

**Aus dem Genzentrum
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. P. Cramer

**Bioverteilungsstudie rekombinanter AAV-Vektoren
in der Maus**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der
Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marcus Aicher
aus
Prien am Chiemsee

2007

Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Hallek

Mitberichterstatter: Prof. Dr. U. Koszinowski
PD Dr. M. Feuring-Buske
Prof. Dr. A. Imhof

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. H. Büning

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2007

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Steckbrief des adeno-assoziierten Virus	1
1.2	Das AAV2-Genom	3
1.3	Infektionsbiologie.....	5
1.4	Die Produktion rekombinanter AAV2-Vektoren.....	8
1.5	Pro und Kontra des AAV als viralen Vektor in der Gentherapie.....	12
1.6	Targeting des viralen Vektors AAV2.....	15
1.7	Zielsetzung	18
2	Materialien und Methoden	20
2.1	Materialien.....	20
2.1.1	Zelllinien	20
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial.....	22
2.1.3	Puffer und Lösungen	24
2.1.4	Enzyme	28
2.1.5	Geräte	28
2.1.6	Bakterienstämme.....	28
2.1.7	Vektoren	29
2.1.8	Tiere	30
2.1.9	Plasmide.....	30
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Kultivierung von Bakterien.....	31
2.2.2	Präparation und Analyse von Nukleinsäuren.....	31
2.2.3	Kultivierung und Einfrieren von Zellen und Zellzahlbestimmung	33
2.2.4	Herstellung und Aufreinigung rekombinanter AAV-Vektoren.....	34
2.2.4.1	Aufschluss der 293 Zellen und Aufreinigung von rAAV.....	35
2.2.4.2	Charakterisierung der AAV-Präparationen.....	35
2.2.4.2.1	Bestimmung des genomischen Titers durch Dot-Blot.....	35
2.2.4.2.1.1	Herstellung Digoxigenin-markierter DNS-Sonden.....	36

2.2.4.2.1.2	Proteinase K-Spaltung und Präparation durch Anionenaustauschersäulen	37
2.2.4.2.1.3	Durchführung des Dot Blots	37
2.2.4.2.2	Bestimmung des genomischen Titers durch real-time-PCR	39
2.2.4.2.2.1	Theorie der PCR	39
2.2.4.2.2.2	Durchführung	40
2.2.5	Transduktion der Zellen mit rAAV-Vektoren	42
2.2.5.1	Bestimmung des transduzierenden Titers	42
2.2.5.2	Transduktion der Zellen mit rAAV2-Vektoren	43
2.2.6	Detektion der Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie	44
2.2.6.1	Theorie der Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS) -Analysen	44
2.2.6.2	Durchführung der Durchflusszytometrie	44
2.2.7	Transduktion der Balb/c-Mäuse	46
2.2.7.1	Transduktion	46
2.2.7.2	Vorbereitung der murinen Proben	46
2.2.7.3	Detektion der Anzahl intrazellulärer GFP-Sequenzen mittels PCR	47
2.2.8	Lokale Transduktion eines venösen Bypasses bei New-Zealand-Kaninchen	50
2.2.8.1	Transduktion	50
2.2.8.2	Organentnahme	51
2.2.8.3	Präparation der Proben	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Lokale rAAV-wt(lacZ)-Infektion bei Kaninchen	53
3.2	Transduktion von Mäusen mit rekombinanten AAV-Vektoren	54
3.2.1	<i>In vitro</i> -Analysen	55
3.2.1.1	Transduktionen mit den Vektoren rAAV-wt(GFP) und rAAV-SIG(GFP)	55
3.2.1.1.1	Tropismus für die humane Zelllinie Hep-G2	56
3.2.1.1.1.1	Transduktion von Hep-G2-Zellen mit rAAV-wt(GFP)	56
3.2.1.1.1.2	Transduktion von Hep-G2-Zellen mit rAAV-SIG(GFP)	58
3.2.1.2	Tropismus ausgewählter muriner Zelllinien	59
3.2.1.2.1	Transduktionsreihe mit rAAV-wt(GFP)	60
3.2.1.2.1.1	Fibroblasten-Zelllinie 10T1/2	60

3.2.1.2.1.2	Fibroblasten NIH-3T3	61
3.2.1.2.1.3	Makrophagen IC-21	62
3.2.1.2.1.4	Hepatozyten H2.35.....	63
3.2.1.2.1.5	Myokardendothel MHEC-5T	64
3.2.1.2.1.6	Nierenmesangium SV40 MES 13	65
3.2.1.2.1.7	Spermatogonien GC-1 sg.....	66
3.2.1.2.1.8	SV40-transformierte endotheliale Zelllinie SVEC 4-10	67
3.2.1.2.1.9	Dottersackendothel C166	68
3.2.1.2.2	Transduktionsreihe mit rAAV-SIG(GFP).....	69
3.2.1.2.2.1	Fibroblasten 10T1/2.....	69
3.2.1.2.2.2	Fibroblasten NIH-3T3	70
3.2.1.2.2.3	Makrophagen IC-21	71
3.2.1.2.2.4	Hepatozyten H2.35.....	72
3.2.1.2.2.5	Myokardendothel MHEC-5T	73
3.2.1.2.2.6	Nierenmesangium SV40 MES13	74
3.2.1.2.2.7	Spermatogonien GC-1sg.....	75
3.2.1.2.2.8	SV40-transformierte Endothel-Zelllinie SVEC 4-10	76
3.2.1.2.2.9	Dottersackendothel C166	77
3.2.1.2.3	Direkter Vergleich von rAAV-wt(GFP) und rAAV-SIG(GFP)	78
3.2.1.2.4	Heparin als Kompetitor des Heparansulfat-Proteoglykans	79
3.2.1.3	Bestimmung der Transduktionseffizienz der neuen Mutanten rAAV- A3(GFP) und rAAV-1B(GFP).....	80
3.2.1.3.1	Spermatogonien GC-1 sg.....	81
3.2.1.3.2	Dottersackendothel C166	82
3.2.2	<i>In vivo</i> -Infektion von Mäusen mit rAAV-Vektoren	83
3.2.2.1	Eingesetzte Vektoren	83
3.2.2.2	Transduktion mit rAAV-wt(GFP)	84
3.2.2.3	Transduktion mit rAAV-pRC99(GFP).....	85
3.2.2.4	Transduktion mit rAAV-SIG(GFP).....	87
3.2.2.5	Transduktion mit rAAV-A3(GFP)	89
3.2.2.6	Transduktion mit rAAV-1B(GFP)	90
3.2.2.7	Vergleich der Mutanten	92

4	Diskussion	95
4.1	Diskussion der <i>in vivo</i> -Daten der Kaninchen	97
4.2	Diskussion der <i>in vitro</i> -Daten.....	98
4.3	Diskussion der <i>in vivo</i> -Daten der infizierten Mäuse.....	100
5	Zusammenfassung.....	102
6	Anhang	104
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	104
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	106
6.3	Literaturverzeichnis	111
6.4	Lebenslauf.....	123
6.5	Danksagung	124

1 Einleitung

1.1 Steckbrief des adeno-assoziierten Virus

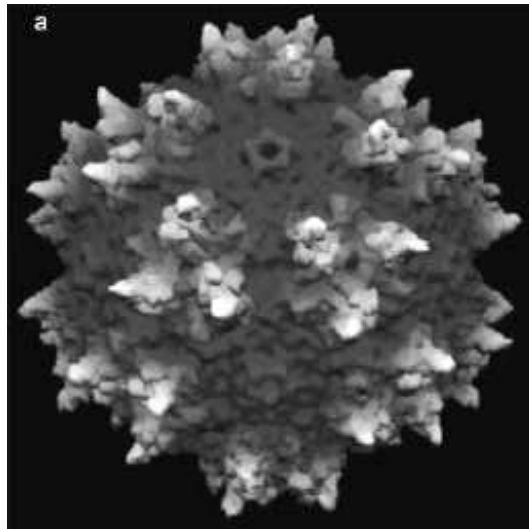


Abbildung 1: Strukturmodell des AAV2 nach Xie *et al.*, 2002

Adeno-assoziierte Viren (AAV) gehören der Gattung der Dependoviren innerhalb der Familie der Parvoviridae an. Sie zeichnen sich durch ein einzelsträngiges, lineares DNS-Genom von etwa 5kb Größe und ein unbehülltes, ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von 18nm bis 30nm aus (Siegl *et al.*, 1985).

Von ihnen sind bis dato elf verschiedene Serotypen bekannt (Mori *et al.*, 2004), davon wurden acht näher charakterisiert: AAV1 bis AAV4 und AAV6 wurden als Kontaminationen von Adenovirus-Präparationen (Ad) entdeckt (Bueler *et al.*, 1999), was diesen Viren zu ihrem Namen verhalf. AAV5 dagegen wurde aus einem

humanen Kondylom isoliert (Bantel-Schaal *et al.*, 1999). Erst im Jahr 2002 gelang die Isolierung der Serotypen AAV7 und AAV8 aus Rhesusaffen-Gewebe (Gao *et al.*, 2002).

Die Serotypen unterscheiden sich durch die Aminosäuresequenz ihrer Kapside: Während AAV2, AAV3 und AAV6 untereinander mehr als 80% Homologie aufweisen (Rabinowitz *et al.*, 2000), zeigt das Kapsid des Serotyps 5 zum Beispiel nur eine 50- bis 60-prozentige Homologie zu den Kapsiden der übrigen Serotypen (Bantel-Schaal *et al.*, 1999). Da die Viren über ihr Kapsid mit den Rezeptoren ihrer Zielzellen in Kontakt treten, weisen diejenigen Viren, die eine hohe Abweichung in der Aminosäuresequenz zueinander haben, auch große Unterschiede hinsichtlich des Tropismus auf. Während AAV1 beispielsweise sehr effizient Leber und Muskel transduziert, sind AAV4 und AAV5 die geeigneten Viren zur Infektion von Ratten-Retina, Lungenepithel (Kaludov *et al.*, 2001; Walters *et al.*, 2001; Zabner *et al.*, 2000) oder Skelettmuskulatur (Duan *et al.*, 2000). Noch effizienter als AAV4 und AAV5 in der Transduktion von Lungenepithel scheint AAV6 zu sein (Halbert *et al.*, 2000).

Die Rezeptoren, die von den einzelnen Serotypen verwendet werden, konnten bisher noch nicht vollständig identifiziert werden. Für AAV2 ist bekannt, dass Heparansulfatproteoglykan (HSPG) als Primärrezeptor dient (Summerford *und* Samulski, 1998). Als Korezeptoren wurden das $\alpha_v\beta_5$ -Integrin und „Fibroblast-Growth-Factor-Receptor-1“ (FGFR-1) beschrieben (Qing *et al.*, 1999; Summerford *et al.*, 1999). Kashiwakura *et al.* konnten 2004 zeigen, dass darüber hinaus „Hepatocyte-Growth-Factor-Receptor“ (HGF) als Korezeptor dient (Kashiwakura *et al.*, 2005).

AAV2, AAV3, und AAV5 sind zwar weit verbreitet (80%-ige Durchseuchung in der menschlichen Bevölkerung (Blacklow *et al.*, 1971)), eine durch diese Viren hervorgerufene Erkrankung ist jedoch bisher nicht bekannt. Das Gleiche gilt für AAV1 und AAV4. Da aber natürliche Infektionen dieser beiden Serotypen beim Menschen nicht vorkommen, kann bei ihnen nicht gesichert von einer Apathogenität ausgegangen werden (ZKBS 2001).

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit AAV2 bzw. mit Vektoren dieses Serotyps.

1.1 Das AAV2-Genom

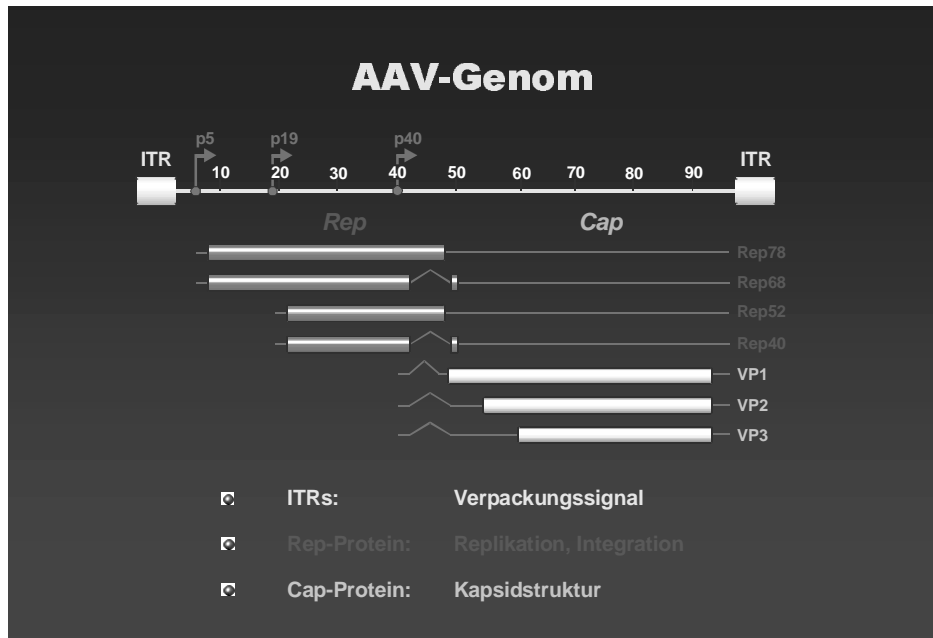


Abbildung 2: Das AAV-Genom (schematisch)

Das AAV2-Genom besteht aus einer einzelsträngigen DNS und ist 4,7kb groß. Es beinhaltet unter anderem folgende Elemente:

- **Rep**: der am 5'-Ende des Genoms liegende offene Leserahmen kodiert für vier multifunktionale, regulatorische Nicht-Struktur-Proteine, die als Rep-Proteine bezeichnet werden. Die Transkription der Rep-Proteine beginnt an den Promotoren p5 (Rep 78/Rep 68) und p19 (Rep 52/Rep 40) (Grimm, 2000).

Die beiden größeren Rep-Proteine Rep78 und Rep68 sind für die Regulierung der Genexpression (Beaton *et al.*, 1989), für die Replikation (Owens *et al.*, 1993; Im *et al.*, 1990) und für eine gezielte Integration (Samulski *et al.*, 1993; Surosky *et al.*, 1997; Balagué *et al.*, 1997) zuständig. Die kleineren Rep-Proteine Rep52 und Rep40 werden für das Einschleusen des AAV-Genoms in das virale Kapsid benötigt (Chejanovski *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1998).

- Cap: der am 3'-Ende des Genoms liegende offene Leserahmen kodiert für die drei Kapsid-Proteine VP1, VP2 und VP3. Die Transkription wird durch den p40-Promoter kontrolliert. Die drei Kapsid-Proteine werden im Verhältnis 1:1:20 translatiert (Muzyczka, 1992). Die unterschiedliche Translations-effizienz entsteht zum einen durch alternatives Spleißen des VP1-Introns und zum anderen durch das seltenere Translations-Initiationskodon ACG für VP2: Das Kodon ACG wird um ein Zehntel weniger frequent translatiert als das Initiationskodon AUG des VP3. Das Stop-Kodon der drei Kapsid-Proteine ist identisch (Becerra *et al.*, 1988; Laughlin *et al.*, 1979).
- ITR: Die zwei ITR-Sequenzen flankieren die beiden Enden des AAV2-Genoms. Sie bestehen aus 145 Basenpaare und sind jeweils in Form eines T in sich selbst gefaltet. Innerhalb der ITRs befindet sich der Replikationsursprung des AAVs (Berns, 1990a). Zusätzlich haben sie Einfluss auf die Regulation der Genexpression und sind essentiell für die Integration des AAV2 in und die Freisetzung aus dem Wirtsgenom nach einer latenten Infektion (McLaughlin *et al.*, 1986, 1988; Berns *et al.*, 1988).

1.2 Infektionsbiologie

Für eine produktive Infektion einer Zielzelle müssen folgende drei Voraussetzungen gegeben sein:

1. Interaktion mit dem jeweiligen Primär- und Sekundärrezeptor (Abb.3 Punkt A), darauffolgende Internalisierung (Abb.3 Punkt B) und Transport zum Nukleus (Abb.3 Punkt C-E)
2. Effiziente Konversion zur Doppelstrang-DNS bei Viren, die RNA als Genom haben oder die nur ein einzelsträngiges DNS-Genom besitzen
3. Adäquate Expression des Vektors

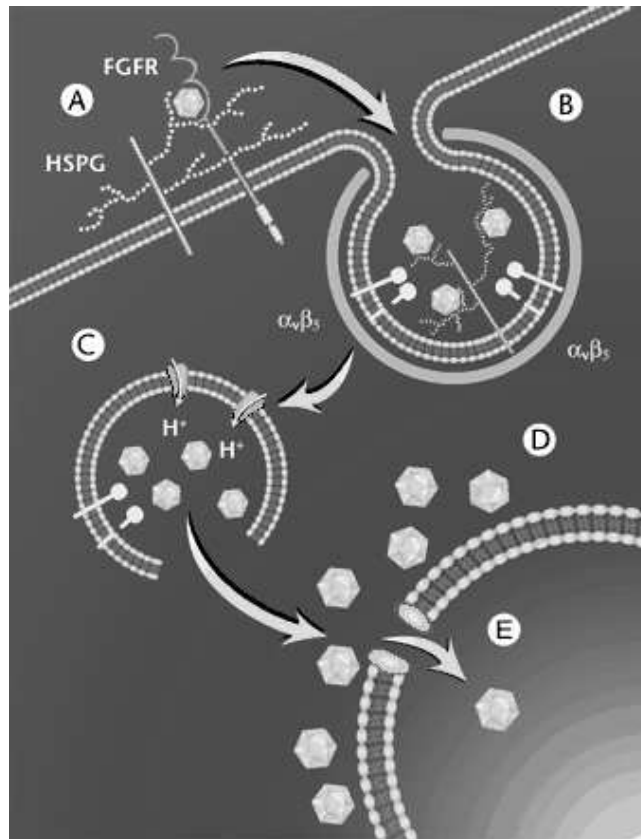


Abbildung 3: Infektionsweg des AAV2 (nach Bartlett *et al.*, 2000)

Ad 1:

Primärrezeptor für AAV2 ist Heparansulfatproteoglykan (Abb.3 Punkt A).

Da die Zellmembran jeder adhärenen Zelle diese Glykosaminoglykane besitzt, erklärt dies den breiten Tropismus des AAV2s.

Als Korezeptoren sind für AAV2 bis jetzt drei verschiedene beschrieben worden: $\alpha_v\beta_5$ -Integrin, „Hepatocyte-Growth-Factor-Receptor“ (HGF) und „Fibroblast-Growth-Factor-Receptor-1“ (FGFR1). FGFR1 und HGF verstärken vermutlich die Anbindung des Virus an die Zellmembran (Kashiwakura *et al.*, 2005; Bartlett *et al.*, 2000; Qing *et al.*, 1999), während das $\alpha_v\beta_5$ -Integrin die darauf folgende Endozytose induziert (Sanlioglu *et al.*, 2000). Dabei wird der Vektor durch Clathrin-vermittelte Endozytose in das Zytosol aufgenommen (Abb.3 Punkt B). Die Clathrin-bedeckten Vesikel entstehen durch Abschnürungen von der Plasmamembran. Dieser Prozess wird durch die zytosolische ATPase Dynamin gesteuert (Bartlett *et al.*, 2000). Durch die Bindung des Vektors an das $\alpha_v\beta_5$ -Integrin wird Rac1 aktiviert, wodurch die Phosphatidylinositol-3-Kinase stimuliert wird. Diese unterstützt die intrazelluläre Mobilität des AAV2 in den Vesikeln mit Hilfe von Mikrofilamenten und Mikrotubuli (Sanlioglu *et al.*, 2000).

