Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Optimierung des Adeno-assoziierten Virus Vektorsystems für die *in vivo* Anwendung

Franz Michael Gerner

aus

New York, NY, U.S.A.

2007

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Michael Hallek betreut und von Herrn Prof. Dr. Horst Domdey vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

Myersville, am 6.Mai 2007

Franz Gerner

Dissertation eingereicht am: 15.05.2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Hallek
2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am: 06.07.2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1999 bis Juli 2005 am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Anleitung von Prof. Dr. Michael Hallek und Prof. Dr. Horst Domdey angefertigt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden folgende Veröffentlichungen angefertigt:

Hacker, U. T., Schildhauer, I., Barroso, M. C., Kofler, D. M., Gerner, F. M., Mysliwietz, J., Buening, H., Hallek, M., King, S. B. (2005). Gene transfer preferentially selects MHC class I positive tumour cells and enhances tumour immunogenicity. *Cancer Immunol Immunother* 55:547-557.

Hacker, U. T., Wingenfeld, L., Kofler, D. M., Schuhmann, N. K., Lutz, S., Herold, T., King, S. B., Gerner, F. M., Perabo, L., Rabinowitz, J., McCarty, D. M., Samulski, R. J., Hallek, M., Buning, H. (2005). Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency. *J Gene Med* 7:1429-1438.

Buning, H., Ried, M. U., Perabo, L., Gerner, F. M., Huttner, N. A., Enssle, J., Hallek, M. (2003). Receptor targeting of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 10:1142-1151.

Hacker, U. T., Gerner, F. M., Buning, H., Hutter, M., Reichenspurner, H., Stangl, M., Hallek, M. (2001). Standard heparin, low molecular weight heparin, low molecular weight herparinoid, and recombinant hirudin differ in their ability to inhibit transduction by recombinant adeno-associated virus type 2 vectors. *Gene Ther* 8:966-968.

Herrn Prof. Dr. Horst Domdey gilt mein ganz besonderer Dank für die Betreuung meiner Promotionsarbeit und die Vertretung der vorliegenden Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
Herrn Prof. Dr. Michael Hallek danke ich herzlich für das interessante und innovative Thema und die exzellenten Voraussetzungen und Rahmenbedingen meiner Arbeit. Ich danke ihm für die engagierten wissenschaftlichen Diskussionen und die motivierende Begleitung während der gesamten Forschungsarbeit. Vor allem danke ich ihm für die persönliche Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Ausbildung und sein Vertrauen in meine Arbeit.
Mein weiterer Dank gilt insbesondere Herrn Dr. Ulrich Hacker für seine engagierte Anleitung, seine kontinuierliche Hilfe und Unterstützung, sowie für die inspirierenden begleitenden Ideen zu den bearbeiteten Projekten.
Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. Hildegard Büning für die gute Zusammenarbeit und der hilfreichen Unterstützung bei den Experimenten, sowie den kritischen Diskussionen meiner Experimente.
Bei Frau Dr. Susan King möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit und Unterstützung bei den Tierexperimenten, sowie für die exzellenten wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.
Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hallek im Genzentrum und der GSF danke ich für die freundschaftliche und erfolgreiche Zusammenarbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und stetige Hilfsbereitschaft. Dieser Dank gilt auch allen Mitarbeitern des 4. Stocks des Genzentrums für die gute Zusammenarbeit.
Frau Julika Jasny danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Tierversuche, ebenso allen Mitarbeitern des Tierstalls des Hämatologikums der GSF München.
Herrn Prof. Dr. Joachim Diebold und Frau Andrea Sendlhofert danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der immunohistochemischen Gewebeproben, sowie Frau Attmanspacher bei der Anfertigung der entsprechenden Aufnahmen.
Für die große Hilfe bei der Bewältigung verwaltungstechnischer Probleme möchte ich mich bei Frau Siegi Kastenmüller, Frau Birgit Mewes, Frau Renate Schilling und Frau Petra Fulde bedanken.
Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für alles, was sie mir mit auf den Weg gegeben haben.
Besonders bedanke ich mich bei meiner Frau, Iwona Gerner, für die stetige Unterstützung und Motivation für die vorliegende Arbeit.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Adeno-assoziierte Viren (AAV) 1
1.1.1 Entdeckung und Systematik 1
1.1.2 Genomorganisation von AAV-2 2
1.1.2.1 Die offenen Leseraster des AAV-2 3
1.1.2.2 Die invertierten terminalen Wiederholungen (ITR) des AAV-2 4
1.1.3 Die Infektion von Zellen mit AAV-2 5
1.1.4 DNA-Synthese von AAV-2 7
1.1.5 Latenz der AAV-2 in Zellen 8
1.1.6 Virusreaktivierung in latent infizierten Zellen 9
1.1.7 Produktive Replikation von AAV-2 10
1.1.8 Umgehung der zeitverzögerten Expression bei AAV-Vektoren 11

1.2 Produktion und Reinigung rekombinanter AAV 12
1.2.1 Herstellung von rekombinanten AAV 13
1.2.2 Reinigung von rekombinanten AAV 15

1.3 AAV als Vektor für die Gentherapie 16

1.4 Ziel der Arbeit 17

2 MATERIAL 19

2.1 Chemikalien und andere Materialien 19

2.2 Antikoagulantien 20

2.3 Enzyme 20

2.4 Nukleinsäuren und Plasmide 21

2.5 Oligonukleotide 21

2.6 DNA-Größenmarker 21

2.7 Bakterienstämme 22

2.8 Medien und Zusätze für Prokaryonten 22

2.9 Zelllinien 22

2.10 Viren 22

2.11 Mäuse 22

2.12 Medien und Zusätze für Eukaryonten 23

2.13 Antikörper und Proteine 23

2.14 Nachweis- und Präparationssysteme 24

2.15 Geräte 25

2.16 Sonstiges 25

3 METHODEN 26

3.1 Kultivierung von Mikroorganismen (Bakterien) 26
3.1.1 Plattenkultur 26

3.1.2 Flüssigkultur 26

3.2 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren 27
3.2.1 Plasmidisolierung aus Bakterien 27
3.2.1.1 Schnellaufschluss durch QIAPrep Miniprep Kit 27
3.2.1.2 Endotoxin-freie Isolation über Anionenaustauschersäulen 28
3.2.2 DNA-Isolierung aus Organen und Viren mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits 29
3.2.3 RNA-Isolierung aus Organen mit Hilfe des RNeasy Tissue Kits 30
3.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im nativen Agarosegel 30
3.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im alkalischen Agarosegel 31
3.2.6 Southern Blot 31
3.2.7 Reinigung und Gelisolation von DNA mit QIAquick Gel Extraction Kits 32
3.2.8 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA 33

3.3 Enzymatische Reaktionen an Plasmiden und DNA-Fragmenten 33
3.3.1 Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen 33
3.3.2 Auffüllen 5'-überhängender Enden mit Klenow Fragment der DNA Polymerase I 33
3.3.3 Deletion 3'-überhängender Enden mit T4-DNA-Polymerase 34
3.3.4 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase 34
3.3.5 Phosphorylierung von Oligonukleotiden 34
3.3.6 Herstellung von Linkern durch Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden 34
3.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten 35
3.3.8 Ligation von Linker in Plasmide 35

3.4 DNA-Sequenzierung 35

3.5 Quantitative Analyse von RNA und DNA 36
3.5.1 Reverse Transkription von RNA 36
3.5.2 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR) 36

3.6 Transformation von Bakterien 38
3.6.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien 38
3.6.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien 39
3.6.3 Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente Bakterien 39
3.6.4 Elektroporation von Plasmiden in elektrokompetente Bakterien 40

3.7 Kultivierung und Aufarbeitung von Zellen 40
3.7.1 Kultivierung von Zelllinien 40
3.7.1.1 Adhärente Zellen 40
3.7.1.2 Stammkulturen 41

3.8 Herstellung Adeno-assoziierter Virus (rAAV)-Vektoren mit Adenovirus-Helferviren und CsCl-Aufreinigung 41
3.8.1 Zellkultur 41
3.8.2 Transfektion 41
3.8.3 Infektion von HeLa Zellen mit Adenovirus 42
3.8.4 Aufschluss von HeLa Zellen (Zelllyse) 42
3.8.5 Konzentrierung und Aufreinigung von AAV 43
3.8.6 Dialyse 43
3.8.7 Lagerung von AAV 43
3.8.8 Hitzeinaktivierung von AAV-Stocklösungen 44

3.9 Adenovirusfreie Verpackung von AAV und Iodixanol-Aufreinigung 44
3.9.1 Zellkultur 44
3.9.2 Transfektion 44
3.9.3 Ernte der Vektor-produzierenden Zellen 45
3.9.4 Ernte der AAV 45
3.9.4.1 Pelletieren der Vektoren im Überstand 45
3.9.4.2 Aufschluss der Zellen durch Ultraschall 45
3.9.4.3 Aufschluss der Zellen durch Einfrieren - Auftauen 46
3.9.5 Aufreinigung von AAV durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung 46
3.9.6 Aufreinigung von AAV durch Ultrazentrifugation mit Iodixanol 46
3.9.7 Aufreinigung von AAV durch Ultrazentrifugation mit Cäsiumchlorid und anschließender Dialyse 47
3.9.8 Aufreinigung von AAV durch Kationenaustauscher-Säulenchromatographie 48

3.9.9 Aufreinigung von AAV durch Heparin-Affinitätschromatographie 49
3.9.10 Lagerung von AAV 50

3.10 Bestimmung des genomischen Virustiters durch Dot-Blot 50
3.10.1 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden 50
3.10.2 Dot-Blot (genomischer Vektortiter) 51
3.10.2.1 Dot-Blot (genomischer Vektortiter) mit NaOH-Aufschluss 51
3.10.2.2 Dot-Blot (genomischer Vektortiter) mit Hilfe eines Proteinase K-Verdaus 51
3.10.2.3 Dot-Blot (genomischer Vektortiter) mit Hilfe der DNeasy-Extraktion 52
3.10.3 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA Sonden 52
3.10.4 Detektion durch Chemolumineszenz 53

3.11 Transduktionsnachweis und transduzierender Vektortiter 54
3.11.1 Transduzierender Titer von AAV-GFP Viren 54
3.11.2 Inhibition von AAV durch Antikoagulantien 54

3.12 Tierversuche 55
3.12.1 Injektionen in Mäuse 55
3.12.1.1 Injektion von AAV in Mäuse 55
3.12.1.2 Injektion von Clodronat-Liposomen und Liposomen in Mäuse 55
3.12.2 Tötung der Mäuse und Entnahme der Organe 55
3.12.3 Blutentnahme von Mäusen 56
3.12.4 Gewinnung von Serum und Plasma 56
3.12.5 Anfertigung von Gewebeschnitten 56
3.12.6 Analyse von GFP-positiven Leberzellen durch FACS-Analyse 57

3.13 Detektion von Proteinen in Gewebeschnitten 57
3.13.1 Detektion AAV und Makrophagen in Leberschnitte 57
3.13.1.1 Fixierung mit Chloroform 57
3.13.1.2 Fixierung mit Formalin 57
3.13.1.3 Anti-AAV-Biotin-Färbung mit polyklonalem anti-AAV Antikörper 58
3.13.1.4 Anti-AAV-Biotin-Färbung mit monoklonalem anti-AAV Antikörper 58
3.13.1.5 Anti-AAV-Biotin-Färbung mit monoklonalem anti-AAV Antikörper unter Blockierung von endogenem Biotin 58
3.13.1.6 Anti-AAV-APAAP-Färbung mit monoklonalem anti-AAV Antikörper unter Blockierung von endogenem Biotin 59
3.13.1.7 Anti-Makrophagen APAAP-Färbung 59
3.13.1.8 Hämatoxylin-Färbung und Eindeckeln der Schnitte 60

3.14 Detektion von murinem Endostatin 60
3.14.1 Detektion von murinem Endostatin in Blutseren und Zellkulturüberständen 60

4 ERGEBNISSE 62

4.1 Optimierung der AAV Reinigung 62
4.1.1 Allgemein 62
4.1.2 Überprüfung der AAV-Konzentration im Mediumüberstand 63
4.1.3 Reinigung der AAV über Kationenaustauscher- und Heparansulfataffinitäts-Säulen 64
4.1.4 Einfluss des Zeitpunktes der Virusernte und von fötalem Kälberserum während der Zelllyse auf die Ausbeute bei der AAV-Herstellung 65
4.1.5 Optimierung der Fällungsbedingungen der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung 66
4.1.6 Verwendung eines Iodixanol-Ultrazentrifugationsschrittes 67
4.1.7 Vergleich der Zelllyse mit Ultraschallbehandlung und Einfrieren – Auftauen 67

4.2 Selbst-komplementärer AAV 69
4.2.1 Allgemein 69
4.2.2 Herstellung der dsAAV- und scAAV-Vektoren 70
4.2.2.1 Herstellung von dsAAV-Vektoren 70
4.2.2.2 Herstellung von scAAV-Vektoren 71
4.2.3 Überprüfung der räumlichen Struktur des scAAV 78
4.2.4 Überprüfung der Expression der unterschiedlichen viralen AAV-Genome 79

4.3 *In vivo* Anwendung von AAV 82

4.3.1 Allgemein 82
4.3.2 Untersuchung der Expressionssteigerung nach *in vivo* Infektion 83
4.3.3 Überprüfung der Art der Probengewinnung und Detektion des murinen Endostatins 84
4.3.4 Überprüfung der Detektion des murinen Endostatins *in vivo* 87
4.3.5 Überprüfung Endostatin-Expression nach AAV-Infektion *in vitro* 88
4.3.6 Untersuchung des Einflusses der Administrationsroute 88
4.3.7 Untersuchung der Anwesenheit der viralen Genome nach *in vivo* Infektionen 91
4.3.8 Untersuchung der mRNA- und DNA- Menge in Leberzellen nach AAV-Infektion 94
4.3.9 Untersuchung des Einflusses von Kupffer Sternzellen auf die Persistenz der AAV-Transduktion 96
4.3.9.1 Nachweis der Lokalisation der AAV in Kupffer Sternzellen 97
4.3.9.1.1 Immunhistochemischer Nachweis von Kupffer Sternzellen 97
4.3.9.1.2 Immunhistochemischer Nachweis von AAV 98
4.3.9.2 Einfluss der Elimination der Kupffer Sternzellen auf die Erhöhung der DNA-Partikel sowie der Expression von murinem Endostatin 100

4.4 Inhibition der AAV-Infektion durch Antikoagulanzien 103
4.4.1 Allgemein 103
4.4.2 Auswirkung der Vorinkubationszeiten auf die AAV-Infektiosität 104
4.4.3 Inhibition der AAV-Infektion durch Antikoagulanzien 105
4.4.4 Auswirkung einer höheren Vektorkonzentration auf die Inhibition der AAV-Infektion durch Heparin 110

5 DISKUSSION 112

5.1 Optimierung von Reinigungsverfahren für AAV 112

5.2 Die Herstellung und Überprüfung des selbst-komplementären Adeno-assoziierten Virus 120

5.3 Untersuchung zur Optimierung von *in vivo* Anwendungen von AAV 125

5.4 Untersuchung zur Inhibition der AAV-Infektion durch Antikoagulanzien 129

6 ZUSAMMENFASSUNG UND PERSPEKTIVEN 133

7 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN 136

8 LITERATURVERZEICHNIS 139

1 Einleitung

1.1 Adeno-assoziierte Viren (AAV)

1.1.1 Entdeckung und Systematik

Adeno-assoziierte Viren wurden in den 60-er Jahren als Kontamination von Adenoviruspräparationen entdeckt. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Affen-Adenoviren wurden ca. 22 µm große Partikel gefunden die eine ikosaedrische Struktur aufwiesen (Hartley und Rowe, 1960; Atchison et al., 1965; Atchison et al., 1966). Da diese Kontaminationen nach Färbung mit Arcidin Orange einen DNA-Gehalt aufwiesen, wurden sie als Viren identifiziert (Jamison und Mayor, 1965). Aufgrund der Kolokalisation der neuen Viren mit Adenoviren erhielten die neu entdeckten Viren den Namen Adeno-assoziiertes Virus (Hoggan et al., 1966). Es gelang jedoch nicht, diese Viren in Zellen zu vermehren. Erst durch eine Koinfektion mit Adenoviren gelang eine erfolgreiche Replikation (Casto et al., 1967).

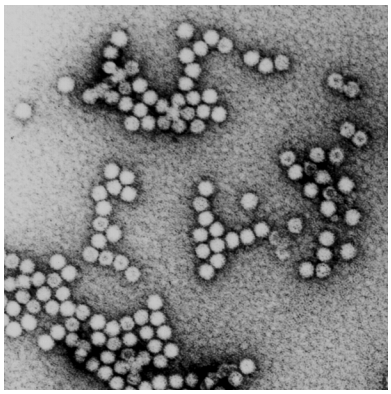


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Adeno-assoziierten Virus (Ried et al., 2002).

Später wurden die Adeno-assoziierte Viren (AAV) der Familie der Parvoviridae zugerechnet (Siegl et al., 1985), welche die Unterfamilien Densovirinae, die Insekten infizieren, und Parvovirinae, die Wirbeltiere infizieren, beinhalten. Letztere enthalten die Genera Parvovirus, Erythrovirus und Dependovirus, zu dem das AAV zugerechnet wird (Büchen-Osmond, 2003). Als bisher einzigen humanpathogenen Vertreter der Parvovirinae ist das zum Genus des Erythrovirus zugeordnete Parvovirus B19 bekannt (Young, 1988; Fairley et al., 1995; Vafaie und Schwartz, 2004). Zwar ist auch bei einer AAV-Infektion der Tod eines Fötus in Mäusen und das Vorhandensein von AAV-Infektionen bei Spontanaborten beschrieben (Botquin et al.,

1994; Tobiasch et al., 1994), jedoch gibt es bisher keine Beweise dafür, dass AAV ursächlich für diese Vorkommnisse verantwortlich war. Im Allgemeinen gilt AAV als nicht humanpathogen und ist mit keiner bekannten Krankheit beim Menschen assoziiert (Monahan und Samulski, 2000; Buning et al., 2004; Grce et al., 2004; Matovina et al., 2004).

Inzwischen wurden neben den ersten in den 60-er Jahren entdeckten vier Serotypen AAV-1 bis AAV-4 (Atchison et al., 1965; Rose et al., 1966; Casto et al., 1967; Parks et al., 1967) weitere sieben Serotypen identifiziert. AAV-5 wurde aus genitalen Kondylomata isoliert (Bantel-Schaal und zur Hausen, 1984), AAV-7 und AAV-8 mittels PCR-Screening aus Gewebe von Rhesusaffen (Gao et al., 2002). Dagegen ist AAV-6 möglicherweise eine Rekombinante aus AAV-1 und AAV-2 (Xiao et al., 1999). AAV-10 und AAV-11 wurden durch PCR in Cynomolgus Affen identifiziert (Mori et al., 2004). Die Serotypen unterscheiden sich in ihrer Gewebespezifität und ihrer Reaktion auf neutralisierende Antikörper (Rutledge et al., 1998; Huttner et al., 2003; Hacker et al., 2005). Dies ist auf die Unterschiede im viralen Kapsid, das für die Infektionsspezifität und die Antigenpräsentation verantwortlich ist, und möglicherweise auch den unterschiedlichen ITR-Sequenzen zurückzuführen. Für die vorliegende Arbeit wurde das Viruskapsid des AAV-2 verwendet, dem bislang am besten untersuchten Serotyp.

1.1.2 Genomorganisation von AAV-2

AAV-2 ist ein einzelsträngiges unbehülltes DNA-Virus. Das 4,7 kb große Genom enthält mindestens drei funktionell unterschiedliche Regionen (s. Abbildung 2), und zwar die beiden offenen Leseraster „rep“ und „cap“, sowie die invertierten terminalen Wiederholungen (Srivastava et al., 1983).

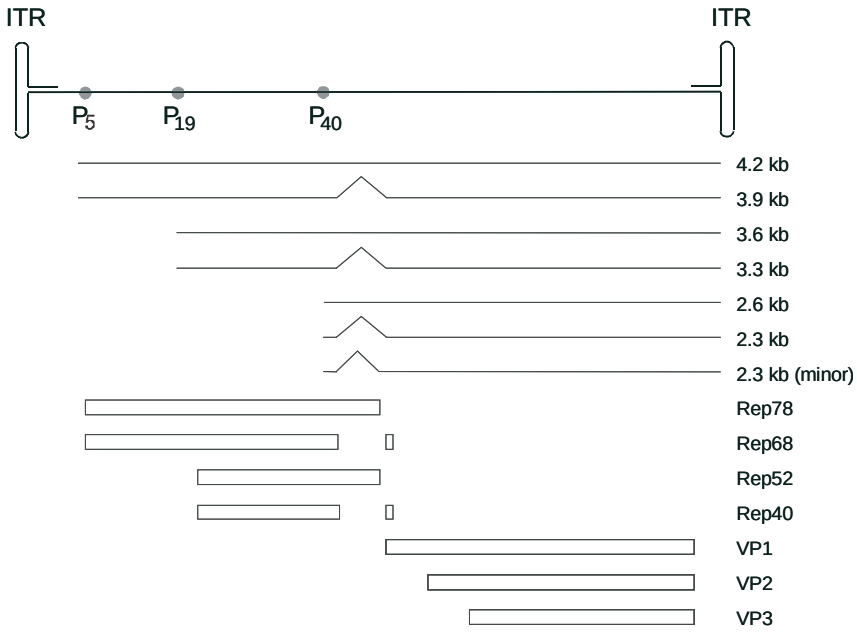


Abbildung 2: Genomorganisation von AAV-2. Das 4,7 kb große AAV-2 Genom ist schematisch dargestellt. Es wird auf beiden Seiten von den invertierten terminalen Wiederholungen (ITR) flankiert. An Position 5, 19 und 40 liegen drei Promotoren, von denen aus die viralen mRNAs transkribiert werden. Die ungespleißten und gespleißten mRNAs kodieren für die regulatorischen Proteine Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40, sowie für die Kapsid-Proteine VP1, VP2, VP3.

1.1.2.1 Die offenen Leseraster des AAV-2

Der 5'-gelegene offene Leserahmen „rep" kodiert für eine Familie multifunktioneller, regulatorischer Nicht-Struktur-Proteine (Rep-Proteine). Die mRNAs, die für die beiden größten Rep-Proteine, Rep78 und die gespleißte Variante Rep68, kodieren, starten am p5-Promotor und sind 4,2 kb bzw. 3,9 kb lang. Die mRNAs der beiden kleineren Rep-Proteine, Rep52 und der gespleißten Variante Rep40, starten am p19-Promotor und sind 3,7 kb bzw. 3,3 kb lang (Marcus et al., 1981; Lusby und Berns, 1982). Die von diesen mRNAs translatierten Proteine Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40 besitzen eine Länge von 621, 537, 397 und 313 Aminosäuren (Mendelson et al., 1986).

Rep78 und Rep68 können an Strukturen der ITR binden und an der terminalen Schnittstelle (terminal resolution site, trs), einer Sequenz innerhalb der ITR (s. 1.1.2.2), aufgrund ihrer Endonuklease-Aktivität einen Einzelstrangbruch verursachen (Im und Muzyczka, 1992; Weitzman et al., 1996). Die beiden kleineren Rep-Proteine, Rep52 und Rep40, sind an der Einschleusung der einzelsträngigen DNA während der AAV-Replikation beteiligt und besitzen, ebenso wie die Rep78- und Rep68-Proteine, eine Helikase- und ATPase-Aktivität

(Im und Muzyczka, 1990; King et al., 2001).

Der 3'-gelegene offene Leserahmen „cap" kodiert für die drei Kapsid-Proteine (Cap-Proteine) VP1 mit 90 kDa, VP2 mit 72 kDa und VP3 mit 60 kDa, die das virale Kapsid bilden. Die mRNAs der Cap-Proteine werden vom p40-Promotor transkribiert. Die unterschiedliche Translations-Effizienz wird dabei durch alternatives Spleißen des Introns für die Synthese von VP1 und durch das ungewöhnliche Initiationskodon ACG für VP2 reguliert. Das vom Initiationskodon AUG ausgehende VP3 wird wesentlich stärker translatiert als das vom ACG initiierte VP2. Alle drei Cap-Proteine verwenden das gleiche Stop-Kodon. Dies hat zur Folge, dass die Cap-Proteine im ungefähren Verhältnis von 1:1:20 vorliegen (Laughlin et al., 1979; Becerra et al., 1988; Rabinowitz et al., 1999). Der Tropismus des AAV-2 wird hauptsächlich durch die Cap-Proteine bestimmt. Insertionen in diesem Bereich können die Gewebespezifität und die Neutralisation durch Antikörper verändern (Girod et al., 1999; Huttner et al., 2003).

1.1.2.2 Die invertierten terminalen Wiederholungen (ITR) des AAV-2

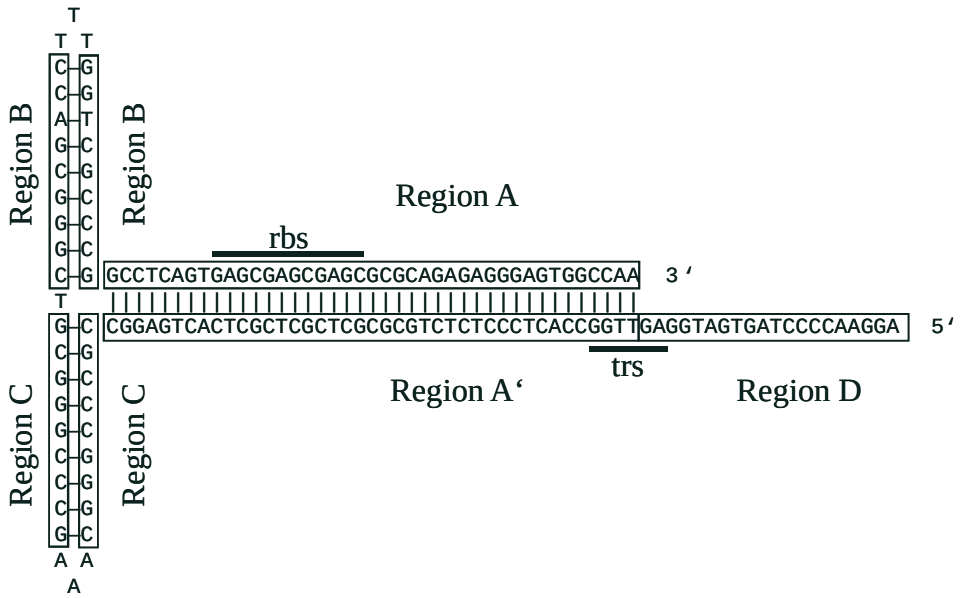


Abbildung 3: Haarnadel-Struktur eines ITR. Die Regionen A bis D sind durch Einrahmung eingeteilt, die Sequenzen einer Rep-Bindungsstelle (rbs) innerhalb des ITRs und der terminalen Schnittstelle (terminal resolution site, trs) sind durch Striche gekennzeichnet. Details sind im Text näher erklärt.

Das virale Genom des AAV-2 wird von zwei invertierten terminalen Wiederholungen (ITR) flankiert. Diese bestehen aus einer 145 Nukleotide umfassenden Sequenz, deren erste 125 Nukleotide eine pallindromische Sequenz aufweisen und dadurch eine Rückfaltung

erlauben, wobei eine T- bzw. Haarnadelstruktur entsteht (Wang et al., 1995).

Durch Zerstörung einer Pallindrom-Sequenz kann das Genom nicht mehr repliziert werden. Stellt man jedoch die Sequenz mit einer abweichenden DNA-Sequenz wieder her und erhält die Symmetrie der Pallindrom-Einheit, so bleiben die Funktionen erhalten (Bohenzky et al., 1988). Die einzelnen Teile der ITR wurden in Unterbereiche eingeteilt. Die Nukleotide 1 bis 41 (Region A) können mit den Nukleotiden 85 bis 125 (Region A') Wasserstoffbrücken ausbilden, die Nukleotide 42 bis 50 mit den Nukleotiden 54 bis 62 (Region B) und die Nukleotide 64 bis 72 mit den Nukleotiden 76 bis 84 (Region C). In der Mitte der Regionen B und C sind drei Thymidin- bzw. Adenosin-Resten vorhanden, die keine entsprechenden Bindungspartner haben und welche die Bögen der Haarnadel-Struktur bilden. Ebenso hat das Thymidin, das die Region B mit der Region C verbindet, keinen Bindungspartner. Die Region D liegt als Einzelstrang vor und bildet die Basis der Haarnadel. Innerhalb der Region A findet sich ein $(GAGC)_3$-Motiv, an dem die Rep-Proteine binden können und die deshalb als Rep-Bindungsstelle (rbs) bezeichnet wird (McCarty et al., 2004). An Position 124 und 125, am Ende der Region A', befinden sich zwei Thymidine, zwischen denen die Rep-Proteine einen Einzelstrangbruch verursachen können. Diese Stelle wird als terminale Schnittstelle (terminal resolution site, trs) bezeichnet (Im und Muzyczka, 1990; Snyder et al., 1990b).

1.1.3 Die Infektion von Zellen mit AAV-2

Im Medium können Adeno-assoziierte Viren frei mit einer Diffusionskonstante von $D \approx 7{,}5\ \mu m^2/sec$ diffundieren. Bei Annäherung an eine Zelle verlangsamt sich die Geschwindigkeit des AAV-2, wobei ein Kontakt mit der Zellmembran stattfindet. Dabei kann das Virus in die Zelle aufgenommen werden oder es verlässt die Zelloberfläche und startet nach kurzer Diffusion eine erneute Annäherung an die Zelle. Diese Kontaktaufnahme kann sich mehrfach wiederholen, wobei durchschnittlich 4,4 Kontaktaufnahmen stattfinden, bis das Virus in die Zelle aufgenommen wird (Seisenberger et al., 2001). Bei diesen Kontakten bindet vermutlich das AAV-2 an Heparansulfatproteoglykan (HSPG), das für dieses Virus als Primärrezeptor fungiert (Summerford und Samulski, 1998). Auch für andere Viren, wie z.B. für das humane Cytomegalus Virus, das HIV-1 und das Herpes Simplex Virus Typ 1 (Neyts et al., 1992; Patel et al., 1993; Herold et al., 1995; Vives et al., 2005), wurde eine Interaktion zwischen Virus und HSPG auf der Zelloberfläche beschrieben. Zur Unterstützung der Internalisation finden weitere Kontakte mit Korezeptoren statt. Dies kann durch Bindung des

AAV-2 an den humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (hFGFR1), $\alpha_V\beta_5$ Integrin und den humanen Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (hHGFR) erfolgen, wobei die Funktion der Korezeptoren nicht vollständig geklärt ist (Qing et al., 1999; Summerford et al., 1999; Kashiwakura et al., 2005). Vermutlich verstärkt hFGFR1 die Bindung des Virus an HSPG, während hHGFR und $\alpha_V\beta_5$ Integrin die anschließende Internalisierung des Virus unterstützen (Buning et al., 2003; Kashiwakura et al., 2005).

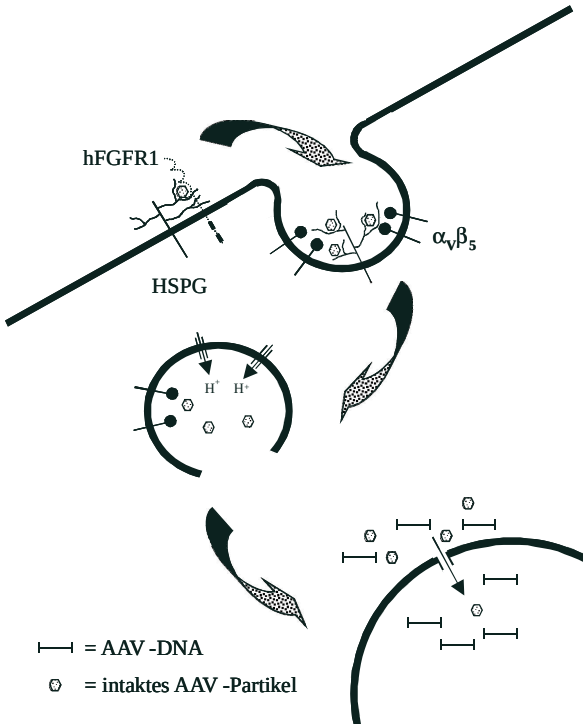


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Infektionswegs von AAV-2. Nach der Bindung des Virus an HSPG wird AAV-2 mit Hilfe von $\alpha_V\beta_5$ Integrin rasch über eine Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert. Über einen Mikrotubulin- und Mikrofilament-vermittelten Transport gelangt das Virus in die Nähe des Zellkerns. Durch die leicht azide Umgebung wird das Virus hier aus dem Endosom freigesetzt. Das Virus sammelt sich perinukleär an, wobei die virale DNA dort oder während des Eintritts in den Zellkern freigesetzt wird. Zeichnung modifiziert nach Bartlett et al., 2000.

Nach Bindung an die Zelloberfläche gelangt AAV-2 sehr schnell durch eine Dynamin-abhängige Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle (Duan et al., 1999; Bartlett et al., 2000). Dabei bildet sich auf der intrazellulären Seite um den Bindungsrezeptor ein Netz aus Clathrin, wodurch eine Einstülpung der Zellmembran bedingt wird. Bei Fortsetzung dieses Vorganges kommt es schließlich zur Abschnürung des Vesikels (Mousavi et al., 2004). Der weitere Transport des Viruses zum Zellkern ist mindestens teilweise Mikrofilament- und Mikrotubulin-abhängig, da durch eine Hemmung der Polymerisation dieser Proteine eine

Akkumulation des AAV-2 in der Nähe des Zellkerns verhindert werden konnte (Sanlioglu et al., 2000). Das Virus wird aus den späten Endosomen freigesetzt, wobei eine Verringerung des pH-Wertes notwendig ist (Douar et al., 2001). Im perinukleären Raum akkumulieren die freigesetzten Viren und setzen dort oder während des weiteren Transports in den Zellkern ihre DNA frei. Es gelingt nur sehr wenigen intakten AAV-Viren in den Zellkern zu kommen. Durch eine Koinfektion mit Adenoviren gelangen jedoch vermehrt intakte virale Partikel in den Zellkern, vermutlich aufgrund von unspezifischen Vorgängen (Xiao et al., 2002; Lux et al., 2005).

1.1.4 DNA-Synthese von AAV-2

Nach Erreichen des Zellkerns muss nun aus dem einzelsträngigen viralen DNA-Genom ein Doppelstrang synthetisiert werden. Diese Synthese des Doppelstranges ist allerdings bislang nur in Grundzügen charakterisiert und beruht auf Modellvorstellungen. Das AAV-Genom enthält keinen Bauplan für eine DNA-Polymerase. Deshalb muss die Doppelstrangsynthese mit Hilfe einer zellulären Polymerase durchgeführt werden, die jedoch noch nicht identifiziert werden konnte. Das 3'-OH-Ende des viralen Genoms, das sich am Ende eines der beiden ITRs befindet, dient dabei als Primer für die Polymerase, die den Doppelstrang von hier aus synthetisiert. Dieser Doppelstrang kann nun für die mRNA-Herstellung und damit für die Genexpression der viralen Proteine verwendet werden (Brister und Muzyczka, 2000).

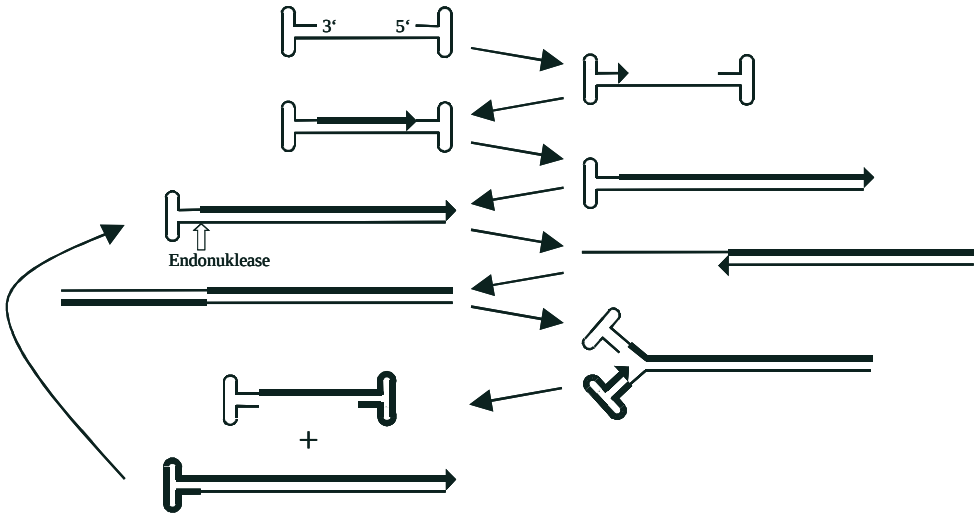


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Replikation von AAV-2. Details sind im Text näher erklärt. Zeichnung modifiziert nach Brister und Muzyczka, 2000.

Bei der Neusynthese von AAV-2-DNA wird nun das am 5'-Ende gelegene ITR mit Hilfe der

Helikase-Aktivität der Rep78/Rep68-Proteine aufgefaltet, damit die Polymerase die Synthese in diesem ITR-Bereich fortführen kann. Am Ende des ITRs bricht die Synthese ab. Für die Synthese des Gegenstranges binden Rep78/Rep68 an die rbs (s. 1.1.2.2), einer Tetranukleotid-Wiederholungs-Region mit der Sequenz $(GAGC)_3$ (McCarty et al., 2004). Durch eine ATP-abhängige Isomerisation dieser Region des ITR wird eine Konformationsänderung bewirkt, so dass die trs exponiert wird (Brister und Muzyczka, 2000). Anschließend führen die Rep-Proteine durch ihre Endonuklease-Aktivität einen Einzelstrangbruch an der trs durch, wodurch neue 3'- und 5'-Enden erhalten werden (Brister und Muzyczka, 2000; Davis et al., 2000). Das Rep68 bindet kovalent an das neue 5'-Ende und entfaltet durch die Helikase-Aktivität die ITR (Snyder et al., 1990a). An dem neu entstandenen 3'-Ende kann nun die Polymerase das zweite ITR fertig synthetisieren. Anschließend bilden sich die ITRs wieder aus und die Polymerase, die den DNA-Strang noch nicht verlassen hat, fährt mit der Synthese des DNA-Strangs bis zu dessen Ende fort (s. Abbildung 5). Das erhaltene DNA-Molekül kann zur weiteren Synthese wie oben beschrieben verwendet werden. Als zweites Produkt wurde ein komplettes AAV-Genom erhalten (Brister und Muzyczka, 2000).

1.1.5 Latenz der AAV-2 in Zellen

In Abwesenheit von Helferviren während der AAV-2-Infektion kann sich, nach dem Erreichen der viralen DNA im Zellkern, die AAV-DNA in das Wirtsgenom integrieren. Dabei wird die virale Genexpression herunter reguliert (Kyostio et al., 1994; Horer et al., 1995). Die Integration erfolgt an einer spezifischen Position in Genomen von höheren Affen und Menschen, wobei diese Integrationsstelle als AAVS1 bezeichnet wird. Sie liegt zwischen den Positionen q13.3 und qter auf dem Chromosom 19 (Kotin et al., 1990; Kotin et al., 1991; Samulski et al., 1991; Weitzman et al., 1994). Das Transkript dieser Integrationsstelle wurde als Teil des muskelzellspezifischen „slow skeletal troponin T-Gens (TNNT1) identifiziert (Dutheil et al., 2000). Wie in der Region A der pallindromischen Sequenz der ITR befindet sich auch innerhalb der AAVS1-Sequenz ein $(GAGC)_3$-Motiv, welches als Bindungsstelle für Rep-Proteine (rbs) dienen kann. Weiterhin ist eine trs-ähnliche Sequenz vorhanden, deren Abstand zum rbs ungefähr gleich ist wie dem Abstand zwischen den trs- und rbs-Sequenzen im ITR des AAV-2 (Linden et al., 1996b). Rep68 kann neben der rbs im ITR des AAV-2 auch an die rbs-Sequenz innerhalb der AAVS1-Region binden. Durch eine gleichzeitige Bindung des Rep78/Rep68-Komplexes kann die virale DNA der zellulären angenähert werden (Weitzman et al., 1994). Wie in 1.1.4 beschrieben, kommt es nun zu einem Einzelstrangbruch,

diesmal an der trs der AAVS1-Sequenz. Nach DNA-Synthese eines Teils der AAVS1-Sequenz kommt es zum Matrizenwechsel auf das AAV-Genom. Anschließend wird durch einen nochmaligen Matrizenwechsel der synthetisierte freie Strang mit der AAVS1-Stelle verbunden und dadurch in das Genom der Zelle integriert. Schließlich wird die DNA-Struktur repariert und die Synthese des Gegenstranges durchgeführt (Linden et al., 1996a; Linden et al., 1996b; McCarty et al., 2004).

1.1.6 Virusreaktivierung in latent infizierten Zellen

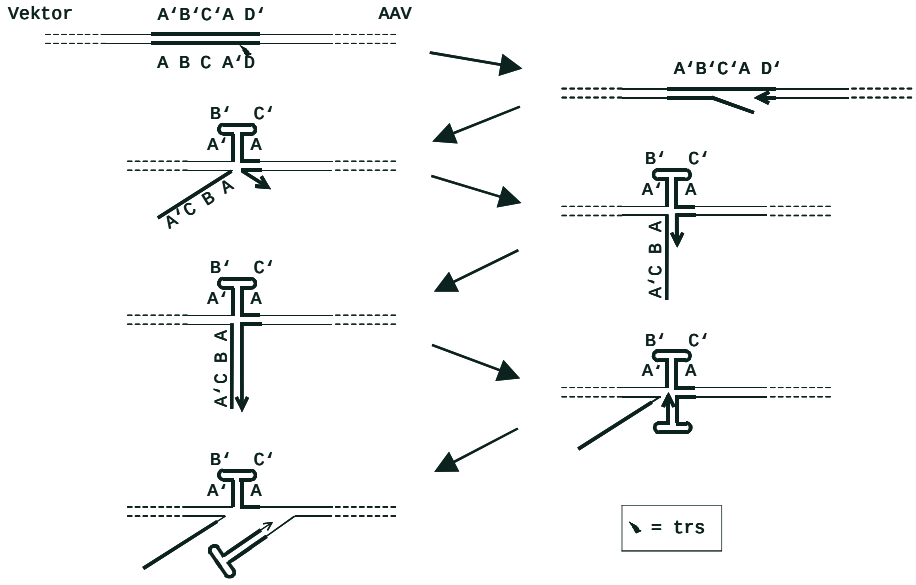


Abbildung 6: Modell für die Virusaktivierung von AAV in latent infizierten Zellen. Details sind in Text näher erklärt. Zeichnung modifiziert nach Ward et al., 2003.

Nach einer latenten Infektion von Zellen können auch nach 100 Passagen wieder AAV-2 hergestellt werden. Dieser Vorgang ist abhängig von einer Infektion mit Helfervirus (Hoggan et al., 1972). Als Modell wurde ein AAV-Plasmid verwendet, in dem, wie auch im Genom, das AAV-Genom zwischen der genomischen bzw. Plasmid-DNA integriert vorliegt (Ward et al., 2003). Bei der Virusreaktivierung wird zunächst ein Einzelstrangbruch durch die Rep-Proteine an der trs in der integrierten AAV-Sequenz bewirkt (s. Abbildung 6). Anschließend wird der ITR-Bereich von Position 124 Richtung Position 1 repliziert. Dabei bildet der einzelsträngige Komplementärstrang im Bereich des ITR eine Haarnadelstruktur aus. Dadurch werden von diesem Komplementärstrang die beiden gegenläufigen DNA-Bereiche abgetrennt. Sie können jedoch miteinander hybridisieren und die Polymerase kann dann den Bereich bis zum Ende des ITR fertig synthetisieren. Anschließend dissoziiert die Helikase-Aktivität diesen Duplex, so dass sich auch im replizierten DNA-Bereich ein ITR ausbilden kann.

Dessen 3'-Ende dient nun wie bei der DNA-Synthese nach Infektion als Primer (s. 1.1.4) und die AAV-Sequenz kann bis deren Ende repliziert werden, wobei sich am Ende des neu synthetisierten DNA-Stranges wieder die Haarnadelkonfiguration des ITR ausbildet. Die hergestellte DNA kann nun für die Vermehrung der viralen DNA verwendet werden (Ward et al., 2003).

1.1.7 Produktive Replikation von AAV-2

Zur produktiven Vermehrung ist AAV-2 auf die Koinfektion der Wirtszelle durch Helferviren angewiesen (Berns, 1990; Muzyczka, 1992). Dabei können Herpes Simplex Viren, Adenoviren oder das humane Cytomegalievirus (hCMV) als virale Helfer fungieren (Buller et al., 1981; Bantel-Schaal und zur Hausen, 1984; McPherson et al., 1985). Unter bestimmten Bedingungen kann AAV-2 auch in Abwesenheit von Helferviren replizieren und infektiöse Virionen bilden, z.B. nach Behandlung von Zellen mit chemischen und physikalischen Karzinogenen (Heilbronn et al., 1985; Yakobson et al., 1987; Yakobson et al., 1989; Yalkinoglu et al., 1991). Dies lässt darauf schließen, dass Helferviren Veränderungen in der Wirtszelle induzieren, welche die für die AAV-2-Replikation notwendigen Helferfunktionen verfügbar machen.

Die für die produktive Replikation des AAV-2 notwendige DNA-Synthese wurde bereits unter 1.1.4 näher beschrieben. Ferner ist die Expression der viralen Proteine für die Replikation der Viren notwendig. 10 bis 12 Stunden nach der Infektion mit AAV sind neben den Rep-Proteinen Rep78 und Rep52 auch die Cap-Proteine VP1, VP2 und VP3 nachweisbar, nach weiteren 2 Stunden neben Rep68 auch Rep40 (Redemann et al., 1989). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Rep-Proteine die Regulation der viralen Genexpression und Suppression beeinflussen (Pereira et al., 1997). Das Maximum der viralen Proteinsynthese ist gleichzeitig mit der maximalen viralen DNA-Doppelstrangsynthese erreicht, die 20 Stunden nach Infektion erlangt wird. Dagegen ist die maximale Menge an viralen DNA-Einzelsträngen erst nach weiteren 4 Stunden nachweisbar (Redemann et al., 1989). Der Zusammenbau der leeren Kapside im Verhältnis von ca. 1:1:20 aus den Proteinen VP1, VP2 und VP3 findet im Bereich des Nukleolus statt (Wistuba et al., 1997; Rabinowitz et al., 1999). In diese leeren Kapside wird unter Mitwirkung der Rep52- und Rep40-Proteine die virale einzelsträngige DNA eingebaut, wobei dieser Vorgang am ehesten im Nukleoplasma stattfindet (Chejanovsky und Carter, 1990; Wistuba et al., 1997; King et al., 2001; Timpe et al., 2005). Hierbei werden

sowohl der (+)-Strang als auch der (–)-Strang gleichermaßen in das Kapsid eingeschleust (Rose et al., 1969).

1.1.8 Umgehung der zeitverzögerten Expression bei AAV-Vektoren

Bei Verwendung herkömmlicher AAV-Systeme kam es bei *in vivo* Anwendungen zu einer Verzögerung der Expression von einigen Wochen. Der hierfür limitierende Faktor ist die Bildung des komplementären Stranges zum einzelsträngigen Virusgenom (ssAAV) nach der viralen Infektion und dem Transport in den Nukleus (Ferrari et al., 1996). Dieses Problem der zeitverzögernden Genexpression nach AAV-Infektion kann dadurch umgangen werden, dass sowohl der (–)-Strang als auch der (+)-Strang des AAV-Genoms in einem DNA-Molekül vorhanden sind und in einem Viruspartikel zusammen verpackt werden (McCarty et al., 2001). Dies kann erreicht werden, indem das einzelsträngige AAV-Genom (ssAAV) auf maximal die Hälfte der Größe des Wildtyp-Genoms verkleinert wird. Nun können die beiden komplementären DNA-Genome in einem Viruspartikel verpackt werden (dsAAV). Da jedoch nicht gesteuert wird welche Stränge verpackt werden, könnten neben dem Komplementär-Gemisch auch zwei (–)-Stränge oder zwei (+)-Stränge verpackt werden, oder auch nur ein Strang. Die Wahrscheinlichkeit für die gewünschte (–)-Strang/(+)-Strang-Kombination beträgt deshalb weniger als 50 %. Deshalb entwickelte McCarty et al., 2003, während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit eine Methode um die Wahrscheinlichkeit auf 100 % zu steigern. Hierzu wäre es eigentlich notwendig, die beiden Komplementärstränge auf einem DNA-Molekül zu haben, getrennt durch einen kurzen Spacer. Ideal für die Rückfaltung der DNA wäre die Verwendung eines ITR des AAV. Jedoch enthalten die ITRs Sequenzen für den Einzelstrangbruch der viralen DNA durch das Rep-Protein während der Vermehrung der viralen DNA, was wiederum zu einem Genom mit der Hälfte der ursprünglichen Größe führen würde. Durch die Deletion dieser Sequenz bei einem der viralen ITRs würde die DNA-Replikation des viralen Genoms an dem unmutierten ITR beginnen und, da das Rep-Protein an dem gegenüberliegenden mutierten ITR den Einzelstrangbruch nicht mehr durchführen kann, über dieses ITR hinweg gehen bis sie wieder beim unmutierten ITR endet. Hierbei erhält man ein dimeres einzelsträngiges Genom mit den unmutierten ITRs an den Enden und dem mutierten ITR in der Mitte. Diese DNA kann durch Rückfaltung ein doppelsträngiges DNA Molekül nach Freisetzung aus dem Kapsid bilden, ohne dass eine zelluläre DNA-Synthese notwendig ist. Durch die Verwendung dieses selbst-komplementären AAV (scAAV) sollte eine schnellere Genexpression nach AAV-Infektion erreicht werden bzw. eine höhere

Genexpression kurz nach der AAV-Infektion im Vergleich zum ssAAV erkennbar sein.

a)

b)

c)

Abbildung 7: Verschiedene Formen des AAV-Genoms. Die verschiedenen Formen des AAV-Genoms nach Freisetzung der viralen DNA aus dem Kapsid sind gezeigt, wobei in a) das normale Genom, in b) das auf die Hälfte des Wildtyp-AAV verkürzte Genom (dsAAV) und in c) das auf die Hälfte des Wildtyp-AAV verkürzte und in einem ITR eine Mutation enthaltene virale Genom (scAAV) dargestellt ist (nach McCarty et al., 2001).

1.2 Produktion und Reinigung rekombinanter AAV

Wie aus den vorhergehenden Kapiteln ersichtlich, ist für die Herstellung bzw. Replikation von AAV-2 lediglich notwendig, dass neben den Helferviren die viralen Replikations- (Rep-) und Kapsid- (Cap-) Proteine, sowie eine von zwei ITR flankierte einzelsträngige DNA vorhanden ist (s. 1.1.7). Dabei kann die einzelsträngige DNA mit Hilfe der Rep-Proteine und einer Wirtszell-Polymerase repliziert werden und in die durch die Cap-Proteine gebildete Kapsidhülle eingeschleust werden. Da die Herstellung der einzelsträngigen DNA aus dem doppelsträngigen Genom einer latent infizierten Zelle möglich ist (s. 1.1.6), kann durch einen analogen Vorgang eine durch ITRs flankierte DNA kodiert auf einem Plasmid für die Herstellung von Viren verwendet werden. Dabei ist es unerheblich, ob die DNA-Sequenz zwischen den ITRs für die viralen Proteine kodiert oder eine andere beliebige Sequenz, z.B. die Expressionskassette für ein Markergen oder therapeutisches Gen, enthält. Lediglich die Größe der inserierten DNA ist limitiert, da ein starker Abfall der Virusausbeute feststellbar ist, wenn die Gesamtgröße des AAV-Genoms inklusive den ITRs mehr als 119 % der Gesamtgröße des Wildtyp-Genoms beträgt (Hermonat et al., 1997). Daher sind für die Herstellung zusammenfassend folgende Faktoren notwendig:

- eine einzelsträngige oder doppelsträngige DNA-Sequenz, die von ITRs flankiert wird; diese kann auch auf einem Plasmid vorhanden sein, darf aber die Gesamtgröße des

viralen Genoms von 4,7 kb nicht wesentlich übersteigen, um noch verpackt zu werden.
- die Rep- und Cap-Proteine, wobei diese durch Expression von einem Plasmid oder von einer stabil exprimierenden Zelllinie stammen können.
- Helferfunktionen durch eine Koinfektion mit Helferviren, z.B. Adenoviren, oder durch Bereitstellung der Helferproteine durch Plasmidtransfektion.

