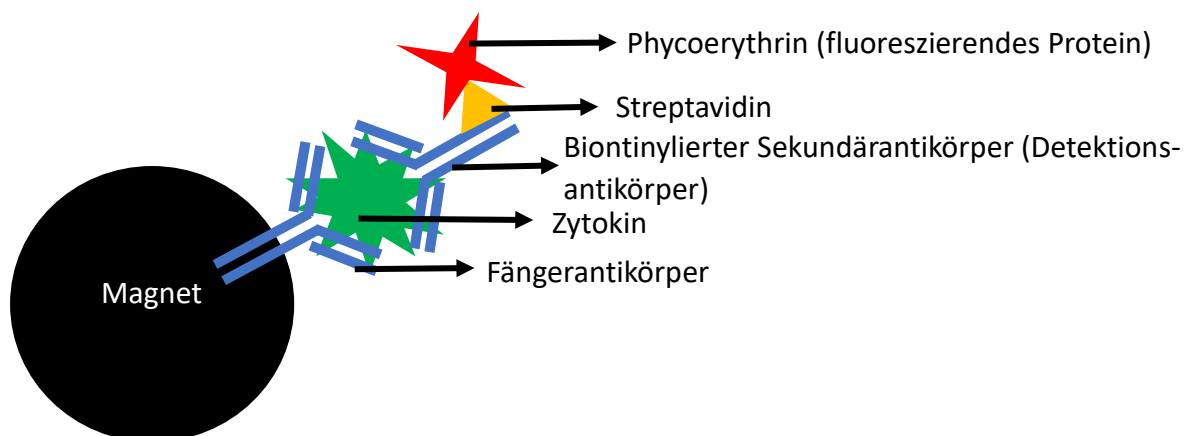


Abbildung 11: Prinzip des Bioplex-Assays

Die magnetischen Kügelchen sind mit den Fängerantikörpern mit Spezifität für ein bestimmtes Zytokin gekoppelt und zusätzlich mit verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert (für jede Fängerantikörperspezifität eine andere Farbe zur Unterscheidung). Die Zytokine werden von den Fängerantikörpern gebunden und von einem zweiten, biotinylierten Antikörper (Detektionsantikörper) mit gleicher Spezifität markiert, die Bindung über Phycoerythrin-markiertes Streptavidin detektiert.

2.6.6 Intrazelluläre und Oberflächen-Immunfluoreszenzfärbungen

Um Aktivierung und Zytokinexpression nach Stimulation von peripheren Blut mononukleären Zellen (PBMC) mit den Vektoren AAV2.GL, AAV2.NN sowie HtWS2_1.1 und HtWS2_1.1 und dem AAV2.WT zu detektieren, wurden Oberflächen- beziehungsweise intrazelluläre Färbungen auf Marker bestimmter Zelltypen und Aktivierungsmarker (Oberflächenfärbung) bzw. Zytokinexpression (intrazelluläre Färbung) durchgeführt (s. **Abbildung 12**). Hierzu wurden periphere Lymphozytenkulturen (je 1 ml) in Kulturplatten mit je 24 Vertiefungen angelegt (s. u.) und nach den entsprechenden Stimulationszeiten geerntet und gefärbt. Die Färbungen wurden mit Kombinationen von jeweils 4 verschiedenen Antikörperspezifitäten ("Antikörpercocktail" 1 bis 4) mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen durchgeführt (s. **Tabelle 12**), um Zellpopulationen besser zu charakterisieren und Zytokinproduktion besser bestimmten Zelltypen zuordnen zu können. Im vornerein wurde das Fixations- (4x) und Permeabilisierungskonzentrat, entsprechend der Herstellerangaben, mit Verdünnungspuffer beziehungsweise destilliertem Wasser auf die Ausgangskonzentration (1x) verdünnt.

Je $1,00 \times 10^9$ vg/1 ml ($\approx 6 \times 10^9$ Kapside/ 1ml) der AAV-Vektoren (s. **Tabelle 20**) wurden, je nach Spendebreitschaft mit $1,5 \times 10^6$ PBMCs/1 ml – $4,0 \times 10^6$ PBMCs/1 ml und 5 % Panexin entweder für 24h oder 4/3 Tage inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Lipopolysaccharid (5 µg/ml), als Negativkontrolle nur Kulturmedium verwendet. Nach der Antigenstimulation wurde die Zytokinsekretion der Zellen für 5 h mit Brefeldin A (1µg/1 ml) inhibiert. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml Röhrchen transferiert und für 6 min bei 400 g zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 40 µl abgenommen und die Zellen in 150 µl PBS/1 % FCS aufgenommen. Die Fc-Rezeptoren wurden durch Zugabe von je 5 µl Mäuseserum blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Für die Oberflächenfärbungen wurden 50 µl PBMCs in die Rundboden-Mikrotiterplatten transferiert und mit 50 µl des jeweiligen Antikörpercocktails (s. **Tabelle 12**) für 30 Min. auf Eis inkubiert. Alle Inkubationsschritte, an denen fluoreszenzmarkierte Antikörper beteiligt waren, wurden zum Schutz vor dem Ausbleichen der Fluoreszenz im Dunkeln durchgeführt. Um unspezifische Antikörperbindungen zu detektieren, wurden die Zellen eines jeden Spenders, parallel zu den Cocktails mit den entsprechend fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörpern, mit nicht-spezifischen Kontrollantikörper mit gleichen Isotypen (Isotypkontrollen) und Fluorochrom inkubiert. Hierzu wurden die Zellen der verschiedenen Stimulationsansätze eines Spenders, die in den Tubes verblieben, gepoolt und für die

Isotypkontrollfärbungen verwendet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/1 % FCS (200 µl/je Kavität) wurden die Zellenmembranen mit 100 µl Cytofix für 45 min auf Eis im Dunkeln permeabilisiert und fixiert und zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit den zytokinspezifischen (IL-1 β , IFN- β) Antikörpern in Permeabilisierungspuffer (s. **Tabelle 12**) für ebenfalls 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen mit 400 µl PBS/1% PFA in Glasröhrchen (Falcon) fixiert und die Fluoreszenzintensitäten der Zellen im FACS gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels FlowJo-Software und Excel. Lebende Zellen des angeborenen (Monozyten/Makrophagen) sowie erworbenen Immunsystems (Lymphozyten) wurden nach Größe (FSC, forward scatter) und Oberflächen-Granularität (SSC, sideward scatter) ausgewählt (s. **Abbildung 13**). Positive, gefärbte Lymphozyten wurden bestimmt, aufgrund der Fluoreszenzintensität des jeweiligen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers, im Vergleich zur Isotypkontrolle mit identischem Fluorochrom. Die Daten werden als Mittelwert \pm SD des "Expansionsindex" dargestellt, d.h. die Populationsgröße der stimulierten Kulturen wurde durch die Größe der jeweiligen Population der (Medium-) Kontrolle dividiert, anschließend wurde der Mittelwert aller Spender gebildet. Als relevante Stimulationen wurden dabei die Expressionsmuster (% positive Zellen) definiert, die über dem 2-fachen der Mediumkontrolle lagen.

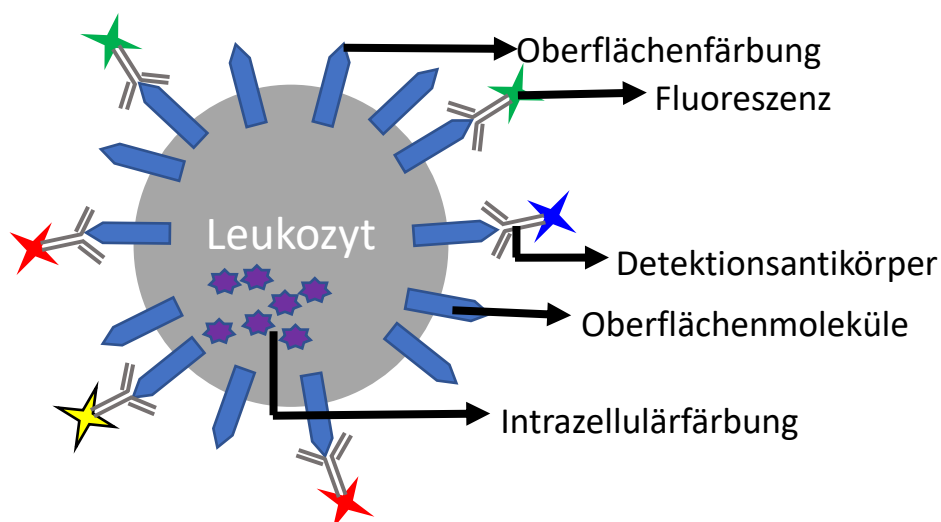


Abbildung 12: Prinzip der Immunfluoreszenzfärbungen von PBMCs

Die mit verschiedenen Fluorochromen markierten Detektionsantikörper binden spezifisch an Oberflächenmoleküle und nach Permeabilisierung der Zellmembran auch an intrazelluläre Zytokine. Im FACS kann die jeweilige Fluoreszenzintensität gemessen und so die Expression des vom Antikörper erkannten Antigens analysiert werden.

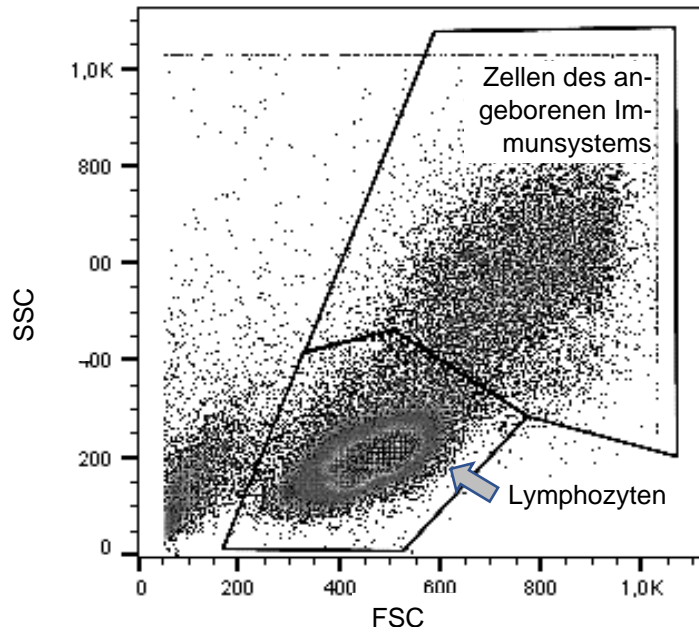


Abbildung 13: Eingrenzung der Leukozytenpopulation

Anhand der Oberflächengranularität (SSC) und Größe (FSC) wurden die vom FACS analysierten Zellen in Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, Granulozyten) und Lymphozyten eingeteilt. Die jeweils eingegrenzten Zellpopulationen wurden separat analysiert.

2.7 Statistik

Um die Signifikanz der Daten des ELISAs, Neutralisationsassays und Multiplexassays zu berechnen wurden der Friedman-Test und Dunn-Test durchgeführt, wobei davon ausgegangen wurde, dass die Daten nicht normalverteilt sind. Die P-Werte wurden nur für signifikante Unterschiede gezeigt. Für die Immunfärbungen wurde ein t-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Immunogenität der Kapsidmutanten

3.1.1 Bestimmung der Kapsidmenge der verschiedenen Vektor-Präparationen

Die Kapsidmengen aller verwendeten Vektoren wurden mittels Progen Sandwich Elisa Kits bestimmt. Der zugehörige Standard (Kitkontrolle) ermöglichte die Berechnung der Kapsid-Titer der verschiedenen Präparationen. Die Kapsidmenge und die Anzahl der Vektorgenome sowie der prozentuale Anteil an Kapsiden mit Genom ist für die einzelnen Präparationen in **Tabelle 21** aufgezeigt. Im Mittel waren die Chargen von AAV2.GL zu 30 % befüllt, von AAV2.NN zu 19% und von AAV2.WT zu 11% befüllt.

Tabelle 21: Titer und Genomgehalt der Chargen

Nr.	Genom	DNA	Kapsidtyp	Charge	Titer (vg/ μ l)	Titer (Kapside/ μ l)	% Kapside m. Genom
1.	Crimson	sc	GL	VP 03/17	–	$2,74 \times 10^8$	–
2.	eGFP	sc	GL	VP 67/18	$1,76 \times 10^8$	$2,91 \times 10^8$	60,40%
3.	eGFP	sc	NN	VP 68/18	$2,46 \times 10^9$	$1,02 \times 10^{10}$	24,10%
4.	eGFP	ss	WT	V-AF10/17 2	$5,70 \times 10^8$	$7,13 \times 10^9$	8%
5.	eGFP	sc	GL	51/18	$2,48 \times 10^9$	$1,74 \times 10^{10}$	14,25%
6.	eGFP	sc	NN	50/18	$2,75 \times 10^9$	$1,80 \times 10^{10}$	15,27%
7.	eGFP	sc	WT	05/19	$9,98 \times 10^9$	$1,05 \times 10^{11}$	9,47%
8.	eGFP	sc	GL	25/20	$4,00 \times 10^9$	$2,57 \times 10^{13}$	15,56%
9.	eGFP	sc	NN	26/20	$8,00 \times 10^9$	$4,72 \times 10^{13}$	16,95%
10.	eGFP	sc	HtW2_S1.1	70/20	$9,90 \times 10^7$	$6,10 \times 10^{11}$	16,23%
11.	eGFP	sc	AAV2 WT	69/20	$3,50 \times 10^{10}$	$2,38 \times 10^{14}$	14,71%
12.	kein Genom	–	AAV2 WT	54/20	0	$1,34 \times 10^{13}$	0%
13.	eGFP	sc	HtW2_S1.2	74/20;82/20	$1,5 \times 10^{10}$	–	–

3.1.2 Etablierung des indirekten ELISAs zum Nachweis der Antikörper gegen AAV2-Kapside

3.1.2.1 Titrationen der ELISA-Platten-Beschichtung und der Nachweis-Antikörper

Um die optimale Kapsidbeschichtung der ELISA-Platte zur Bestimmung der anti-AAV-Antikörper aus Humanseren zu definieren, wurde der Assay zunächst mit dem Maus-monoklonalen anti-AAV2-Antikörper A20 mit bekannter Bindungsspezifität und entsprechendem anti-Maus-Sekundärantikörper anstatt der Humanseren etabliert. Es wurden verschiedene Kapsidkonzentrationen für die Plattenbeschichtung ("Coat"), verschiedene Konzentrationen von Antikörper A20 sowie des sekundären, biotinylierten anti-Maus-Antikörpers gegeneinander

Ergebnisse

ausgetestet. **Abbildung 14** zeigt drei verschiedene Plattenbeschichtungen mit dem Testkapsid AAV2.GL pAAV_sc-CMV_Crimson [C1) $7,9 \times 10^7$ Kapside/100 μ l Vertiefung, C2) $3,95 \times 10^7$ Kapside/Vertiefung und C3) $1,98 \times 10^7$ Kapside/Vertiefung] mit je drei Verdünnungen [P1) 1:10, P2) 1:100 und P3) 1:1000] des biotinylierten Maus-monoklonalen Primärantikörpers und jeweils zwei verschiedene Konzentrationen [S1) 1/2000 und S2) 1/20.000] des biotinylierten Sekundärantikörpers (hier: Ziege-anti-Maus-IgG-Biotin). Die optimale Kombination von Plattenbeschichtung und Sekundärantikörper wurde über die maximale OD bei geringster Primärantikörperkonzentration definiert. Hier war dies bei einer Plattenbeschichtung von $7,9 \times 10^7$ Kapside/Kavität, einer Verdünnung des Maus Anti-AAV2-A20 Primärantikörpers von 1:10, 1:100, 1:1000 und einer Verdünnung des anti-Maus-IgG-Biotin-Sekundärantikörpers von 1:2000 der Fall. Die Streptavidin-Peroxidase wurde in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt (s. **Abbildung 14**).

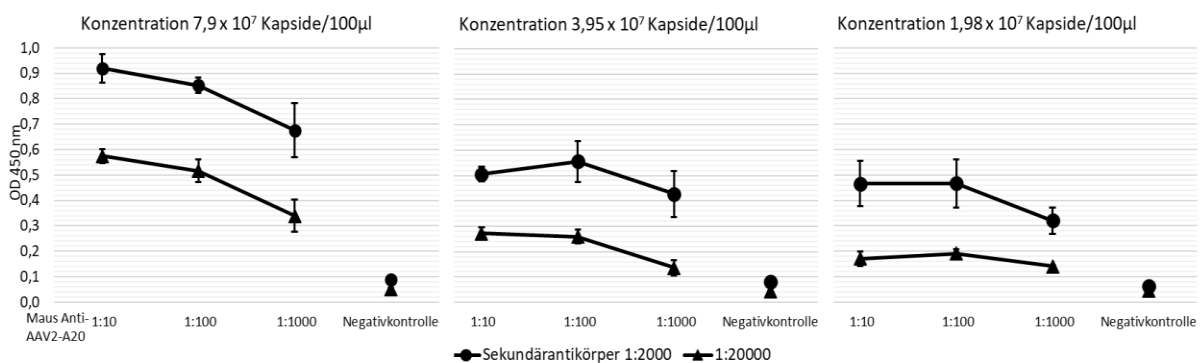


Abbildung 14: Etablierung des indirekten Kapsid-ELISAs

Die drei Diagramme zeigen verschiedene Kapsidbeschichtungen der ELISA-Platten und als Primärantikörper die Titrations des Maus-anti-AAV2 A20 (1:10, 1:100, 1:1000) bzw. nur Puffer/keine Antikörper als Negativkontrolle, der anti-Maus-IgG-Biotin-Sekundärantikörper wurde jeweils in den Verdünnungen 1:2000 (S1) und 1:20000 (S2) eingesetzt.

3.1.2.2 Grenzwerte für positive Vektorbindung der Antikörper

In Ermangelung eines offiziellen Standards für humane anti-AAV2-Antikörper wurden die Grenzwerte für die Antikörperbindung mit Hilfe des Serums eines Spenders mit bekannter neutralisierender Antikörperantwort gegen AAV2 (hier: Serum H2) definiert. Ein Serum wurde als positiv angesehen, wenn bei einer Verdünnung von 1:400 die OD 450 im ELISA größer oder gleich der OD des 1:400 verdünnten Serums H2 war. Spenderserum H2 wurde bei jeder Wiederholung des ELISAs als Kontrolle mitgeführt. Dieser Grenzwert wurde als niedrigster Wert im linearen Bereich der Titrationskurve von Serum H2 gewählt. Da alle

Antikörperbestimmungen im ELISA bereits vorher erfolgt waren, wurde von den Titrationskurven aller Seren die OD 450 bei 1:400 Verdünnung nachträglich berechnet.

3.1.2.3 Inter- und Intraassay-Variabilität CV%

Wiederholt getestet wurden die Seren H1, H2, H3, H4, H5, H6 und H7; aus diesen Werten wurde die Interassay- Variabilität berechnet. Da jede Probe als Duplikat angesetzt wurde, konnte hieraus auch die Intraassay- Variabilität berechnet werden.

Die Formel zur Berechnung der CV war folgende: $CV = \text{Standardabweichung} / \text{Mittelwert} \times 100$

Die Interassay-Variabilität lag stets unter 15,2% und die Intraassay-Variabilität unter 11,5%, die Ergebnisse also zuverlässig reproduzierbar (s. **Tabelle 22**).

Tabelle 22: Inter-/Intraassay Variabilität ELISA

<i>Interassay-Variabilität</i>	<i>AAV2.WT</i>	<i>AAV2.GL</i>	<i>AAV2.NN</i>
CV%	13,23	9,39	15,20
<i>Intraassay-Variabilität</i>	<i>AAV2.WT</i>	<i>AAV2.GL</i>	<i>AAV2.NN</i>
CV%	11,47	11,20	11,18

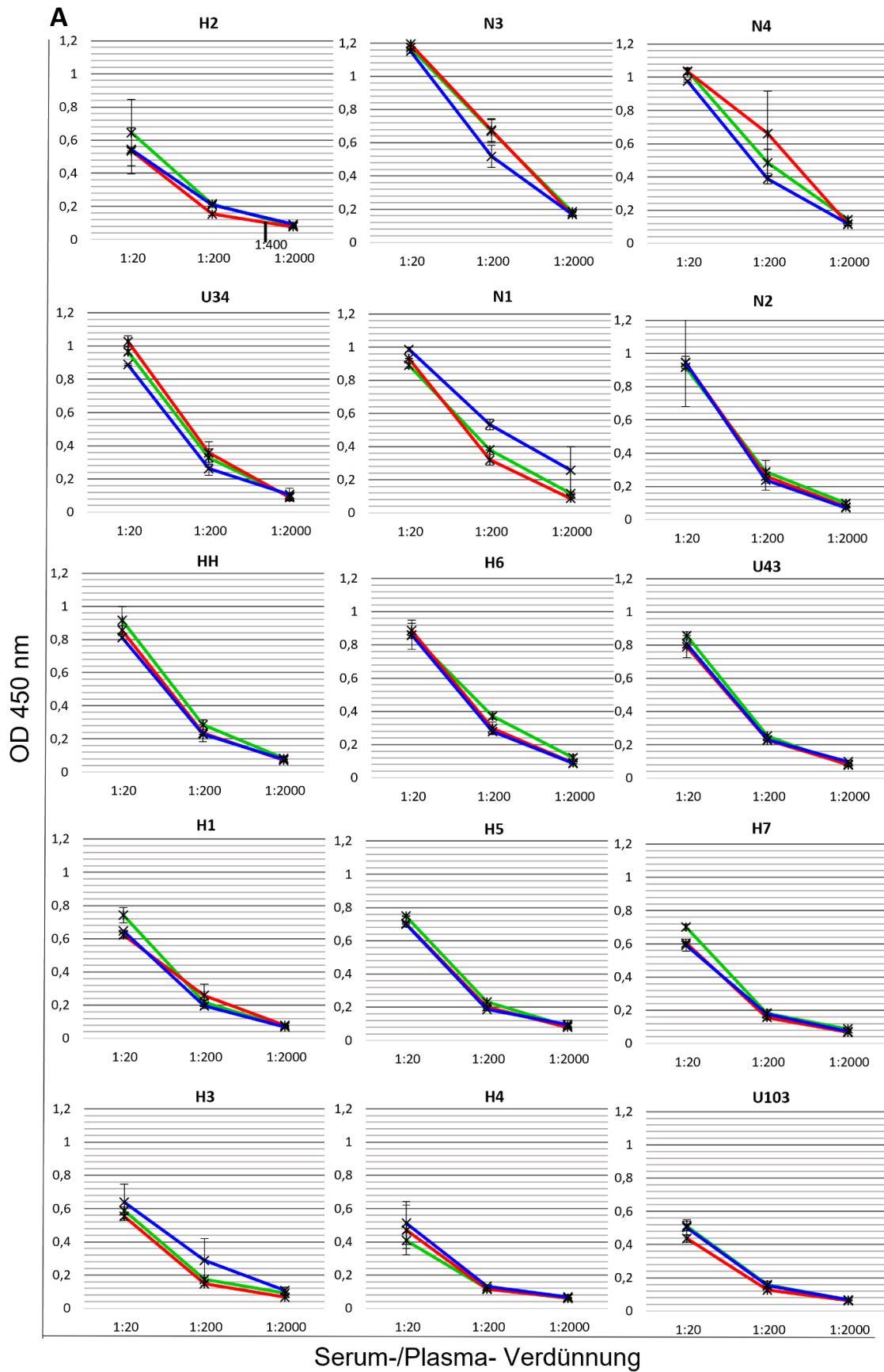
3.1.3 Vektorspezifische Antikörper der Blutspender

Zur Untersuchung der Antikörperbindung an AAV2.WT und die Varianten AAV2.GL und AAV2.NN wurden Seren von 24 verschiedenen Spender mittels indirektem ELISA untersucht. Die ELISA-Platten wurden mit der zuvor bestimmten optimalen Kapsidkonzentration von $6,9 \times 10^7$ Kapsiden/100 μ l beschichtet und mit Serumverdünnungen von 1:20, 1:200 und 1:2000 bestückt. Der anti-human-Ig-spezifische, biotinylierte Sekundärantikörper wurde gemäß Herstellerangaben in der höchsten Konzentration eingesetzt (1:20.000), unter Verwendung eines anti-AAV2 haltigen Referenzserums (H2) beziehungsweise Puffer als Positiv- und Negativkontrollen. Spender galten als seropositiv, wenn die OD bei einer Serumverdünnung von 1:400 größer war als die des Referenzserums bei derselben Verdünnung.

Von den 24 Probanden hatten 2 (8,34%) keine kapsidspezifischen Antikörper, 22 Spender (91,67%) waren hingegen seropositiv. Negativ waren die Spender H4 und U103. Die höchsten Antikörpertiter zeigten die Spender N3, N4, U34, N1, U13, HP, U49 (s. **Abbildung 15**).

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Gesamtantikörperbindung an AAV2.WT und die Varianten AAV2.GL und AAV2.NN festgestellt werden. Die Peptidinsertionen der

Variantenkapside konnten folglich die Bindung von Anti-AAV2.WT-Antikörpern der Spender nicht beeinflussen. Diese Antikörper, die von früheren Infektionen der Spender mit natürlich vorkommendem AAV2.WT stammen, sind zwischen dem Wildtyp und den Varianten kreuzreaktiv (s. **Abbildung 16**).



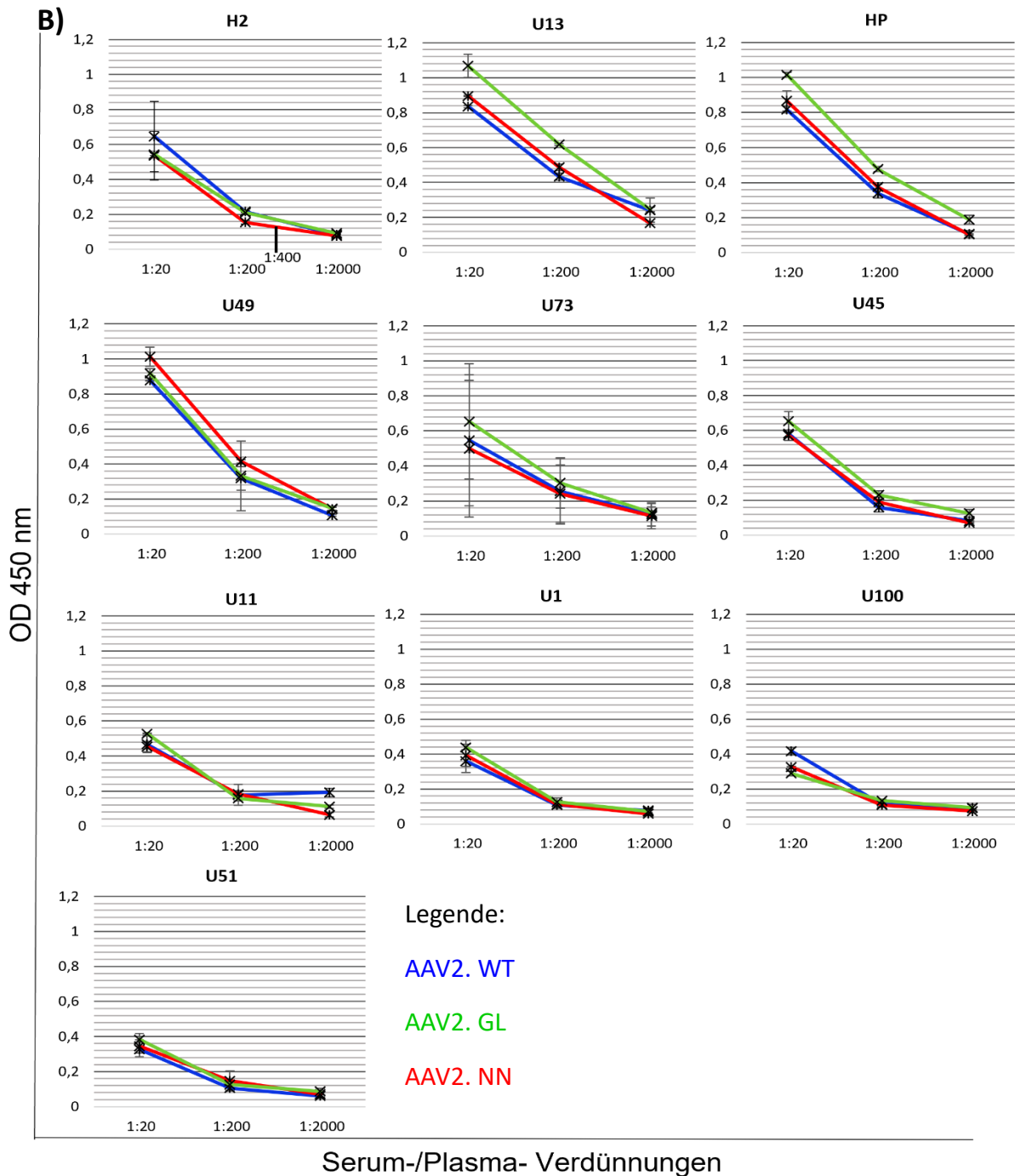


Abbildung 15: Titrationskurven der getesteten Serum- und Plasma-Proben auf Antikörper gegen AAV2.WT (blau), AAV2.GL (grün) und AAV2.NN (rot)

Die Proben wurden an zwei verschiedenen Zeitpunkten getestet (A, B). Aufgrund der Interassay-Variabilität wurde das Serum H2 als Referenzserum mitgetestet. Die Proben sind, nach Darstellung des Referenzserums H2, in absteigender Reihenfolge, mit den höchsten ODs beginnend sortiert. Der Cut-off zu jedem Zeitpunkt, war abhängig von der gemessenen optischen Dichte OD des Referenzserums H2 (gelb). Proben galten als positiv, wenn bei einer Verdünnung von 1:400 die OD 450 des Testserums \geq der OD 450 des Referenzserums H2 bei 1:400 war. Zum Zeitpunkt A bzw. B wurden Proben bei einer Verdünnung von 1:400 mit: **A)** OD < 0,1; **B)** OD < 0,13 als negativ erachtet.