Die Vesikel verschmelzen mit sauren Endosomen zu sekundären Lysosomen.

Aus den späten Endosomen wird AAV wieder freigesetzt (Abb.3 Punkt C) und findet sich dann vorwiegend perinucleär (Abb.3 Punkt D). Bis zu diesem Schritt werden ca. 40 Minuten benötigt. Am vorläufigen Ziel angekommen können AAV-Partikel dort für einige Stunden detektiert werden (Bartlett *et al.*, 2000).

Während die Arbeitsgruppe um Bartlett noch annahm, dass intakte AAV-Kapside dort auf Grund ihrer geringen Größe vermutlich über den Kernporenkomplex die Membran des Nukleus durchdringen würden (Durchmesser des AAV=20 bis 25nm, maximaler Durchmesser einer Kernpore=23nm) (Abb.3 Punkt E), konnten Lux *et al.* dies widerlegen: Es wurden bis zu 24 Stunden nach einer Infektion nur sehr vereinzelt Kapside im Zellkern nachgewiesen. Das virale Genom des AAV dagegen konnte bereits nach zwei Stunden post infectionem im Nukleus detektiert werden. Dies spricht dafür, dass das Genom entweder vor oder während des Eindringens in den Nukleus aus dem Kapsid freigesetzt wird. (Lux *et al.*, 2005)

Ad 2:

Im nächsten Schritt integriert AAV in Abwesenheit eines Helfervirus mit Hilfe von Rep68 und Rep78 in das Zellgenom (Kotin *et al.*, 1991). Da dafür eine Doppelstrang-DNS vorliegen muss, ist entweder eine vorhergehende Synthese eines Komplementärstrangs mit Hilfe von Proteinen der Wirtszelle nötig, oder aber es lagern sich zwei komplementäre virale Stränge aneinander.

Die Integration erfolgt in >70% der Fälle in das humane Chromosom 19, da dieses im langen Arm (Locus q13.4ter) Mikrohomologien mit den ITRs aufweist (Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991; Weitzman *et al.*, 1994; Linden *et al.*, 1996a,b; Rutledge *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997).

Dort geht das Virus in ein Ruhestadium über („latente Infektion“).

Da rekombinanten AAV-Vektoren (rAAV) nicht mehr für die viralen Rep-Proteine kodieren, integrieren diese nur in Einzelfällen in das Genom der Wirtszelle, und dies darüber hinaus unspezifisch (siehe 1.2 Das AAV2-Genom). Zumeist liegen sie als Doppelstrang vor. Als Einzelstränge haben sie nur eine kurze Überlebenszeit, da sie von der Zelle zumeist als beschädigte DNS wahrgenommen und lysiert werden. Es gibt zwei Wege wie eine Doppelstrang-DNS gebildet werden kann:

1. de novo-Synthese durch zelleigene Proteine (Qing *et al.*, 2001)
2. Annealing von Einzelsträngen unterschiedlicher Polarität (Nakai *et al.*, 2000)

Ad 3:

Um nun von einer latenten Infektion zu einer produktiven Infektion zu gelangen, wird ein Helfervirus benötigt. Neben Adenoviren sind vor allem das Herpes-simplex-Virus (HSV), das humane Herpes-Virus Typ 6 (HHV6), das humane Papilloma-Virus (HPV), das humane Zytomegalie-Virus (HCMV) und das Vaccinia-Virus als Helfervirus beschrieben (Schlehofer *et al.*, 1986; Berns, 1990; Walz *et al.*, 1991; Muzyczka, 1992; Thomson *et al.*, 1994). Bei einer solchen Superinfektion wird mit Hilfe bestimmter Proteine eines Helfervirus der Replikationszyklus durch Aktivierung des Rep-Proteins initiiert: Beim Adenovirus sind dies beispielsweise die Gene E1A, E1B, VA, E2A und E4orf6, die für diese Proteine kodieren (Chang *et al.*, 1989; Leppard,

1997; Duan *et al.*, 1999). Nach der Verpackung wird AAV zusammen mit seinem Helfervirus freigesetzt (Berns *et al.*, 1975; Cheung *et al.*, 1980; McLaughlin *et al.*, 1986, 1988).

Nach chemischen oder physikalischen Reizen kann AAV2 auch in Abwesenheit von Helferviren replizieren und infektiöse Virionen bilden (Heilbronn *et al.*, 1985; Yakobson *et al.*, 1987, 1989; Yalkinoglu *et al.*, 1988).

Die eben genannten Schritte sind auch ohne eine vorherige Integration des AAV in die Wirts-DNS möglich.

1.3 Die Produktion rekombinanter AAV2-Vektoren

Das AAV2-Genom ist relativ klein und einfach aufgebaut (siehe Kapitel 1.2 Das AAV2-Genom). Für die Produktion rekombinanter Vektoren werden die beiden offenen Leserahmen Rep und Cap durch ein Transgen ersetzt. Dies kann sowohl ein Marker-Gen sein -wie etwa das „green-fluorescent-protein“ (GFP) oder β -Galaktosidase (lacZ)- als auch ein therapeutisches Gen. Hierbei ist zu beachten, dass die Größe des Transgens in etwa im Bereich des ursprünglichen AAV-Genoms (exklusiv der Verpackungssequenzen) von ca. 4,5 kb liegen sollte, um eine möglichst hohe Verpackungseffizienz zu erreichen.

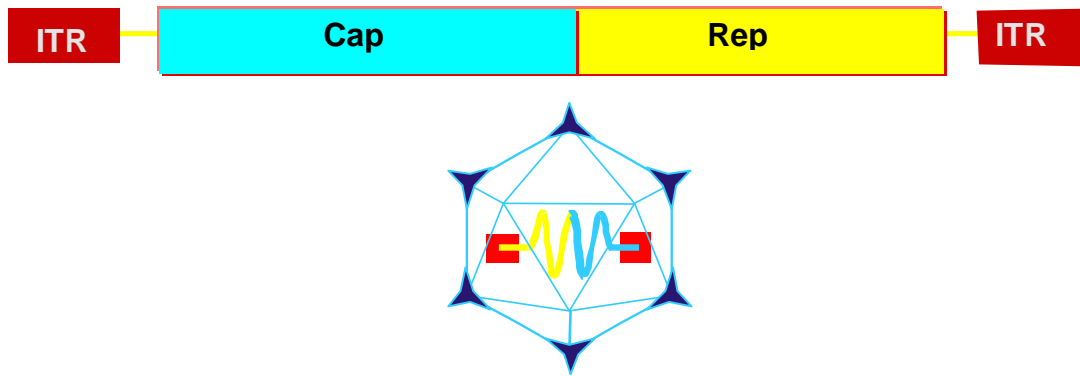


Abbildung 4: AAV-wt-Genom (Genom und Struktur schematisch dargestellt)

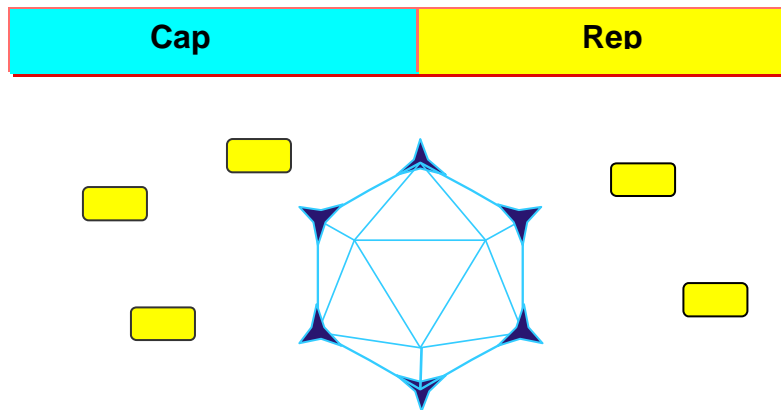


Abbildung 5: Helferplasmid (Gensequenz und Struktur schematisch dargestellt)

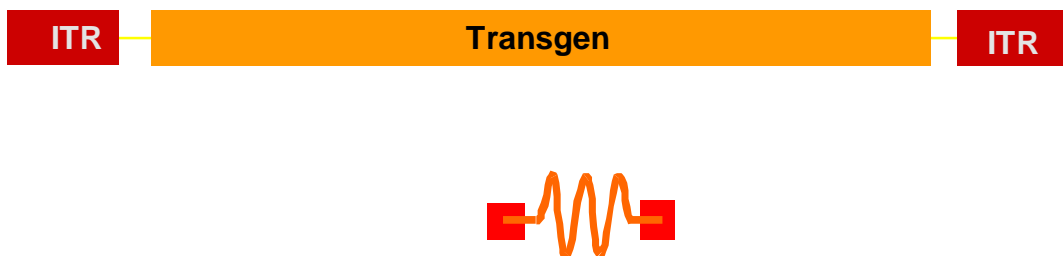


Abbildung 6: Vektorplasmid (Gensequenz und Struktur schematisch dargestellt)

Für die Produktion rekombinanter AAV2-Vektoren gibt es zwei gängige Verfahren:

- Anfangs wurde vorwiegend die Technik der Adenovirus(Ad)-unterstützten AAV2-Produktion angewandt. Hierzu werden zwei Plasmide benötigt, ein Helferplasmid (siehe Abbildung 5) und ein Vektorplasmid (siehe Abbildung 6). Das Helferplasmid kodiert für das AAV2-wt-Genom, jedoch wurden die invertierenden terminalen Repetitionen (ITR) entfernt. Das heißt, es besteht nur noch aus den viralen offenen Leserahmen Cap und Rep. Diese Proteine sind verantwortlich für die Replikation des von den ITRs flankierten Transgens auf dem Vektorplasmid, für die Ausbildung des Kapsids und die Einschleusung der zu transportierenden Transgen-DNS. Da die beiden offenen Leserahmen nicht von den viralen Verpackungssignalen (ITR) flankiert sind, wird die für Cap und Rep kodierende DNS nicht in das Kapsid verpackt.

Das Vektorplasmid hingegen kodiert für das von den ITRs flankierte Transgen, das nach Replikation mit Hilfe der Rep-Proteine in das durch die Cap-Proteine gebildete virale Kapsid verpackt wird.

Für die Vektorherstellung werden beide Plasmide mittels $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Transfektion in HeLa-Zellen eingebracht (Chen *und* Okayama, 1987, 1988). Anschließend folgt eine Koinfektion mit Adenovirus, um eine produktive Infektion zu initiieren. Hierbei werden die offenen Leserahmen innerhalb der HeLa-Zellen transkribiert und daraufhin zu regulatorischen Proteinen und zu Kapsid-Proteinen translatiert. Das vom Vektorplasmid kodierte Transgen wird als Einzelstrang repliziert und in das Viruskapsid verpackt (Samulski *et al.*, 1989). Die HeLa-Zellen werden anschließend lysiert und die viralen Vektoren zweimal über einen CsCl-Dichtegradienten aufgereinigt. Vor der Verwendung der Vektoren wird die Präparation hitzebehandelt, um möglicherweise noch vorhandene Adenoviren zu inaktivieren. Hierbei macht man sich zu nutze, daß AAV hitzestabiler ist als Ad.

Das Hauptproblem dieser Methode liegt in einer möglichen Kontamination der rAAV-Präparation mit Adenovirus. Dies ist ein bedeutender Nachteil sowohl bei der späteren Verwendung, als auch in der Produktion. Da bestimmte Adenovirus-Proteine im Verdacht stehen, eine zytotoxische Lymphozytenreaktion (CTL) hervorzurufen (Yang *et al.*, 1994, 1995), limitieren sich die Anwendungsbereiche einer Gentherapie ohne entsprechende Aufreinigungsschritte. Diese schaden dem Vektor jedoch sowohl durch eine langwierige und durch den hohen Salzgehalt schädlichen CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation, als auch durch die Thermoaktivierung.

- Aus den oben genannten Gründen sind wir dazu übergegangen, auf den Einsatz von Adenovirus zu verzichten. An Stelle dessen verwendet man nun ein drittes Helferplasmid, das für die benötigten Ad-Funktionen kodiert. Dieses kodiert für die adenoviralen Gene E2A, VA und E4. Die drei Plasmide (Helferplasmid, Vektorplasmid und Ad-Plasmid) werden ebenfalls über eine $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Transfektion in 293-Zellen eingebracht (Grimm *und* Kleinschmidt, 1999). Bis auf die Aufreinigung ist das weitere Vorgehen identisch mit dem oben Beschriebenen. Hier kann nun auf den Thermoaktivierungsschritt verzichtet werden. Zusätzlich wurde die CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation durch ein schonenderes Verfahren, den Iodixanol-Gradienten, ersetzt. Dies erbrachte einen 40- bis 60-fach besseren Titer als die herkömmliche Methode (Ferrari *et al.*, 1997; Summerford *et al.*, 1999).

Es gibt hierfür Protokolle von Matsushita *et al.* (Matsushita *et al.*, 1998), Salvetti *et al.* (Salvetti *et al.*, 1998) und Xiao *et al.* (Xiao *et al.*, 1998), die unabhängig voneinander jeweils diese Methode der Ad-freien Verpackung entwickelt haben.

1.4 Pro und Kontra des AAV als viralen Vektor in der Gentherapie

AAV gewinnt ein immer größeres Gewicht in der Gentherapie und besitzt sicherlich auch für die Zukunft ein noch zunehmendes Potential als viraler Vektor. Die Vorteile dieses Vektorsystems im Vergleich zu sonstigen bisher etablierten Systemen sind beeindruckend.

Der Hauptvorteil liegt in der fehlenden Pathogenität für den Menschen. Bis dato konnte keine pathologische Reaktion auf eine Infektion mit AAV festgestellt werden. Entgegen den Befürchtungen (durch die Integration in das Chromosom sind protoonkogene Auswirkungen denkbar) scheint AAV sogar einen protektiven Einfluß auf viroge Mutationen innerhalb der Zelle zu haben. *In vivo* ist ein inhibitorischer Effekt auf karzinomatöse Vorgänge denkbar (Ostrove *et al.*, 1981; Hermonat 1989, 1991; Schlehofer 1994; Batchu *et al.*, 1999).

Als Begründung für die fehlende Immunogenität vermutet man, dass bei Infektionen mit AAV allenfalls eine humorale Antwort ausgelöst wird (Joss *et al.*, 1998). Eine zelluläre Antwort bildet die Ausnahme. Gründe hierfür liegen vor allem in der geringen Infektionseffizienz für dendritische Zellen und der fehlenden Expression viraler Gene bei latenter Infektion. Da man darüber hinaus bei rekombinanten AAV-Vektoren auf virale Gene bzw. Genprodukte verzichtet -das Kapsid ist nur zur Beginn des Gentransfers vorhanden, andere virale Proteine werden in dem rAAV nicht transportiert- wird eine Immunantwort auf virale Antigene weitestgehend ausgeschaltet (Bueler, 1999). Zu beachten ist jedoch, dass das Transgen selbst immunstimulierend wirken kann.

Als wünschenswert gilt weiterhin die Fähigkeit, sowohl proliferierende als auch postmitotische Zellen zu infizieren. Dadurch erhöht sich nicht nur die Effektivität, sondern auch die Bandbreite an möglichen Zielgeweben, da somit ausdifferenzierte und bradytrophe Zellen transfiziert werden können.

Wie bereits erwähnt besitzt das AAV einen breitgefächerten Tropismus: Lunge, Neurone (Davidson *et al.*, 2000), Retina, Leber, Muskel, hämatopoetische Vorläuferzellen, Gelenk-Synovia, endotheliale und viszerale Zellen konnten mit AAV

infiziert werden (Stilwell und Samulski, 2003). Dadurch ergibt sich eine große Auswahl an potentiellen Zielzellen.

Bei *in vivo*-Versuchen konnte eine langanhaltende Expression des integrierten Transgens über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr in verschiedenen Organen nachgewiesen werden. Langzeit-Gentransfer wurde bisher bestätigt in Skelettmuskulatur (β -Gal-Expression >1,5 Jahre) (Xiao X *et al.*, 1996), Gehirn (Kaplitt *et al.*, 1994; McCown *et al.*, 1996; Bartlett *et al.*, 1998; During *et al.*, 1998), Leber (Koeberl *et al.*, 1997; Ponnazhagan *et al.*, 1997; Snyder *et al.*, 1997), Lunge (Flotte *et al.*, 1996; Afione *et al.*, 1996), Retina (Ali *et al.*, 1996; Bennett *et al.*, 1997) und Herzmuskulatur (Kaplitt MG *et al.*, 1996). Begünstigend wird hier wiederum die geringe Immunogenität des viralen Vektors gesehen (Fisher *et al.*, 1997). Der breitgefächerte Tropismus verbunden mit der stabilen Langzeitexpression des Transgens ermöglicht eine ganze Reihe an hypothetischen Therapieansätzen. Forschungsarbeiten gibt es unter anderem zur Behandlung von Parkinson (Hermonat 1989, 1991), Hämophilie A und B (Ostrove *et al.*, 1981; Mebatsion *et al.*, 1997; Carter und Samulski, 2000), Mukoviszidose (Surosky *et al.*, 1997), α -Antitrypsin-1-Mangel (Song *et al.*, 1998), Fanconi-Anämie (Walsh *et al.*, 1994), Thalassämie und Sichelzellanämie (Einhard *et al.*, 1995), Karzinome (Su *et al.*, 1997; Maass *et al.*, 1998; Mizuno *et al.*, 1998), Diabetes (Murphy *et al.*, 1997), Lactose-Intoleranz (During *et al.*, 1998) und Mucopolysaccharidose VII (Daly *et al.*, 1999).

Ein weiterer wichtiger Vorteil bei der Virusproduktion liegt in der hohen Stabilität des Virions. Dadurch ist eine Aufreinigung zu hohen Titern möglich. Hochreine Präparationen von rAAV-Vektoren mit transduzierenden Titern um 5×10^{10} stellten bereits 1999 kaum noch eine Schwierigkeit dar (Grimm und Kleinschmidt, 1999).

Nachteile, die es noch zu überdenken und evtl. zu verbessern gilt, liegen unter anderem in einer zeitlich verzögerten Expression des Transgens. Da AAV ein Einzelstrang-DNS-Virus ist, muss zuerst der zweite Strang synthetisiert werden, um dann mit Hilfe des erhaltenen Doppelstrangs das Transgen zu exprimieren. Dadurch kommt es zu einer verzögerten Expression nach rAAV-Applikation *in vivo*.

Ein weiterer Nachteil liegt hypothetisch in der humoralen Immunantwort. Obwohl es zu keiner nennenswerten zellulären Immunantwort der Wirtsspezies nach AAV2-Infektion kommt, ist eine verminderte Effizienz nach wiederholter Applikation durch die humorale Immunreaktion denkbar (Stilwell und Samulski, 2003). Studien *in vivo* haben gezeigt, dass die wiederholte Gabe eines AAV-Vektors zu einer stark verminderten Transgen-Expression führte (Fisher *et al.*, 1997; Chirmule *et al.*, 2000). Es gibt allerdings auch Studien, die Gegenteiliges zeigen (Halbert *et al.*, 1997).

Die unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise auf die unterschiedliche Reinheit der verwendeten Vektor-Präparationen und auch auf deren jeweiligen Applikationsweise zurückzuführen. Falls sich diese Immunantwort zukünftig als Problem darstellen sollte, wäre es möglich, als Alternative andere Serotypen -wie etwa AAV4, AAV5, AAV7 und AAV8- zu verwenden, da diese auf Grund Ihrer starken Divergenz zu den übrigen Serotypen nicht kreuzreagieren (Gao *et al.*, 2002).