1.2.1 Herstellung von rekombinanten AAV

Aufgrund dieser Voraussetzungen wurden Produktionsmethoden entwickelt, bei denen durch eine Doppeltransfektion unter Verwendung eines Helferplasmids zur Expression der viralen Rep- und Cap-Proteine und eines zweiten Vektorplasmids mit einer beliebigen Gensequenz zwischen zwei AAV-ITRs, einem Markergen oder einem therapeutischen Gen, (s. Abbildung 8), sowie einer Koinfektion mit Adenoviren die Herstellung von AAV möglich war (Samulski et al., 1982; Laughlin et al., 1983; Samulski et al., 1987; Ohi et al., 1990; Chatterjee et al., 1992; Walsh et al., 1992). Die Basensequenz der AAV-Gene im Helferplasmid wird dabei in den transfizierten Zellen zu mRNAs transkribiert und diese zu den Rep- und Cap-Proteinen translatiert. Das Marker- oder therapeutische Gen des Vektorplasmids, das von den beiden ITRs flankiert ist, wird als Einzelstrang in das Viruskapsid verpackt (Tratschin et al., 1984). Die entstandenen Vektoren können dann aus den Zellen isoliert und aufgereinigt werden.

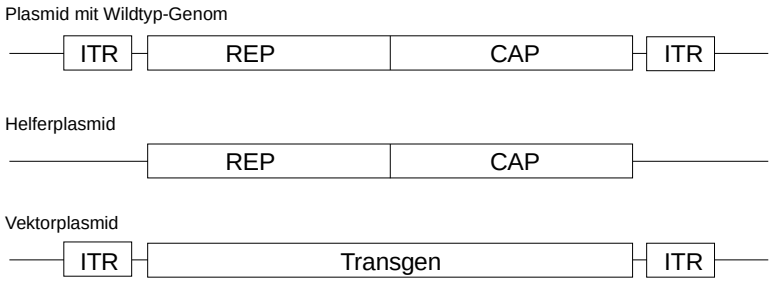


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Wildtyp-AAV-Plasmids, eines Helferplasmids und eines Vektorplasmids: Dem Helferplasmid fehlen die ITRs des Wildtyp-AAV-Plasmids. Dagegen sind im Vektorplasmid die viralen ITRs vorhanden, aber anstatt der viralen Gene ist eine Transgenkassette eingebaut. Vom Helferplasmid werden die Replikations- (Rep-) und Kapsid- (Cap-) Proteine exprimiert, während das Transgen des Vektorplasmids von den ITRs aus repliziert und verpackt wird.

Bei dieser Herstellungsmethode konnten die eingesetzten Adenoviren durch die Inaktivierung und Reinigung nicht komplett eliminiert werden. Diese Kontamination kann jedoch bei der Applikation und anschließender Auswertung der Ergebnisse zu messbaren Effekten führen, die nicht durch AAV, sondern aufgrund der Kontamination mit Adenoviren bedingt sind.

Insbesondere bei *in vivo* Anwendungen kann dieses Problem auftreten, da hier Adenoviren aufgrund ihrer hohen Immunogenität eine Immunantwort hervorrufen können (Xiao et al., 1998). Weiterhin ist bei einer ungenügenden Abtrennung von Kontaminationen eine Scheintransduktion möglich, was zu vorgetäuschten Ergebnissen führen kann (Alexander et al., 1997).

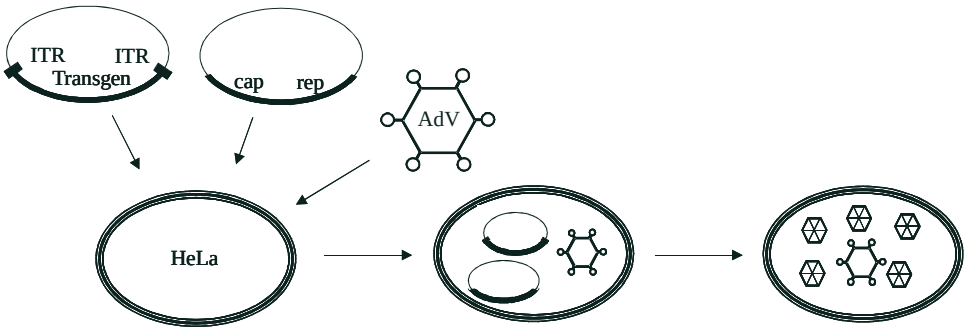


Abbildung 9: Herstellung von rekombinanten AAV mit Hilfe von Adenoviren. Das Vektorplasmid, das das Transgen zwischen den viralen ITRs enthält, und das Helferplasmid, das die Gene für die Rep- und Cap-Proteine enthält, werden in HeLa-Zellen kotransfiziert. Die für die AAV-Herstellung benötigten adenoviralen Helferfunktionen werden durch Superinfektion der Zellen eingebracht.

Als Vereinfachung für die AAV-Herstellung wurden Zelllinien etabliert, die stabil die Rep- und Cap-Proteine exprimieren (Gao et al., 1998; Inoue und Russell, 1998). Jedoch muss auch hier eine Koinfektion mit Adenoviren durchgeführt werden.

Bei weiteren Untersuchungen wurde versucht, diejenigen Gen-Abschnitte des Adenovirus herauszufinden, die für die adenoviralen Helferfunktionen bei der Herstellung der AAV benötigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass neben E1a, E1b, E2 und E4 des Adenoviruses auch dessen VA-Region notwendig ist, die für adenovirale mRNAs kodiert. Bei der Replikation des AAV dient E1a als Transaktivator und erhöht die Transkriptionsaktivität verschiedener adenoviraler Proteine und auch der Rep- und Cap-Proteine des AAV. E1b kann durch die Interaktion mit E4 den Transport von viraler mRNA vermitteln. E4, insbesondere der offene Leserahmen 6, ist auch bei der Replikation der AAV-DNA beteiligt. E2 und die VA-mRNAs stabilisieren die viralen mRNAs und verstärken deren Translation, insbesondere der Cap-Proteine (Xiao et al., 1998). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden Plasmide hergestellt, die diese adenoviralen Regionen enthalten (Grimm et al., 1998; Matsushita et al., 1998; Xiao et al., 1998; Collaco et al., 1999). Durch Kotransfektion eines Vektorplasmids und eines Helferplasmids, das für die Rep- und Cap-Proteine des AAV kodiert und auch die

adenoviralen Helferregionen enthält, war es nun möglich AAV herzustellen ohne dass eine Koinfektion mit Adenoviren notwendig ist. Alternativ kann die Information für die adenoviralen Helferfunktionen auch auf einem dritten Plasmid zur Verfügung gestellt werden.

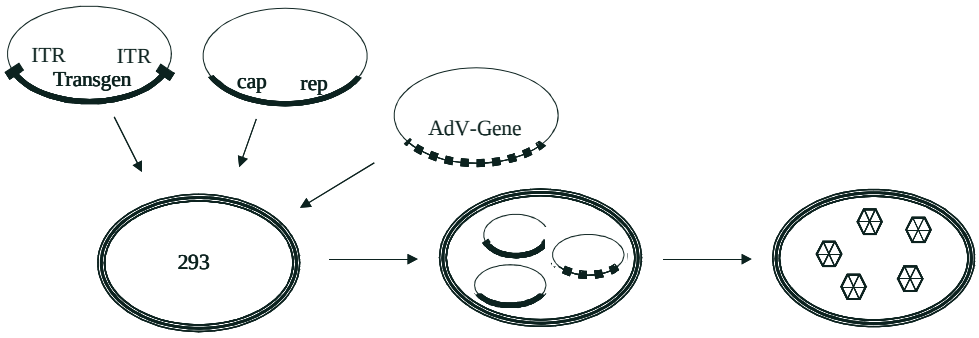


Abbildung 10: Herstellung von rekombinanten AAV ohne Adenoviren. Das Vektorplasmid, das das Transgen zwischen den viralen ITRs enthält, das Helferplasmid, das die Gene für die Rep- und Cap-Proteine enthält, und das Adeno-Helferplasmid, das für die adenoviralen Helferfunktionen kodiert, werden zur Adenovirus-freien Herstellung in 293-Zellen kotransfiziert.

1.2.2 Reinigung von rekombinanten AAV

Zum Beginn der Arbeiten am vorliegenden Projekt wurden die hergestellten AAV über eine Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation gereinigt (Qing et al., 1998; Girod et al., 1999; Qing et al., 1999; Summerford et al., 1999). Anschließend wurde das potentiell toxische Cäsiumchlorid durch mehrfache Dialyse eliminiert. Diese Methode ist sehr zeitaufwändig (sie dauerte mehrere Tage), oft wurde ein Großteil der infektiösen AAV-Partikel verloren und die Vektorpräparationen waren von unterschiedlicher Qualität (Zolotukhin et al., 1999).

Um diese Nachteile zu umgehen, wurde die Reinigung der AAV-Verpackung im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf eine neue Methode umgestellt, bei der als Dichtegradientmaterial Iodixanol verwendet wurde (Hermens et al., 1999; Zolotukhin et al., 1999). Iodixanol wird als Röntgenkontrastmittel schon seit Jahren eingesetzt, was die geringe bzw. fehlende Toxizität dieser Substanz zeigt (Bolstad et al., 1991; Svaland et al., 1992; Andersen et al., 1993; Pannu et al., 2005). Auch war bei direkter Injektion einer AAV-Präparation mit Iodixanol in das Gehirn von Mäusen keine zytopathischen Effekte erkennbar (Hermens et al., 1999). Um Iodixanol abzutrennen, können auch Kationenaustauscher- oder Heparinaffinitäts-Säulen nach der Ultrazentrifugation verwendet werden (Zolotukhin et al., 1999). Aufgrund dieser Verbesserungen konnte die Ausbeute und Reinheit gesteigert und der Zeitaufwand verringert

werden.

1.3 AAV als Vektor für die Gentherapie

Die auf dem AAV-2 basierenden Vektorsysteme besitzen ein großes Potential für die Gentherapie am Menschen (Hallek et al., 1998; Flotte, 2005; Wang und Herzog, 2005). Dieses System weist gegenüber anderen viralen Vektorsystemen insbesondere in folgenden Bereichen Vorteile auf:

- Fehlende Pathogenität für den Menschen

  Bisher konnten keine Krankheiten beim Menschen gefunden werden, die auf eine AAV-Infektion zurückzuführen war (Monahan und Samulski, 2000; McCarty et al., 2001; Buning et al., 2004). Allerdings liegen die hypothetischen Risiken in der Genaktivierung von angrenzenden Sequenzen oder intrinsischen Promotoren durch die ITRs bei der Integration der AAV-Vektoren in das humane Genom (Blacklow et al., 1971; Kotin, 1994). Auch bleibt noch auszuschließen, ob AAV-Vektoren gonadale Zellen infizieren können, was bei Wildtyp-Infektionen beobachtet wurde (Burguete et al., 1999; Rohde et al., 1999; Erles et al., 2001).
- Langzeitexpression der transduzierten Gene

  Nach Infektion mit AAV konnte *in vivo* eine stabile und langanhaltende Expression, z.T. über ein Jahr hinaus nachgewiesen werden (Michel et al., 2005; Watanabe et al., 2005).
- Infektion von sich nicht-teilenden Zellen

  AAV kann sowohl proliferierende, als auch postmitotische Zellen infizieren. Jedoch verweilen rekombinante Vektoren in sich nicht-teilenden Zellen häufig in einer stationären Phase, so das die Konversion vom Einzel- in den Doppelstrang erst nach Eintritt in die S-Phase stattfindet (Flotte et al., 1994; Russell et al., 1994). Die Problematik der Einzelstrang-Doppelstrang-Konversion kann jedoch durch den Einsatz selbst-komplementärer AAV-Vektoren umgangen werden (McCarty et al., 2001; McCarty et al., 2003).
- Stabilität des Virions und damit eine mögliche Aufreinigung zu hohen Titern

  Die Reinigung und Konzentrierung von AAV konnte in den letzten Jahren erheblich verbessert und vereinfacht werden. Im Labormaßstab konnten Präparationen mit einem genomischen Partikelkonzentration von bis zu $5 \cdot 10^{12}$ pro ml hergestellt werden (eigene

Daten).

- Geringe Immunogenität

  Infektionen mit rekombinanten AAV induzieren zwar eine humorale Immunantwort, jedoch selten eine zelluläre. Dies ist begründet durch die geringe Infektion von dentritischen Zellen und der fehlenden Expression viraler Gene. Dadurch kann eine langanhaltende Expression des Transgens erreicht werden (Fisher et al., 1997).
- Weitgehendes Fehlen von viralen Genen und Genprodukten im rekombinanten AAV

  Im Gegensatz zu den „High-Capacity"-Vektoren Cytomegalie Viren und Epstein Barr Viren, besitzen rekombinante AAV lediglich ein Kapsid aus viralen Proteinen und den beiden viralen ITRs (Bueler, 1999).
- Möglichkeit des Transfers auch größerer Gensequenzen

  Durch die Verpackung eines Gens, das so in zwei AAV-Vektoren aufgeteilt ist, dass am Ende des ersten bzw. am Anfang des zweiten eine Splicedonor- bzw. Spliceakzeptor-Sequenz liegt, können auch größere Sequenzen durch das AAV-System transferiert werden (Nakai et al., 2000a; Samulski, 2000; Chao et al., 2002).

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Reinigung und Anwendung des AAV-Systems für *in vivo* Applikationen zu optimieren.

Dies sollte zuerst durch Optimierung der Reinigungsschritte erreicht werden, um eine möglichst hohe Ausbeute und gleichzeitig eine möglichst geringe Kontamination der AAV-Präparation zu erhalten. Hierbei sollten mehrere, auf unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften der Viren beruhende Reinigungsschritte nacheinander durchlaufen und optimiert werden. Insbesondere die Art des Aufschlusses der Zellen, die Verwendung von Ammoniumsulfatfällungen, der Ersatz der Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation durch die Iodixanol-Ultrazentrifugation und der Einsatz von säulenchromatographischen Methoden sollte hierbei überprüft werden.

Als weitere Optimierung des AAV-Systems sollte untersucht werden, ob die Verwendung von selbst-komplementären AAV (scAAV) zu einer schnelleren der Transgen-Expression nach Infektion führt und ob die virale DNA in der vorausgesagten Faltung vorliegt. Bei einer

schnelleren Expression könnte die Anwendung des AAV-Systems für Applikationen, die einen möglichst raschen Beginn der Therapie verlangen, interessant werden.

Weiterhin sollte evaluiert werden, ob bei murinen *in vivo* Modellen eine Optimierung des Gentransfers und der Expression des transferierten Gens möglich ist. Dabei mußte untersucht werden, durch welche Veränderungen bei der Applikation dies erreicht werden kann. Dadurch sollte es ermöglicht werden, dass durch eine möglichst geringe Applikationsmenge unter geringster Belastung des Tieres ein größtmöglicher Effekt erreicht wird. Hierfür soll als Transgen Endostatin verwendet werden, da Endostatin-Protein als sekretorisches Protein unabhängig vom Expressionsort im Blut über einen ELISA nachgewiesen werden kann.

Ferner sollte der Einfluss von Antikoagulanzien auf die AAV-Infektion evaluiert werden. Da Heparin in der Klinik standardmäßig bei Patienten angewendet wird und auch bei Forschungsprojekten, z.B. bei gentherapeutischen Tierversuchen, die auf das Gefäßsystem zielen und mit Operationen verbunden sind, als Antikoagulanz eingesetzt wird, könnte dies den Einsatz von AAV negativ beeinflussen, da AAV Heparansulfatproteoglykan (HSPG) als Rezeptor verwendet und aufgrund der nahen Verwandtschaft auch an Heparin bindet. Aus diesem Grund ist es interessant, ob eine Abnahme der Inhibition der AAV-Infektion feststellbar ist, wenn die eingesetzten Antikoagulanzien eine Verringerung der strukturellen Ähnlichkeit mit Heparin aufweisen. Ferner sollte untersucht werden, in wiefern ein Antikoagulanz, das keine strukturelle Ähnlichkeit mit Heparin hat, einen Einfluss auf die AAV-Infektion hat. Dadurch sollte überprüft werden, ob es alternative Antikoagulanzien gibt, die eine geringere oder keine Inhibition der AAV-2-Infektion aufweisen und dadurch als Alternative für Patienten, die eine Gentherapie erhalten sollen, verwendet werden könnten.

2 Material

2.1 Chemikalien und andere Materialien

$(NH_4)Cl$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
$(NH_4)_2SO_4$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
10x PBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
$CaCl_2$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Clodronat-Liposomen	Dr. van Rooijen, VU medisch centrum, Amsterdam, Niederlande (Clodronat wurde kostenlos zur Verfügung gestellt von Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
Chloroform	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
CsCl	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Desoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylformamide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DMSO	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
EDTA	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
Eosin	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
Essigsäure	Riedel-de-Haen, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Formalin	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
Formamid	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glycerin	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
H_2O_2	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
Hämalaun-Lösung (Mayer)	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
K_2HPO_4	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
Kalium-Ferri-Cyanur	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kalium-Ferro-Cyanur	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
KCl	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
Ketamin	Essex Pharma, München, Deutschland
$KHCO_3$	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
KOAc	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
LiCl	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
Liposomen	Dr. van Rooijen, VU medisch centrum, Amsterdam, Niederlande
Maleinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
$MgCl_2$	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
$MnCl_2$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Na_2HPO_4	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
NaCl	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland

NaH_2PO_4	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
NaMOPS (pH 7.0)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Na_2SO_3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
$Na_2S_2O_5$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumcitrat	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
Optiprep	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Phenolrot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
SDS	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
Tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
XGal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Xylazin	Alvetra GmbH, Neumünster, Deutschland
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Xylol	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland

2.2 Antikoagulantien

Danaparoid-Natrium	Orgaran, Thiemann Arzneimittel, Waltrop, Deutschland
Heparin	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Hirudin (Lepirudin)	Refludan, Pharmion, Cambridge, UK
Tinzaparin-Natrium	Innohep, B.Braun, Melsungen, Deutschland

2.3 Enzyme

Alkalische Phosphathase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Benzonase	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
DNase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Klenow Fragment	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Pfu-Polymerase	Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
Proteinase K	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
Restriktionsenzyme	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
	New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland
	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
	Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
T4-DNA Ligase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
T4-DNA Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

2.4 Nukleinsäuren und Plasmide

pBLAST-mEndostatin	Invivogen, San Diego, U.S.A.
pBluescript KS-	Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
pGFP	A. Girod, LMU München, Deutschland
pGL-2	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
pSUB201+	R.J. Samulski, University of North Carolina, Chapel Hill, U.S.A.
pTRACER-CMV	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pZeoSV2	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Matabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert und gegebenenfalls modifiziert.

Name	Sequenz
HpaI-Linker	Pho-GTC GTT AAC GAC
PCR CMV forward	GGC GGA GTT GTT ACG ACA T
PCR CMV reverse	GGG ACT TTC CTA CTT GGC A
PCR GFP forward	GCT ACC CCG ACC ACA TGA AG
PCR GFP reverse	GTC CAT GCC GAG AGT GAT CC
PCR murines Endostatin forward	TCC AGT GCT TCC AGC AAG CC
PCR murines Endostatin reverse	GGA CGA TGT AGC TGT TGT GG
RT-PCR GFP reverse	GCA GCT TAT AAT GG

2.6 DNA-Größenmarker

Alle unmarkierten DNA-Größenmarker wurden von der Firma Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland, gekauft, der Digoxigenin-markierte DNA-Größenmarker von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland.

Lamda DNA/EcoRI+HindIII	125, 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226
Lamda DNA/Hind III	125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130
Lamda DNA/Hind III, Digoxigenin-markiert	125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130
100 bp-Leiter	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031, 1200, 1500, 2000, 3000
1 kbp-Leiter	250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000

2.7 Bakterienstämme

E. coli DH10B	F- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ80d*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K λ- *rps*L *nup*G (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
E. coli TOP10F'	F' {*lac*I^{q}*Tn10*(Tet^{R})} *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^{R}) *end*A1 *nup*G (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
E. coli XL1-Blue	F' ::Tn*10 proA*$^{+}$*B*$^{+}$ *lacl*^{q} *Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96*(Nal^{r}) *thi hsdR17*($r_K^- m_K^+$) *glnV44 relA1 lac* (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland)

2.8 Medien und Zusätze für Prokaryonten

Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bacto Agar	Becton Dickenson, Le Pont de Claix, Frankreich
Bacto Trypton	Becton Dickenson, Le Pont de Claix, Frankreich
Blast-Flüssigmedium	Invivogen, San Diego, U.S.A.
Blast-Plattenmedium	Invivogen, San Diego, U.S.A.
Hefe-Extrakt	Becton Dickenson, Le Pont de Claix, Frankreich
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2.9 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Hallek entnommen.

293	Humane embryonale Nierenzelle; ATCC: CRL 1573
HeLa	Humanes Cervixkarzinom, HPV 16-transformiert; ATCC : CCL 2

2.10 Viren

Wildtyp-Stamm des Adenovirus Typ 5 wurde von der Firma MediGene (Martinsried, Deutschland) bezogen und in HeLa Zellen vermehrt.

2.11 Mäuse

C57Bl/6-Mäuse und Balb/c-Mäuse wurden von der Firma Bomholtgard (Ry, Dänemark) bezogen.

2.12 Medien und Zusätze für Eukaryonten

DMEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
H_20 (für Virusreinigung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
PBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin in PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trysin/EDTA (0,5% Trypsin und 0,2% EDTA in PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin (0.25 % in PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.13 Antikörper und Proteine

Antikörper

Spezies	Spezifität	Isotyp	Firma
Kaninchen	AAV VP1, VP2, VP3	Polyklonal	Progen, Heidelberg, Deutschland
Kaninchen	Ratten Ig	Ig	DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland
Kaninchen	Serum	-	DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland
Maus	AAV VP1, VP2, VP3	IgG1	Progen, Heidelberg, Deutschland
Maus	Isotyp	IgG1	SouthernBiotech, Birmingham, U.S.A.
Ratte	Murines F4/80	IgG	Serotec GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Ratte	Isotyp	IgG2b	Serotec GmbH, Düsseldorf, Deutschland

Proteine

rekombinantes murines Endostatin	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland

Weitere Medien und Systeme für Antikörper-Reaktionen

Antikörper-Verdünnungsmedium	DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland
APAAP-Komplex Ratte	DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland
Biotin Blockierungs- System	DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland
Brückenantikörper Picture Plus anti Kaninchen	Zytomed Laboratories Inc., South San Francisco, U.S.A.
Brückenantikörper Picture Plus anti Maus	Zytomed Laboratories Inc., South San Francisco, U.S.A.
DAB	DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland
Fast-Red System	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung	Vector Laboratories Inc. Burlingame, U.S.A.
Kaisers Glyceringelatine	Merck KGaA, Schwalbach, Deutschland
Maus-auf-Maus Peroxidase System	Vector Laboratories Inc. Burlingame, U.S.A.
Proteinblocker	DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland

2.14 Nachweis- und Präparationssysteme

1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
ACCUCYTE Murine Endostatin Kit	Cytimmune, College Park, U.S.A.
CytElisa Mouse Endostatin Kit	Cytimmune, College Park, U.S.A.
DIG-DNA-Labeling und Detektion-Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
EndoFree Plasmid Midi-/Maxi-/Giga-Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Plasmid Midi-/Maxi-/Giga-Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAPrep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNAlater TissueProtect Tubes	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

2.15 Geräte

^{137}Cs-Quelle	Hämatologikum der GSF, München, Deutschland
96-Well Spektralphotometer	Molecular Devices GmbH, Ismaning, Deutschland
Eagle Eye	Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
FACS-Gerät	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Laminar Flow	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
LightCycler PCR Maschine	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Spektralphotometer DU 640	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Tiefgefrierschränke	Forma Scientific GmbH, Marietta, U.S.A.

2.16 Sonstiges

8-fach Kammer-Objektträger	Nalge Nunc International, Naperville, U.S.A.
Catgut 4-0 Nahtmaterial	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
Cryostat	Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland
Dialyse-Membran	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
EDTA-Röhrchen	Becton Dickenson Systems Plymouth, UK
Elektroporationsküvetten	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Weseling-Berzdorf, Deutschland
Filmkassetten	Quantum Appligene, Heidelberg, Deutschland
Gewebekultur-Flaschen	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Gewebekultur-Platten	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
GSA-Zentrifugenröhrchen	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Heparin-Säule	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Homogenizer	Wheaton, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Hybridisierungsrohr	Schott AG, Mainz, Deutschland
LightCycler Glaskapillaren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Mersilene 3-0 Nahtmaterial	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
Mikroskop	Leica, Pensheim, Deutschland
Nylonmembran	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Reaktionsgefäße	Josef Peske oHG, Aindling, Deutschland
Röntgenfilm Biomax MR	Eastman Kodak Co., Rochester, U.S.A.
Skalpelle	Paragon International Ltd., Sheffield, UK
Spritzen	Becton Dickenson Systems Plymouth, UK
Spritzenkanülen	Becton Dickenson Systems Plymouth, UK
SS34-Zentrifugenröhrchen	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Ultrazentrifugations-Röhrchen	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Whatman-Papier	Whatman International Ltd., Maldstone, UK
Zellsieb 40 µm	Becton Dickenson Systems Plymouth, UK

3 Methoden

3.1 Kultivierung von Mikroorganismen (Bakterien)

LB-Medium:	Bacto Trypton	1 %
	Hefe-Extrakt	0,5 %
	NaCl	0,5 %
	NaOH	1 mM
	Bacto Agar (bei Platten)	1,5 %
Ampicillin:	Stocklösung: 50 mg/ml in H_2O; steril filtriert Endkonzentration: 50 µg/ml	
Tetrazyklin	Stocklösung: 5 mg/ml in Ethanol Endkonzentration: 12,5 µg/ml	

3.1.1 Plattenkultur

Mit einem sterilen Drygalski-Spatel wurden Bakterien aus einer Flüssigkultur auf sterile LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C invertiert im Brutschrank inkubiert.
Zur Herstellung der Platten wurde das Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55 °C in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Abkühlen wurden die Platten bei 4 °C invertiert gelagert. Zur Selektion der Bakterien auf Plasmide wurde dem Medium zusätzlich das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

3.1.2 Flüssigkultur

Von Plattenkulturen entnommene Einzelkolonien wurden in 4 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überimpft und über Nacht bei 220 rpm und 37 °C inkubiert. Mit diesen Übernachtkulturen wurde frisches Medium angeimpft und mit den Bakterien in einem Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37 °C bis zur gewünschten optischen Dichte inkubiert.

3.2 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

3.2.1 Plasmidisolierung aus Bakterien

3.2.1.1 Schnellaufschluss durch QIAPrep Miniprep Kit

Diese Methode wurde nach der Transformation eines Ligationsansatzes angewandt, um schnell eine große Anzahl von Einzelkolonien auf eine erfolgreiche Insertklonierung zu untersuchen.

Die Plasmid-Isolierung mit Hilfe des QIAPrep Miniprep Kits erfolgte mit den mitgelieferten Puffern. Pro Transformante wurden 4 ml Ampicillin-haltiges (50 µg/ml) LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und 12-16 Stunden bei 37 °C im Schüttler (200 rpm) inkubiert. 3 ml der Bakterien wurden anschließend über Zentrifugation geerntet (3000 rpm, 5 min, RT). Nach Abgießen des Kulturüberstandes erfolgte die Resuspension in 250 µl P1-Puffer durch kräftiges Mischen der Suspension. Nach Zusatz von 250 µl P2-Puffer und Mischen des Ansatzes, wurde dieser für 5 min auf Eis inkubiert. Zur Fällung der chromosomalen DNA wurden zur Suspension anschließend 350 µl N3-Puffer pipettiert. Nach mehrmaligem Invertieren wurde erneut zentrifugiert (14000 rpm, 10 min, RT). Der klare Überstand wurde in QIAprep Säulen überführt und durch das Säulenmaterial zentrifugiert (14000 rpm). Die säulengebundene DNA wurde je einmal durch Zentrifugation mit 500 µl Puffer PB und mit 750 µl Puffer PE gewaschen und abschließend mit 50 µl EB-Puffer eluiert.

P1-Puffer (Resuspensionspuffer):	Tris/HCl (pH 8,8)	50	mM
	EDTA	10	mM
	RNase A	100	µg/ml
P2-Puffer (Lysispuffer):	NaOH	200	mM
	SDS	1	%
N3-Puffer:	Qiagen System		
PB-Puffer:	Qiagen System		
PE-Puffer:	Qiagen System		
EB-Puffer:	Tris/HCl (pH 8,5)	10	mM

3.2.1.2 Endotoxin-freie Isolation über Anionenaustauschersäulen

Für sehr saubere Plasmidpräparationen (Sequenzierung, Virenverpackung) wurden Anionenaustauschersäulen der Firma Qiagen eingesetzt. Es wurden Präparationen im Plasmid "Midi"-, "Maxi"- und "Giga"-Maßstab nach den Standardprotokollen und Systemkits Qiagen 100, 500 und 2500 mit den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Bei Verwendung der DNA für Transfektionen wurde die EndoFree-Version der o.g. Kits verwendet, um höhere Transfektionseffizienzen zu erhalten.

Ausgegangen wurde dabei jeweils von einer Bakterien-Übernachtkultur aus 25 ml bis 5 l LB-Medium (supplementiert mit Ampicillin: 50 µg/ml). Zur Aufzucht wurden zunächst 5 ml des Mediums mit einer Einzelkolonie von einer Platte oder aus einer Stammkultur beimpft, und dieses nach 10-12 h bei 37 °C im Schüttler (200 rpm) in entsprechender Menge in das Kulturmedium überführt.

Zur Plasmidisolation wurden die Bakterien abzentrifugiert (6000 rpm, 15 min, 4 °C) und in P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von P2-Puffer wurde die Lösung vorsichtig mehrmals invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von P3-Puffer wurde abermals vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die ausgefällte chromosomale DNA und Proteinanteile konnten anschließend über Zentrifugation abgetrennt werden (9000 rpm, 40 min, 4 °C). Der klare Überstand wurde hierauf über einen Vakkum-Filter filtriert, mit ER-Puffer versetzt, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurden die Anionenaustauschersäulen mit QBT-Puffer äquilibriert. Der klare plasmidhaltige Überstand wurde auf die Säulen gegossen. Die Säulen wurden anschließend mit QC-Puffer mehrmals gewaschen und die DNA schließlich mit QN-Puffer eluiert. Die eluierte DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert, abzentrifugiert (4000 rpm, 60 min, 4 °C), nach dem Abgießen des Überstandes mit 2 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (4000 rpm, 30 min, 4 °C) und nach Absaugen des Überstandes unter einer Laminar Flow in 150 bis 1500 µl TE-Puffer aufgenommen. DNA für Virusverpackungen wurde ab diesem Zeitpunkt ausschließlich steril unter der Laminar Flow in der Zellkultur gehandhabt.

P1-Puffer (Resuspensionspuffer):	Tris/HCl (pH 8,8)	50	mM
	EDTA	10	mM
	RNase A	100	µg/ml

P2-Puffer (Lysispuffer):	NaOH	200	mM
	SDS	1	%
P3-Puffer (Neutralisationspuffer):	KOAc (pH 4.8)	2,55	M
ER-Puffer:	Qiagen System		
QBT-Puffer (Äquilibrierungspuffer):	NaCl	750	mM
	MOPS, pH 7,0	50	mM
	EtOH	15	%
	Triton X-100	0,15	%
QC-Puffer (Waschpuffer):	NaCl	1	mM
	MOPS, pH 7,0	50	mM
	EtOH	15	%
QN-Puffer (Elutionspuffer):	NaCl	1,6	M
	MOPS, pH 7,0	50	mM
	Isopropanol	15	%
TE-Puffer (Resuspensionspuffer):	Tris/HCl, pH 8,0	10	mM
	EDTA	1	mM

3.2.2 DNA-Isolierung aus Organen und Viren mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits

Die DNA-Isolierung mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits erfolgte mit den mitgelieferten Puffern. Die tiefgefrorenen Organe wurden mit einem Skalpell für 5 min zerkleinert und maximal 25 mg (bei Milz maximal 10 mg) mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (600 mU/ml) versetzt, gemischt und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Zur Elimination von RNA wurde die Lösung mit 20 µl RNase A (10 mg/ml) für 2 min bei Raumtemperatur versetzt. Bei der Isolation aus Viren wurde die Viruslösung mit demselben Volumen PBS verdünnt. Die Suspension aus Organen nach RNase-Behandlung bzw. die verdünnte Viruslösung wurde mit 200 µl AL-Puffer versetzt, gemischt und bei 70 °C für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol wurde der Inhalt in DNeasy Säulen überführt und durch das Säulenmaterial zentrifugiert (8000 rpm, 1 min). Die säulengebundene DNA wurde einmal durch Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min mit 500 µl Puffer AW1 und einmal durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 3 min mit 500 µl Puffer AW2 gewaschen. Abschließend wurde die DNA zweimal mit je 100 µl EB-Puffer eluiert und die zwei Fraktionen vereint.
Bei der Isolierung von DNA aus AAV wurden die Viruslösungen auf 200 µl mit PBS verdünnt und das Protokoll ab der Zugabe von AL-Puffer durchgeführt.

EB-Puffer	Tris/HCl (pH 8,5)	10	mM

3.2.3 RNA-Isolierung aus Organen mit Hilfe des RNeasy Tissue Kits

Die RNA-Isolierung mit Hilfe des RNeasy Tissue Kits erfolgte mit den mitgelieferten Puffern. Die in RNAlater gehaltenen Organe wurden mit einem Skalpell zerkleinert und maximal 10 mg mit 350 µl RLT-Puffer versetzt. Durch mehrfaches Aufziehen durch eine Kanüle wurden die Organe weiter zerkleinert. Schließlich wurde die Suspension in eine QIAschredder Säule überführt und zentrifugiert (14000 rpm, 2 min). Der Durchfluss wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals zentrifugiert (14000 rpm, 3 min). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 70 %igem Ethanol versetzt, gemischt, in RNeasy Säulen überführt und durch das Säulenmaterial zentrifugiert (10000 rpm, 15 sec). Die säulengebundene RNA wurde durch Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 sec mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und zur Elimination von DNA mit einer Mischung aus 10 µl DNaseI Stocklösung und 70 µl Rad-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 sec mit 350 µl RW1 und für 2 min mit RPR-Puffer gewaschen. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation bei 14000 für 1 min getrocknet. Anschließend wurde die RNA zweimal mit je 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die beiden Fraktionen vereint.

3.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im nativen Agarosegel

Zum Nachweis der Größe und präparativen Trennung von DNA und DNA-Fragmenten wurden diese in einem Agarosegel durch Anlegen eines elektrischen Feldes der Größe nach aufgetrennt.

Die Agarose wurde in Tris-Borat-EDTA- (TBE-) Puffer aufgeschlämmt, im Mikrowellenherd aufgekocht und gelöst. Falls das Gel nicht für einen Southern Blot verwendet wurde, gab man der Lösung nach dem Abkühlen auf 60 °C Ethidiumbromid bis zu einer Konzentration von 0,5 µg/ml zu. Das 0,8 %ige bis 2 %ige Agarosegel wurde in eine vorbereitete Form gegossen und nach dem Erstarren in eine entsprechende Gelapparatur eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 0,1 Volumen Auftragspuffer versetzt und die Elektrophorese in TBE-Puffer mit 30 bis 180 V durchgeführt. Das Gel wurde dann entweder für einen Southern Blot nach 3.2.6 verwendet oder die DNA wurde durch UV-Absorption des interkalierten Ethidiumbromids bei einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht. Dabei erlaubten die parallel aufgetragenen Größenmarker eine Abschätzung der Länge der DNA-Fragmente.

Auftragspuffer :	Glycerin	50	%
	EDTA, pH 8,0	100	mM
	Bromphenolblau	0,25	%
	Xylencyanol FF	0,25	%
10x TBE:	Tris	890	mM
	Borsäure	890	mM
	EDTA	20	mM

3.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im alkalischen Agarosegel

Zum Nachweis der Größe von Einzelstrang-DNA mussten eventuelle Hybridisierungen der DNA bei der Auftrennung in einem Agarosegel denaturiert werden. Hierfür fand die Auftrennung in einem alkalischen Agarosegel statt, wobei die Hybridisierungen durch das stark alkalische Milieu denaturiert wurden.

Die Agarose wurde in Wasser aufgeschlämmt, im Mikrowellenherd aufgekocht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf 60 °C wurde die Lösung mit Natriumhydroxid bis zu einer Konzentration von 50 mM und EDTA bis zu einer Konzentration von 1 mM versetzt. Das 1 %ige alkalische Agarosegel wurde in eine vorbereitete Form gegossen und nach dem Erstarren in eine entsprechende Gelapparatur eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit NaOH und EDTA bis zu einer Konzentration von 50 mM und 1 mM versetzt und 0,2 Volumen alkalischer Auftragspuffer wurden beigemischt. Die Positivkontrolle wurde wegen der pH-Empfindlichkeit weder mit NaOH und EDTA noch mit alkalischem Laufpuffer versetzt, sondern es wurde hierbei der Gelauftragspuffer von 3.2.4 verwendet. Die Elektrophorese im alkalischen Laufpuffer wurde mit 40 bis 50 V für 5 h durchgeführt und das Gel anschließend für 2 h in Neutralisierungspuffer geschwenkt.

Alkalischer Auftragspuffer :	NaOH	300	mM
	EDTA	6	mM
	Pancoll (1,077 g/ml)	18	%
	Xylencyanol FF	0,25	%
alkalischer Laufpuffer:	NaOH	50	mM
	EDTA	1	mM
Neutralisierungspuffer	Tris/HCl (pH 7,5)	1	M
	NaCl	1,5	M

3.2.6 Southern Blot

Zum Nachweis der DNA in alkalischen Gelen ist es nicht möglich Ethidiumbromid zu verwenden, da dieses durch den starken alkalischen pH zersetzt werden würde. Deshalb wurde

der Nachweis von DNA in alkalischen Gelen und den entsprechenden Kontrollen in nativen Gelen über Southern Blot nachgewiesen. Dabei wurde die DNA nach der Auftrennung im alkalischen oder nativen Gel auf eine Nylonmembran transferiert, indem die DNA-Moleküle durch den Transferpuffer, durch die Kapillarkräfte nach oben gesaugt, mitgenommen wurden und an der positiv geladenen Nylonmembran hängen blieben. Die DNA wurde durch Crosslinking mit Hilfe von Hitze fixiert und nach Hybridisierung mit einer DNA-Sonde durch Chemolumineszenez detektiert.

Die Gele von 3.2.4 oder 3.2.5 wurden für 15 min in 0,25 M HCl geschwenkt, kurz mit Wasser gespült und erneut für 20 min in der Denaturierungslösung behandelt. Sie wurden anschließend mit den Taschen nach unten blasenfrei auf ein mit 20x SSC getränktes Whatman-Filterpapier gelegt, das auf einem Plastikgitter lag und dessen Filterpapierenden in ein Reservoir von 20x SSC in eine Wanne hineinragte. Es wurden eine befeuchtete Nylonmembran und darüber nochmals fünf feuchte Whatman-Filterpapiere blasenfrei darüber gelegt und der Aufbau durch Auflegen von mehreren trockenen Papiertüchern und eines Gewichtes zum Beschweren abgeschlossen. Es wurde 14 bis 16 h geblottet und danach die Nylonmembran zum Crosslinking für 2 h bei 80 °C oder für 15 min bei 120 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA wie unter 3.10.2.3 beschrieben mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde hybridisiert und durch Chemolumineszenz wie unter 3.10.4 beschrieben detektiert.

20x SSC:	NaCl	3	M
	Natriumcitrat, pH 7,0	300	mM
	Maleinsäure, pH 7,5	100	mM
Denaturierungspuffer	NaOH	0,5	M
	NaCl	1,5	M

3.2.7 Reinigung und Gelisolation von DNA mit QIAquick Gel Extraction Kits

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen und zur Aufreinigung von DNA (Entfernung von Enzymen und Umpufferung) wurden QIAquick Spin Kits von Qiagen unter Benutzung der mitgelieferten Puffer verwendet. Die isolierten Gelstücke wurden hierzu mit dem dreifachen Volumen QG-Puffer gemischt und über 10 min bei 50 °C geschmolzen. Nach Zusatz von einem Gelvolumen Isopropanol wurde die Lösung auf eine QIAquick-Säule aufgetragen und durch das Säulenmaterial zentrifugiert (14000 rpm). Die säulengebundene DNA wurde einmal durch Zentrifugation mit 500 µl Puffer QG und einmal mit 750 µl Puffer PE gewaschen und abschließend mit 50 µl EB-Puffer eluiert.

Zur Reinigung von DNA-Lösungen von Enzymen und Salzen wurde die DNA-Lösung mit drei Volumen QG-Puffer und einem Volumen Isopropanol gemischt und in analoger Weise über QIAquick-Säulen gereinigt.

EB-Puffer: Tris/HCl, pH 8,0 10 mM

3.2.8 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden spektrophotometrisch mit einem Spektralphotometer bestimmt und computerunterstützt ausgewertet. Ein OD_{260} Wert von 1 entspricht dabei einer Konzentration von ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA bzw. 20 µg/ml Oligonukleotiden (Sambrook et al., 1989).
Aus dem Quotienten von OD_{260}/OD_{280} konnte weiter der Reinheitsgrad der DNA bestimmt werden. Ein maximaler Reinheitsgrad für DNA wird bei einem Quotienten von 1,8 - 2,0 erreicht. Niedrigere Werte sind Anhaltspunkte für Verunreinigungen durch Proteine.

3.3 Enzymatische Reaktionen an Plasmiden und DNA-Fragmenten

3.3.1 Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde für Vektorklonierungen und zur anschließenden Überprüfung auf erfolgreiche Insert- und Deletionsklonierung eingesetzt. Für eine vollständige Restriktion wurden dabei zwischen 0,2 und 10 µg DNA mit 1 bis 30 U Enzym eingesetzt. Die Spaltung erfolgte über 1,5 - 12 h bei vorgegebener Temperatur (meist 37 °C) in 15 bis 100 µl Gesamtvolumen. Standardbedingungen, wie erforderlicher 1x Restriktionspuffer, Temperatur und Restriktionsaktivität, wurden den Herstellerangaben entnommen. Die Kontrolle der Spaltung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

3.3.2 Auffüllen 5'-überhängender Enden mit Klenow Fragment der DNA Polymerase I

Zum Auffüllen 5'-überhängender DNA-Enden wurde die 5'-3'-DNA-Polymerase Aktivität des Klenow Fragments der DNA Polymerase I genutzt. Hierzu wurden der Reaktionslösung nach einer Restriktionsspaltung 0,5 µl dNTP-Mix (2 mM), 0,5 µl Klenow Fragment der DNA-Polymerase I (10 U/µl) und H_2O mit dem entsprechenden Restriktionspuffer bis zu einem Volumen von 20 µl zugesetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei 37 °C inkubiert und die Poly-

merase anschließend bei 70 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Die Abtrennung der Enzyme und Konzentrierung der DNA erfolgte durch QIAquick Spin Kits (s. 2.2.3).

3.3.3 Deletion 3'-überhängender Enden mit T4-DNA-Polymerase

Zur Deletion von 3'-überhängenden DNA-Enden wurde die 3'-5'-Exonuklease Aktivität der T4-DNA-Polymerase genutzt. Hierzu wurden der Reaktionslösung nach einer Restriktionsspaltung 1 µl dNTP-Mix (2 mM), 0,5 µl T4-DNA-Polymerase (5 U/µl) und H_2O mit dem entsprechenden Restriktionspuffer bis zu einem Volumen von 20 µl zugesetzt. Der Ansatz wurde 20 min bei 11 °C inkubiert und die Polymerase anschließend bei 75 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Die Abtrennung der Enzyme und Konzentrierung der DNA erfolgte durch QIAquick Spin Kits (s. 2.2.3).

3.3.4 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Um eine intramolekulare Religation der linearisierten Vektoren bei Klonierungen zu verhindern, wurde der 5'-Phosphorsäureester mit alkalischer Phosphatase abgespalten. Hierzu wurde nach einer Restriktionsspaltung der Reaktionslösung 1 µl CIP (1 U/µl, Calf Intestinal Phosphatase) und H_2O mit dem entsprechenden Restriktionspuffer bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl zugesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Die alkalische Phosphatase wurde anschließend durch Zusatz von EDTA (Endkonzentration 5 mM) und Erhitzen auf 85 °C für 15 min inaktiviert.

3.3.5 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Die Phosphorylierung von Oligonukleotiden wurde von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) im Anschluss an die Synthese durchgeführt.

3.3.6 Herstellung von Linkern durch Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden

Für die Insertion von kurzen DNA-Sequenzen (Linker) in Plasmide mussten die synthetisch hergestellten komplementären Oligonukleotide hybridisiert werden.

Hierfür wurden je 50 µl der beiden Oligonukleotide (1 µg/µl) mit 20 µl Puffer X und 80 µl sterilem autoklaviertem Wasser vermischt und für 15 min bei 65 °C in einem Wärmeblock oder Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Wärmeblock bzw. das Wasserbad aus-

geschaltet, so dass sich die Lösung sehr langsam über Nacht auf Raumtemperatur abkühlen konnte.

Puffer X:	Tris/HCl, pH 7,4	100	mM
	NaCl	1500	mM

3.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten und Vektoren wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Dabei wurde im Allgemeinen zwischen 100 - 200 ng dephosphorylierter Vektor mit 3 bis 5 molarem Überschuss an Insertfragment ligiert. Die Ligation wurde gewöhnlich mit 10 U Ligase (5 U/µl) in einem Gesamtvolumen von 20 µl im Ligase-Puffer durchgeführt. Die Reaktion erfolgte entweder über 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14 °C. Anschließend wurde die Hälfte des Ligationsansatzes direkt in kompetente Bakterien transformiert. Als Negativkontrolle diente CIP-behandeltes Plasmidbackbone ohne Insert.

3.3.8 Ligation von Linker in Plasmide

Zur Klonierung von Oligonukleotiden in Plasmide wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Dabei wurde 200 ng dephosphorylierter Vektor mit 1 µg phosphoryliertem doppelsträngigem Linker ligiert. Die Ligation wurde mit 5 % PEG 4000 Lösung und 10 U Ligase (5 U/µl) in einem Gesamtvolumen von 20 µl im Ligase-Puffer durchgeführt. Die Reaktion erfolgte über 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Hälfte des Ligationsansatzes direkt in kompetente Bakterien transformiert. Als Negativkontrolle diente CIP-behandeltes Plasmidbackbone ohne Insert.

3.4 DNA-Sequenzierung

Sequenzanalysen der hergestellten viralen Vektorplasmide (s. Abschnitt 4.2.2) wurden von der Arbeitsgruppe Blum im Genzentrum München nach dem Kettenabbruch- und Fluoreszenzdetektionsverfahren durchgeführt (Rosenblum et al., 1997).

3.5 Quantitative Analyse von RNA und DNA

3.5.1 Reverse Transkription von RNA

Durch die Reverse Transkription wird von einer RNA die komplementäre Einzelstrang-DNA hergestellt, die dann für eine quantitative PCR eingesetzt werden kann.

Für diese Reaktion wurde das 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) der Firma Roche verwendet. Dabei wurde die RNA, der RNase Inhibitor und die AMV-Reverse Transkriptase auf Eis, alle anderen Lösungen bei Raumtemperatur aufgetaut. Zu 1 µg RNA wurde 2 µl 10-fach Reaktionspuffer, 4 µl $MgCl_2$ (25 mM), 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 2 µl reverse Primer „RT-PCR GFP reverse“ (10 µM), 1 µl RNase Inhibitor (500 U), 0,8 µl AMV Reverse Transkriptase (25 U/ml) und H_2O bis zu einem Volumen von 20 µl zugesetzt. Nach Vortexen wurde 10 min bei 25 °C zum Hybridisieren, anschließend 60 min bei 42 °C für die reverse Transkriptionsreaktion inkubiert. Die Polymerase wurde danach bei 99 °C für 5 min hitzeinaktiviert und der Ansatz bei 4 °C für 5 min abgekühlt. Der Ansatz wurde entweder direkt weiter für eine quantitative PCR verwendet oder bei –20 °C eingefroren.

3.5.2 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei dieser PCR wird nach der Verdopplung der DNA-Stränge die Fluoreszenz von SYBR Green I gemessen, deren Fluoreszenz sich äußerst stark erhöht bei einer Interkalation in Doppelstrang-DNA. Durch einen Vergleich der Fluoreszenz einer Probe mit der Fluoreszenz einer Referenzprobe im Laufe der PCR kann die Konzentration der Probe berechnet werden. Auch die Spezifität der PCR kann anhand eines Schmelzkurvendiagramms bestimmt werden. Dabei werden am Ende der PCR-Reaktionen die Proben abgekühlt und langsam unter kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz bis auf 95 °C erhitzt. Bei der spezifischen Schmelztemperatur der Probe wird die DNA denaturiert und die Fluoreszenz sinkt dadurch sehr stark ab, da die Interkalation von SYBR Green I nun nicht mehr gegeben ist. Falls dieser Abfall der Fluoreszenz bei einer anderen Temperatur als derjenigen der Positivkontrolle geschieht, ist von einer unspezifischen Amplifikation der Probe auszugehen. Nur bei einer Übereinstimmung der Temperatur des Fluoreszenzabfalls der Probe mit der Positivkontrolle ist von einer spezifischen Amplifikation der Probe und korrekter quantitativer Konzentrationsbestimmung des amplifizierten Bereiches auszugehen.

Für die quantitative PCR wurde das LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit der Firma Roche verwendet. Zu 50 bis 100 ng der DNA bzw. 2 bis 4 µl des reversen Trans-

kriptionsansatzes von 3.5.1 wurden 1,6 µl $MgCl_2$ (25 mM), 0,1 µl PCR forward Primer „PCR CMV forward“ bzw. „PCR GFP forward“ oder „PCR murines Endostatin forward“ (100 pmol/µl), 0,1 µl PCR reverse Primer „PCR CMV reverse“ bzw. „PCR GFP reverse“ oder „PCR murines Endostatin reverse“ (100 pmol/µl), 2 µl 10-fach LC – FastStart DNA Master SYBR Green I Lösung und H_2O bis zu einem Volumen von 20 µl zugesetzt und in LightCycler Glaskapillaren überführt, die mit einem Stopfen verschlossen wurden. Nach Zentrifugation (2000 rpm, 30 sec) wurden die Glaskappilaren in den LightCycler eingesetzt und die quantitative PCR mit folgenden Bedingungen durchgeführt:

Amplifiziertes Gen	Parameter	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
CMV	Denaturierung	95	600 sec	1
	Denaturierung	95	15 sec	50
	Hybridisierung	64	5 sec	
	Polymerase-Reaktion	72	15 sec	
	Denaturierung	95	0 sec	1
	Hybridisierung	64	10 sec	1
	Schmelzkurve	64 - 95	0,1 °C/min	1
	Abkühlen	45	10 sec	1
GFP	Denaturierung	95	600 sec	1
	Denaturierung	95	15 sec	50
	Hybridisierung	67	3 sec	
	Polymerase-Reaktion	72	20 sec	
	Denaturierung	95	0 sec	1
	Hybridisierung	68	10 sec	1
	Schmelzkurve	68 - 95	0,1 °C/min	1
	Abkühlen	45	10 sec	1
Murines Endostatin	Denaturierung	95	600 sec	1
	Denaturierung	95	15 sec	50
	Hybridisierung	69	5 sec	
	Polymerase-Reaktion	72	17 sec	
	Denaturierung	95	0 sec	1
	Hybridisierung	58	10 sec	1
	Schmelzkurve	58 - 95	0,1 °C/min	1
	Abkühlen	45	10 sec	1

3.6 Transformation von Bakterien

3.6.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Transformation rekombinanter DNA in die *E. coli* Bakterienstämme TOP10F' und XL1-Blue wurden diese nach einer modifizierten Methode von Cohen et al., 1972, kompetent gemacht. Hierzu wurden die Bakterien zunächst aus Dauerkulturen auf $MgCl_2$-LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Mit einer gepickten Einzelkolonie wurden 5 ml TYM-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die Übernachtkultur wurde am nächsten Morgen in 300 ml TYM-Medium überimpft und unter den gleichen Bedingungen bis zu einer OD_{600} von 0,7 bis 0,8 vermehrt. Der 300 ml Ansatz wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und der Zellniederschlag sofort auf Eis gestellt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden im Kühlraum (4 °C) durchgeführt. Die Bakterien (alle Mengenangaben beziehen sich auf einen 50 ml Ansatz) wurden vorsichtig in je 15 ml TfbI-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben) wurde der Niederschlag in 2 ml TfbII-Puffer aufgenommen, zügig zu 50 µl Aliquots abgefüllt und die Eppendorf-Gefäße sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C. Die Transformationseffizienz betrug zwischen $0{,}7 \cdot 10^8$ und $2{,}0 \cdot 10^8$ Kolonien pro µg DNA-Plasmid.