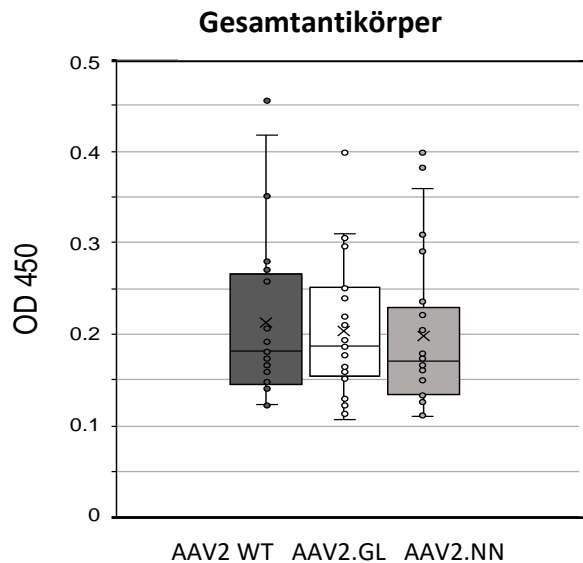


Abbildung 16: Gesamt-Antikörperantwort auf den AAV2 Wildtyp sowie die Mutanten AAV2.GL und AAV2.NN

Gesamt-Antikörperantworten auf AAV2-Kapside AAV2.WT, AAV2.GL und AAV2.NN, berechnet aus den ODs aller Serumproben bei einer Verdünnung von 1:400. Die mittlere Linie des Kasten-diagramms repräsentiert den Median, X den Mittelwert und die oberen und unteren Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum mit 1,5-fachem Interquartilsabstand.

3.1.3.1 Vergleich der Antikörper-Bindungen von Serum versus Plasma

Plasma wird aus heparinisiertem Blut gewonnen und enthält möglicherweise noch geringe Mengen an Heparin, das über die HSPG-Bindungsdomäne an AAV2-Kapside binden und somit eine wichtige Antikörperbindungsstelle (v. a. für neutralisierende Antikörper) blockieren könnte. Daher wurden Serum und Plasma im direkten Vergleich im Bindungs-ELISA getestet. Es konnte kein Unterschied in der Antikörperbindung an die AAV-Kapside zwischen Serum und Plasma festgestellt werden (s.

Abbildung 17). Nachfolgend wurde daher nicht mehr zwischen Plasma und Serum unterschieden und beides nur noch als "Serum" bezeichnet.

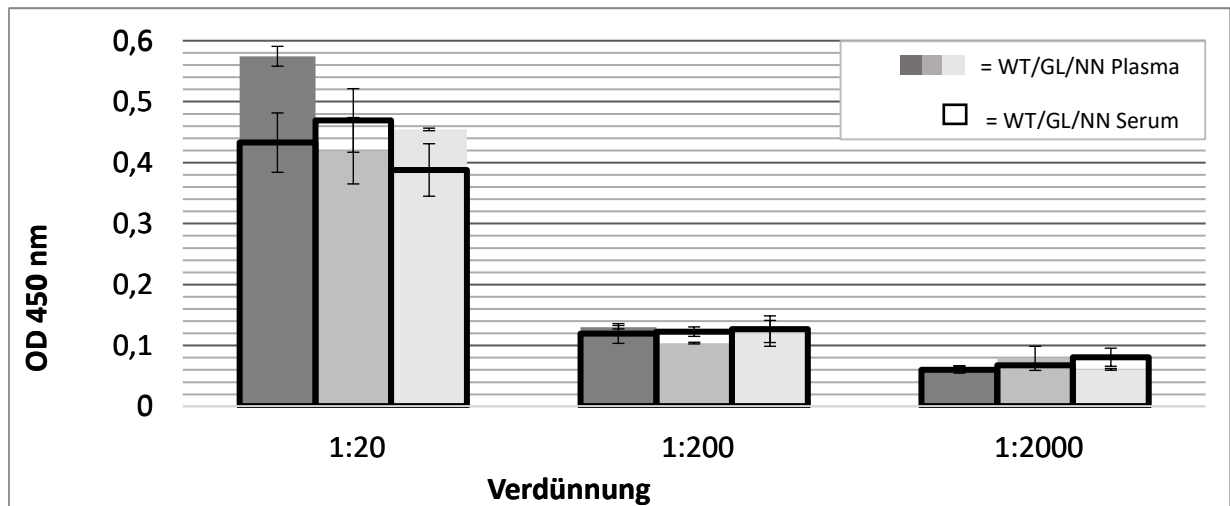


Abbildung 17: Vergleich von Serum und Plasma des Spenders H1

Die y-Achse zeigt die Optische Dichte gemessen mit einer Wellenlänge von 450nm, auf der x-Achse sind die jeweiligen Plasma/Serum Verdünnungen eines exemplarischen Blutspenders gezeigt. Die ODs der Antikörperantworten aus Plasma auf die verschiedenen Kapside sind als Säulen in unterschiedlichen Grautönen dargestellt (WT: dunkelgrau, GL: mittelgrau, NN: hellgrau), die jeweils korrespondierenden ODs gemessen mit Serum desselben Spenders vom gleichen Zeitpunkt sind als überlagerte Säulen mit schwarzem Rahmen ohne Füllung gezeigt.

3.1.4 Etablierung des Neutralisationsassays

3.1.4.1 Titration der Vektoren zur Bestimmung der optimalen Transduktionseffizienz (Multiplizität der Infektion, MOI)

Mit Multiplizität der Infektion wird das Verhältnis von Viruspartikeln zu deren Zielzellen beschrieben. Um die optimale Menge an Viruspartikeln für die Transduktion von HeLa-Zellen zu bestimmen, wurden der AAV2.WT (Präp 05/19) mit verschiedenen MOIs von 20, 100, 160, 200, 250, 1000, 10000 bei 48-stündiger Inkubation getestet (s. **Abbildung 18**). Für die Neutralisationstestung der Seren wurde der AAV2.WT mit einer MOI von 20, AAV2.GL mit einer MOI von 200 und AAV2.NN mit einer MOI von 250 eingesetzt (s. **Abbildung 19**).

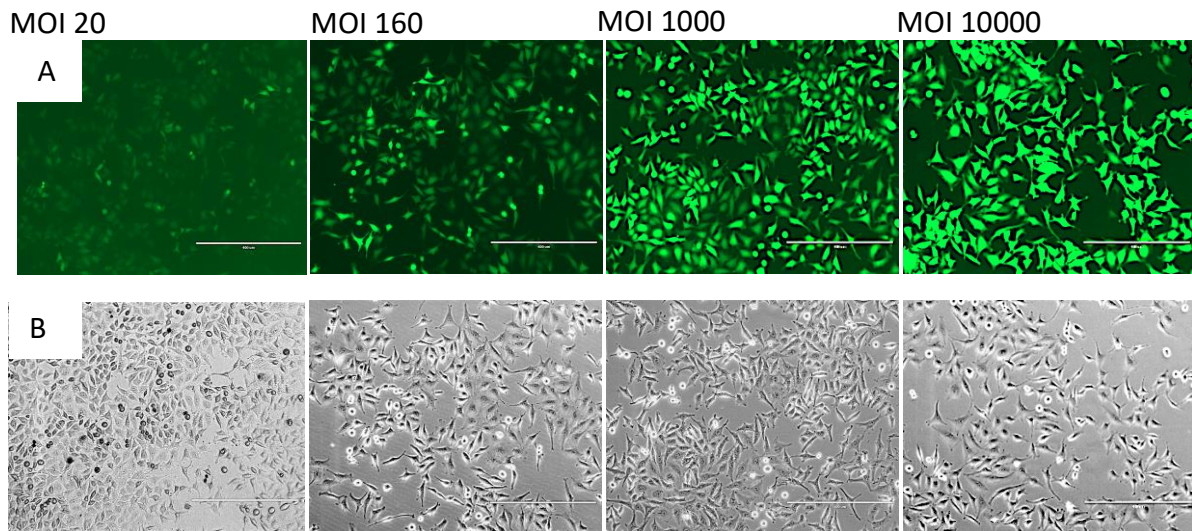


Abbildung 18: MOI-Testung von AAV2 WT und HeLa-Zellen

Reihe A) Transduzierte Zellen (GFP+, grüne Fluoreszenz); **Reihe B)** entsprechende Ausschnitte im Phasenkontrast. Die Aufnahmen entstanden mit dem EVOS XL Core Fluoreszenzmikroskop. Der Maßstab entspricht 400 µm.

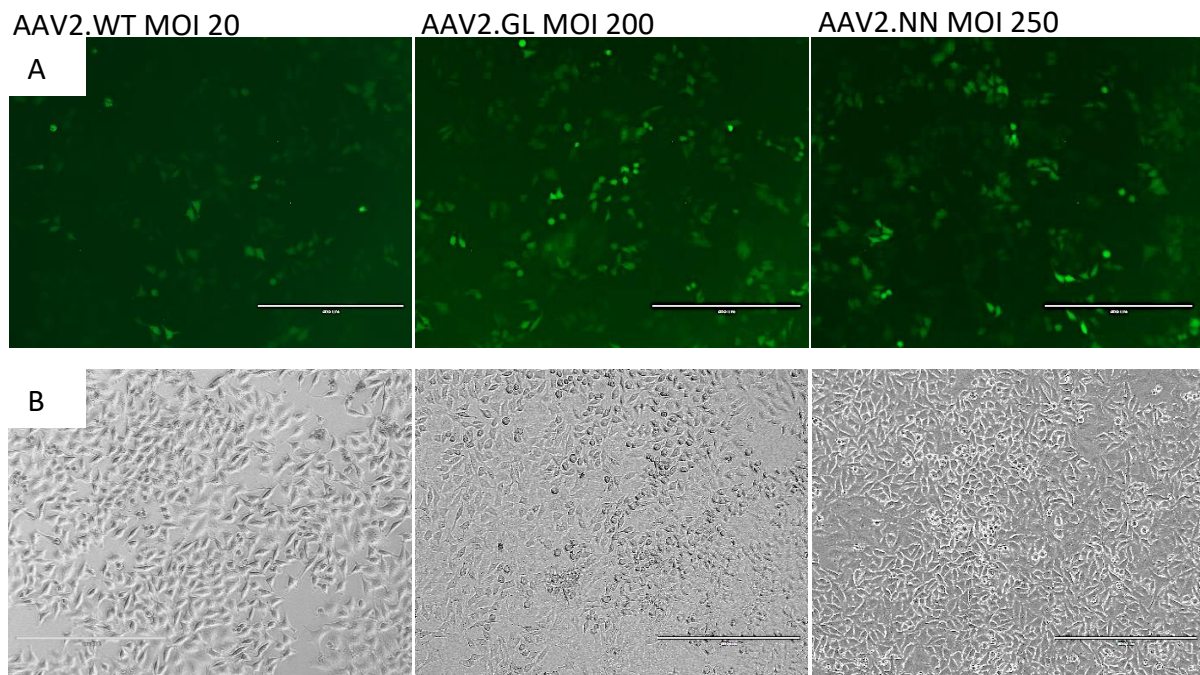


Abbildung 19: MOIs der verschiedenen Vektoren für den Einsatz im Neutralisationsassay

Reihe A) Transduzierte Zellen (GFP+); **Reihe B)** Entsprechende Ausschnitte im Phasenkontrast. Die Aufnahmen entstanden mit dem EVOS XL Core Fluoreszenzmikroskop. Der Maßstab entspricht 400 µm.

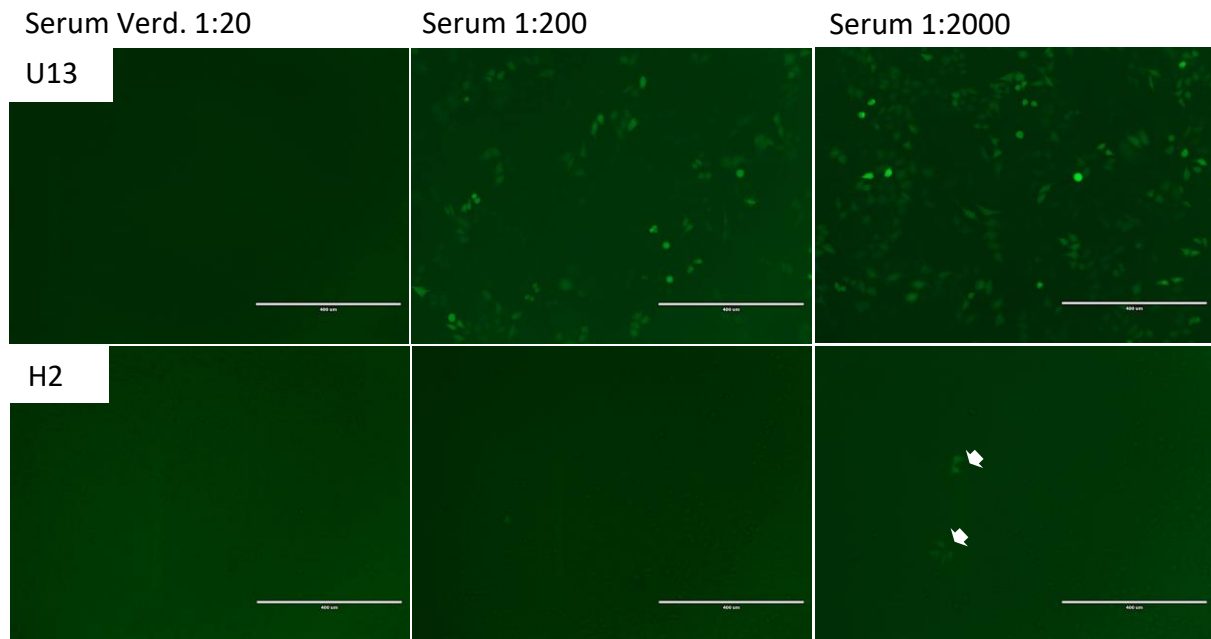


Abbildung 20: Beispiele für Neutralisation des AAV2 WT durch die Seren U13 (wenig Neutralisation) und H2 (gute Neutralisation)

Bei Serum H2 sind erst bei der Verdünnung von 1:2000 schwach GFP+ Zellen zu erkennen (unten links, weiße Pfeile). Die Aufnahmen entstanden mit dem EVOS XL Core Fluoreszenzmikroskop. Der Maßstab entspricht 400 μm .

3.1.4.2 Titration der Serum/Plasma Proben zur Bestimmung der optimalen Verdünnungen

Zur weiteren Etablierung der Neutralisationsassays wurden Seren von drei Spendern getestet, die sich folgendermaßen auszeichneten: Spender H1 und H6 hatten zwar gemäß ELISA nur intermediäre Antikörpertiter ($H6 > H1$), aber zelluläre Reaktionen auf AAV2-Vektoren gezeigt; Spender H2 hatte jahrelang mit AAV2-Vektoren experimentell gearbeitet, daher wurde vermutet, dass dieses Serum auch neutralisierende Antikörper enthalten würde.

Die Seren wurden zunächst in Verdünnungen von 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:250; 1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000; 1:3000 und 1:4000 getestet. Aufgrund der schwachen Neutralisation der Seren H1 und H6 wurden Verdünnungen ab 1:20; 1:200; 1:2000 für alle weiteren Seren eingesetzt. Serum H2 zeigte sehr starke Neutralisation, daher wurden für alle Seren weitere Verdünnungen von 1:1000; 1:5000; 1:25000; 1: 125000 verwendet, um auch bei hoch neutralisierenden Seren noch einen Effekt zu sehen (s. **Abbildung 20**).

3.1.4.3 Grenzwerte für positive Vektorbindung der neutralisierenden Antikörper

Da höhere Serumkonzentrationen zu einer unspezifischen Inhibition der Transduktion führen können, wurde der Grenzwert bei 50 % Neutralisation mit einer Serumverdünnung von $> 1:40$ festgesetzt. Dies wurde anhand der Titrationskurven der Seren berechnet.

3.1.4.4 Wahl der Nachweismethode für die Transduktionseffizienz

Das Neutralisationsassay wurde sowohl mit dem automatischen Zellzähler Countess als auch durch FACS-Analyse quantifiziert. Der Vergleich der von Countess und FACS erfassten transduzierten GFP+ HeLa-Zellen zeigte eine deutlich höhere Sensitivität der FACS-Analyse (s. **Abbildung 21**). Im FACS wurden auch schwach GFP-exprimierende Zellen erkannt, die vom Countess-Zähler unentdeckt bleiben. Daher wurden alle Neutralisationsassays im FACS analysiert.

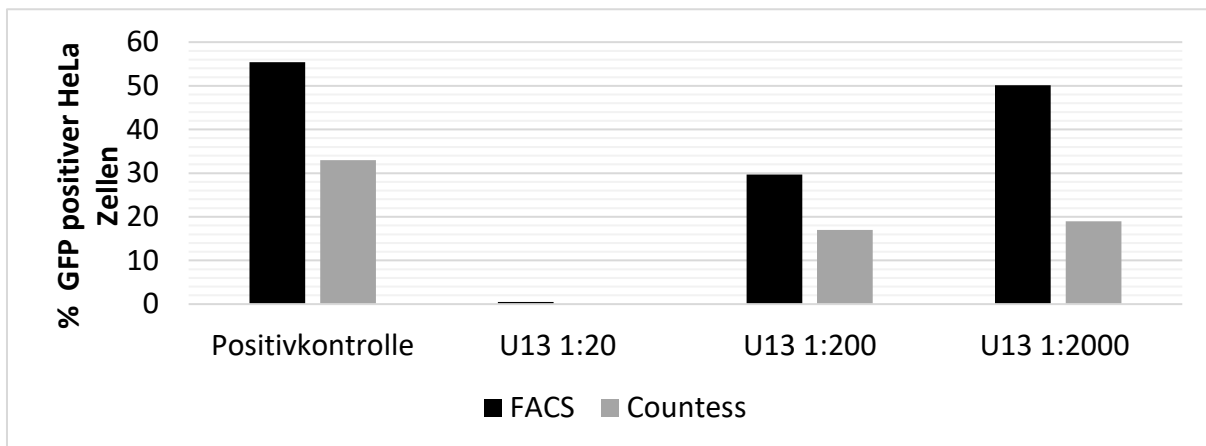


Abbildung 21: Vergleich der Messung GFP-positiver Zellen in der Countess und im FACS

Auf der y-Achse ist der Anteil GFP positiver Zellen dargestellt, auf der x-Achse die maximale Transduktionseffizienz von AAV2.WT ohne Serum (Positivkontrolle) sowie die Neutralisation nach Titration des Serums U13. Die Messungen der GFP+ Zellzahlen im FACS (schwarze Säulen) und Countess (graue Säulen) sind im Vergleich dargestellt.

3.1.4.5 Berechnung der Kapsidmengen

Um die Neutralisation der Vektoren vergleichen zu können, ist es wichtig, die Kapsidbefüllung der Chargen zu berücksichtigen. Da für das Neutralisationsassay die Transduktion der HeLa-Zellen vergleichbar sein musste, wurden abhängig vom jeweiligen Kapsid (AAV2.WT, AAV2.GL, AAV2.NN) unterschiedlich viele Vektorgenome (hier: für GFP kodierend zum Nachweis der Transduktion) pro HeLa-Zelle eingesetzt. Dabei ist zu beachten, dass, neben den detektierbaren und mit Vektorgenom (für GFP-kodierend) gefüllten Kapsiden, auch leere Kapside neutralisiert werden. Folglich werden neutralisierende Antikörper abgefangen, die ansonsten genomhaltige Kapside binden könnten. Deshalb gilt: je geringer der Gehalt an Vektorgenom, desto größer die Menge leerer Kapside, und desto größer der Neutralisationsvorteil dieser Chargen. Für AAV2.WT (05/19) waren nur 9,47%, für AAV2.GL (51/18) 14,25% und für AAV2.NN (50/18) 15,27% der Kapside gefüllt. Dieser vermeintliche Fehler wurde in der Auswertung der Daten berücksichtigt und mit folgender Formel herausgerechnet:

Kehrwert der Plasma- bzw. Serumverdünnung : (prozentuale Befüllung der Kapside x 100)

3.1.4.6 Interassay-Variabilität

Die Interassay-Variabilität wurde wie für die Bestimmung der gesamten Antikörper (unter Sektion 3.1.2.3 beschrieben) und durch wiederholte Testung der Spender H1, H6, U34 berechnet. Die Interassay-Variabilität betrug 17,3%.

3.1.5 Neutralisierende vektorspezifische Antikörper

Die für eGFP kodierenden Vektoren wurden mit den Serum-Proben präinkubiert, um eine effiziente Bindung der Serumantikörper an die AAV2-Vektorkapside zu ermöglichen. Anschließend wurde das Serum-Vektorgemisch für die Transduktion 48 Stunden lang mit den HeLa-Zellen kultiviert. Die Transduktionseffizienz, die reziprok zur Antikörper-Neutralisation ist, wurde über die GFP-Fluoreszenz der transduzierten HeLa-Zellen im FACS ausgelesen. Ein Beispiel einer solchen FACS-Analyse ist in (s. **Abbildung 22**) dargestellt.

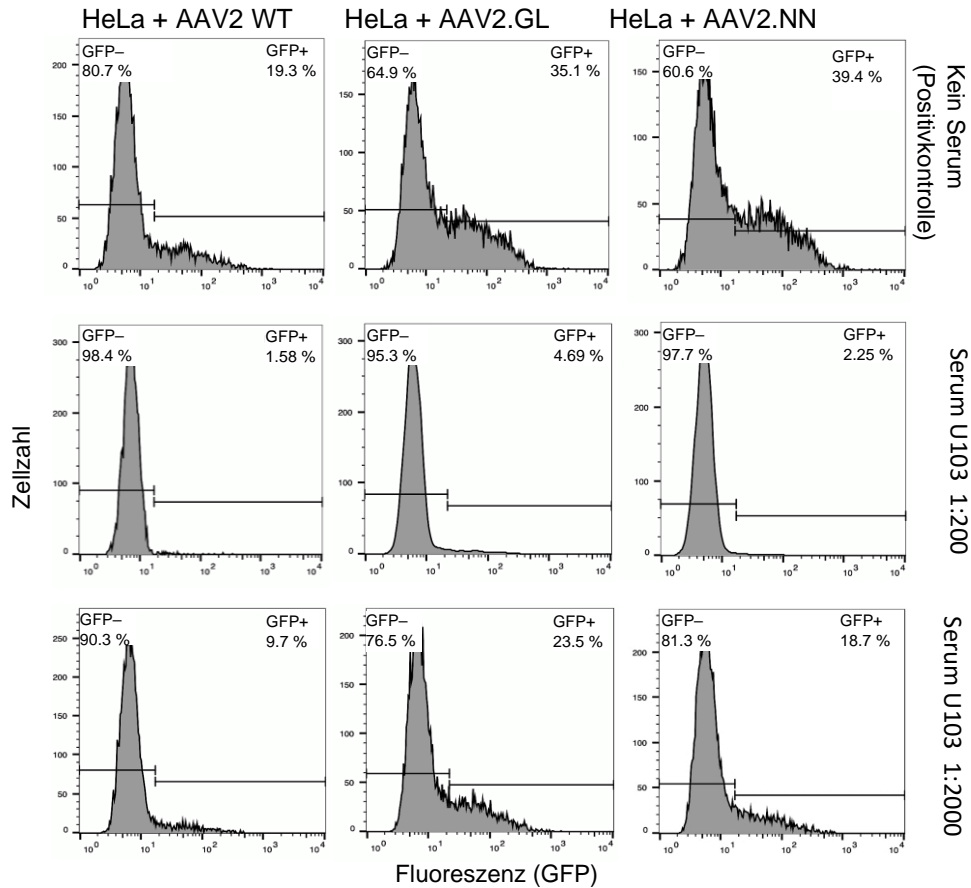


Abbildung 22: Darstellung von eGFP+ HeLa Zellen nach Transduktion mit AAV2 WT, AAV2.GL, AAV2.NN und Inkubation mit Serum U 103 als Dot-Plot im FACS

Die x-Achse gibt die Fluoreszenzintensität der GFP+ HeLa-Zellen an. Die maximale Transduktionseffizienz ohne neutralisierendes Serum ist in der obersten Reihe für die drei Vektoren (in senkrechten Spalten) dargestellt. In der 2. und 3. Reihe sind Diagramme der HeLa-Fluoreszenz mit jeweils steigenden Verdünnungen eines neutralisierenden Serums gezeigt. Der hohe, linke Peak stellt die GFP-negativen, nicht-transduzierten HeLa-Zellen dar und ist durch die linke waagrechte Linie eingegrenzt (prozentualer Anteil dieser Zellen in jedem Histogramm oben links angegeben). Die rechts davon lokalisierten Zellen sind Vektor-transduziert und somit GFP+ (prozentualer Anteil der GFP+ Zellen oben rechts in den Diagrammen). Mit steigender Serumverdünnung nimmt die Neutralisation ab und die GFP+ Zellpopulation zu.

Tabelle 23: Auflistung der Serumverdünnungen für 50% Transduktion der HeLa-Zellen mit den Vektoren AAV2.WT, AAV2.GL und AAV2.NN

Kehrwert der Serumverdünnungen	WT	GL	NN
U11	25049,37	4380,98	19576,10
Maus	5191,79	3487,72	3396,46
H2	2405,26	1299,23	1349,18
U1	990,80	444,84	710,02
N2	443,46	197,23	252,24
H5	433,39	276,19	348,17
U100	352,08	157,11	312,64
N1	264,41	127,65	148,19
H3	248,79	114,95	142,69
U103	208,51	101,91	137,86
U45	171,13	119,44	130,84
U73	155,74	72,76	118,20
N3	149,78	75,88	79,42
U43	144,85	74,49	86,58
HP	123,15	113,59	141,37
H4	116,01	61,71	73,56
N4	35,83	12,14	27,18
U13	22,92	16,63	22,75
U51	21,37	20,01	25,24
H7	11,07	8,20	7,19
H6	10,96	8,11	13,60
U49	9,25	9,72	9,96
H1	8,25	7,00	6,85
U34	7,54	6,23	8,46

Die Seren sind nach absteigender Neutralisation sortiert, die 8 nicht-neutralisierenden Seren sind fett gedruckt.

Die Neutralisationseffizienz wurde als die Serumverdünnung, bei der eine 50 %ige Neutralisation der Vektoren erreicht wird, bestimmt. Die berechneten Werte für alle Seren und die jeweiligen Vektoren sind in **Tabelle 23** aufgeführt. Die Mittelwerte der Kehrwerte aller Serumverdünnungen bei 50% Transduktion für die jeweiligen Vektoren sind als Kastendiagramme in **Abbildung 23** dargestellt.

Die Ergebnisse zeigten eine geringere Neutralisation der beiden modifizierten Vektoren AAV2.GL und AAV2.NN im Vergleich zum Wildtyp AAV2. Bei einem Schwellenwert für die Seropositivität bei einer Serumverdünnung von $\geq 1:40$ hatten lediglich 65.2 % (15 von 23) der Probanden neutralisierende Antikörper gegen die drei getesteten Vektoren. Serum H2 zeigt

die höchste Neutralisation, gefolgt von den Seren U1, U43 und HP. Die gemessene Neutralisation der einzelnen Vektoren war individuell unterschiedlich.

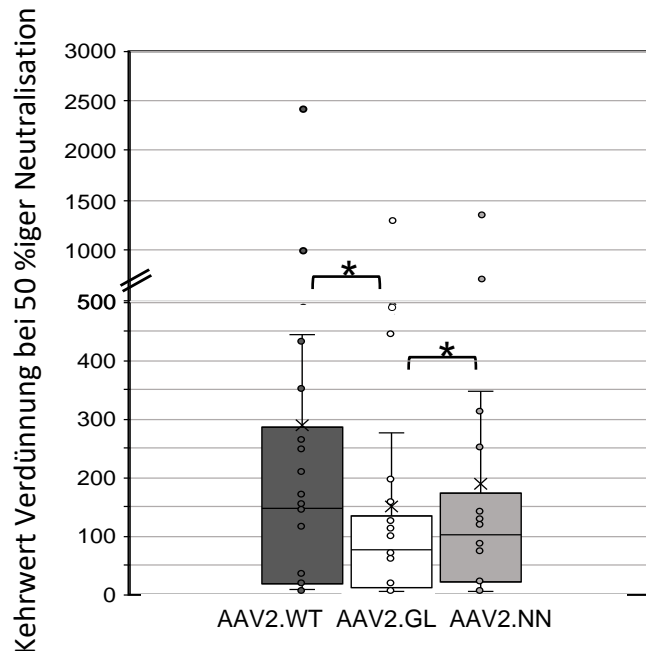


Abbildung 23: Vektorspezifitäten neutralisierender Antikörper

Die Kastendiagramme zeigen die neutralisierenden Antikörper für die Vektoren AAV2.WT, AAV2.GL und AAV2.NN. Auf der y-Achse ist die Serumverdünnung bei 50% Neutralisation dargestellt. Die mittlere Linie der Kastendiagramme repräsentiert den Median, X den Mittelwert und die oberen und unteren Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum mit 1,5-fachem Interquartilsabstand. AAV2.GL wurde signifikant geringer neutralisiert als AAV2.WT ($p < 0.001$) und AAV2.NN ($p < 0.01$).