Ein weiteres, bis jetzt ungelöstes Problem ist durch den Aufbau des AAV vorgegeben. Durch die geringe Grösse des Genoms von 4,7kb beschränkt sich die Kodierungskapazität auf <5kb (Monahan *et al.*, 1998). 80% der gesamten cDNS fällt in den Bereich zwischen 3 und 6kb. Bei einer Gensequenzlänge von 5kb und darüber -wie z.B. bei Dystrophin (14kb, erst vor kurzem gelang die Herstellung eines „Mini-Dystrophin-Gens“ mit 4,2kb (Xiao *et al.*, 2000)), Faktor VIII (7,6kb cDNS (Paleyanda *et al.*, 1997) und CFTR (6,1kb (Riordan *et al.*, 1989))- wurden enttäuschende Ergebnisse bei der Verpackungseffizienz erzielt (Monahan und Samulski, 2000). Versuche, die Kodierungskapazität zu erhöhen, sind bereits unternommen worden (Kaplitt *et al.*, 1994; Chou *et al.*, 1999).

Das Risiko einer unspezifischen Integration des rAAV und deren Auswirkung auf den Wirt muss noch näher untersucht werden.

Ebenfalls noch abzuklären bleibt eine mögliche Infektion der Gonaden bzw. Spermatogonien/Oozyten, die bei Wildtyp-Infektionen beobachtet wurde (Burguete *et al.*, 1999; Rohde *et al.*, 1999).

Bei lokaler Applikation schätzt man den breitgefächerten Tropismus sehr. Bei systemischer Gabe kann er jedoch hinderlich sein, da das therapeutische Gen nicht gezielt eingebracht werden kann. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass

unerwünschte Wirkungen auf Grund einer Infektion von Nicht-Zielzellen entstehen. Weiterhin reduziert sich dadurch die Effizienz des Vektorsystems erheblich.

1.5 Targeting des viralen Vektors AAV2

Unter Targeting versteht man die spezifische Infektion ausgewählter Zielzellen und die daraus folgende Expression eines Transgens in diesen transduzierten Zellen mit der Zielsetzung einer optimierten Genkorrektur (Schnierle *und* Grohner, 1996). Dadurch ergeben sich gegenüber dem Vektor mit unverändertem Kapsid (AAV-wt) eine gesteigerte Effizienz und eine erhöhte Sicherheit des Vektorsystems. Dafür gibt es verschiedene Möglichkeiten:

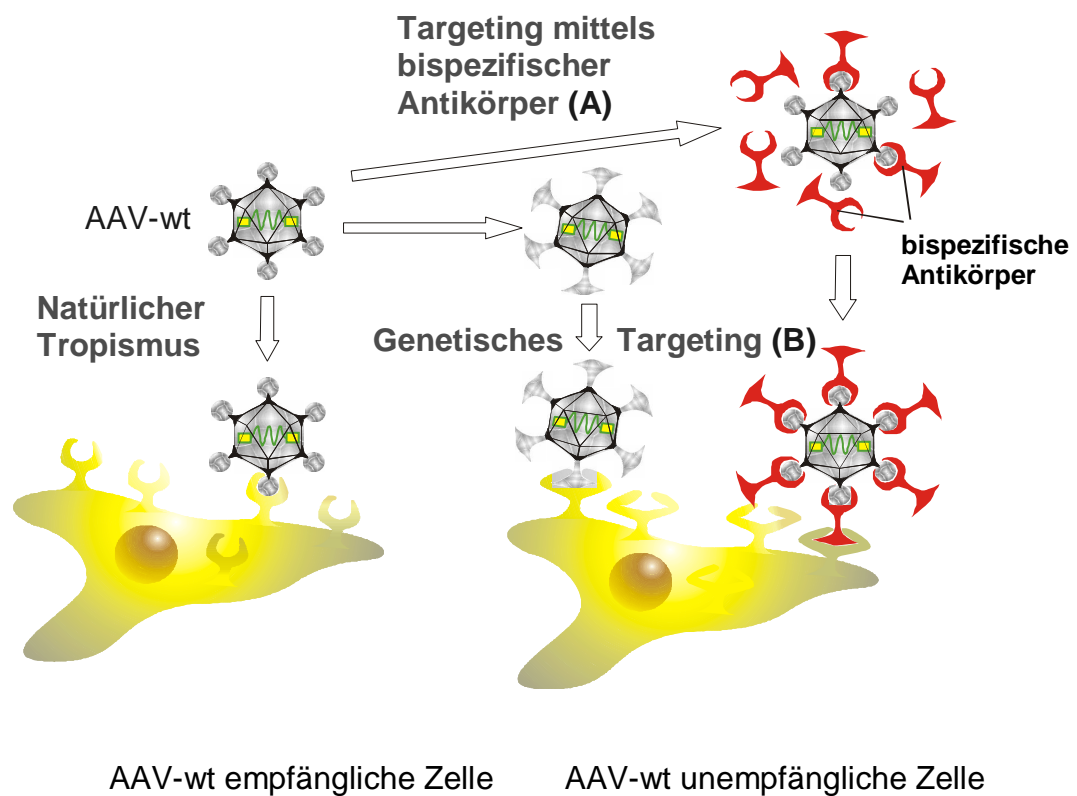


Abbildung 7: Schema der Targetingmöglichkeiten: Gezeigt werden mögliche Targetingmechanismen. Zuerst der natürliche Tropismus mit unverändertem AAV-wt bei einer AAV-wt-empfindlichen Zelle. Bei einer unempfindlichen Zelle kann wie unter (A) gezeigt ein Targeting mittels bispezifischer Antikörper durchgeführt werden. Eine andere Möglichkeit stellt ein genetisches Targeting mit Modifikation des viralen Kapsids durch Integration von Liganden (siehe (B)) dar.

- ad A) Beim Targeting auf nicht-genetischer Ebene werden bispezifische Antikörper eingesetzt. Diese Antikörper haben zum einen eine Spezifität für das AAV2-Kapsid (z.B. A20-Antikörper (Wistuba *et al.*, 1995)), zum anderen eine Spezifität für bestimmte Zell-Antigene, wie beispielsweise das Integrin $\alpha(\text{IIb})\beta 3$ auf Megakaryozyten und Thrombozyten (Bartlett *et al.*, 1999). Der Nachteil dieser Technik besteht in einer möglichen Dissoziation der Bindung zwischen Vektor und Molekül vor allem während der Aufreinigungsphase, wodurch ein Targeting nicht mehr möglich wäre bzw. sich die Effizienz deutlich verringern würde (Harris *und* Lemoine, 1996; Snitkovsky *und* Young, 1998).
- ad B) Eine weitere Möglichkeit stellt eine genetische Modifikation des Vektors dar. Hierbei wird die Gensequenz eines Liganden in das Cap-Gen integriert, so dass dieser auf der Kapsidoberfläche exprimiert wird (Walther *und* Stein, 1996). Hierfür muss zuerst ein Ligand gefunden werden, der an die gewünschte Zielzelle bindet. Anschließend ist der Locus der Integration so zu wählen, dass weder die Sekundär-, noch die Tertiärstruktur beeinflusst wird, da sonst der Ligand nicht ausreichend präsentiert werden kann, bzw. der Vektor in seiner Funktion beeinträchtigt wird. Girod *et al.* (Girod *et al.*, 1999) entwickelten ein hypothetisches Modell der AAV2-Struktur auf Basis der bekannten Struktur des kaninen Parvovirus. Es wurde angenommen, dass sich die beiden Viren in ihrem Aufbau nicht wesentlich unterscheiden. Aus der vermuteten Struktur des AAV ließen sich sechs mögliche Liganden-Insertionsstellen identifizieren (Aminosäureposition 261, 381, 447, 534, 573 und 587), die sich ohne Störung verwenden lassen sollten (Wistuba *et al.*, 1997). Weitere Untersuchungen zeigten, dass im Bezug auf die Ausbildung der Kapsidstruktur hiervon vor allem eine Position, nämlich bei I-587, für ein effizientes Targeting geeignet ist (Girod *et al.*, 1999).

Folgende Strategien wurden unter anderem bereits verwendet:

- Antikörper-bindende Domänen

Ried *et al.* (Ried *et al.*, 2002) entwickelten ein Antikörper-Targeting mit kombinierter genetischer Modifikation des Kapsids des AAV2 an dem Locus I-587 (Girod *et al.*, 1999). An dieser Stelle wurde eine IgG-Bindungsdomäne integriert. Dort können verschiedene Antikörper gekoppelt werden, die das Targeting vermitteln.

- Aus Phage-Display-Ansätzen identifizierte Peptide

Bei einem Phage-Display werden Bakteriophagen mit cDNS transformiert, so dass fremdes Protein auf der Oberfläche des Phagen exprimiert wird. Dabei können gezielt Gensequenzen vermuteter Liganden gewählt werden. Eine weitere Möglichkeit ist es ganze cDNS-„Libraries“ mit einer großen Anzahl diverser Sequenzen zu verwenden. Mittels einer einfachen *in vitro*-Selektion wird das Zielgewebe mit den Phagen inkubiert. Nach einigen Zyklen und Aufreinigungen kann der Ligand der besten Bindungskapazität durch Gensequenzierung identifiziert werden. (Smith, 1985)

Mit der oben beschriebenen Technik wurde auf humanen Nabelschnurendothelzellen ein 7mer Peptid (SIGYPLP) selektioniert, das in den Locus I-587 eingebaut einen effizienten AAV-vermittelten Gentransfer in Endothelzellen ermöglichte. (Nicklin *et al.*, 2001)

- Aus AAV-„Libraries“ identifizierte Peptide (Perabo *et al.*, 2003)

Nach Generierung einer großen Anzahl verschiedener AAV-Mutanten, denen an der Stelle I-587 eine beliebige Kombination von sieben Aminosäuren inseriert wurde, werden mit dieser „Bibliothek“ an Kapsidmutanten Selektionsrunden auf der gewünschten Zielzelle durchgeführt. Dabei werden diejenigen Kapsidmutanten vermehrt, die die Zielzelle erfolgreich infiziert haben. Durch die grosse Diversität der

generierten Vektoren ist die Wahrscheinlichkeit gross, dass zumindest eine Mutante entstanden ist, die erfolgreich auf die Zielzelle getargetet ist.

1.6 Zielsetzung

Die Gentherapie ist in den Focus klinischen Interesses gerückt. Es werden bereits klinische Studien an Patienten durchgeführt. Ausschlaggebend für ein positives Ergebnis ist die Erreichbarkeit der Ziel-Zellpopulation für den Vektor und dessen Spezifität für diese Zellen, kombiniert mit einer ausreichend hohen Expression des therapeutischen Gens.

Obwohl es teilweise invasive Möglichkeiten eines direkten Zugangs zu diversen Zielgeweben gibt, schließen sich andere aufgrund ihrer anatomischen Verhältnisse aus. Das beträchtliche Risiko an iatrogenen Komplikationen wäre hierbei nicht zu verantworten. Es entstand daher die Idee, diese über eine systemische Applikation der Vektoren zu transduzieren. Damit dabei nur die dafür vorgesehene Ziel-Zellpopulation transduziert wird, werden geeignete Vektoren benötigt.

Gerade das vaskuläre Endothel bietet sich als Zielgewebe an, da es in ständigem Kontakt zum Blut steht. Dadurch wird der Kontakt von Vektor und Zielzelle erleichtert. Da das Endothel darüber hinaus auch bei vielen Pathologien des Menschen involviert ist (ischämische Herzkrankheiten sind in Deutschland die häufigsten Todesursachen (Statistisches Bundesamt, Stand 16.09.2004)), ist das Interesse an einer gezielten Therapiemöglichkeit groß.

Bei Infektionen mit Wildtyp-Vektoren ist jedoch die Leber häufig der Hauptaufnahmeort, während Endothelien kaum transduziert werden. Was daher benötigt wird, ist ein Vektor, der spezifisch nur an Endothelien bindet und dort eine suffiziente Expression des Transgens vermittelt.

Um dies zu erreichen wurden rAAV2-Vektoren mit einem Liganden ausgestattet, der durch Phage-Display auf HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) gefunden wurde (rAAV2-SIG). Gleichzeitig wurde eine Mutante generiert, die durch den Verlust der HSPG-Bindung nicht mehr in der Lage ist, mit dem Primärrezeptor des AAV2 zu

interagieren (rAAV2-A3). Eine Kombination aus rezeptorspezifischen Liganden und „knock out“ Mutation für den primären AAV-Rezeptor sollte einen „echten“ rezeptorspezifischen Vektor ergeben (rAAV2-1B).

Zielsetzung dieser Doktorarbeit war es, diese Mutanten im Vergleich zum Wildtyp *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. *In vitro* sollte anhand ausgewählter Zelllinien die jeweilige Transduktionseffizienz bestimmt werden.

Bei Balb/c-Mäusen sollte in einer Bioverteilungsstudie die Spezifität der einzelnen Mutanten *in vivo* verglichen werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

293

Zelltyp: humane embryonale Nierenzelllinie
Medium: DMEM mit GlutaMAX1 (Invitrogen) + 10% FCS + 1% P/S
Herkunft: AG Hallek, Genzentrum der LMU München

HUVEC

Zelltyp: humane Nabelschnur-Endothel-Zellen
Medium: Endothelial Cell Growth Medium + Supplement Mix
Herkunft: Dr. von Haunersches Kinderspital, München

HeLa

Zelltyp: humane Zervixkarzinom-Zelllinie
Medium: DMEM mit GlutaMAX1 (Invitrogen) + 10% FCS + 1% P/S
Herkunft: AG Hallek, Genzentrum der LMU München

C166

Zelltyp: murine Dottersack-Endothel Zelllinie
Medium: DMEM (Biochrom) + 10% FCS + 1% P/S
Herkunft: ATCC, Manassas, USA

SV40 MES 13

Zelltyp: murine Nierenmesangium-Zelllinie
Medium: DMEM (Biochrom) 3:1 Ham's F12 (14mM HEPES)+ 5% FCS + 1% P/S
Herkunft: ATCC, Manassas, USA

H2.35

Zelltyp: murine Hepatozyten-Zelllinie
Medium: DMEM (ATCC) + 200 nM Dexametason + 4% FCS + 1% P/S
Herkunft: ATCC, Manassas, USA

GC-1 sq

Zelltyp: murine Spermatogonien-Zelllinie
Medium: DMEM (Biochrom) + 10% FCS + 1% P/S
Herkunft: ATCC, Manassas, USA

C3H/10T 1/2

Zelltyp: murine Fibroblasten-Zelllinie
Medium: Eagle´s Basal Medium (Biochrom) + 10% FCS + 1% P/S
Herkunft: AG Grosschedl, Genzentrum der LMU München

NIH-3T3

Zelltyp: murine Fibroblasten-Zelllinie
Medium: DMEM (Biochrom) + 10% FCS + 1% P/S
Herkunft: AG Hallek, Genzentrum der LMU München

IC-21

Zelltyp: murine Makrophagenlinie
Medium: RPMI 1640 Medium (Invitrogen) + 10% FCS + 1% P/S
Herkunft: AG Hallek, Genzentrum der LMU München

MHEC-5T

Zelltyp: murine Myokardendothel-Zelllinie
Medium: DMEM (2mM L-Glutamin) + 10% FCS + 1% P/S
Herkunft: AG Hallek, Genzentrum der LMU München

SVEC 4-10

Zelltyp:	SV40 transformierte murine Endothel-Zelllinie
Medium:	Eagle´s Basal Medium (Biochrom) + 10% FCS + 1% P/S
Herkunft:	AG Koszinowski, Genzentrum der LMU München

Hep-G2

Zelltyp:	Zelllinie eines humanen hepatozellulären Karzinoms
Medium:	Mem (Invitrogen) + 10% FCS + 1% P/S
Herkunft:	AG Hallek, Genzentrum der LMU München

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Benzonase	Merck, Darmstadt
Biomax Light Film	Kodak, Stuttgart
Blocking-Reagenz Boehringer Mannheim	Boehringer, Mannheim
Dexametason	Braun, Melsungen
DIG-DNS Labeling and Detection Kit	Boehringer, Mannheim
DMEM	
-mit 4,5g/L-Glucose, 1,5g/L NaHCO ₃ , Glutamin	ATCC, Manassas
-mit 1,0g/L-Gucose, 3,7g/L NaHCO ₃ , Glutamin	Biochrom AG, Berlin
DMEM/F12 mit GlutaMAX1	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNeasy®Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Eagle´s Basal Medium	
mit 5g/L-Glucose, 1,5g/L NaHCO ₃	Biochrom AG, Berlin
EDTA	AppliChem, Darmstadt
EndoFree® Plasmid Kit	Qiagen, Hilden

Endothelial Cell Growth Medium + Supplement Mix	Promocell, Heidelberg
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formamid	Fluka ChemieAG, Buchs, Schweiz
FCS (Fötales Kälberserum)	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Light-Cycler-FastStart DNS Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
McCoy's 5A Medium mit L-Glutamin	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
MEM mit Earle's Salzen & GlutaMAX1	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
<u>Molekulargewichtsmarker für DNS</u>	
-1kb Leiter	New England Biolabs, Schwalbach
-λ DNA Hind III	New England Biolabs, Schwalbach
New QuantiTect™SYBR®Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Nylonmembran, positiv geladen	Roche, Mannheim
OptiPrep™	Sigma, Deisenhofen
PBS	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Plasmid Purification Kit	Qiagen, Hilden
Primer	Methabion, Martinsried
Pyruvat (100 mM)	Merck, Darmstadt
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
RPMI 1640 mit GlutaMAX1	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
SSC (Salines Sodium Citrate)	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt

Trypsin-EDTA	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Tween®20	Merck, Darmstadt

2.1.3 Puffer und Lösungen

Ampicillin: Stocklösung: 50 mg/ml in H₂O, steril filtriert
Endkonzentration: 50 µg/ml

Auftragspuffer für

Agarosegele:	Tris/HCl, pH 8,0	10	mM
	EDTA, pH 8,0	50	mM
	Ficoll	10	%
	Glycerin	10	%
	BPB	0,01	%

Puffer für Dot Blot:

- **Blockierungspuffer:** Maleinsäurepuffer 90 %
Blocking-Reagenz 10 %
- **Detektionspuffer:** Tris/HCl, pH 9,5 100 mM
NaCl 100 mM
- **Maleinsäurepuffer:** Maleinsäure, pH 7,5 100 mM
NaCl 150 mM
- **Hybridisierungslsg.:** Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,2 125 mM
NaCl 250 mM
EDTA 1 mM
Formamid 45 % (w/v)
SDS 7 % (w/v)

- **2x SSC-Waschlsg.:** 2x SSC mit 0,1% SDS
- **0,1x SSC-Waschlsg.:** 0,1x SSC mit 0,1% SDS
- **20x SSC-Puffer:**

NaCl	3 mM
Natriumcitrat, pH 7,0	30 mM
	0
- **10x TBE:**

Tris	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	20 mM
- **Waschpuffer:**

Maleinsäurepuffer	50 ml
Tween	150 µl
- **PK-Puffer**

Tris (pH 8,0)	75 mM
EDTA	25 mM

Puffer und Lösungen für die Virusproduktion

- **Ammoniumsulfat** 35% bzw. 55%
- **Lysispuffer für Zellaufschluss**

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

Transfektionspuffer (HBS)

für Virusherstellung:	HEPES, pH 7,2	50	mM
	NaCl	280	mM
	Na ₃ P	1,5	mM

Grundlösung für Iodixanolgradient:

PBS	1x
MgCl ₂ in mM	1
KCl in mM	2,5
Phenolrot in µl	75

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

Puffer der Firma QIAGEN:**Für das Kit DNeasy**

Elutionspuffer AE	QIAGEN-Produkt
Waschpuffer AW1	QIAGEN-Produkt
Waschpuffer AW2	QIAGEN-Produkt
Lysis-Puffer AL	QIAGEN-Produkt
Puffer ATL	QIAGEN-Produkt

Für die Kits Mini-, Midi-, Maxi- und Mega-Prep

<u>Resuspensionspuffer P1</u>	Tris/HCL (pH 8,8)	50	mM
	EDTA	10	mM
	RNaseA	100	µg/ml
<u>Lysispuffer P2</u>	NaOH	200	mM
	SDS	1	%
<u>Neutralisierungspuffer P3</u>	KOAc (pH 5,5)	3	M
<u>ER-Puffer</u>	QIAGEN-Produkt		
<u>Säulenäquilibrierungspuffer QBT</u>	NaCl	750	mM
	MOPS (pH 7,0)	50	mM
	Isopropanol	15	%
	Triton X-1000	0,15	%
<u>Waschpuffer QC</u>	NaCl	1	M
	MOPS (pH 7,0)	50	mM
	Isopropanol	15	%
<u>Elutionspuffer QF</u>	NaCl	1,25	M
	Tris/HCl (pH 8,5)	50	mM
	Isopropanol	15	%
<u>Elutionspuffer QN</u>	NaCl	1,6	M
	MOPS (pH 7)	50	mM
	Isopropanol	15	%
<u>Resuspensionspuffer TE</u>	Tris/Cl (pH 8)	10	mM
	EDTA	1	mM

2.1.4 Enzyme

Benzonase	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen

2.1.5 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	Hybaid, Ulm
DotBlot Apparatur	Gibco BRL, Eggenstein
Durchflusszytometer: <i>Coulter Epics XL-MCL</i>	Beckman, Krefeld
Eagle Eye	Stratagene, Amsterdam, NL
PCR: <i>Light Cycler</i>	Roche, Mannheim
Spektralphotometer: <i>DU 640</i>	Beckman, Krefeld
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss, Jena

2.1.6 Bakterienstämme

Die verwendeten Plasmide wurden in *E. coli* TOP10F' und *E. coli* DH10B amplifiziert:

TOP10F':

F' {*lacI*^q*Tn10*(Tet^R)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *deoR*
recA1 *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*
 (Invitrogen Corp., Karlsruhe)

DH10B:

F' *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *end A1* *araD139* Δ
 (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* λ-*rpsL* *nupG*
 (Invitrogen Corp., Karlsruhe)

2.1.7 Vektoren

rAAV-wt

Als rAAV-wt wird im Folgenden das rekombinante AAV2 mit unmodifiziertem Kapsid und GFP bzw. lacZ (= β -Galaktosidase) als Transgen bezeichnet. Dieses wurde in 293-Zellen hergestellt.

rAAV-Mutanten

Folgende rekombinante AAV-2-Vektoren wurden durch die Arbeitsgruppe Hallek für die beschriebenen Experimente bereitgestellt:

Vektor	Genesequenz 580-591	Referenz
rAAV-wt	NLQRG N ₅₈₇ RQAA	(Girod <i>et al.</i> , 1999)
rAAV-pRC99	NLQRG N ₅₈₇ ASGGS ARQAA	(Nicklin <i>et al.</i> ; 2001)
rAAV-SIG	NLQRG N ₅₈₇ ASIGYPL PARQAA	(Nicklin <i>et al.</i> ; 2001)
rAAV-A3	NLQAGAAQAA	(Wu <i>et al.</i> , 2000)
rAAV-1B	NLQAGA ASIGYPL PAAQAA	unpublished data
rAAV-eon	Negativkontrolle mit invertierter Genesequenz für Neomycin-Phosphotransferase als Platzhalter im Cap-Gen	unpublished data

Abbildung 8: Auflistung der rAAV-Vektoren nach ihren Genesequenzen einschließlich der Referenzen

Alle Vektoren kodierten entweder für GFP oder für lacZ.

2.1.8 Tiere

Für den *in vivo*-Versuch wurden weibliche, 74 Tage alte Balb/c -Mäuse verwendet. Für die lokale Infektion eines venösen Bypasses wurden weibliche New-Zealand-Kaninchen mit einem Gewicht zwischen 2,5 kg bis 3,5 kg verwendet.

2.1.9 Plasmide

pGFP, pZNL und pRep/Cap entstammen der Arbeitsgruppe Hallek (Huttner *et al.*, 2003; Girod *et al.*, 1999), pXX6-80 wurde uns freundlicherweise von Prof. Jude Samulski (Chapel Hill, Universität North Carolina, USA) zur Verfügung gestellt (Xiao *et al.*, 1998).

pGFP

Transgenplasmid: Expressionsplasmid für das „green-fluorescent protein“ (GFP) und eine Hygromycinresistenz. Die Expressionskassette ist von den viralen Verpackungssignalen (ITR) des AAV2 flankiert.

pZNL

Transgenplasmid: Expressionsplasmid für β -Galaktosidase. Die Expressionskassette ist von den viralen Verpackungssignalen (ITR) des AAV2 flankiert.

pXX6-80

Adeno-Helferplasmid: Expressionsplasmid für die adenoviralen Proteine VA, E2A und E4, die neben E1A und E1B für die rAAV-Herstellung benötigt werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Zur Herstellung der Bakterienkultur-Platten wurde das Medium nach Autoklavieren und Abkühlen auf 55°C mit Agarose versetzt und in sterile Petrischalen gegossen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Platten bei 4°C invertiert gelagert. Mit einer sterilen Impföse wurden Bakterien aus einer Flüssigkultur auf diese sterilen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C invertiert im Brutschrank inkubiert.

Zur Selektion der Bakterien auf Plasmide wurde dem Medium zusätzlich das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

2.2.2 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

Um hochreine Plasmidpräparationen (für Klonierungen, Sequenzierung, Viren-/Vektorherstellung) zu erhalten, wurden Anionen-Austauschersäulen der Firma Qiagen eingesetzt. Es wurden Präparationen im "Midi"-, "Maxi"- und "Mega"-Maßstab nach den Standardprotokollen und Systemkits Qiagen 100, 500 und 2500 durchgeführt.

Anschließend wurde eine Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung durchgeführt:

Die Konzentrationen wurden mit einem Spektralphotometer (DNS-Spektralphotometer DU 640, Firma Beckmann) bestimmt und computergestützt ausgewertet. Ein OD₂₆₀ Wert von 1 entspricht dabei einer Konzentration von ca. 50µg/ml dsDNS (Maniatis *et al.*, 1989).

Alternativ wurde die Konzentration in einem Agarosegel durch Vergleich der Bandenintensität mit einem Längenstandard bekannter Konzentration bestimmt.

Weiterführend wurde eine Restriktionsenzymspaltung vorgenommen. Diese Spaltung der DNS mit Restriktionsendonukleasen wurde zur Kontrolle von Plasmiden eingesetzt. Dafür wurden ca. 200ng DNS benötigt, die von Restriktions-

endonucleasen in Fragmente bestimmter Länge aufgetrennt wurden. Die Schnittstellen innerhalb der jeweiligen Plasmide waren bekannt. Auf dieser Basis wurden Enzyme gewählt, die mindestens zwei Schnittstellen auf den Plasmiden vorweisen konnten und dadurch die DNS in mindestens zwei Fragmente mit möglichst unterschiedlicher Länge teilten. Standardbedingungen wie erforderlicher Restriktionspuffer, Temperatur und Restriktionsaktivität wurden den Herstellerangaben entnommen.

Anschließend erfolgte die Analyse der Spaltung mittels Agarosegel-Elektrophorese. Dazu wurde je nach zu erwartender Fragmentlänge ein 0,8%- bis 2%-iges Agarosegel gegossen: Die Agarose wurde in Tris-Borat-EDTA(TBE)-Puffer aufgeschlämmt, im Mikrowellenherd aufgeköcht und so gelöst. Nach dem Abkühlen auf etwa 60°C wurde das flüssige Gel in eine vorbereitete Form gegossen und mit Ethidiumbromid bis zu einer Konzentration von 0,5µg/ml versetzt. Sobald das Gel eine feste Konsistenz erlangt hatte, wurde es in eine entsprechende Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Das Gel wurde in TBE-Puffer gebettet und mit den DNS-Proben in Auftragspuffer bestückt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der DNS bei einer Spannung von 30 bis 120V.

Anschließend wurde die DNS durch UV-Absorption des in die dsDNS interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht ($\lambda = 366\text{nm}$). Durch den Vergleich mit parallel aufgetragenen Standards konnte die Länge dieser Fragmente abgeschätzt werden.

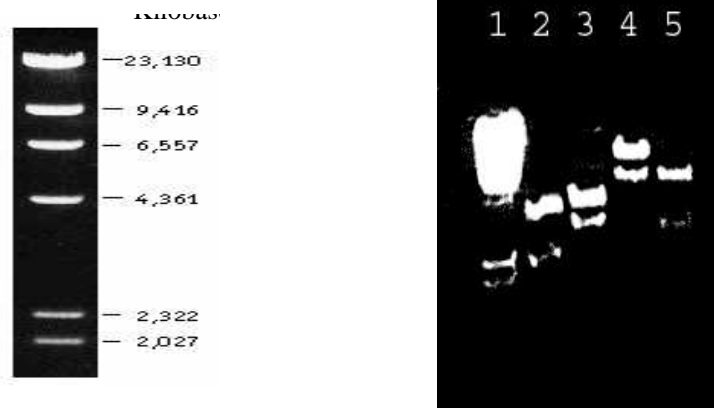


Abbildung 9: **Linke Graphik:** Hind III-Verdau von λ -DNS zur Abschätzung von DNA-Fragmentlängen, Angabe in Kilobasen

Rechte Graphik: Beispiel einer Restriktionsenzymspaltung der verwendeten Plasmide (von links nach rechts: λ -DNS mit Hind III gespalten (Spur 1), pRC (Spur 2) mit Pst I gespalten, pGFP mit Hind III gespalten (Spur 3), pXX6-80 mit Eco RI (Spur 4) und Hind III gespalten (Spur 5). Die enthaltenen Fragmente entsprechen den Erwartungen

2.2.3 Kultivierung und Einfrieren von Zellen und Zellzahlbestimmung

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei 37°C in Wasser-gesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ in den jeweiligen geeigneten Medien.

Die Zellen wurden je nach Teilungsrate zwei- bis dreimal die Woche umgesetzt. Bei adhärennten Zelllinien wurde das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1% Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden in Verdünnungen von 1:5 bis 1:20 in frisches Medium aufgenommen.

Zum Einfrieren der Zellen wurden die Zellen bei 4°C und 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einer DMSO:FCS=1:9-Lösung aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend eine Stunde auf Eis gelagert, um sie dann über Nacht bei -80°C einzufrieren, bevor sie in flüssigen Stickstoff zur Aufbewahrung

überführt wurden.

Bei Experimenten in denen eine definierte Zellzahl eingesetzt werden musste, wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Der durchschnittliche Wert der Zellzahl pro Großquadrat (16 Kleinquadrate) mit 10^4 multipliziert entspricht der Zellzahl pro ml.

2.2.4 Herstellung und Aufreinigung rekombinanter AAV-Vektoren

Es wurde die Methodik der adenovirusfreien Herstellung und Aufreinigung rekombinanter AAV-Vektoren über einen diskontinuierlichen Iodixanolgradienten gewählt.

Die Transfektion der Zellen und die Aufreinigung der Viruspräparation erfolgte wie bereits erwähnt in modifizierter Form nach einem Verfahren von Zolothukin (Zolothukin *et al.*, 1998, 1999).

Die Virusverpackung wurde in HEK293-Zellen durchgeführt. Dazu wurden $7,5 \times 10^6$ Zellen in Zellkulturschalen von 150 mm Durchmesser ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das alte Medium durch frisches ersetzt. Nach weiteren 2 Stunden wurden die Zellen mit Hilfe einer Kalziumphosphat-Präzipitation mit insgesamt 37,5µg Plasmid DNS transfiziert.

Zur Vorbereitung des Transfektionsansatzes wurden pro transfizierte Zellkulturplatte 5µg Adenovirus-Helferplasmid, 7,5µg Transgenplasmid und 7,5µg Helferplasmid in 1ml 250mM CaCl₂ pipettiert, gemischt, 1ml HBS hinzugefügt und abermals gemischt. Bevor der Ansatz auf die Zellen gegeben wurde, wurde er zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ wurde das Medium durch frisches Medium (DMEM mit Penicillin/Streptomycin als Antibiotika-Kombination und mit 2% FCS) ersetzt, und die Zellen erneut 24 Stunden inkubiert.

2.2.4.1 Aufschluss der 293 Zellen und Aufreinigung von rAAV

48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen durch Abkratzen geerntet und bei 3000g pelletiert. Die Zellen wurden in 7,5ml Lysispuffer (siehe oben) aufgenommen, dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im 37°C warmen Wasserbad wieder aufgetaut, um sie anschließend über Nacht bei -80°C aufzubewahren. Die Präparation wurde am darauf folgenden Tag bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und mit Benzonase (50U/ml) versetzt um freie RNS und DNS abzubauen. Anschließend wurde die Präparation für 20 Minuten bei 3700g abzentrifugiert und der Überstand für die Weiterverarbeitung in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Unter dem Überstand wurde ein Iodixanolgradient aufgebaut, indem die Suspension zunächst mit 15% Iodixanollösung (7ml), dann mit 25% (5ml), mit 40% (5ml) und anschließend mit 60% Iodixanollösung (6ml) unterschichtet wurde, um es zum Schluss mit PBS/MK zu überschichten. Der Gradient wurde für eine Stunde in der Ultrazentrifuge bei 18°C zentrifugiert. Danach wurde die 40%-Phase, welche den Vektor enthält, abgenommen.

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

2.2.4.2 Charakterisierung der AAV-Präparationen

2.2.4.2.1 *Bestimmung des genomischen Titers durch Dot-Blot*

Der genomische Titer, das heißt die Anzahl DNS-enhaltender Partikel pro ml wurde über Dot-Blot und anschließende Fluoreszenzdetektion mit Digoxigenin-markierten Sonden bestimmt. Dabei lässt man eine Digoxigenin-markierte Sonde an das Vektorgenom hybridisieren, welche von einem mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelten Antikörper detektiert wird. Die alkalische Phosphatase katalysiert bei Zugabe eines bestimmten Substrats (CSPD) eine Lumineszenzreaktion.

Die Markierung von DNS-Sonden wurde mit dem DIG-DNS-Labeling und Detektion-Kit nach dem Standard Protokoll der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Für Hybridisierung und Detektion wurde nach einem leicht abgewandelten Protokoll gearbeitet (High-SDS).

2.2.4.2.1.1 Herstellung Digoxigenin-markierter DNS-Sonden

Die zu markierende dsDNS (100ng bis 3µg) wurde zehn Minuten bei 95°C im Wasserbad denaturiert und anschließend im NaCl-Eisbad schockgekühlt. Die Markierung wurde nach der sogenannten "Random Primer Labeling"-Methode in 20µl mit folgendem Ansatz durchgeführt:

Linearisierte ssDNS	300ng
10x Hexanukleotid Mischung	2µl
10x DIG dNTP Labeling Mischung	2µl
Klenow Polymerase (2 U/µl)	1µl
H₂O	ad 20µl

Abbildung 10: Ansatz zur Herstellung Digoxigenin-markierter DNS-Sonden

Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und 20 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl 0,5M EDTA gestoppt. Abschließend wurde die markierte DNS durch Zusatz von 0,1 Volumen 4M LiCl und 3 Volumen eiskaltem Ethanol (100%) für eine Stunde bei -80°C präzipitiert und anschließend bei 4°C für 30 Minuten pelletiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Wiederum wurde der Überstand abgenommen, die DNS für zehn Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer oder H₂O resuspendiert.

2.2.4.2.1.2 Proteinase K-Spaltung und Präparation durch Anionenaustauschersäulen

Zur Probenvorbereitung für den Dot Blot wurden 5µl bis 15µl der Viruspräparation mit dem DNeasy®Tissue Kit behandelt. Das Kapsid wurde dabei mit Proteinase K verdaut und die DNS über Anionenaustauscherchromatographie von Iodixonal und Proteinen befreit. Die gebundene DNS wurde mit 190µl Elutionspuffer des DNeasy®Tissue Kits von der Säule eluiert.

Viruslösung	5µl
PBS	80,5µl
PK-Puffer	95µl
⇒ Inkubation 10 Minuten bei 70°C	
+ Proteinase K (20mg/ml)	9,5µl
⇒ Inkubation 2 Stunden bei 50°C	

Abbildung 11: Dot-Blot-Ansatz

2.2.4.2.1.3 Durchführung des Dot Blots

Über den Intensitätsvergleich mit einem Standard bekannter Partikelkonzentration kann auf die Anzahl genomischer Partikel pro ml zurückgerechnet werden.

Zur Herstellung der Verdünnungsreihen wurden in einer 96-Loch Rundbodenplatte in den Reihen 2 bis 8 jeweils 100µl 0,5M NaOH vorgelegt. In die erste Reihe wurde oben genannter Versuchsansatz hinzugegeben.

Parallel dazu wurde der Referenzwert von $3,2 \times 10^8$ doppelsträngiger GFP-Moleküle pro Mikroliter aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde H₂O verwendet. Danach wurde mit Hilfe einer Multikanalpipette eine serielle 1:1 Verdünnung erstellt. Dazu wurden die einzelnen Proben jeweils gründlich gemischt und anschließend aus jedem Loch 100µl in die nachfolgende Reihe überführt. Die 100µl der abgenommenen Lösung des letzten Lochs wurden verworfen. Die Platte wurde locker mit einer Paraffin-Folie überzogen und zur Denaturierung der DNS 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Proben der 96-Loch-Platte wurden anschließend auf ein Gesamtvolumen von 200µl mit 0,5M NaOH aufgefüllt und durch Wasserstrahlvakuum auf eine positiv geladene Nylonmembran geblottet. Zum Crosslinking wurde die zwischen Whatman-Papier gelagerte Membran zwei Stunden bei 80°C inkubiert.

Zur Hybridisierung wurde die Membran in eine Rollinkubator-Röhre gegeben und mit 15ml einem auf 60°C vorgewärmten Prähybridisierungspuffer bei 42°C für mindestens 15 Minuten inkubiert. Danach wurde die Membran mit in 15ml Prähybridisierungspuffer gelöster Sonde bei einer Endkonzentration von 15ng/ml über Nacht bei 42°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran nach Abgießen der Sonde jeweils zweimal für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 2 x SSC-Puffer und anschließend bei 65°C zweimal für 20 Minuten mit 0,1 x SSC gewaschen. Anschließend wird die Membran kurz in Waschpuffer getaucht.

Zur Chemielumineszenz-Detektion wurde die Membran 30 bis 60 Minuten in Blockierungspuffer im Rollinkubator bei Raumtemperatur inkubiert, um sie anschließend wiederum 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur mit 15ml Blockierungspuffer, diesmal mit Anit-Digoxygenin-AP-Antikörper (1:10.000) angereichert, zu inkubieren.

Hierauf wurde die Membran zweimal für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Waschpuffer gewaschen und 1 Minute in Detektionspuffer äquilibriert. Zum Schluß wurde die Membran und 500µl Detektionspuffer mit 5µl Chemilumineszenzsubstrat

CSPD[®] vermischt in eine Folie eingeschweißt, um sie in dieser Folie für 15 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren.