$MgCl_2$-LB-Platten:	Bacto Trypton	1	%
	Bacto Yeast Extract	0,5	%
	NaCl	0,5	%
	Bacto Agar	1,5	%
	$MgCl_2$	10	mM
TYM-Medium:	Bacto Trypton	2	%
	Bacto Yeast Extract	0,5	%
	NaCl	0,1	M
	$MgCl_2$	10	mM
TfbI-Puffer:	KOAc	30	mM
	$MnCl_2$ (sterilfiltriert)	50	mM
	$CaCl_2$	100	mM
	Glycerin	15	%
TfbII-Puffer:	NaMOPS (pH 7,0)	10	mM
	$CaCl_2$	75	mM
	KCl	10	mM
	Glycerin	15	%

3.6.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Elektroporation rekombinanter DNA in den *E. coli* Bakterienstamm DH10B wurde dieser elektrokompetent gemacht. Hierzu wurden die Bakterien zunächst aus Dauerkulturen auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Mit einer gepickten Einzelkolonie wurden 50 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die Übernachtkultur wurde am nächsten Morgen in 2 l LB-Medium überimpft und unter den gleichen Bedingungen bis zu einer OD_{600} von 0,6 vermehrt. Der Ansatz wurde in GS3-Röhrchen aufgeteilt und abzentrifugiert (7000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und der Zellniederschlag sofort auf Eis gestellt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden im Kühlraum (4 °C) durchgeführt. Die Bakterien wurden mit 800 ml eiskaltem autoklaviertem Wasser gewaschen und abzentrifugiert (7000 rpm, 10 min, 4 °C). Die Pellets wurden zweimal in 800 ml einer eiskalten autoklavierten 10 %igen Glycerin in Wasser-Lösung gewaschen und abzentrifugiert (7000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde dann in 80 ml einer eiskalten sterilen 10% igen Glycerin in Wasser-Lösung resuspendiert, zügig zu 50 µl Aliquots abgefüllt und die Eppendorf-Gefäße sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C. Die Transformationseffizienz betrug zwischen $0{,}5 \cdot 10^9$ und $2{,}0 \cdot 10^9$ Kolonien pro µg DNA-Plasmid.

LB-Medium:	Bacto Trypton	1	%
	Hefe-Extrakt	0,5	%
	NaCl	0,5	%
	NaOH	1	mM
	Bacto Agar (bei Platten)	1,5	%

3.6.3 Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente Bakterien

Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl kompetenter *E. coli* TOP10F' oder XL1-Blue Zellen auf Eis aufgetaut. In einem 1,5 ml Gefäß wurde die zu transformierende DNA vorgelegt, vorsichtig mit 50 µl kompetenter Zellen vermischt und sofort für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie für 45 bis 60 sec bei 37 °C im Wasserbad inkubiert (Hitzeschock), sofort wieder für 2 min auf Eis abgekühlt, bei Raumtemperatur mit 900 µl LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. 50 bis 500 µl der Kultur wurde danach auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht invertiert bebrütet.

3.6.4 Elektroporation von Plasmiden in elektrokompetente Bakterien

Die zu transformierende DNA wurde für 2 h gegen 250 ml Wasser dialysiert. Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl elektrokompetenter *E. coli* DH10B Zellen auf Eis aufgetaut. In einem 1,5 ml Gefäß wurde die zu dialysierte DNA vorgelegt, vorsichtig mit 50 µl kompetenter Zellen vermischt und sofort auf Eis aufbewahrt. Die Mischung wurde in eine Elektroporations-Küvette überführt und die Elektroporation durchgeführt (25 µF, 400 Ω, 2500 V). Anschließend wurde die Suspension in ein 1,5 ml Gefäß überführt und bei Raumtemperatur mit 900 µl LB-Medium versetzt. Nach Schütteln für 60 min bei 37 °C und 200 rpm wurden 50 bis 500 µl der Kultur auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht invertiert bebrütet.

3.7 Kultivierung und Aufarbeitung von Zellen

3.7.1 Kultivierung von Zelllinien

Als Nährlösung für die verwendeten Zelllinien dienten die unten aufgeführten Medien der Firma Invitrogen, angereichert mit fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Die Zellen wurden in Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Alle nachfolgend aufgeführten Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow in der Zellkultur durchgeführt.

293	DMEM	10 % FKS	1% Penicillin/Streptomycin
HeLa	DMEM	10 % FKS	1% Penicillin/Streptomycin

3.7.1.1 Adhärente Zellen

Adhärente Zellen wurden als "Monolayer"-Kulturen im entsprechenden Medium kultiviert. Sie wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Zellen wurden in Plastik-Petrischalen bzw. Plastik-Gewebekultur-Flaschen gehalten, nach Waschen mit PBS-Puffer und 1 – 5 Minuten Inkubation bei 37 °C mit einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und im gewünschten Verhältnis bis 1:20 gesplittet. Das Medium wurde spätestens nach 3 Tagen gewechselt.

3.7.1.2 Stammkulturen

Ca. 10^7 Zellen wurden in 5 ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen, zu 1 ml in Kryo-Gefäße aliquotiert, langsam über Nacht auf –80 °C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen durch Überführung von –80 °C in 37 °C warmes Wasser schnell aufgetaut, anschließend zügig in das gewünschte Volumen des entsprechenden Mediums überführt und in Zellkulturflaschen kultiviert. Nach einem Tag wurde das Medium zur Entfernung von DMSO-Resten gewechselt.

Einfriermedium:	FKS	50 %
	DMEM	40%
	DMSO	10 %

3.8 Herstellung Adeno-assoziierter Virus (rAAV)-Vektoren mit Adenovirus-Helferviren und CsCl-Aufreinigung

Die Verpackung von AAV-Viren wurde in HeLa Zellen durch Transfektion von DNA in $Ca_3(PO_4)_2$-Medium und Infektion mit Adenovirus durchgeführt. Konzentrierung und Aufreinigung des Vektors wurde über CsCl-Dichtegradienten mit anschließender Dialyse vorgenommen. Alle nachfolgend aufgeführten Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow in der Zellkultur ausgeführt. Gearbeitet wurde ausschließlich mit sterilen Lösungen.

3.8.1 Zellkultur

Pro Virusverpackung wurden jeweils 15 Zellkultur-Petrischalen (Durchmesser 15 cm) eingesetzt, die am Tag der Transfektion zu 10 % konfluent mit HeLa Zellen bewachsen waren.

3.8.2 Transfektion

Die Transfektion von HeLa Zellen erfolgte in modifizierter Form nach der Methode von Chen und Okayama, 1987, und Chen und Okayama, 1988, in $Ca_3(PO_4)_2$-Medium auf 15 cm Zellkultur-Petrischalen mit 10 % konfluenten HeLa Zellen.

Zur Vorbereitung des Transfektionsansatzes wurden pro transfizierter Platte 17,5 µg Helferplasmid pRC und 17,5 µg Vektorplasmid mit 875 µl $CaCl_2$-Lösung (260 mM) und 875 µl Transfektionspuffer BBS (2x) verdünnt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während-

dessen wurde das Medium der HeLa Zellen durch 17,5 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Die Transfektionslösung wurde anschließend unter leichtem Schwenken der Platten gleichmäßig auf die Kulturen pipettiert. Die Zellen wurden 20 h bei 37 °C und 3 % CO_2 gehalten und nach Zugabe von 7,5 ml frischem Medium noch einmal 25 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Transfektionspuffer BBS (2x), pH 6,95:	NaCl	260 mM
	BES	50 mM
	NaH_2PO_4	0,75 mM
	Na_2HPO_4	0,75 mM

3.8.3 Infektion von HeLa Zellen mit Adenovirus

HeLa Zellen, die wie unter 3.8.2 beschrieben transfiziert worden waren, wurden zur produktiven Vermehrung von AAV mit Adenovirus Typ 5 infiziert. Das Medium der Transfektion wurde hierzu abgenommen, und durch 20 ml frisches DMEM-Medium (10 % FKS) mit 10^8 Adenoviren (Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle (multiplicity of infection; moi) von 5-10) pro Platte ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für 70 h im Brutschrank weiter kultiviert (37 °C, 5 % CO_2). Die infizierten Zellen zeigten danach einen zytopathischen Effekt, waren aber noch auf dem Schalenboden adhäriert.

3.8.4 Aufschluss von HeLa Zellen (Zelllyse)

Zum Ernten der AAV-Vektoren wurden die Zellen mit einem Zell-Heber von den Plattenböden geschabt und mit Medium in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1100 rpm, 10 min, RT) und der Überstand abgegossen. Die Pellets von 15 Platten wurden hierauf in insgesamt 7 ml TD-Puffer (unter Berücksichtigung des Eigenvolumens der Zellen) resuspendiert. Pro 7 ml Volumen wurden der Zellsuspension 500 µl 0,25 %iges Trypsin und 500 µl sterilfiltriertes 10 %iges Natriumdesoxycholat (gelöst in TD-Puffer) zugesetzt. Der Ansatz wurde durch mehrmaliges Invertieren des Gefäßes gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde die Zellsuspension im Homogenizer mit ca. 30 Schlägen homogenisiert.

TD-Puffer:	NaCl	140 mM
	KCl	5 mM
	K_2HPO_4	0,7 mM
	Tris/HCl, pH 7,4	25 mM

3.8.5 Konzentrierung und Aufreinigung von AAV

Konzentrierung und Reinigung von rAAV-Vektoren erfolgte über Auftrennung der einzelnen Fraktionen in zwei aufeinanderfolgenden CsCl-Dichtegradienten.

Dem Homogenisat der Zelllyse wurden hierzu 0,55 g CsCl pro ml Suspension zugesetzt. Nach Lösen des CsCl wurde der Brechungsindex mit einem Refraktometer auf 1,3720 eingestellt. Das Zelllysat von 15 Platten wurde auf 2 Ultrazentrifugenröhrchen (13 x 51 mm) verteilt, die mit TD-Referenzlösung auf ein Volumen von je 5 ml aufgefüllt wurden. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 40000 rpm und 18 °C über 20 h. Nach der ersten Zentrifugation hatten sich Lipide an der Oberfläche der Lösung angereichert und im oberen Drittel war die Adenovirusbande im Gradientenfeld mit Brechungsindex 1,3700 zu erkennen. Mit einer Spritzenkanüle (0,9 x 40 mm) wurde 1 cm oberhalb des Röhrchenbodens mit der Kanülenöffnung nach unten eingestochen, die Kanülenöffnung hierauf nach oben gedreht, die Lösung bis unmittelbar unter die Adenovirusbande tropfenweise oder durch Abziehen mit einer Spritze abgenommen und gemeinsam mit der Fraktion des zweiten Zentrifugen-Gefäßes in einem neuen Zentrifugenröhrchen vereinigt. Wiederum wurde das Zentrifugengefäß mit TD-Referenzlösung auf 5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und unter den gleichen Bedingungen (40000 rpm, 20 h, 18 °C) zentrifugiert. Zur Fraktionierung des Gradienten wurde abermals wie oben mit einer Kanüle eingestochen und der Abfluss in Eppendorf-Röhrchen zu je 8 Tropfen aufgefangen. Von allen Fraktionen wurde mit 5 µl Aliquots der Brechungsindex bestimmt. Die Hauptfraktion von AAV-Vektoren konnte bei einem Brechungsindex von 1,3720 lokalisiert werden. Gepoolt wurden grundsätzlich Fraktionen mit theoretisch hohen Virustitern mit einem Brechungsindex zwischen 1,3705 und 1,3745. Der gewonnene Virusstock konnte bis zur weiteren Verarbeitung über einige Tage bei 4 °C gelagert werden.

TD-Referenzlösung:	TD-Puffer	
	CsCl	0,55 g/ml
		Brechungsindex 1,3720

3.8.6 Dialyse

Zur Entfernung des CsCl aus dem gepoolten Vektorstock wurde dieser fünfmal gegen je 100 ml PBS-Lösung mit 400 mM NaCl bei 4 °C dialysiert.

3.8.7 Lagerung von AAV

AAV-Vektorstöcke wurden bei -80 °C gelagert und vor ihrer Verwendung auf Eis aufgetaut.

3.8.8 Hitzeinaktivierung von AAV-Stocklösungen

Zur Inaktivierung von Adenovirusresten im Vektorstock wurde die Vektorlösung nach dem Auftauen mindestens zehnfach mit Zellkulturmedium verdünnt, 30 min bei 56 °C oder 10 min bei 60 °C inkubiert und anschließend bis zur Verwendung wieder auf Eis gelagert.

3.9 Adenovirusfreie Verpackung von AAV und Iodixanol-Aufreinigung

Alternativ zum oben beschriebenen Verfahren wurden Verpackungen in 293-Zellen durchgeführt, die anstelle der Koinfektion mit Adenovirus mit einem Plasmid kotransfiziert wurden, das für die verpackungsrelevanten Adenovirus-Gene kodierte. Anstelle der CsCl-Reinigung wurde das AAV über fraktionierte Ammoniumsulfatfällungen und einen Iodixanol-Dichtegradienten aufgereinigt. Die Verfahren sind bei Xiao et al., 1998, und Zolotukhin et al., 1999, beschrieben.

Alle nachfolgend aufgeführten Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow in der Zellkultur ausgeführt. Gearbeitet wurde ausschließlich mit sterilen Lösungen.

3.9.1 Zellkultur

Pro Virusverpackung wurden jeweils 15 Zellkultur-Petrischalen (Durchmesser 15 cm) eingesetzt. 24 h vor der Transfektion wurden pro Zellkultur-Petrischale $7{,}5 \cdot 10^6$ 293-Zellen ausgesät.

3.9.2 Transfektion

Die Transfektion von 293-Zellen erfolgte in $Ca_3(PO_4)_2$-Medium auf 15 cm Zellkultur-Petrischalen mit ca. 70 % konfluenten 293-Zellen.

2 h vor Transfektion wurde das Medium durch frisches ersetzt (25 ml). Zur Vorbereitung des Transfektionsansatzes wurden pro transfizierte Platte 7,5 µg Helferplasmid pRC (Girod et al., 1999), 7,5 µg Vektorplasmid und 22,5 µg Adeno-Helferplasmid pXX6-80 (Xiao et al., 1998) mit 1000 µl $CaCl_2$-Lösung und 1000 µl Transfektionspuffer HBS verdünnt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionslösung wurde anschließend unter leichtem Schwenken der Platten gleichmäßig auf die Kulturen pipettiert. Die Zellen wurden 24 h (bei

Versuch 4.1.4 auch nach 72 h) bei 37 °C und 5 % CO_2 gehalten, danach wurde das Medium (DMEM mit 2% FKS) gewechselt und die Zellen für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 gehalten.

$CaCl_2$-Lösung	$CaCl_2$	250 mM
Transfektionspuffer HBS, pH 7,12:	HEPES	50 mM
	NaCl	280 mM
	$Na_xH_yPO_4$ (pH 7,2)	0,75 mM
	NaOH	ad pH 7,12

3.9.3 Ernte der Vektor-produzierenden Zellen

Zum Ernten der AAV-Vektoren wurden die Zellen mit einem Zell-Heber von den Plattenböden geschabt und mit FKS-freiem Medium (bei Versuch 4.1.4 auch mit 10% FKS in Medium) in GSA-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3000 G, 10 min, 4 °C).

3.9.4 Ernte der AAV

3.9.4.1 Pelletieren der Vektoren im Überstand

Der Überstand von 3.9.3 wurde mit Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 2,38 M versetzt und bei 7000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit den Überständen aus 3.9.4.2 resuspendiert.

3.9.4.2 Aufschluss der Zellen durch Ultraschall

Die Pellets von 15 Platten aus 3.9.3 wurden mit 20 ml DMEM resuspendiert und in ein SS34-Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellen wurden mit 40 Stößen (50 % Nutzleistung, Stärke 2) lysiert, die Zelldebris durch Zentrifugation (3000 G, 5 min, 4°C) pelletiert. Der Zelldebris wurde nochmals in 20 ml DMEM resuspendiert und die Ultraschallbehandlung und Zentrifugation wiederholt. Die Überstände aus beiden Zentrifugationsschritten wurden vereinigt.

3.9.4.3 Aufschluss der Zellen durch Einfrieren - Auftauen

Alternativ zu 3.9.4.2 wurden die Pellets von 15 Platten aus 3.9.3 wurden mit 7,5 ml Lysispuffer aufgenommen, in ein SS34-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Suspension im flüssigen Stickstoff eingefroren und danach bis zum Auftauen in einem 37 °C-Wasserbad inkubiert, was insgesamt dreimal durchgeführt wurde. Danach wurde die Suspension mit Benzonase mit einer Endkonzentration von 50 U/ml zur Elimination freier DNA versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Zelldebris wurde anschließend durch Zentrifugation (20 min, 3700 G, 4 °C) pelletiert und der vektorhaltige Überstand weiter gereinigt.

Lysispuffer:	NaCl	150 mM
	Tris/HCl, pH 8,5	50 mM

3.9.5 Aufreinigung von AAV durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Durch die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung mit 35 %igen und 55 %igen Ammoniumsulfatlösungen werden sämtliche Verunreinigungen abgetrennt, die bei <35 % bzw. >55 % Ammoniumsulfat ausfällen.

Die Überstände aus 3.9.4.2 oder 3.9.4.3 bzw. die vereinten virushaltigen Fraktionen aus 3.9.4.1 und 3.9.4.2 wurden in einem SS34 Zentrfugationsröhrchen bis zur Endkonzentration von 35 % mit einer gesättigten 4 °C-kalten Ammoniumsulfatlösung versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 8000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand bis zu einer Endkonzentration von 55 % mit der gesättigten 4 °C-kalten Ammoniumsulfatlösung versetzt. Nach nochmaliger Inkubation für 20 min auf Eis und anschließender Zentrifugation (20 min, 12000 rpm, 4 °C) wurde das virushaltige Pellet mit 7,5 ml PBS-MK resuspendiert.

Ammoniumsulfatlösung	$(NH_4)_2SO_4$, pH 7,0	gesättigt

PBS-MK:	10x PBS	10 %
	$MgCl_2$	1 mM
	KCl	2,5 mM
	H_2O	ad 500 ml

3.9.6 Aufreinigung von AAV durch Ultrazentrifugation mit Iodixanol

Durch die Ultrazentrifugation mit Iodixanol wird die Abtrennung von Verunreinigung mit höherer und niedrigerer Dichte im Vergleich zu AAV erreicht.

Hierfür wird die Suspension aus 3.9.5 in ein Ultrazentrifugations-Röhrchen (26 x 77 mm)

überführt und mit 7 ml 15 % Iodixanol-Lösung, 5 ml 25 % Iodixanol-Lösung, 5 ml 40 % Iodixanol-Lösung und 6 ml 60 % Iodixanol-Lösung unterschichtet. Nach Ultrazentrifugation (1,5 h, 70000 rpm, 18 °C) wurde die 40 % Phase abgenommen, indem mit einer Spritzenkanüle (0,9 x 40 mm) mit der Kanülenöffnung nach unten am unteren Ende der 40 % Iodixanol-Phase eingestochen wurde, die Kanülenöffnung hierauf nach oben gedreht und die Lösung bis unmittelbar unter der 25 % Iodixanol-Phase tropfenweise abgenommen wurde.

15 % Iodixanol-Lösung	10x PBS	10	%
	$MgCl_2$	1	mM
	KCl	2,5	mM
	NaCl	1	M
	Optiprep	15	%
	Phenolrot	$7{,}5 \cdot 10^{-4}$	%
	H_2O	ad 500	ml
25 % Iodixanol-Lösung	10x PBS	10	%
	$MgCl_2$	1	mM
	KCl	2,5	mM
	Optiprep	25	%
	Phenolrot	$1{,}0 \cdot 10^{-3}$	%
	H_2O	ad 500	ml
40 % Iodixanol-Lösung	10x PBS	10	%
	$MgCl_2$	1	mM
	KCl	2,5	mM
	Optiprep	40	%
	H_2O	ad 500	ml
60 % Iodixanol-Lösung	$MgCl_2$	1	mM
	KCl	2,5	mM
	Optiprep	60	%
	Phenolrot	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	%
	H_2O	ad 500	ml

3.9.7 Aufreinigung von AAV durch Ultrazentrifugation mit Cäsiumchlorid und anschließender Dialyse

Durch die Ultrazentrifugation mit Cäsiumchlorid wird ähnlich wie unter 3.9.6 eine Abtrennung von Verunreinigung mit höherer und niedrigerer Dichte im Vergleich zu AAV erreicht. Das Cäsiumchlorid wird anschließend durch Dialyse entfernt.

Hierfür wird die Suspension aus 3.9.5 mit 0.55 g CsCl pro ml Suspension versetzt. Nach Lösen des CsCl wurde der Brechungsindex mit einem Refraktometer auf 1.3720 eingestellt und auf 2 Ultrazentrifugenröhrchen (13 x 51 mm, Firma Beckmann) verteilt, die mit TD-

Referenzlösung auf ein Volumen von je 5 ml aufgefüllt wurden. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 40000 rpm und 18 °C über 20 h. Nach der ersten Zentrifugation hatten sich Lipide an der Oberfläche der Lösung angereichert. Mit einer Spritzenkanüle (0.9 x 40 mm) wurde 1 cm oberhalb des Röhrchenbodens mit der Kanülenöffnung nach unten eingestochen, die Kanülenöffnung hierauf nach oben gedreht, die Lösung bis unmittelbar unter die Adenovirusbande tropfenweise oder durch Abziehen mit einer Spritze abgenommen und gemeinsam mit der Fraktion des zweiten Zentrifugen-Gefäßes in einem neuen Zentrifugenröhrchen vereinigt. Wiederum wurde das Zentrifugengefäß mit TD-Referenzlösung auf 5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und unter den gleichen Bedingungen (40000 rpm, 20 h, 18 °C) zentrifugiert. Zur Fraktionierung des Gradienten wurde abermals wie oben mit einer Kanüle eingestochen und der Abfluss in Eppendorf-Röhrchen zu je 8 Tropfen aufgefangen. Von allen Fraktionen wurde mit 5 µl Aliquots der Brechungsindex bestimmt. Die Hauptfraktion von AAV-Vektoren konnte bei einem Brechungsindex von 1.3720 lokalisiert werden. Gepoolt wurden grundsätzlich Fraktionen mit theoretisch hohen Virustitern mit einem Brechungsindex zwischen 1.3705 und 1.3745. Der gewonnene Virusstock konnte bis zur weiteren Verarbeitung über einige Tage bei 4 °C gelagert werden.

TD-Puffer:	NaCl	140	mM
	KCl	5	mM
	K_2HPO_4	0,7	mM
	Tris/HCl, pH 7.4	25	mM
TD-Referenzlösung	TD-Puffer		
	CsCl	0,55	g/ml
	Brechungsindex	1,3720	

Zur Entfernung des CsCl aus dem gepoolten Virusstock wurde dieser fünfmal gegen je 100 ml PBS-Lösung mit 400 mM NaCl dialysiert.

3.9.8 Aufreinigung von AAV durch Kationenaustauscher-Säulenchromatographie

Für eine weitere Reinigung des AAV kann eine Kationenaustauscher-Säulenchromatographie verwendet werden. Hierbei werden die an die Säule gebundenen Vektoren nach einem Waschschritt durch Erhöhung der Salzkonzentration eluiert.

Für die Reinigung von AAV durch eine Kationenaustauscher-Säulenchromatographie wurde das Schlauchsystem und die Kationenaustauscher-Säule mit 30 ml PBS-MK zum Äquilibrieren, mit 20 ml PBS-MK/NaCl zum Ausspülen von eventuellen Verunreinigungen

und danach nochmals mit PBS-MK zum Äquilibrieren gespült. Anschließend wurde eine mit PBS-MK 10-fach verdünnte AAV-Fraktion von 3.9.6 auf die Kationenaustauscher-Säule geladen und mit insgesamt 20 ml PBS-MK gewaschen. Danach wurde AAV durch Zugabe von PBS-MK/NaCl von der Säule eluiert. Es wurden Fraktionen à 500 µl gesammelt und per Dot Blot die Anzahl der genomischen Partikel bestimmt.

PBS-MK:	10x PBS	10	%
	$MgCl_2$	1	mM
	KCl	2,5	mM
	H_2O	ad 500	ml
PBS-MK/NaCl:	10x PBS	10	%
	$MgCl_2$	1	mM
	KCl	2,5	mM
	NaCl	1	M
	H_2O	ad 500	ml

3.9.9 Aufreinigung von AAV durch Heparin-Affinitätschromatographie

Zur Infektion von Zellen benutzt AAV Heparansulfatproteoglykane (HSPG) als Rezeptor (Summerford und Samulski, 1998). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit kann sich deshalb AAV auch an Heparin binden. Diese Eigenschaft kann zur weiteren Reinigung von AAV verwendet werden.

Für die Reinigung von AAV durch eine Heparin-Affinitätschromatographie wurde das Schlauchsystem und die Heparinsäule mit 30 ml PBS-MK zum Äquilibrieren, mit 20 ml PBS-MK/NaCl zum Ausspülen von eventuellen Verunreinigungen und danach nochmals mit PBS-MK zum Äquilibrieren gespült. Anschließend wurde eine mit PBS-MK 10-fach verdünnte AAV-Fraktion von 3.9.4.2, 3.9.6 oder 3.9.8 auf die Heparin-Säule geladen und mit insgesamt 20 ml PBS-MK gewaschen. Danach wurde AAV durch Zugabe von PBS-MK/NaCl von der Säule eluiert. Es wurden Fraktionen à 500 µl gesammelt und die Konzentration der einzelnen Fraktionen durch den Aufschluss von je 2 µl Viruslösung pro Fraktion durch DNeasy Tissue Kit und anschließender quantitativer PCR bestimmt.

PBS-MK:	10x PBS	10	%
	$MgCl_2$	1	mM
	KCl	2,5	mM
	H_2O	ad 500	ml

PBS-MK/NaCl:	10x PBS	10	%
	$MgCl_2$	1	mM
	KCl	2,5	mM
	NaCl	1	M
	H_2O	ad 500	ml

3.9.10 Lagerung von AAV

AAV-Vektorstöcke wurden bei -80 °C gelagert und vor ihrer Verwendung auf Eis aufgetaut.

3.10 Bestimmung des genomischen Virustiters durch Dot-Blot

Der genomische Virustiter wurde über Dot-Blot und anschließender Fluoreszenzdetektion mit Digoxigenin-markierten Sonden bestimmt. Die Markierung von DNA-Sonden wurde mit dem DIG-DNA-Labeling und Detektion-Kit nach dem Standardprotokoll der Firma Roche durchgeführt. Für Hybridisierung und Detektion wurde nach einem leicht abgewandelten Protokoll gearbeitet (High-SDS).

3.10.1 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

Die zu markierende dsDNA (300ng) wurde 10 min bei 95 °C im Wasserbad denaturiert und anschließend im NaCl/Eisbad schockgekühlt. Die Markierung wurde nach der sogenannten "random primer labeling" Methode in 20 µl mit folgendem Ansatz durchgeführt:

linearisierte ssDNA		
10x Hexanukleotid Mixtur	2	µl
10x dNTP Labeling Mixtur	2	µl
Klenow-Polymerase (2 U/µl)	1	µl
H_2O	ad 20	µl

Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA abgestoppt. Abschließend wurde die markierte DNA durch Zusatz von 0,1 Volumen 4 M LiCl und 3 Volumen eiskaltem Ethanol (100 %) und Inkubation bei –80 °C für 30 min präzipitiert. Die DNA wurde hierauf nach gründlichem Durchmischen bei 4 °C für 30 min zentrifugiert (14000 rpm), nach dem Abgießen des Überstandes mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abpipettiert, die DNA für 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Zum Testen der Labeling-Reaktion wurden Aliquots der Sonde in unterschiedlichen

Verdünnungen auf eine Nylonmembran aufgetragen und die Markierungsrate im Vergleich zu einer mitgelieferten Kontrolle durch Chemolumineszenz detektiert.

3.10.2 Dot-Blot (genomischer Vektortiter)

Der genomische Vektortiter wurde über Dot-Blot und anschließende Fluoreszenzdetektion mit Digoxigenin-markierten Sonden bestimmt. Zur Vorbereitung der Verdünnungsreihen wurden in einer 96-Well Rundbodenplatte von der zweiten Reihe an jeweils 100 µl 0,5 M NaOH vorgelegt. Als Referenz wurden $32x10^8$ doppelsträngige Moleküle (2 µl) der zu detektierenden Sonde eingesetzt, als Negativkontrolle diente ein 705 bp-Fragment des Neomycin Gens.

3.10.2.1 Dot-Blot (genomischer Vektortiter) mit NaOH-Aufschluss

Die hier beschrieben Methode wurde in Kapitel 4.1 eingesetzt. Jeweils 2 µl der Vektor-Lösungen wurden mit 198 µl 0,5 M NaOH verdünnt und in die ersten Reihen der 96-Well Platte eingesetzt. Zur Herstellung einer 1:1-Verdünnungsreihe wurden diese mit der Multikanalpipette gemischt und anschließend aus jedem Well 100 µl in die nachfolgende Reihe überführt. Die 100 µl abgenommene Lösung des letzten Wells wurde verworfen. Die Platte wurde locker mit Parafilm überzogen und zur Lyse der Vektoren 60 min bei 37 °C inkubiert.

Zum Blotten wurde die positiv geladene Nylonmembran kurz in H_2O angefeuchtet und 5 min in 0,5 M NaOH inkubiert. Die Proben der 96-Well Platte wurden nach Verdünnen auf 200 µl Gesamtvolumen mit 0,5 M NaOH durch Wasserstrahlvakuum auf die Membran geblottet. Zum Crosslinking wurde die Membran anschließend 2 h bei 80 °C inkubiert und bis zur Hybridisierung nach 3.10.2 zwischen Whatman-Papier bei Raumtemperatur gelagert.

3.10.2.2 Dot-Blot (genomischer Vektortiter) mit Hilfe eines Proteinase K-Verdaus

Die hier beschriebene Methode wurde stets, außer in Kapitel 4.1 und 4.2, verwendet. 5-10 µl der Vektor-Lösungen wurden mit 85,5 µl PBS und 95 µl PK-Puffer versetzt. Nach Inkubation für 10 min bei 70 °C wurden 9,5 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und für 2 h bei 50 °C inkubiert. Danach wurden 10 µl 10 M NaOH zugesetzt. Die behandelten Vektor-Lösungen wurden in die erste Reihe der 96-Well Platte pipettiert. Zur Verdünnung der Lösungen in den einzelnen Wells wurden diese mit der Multikanalpipette gemischt und anschließend aus jedem

Well 100 µl in die nachfolgende Reihe überführt. Die 100 µl abgenommene Lösung des letzten Wells wurde verworfen. Die weiteren Schritte des Blottens wurde wie unter Kapitel 3.10.2.1 beschrieben durchgeführt.

PK-Puffer:	Tris/HCl, pH 8,0	75	mM
	EDTA, pH 8,0	0,25	mM

3.10.2.3 Dot-Blot (genomischer Vektortiter) mit Hilfe der DNeasy-Extraktion

Die hier beschriebene Methode wurde in Kapitel 4.2 verwendet. Zur Eliminierung freier DNA wurden diese Vektorproben zuvor mit DNase-Lösung (Endkonzentration 500 µg/ml) 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und zur Inaktivierung der DNase anschließend mit 8 µl EDTA (0,5 M) und 0,5 M NaOH ad 200 µl versetzt. Die behandelten Vektor-Lösungen wurden in die erste Reihe der 96-Well Platte pipettiert. Zur Verdünnung der Lösungen in den einzelnen Wells wurden diese mit der Multikanalpipette gemischt und anschließend aus jedem Well 100 µl in die nachfolgende Reihe überführt. Die 100 µl abgenommene Lösung des letzten Wells wurde verworfen.

3.10.3 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA Sonden

Die Nylonmembran des Dot-Blots oder des Southern Blots wurde in ein Hybridisierungsrohr gegeben und im Rollinkubator 15 min bei 42 °C in 50 ml SDS-Hybridisierungslösung prähybridisiert. Vor dem Ende der Prähybridisierung wurde die DIG-markierte DNA-Sonde in 15 ml frische SDS-Hybridisierungslösung pipettiert (Endkonzentration 15 ng/ml), die Lösung 10 min bei 95 °C denaturiert und im NaCl/Eisbad schockgekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde gegen die Hybridisierungslösung ausgetauscht und die Membran über Nacht im Rollinkubator bei 42 °C hybridisiert.

Alle weiteren Schritte bis zur Detektion wurden ebenfalls im Rollinkubator bei den angegebenen Temperaturen durchgeführt. Die Membran wurde zweimal je 5 min in 2x SSC-Waschlösung bei Raumtemperatur, zweimal je 15 min in 0,1x SSC-Waschlösung bei 65 °C und einmal 1 min in Waschpuffer bei Raumtemperatur äquilibriert.

SDS-Hybridisierungslösung:	$Na_xH_y(PO_4)$, pH 7,2	125	mM
	NaCl	250	mM
	EDTA	1	mM
	Formamid	45	%
	SDS	7	%

2x SSC-Waschlösung:	20xSSC	10	%
	SDS	0,1	%
0,1x SSC-Waschlösung:	20xSSC	0,5	%
	SDS	0,1	%
20x SSC-Puffer:	NaCl	3	M
	Natriumcitrat, pH 7,0	300	mM
Maleinsäurepuffer:	Maleinsäure, pH 7,5	100	mM
	NaCl	150	mM
Waschpuffer:	Maleinsäurepuffer	99,7	%
	Tween-20	0,3	%

3.10.4 Detektion durch Chemolumineszenz

Zur Chemolumineszenz-Detektion wurde die Membran nach der Hybridisierung 30 min in Blockierungspuffer im Rollinkubator bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wiederum 30 min in 15 ml Blockierungspuffer mit anti-DIG-AP Antikörper (Verhältnis 1:10000). Die Membran wurde hierauf zweimal 15 min bei Raumtemperatur in Waschpuffer gewaschen und 1 min in Detektionspuffer äquilibriert. Währenddessen wurde das Chemolumineszenzsubstrat CSPD® in Detektionspuffer im Verhältnis 1:100 verdünnt (500 µl Gesamtvolumen pro Membran). Die Membran wurde mit der vorbereiteten Lösung überschichtet und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Einschweißen in Folie erfolgte eine Inkubation bei 37 °C im Brutschrank über 20 min. Die Membran wurde hierauf in einer Filmkassette auf einem Röntgenfilm Biomax MR zwischen 0,5 und 60 min exponiert und der Film zuletzt in einem Standardprozess entwickelt.

Maleinsäurepuffer:	Maleinsäure, pH 7,5	100	mM
	NaCl	150	mM
Blockierungspuffer:	Maleinsäurepuffer	90	%
	Blocking-Reagenz	10	%
Waschpuffer:	Maleinsäurepuffer	99,7	%
	Tween-20	0,3	%
Detektionspuffer:	Tris/HCl, pH 9,5	100	mM
	NaCl	100	mM

3.11 Transduktionsnachweis und transduzierender Vektortiter

Zur Ermittlung des transduzierenden Vektortiters wurden die zu transduzierenden Zellen auf Plastikkulturschalen (6- bis 96-Well-Platten) ausgesät und in unterschiedlichen Verdünnungen mit der AAV2-Vektorpräparationen transduziert. Zur Bereitstellung der für die AAV Replikation notwendigen Helferfunktionen wurden die Zellen mit Adenovirus koinfiziert (moi von 1) oder 2 h vor Infektion mit einer ^{137}Cs-Quelle mit einer Dosis von 100 Gy bestrahlt. Infektionen von Viren mit GFP-Markergenen wurden über FACS-Analyse nachgewiesen.

3.11.1 Transduzierender Titer von AAV-GFP Viren

Zellen, transduziert mit AAV-Vektoren, die für GFP als Transgen kodieren, wurden 48 h nach der Transduktion wie unter 3.7.1.1 beschrieben trypsiniert und einmal mit 10% FKS in PBS gewaschen. Sie wurden in 1 ml PBS resuspendiert und die Gesamtzahl an Zellen pro Well bestimmt. Die Prozentzahl der GFP-positiven Zellen wurden per FACS-Analyse bestimmt und mit Hilfe der oben bestimmten Gesamtzahl an Zellen die Anzahl der gesamten infizierten Zellen berechnet. Bei Werten von 2 bis 10 % infizierter Zellen wurde die Anzahl der gesamten infizierten Zellen gleichgesetzt mit der Anzahl der applizierten Vektoren und über die entsprechende Verdünnungsreihe konnte auf die Zahl transduzierender Partikel im Vektorstock zurückgerechnet werden.

3.11.2 Inhibition von AAV durch Antikoagulantien

Zur Untersuchung der Inhibition von AAV durch Antikoagulantien wurden HeLa-Zellen mit einer Dichte von $7 \cdot 10^4$ pro Well in 12-Well Platten ausgesät und nach 24 h mit einer Dosis von 100 Gy durch eine ^{137}Cs-Quelle bestrahlt. Antikoagulanzien wurden mit $0{,}8 \cdot 10^4$ AAV, $8{,}0 \cdot 10^4$ AAV oder einer sequentiellen Verdünnung von $2{,}4 \cdot 10^5$ bis $8{,}0 \cdot 10^8$ AAV vermischt und für 10 min oder 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die bestrahlten Zellen mit den Verdünnungen versetzt. 2 h später wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischen Normal-Medium versetzt. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen wie unter 3.11.1 beschrieben per FACS analysiert.

3.12 Tierversuche

Mäuse vom Stamm Balb/c und C57Bl/6 wurden nach Einschleusen in die vollklimatisierten SPF-Tierhaltungsräumen der GSF-Gesellschaft für Umwelt und Gesundheit (München-Großhadern, Deutschland) zu 3 bis 5 Tieren pro Käfig in Techniplast Typ II-Käfigen, die mit konstanten Tag-Nacht-Rhythmus beleuchtet wurden, gehalten. Trinkwasser und Futter (ssniff Spezialdiät GmbH, Soest, Deutschland) standen den Tieren jederzeit unbegrenzt zur Verfügung. Die Genehmigung der Tierexperimente erfolgte durch die Regierung von Oberbayern (Az. 209.1/211-2531-21/02).

3.12.1 Injektionen in Mäuse

3.12.1.1 Injektion von AAV in Mäuse

6 bis 8 Wochen alte Mäuse wurden mit maximal 50 %iger Viruslösung in PBS und einem Volumen von maximal 300 µl in die Schwanzvene bzw. höchstens dreimal pro Muskel à 50 µl pro Injektion injiziert. Bei der Injektion in die Pfortader wurden die Mäuse mit einer Anästhetikumlösung (100 µl pro 10 g Körpergeweicht) behandelt, die Pfortader freigelegt und ein maximales Volumen von 100 µl der 50 %igen Viruslösung in PBS injiziert. Anschließend wurde der Bauchraum mit 2 Stichen Catgut 4-0 und die Haut mit 3 Stichen Mersilene 3-0 verschlossen.

Anästhetikum	Ketamin 10 %	1	ml
	Xylazin 2%	0,25	ml
	PBS	6	ml

3.12.1.2 Injektion von Clodronat-Liposomen und Liposomen in Mäuse

Clodronat-Liposomen und Liposomen wurden vor der Injektion auf Raumtemperatur gebracht und in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Die Injektion von AAV erfolgte 48 h danach.

3.12.2 Tötung der Mäuse und Entnahme der Organe

Die Mäuse wurden in ein 5 l Glasgefäß überführt und durch Freisetzen eines CO_2-Argon-Gemisches getötet. Die zu untersuchenden Organe wurde sofort nach der Tötung entnommen und direkt für die FACS-Analyse nach 3.12.6 weiterverarbeitet, in flüssigem Stickstoff für die DNA-Entnahme nach 3.2.2, in RNAlater TissueProtect Tubes für die RNA-Extraktion nach

3.2.3, in durch flüssigen Stickstoff gekühltes Isopentan oder in Aluminiumfolie auf Trockeneis für die Anfertigung von Schnitten eingefroren. Organe wurden im Allgemeinen bei -80 °C gelagert, Organe in RNAlater TissueProtect Tubes wurden jedoch über Nacht bei 4 °C gelagert und danach bei –20 °C eingefroren. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass maximal 150 mg Organ, das nicht dicker als 0,5 cm geschnitten worden war, pro Tube eingesetzt wurde und komplett in der Flüssigkeit untergetaucht wurde.

3.12.3 Blutentnahme von Mäusen

Falls die Mäuse bei der Blutentnahme nicht getötet werden sollten, wurde bis zu 200 µl Blut durch Anritzen der Schwanzvene entnommen. Falls die Mäuse bei der Blutentnahme getötet werden sollten, wurde nach Tötung der Brustraum und das Herz aufgeschnitten und bis zu 700 µl Blut dort entnommen.

3.12.4 Gewinnung von Serum und Plasma

Zur Gewinnung von Serum wurden die Blutproben 30 min bei Raumtemperatur, zur Untersuchung der Stabilität auch 1 oder 2 d bei 4 °C stehen gelassen und dann zentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Serum wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Für die Gewinnung von Plasma wurden die Blutproben bei der Abnahme in ein EDTA-Röhrchen gesammelt und innerhalb von 30 min zentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Plasma wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

3.12.5 Anfertigung von Gewebeschnitten

Für die optische Detektion von AAV mit Hilfe von Antikörpern in Leber mussten die Organe zuvor geschnitten werden. Hierzu wurde in einem Cryostat bei einer Blocktemperatur von -18 °C und einer Kammertemperatur von –20 °C unter einem Schnittwinkel von 7° die Schnitte mit einer Dicke von 5 bis 6 µm angefertigt, wobei die Schnitte auf unbeschichtete Objektträger aufgenommen und bei –20 °C gelagert wurden.

3.12.6 Analyse von GFP-positiven Leberzellen durch FACS-Analyse

Für die Analyse von GFP-positiven Leberzellen wurden aus den Lebern zuerst Einzelzellen gewonnen, indem man die Organe zusammen mit PBS/FKS durch ein Zellsieb durchpresste. Nach Zentrifugation bei 280 G für 5 min wurden sie in 2,5 ml Lysispuffer resuspendiert und für 5 min damit bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von mindestens derselben Menge an PBS/FKS wurden die Zellen bei 280 G für 5 min abzentrifugiert und nochmals mit PBS/FKS gewaschen. Sie wurden in PBS/FKS resuspendiert und per FACS-Gerät analysiert.

PBS/FKS:	FKS in PBS	2	%
Lysispuffer	$(NH)_4Cl$	150	mM
	$KHCO_3$	1	mM
	EDTA	0,1	mM
	HCl	ad	pH 7,3

3.13 Detektion von Proteinen in Gewebeschnitten

3.13.1 Detektion AAV und Makrophagen in Leberschnitte

3.13.1.1 Fixierung mit Chloroform

Zur Fixierung mit Chloroform wurden die Gewebeschnitte kurz bei Raumtemperatur aufgetaut und in Chloroform für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Schnitte wurden danach mehrmals für 5 min in Tris-Puffer gewaschen.

Tris-Puffer	Tris/HCl, pH 7,5	50	mM
	NaCl	150	mM

3.13.1.2 Fixierung mit Formalin

Zur Fixierung mit Formalin wurden die Gewebeschnitte kurz bei Raumtemperatur aufgetaut und in Formalinlösung für 30 min bei 4 °C fixiert. Die Schnitte wurden danach für 15 min fließend gewässert und für 10 min mit einer H_2O_2-Lösung inkubiert. Anschließend wurde für 10 min fließend gewässert und zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer äquilibriert.

Formalinlösung	Formalin in Tris-Puffer	4	%
H_2O_2-Lösung	H_2O_2 in H_2O	7,5	%

3.13.1.3 Anti-AAV-Biotin-Färbung mit polyklonalem anti-AAV Antikörper

Die fixierten Gewebeschnitte wurden 10 min mit einem Proteinblocker behandelt und danach mit unterschiedlichen Verdünnungen von anti-AAV Antikörper aus Kaninchen, welcher mit Antikörper-Verdünnungsmedium verdünnt wurde, für 1 h inkubiert. Als Kontrolle diente Kaninchen-Serum. Für eine System-Kontrolle wurde nur das Antikörper-Verdünnungsmedium verwendet. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min mit Tris-Puffer wurde der Brücken-Antikörper gegen Kaninchen zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gewaschen, das DAB-Reagenz für 3 min inkubiert und danach 30 min fließend gewässert. Anschließend wurde eine Hämatoxylin-Färbung durchgeführt (s. 3.13.1.8).

3.13.1.4 Anti-AAV-Biotin-Färbung mit monoklonalem anti-AAV Antikörper

Da es sich bei den Gewebeschnitten um Schnitte aus der Maus handelt und deshalb diese Schnitte endogene murine Antikörper enthalten, müssen diese erst eliminiert oder maskiert werden, um mit einer Detektion eines murinen monoklonalen Antikörpers arbeiten zu können. Es wurde in das ursprüngliche Protokoll deshalb das Maus-auf-Maus (MOM)-Protokoll der Firma Vector mit den mitgelieferten Puffern eingebunden.

Die fixierten Gewebeschnitte wurden 1 h mit MOM Maus Ig Blockierungsreagenz inkubiert, wobei die endogenen Antikörper blockiert werden. Nach zweimaligem Waschen für 5 min mit Tris-Puffer wurden 5 min mit MOM Proteinblocker inkubiert und nach Abwischen der primäre Antikörper muriner anti-AAV, verdünnt in MOM Proteinblocker, für 1 h inkubiert. Als Kontrolle diente Maus IgG1-Antikörper. Für eine Systemkontrolle wurde nur das Antikörper-Verdünnungsmedium verwendet. Es wurde zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gewaschen, anschließend für 10 min mit dem MOM biotinyliertem anti-Maus IgG Reagenz inkubiert und danach wieder zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gewaschen. Das DAB-Reagenz wurde für 3 min inkubiert und anschließend 30 min fließend gewässert. Danach wurde eine Hämatoxylin-Färbung durchgeführt (s. 3.13.1.8).

3.13.1.5 Anti-AAV-Biotin-Färbung mit monoklonalem anti-AAV Antikörper unter Blockierung von endogenem Biotin

Für die Blockierung von endogenem Biotin wurde das Biotin Blockierungs-System von Dako mit den mitgelieferten Lösungen verwendet, welches wie folgt in das unter 3.13.1.4

beschriebene Protokoll eingefügt wurde.

Die fixierten Gewebeschnitte wurden für 10 min mit Avidin-Lösung behandelt. Nach Abwischen wurden die Schnitte für 10 min mit Biotin-Lösung inkubiert und anschließend zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gewaschen. Danach wurde mit der Blockierung mit MOM Maus Ig Blockierungsreagenz wie unter 3.13.1.4 beschrieben fortgefahren.

3.13.1.6 Anti-AAV-APAAP-Färbung mit monoklonalem anti-AAV Antikörper unter Blockierung von endogenem Biotin

Die fixierten Gewebeschnitte von 3.13.1.1 bzw. 3.13.1.2 wurden 10 min mit einem Proteinblocker behandelt und danach mit dem anti-AAV Antikörper aus Maus, welcher mit Antikörper-Verdünnungsmedium verdünnt wurde, für 1 h inkubiert. Als Kontrolle diente Maus IgG1-Antikörper. Für eine Systemkontrolle wurde nur das Antikörper-Verdünnungsmedium verwendet. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min mit Tris-Puffer wurde der Brückenantikörper anti-Maus, 1:50 verdünnt in Antikörper-Verdünnungsmedium, zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gewaschen, für 30 min mit APAAP-Komplex Ratte (APAAP: Calf Intestinal Alkaline Phosphatase and rat monoclonal Anti-Alkaline Phosphatase), 1:50 verdünnt mit Tris-Puffer, inkubiert und nochmals zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gewaschen. Die Applikation des Brücken-Antikörpers und des APAAP-Komplexes wurde nochmals wiederholt, wobei die Inkubationszeiten dabei nur jeweils 10 min betrugen. Nach dem letzten Waschschritt wurde Fast-Red für 10 min appliziert und danach 10 min fließend gewässert. Anschließend wurde eine Hämatoxylin-Färbung durchgeführt (s. 3.13.1.8).

3.13.1.7 Anti-Makrophagen APAAP-Färbung

Die fixierten Gewebeschnitte von 3.13.1.1 bzw. 3.13.1.2 wurden 10 min mit einem Proteinblocker behandelt und danach der anti-Makrophagen Antikörper (anti-Maus F4/80 Antigen) aus der Ratte, welcher mit Antikörper-Verdünnungsmedium verdünnt wurde, für 1 h inkubiert. Als Kontrolle diente Ratten IgG2b-Antikörper. Für eine System-Kontolle wurde nur das Antikörper-Verdünnungsmedium verwendet. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min mit Tris-Puffer wurde der sekundäre Kaninchen Antikörper gegen Ratte, 1:50 verdünnt in Antikörper-Verdünnungsmedium, zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gewaschen, für 30 min mit

APAAP-Komplex Ratte (APAAP: Calf Intestinal Alkaline Phosphatase and rat monoclonal Anti-Alkaline Phosphatase), 1:50 verdünnt mit Tris-Puffer, inkubiert und nochmals zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gewaschen. Die Applikation des Brücken-Antikörpers und des APAAP-Komplexes wurde nochmals wiederholt, wobei die Inkubationszeiten dabei nur jeweils 10 min betrugen. Nach dem letzten Waschschritt wurde Fast-Red für 10 min appliziert und danach 10 min fließend gewässert. Anschließend wurde eine Hämatoxylin-Färbung durchgeführt (s. 3.13.1.8).

3.13.1.8 Hämatoxylin-Färbung und Eindeckeln der Schnitte

Durch die Hämatoxylin-Färbung wurden die Zellkerne leicht angefärbt. Dies erleichtert die Analyse der Gewebeschnitte aufgrund der Erhöhung des Kontrastes.
Die gefärbten Gewebeschnitte wurden 15 sec in die Hämatoxylin-Lösung eingetaucht und dann für 30 min fließend mit normalem Leitungswasser gewässert. Danach wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

3.14 Detektion von murinem Endostatin

3.14.1 Detektion von murinem Endostatin in Blutseren und Zellkulturüberständen

Zur Detektion von murinem Endostatin in Blutseren und Zellkulturüberständen wurde das AccuCyte Murine Endostatin Kit der Firma Cytimmune unter Verwendung der mitgelieferten Lösungen verwendet. Dieser Kit basiert auf einem kompetitiven Sandwich ELISA. Das Endostatin der Proben kompetitiert mit einer definierten Menge an zugegebenen konjugierten Endostatin um die Bindung über einen primären anti-Endostatin Antikörper an die sekundären Antikörper, welche an der 96-Well Platte gebunden sind. In nachfolgenden Reaktionen wird die Menge des Konjugats des zugegebenen konjugierten Endostatins nachgewiesen. Je mehr Endostatin in der Probe war, desto weniger konjugiertes Endostatin konnte sich binden und desto schwächer ist dann die Färbereaktion am Ende des Experiments. Durch Vergleich mit den Werten aus den mitgelieferten Standards kann die Konzentration an Endostatin in den Proben ermittelt werden.
Vor Beginn des Experimentes wurden alle Proben und die Lösungen des Kits auf Raumtemperatur gebracht. Die Proben wurden mit demselben Volumen Verdünnungsreagenz

2 versetzt und je nach gewünschtem Verdünnungsfaktor mit Verdünnungsmedium 1 verdünnt. Diese Lösungen wurden in Duplikate auf die vorbeschichtete 96-Well Platte gegeben (je 100 µl). Es wurden pro Well 25 µl Endostatin-Konjugat und 25 µl anti-murines Endostatin Antikörper-Lösung zugegeben, gemischt und für 3 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Lösungen ausgeschüttet und die Wells fünfmal mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 50 µl einer Streptavidin-alkalische Phosphatase-Lösung zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Lösungen ausgeschüttet und die Wells wiederum fünfmal mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen. Es wurden 200 µl Färbereagenz zugegeben und nach ca. 20 min die OD_{492} mit einem 96-Well Spektralphotometer gemessen. Die Werte der Proben wurden mit Hilfe der Kurve aus den OD_{492}-Werten der mitgelieferten Standards berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung der AAV Reinigung

4.1.1 Allgemein

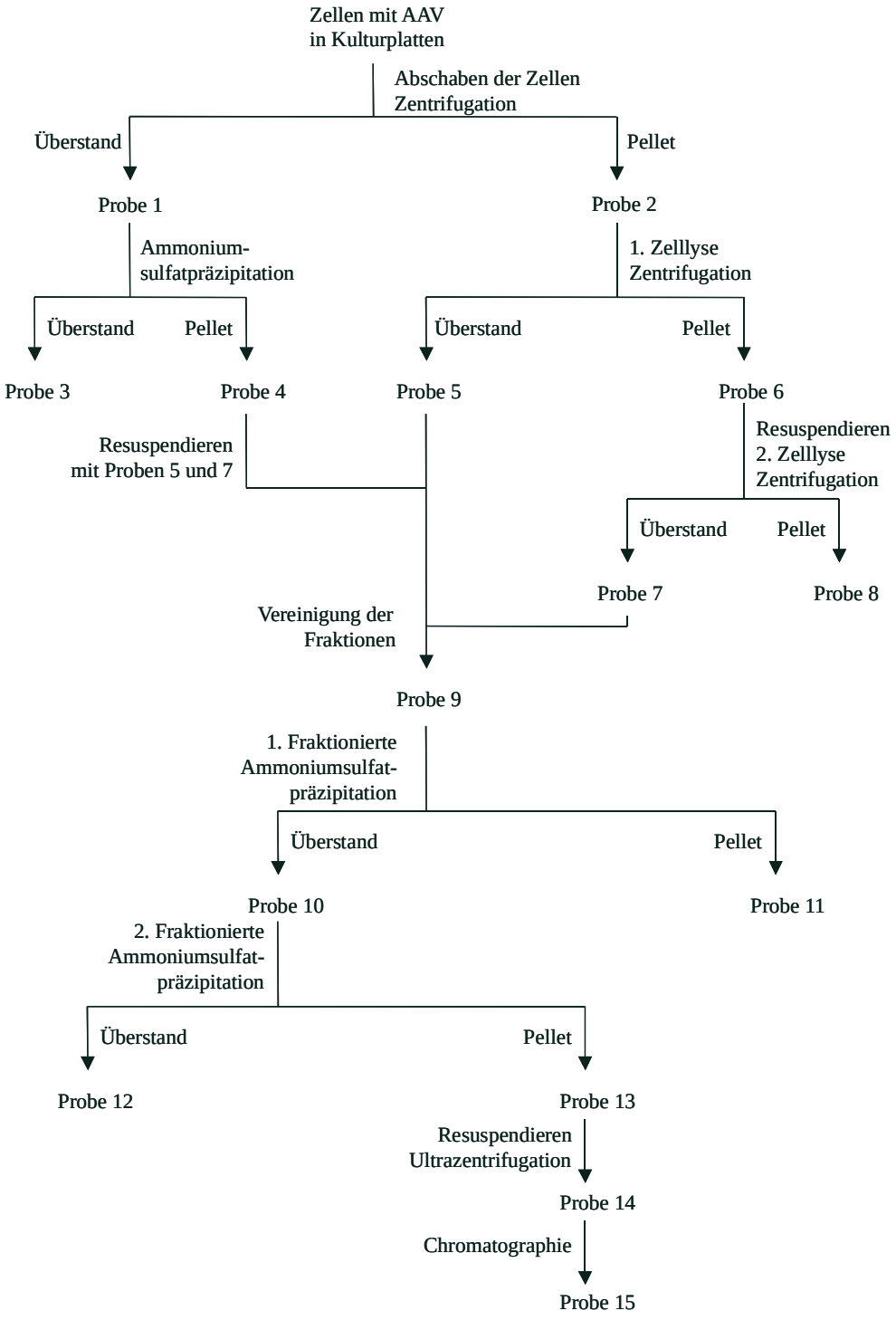


Abbildung 11: Reinigungsschema für AAV. Die in 293-Zellen hergestellten AAV können durch verschiedene nacheinander geschaltete physikalische und chemische Trennmethoden gereinigt werden.