Eine 50 %ige Neutralisation der Vektoren wurde im Durchschnitt bei einer Serumverdünnung von 1:147 für AAV2.WT, 1:102 für AAV2.NN und 1:75 für AAV2.GL erzielt. Um die Varianten zu neutralisieren, wurden höhere Serumkonzentrationen benötigt als für den Wildtyp. AAV2.GL wurde signifikant weniger neutralisiert als der Wildtyp ($p < 0,001$) und die Vektorvariante AAV2.NN ($p < 0,01$). Dieses Reaktionsmuster war bei allen individuellen Seren zu beobachten (s. **Abbildung 23**).

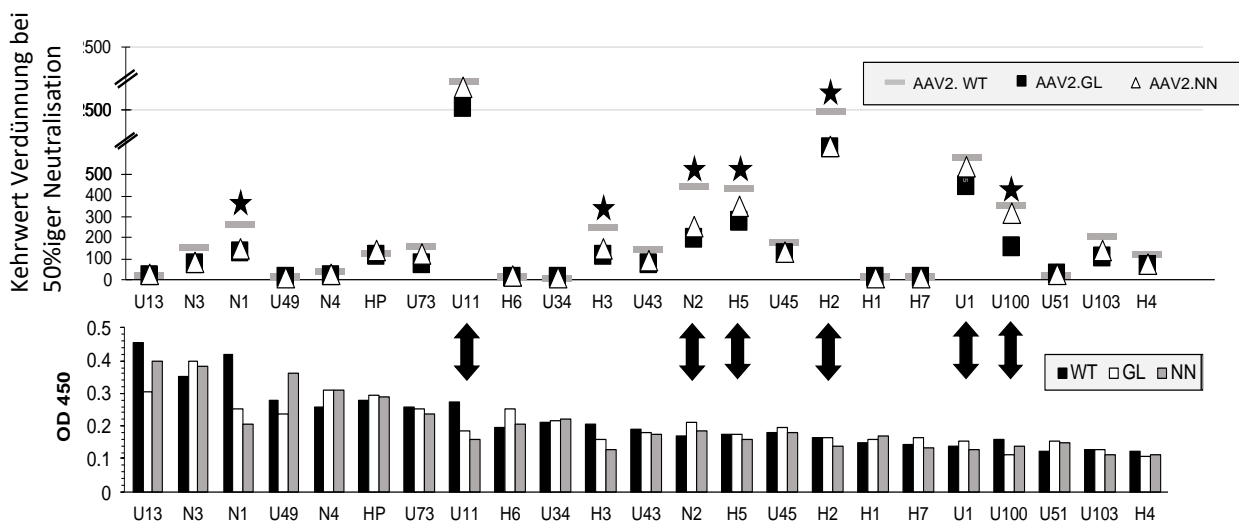
Der Unterschied in der Neutralisation zwischen AAV2.GL und AAV2.NN war trotz der Signifikanz sehr gering, ein signifikanter biologischer Unterschied zwischen den beiden Kapsidvarianten ist dadurch wahrscheinlich eher nicht gegeben. Die geringere Neutralisationseffizienz der Kapsidvarianten könnte bei der retinalen Gentherapie dann eine Rolle spielen, wenn beim Patienten die Blut-Retina-Schranken vor der Gentherapie bereits gestört waren und so Serum

(mit neutralisierenden Antikörpern) aus dem Blut in Glaskörper oder Netzhaut eindringen konnte. In diesem Fall wäre eine verminderte Neutralisation von Vorteil für einen besseren Erfolg der Gentherapie.

Obwohl die Unterschiede zwischen AAV2.WT und AAV2.NN statistisch nicht signifikant waren, konnte ein Trend zu einer geringeren Neutralisation und somit einem geringen Vorteil von AAV2.NN gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden.

3.1.6 Vergleich von gesamten und neutralisierenden Antikörpern

Es konnte keine Korrelation zwischen den Gesamt-Antikörpertitern und den neutralisierenden Antikörpern der einzelnen Spender festgestellt werden. So hatten manche Spender hohe Gesamtantikörper-Titer bei gleichzeitig niedrigen oder keinen neutralisierenden Antikörpern und umgekehrt, wie die Seren der Spender U1 und U100 mit geringen Gesamtantikörpern bei hohen Neutralisationsraten, während die Seren U13, U49 und N4 zwar hohe Gesamtantikörper-titer hatten, die aber nicht neutralisierten. Spender H1 und H2 hatten vergleichbare Gesamtantikörper-titer, aber nur Spender H2 auch neutralisierende Antikörper (s. **Abbildung 24**).



Legende zur Abbildung 24 siehe nächste Seite.

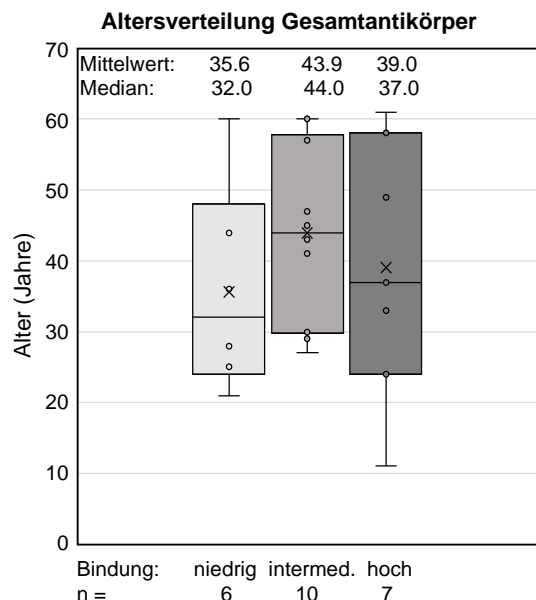
Abbildung 24: Gesamte anti-AAV2 Antikörper im Vergleich zu den neutralisierenden Antikörpern

Oberes Bild: Hier ist der Kehrwert der Serumverdünnung bei 50 %iger Neutralisation dargestellt, die jeweiligen AAV2-Vektoren mit verschiedenen Symbolen repräsentiert. Je höher der Wert, desto höher die Serumverdünnung bei halbmaximaler Neutralisation der Vektoren. Unteres Bild: Hier sind die jeweiligen Gesamtantikörpermengen als OD-Werte dargestellt und wie im Bindungs-ELISA bestimmt. Je höher der Antikörpertiter, desto höher ist die OD.

3.1.7 Altersabhängige Antikörperantworten der Spender

Da der Erstkontakt mit Adeno-assoziierten Viren meist im frühen Kindesalter stattfindet, ergab sich die Frage, ob eher jüngere Spender eine höhere Antikörperantwort haben oder eher ältere Spender mit möglicherweise bereits mehrfachem Kontakt mit AAV. Daher wurde für niedrige, mittlere und hohe Antikörpertiter das Durchschnittsalter der Spender ermittelt.

Zwischen niedrigen, mittleren und hochtitrigen Seren konnte kein signifikanter Unterschied im Alter der Spender festgestellt werden (s. **Abbildung 25**). Die Spender mit den niedrigsten Gesamtantikörpertitern (H7, U1, U100, U51, U103, H4) waren nur geringfügig jünger (Durchschnitt 35,6 Jahre) als die Spender mit mittleren (U11, H6, U34, H3, U43, N2, H5, U45, H2, H1; Durchschnitt 43,9 Jahre) oder hohen Antikörpertitern (U13, N3, N1, U49, N4, HP, U73; Durchschnitt: 39,0 Jahre). Auch bei den Neutralisationsassays konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Alter der Spender und der Neutralisationseffizienz der Antikörper festgestellt werden (s. **Abbildung 26**).



Legende zur Abbildung 25 siehe nächste Seite.

Abbildung 25: Altersverteilung der gesamten anti-AAV-Antikörperantworten

Der linke Kasten repräsentiert Seren mit niedrigem Titer, der mittlere die intermediären und der rechte Kasten die hochtitrigen Seren. Eine "niedrige" Bindung der Antikörper wurde definiert als eine OD < 0,1 bei einer Verdünnung von 1:400, "intermediäre" Bindung als OD von > 0,1 bis < 0,24 und eine "hohe" Bindung als OD > 0,24. Mittelwert und Median zeigen das Alter der Spender in Jahren an, unter der x-Achse sind Bindungsintensität und Gruppengrößen (n) angegeben. Die mittlere Linie des Kastendiagramms repräsentiert den Median, X den Mittelwert und die oberen und unteren Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum mit 1,5-fachem Interquartilsabstand.

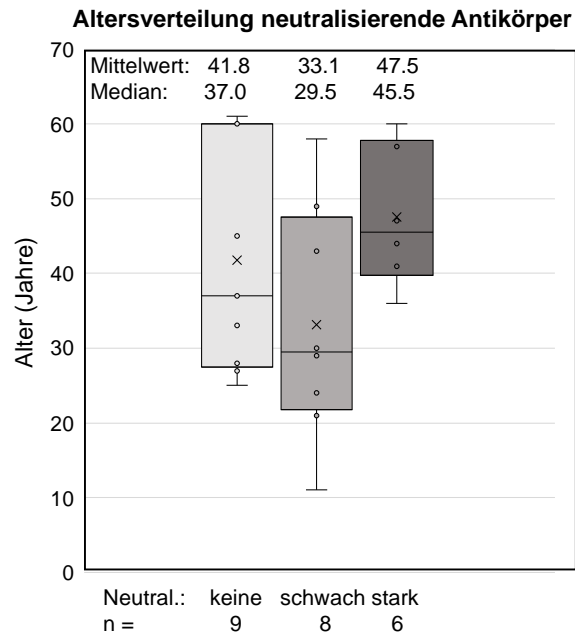


Abbildung 26: Altersverteilung der neutralisierenden Antikörperantworten

Der linke Kasten repräsentiert die nicht-neutralisierenden Seren, der mittlere die schwach und der rechte Kasten die stark neutralisierenden Seren. Bei einer Verdünnung von < 1:40 galten Spender als negativ. Eine "schwache" Neutralisation wurde definiert als eine Verdünnung von > 1:50 bis < 1:300 bei 50% Neutralisation, "starke Neutralisation" als Verdünnung > 1:300. Mittelwert und Median zeigen das Alter der Spender in Jahren an, unter der x-Achse sind Neutralisationsintensität und Gruppengröße (n) angegeben. Die mittlere Linie des Kastendiagramms repräsentiert den Median, X den Mittelwert und die oberen und unteren Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum mit 1,5-fachem Interquartilsabstand.

3.2 Zelluläre Immunantworten auf AAV2 WT und die Varianten AAV2.GL und AAV2.NN

3.2.1 Etablierung der Stimulationsassays

Die optimalen Kultur- und Stimulationsbedingungen für die zelluläre Immunantwort auf die AAV2-Vektoren wurde mit derselben Vektorpräparation von AAV2.GL scCrimson ausgetestet

wie die Antikörperassays und die Stoffwechselaktivität als auch Proliferation der Zellen im XTT-Assay gemessen.

3.2.1.1 Mediumzusätze

Als Mediumzusatz für die in vitro-Stimulation wurden sowohl 5% FKS, HS-Pool und autologes Spenderserum getestet. Zuerst wurde das Assay mit FKS durchgeführt, allerdings zeigte sich hierbei eine hohe Grundaktivität der Zellen durch unspezifische Aktivierung. Daher wurden anschließend statt FKS gepooltes HS oder autologes Serum getestet. Ein Unterschied zwischen autologem Serum oder dem Serumpool war nicht zu sehen. Da zu diesem Zeitpunkt weder die Neutralisationskapazität der einzelnen Spenderseren noch der Einfluss möglicher Antikörperbindungen an die Vektoren auf die zelluläre Stimulation bekannt waren und davon ausgegangen wurde, dass jedes spenderspezifische Serum unterschiedliche Titer neutralisierender Antikörper enthält, wurde für die Vergleichbarkeit und Standardisierung der Stimulationsassays 5% Humanserumpool zum Medium hinzugegeben.

3.2.1.2 Zellzahl der Lymphozyten und Vektordosis

Getestet wurden Zellzahlen von 1×10^6 Zellen bis 1×10^5 Zellen/Kavität. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Reaktion auf die Kapside. Final wurden, je nach Ausbeute der Zellen aus dem peripheren Blut des jeweiligen Spenders, 2×10^5 - 8×10^5 Zellen/Kavität eingesetzt. Da in jedem Assay die Stimulation mit der jeweiligen Mediumkontrolle verrechnet wurde, wurden Unterschiede bei den eingesetzten Zellzahlen nivelliert.

Der Testvektor (Ausgangskonzentration $2,74 \times 10^{11}$ Kapside/ml) wurde zunächst titriert und in Konzentrationen von $2,74 \times 10^8$ /ml (Verdünnung 1:1000), 9×10^7 /ml (1:3000), 3×10^7 /ml (1:9000) und 1×10^6 /ml (1:27.000) eingesetzt.

Schließlich wurden alle Proben mit Zusatz von $2,74 \times 10^8$ /ml (Verdünnung 1:1000), $2,74 \times 10^7$ /ml (Verdünnung 1:10.000), $2,74 \times 10^6$ /ml (Verdünnung 1:100.000) Kapsiden stimuliert.

3.2.1.3 Stimulationsdauer

Als Stimulationskontrolle für Lymphozyten wurden das Impfantigen Tetanus-Toxoid (TT) und PPD (Tuberkulin) eingesetzt. Zunächst wurde jeweils nach 3, 4 und 5 Tagen die Aktivität der Zellen eines Spenders als Reaktion auf die AAV-Kapside und Kontrollantigene im XTT-Assay untersucht (s. **Abbildung 27**), um die optimale Stimulationsdauer zu bestimmen. Da sich keine weitere Steigerung der Stimulation durch eine verlängerte Inkubation zeigte, wurde eine 4-

tägige Kultivierung für das XTT-Assay gewählt. Sechs Stunden nach Zugabe von XTT-Reagenz wurde die optische Dichte gemessen.

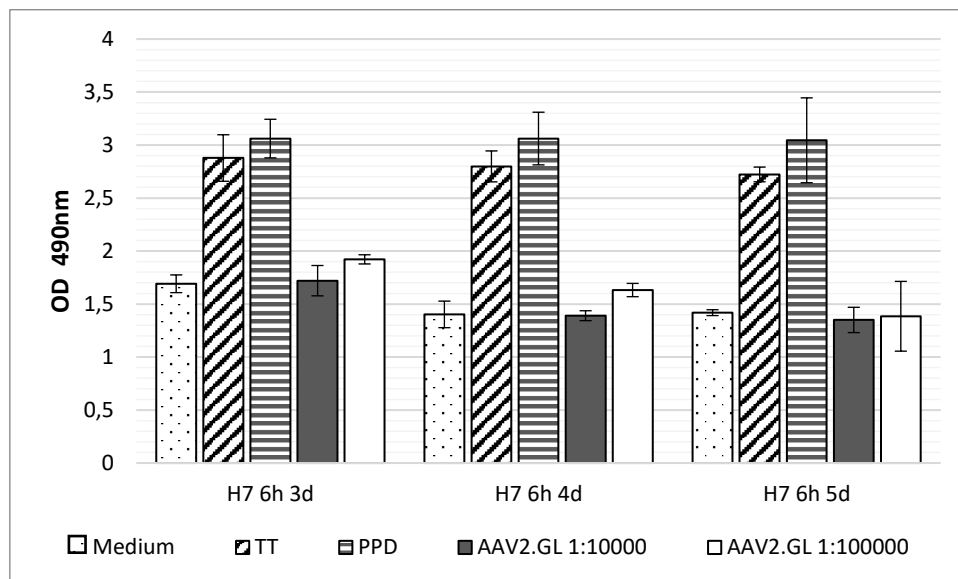


Abbildung 27: Etablierung der Stimulationsdauer der Lymphozyten mit Spender H7

Die Farbintensität des XTT-Substrats wurde nach 3, 4 und 5 Tagen jeweils nach 6 Stunden gemessen. Stimuliert wurde nur mit dem Testvektor AAV2.GL scCrimson. Auf der y-Achse ist die OD aufgetragen, auf der x-Achse die Länge der Stimulation mit verschiedenen Antigenen.

3.2.2 Stimulation von PBMCs mit den AAV2-Kapsiden - XTT-Assay

Nachdem der Serumzusatz, die optimalen Kapsidkonzentrationen und Stimulationsdauer bestimmt waren, wurde die zelluläre Immunantwort auf die AAV2 Kapsidvarianten von 5 verschiedenen Spendern jeweils als Triplikate bestimmt (s. **Abbildung 28**). Die Stimulationen wurden zweifach angesetzt, ein Ansatz wurde im XTT-Assay untersucht, vom anderen wurden täglich Proben der Kulturüberstände abgenommen und bei -80°C für spätere Untersuchungen der Zytokinsekretion gelagert.

Außer bei Spender H1 lagen im XTT-Assay bei den übrigen Spendern die OD 490-Werte der Mediumkontrolle höher als 1,0, und keiner der Spender zeigte auf die AAV2-Kapside eine besondere Reaktion im XTT-Assay, die Werte lagen nur bei AAV2.WT und AAV2.NN minimal über der Mediumkontrolle. Nur Spender H1 zeigte eine erhöhte Reaktion auf PPD, und sowohl H1 als auch H2 auch Reaktion auf TT, bei den übrigen Spendern war auch auf die Kontrollantigene keine Reaktion zu sehen, was mit einem abgeschwächten Impfschutz der Spender erklärt werden könnte (s. **Abbildung 28**).

Es waren auch keine Unterschiede bei den Stimulationen und vor allem keine Unterschiede bei den Titrationen der AAV2-Kapside zu sehen. Dies ist entweder darauf zurückzuführen, dass (a) die Spender keine AAV2-spezifischen Lymphozyten hatten, (b) die Grundstimulation eventuell bedingt durch Zugabe des Serumpools, schon so hoch war, dass spezifischen Reaktionen überdeckt wurden oder (c) die AAV2-Kapside von den in PBMC-Kulturen vorhandenen antigenpräsentierenden Zellen nicht adäquat prozessiert und präsentiert werden konnten.

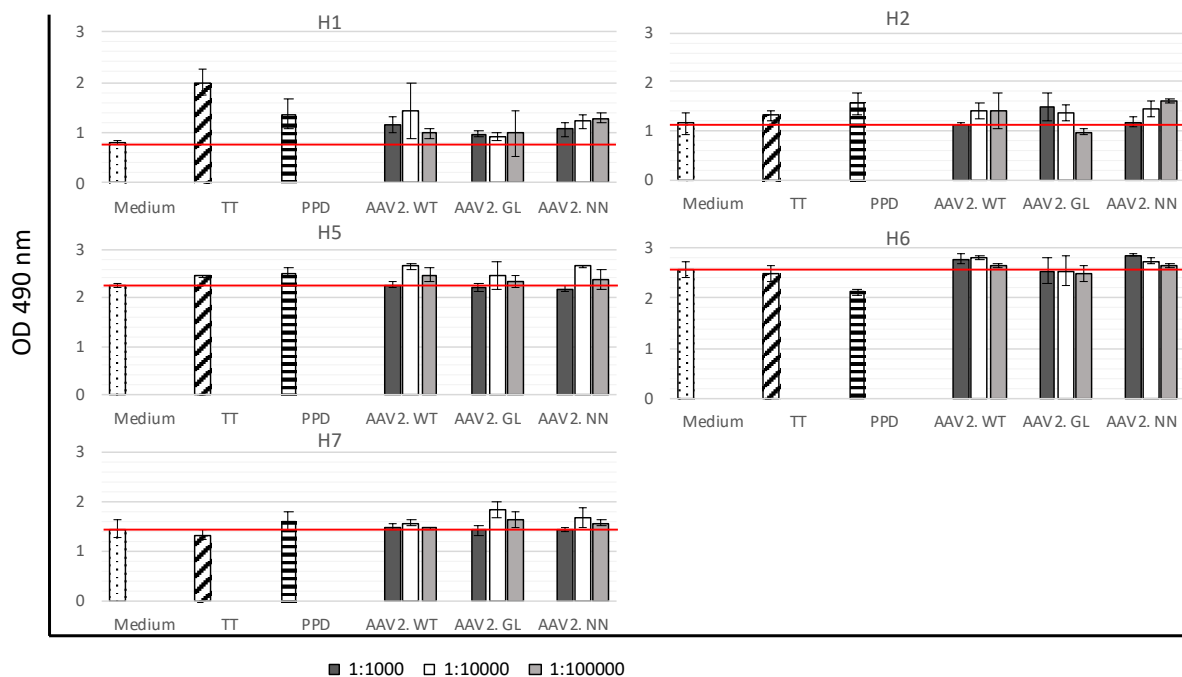


Abbildung 28: XTT-Assay nach PBMC-Stimulation mit AAV2.WT, AAV2.GL und AAV2.NN

Die Stimulationsintensität der Spenderlymphozyten ist als Mittelwert der ODs der Triplikatkulturen aus dem XTT-Assay angegeben. Die rote Linie markiert jeweils den Mittelwert der Mediumkontrolle.

3.2.3 Sekretion von Zytokinen und Chemokinen der stimulierten Lymphozytenkulturen

Ein wichtiger Parameter neben der Proliferation von Lymphozyten als Antwort auf ein Antigen ist auch die Sekretion von Faktoren wie Zytokinen und Chemokinen, die zur Kommunikation zwischen den Zellen dienen. Von allen vektorstimulierten Lymphozytenkulturen sowie von Medium, TT- und PPD-Kontrollen wurden für die Zytokinbestimmung täglich Überstände abgenommen. Die Überstände der jeweiligen Triplikate wurden vereinigt und schockgefroren. Für das Multiplex-Bead-Assay wurden die Überstände kurz vorher aufgetaut und die Überstände der einzelnen Abnahmezeitpunkte als auch Stimulationen zu gleichen Volumina vereinigt. Die Zytokinbestimmungen erfolgten nur mit diesen gepoolten Überständen. Mit der täglichen Ernte von Kulturüberständen, statt einmaliger Abnahme am Ende der

Stimulationsphase, sollen auch früh in der Lymphozytenaktivierung produzierte Faktoren erfasst werden, die möglicherweise nach 4 Tagen bereits von den Zellen selbst aufgebraucht waren. So erhält man einen Überblick über die tägliche Produktion von Zytokinen und Chemokinen.

Die gepoolten Kulturüberstände der Stimulationsassays der Spender H1, H2, H5, H6, und H7 wurden auf folgende 48 Zytokine und Chemokine getestet: CTACK, Eotaxin, BasicFGF, G-CSF, GM-CSF, Gro- α , HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-12 (p40), IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IP10, LIF, MCP-1, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , β -NGF, PDGF-BB, RANTES, SCF, SCGF- β , SDF-1 α , TNF- α , TNF- β , TRAIL, VEGF.

Bereits im XTT-Assay hatten sich bei der Titration der AAV2-Vektoren keine Unterschiede in der Stimulation gezeigt, was sich bei der Analyse der Zytokinsekretion bestätigte. Daher wurden von den Konzentrationen (pg/ml) der Zyto- und Chemokine der Stimulationen mit den drei Vektorverdünnungen die Mittelwerte gebildet und die Sekretionsindices der nachweisbaren Faktoren in **Abbildung 29** dargestellt. Der Sekretionsindex (SI) stellt den Quotienten aus der Sekretion der Antigen-stimulierten Kulturen und der Basissekretion im Kontrollmedium (ohne Antigen) dar. Ein Sekretionsindex > 2 wurde als relevant definiert. Von den 48 getesteten Zytokinen konnten nach Stimulation mit den AAV2-Vektoren nur 7 mit einem Sekretionsindex von über 2 nachgewiesen werden. Diese sieben nachgewiesenen Zytokine gehören zu der Gruppe der Monokine, d.h. Zytokine, die von Monozyten produziert werden, und sind in **Abbildung 29** gezeigt.

Die typischen T-Helferzell-Zytokine wie IFN- γ oder IL-17 konnten nicht als Reaktion auf die AAV-Kapside nachgewiesen werden. In den Kulturenüberständen, die von TT- bzw. PPD-stimulierten Zellen stammten, konnten jeweils die höchsten Zytokin- und Chemokinmengen nachgewiesen werden, mit Ausnahme von VEGF (nur nach PPD-Stimulation SI > 3) und IL-8/CXCL8 (nur nach TT-Stimulation erhöht, SI 6).

MIP-1 α /CCL3 wurde mit einem Sekretionsindex von über > 10 bevorzugt als Reaktion auf AAV2.GL und AAV2.NN, aber nicht auf AAV2.WT ausgeschüttet (SI < 2) (s. **Abbildung 29**).

IL-6, Gro-1 α /CXCL1 und IL-1 β wurden präferentiell nach Stimulation mit AAV2.NN nachgewiesen, aber nicht (Gro-1 α /CXCL1 und IL-1 β) oder deutlich weniger (IL-6) nach AAV2 WT- und AAV2.GL-Stimulation. So war insbesondere die IL-6 Produktion auf das Kapsid AAV2.NN mit

einem Sekretionsindex von 69 bis zu zehnfach höher als auf AAV2.WT (SI 6,6) und AAV2.GL (SI 8,8). LIF und IL-8/CXCL8 wurden nur als Reaktion auf AAV2.GL minimal hochreguliert, nicht jedoch auf AAV2.NN oder AAV2.WT. Interessanterweise wurde VEGF nur als Antwort auf den AAV2 WT (SI 4) und minimal auf PPD in erhöhter Menge nachgewiesen, TT und die Varianten AAV2.GL und AAV2.NN konnten keine VEGF-Sekretion in den Lymphozyten induzieren (s. **Abbildung 29**). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, weder zur Mediumkontrolle noch zu den anderen Vektoren allerdings konnten AAV2.GL und AAV2.NN im Vergleich zum Wildtyp eher eine Sekretion von Monokinen induzieren.

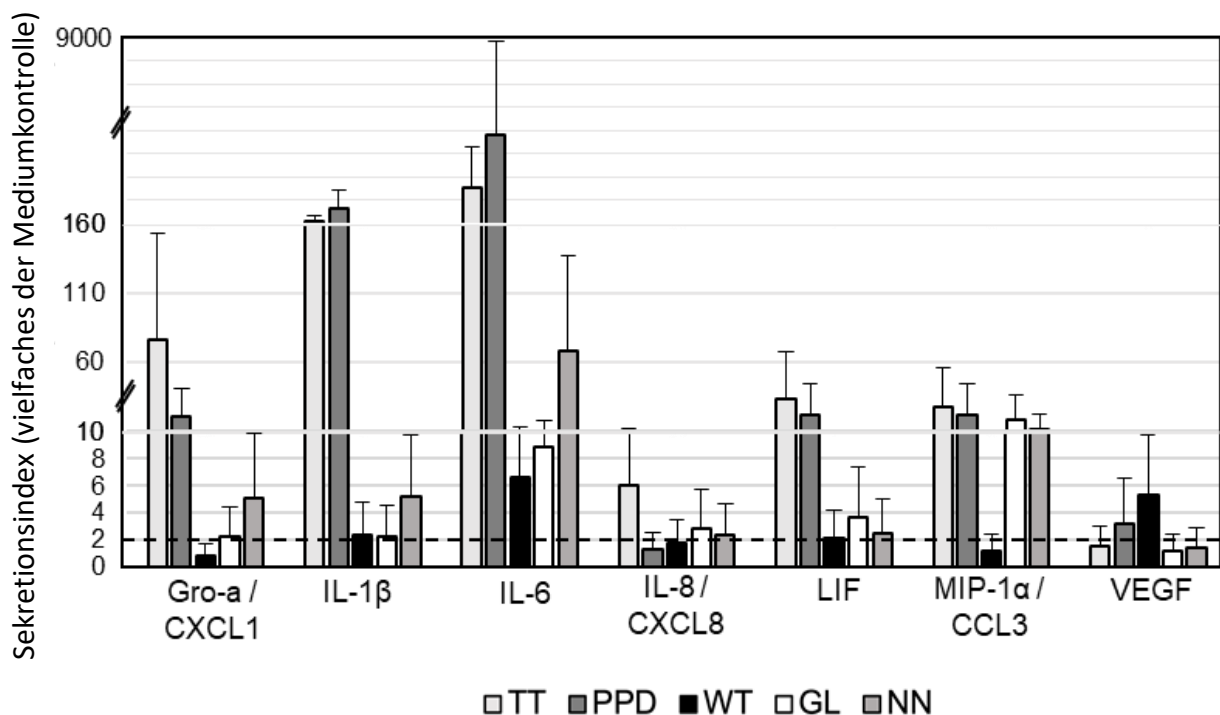


Abbildung 29: Zytokin- und Chemokinsekretion nach in vitro-Stimulation mit AAV2-Vektoren (AAV2.GL, AAV2.NN und AAV2.WT) und Kontrollen

Gezeigt sind nur die Faktoren, die nach Stimulation mit AAV2-Kapsiden einen Sekretionsindex > 2 erreicht hatten. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 2, der als Grenzwert für eine positive Reaktion gesetzt wurde. Zu beachten sind die 3 unterschiedlichen Skalen der y-Achse, jeweils unterteilt durch die Doppelstriche.