Nach einer Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Membran 20 Minuten im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Um das Ergebnis sichtbar zu machen, wurde die Membran hierauf in einer Filmkassette auf Röntgenfilm (Kodak Biomax) aufgelegt und der Konzentration der Probe (und damit der Helligkeit) entsprechend lange belichtet. Der Film wurde in einem automatisierten Verfahren entwickelt.

2.2.4.2.2 Bestimmung des genomischen Titers durch real-time-PCR

2.2.4.2.2.1 Theorie der PCR

Bei der „Polymerase-Ketten-Reaktion“ (PCR) werden bestimmte Sequenzen aus einem DNS-Substrat gezielt vermehrt. Dadurch wird es möglich, einen bestimmten DNS-Abschnitt, beispielsweise ein Gen aus einer sehr langen DNS oder auch aus einem Gen-Gemisch, selektiv im Reagenzglas hochpotenziert zu vermehren. Rückwirkend kann damit die Basismenge der gesuchten Gensequenz ermittelt werden. Dazu werden spezifische Primer benötigt, die der gesuchten Sequenz entsprechen. Damit sich sowohl die als 3′-, als auch die als 5′-Einzelstrang-DNS vorliegenden Primer an die gesuchte Sequenz anlagern können, muß die zu untersuchende DNS in ihre Einzelstränge aufgespalten werden. Dies geschieht durch Temperatureinwirkung bei 95°C. Beim zweiten Schritt der Amplifikationsphase, der sogenannten Annealingphase, lagern sich die Primer an jeden der beiden Einzelstränge an. Von den Primern ausgehend werden mit Hilfe einer temperaturresistenten DNS-Polymerase die komplementären DNS-Stränge an dem jeweiligen Matrizenstrang synthetisiert (Elongationsphase), wobei auch die Primer-Bindesequenzen verdoppelt werden. Die neu entstandenen Doppelstränge werden wieder denaturiert, die Primer können erneut binden, und die Elongation kann wieder beginnen. Bei jedem Zyklus wird der zwischen den Primern liegende DNS-Abschnitt verdoppelt, d.h. bei n Zyklen entstehen im Idealfall 2^n identische DNS-Sequenzen. Nachgewiesen werden die replizierten DNS-Stränge u.a. durch fluoreszierende Substanzen, wie etwa hier mit SYBR-Green, die ausschließlich in doppelsträngige DNS integrieren und unter Lichteinstrahlung der Wellenlänge $\lambda=530\text{nm}$ dort fluores-

zieren. Nach jedem Amplifikationszyklus der PCR wird beim LightCycler automatisch die Gesamtfluoreszenz gemessen, die sich proportional zur amplifizierten DNS steigert.

Zur Kontrolle, ob Kontaminationen aufgetreten sind, kann am Schluß noch eine Schmelzkurve generiert werden. Da jede DNS-Sequenz aufgrund ihres Aufbaus eine spezifische Schmelztemperatur hat, bei der sie in ihre Einzelstränge zerfällt und somit SYBR Green wieder freisetzt, sollte sich die gemessene Fluoreszenz bei einer bestimmten Temperatur stark verringern, falls keine Kontamination vorliegt. Aus unspezifisch amplifizierten Gen-Sequenzen vorliegende Kontaminationen zerfallen ungleichmäßig und meist frühzeitig, wodurch sie leicht zu erkennen sind. Mit Hilfe der Schmelzkurve kann man somit zeigen, dass die detektierte Fluoreszenz ausschließlich von ein und derselben Gensequenz ausgegangen ist.

Die Länge der Sequenz kann anschließend durch eine Gelelektrophorese bestimmt werden. Diese kann mit der Länge der gewünschten Gensequenz verglichen werden. Die Stärken der PCR liegen einerseits in der hohen Selektivität, mit der ein bestimmter DNS-Abschnitt aus einem Gen-Pool amplifiziert wird, andererseits in der extrem niedrigen Nachweisgrenze der Methode.

2.2.4.2.2.2 Durchführung

Bei der real-time PCR-Methode wurde die mit der DNeasy®Tissue Kit vorbereitete Virus-/Vektor-DNS mit dem SYBR®Green PCR Kit wie folgend behandelt:

14,2 µl	H ₂ O (SYBR®Green PCR Kit)
1,6µl	MgCl ₂ 25mM (SYBR®Green PCR Kit)
0,1µl	EGFP-1 forward primer 100pmol/µl
0,1µl	EGFP-1 reverse primer 100pmol/µl
<u>2µl</u>	<u>SYBR Green 10x (SYBR®Green PCR Kit)</u>
18µl	pro Probe

Abbildung 12: SYBR®Green-Ansatz

Der Ansatz wurde gründlich gemischt und in die in einer Kühlbox vorbereiteten PCR-Kapillaren pipettiert. Zuletzt wurden 2µl der isolierten Virus-/Vektor-DNS hinzugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Nach dem Verschließen der Kapillaren wurden die Proben für 30 Sekunden zentrifugiert und einer PCR unterzogen. Die PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Programm (siehe Abb. 13):

	ZYKLEN	TEMPERATUR	ΔT	DAUER	MESSMODUS
Denaturierung	1	95°C	20°C/s	600s	-
		95°C	20°C/s	10s	-
Amplifizierung	40	63°C	20°C/s	3s	-
		72°C	20°C/s	20s	einmal
		95°C	20°C/s	0s	-
Schmelzkurve	1	68°C	20°C/s	10s	-
		95°C	0,1°C/s	0s	kontinuierlich
Kühlphase	1	40°C	20°C/s	30s	-

Abbildung 13: PCR-Programm

Zuerst wurde über eine Dauer von 10 Minuten bei 95°C das SYBR Green aktiviert und die DNS erstmalig in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Im Anschluß daran folgte die Amplifikationsreihe, bestehend aus einer DNS-Denaturierungsphase (95°C für 10 Sekunden), einer Annealingsphase für die Primer (63°C für 3 Sekunden) und einer Elongationsphase (72°C für 20 Sekunden). Am Ende eines solchen Zyklus detektierte man bei einer Wellenlänge von $\lambda = 530\text{nm}$ die Fluoreszenz des in dsDNS

integrierenden SYBR-Greens. Der Amplifikationszyklus wurde bis zu 40mal wiederholt. Die Anzahl der benötigten Zyklen bis zum Überschreiten einer festgelegten Fluoreszenzgrenze wurde festgehalten. Anhand eines Standards konnte daraus die Anzahl genomischer Partikel in der Probe errechnet werden.

Im Anschluß daran wurde zur Kontrolle die Schmelzkurve bestimmt, bei der eine kontinuierliche Aufheizung um 0,1°C pro Sekunde auf 95°C stattfand. Während dieses Vorgangs lösen sich doppelsträngige DNS-Sequenzen voneinander und verlieren ihre Fluoreszenz. Da jede Sequenz aufgrund ihres Aufbaus eine spezifische Schmelztemperatur hat, sollte sich die gemessene Fluoreszenz bei einer bestimmten Temperatur schlagartig verringern, falls keine Kontamination vorliegt. Daher dient die Schmelzkurve als eine Bestätigung, dass die detektierte Fluoreszenz ausschließlich von einer bestimmten Sequenz ausgegangen ist.

2.2.5 Transduktion der Zellen mit rAAV-Vektoren

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in mit Wasser gesättigter Atmosphäre bei einem CO₂-Gehalt von 5% in dem für die jeweilige Zelllinie geeigneten Medium. Für die Transduktion wurden die Zelllinien auf Kultivierungs-Platten ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Infektion zu 50% konfluent waren.

Die Zellen aus jeweils zwei der Kammern wurden ca. 24 Stunden nach Aussaat geerntet, zusammengeführt und gezählt. Der daraus gewonnene Durchschnittswert wurde zur Berechnung der zur Transduktion einzusetzenden Menge an Vektorpräparation benötigt. Im Anschluss an die Transduktion wurden die Zellen in den Brutschrank (37°C; 5% CO₂) rücküberführt.

2.2.5.1 Bestimmung der Transduktionsfähigkeit und des transduzierenden Titers

Zur Ermittlung des transduzierenden Titers wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen der AAV2-Präparationen transduziert. Hierzu wurden 7x10⁴

Zellen pro Kammer auf einer Kultivierungs-Platte mit 12 Kammern ausgesät. Nach 24 Stunden wurden diese zur Optimierung der AAV-Genexpression zwei Stunden vor Infektion mittels einer ^{137}Cs -Quelle (GSF, Hämatologikum, München) mit einer Dosis von 100 Gy bestrahlt. Nach zwei weiteren Stunden erfolgte die Transduktion mit einer Verdünnungsreihe von 1 μl bis 0,0003 μl .

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Zellen abgelöst und bei 2.700 rpm 3 Minuten zentrifugiert.

Erfolgreiche Transduktionen der Vektoren mit GFP-Markergenen wurden über FACS nachgewiesen. Anhand der Anzahl Transgen exprimierender Zellen und über die entsprechende Verdünnungsreihe konnte auf die Zahl infektiöser Partikel pro ml im Virusstock zurückgerechnet werden.

2.2.5.2 Transduktion der Zellen mit rAAV2-Vektoren

In eine 24-Loch-Platte wurden je nach Zelllinie zwischen 2,0 und 2,5 x 10⁴ Zellen überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Am nächsten Tag wurde die Zellzahl pro Loch bestimmt. Daraus wurde die zuzugebende Menge an Virus errechnet. Es wurde ein Versuchsansatz erstellt, der Infektionen mit einer ansteigenden Anzahl genomischer Partikel pro Zelle vorsah:

500, 1.000, 5.000, 10.000, 50.000 und 100.000 genomischen Partikeln pro Zelle.

Zusätzlich wurde ein Heparin-Inhibitionstest durchgeführt, das heißt es wurde in einem weiteren Well zu 100.000 genomischer Partikel pro Zelle 200 IE Heparin-Natrium zugeführt.

Nach der Zellzahlbestimmung wurde das alte Medium in der 24-Loch-Platte entfernt, die Zellen gewaschen, der Vektor zugegeben und die Wells mit Medium auf 500 μl aufgefüllt. Anschließend folgte die Transduktionsphase über 48 Stunden.

2.2.6 Detektion der Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie

2.2.6.1 Theorie der Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS) -Analysen

Das FACS-Gerät ist ein Durchfluß-Zytometer, das durch Aussenden von Lichtwellen bestimmter Wellenlängen (z.B. das „green-fluorescent-protein“ (GFP)) zum Fluoreszieren anregt. Mit Hilfe diverser Lichtschranken kann das Durchfluß-Zytometer gleichzeitig die Fluoreszenz detektieren und zusätzlich die Größe und Dichte jeder einzelnen Zelle messen. Indem das Detektionsraster für die zu messenden Zellen auf die Hauptpopulation gerichtet werden kann, werden Abweichungen -wie etwa durch abgestorbene oder pathologisch veränderte Zellen- aus der Kalkulation entfernt und damit verfälschte Ergebnisse vermieden.

Bei jeder FACS-Untersuchung werden Negativkontrollen mitgeführt. Diese werden benötigt, um die zelleigene Fluoreszenz herauszurechnen. Bei unseren Versuchen wurde der Grenzwert, bei dem eine Fluoreszenz detektiert wird, bei der Negativkontrolle so hoch gesetzt, dass der Anteil der über dem Basiswert fluoreszierenden Zellen unter 1% betrug. Dieser Wert wurde dann auf die Proben transduzierter Zellen übertragen. Gemessen wurde somit jeweils die Anzahl fluoreszierender Zellen mit einer Fluoreszenzintensität über der zelleigenen.

2.2.6.2 Durchführung der Durchflusszytometrie

48 Stunden nach Initiierung der Transduktion durch Zugabe des Vektors wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1%Trypsin-EDTA vom Boden der Platte abgelöst. Das Medium mit den Zellen wurde dann bei 2700rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand, der potentiell noch Vektor beinhaltet, abgenommen und autoklaviert. Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden sogleich auf +8°C gekühlt. Die Analyse der Genexpression erfolgte durch Fluoreszenzmessung in der Durchflusszytometrie. Bei jeder Messung wurden mindestens 5000 Zellen analysiert. Als Neutral-Null-Punkt

wurde die Fluoreszenz der Zellen der Negativkontrolle gewertet. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der WinMDI 2.8 FACS Software.

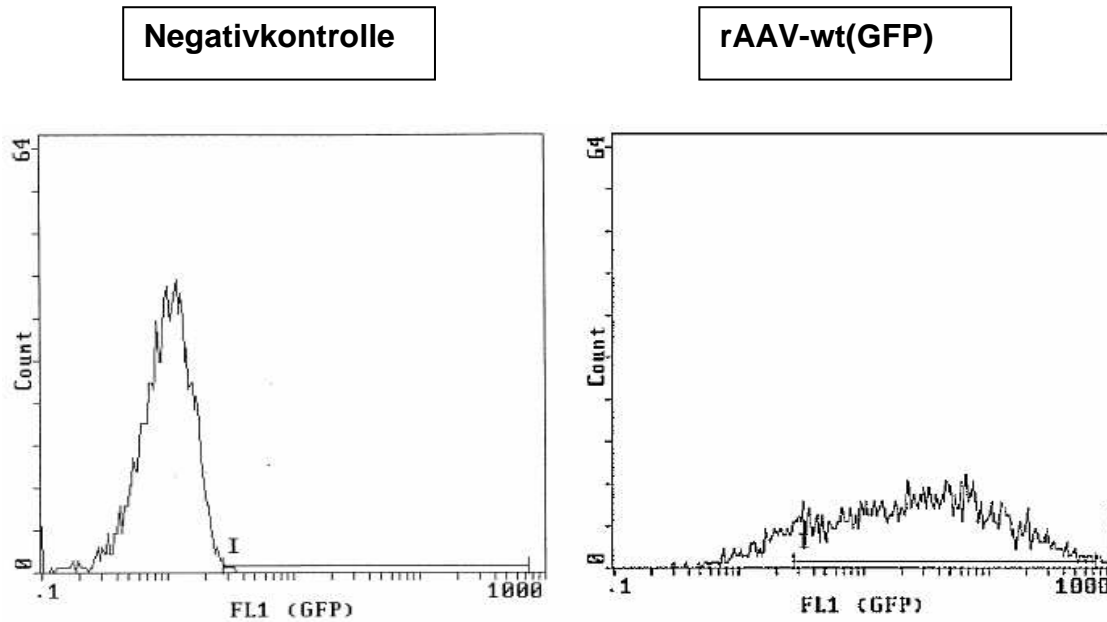


Abbildung 14: Bei der Negativkontrolle der Fluoreszenz einer Zellart wird die Nachweisgrenze eingestellt, um nach einer Transduktion die neu aufgetretene Fluoreszenz bewerten zu können. Links Negativkontrolle, rechts nach Infektion mit 100.000 genomischer Partikel rAAV-wt(GFP). In der x-Achse ist die Stärke der Fluoreszenz aufgetragen.

2.2.7 Transduktion der Balb/c-Mäuse

2.2.7.1 Transduktion

Die *in vivo*-Versuche wurden bei 74 Tage alten weiblichen Balb/c-Mäusen durchgeführt. Den Mäusen wurden jeweils ca. $1,5 \times 10^8$ genomische Partikel an rAAV2-wt, rAAV2-pRC99, rAAV2-SIG, rAAV2-A3, rAAV2-1B und rAAV2-eon in die Schwanzvene injiziert. Als Negativkontrolle wurde eine zusätzliche Maus mitgeführt, der kein Vektor injiziert wurde.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Mäuse durch CO₂-Intoxikation getötet.

2.2.7.2 Vorbereitung der murinen Proben

Folgende Organe wurden direkt nach Tötung entnommen: Ovar, Leber, Niere, Milz, Gehirn, Herz, Muskel und Lunge. Diese Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschliessend auf Trockeneis gelagert.

Unter der Sterilwerkbank wurden die Organe aufgetaut, mit Pinzette und Skalpell stark zerkleinert und homogen durchmischt. Den Präparationen wurde pro Versuch jeweils 20mg bis 25mg entnommen. Aufgrund ihrer hohen DNS-Menge benötigte man bei der Milz nur 10mg. Da die Ovarien insgesamt durchschnittlich nur ca. 20mg schwer waren, konnte bei ihnen jeweils nur eine Bestimmung durchgeführt werden.

Anschließend wurden die Präparate mittels DNeasy-Kit von QIAGEN weiter bearbeitet:

Den Proben wurde 200µl PBS und 4µl RnaseA zugefügt, um eine RNS-freie DNS zu erhalten. Dies ließ man für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend gab man 20µl Proteinase K und 200µl AL-Puffer hinzu. Die Proteinase K sollte unter anderem die Zell- und Kernmembran aufschließen und Zugang zur DNS ermöglichen. Bei diesem Schritt war ein gründliches Mischen essentiell.

Dann wurde bei 70°C für zehn Minuten inkubiert. Als nächsten Schritt fügte man 200µl 96% Ethanol hinzu und vermischte es gründlich. Das Gemisch wurde

daraufhin auf eine „DNeasy-spin-column“ überführt und bei 8.000rpm für eine Minute zentrifugiert. Die DNS wurde an die Säule gebunden. Die abzentrifugierte Lösung wurde verworfen, der Säule 500µl AW1-Puffer hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Um die DNS noch gründlicher aufzureinigen wurden 500µl AW2-Puffer hinzugefügt und diesmal mit 14.000rpm für drei Minuten zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit aus der Säule zu lösen. Erneut wurde der Überstand verworfen. Um die DNS aus der Säule zu eluieren, wurde in zwei Schritten jeweils 100µl AE-Puffer hinzugefügt und die abzentrifugierte Flüssigkeit aufgefangen. Die beiden Proben wurden vereint. Die Konzentration der durch das QIAGEN-DNeasy-Kits gewonnenen DNS wurde optisch mit einem Spektralphotometer (DNS-Spektralphotometer DU 640, Firma Beckmann) der Arbeitsgruppe Wolf bestimmt.

2.2.7.3 Detektion der Anzahl intrazellulärer GFP-Sequenzen mittels PCR

Um die Proben für die PCR vorzubereiten wurden der durch das DNeasy-Kit gewonnenen DNS-Lösung jeweils 200ng entnommen. Nach Vorgaben des „Light-Cycler-FastStart DNS Master SYBR Green I“-Kits (Roche) wurden die Ansätze vorbereitet:

200ng	DNS
1,6 µl	MgCl ₂ -Stocklösung (25mM)
1 µl	EGFP-1 forward primer (10pmol/µl)
1 µl	EGFP-1 reverse primer (10pmol/µl)
2 µl	LC-FastStart DNS Master SYBR Green I (10x)

mit sterilem H₂O auf 20µl Volumen auffüllen

Abbildung 15: PCR-Ansatz

Die jeweiligen Proben wurden anschließend in die in einem Kühlblock platzierten Kapillaren gefüllt. Diese wurden in der LC-Karussellzentrifuge abzentrifugiert, um die Proben gleichmäßig in den Kapillaren zu verteilen, und dann in den LightCycler gegeben (Programm siehe Abbildung 15).