Um AAV mit einer möglichst großen Reinheit und einem möglichst hohen Titer herzustellen, musste das Herstellungs- und Reinigungsprotokoll umgestellt werden. Frau Dr. Büning und Herr Hutter aus unserer Arbeitsgruppe haben hierfür die Herstellung der Viren für eine möglichst hohe Anzahl der geernteten Viren optimiert. Anschließend sollte die Umstellung der Reinigung der AAV-Vektoren von einer zweifachen Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation mit anschließender Dialyse auf ein Reinigungsprotokoll umgestellt werden, um einen höheren Titer und eine höhere Reinheit der Vektorpräparationen zu erreichen

Für die Optimierung der AAV-Reinigung sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Welche der einzelnen Schritte der Virusreinigung sind notwendig bzw. erhält man ähnliche Ausbeuten in ähnlicher Reinheit bei Umgehung einzelner Schritte?
- Unter welchen Bedingungen sind die einzelnen Reinigungsschritte optimal?

4.1.2 Überprüfung der AAV-Konzentration im Mediumüberstand

Es wurde untersucht, inwiefern die Fällung des Überstandes bei der Zellernte die Virusausbeute erhöht. Hierbei wurden AAV-Partikel gefällt, die durch Zelllyse während der normalen Kulturbedingungen freigesetzt worden waren. Nach Herstellung der AAV und Beginn der Reinigung bis einschließlich Probe 9 (s. Abbildung 11, S. 62) wurde mit Hilfe von Dot Blots die Anzahl der genomischen Gesamtpartikel bestimmt.

Nummer der Probe	Genomische Gesamtpartikel
Probe 1	n.d.
Probe 4	n.d.
Probe 5	$1{,}0 \cdot 10^{13}$
Probe 7	$2{,}5 \cdot 10^{12}$
Probe 9	$1{,}0 \cdot 10^{13}$

Tabelle 1: Bestimmung der genomischen Gesamtpartikel: AAV-GFP wurden in 15 Zellkultur-Petrischalen (15 cm Durchmesser) in 293-Zellen hergestellt und die Anzahl der genomischen Gesamtpartikel im Mediumüberstand (Probe 1), nach Fällung des Mediumüberstandes (Probe 4), im Überstand nach erstem Sonifizieren (Probe 5) und nach dem zweiten Sonifizieren (Probe 7) der Zellen, sowie nach Vereinigung der Proben 4, 5 und 7 (Probe 9) bestimmt. n.d. = nicht detektierbar.

Hierbei ist eindeutig zu erkennen, dass die Anzahl der genomischen Gesamtpartikel sowohl im Mediumüberstand (Probe 1) als auch nach Ammoniumsulfatfällung des Mediumüber-

standes (Probe 4) nicht detektierbar war. Ferner war im Vergleich der Anzahl der genomischen Gesamtpartikel nach Sonifizieren ($1{,}3 \cdot 10^{13}$, Probe 5) mit der Anzahl der genomischen Gesamtpartikel nach Vereinigung der Überstände nach beiden Sonifikationen und der Ammoniumsulfatfällung des Mediumüberstandes ($1{,}0 \cdot 10^{13}$, Probe 9) keine Erhöhung feststellbar. Aufgrund der geringen Anzahl von Viren im Mediumüberstand wurde in Zukunft auf die sehr aufwändige Reinigung der AAV aus dem Mediumüberstand verzichtet.

4.1.3 Reinigung der AAV über Kationenaustauscher- und Heparansulfat-affinitäts-Säulen

Um die Reinheit der AAV zu steigern, können die Viren nach der Reinigung durch die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und Ultrazentrifugation noch weiter über eine Säulenchromatographie gereinigt werden. Hierzu kann der Vektor über eine Kationenaustauscher-Säule und/oder eine Heparansulfataffinitäts-Säule gereinigt werden. Die Elution erfolgt durch eine Erhöhung der Salzkonzentration zur Elimination der Ionenbindung bei der Kationenaustauscher-Säule bzw. zur Elimination der Heparansulfat – HSPG-Rezeptor-Bindung bei der Heparansulfataffinitäts-Säule.

Nummer der Probe	Genomische Gesamtpartikel
Probe 14	$1{,}5 \cdot 10^{12}$
Probe 15a, Kationenaustauscher-Säule	$1{,}2 \cdot 10^{12}$
Probe 15b, Heparansulfataffinitäts-Säule	$1{,}0 \cdot 10^{12}$

Tabelle 2: Bestimmung der genomischen Gesamtpartikel: AAV-GFP wurden in 15 Zellkultur-Petrischalen (15 cm Durchmesser) in 293-Zellen hergestellt, die Zellen über zweifache Sonifizierung lysiert und die Viren über eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung bei 25% und 50% gesättigter Ammoniumsulfatlösung, sowie über eine Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation für 48 h und anschließender Zentrifugation der positiven Fraktion bei 10.000 G gereinigt (Probe 14). Die Präparation wurde über eine Kationenaustauscher-Säule (POROS 50) weiter gereinigt, die erhaltenen positiven Fraktion vereinigt (Probe 15a) und über eine Heparansulfataffinitäts-Säule weiter gereinigt, wobei die positiven Fraktionen gepoolt wurden (Probe 15b). Die enthaltenen genomischen Gesamtpartikel nach den Säulenreinigungen wurden mittels Dot Blot bestimmt.

Hierbei ist zu erkennen, dass die Anzahl der genomischen Gesamtpartikel bei der Reinigung über die Kationenaustauscher-Säule lediglich von $1{,}5 \cdot 10^{12}$ auf $1{,}2 \cdot 10^{12}$ abnahm und die Anzahl der genomischen Gesamtpartikel bei der Reinigung über die Heparansulfataffinitäts-

Säule sich von $1{,}2 \cdot 10^{12}$ auf $1{,}0 \cdot 10^{12}$ verringerte.

4.1.4 Einfluss des Zeitpunktes der Virusernte und von fötalem Kälberserum während der Zelllyse auf die Ausbeute bei der AAV-Herstellung

In den vorherigen Versuchen wurden die Zellen 48 h nach Transfektion geerntet. Falls diese Ernte später erfolgen würde, könnten theoretisch mehr Viren hergestellt werden, allerdings könnten vermehrt Viren abgebaut werden bzw. sich im Mediumüberstand befinden, wenn die Zellen lysieren. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des Zeitpunktes der Virusernte untersucht. Weiterhin sollte untersucht werden, ob das im Medium vorhandene fötale Kälberserum (FKS) bei der Zelllyse stören könnte. Möglicherweise könnte sich das Virus an Komponenten des FKS binden und dadurch die Infektionsfähigkeit reduziert werden, oder das Virus könnte durch diese Komponenten stabilisiert werden. Um dies zu untersuchen, wurde die Sonifikation mit Medium, das FKS enthielt bzw. nicht enthielt, durchgeführt.

Zeitpunkt der Zellernte	Konzentration von FKS	Genomische Gesamtpartikel AAV-GFP	Genomische Gesamtpartikel AAV-LacZ
48 h	0 %	$1{,}5 \cdot 10^{11}$	$1{,}5 \cdot 10^{11}$
	10 %	$1{,}5 \cdot 10^{11}$	$7{,}0 \cdot 10^{10}$
72 h	0 %	$1{,}5 \cdot 10^{11}$	$8{,}0 \cdot 10^{10}$
	10%	$1{,}5 \cdot 10^{11}$	$1{,}6 \cdot 10^{11}$

Tabelle 3: Bestimmung der genomischen Gesamtpartikel: AAV-GFP und AAV-LacZ wurden in jeweils 15 Zellkultur-Petrischalen (15 cm Durchmesser) in 293-Zellen hergestellt und die Zellen nach 48 h bzw. 72 h geerntet und nach Zentrifugation in Medium mit 10 % FKS bzw. ohne FKS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen über eine zweifache Sonifizierung lysiert und das Zelldebris bei 3.000 G abzentrifugiert. Die Anzahl an genomischen Gesamtpartikeln im Überstand wurde mittels Dot Blot bestimmt.

Es zeigte sich, dass für die Ausbeute an Virus der Zeitpunkt der Virusernte nicht relevant war, ebenso beeinflusste die Anwesenheit von fötalem Kälberserum nicht die Ausbeute an Viren. Es wurden jeweils ca. $1{,}5 \cdot 10^{11}$ genomische Gesamtpartikel gewonnen.

4.1.5 Optimierung der Fällungsbedingungen der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung

Um bei einer weiteren Reinigung mit Hilfe einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung eine größtmögliche Abtrennung von Kontaminationen zu erreichen ohne einen signifikanten Verlust an Vektor zu erhalten, sollte dieser Schritt bezüglich der eingesetzten Konzentrationen von gesättigter Ammoniumsulfatlösung optimiert werden. Hierzu wurde nach der Zelllyse und Zentrifugation der Überstand verwendet und mit verschiedenen Konzentrationen an gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Nach Zentrifugation wurde die Konzentration an AAV im Überstand und Pellet bestimmt.

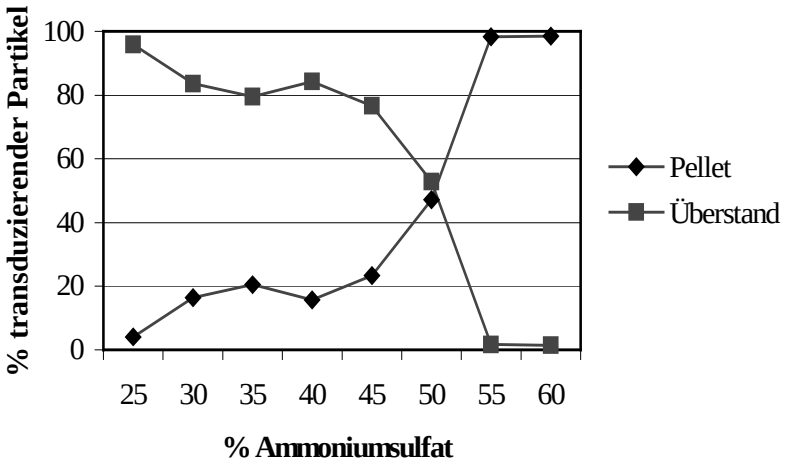


Abbildung 12: Verteilung der AAV im Pellet und Überstand bei Zugabe von verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen und anschließender Zentrifugation. AAV-GFP wurden in 15 Zellkultur-Petrischalen (15 cm Durchmesser) in 293-Zellen hergestellt, die Zellen über zweifache Sonifizierung lysiert und das Zelldebris abzentrifugiert. Zu dem Überstand wurden unterschiedliche Konzentrationen an gesättigter Ammoniumsulfatlösung gegeben und die erhaltene Suspension abzentrifugiert. Anschließend wurde die Menge an zur Transduktion befähigten AAV im Überstand und im Pellet mit Hilfe der FACS-Analyse bestimmt.

Hierbei ist zu erkennen, dass bei der Konzentration von 25 % an gesättigtem Ammoniumsulfat noch kein Verlust an rAAV im Überstand messbar war. Bei höherer Konzentration von 30 % bis ca. 45 % ist erkennbar, dass ca. 20 % des Vektors ausfiel. Da jedoch auch weitere Verunreinigungen hier abgetrennt werden und der Verlust von rAAV-Vektoren gering war (nur ca. 20 %), sollte für weitere Versuche der erste Schritt der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung bei 35 % erfolgen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass sich erst bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 55 % die AAV fast vollständig im Pellet vorhanden sind. Dies bedeutet, dass für die zweite Ammoniumsulfatfällung diese

Konzentration an Ammoniumsulfat eingesetzt werden sollte.

4.1.6 Verwendung eines Iodixanol-Ultrazentrifugationsschrittes

In den bisherigen Versuchen wurde eine Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation als Reinigungsschritt durchgeführt, welche 2 Tage dauerte. Aus diesem Grund wurde eine verkürzte Ultrazentrifugation von 1,5 h mit Iodixanol, einem in der Medizin verwendeten Röntgenkontrastmittel (Bolstad et al., 1991; Svaland et al., 1992; Andersen et al., 1993; Pannu et al., 2005), durchgeführt.

Probenentnahme	Genomische Gesamtpartikel
Überstand nach Sonifikation	$3{,}1 \cdot 10^{10}$
Überstand nach 35 % AS-Fällung	$3{,}1 \cdot 10^{10}$
Pellet nach 55 % AS-Fällung	$3{,}2 \cdot 10^{10}$
Nach Iodixanol-Ultrazentrifugation	$2{,}1 \cdot 10^{10}$

Tabelle 4: Überprüfung des Verlustes nach Iodixanol-Ultrazentrifugation: AAV-GFP wurden in 15 Zellkultur-Petrischalen (15 cm Durchmesser) in 293-Zellen hergestellt, die Zellen über zweifache Sonifizierung lysiert und die Vektoren über eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung bei 35% und 55% gesättigter Ammoniumsulfatlösung gereinigt. Anschließend wurde eine Iodixanol-Ultrazentrifugation durchgeführt. Der transduzierende Titer nach den jeweiligen Schritten wurden per FACS bestimmt. AS = Ammoniumsulfat.

Das Pellet wurde nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung in PBS-MK gelöst und mit 15 %, 25 %, 40 % und 60 % Iodixanol-Lösung unterschichtet. Nach der Ultrazentrifugation wurde die 40 %-Bande abgenommen und auf ihren AAV-Gehalt untersucht. Hierbei ist zu erkennen, dass die Anzahl der zur Transduktion befähigten Partikel nach Iodixanol-Ultrazentrifugation lediglich von $3{,}2 \cdot 10^{10}$ (vor Gradienten) auf $2{,}1 \cdot 10^{10}$ abnimmt.

4.1.7 Vergleich der Zelllyse mit Ultraschallbehandlung und Einfrieren – Auftauen

Neben der Zelllyse mit Ultraschall können Zellen durch wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen bei 37 °C lysiert werden. Hierbei ist interessant, wie die Effizienz der Methode des Einfrieren – Auftauens im Vergleich zu der bisher verwendeten Ultraschallbehandlung ist.

Art des Aufschlusses	Infektiöse Gesamtpartikel
Ultraschall	$1{,}6 \cdot 10^9$
Einfrieren - Auftauen	$4{,}1 \cdot 10^9$

Tabelle 5: Vergleich des Aufschlusses mit Ultraschall und Einfrieren - Auftauen: AAV-GFP wurden in 15 Zellkultur-Petrischalen (15 cm Durchmesser) in 293-Zellen hergestellt, die Zellen abgeschabt und zentrifugiert. Nach Resuspension wurden die Suspensionen entweder per Ultraschall oder per Einfrieren – Auftauen lysiert, die Zellen nochmals abzentrifugiert und die Anzahl der zur Transduktion befähigten Partikel per FACS bestimmt.

Es zeigte sich, dass bei der Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen ca. $4{,}1 \cdot 10^9$ infektiöse Partikel freigesetzt wurden, was ca. die dreifache Menge war, wie durch Zelllyse mit Ultraschall erhalten wurden ($1{,}6 \cdot 10^9$). Deshalb wurde für zukünftige AAV-Herstellungen die Zellen per Einfrieren – Auftauen lysiert.

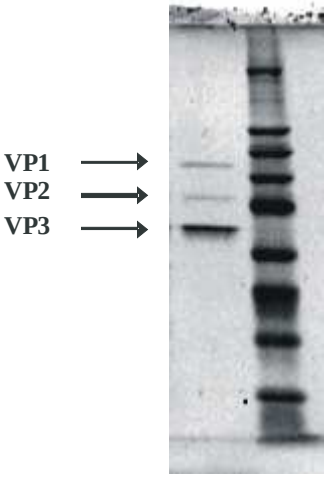


Abbildung 13: Gelchromatographische Auftrennung einer Vektorpräparation. AAV-GFP wurden in 15 Zellkultur-Petrischalen (15 cm Durchmesser) in 293-Zellen hergestellt, die Zellen über zweifache Sonifizierung lysiert und das Zelldebris abzentrifugiert. Der Vektor wurde über eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung (35% und 55%), eine Iodixanol-Ultrazentrifugation, sowie eine Kationen- und Heparansulfat-Säulenchromatographie gereinigt. Anschließend wurde die Präparation auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, gelchromatographisch aufgetrennt, und über eine Cyberorange-Färbung die Proteine nachgewiesen. Es sind hier lediglich die drei viralen Proteile VP1, VP2, sowie VP3 zu erkennen. Dieser gelchromatographischer Nachweis wurde von Medigene AG, Martinsried, angefertigt und mit deren freundlichen Genehmigung hier verwendet.

Aufgrund der Optimierungen der Reinigungsschritte wurde ein neues Reinigungsschema für AAV etabliert, auf das in der Diskussion näher eingegangen wird. Der Titer, der mit dieser Methode erreicht werden konnte, war im Bereich von ca. $3 \cdot 10^9$ transduzierenden Partikel pro

ml (bzw. im Bereich von 10^{12} genomischen Partikel pro ml; eigene Observationen), eine wesentliche Erhöhung gegenüber ca. $5 \cdot 10^{7}$ transduzierenden Partikel pro ml, was vor der Umstellung der Reinigungsmethode erreicht wurde (Girod et al., 1999). Zur Nachweis der Reinheit wurde in Zusammenarbeit mit unserem Kooperationspartner Medigene AG, Martinsried, ein gelchromatographischer Nachweis der in der Vektorpräparation vorhanden Proteine durchgeführt, wobei nur die viralen Proteine VP1, VP2 und VP3 zu sehen sind (s. Abbildung 13, S. 68).

4.2 Selbst-komplementärer AAV

4.2.1 Allgemein

Wie schon unter 1.1.8 erwähnt, ist eine Verzögerung der Expression von bis zu einigen Wochen bei der *in vivo* Anwendung von AAV-Vektoren mit einzelsträngiger DNA zu beobachten. Der Grund hierfür ist der Zeitbedarf für die Bildung des komplementären Stranges aus dem einzelsträngigen Vektorgenom (ssAAV) nach der Infektion (Ferrari et al., 1996). Indem die Genomlänge auf die Hälfte der Wildtyp Genomlänge verkürzt wird (dsAAV), könnte zwar eine Verpackung eines (–)-Stranges zusammen mit einem (+)-Strang erfolgen, jedoch beträgt die Wahrscheinlichkeit weniger als 50 %. Eine Erhöhung dieser Wahrscheinlichkeit sollte durch scAAV-Vektoren erreicht werden (McCarty et al., 2001).

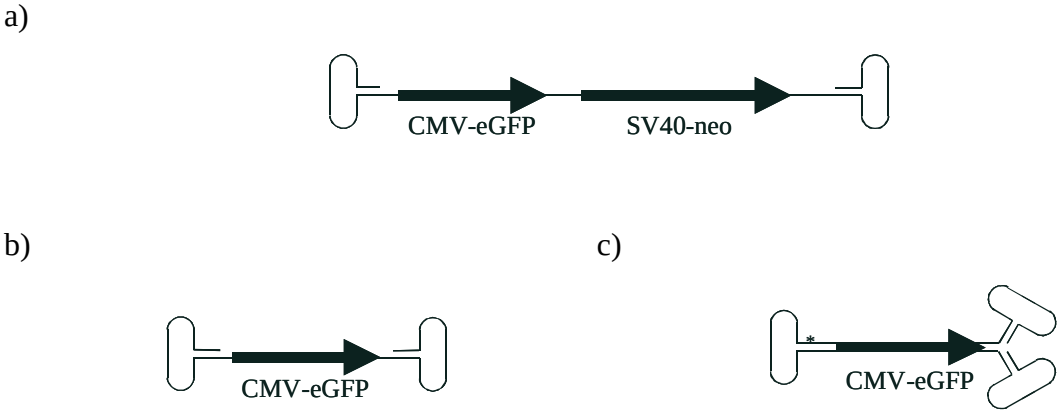


Abbildung 14: Verschiedene Formen des AAV-Genoms. Die verschiedenen Formen des AAV-Genoms nach Freisetzung der viralen DNA aus dem Kapsid sind gezeigt, wobei in a) das normale Genom, in b) das auf die Hälfte des Wildtyp-AAV verkürzte Genom (dsAAV) und in c) das auf die Hälfte des Wildtyp-AAV verkürzte und in einer ITR eine Mutation enthaltene virale Genom (scAAV) dargestellt ist (nach McCarty et al., 2001).

Diese enthalten zwischen einem Wildtyp ITR und einem mutierten ITR, bei dem die terminale Schnittstelle (terminal resolution site, trs) deletiert worden ist, eine auf ca. die Hälfte der Wildtyp Genomlänge verkürzte Sequenz. Während der Vektorproduktion wird durch den Replikationsmechanismus ein AAV-Genom hergestellt, das zwischen den unmutierten ITRs den (–)-Strang und den (+)-Strang enthält, getrennt durch das mutierte ITR (vgl. 1.1.8). Da bei einer Infektion nach Freisetzung der DNA beide Stränge im Bereich des zu exprimierenden Gens vorhanden sind und sich deshalb ein doppelsträngiges DNA-Molekül ausbilden kann, sollte bei Anwendung des selbst-komplementären AAV (scAAV) eine Verkürzung der Zeitverzögerung der Genexpression nach AAV-Transduktion erkennbar sein.

Um dies zu evaluieren wurden zunächst Vektoren für die Herstellung des ssAAV, des dsAAV und des scAAV hergestellt. Basierend auf diesen Plasmiden sollten die entsprechenden Viren hergestellt und die folgenden Fragen beantwortet werden:

- In welchen Formen liegen die viralen Genome vor?
- Lässt sich durch die Verwendung des scAAV die Verzögerung der Genexpression nach AAV-Infektion verkürzen?

4.2.2 Herstellung der dsAAV- und scAAV-Vektoren

Bei den folgenden Klonierungen wurden alle klonierten Vektoren durch Schnitte mit Restriktionsenzymen überprüft.

4.2.2.1 Herstellung von dsAAV-Vektoren

Zur Herstellung des Vektors für die Herstellung des dsAAV-GFP, der für das eGFP kodiert, wurde die CMV-Promotor/eGFP-ORF/SV40 PolyA-Sequenz durch Schneiden mit dem Restriktionsenzym SalI aus dem Vektor pGFP (Girod et al., 1999), der zur Herstellung von ssAAV-GFP diente, ausgeschnitten. Dieses Fragment wurde nach Klenow-Behandlung zum Auffüllen der 5'-überhängenden Enden in das Plasmid pSUB201(+) (Samulski et al., 1987), aus dem die viralen Sequenzen durch Schneiden mit den Enzymen SnaBI und XhoI ausgeschnitten und dessen Ende zur Verhinderung einer Religation mit einer Phosphatase-Reaktion dephosphoryliert worden waren, durch eine Ligationsreaktion eingebaut. Dadurch wurde das Plasmid pdsAGFPFG erhalten, das zur Herstellung von dsAAV, die für eGFP kodieren, verwendet werden konnte. Dieses Plasmid wurde sowohl durch Spaltungen mit

Restriktionsenzymen als auch durch Sequenzierung überprüft.

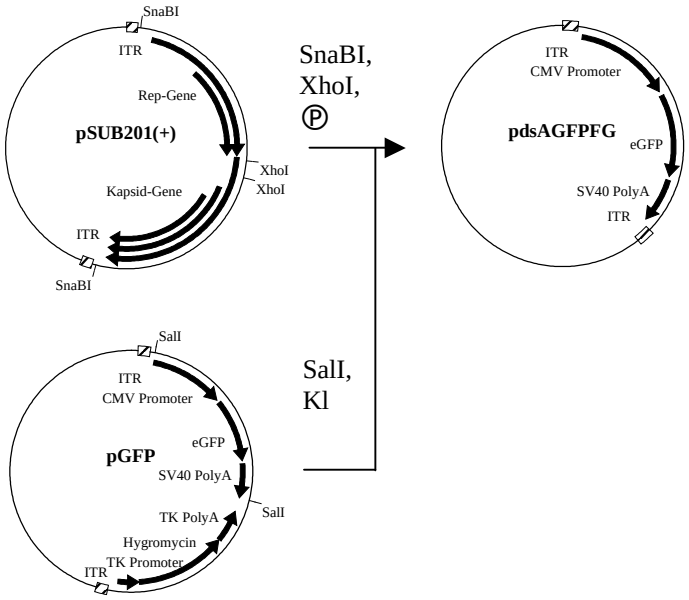


Abbildung 15: Herstellung des Vektors pdsAGFPFG. Die Herstellung des Vektors pdsAGFPFG ist schematisch dargestellt. Mit diesem können dsAAV hergestellt werden, die für eGFP kodieren. Kl stellt eine Klenow-Reaktion, Ⓟ eine Phosphatase-Reaktion dar.

4.2.2.2 Herstellung von scAAV-Vektoren

Für die Herstellung des Plasmids für die Herstellung des scAAV, das eine Deletion in einem der beiden ITRs enthält, wurde zuerst in dem Klonierungsvektor pBluescript KS- (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) die XbaI-Schnittstelle deletiert: durch Öffnen des Vektors mit XbaI, Auffüllen der 5'-überhängenden Sequenz mit Hilfe einer Klenow-Reaktion und anschließender Religation, wodurch das Plasmid pBSNOX erhalten wurde. Die Sequenz des AAV-Genomes aus dem Plasmid pSUB201(+) (Samulski et al., 1987) mit den Sequenzen der Rep-Proteine und eines ITR, welches das größere Fragment war, das man durch Schneiden mit den Enzymen ClaI und XhoI erhielt, wurde zwischen die ClaI- und XhoI-Schnittstelle des Plasmids pBSNOX eingebaut, um das Plasmid pBSUBG zu erhalten. Hierdurch wurde verhindert, dass bei der Deletionsreaktion in beiden ITRs die Rep-bindenden Sequenzen deletiert wurden, da die beiden ITRs in dem Plasmid pSUB201(+) identisch sind.

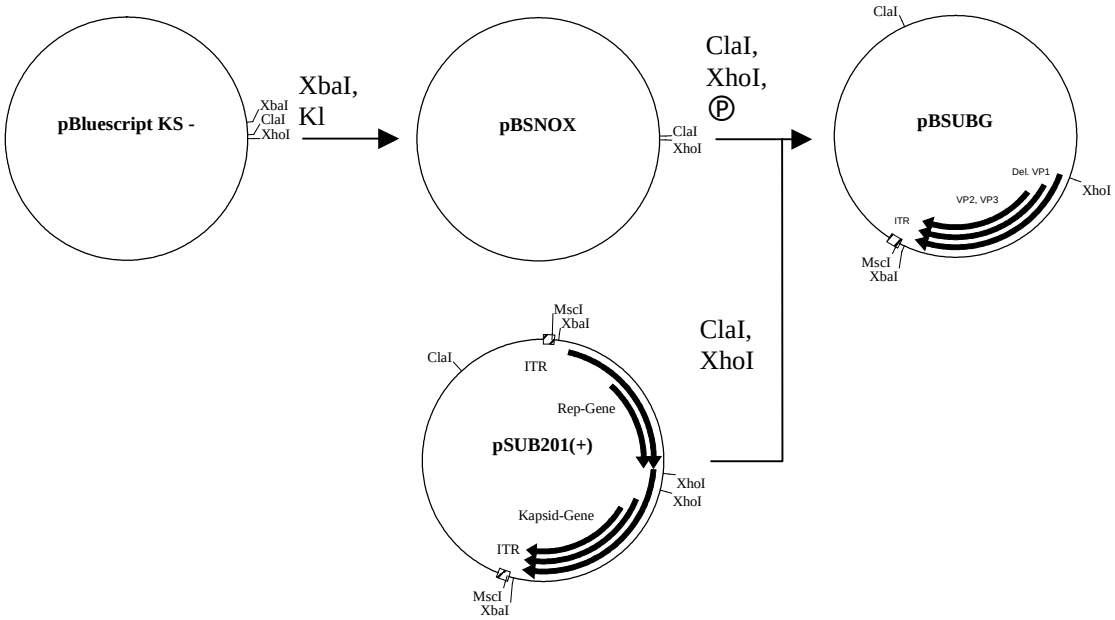


Abbildung 16: Herstellung des Zwischenklonierungsvektors pBSUBG. Die Herstellung des Zwischenklonierungsvektors pSUBG ist schematisch dargestellt. Kl stellt eine Klenow-Reaktion, Ⓟ eine Phosphatase-Reaktion dar.

Anschließend wurde ein HpaI-Linker mit der Sequenz GTC GTT AAC GAC in die MscI-Schnittstelle von pBSUBG eingebaut, was zu dem Plasmid pBSUBGH führte. Die Deletion erfolgte dann durch Entfernen der Sequenz zwischen den HpaI- und XbaI-Schnittstellen, Auffüllen der 5'-überhängenden Sequenz mit einer Klenow-Behandlung und Religation der erhaltenen Enden, wodurch das Plasmid pscG hergestellt wurde. Abschließend wurde die ursprünglich ausgeschnittene und danach mutierte Sequenz durch Schneiden mit den Enzymen ClaI und XhoI und anschließender Ligation mit dem durch die Reaktion mit den Enzymen mit ClaI und XhoI erhaltenen kleineren Fragment aus dem Plasmid pSUB201(+) wieder zurück inseriert. Dadurch wurde das Plasmid pscAGFG erhalten, das dem ursprünglichen Plasmid pSUB201(+) identisch ist bis auf die Deletion in einem ITR, was die Herstellung des scAAV bedingt, sowie einer Deletion zwischen den XhoI-Schnittstellen im AAV-Genom, das den Anfang des VP1-Kapsidgenoms enthält. In dieses Plasmid können nun Sequenzen für Marker- oder therapeutische Gene zwischen die beiden ITRs eingebaut werden um scAAV-Vektoren zu erhalten. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Größe der Insertion zusammen mit den ITRs nur maximal die Hälfte der Größe eines Wildtyp Viruses erreicht.

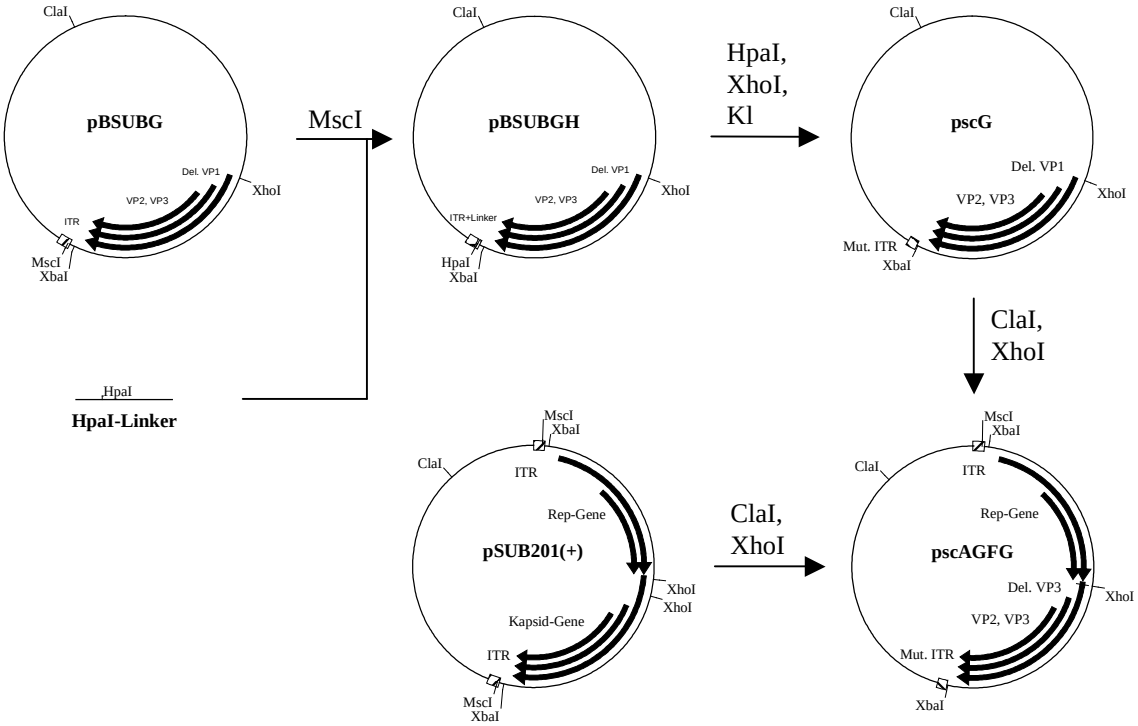


Abbildung 17: Herstellung des Vektors pscAGFG. Die Herstellung des Vektors pscAGFG ist schematisch dargestellt. Dieser dient als Ausgangsplasmid für die Klonierung von scAAV-Vektoren. Kl stellt eine Klenow-Reaktion dar.

Für die Herstellung eines scAAV mit dem Austausch der viralen Gene des Vektors pscAGFG gegen die Expressionkassette von GFP unter dem CMV-Promotor, wurden diese viralen Gene aus dem Plasmid pscAGFG mit den Enzymen SnaBI, XbaI und XhoI ausgeschnitten und die 5'-überhängenden Enden des größten Fragmentes, das auch die ITRs enthält, mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt. Mit diesem Fragment wurde anschließend die GFP-Expressionskassette, die durch Reaktion des Plasmids pGFP (Girod et al., 1999) mit dem Enzym SalI ausgeschnitten und bei dem mit Hilfe einer Klenow-Reaktion die 5'-überhängenden Enden aufgefüllt worden waren, ligiert, wodurch das Plasmid pscAGFPFG erhalten wurde. Dieses Plasmid, das für die Herstellung von scAAV, die für eGFP kodieren, verwendet werden konnte, wurde sowohl durch Spaltungen mit Restriktionsenzymen als auch durch Sequenzierung überprüft.

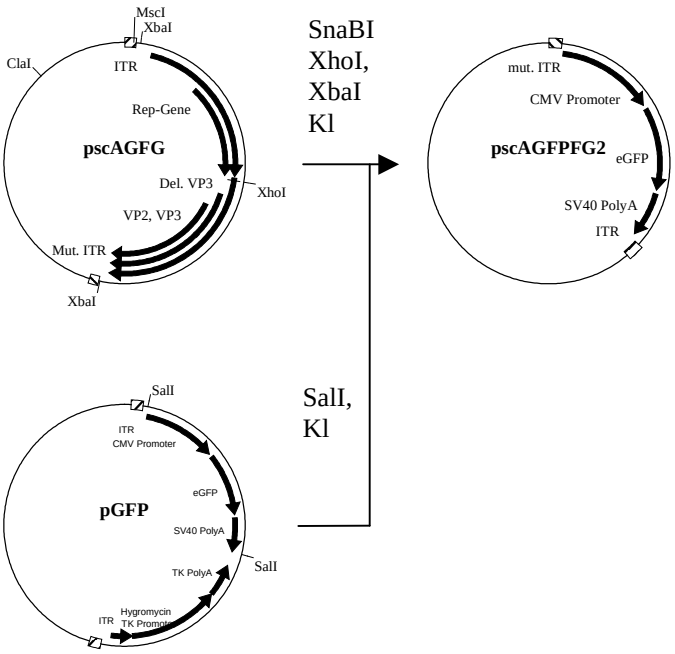


Abbildung 18: Herstellung des viralen Vektorplasmids pscAGFPFG. Die Herstellung des Vektors pscAGFPFG ist schematisch dargestellt. Mit diesem Vektor können scAAV hergestellt werden, die für eGFP kodieren. Kl stellt eine Klenow-Reaktion dar.

Neben einem scAAV, der für GFP kodiert, sollte ein weiterer scAAV mit einer murinen Endostatin-Expressionskassette hergestellt werden. Hierfür wurde aus dem Vektor pBLAST-mEndostatin (Invivogen, San Diego, U.S.A) eine Sequenz, bestehend aus einem Fusions-protein, das die sekretorische Sequenz von Interleukin-2 (Il2) und die kodierende Sequenz von murinem Endostatin enthält, sowie einem PolyA-Signal, durch Schneiden mit DrdI, Abtrennen der 3'-überhängenden Enden mit T4-Polymerase und anschließendem Schneiden mit SgrAI ausgeschnitten. Diese Sequenz wurde in den Vektor pBluescript KS- (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland), der mit SpeI, Klenow und anschließend mit XmaI behandelt worden war, eingefügt. In das erhaltene Plasmid pBSEND wurde nun eine CMV-Promotor-Sequenz eingebaut. Dies geschah indem pBSEND mit EcoRV geöffnet wurde und durch eine Phosphatase-Behandlung eine Religation verhindert wurde. Die CMV-Promotor-Sequenz wurde durch Schneiden des Vektors pZeoSV2 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) mit BglII und BbsI ausgeschnitten und die 5'-überhängenden Enden durch eine Klenow-Reaktion aufgefüllt. Durch Ligation dieses Fragmentes mit dem geöffneten pBSEND-Vektor wurde der Vektor pCMVEND erhalten, der die gesamte murine Endostatin-Expressionskassette enthält.

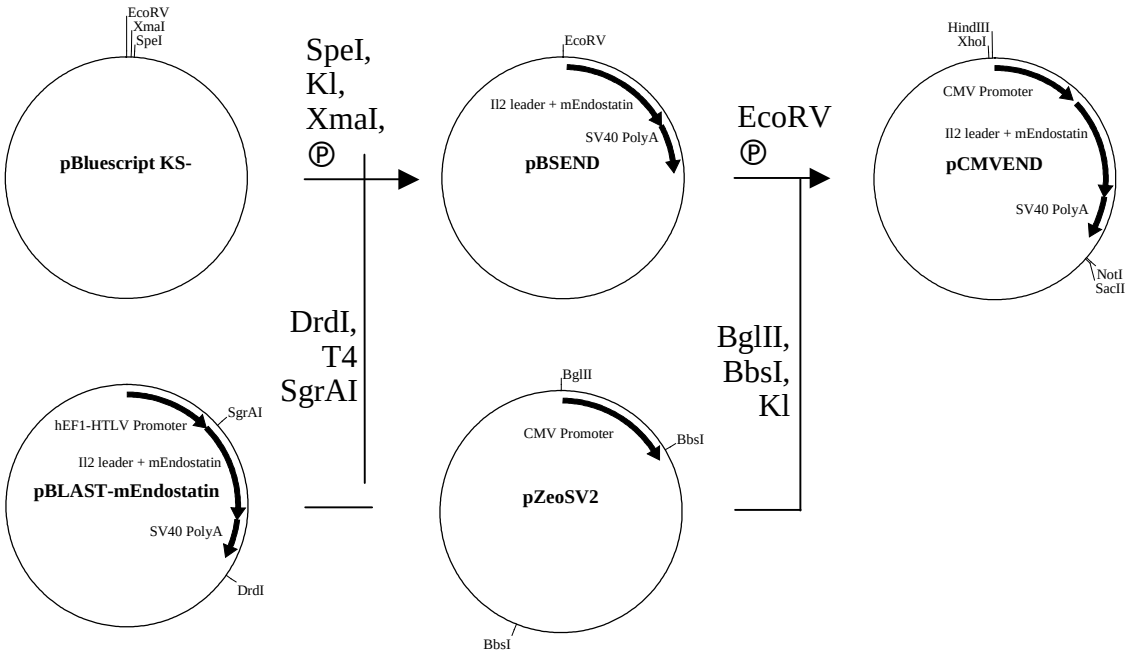


Abbildung 19: Herstellung des Vektors pCMVEND. Die Herstellung des Vektors pCMVEND ist schematisch dargestellt. Kl stellt eine Klenow-Reaktion, T4 eine T4-Polymerase-Reaktion, Ⓟ eine Phosphatase-Reaktion dar.

Der Vektor pCMVEND wurde durch Behandlung mit HindIII geöffnet, die 5'-überhängenden Enden durch eine Klenow-Reaktion aufgefüllt und eine Religation durch eine Phosphatase-Behandlung verhindert. Durch Behandlung des Vektors pCMVEND mit HindIII, Not I und Klenow wurde die murine Endostatin-Expressionskassette ausgeschnitten und in den mit HindIII geöffneten Vektor pCMVEND inseriert. Der erhaltene Vektor p2CMV2END, der nun zwei murine Endostatin-Expressionskassetten enthält, wurde durch Reaktion mit EcoRV geöffnet und eine Religation mit Phosphatase verhindert. In diesen geöffneten Vektor wurde als Stuffersequenz eine 3'-untranslatierte Sequenz eingebaut, die durch Schneiden des Vektors pGL-2 (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) mit FauI und BamHI, sowie Auffüllen der 5'-überhängenden Enden durch eine Klenow-Reaktion erhalten worden war. Von dem erhaltenen Vektor p2CMV2ENDGR wurden die beiden murinen Endostatin-Expressions-kassetten inklusive der Stuffersequenz durch Schneiden SacII und XhoI ausgeschnitten und durch eine Behandlung mit T4-Polymerase die 5'-überhängenden Enden aufgefüllt und die 3'-überhängenden Enden abgeschnitten. Diese Sequenz wurde dann in das virale Vektorplasmid pSUB201(+) (Samulski et al., 1987), dem die viralen Gene durch Schneiden mit SnaBI und XhoI abgetrennt und die Religation durch Phosphatase-Reaktion verhindert worden war, ein-gebaut. Dadurch wurde das virale Plasmid pA2CMV2ENDFG erhalten, das zwei murine Endostatin-Expressionskassetten enthält und von dem ssAAV hergestellt werden können, die

für murines Endostatin kodieren.

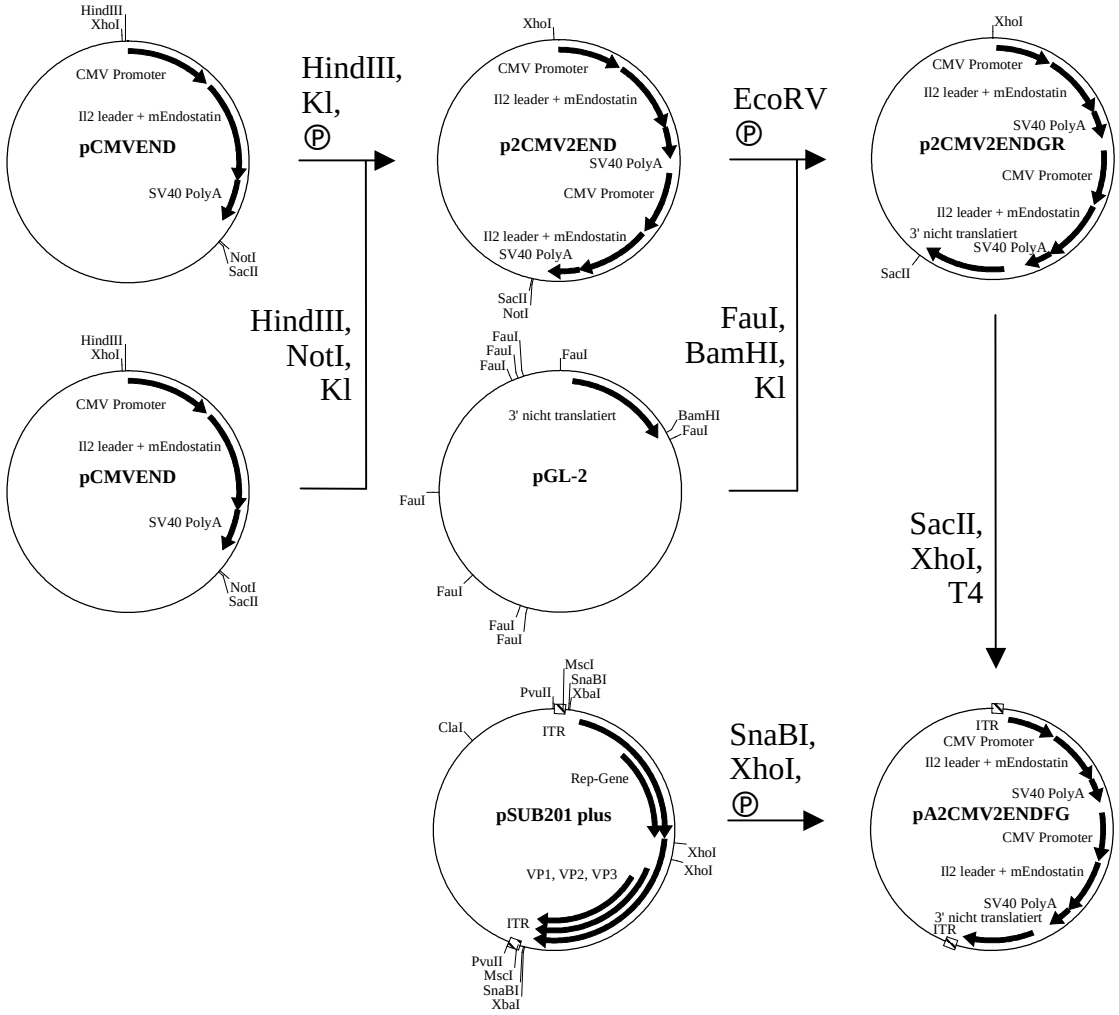


Abbildung 20: Herstellung des viralen Vektorplasmids pA2CMV2ENDFG. Die Herstellung des Vektors pA2CMV2ENDFG ist schematisch dargestellt. Mit diesem Vektor können ssAAV hergestellt werden, die für murines Endostatin kodieren. Kl stellt eine Klenow-Reaktion, T4 eine T4-Polymerase-Reaktion, Ⓟ eine Phosphatase-Reaktion dar.

Aus dem Vektor pTRACER-CMV (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde eine PolyA-Sequenz als Stuffersequenz mit PvuII und EcoRV ausgeschnitten. Diese wurde in den Klonierungsvektor pBluescript KS- (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland), der mit EcoRV geöffnet und zur Verhinderung einer Religation mit Phosphatase behandelt worden war, eingebaut. Der erhaltene Vektor pBSPolyA wurde mit SpeI geöffnet und eine Religation durch eine Phosphatase-Behandlung verhindert. Hierin wurde eine murine Endostatin-Expressionskassette inseriert, die durch Ausschneiden aus dem Vektor pA2CMV2ENDFG mit XbaI erhalten wurde. Aus dem hergestellten Vektor pBSCEP wurde die murine Endostatin-Expressionskassette inklusive der Stuffersequenz mit SacII und HindIII ausge-

schnitten und durch eine T4-Polymerase-Reaktion die 5'-überhängenden Enden aufgefüllt und die 3'-überhängenden Enden abgeschnitten. Der Vektor pscAGFG (s. Abbildung 17, S. 73), dem die viralen Gene durch Schneiden mit SnaBI, XbaI und XhoI abgetrennt und die Religation durch Phosphatase-Reaktion verhindert worden waren, wurde mit dem oben erhaltenen Fragment ligiert. Das hergestellte virale Vektorplasmid pscACMVENDFG enthält eine murine Endostatin-Expressionskassette und kann zur Herstellung von scAAV-Vektoren, die für murines Endostatin kodieren, verwendet werden. Dieses Plasmid wurde sowohl durch Spaltungen mit Restriktionsenzymen als auch durch Sequenzierung überprüft.

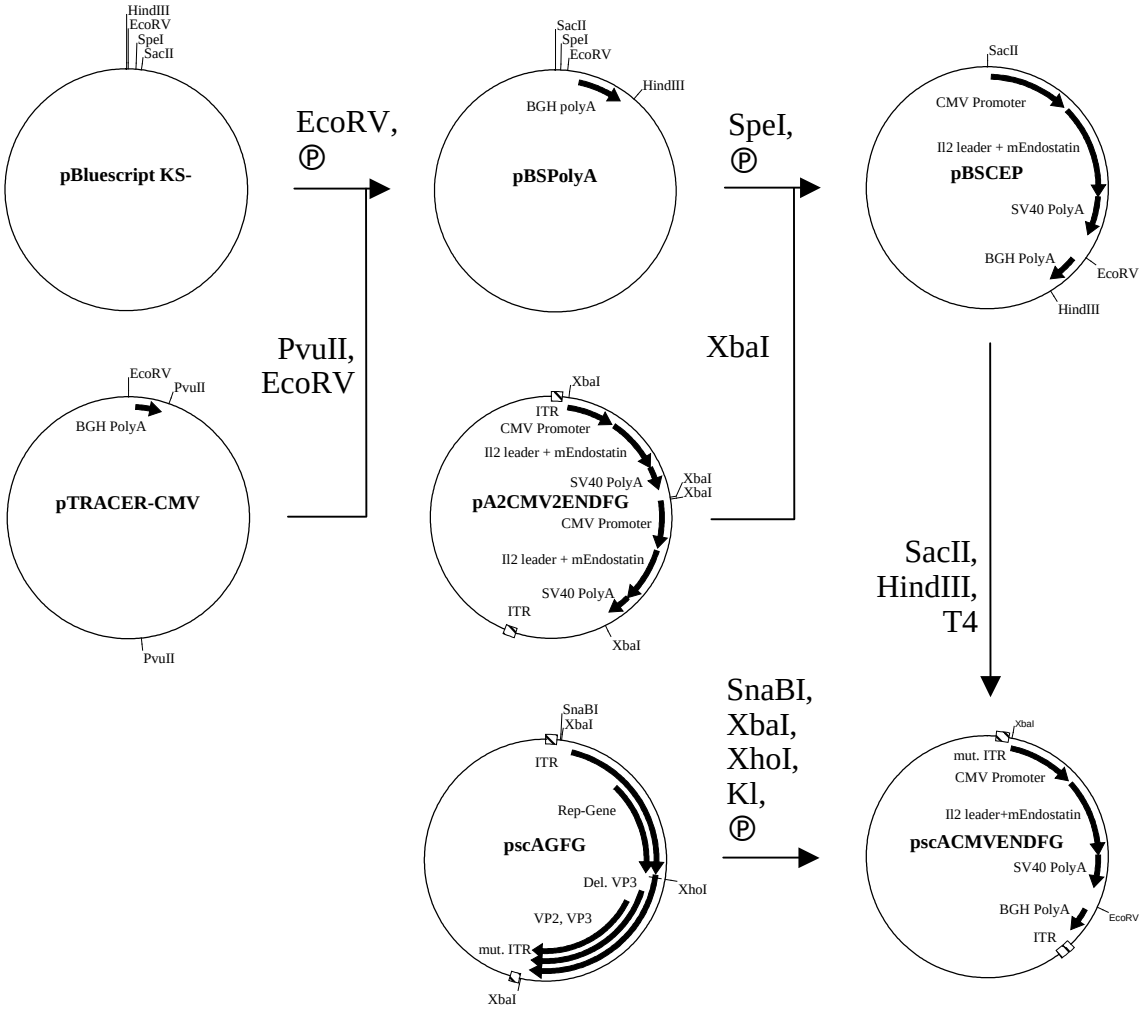
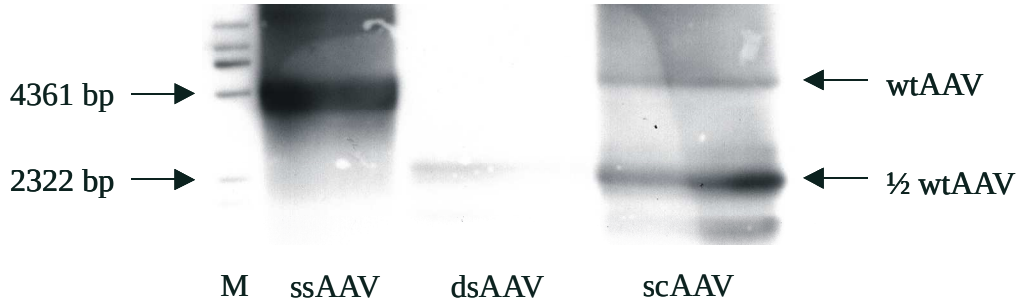


Abbildung 21: Herstellung des viralen Vektorplasmids pscACMVEND. Die Herstellung des Vektors pscACMVENDFG ist schematisch dargestellt. Mit diesem Vektor können scAAV hergestellt werden, die für murines Endostatin kodieren. Kl stellt eine Klenow-Reaktion, T4 eine T4-Polymerase-Reaktion, Ⓟ eine Phosphatase-Reaktion dar.