3.2.4 Immunfluoreszenzanalyse von Zellpopulationen nach Vektorstimulation

PBMC der Spender H1, H2, H3, H4, H6, H7 and C1 wurden mit AAV2 Vektoren stimuliert und die Expansion verschiedener Zellpopulationen und sowie deren Produktion von IFN- β und IL-1 β nach 24 h bzw. 4 Tagen über Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Es wurde dafür die Expression von Markerproteinen von T-Zell-Populationen (CD3, CD4, CD8), NK-Zellen (CD56), B-Zellen (CD19), Monozyten (CD14), dendritische Zellen (CD11c) sowie des Aktivierungs-

markers CD69 und der Monokine IL-1 β und IFN-beta untersucht. Die hier gezeigten Fluoreszenzfärbungen konnten auch Expansionen angeborener Immunzellen und ihre Zytokinproduktion darstellen, weshalb als Positivkontrolle diesmal Lipopolysaccharid (LPS) verwendet wurde, ein bakterielles Oberflächenmolekül, das v. a. auch Zellen des angeborenen Immunsystems stark stimuliert. Da Zellen des angeborenen Immunsystems sehr schnell reagieren, wurden die Immunfluoreszenzfärbungen bereits nach 24 Stunden und ein weiterer identischer Stimulationsansatz nach insgesamt 4 Tagen Inkubationsdauer (T- und B-Zell-Reaktion) analysiert. Tote Zellen wurden, unabhängig von Fluoreszenzfärbungen, von lebenden Zellen im FACS mittels FSC und SSC abgegrenzt. FSC und SSC berücksichtigen die Zellgröße und ihre Oberflächenbeschaffenheit (Granularität) (s. **Abbildung 13**; Seite 43). Der zur Veranschaulichung der Daten bestimmte Expansionsindex ist der Quotient aus der unstimulierten (% Zellen) und der jeweils stimulierten Population (%), angezeigt wird in **Abbildung 30** der Mittelwert der Expansionsindizes aller getesteter Spender.

Sechs der 7 Spender hatten eine zuvor ermittelte Antikörperantwort und damit eine adaptive Immunantwort auf AAV2. Die Spender H4 und H7 hatten geringe Antikörpertiter, die von H1, H2, H3 und H6 lagen im mittleren Bereich. C1 war zum Zeitpunkt der Antikörpertestung noch nicht Teil des Projekts. Drei der 7 Spender hatten auch neutralisierende Antikörper (H2, H3 und H4).

Die Stimulation der peripheren Blutmonozyten durch die drei Vektoren war generell eher gering. T Helfer-Zellen (CD3⁺/CD4⁺), zytotoxische T-Zellen (CD3⁺/CD8⁺), CD56+NK-Zellen oder CD19⁺ B-Zellen zeigten keine Reaktivität, weder auf LPS noch auf die AAV2-Vektoren (s. **Abbildung 30 A**). Nach 24 h sowie nach 4 Tagen zeigten sich ähnliche Bilder, nach 4 Tagen wurden keine weiteren Reaktionen beobachtet (s. **Abbildung 30**). Es werden daher nur entweder die Stimulationen nach 24 Stunden oder 4 Tagen gezeigt.

Weder CD11⁺/CD14⁻ DC, CD11⁻/CD14⁺ Monozyten noch die CD11⁺/CD14⁺ monozytären dendritischen Zellen zeigten eine Expansion nach 24-stündiger Stimulation als Reaktion auf einen der getesteten Vektoren (s. **Abbildung 30 B**). Innerhalb der Monozytenpopulation reagierten lediglich die CD14⁺ Monozyten auf LPS mit einer Expansion dieser Population nach 24 h. Weder CD11⁺/CD14⁻ DC, CD11⁻/CD14⁺ Monozyten noch CD11⁺/CD14⁺ monozytäre DC zeigten eine Expansion als Reaktion auf die AAV Vektoren (s. **Abbildung 30 B**). Die Zytokinproduktion

der Zellen des angeborenen Immunsystems spiegelt jedoch ein anderes Bild wider. IFN- β wurde von CD11c⁺ DC und CD11c⁻/CD14⁺ Monozyten als Reaktion auf alle drei Kapside produziert (s. **Abbildung 30 C**). Es konnten spenderindividuelle Unterschiede der CD14⁺-Zellantwort auf die Kapside und eine nicht signifikante Tendenz einer verstärkten Antwort auf AAV2.GL festgestellt werden (s. **Abbildung 30 C**). Eine Subpopulation von CD11c⁺/CD14⁺ Zellen produzierten nach Stimulation mit LPS und den AAV Kapsiden sowohl IL-1 β und IFN- β und zeigte ebenfalls eine Tendenz zu einer stärkeren Antwort auf AAV2.GL. Eine IL-1 β Produktion wurde lediglich nach Stimulation mit LPS, jedoch nicht mit AAV-Kapsiden nachgewiesen. Alle Vektoren induzierten eine antivirale IFN- β Antwort in Zellen des angeborenen Immunsystems (DC/Monozyten) (s. **Abbildung 30 C**). Eine adaptive Immunantwort konnte keiner der Vektoren in vitro auslösen, typische T-Helferzell-Zytokine wie IFN- γ oder IL-17 wurden nicht als Reaktion auf die AAV-Kapside induziert, wie bereits im Bioplex-Assay gezeigt wurde.

Da die Zellen hier in antikörperfreiem Panexin-Serumersatz inkubiert wurden, kann eine Stimulation angeborener Zellen durch Antigen-Antikörper-FcR-Bindung ausgeschlossen werden. Zusammenfassend zeigte sich durch die Immunfluoreszenzfärbung mit anschließender FACScan-Analyse keine lymphozytäre (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T-, CD19⁺ B-Zellen), sondern nur eine leukozytäre (CD14⁺ Monozyten/Makrophagen, CD11c⁺ dendritische Zellen) Reaktion auf die Vektorkapside. IL-1 β wurde als Antwort auf LPS produziert, während IFN- β als dominante Zytokinantwort auf Viruskapside in AAV2.GL-stimulierten Kulturen bei DC (CD11c) und Makrophagenpopulationen (CD14) sogar noch geringfügig erhöht nachweisbar war. Es waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Ein Vorteil der Mutanten AAV2.GL und AAV2.NN, im Vergleich zum Wildtyp, konnte auch hier nicht gezeigt werden.

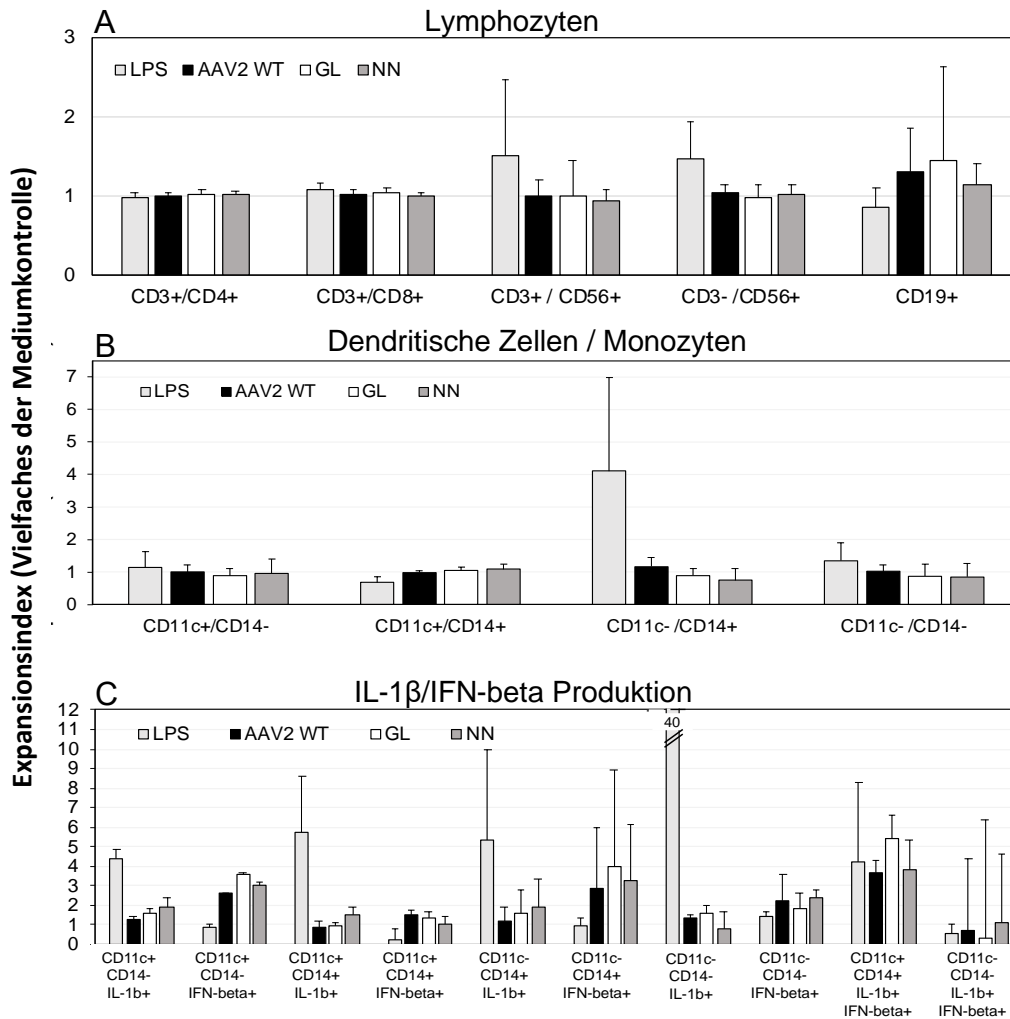


Abbildung 30: Zellpopulationen nach in-vitro Stimulation für 24h mit AAV2-Kapsiden und LPS

Die Daten sind als Stimulationsindex (SI), d.h. dem Vielfachen der Mediumkontrolle dargestellt und zeigen den Mittelwert von allen 7 Spendern. Als positiv galt ein SI > 2. A) Lymphozytenpopulationen: CD4⁺ T-Helfer, CD8⁺ T-Killer, CD56⁺ NK-Zellen; B) CD11c⁺ dendritische Zellen, CD14⁺ Monozyten, CD11c⁺ und CD14⁺ monozytäre dendritische Zellen (moDC); C) IL-1β/IFN-beta-Produktion von CD11⁺ und CD14⁺ Zellen.

3.3 AAV2-Kapsidvarianten mit Expression der Rezeptorbindungsstelle von SARS-CoV2 (HtW2 S1.1 und HtW2 S1)

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die zelluläre in vitro-Immunantwort auf neue AAV2-Kapsidvarianten untersucht, die im Kapsid inserierte Epitope der RBD des SARS-CoV2 Spike-Proteins exprimieren. Im Gegensatz zur Immunantwort der "natürlich durchseuchten" Blutspender im ersten Teil der Arbeit wurden hier Spender ausgewählt, die kurz zuvor mit dem anti-Corona-Impfstoff Comirnaty geimpft wurden, einem mRNA-Impfstoff, der für das Spike-Protein kodiert. Die Impfantwort der drei Spender wurde über anti-Spike-Antikörper verifiziert

(s. **Abbildung 31 A**) und die zellulären Immunantworten über die Zyto- und Chemokinsekretion der stimulierten Kulturen sowie über die Expansion bestimmter Immunzell-Populationen mit anschließender Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Es standen zwei Vektorkapsid-Varianten mit überlappenden RBD-Sequenzen zur Verfügung, HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2.

Alle 3 Spender hatten vor den Impfungen keinen Kontakt mit SARS CoV2, was durch die negative Antikörperantwort sowohl gegen das Spike- als auch gegen das nukleäre Protein (N-Protein) des Corona-Virus bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Die weibliche Spenderin H1 zeigte bereits 2 Wochen nach der 1. Impfung einen höheren Antikörpertiter als die beiden männlichen Spender H6 und H7, 2 Wochen nach der 2. Impfung war der Titer von H1 im Vergleich zu H6 und H7 sogar mehr als dreifach erhöht (s. **Abbildung 31 A**). Die Bindung neutralisierender Antikörper wurde mittels Neutralisationsassay von Sabrina Babutzka (AG Michalakis) bestimmt, die mir ihre Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat (**Abbildung 31 B**). Getestet wurde das Serum des Spenders H1 vor beziehungsweise nach der ersten und zweiten Impfung. Vor Exposition mit COVID-19 oder Impfung mit Comirnaty wurde die Transduktion von HtW2_S1.2 durch das Serum nicht gehindert. Die Transduktionsrate vor der Impfung betrug 88,21%. Nach der ersten als auch zweiten Impfung und Inkubation mit den Seren von H1 bei einer Verdünnung von 1:50 lag die Transduktionsrate hingegen lediglich bei 34,88% und 30,14%. Somit konnte das Serum von Spender H1 nach den Impfungen 60% der HtW2_S1.2-Kapside neutralisieren, nicht aber den AAV2.WT.

Bei höheren Verdünnungen von 1:500 und 1:1000 konnte das H1-Serum auch HtW_S1.2 nicht mehr neutralisieren. (s. **Abbildung 31 B**).

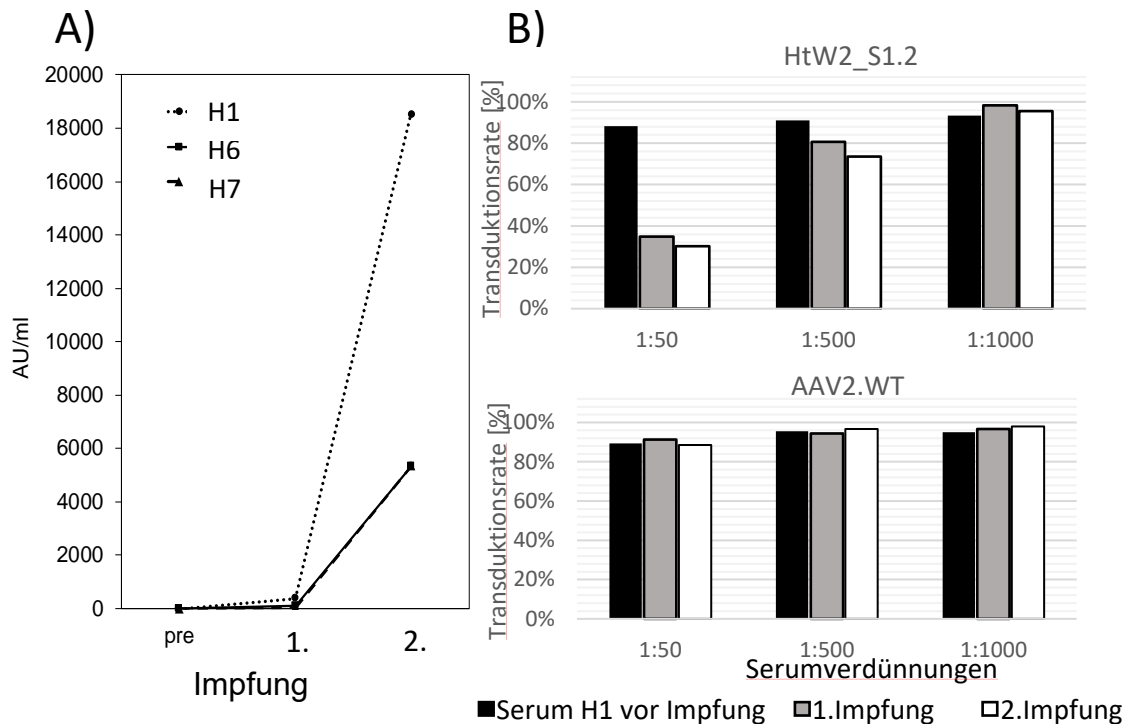


Abbildung 31: Anti-SARS-CoV2 (Spike-Protein)-IgG Titer

A) Gesamt-Antikörpertiter vor und nach den Impfungen. Auf der y-Achse sind die Antikörpertiter in "arbiträren Einheiten" (AU)/ml aufgetragen, auf der x-Achse die Zeitpunkte der Messung, vor der Impfung und zwei Wochen nach der ersten (1.) bzw. eine Woche nach der zweiten Impfung (2.) mit Comirnaty. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Herrn Dr. Andreas Osterman (Max von Pettenkofer-Institut, München) **B)** Neutralisierende Antikörper vor und nach den Impfungen. Auf der y-Achse ist die Transduktionsrate aufgetragen, die sich aus der Transduktion der mit Serum inkubierten Proben und der Positivkontrolle ohne Seren ergibt. Auf der x-Achse sind die getesteten Serumverdünnungen gezeigt. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Frau Sabrina Babutzka (Augenlinik LMU München).

3.3.1 Zelluläre Antwort nach Impfung mit Comirnaty

Die PBMC-Stimulationen wurden zwei Wochen nach der ersten und eine Woche nach der zweiten Impfung der Probanden mit dem mRNA-Impfstoff Comirnaty angelegt und wie bereits im ersten Teil beschrieben mit den verschiedenen Kapsiden und Kontrollantigenen stimuliert. Die Vektorvariante HtW2_S1.2 stand erst nach der ersten Impfung zum Testen zur Verfügung und fehlt daher in allen Vorimpfungsdaten.

Die Lymphozytenstimulationen wurden analog den Stimulationen mit den Vektorvarianten AAV2.GL und AAV2.NN angesetzt. Es stellte sich allerdings heraus, dass durch die in vivo-Aktivierung nach der 2. Impfung eine Verkürzung der in vitro-Stimulationsdauer von 4 auf 3 Tage notwendig wurde. Wie auch schon im ersten Teil der Arbeit wurden täglich Proben der Überstände der stimulierten Kulturen asserviert und auf sezernierte Zytokine und Chemokine

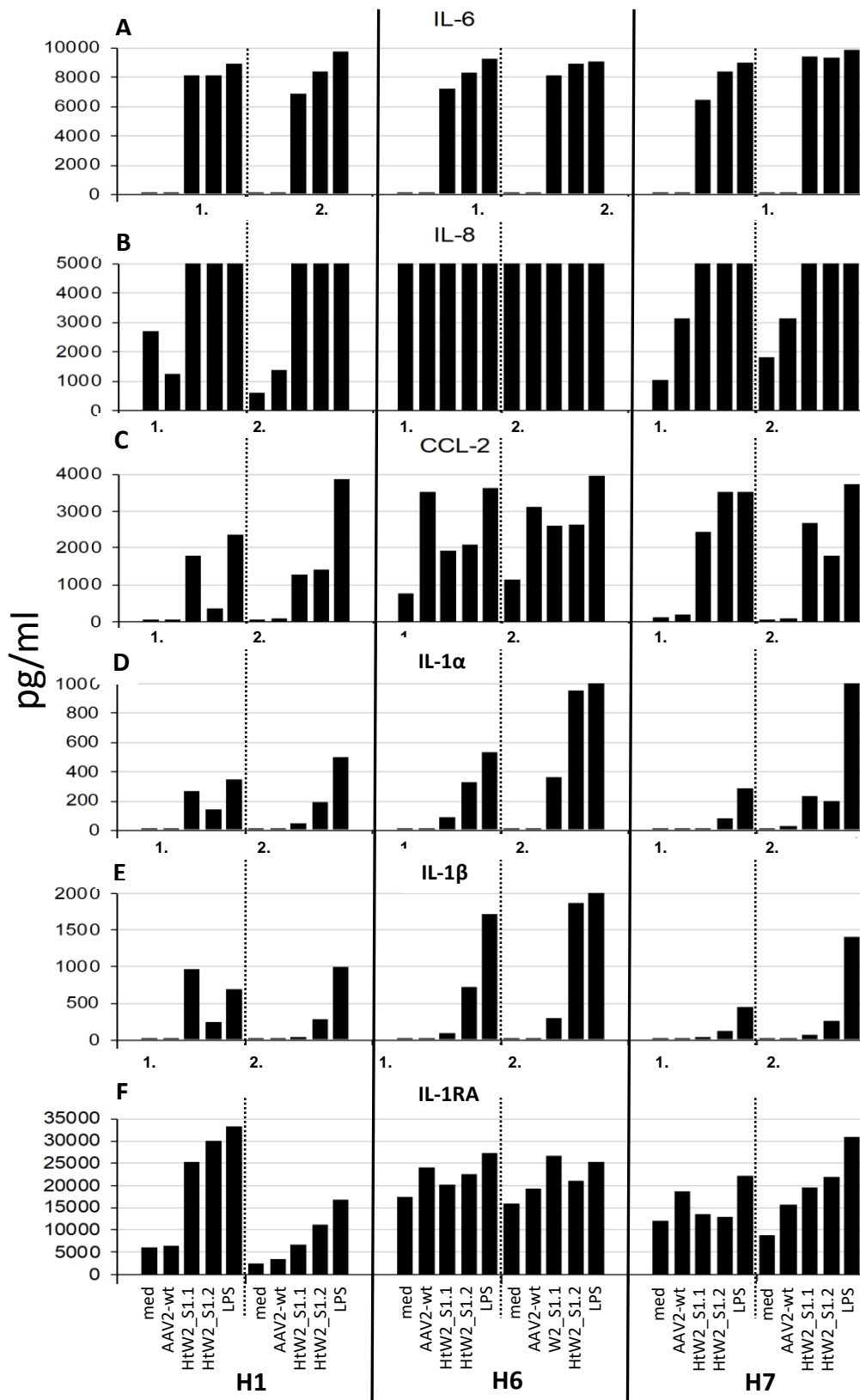
untersucht. Ferner wurden nach 24 Stunden und 3 bzw. 4 Tagen mittels Immunfluoreszenzfärbung und anschließender FACS-Analyse die Effekte der Stimulation mit den Spike-Epitop-exprimierenden AAV2-Vektorvarianten auf Zellpopulationen der angeborenen (Monozyten/Makrophagen (CD14), DC (CD11c), NK-Zellen (CD56)) und der adaptiven Immunantwort (B-Zellen (CD19), CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen) sowie die Produktion der Monokine IL-1 β und IFN- β analysiert. Zusätzlich wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD69+ bestimmt.

3.3.2 Zytokin- und Chemokinsekretion nach Stimulation mit HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2

Leider wurden von den PBMC-Stimulationen der Spender H1, H6 und H7 vor den Impfungen keine Kulturüberstände für die Zytokinbestimmung gesammelt, nur von den jeweils 3 Zeitpunkten nach der 1. und 2. Impfung standen gepoolte Überstände der Triplikatkulturen zur Verfügung. Alle drei Spender zeigten nach beiden Impfungen gleichermaßen hohe IL-6-Sekretion nur nach Stimulation mit den Spike-Variantenvektoren HtW2_S1.1 und -S1.2 sowie LPS, keine Reaktion auf den AAV2.WT. IL-8/CXCL8 war im Gegensatz dazu bei den Spendern H1 und H7 auch in der Mediumkontrolle und der AAV2 WT-stimulierten Kultur zu entdecken, und die HtW2- und LPS-stimulierten Kulturen produzierten IL-8-Mengen jenseits der Nachweisgrenze dieses Assays. In den Kulturen von Spender H6 lag sogar schon die Mediumkontrolle über der Nachweisgrenze von IL-8 (s. **Abbildung 32 A/B**).

Auch bei CCL2 zeigten sich in den Mediumkontrollen von Spender H6 bereits erhöhte Konzentrationen, erstaunlicherweise wurde als Antwort auf die Spike-Vektorvarianten weniger CCL2 sezerniert als auf den AAV2.WT und die LPS-Kontrolle, und es war kein Unterschied zwischen 1. und 2. Impfung. Im Gegensatz dazu zeigten Spender H1 und H7 nur CCL2-Sekretion in den Kulturen mit HtW2-Vektoren und LPS, nicht bei Medium oder AAV2 WT, mit keiner oder nur geringfügiger Steigerung nach der 2. Impfung (s. **Abbildung 32 C**).

Sowohl IL-1 α als auch IL-1 β wurde bei allen Spendern nur in Reaktion auf HtW2_S1.1, HtW2_S1 und LPS produziert, vor allem Spender H6 zeigte erhöhte Produktion nach der 2. Impfung und erkannte bevorzugt HtW2_S1.2. Spender H1 zeigte nach der 2. Impfung eine deutlich reduzierte IL-1-Antwort auf HtW2_S1.1, während bei Spender H7 nach der 2. Impfung vor allem in der LPS-Kontrolle eine dreifache Zunahme von IL-1 α und IL-1 β zu sehen war (s. **Abbildung 32 D/E**).



Legende zur Abbildung 32 siehe nächste Seite.

Abbildung 32: Monokin- und Chemokinsekretion nach Stimulation mit HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2, AAV2 WT und LPS im Vergleich zum Medium

Auf der y-Achse ist Menge der Zytokine/Chemokine in pg/ml, auf der x-Achse sind die verschiedenen Antigene und die Zeitpunkte der Impfungen für die drei Spender (H1, H6, H7) aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte von je mindestens 50 analysierten Beads/Zytokin (Menge bestimmt anhand der Fluoreszenzintensität) der Pools von 9 bzw. 12 Kulturüberständen: jeweils Triplikat-Kulturen, 3 (nach der 2. Impfung) bzw. 4 (nach der 1. Impfung) täglich entnommene Proben von in vitro-Stimulationen der 3 Spender H1, H6 und H7.

Der IL-1-Rezeptorantagonist IL-1RA wurde von Spender H1 vor allem nach der 1. Impfung als Reaktion auf HtW2_S1.1, HtW2_S1 und LPS produziert, dagegen war nach der 2. Impfung die IL-1RA-Sekretion auf 50% (LPS) bis 25% (HtW2_S1.1) reduziert. Die beiden Spender H6 und H7 zeigten nur minimale Unterschiede zwischen den AAV2 WT- und HtW2_S1.1 und HtW2_S1-stimulierten Kulturen und keinen Unterschied zwischen 1. und 2. Impfung (s. **Abbildung 32 F**). Es zeigte sich hier eine bevorzugte Aktivierung der Monokine IL-6, IL-1 α und IL-1 β als Reaktion auf HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2 (s. **Abbildung 32**).

IL-10 wurde von allen Spenderlymphozyten bevorzugt in LPS-stimulierten Kulturen produziert und eher in Reaktion auf HtW2_S1.2 als auf HtW2_S1.1. Eine gesteigerte IL-10-Produktion war außerdem nach der 2. Impfung zu sehen (s. **Abbildung 33 A**).

Nur die Spender H1 und H6 (H6 mehr als H1), nicht aber H7, reagierten auf die Vektorvarianten und LPS mit IL-13-Sekretion. Die IL-13-Sekretion war bei H7 kaum nachweisbar. Auch IL-17 und IFN- γ -Sekretion konnte in den Kulturen von H7 und auch von H1 nicht nachgewiesen werden, während die Lymphozyten von Spender H6 nach der 1. Impfung eine schwache Reaktion auf HtW2_S1.2 und LPS zeigten, die nach der 2. Impfung auf beide Varianten, HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2 und LPS 2 – 3-fach (IL-17) bzw. 5 – 6-fach (IFN- γ , LPS) erhöht waren.

Es zeigten sich eine individuell sehr unterschiedliche Zytokinsekretion, vor allem die T-Helfer-Zytokine IL-17 (Th17) und IFN- γ (Th1) wurden nur von den Lymphozyten des jüngsten hier getesteten Spenders produziert (H6: 45 Jahre versus 60 Jahre bei H1 und H7). Auch IL-13, ein von T-Helfer 2-Zellen produziertes Zytokin wurde lediglich in geringen Mengen (< 50 pg/ml) durch Spender H1 und H6 sezerniert (s. **Abbildung 33 B/C/D**).

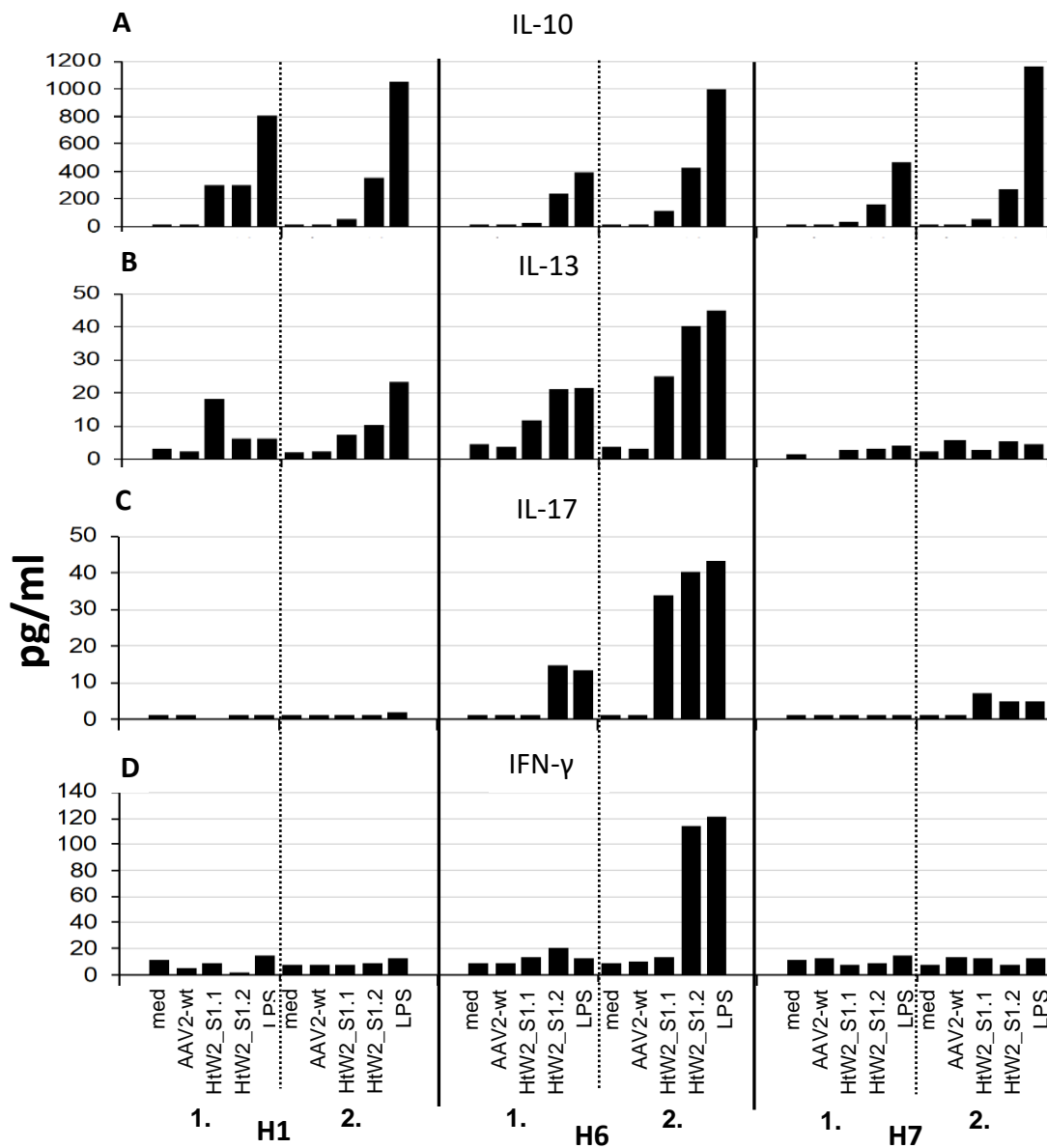


Abbildung 33: Zytokinsekretion nach Stimulation mit HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2, AAV2 WT und LPS im Vergleich zum Medium

Auf der y-Achse ist Menge der Zytokine in pg/ml, auf der x-Achse sind die verschiedenen Antigene und die Zeitpunkte der Impfungen für die drei Spender (H1, H6, H7) aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte von je mindestens 50 analysierten Beads/Zytokin (Menge bestimmt anhand der Fluoreszenzintensität) der Pools von 9 bzw. 12 Kulturüberständen: jeweils Triplikatkulturen, 3 (nach der 2. Impfung) bzw. 4 (nach der 1. Impfung) täglich entnommene Proben von in vitro-Stimulationen der 3 Spender H1, H6 und H7.