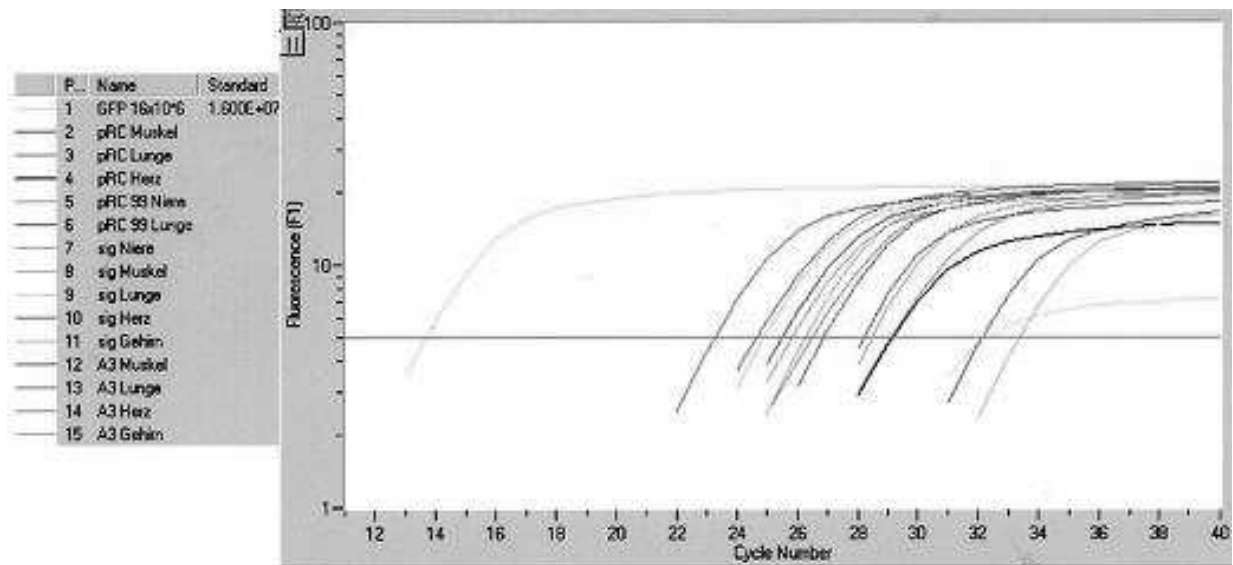


Abbildung 16: PCR-Datensatz: Dargestellt wird die Zunahme der zu detektierenden DNS-Fragmente. Die x-Achse zeigt die Anzahl der Zyklen, die y-Achse die Intensität der Fluoreszenz.

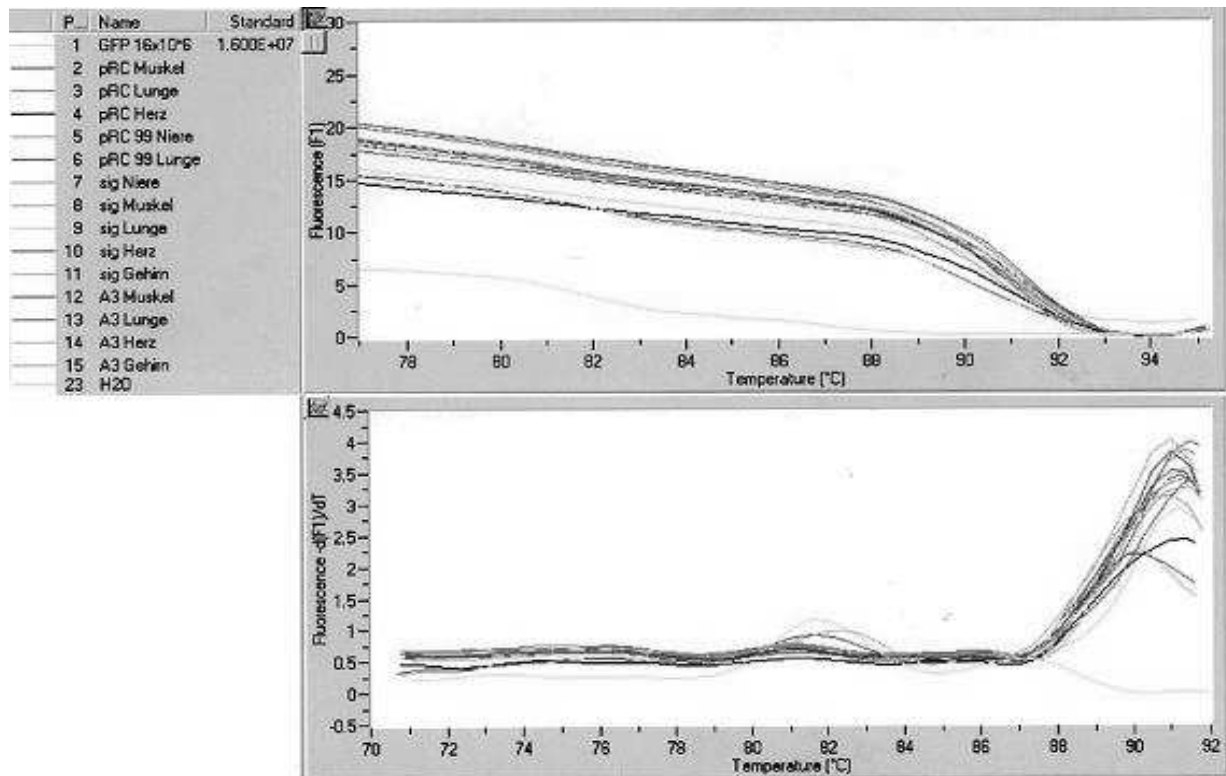


Abbildung 17: Schmelzkurve. Im oberen Diagramm ist die Abnahme der Fluoreszenz im Zeitverlauf zu sehen, im unteren deren 1. Ableitung. Die x-Achse zeigt die Anzahl der Zyklen, die y-Achse die Intensität der Fluoreszenz.

Zusätzlich zur Schmelzkurve wurden die Proben in einem Agarosegel analysiert, um die Größe der amplifizierten Gen-Sequenzen mit der Größe des zu erwartenden GFP-Fragmentes zu vergleichen.

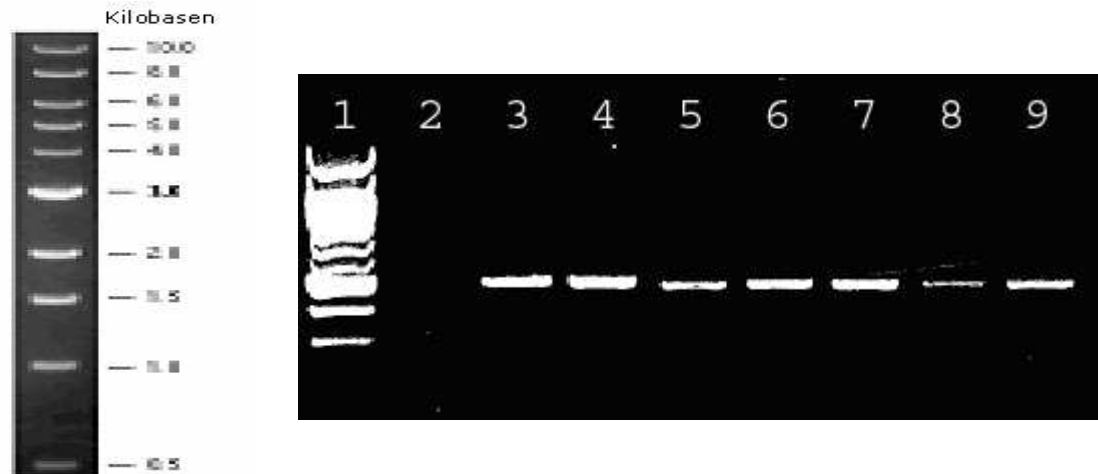


Abbildung 18: Linke Graphik: 1 kb-Leiter als Größen-/Längenstandard

Rechte Graphik: Darstellung der amplifizierten GFP-Sequenzen aus den Organen einer mit rAAV-SIG transduzierten Maus. Analysiert wurden 1. 1kb-Leiter, 2. Negativkontrolle, 3. Positivkontrolle, 4. Leber, 5. Milz, 6. Niere, 7. Muskel, 8. Lunge, 9. Herz

2.2.8 Lokale Transduktion eines venösen Bypasses bei New-Zealand-Kaninchen

2.2.8.1 Transduktion

Nachdem die Kaninchen mit Ketamin-Xylacin (50mg/kg) in Narkose versetzt worden waren, wurden diese in supiner Haltung gelagert. Zur Vorbereitung wurde das Fell am Hals rasiert.

Der Hautschnitt von circa 3 cm Länge wurde zwischen Larynx und Musculus sternocleidomastoideus gesetzt. Die Arteria carotis wurde bis zu ihrer Aufgabelung in A. carotis interna und externa aufgesucht und freipräpariert, ebenso die Vena jugularis. Die Vena jugularis wurde mit Clips ligiert und ein Stück der Länge von circa 2cm abgesetzt. Daraufhin wurden die beiden Enden des abgesetzten Stückes ebenfalls ligiert und mit einer Insulinspritze 300µl rAAV-wt(lacZ) injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde der venöse Bypass Seit-zu-Seit an die im Verlauf durch eine Ligatur unterbrochene Arteria carotis anastomosiert und auf ihre Durchgängigkeit hin überprüft (siehe Abbildung 21).



Abbildung 19: Prüfung der Durchgängigkeit des Bypasses

Die Wunde wurde schichtweise mit Fäden verschlossen und mit sterilem Wundverband abgedeckt. Perioperativ erhielt das Kaninchen eine Antibiotika-Prophylaxe mit Cefuroxim 200mg und eine Hirudin-Injektion zur Antikoagulation. Als weiteren Thrombose-Schutz erhielt es eine ASS-Injektion mit 200mg am ersten postoperativen Tag. Postoperativ wurden dem Tier Novalgin-Tropfen unter das Futter gemischt.

2.2.8.2 Organentnahme

Vier Wochen post infectionem wurden die Kaninchen erneut mit Ketamin in Vollnarkose versetzt, entlang der alten Wunde der Hautschnitt gesetzt und der Bypass freipräpariert. Auf der anderen Seite des Halses wurde die Vena jugularis

freipräpariert. Um den Tod des narkotisierten Kaninchens herbeizuführen wurden anschließend die Halsgefäße eröffnet, woraufhin das Tier verblutete. Es wurden der Bypass, die native Vena jugularis der Gegenseite und ein Stück des Musculus Sternocleidomastoideus entnommen. Der Bauchraum wurde eröffnet und Teile der Leber und der Milz entnommen. Anschließend wurde der Brustraum eröffnet, um Teile der Lunge, des Herzmuskels und der Aorta zu entnehmen.

2.2.8.3 Präparation der Proben

Unmittelbar nach Entnahme der Proben wurde der Bypass senkrecht stehend in Tissue Tek eingebracht und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die restlichen Organe wurden mit NaCl gespült und in Einbettkassetten ebenfalls flüssigem Stickstoff zugeführt.

Die gefrorenen Proben wurden im Kryostaten geschnitten. Anschliessend folgte eine β -Galaktosidase-Färbung. Die Zellen wurden wahlweise mit HE-Färbung oder mit Elastica van Gieson dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Lokale rAAV-wt(lacZ)-Infektion bei Kaninchen

Initial wurde die Effizienz einer lokalen Applikation des rAAV-wt(lacZ) mit unmodifiziertem Kapsid und lacZ als Transgen untersucht. Das Zielgewebe war ein venöser Bypass im Kaninchenmodell. Damit sollte festgestellt werden, ob mittels einer direkten Transduktion eines Zielgewebes ein effizienter Gentransfer durch AAV möglich ist.

Mittels eines autogenen venösen Bypasses überbrückten wir bei Kaninchen die im Verlauf durch eine Ligatur unterbrochene Arteria carotis. Dieser der Vena jugularis entnommene Bypass war vor der Anastomisierung *ex vivo* 30 Minuten mit rAAV-wt(lacZ) inkubiert worden.

Die angefertigten Schnitte des infizierten Bypasses nach Vektorapplikation mit anschließender Färbung wiesen erfolgreich transduzierte Zellen auf, die bisher noch nicht einwandfrei einer spezifischen Zellart zugewiesen werden konnten.

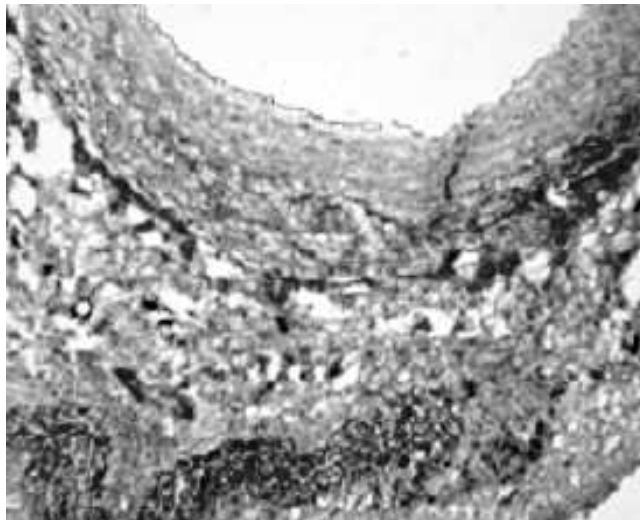


Abbildung 20: Querschnitt der Arteria Carotis mit Elastica-van-Gieson-Färbung bei 15-facher Vergrößerung

Um die Effizienz und die Spezifität des Gentransfers in Endothelzellen zu erhöhen, sollte im Folgenden ein bereits vorhandener endothelspezifischer AAV-Vektor (rAAV-SIG) als Vorbereitung für eine Anwendung im Kaninchenmodell getestet werden.

3.2 Transduktion von Mäusen mit rekombinanten AAV-Vektoren

Seit der Identifizierung der Insertionsposition I-587 im AAV-Kapsid ist es möglich, durch Insertion kurzer Peptide ein Retargeting von rekombinanten AAV-Vektoren zu erreichen, d.h. die Transduktion wird vermittelt durch die Interaktion des inserierten Peptides mit den entsprechenden Rezeptoren der Zielzelle. Um ein vollständiges Targeting durchzuführen ist es allerdings zusätzlich notwendig den natürlichen Tropismus zu eliminieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine endothelselektive AAV-Mutante (rAAV-SIG, Nicklin *et al.*, 2001) *in vitro* und *in vivo* auf ihre Spezifität untersucht. Gleichzeitig wurde eine Mutante analysiert, deren Interaktion mit den „natürlichen“ AAV-Rezeptoren gestört ist (rAAV-A3, Wu *et al.*, 2000). Durch Kombination aus Ligandeninsertion und „Knock-Out“ der natürlichen Liganden-Rezeptor-Interaktion sollte sich ein Targeting-Vektor generieren lassen, der nur spezifisch mit dem über den inserierten Liganden ansprechbaren Rezeptor interagiert (rAAV-1B, unpublished data). Diese Erhöhung der Spezifität sollte *in vivo* einen hohen Beitrag zur Sicherheit und Effizienz eines vektorvermittelten Gentransfers nach systemischer Applikation leisten.

Im ersten Projektabschnitt wurden bestimmte murine Zellarten *in vitro* transduziert. Anschließend wurde die Transgenexpression im FACS quantifiziert.

Der zweite Abschnitt befasst sich mit Transduktionen durch rAAV-Vektoren bei Mäusen. 60 Minuten post infectionem erfolgte eine Organentnahme mit anschließender Detektion der Vektor-DNS in den isolierten Organen durch PCR (siehe 2.2.8.3 Detektion der Anzahl zellinterner GFP-Sequenzen mittels PCR).

3.2.1 *In vitro*-Analysen

Als Vorbereitung für die Bioverteilungsstudie in der Maus wurden ausgewählte Zelllinien mit der rAAV-Targeting-Mutante rAAV-SIG (siehe 2.1.7.2 rAAV-Mutanten) transduziert, um einen Anhalt für dessen Spezifität zu bekommen. Als Vergleich diente der Vektor rAAV-wt mit unverändertem Viruskapsid. Beide Vektoren kodierten für das Markerprotein GFP.

48 Stunden post infectionem wurde die Transgenexpression mittels FACS (siehe 2.2.6. Detektion der Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie) bestimmt.

3.2.1.1 Transduktionen mit den Vektoren rAAV-wt(GFP) und rAAV-SIG(GFP)

Zunächst wurden die Vektorpräparationen charakterisiert. Dabei konnte ein genomischen Partikeltiter von $9,6 \times 10^8/\mu\text{l}$ für rAAV-wt(GFP) und von $4,8 \times 10^8/\mu\text{l}$ für rAAV-SIG(GFP) bestimmt werden.

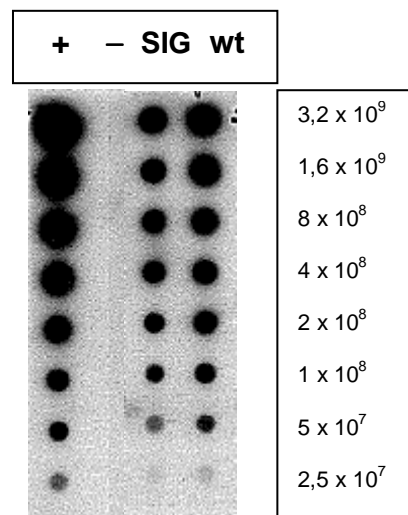


Abbildung 21: Bestimmung des genomischen Titers von rAAV-wt(GFP) und rAAV-SIG(GFP) mittels Dot-Blot. (1. Spalte: GFP-Positivkontrolle mit $c_{\text{max}} = 3,2 \times 10^9/\mu\text{l}$, 2. Spalte: Negativkontrolle, 3. Spalte: rAAV-SIG(GFP), 4. Spalte: rAAV-wt(GFP)).

Anschließend wurde der transduzierende Titer (Anzahl der zur Transduktion befähigten Partikel) bestimmt. Hierzu wurden bestrahlte HeLa-Zellen in aufsteigender Konzentration mit dem jeweiligen rAAV transduziert.

Diese Zellen lassen sich mit rAAV-wt Vektoren, die ein unmodifiziertes Kapsid tragen, sehr effizient infizieren, wie an dem transduzierenden Titer von $3,96 \times 10^9/\text{ml}$ für rAAV-wt(GFP) zu sehen ist.

Targeting-Vektoren verlieren aufgrund der Insertion in I-587, die mit der Bindung an den Primärrezeptor interferieren kann, an Transduktionseffizienz für ihre „natürlichen“ Zielzellen. Daher ist der niedrigere Titer für rAAV-SIG(GFP) mit $2,93 \times 10^7/\text{ml}$ nicht überraschend.

3.2.1.1.1 Tropismus für die humane Zelllinie Hep-G2

Um einen Eindruck zu erhalten, ob der Targetvektor rAAV-SIG(GFP) eine Tropismusänderung (Detargeting von Nichtzielzellen) im Vergleich zu rAAV-wt(GFP) aufweist, wurde Hep-G2 als Vertreter humanen Lebergewebes mit den beiden Vektoren transduziert. Von Hep-G2 ist bekannt, dass es sich durch rAAV-wt(GFP) gut transduzieren lässt (Loiler *et al.*, 2003).

3.2.1.1.1.1 Transduktion von Hep-G2-Zellen mit rAAV-wt(GFP)

Die humane Hepatozelluläre-Karzinoma-Zelllinie Hep-G2 wurde wie in Abbildung 24 und 25 gezeigt mit aufsteigenden Vektormengen transduziert. Hierzu wurden diese 24 Stunden vor Transduktion ausgesät und mit steigenden Vektormengen inkubiert. 48 Stunden später erfolgte die Detektion der Transgen-positiven Zellen mittels FACS.

Bei den drei durchgeführten Messreihen zeigte sich ein sigmoidaler Anstieg der Transgen-positiven Zellen, das heißt bis zu einem bestimmten Sättigungswert zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Vektormenge und Anzahl transduzierter Zellen. Die Sättigung wurde nach einer Transduktion mit 100.000 genomischen

Partikeln pro Zelle annähernd erreicht bei einem gemittelten Maximalwert von 81,6% GFP-exprimierender Zellen.