4.2.3 Überprüfung der räumlichen Struktur des scAAV

Wie unter Kapitel 1.1.8 schon beschrieben, sollte das virale Genom des ssAAV als Einzelstrangmolekül, das dsAAV-Genom als Einzelstrangmolekül mit der halben Größe des ssAAV-Genoms und das scAAV-Genom als Doppelstrangmolekül vorliegen. Um dies zu überprüfen, wurden Vektorpräparationen mit den o.g. Genomorganisationen hergestellt, die für GFP kodieren. Es wurden die viralen DNA der Präparationen extrahiert und in einem nativen und einem denaturierendem Gel analysiert.

a)



b)

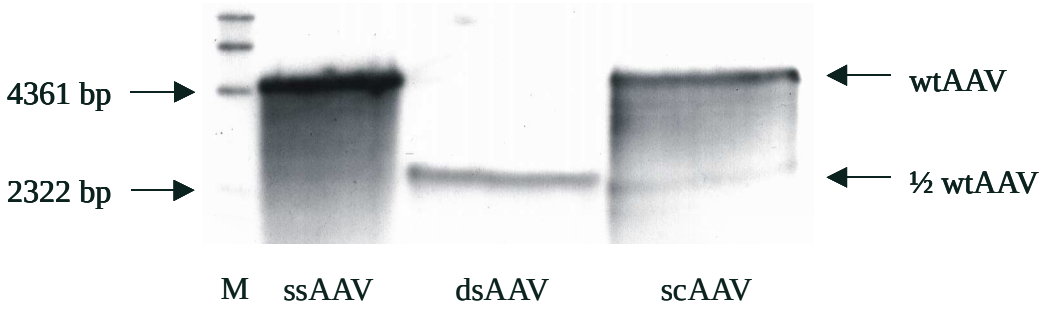


Abbildung 22: Überprüfung der viralen AAV-DNA von ssAAV, dsAAV und scAAV. ssAAV, dsAAV und scAAV wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Die DNA aus 200 µl der Vektorpräparationen wurden mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits gewonnen, jeweils in einem nativen Gel (a) und einem denaturierenden Gel (b) aufgetrennt und die DNA mit Hilfe einer Digoxigenin-markierten Sonde im Southern Blot detektiert. Spur 1 zeigt hierbei den DNA-Größenmarker Lamda/HindIII, Spur 2 die DNA des ssAAV, Spur 3 die DNA des dsAAV und Spur 4 die DNA des scAAV.

Die einzelsträngige DNA des ssAAV beträgt ca. 4,3 kb, die des dsAAV ca. 2,3 kb. Im nativen Gel könnten sich jeweils die (+)- und (–)-Stränge dieser Vektoren hybridisieren, was im nativen Gel zu Größen der doppelsträngigen DNA von 4,3 kbp und 2,3 kbp führt, welche in

Abbildung 22a (Spur 2 und 3) gut zu erkennen sind. Im denaturierendem Gel wird diese Hybridisierung aufgebrochen und die ssAAV und dsAAV sollten wieder in Ihrer ursprünglichen einzelsträngigen Form mit den Größen der einzelsträngigen DNA von 4,3 kb und 2,3 kb vorliegen, was in Abbildung 22b (Spur 2 und 3) eindeutig zu erkennen ist. Die Größe des scAAV ist als Einzelstrang durch drei ITRs und der doppelten Größe des Inserts zwischen den ITRs festgelegt und sollte hier ca. 4,5 kb betragen, was im denaturierenden Gel gezeigt werden konnte (Abbildung 22b, Spur 4). Eine schwächere Bande ist jedoch bei ca. 2,3 kb zu erkennen. Zwar sollte durch die Mutation der Einzelstrangbruch verhindert werden und dadurch nur scAAV hergestellt werden. Falls der Einzelstrangbruch jedoch nicht vollständig verhindert wird, kann neben scAAV auch dsAAV produziert werden, der diese Bande bei 2,3 kb erklären kann. Im nativen Gel sollte das scAAV mit sich selbst hybridisieren können (s Abbildung 14c) und damit die Hälfte der Einzelstranggröße von 4,5 kbp, dies wäre 2,3 kbp, betragen. Dass dies wirklich der Fall ist, konnte in Abbildung 22a (Spur 4) eindeutig belegt werden. Eine schwächere Bande bei 4,5 kbp kann daher rühren, dass auch zu einem geringen Anteil (–)-Stränge und (+)-Stränge des scAAV miteinander hybridisiert haben.

4.2.4 Überprüfung der Expression der unterschiedlichen viralen AAV-Genome

Durch diese Analyse der DNA des ssAAV-, dsAAV- und scAAV-Genoms konnte gezeigt werden, dass die jeweilige virale DNA, wie in Abbildung 14 vorausgesagt, vorlag. Dies sollte bei der Verwendung des scAAV dazu führen, dass die Expression wesentlich schneller startet, da hierbei der limitierende Schritt der Doppelstrang-Synthese entfallen sollte. Also müsste kurze Zeit nach der AAV-Transduktion eine höhere Genexpression bei der Verwendung von scAAV gegenüber ssAAV feststellbar sein.

Bei dieser Untersuchung wurde die Anzahl der Partikel an ssAAV-GFP und scAAV-GFP, die zur Transduktion von unbestrahlten Zellen fähig sind, bestimmt. Anschließend wurden dieselben Volumina an ssAAV-GFP und scAAV-GFP auf Zellen, die mit einer radioaktiven ^{137}Cs-Quelle bestrahlt worden waren und damit die virale Doppelstrang-Synthese unterstützen können, gegeben. Dabei wurden die Anzahl der Partikel, die zur Transduktion von Zellen, die die Doppelstrang-Synthese unterstützen, bestimmt und mit der Anzahl der Partikel, die zur Transduktion von unbestrahlten Zellen ohne Unterstützung der Doppelstrang-Synthese fähig sind, verglichen.

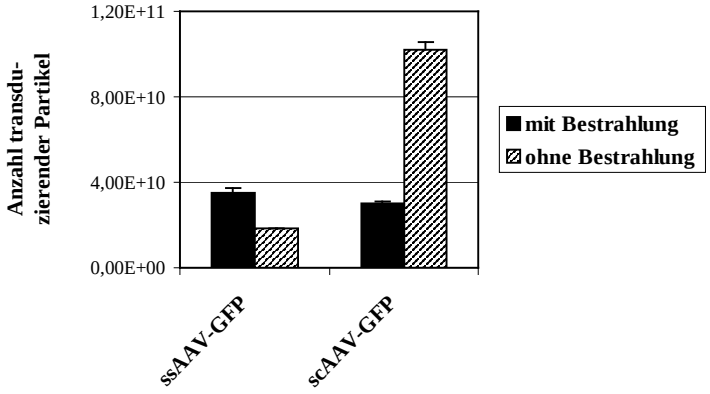


Abbildung 23: Überprüfung der Expression von eGFP nach Infektion von bestrahlten und unbestrahlten HeLa-Zellen mit ssAAV und scAAV: ssAAV und scAAV, die jeweils für GFP kodierten, wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammonium-sulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Es wurden analog der Bestimmung des transduzierenden Titers mit seriellen Verdünnungen die Transduktionshöhe der Vektoren auf HeLa-Zellen ohne und mit voran-gegangener Bestrahlung der Zellen durchgeführt. Die Anzahl der transduzierenden Partikel ist angegeben. Die Versuche wurden in zwei unabhängigen Testreihen durchgeführt.

Hierbei ist zu erkennen, dass die gemessene Anzahl an transduzierenden Partikeln 48 h nach Transduktion von bestrahlten HeLa-Zellen fast identisch war, die Anzahl der eingesetzten transduzierenden Partikel von ssAAV-GFP mit $(3,5\pm0,2)\cdot10^{10}$ und scAAV-GFP mit $(3,0\pm0,1)\cdot10^{10}$ also nahezu gleich waren. Bei der Transduktion von unbestrahlten Zellen sank die Anzahl der transduzierenden Partikel bei der Verwendung von ssAAV-GFP wie erwartet, und zwar fast um die Hälfte, von $(3,5\pm0,2)\cdot10^{10}$ transduzierenden Partikeln auf $(1,8\pm0,1)\cdot10^{10}$ transduzierende Partikel. Dagegen stieg bei der Transduktion von unbestrahlten HeLa-Zellen die Anzahl der transduzierenden Partikel bei der Verwendung von scAAV-GFP beträchtlich, und zwar auf mehr als den 3-fachen Wert, von $(3,0\pm0,1)\cdot10^{10}$ transduzierenden Partikeln auf $(10,2\pm0,4)\cdot10^{10}$ transduzierende Partikel. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Transduktion von unbestrahlten Zellen durch die Verwendung von scAAV wesentlich gesteigert werden konnte.

Um auszuschließen, dass die Verbesserung der Expression bei Verwendung von scAAV durch das Transgen bedingt sein konnte, wurden Zellen mit identischen genomischen Titern von ssAAV und scAAV, die jeweils für murines Endostatin kodierten, infiziert und die murine Endostatin-Konzentration bestimmt.

a) b)

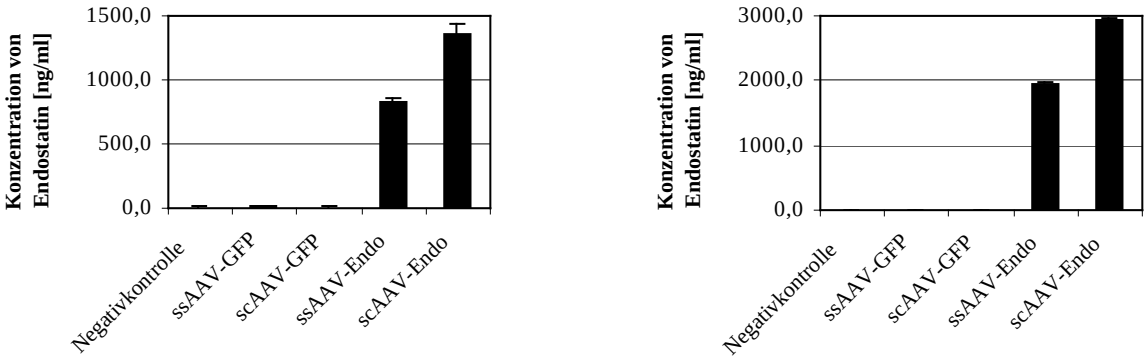


Abbildung 24: Überprüfung der Expression von murinem Endostatin nach Infektion von HeLa-Zellen mit ssAAV und scAAV: Jeweils zwei unabhängige Präparationen von ssAAV und scAAV, die jeweils für GFP oder murines Endostatin kodieren, wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Nach Bestimmung des genomischen Titers der beiden unabhängig verpackten und gereinigten Präparationen wurde von der ersten Verpackung $1{,}0 \cdot 10^9$ genomische Partikel auf $5{,}0 \cdot 10^5$ unbestrahlte HeLa-Zellen (a) bzw. von der zweiten Verpackung $1{,}5 \cdot 10^{10}$ genomische Partikel auf $1{,}5 \cdot 10^7$ unbestrahlte HeLa-Zellen (b) unter reduziertem Wachstums-Medium (1 % FKS) gegeben und 48 h später die Konzentration von murinem Endostatin im Überstand durch einen ELISA in Duplikaten bestimmt. Als Negativkontrollen dienten nicht infizierte HeLa-Zellen.

Hierbei zeigte sich, dass die Expression 48 h nach Infektion bei der Verwendung von scAAV bedeutend höher war als bei der Verwendung von ssAAV. Die Konzentration erhöhte sich von 831±24 ng/ml murinem Endostatin bei ssAAV auf 1364±80 ng/ml murinem Endostatin bei der ersten der beiden unabhängig verpackten und gereinigten Präparation von scAAV (Abbildung 24a) bzw. von 1942±27 ng/ml auf 2943±15 ng/ml bei der zweiten unabhängig verpackten und gereinigten Präparation (Abbildung 24b), was eine Erhöhung um ca. 160 % bzw. ca. 150 % bedeutete.

Damit auch ausgeschlossen werden konnte, dass dieser Effekt sich rein auf die Zelllinie HeLa beschränkt, wurden die Versuche mit den mit AAV gut infizierbaren 293-Zellen wiederholt.

Hierbei ist bei beiden Transgenen zu erkennen, dass bei Verwendung von scAAV eine höhere Anzahl von Zellen transduziert wurde bzw. eine höhere Expressionsstärke erreicht wurde als bei der Verwendung von ssAAV messbar war. Bei der Analyse der GFP-Expression ist eine deutliche Zunahme der Anzahl der transduzierten Zellen von 87,9 % bei der Verwendung von

ssAAV-GFP auf 99,9 % bei scAAV-GFP festzustellen (Abbildung 25a). Bei der Überprüfung der Expressionsstärke von murinem Endostatin in 293-Zellen ist noch deutlicher als bei der Infektion von HeLa-Zellen zu erkennen, dass sich die Expression von murinem Endostatin 36 h nach der AAV-Infektion deutlich steigern ließ, wenn anstatt ssAAV scAAV verwendet wurde. Die Steigerung der Konzentration um mehr als den 5-fachen Wert, von 326±43 ng/ml auf 1873±11 ng/ml (Abbildung 25b), zeigt sogar eine höhere Steigerung als bei der Verwendung von HeLa-Zellen, die bei ungefähr dem 1,5-fachen Wert lag (siehe Abbildung 24a und Abbildung 24b).

a) b)

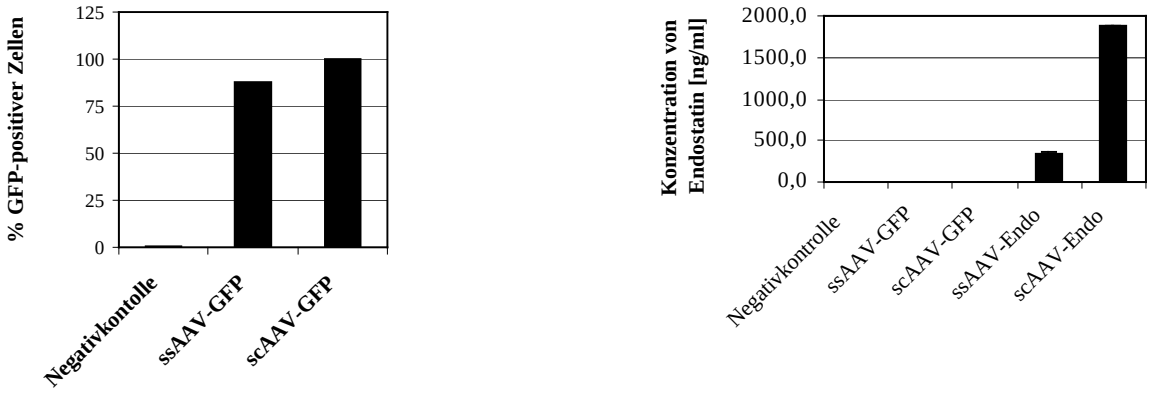


Abbildung 25: Überprüfung der Expression von murinem Endostatin nach Infektion von 293-Zellen mit ssAAV und scAAV: ssAAV und scAAV, die jeweils für GFP oder murines Endostatin kodieren, wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Nach Bestimmung des genomischen Titers wurden jeweils $1{,}4 \cdot 10^{10}$ genomische Partikel auf $2{,}0 \cdot 10^{6}$ unbestrahlte 293-Zellen gegeben. 36 h später wurden die Zellen abgelöst und die Anzahl der GFP-positiven Zellen per FACS-Analyse bestimmt. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte 293-Zellen verwendet (a). 36 h nach der Infektion wurde die Konzentration von murinem Endostatin im Überstand (4 ml) durch einen ELISA in Duplikaten bestimmt. Als Negativkontrolle diente der Überstand von nicht infizierten 293-Zellen (b).

4.3 *In vivo* Anwendung von AAV

4.3.1 Allgemein

In Kapitel 4.1 wurde die Reinigung der AAV bezüglich Reinheit und Ausbeute optimiert, was eine wesentliche Voraussetzung für deren *in vivo* Applikation ist. Der Einsatz der AAV *in vivo* direkt nach der Iodixanol-Ultrazentrifugation war möglich, da hier die Reinheit im

Vergleich zu der weiteren säulenchromatographischen Aufreinigung ähnlich war (mündliche Mitteilung Fr. Dr. Büning) und in Publikationen gezeigt worden war, dass bei direkter Injektion einer AAV-Präparation mit Iodixanol in das Gehirn von Mäusen keine zytopathischen Effekte erkennbar waren (Hermens et al., 1999). Als Transgen diente das murine Endostatin-Gen, dessen Genprodukt leicht über einen ELISA für murines Endostatin im Blut detektiert werden kann.

4.3.2 Untersuchung der Expressionssteigerung nach *in vivo* Infektion

Hierbei sollte untersucht werden, wie schnell und in welcher Höhe die Expression von Endostatin nach AAV-vermitteltem Gentransfer in die Leber mittels intravenöser Infektion in die Schwanzvene stattfindet. Dabei wurde nach erfolgter Infektion mit AAV, das für murines Endostatin unter der Kontrolle des CMV-Promotors kodiert (AAV-CMV-Endo), die murine Endostatin-Konzentration im Blutserum zweimal wöchentlich gemessen um möglichst genaue Werte zu erhalten. Damit die Tiere mit möglichst wenig Stress belastet wurden und um sicher zu gehen, dass durch eine häufige Blutentnahme die Werte nicht verfälscht wurden, sollten die Experimente mit zwei Subgruppen pro Testgruppe durchgeführt werden. Zwischen den Blutabnahmen innerhalb der Subgruppen sollten 7 Tage vergehen, wobei der Abstand zwischen den Blutabnahmen der zwei Subgruppen 3 bzw. 4 Tage betragen sollte. Als Kontrollgruppen zu den mit AAV-CMV-Endo transduzierten Tieren hatten AAV-GFP transduzierte bzw. mit PBS injizierte Gruppen gedient.

Hierbei ist zu erkennen, dass die Konzentrationen an murinem Endostatin von der AAV-CMV-Endo transduzierten Gruppe sich nicht von den Konzentrationen der Kontrollgruppen unterschied. Es wurde in allen Gruppen eine Konzentration von ca. 60 ng/ml murinem Endostatin detektiert. Da jedoch in Veröffentlichungen gezeigt wurde, dass 6 bis 8 Wochen die Expression im AAV-System auf hohem Niveau stattfindet (Malik et al., 2000), musste die Ursache hierfür gefunden werden. Diese könnte in der Art der Probengewinnung und Detektion des Endostatins liegen, ebenso in der Art der Vektorapplikation, der Vektormenge, des Maussystems, oder auch des Promotors.

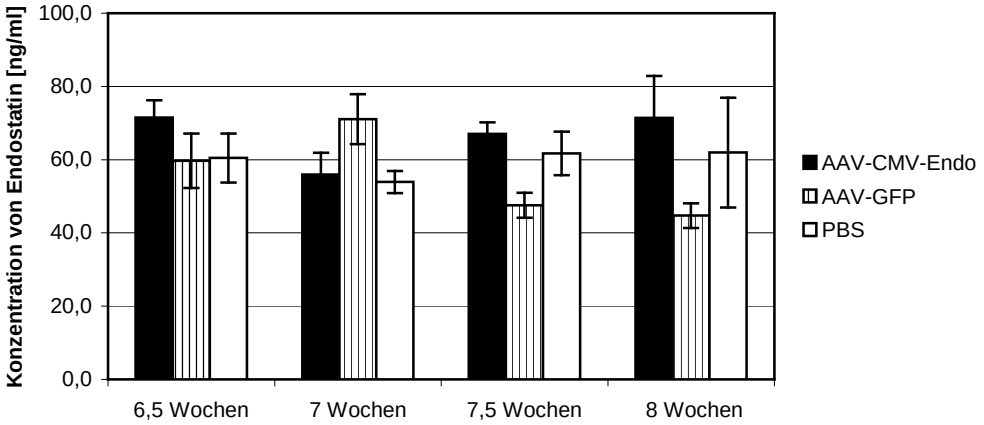


Abbildung 26: Konzentration von murinem Endostatin im Blutserum nach Infektion mit AAV-CMV-Endo: AAV-CMV-Endo und AAV-GFP wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Nach Bestimmung des genomischen Titers wurden jeweils $8{,}0 \cdot 10^9$ Viren auf 300 µl mit PBS verdünnt und in die Schwanzvene von Balb/c Mäusen injiziert. Als Negativkontrolle wurden 300 µl PBS in die Schwanzvene injiziert. Es wurden jeweils 200 µl venöses Blut nach der angegebenen Zeit abgenommen, das Plasma isoliert und die Endostatin-Konzentration per ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Ergebnisse von jeweils fünf Mäusen.

4.3.3 Überprüfung der Art der Probengewinnung und Detektion des murinen Endostatins

Durch die falsche Handhabung der Proben könnte das murine Endostatin vor der Detektion im ELISA zerstört worden sein. Deshalb wurde die Art der Probengewinnung überprüft. Hierbei könnte die Verwendung eines falschen Probenröhrchens problematisch gewesen sein. Auch deren Handhabung zur Gewinnung des Serums bzw. Plasmas könnte eine Fehlerursache gewesen sein. Aus diesem Grund wurde die Verwendung von Eppendorf-Röhrchen (Eppi) und Serum-Separations-Röhrchen (SST) zur Gewinnung von Blutserum, sowie die Verwendung von Kalium-EDTA-Röhrchen (K-EDTA) zur Gewinnung von Blutplasma untersucht. Hierfür wurde nach der Blutabnahme das Blut in jeweils 3 Eppi-, SST- oder K-EDTA-Röhrchen überführt und zu jeweils zwei der Röhrchen 300 ng murines Endostatin-Protein zugegeben. Ferner wurde untersucht, ob das Einfrieren und Auftauen der Proben einen Effekt auf die Messung der Endostatin-Konzentration hatte. Dazu wurden die Proben in zwei Teile aufgeteilt und entweder bei 4 °C oder –20 °C für 1 h inkubiert.

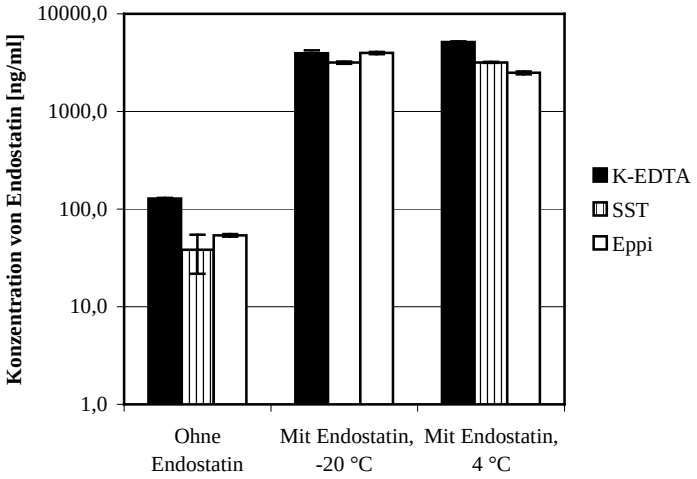


Abbildung 27: Handhabung der Endostatin-Proben nach der Blutentnahme: Murines Blut von Balb/c Mäusen wurde nach der Blutabnahme in jeweils drei K-EDTA-, SST- oder Eppi-Röhrchen aufbewahrt, wobei zu jeweils zwei 300 ng murines Endostatin zugegeben wurde und 30 min bei RT aufgewahrt wurde. Nach Gewinnung des Blutserums bzw. –plasmas durch Zentrifugation wurden die Proben für 1 h entweder bei 4 °C aufbewahrt oder bei –20 °C eingefroren. Danach wurde die Konzentration des murinen Endostatins per ELISA in Duplikaten gemessen.

Es zeigt sich, dass das Einfrieren und Auftauen der Probe im Vergleich zu der bei 4 °C aufbewahrten zu keiner Verfälschung der Messergebnisse führte. Bei der Verwendung von K-EDTA-Röhrchen lagen die gemessenen Endostatin-Konzentrationen bei 3952±290 ng/ml nach Einfrieren-Auftauen und bei 5157±76 ng/ml bei der Aufbewahrung bei 4 °C. Wurden die SST-Röhrchen verwendet, lagen die Endostatin-Konzentrationen bei 3163±79 ng/ml und bei 3183±29 ng/ml nach Einfrieren-Auftauen bzw. Aufbewahrung bei 4 °C. Für die Eppi-Röhrchen betrugen die Endostatin-Konzentrationen nach Einfrieren-Auftauen 3967±96 ng/ml, bei der Aufbewahrung bei 4 °C 2488±86 ng/ml. Diese Schwankungen zwischen Einfrieren-Auftauen können dadurch erklärt werden, dass nicht immer genau dieselbe Menge an Blut bei der Abnahme in jedes Röhrchen gegeben werden konnte, da aufgrund des technischen Gegebenheit des Experiments ein schneller Transfers des Blutes nach Töten der Tieren notwendig war um eine Gerinnung zu verhindern. Dies erfolgte mit einer 2 ml Spritze, deren Skalierung allerdings sehr grob für die hier verwendeten Volumina war. Deshalb konnte das Volumen bei gleichbleibender Zugabemenge von Endostatin etwas unterschiedlich sein. Es konnte hierbei jedoch gezeigt werden, dass die Ergebnisse sich innerhalb derselben Größenordnung befanden. Bei den Negativkontrollen fiel auf, dass bei der Bestimmung der Endostatin-Konzentration im Blutplasma, das durch die Verwendung von K-EDTA-Röhrchen

gewonnen wurde, ein weitaus höherer Hintergrundswert von 127±2 ng/ml gemessen wurde im Vergleich zu den Endostatin-Werten aus Blutserum, der bei 38±1 ng/ml bei der Verwendung von SST-Röhrchen und bei 54±2 ng/ml bei der Verwendung von Eppi-Röhrchen lag. Deshalb wurde für weitere Versuche die Verwendung von SST-Röhrchen, deren Handhabung in diesen Versuchen einfacher als Eppendorf-Röhrchen ist, bevorzugt.

Es war jedoch nicht auszuschließen, dass murines Endostatin exprimiert wurde, von dem Detektionssystem jedoch fehlerhaft erkannt wurde. Um dies zu überprüfen wurde das murine Endostatin-Protein direkt in einem ELISA mit verschiedenen Konzentrationen gemessen.

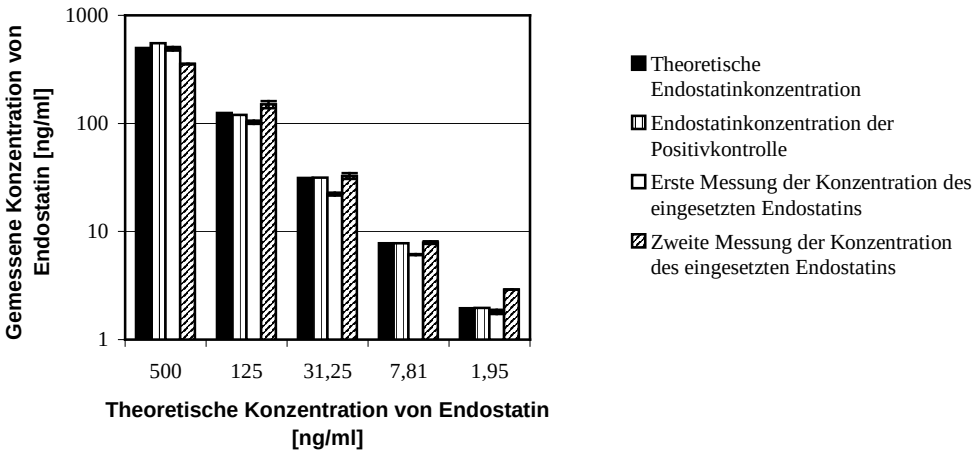


Abbildung 28: Überprüfung des Nachweises des Endostatin-Proteins: Verschiedene Verdünnungen des in die Mäuse injizierten murinen Endostatin-Proteins wurden in zwei unabhängigen Versuchen per ELISA jeweils in Duplikaten detektiert.

Bei diesem Versuch war zu erkennen, dass die gemessenen Konzentrationen des eingesetzten Endostatin-Proteins mit der theoretischen Konzentration übereinstimmte, das verwendete murine Endostatin also in korrekter Quantität von dem verwendeten ELISA-Detektionssystem erkannt wurde. Für die eingesetzte Endostatin-Konzentration von 500 ng/ml wurden 492±19 ng/ml und 355±1 ng/ml, für die Konzentration von 125 ng/ml wurden 103±4 ng/ml und 150±12 ng/ml, für die murine Endostatin-Konzentration von 31,3 ng/ml wurden 22,2±0,7 ng/ml und 32,7±2,0 ng/ml, für die Endostatin-Konzentration von 7,8 ng/ml wurden 6,1±0,1 ng/ml und 7,9±0,2 ng/ml und für die Konzentration von 1,95 ng/ml wurden 1,80±0,08 und 2,90±0,01 erhalten. Damit konnte das eingesetzte murine Endostatin bzw. der AAV-Vektor zur Expression des murinen Endostatins für weitere Versuche verwendet werden.

4.3.4 Überprüfung der Detektion des murinen Endostatins *in vivo*

Als weitere Fehlerursache für das negative Ergebnis in 4.3.2 könnte eine mögliche Maskierung des Endostatins sein, so dass dies durch den ELISA nicht mehr erkannt werden konnte oder überschüssiges Endostatin könnte im Organismus der Maus gebunden sein, so dass es im Blutplasma nicht detektierbar wäre. Um dies zu testen wurden unterschiedliche Mengen an murinem Endostatin in Balb/c- und C57Bl/6-Mäuse injiziert. Nach einer Inkubationsdauer von 20 min wurden die Mäuse getötet, die Blutseren gewonnen und die Menge an Endostatin bestimmt.

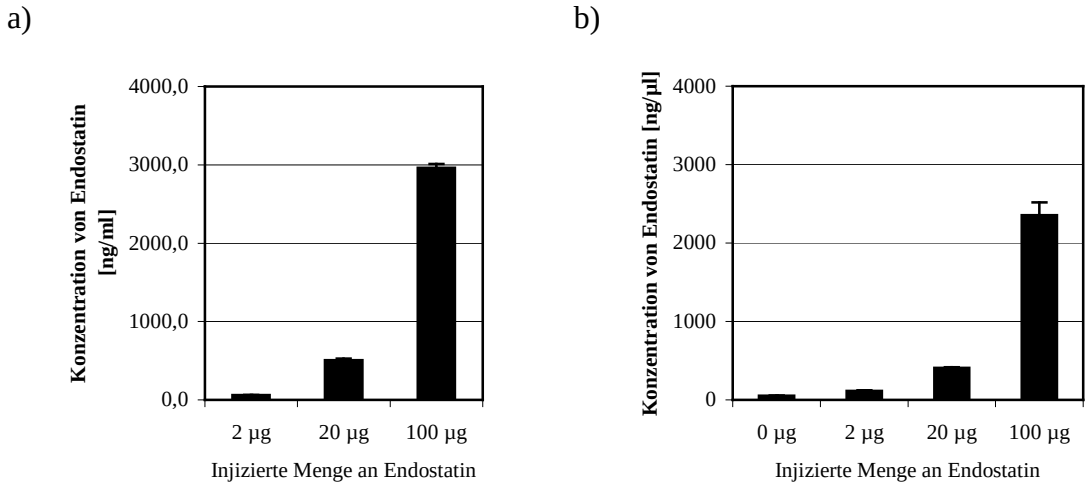


Abbildung 29: Detektion von murinem Endostatin nach intravenöser Injektion des Proteins in Balb/c- und C57Bl/6-Mäuse: Endostatin-Protein wurde in verschiedenen Mengen in die Schwanzvene von Balb/c-Mäusen (a) und C57Bl/6-Mäusen (b) injiziert. Nach 20 min wurde das Blut abgenommen und das Serum gewonnen. Die Menge an murinem Endostatin wurde per ELISA in Duplikaten detektiert.

Bei Injektion des Endostatin-Proteins in Balb/c-Mäuse wurde für die eingesetzte Menge von 2 µg eine murine Endostatin-Konzentration von 62,3±0,9 ng/ml gemessen, für die eingesetzte Menge von 20 µg erhielt man eine Konzentration von 505±21 ng/ml und für die eingesetzte Menge von 100 µg wurde eine Endostatin-Konzentration von 2962±52 ng/ml gemessen. Unter der Annahme, dass eine Maus ca. 1,5 bis 1,8 ml Blutvolumen hat (Diehl et al., 2001), wurden maximal für die Endostatin-Mengen 0,112±0,002 µg, 0,909±0,038 µg bzw. 5,314±0,094 µg murines Endostatin bei 2 µg, 20 µg bzw. 100 µg injiziertes Protein erhalten. Bei C57Bl/6-Mäusen wurde für die eingesetzte Menge von 2 µg eine murine Endostatin-Konzentration von 113±8 ng/ml gemessen, für die eingesetzte Menge von 20 µg erhielt man

eine Konzentration von 408±10 ng/ml und für die eingesetzte Menge von 100 µg wurde eine Endostatin-Konzentration von 2355±165 ng/ml gemessen. Wieder unter der Annahme, dass eine Maus maximal 1,8 ml Blutvolumen hat, wurden bei den C57Bl/6-Mäusen für die Endostatin-Mengen 0,203±0,014 µg, 0,734±0,018 µg bzw. 4,239±0,301 µg murines Endostatin bei 2 µg, 20 µg bzw. 100 µg injiziertes Protein erhalten. Hierbei ist zu erkennen, dass nur 4 % bis 5 % der ursprünglich eingesetzten Endostatin-Menge im ELISA detektiert worden war, unabhängig vom Mausstamm und der eingesetzten Endostatin-Menge.

4.3.5 Überprüfung Endostatin-Expression nach AAV-Infektion *in vitro*

Eine weitere Ursache der fehlenden Expression in 4.3.2 könnte dadurch bedingt sein, dass Endostatin nicht oder nur in geringer Menge nach Transduktion exprimiert wird. Jedoch wurde schon in Abbildung 24a in Kapitel 4.2.4 gezeigt werden, dass bei Infektion von $5{,}0 \cdot 10^5$ HeLa-Zellen mit $5{,}0 \cdot 10^9$ Vektoren (s. S. 81) die Endostatin-Konzentration in 4 ml Überstand für AAV-CMV-Endo 832±25 ng/ml betrug und für scAAV-CMV-Endo bei 1364±80 ng/ml. Dagegen lagen die Werte für die Negativkontrollen unter 10 ng/ml. Bei einem Volumen von 4 ml ergab dies eine Endostatin-Menge von 3328±100 ng bei AAV-CMV-Endo und 5456±320 ng bei scAAV-CMV-Endo.

4.3.6 Untersuchung des Einflusses der Administrationsroute

Einen Einfluss auf die Konzentrationshöhe des exprimierten Endostatins kann auch die Administrationsroute haben. Neben der systemischen Applikation über die Schwanzvene wie in Versuch 4.3.2 kann die systemische Applikation auch über die Milzkapsel erfolgen, oder lokal, indem die Vektoren intramuskulär injiziert werden. Um dies zu testen, wurden Mäuse mit scAAV-CMV-Endo über die Milzkapsel oder intramuskulär transduziert und die Endostatin-Konzentration im Blutserum überprüft.

Die gemessenen Konzentrationen an murinem Endostatin lagen bei 52,1±0,2 ng/ml, 60,8±1,0 ng/ml, 71,2±0,9 ng/ml und 64,6±4,1 ng/ml 4 Wochen nach Milzkapsel-Injektionen und bei 53,7±0,3 ng/ml, 45,6±1,0 ng/ml, 54,2±5,3 ng/ml und 49,0±0,2 ng/ml 4 Wochen nach intramuskulärer Injektion. 8 Wochen nach Milzkapsel-Injektionen wurden murine Endostatin-Konzentrationen von 56,0±3,1 ng/ml, 46,8±4,7 ng/ml, 49,7±4,1 ng/ml und 48,7±1,1 ng/ml und nach intramuskulärer Injektion 55,8±1,8 ng/ml, 49,5±1,1 ng/ml, 51,0±1,4 ng/ml und

42,0±1,9 ng/ml erhalten. Es ist erkennbar, dass sowohl 4 als auch 8 Wochen nach Injektion über die alternativen Administrationsrouten die erhaltenen Werte wieder bei ca. 60 ng/ml an muriner Endostatin-Konzentration lagen, welches auch die Werte der Endostatin-Konzentrationen der mit AAV-CMV-Endo über die Schwanzvene injizierten Tiere sowie der Kontrollgruppen unter 4.3.2 waren.

a) b)

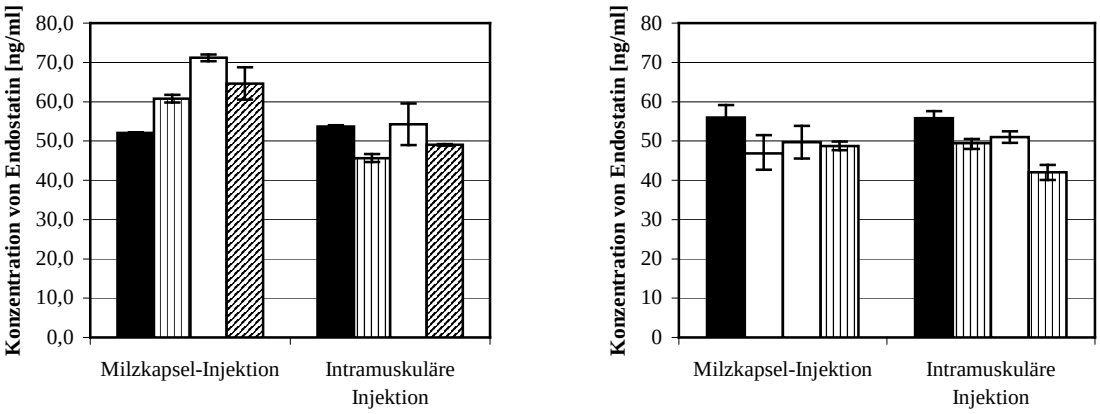


Abbildung 30: Einfluss der Administrationsroute auf die Expression von murinem Endostatin 4 und 8 Wochen nach AAV-Administration: scAAV-CMV-Endo wurde Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Nach Bestimmung des genomischen Titers wurden $1{,}3 \cdot 10^{11}$ Viren auf 200 µl mit PBS verdünnt und in jeweils 4 Balb/c Mäuse durch eine Milzkapsel-Injektion bzw. intramuskulär injiziert. Es wurden jeweils 200 µl venöses Blut nach 4 Wochen (a) und 8 Wochen (b) abgenommen, das Plasma isoliert und die Endostatin-Konzentration per ELISA in Duplikaten bestimmt.

Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine der Ursachen das Transgen selbst war. Aus diesem Grund wurden die Versuche unter Verwendung von AAV-GFP und scAAV-GFP Vektoren wiederholt und die Expression des Transgens GFP nach 2 Tagen per FACS-Analyse der Leberzellen, die eine der Zielorgane von AAV bei systemischer Applikation darstellen, überprüft.

Injizierter Vektor	Anzahl positiver Zellen [%]	
Negativkontrolle	0,01	
AAV-GFP	0,06	0,02
scAAV-GFP	0,06	0,04

Tabelle 6: Einfluss der Administrationsroute auf die Expression von GFP in der Leber 2 Tage nach AAV-Administration: AAV-GFP und scAAV-GFP wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Nach Bestimmung des genomischen Titers wurden jeweils $3{,}2 \cdot 10^{11}$ scAAV-GFP bzw. AAV-GFP auf 200 µl mit PBS verdünnt und in die Schwanzvene bzw. Milzkapsel von Balb/c-Mäusen injiziert. 2 Tage nach Infektion wurden die Leberzellen von jeweils 2 Tieren geerntet, Einzelzellen gewonnen und die Expression von GFP in den Leberzellen der mit AAV-GFP bzw. scAAV-GFP per Schwanzvenen-Injektion transduzierter Mäuse durch FACS-Analyse bestimmt. Als Negativkontrollen dienten Leberzellen einer uninfizierten Balb/c-Maus.

2 Tage nach AAV-Administration war eindeutig zu erkennen, dass keine GFP-positiven Zellen in der Leber der Mäuse messbar waren. Um jedoch auszuschließen, dass die Inkubationszeit zu kurz war, wurden von weiteren Tieren die Expression von GFP in den Leberzellen 4 Wochen nach AAV-Administration per FACS Analyse bestimmt.

Injizierter Vektor	Art der Administration	Anzahl positiver Zellen [%]		
Negativkontrolle	–	0,07	0,03	0,03
AAV-GFP	Schwanzvenen-Injektion	0,03	0,05	0,04
scAAV-GFP	Schwanzvenen-Injektion	0,03	0,07	0,045
scAAV-GFP	Milzkapsel-Injektion	0,00	0,04	0,05

Tabelle 7: Einfluss der Administrationsroute auf die Expression von GFP in der Leber 4 Wochen nach AAV-Administration: AAV-GFP und scAAV-GFP wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Nach Bestimmung des genomischen Titers wurden jeweils $3{,}2 \cdot 10^{11}$ Vektoren auf 200 µl mit PBS verdünnt und in die Schwanzvene und Milzkapsel von Balb/c-Mäusen injiziert. 4 Wochen nach Transduktion wurden die Leberzellen von jeweils 3 Tieren geerntet, Einzelzellen gewonnen und die Expression von GFP in den Leberzellen der mit AAV-GFP und scAAV-GFP per Schwanzvenen-Injektion transduzierten Mäuse bzw. der mit scAAV-GFP über die Milzkapsel transduzierten Mäuse durch FACS-Analyse bestimmt. Als Negativkontrollen dienten Leberzellen von drei uninfizierten Balb/c-Mäusen.

Auch nach 4 Wochen konnte keine Expression des GFP in der Leber nachgewiesen werden, gleich welche Administrationsroute verwendet wurde. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass nach Milzkapsel-Injektion der Grossteil der Infektion und damit der Transgen-Expression in der Milz selbst statt fand. Um dies zu überprüfen wurden von den in Tabelle 7 verwendeten Tieren die Milz entnommen und auf GFP-Expression untersucht.

Injizierter Vektor	Art der Administration	Anzahl positiver Zellen [%]		
Negativkontrolle	–	0,04		0,09
scAAV-GFP	Milzkapsel-Injektion	0,13	0,26	0,17

Tabelle 8: Überprüfung der Expression von GFP in der Milz 4 Wochen nach Milzkapsel-Injektion: Von den in Tabelle 7 untersuchten 3 Mäusen nach Milzkapsel-Injektion wurden die Milzzellen geerntet, Einzelzellen gewonnen und die Expression von GFP in den Milzzellen der Mäuse per FACS Analyse bestimmt. Als Negativ-kontrollen dienten Milzzellen von zwei uninfizierten Balb/c-Mäusen.

Hierbei war jedoch zu erkennen, dass auch in der Milz nach einer Milzkapsel-Injektion keine Expression detektierbar war. Dies bedeutet, dass unabhängig von der Administrationsroute, des Transgens und dem Zeitpunkt der Analyse nach Infektion keine Expression des trans-ferierten Transgens gemessen werden konnte.

4.3.7 Untersuchung der Anwesenheit der viralen Genome nach *in vivo* Infektionen

Einer der Gründe für die negativen Ergebnisse bei den Untersuchungen der Transgen-Expression in 4.3.2 könnte sein, dass die Vektoren nach Applikation von Zellen aufgenom-men wurden, in denen sie abgebaut werden, oder auch aus den Zielzellen schnell eliminiert wurden, so dass keine Transgen-Expression stattfinden konnte. Um dies zu Überprüfen, sollte die Anwesenheit von AAV-Genomen nach Infektion in Mäusen untersucht werden. Hierzu wurden Mäuse analog zu 4.3.6 mit scAAV-GFP behandelt, die Leberzellen geerntet und die DNA, die auch die virale DNA des AAV enthalten sollte, isoliert und per quantitativer PCR die Menge an viraler DNA bestimmt.

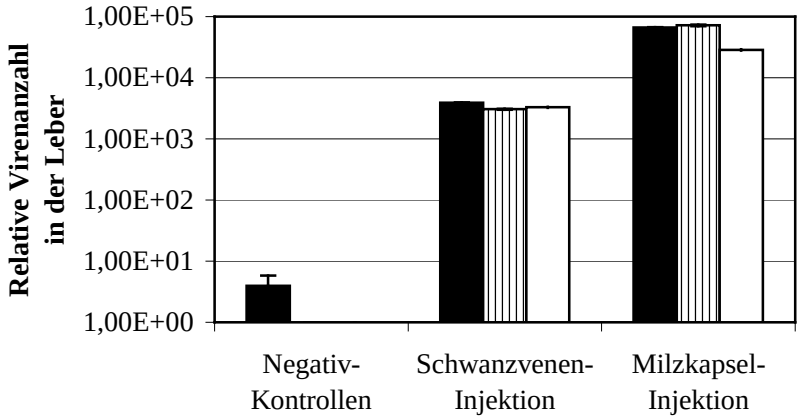


Abbildung 31: Anzahl der viralen scAAV-GFP Genome in der Leber 4 Wochen nach Infektion: scAAV-GFP wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Nach Bestimmung des genomischen Titers wurden jeweils $3{,}2 \cdot 10^{11}$ Viren auf 200 µl mit PBS verdünnt und in die Schwanzvene oder in die Milzkapsel von Balb/c-Mäusen injiziert. 4 Wochen nach Infektion wurden die Leberzellen von jeweils 3 Tieren geerntet, die DNA isoliert und die Menge an viralen Genomen per quantitativer PCR unter Verwendung der Primer „PCR GFP forward" und „PCR GFP reverse" in Triplikaten bestimmt. Als Negativkontrollen wurden die Leber von 3 uninfizierten Mäusen verwendet.

Hier war eindeutig zu erkennen, dass das Transgen in der Leber 4 Wochen nach Injektion vorhanden war. Für die Schwanzvenen-Injektion lagen die relativen Werte bei $(3{,}9 \pm 0{,}1) \cdot 10^3$, $(3{,}1 \pm 0{,}1) \cdot 10^3$ und $(3{,}3 \pm 0{,}1) \cdot 10^3$, für die Injektion in die Milzkapsel bei $(6{,}7 \pm 0{,}1) \cdot 10^4$, $(7{,}2 \pm 0{,}2) \cdot 10^4$ und $(2{,}9 \pm 0{,}1) \cdot 10^4$. Die Menge an relativen viralen Genomen in der Leber waren nach der Injektion in die Milzkapsel mit durchschnittlich $(5{,}6 \pm 0{,}2) \cdot 10^4$ ca. 20-fach höher als nach der Schwanzveneninjektion, die durchschnittlich bei $(3{,}4 \pm 0{,}1) \cdot 10^3$ lag. Dies bedeutet, dass die Infektionsrate von AAV bei Administration in die Milzkapsel wesentlich besser funktioniert als bei Injektion in die Schwanzvene. Ferner war bei der Milzkapsel-Injektion noch zu untersuchen, ob ein gewisser Teil der injizierten AAV in der Milz selbst „hängen" blieb.

Bei der Überprüfung der Anzahl der relativen viralen Genome in der Milz nach Milzkapsel-Injektion wurden $(1{,}3 \pm 0{,}1) \cdot 10^4$, $(2{,}8 \pm 0{,}2) \cdot 10^3$ und $(1{,}2 \pm 0{,}1) \cdot 10^4$ erhalten (s. Abbildung 32). Hierdurch war zu erkennen, dass nach Injektion in die Milzkapsel nur durchschnittlich $(9{,}0 \pm 0{,}8) \cdot 10^3$ relative virale Genome gemessen wurden, was einem Wert von ca. 16 % der Menge an relativen viralen Genomen in der Leber entsprach, die durchschnittlich

$(5,6\pm0,2)\cdot10^4$ relative virale Genome betrugen (s. Abbildung 31).

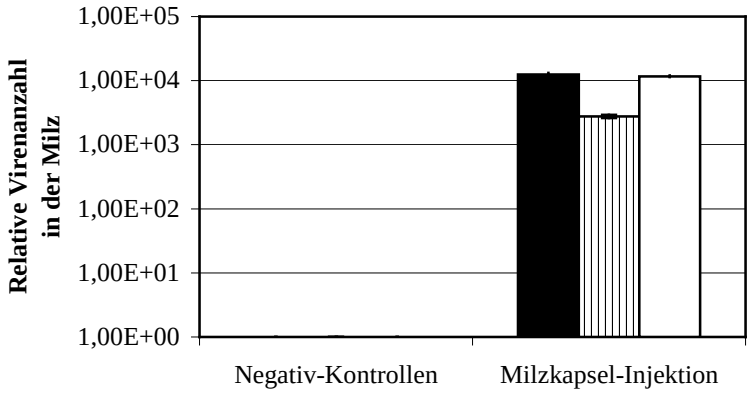


Abbildung 32: Anzahl der viralen scAAV-GFP Genome in der Milz 4 Wochen nach Infektion: Von den in Abbildung 31 verwendeten 3 Mäusen, die die AAV durch Milzkapsel-Injektionen erhalten hatten, wurden parallel zur Leberentnahme die Milz geerntet, daraus die DNA isoliert und die Menge an viralen Genomen per quantitativer PCR unter Verwendung der Primer „PCR GFP forward" und „PCR GFP reverse" in Triplikaten bestimmt. Als Negativkontrollen dienten Milzzellen von drei unbehandelten Mäusen.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden analoge Experimente mit AAV-CMV-Endo durchgeführt.

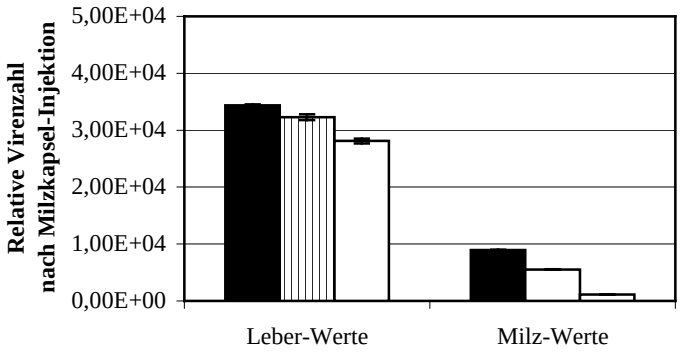


Abbildung 33: Anzahl der viralen scAAV-CMV-Endo Genome in der Leber und der Milz 10 Wochen nach Infektion: scAAV-CMV-Endo wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Nach Bestimmung des genomischen Titers wurden $1,3\cdot10^{11}$ Viren auf 200 µl mit PBS verdünnt und in die Milzkapsel von Balb/c-Mäusen injiziert. 10 Wochen nach Infektion wurden die Leber- und Milzzellen von 3 Tieren geerntet, die DNA isoliert und die Menge an viralen Genomen per quantitativer PCR unter Verwendung der Primer „PCR CMV forward" und „PCR CMV reverse" in Triplikaten bestimmt.

10 Wochen nach Milzkapsel-Injektion lagen die Werte der relativen Genomanzahl in der Leber bei $(3,4\pm0,1)\cdot10^4$, $(3,2\pm0,1)\cdot10^4$ und $(2,8\pm0,1)\cdot10^4$ wogegen in der Milz die Werte bei $(8,9\pm0,1)\cdot10^3$, $(5,5\pm0,1)\cdot10^3$ und $(1,1\pm0,1)\cdot10^3$ lagen. Auch hier ist zu erkennen, dass nach Milzkapsel-Injektion die überwiegende Menge an viralen Genomen in der Leber vorkam, da die relative Vektorenanzahl hier durchschnittlich bei $(3,2\pm0,1)\cdot10^4$ lag, dagegen in der Milz durchschnittlich nur bei $(5,2\pm0,1)\cdot10^3$, was ca. 16 % des Leberwertes entsprach.