3.3.3 Populationen der angeborenen Immunantwort: Monozyten, dendritische Zellen und ihre Produktion von IFN- β und IL-1 β

Die zellulären Immunreaktionen wurden nach in vitro-Stimulation durch Immunfluoreszenzfärbung von Oberflächenmarkern analysiert, die spezifisch von bestimmten Zellpopulationen exprimiert werden. Zunächst wurden Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems untersucht, CD11c⁺ dendritische Zellen, CD14⁺ Monozyten und CD11c sowie CD14 koexprimierende monozytäre DC (moDC) (s. **Abbildung 34 A**). Der prozentuale Anteil dieser Zellen an der Gesamtpopulation der angeborenen Immunzellen zeigte nach den Impfungen bei allen Spendern eine Zunahme nach den Impfungen, unabhängig vom stimulierenden Antigen. Während, ebenfalls antigenunabhängig, bei allen Spendern nach den Impfungen die CD11c⁺ DC stark reduziert waren, zeigte sich ein Anstieg der CD11c⁺/CD14⁺ moDC-Population sowie ein leichter Anstieg an CD14⁺/CD11⁻ Monozyten. Keine der Populationen zeigte eine Veränderung, die mit den AAV2-Spike-Variantenvektoren oder generell mit viralen Vektoren (AAV2 WT) korrelierte. Zusätzlich zur Veränderung der Populationsgrößen wurde auch die Produktion zweier wichtiger, antiviraler Monokine (IL-1 β und IFN- β) durch intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung untersucht (s. **Abbildung 34 B/C**). Interessanterweise zeigte sich bei CD14⁺ Monozyten eine spezifisch erhöhte IL-1 β -Antwort auf HtW2_1.1 und LPS bei PMBC aller Spender vor der Impfung ("prä") (s. **Abbildung 34 B**). Da HtW2_1.2 zu dem Zeitpunkt noch nicht verfügbar war, gibt es dazu leider keine Vergleichsdaten. Eine ähnliche Spezifität der IL-1 β -Antwort war auch bei CD11c⁺/CD14⁺ moDC vor den Impfungen zu sehen (s. **Abbildung 34 C**). Während die monozytäre und moDC-Produktion von IL-1 β spezifisch auf LPS, HtW2_S1.1 und auch HtW2_S1.2 bei den Spendern H1 und H6 nach der 1. Impfung noch deutlich zu sehen war, zeigte Spender H7 erst nach der 2. Impfung, nicht aber nach der 1., wieder eine präferentielle IL-1 β -Antwort auf die beiden AAV2-Spike-Variantenvektoren und LPS, aber nicht auf AAV2.WT. Während vor den Impfungen keine IFN- β -Produktion nachweisbar war, zeigte sich bei allen Spendern ein antigenunabhängiger, genereller Anstieg von IFN- β - und IFN- β /IL-1 β produzierenden Monozyten (s. **Abbildung 34 B**). Die IFN- β ⁺ Monozytenpopulation stieg nach der 1. Impfung auf 25- 53 % (H1) bis auf über 80% (H7, HtW2_S1.1) an. Bei H1 zeigte sich nach der 2. Impfung ein weiterer, antigenunspezifischer Anstieg dieser Population, während sich bei den Spendern H6 und H7 ein Rückgang der IFN- β ⁺ Monozytenpopulation zeigte. Es koproduzierten nach der 2. Impfung auch deutlich mehr Monozyten von Spender H1 IFN- β sowie auch IL-1 β (s. **Abbildung 34 B**).

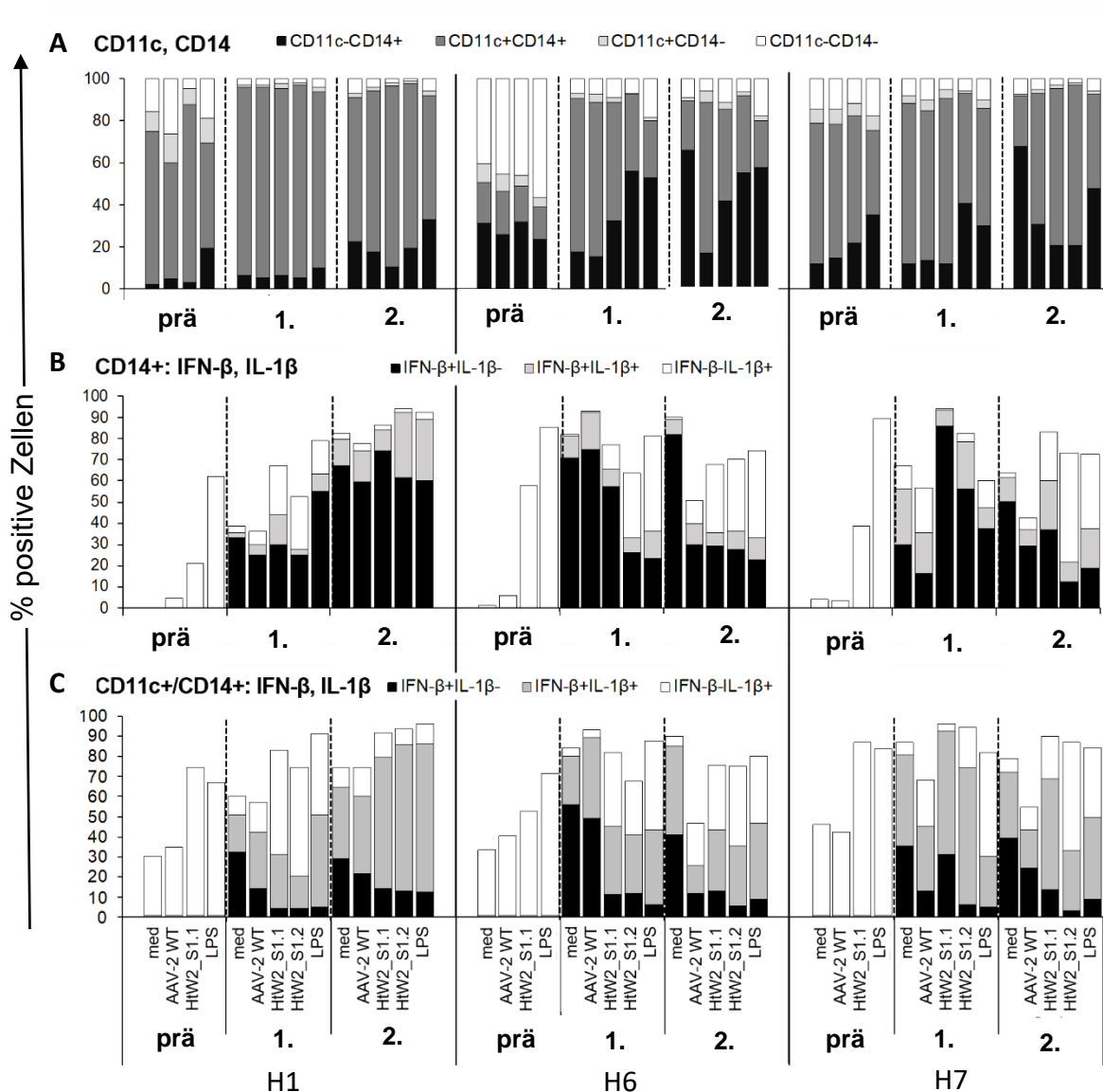


Abbildung 34: Immunfluoreszenzanalyse der Zellen des angeborenen Immunsystems nach in vitro-Stimulation mit den Spike Mutanten HtW2_S1.1 sowie HtW2_S1.2: CD11c⁺ DC, CD14⁺ Monozyten und CD11c⁺/CD14⁺ monozytäre DC

Die % positiven Zellen der y-Achse beziehen sich auf alle eingegrenzten "Zellen des angeborenen Immunsystems" in **Abbildung 13** (Seite 43). Dargestellt sind die Mittelwerte der % positiven Zellpopulationen der getesteten Spender. "Prä" = Blutabnahme vor der Impfung, "1." 2 Wochen nach der ersten Impfung mit Comirnaty, "2". 1 Woche nach der 2. Impfung. Dargestellt sind die Ergebnisse nach A) 24h und B, C) nach 4 Tagen (prä = vor oder nach 1. Impfung) oder 3 Tagen (nach 2. Impfung). n= 3 Spender (H1, H6, H7).

Die CD11c⁺/CD14⁺ moDC war die größte Population unter den hier analysierten angeborenen Immunzellen, es wurde ihre Produktion von IL-1β und IFN-β untersucht (s. **Abbildung 34 C**). Vor den Impfungen war lediglich eine IL-1β-Produktion in dieser Population nachweisbar,

während nach den Impfungen auch einige Zellen IFN- β , aber kein IL-1 β produzierten. Diese Zellen fanden sich vorwiegend in den unstimulierten Kulturen (Mediumkontrolle), jedoch kaum in den Vektor- oder LPS-stimulierten. MoDC mit Koproduktion von IFN- β und IL-1 β traten vermehrt und v. a. in den Kulturen mit HtW2_S1.1 und S1.2 sowie LPS bei H1 nach der 2. Impfung auf. Bei den beiden anderen Spendern waren nach der 2. Impfung vermehrt IL-1 β ⁺ moDC in den HtW2_S1.1, HtW2_S1.2 und LPS-stimulierten Kulturen zu sehen, bei H6 auch schon nach der 1. Impfung (s. **Abbildung 34 C**). Generell war zu sehen, dass die AAV2-Vektoren mit SARS CoV2-Spike-Anteilen keinen besonders stimulierenden Effekt auf Monozyten, moDC und DC in vitro hatten, es zeigte sich aber deutlich, dass die Impfung mit dem nanoverkapselten RNA-Impfstoff Comirnaty einen generell stimulierenden Effekt auf die hier untersuchten Zellen des angeborenen Immunsystems hatte. Keiner der hier getesteten Spender hatte während des Untersuchungszeitraums eine Infektion mit SARS CoV2, alle antigenspezifischen Effekte waren also auf die Impfung zurückzuführen.

3.3.4 NK und NK-T-Zellen und Zellen der erworbenen Immunantwort: B-Zellen, T-Helfer und zytotoxische T-Zellen

NK und NKT-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Virusabwehr, vor allem die NK-Populationen, die den NK-Rezeptor CD56 nur schwach exprimieren (CD56^{dim}) und, wie auch die NKT-Zellen, einen zytotoxischen Effekt ausüben. Während hier die CD56^{dim} NK-Zell-Population konstant blieb, sowohl bezüglich der Antigenspezifitäten als auch vor und nach den jeweiligen Impfungen, zeigte sich nach der 1. Impfung ein Anstieg der CD56^{dim}CD3⁺ NKT-Zellpopulation, die aber mit keiner Antigenspezifität korreliert war (s. **Abbildung 35 A**). Bei allen drei Spendern zeigten sich weder vor noch nach der ersten Impfung Veränderungen der CD19⁺ B-Zellpopulation (s. **Abbildung 35 B**). Nach der 2. Impfung zeigte sich bei allen Spendern eine leicht erhöhte B-Zell-Antwort auf den AAV2.WT, Spender H1 zeigte eine starke B-Zell-Proliferation auf die Spike-Vektorvariante HtW2_S1.2, Spender H6 auf die Variante HtW2_S1.1. Bei Spender H7 zeigte sich lediglich eine starke B-Zell-Antwort auf LPS, nicht aber auf die Spike-Vektorvarianten (s. **Abbildung 35 B**). Die T-Zell-Antworten sind in **Abbildung 35 C** dargestellt und sind gleich vor und nach den Impfungen und zeigten keine Reaktion auf eines der Antigene.

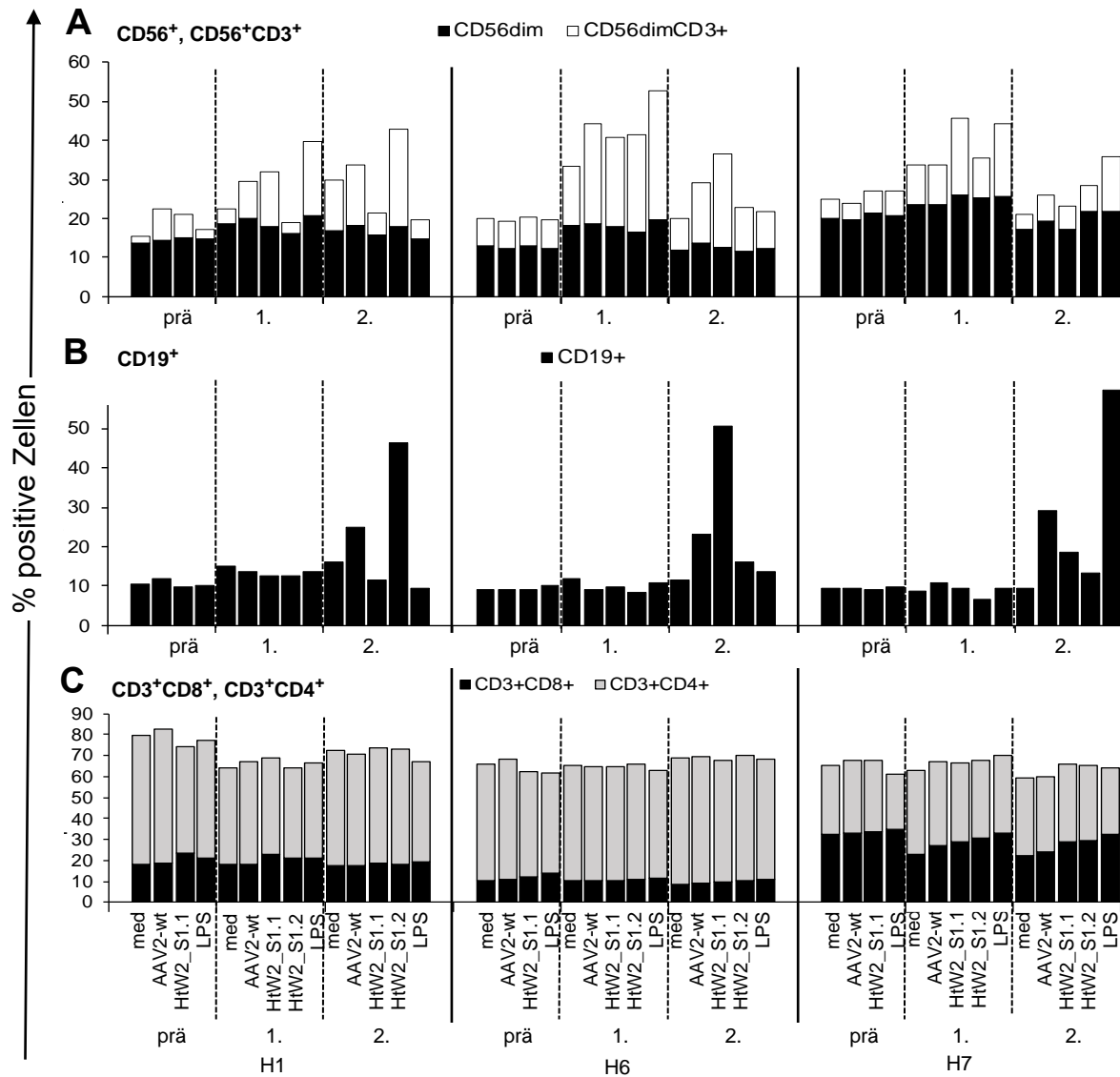


Abbildung 35: Immunfluoreszenzanalyse der Zellen des erworbenen Immunsystems nach in vitro-Stimulation mit den Spike-Varianten HtW2_S1.1 sowie HtW2_S1.2
 A) $CD56^{dim+}$ NK-Zellen ($CD56^+$), NKT-Zellen ($CD56^+/CD3^+$), 24 h nach Antigenstimulation; B) $CD19^+$ B-Zellen, 24h nach Antigenstimulation; C) $CD3^+/CD4^+$ T-Helfer und $CD3^+/CD8^+$ zytotoxische Zellen, nach 4 Tagen (nach 1. Impfung) bzw. 3 Tagen (nach 2. Impfung) Antigenstimulation. "Prä": vor der Impfung; 1.: Blutentnahme 2 Wochen nach der ersten Impfung; 2.: Blutentnahme 1 Woche nach der zweiten Impfung. Dargestellt sind Mittelwerte der % positiven Zellen von n= 3 Spendern (H1, H6, H7).

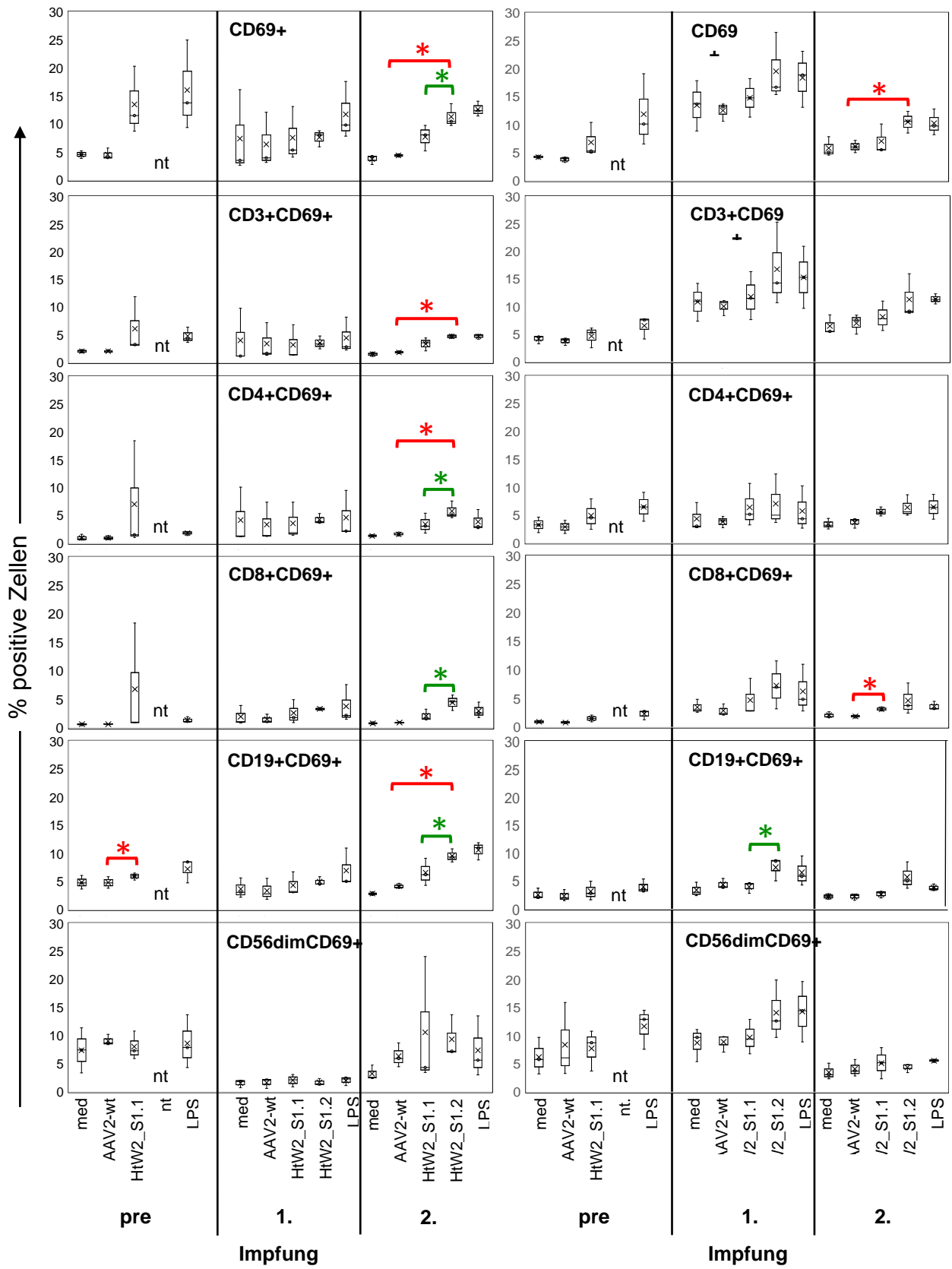
3.3.5 Aktivierte Leukozyten: CD69⁺ Zellen

Die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 wurde als Mittelwerte aller Spender für die gesamte Leukozytenpopulation nach 24 h sowie nach 3 bzw. 4 Tagen Antigenstimulation in vitro analysiert (s. **Abbildung 36**). Vor der Impfung zeigt sich nach 24 Stunden Stimulation (s. **Abbildung 36 A**) ein Anstieg aller CD69⁺ Zellen sowie speziell der CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in den Kulturen mit der Spike-Vektorvariante HtW2_S1.1. HtW2_S1.2 war zu dem Zeitpunkt noch nicht verfügbar (s. **Abbildung 36**). Dieser Effekt war nach 4 Tagen Stimulation nicht mehr sichtbar. Die CD69⁺ CD19⁺ B-Zellen reagierten bis zu diesem Zeitpunkt auf LPS und den Mutanten HtW1.2, signifikante Unterschiede wurden zwischen dem WT und HtWS1.1 beobachtet. Die Population der aktivierten NK-Zellen (CD56^{dim}/CD69⁺) blieb unverändert (s. **Abbildung 36 B**). Nach der 1. Impfung und 24 h Inkubation zeigten sich signifikante Unterschiede innerhalb der CD69⁺ Population zwischen dem Wildtyp und HtW2_S1.1, die CD19⁺ B-Zellen reagierten auch auf LPS. Erst nach der 2. Impfung war ein Anstieg aller CD69⁺ Zellen sowie der CD69⁺ CD3⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Helferzellen, CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und der CD19⁺ B-Zellen auf die Vektorvarianten HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2 sowie auf LPS (nur bei der Gesamtpopulation und den B-Zellen) zu sehen. Signifikante Unterschiede wurden zwischen dem Wildtyp und dem Mutanten HtW2_S1.2 als auch zwischen den Mutanten HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2 festgestellt (s. **Abbildung 36 A**).

In der gleichen Stimulation zeigte sich vor den Impfungen nach 4 Tagen lediglich ein geringer Anstieg der CD69⁺ Populationen auf LPS. Nach der 1. Impfung und 3 Tagen Stimulation war ein genereller Anstieg an CD69⁺ Zellen zu verzeichnen, besonders in der Antwort auf HtW2_S1.2 und LPS, vor allem bei den T-Zellen (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) und den B-Zellen (CD 19⁺) und diesmal auch bei den CD56^{dim} NK-Zellen. Ein signifikanter Unterschied war ausschließlich innerhalb der CD 19⁺ CD69⁺ Zellen zwischen den Mutanten HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2 nachzuweisen. Nach der 2. Impfung zeigte sich ein vergleichbarer, aber leicht abgeschwächter Effekt, wieder mit einer Präferenz für HtW2_S1.2 bei den T- und B-Zellen, bei den NK-Zellen zeigten sich nach 3 Tagen keine Reaktionen mehr. Signifikante Unterschiede wurden sowohl in der CD69⁺ Population, zwischen dem WT und HtW2_S1.2, als auch innerhalb der CD8⁺ CD69⁺ Population zwischen dem Wildtyp und HtW2_S1 festgestellt (s. **Abbildung 36 B**).

A) 24 h nach Stimulation

B) 4 bzw. 3 Tage nach Stimulation



Legende zur Abbildung 36 siehe nächste Seite

Abbildung 36: Immunfluoreszenzanalyse von CD69⁺ Zellpopulationen nach in vitro-Stimulation mit den Kapsiden HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2

Auf der y-Achse ist der prozentuale Anteil der für das jeweilige Oberflächenmolekül positiven Zellen, auf der x-Achse sind die verschiedenen Antigene und der Impfstatus aufgetragen.

Prä: vor der Impfung; 1.: 2 Wochen nach der ersten Impfung; 2.: 1 Woche nach der zweiten Impfung. Die Linie mit Kreis in den Kastendiagrammen repräsentiert den Median, X den Mittelwert und die oberen und unteren Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum mit 1,5-fachem Interquartilsabstand. n= 3 Spender (H1, H6, H7).

Verglichen und auf Signifikanz geprüft wurden AAV2.WT mit HtW2_S1.1 oder HtW2_S1.2. Diese Signifikanzen sind durch die roten Klammern markiert ($p < 0,05$). Außerdem wurde HtW2_S1.1 mit HtW2_S1.2 verglichen, signifikante Unterschiede sind durch die grünen Klammern dargestellt (* $p < 0,05$). Nicht-signifikante Unterschiede sowie signifikante Unterschiede zwischen der Mediumkontrolle (med), LPS und den AAV-Kapsiden sind nicht angegeben. Die Statistik wurde mittels t-Test und Bonferroni Korrektur durchgeführt.*

4 Diskussion

4.1 Immunogenität der neuartigen Kapsidmutanten AAV2.GL und AAV2.NN

Die Gentherapie mit viralen Vektoren ist zur Behandlung hereditärer Defekte mehr und mehr in den Fokus des klinischen Interesses, insbesondere in der Augenheilkunde, gerückt. Im November 2018 wurde Voretigen Neparvovec (Luxturna®) für die intraokulare Behandlung der Leberschen kongenitalen Amaurose (LCA) von der europäischen Arzneimittelbehörde zugelassen. Für weitere erbliche Augenerkrankungen wurden und werden klinische Studien durchgeführt, die mehr oder weniger mit unerwünschten Nebenwirkungen intraokularer Entzündungen (Uveitis) belastet waren, wie z. B. bei der Leberschen Hereditären Optikopathie (LHON) (Newman et al. 2021). Der Erfolg der Gentherapie mit adenoassoziierten Virusvektoren kann durch Entzündungen (Uveitis) und ihre Folgen für intraokulare Gewebe verringert werden (Chan et al. 2021). Bei der Gentherapie der äußeren Netzhautzellen wie retinales Pigmentepithel oder Photorezeptoren müssen außerdem die Vektoren in die Nähe der betroffenen Zellen gebracht werden, was in diesem Fall mit einer subretinalen Injektion mit einer absichtlich induzierten, lokal begrenzten Netzhautablösung im Bereich der Makula geschieht. Dabei besteht einerseits das Risiko einer unkontrollierten Ausbreitung der Netzhautablösung, es werden nur relativ wenige Zellen im Bereich des subretinalen Vektor-Depots transduziert, und die Prozedur muss unter Vollnarkose des Patienten durchgeführt werden (Ross und Ofri 2021). Eine intravitreale Injektion mit den z.Z. verfügbaren Vektoren erreicht die Zielzellen in der äußeren Retina nicht, außerdem führen intravitreale Injektionen mit AAV-Vektoren noch häufiger zu intraokularen Entzündungsreaktionen als die Applikationen in den immunprivilegierten subretinalen Raum. Erstrebenswert wären also Vektoren, die sowohl ihre Zielzellen in der äußeren Retina, auch nach intravitrealer Injektion, erreichen und gleichzeitig eine verringerte Immunogenität aufweisen.