Nach Zugabe von Heparin, das als Analogon des Primärrezeptors HSPG AAV-Infektionen inhibieren kann, ging die Anzahl Transgen-positiver Zellen auf 1,7% zurück.

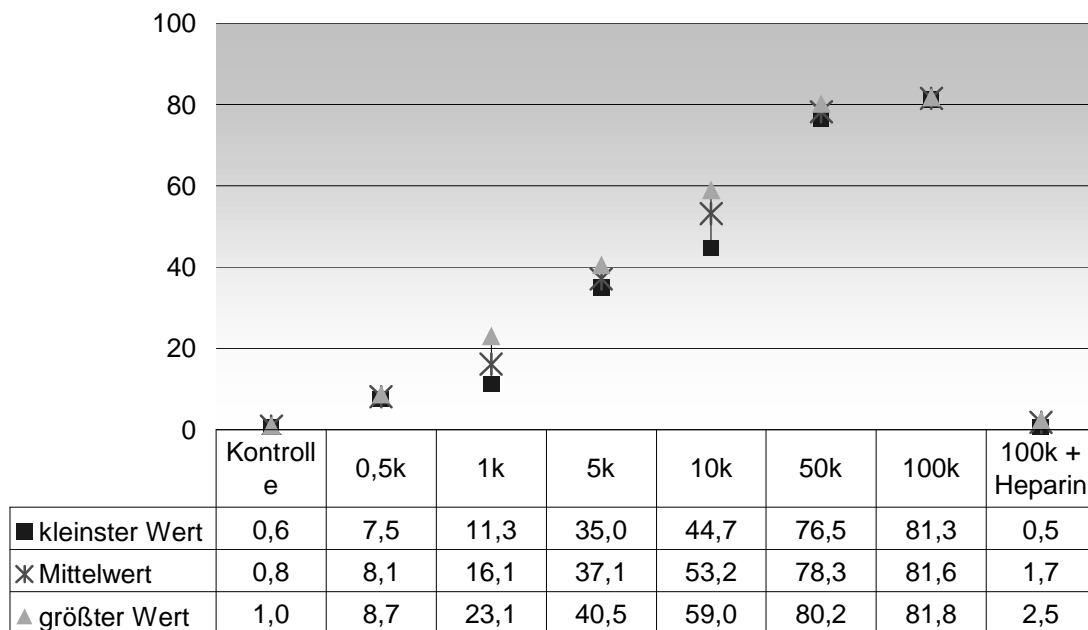


Abbildung 22: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der humanen Hepatozelluläre-Karzinoma-Zelllinie Hep G2.

3.2.1.1.1.2 Transduktion von Hep-G2-Zellen mit rAAV-SIG(GFP)

Die humane Hepatozelluläre-Karzinoma-Zelllinie Hep-G2 wies ab einer Konzentration von 10.000 genomischen Partikeln rAAV-SIG(GFP) pro Zelle eine Zunahme der Transfektionsrate auf. Diese stieg auf bis zu 16,3% GFP-exprimierender Zellen bei einer Konzentration von 100.000 genomischen Partikeln an. Die Zugabe von Heparin senkte diesen Wert nur unwesentlich.

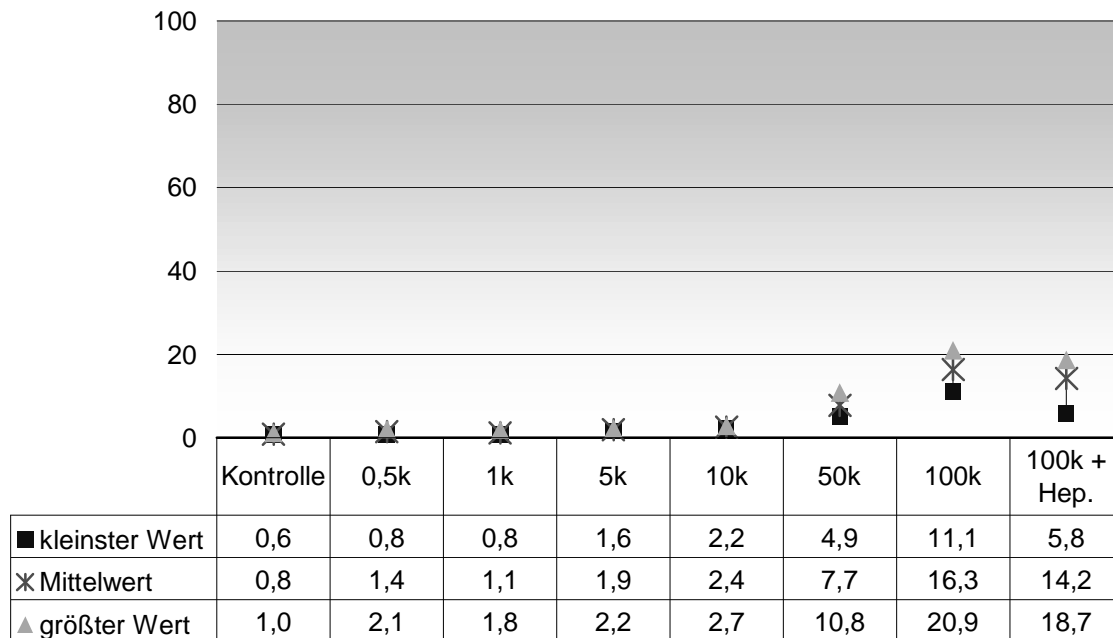


Abbildung 23: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der humanen Hepatozelluläre-Karzinoma-Zelllinie Hep G2

3.2.1.2 Tropismus ausgewählter muriner Zelllinien

Als Vertreter der wichtigsten Organe, bei denen hypothetisch eine *in vivo*-Infektion erfolgen könnte, wurden verschiedene murine Zellreihen gewählt:

Organ	Funktion	Vertreter
Endothel	Gefäßsystem	Dottersackendothel C166
		SV40 transf. Endothel SVEC 4-10
Makrophagen	Immunsystem	Makrophagen IC-21
Myokard	(Herz)Muskelgewebe	Myokardendothel MHEC-5T
Niere	Filterorgan	Nierenmesangium CRL-1927
Leber	Filterorgan	Hepatozyten H2.35
Spermatogonien	Gonaden	Spermatogonien GC-1 sg
Binde- und Stützgewebe	Aufbau des Körpers	Fibroblasten 10T1/2
		Fibroblasten NIH-3T3

Abbildung 24: Auflistung und Einteilung der Zelllinien

3.2.1.2.1 Transduktionsreihe mit rAAV-wt(GFP)

3.2.1.2.1.1 Fibroblasten-Zelllinie 10T1/2

Die Auswertung der FACS-Daten dreier Messreihen bei der Fibroblasten-Zelllinie 10T1/2 ergab einen sprunghaften Anstieg der transduzierten Zellen bei einem Wert von 50.000 genomischen Partikeln pro Zelle. Der Mittelwert bei 100.000 genomischen Partikeln pro Zelle betrug 49,3% Transgen-exprimierender Zellen.

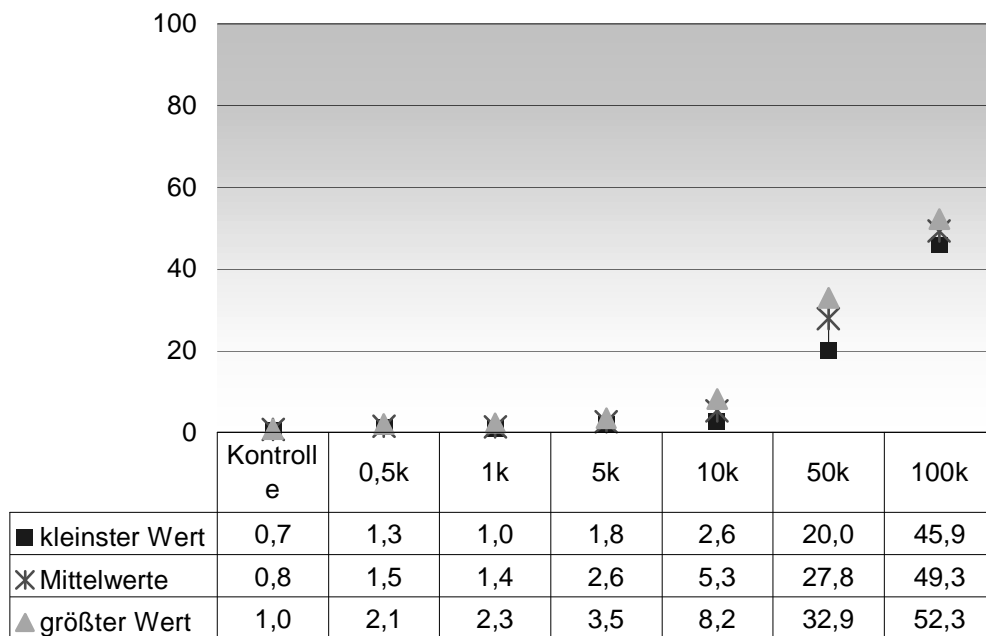


Abbildung 25: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der Fibroblasten-Zelllinie 10T1/2

3.2.1.2.1.2 Fibroblasten NIH-3T3

Ab einer Konzentration von 50.000 genomischen Partikeln rAAV-wt(GFP) pro Zelle wurde bei der Zelllinie NIH-3T3 eine Zunahme der Transfektionsrate gemessen. Diese stieg auf bis zu 42,4% GFP-positiver Zellen bei einer Konzentration von 100.000 genomischen Partikeln pro Zelle.

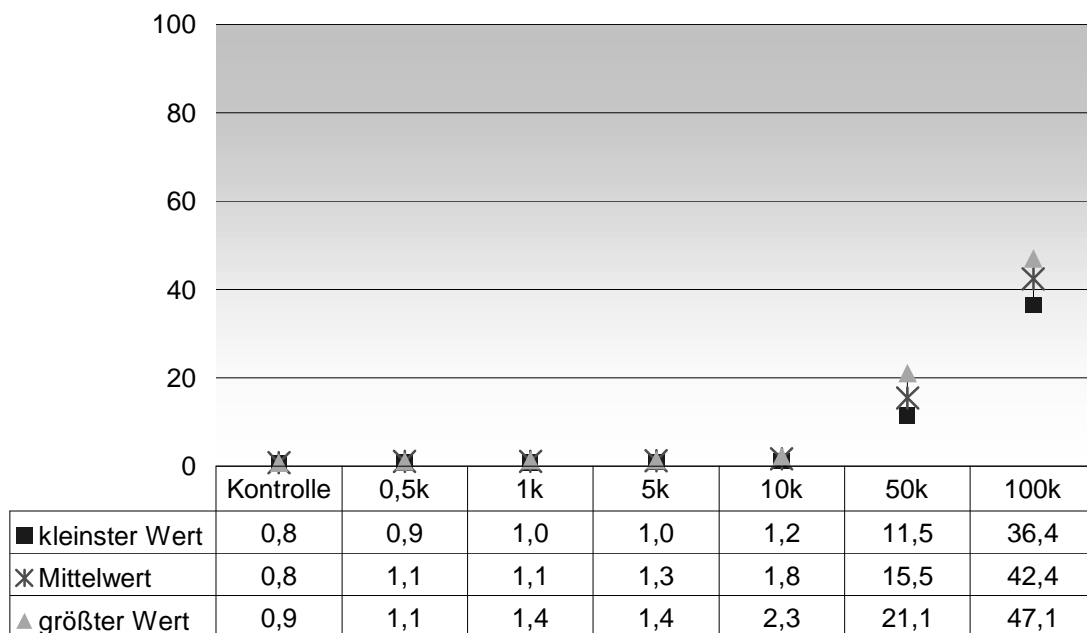


Abbildung 26: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3

3.2.1.2.1.3 Makrophagen IC-21

Die Makrophagen-Zelllinie IC-21 ergab eine maximale Transgen-Expressionsrate von 6%.

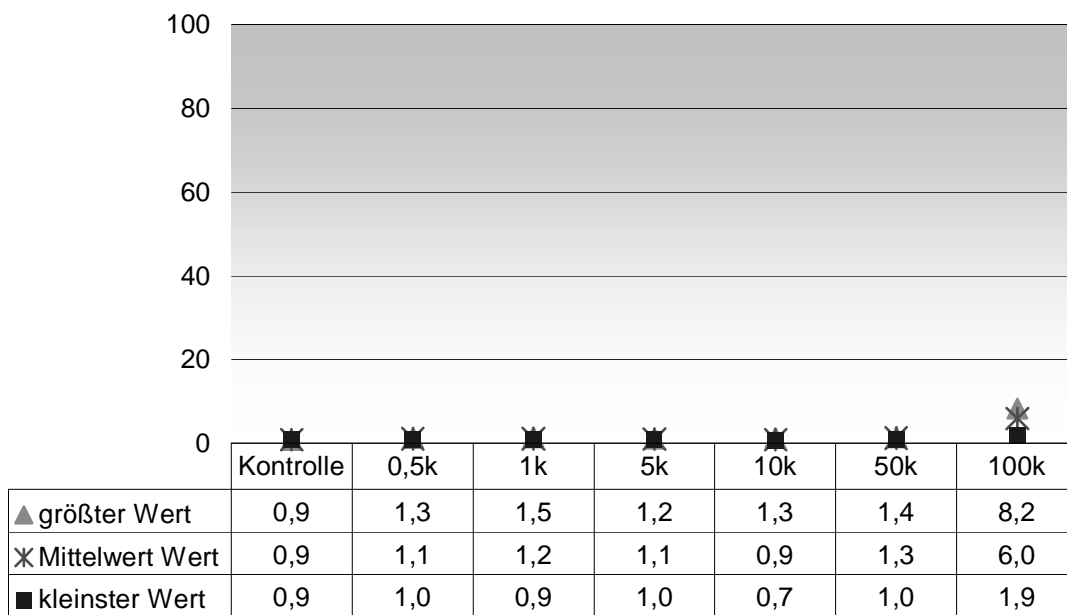


Abbildung 27: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der Makrophagen-Zelllinie IC 21

3.2.1.2.1.4 Hepatozyten H2.35

Die Auswertung zweier Messreihen ergab einen Anteil Transgen-positiver Zellen von 4,7% bei 100.000 genomischen Partikeln.

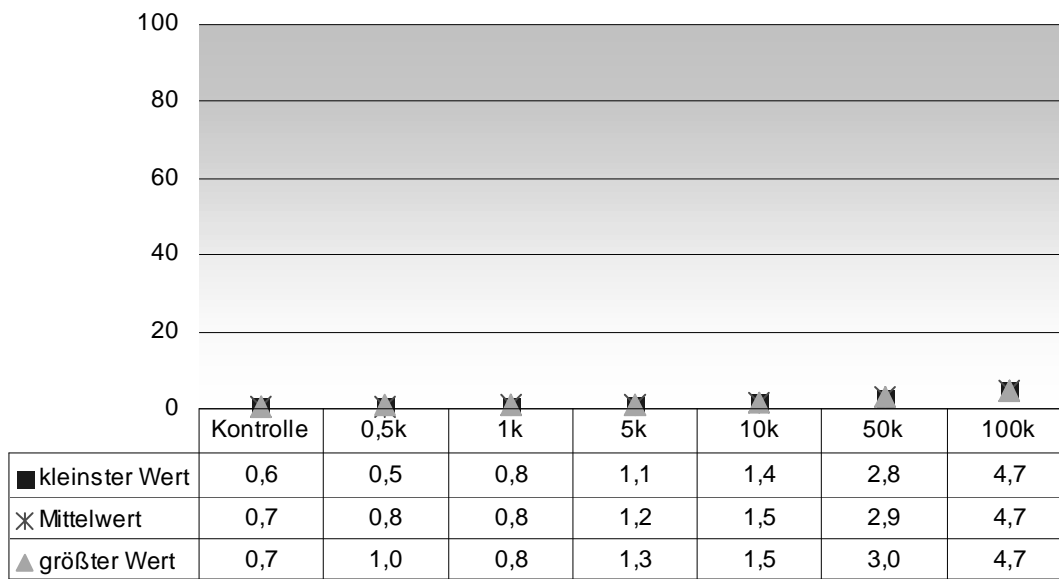


Abbildung 28: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der murinen Hepatozyten-Zelllinie H2.35

3.2.1.2.1.5 Myokardendothel MHEC-5T

Die murine Myokardendothel-Zelllinie MHEC-5T zeigte ab einer Konzentration von 50.000 genomischen Partikeln rAAV-wt(GFP) pro Zelle eine Zunahme der Transfektionsrate. Diese ließ sich auf bis zu 14,4% GFP-produzierender Zellen bei einer Konzentration von 100.000 genomischen Partikeln steigern.

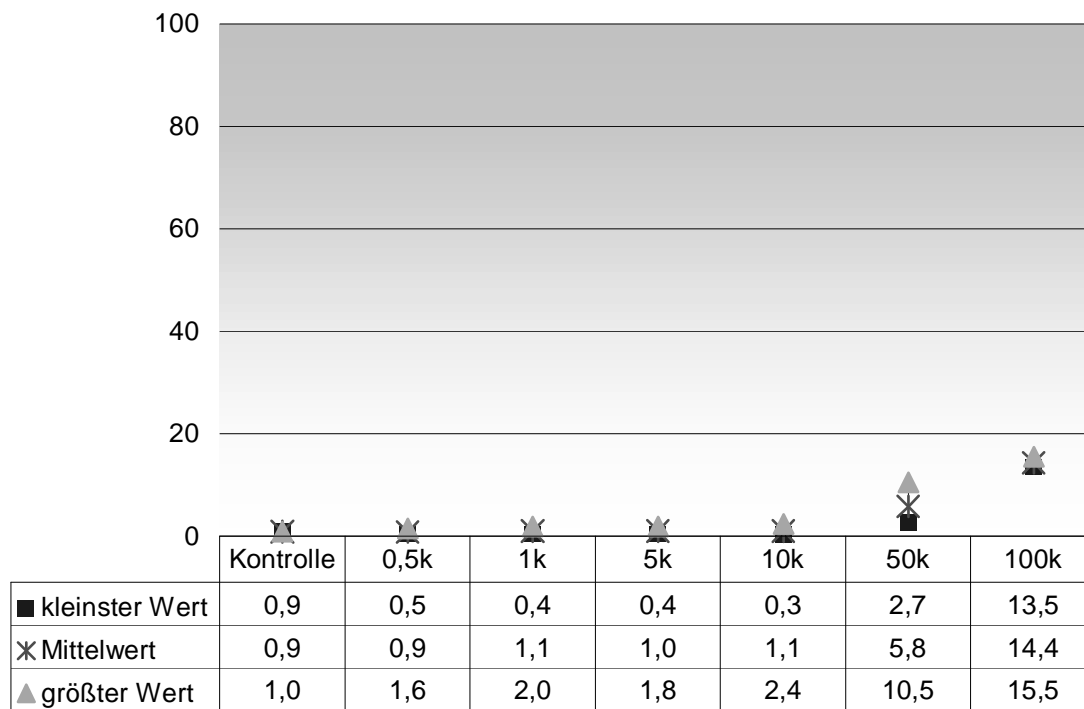


Abbildung 29: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der murinen Myokardendothel-Zelllinie MHEC-5T

3.2.1.2.1.6 Nierenmesangium SV40 MES 13

Die murinen Nierenmesangiumzellen zeigten einen sigmoidalen Kurvenverlauf bei Zunahme der Konzentration an genomischen Partikeln. In dem Bereich der maximalen Zuwachsraten des Anteils der Transgen-positiven Zellen, d.h. bei 5.000 und bei 10.000 genomischen Partikeln pro Zelle, trat eine Divergenz der Werte der einzelnen Testreihen auf. Die maximale Abweichung zueinander betrug 24,4% bei der Konzentration von 5.000 genomischen Partikeln pro Zelle. Nach Abschluss der Steilphase der sigmoidalen Kurve bewegten sich die Werte wieder aufeinander zu, so dass bei einer maximalen Konzentration von 100.000 genomischen Partikeln pro Zelle sich schließlich die Werte asymptotisch einem Anteil von 90% fluoreszierender Zellen annäherten.