4.3.8 Untersuchung der mRNA- und DNA- Menge in Leberzellen nach AAV-Infektion

Um nun zu untersuchen, auf welcher Ebene der Expression, nämlich der Transkription oder der Translation, die Herstellung der Transgen-Proteine nicht stattfand, wurden die mRNA-Partikel des Transgens und DNA-Partikel in der Leber nach Infektion mit scAAV-GFP untersucht. Hierzu wurden Mäuse mit scAAV-GFP über die Schwanzvene infiziert und die Leberzellen geerntet. Aus diesen wurden die DNA, die auch die virale DNA des AAV enthalten sollte, und die RNA, die auch die mRNA für das GFP-Protein enthalten sollte, isoliert und per quantitativer PCR bzw. RT-PCR die Menge an viraler DNA und GFP-mRNA bestimmt.

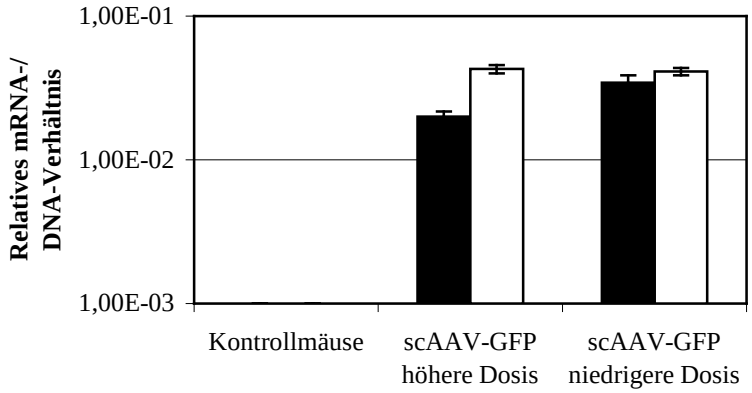


Abbildung 34: mRNA/DNA-Verhältnis in der Leber 4 Wochen nach scAAV-GFP Transduktion: scAAV-GFP wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Nach Bestimmung des genomischen Titers wurden $1,3\cdot10^{10}$ Viren bzw. $1,3\cdot10^9$ Viren auf 200 µl mit PBS verdünnt und damit jeweils 2 Balb/c-Mäuse per Schwanzvenen-Injektion infiziert. 4 Wochen nach Transduktion wurden die Leberzellen der Tiere geerntet und die DNA und die Gesamt-RNA isoliert. Die Anzahl der viralen DNA- und mRNA-Partikel wurden per quantitativer PCR und quantitativer RT-PCR unter Verwendung der Primer „RT-PCR GFP reverse", „PCR GFP forward" und „PCR GFP reverse" in Triplikaten bestimmt. Als Negativkontrolle dienten zwei uninfizierte Balb/c-Mäuse.

Hierbei lagen die Werte für das relative mRNA/DNA-Verhältnis nach Injektion der niedrigeren Dosis bei $(2,0\pm0,2)\cdot10^{-2}$ und $(4,3\pm0,3)\cdot10^{-2}$, im Durchschnitt bei $(3,1\pm0,3)\cdot10^{-2}$, nach Injektion der höheren Dosis bei $(3,4\pm0,4)\cdot10^{-2}$ und $(4,1\pm0,3)\cdot10^{-2}$, im Durchschnitt bei $(3,8\pm0,5)\cdot10^{-2}$. Dabei ist zu erkennen, dass ca. um den Faktor 100 weniger mRNA in den Leberzellen vorhanden ist als DNA. Dies war unabhängig von der Anzahl der ursprünglich injizierten AAV. Um jedoch sicher zu gehen, dass in diesem Versuch auch wiederum keine Expression stattfand wurden von identisch behandelten Mäusen die Leberzellen nach 4 Wochen geerntet und per FACS-Analyse auf das Vorhandensein von GFP überprüft.

Wie auch schon bei den vorherigen Versuchen, konnte auch hier wiederum keine Transgen-Expression detektiert werden.

Tiernummer	Prozent positiver Zellen
a1	0.01
a2	0,01
b1	0,01
b2	0,01
c1	0,00
c2	0,01

Tabelle 9: Überprüfung der Transgen-Expression 4 Wochen nach AAV-Transduktion: scAAV-GFP wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Nach Bestimmung des genomischen Titers wurden $1,3\cdot10^{10}$ Viren (b1, b2) bzw. $1,3\cdot10^{9}$ Viren (c1, c2) auf 200 µl mit PBS verdünnt und jeweils 2 Balb/c-Mäuse per Schwanzvenen-Injektion infiziert. 4 Wochen nach Transduktion wurden die Leberzellen von je 2 Tieren geerntet, Einzelzellen isoliert und per FACS auf die GFP-Expression überprüft. Als Negativkontrollen dienten uninfizierte Balb/c-Mäuse (a1, a2). Gezeigt ist der Anteil positiver Zellen in %.

Wie auch schon bei den vorherigen Versuchen, konnte auch hier wiederum keine Transgen-Expression detektiert werden.

Um nun als Vergleich das mRNA/DNA-Verhältnis bei einer positiven Transgen-Expression zu überprüfen, sollten diese Versuche mit infizierten HeLa-Zellen als Vergleichskontrolle wiederholt werden.

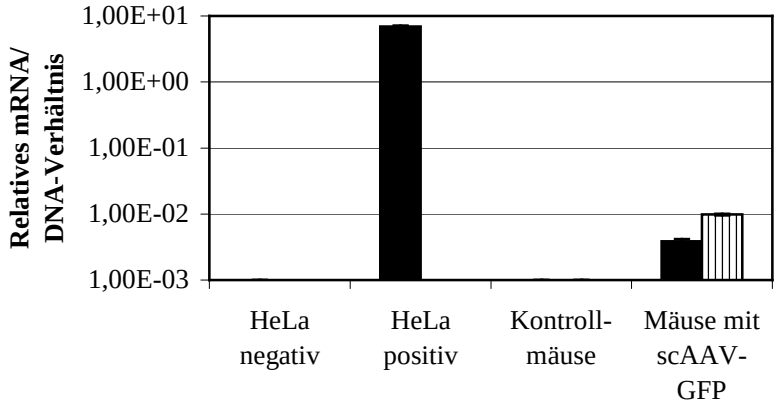


Abbildung 35: mRNA/DNA-Verhältnis in der Leber 1 Wochen nach scAAV-GFP Transduktion: scAAV-GFP wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Nach Bestimmung des genomischen Titers wurden $1{,}3 \cdot 10^{11}$ Viren auf 200 µl mit PBS verdünnt und 2 Balb/c-Mäuse per Schwanzvenen-Injektion infiziert. 1 Woche nach Transduktion wurden die Leberzellen von den Tieren geerntet und die DNA und die RNA isoliert. Als Vergleichskontrolle wurden uninfizierte HeLa-Zellen und HeLa-Zellen, die mit $4{,}0 \cdot 10^7$ (Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle (multiplicity of infection, moi) ≈ 300) infiziert wurden, verwendet und die DNA und Gesamt-RNA 48 h nach Transduktion isoliert. Die Anzahl der viralen DNA- und mRNA-Moleküle wurden per quantitativer PCR und quantitativer RT-PCR unter Verwendung der Primer „RT-PCR GFP reverse", „PCR GFP forward" und „PCR GFP reverse" in Triplikaten bestimmt. Als Negativkontrolle dienten zwei uninfizierte Balb/c-Mäuse.

Hier war zu erkennen, dass bei der Vergleichskontrolle, den AAV-infizierten HeLa-Zellen, eine ca. 10-fach höhere Konzentration von mRNA als DNA vorhanden war und ein mRNA/DNA-Verhältnis von 7,0±0,2 messbar war, eine ca. 1000-fach höheres Verhältnis als bei den *in vivo* Versuchen (vgl. Abbildung 34, S. 94).

4.3.9 Untersuchung des Einflusses von Kupffer Sternzellen auf die Persistenz der AAV-Transduktion

Weiterhin sollte untersucht werden, ob möglicherweise AAV, wie es schon für Adenoviren gezeigt wurde, von Makrophagen bis zu deren Sättigung aufgenommen und abgebaut werden. Erst nach deren Sättigung würden die gewünschten Transgen-exprimierenden Zellen infiziert werden. Die nachgewiesenen DNA-Partikel bei 4.3.7 könnten zu gering für einen Nachweis der Expression gewesen sein. Um dies zu untersuchen, wurden zwei Ansätze durchgeführt:

- Nachweis der Lokation des AAV in Kupffer Sternzellen der Leber durch immunhistochemische Methoden unter Verwendung von Leberschnitten.
- Nachweis der Erhöhung der DNA-Partikel 4 Wochen nach der Transduktion bei Elimination der Kupffer Sternzellen vor der Transduktion, sowie Überprüfung der Expression von murinem Endostatin.

4.3.9.1 Nachweis der Lokalisation der AAV in Kupffer Sternzellen

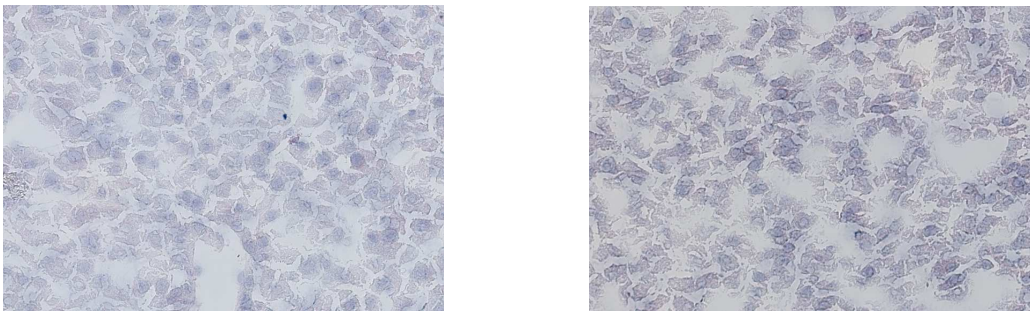
Falls, wie bei den Adenoviren berichtet, auch im AAV-System die Viren bis zur Absättigung der Kupffer Sternzellen von diesen Zellen aufgenommen werden, sollte bei einer immunhistochemischen Doppelfärbung eine Lokalisation der AAV in Kupffer Sternzellen nachweisbar sein. Hierzu mussten erst die optimalen Bedingungen für den Nachweis der Kupffer Sternzellen und der AAV in Leberschnitten gefunden werden. Primär wurden deshalb die Experimente mit Formalin- und Chloroformfixierung, sowie verschiedenen Antikörper- und den entsprechenden Isotyp-Verdünnungen durchgeführt.

4.3.9.1.1 Immunhistochemischer Nachweis von Kupffer Sternzellen

Der immunologische Nachweis der Kupffer Sternzellen wurde unter Berücksichtigung der veröffentlichten Experimente (Tao et al., 2001) durchgeführt, wobei als Detektionssystem das APAAP-System verwendet wurde. Die Schnitte wurden nach Fixierung mit Formalin oder Chloroform mit Hilfe verschiedener Antikörperverdünnungen und entsprechenden Verdünnungen der Isotyp-Kontrollen wie unter 3.13.1.7 beschrieben behandelt.

In den Gewebeschnitten konnten die Kupffer Sternzellen eindeutig durch die an den Zellwänden sichtbare Rotfärbung, die weder in der Systemkontrolle noch in der Isotyp-Kontrolle vorhanden war, nachgewiesen werden (Abbildung 36, S. 98). Ferner wurde festgestellt, dass bei der Fixierung mit Chloroform die Makrophagen-Färbung besser war als bei der Fixierung mit Formaldehyd, so dass die Chloroform-Fixierung für weitere Färbungen zu bevorzugen war.

a) b)



c)

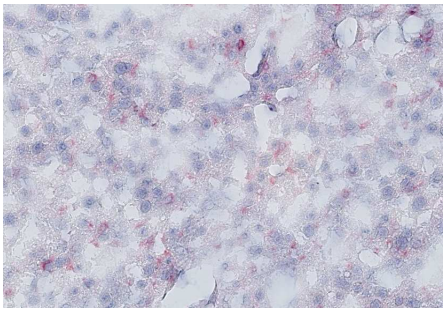


Abbildung 36: Immunhistochemischer Nachweis von Kupffer Sternzellen in Leberschnitten: Gewebeschnitte von Leber unbehandelter Balb/c-Mäuse wurden mit Chloroform fixiert und wie unter 3.13.1.7 beschrieben die Immunhistochemie mit verschiedenen Konzentrationen des Primärantikörpers anti-Maus F4/80 aus Ratte (c) und den identischen Verdünnungen der Isotyp-Kontrolle (Ratten IgG2b Antikörper) (b), sowie des Antikörper-Verdünnungsmediums als Systemkontrolle (a) durchgeführt. Die Zellkerne wurden durch Gegenfärbung mit Hämalaun sichtbar gemacht.

4.3.9.1.2 Immunhistochemischer Nachweis von AAV

Nach dem Einzelnachweis der Makrophagen musste vor der Doppelfärbung die Optimierung des AAV-Nachweises durchgeführt werden. Als Färbesystem sollte hierbei das Biotin-DAB-System verwendet werden, das positive Signale durch eine Braunfärbung aufzeigt. Diese Färbung hebt sich gut von der Rotfärbung der positiven Signale der Kupffer Sternzellen und der Blaufärbung der Zellkerne durch Hämalaun ab.

Für den Nachweis von AAV gab es zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente nur monoklonale Antikörper aus der Maus und polyklonale Antikörper aus Kaninchen. Zwar ist die Verwendung von polyklonalen Antikörpern in der Immunhistochemie nicht zu favorisieren, jedoch war die einzige Alternative die Verwendung eines monoklonalen anti-AAV Antikörpers aus der Maus, demselben System wie die Gewebeschnitte. Da die Verwendung eines Maus-auf-Maus-Systems mit einer potentiellen größeren Fehlerproblematik

durch zusätzliche Schritte gekennzeichnet ist, wurde zuerst die Verwendung des polyklonalen Antikörpers überprüft.

Hierbei war zu erkennen, dass bei den Isotyp-Kontrollen positive Signale erhalten wurden (s. Abbildung 37a), der Hintergrund also zu stark für eine Detektion der AAV war. Deshalb wurde für den Nachweis das Antikörpersystem gewechselt. Hierbei wurde derselbe Versuch wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch wurde als Primärantikörper ein aus der Maus gewonnener und gereinigter anti-AAV Antikörper verwendet. Da auch die Gewebeschnitte von der Maus stammten, mussten die darauf vorhandenen murinen Antikörper eliminiert oder maskiert werden. Dies wurde durch die Verwendung eines Maus-auf-Maus-Systems erreicht.

Auch hier war wieder erkennbar (s. Abbildung 37b), dass die Isotypkontrolle in der Verdünnung, in denen der Antikörper verwendet werden sollte, positive Signale aufwiesen. Zwar wurden die endogenen Antikörper des Gewebeschnittes maskiert, jedoch weisen Leberschnitte auch eine erhöhte Biotin-Konzentration auf. Da das verwendete Detektionssystem über Biotin funktioniert, könnte diese endogene Biotin-Konzentration als Hintergrund sichtbar sein. Deshalb sollte der Versuch unter Verwendung eines Biotin-Blockierungs-Systems nochmals wiederholt werden, wobei endogenes Biotin blockiert wird.

Auch hier war wieder zu erkennen, dass die Gewebeschnitte der Isotypkontrolle positive Signale aufwiesen und damit eine Detektion der AAV bei diesem Hintergrund nicht ermöglichte (s. Abbildung 37c). Möglicherweise wurde die Problematik des starken Hintergrundes durch das Detektionssystem selbst ausgelöst. Deshalb konnte als weitere Möglichkeit für eine Detektion der AAV noch das Detektionssystem gewechselt werden, wobei als alternatives Detektionssystem das APAAP-Systems verwendet wurde. Dieses hat den Vorteil, dass es schon erfolgreich bei der Detektion der Kupffer Sternzellen eingesetzt worden war, das System selbst also funktionierte. Bei einer Doppelfärbung von AAV unter Verwendung des APAAP-Systems mit den Kupffer Sternzellen hätte allerdings dann das Detektionssystem für die Kupffer Sternzellen gewechselt werden müssen.

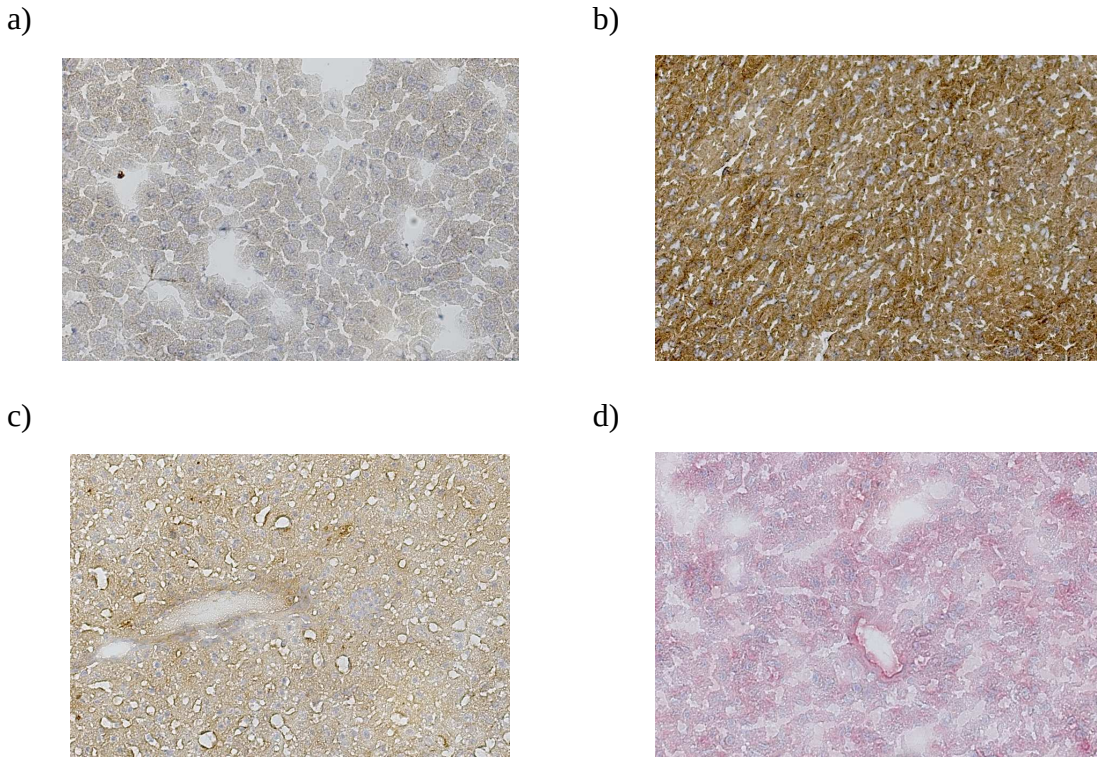


Abbildung 37: Immunhistochemischer Nachweis von AAV mit Hilfe eines polyklonalen anti-AAV Antikörpers in Leberschnitten: scAAV-CMV-Endo wurde Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt und der genomische Titer bestimmt. Je $1{,}6 \cdot 10^{11}$ Viren auf 300 µl mit PBS verdünnt und in die Schwanzvene von 2 Balb/c-Mäusen injiziert. Nach 2 Stunden wurden die Mäuse getötet und Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden mit Chloroform fixiert und wie unter 3.13.1.3 (a), 3.13.1.4 (b), 3.13.1.5 (c) bzw. 3.13.1.6 (d) beschrieben die Immunhistochemie mit den Verdünnungen 1:5 (a, b) bzw. 1:10 (c, d) der Isotyp-Kontrollen, welche den gewünschten Verdünnungen der Antikörper entsprechen würde, durchgeführt. Die Zellkerne wurden durch Gegenfärbung mit Hämalaun sichtbar gemacht.

Allerdings war auch hier wieder kein Unterschied zwischen den mit anti-AAV-Antikörper behandelten Gewebeschnitten und den Kontrollen nachweisbar (s. Abbildung 37d). Da es nicht möglich war, mit den vorhandenen Systemen den Hintergrund zu eliminieren, wurde der Nachweis der möglichen Aufnahme von AAV und deren Elimination in Kupffer Sternzellen mit Hilfe der quantitativen PCR durchgeführt.

4.3.9.2 Einfluss der Elimination der Kupffer Sternzellen auf die Erhöhung der DNA-Partikel sowie der Expression von murinem Endostatin

Falls die Aufnahme von AAV in die Kupffer Sternzellen für die negativen Ergebnisse der Expression verantwortlich waren, sollte nach deren Elimination, was durch Injektion von

Clodronat in Liposomen erreicht werden kann (Van Rooijen und Sanders, 1996; Schiedner et al., 2003), die Aufnahme in den Hepatozyten erhöht sein und die Expression des transferierten Transgens 4 Wochen nach AAV-Transduktion nachweisbar sein.

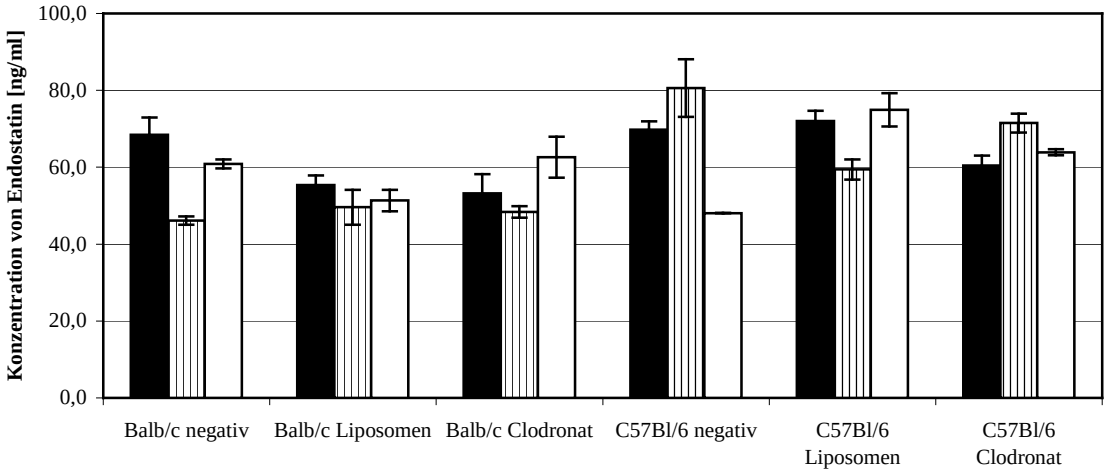


Abbildung 38: Einfluss der Kupffer Sternzellen auf die Expression von murinem Endostatin 4 Wochen nach Transduktion: scAAV-CMV-Endo wurde Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und des Iodixanol-Gradienten aufgereinigt und der genomische Titer bestimmt. Balb/c-Mäuse und C57Bl/6-Mäuse wurden mit 200 µl Clodronat-Liposomen zur Elimination der Kupffer Sternzellen behandelt. 48 h später wurden $1{,}3 \cdot 10^{11}$ Viren auf 300 µl mit PBS verdünnt und in die Schwanzvene von 3 Balb/c-Mäusen bzw. 3 C57Bl/6-Mäusen injiziert. Es wurden jeweils 200 µl venöses Blut nach 4 Wochen abgenommen, das Plasma isoliert und die Endostatin-Konzentration per ELISA in Duplikaten bestimmt. Als Kontrollen dienten jeweils drei uninfizierte Mäuse, sowie jeweils drei Mäuse, die nur 200 µl Liposomen injiziert bekamen.

Hierbei war zu erkennen, dass es sowohl bei den Balb/c-Mäusen als auch bei den C57Bl/6-Mäusen wiederum zu keiner Erhöhung der murinen Endostatin-Konzentration gekommen war. Die gemessenen Konzentrationen lagen bei 68,4±4,5 ng/ml, 46,1±1,1 ng/ml und 60,9±1,1 ng/ml für die unbehandelten Balb/c-Mäuse, 55,4±2,5 ng/ml, 49,6±4,6 ng/ml und 51,4±2,8 ng/ml für die Balb/c-Mäuse, die Liposomen erhalten hatten, und 53,2±5,0 ng/ml, 48,4±1,5 ng/ml und 62,6±5,3 ng/ml bei den Balb/c-Mäusen, die Clodronat-Liposomen erhalten hatten. Die Konzentrationen bei den C57Bl/6-Mäusen lagen bei 69,7±2,2 ng/ml, 80,6±7,5 ng/ml und 48,1±0,1 ng/ml für die unbehandelten Mäuse, 72,1±1,5 ng/ml, 59,4±2,6 ng/ml und 74,9±4,3 ng/ml für die Mäuse, die Liposomen erhalten hatten, und 60,4±1,6 ng/ml, 71,5±2,4 ng/ml und 63,9±0,8 ng/ml bei den Mäusen, die Clodronat-Liposomen erhalten hatten. Bei Balb/c-Mäusen wurden nach Elimination der Kupffer Stern-

zellen eine Endostatin-Konzentration von durchschnittlich 55±7 ng/ml erhalten, bei der Verwendung von Liposomen als Kontrollen durchschnittlich 52±6 ng/ml und bei unbehandelten Mäusen durchschnittlich 58±4 ng/ml. Bei C57Bl/6-Mäusen lag die murine Endostatin-Konzentration nach Elimination der Kupffer Sternzellen bei durchschnittlich 65±3 ng/ml, bei den Kontrollmäusen, die Liposomen erhielten bei durchschnittlich 69±5 ng/ml, und bei den unbehandelten C57Bl/6-Mäusen bei durchschnittlich 66±7 ng/ml.

Um auszuschließen, dass tatsächlich ein Effekt, die Erhöhung der Transduktionsrate in der Leber, stattfand und nur die Konzentration der exprimierten Endostatin-Proteine zu gering war um sich vom Hintergrund abzusetzen, wurde die Anzahl der viralen DNA-Partikel aus den Lebern der in Abbildung 38 verwendeten Mäusen bestimmt.

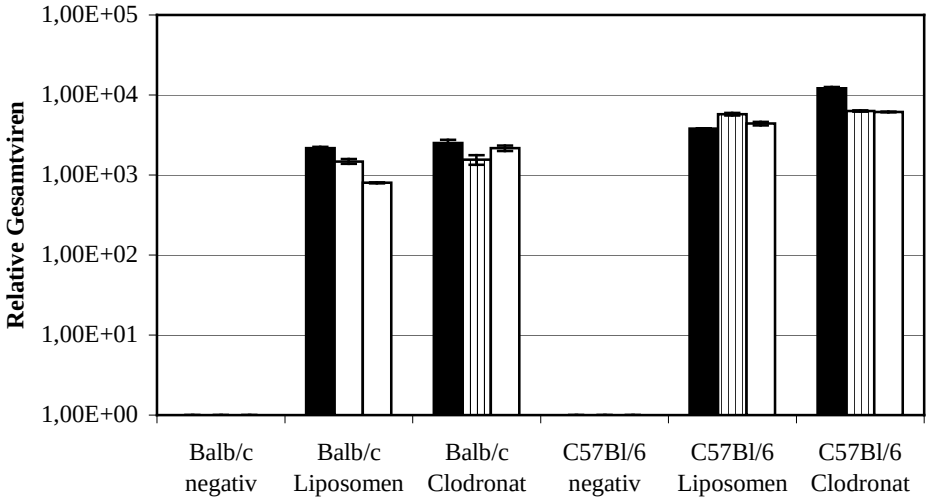


Abbildung 39: Einfluss der Kupffer Sternzellen auf die Anzahl der viralen DNA-Partikel in der Leber 4 Wochen nach Transduktion: Von den Mäusen, die in Abbildung 38 verwendet wurden, wurden die Leberzellen entnommen. Es wurde jeweils die DNA isoliert und die Menge an viralen Genomen von jeweils drei Mäusen pro Gruppe per quantitativer PCR unter Verwendung der Primer „PCR murines Endostatin forward“ und „PCR murines Endostatin reverse“ in Triplikaten bestimmt. Als Negativkontrollen wurden uninfizierte Mäuse verwendet.

Auch hier war zu erkennen, dass bei den Balb/c-Mäusen die Elimination der Kupffer Sternzellen keine wesentliche Erhöhung der Transduktionsrate zur Folge hatte. Es wurden nach Elimination der Kupffer Sternzellen eine relative DNA-Partikelzahl von $(2,5\pm0,2)\cdot10^3$, $(1,6\pm0,2)\cdot10^3$ und $(2,2\pm0,2)\cdot10^3$, im Durchschnitt $(2,1\pm0,4)\cdot10^3$, bei der Verwendung von Liposomen als Kontrollen $(2,2\pm0,1)\cdot10^3$, $(1,5\pm0,1)\cdot10^3$ und $(8,0\pm0,1)\cdot10^2$, im Durchschnitt

$(1,5\pm0,1)\cdot10^3$. Auch bei C57Bl/6-Mäusen wurden keine wesentlich erhöhten Werte an relativen DNA-Partikeln nach Elimination der Kupffer Sternzellen erhalten. Hierbei lagen die relativen DNA-Partikelzahlen nach Elimination der Kupffer Sternzellen bei $(1,2\pm0,1)\cdot10^4$, $(6,3\pm0,1)\cdot10^3$ und $(6,1\pm0,1)\cdot10^3$, im Durchschnitt bei $(8,2\pm0,3)\cdot10^3$, bei der Verwendung von Liposomen als Kontrollen $(3,8\pm0,1)\cdot10^3$, $(5,8\pm0,2)\cdot10^3$ und $(4,4\pm0,2)\cdot10^3$, im Durchschnitt $(4,7\pm0,3)\cdot10^3$. Die unbehandelten Kontrollmäuse wiesen jeweils keine DNA-Partikel in ihren Lebern auf.

4.4 Inhibition der AAV-Infektion durch Antikoagulanzien

4.4.1 Allgemein

Da die AAV-Infektion durch Heparin verhindert werden kann (Summerford und Samulski, 1998), Heparin aber weit verbreitet in der klinischen Anwendung ist (Hirsh, 1991), könnte es die Gentherapie mit AAV stark beeinträchtigen oder gar verhindern, wenn diese an heparinisierten Patienten durchgeführt würde. Aus diesem Grund war es interessant, ob alternative Antikoagulanzien die AAV-Infektion weniger stark beeinflussen würden. Für die Untersuchung des Ausmaßes der Inhibition der AAV-Infektion durch Antikoagulanzien wurden neben Heparin weitere im klinischen Alltag gebräuchliche Antikoagulanzien ausgewählt, die sich sowohl strukturell dem Heparin ähneln, als sich auch von ihm stark unterscheiden. Es wurden für diese Untersuchungen folgende Substanzen ausgewählt:

- Heparin.
- Tinzaparin-Natrium (Handelsname Innohep), ein niedermolekulares Heparin.
- Danaparoid-Natrium (Handelsname Orgaran), ein niedermolekulares Heparinoid.
- Hirudin (Handelsname Refludan), ein Peptid, das als Thrombin-Inhibitor wirkt.

Weiterhin sollte untersucht werden, wie schnell die Inhibitionen funktioniert, wobei die AAV für 10 min oder 2 h Zeit mit den Antikoagulanzien bei Raumtemperatur vorinkubiert werden, bevor sie auf Zellen gegeben wurden. Dabei war es essentiell auszuschließen, dass während der verschiedenen Vorinkubationszeit die Infektiosität *per se* unterschiedlich abnahm, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen würde.

Aufgrund dieser Überlegungen sollen folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Ist die Infektiosität der AAV nach der Vorinkubationszeit von 2 h im Vergleich zu der Infektiosität nach der Vorinkubationszeit von 10 min geringer?
- Wie stark inhibieren die eingesetzten Antikoagulanzien die AAV-Infektion und ist ein Unterschied nach den verschiedenen Vorinkubationszeiten zu erkennen?
- Tritt eine Veränderung der Inhibition bei Verwendung einer höheren AAV-Konzentration ein?

4.4.2 Auswirkung der Vorinkubationszeiten auf die AAV-Infektiosität

Da im folgenden Abschnitt eine Untersuchung der Inhibition von AAV nach einer Inkubation von bis zu 2 h untersucht werden sollte, war es essentiell zuerst zu prüfen, ob nach dieser Zeit schon eine verminderte Infektiosität von AAV gegeben war. Da die Inhibition anhand der Anzahl der positiven Zellen gemessen wurde, wäre alleine durch die verminderte Infektion aufgrund der Vorinkubation eine geringere Anzahl an positiven Zellen messbar und hätte dadurch eine Pseudo-„Inhibition“ der Vektortransduktion ergeben.

Für die Untersuchung, ob die Infektiosität von AAV nach den verschiedenen Vorinkubationszeiten von 10 min und 2 h identisch sind, wurden sequenzielle Verdünnungen von AAV für 10 min oder 2 h in Medien ohne Zusatz von Antikoagulanzien bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann auf die Zellen gegeben.

Hierbei zeigte sich bei jedem der drei Versuche, dass die Infektiosität der Inkubationszeit von 2 h gegenüber derjenigen von 10 min nahezu identisch war. Eine Inkubation von AAV in Medium bei Raumtemperatur verminderte demnach nicht die Infektiosität der Viren. Dies war nun eine wichtige Voraussetzung um die Kinetik der Inhibition in dem folgenden Abschnitt zu untersuchen.

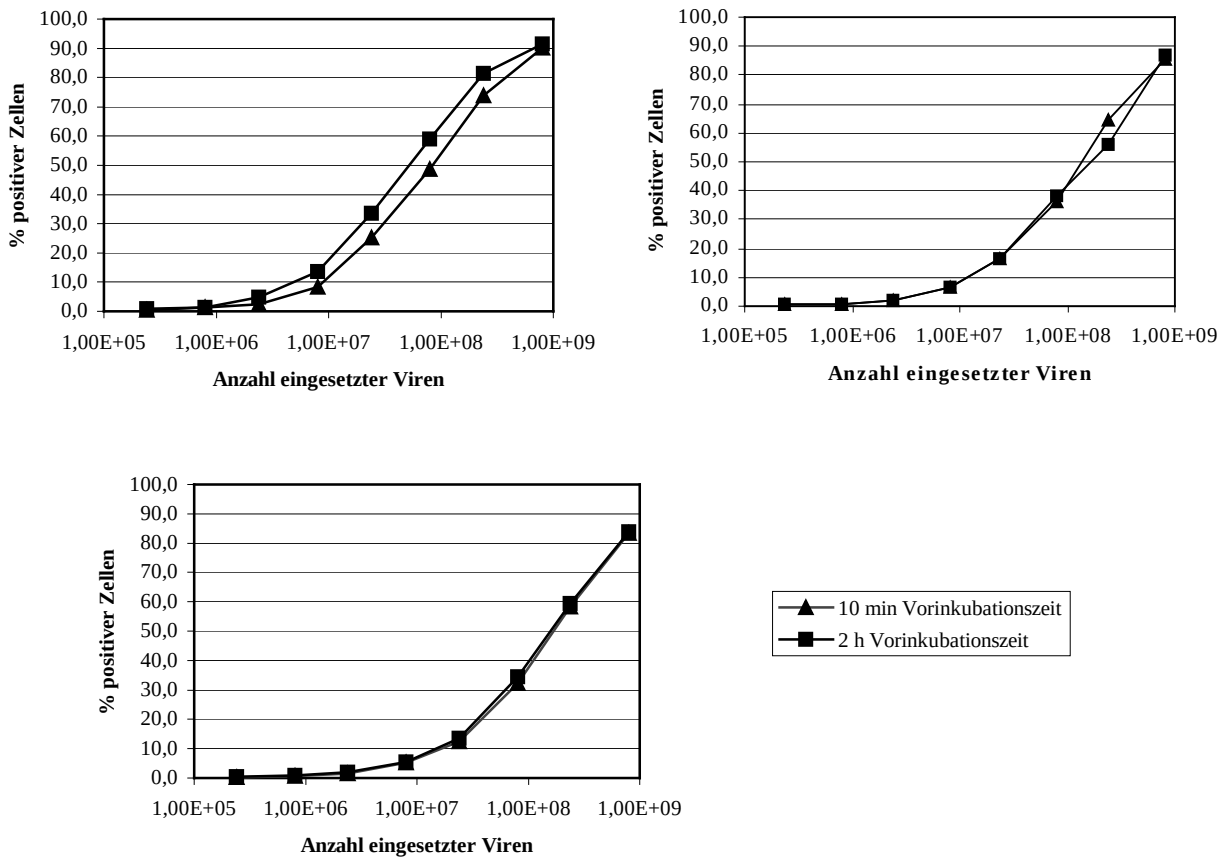


Abbildung 40: Auswirkung der Vorinkubation auf die AAV-Infektiosität. AAV-GFP wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung, eines Cäsiumchlorid-Gradienten, sowie über eine Kationenaustauscher- und Heparansulfat-affinitäts-Säule aufgereinigt. Nach Bestimmung des infektiösen Titers wurden serielle Verdünnungen von AAV-GFP 10 min oder 2 h bei Raumtemperatur in serumfreiem Medium stehen gelassen und danach für 2 h auf HeLa-Zellen gegeben, wonach das Medium durch Normalmedium ersetzt wurde. 48 h später wurde die Anzahl der positiven Zellen per FACS-Analyse bestimmt. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen.

4.4.3 Inhibition der AAV-Infektion durch Antikoagulanzien

Wie unter 4.4.1 erwähnt, kann Heparin die Infektion von AAV inhibieren. Um zu untersuchen wie stark diese Inhibition war und ob durch Alternativen zu Heparin eine geringere oder gar keine Inhibition der AAV-Infektion vorliegt, wurden die Antikoagulanzien Heparin, Tinzaparin-Natrium, Danaparoid-Natrium und Hirudin auf ihre Stärke der Beeinflussung der AAV-Infektion untersucht. Da auch die Kinetik dieser Inhibition nicht bekannt war, wurde die Inkubation von AAV mit den Antikoagulanzien für 10 min und 2 h durchgeführt, um festzustellen, ob dies zu einer Änderung einer eventuellen Inhibition führte.

Für diese Untersuchung wurde eine konstante Anzahl von infektiösen Viren mit einer seriellen Verdünnung der Antikoagulanzien für 10 min bzw. 2 h inkubiert und danach zur Infektion für 2 h auf Zellen gegeben. Nach weiteren 48 h wurde die GFP-Expression der Zellen per FACS-Analyse untersucht.

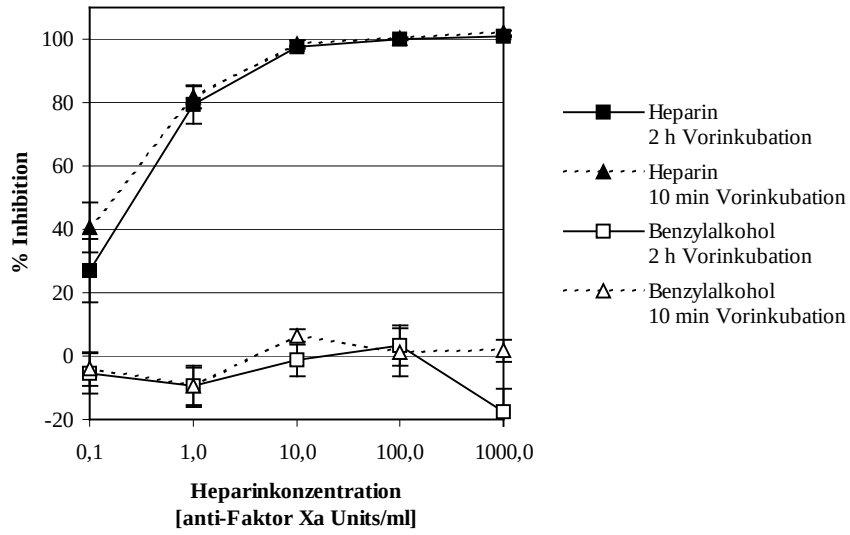


Abbildung 41: Inhibition der AAV-Infektion durch Heparin. AAV-GFP wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung, eines Cäsiumchlorid-Gradienten, sowie über eine Kationenaustauscher- und Heparansulfataffinitäts-Säule aufgereinigt. Nach Bestimmung des infektiösen Titers wurden serielle Verdünnungen von 0,1 U/ml bis 1000 U/ml Heparin 10 min (gestrichelte Linien) oder 2 h (durchgezogene Linien) bei Raumtemperatur in serumfreiem Medium mit $0{,}8 \cdot 10^4$ AAV-GFP inkubiert und danach das Gemisch für 2 h auf HeLa-Zellen gegeben, die zuvor mit einer ^{137}Cs-Quelle mit einer Dosis von 100 Gy bestrahlt worden waren. Anschließend wurde das Medium durch Normalmedium ersetzt. 48 h später wurde die Anzahl der GFP-positiven Zellen per FACS-Analyse bestimmt. Bei den Negativkontrollen wurden die entsprechenden Lösungen, in der das Antikoagulanz vorlag, in den jeweiligen Verdünnungen eingesetzt. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen, welche jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden (n=6). Die Standardabweichung des Mittelwertes ist angezeigt durch die Fehlerbalken.

Schon bei der geringen Konzentration von 0,1 U/ml konnte Heparin fast die Hälfte der Viren, 40,5±7,9 %, inhibieren. Bei der Konzentration von 1 U/ml kam es zu einer Inhibition von 81,7±3,6 % und bei höheren Konzentrationen von Heparin war eine fast vollständige Inhibition der AAV-Infektion gegeben. Eine Erhöhung der Vorinkubationszeit des Vektors mit dem Antikoagulanz von 10 min auf 2 h veränderte die Inhibition von Heparin dagegen nur sehr geringfügig. Bei 0,1 U/ml wurde hierbei eine Inhibition von 26,9±10,0 %, bei 1 U/ml eine

Inhibition von 79,3±6,0 % und bei höherer Heparinkonzentration eine fast vollständige Inhibition der AAV-Infektion erhalten. Im Gegensatz dazu war bei den Negativkontrollen keine Inhibition der AAV-Infektion erkennbar.

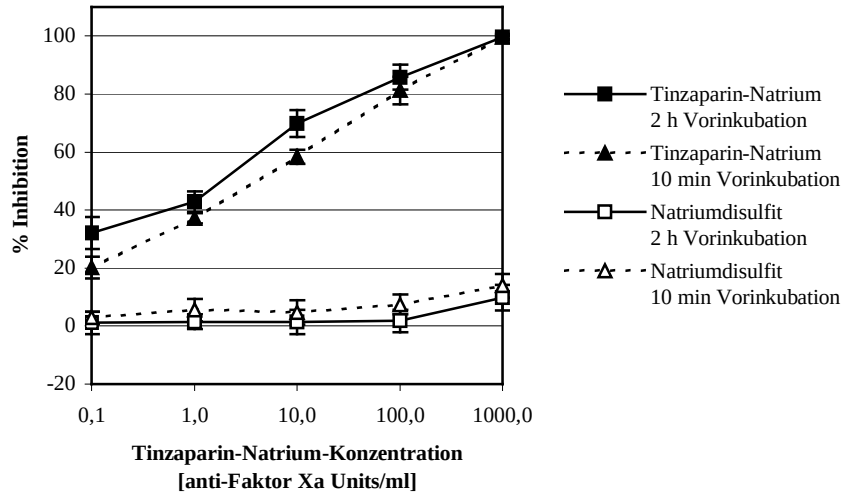


Abbildung 42: Inhibition der AAV-Infektion durch Tinzaparin-Natrium. AAV-GFP wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammonium-sulfatfällung, eines Cäsiumchlorid-Gradienten, sowie über eine Kationenaustauscher- und Heparansulfat-affinitäts-Säule aufgereinigt. Nach Bestimmung des infektiösen Titers wurden serielle Verdünnungen von 0,1 U/ml bis 1000 U/ml Tinzaparin-Natrium 10 min (gestrichelte Linien) oder 2 h (durchgezogene Linien) bei Raumtemperatur in serumfreiem Medium mit $0{,}8 \cdot 10^4$ AAV-GFP inkubiert und danach das Gemisch für 2 h auf HeLa-Zellen gegeben, die zuvor mit einer ^{137}Cs-Quelle mit einer Dosis von 100 Gy bestrahlt worden waren. Anschließend wurde das Medium durch Normalmedium ersetzt. 48 h später wurde die Anzahl der GFP-positiven Zellen per FACS-Analyse bestimmt. Bei den Negativkontrollen wurden die entsprechenden Lösungen, in der das Antikoagulanz vorlag, in den jeweiligen Verdünnungen eingesetzt. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen, welche jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden (n=6). Die Standardabweichung des Mittelwertes ist angezeigt durch die Fehlerbalken.

Im Gegensatz zu Heparin kam es bei dem niedermolekularen Heparin Tinzaparin-Natrium bei einer Konzentration von 0,1 U/ml nur zu einer Inhibition von 20,2±3,8%, welches ca. die Hälfte des Wertes von Heparin war. Auch bei einer höheren Konzentration von 1 U/ml wurde nur ca. die Hälfte des Heparin-Wertes erreicht, 37,1±1,8 %. Bei den Konzentrationen von 10 U/ml und 100 U/ml, bei denen bei Heparin schon eine fast vollständige Inhibition der AAV-Infektion vorlag, erreichten die Werte bei der Verwendung von Tinzaparin-Natrium nur 58,3±2,4 % und 81,2±4,7 %. Erst bei einer Tinzaparin-Natrium-Konzentration von 1000 U/ml war eine fast vollständige Inhibition erkennbar. Auch hier veränderte sich die Stärke der Inhibition bei Verlängerung der Vorinkubationszeiten von 10 min auf 2 h nur geringfügig. Bei

dieser längeren Vorinkubationszeit war bei 0,1 U/ml eine Inhibition von 32,1±5,4 %, bei 1 U/ml eine Inhibition von 42,9±3,6 %, bei 10 U/ml eine Inhibition von 69,8±4,6 %, bei 100 U/ml eine Inhibition von 85,8±4,4 % und auch hier erst bei einer Konzentration von 1000 U/ml eine fast vollständige Inhibition gegeben. Die Negativkontrollen zeigten keine Auswirkung auf die AAV-Infektion.

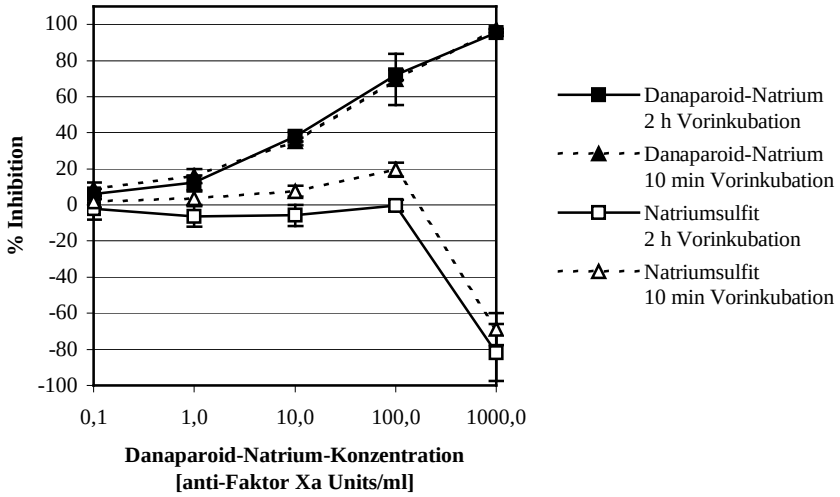


Abbildung 43: Inhibition der AAV-Infektion durch Danaparoid-Natrium. AAV-GFP wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung, eines Cäsiumchlorid-Gradienten, sowie über eine Kationenaustauscher- und Heparansulfat-affinitäts-Säule aufgereinigt. Nach Bestimmung des infektiösen Titers wurden serielle Verdünnungen von 0,1 U/ml bis 1000 U/ml Danaparoid-Natrium 10 min (gestrichelte Linien) oder 2 h (durchgezogene Linien) bei Raumtemperatur in serumfreiem Medium mit $0{,}8 \cdot 10^4$ AAV-GFP inkubiert und danach das Gemisch für 2 h auf HeLa-Zellen gegeben, die zuvor mit einer ^{137}Cs-Quelle mit einer Dosis von 100 Gy bestrahlt worden waren. Anschließend wurde das Medium durch Normalmedium ersetzt. 48 h später wurde die Anzahl der GFP-positiven Zellen per FACS-Analyse bestimmt. Bei den Negativkontrollen wurden die entsprechenden Lösungen, in der das Antikoagulanz vorlag, in den jeweiligen Verdünnungen eingesetzt. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen, welche jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden (n=6). Die Standardabweichung des Mittelwertes ist angezeigt durch die Fehlerbalken.

Bei dem niedermolekularen Heparinoid Danaparoid-Natrium, das strukturell noch weiter entfernt ist von Heparin als Tinzaparin-Natrium, konnte eine noch geringere Inhibition der AAV-Infektion im Vergleich zu Tinzaparin-Natrium erreicht werden, wobei auch hier die Werte für die Vorinkubationszeiten von 10 min und 2 h nahezu identisch waren. Bei der geringsten eingesetzten Danaparoid-Natrium-Konzentration von 0,1 U/ml waren fast keine Inhibitionen zu erkennen, nur 8,8±3,5 % bei 10 min Vorinkubationszeit und 6,1±3,0 % bei 2 h Vorinkubationszeit. Diese Werte erhöhten sich bei der Konzentration von 1 U/ml nur gering-

fügig auf 16,0±3,9 % bzw. 12,3±4,1 %. Erst bei den höheren Konzentrationen von 10 U/ml und 100 U/ml steigerten sich die Inhibitionswerte auf 35,2±2,1 % und 69,7±14,2 % bei 10 min Vorinkubation und 37,9±2,6 % und 72,1±2,8 % bei 2 h Vorinkubation. Wie bei Tinzaparin-Natrium war auch bei Danaparoid-Natrium eine fast vollständige Inhibition der AAV-Infektion erst bei einer Konzentration von 1000 U/ml gegeben. Die Negativkontrollen hatten auch hier, bis auf die Ausnahme bei 1000 U/ml, keinen Einfluss auf die AAV-Infektion. Die „Verstärkung" der AAV-Infektion bei 1000 U/ml bei den Negativkontrollen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die untersuchten Zellen bei dieser Kontrolle geschädigt aussahen, was evtl. durch die hohe ungepufferte Natriumsulfit-Konzentration bedingt war. Da geschädigte Zellen bei der FACS-Analyse eine Fluoreszenz aufweisen können, ist diese Eigenfluoreszenz vermutlich die Erklärung für das Auftreten der vielen pseudo-positiven Zellen bei den Negativkontrollen von Danaparoid-Natrium bei der Konzentration von 1000 U/ml.

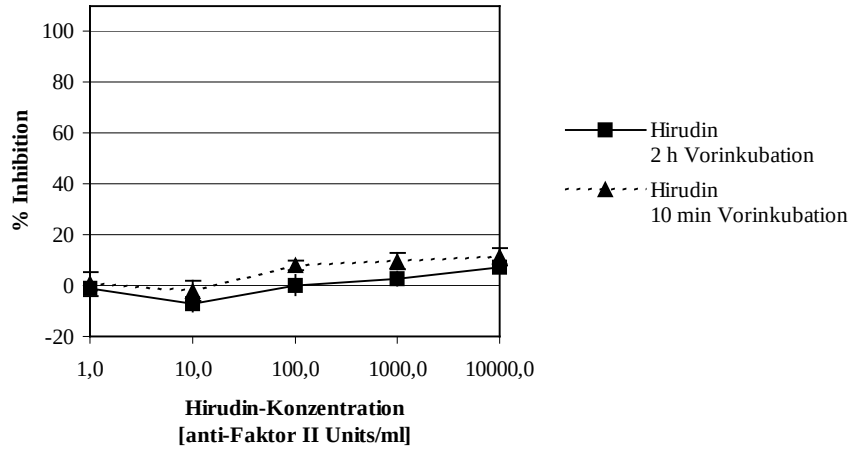


Abbildung 44: Inhibition der AAV-Infektion durch Hirudin. AAV-GFP wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung, eines Cäsiumchlorid-Gradienten, sowie über eine Kationenaustauscher- und Heparansulfataffinitäts-Säule aufgereinigt. Nach Bestimmung des infektiösen Titers wurden serielle Verdünnungen von 0,1 U/ml bis 1000 U/ml Hirudin 10 min (gestrichelte Linien) oder 2 h (durchgezogene Linien) bei Raumtemperatur in serumfreiem Medium mit $0{,}8 \cdot 10^4$ AAV-GFP inkubiert und danach das Gemisch für 2 h auf HeLa-Zellen gegeben, die zuvor mit einer ^{137}Cs-Quelle mit einer Dosis von 100 Gy bestrahlt worden waren. Anschließend wurde das Medium durch Normalmedium ersetzt. 48 h später wurde die Anzahl der GFP-positiven Zellen per FACS-Analyse bestimmt. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen, welche jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden (n=6). Die Standardabweichung des Mittelwertes ist angezeigt durch die Fehlerbalken.