Die Kapside der AAV-Vektoren lassen sich gentechnisch gut modifizieren und ermöglichen so die Konstruktion rekombinanter Kapside mit Expression zusätzlicher Peptidepitope, ohne die Kapsidstruktur zu stören. Um einen effizienteren Gentransfer der Zellen der äußeren Netzhautschichten zu erreichen, wurden rekombinante AAV-Vektoren durch Screening einer AAV2-Peptid-Bibliothek in Mäusen aufgrund ihres verbesserten Tropismus für Photorezeptorzellen (Stäbchen oder Zapfen) selektiert (Pavlou et al. 2021). Die resultierenden Kapsidvarianten AAV2.GL und AAV2.NN können tatsächlich Photorezeptoren effizient transduzieren, auch

wenn sie intravitreal statt subretinal injiziert werden, was einen großen Fortschritt für die klinische Anwendung darstellen würde. Der subretinale Raum ist zwar immunprivilegiert, weshalb eine subretinale Vektorinjektion im Vergleich zur intravitrealen Applikation keine oder kaum immunologische Komplikationen induzieren sollte (Streilein 2003; Dalkara und Sahel 2014), dies konnte aber in präklinischen und klinischen Studien nicht immer bestätigt werden (Chan et al. 2021). Allerdings ermöglicht die effizientere Transduktion der Photorezeptoren mit den Varianten AAV2.GL und AAV2.NN eine Dosisreduktion der therapeutischen Vektoren, wodurch die Immunogenität reduziert werden sollte (Chan et al. 2021). Dies zu untersuchen war ein Ziel dieser Arbeit.

Da keine Proben von Patienten mit bereits vorhergegangenen Gentherapien zur Verfügung standen, konnten lediglich bereits bestehende, natürliche Immunantworten gegen den AAV2.WT auf Kreuzreaktivität für die neuen Kapsidvarianten untersucht werden. Hierfür wurden Proben von Spendern auf Antikörperantworten und zelluläre Immunantworten untersucht (Moskalenko et al. 2000).

Für die Untersuchung der Antikörperantworten musste zunächst ein Vektorkapsid-spezifischer ELISA als Testsystem entwickelt werden, ferner wurde die Neutralisationsfähigkeit der Antikörper in den Spenderseren bestimmt. Antikörper gegen therapeutische Vektoren könnten auch bei okularer Gentherapie Probleme verursachen. Normalerweise geht man davon aus, dass im immunprivilegierten Auge keine Antikörper vorhanden sind. Dies trifft für gesunde Augen mit intakter Blut-Retina-Schranke zu, bei Patienten mit genetisch bedingten Netzhauterkrankungen und Degeneration der Retina kann eine Schrankenstörung der Netzhautgefäße und somit ein Eindringen von Serum in das Auge nicht ausgeschlossen werden. Tatsächlich können neutralisierende Anti-AAV-Antikörper neben dem Serum auch in Glaskörper, Vorderkammer und Kammerwasser nachgewiesen werden (Kotterman et al. 2015; Lee et al. 2019; Bucher et al. 2020). In dieser Situation könnten neutralisierende Antikörper die gentherapeutische Transduktion der retinalen Zellen verhindern (Lee et al. 2019; Kotterman et al. 2015). Es könnten die Vektoren auch durch AAV-bindende Antikörper markiert (opsonisiert) und so eine angeborene Immunreaktion von Phagozyten induziert werden, was dann zu einer Entzündungsreaktion führt.

Bei den Antikörperbindungstests zeigte sich eine Seroprävalenz von 91,7 % und kein Unterschied in der Bindung der Antikörper an die Mutanten AAV2.GL/AAV2.NN oder den Wildtyp.

Die gemessene Seroprävalenz steht im Einklang mit bisherigen Daten, in denen zwischen 70% bis 90 % der Bevölkerung seropositiv für AAV2 sind ([Bucher et al. 2020](#); [Kotterman et al. 2015](#); [Ling et al. 2015](#)). Genau wie durch [Huttner et al. 2003](#) zuvor bewiesen, hatten die Peptidinsertionen an Aminosäureposition I-587 im AAV2-Kapsid keinen Einfluss auf die Antikörperbindung an das Kapsid. Dies deutet darauf hin, dass die meisten der von den Antikörpern erkannten Epitope des AAV2-Kapsids in den Regionen zwischen den Peptidinsertionen liegen.

Im Gegensatz dazu wurde eine geringere Neutralisierung der Mutanten AAV2.GL und AAV2.NN im Vergleich zum Wildtyp mit denselben Seren beobachtet. Offensichtlich binden neutralisierende Antikörper bevorzugt an oder in der Nähe der Peptidinsertionen an I-587. Wie in **Abbildung 2 C** (S. 14) dargestellt, bildet die Insertion "GL" eine größere Peptidschleife als "NN" aus, was zu einer direkten Abdeckung von Antikörperbindungsstellen oder zu einer verstärkten sterischen Inhibition der Bindung neutralisierender Antikörper in der näheren Umgebung führen könnte ([Perabo et al. 2006](#); [Maersch et al. 2010](#); [McCraw et al. 2012](#); [Gurda et al. 2013](#); [Tseng et al. 2015](#); [Smith 2001](#)).

Interessanterweise gab es keine Korrelation zwischen den Gesamt-Antikörpertitern und neutralisierenden Antikörpern, wie zuvor auch von anderen gezeigt ([Huttner et al. 2003](#)), jedoch eine leichte Tendenz zu stärkerer Neutralisation bei den Spendern mit geringerer Gesamtantikörpermenge. Obwohl die meisten AAV-Infektionen in früher Kindheit stattfinden ([Calcedo und Wilson 2013](#)), konnte keine Korrelation zwischen dem Alter der Spender und den Antikörpertitern (Gesamt- beziehungsweise neutralisierende Antikörper) festgestellt werden. Der Zeitpunkt der natürlichen Infektion der Spender war nicht bekannt, außerdem fallen Antikörpertiter individuell unterschiedlich schnell ab.

Zusätzlich zur Antikörperbindung wurde die zelluläre Immunantwort auf die neuen AAV-Kapside in vitro untersucht. Wie natürliche Viren werden auch die therapeutischen Vektoren von den Zellen des Immunsystems als fremd erkannt und bekämpft. An vorderster Front stehen die Zellen der angeborenen Immunabwehr wie Monozyten oder DCs, die die Eindringlinge über ihre Pattern-Recognition Rezeptoren (PRRs), wie z. B. TLRs ([Hensley und Amalfitano 2007](#); [Oliveira-Nascimento et al. 2012](#)) erkennen. Auch Zellen im Auge wie RPE Zellen, Mikroglia, Müller-Glia, Photorezeptoren, Ganglien Zellen, retinale Astrozyten sind an der okularen Immunabwehr beteiligt und exprimieren ebenfalls PRRs, wie die TLR1 bis TLR10 ([Kumar et al. 2004](#); [Detrick und Hooks 2010](#); [Bucher et al. 2020](#); [Lin et al. 2013](#); [Singh und Kumar 2015](#); [Jiang](#)

et al. 2009; Rodríguez-Martínez et al. 2005). Durch den auf Zelloberflächen exprimierten TLR2 und den endosomalen TLR9, oder auch direkt durch Zellschädigung mit Freisetzung von DAMPs bei chirurgischem Vorgehen, werden AAV-Partikel aufgespürt und die angeborene Immunantwort ausgelöst (Hareendran et al. 2013). TLR2 erkennt repetitive Protein-Untereinheiten des Viruskapsids und TLR9 das virale Genom (Hensley und Amalfitano 2007; Hösel et al. 2012; Bucher et al. 2020; Mingozi und Büning 2015). Als Konsequenz könnten AAV-Kapside von TLR2 und TLR9 wahrgenommen werden, ungeachtet der AAV-Kapsid-Modifikationen, und das angeborene Immunsystem alarmiert werden. Dies kann durch TLR-exprimierende Netzhautzellen, oder auch direkt durch Zellschädigung mit Freisetzung von DAMPs bei chirurgischem Vorgehen geschehen.

Um die Zellen zu identifizieren, die AAV-Kapside erkennen, wurden zelltypspezifische Immunfluoreszenzfärbungen sowie ein XTT-Assay zur Messung von Proliferation und Aktivität Kapsid-stimulierter peripherer PBMC-Kulturen durchgeführt. Auch hier mangelte es an PBMC von Patienten, die zuvor mit einer okularen AAV-Gentherapie behandelt wurden, daher wurden lediglich frische periphere Lymphozyten von Spendern mit unterschiedlichen Gesamt- bzw. neutralisierenden Anti-AAV2-Antikörpern getestet.

Es zeigten lediglich die hier getesteten CD14⁺ Monozyten/Makrophagen und CD11c⁺ DC eine leichte Reaktion nach Stimulation mit AAV2.WT, AAV2.GL und AAV2.NN, vor allem proliferierten Monozyten /Makrophagen und DCs, die IFN- β , aber nicht IL-1 β als Reaktion auf alle Vektoren produzierten. Die CD11c⁺/CD14⁺ Monozyten-abgeleiteten DCs (MoDCs) produzierten dagegen beide Zytokine als Reaktion auf alle drei AAV-Vektoren, den WT und die Kapsidvarianten, sowie auf LPS. MoDCs sind an der Abwehr von Viren beteiligt und sehr effizient bei der Aktivierung von Zellen der adaptiven Immunantwort (Domínguez, P. M. und Ardavín, C. 2010). Tummala et al. konnten in einem Mausmodell mit intraokularer Entzündung nach intravitrealer AAV2-Gentherapie einen massiven Anstieg von Ly6C⁺ Makrophagen im Auge innerhalb der ersten 7 Tage nachweisen (Tummala et al. 2021). Da in der Maus auch MoDC Ly6C exprimieren, könnten diese Zellen MoDC sein (Menezes et al. 2016; Gardner und Ruffell 2018). Diese Befunde passen zu dem nodulären Entzündungstyp bei viraler Uveitis sowie zu dem klinischen Bild der Uveitis mit nodulären Hornhaut-Präzipitaten nach okulärer Gentherapie (Babu et al. 2020; Kiss et al. 2021; Grishanin et al. 2019). AAV Vektoren können sowohl eine zytotoxische als auch eine humorale Immunantwort hervorrufen, sie sind aber keine guten

Immunstimulatoren, was sie wiederum als Vektoren für die Genterapie prädisponiert (Bucher et al. 2020; Chan et al. 2021; Chirmule et al. 1999; Hernandez et al. 1999; Zaiss et al. 2002).

Trotz nachgewiesener Antikörper konnten weder CD19⁺ B-Zellen noch T-Helfer, zytotoxische T-Zell- oder NKT-Zell-Reaktionen induziert werden. Auch die mittels XTT gemessene T-Zellproliferation als Reaktion auf die AAV-Kapside (XTT-Assay) war schwach und nur bei wenigen Spendern zu beobachten, insbesondere im Vergleich zu den Positivkontrollen LPS, TT und PPD. Das Fehlen einer zellulären Reaktion könnte nicht nur durch eine zu geringe Frequenz an Gedächtniszellen im Blut, sondern möglicherweise auch mit einer insuffizienten Prozessierung und Präsentation der Kapside bzw. deren Peptide durch APCs in vitro erklärt werden. Zusätzlich korrelieren die humorale und zelluläre Immunantwort auf AAVs nicht (Chirmule et al. 1999; Hernandez et al. 1999). Diese Diskrepanz zwischen zum Teil hohen Antikörpertitern bei gleichzeitig geringer zellulärer Antwort könnte damit erklärt werden, dass möglicherweise eine T-Zell-Memory Antwort schneller nachlässt als eine Antikörperantwort gegen Viren, die mehr als 50 Jahre oder sogar ein Leben lang bestehen bleiben können (Antia et al. 2018; Borghans und Ribeiro 2017).

Ein weiterer Nachweis einer Immunantwort ist die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen. Sieben der 48 getesteten Zytokine wurden nach Stimulation der Kulturen mit AAV2.WT, AAV2.GL und AAV2.NN nachgewiesen. Die Kulturüberstände wurden täglich gesammelt und zu gleichen Volumina gepoolt, um zu verschiedenen Zeitpunkten sezernierte Zytokine und Chemokine zu erfassen, bevor sie von den Zellen selbst verbraucht werden.

Die Analyse der Zytokin-Freisetzung aus den stimulierten PBMC zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den drei getesteten Vektoren, jedoch erneut eine Tendenz zu einer stärkeren Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems. Beobachtet wurde eine Sekretion von Monokinen und Chemokinen, die v.a. von Monozyten/Makrophagen/DC sezerniert werden. Die Zytokinsekretionsmuster als Antwort auf die Mutanten und Kontrollen waren individuell sehr unterschiedlich. Nachgewiesen wurden inflammatorische Zytokine wie Gro- α /CXCL1, CCL-3, IL-1 β und IL-6, bevorzugt stimuliert durch die Vektorvarianten, obwohl diese von neutralisierenden Antikörpern schlechter erkannt wurden. Die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Hösel et al. 2012; Rogers et al. 2011; McPhee et al. 2006; Chandler et al. 2019; Zhu et al. 2009) führen zu einer erhöhten

Durchlässigkeit der Blut-Augen-Schranken und zur Rekrutierung von Immunzellen, vor allem von Makrophagen und Neutrophilen, aus der Blutzirkulation in die Netzhaut ([Chandler et al. 2019](#); [Reichel et al. 2017](#)). Analog zu den Proliferationsassays wurden vor allem Monokine nachgewiesen. Chemotaktische Faktoren ([Spandau et al. 2003](#)) wie IL-8/CXCL8, Gro- α /CXCL1 und MIP-1 α /CCL-3 wurden als Reaktion auf AAV2.GL und AAV2.NN gleichermaßen stark sezerniert, aber nur minimal auf das Wildtyp-Kapsid. Gro- α /CXCL1, MIP-1 α /CCL3 und IL-8/CXCL8 werden bei Virusinfektionen vermehrt sezerniert und fördern zum einen die Beseitigung der Vektoren, können jedoch auch zu weiterer Schädigung führen. Zusätzlich agieren diese Chemokine als Lockstoffe für Makrophagen, Monozyten und Neutrophile und können somit Entzündungsreaktionen beziehungsweise den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke auslösen ([Michael et al. 2020](#); [Melchjorsen et al. 2003](#)). Die proliferationsinduzierenden Faktoren IL-6, IL-1 β und Gro- α waren bevorzugt nach Stimulation mit der Mutante AAV2.NN nachweisbar ([Xu et al. 2020](#)). IL-6 wird erwartungsgemäß nach viralen Infektionen sezerniert und spielt insbesondere bei der Vermittlung der akuten Phase der Infektion eine Rolle ([Velazquez-Salinas et al. 2019](#)). Überraschend war jedoch, dass v.a. die Stimulation mit dem WT die Sekretion von VEGF induzierte. VEGF sorgt für eine Abdichtung der Gefäßwände und stimuliert die Bildung von Blutgefäßen und ist somit von Bedeutung für vaskuläre Veränderungen bei Erkrankungen wie der altersbedingten Makuladegeneration, diabetischen Retinopathie als auch bei retinalen Venenverschlüssen ([Wallsh und Gallemore 2021](#)). Auch bei intraokularen Entzündungen wie Uveitis können Gefäßproliferationen auftreten, die durch die VEGF-Produktion der T-Zellen verursacht wird ([Diedrichs-Möhring et al. 2018](#)). Bei Gentherapie von Patienten mit derartigen Erkrankungen wäre somit zu bedenken, dass die Vektoren die Bildung von VEGF stimulieren können und somit die AAV2-vektorbasierte Gentherapie den Verlauf dieser Erkrankungen negativ beeinflussen könnte.

In Analogie zu den Proliferationsassay konnten die typischen T-Helferzell-Zytokine wie IFN- γ oder IL-17 ([Kuranda et al. 2018](#); [Qu et al. 2013](#)) auch nicht als Antwort auf die AAV-Kapside nachgewiesen werden. Auch TNF- α wurde trotz seiner bekannten antiviralen Wirkung nicht sezerniert ([Kuranda et al. 2018](#); [Li et al. 2011](#)).

In diesem Teil der Arbeit, in dem die Immunantworten auf die neuen Vektorvarianten AAV2.GL und AAV2.NN im Vergleich zum AAV2.WT untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass die Vektorvarianten, v. a. AAV2.GL von neutralisierenden Antikörpern weniger gut erkannt

werden. Weiterhin gab es keine Hinweise auf eine Verstärkung der Immunantwort durch die Peptidinsertionen an Aminosäureposition 587, lediglich eine geringe Aktivierung von monozytären DCs der angeborenen Immunantwort. Zusammen mit dem verbesserten retinalen Tropismus der Mutanten AAV2.GL und AAV2.NN, der eine Verringerung der therapeutischen Vektordosis erlaubt, stellen die neuen Vektorvarianten einen bedeutenden Fortschritt dar. Da sowohl die Aktivierung des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems stark dosisabhängig sind, sorgt die Reduktion der injizierten Vektormenge für eine Abschwächung der Immunreaktion ([Ramachandran et al. 2017](#); [Timmers et al. 2020](#)).

Leider standen für die Testung der zellulären Antwort lediglich 7 der 24 Spender zur Verfügung, da immer frische PBMC für optimale Ergebnisse benötigt wurden. Ferner war es schwierig, unter Bedingungen im Forschungslabor die AAV Vektoren in großem Maßstab und entsprechender Reinheit zu produzieren, weshalb für die verschiedenen Assays unterschiedliche Vektorchargen verwendet werden mussten.

4.2 Immunreaktionen auf AAV2-Kapside mit Expression von SARS-CoV2-Spike-Epitopen

Da sich, wie schon erwähnt, die AAV2-Kapside leicht gentechnisch modifizieren lassen, lag es nahe, AAV2-Kapside auch als Plattform für die Expression von Antigenepitopen und somit als Proteinimpfstoff zu nutzen, zumal die AAV2-Kapside auch ohne Genom synthetisiert werden können ([Nieto und Salvetti 2014](#)). Somit wurden während der Covid19-Pandemie zwei AAV2-Kapsidkonstrukte entwickelt, die äquivalent zu AAV2.GL und AAV2.NN, an derselben Insertionsstelle Epitope der Rezeptorbindungsstelle (RBD) von SARS-CoV2 exprimieren. Die Immunogenität der HtW2_S1.1 bzw. HtW2_S1.2 benannten Kapside wurde mit PBMC von Spendern vor (Negativkontrolle) und nach den beiden Impfungen mit dem mRNA-Impfstoff Comirnaty untersucht. Während die mRNA von Comirnaty für das komplette SARS-CoV2-Spike-Protein kodiert, wurden auf den AAV-Kapsiden nur größtmögliche, überlappende Epitope der Rezeptorbindungsstelle exprimiert. Das AAV2-Kapsid erlaubt aus Stabilitätsgründen nur begrenzte Insertionen ([Babutzka et al., Manuskript in Vorbereitung](#)).

Die Kapsidvarianten exprimieren jeweils 60 SARS-CoV2-Spike-RBDs von jeweils etwa 200 Aminosäuren Länge. HtW2_S1.1 exprimiert 197 Aminosäuren (333-529) der Rezeptor-Bindestelle (RBD) des Spike Proteins von SARS-CoV2, die Variante HtW2_S1.2 206 Aminosäuren (300-505). Die Sequenz von HtW2_S1.2 ist im Vergleich zu HtW2_S1.1 N-terminal um 33

Aminosäuren versetzt, da in diesem Bereich weitere T-Zell- immunogene Sequenzen liegen sollen ([Devi et al. 2021](#); [Lan et al. 2020](#)). Die hier getesteten AAV-2-RBD-Varianten sowie der AAV-2 Wildtyp enthielten alle das gleiche Genom und kodierten unter der Kontrolle des CMV-Promotors für eGFP, weshalb ähnliche Reaktionen auf die virale DNA im Falle einer PRR-Aktivierung zu erwarten sind. Im Vergleich zum Wildtyp-Kapsid und eventuell auch zueinander wurden jedoch unterschiedliche zelluläre Reaktionen auf die Spike-Epitope erwartet, die von den beiden HtWS-Varianten exprimiert werden.

Von drei Blutspendern, deren Reaktionen auch bereits zuvor auf AAV2.GL und AAV2.NN untersucht wurden, wurden vor und zum selben Zeitpunkt nach den gleichzeitigen Impfungen mit dem Anti-SARS-CoV2 mRNA-Impfstoff BNT162b2 von BioNTech/Pfizer ([Sahin et al. 2020](#)) Antikörper und zelluläre Immunantworten getestet. Es konnten nicht mehr Spender getestet werden, da keine zeitgleich geimpften Probanden und keine ausreichenden Mengen an Virus-kapsid zur Verfügung standen. Die Spender H1 und H7 hatten das gleiche Alter, Spender H6 und H7 waren männlich. Die optimalen Bedingungen für die zelluläre Stimulation konnten erst im Rahmen der Assays gefunden werden, daher wurden größere Ansätze unter identischen Bedingungen zu verschiedenen Stimulationszeiten geerntet und mit multiplen Antikörperkombinationen gefärbt, um expandierte Zellpopulationen zu detektieren und zu definieren. Nach der ersten Impfung waren die Antikörpertiter für alle Spender noch sehr niedrig, erst nach der zweiten Impfung zeigte sich ein massiver Titeranstieg der anti-SARS-CoV2-Spike-IgGs, insbesondere bei der weiblichen Probandin H1. Gemäß [Demonbreun et al.](#) tendieren Frauen nach der Impfung zur stärkeren Antikörperproduktion als Männer ([Demonbreun et al. 2021](#)). Alle drei Spender bekamen gemäß der damaligen Zulassungsvorschrift des Impfstoffs die zweite Impfung nach 3 Wochen, sodass keine Aussage getroffen werden kann, ob eine zweite Impfung zu späterem Zeitpunkt einen höheren Antikörpertiter oder eine stärkere zelluläre Reaktion zur Folge gehabt hätte. Eine reduzierte Transduktion von HeLa-Zellen mit HtWS_1.2 nach Präinkubation mit dem hochtitrigen Serum von Spender H1 in sehr geringer Verdünnung zeigte eine 60%ige Neutralisation der RBD-Spike-exprimierenden AAV2-Kapsidvariante. Da die Neutralisationskapazität dieses Serums für das native Spike-Protein bzw. SARS-CoV2 nicht bekannt ist, kann man keine Vergleiche zwischen der Neutralisation von SARS-CoV2 und dem hier gezeigten, modifizierten AAV2-Kapsid ziehen.

Auf Lipid-Nanopartikeln basierende mRNA-Impfstoffe können effizient PRRs aktivieren, so triggern Nanopartikel TLR2 und NLRP3-Inflammasome (Lonez et al. 2014). NLRP3 (NOD-, LRR- und Pyrin-Domänen-enhaltendes Protein 3), ein intrazellulärer Sensor, der endogene Gefahrensignale erkennt, führt zur Bildung und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und damit zur Aktivierung und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β oder IL-18 (Swanson et al. 2019). Zusätzlich werden TLR3, TLR7 und TLR 8 in Endosomen durch mRNA aktiviert und führen zur Steigerung der Produktion von Typ-1-Interferonen (Pardi et al. 2018; Teijaro und Farber 2021). Dies wurde auch bei den in-vitro-Stimulationen gezeigt, IFN- β -produzierenden Zellen waren generell nach den Impfungen auch in der Mediumkontrolle erhöht zu finden, ein Indiz für eine unspezifische Stimulation der angeborenen Immunität. Die hier getesteten AAV-2-Spike-exprimierenden Kapside sowie auch der AAV2.WT enthalten DNS, die TLR9 aktivieren kann (Sayedahmed et al. 2020; Teijaro und Farber 2021), während LPS, hier als Positivkontrolle verwendet, TLR4 triggert (Lu et al. 2008; Noppert et al. 2007). Alle Toll-like-Rezeptoren führen zu einer Hochregulierung der Typ 1-Interferone (Noppert et al. 2007), was in allen Kulturen einschließlich der Mediumkontrolle nach der ersten Impfung für IFN- β beobachtet wurde. Bereits vor der ersten Impfung zeigten alle Spender-PBMC eine verstärkte IL-1 β -Produktion als Reaktion auf die Spike-tragende Kapsidvariante HtWS1.1 (HtWS1.2 stand zu dem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung), was darauf hindeutet, dass das Spike-Epitop eine starke aktivierende Wirkung auf die PRR angeborener Immunzellen hat (Arunachalam et al. 2021). Obwohl nach der Impfung mit Comirnaty/BNT162b1 eine Induktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie deren IFN- γ -Produktion beschrieben wurde (Sahin et al. 2020), konnte hier nach in vitro-Stimulation mit den SARS-Cov2-Spike-RBD-exprimierenden AAV-2-Kapsiden keine Expansion von T-Helfer-oder zytotoxischen T-Zellen beobachtet werden. Nur der jüngste Spender zeigte nach der zweiten Impfung eine leicht erhöhte IL-17- und IFN- γ -Sekretion auf HtWS1.2 als Indiz für eine Th1- und Th17-Antwort, was entweder auf eine interindividuelle Variation oder einen potenziellen Alterungseffekt der Immunantwort bei den beiden anderen Spendern durch die nachlassende Verarbeitung und Antigenpräsentation des Immunsystems hinweist (Bajaj et al. 2020; Collier et al. 2021). Der Nachweis der IL-13-Induktion bei zwei der Spender (H1, H6) könnte mit deren atopischem Phänotyp erklärt werden. IL-13 wird von aktivierten Th- und NK-Zellen, Mastzellen und Granulozyten produziert und kann die durch LPS-induzierte Zytokinproduktion herunterregulieren (Hoving 2018).

Entsprechend der Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems sind die Mehrheit der im Bioplex gemessenen Zytokine und Chemokine, die von Monozyten produziert werden. So werden Faktoren wie IL-8 und IL-1RA von Zellen aller Spender sezerniert. Als Folge von TLR- oder Inflammasom-Aktivierung nimmt die IL-8 und IL-1RA Sekretion, nach Stimulation mit den Spike-exprimierenden AAV-Varianten und LPS zu (Zhao et al. 2021). Die Sekretion von IL-1 α - und IL-1 β zeigte ähnliche Muster ebenfalls nur nach der Stimulation mit den Spike-RBD-exprimierende AAVs und LPS, was darauf hindeutet, dass beide Zytokine von denselben Zellpopulationen produziert werden könnten. IL-6 kann durch IL-1 β induziert werden und wird von infizierten Zellen nach der Viruserkennung sezerniert (Delehedde et al. 2021; Dinarello 2018; Viana et al. 2021). Mehrere Funktionen von IL-6 sind bekannt, einschließlich der Förderung der Monozytendifferenzierung, der Antikörperproduktion, und der Induktion von Th17-Zellen und CTL (Cahill und Rogers 2008; Velazquez-Salinas et al. 2019; Tanaka et al. 2014). In den stimulierten Kulturen wurde IL-6 nur als spezifische Reaktion auf RBD-exprimierende AAVs und LPS sezerniert, nicht aber auf den AAV2.WT.

IL-1RA und IL-10 werden von allen Spendern antigenspezifisch exprimiert und haben regulatorische Funktion, sie hemmen proinflammatorische Zytokine einschließlich IL-1 β (Chomarat et al. 2000; Minty et al. 1993; Shao et al. 2014). Hingegen wurden die T-Helfer-typischen Zytokine IL-17 (Th17) und IFN- γ (Th1) lediglich vom jüngsten Spender nach der zweiten Impfung in geringen Mengen sezerniert (Weyand et al. 2011).

Das Fehlen einer effizienten T-Zell-Antwort könnte, wie auch für die Varianten AAV2.GL und AAV2.NN diskutiert, darauf zurückzuführen sein, dass die Kulturen mit ganzen AAV-2-Viruspartikeln, anstelle von Spike-Peptiden (Sahin et al. 2020) stimuliert wurden. Unter diesen Kulturbedingungen waren möglicherweise die vorhandenen antigenpräsentierenden Zellen der Spender nicht in der Lage, die auf den Kapsiden exprimierten Spike-Epitope effizient zu prozessieren und zu präsentieren. Außerdem könnte die Menge des auf den Kapsiden exprimierten Antigens von je 60 Spike-Epitopen pro Kapsid (etwa 1/10 des gesamten Spike-Proteins) unter der Schwelle für die T-Zell-Aktivierung v.a. der älteren Spender liegen (Bajaj et al. 2020; Collier et al. 2021). Hinzu kommt, dass sich viele Spike-Epitope, die stark an HLA-Moleküle binden und/oder von T-Zellen erkannt werden, außerhalb der RBDs befinden (Mateus et al. 2020; Pretti et al. 2020; Nelde et al. 2021; Can et al. 2020).

Bei zwei der Spender (H1, H6) zeigte sich erst nach der 2. Impfung eine spezifische Expansion von CD19⁺ B-Zellen als Reaktion auf HtW2_S1.1 bzw. HtW2_S1.2. Die Präferenz der CD19⁺-B-Zellen für die Spike-Epitope war individuell unterschiedlich, die B-Zellen von Spender H1 bevorzugten die Variante HtW2_S1.2, die B-Zellen von H6 die Variante HtW2_S1.1, während die T-Zellen dieses Spenders eine Präferenz für HtW2_S1.2 aufwiesen. Im Gegensatz zur Peptiderkennung durch den T-Zell-Rezeptor erkennt der B-Zell-Rezeptor größere und intakte Proteine sowie deren dreidimensionale Struktur und ist somit unabhängig von der Antigenverarbeitung durch Zellen des angeborenen Immunsystems.

Ein weiteres Maß für zelluläre Aktivierung ist die verstärkte Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, die als "Aktivierungsmarker" definiert werden, wie z. B. CD69, welches insbesondere zu Beginn einer Immunantwort hochreguliert wird ([Choi Sangdun 2017](#)). Als früher Aktivierungsmarker wurde CD69 nach der zweiten Impfung und 24-stündiger Stimulation v. a. mit HtW2_S1.2 von T Helfer, zytotoxischen T-Zellen und B Zellen verstärkt exprimiert, auch CD56^{dim}NK-Zellen zeigten eine leicht erhöhte Expression von CD69. Bei der CD69-Expression zeigte sich bei allen drei Spendern eine eindeutige Präferenz für HtW2_S1.2.