Bei den Inhibitionsversuchen mit Hirudin, das keinerlei Verwandtschaft mit Heparin aufweist, war selbst bei hohen Konzentrationen von 10.000 U/ml keine ausgeprägte Beeinflussung der AAV-Infektion nachweisbar. Dies war sowohl bei den Werten für 10 min Vorinkubation, als auch für 2 h Vorinkubation gegeben. Dies würde bedeuten, dass das rekombinante Peptid Hirudin, das keine strukturellen Ähnlichkeiten mit den anderen analysierten Antikoagulanzien hat, keinen Einfluss auf die Infektion von Zellen durch AAV hatte. Eine Negativkontrolle wurde nicht durchgeführt, da das Antikoagulanz Hirudin nur in Wasser gelöst wurde, was keinen Einfluss auf die AAV-Infektion hat.

4.4.4 Auswirkung einer höheren Vektorkonzentration auf die Inhibition der AAV-Infektion durch Heparin

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die AAV-Infektion durch eine höhere Konzentration an Heparin oder Heparin-Derivaten stärker inhibiert werden konnte. In diesen Versuchen wurde die Konzentration der Viren gleich gehalten und die Konzentration der Antikoagulanzien verändert. Falls es sich um eine Kompetition der Heparansulfatproteoglykan- (HSPG-) Bindungsstellen handelte, müsste bei einer höheren Vektorkonzentration bei denselben Verdünnungen der Antikoagulanzien eine weniger starke Inhibition der AAV-Infektion sichtbar werden, da nun eine höhere Anzahl von Viren und damit HSPG-Bindungsstellen bei derselben Anzahl von Molekülen der Antikoagulanzien vorhanden war.

Um zu evaluieren, in wiefern die Inhibition der Viren auch von der Vektorkonzentration abhängig ist, wurden die Inhibitionsversuche mit Heparin mit einer 10-fach höheren Konzentration an AAV als in den vorangegangenen Experimenten durchgeführt.

Hierbei ist erkennbar, dass bei einer höheren AAV-Konzentration die Inhibition durch Heparin tatsächlich vermindert war (s. Abbildung 45, S. 111). Bei 0,1 U/ml war die Inhibition nach 10 min Vorinkubationszeit von 40,5±7,9 % auf 18,7±2,3 %, bei 2 h Vorinkubationszeit von 26,9±10,0 % auf 18,1±1,2 % gesunken. Bei der Heparinkonzentration von 1 U/ml nach 10 min Vorinkubationszeit war die Inhibition von 81,7±3,6 % auf 72,5±2,5 %, und nach 2 h Vorinkubationszeit von 79,3±6,0 % auf 73,3±1,6 % gesunken. Selbst bei der Konzentration von 10 U/ml war noch eine Verminderung der Inhibition von 98,6±1,2 % auf 93,7±0,4 % nach 10 min Vorinkubation und von 97,5±0,5 % auf 94,8±0,3 % nach 2 h Vorinkubationszeit deutlich erkennbar. Erst bei den Konzentrationen von 100 U/ml und 1000 U/ml war die

Verminderung der Inhibition nicht mehr deutlich, vermutlich waren hier genügend Moleküle der Antikoagulanzien vorhanden, um auch bei einer 10-fach höheren Vektorkonzentration die Inhibition noch nahezu vollständig aufrecht zu halten.

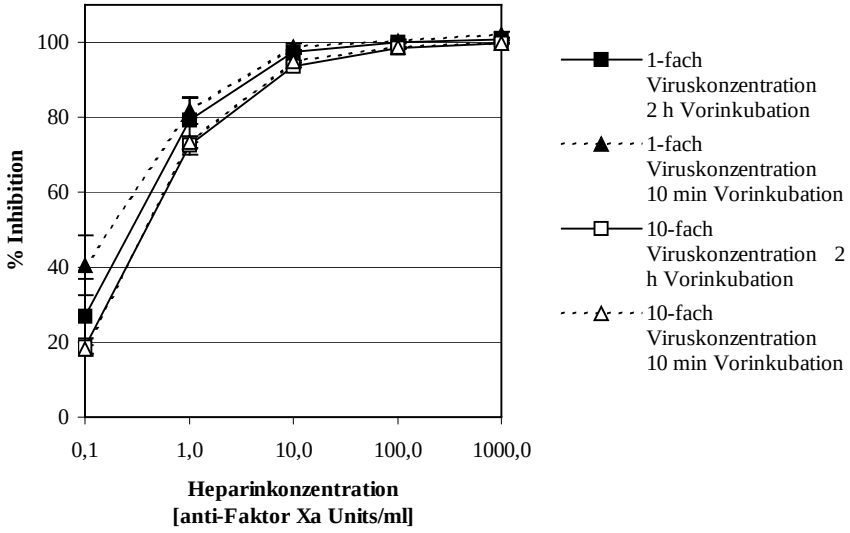


Abbildung 45: Inhibition der AAV-Infektion durch Heparin bei Verwendung zweier unterschiedlicher Vektorkonzentrationen. AAV-GFP wurden Adenovirus-frei hergestellt und nach Zelllyse durch Einfrieren – Auftauen mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung, eines Cäsiumchlorid-Gradienten, sowie über eine Kationenaustauscher- und Heparansulfataffinitäts-Säule aufgereinigt. Nach Bestimmung des infektiösen Titers wurden serielle Verdünnungen von 0,1 U/ml bis 1000 U/ml Heparin 10 min (gestrichelte Linien) oder 2 h (durchgezogene Linien) bei Raumtemperatur in serumfreiem Medium mit $0{,}8 \cdot 10^4$ AAV-GFP oder $8{,}0 \cdot 10^4$ AAV-GFP inkubiert und danach das Gemisch für 2 h auf HeLa-Zellen gegeben, die zuvor mit einer ^{137}Cs-Quelle mit einer Dosis von 100 Gy bestrahlt worden waren. Anschließend wurde das Medium durch Normalmedium ersetzt. 48 h später wurde die Anzahl der GFP-positiven Zellen per FACS-Analyse bestimmt. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen, welche jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden (n=6). Die Standardabweichung des Mittelwertes ist angezeigt durch die Fehlerbalken.

5 Diskussion

5.1 Optimierung von Reinigungsverfahren für AAV

Nach der Entdeckung der Adeno-assoziierten Viren (AAV) und der Herstellung erster rekombinanter Vertreter, wurden in den Versuchen zunächst ungereinigte Viren verwendet, von denen nach Zelllyse durch Einfrieren und Auftauen der Zelldebris durch Filtration mit Mikrofilter oder durch Zentrifugation abgetrennt worden waren (Hermonat und Muzyczka, 1984; Walsh et al., 1992). Auch später wurden für *in vitro* Anwendungen rAAV auf diese Weise gewonnen und eingesetzt (Maeda et al., 1997). Für genauere Analysen und den Einsatz bei *in vivo* Anwendungen war die Reinheit dieser gewonnen rAAV nicht ausreichend, da z.B. durch Pseudotransduktion die Ergebnisse verfälscht werden oder durch vorhandene aktive Adenoviren Immunantworten zu erwarten waren (Alexander et al., 1997; Xiao et al., 1998). Deshalb wurden neue Reinigungsmethoden etabliert. Tamayose et al., 1996, berichteten, dass durch die Verwendung von sulfatierter Zellulose die rAAV gereinigt und um den Faktor 50 gegenüber dem Rohlysat konzentriert werden konnten. Bei einer weiteren Reinigungsmethode wurde eine Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation eingesetzt. Hierbei wurden nach der Zellernte die Zellen lysiert und direkt oder nach Zentrifugation zur Abtrennung von Zelldebris auf einen Cäsiumchlorid-Gradienten aufgetragen und eine Ultrazentrifugation für 36-48 h durchgeführt. Meist wurde der Ultrazentrifugationsschritt ein- bis zweimal wiederholt und das Cäsiumchlorid durch Dialyse abgetrennt. Allerdings war ein Hitzeinaktivierungsschritt notwendig, um intakte Adenoviren abzutrennen (Kessler et al., 1996; Koeberl et al., 1997; Rolling et al., 1997). Falls der Hitzeinaktivierungsschritt nicht durchgeführt wurde, können bei *in vivo* Anwendungen Adenoviren eine Immunantwort hervorrufen. Schließlich konnte dann der Hitzeinaktivierungsschritt durch die weitere Optimierung der rAAV-Herstellung unter Verwendung eines Adenovirus-Helferplasmids anstatt der Superinfektion mit Adenoviren umgangen werden (Xiao et al., 1998).

Eine Variation dieser Reinigungsmethode von rAAV unter Verwendung von Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugationsschritten war vor Optimierung der Reinigungsmethode, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben ist, verwendet worden (Girod et al., 1999). Hierbei wurden nach der Herstellung von rAAV mit Hilfe von Adenoviren die Zellen unter Anwesenheit von Trypsin und Natriumdesoxycholat im Homogenizer lysiert. Die Viren wurden dann durch

zweimalige Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation für jeweils 20 h gereinigt und durch fünfmalige Dialyse gegen PBS mit NaCl entsalzt. Hierbei wurden Titer im Bereich von $5 \cdot 10^7$ infektiösen Partikeln pro ml erzielt.

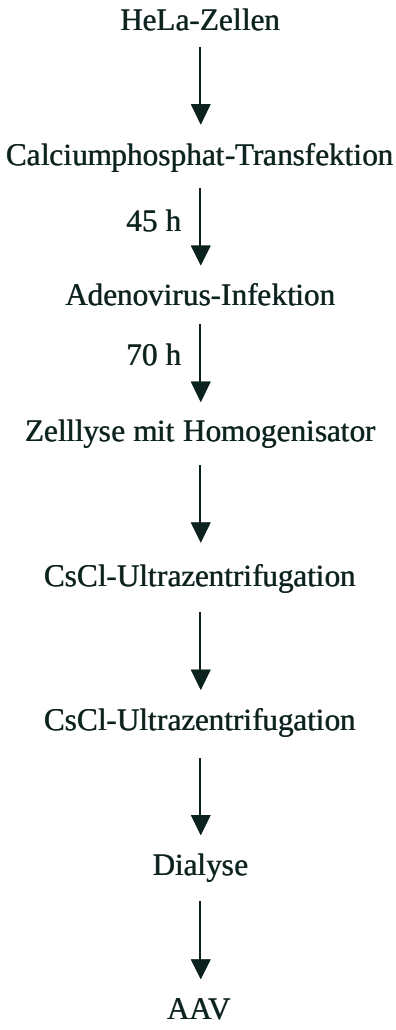


Abbildung 46: Ursprüngliches Herstellungs- und Reinigungsschema für AAV. Nach Transfektion der Plasmide in HeLa-Zellen wurden diese mit Adenoviren koinfiziert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Homogenisators lysiert. Danach wurden die freigesetzten AAV durch zweifache Ultrazentrifugation mit Cäsiumchlorid gereinigt und das Cäsiumchlorid anschließend per Dialyse entfernt.

Hierbei treten jedoch folgende mögliche Probleme auf:

- Potentielle Verunreinigung mit zellulären Faktoren aufgrund nur einer Reinigungsmethode: Dadurch könnten Ergebnisse beeinflusst werden, unter anderem durch Pseudotransduktionen (Alexander et al., 1997; Zolotukhin et al., 1999).

- Potentielle Verunreinigung mit Adenoviren und adenoviralen Proteinen: Durch die Umstellung der Herstellungsmethode auf eine Adenovirus-freie Verpackungsmethode konnte zwar die Kontamination mit Adenoviren ausgeschlossen werden, nicht jedoch die mit adenoviralen Proteinen. Diese könnten aufgrund nur einer Reinigungsmethode noch ungenügend abgetrennt werden und aufgrund ihrer hohen Immunogenität bei *in vivo* Versuchen zu Immunantworten führen (Xiao et al., 1998). Hier wäre es von Vorteil weitere Reinigungsschritte einzusetzen, die auf andere physikalische und/oder chemische Eigenschaften beruhen.
- Potentielle Verunreinigung mit Cäsiumchlorid: Durch ungenügende Abtrennung des potentiell toxischen Cäsiumchlorids bei der Dialyse könnten unerwünschte Nebeneffekte auftreten (Summerford und Samulski, 1999).
- Sehr zeitaufwändige Methode zur Vektorreinigung: Aufgrund der zweifachen Ultrazentrifugation und anschließenden 5-fachen Dialyse streckt sich die Vektoraufreinigung über einen Zeit von ca. 3 Tagen. Dies führt zu einem signifikanten Verlust an infektiösen Partikeln, da für jeden Tag eine Abnahme der Infektiosität um den Faktor 2 berichtet wurde (Auricchio et al., 2001).
- Sehr arbeitsintensive Methode: Aufgrund der genauen Einstellung der optischen Dichte des Cäsiumchlorid-Dichtegradienten ist die zweimalige Herstellung des Dichtegradienten sehr arbeitsintensiv (Auricchio et al., 2001).

Um diese Nachteile zu umgehen, wurde eine neue Methode, basierend auf Vorarbeiten von Zolotukhin et al., 1999, etabliert und optimiert. Hierbei werden die Viren nach Zelllyse durch drei physikalisch und chemisch unterschiedliche nacheinandergeschaltete Reinigungsmethoden gereinigt:

- Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung: Hierdurch werden Kontaminationen beseitigt, die ein unterschiedliches Fällungsverhalten gegenüber rAAV aufweisen.
- Iodixanol-Ultrazentrifugation: Hierbei werden Kontaminationen eliminiert, die eine geringere oder höhere Dichte als rAAV aufweisen. Aufgrund der Biokompatibilität des Iodixanol, es wird in der Klinik als Röntgenkontrastmittel eingesetzt (Bolstad et al., 1991; Svaland et al., 1992; Andersen et al., 1993; Pannu et al., 2005), dürfte es auch bei einer ungenügenden Abtrennung

zu keinen unerwünschten Nebenwirkungen *in vivo* führen. Dies konnte durch eine Injektion von Iodixanol-gereinigten und in diesem Medium belassenen rAAV in das Gehirn von Mäusen gezeigt werden (Hermens et al., 1999). Ferner wird in diesem Schritt das Ammoniumsulfat abgetrennt.

- Kationenaustauscher-Chromatographie und Heparin-Affinitätschromatographie: Hierbei werden Kontaminationen ausselektioniert, die eine geringere oder höhere Adsorptionseigenschaft an Heparin oder eine unterschiedlich starke Ionenstärke aufweisen. Ferner wird in diesem Schritt das Iodixanol der Ultrazentrifugation abgetrennt.

Durch das Hintereinanderschalten dieser Reinigungsschritte sollte eine größtmögliche Abtrennung von Kontaminationen erreicht werden. Diese Methode sollte deshalb in unserem Labor vor der Durchführung von *in vivo* Versuchen etabliert und die einzelnen Reinigungsschritte bezüglich Ausbeute, Methodik und Zeiteinsatz optimiert werden.

Da bei der Produktionsmethode keine Adenoviren eingesetzt wurden und AAV kein lytisches Virus ist, können nur AAV aus den Zellen freigesetzt werden, die abgestorben sind (Xiao et al., 1998). Unter den verwendeten Kulturbedingungen war allerdings die weit überwiegende Anzahl der Zellen in einem guten Zustand. Dies würde bedeuten, dass die produzierten rAAV vor der Zelllyse fast ausschließlich im Zellpellet vorhanden sind und nur vernachlässigbare Mengen im Mediumüberstand, was durch diesen Versuch untersucht werden sollte. Zolotukhin et al., 1999, untersuchten die Menge an Vektoren im Mediumüberstand bei der Adenovirus-freien Herstellungsmethode von rAAV und kamen zu der Folgerung, dass die Gewinnung von rAAV-Vektoren aus dem Mediumüberstand nicht effizient wäre. Auch bei uns konnte bei der direkten Messung der rAAV-Vektormenge im Pellet nach Fällung des Mediumüberstandes mit Ammoniumsulfat im Rahmen der Nachweisbarkeit kein Vektor detektiert werden. Ferner konnte bei der Bestimmung der Vektormenge nach Vereinigung dieser Probe mit den Proben aus zwei Zellaufschlüssen keine Erhöhung der rAAV-Menge gegenüber derjenigen aus den Zellaufschlüssen alleine detektiert werden (s. Tabelle 1, S. 63). Außerdem konnten wir feststellen, dass nach dem zweiten Sonifizieren nur eine geringe Menge an weiteren AAV freigesetzt wurden, so dass dieser Schritt der weiteren Zelllyse übergangen werden konnte.

Um auszuschließen, dass die Anwesenheit von FKS im Medium während der Zelllyse durch Sonifikaton einen Einfluss auf die Menge an gewonnenem rAAV hat, wurde auch eine Präparation unter Abwesenheit von FKS bei der Zelllyse gemacht. Hierbei wurde festgestellt, dass die Anwesenheit von FKS jedoch keinen Einfluss auf die Vektorausbeute hatte, da die Menge an genomischen Gesamtpartikeln bei Anwesenheit oder Abwesenheit von FKS nach der Zelllyse im Überstand gleich waren (s. Tabelle 3, S. 65). Deshalb kann bei der Zellernte, die 48 h nach Transfektion statt finden sollte, FKS anwesend sein.

Weiterhin könnte der Zeitpunkt der Vektorernte entscheidend für eine hohe Ausbeute sein. Bei Herstellung von rAAV mit Hilfe von Adenoviren wurde die Ernte ca. 48 Stunden nach Adenovirus-Koinfektion durchgeführt (Girod et al., 1999). Ein späterer Erntezeitpunkt könnte die Ausbeute an Viren erhöhen, da die Zelle über einen längeren Zeitraum die Möglichkeit der rAAV-Produktion hat. Andererseits könnte die Ausbeute auch geringer sein, das die viralen Proteine auch wieder abgebaut werden könnten. Allerdings konnte festgestellt werden, dass die Menge an geernteten Viren gleich waren, unabhängig vom Zeitpunkt der Zelllyse (Tabelle 3, S. 65). Auch Xiao et al., 1998, untersuchten den Einfluss des Zeitpunktes der Ernte von rAAV, wobei die Zeitpunkte 36 h, 48 h, 60 h und 72 Stunden nach der Transfektion gewählt wurden. Hierbei konnten sie zeigen, dass die maximale Ausbeute an rAAV 48 Stunden nach der Transfektion erreicht war, was mit den hier beschriebenen Daten übereinstimmt. Um die Vektorherstellung und –reinigung möglichst kurz zu halten, sollte deshalb die Zellernte und der Beginn der Vektorreinigung 48 h nach Transfektion statt finden.

Da in der Literatur von unterschiedlichen Methoden der Zelllyse berichtet wird (Gao et al., 2000; Auricchio et al., 2001), sollte untersucht werden, ob eine Ultraschallbehandlung oder das Einfrieren und Auftauen der Zellen eine höhere Ausbeute an infektiösen Partikeln freisetzt. Dabei konnte festgestellt werden, dass nach Einfrieren und Auftauen ca. 3-mal mehr infektiöse Partikel freigesetzt wurden als nach der Ultraschallbehandlung (Tabelle 5, S. 68).

Als weiterer Optimierungsschritt sollte bei der Optimierung der Fällungsbedingungen der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung zuerst diejenige Konzentration an gesättigtem Ammoniumsulfat gefunden werden, bei der rAAV noch vollständig im Mediumüberstand vorhanden ist. Dabei können diejenigen Kontaminationen abgetrennt werden, die eine geringere Löslichkeit als rAAV aufweisen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass nur bei Ammonium-

sulfatkonzentration von bis zu 25 % keine AAV dem Überstand durch Fällung verloren gehen. Die Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration von 25 % auf 30 % bis 45 % führt zu einem Abfall der AAV-Konzentration im Überstand um etwa 20 % (s. Abbildung 12, S. 66). Da jedoch bei höheren Ammoniumsulfatkonzentrationen auch weitere Verunreinigungen abgetrennt werden können, wurde für die weiteren Versuche die erste Fällung bei 35 % durchgeführt. Im zweiten Schritt der Optimierung der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung soll diejenige Konzentration an gesättigtem Ammoniumsulfat bestimmt werden, bei der der Vektor komplett ausfällt. Dadurch können Kontaminationen abgetrennt werden, die eine höhere Löslichkeit als rAAV haben. Erst bei einer Konzentration an gesättigtem Ammoniumsulfat von 55 % konnte kein Verlust an rAAV im Überstand erreicht werden (s. Abbildung 12, S. 66). Aufgrund dieser Ergebnisse sollte die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung mit 35 % und 55 % gesättigtem Ammoniumsulfat durchgeführt werden.

Die vor dem Beginn der vorliegenden Arbeit durchgeführten Reinigungen der rAAV über Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation hatten den Nachteil, dass dieser Schritt 2 Tage dauert und die Reinigung so lange unterbrochen werden muss (Girod et al., 1999). Weiterhin muss anschließend das toxische Cäsiumchlorid durch Dialyse abgetrennt werden, wobei nicht gewährleistet ist, dass bei jeder Präparation das Cäsiumchlorid vollständig abgetrennt wird. Um diese Nachteile der Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation zu umgehen, sollte als Alternative der Einsatz der Iodixanol-Ultrazentrifugation überprüft werden, analog wie es von Zolotukhin et al., 1999, beschrieben wurde. Dies hätte nicht nur den Vorteil, dass dieser Reinigungsschritt auf 1,5 Stunden verkürzt wird, sondern auch, dass das toxische Cäsiumchlorid gegen ein nicht-toxisches Substrat ausgetauscht wird, Iodixanol wird in der Medizin als Röntgenkontrastmittel verwendet (Bolstad et al., 1991; Svaland et al., 1992; Andersen et al., 1993; Pannu et al., 2005). Hierfür wurden rAAV in einem diskontinuierlichen Gradienten mit Fraktionen von 60 %, 40 %, 25% und 15 % Iodixanol in einem Ultrazentrifugations-Röhrchen unterschichtet und nach Ultrazentrifugation ca. 2 ml der 40 %-Bande entnommen. Wie Zolotukhin et al., 1999, zeigen konnte, war die Hauptfraktion an rAAV-Vektoren in diesem Bereich vorhanden, wobei sie bei Abnahme von 4 ml einen Verlust von 20-25 % erhielten. Insbesondere zelluläre Proteine sind in den Übergangsbereichen zu den anderen Fraktionen vorhanden. Bei unseren Experimenten wurde eine Abnahme der genomischen Gesamtpartikelzahl um 34 % festgestellt (s. Tabelle 4, S. 67). Die Verluste sind dadurch zu erklären, dass die rAAV-Vektoren auch an den Übergängen zu den 60 %- und 25 %-Banden

vorhanden sind (Zolotukhin et al., 1999) und aufgrund der gewünschten hohen Reinheit diese Bereiche der 40 %-Bande zu diesen benachbarten Banden bei unseren Experimenten großzügig nicht abgenommen wurden, so dass wir ein etwas höheren Verlust als Zolotukhin et al., 1999, erhielten. Da hierdurch allerdings nur ein relativ geringer Verlust resultierte, wurden bei diesem Schritt keine weiteren Optimierungen durchgeführt.

Als letzter Schritt des Reinigungsschemas sollte der Einsatz von Kationenaustauscher-Säulen und Heparansulfataffinitätschromatograpie-Säulen überprüft werden. Insbesondere aufgrund der Affinität des Vektors zu Heparansulfatproteoglykan, das als Rezeptor für AAV fungiert (Summerford und Samulski, 1998), und deswegen auch zu Heparansulfat, könnten rAAV durch den Einsatz solcher Säulen weiter gereinigt werden (Zolotukhin et al., 1999). Hierfür wurden bereits über Iodixanol-Gradienten gereinigte rAAV eingesetzt. Dabei war lediglich ein Verlust von 20 % bei Verwendung der Kationenaustauscher-Säule und von 17 % bei Verwendung der Heparansulfataffinitäts-Säule messbar. Bei weiteren Versuchen konnte Fr. Dr. Büning aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass durch die säulenchromatographische Reinigungsschritten keine weitere Verbesserung der AAV-Reinheit erlangt wurde. Da auch in Veröffentlichungen gezeigt werden konnte, dass Iodixanol keine unerwünschten Neben-wirkungen aufweist, wenn es direkt *in vivo* verwendet wurde (Hermens et al., 1999), wurde in zukünftigen Experimenten auf die Anwendung der zusätzlichen säulenchromatographischen Reinigungsschritte verzichtet.

Aufgrund der Optimierungsschritte für die Reinigung von rAAV konnte ein effizientes Protokoll für die Aufreinigung von rAAV aufgestellt werden (s. Abbildung 47, S. 119). Wie auch Zolotukhin et al., 1999, verwendeten wir einen diskontinuierlichen Iodixanol-Gradienten zur Aufreinigung, jedoch benutzten wir vor diesem Gradienten eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und danach keine säulenchromatographische Aufreinigungsschritte. In unseren Händen konnten wir damit einen ähnlich hohen genomischen Titer wie sie erhalten, der im Bereich von 10^{12} genomischen Partikeln pro ml lag. Zwar wurde bei unserer Reinigung das Iodixanol nicht abgetrennt, jedoch war dieser Schritt nicht notwendig, aufgrund der fehlenden Toxizität des Iodixanol. Im Vergleich zu Hermens et al., 1999, konnten wir ähnliche Titer erhalten, die den Wert von $3 \cdot 10^9$ transduzierende Partikel pro ml erreichten. Es wurde allerdings von Hermens et al., 1999, gezeigt, dass nach einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und anschließender Iodixanol-Ultrazentrifugation sehr viele

Verunreinigungen noch vorhanden waren und deshalb eine säulenchromatographische Aufreinigung anstatt des Ammoniumsulfatschrittes durchgeführt werden sollte. Sie verwendeten jedoch einen diskontinuierlichen Gradienten wo die Virussuspension in PBS lediglich von einer 60 %igen Iodixanol-Lösung unterschichtet wurde. Zolotukhin et al., 1999, konnte dagegen zeigen, dass das AAV in der 40 % Bande vorhanden ist und sich in der 60 % Bande Verunreinigungen ansammelten. Dies wäre eine Erklärung für die hohen Konzentration an Verunreinigung nach einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und anschließendem Iodixanol-Gradienten bei Hermens et al., 1999. Aufgrund von vergleichbar hohen Titern und Reinheit mit den zu der Zeit der Durchführung der Optimierung veröffentlichten Publikationen wurde für die weitere Herstellung von AAV-Vektoren das unter Abbildung 47 (Seite 119) dargestellte Reinigungsprotokoll verwendet, wobei Titer im Bereich von $3 \cdot 10^9$ infektiösen Partikeln pro ml erreicht wurden. Dies entsprach einer ca. 100-fachen Steigerung im Vergleich zu den Titern, die vor der Optimierung erreicht worden waren, und gleichzeitig konnte mit diesem Protokoll sehr reine Vektorpräparationen erhalten werden (s. Abbildung 13, S. 68).

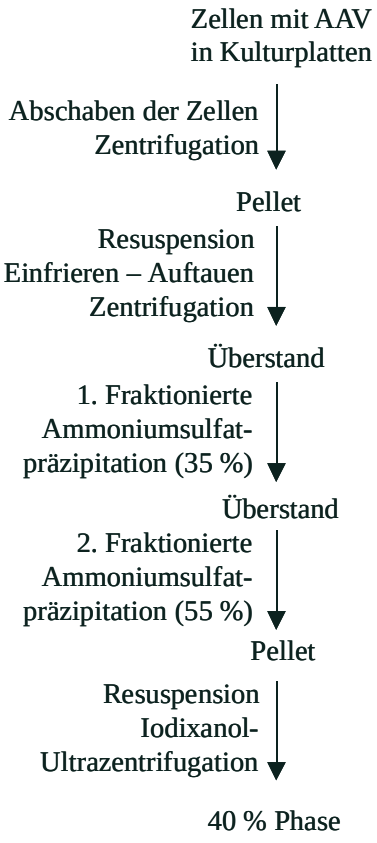


Abbildung 47: Optimiertes Reinigungsprotokoll für AAV. Durch die oben beschriebenen Optimierungen konnte dieses neue Reinigungsschema entwickelt werden.

5.2 Die Herstellung und Überprüfung des selbst-komplementären Adeno-assoziierten Virus

Adeno-assoziierte Viren enthalten ein 4,7 kb großes Genom, das als einzelsträngige DNA vorliegt, wobei sowohl der (+)-Strang als auch der (–)-Strang mit gleicher Effizienz verpackt wird (Rose et al., 1969; Srivastava et al., 1983). Nach der Infektion einer Zelle mit dem einzelsträngigen AAV (ssAAV) ist der limitierende Schritt für die Expression die Konversion des Einzelstranges durch Synthese in einen Doppelstrang (Ferrari et al., 1996). Bei einer Koinfektion mit Adenoviren wird dieser Schritt beschleunigt, wofür E4orf6 verantwortlich ist. Da jedoch eine Koinfektion mit Adenoviren bei *in vivo* Versuchen vermieden werden soll, insbesondere aufgrund der erhöhten Immunantwort (Xiao et al., 1998), kommt es beim Einsatz von rAAV zu Verzögerung der Expression von mehreren Wochen (Nathwani et al., 2001).

Allerdings kann bei einer hohen Anzahl von infektiösen Partikel pro Zelle (multiplicity of infection, moi) durch Hybridisierung eines (+)-Stranges mit einem (–)-Strang aus verschiedenen viralen AAV-Partikel, die durch Koinfektion in dieselbe Zelle gelangt sind, die Genexpression beschleunigen (Nakai et al., 2000b). Dies kann auch geschehen durch den gleichzeitigen Transfer eines (+)-Strang-Genoms mit einem (–)-Strang-Genom in einem einzigen Viruspartikel. Da das Viruskapsid allerdings eine maximale Größe der natürlichen Genomlänge von 119 % aufnehmen kann (Hermonat et al., 1997), muss dies durch die Verwendung eines Virus-Genoms, das ungefähr die Hälfte der Wildtyp-Größe beträgt, erreicht werden (= dsAAV). Hierbei können zwei Genome in einem Kapsid aufgenommen werden. Allerdings ist auch das Verpacken nur eines Stranges möglich, wobei diese Viren in einem Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugationsschritt aufgrund der unterschiedlichen Dichte abgetrennt werden können (McCarty et al., 2001). Ein weiteres Problem ist, dass die Wahrscheinlichkeit für die (+)-Strang - (–)-Strang-Kombination weniger als 50 % beträgt, da auch eine Kombination von zwei (+)-Strängen oder zwei (–)-Strängen vorkommen oder auch nur ein kurzes Genom verpackt werden kann.

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass beide Polaritäten des AAV-Genoms in einem Viruskapsid vorhanden sind, sollen die beiden Einzelstränge auf einem DNA-Molekül vorliegen. Dabei können sie durch einen kurzen Spacer getrennt sein, der die Rückfaltung

nach Infektion einer Zelle ermöglicht. Hierfür wäre ein ITR ideal, da es z.B. bei der Replikation für diese Rückfaltung sorgt. Allerdings wird an der terminalen Schnittstelle (trs) des ITRs die Sequenz während der Verpackung durch Rep geschnitten (Im und Muzyczka, 1992; Weitzman et al., 1996). Falls jedoch die Sequenz der trs an einem ITR deletiert wird, kann der Einzelstrangbruch hier nicht mehr durchgeführt werden, diese können nur an den äußeren ITRs statt finden.

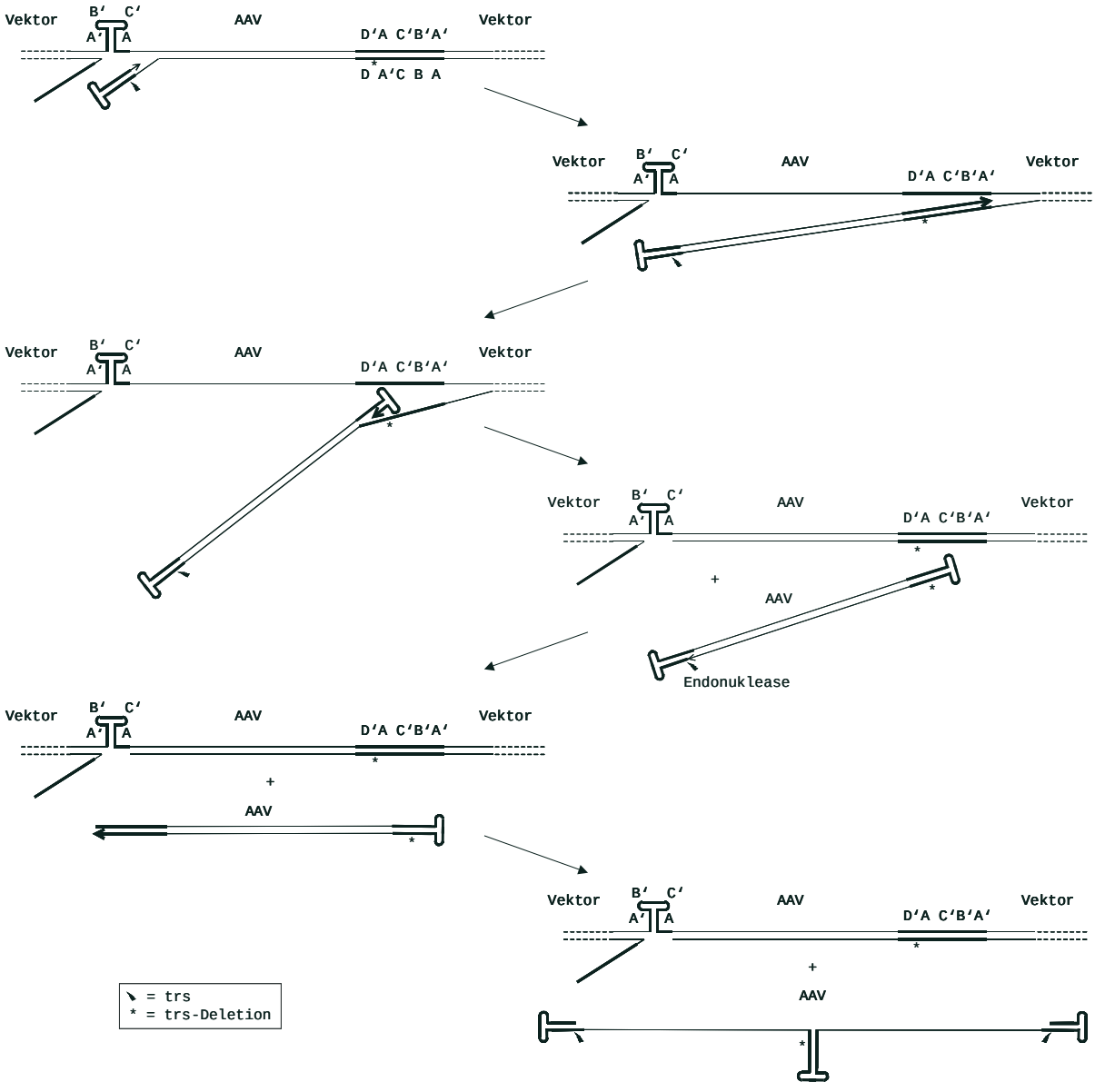


Abbildung 48: Modell für das Virusaktivierung des scAAV aus einem Plasmid. Genauere Details sind im Text erklärt.

In einem Plasmid kann somit ein Transgen zwischen zwei ITRs eingebaut werden, wobei bei einem ITR die trs-Sequenz deletiert ist und die Gesamtgenomlänge inklusive ITRs ungefähr

die Hälfte der Wildtyp-Genomlänge beträgt (McCarty et al., 2003; Wang et al., 2003). Bei der Virusaktivierung könnten dann folgende Vorgänge für die Herstellung des Genoms des selbstkomplementären AAV (scAAV) durchlaufen werden (s. a. Abbildung 48, S. 121). Wie bei der Virusaktivierung aus latent infizierten Zellen (vgl. Abbildung 6, S. 9), würde durch die Aktivierung am unmutierten ITR beginnen. Wenn das mutierte ITR repliziert worden ist, könnte sich die Haarnadelstruktur ausbilden und die Replikation am Gegenstrang fortgesetzt werden, wobei der zelluläre Strang verdrängt würde und dieser an der trs-Stelle durch Einzelstrangbruch von dem neu synthetisierten viralen Strang abgetrennt würde (s. Abbildung 48, S. 121). Die Replikation könnte dann bis zum Ende des ITRs fortgeführt werden. Dadurch wäre das scAAV-Genom hergestellt und könnte wie unter Kapitel 1.1.4 (s. S. 7) repliziert werden.

Für die Herstellung von scAAV-Vektoren muss in dem Vektorplasmid ein trs von einem der beiden ITR deletiert werden (Wang et al., 2003). Dadurch kann ein dimeres einzelsträngiges AAV-Genom mit den unmutierten ITRs an den Enden und dem mutierten ITR in der Mitte hergestellt werden, das ohne die Hilfe einer zellulären DNA-Synthese mit sich selber ein doppelsträngiges DNA Molekül nach Freisetzung aus dem Kapsid bilden kann. Da der limitierende Schritt der Doppelstrang-Synthese nun entfällt, sollte bei Anwendung des selbstkomplementären AAV eine höhere Genexpression in den scAAV-infizierten gegenüber den ssAAV-infizierten Zellen kurz nach der Infektion erkennbar sein.

Um diesen verbesserten Typ von AAV herzustellen, wurde in das ssAAV-Vektorplasmid pSUB201(+) eine Mutation in einem ITR eingefügt, so dass in diesem der trs-Bereich deletiert ist. Anschließend wurde die virale DNA zwischen den ITRs gegen eine Transgenkassette für GFP bzw. murines Endostatin ersetzt.

Es wurden hieraus Vektoren hergestellt. McCarty et al., 2003, konnten bereits in einem denaturierenden Gel zeigen, dass durch diese Mutation vorwiegend scAAV hergestellt wurden. Um nun zu überprüfen, ob die Vektorgenome in unserer Präparation auch in ihrer gewünschten Form vorliegen, wurde ein natives und ein denaturierendes Gel mit einer Vektorpräparation von ssAAV-GFP und scAAV-GFP durchgeführt (Abbildung 22, S. 78). Als weitere Kontrolle diente dsAAV-GFP, das durch Verkürzung des ssAAV-Genoms auf die Hälfte ohne Mutation der ITRs erhalten wurde. Das ssAAV-GFP soll im Viruskapsid als einzelsträngiges DNA Molekül mit der Wildtyp-Genomgröße vorliegen, wobei unter nicht

denaturierenden Bedingungen die beiden Polaritäten der Genome mit sich selbst hybridisieren könnten. Dadurch sollte unter diesen Bedingungen ein Doppelstrang mit der Wildtyp-Genomgröße erhalten werden, dagegen unter denaturierenden Bedingungen ein Einzelstrang mit der Wildtyp-Genomgröße (Wang et al., 2003). Beim dsAAV-GFP sind identische Bedingungen vorhanden, nur ist hier die Genomgröße auf die Hälfte der Wildtyp-Genomgröße reduziert, wodurch zwei dsAAV-Genome in einem Kapsid verpackt werden können. Deshalb sollten unter denaturierenden Bedingungen ein Einzelstrang mit der Hälfte der Wildtyp-Genomgröße erhalten werden, unter nativen Bedingungen ein Doppelstrang mit der Hälfte der Wildtyp-Genomgröße. Beim scAAV-GFP liegt das Genom unter denaturierenden Bedingungen als Einzelstrang von der Größe des Wildtyp-Genoms vor, da es zwar auf die Hälfte gekürzt worden ist, jedoch die doppelte Transgen-ITR-Sequenz, verbunden über das mutierte ITR, enthält. Unter nativen Bedingungen kann sich das Genom mit sich selbst hybridisieren, wobei das mutierte ITR als Rückfaltungssequenz dient. Dadurch wird unter nicht denaturierenden Bedingungen ein Doppelstrang mit der Hälfte der Wildtyp-Genomgröße erhalten (Wang et al., 2003). Bei der Analyse der drei AAV-Formen konnten diese Einzelstrang- und Doppelstrang-Formen durch ein natives und denaturierendes Gel verifiziert werden. Die ssAAV-, dsAAV und scAAV-Genome unserer Präparationen lagen wie theoretisch vorausgesagt in den entsprechenden Formen vor.

Der Vorteil der scAAV-Vektoren soll die höhere Transgen-Expression bereits kurz nach der Infektion sein. Nach *in vitro* Infektionen konnte bereits nach 3 Tagen eine höhere Expression von GFP und Angiostatin bei Verwendung von scAAV gegenüber ssAAV gemessen werden (Wang et al., 2003). Für die Überprüfung unser Konstrukte wurden HeLa-Zellen mit bzw. ohne Bestrahlung mit den beiden AAV-Formen, die für GFP kodieren, infiziert (Abbildung 23, S. 80). Dabei zeigte sich, dass bei Transduktion von bestrahlten Zellen mit derselben Anzahl an transduzierenden Partikeln kein Unterschied bei der Expression zwischen ssAAV-GFP und scAAV-GFP feststellbar war. Da die Zellen aufgrund der Bestrahlung die Doppelstrangsynthese verstärkt durchführen, ist der Schritt der Doppelstrangsynthese nicht mehr limitierend. Bei der Infektion von unbestrahlten HeLa-Zellen verringerte sich die Anzahl der transduzierenden ssAAV-GFP-Partikel auf ca. die Hälfte des Wertes, der bei bestrahlten HeLa-Zellen erreicht wurde. Dies ist erwartet, da unter diesen Bedingungen die Doppelstrangsynthese der limitierende Schritt ist und dadurch die Anzahl der Partikel, die die Doppelstrangsynthese und damit die Expression ihres Transgens erreichen, reduziert ist (Alexander et

al., 1996). Dagegen stieg die Anzahl der transduzierenden scAAV-GFP-Partikel bei unbestrahlten HeLa gegenüber bestrahlten HeLa um den 3-fachen Wert an. Dies kann dadurch erklärt werden, dass der scAAV-GFP im Gegensatz zum ssAAV-GFP keine Doppelstrang-Synthese durch zelluläre Faktoren benötigt, sondern durch Faltung, wie in Abbildung 14c gezeigt, selbst einen Doppelstrang ausbilden kann, der zur Expression führt (McCarty et al., 2001). Deshalb gab es keine Abnahme bei der Infektion von unbestrahlten HeLa-Zellen durch scAAV. Dies ist auch in Einklang mit Ergebnissen von Wang et al., 2003, die eine höhere Transgen-Expression mit scAAV-GFP gegenüber ssAAV-GFP zeigen konnten. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Werte des scAAV-GFP bei der Infektion von unbestrahlten gegenüber bestrahlten HeLa-Zellen ansteigen, könnte sein, dass die Zellen bei der Bestrahlung zwar die Doppelstrang-Synthese verstärkten, aber durch die Bestrahlung gleichzeitig so geschädigt wurden, dass dies zu einer Abnahme der Ergebniswerte bei der Infektion mit scAAV der bestrahlten Zellen im Vergleich zu der Infektion von unbestrahlten Zellen geführt haben könnte. Auch bei ssAAV müsste dies zu einer Erhöhung der Werte bei der Transduktion von unbestrahlten Zellen führen, nur ist hierbei die Abnahme der Expression aufgrund der fehlenden Zweitstrang-Synthese zu groß, so dass es insgesamt zu einer starken Abnahme der Genexpression hier kommt. Zusammenfassend konnte erreicht werden, dass die Transduktion von unbestrahlten Zellen durch die Verwendung von scAAV-GFP gegenüber ssAAV-GFP um den Faktor 10 gesteigert werden konnte. Dies ist in Übereinstimmung mit *in vivo* Ergebnissen, wo bei dem Einsatz von scAAV, die für murines Erythropoietin kodieren, die benötigte virale Partikelzahl auf 1/10 von ssAAV reduziert werden konnte um die gleiche Expressionsstärke zu erreichen (McCarty et al., 2003).

Um allerdings auszuschließen, dass dieser Effekt auf das Transgen GFP beschränkt ist, wurde ferner das sekretorische murine Endostatin als Transgen verwendet und nach Infektion mit ssAAV-Endo und scAAV-Endo die Konzentration an murinem Endostatin im Überstand gemessen. Hierbei konnte bei der Verwendung von scAAV gegenüber ssAAV auf HeLa-Zellen eine Steigerung der Konzentration um 30 % erhalten werden (Abbildung 24, S. 81). Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich der Effekt nicht auf das Transgen GFP beschränkt.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob auch bei Infektion von 293-Zellen diese Steigerung der Transgen-Expression bei Verwendung von scAAV gegenüber ssAAV messbar ist (Abbildung 25, S. 82). Bei der Verwendung von murinem Endostatin konnte hierbei eine Steigerung der

Konzentration im Überstand um den Faktor 5 erreicht werden. Wurde als Transgen GFP verwendet, wurde eine Steigerung der Anzahl positiver Zellen von 88 % auf 100 % erreicht. Dieser Unterschied spiegelt eine mehrfach bessere Transduktionsrate von scAAV-GFP gegenüber ssAAV-GFP wieder, da sich die Anzahl der positiven Zellen asymptotisch dem Maximalwert 100 % annähert. Also konnte auch bei 293-Zellen unter Verwendung von zwei verschiedenen Transgenen eine erhebliche Steigerung der Transduktionseffizienz gezeigt werden. Die ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Wang et al., 2003, wobei sie diese Expressionssteigerung von scAAV gegenüber ssAAV sowohl mit dem Transgen GFP als auch mit dem sekretorischen Protein Angiostatin zeigen konnten.

Die beobachtete Steigerung in der vorliegenden Arbeit ist bei 293-Zellen größer als diejenige bei der Infektion von HeLa-Zellen, z.B. konnte bei Verwendung von murinem Endostatin in HeLa-Zellen eine Steigerung der Konzentration von murinem Endostatin, das ein Maß für die Expressions- und damit auch Transduktionseffizienz darstellt, bei Verwendung von scAAV gegenüber ssAAV auf 130 % erreicht werden. Dagegen war die Steigerung bei Infektion von 293-Zellen 500 %. Bei Wang et al., 2003 wurde sogar von einer Steigerung von bis zu 3600 % berichtet. Dies lässt sich dadurch erklären, dass HeLa-Zellen schneller proliferieren als 293-Zellen. Damit ist in HeLa-Zellen die Replikationsmaschinerie stärker beansprucht als in 293-Zellen und schon bei fehlender Bestrahlung ist der Vorgang der Doppelstrangsynthese bei HeLa-Zellen stärker vorhanden, es werden also hier ohne Bestrahlung schon potentiell höhere Werte erreicht als bei 293-Zellen. Dadurch ist der Einfluss des limitierenden Schrittes der Doppelstrangsynthese von ssAAV und damit die Steigerung der Transduktionseffizienz von scAAV in HeLa-Zellen geringer. Dies würde auch bedeuten, dass bei der AAV-Infektion von ruhenden oder sich langsam teilenden Zellen der Vorteil der Verwendung von scAAV gegenüber der von ssAAV viel stärker wäre als bei der Infektion von sich stark teilenden Zellen, wie z.B. Tumoren oder bei der Wundheilung.

5.3 Untersuchung zur Optimierung von *in vivo* Anwendungen von AAV

Durch die Optimierung des Reinigungsprotokolls der AAV war es nun möglich, diese Viren in hoher Reinheit und hohem Titer zu erhalten. Dies war eine wesentliche Voraussetzung für deren Anwendung *in vivo*, da durch die hohe Reinheit Pseudotransduktionen und

Immunantworten durch Adenoviren oder adenovirale Proteine möglichst ausgeschlossen waren (Alexander et al., 1997; Xiao et al., 1998). Auch der mögliche toxische Einfluss von Cäsiumchlorid, falls noch Reste durch ungenügende Dialyse vorhanden wären, wurde ausgeschlossen, da auf Iodixanol-Ultrazentrifugation umgestellt wurde und die Abtrennung von Iodixanol über säulenchromatographische Methoden möglich war. Die Viren wurden jedoch ohne weitere säulenchromatographische Aufreinigung verwendet, da die Reinheit durch diesen weiteren Reinigungsschritt zu keiner höheren Reinheit führte (mündliche Mitteilung Fr. Dr. Büning) und außerdem Iodixanol keine toxischen Effekte aufweist, da es auch als Röntgenkontrastmittel in medizinischen Anwendungen verwendet wird (Bolstad et al., 1991; Svaland et al., 1992; Andersen et al., 1993; Pannu et al., 2005). Auch waren bei direkter Injektion einer AAV-Präparation mit Iodixanol in das Gehirn von Mäusen keine zytopathischen Effekte erkennbar (Hermens et al., 1999). Durch den hohen Titer von $3 \cdot 10^9$ infektiösen Partikeln pro ml, der durch die neue Reinigungsmethode erreicht wurde, sollte es möglich sein, mit einem möglichst kleinen Transfervolumen einen möglichst großen Effekt zu erzielen, das insbesondere bei *in vivo* Applikationen der AAV aufgrund der Begrenzung des transferierten Volumens wichtig ist.

Für den *in vivo* Transfer wurde als Transgen murines Endostatin gewählt. Dieses hat den Vorteil, dass murines Endostatin-Protein endogen in Mäusen vorhanden ist und deshalb eine Immunantwort gegen das exprimierte Transgen unwahrscheinlich ist. Weiterhin handelt es sich um ein sekretorisches Protein, was dessen Detektion erleichtert, da es, unabhängig vom Expressionsort, in das Blutplasma sezerniert wird und dadurch leicht über einen ELISA für murines Endostatin quantitativ detektiert werden kann. Dadurch wird der Nachweis der Expression erleichtert. Ferner könnte die Funktionalität des exprimierten murinen Endostatins getestet werden, da es sich um ein funktionelles Protein handelt und es schon zur Verminderung des Tumorwachstums bzw. dessen Reduktion eingesetzt worden war (O'Reilly et al., 1997). Das humane Endostatin wurde nicht verwendet, da der Transfer in immunkompetente Mäuse durchgeführt werden soll und hierbei das humane Endostatin eine Immunantwort erzeugen könnte.

Es wurde berichtet, dass die Transgen-Expression linear bis ca. 8 Wochen ansteigt, zum Teil nach einer Verzögerungsphase (Malik et al., 2000). Um dies zu überprüfen, wurde nach dem Gentransfer die Konzentration an murinem Endostatin zweimal wöchentlich gemessen.

Hierbei konnten jedoch keine erhöhten Werte für den Zeitraum von 6,5 bis 8 Wochen festgestellt werden gegenüber Kontrollmäusen, die entweder PBS erhielten oder AAV, die für GFP kodierten. Aufgrund dieser negativen Ergebnisse wurden die Ursachen hierfür gesucht und hierfür verschiedene Parameter untersucht, die für einen erfolgreichen Gentransfer und Expression der Gene essentiell sind.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde versucht die Ursache für die fehlende Expression *in vivo* zu finden. Dabei wurden mögliche technische Probleme und Fehler untersucht, wie unterschiedliche Methoden der Gewinnung und Lagerung des Serums (Abbildung 27, S. 85), unterschiedliche Applikationswege, wie i.v., i.m. und in die Pfortader der Milz (Abbildung 30, S.89) und der Nachweis von Endostatin-Protein direkt aus *in vivo* Proben von Balb/c und C57Bl/6-Mäusen (Abbildung 28, S. 86, und Abbildung 29, S. 87). Bei letzterem Versuch zeigte sich, dass die gemessene Endostatin-Menge unabhängig von der injizierten Menge nur jeweils ca. 4 % bis 5 % der ursprünglich eingesetzten repräsentiert. In der Literatur ist beschrieben, dass bei Versuchen mit Faktor IX zwar die Expression von Beginn an statt fand, jedoch wurden zuerst die Faktor IX Bindungsstellen in den Endothelzellen und im vaskulären Gewebe gesättigt bevor Faktor IX im Blutgemessen werden konnte (Cheung et al., 1996; Herzog et al., 1997). Auch bei Endostatin sind Bindungsstellen bekannt, an die das transferierte Endostatin-Protein binden könnte und damit bei der Messung der murinen Endostatin-Konzentration im Blut entgehen würde (Sasaki et al., 1999; Karumanchi et al., 2001; Reis et al., 2005). Allerdings wäre bei niedriger Endostatin-Konzentration bis zu einem bestimmten Wert kein Endostatin nachweisbar und ab diesem Wert ein linearer Anstieg der Konzentration messbar. Bei dem hier durchgeführten Versuch ist jedoch unabhängig von der eingesetzten Menge nur 4 % bis 5 % an murinem Endostatin nachweisbar. Dieses Phänomen dürfte deshalb nicht aufgrund der Sättigung von Endostatin-Bindungsstellen auftreten, die Ursache hierfür müsste noch in weiteren Versuchen untersucht werden.

Eine weitere Überprüfung des Konstruktes erfolgte *in vitro*, wobei 3328±100 ng nach Infektion mit AAV-CMV-Endo und 5456±320 ng Endostatin nach Infektion von scAAV-CMV-Endo gemessen werden konnte (Abbildung 24, S. 81). Da mit einer ähnlich hohen Vektormenge wie bei den *in vivo* Versuchen infiziert wurde, und das Volumen von 4 ml ca. das Doppelte des Blutvolumens einer Maus ist (Diehl et al., 2001), konnte hiermit gezeigt werden, dass unter ähnlichen Bedingungen wie bei den *in vivo* Versuchen sowohl die Expression des

murinen Endostatins durch die Viren, als auch dessen Nachweis *in vitro* funktioniert. Auch beim Austausch des Transgens gegen GFP konnten keine positiven Zellen in der Leber gefunden werden (Tabelle 6, S. 90, und Tabelle 7, S. 90).

Ein immunhistochemischer Nachweis der rAAV-Vektoren in Leberschnitte konnte aufgrund technischer Probleme, die vermutlich durch geringe spezifische Antikörperkonzentrationen der kommerziell erhältlichen Antikörper bedingt sind (mündl. Mitteilung Fr. Sendlhofert, pathologisches Institut der Universität München), nicht erbracht werden (Abbildung 36, S. 98, und Abbildung 37, S. 100). Dagegen konnten virale Genome in der Leber über quantitativer PCR nachgewiesen werden, wobei eine Elimination von Makrophagen vor rAAV-Applikation zu keiner Erhöhung der Anzahl der viralen Genome führte (Abbildung 31, S. 92, Abbildung 33, S. 93, Abbildung 38, S. 101, und Abbildung 39, S. 102), was bei Adenoviren gezeigt werden konnte (Tao et al., 2001).

Bei weiteren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu *in vitro* Versuchen bei den durchgeführten *in vivo* Versuchen ein ca. 1000-fach geringeres Verhältnis von RNA-Menge zu der Anzahl an vorhandenen viralen Genomen vorlag (Abbildung 34, S. 94, und Abbildung 35, S. 96). In der Publikation von Nathwani et al., 2001, wurde gezeigt, dass die Stärke des CMV-Promotors, der in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, eine niedrige Expressionsstärke gegenüber anderen Promotoren, dem CMV Enhancer/β-Actin-Promotor-Komplex (CAGG) und einem Leber-spezifischen Promotor aus dem Hepatitis B Virus, aufweist. Bei *in vivo* Versuchen wurde bei Verwendung des CAGG-Promotors eine 10-fach höhere Expression von humanen Faktor IX (hFIX) erreicht als bei Verwendung des CMV-Promotors. Bei diesem wurden Werte von bis zu 50 ng/ml erreicht, ein Wert der ungefähr der Negativkontrolle bei den hier durchgeführten Versuchen mit murinem Endostatin entspräche.

Ein weiterer Grund für die geringe Transkription des Transgens kann das *in vivo* Silencing des CMV-Promotors sein. Hierbei wird über Methylierung und Acetylierung die Aktivität des Promotors reduziert bzw. eliminiert (Kay et al., 1992; Snyder et al., 1997; Gerolami et al., 2000; Gill et al., 2001; Teschendorf et al., 2002; Brooks et al., 2004). Die Methylierung war dabei schon 24 Stunden nach Transduktion zu erkennen. Auch hier war ein Verhältnis von RNA zu DNA von ca. $1 \cdot 10^{-2}$ zu erkennen, demselben Verhältnis das auch in der vorliegenden

Arbeit erhalten wurde (Abbildung 34, S. 94; Brooks et al., 2004). Um diese Einflüsse zu überprüfen bzw. zu umgehen müssten neue Vektoren mit einem stärkeren Promotor, der nicht durch das Silencing ausgeschaltet wird und eine hohe Expressionsrate *in vivo* aufweist, kloniert, hergestellt und deren Expressionsstärke *in vivo* überprüft werden. Dies würde den zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch sprengen und wurde aus diesem Grund nicht mehr durchgeführt.

5.4 Untersuchung zur Inhibition der AAV-Infektion durch Antikoagulanzien

Das Ziel der AAV-Technologie ist insbesondere dessen Verwendung in der Gentherapie (Stilwell und Samulski, 2003). Hierbei sollen rekombinante AAV, die für das entsprechende therapeutische Gen kodieren, in Menschen injiziert werden. Oft werden Patienten in Kliniken vorsorglich mit Heparin, einem Antikoagulanz, das den antithrombotischen Effekt durch anti-Thrombin III- (AT III-) vermittelter Inhibition des Koagulationsfaktors Xa ausübt, behandelt, um die Gefahr von Thrombosen zu minimieren (Hirsh, 1991).

Summerford und Samulski, 1998, fanden heraus, dass Heparansulfatproteoglykan (HSPG) auf Zelloberflächen als Primärrezeptor für AAV dient. HSPG ist ein Proteoglykan, dessen Karbohydrat-Teil aus alternierenden Einheiten von Hexaunronsäure (D-Glukouronsäure, GlcA) bzw. L-Iduronsäure (IdoA) mit D-Glukosamin (GlcN) besteht. Die GlcN-Einheiten sind überwiegend N-sulfatiert bzw. N-acetyliert (Gallagher und Walker, 1985; van den Born et al., 1995; Salmivirta et al., 1996). Weiterhin kann eine 6-O-Sulfatierung für eine weitere Variabilität der Karbohydratketten verantwortlich sein (Lindahl et al., 1998). Ein naher Verwandter zu HSPG ist das Polysaccharid Heparin. Im Gegensatz zu HSPG sind die Karbohydratketten hier vorwiegend N-sulfatiert. Dies würde die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass AAV auch an Heparin binden kann und dadurch eine Infektion mit AAV durch Heparin verhindert werden könnte. Summerford und Samulski, 1998, konnten bei ihren Untersuchungen dies darstellen und auch bei unseren Untersuchungen konnten wir dies verifizieren (s. Abbildung 41, S. 106). Schon bei der Konzentration von 0,1 U/ml, einer Konzentration, die in der Klinik prophylaktisch eingesetzt wird (Institut für Klinische Chemie Großhadern), war eine Inhibition von 30 bis 40 % messbar und bei 10 U/ml war eine vollständige Inhibition der AAV-Infektion zu erkennen. Dies bestätigt die Ergebnisse von

Summerford und Samulski, 1998, wobei auch eine starke Inhibition bei geringen Heparinkonzentration gezeigt werden konnte.

Da Heparin aber weit verbreitet in der klinischen Anwendung ist (Hirsh, 1991), andererseits die AAV-Infektion durch Heparin inhibiert werden kann, könnte bei heparinisierten Patienten die gentherapeutischen Anwendung mit AAV nicht angewendet werden. Deshalb sollte nun untersucht werden, ob alternative in der Klinik eingesetzte Antikoagulanzien eingesetzt werden könnten, die eine AAV-Infektion geringer oder gar nicht inhibieren würden.

Tinzaparin-Natrium (Handelsname Innohep) ist ein niedermolekulares Heparin gewonnen aus enzymatischer Depolymerisierung von unfraktioniertem Heparin, das aus einem heterologem Gemisch von sulfatiertem Glykosamidglykan-Ketten mit einer Masse zwischen 5000 kDa und 7500 kDa besteht (Simonneau et al., 1997). Es wies eine etwas geringere Inhibitionseigenschaft der AAV-Infektion als Heparin auf (s. Abbildung 42, S. 107). Bei der Konzentration von 0,1 U/ml, einer klinisch relevanten Konzentration (Institut für Klinische Chemie Großhadern), lag eine geringe Inhibition von 20 bis 30 % vor. Erst bei einer Konzentration von 1000 U/ml, und nicht schon bei 10 U/ml wie bei Heparin, war eine vollständige Inhibition der AAV-Infektion zu erkennen.

Ein noch weiter entfernter Verwandter von Heparin als Tinzaparin-Natrium ist Danaparoid-Natrium (Handelsname Orgaran), ein niedermolekulares Heparinoid. Es besteht aus einem Gemisch an Heparansulfat, Dermatansulfat und Chondroitinsulfat (Skoutakis, 1997). Es wies eine noch geringere Inhibition der AAV-Infektion als Tinzaparin-Natrium auf (s. Abbildung 43, S. 108). Bei der klinisch relevanten Konzentration von 0,1 U/ml (Institut für Klinische Chemie Großhadern) war fast keine Inhibition erkennbar. Diese stieg auch bedeutend langsamer in Vergleich Tinzaparin-Natrium und auch erst bei einer Konzentration von 1000 U/ml war eine vollständige Inhibition der AAV-Infektion erreicht.

Als weiteres Antikoagulanz wurde Hirudin eingesetzt, ein Peptid das als Thrombin-Inhibitor wirkt und keine Ähnlichkeit mit Heparin aufweist. Es wurde ursprünglich aus dem medizinischen Blutegel (Hirudo Medicinalis) gewonnen, jedoch wird es inzwischen rekombinant erzeugt. Anders als die bisher untersuchten Antikoagulanzien wirkt es direkt mit Thrombin (Greinacher et al., 1999). Aufgrund einer fehlenden strukturellen Ähnlichkeit mit Heparin ist

eine Abnahme der Inhibition der AAV-Injektion zu erwarten. Es zeigte sich in unseren Untersuchungen keine Inhibition er AAV-Infektion (s. Abbildung 44, S. 109). Selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration konnte keine Auswirkung auf die Inhibition der AAV-Infektion erreicht werden.

Bei unseren Untersuchungen ist eine Tendenz zu erkennen, dass die Stärke der Inhibition abhängig ist von der strukturellen Ähnlichkeit mit Heparin. Um dies herauszustellen, wurden die Ergebnisse für die Vorinkubationszeit von 10 min in nachfolgender Abbildung zusammengefasst.

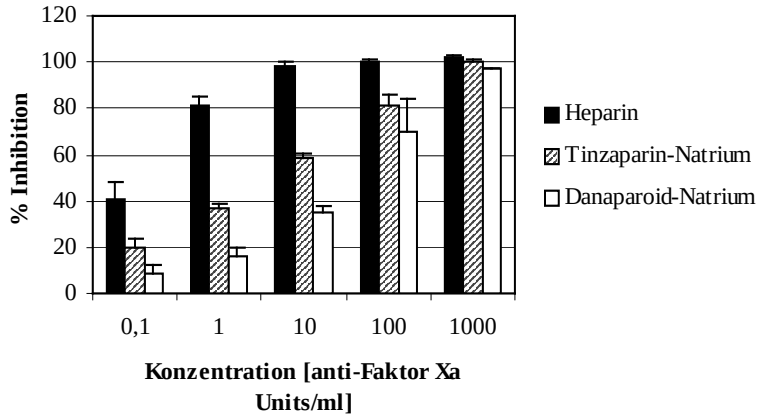


Abbildung 49: Übersicht der Inhibition der AAV-Infektion durch Heparin und Heparin-ähnliche Antikoagulanzien. Die Ergebnisse für die Inhibition der AAV-Infektion durch Heparin, Tinzaparin-Natrium und Danaparoid-Natrium bei 10 min Vorinkubationszeit ist von den Abbildung 41, Abbildung 42 und Abbildung 43 als Zusammenfassung in diesem Balkendiagramm dargestellt.

Bei sämtlichen Verdünnungen dieser vergleichenden Zusammenstellung stellt sich sehr deutlich dar, dass die Inhibition umso schwächer war, je geringer die strukturelle Ähnlichkeit des Antikoagulanz mit Heparin ist. Die Inhibition nahm von Heparin über das niedermolekulare Heparin Tinzaparin-Natrium zum niedermolekularen Heparinoid Danaparoid-Natrium bei allen Konzentrationen bis 100 U/ml stark ab. Nur bei der sehr hohen Konzentration von 1000 U/ml war bei allen in der Abbildung 49 dargestellten Antikoagulanzien eine vollständige Inhibition zu erkennen.

Diese Erhöhung der Inhibition der AAV-Infektion bei Erhöhung der Konzentration von Heparin oder dessen Derivate ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Heparin an AAV bindet und damit den Ligand sättigt. Dabei müsste eine Erhöhung der Konzentration der Viren bei gleichbleibender Konzentration der Antikoagulanzien zu einer Verringerung der Inhibition

führen, da nun eine höhere Anzahl von Viren für die Bindung an Antikoagulanzien sowie den HSPG der Zellmembrane zu Verfügung steht und deshalb zu einer Erhöhung der Infektion führen sollte. Eine solche Verringerung der Inhibition konnte bestätigt werden, was, wie schon beschrieben, auf eine Kompetition der Antikoagulanzien mit den HSPG auf den Zellmembranen um die HSPG-Bindungsstellen des AAV zurückzuführen ist (s Abbildung 45, S. 111).

Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Heparin eine AAV-Infektion stark inhibieren kann und diese Inhibition umso schwächer ist, je weniger verwandt das verwendete Antikoagulanz mit Heparin ist. Da auch bei anderen Viren, wie z.B. bei humanen Cytomegalus Virus, HIV-1 und Herpes Simplex Virus Typ 1, die für einen möglichen gentherapeutischen Ansatz untersucht werden, oft deren Infektion durch Heparin inhibiert werden kann (Neyts et al., 1992; Patel et al., 1993; Herold et al., 1995; Vives et al., 2005), sollte bei Einsatz von Antikoagulanzien bei Patienten, die einer viralen Gentherapie unterzogen werden sollen, darauf geachtet werden, dass durch diese Antikoagulanzien der Erfolg der gentherapeutischen Behandlung aufgrund der Inhibition der Infektion dieser Viren möglicherweise verringert oder gar ausgeschlossen sein könnte.

6 Zusammenfassung und Perspektiven

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Optimierung der *in vivo* Anwendung von Adeno-assoziierte Virus- (AAV-) Vektoren.

Aufgrund der Notwendigkeit bei *in vivo* Versuchen, die injizierte Vektorsuspension möglichst kontaminationsfrei und mit einer hohen Konzentration herzustellen und zu reinigen, wurde das Reinigungsprotokoll für AAV bezüglich Zeitaufwand, Reinheit und hohen Titern optimiert. Hierfür wurde die Anwendung und Notwendigkeit von verschiedenen Reinigungsschritten, die auf unterschiedliche chemische und physikalische Trennmethoden beruhen, bezüglich der Erhöhung der Reinheit und des Titers untersucht. Dabei konnte ein neues Reinigungsprotokoll etabliert werden, dessen Schema in Abbildung 47 (s. S. 119) aufgezeigt ist. Hiermit können Viren mit ausreichender Reinheit und Titer für Anwendungen, bei denen eine hohe Reinheit erforderlich ist, hergestellt werden. Sollen jedoch Versuche durchgeführt werden, bei denen eine noch höhere Menge an Viren benötigt werden z.B. mit größeren Tieren oder auch beim Menschen, ist eine weitere Optimierung bezüglich der Vektormenge erforderlich. Dies sollte durch den Einsatz von automatisch durchführbaren Reinigungsschritten erfolgen.

Ferner war insbesondere bei *in vivo* Versuchen die Zeitlücke zwischen Infektion und Expression des Transgens von zum Teil mehreren Wochen ein Fokus für die Optimierungsarbeiten in der vorliegenden Arbeit. Diese Zeitlücke ist dadurch bedingt, dass nach der Infektion durch AAV für eine Expression des Transgens zuerst eine Konversion des viralen Einzelstrang-Genoms in einen Doppelstrang notwendig ist und dies von den zellulären Faktoren nicht spontan durchgeführt wird, so dass dieser Schritt limitierend bei der AAV-Infektion ist. Durch die Herstellung von selbst-komplementären konnten AAV produziert werden, die nach Infektion und Freisetzung aus dem Kapsid einen Doppelstrang durch Rückfaltung bilden können. Auch eine deutlich höhere Transgen-Expression schon kurz nach der Infektion gegenüber den normalen einzelsträngigen AAV konnte bei anschließenden *in vitro* Versuchen bestätigt werden.

Bei *in vitro* Versuchen konnte eine Expression des Transgens gemessen werden, nicht jedoch *in vivo*. Auch durch Optimierung der Analyse des Transgen-Produktes, der Art des Gentransfers und des Austauschs des Transgens konnten hier keine Änderung bewirken. Ein Einfluss

der Makrophagen auf die AAV-Infektion *in vivo* wurde ausgeschlossen. Durch weitere Analysen wurde festgestellt, dass zwar die viralen Genome in den Mäusen vorhanden waren, die Transgene aber nicht genügend transkribiert worden waren. Dies lässt auf ein Silencing des Promotors schließen, das in der Literatur für den hierfür verwendeten CMV-Promotor beschrieben worden ist. Ein weiterer Grund für die fehlende Expression könnte dadurch bedingt sein, dass zwar die verwendeten Viren auf humane Zellen getestet wurden, jedoch könnte aufgrund unterschiedlicher Oberflächenmoleküle die Effizienz der Infektion der Viren bei murinen Zielzellen geringer sein. Eine Erhöhung dieser Effizienz könnte eventuell durch einen Wechsel des Serotyps erreicht werden. Aufgrund des zeitlichen Rahmens der Promotionsarbeit wurde jedoch auf einen Austausch des Promotors durch Klonierungen und der Wechsel des Serotyps, sowie die Wiederholung der durchgeführten Tierversuche mit diesen Änderungen verzichtet.

Insbesondere bei der Anwendung des AAV-Systems für die humane somatische Gentherapie ist die Inhibition der AAV-Infektion durch Heparin zu berücksichtigen, da häufig Patienten zur Vorbeugung von Thrombosen heparinisiert werden. Aus diesem Grund wurde die Stärke der Inhibition der AAV-Infektion durch Heparin und weitere Antikoagulanzien, die strukturell verwandt oder verschieden von Heparin sind, untersucht. Hierbei konnte eine Kompetition der Antikoagulanzien mit den zellulären Heparansulfatproteoglykane (HSPG) um die viralen HSPG-Bindungsstellen festgestellt werden. Dieser Effekt war umso ausgeprägter, je näher verwandt das Antikoagulanz zu Heparin war, das die stärkste Inhibition aufwies. Dagegen war bei dem mit Heparin strukturell nicht verwandten Hirudin, einem Peptid, keine Inhibition der AAV-Infektion auch bei höchsten Konzentrationen nachweisbar.

Die hier durchgeführten Optimierungen des Reinigungsverfahrens stellt eine wichtige Grundlage für die weitere Anwendung von AAV-Vektoren *in vivo* dar. Auch die Verwendung des hergestellten selbst-komplementären AAV, dessen Vorteile gegenüber den normalen einzelsträngigen AAV gezeigt werden konnte, sollte bei weiteren Studien, sofern die Größe dies erlaubt, aufgrund der höheren Genexpression schon kurz nach der Infektion in Zukunft favorisiert werden. Für weitere *in vivo* Studien sollte jedoch zuerst der CMV-Promoters durch andere starke Promotoren, die kein Silencing aufweisen, ausgetauscht werden. Weiterhin sollte beachtet werden, dass bei Verwendung von Antikoagulanzien bei der humanen Gentherapie mit AAV, aber auch bei *in vivo* Applikation dieses Viruses unter Einsatz von Anti-

koagulanzien, z.B. bei operativen Eingriffen, möglichst kein Heparin verwendet werden sollte, ebenso wären strukturell ähnliche Antikoagulanzien nicht zu favorisieren, sondern idealerweise ein nicht mit Heparin verwandtes Antikoagulanz, z.B. Hirudin. Die Untersuchung all dieser Faktoren sind notwendige Voraussetzungen für eine erfolgreiche *in vivo* Applikation von AAV-Vektoren in der Gentherapie.

7 Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Ω	Ohm
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AAVS1	Integrationsstelle des AAV im humanen Genom
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AP	alkalische Phosphatase
APAAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase and rat monoclonal Anti-Alkaline Phosphatase
AS	Ammoniumsulfat
AT III	anti-Thrombin III
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATCC	American Type Culture Collection

Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

BBS	BES-gepuffertes Salz
BES	*N*,*N*-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CAGG	CMV Enhancer/β-Actin-Promotor-Komplex
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
Cs	Cäsium
d	Tag
D	Diffusionskonstante
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleotid
dsAAV	doppelsträngiges AAV
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced GFP
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
Endo	Endostatin
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm

G	Gravitationskonstante
GFP	Green Fluorescent Protein
Gy	Gray
h	Stunde
hCMV	humanes Cytomegalievirus
HEPES	*N*-2-Hydroxyethylpiperazin-*N*'-2-ethansulfonsäure
hFGFR1	humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1
hHGFR	humanen Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
Ig	Immunglobulin
Il2	Interleukin-2
ITR	invertierte terminale Wiederholung
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
Kl	Klenow-Reaktion
l	Liter
LB-Medium	Lauria-Bertani Medium
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
moi	multiplicity of infection
MOM	Maus-auf-Maus
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n.d.	nicht detektierbar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
OD	Optische Dichte
orf	Offener Leserahmen
Ⓟ	Phosphatase-Reaktion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-MK	Magnesium- und Kalium-haltiges PBS
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration
pmol	Pikomol
PolyA	Polyadenylierungssignal
rAAV	rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus
rbs	Rep-Bindungsstelle
Rep	Regulatorisches Protein

RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
s.	siehe
S.	Seite
scAAV	selbstkomplementäres AAV
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ssAAV	einzelsträngiges AAV
SSC	Saline sodium citrat
ssDNA	einzelsträngige DNA
SST	Serum-Separations-Röhrchen
SV	Simian Virus
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
trs	terminale Schnittstelle
TYM-Medium	Trypticase Yeast Extract Maltose Medium
U	Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VP	Kapsidprotein
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel

8 Literaturverzeichnis

Institut für Klinische Chemie Großhadern. Untersuchungsantrag 5: Hämostaseologie. http://www.w-klch.med.uni-muenchen.de/verfahrensliste/antrag5.html.

Alexander, I. E., Russell, D. W., Miller, A. D. (1997). Transfer of contaminants in adeno-associated virus vector stocks can mimic transduction and lead to artifactual results. *Hum Gene Ther* 8:1911-20.

Alexander, I. E., Russell, D. W., Spence, A. M., Miller, A. D. (1996). Effects of gamma irradiation on the transduction of dividing and nondividing cells in brain and muscle of rats by adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* 7:841-50.

Andersen, P. E., Bolstad, B., Berg, K. J., Justesen, P., Thayssen, P., Kloster, Y. F. (1993). Iodixanol and ioxaglate in cardioangiography: a double-blind randomized phase III study. *Clin Radiol* 48:268-72.

Atchison, R. W., Casto, B. C., Hammon, W. M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149:754-6.

Atchison, R. W., Casto, B. C., Hammon, W. M. (1966). Electron microscopy of adenovirus-associated virus (AAV) in cell cultures. *Virology* 29:353-7.

Auricchio, A., Hildinger, M., O'Connor, E., Gao, G. P., Wilson, J. M. (2001). Isolation of highly infectious and pure adeno-associated virus type 2 vectors with a single-step gravity-flow column. *Hum Gene Ther* 12:71-6.

Bantel-Schaal, U. und zur Hausen, H. (1984). Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* 134:52-63.

Bartlett, J. S., Wilcher, R., Samulski, R. J. (2000). Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 74:2777-85.

Becerra, S. P., Koczot, F., Fabisch, P., Rose, J. A. (1988). Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J Virol* 62:2745-54.

Berns, K. I. (1990). Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 54:316-29.

Blacklow, N. R., Hoggan, M. D., Sereno, M. S., Brandt, C. D., Kim, H. W., Parrott, R. H., Chanock, R. M. (1971). A seroepidemiologic study of adenovirus-associated virus infection in infants and children. *Am J Epidemiol* 94:359-66.

Bohenzky, R. A., LeFebvre, R. B., Berns, K. I. (1988). Sequence and symmetry requirements within the internal palindromic sequences of the adeno-associated virus terminal repeat. *Virology* 166:316-27.

Bolstad, B., Borch, K. W., Grynne, B. H., Lundby, B., Nossen, J. O., Kloster, Y. F., Kristoffersen, D. T., Andrew, E. (1991). Safety and tolerability of iodixanol. A dimeric,

nonionic contrast medium: an emphasis on European clinical phases I and II. *Invest Radiol* 26 Suppl 1:S201-4; discussion S208.

Botquin, V., Cid-Arregui, A., Schlehofer, J. R. (1994). Adeno-associated virus type 2 interferes with early development of mouse embryos. *J Gen Virol* 75 (Pt 10):2655-62.

Brister, J. R. und Muzyczka, N. (2000). Mechanism of Rep-mediated adeno-associated virus origin nicking. *J Virol* 74:7762-71.

Brooks, A. R., Harkins, R. N., Wang, P., Qian, H. S., Liu, P., Rubanyi, G. M. (2004). Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 6:395-404.

Büchen-Osmond, C. (Ed), (2003). 00.050. Parvoviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. ICTVdB Management, The Earth Institute, Biosphere 2 Center, Oracle, AZ, USA.

Bueler, H. (1999). Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. *Biol Chem* 380:613-22.

Buller, R. M., Janik, J. E., Sebring, E. D., Rose, J. A. (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* 40:241-7.

Buning, H., Braun-Falco, M., Hallek, M. (2004). Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy. *Cells Tissues Organs* 177:139-50.

Buning, H., Ried, M. U., Perabo, L., Gerner, F. M., Huttner, N. A., Enssle, J., Hallek, M. (2003). Receptor targeting of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 10:1142-51.

Burguete, T., Rabreau, M., Fontanges-Darriet, M., Roset, E., Hager, H. D., Koppel, A., Bischof, P., Schlehofer, J. R. (1999). Evidence for infection of the human embryo with adeno-associated virus in pregnancy. *Hum Reprod* 14:2396-401.

Casto, B. C., Atchison, R. W., Hammon, W. M. (1967). Studies on the relationship between adeno-associated virus type I (AAV-1) and adenoviruses. I. Replication of AAV-1 in certain cell cultures and its effect on helper adenovirus. *Virology* 32:52-9.

Chao, H., Sun, L., Bruce, A., Xiao, X., Walsh, C. E. (2002). Expression of human factor VIII by splicing between dimerized AAV vectors. *Mol Ther* 5:716-22.

Chatterjee, S., Johnson, P. R., Wong, K. K., Jr. (1992). Dual-target inhibition of HIV-1 in vitro by means of an adeno-associated virus antisense vector. *Science* 258:1485-8.

Chejanovsky, N. und Carter, B. J. (1990). Mutation of a consensus purine nucleotide binding site in the adeno-associated virus rep gene generates a dominant negative phenotype for DNA replication. *J Virol* 64:1764-70.

Chen, C. und Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7:2745-52.

Chen, C. A. und Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6:632-8.

Cheung, W. F., van den Born, J., Kuhn, K., Kjellen, L., Hudson, B. G., Stafford, D. W. (1996). Identification of the endothelial cell binding site for factor IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11068-73.

Cohen, S. N., Chang, A. C., Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:2110-4.

Collaco, R. F., Cao, X., Trempe, J. P. (1999). A helper virus-free packaging system for recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene* 238:397-405.

Davis, M. D., Wu, J., Owens, R. A. (2000). Mutational analysis of adeno-associated virus type 2 Rep68 protein endonuclease activity on partially single-stranded substrates. *J Virol* 74:2936-42.

Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. M., van de Vorstenbosch, C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 21:15-23.

Douar, A. M., Poulard, K., Stockholm, D., Danos, O. (2001). Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol* 75:1824-33.

Duan, D., Li, Q., Kao, A. W., Yue, Y., Pessin, J. E., Engelhardt, J. F. (1999). Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 73:10371-6.

Dutheil, N., Shi, F., Dupressoir, T., Linden, R. M. (2000). Adeno-associated virus site-specifically integrates into a muscle-specific DNA region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4862-6.

Erles, K., Rohde, V., Thaele, M., Roth, S., Edler, L., Schlehofer, J. R. (2001). DNA of adeno-associated virus (AAV) in testicular tissue and in abnormal semen samples. *Hum Reprod* 16:2333-7.

Fairley, C. K., Smoleniec, J. S., Caul, O. E., Miller, E. (1995). Observational study of effect of intrauterine transfusions on outcome of fetal hydrops after parvovirus B19 infection. *Lancet* 346:1335-7.

Ferrari, F. K., Samulski, T., Shenk, T., Samulski, R. J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 70:3227-34.

Fisher, K. J., Jooss, K., Alston, J., Yang, Y., Haecker, S. E., High, K., Pathak, R., Raper, S. E., Wilson, J. M. (1997). Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med* 3:306-12.

Flotte, T. R. (2005). Adeno-associated virus-based gene therapy for inherited disorders. *Pediatr Res* 58:1143-7.

Flotte, T. R., Afione, S. A., Zeitlin, P. L. (1994). Adeno-associated virus vector gene expression occurs in nondividing cells in the absence of vector DNA integration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:517-21.

Gallagher, J. T. und Walker, A. (1985). Molecular distinctions between heparan sulphate and heparin. Analysis of sulphation patterns indicates that heparan sulphate and heparin are separate families of N-sulphated polysaccharides. *Biochem J* 230:665-74.

Gao, G., Qu, G., Burnham, M. S., Huang, J., Chirmule, N., Joshi, B., Yu, Q. C., Marsh, J. A., Conceicao, C. M., Wilson, J. M. (2000). Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance in vivo. *Hum Gene Ther* 11:2079-91.

Gao, G. P., Alvira, M. R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., Wilson, J. M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11854-9.

Gao, G. P., Qu, G., Faust, L. Z., Engdahl, R. K., Xiao, W., Hughes, J. V., Zoltick, P. W., Wilson, J. M. (1998). High-titer adeno-associated viral vectors from a Rep/Cap cell line and hybrid shuttle virus. *Hum Gene Ther* 9:2353-62.

Gerolami, R., Uch, R., Jordier, F., Chapel, S., Bagnis, C., Brechot, C., Mannoni, P. (2000). Gene transfer to hepatocellular carcinoma: transduction efficacy and transgene expression kinetics by using retroviral and lentiviral vectors. *Cancer Gene Ther* 7:1286-92.

Gill, D. R., Smyth, S. E., Goddard, C. A., Pringle, I. A., Higgins, C. F., Colledge, W. H., Hyde, S. C. (2001). Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1alpha promoter. *Gene Ther* 8:1539-46.

Girod, A., Ried, M., Wobus, C., Lahm, H., Leike, K., Kleinschmidt, J., Deleage, G., Hallek, M. (1999). Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med* 5:1052-6.

Grce, M., Husnjak, K., Matovina, M., Milutin, N., Magdic, L., Husnjak, O., Pavelic, K. (2004). Human papillomavirus, cytomegalovirus, and adeno-associated virus infections in pregnant and nonpregnant women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol* 42:1341-4.

Greinacher, A., Volpel, H., Janssens, U., Hach-Wunderle, V., Kemkes-Matthes, B., Eichler, P., Mueller-Velten, H. G., Potzsch, B. (1999). Recombinant hirudin (lepirudin) provides safe and effective anticoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study. *Circulation* 99:73-80.

Grimm, D., Kern, A., Rittner, K., Kleinschmidt, J. A. (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* 9:2745-60.

Hacker, U. T., Wingenfeld, L., Kofler, D. M., Schuhmann, N. K., Lutz, S., Herold, T.,

King, S. B., Gerner, F. M., Perabo, L., Rabinowitz, J., McCarty, D. M., Samulski, R. J., Hallek, M., Buning, H. (2005). Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency. *J Gene Med*
Hallek, M., Bergsagel, P. L., Anderson, K. C. (1998). Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 91:3-21.

Hartley, J. W. und Rowe, W. P. (1960). A new mouse virus apparently related to the adenovirus group. *Virology* 11:645-7.

Heilbronn, R., Schlehofer, J. R., Yalkinoglu, A. O., Zur Hausen, H. (1985). Selective DNA-amplification induced by carcinogens (initiators): evidence for a role of proteases and DNA polymerase alpha. *Int J Cancer* 36:85-91.

Hermens, W. T., ter Brake, O., Dijkhuizen, P. A., Sonnemans, M. A., Grimm, D., Kleinschmidt, J. A., Verhaagen, J. (1999). Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks for gene transfer in the nervous system. *Hum Gene Ther* 10:1885-91.

Hermonat, P. L. und Muzyczka, N. (1984). Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6466-70.

Hermonat, P. L., Quirk, J. G., Bishop, B. M., Han, L. (1997). The packaging capacity of adeno-associated virus (AAV) and the potential for wild-type-plus AAV gene therapy vectors. *FEBS Lett* 407:78-84.

Herold, B. C., Gerber, S. I., Polonsky, T., Belval, B. J., Shaklee, P. N., Holme, K. (1995). Identification of structural features of heparin required for inhibition of herpes simplex virus type 1 binding. *Virology* 206:1108-16.

Herzog, R. W., Hagstrom, J. N., Kung, S. H., Tai, S. J., Wilson, J. M., Fisher, K. J., High, K. A. (1997). Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5804-9.

Hirsh, J. (1991). Heparin. *N Engl J Med* 324:1565-74.

Hoggan, M. D., Blacklow, N. R., Rowe, W. P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55:1467-74.

Hoggan, M. D., Thomas, G. F., Thomas, F. B., Johnson, F. B. (1972). Continuous carriage of adenovirus associated virus genome in cell culture in the absence of helper adenovirus. *Presented at Proc. Leptite Colloquium, 4th,* Cocoyac, Mexico

Horer, M., Weger, S., Butz, K., Hoppe-Seyler, F., Geisen, C., Kleinschmidt, J. A. (1995). Mutational analysis of adeno-associated virus Rep protein-mediated inhibition of heterologous and homologous promoters. *J Virol* 69:5485-96.

Huttner, N. A., Girod, A., Perabo, L., Edbauer, D., Kleinschmidt, J. A., Buning, 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. *Gene Ther* 10:2139-47.

Im, D. S. und Muzyczka, N. (1990). The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 61:447-57.

Im, D. S. und Muzyczka, N. (1992). Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *J Virol* 66:1119-28.

Inoue, N. und Russell, D. W. (1998). Packaging cells based on inducible gene amplification for the production of adeno-associated virus vectors. *J Virol* 72:7024-31.

Jamison, R. M. und Mayor, H. D. (1965). Acridine orange staining of purified rat virus strain X14. *J Bacteriol* 90:1486-8.

Karumanchi, S. A., Jha, V., Ramchandran, R., Karihaloo, A., Tsiokas, L., Chan, B., Dhanabal, M., Hanai, J. I., Venkataraman, G., Shriver, Z., Keiser, N., Kalluri, R., Zeng, H., Mukhopadhyay, D., Chen, R. L., Lander, A. D., Hagihara, K., Yamaguchi, Y., Sasisekharan, R., Cantley, L., Sukhatme, V. P. (2001). Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol Cell* 7:811-22.

Kashiwakura, Y., Tamayose, K., Iwabuchi, K., Hirai, Y., Shimada, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Watanabe, M., Oshimi, K., Daida, H. (2005). Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 79:609-14.

Kay, M. A., Baley, P., Rothenberg, S., Leland, F., Fleming, L., Ponder, K. P., Liu, T., Finegold, M., Darlington, G., Pokorny, W., et al. (1992). Expression of human alpha 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:89-93.

Kessler, P. D., Podsakoff, G. M., Chen, X., McQuiston, S. A., Colosi, P. C., Matelis, L. A., Kurtzman, G. J., Byrne, B. J. (1996). Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14082-7.

King, J. A., Dubielzig, R., Grimm, D., Kleinschmidt, J. A. (2001). DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *Embo J* 20:3282-91.

Koeberl, D. D., Alexander, I. E., Halbert, C. L., Russell, D. W., Miller, A. D. (1997). Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1426-31.

Kotin, R. M. (1994). Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum Gene Ther* 5:793-801.

Kotin, R. M., Menninger, J. C., Ward, D. C., Berns, K. I. (1991). Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* 10:831-4.

Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., Berns, K. I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2211-5.

Kyostio, S. R., Owens, R. A., Weitzman, M. D., Antoni, B. A., Chejanovsky, N., Carter, B. J. (1994). Analysis of adeno-associated virus (AAV) wild-type and mutant Rep proteins for their abilities to negatively regulate AAV p5 and p19 mRNA levels. *J Virol* 68:2947-57.

Laughlin, C. A., Tratschin, J. D., Coon, H., Carter, B. J. (1983). Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids. *Gene* 23:65-73.

Laughlin, C. A., Westphal, H., Carter, B. J. (1979). Spliced adenovirus-associated virus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5567-71.

Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., Kjellen, L. (1998). Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem* 273:24979-82.

Linden, R. M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E., Berns, K. I. (1996a). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11288-94.

Linden, R. M., Winocour, E., Berns, K. I. (1996b). The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7966-72.

Lusby, E. W. und Berns, K. I. (1982). Mapping of the 5' termini of two adeno-associated virus 2 RNAs in the left half of the genome. *J Virol* 41:518-26.

Lux, K., Goerlitz, N., Schlemminger, S., Perabo, L., Goldnau, D., Endell, J., Leike, K., Kofler, D. M., Finke, S., Hallek, M., Buning, H. (2005). Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. *J Virol* 79:11776-87.

Maeda, Y., Ikeda, U., Ogasawara, Y., Urabe, M., Takizawa, T., Saito, T., Colosi, P., Kurtzman, G., Shimada, K., Ozawa, K. (1997). Gene transfer into vascular cells using adeno-associated virus (AAV) vectors. *Cardiovasc Res* 35:514-21.

Malik, A. K., Monahan, P. E., Allen, D. L., Chen, B. G., Samulski, R. J., Kurachi, K. (2000). Kinetics of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer. *J Virol* 74:3555-65.

Marcus, C. J., Laughlin, C. A., Carter, B. J. (1981). Adeno-associated virus RNA transcription in vivo. *Eur J Biochem* 121:147-54.

Matovina, M., Husnjak, K., Milutin, N., Ciglar, S., Grce, M. (2004). Possible role of bacterial and viral infections in miscarriages. *Fertil Steril* 81:662-9.

Matsushita, T., Elliger, S., Elliger, C., Podsakoff, G., Villarreal, L., Kurtzman, G. J., Iwaki, Y., Colosi, P. (1998). Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 5:938-45.

McCarty, D. M., Fu, H., Monahan, P. E., Toulson, C. E., Naik, P., Samulski, R. J. (2003).

Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* 10:2112-8.

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. *Gene Ther* 8:1248-54.

McCarty, D. M., Young, S. M., Jr., Samulski, R. J. (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet* 38:819-45.

McPherson, R. A., Rosenthal, L. J., Rose, J. A. (1985). Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* 147:217-22.

Mendelson, E., Trempe, J. P., Carter, B. J. (1986). Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. *J Virol* 60:823-32.

Michel, U., Malik, I., Ebert, S., Bahr, M., Kugler, S. (2005). Long-term in vivo and in vitro AAV-2-mediated RNA interference in rat retinal ganglion cells and cultured primary neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 326:307-12.

Monahan, P. E. und Samulski, R. J. (2000). Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol Med Today* 6:433-40.

Mori, S., Wang, L., Takeuchi, T., Kanda, T. (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 330:375-83.

Mousavi, S. A., Malerod, L., Berg, T., Kjeken, R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* 377:1-16.

Muzyczka, N. (1992). Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 158:97-129.

Nakai, H., Storm, T. A., Kay, M. A. (2000a). Increasing the size of rAAV-mediated expression cassettes in vivo by intermolecular joining of two complementary vectors. *Nat Biotechnol* 18:527-32.

Nakai, H., Storm, T. A., Kay, M. A. (2000b). Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *J Virol* 74:9451-63.

Nathwani, A. C., Davidoff, A., Hanawa, H., Zhou, J. F., Vanin, E. F., Nienhuis, A. W. (2001). Factors influencing in vivo transduction by recombinant adeno-associated viral vectors expressing the human factor IX cDNA. *Blood* 97:1258-65.

Neyts, J., Snoeck, R., Schols, D., Balzarini, J., Esko, J. D., Van Schepdael, A., De Clercq, E. (1992). Sulfated polymers inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparan sulfate. *Virology* 189:48-58.

Ohi, S., Dixit, M., Tillery, M. K., Plonk, S. G. (1990). Construction and replication of an adeno-associated virus expression vector that contains human beta-globin cDNA. *Gene* 89:279-82.

O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88:277-85.

Pannu, H. K., Thompson, R. E., Phelps, J., Magee, C. A., Fishman, E. K. (2005). Optimal contrast agents for vascular imaging on computed tomography: iodixanol versus iohexol. *Acad Radiol* 12:576-84.

Parks, W. P., Green, M., Pina, M., Melnick, J. L. (1967). Physicochemical characterization of adeno-associated satellite virus type 4 and its nucleic acid. *J Virol* 1:980-7.

Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D. C., Oravecz, T., Hascall, V. C., Norcross, M. A. (1993). Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9:167-74.

Pereira, D. J., McCarty, D. M., Muzyczka, N. (1997). The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol* 71:1079-88.

Qing, K., Khuntirat, B., Mah, C., Kube, D. M., Wang, X. S., Ponnazhagan, S., Zhou, S., Dwarki, V. J., Yoder, M. C., Srivastava, A. (1998). Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: correlation of tyrosine phosphorylation of the cellular single-stranded D sequence-binding protein with transgene expression in human cells in vitro and murine tissues in vivo. *J Virol* 72:1593-9.

Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V., Srivastava, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 5:71-7.

Rabinowitz, J. E., Xiao, W., Samulski, R. J. (1999). Insertional mutagenesis of AAV2 capsid and the production of recombinant virus. *Virology* 265:274-85.

Redemann, B. E., Mendelson, E., Carter, B. J. (1989). Adeno-associated virus rep protein synthesis during productive infection. *J Virol* 63:873-82.

Reis, R. C., Schuppan, D., Barreto, A. C., Bauer, M., Bork, J. P., Hassler, G., Coelho-Sampaio, T. (2005). Endostatin competes with bFGF for binding to heparin-like glycosaminoglycans. *Biochem Biophys Res Commun* 333:976-83.

Ried, M. U., Girod, A., Leike, K., Buning, H., Hallek, M. (2002). Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. *J Virol* 76:4559-66.

Rohde, V., Erles, K., Sattler, H. P., Derouet, H., Wullich, B., Schlehofer, J. R. (1999). Detection of adeno-associated virus in human semen: does viral infection play a role in the pathogenesis of male infertility? *Fertil Steril* 72:814-6.

Rolling, F., Nong, Z., Pisvin, S., Collen, D. (1997). Adeno-associated virus-mediated gene transfer into rat carotid arteries. *Gene Ther* 4:757-61.

Rose, J. A., Berns, K. I., Hoggan, M. D., Koczot, F. J. (1969). Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: formation of a DNA density hybrid on release of viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64:863-9.

Rose, J. A., Hoggan, M. D., Shatkin, A. J. (1966). Nucleic acid from an adeno-associated virus: chemical and physical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56:86-92.

Rosenblum, B. B., Lee, L. G., Spurgeon, S. L., Khan, S. H., Menchen, S. M., Heiner, C. R., Chen, S. M. (1997). New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res* 25:4500-4.

Russell, D. W., Miller, A. D., Alexander, I. E. (1994). Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8915-9.

Rutledge, E. A., Halbert, C. L., Russell, D. W. (1998). Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol* 72:309-19.

Salmivirta, M., Lidholt, K., Lindahl, U. (1996). Heparan sulfate: a piece of information. *Faseb J* 10:1270-9.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA

Samulski, R. J. (2000). Expanding the AAV package. *Nat Biotechnol* 18:497-8.

Samulski, R. J., Berns, K. I., Tan, M., Muzyczka, N. (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:2077-81.

Samulski, R. J., Chang, L. S., Shenk, T. (1987). A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J Virol* 61:3096-101.

Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N., Hunter, L. A. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *Embo J* 10:3941-50.

Sanlioglu, S., Benson, P. K., Yang, J., Atkinson, E. M., Reynolds, T., Engelhardt, J. F. (2000). Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol* 74:9184-96.

Sasaki, T., Larsson, H., Kreuger, J., Salmivirta, M., Claesson-Welsh, L., Lindahl, U., Hohenester, E., Timpl, R. (1999). Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *Embo J* 18:6240-8.

Schiedner, G., Hertel, S., Johnston, M., Dries, V., van Rooijen, N., Kochanek, S. (2003).

Selective depletion or blockade of Kupffer cells leads to enhanced and prolonged hepatic transgene expression using high-capacity adenoviral vectors. *Mol Ther* 7:35-43.

Seisenberger, G., Ried, M. U., Endress, T., Buning, H., Hallek, M., Brauchle, C. (2001). Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* 294:1929-32.

Siegl, G., Bates, R. C., Berns, K. I., Carter, B. J., Kelly, D. C., Kurstak, E., Tattersall, P. (1985). Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23:61-73.

Simonneau, G., Sors, H., Charbonnier, B., Page, Y., Laaban, J. P., Azarian, R., Laurent, M., Hirsch, J. L., Ferrari, E., Bosson, J. L., Mottier, D., Beau, B. (1997). A comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin for acute pulmonary embolism. The THESEE Study Group. Tinzaparine ou Heparine Standard: Evaluations dans l'Embolie Pulmonaire. *N Engl J Med* 337:663-9.

Skoutakis, V. A. (1997). Danaparoid in the prevention of thromboembolic complications. *Ann Pharmacother* 31:876-87.

Snyder, R. O., Im, D. S., Muzyczka, N. (1990a). Evidence for covalent attachment of the adeno-associated virus (AAV) rep protein to the ends of the AAV genome. *J Virol* 64:6204-13.

Snyder, R. O., Miao, C. H., Patijn, G. A., Spratt, S. K., Danos, O., Nagy, D., Gown, A. M., Winther, B., Meuse, L., Cohen, L. K., Thompson, A. R., Kay, M. A. (1997). Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 16:270-6.

Snyder, R. O., Samulski, R. J., Muzyczka, N. (1990b). In vitro resolution of covalently joined AAV chromosome ends. *Cell* 60:105-13.

Srivastava, A., Lusby, E. W., Berns, K. I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 45:555-64.

Stilwell, J. L. und Samulski, R. J. (2003). Adeno-associated virus vectors for therapeutic gene transfer. *Biotechniques* 34:148-50, 152, 154 passim.

Summerford, C., Bartlett, J. S., Samulski, R. J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5:78-82.

Summerford, C. und Samulski, R. J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72:1438-45.

Summerford, C. und Samulski, R. J. (1999). Viral receptors and vector purification: new approaches for generating clinical-grade reagents. *Nat Med* 5:587-8.

Svaland, M. G., Haider, T., Langseth-Manrique, K., Andrew, E., Hals, P. A. (1992). Human pharmacokinetics of iodixanol. *Invest Radiol* 27:130-3.

Tamayose, K., Hirai, Y., Shimada, T. (1996). A new strategy for large-scale preparation of

high-titer recombinant adeno-associated virus vectors by using packaging cell lines and sulfonated cellulose column chromatography. *Hum Gene Ther* 7:507-13.

Tao, N., Gao, G. P., Parr, M., Johnston, J., Baradet, T., Wilson, J. M., Barsoum, J., Fawell, S. E. (2001). Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver. *Mol Ther* 3:28-35.

Teschendorf, C., Warrington, K. H., Jr., Siemann, D. W., Muzyczka, N. (2002). Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus. *Anticancer Res* 22:3325-30.

Timpe, J., Bevington, J., Casper, J., Dignam, J. D., Trempe, J. P. (2005). Mechanisms of adeno-associated virus genome encapsidation. *Curr Gene Ther* 5:273-84.

Tobiasch, E., Rabreau, M., Geletneky, K., Larue-Charlus, S., Severin, F., Becker, N., Schlehofer, J. R. (1994). Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J Med Virol* 44:215-22.

Tratschin, J. D., West, M. H., Sandbank, T., Carter, B. J. (1984). A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Mol Cell Biol* 4:2072-81.

Vafaie, J. und Schwartz, R. A. (2004). Parvovirus B19 infections. *Int J Dermatol* 43:747-9.

van den Born, J., Gunnarsson, K., Bakker, M. A., Kjellen, L., Kusche-Gullberg, M., Maccarana, M., Berden, J. H., Lindahl, U. (1995). Presence of N-unsubstituted glucosamine units in native heparan sulfate revealed by a monoclonal antibody. *J Biol Chem* 270:31303-9.

Van Rooijen, N. und Sanders, A. (1996). Kupffer cell depletion by liposome-delivered drugs: comparative activity of intracellular clodronate, propamidine, and ethylenediaminetetraacetic acid. *Hepatology* 23:1239-43.

Vives, R. R., Imberty, A., Sattentau, Q. J., Lortat-Jacob, H. (2005). Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 coreceptor binding site. *J Biol Chem* 280:21353-7.

Walsh, C. E., Liu, J. M., Xiao, X., Young, N. S., Nienhuis, A. W., Samulski, R. J. (1992). Regulated high level expression of a human gamma-globin gene introduced into erythroid cells by an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7257-61.

Wang, L. und Herzog, R. W. (2005). AAV-mediated gene transfer for treatment of hemophilia. *Curr Gene Ther* 5:349-60.

Wang, X. S., Ponnazhagan, S., Srivastava, A. (1995). Rescue and replication signals of the adeno-associated virus 2 genome. *J Mol Biol* 250:573-80.

Wang, Z., Ma, H. I., Li, J., Sun, L., Zhang, J., Xiao, X. (2003). Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* 10:2105-11.

Ward, P., Elias, P., Linden, R. M. (2003). Rescue of the adeno-associated virus genome from a plasmid vector: evidence for rescue by replication. *J Virol* 77:11480-90.

Watanabe, M., Nasu, Y., Kashiwakura, Y., Kusumi, N., Tamayose, K., Nagai, A., Sasano, T., Shimada, T., Daida, H., Kumon, H. (2005). Adeno-associated virus 2-mediated intratumoral prostate cancer gene therapy: long-term maspin expression efficiently suppresses tumor growth. *Hum Gene Ther* 16:699-710.

Weitzman, M. D., Kyostio, S. R., Carter, B. J., Owens, R. A. (1996). Interaction of wild-type and mutant adeno-associated virus (AAV) Rep proteins on AAV hairpin DNA. *J Virol* 70:2440-8.

Weitzman, M. D., Kyostio, S. R., Kotin, R. M., Owens, R. A. (1994). Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5808-12.

Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D., Kleinschmidt, J. A. (1997). Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol* 71:1341-52.

Xiao, W., Chirmule, N., Berta, S. C., McCullough, B., Gao, G., Wilson, J. M. (1999). Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* 73:3994-4003.

Xiao, W., Warrington, K. H., Jr., Hearing, P., Hughes, J., Muzyczka, N. (2002). Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2. *J Virol* 76:11505-17.

Xiao, X., Li, J., Samulski, R. J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72:2224-32.

Yakobson, B., Hrynko, T. A., Peak, M. J., Winocour, E. (1989). Replication of adeno-associated virus in cells irradiated with UV light at 254 nm. *J Virol* 63:1023-30.

Yakobson, B., Koch, T., Winocour, E. (1987). Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. *J Virol* 61:972-81.

Yalkinoglu, A. O., Zentgraf, H., Hubscher, U. (1991). Origin of adeno-associated virus DNA replication is a target of carcinogen-inducible DNA amplification. *J Virol* 65:3175-84.

Young, N. (1988). Hematologic and hematopoietic consequences of B19 parvovirus infection. *Semin Hematol* 25:159-72.

Zolotukhin, S., Byrne, B. J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R. J., Muzyczka, N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 6:973-85.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Franz Michael Gerner
Geburtsdatum:	1. Juni 1969
Geburtsort:	New York/U.S.A.
Nationalität:	U.S.A.
Familienstand:	Verheiratet

Ausbildung und beruflicher Werdegang

1979-1985	Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium Ottobrunn
1985-1986	West High School, Iowa City, U.S.A.
06/1985	High School Abschluss (High School Graduation with Honor)
1986-1988	Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium Ottobrunn
06/1988	Abitur
10/1988-01/1995	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
05/1991	Diplom-Vorprüfung in Chemie
02/1994	Diplom-Hauptprüfung in Chemie
04/1994-01/1995	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. P.-H. Hofschneider am Max-Planck-Institut für Biochemie München (Arbeitsgruppe Sendai Viren, PD Dr. Wolfgang Neubert). Thema: Stabile Synthese von rekombinanten Sendai-Virus Oberflächenproteinen F und HN in eukaryontischen Zellen.
06/1995-06/1997	Wissenschaftlicher Angestellter bei Prof. Dr. Holsboer am Max-Planck-Institut für Psychiatrie München, Klinisches Institut. Thema: Entwicklung gentherapeutischen Ansätze zur Behandlung chronischer Depressionen.

07/1997-03/1999	Wissenschaftlicher Angestellter bei Theragene Biomedical Laboratories GmbH, Martinsried. Thema: Entwicklung nicht-viraler Gentransfersysteme zur Behandlung von Hämophilie.
05/1999-07/2005	Promotionsarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Michael Hallek und Prof. Dr. Horst Domdey am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Genzentrum, Arbeitsgruppe Gentherapie). Thema: Optimierung des Adeno-assoziierten Virus Vektorsystems für die *in vivo* Anwendung.