Die getesteten Spender zeigten auf andere Impfantigene wie Tetanus-Toxoid durchaus starke Immunantworten wie Proliferation und die Sekretion von IL-2, IFN- γ und TNF- α (Daten hier nicht gezeigt), wobei die letzten Tetanus-Impfungen der Spender bereits einige Jahre zurück lagen. Generell sind "Recall"-Antworten, d.h. in vitro-Stimulationen mit gängigen Impfantigenen eine gute Kontrolle für humane zelluläre Reaktionen ([Wildner und Diedrichs-Möhring 2003](#); [Garip et al. 2009](#)). Obwohl die hier untersuchten Spender nachweislich zumindest gute Antikörperantworten gegen SARS-CoV2-Spike-Protein entwickelt hatten (s. **Abbildung 31**; S. 71), waren die Immunantworten auf die von AAV2-exprimierten RBD-Epitope sehr schwach bis nicht nachweisbar. Die RBD-Epitope auf den AAV-2-Kapsiden ([Chirmule et al. 1999](#)) HtW2_S1.1 und HtW2_S1.2 stellen jeweils nur einen Teil des gesamten Spike-Proteins und der Rezeptorbindungsdomäne von SARS-CoV2 dar, während der mRNA-Impfstoff Comirnaty für das komplette Spike-Protein kodiert. Somit kann auch nur ein Teil der durch die Impfung induzierten Immunantwort über die Restimulation mit den AAV-Varianten abgerufen werden.

Zumindest kann das Epitop der SARS-CoV2-Spike RBD, das auf AAV-2-Kapsiden exprimiert wird, auch in Zellen des angeborenen Immunsystems von den hier untersuchten, nicht-infizierten Spendern vor der Impfung eine Immunantwort induzieren, was eine Voraussetzung

für die Induktion einer adaptiven Immunantwort mit der Produktion von (neutralisierenden) Antikörpern und der Aktivierung von Helfer- und zytotoxischen T-Zellen ist. Es ist unklar, warum adeno-assoziierte Viren vor allem bezüglich der erworbenen zellulären Reaktionen kaum immunogen sind, entweder sie sind für das Immunsystem nicht sehr auffällig, oder aber sie induzieren eine starke Immunregulation. Beides ist von Vorteil für die Anwendung bei der Gentherapie, für die eine geringe Immunogenität erwünscht ist, aber andererseits keine gute Voraussetzung für einen effizienten Impfstoff, der gute Immunantworten induzieren sollte. Letztlich können nur präklinische in vivo-Studien und klinische Studien zeigen, ob diese AAV-Varianten als Proteinimpfstoffträger für die breite Anwendung geeignet sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die hier gezeigten Untersuchungen wiederum nur geringe Mengen gereinigter, rekombinanter AAV2-Kapside zur Verfügung standen, aber auch die Anzahl an verfügbaren und geeigneten Spendern für die zellulären Assays sehr beschränkt war, da die Spender aus Gründen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse zum gleichen Zeitpunkt nach der gleichen Impfung getestet werden mussten. Beides hatte die Gruppengrößen stark eingeschränkt. Wegen dieser kleinen Fallzahl sind die signifikanten Unterschiede der CD69⁺-Expression der verschiedenen Zellpopulationen zu verschiedenen Zeiten eher als Neigungen zu werten, da bei einer Fallzahl von 3 keine aussagekräftige Statistik möglich ist. Es gab außerdem keine bekannten und zuverlässigen Testsysteme für die Untersuchungen der Immunantworten, diese mussten erst etabliert werden. Außerdem konnte erst durch die Analyse multipler Ansätze mit zahlreichen verschiedenen Analyten und verschiedenen Stimulationszeiten (wie bei den einmaligen Probenahmen der Impflinge nach der Vakzinierung) eine Möglichkeit für die nachträgliche Auswahl der optimalen Bedingungen geschaffen werden.

Letztlich lässt sich sagen, dass modifizierte AAV2-Kapside, die neue, nicht-AAV2-spezifische Epitope tragen, einerseits eine geringere Immunogenität im Vergleich zum Wildtyp-Kapsid aufweisen können (AAV2.GL und AAV2.NN), andererseits auch als Plattform für neue Impfstoffe dienen könnten, wenn sie entscheidende Epitope von Pathogenen exprimieren und so pathogenspezifische Immunantworten induzieren können.

5 Zusammenfassung

Die intraokulare Gentherapie ist für viele genetisch bedingte Augenerkrankungen ein hoffnungsvoller Behandlungsweg. Aufgrund ihrer vielen Vorteile im Vergleich zu anderen Viren sind AAV-Vektoren das Mittel der Wahl geworden. Wünschenswert wären hierbei Vektoren mit einem verbesserten Tropismus für ihre jeweiligen Zielzellen bei gleichzeitiger verringerter Immunogenität. Die hier untersuchten und als „AAV2.GL“ und „AAV2.NN“ bezeichneten Mutanten vom AAV2-Serotyp zeichnen sich durch 7-mer Peptid-Insertionen in ihrem Kapsidprotein (GLSPPTR; NNPTPSR) zwischen Aminosäureposition N587 und R588 aus und beeinflussen somit einen wichtigen Locus für die Anheftung an die Zielzelle aufgrund der Nähe zur Heparansulfat-Proteoglykan-(HSPG)-Bindungsstelle.

Mit diesen Mutanten wurde ein verbesserter Tropismus für Photorezeptorzellen erzielt, Variante AAV2.GL transduziert effizient Photorezeptor-Zapfen und AAV2.NN hauptsächlich Stäbchen. Dies ermöglicht eine Reduktion der therapeutischen Vektordosis und somit wird auch eine Verringerung der Immunogenität erwartet. Außerdem müssen diese Vektoren nicht mehr subretinal appliziert werden, sondern erreichen die Photorezeptoren auch nach intravitrealer Injektion.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die humoralen und zellulären "Durchseuchungs"-Immunantworten von Blutspendern, die zuvor keiner AAV-Gentherapie unterzogen wurden, auf die beiden AAV2-Kapsidmutanten im Vergleich zum Wildtyp AAV2-Kapsid untersucht. Zelluläre Immunantworten waren kaum zu beobachten, weder auf AAV2.WT noch auf die Varianten AAV2. Bei den Gesamt-Antikörperantworten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Varianten und dem Wildtyp, aber die Varianten AAV2.NN und vor allem von AAV2.GL wurden weniger effizient neutralisiert als AAV2.WT.

In einem zweiten Projekt wurden im Vergleich zum AAV2.WT die humorale und zelluläre Immunität auf zwei AAV-2-Kapsidmutanten (HTW2_S1.1 und HTW2_S1.2) untersucht, die überlappende Regionen der ACE2-Rezeptor-bindenden Domäne (RBD) des SARS-CoV2-Spike-Proteins exprimieren. Hier wurden Blutspender nach der ersten und zweiten Impfung mit dem mRNA-Impfstoff Comirnaty (Biontech/Pfizer) getestet, der für das komplette SARS-CoV2-Spike-Protein kodiert. Periphere Blutlymphozyten wurden *in vitro* auf Expansion und Zytokinproduktion untersucht. Wie im ersten Teil der Arbeit waren kaum Immunantworten auf den AAV2-Wildtyp, jedoch individuelle Unterschiede zwischen den Immunreaktionen der Spender

und den beiden AAV2-Varianten, zu sehen. Alle Spender zeigten nur nach den Impfungen erhöhte Aktivierung (CD69-Expression) der T-, B- und NK-Zellen auf HTW2_S1.1- und HTW2_S1.2-Stimulation, aber auch gesteigerte Zytokin- und Chemokinexpression, vor allem von Monokinen. Die AAV2-exprimierten RBD-Epitope sind also immunogen und stimulieren bei geimpften Probanden eine SARS-CoV2-spezifische Immunantwort.

Diese Arbeit zeigt, dass je nach Modifikation des AAV2-Kapsids eine Abschwächung oder sogar eine verstärkte Immunantwort induziert werden kann, obwohl das Wildtyp-Kapsid per se kaum oder nur gering immunogen ist.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas, Abul K.; Lichtman, Andrew H.; Pillai, Shiv (2016): Basic immunology : functions and disorders of the immune system. Fifth edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Antia, Alice; Ahmed, Hasan; Handel, Andreas; Carlson, Nichole E.; Amanna, Ian J.; Antia, Rustom; Slifka, Mark (2018): Heterogeneity and longevity of antibody memory to viruses and vaccines. In: *PLoS biology* 16 (8), e2006601. DOI: 10.1371/journal.pbio.2006601.
- Arunachalam, Prabhu S.; Scott, Madeleine K. D.; Hagan, Thomas; Li, Chunfeng; Feng, Yupeng; Wimmers, Florian et al. (2021): Systems vaccinology of the BNT162b2 mRNA vaccine in humans. In: *Nature* 596 (7872), S. 410–416. DOI: 10.1038/s41586-021-03791-x.
- Asokan, Aravind; Schaffer, David V.; Samulski, R. Jude (2012): The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (4), S. 699–708. DOI: 10.1038/mt.2011.287.
- ATCHISON, R. W.; CASTO, B. C.; HAMMON, W. M. (1965): ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. In: *Science* 149 (3685), S. 754–756. DOI: 10.1126/science.149.3685.754.
- Babu, Kalpana; Konana, Vinaya Kumar; Ganesh, Sudha K.; Patnaik, Gazal; Chan, Nicole S. W.; Chee, Soon-Phaik et al. (2020): Viral anterior uveitis. In: *Indian journal of ophthalmology* 68 (9), S. 1764–1773. DOI: 10.4103/ijo.IJO_928_20.
- Baek, Minkyung; DiMaio, Frank; Anishchenko, Ivan; Dauparas, Justas; Ovchinnikov, Sergey; Lee, Gyu Rie et al. (2021): Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. In: *Science (New York, N.Y.)* 373 (6557), S. 871–876. DOI: 10.1126/science.abj8754.
- Bajaj, Varnica; Gadi, Nirupa; Spihlman, Allison P.; Wu, Samantha C.; Choi, Christopher H.; Moulton, Vaishali R. (2020): Aging, Immunity, and COVID-19: How Age Influences the Host Immune Response to Coronavirus Infections? In: *Frontiers in physiology* 11, S. 571416. DOI: 10.3389/fphys.2020.571416.
- Bantel-Schaal, U.; zur Hausen, H. (1984): Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. In: *Virology* 134 (1), S. 52–63. DOI: 10.1016/0042-6822(84)90271-x.
- Berns, Kenneth I. (2020): The Unusual Properties of the AAV Inverted Terminal Repeat. In: *Human gene therapy* 31 (9-10), S. 518–523. DOI: 10.1089/hum.2020.017.
- Borghans, Jose; Ribeiro, Ruy M. (2017): The maths of memory. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.26754.
- Bouquet, Céline; Vignal Clermont, Catherine; Galy, Anne; Fitoussi, Serge; Blouin, Laure; Munk, Marion R. et al. (2019): Immune Response and Intraocular Inflammation in Patients With Leber Hereditary Optic Neuropathy Treated With Intravitreal Injection of Recombinant Adeno-Associated Virus 2 Carrying the ND4 Gene: A Secondary Analysis of a Phase 1/2 Clinical Trial. In: *JAMA ophthalmology* 137 (4), S. 399–406. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2018.6902.
- Boyd, R. F.; Boye, S. L.; Conlon, T. J.; Erger, K. E.; Sledge, D. G.; Langohr, I. M. et al. (2016): Reduced retinal transduction and enhanced transgene-directed immunogenicity with intravitreal delivery of rAAV following posterior vitrectomy in dogs. In: *Gene therapy* 23 (6), S. 548–556. DOI: 10.1038/gt.2016.31.
- Bucher, Kirsten; Rodríguez-Bocanegra, Eduardo; Dauletbekov, Daniyar; Fischer, M. Dominik (2020): Immune responses to retinal gene therapy using adeno-associated viral vectors - Implications for treatment success and safety. In: *Progress in retinal and eye research*, S. 100915. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100915.

- Büning, Hildegard; Huber, Anke; Zhang, Liang; Meumann, Nadja; Hacker, Ulrich (2015): Engineering the AAV capsid to optimize vector-host-interactions. In: *Current opinion in pharmacology* 24, S. 94–104. DOI: 10.1016/j.coph.2015.08.002.
- Büning, Hildegard; Perabo, Luca; Coutelle, Oliver; Quadt-Humme, Sibille; Hallek, Michael (2008): Recent developments in adeno-associated virus vector technology. In: *The journal of gene medicine* 10 (7), S. 717–733. DOI: 10.1002/jgm.1205.
- Büning, Hildegard; Srivastava, Arun (2019): Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors. In: *Molecular therapy. Methods & clinical development* 12, S. 248–265. DOI: 10.1016/j.omtm.2019.01.008.
- Cahill, Catherine M.; Rogers, Jack T. (2008): Interleukin (IL) 1beta induction of IL-6 is mediated by a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT/IkappaB kinase alpha pathway targeting activator protein-1. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (38), S. 25900–25912. DOI: 10.1074/jbc.M707692200.
- Calcedo, Roberto; Wilson, James M. (2013): Humoral Immune Response to AAV. In: *Frontiers in immunology* 4, S. 341. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00341.
- Can, Hüseyin; Köseoğlu, Ahmet Efe; Erkunt Alak, Sedef; Güvendi, Mervener; Döşkaya, Mert; Karakavuk, Muhammet et al. (2020): In silico discovery of antigenic proteins and epitopes of SARS-CoV-2 for the development of a vaccine or a diagnostic approach for COVID-19. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 22387. DOI: 10.1038/s41598-020-79645-9.
- Chan, Ying Kai; Dick, Andrew D.; Hall, Sara Mary; Langmann, Thomas; Scribner, Curtis L.; Mansfield, Brian C. (2021): Inflammation in Viral Vector-Mediated Ocular Gene Therapy: A Review and Report From a Workshop Hosted by the Foundation Fighting Blindness, 9/2020. In: *Translational vision science & technology* 10 (4), S. 3. DOI: 10.1167/tvst.10.4.3.
- Chandler, Laurel C.; Barnard, Alun R.; Caddy, Sarah L.; Patrício, Maria I.; McClements, Michelle E.; Fu, Howell et al. (2019): Enhancement of Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Therapy Using Hydroxychloroquine in Murine and Human Tissues. In: *Molecular therapy. Methods & clinical development* 14, S. 77–89. DOI: 10.1016/j.omtm.2019.05.012.
- Chira, Sergiu; Jackson, Carlo S.; Oprea, Iulian; Ozturk, Ferhat; Pepper, Michael S.; Diaconu, Iulia et al. (2015): Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. In: *Oncotarget* 6 (31), S. 30675–30703. DOI: 10.18632/oncotarget.5169.
- Chirmule, N.; Propert, K. J.; Magosin, S. A.; Qian, Y.; Qian, R.; Wilson, J. M. (1999): Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. In: *Gene therapy* 6 (9), S. 1574–1583. DOI: 10.1038/sj.gt.3300994.
- Choi Sangdun (Hg.) (2017): *Encyclopedia of Signaling Molecules*. CD69. Unter Mitarbeit von Niess J.H. Radulovic K. New York: Springer.
- Chomarat, P.; Banchereau, J.; Davoust, J.; Palucka, A. K. (2000): IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. In: *Nature immunology* 1 (6), S. 510–514. DOI: 10.1038/82763.
- Colella, Pasqualina; Ronzitti, Giuseppe; Mingozi, Federico (2018): Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. In: *Molecular therapy. Methods & clinical development* 8, S. 87–104. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.11.007.

- Collaco, Roy F.; Kalman-Maltese, Vivian; Smith, Andrew D.; Dignam, John David; Trempe, James P. (2003): A biochemical characterization of the adeno-associated virus Rep40 helicase. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (36), S. 34011–34017. DOI: 10.1074/jbc.M301537200.
- Collier, Dami A.; Ferreira, Isabella A. T. M.; Kotagiri, Prasanti; Datir, Rawlings P.; Lim, Eleanor Y.; Touizer, Emma et al. (2021): Age-related immune response heterogeneity to SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2. In: *Nature* 596 (7872), S. 417–422. DOI: 10.1038/s41586-021-03739-1.
- Cunha-Vaz, José; Bernardes, Rui; Lobo, Conceição (2011): Blood-retinal barrier. In: *European journal of ophthalmology* 21 Suppl 6, S3-9. DOI: 10.5301/EJO.2010.6049.
- Dalkara, Deniz; Sahel, José-Alain (2014): Gene therapy for inherited retinal degenerations. In: *Comptes rendus biologiques* 337 (3), S. 185–192. DOI: 10.1016/j.crv.2014.01.002.
- Darrow, Jonathan J. (2019): Luxturna: FDA documents reveal the value of a costly gene therapy. In: *Drug discovery today* 24 (4), S. 949–954. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.01.019.
- Daya, Shyam; Berns, Kenneth I. (2008): Gene therapy using adeno-associated virus vectors. In: *Clinical microbiology reviews* 21 (4), S. 583–593. DOI: 10.1128/CMR.00008-08.
- Delehedde, Christophe; Even, Luc; Midoux, Patrick; Pichon, Chantal; Perche, Federico (2021): Intracellular Routing and Recognition of Lipid-Based mRNA Nanoparticles. In: *Pharmaceutics* 13 (7). DOI: 10.3390/pharmaceutics13070945.
- Demonbreun, Alexis R.; Sancilio, Amelia; Velez, Matt E.; Ryan, Daniel T.; Pesce, Lorenzo; Saber, Rana et al. (2021): COVID-19 mRNA Vaccination Generates Greater Immunoglobulin G Levels in Women Compared to Men. In: *The Journal of infectious diseases* 224 (5), S. 793–797. DOI: 10.1093/infdis/jiab314.
- Detrick, Barbara; Hooks, John J. (2010): Immune regulation in the retina. In: *Immunologic research* 47 (1-3), S. 153–161. DOI: 10.1007/s12026-009-8146-1.
- Devi, Yengkhom Damayanti; Goswami, Himanshu Ballav; Konwar, Sushmita; Doley, Chandrima; Doley, Anutee; Devi, Arpita et al. (2021): Immunoinformatics mapping of potential epitopes in SARS-CoV-2 structural proteins. In: *PloS one* 16 (11), e0258645. DOI: 10.1371/journal.pone.0258645.
- Diedrichs-Möhring, Maria; Niesik, Sandy; Priglinger, Claudia S.; Thurau, Stephan R.; Obermayr, Franz; Sperl, Stefan; Wildner, Gerhild (2018): Intraocular DHODH-inhibitor PP-001 suppresses relapsing experimental uveitis and cytokine production of human lymphocytes, but not of RPE cells. In: *Journal of neuroinflammation* 15 (1), S. 54. DOI: 10.1186/s12974-018-1088-6.
- Dinareello, Charles A. (2018): Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. In: *Immunological reviews* 281 (1), S. 8–27. DOI: 10.1111/imr.12621.
- Dismuke, David J.; Tenenbaum, Liliame; Samulski, R. Jude (2013): Biosafety of recombinant adeno-associated virus vectors. In: *Current gene therapy* 13 (6), S. 434–452. DOI: 10.2174/15665232113136660007.
- Domínguez, P. M. und Ardavín, C. (2010): Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. In: *Immunological reviews* 234 (1), S. 90–104. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2009.00876.x.
- El Andari, Jihad; Grimm, Dirk (2021): Production, Processing, and Characterization of Synthetic AAV Gene Therapy Vectors. In: *Biotechnology journal* 16 (1), e2000025. DOI: 10.1002/biot.202000025.

- Ertl, Hildegund C. J. (2021): T Cell-Mediated Immune Responses to AAV and AAV Vectors. In: *Frontiers in immunology* 12, S. 666666. DOI: 10.3389/fimmu.2021.666666.
- Flotte, Terence R.; Berns, Kenneth I. (2005): Adeno-associated virus: a ubiquitous commensal of mammals. In: *Human gene therapy* 16 (4), S. 401–407. DOI: 10.1089/hum.2005.16.401.
- Friedmann, T.; Roblin, R. (1972): Gene therapy for human genetic disease? In: *Science* 175 (4025), S. 949–955. DOI: 10.1126/science.175.4025.949.
- Gao, Guangping; Vandenberghe, Luk H.; Wilson, James M. (2005): New recombinant serotypes of AAV vectors. In: *Current gene therapy* 5 (3), S. 285–297. DOI: 10.2174/1566523054065057.
- Gao, Guang-Ping; Alvira, Mauricio R.; Wang, Lili; Calcedo, Roberto; Johnston, Julie; Wilson, James M. (2002): Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18), S. 11854–11859. DOI: 10.1073/pnas.182412299.
- Gardner, Alycia; Ruffell, Brian (2018): moDCs, Less Problems. In: *Immunity* 48 (1), S. 6–8. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.12.017.
- Garip, Aylin; Diedrichs-Möhring, Maria; Thurau, Stephan R.; Deeg, Cornelia A.; Wildner, Gerhild (2009): Uveitis in a patient treated with Bacille-Calmette-Guérin: possible antigenic mimicry of mycobacterial and retinal antigens. In: *Ophthalmology* 116 (12), 2457-62.e1-2. DOI: 10.1016/j.ophtha.2009.05.021.
- Gehrke, Miranda; Diedrichs-Möhring, Maria; Bogedain, Jacqueline; Büning, Hildegard; Michalakis, Stylianos; Wildner, Gerhild (2022): Immunogenicity of Novel AAV Capsids for Retinal Gene Therapy. In: *Cells* 11 (12). DOI: 10.3390/cells11121881.
- Grishanin, Ruslan; Vuilleminot, Brian; Sharma, Pallavi; Keravala, Annahita; Greengard, Judith; Gelfman, Claire et al. (2019): Preclinical Evaluation of ADVN-022, a Novel Gene Therapy Approach to Treating Wet Age-Related Macular Degeneration. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 27 (1), S. 118–129. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.11.003.
- Gurda, Brittney L.; DiMattia, Michael A.; Miller, Edward B.; Bennett, Antonette; McKenna, Robert; Weichert, Wendy S. et al. (2013): Capsid antibodies to different adeno-associated virus serotypes bind common regions. In: *Journal of virology* 87 (16), S. 9111–9124. DOI: 10.1128/JVI.00622-13.
- Guruprasad, Lalitha (2021): Human SARS CoV-2 spike protein mutations. In: *Proteins* 89 (5), S. 569–576. DOI: 10.1002/prot.26042.
- Hamilton, Henry; Gomos, Jannette; Berns, Kenneth I.; Falck-Pedersen, Erik (2004): Adeno-associated virus site-specific integration and AAVS1 disruption. In: *Journal of virology* 78 (15), S. 7874–7882. DOI: 10.1128/JVI.78.15.7874-7882.2004.
- Hareendran, Sangeetha; Balakrishnan, Balaji; Sen, Dwaipayan; Kumar, Sanjay; Srivastava, Alok; Jayandharan, Giridhara R. (2013): Adeno-associated virus (AAV) vectors in gene therapy: immune challenges and strategies to circumvent them. In: *Reviews in medical virology* 23 (6), S. 399–413. DOI: 10.1002/rmv.1762.
- Heegaard, Erik D.; Brown, Kevin E. (2002): Human parvovirus B19. In: *Clinical microbiology reviews* 15 (3), S. 485–505. DOI: 10.1128/CMR.15.3.485-505.2002.
- Hensley, Scott E.; Amalfitano, Andrea (2007): Toll-like receptors impact on safety and efficacy of gene transfer vectors. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 15 (8), S. 1417–1422. DOI: 10.1038/sj.mt.6300217.

- Hernandez, Y. J.; Wang, J.; Kearns, W. G.; Loiler, S.; Poirier, A.; Flotte, T. R. (1999): Latent adeno-associated virus infection elicits humoral but not cell-mediated immune responses in a nonhuman primate model. In: *Journal of virology* 73 (10), S. 8549–8558. DOI: 10.1128/JVI.73.10.8549-8558.1999.
- Herzog, Roland W. (2019): Complexity of immune responses to AAV transgene products - Example of factor IX. In: *Cellular immunology* 342, S. 103658. DOI: 10.1016/j.cellimm.2017.05.006.
- Hösel, Marianna; Broxtermann, Mathias; Janicki, Hanna; Esser, Knud; Arzberger, Silke; Hartmann, Pia et al. (2012): Toll-like receptor 2-mediated innate immune response in human nonparenchymal liver cells toward adeno-associated viral vectors. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (1), S. 287–297. DOI: 10.1002/hep.24625.
- Hoving, J. Claire (2018): Targeting IL-13 as a Host-Directed Therapy Against Ulcerative Colitis. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8, S. 395. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00395.
- Huttner, N. A.; Girod, A.; Perabo, L.; Edbauer, D.; Kleinschmidt, J. A.; Büning, H.; Hallek, M. (2003): Genetic modifications of the adeno-associated virus type 2 capsid reduce the affinity and the neutralizing effects of human serum antibodies. In: *Gene therapy* 10 (26), S. 2139–2147. DOI: 10.1038/sj.gt.3302123.
- Jiang, Guomin; Ke, Yan; Sun, Deming; Wang, Yali; Kaplan, Henry J.; Shao, Hui (2009): Regulatory role of TLR ligands on the activation of autoreactive T cells by retinal astrocytes. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 50 (10), S. 4769–4776. DOI: 10.1167/iovs.08-3303.
- Johnson, Jarrod S.; Samulski, R. Jude (2009): Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus. In: *Journal of virology* 83 (6), S. 2632–2644. DOI: 10.1128/JVI.02309-08.
- K.I. Berns und C. Giraud (1996): Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in Gene Therapy. *Biology of Adeno-associated Virus*: Springer.
- Kaul, Dinesh (2020): An overview of coronaviruses including the SARS-2 coronavirus - Molecular biology, epidemiology and clinical implications. In: *Current medicine research and practice* 10 (2), S. 54–64. DOI: 10.1016/j.cmrp.2020.04.001.
- Kiss, Szilárd; Oresic Bender, Kristina; Grishanin, Ruslan N.; Hanna, Kelly M.; Nieves, Julio D.; Sharma, Pallavi et al. (2021): Long-Term Safety Evaluation of Continuous Intraocular Delivery of Aflibercept by the Intravitreal Gene Therapy Candidate ADVIM-022 in Nonhuman Primates. In: *Translational vision science & technology* 10 (1), S. 34. DOI: 10.1167/tvst.10.1.34.
- Kotterman, M. A.; Yin, L.; Strazzeri, J. M.; Flannery, J. G.; Merigan, W. H.; Schaffer, D. V. (2015): Antibody neutralization poses a barrier to intravitreal adeno-associated viral vector gene delivery to non-human primates. In: *Gene therapy* 22 (2), S. 116–126. DOI: 10.1038/gt.2014.115.
- Kumar, Matam Vijay; Nagineni, Chandrasekharam N.; Chin, Marian S.; Hooks, John J.; Detrick, Barbara (2004): Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. In: *Journal of neuroimmunology* 153 (1-2), S. 7–15. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2004.04.018.
- Kuranda, Klaudia; Jean-Alphonse, Priscilla; Leborgne, Christian; Hardet, Romain; Collaud, Fanny; Marmier, Solenne et al. (2018): Exposure to wild-type AAV drives distinct capsid immunity profiles in humans. In: *The Journal of clinical investigation* 128 (12), S. 5267–5279. DOI: 10.1172/JCI122372.

Lan, Jun; Ge, Jiwan; Yu, Jinfang; Shan, Sisi; Zhou, Huan; Fan, Shilong et al. (2020): Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. In: *Nature* 581 (7807), S. 215–220. DOI: 10.1038/s41586-020-2180-5.

Le Bec und Douar (2006): Gene Therapy Progress and Prospects – Vectorology: Gene Therapy Progress and Prospects – Vectorology: design and production of expression cassettes in AAV vectors. In: *Gene therapy* 13 (10), S. 805–813. DOI: 10.1038/sj.gt.3302724.

Lee, Suhwan; Im Kang, Kyeong; Kim, Ji Hyun; Jung, Bok Kyoung; Park, Keerang; Chang, Heesoon et al. (2019): Relationship Between Neutralizing Antibodies Against Adeno-Associated Virus in the Vitreous and Serum: Effects on Retinal Gene Therapy. In: *Translational vision science & technology* 8 (2), S. 14. DOI: 10.1167/tvst.8.2.14.

Li, Chengwen; Hirsch, Matthew; Asokan, Aravind; Zeithaml, Brian; Ma, Hong; Kafri, Tal; Samulski, R. Jude (2007): Adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid-specific cytotoxic T lymphocytes eliminate only vector-transduced cells coexpressing the AAV2 capsid in vivo. In: *Journal of virology* 81 (14), S. 7540–7547. DOI: 10.1128/JVI.00529-07.

Li, Hua; Lasaro, Marcio O.; Jia, Bei; Lin, Shih Wen; Haut, Larissa H.; High, Katherine A.; Ertl, Hildegund C. J. (2011): Capsid-specific T-cell responses to natural infections with adeno-associated viruses in humans differ from those of nonhuman primates. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (11), S. 2021–2030. DOI: 10.1038/mt.2011.81.

Li, Qihong; Miller, Rehae; Han, Ping-Yang; Pang, Jijing; Dinculescu, Astra; Chiodo, Vince; Hauswirth, William W. (2008): Intraocular route of AAV2 vector administration defines humoral immune response and therapeutic potential. In: *Molecular Vision* 14, S. 1760–1769.

Lin, Xiaomin; Fang, Dan; Zhou, Hongyan; Su, Shao Bo (2013): The expression of Toll-like receptors in murine Müller cells, the glial cells in retina. In: *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 34 (8), S. 1339–1346. DOI: 10.1007/s10072-012-1236-1.

Ling, Chen; Wang, Yuan; Feng, Ying-lu; Zhang, Ya-ni; Li, Jun; Hu, Xin-rui et al. (2015): Prevalence of neutralizing antibodies against liver-tropic adeno-associated virus serotype vectors in 100 healthy Chinese and its potential relation to body constitutions. In: *Journal of Integrative Medicine* 13 (5), S. 341–346. DOI: 10.1016/S2095-4964(15)60200-X.

Liu, Q.; Huang, W.; Zhang, H.; Wang, Y.; Zhao, J.; Song, A. et al. (2014): Neutralizing antibodies against AAV2, AAV5 and AAV8 in healthy and HIV-1-infected subjects in China: implications for gene therapy using AAV vectors. In: *Gene therapy* 21 (8), S. 732–738. DOI: 10.1038/gt.2014.47.

Liu, Yu-Fen; Huang, Shaofen; Ng, Tsz Kin; Liang, Jia-Jian; Xu, Yanxuan; Chen, Shao-Lang et al. (2020): Longitudinal evaluation of immediate inflammatory responses after intravitreal AAV2 injection in rats by optical coherence tomography. In: *Experimental eye research* 193, S. 107955. DOI: 10.1016/j.exer.2020.107955.

Lonez, Caroline; Bessodes, Michel; Scherman, Daniel; Vandenbranden, Michel; Escriou, Virginie; Ruysschaert, Jean-Marie (2014): Cationic lipid nanocarriers activate Toll-like receptor 2 and NLRP3 inflammasome pathways. In: *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 10 (4), S. 775–782. DOI: 10.1016/j.nano.2013.12.003.

Lu, Yang (2004): Recombinant Adeno-Associated Virus As Delivery Vector for Gene Therapy—A Review. In: *Stem cells and development* (13), S. 133–145. DOI: 10.1089/154732804773099335.

- Lu, Yong-Chen; Yeh, Wen-Chen; Ohashi, Pamela S. (2008): LPS/TLR4 signal transduction pathway. In: *Cytokine* 42 (2), S. 145–151. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.01.006.
- Luckheeram, Rishi Vishal; Zhou, Rui; Verma, Asha Devi; Xia, Bing (2012): CD4⁺T cells: differentiation and functions. In: *Clinical & developmental immunology* 2012, S. 925135. DOI: 10.1155/2012/925135.
- Maersch, Stephan; Huber, Anke; Büning, Hildegard; Hallek, Michael; Perabo, Luca (2010): Optimization of stealth adeno-associated virus vectors by randomization of immunogenic epitopes. In: *Virology* 397 (1), S. 167–175. DOI: 10.1016/j.virol.2009.10.021.
- Martino, Ashley T.; Markusic, David M. (2020): Immune Response Mechanisms against AAV Vectors in Animal Models. In: *Molecular therapy. Methods & clinical development* 17, S. 198–208. DOI: 10.1016/j.omtm.2019.12.008.
- Mateus, Jose; Grifoni, Alba; Tarke, Alison; Sidney, John; Ramirez, Sydney I.; Dan, Jennifer M. et al. (2020): Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. In: *Science* 370 (6512), S. 89–94. DOI: 10.1126/science.abd3871.
- Matthews, K. E.; Keating, A. (1996): Gene therapy with physical methods of gene transfer. In: *Transfus Sci* 17 (1), S. 29–34. DOI: 10.1016/0955-3886(95)00055-0.
- McCarty, D. M.; Monahan, P. E.; Samulski, R. J. (2001): Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. In: *Gene therapy* 8 (16), S. 1248–1254. DOI: 10.1038/sj.gt.3301514.
- McCormack und Rabbitts (2004): Activation of the T-Cell Oncogene LMO2 after Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. In: *New England Journal of Medicine* 350 (9), S. 913–922. DOI: 10.1056/NEJMra032207.
- McCraw, Dustin M.; O’Donnell, Jason K.; Taylor, Kenneth A.; Stagg, Scott M.; Chapman, Michael S. (2012): Structure of adeno-associated virus-2 in complex with neutralizing monoclonal antibody A20. In: *Virology* 431 (1), S. 40–49. DOI: 10.1016/j.virol.2012.05.004.
- McPhee, S. W. J.; Janson, C. G.; Li, C.; Samulski, R. J.; Camp, A. S.; Francis, J. et al. (2006): Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease. In: *The journal of gene medicine* 8 (5), S. 577–588. DOI: 10.1002/jgm.885.
- Melchjorsen, Jesper; Sørensen, Louise N.; Paludan, Søren R. (2003): Expression and function of chemokines during viral infections: from molecular mechanisms to in vivo function. In: *J Leukoc Biol* 74 (3), S. 331–343. DOI: 10.1189/jlb.1102577.
- Menezes, Shinelle; Melandri, Daisy; Anselmi, Giorgio; Perchet, Thibaut; Loschko, Jakob; Dubrot, Juan et al. (2016): The Heterogeneity of Ly6Chi Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS⁺ Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells. In: *Immunity* 45 (6), S. 1205–1218. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.12.001.
- Mercurio, Ivan; Tragni, Vincenzo; Busto, Francesco; Grassi, Anna de; Pierri, Ciro Leonardo (2021): Protein structure analysis of the interactions between SARS-CoV-2 spike protein and the human ACE2 receptor: from conformational changes to novel neutralizing antibodies. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 78 (4), S. 1501–1522. DOI: 10.1007/s00018-020-03580-1.
- Mével, Mathieu; Bouzelha, Mohammed; Leray, Aurélien; Pacouret, Simon; Guilbaud, Mickael; Penaud-Budloo, Magalie et al. (2020): Chemical modification of the adeno-associated virus capsid to improve gene delivery. In: *Chem. Sci.* 11 (4), S. 1122–1131. DOI: 10.1039/C9SC04189C.

- Michael, Benedict D.; Bricio-Moreno, Laura; Sorensen, Elizabeth W.; Miyabe, Yoshishige; Lian, Jeffrey; Solomon, Tom et al. (2020): Astrocyte- and Neuron-Derived CXCL1 Drives Neutrophil Transmigration and Blood-Brain Barrier Permeability in Viral Encephalitis. In: *Cell reports* 32 (11), S. 108150. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108150.
- Mingozzi, Federico; Büning, Hildegard (2015): Adeno-Associated Viral Vectors at the Frontier between Tolerance and Immunity. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 120. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00120.
- Minty, A.; Chalon, P.; Derocq, J. M.; Dumont, X.; Guillemot, J. C.; Kaghad, M. et al. (1993): Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. In: *Nature* 362 (6417), S. 248–250. DOI: 10.1038/362248a0.
- Moskalenko, Marina; Chen, Lili; Roey, Melinda; Donahue, Brian; Snyder, Richard; McArthur, James; Patel, Salil (2000): Epitope Mapping of Human Anti-Adeno-Associated Virus Type 2 Neutralizing Antibodies: Implications for Gene Therapy and Virus Structure. In: *Journal of virology* 74. DOI: 10.1128/JVI.74.4.1761-1766.2000.
- Nayerossadat, Nouri; Maedeh, Talebi; Ali, Palizban Abas (2012): Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. In: *Advanced biomedical research* 1, S. 27. DOI: 10.4103/2277-9175.98152.
- Nelde, Annika; Bilich, Tatjana; Heitmann, Jonas S.; Maringer, Yacine; Salih, Helmut R.; Roerden, Malte et al. (2021): SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. In: *Nature immunology* 22 (1), S. 74–85. DOI: 10.1038/s41590-020-00808-x.
- Newman, Nancy J.; Yu-Wai-Man, Patrick; Carelli, Valerio; Moster, Mark L.; Biousse, Valerie; Vignal-Clermont, Catherine et al. (2021): Efficacy and Safety of Intravitreal Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy Treated within 6 Months of Disease Onset. In: *Ophthalmology* 128 (5), S. 649–660. DOI: 10.1016/j.ophtha.2020.12.012.
- Nieto, Karen; Salvetti, Anna (2014): AAV Vectors Vaccines Against Infectious Diseases. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 5. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00005.
- Noppert, Susie J.; Fitzgerald, Katherine A.; Hertzog, Paul J. (2007): The role of type I interferons in TLR responses. In: *Immunology and cell biology* 85 (6), S. 446–457. DOI: 10.1038/sj.icb.7100099.
- Okunuki, Yoko; Mukai, Ryo; Nakao, Takeshi; Tabor, Steven J.; Butovsky, Oleg; Dana, Reza et al. (2019): Retinal microglia initiate neuroinflammation in ocular autoimmunity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (20), S. 9989–9998. DOI: 10.1073/pnas.1820387116.
- Oliveira-Nascimento, Laura; Massari, Paola; Wetzler, Lee M. (2012): The Role of TLR2 in Infection and Immunity. In: *Frontiers in immunology* 3, S. 79. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00079.
- Pardi, Norbert; Hogan, Michael J.; Porter, Frederick W.; Weissman, Drew (2018): mRNA vaccines - a new era in vaccinology. In: *Nature reviews. Drug discovery* 17 (4), S. 261–279. DOI: 10.1038/nrd.2017.243.
- Pavlou, Marina; Schön, Christian; Ocelli, Laurence M.; Rossi, Axel; Meumann, Nadja; Boyd, Ryan F. et al. (2021): Novel AAV capsids for intravitreal gene therapy of photoreceptor disorders. In: *EMBO molecular medicine* 13 (4), e13392. DOI: 10.15252/emmm.202013392.
- Pedersen, Savannah F.; Ho, Ya-Chi (2020): SARS-CoV-2: a storm is raging. In: *The Journal of clinical investigation* 130 (5), S. 2202–2205. DOI: 10.1172/JCI137647.

- Pénzes, Judit J.; Söderlund-Venermo, Maria; Canuti, Marta; Eis-Hübinger, Anna Maria; Hughes, Joseph; Cotmore, Susan F.; Harrach, Balázs (2020): Reorganizing the family Parvoviridae: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. In: *Archives of virology* 165 (9), S. 2133–2146. DOI: 10.1007/s00705-020-04632-4.
- Perabo, Luca; Endell, Jan; King, Susan; Lux, Kerstin; Goldnau, Daniela; Hallek, Michael; Büning, Hildgard (2006): Combinatorial engineering of a gene therapy vector: directed evolution of adeno-associated virus. In: *The journal of gene medicine* 8 (2), S. 155–162. DOI: 10.1002/jgm.849.
- Pretti, Marco Antônio M.; Galvani, Rômulo G.; Vieira, Gustavo Fioravanti; Bonomo, Adriana; Bonamino, Martín H.; Boroni, Mariana (2020): Class I HLA Allele Predicted Restricted Antigenic Coverages for Spike and Nucleocapsid Proteins Are Associated With Deaths Related to COVID-19. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 565730. DOI: 10.3389/fimmu.2020.565730.
- Qu, Ning; Xu, Mingli; Mizoguchi, Izuru; Furusawa, Jun-ichi; Kaneko, Kotaro; Watanabe, Kazunori et al. (2013): Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in inflammatory diseases. In: *Clinical & developmental immunology* 2013, S. 968549. DOI: 10.1155/2013/968549.
- Ramachandran, Pavitra S.; Lee, Vivian; Wei, Zhangyong; Song, Ji Yun; Casal, Giulia; Cronin, Therese et al. (2017): Evaluation of Dose and Safety of AAV7m8 and AAV8BP2 in the Non-Human Primate Retina. In: *Human gene therapy* 28 (2), S. 154–167. DOI: 10.1089/hum.2016.111.
- Reichel, Felix F.; Dauletbekov, Daniyar L.; Klein, Reinhild; Peters, Tobias; Ochakovski, G. Alex; Seitz, Immanuel P. et al. (2017): AAV8 Can Induce Innate and Adaptive Immune Response in the Primate Eye. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (12), S. 2648–2660. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.08.018.
- Rivière, C.; Danos, O.; Douar, A. M. (2006): Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. In: *Gene therapy* 13 (17), S. 1300–1308. DOI: 10.1038/sj.gt.3302766.
- Rodríguez-Martínez, S.; Cancino-Díaz, M. E.; Jiménez-Zamudio, L.; García-Latorre, E.; Cancino-Díaz, J. C. (2005): TLRs and NODs mRNA expression pattern in healthy mouse eye. In: *The British journal of ophthalmology* 89 (7), S. 904–910. DOI: 10.1136/bjo.2004.056218.
- Rogers, Geoffrey L.; Martino, Ashley T.; Aslanidi, George V.; Jayandharan, Giridhara R.; Srivastava, Arun; Herzog, Roland W. (2011): Innate Immune Responses to AAV Vectors. In: *Frontiers in microbiology* 2, S. 194. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00194.
- Roh, Jong Seong; Sohn, Dong Hyun (2018): Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. In: *Immune network* 18 (4), e27. DOI: 10.4110/in.2018.18.e27.
- Ross, Maya; Ofri, Ron (2021): The future of retinal gene therapy: evolving from subretinal to intravitreal vector delivery. In: *Neural regeneration research* 16 (9), S. 1751–1759. DOI: 10.4103/1673-5374.306063.
- Sahin, Ugur; Muik, Alexander; Derhovanessian, Evelyn; Vogler, Isabel; Kranz, Lena M.; Vormehr, Mathias et al. (2020): COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. In: *Nature* 586 (7830), S. 594–599. DOI: 10.1038/s41586-020-2814-7.
- Salmon, Florence; Grosios, Konstantina; Petry, Harald (2014): Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: focus on alipogene tiparvovec (Glybera®). In: *Expert review of clinical pharmacology* 7 (1), S. 53–65. DOI: 10.1586/17512433.2014.852065.

Sayedahmed, Ekramy E.; Elkashif, Ahmed; Alhashimi, Marwa; Sambhara, Suryaprakash; Mittal, Suresh K. (2020): Adenoviral Vector-Based Vaccine Platforms for Developing the Next Generation of Influenza Vaccines. In: *Vaccines* 8 (4). DOI: 10.3390/vaccines8040574.

Schamhart und Westerhof (1999): Strategies for gene cloning. In: *Urological Research* 27 (2), 83-96. DOI: 10.1007/s002400050093.

Schlehofer, J. R.; Ehrbar, M.; zur Hausen, H. (1986): Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. In: *Virology* 152 (1), S. 110–117. DOI: 10.1016/0042-6822(86)90376-4.

Shao, Ying; Cheng, Zhongjian; Li, Xinyuan; Chernaya, Valeria; Wang, Hong; Yang, Xiao-feng (2014): Immunosuppressive/anti-inflammatory cytokines directly and indirectly inhibit endothelial dysfunction—a novel mechanism for maintaining vascular function. In: *Journal of hematology & oncology* 7, S. 80. DOI: 10.1186/s13045-014-0080-6.

Shechter, Ravid; London, Anat; Schwartz, Michal (2013): Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (3), S. 206–218. DOI: 10.1038/nri3391.

Shepardson, Kelly M.; Schwarz, Benjamin; Larson, Kyle; Morton, Rachelle V.; Avera, John; McCoy, Kimberly et al. (2017): Induction of Antiviral Immune Response through Recognition of the Repeating Subunit Pattern of Viral Capsids Is Toll-Like Receptor 2 Dependent. In: *mBio* 8 (6). DOI: 10.1128/mBio.01356-17.

Shieh, Perry B.; Bönnemann, Carsten G.; Müller-Felber, Wolfgang; Blaschek, Astrid; Dowling, James J.; Kuntz, Nancy L.; Seferian, Andreea M. (2020): Re: "Moving Forward After Two Deaths in a Gene Therapy Trial of Myotubular Myopathy" by Wilson and Flotte. In: *Human gene therapy* 31 (15-16), S. 787. DOI: 10.1089/hum.2020.217.

Singh, Pawan Kumar; Kumar, Ashok (2015): Retinal photoreceptor expresses toll-like receptors (TLRs) and elicits innate responses following TLR ligand and bacterial challenge. In: *PloS one* 10 (3), e0119541. DOI: 10.1371/journal.pone.0119541.

Smith, Thomas (2001): Antibody Interactions with Rhinovirus: Lessons for Mechanisms of Neutralization and the Role of Immunity in Viral Evolution. In: *Current topics in microbiology and immunology* 260, S. 1–28. DOI: 10.1007/978-3-662-05783-4_1.

Sonoda, Koh-Hei; Sakamoto, Taiji; Qiao, Hong; Hisatomi, Toshio; Oshima, Toru; Tsutsumi-Miyahara, Chikako et al. (2005): The analysis of systemic tolerance elicited by antigen inoculation into the vitreous cavity: vitreous cavity-associated immune deviation. In: *Immunology* 116 (3), S. 390–399. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02239.x.

Spandau, Ulrich H. M.; Toksoy, Atiye; Verhaart, Soraya; Gillitzer, Reinhard; Kruse, Friedrich E. (2003): High expression of chemokines Gro-alpha (CXCL-1), IL-8 (CXCL-8), and MCP-1 (CCL-2) in inflamed human corneas in vivo. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 121 (6), S. 825–831. DOI: 10.1001/archophth.121.6.825.

Srivastava, A.; Lusby, E. W.; Berns, K. I. (1983): Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. In: *Journal of virology* 45 (2), S. 555–564. DOI: 10.1128/JVI.45.2.555-564.1983.

Srivastava, Arun (2016): In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. In: *Current opinion in virology* 21, S. 75–80. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.08.003.

- Srivastava, Arun (2020): AAV Vectors: Are They Safe? In: *Human gene therapy* 31 (13-14), S. 697–699. DOI: 10.1089/hum.2020.187.
- Streilein, J. Wayne (2003): Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. In: *Nature reviews. Immunology* 3 (11), S. 879–889. DOI: 10.1038/nri1224.
- Swanson, Karen V.; Deng, Meng; Ting, Jenny P-Y (2019): The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. In: *Nature reviews. Immunology* 19 (8), S. 477–489. DOI: 10.1038/s41577-019-0165-0.
- Tanaka, Toshio; Narazaki, Masashi; Kishimoto, Tadimitsu (2014): IL-6 in inflammation, immunity, and disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6 (10), a016295. DOI: 10.1101/cshperspect.a016295.
- Teijaro, John R.; Farber, Donna L. (2021): COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. In: *Nature reviews. Immunology* 21 (4), S. 195–197. DOI: 10.1038/s41577-021-00526-x.
- Tenenbaum, L.; Lehtonen, E.; Monahan, P. E. (2003): Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. In: *Current gene therapy* 3 (6), S. 545–565. DOI: 10.2174/1566523034578131.
- Timmers, Adrian M.; Newmark, Judith A.; Turunen, Heikki T.; Farivar, Tanaz; Liu, Jilin; Song, Chunjuan et al. (2020): Ocular Inflammatory Response to Intravitreal Injection of Adeno-Associated Virus Vector: Relative Contribution of Genome and Capsid. In: *Human gene therapy* 31 (1-2), S. 80–89. DOI: 10.1089/hum.2019.144.
- Tseng, Yu-Shan; Agbandje-McKenna, Mavis (2014): Mapping the AAV Capsid Host Antibody Response toward the Development of Second Generation Gene Delivery Vectors. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 9. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00009.
- Tseng, Yu-Shan; Gurda, Brittney L.; Chipman, Paul; McKenna, Robert; Afione, Sandra; Chiorini, John A. et al. (2015): Adeno-associated virus serotype 1 (AAV1)- and AAV5-antibody complex structures reveal evolutionary commonalities in parvovirus antigenic reactivity. In: *Journal of virology* 89 (3), S. 1794–1808. DOI: 10.1128/JVI.02710-14.
- Tummala, Gayathri; Crain, Adam; Rowlan, Jessica; Pepple, Kathryn L. (2021): Characterization of Gene Therapy Associated Uveitis Following Intravitreal Adeno-Associated Virus Injection in Mice. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 62 (2), S. 41. DOI: 10.1167/iovs.62.2.41.
- Urquhart, Lisa (2019): FDA new drug approvals in Q2 2019. In: *Nature reviews. Drug discovery* 18 (8), S. 575. DOI: 10.1038/d41573-019-00121-9.
- Velazquez-Salinas, Lauro; Verdugo-Rodriguez, Antonio; Rodriguez, Luis L.; Borca, Manuel V. (2019): The Role of Interleukin 6 During Viral Infections. In: *Frontiers in microbiology* 10, S. 1057. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01057.
- Verdera, Helena Costa; Kuranda, Klaudia; Mingozzi, Federico (2020): AAV Vector Immunogenicity in Humans: A Long Journey to Successful Gene Transfer. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 28 (3), S. 723–746. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.12.010.
- Viana, Iara Maíra de Oliveira; Roussel, Sabrina; Defrêne, Joan; Lima, Eliana Martins; Barabé, Frédéric; Bertrand, Nicolas (2021): Innate and adaptive immune responses toward nanomedicines. In: *Acta pharmaceutica Sinica. B* 11 (4), S. 852–870. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.02.022.
- Wallsh, Josh O.; Gallemore, Ron P. (2021): Anti-VEGF-Resistant Retinal Diseases: A Review of the Latest Treatment Options. In: *Cells* 10 (5). DOI: 10.3390/cells10051049.

- Wang, Dan; Tai, Phillip W. L.; Gao, Guangping (2019): Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. In: *Nature reviews. Drug discovery* 18 (5), S. 358–378. DOI: 10.1038/s41573-019-0012-9.
- Weyand, Cornelia M.; Younge, Brian R.; Goronzy, Jörg J. (2011): IFN- γ and IL-17: the two faces of T-cell pathology in giant cell arteritis. In: *Current opinion in rheumatology* 23 (1), S. 43–49. DOI: 10.1097/BOR.0b013e32833ee946.
- Wildner, Gerhild; Diedrichs-Möhrling, Maria (2003): Autoimmune uveitis induced by molecular mimicry of peptides from rotavirus, bovine casein and retinal S-antigen. In: *European journal of immunology* 33 (9), S. 2577–2587. DOI: 10.1002/eji.200324058.
- Wilmott, Patrick; Lisowski, Leszek; Alexander, Ian E.; Logan, Grant J. (2019): A User's Guide to the Inverted Terminal Repeats of Adeno-Associated Virus. In: *Human gene therapy methods* 30 (6), S. 206–213. DOI: 10.1089/hgtb.2019.276.
- Wu, Zhijian; Asokan, Aravind; Samulski, R. Jude (2006): Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14 (3), S. 316–327. DOI: 10.1016/j.ymthe.2006.05.009.
- Xiong, Wenjun; Wu, David M.; Xue, Yunlu; Wang, Sean K.; Chung, Michelle J.; Ji, Xuke et al. (2019): AAV cis-regulatory sequences are correlated with ocular toxicity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (12), S. 5785–5794. DOI: 10.1073/pnas.1821000116.
- Xu, Zhi-Sheng; Shu, Ting; Kang, Liang; Di Wu; Zhou, Xing; Liao, Bo-Wei et al. (2020): Temporal profiling of plasma cytokines, chemokines and growth factors from mild, severe and fatal COVID-19 patients. In: *Signal transduction and targeted therapy* 5 (1), S. 100. DOI: 10.1038/s41392-020-0211-1.
- Zaiss, Anne-Kathrin; Liu, Qiang; Bowen, Gloria P.; Wong, Norman C. W.; Bartlett, Jeffrey S.; Muruve, Daniel A. (2002): Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. In: *Journal of virology* 76 (9), S. 4580–4590. DOI: 10.1128/jvi.76.9.4580-4590.2002.
- Zengel, James; Carette, Jan E. (2020): Structural and cellular biology of adeno-associated virus attachment and entry. In: *Advances in virus research* 106, S. 39–84. DOI: 10.1016/bs.aivir.2020.01.002.
- Zhao, Ni; Di, Bin; Xu, Li-Li (2021): The NLRP3 inflammasome and COVID-19: Activation, pathogenesis and therapeutic strategies. In: *Cytokine & growth factor reviews* 61, S. 2–15. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2021.06.002.
- Zhu, Jiangao; Huang, Xiaopei; Yang, Yiping (2009): The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 119 (8), S. 2388–2398. DOI: 10.1172/JCI37607.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meines Promotionsvorhabens unterstützt und motiviert haben. Allem voran gilt mein ganz besonderer Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Gerhild Wildner, die mir die vorgestellten Projekte ermöglichte und mir während der Durchführung, Auswertung sowie dem Verfassen der Arbeit stets sachkundig zur Seite stand. Bedanken möchte ich mich auch für die zahlreichen Diskussionen, die mein Interesse an der Wissenschaft und Immunologie konsolidierten und mich auf eine akademische Laufbahn vorbereiteten.

Gleichermaßen danke ich Frau Dr. rer. nat. Maria Diedrichs-Möhring herzlichst, ohne Ihre anhaltende Unterstützung und Hilfestellung wäre das Gelingen des Projekts nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die geduldige Einarbeitung in die Labortätigkeiten und die kompetente Begleitung meines Promotionsvorhabens durch zahlreiche hilfreiche Anregungen. Überdies möchte ich mich bei sowohl Frau Prof. Dr. Gerhild Wildner als auch Dr. Maria Diedrichs-Möhring für Ihre Zeit und Mühe als Korrekturleserinnen und konstruktive Kritik bedanken.

Außerdem danke ich Herr Univ. Prof. Dr. rer. nat. Stylianos Michalakis (LMU Augenklinik) und Frau Prof. Dr. rer. nat. Hildegard Büning (MHH Hannover), die gemeinsam mit Frau Prof. Dr. rer. nat. Gerhild Wildner dieses Projekt ins Leben riefen und die Vektoren als Grundlage meiner Arbeit zur Verfügung stellten. Vielen Dank für die kompetenten Ratschläge sowie die großzügige Bereitstellung eines Teils der Mittel und Materialien für beide Projekte.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Stephan Thureau für die herausragende Lehre, welche mein Interesse an der Augenheilkunde weckten.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Sabrina Babutzka, Frau Kerstin Skokann und Frau Dr. rer. nat. Johanna Wagner für deren Starthilfe bei der Durchführung der Neutralisationsassays, Frau Prof. Dr. rer. nat. Elfriede Nößner und Frau Barbara Mosetter (Helmholtz-Institute) für die Möglichkeit der Datenerfassung des Zytokin-Assays, Frau Prof. Dr. rer. nat. Kathrin Schumann sowie Frau Saskia Kolb (TU München) für deren Hilfe bei der FACS Analyse und Herr Andreas Osterman für die Bestimmung der Anti-SARS-CoV-2 Spike-Antikörper bedanken. Außerdem gilt mein Dank Frau Jacqueline Bogedein für die bildliche 3D-Darstellung der Vektoren, Herrn Dr. rer. nat. Markus Schaumberger für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und Frau Elke Barczak (MHH Hannover) für ihre hervorragende technische Unterstützung. All deren exzellente Arbeit trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ein besonderer Dank gilt auch allen Blutspendern dieses Projekt, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Insbesondere möchte ich mich bei der AG Young der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) für die Anerkennung und mein Promotionsstipendium bedanken. Durch die finanzielle Unterstützung meiner Forschung war es mir nicht nur möglich, mich vollkommen auf die Promotion zu fokussieren, sondern auch im Rahmen des Jahreskongresses der DOG meine Ergebnisse zu präsentieren und am wissenschaftlichen Austausch mit anderen Stipendiaten teilzunehmen.

Ein großes „Dankeschön“ gilt auch meinen Freunden, die mich im Rahmen der Promotion begleitet und moralisch unterstützt haben.

Abschließend möchte ich mich Von ganzen Herzen bei meiner Familie bedanken, die mir während des gesamten Promotionsvorhabens unermüdlich bei Seite standen, mir in jeglichen Situationen halfen, mich motivierten, ermutigten und mir in jeglicher Hinsicht mein Studium ermöglichten.

8 Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Gehrke, Miranda

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

"Untersuchungen zur Immunogenität von AAV2-Kapsidvarianten für die okuläre Gentherapie und Impfstoffentwicklung"

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 16.10.2022

Miranda Petra Martha Vivian Gehrke

München, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

9 Veröffentlichungen

Originalpublikationen

2022

Gehrke M., Diedrichs-Möhring M., Bogedein J., Büning H., Michalakis S., Wildner G.

Immunogenicity of Novel AAV Capsids for Retinal Gene Therapy.

Cells. 2022 Jun 9;11(12):1881. doi: 10.3390/cells11121881. PMID: 35741009; PMCID: PMC9221425.

Maria Diedrichs-Möhring*, **Miranda Gehrke***, Sabrina Babutzka, Lena Zobel, Andreas Osterman, Stylianos Michalakis, Gerhild Wildner (*geteilte Erstautorenschaft)

Immune responses of mRNA-Covid-vaccine immunized donors to Adeno-associated virus 2 capsids expressing SARS-CoV2-spike-epitopes

In Vorbereitung.

Kongressbeiträge:

25.08.2022-27.08.2022

10th International Symposium on Uveitis - ISU 2022 (Poster)

Gehrke M., Diedrichs-Möhring M., Bogedein J., Büning H., Michalakis S., Wildner G.

Immunogenicity of Novel AAV Capsids for Retinal Gene Therapy

04.12.2021

54. Weihnachtssitzung der Münchener Ophthalmologischen Gesellschaft (MOG) (Vortrag)

Gehrke M.

Immunantworten nach Gentherapie - ein potenzielles Risiko?!

19.-22- 10.2021

28th Annual Congress (Virtual) of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT)
(Abstract)

Babutzka S., Zobel L., Diedrichs-Möhring M., **Gehrke M.**, Wildner G., Ammer H., Michalakis S.
Engineered AAV-based vaccines against SARS-CoV-2

01.10.2021

Jahreskongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG 2021) (Vortrag)

Gehrke M.

Untersuchungen zur Immunogenität von AAV2-Capsidmutanten für die okuläre Gentherapie