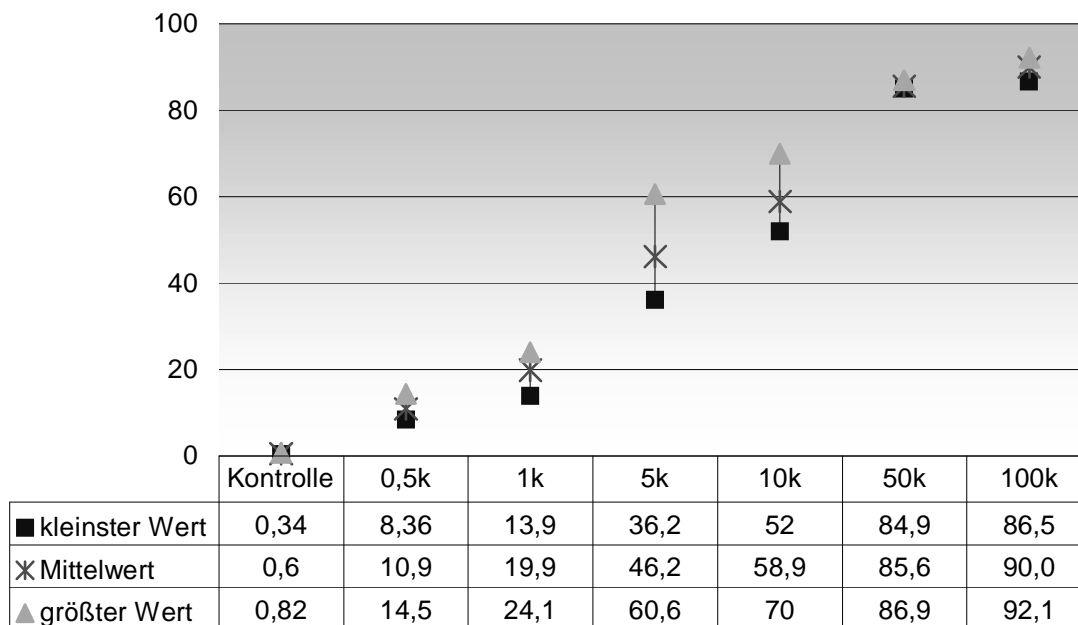


Abbildung 30: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der Nierenmesangium-Zelllinie SV40 MES 13

3.2.1.2.1.7 Spermatogonien GC-1 sg

Die murine Spermatogonien-Zelllinie GC-1sg zeigte einen annähernd sigmoidalen Kurvenverlauf bei Zunahme der Konzentration genomischer Partikel. In dem Bereich der maximalen Zuwachsraten des Anteils der Transgen-positiven Zellen (d.h. bei 5.000 genomischen Partikeln pro Zelle) trat ebenfalls (siehe 3.2.1.3.1.6. Nierenmesangium-Zelllinie) eine Divergenz der Werte der einzelnen Testreihen auf. Es ergab sich eine Abweichung von 27,3%. Nach Abschluss der Steilphase der sigmoidalen Kurve näherten sich die Werte wieder aneinander an, so dass bei der maximalen Konzentration von 100.000 genomischen Partikeln pro Zelle sich der Mittelwert von 77,4% Transgen-positiver Zellen darstellen ließ.

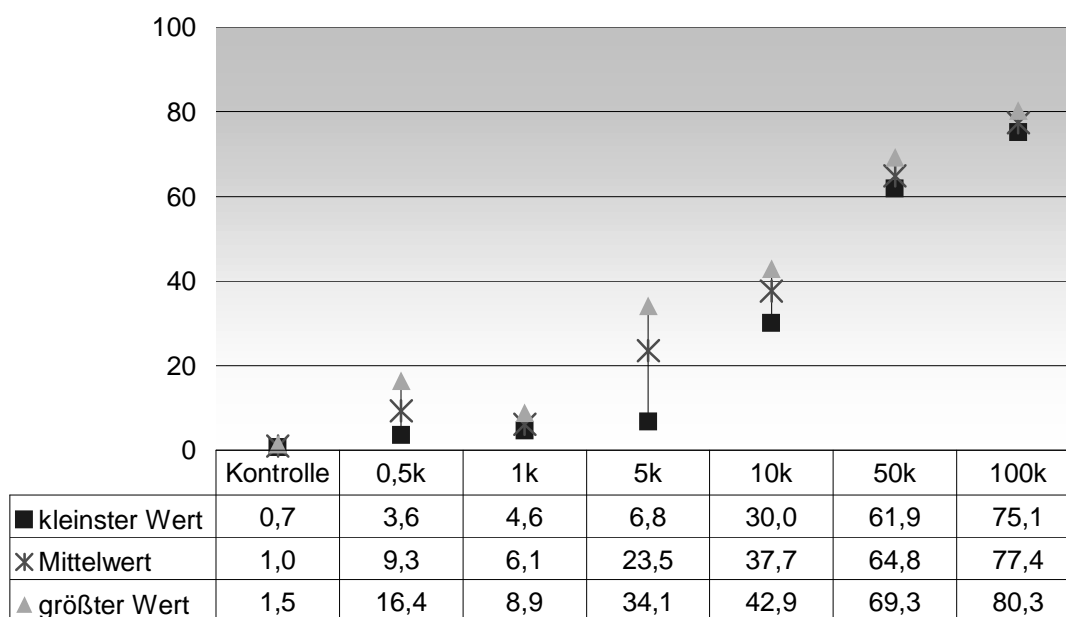


Abbildung 31: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der Spermatogonien-Zelllinie GC-1 sg

3.2.1.2.1.8 SV40-transformierte endotheliale Zelllinie SVEC 4-10

Die endotheliale Zelllinie SVEC 4-10 zeigte einen annähernd sigmoidalen Kurvenverlauf bei zunehmender Konzentration genomischer Partikel. Bei dieser Zelllinie wurden versuchsweise Konzentrationen von bis zu 1.000.000 genomischen Partikeln pro Zelle verwendet, wobei gezeigt wurde, dass sich zumindest bei dieser Zelllinie durch eine weitere Steigerung transduzierender Partikel eine Augmentation des Anteils Transgen-positiver Zellen herbeiführen ließ. Der Vergleichswert bei der Konzentration von 100.000 genomischen Partikeln pro Zelle beträgt 30%.

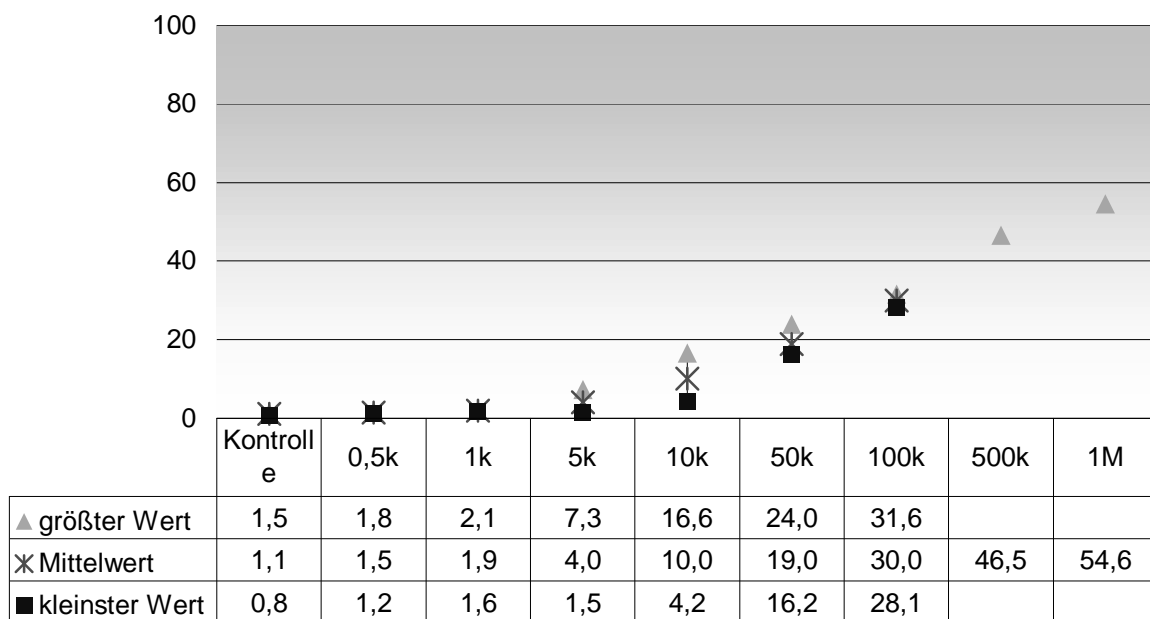


Abbildung 32: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der SV40-transformierten Endothel-Zelllinie (SVEC 4-10)

3.2.1.2.1.9 Dottersackendothel C166

Die Auswertung zweier Messreihen zeigte einen nur geringfügigen Anstieg der Transgen-positiven Zellen auf einen gemittelten Maximalwert von 6,8%.

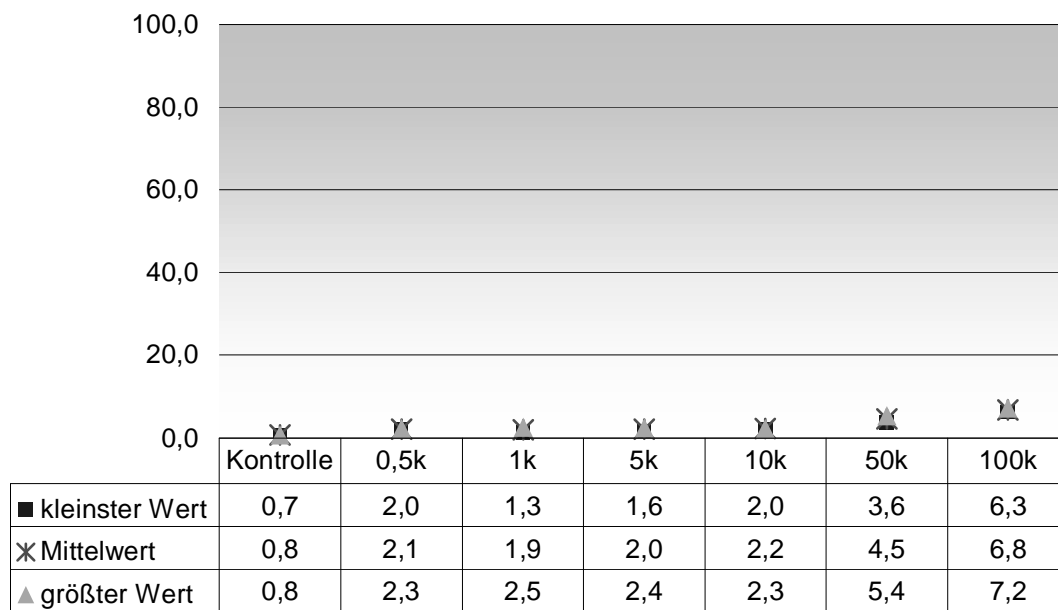


Abbildung 33: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der Dottersackendothel-Zelllinie C166

3.2.1.2.2 Transduktionsreihe mit rAAV-SIG(GFP)

3.2.1.2.2.1 Fibroblasten 10T1/2

Die Fibroblasten der Zelllinie 10T1/2 wiesen ab einer Konzentration von 50.000 genomischen Partikeln rAAV-wt(GFP) pro Zelle eine Zunahme der Transfektionsrate auf. Diese stiegen auf bis zu 23,2% GFP-exprimierender Zellen bei einer Konzentration von 100.000 genomischen Partikeln.

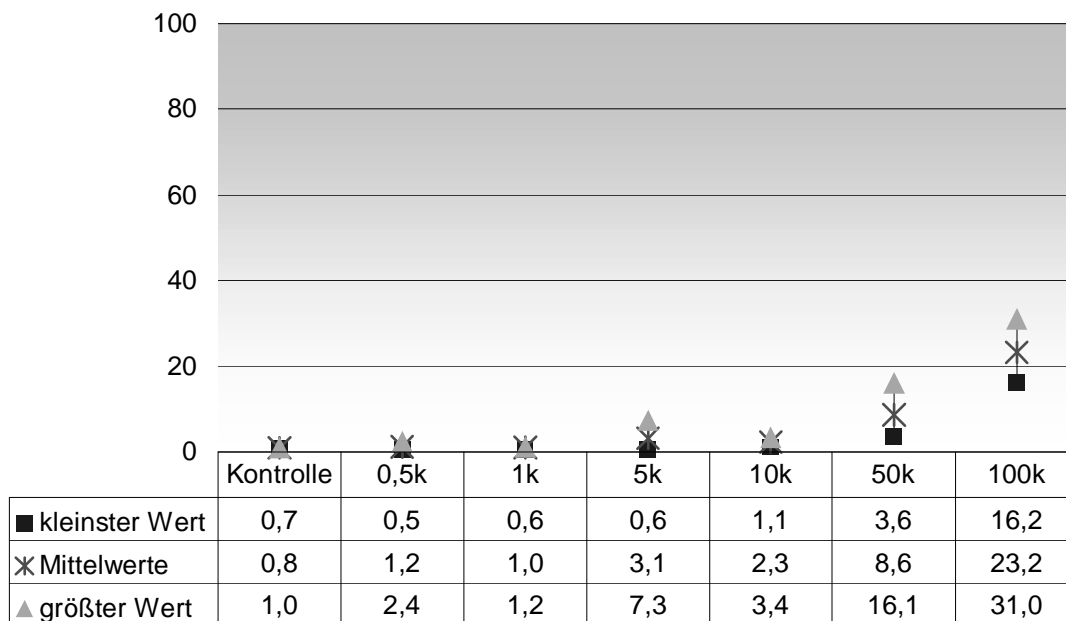


Abbildung 34: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der Fibroblasten-Zelllinie 10T1/2

3.2.1.2.2.2 Fibroblasten NIH-3T3

Die Zelllinie NIH-3T3 ergab bei einer Konzentration von 100.000 genomischen Partikeln rAAV-SIG(GFP) pro Zelle eine Zunahme der Transfektionsrate auf 17,1%.

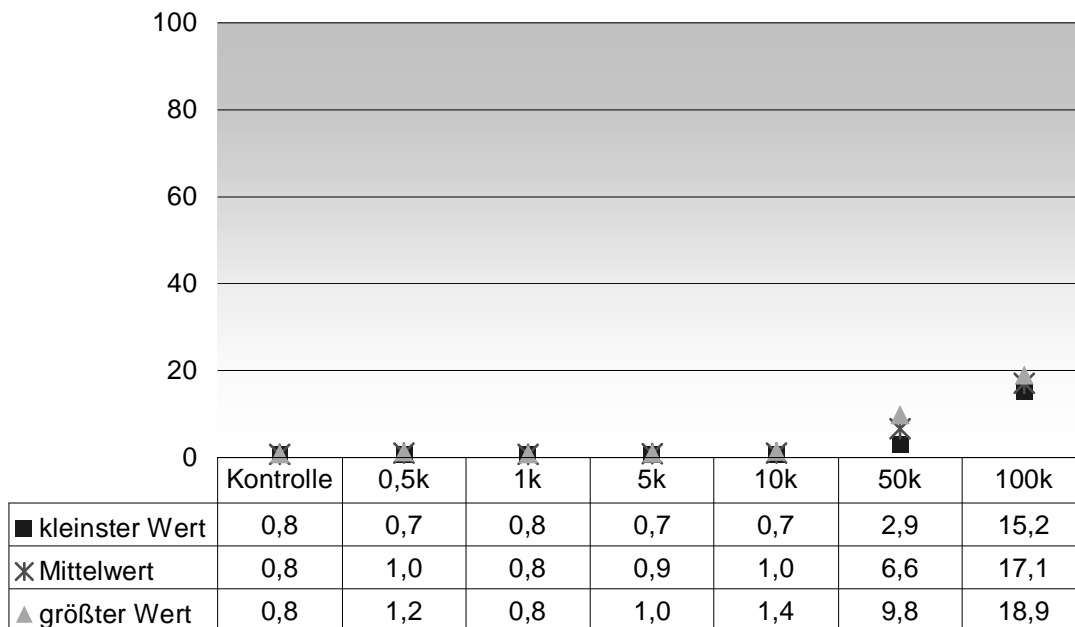


Abbildung 35: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion von der Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3

3.2.1.2.2.3 Makrophagen IC-21

Die murine Makrophagen-Zelllinie IC-21 ergab eine maximale Transgen-Expressionsrate von 5,3%.

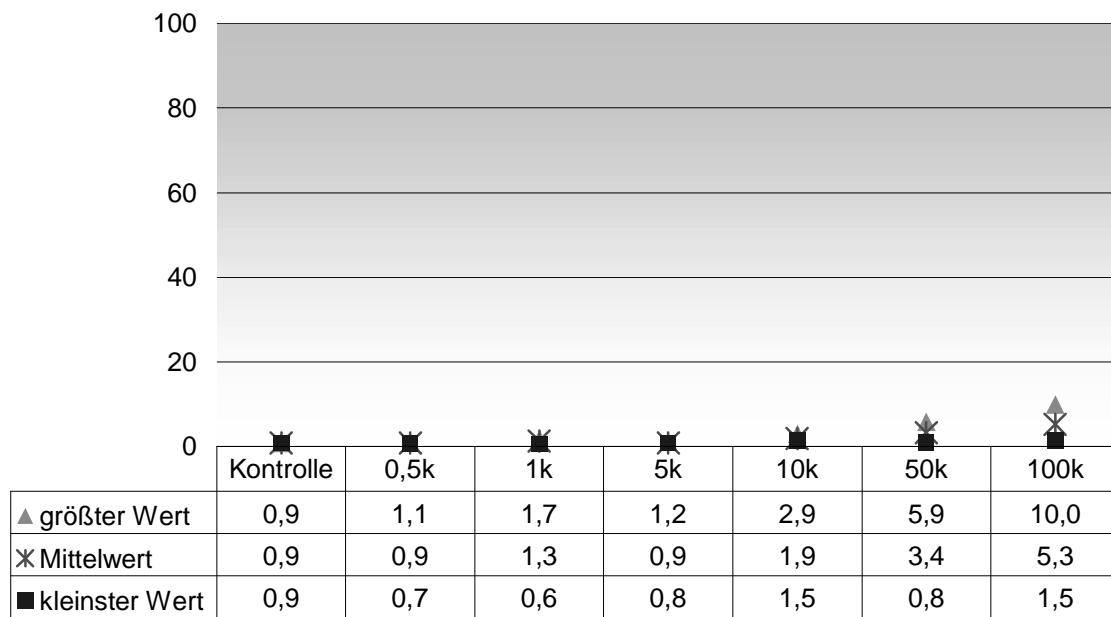


Abbildung 36: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der Makrophagen-Zelllinie IC-21

3.2.1.2.2.4 Hepatozyten H2.35

Die Zellen der Maushepatozyten-Zelllinie H2.35 ergaben eine maximale Transgen-Expressionsrate von 5,4%.

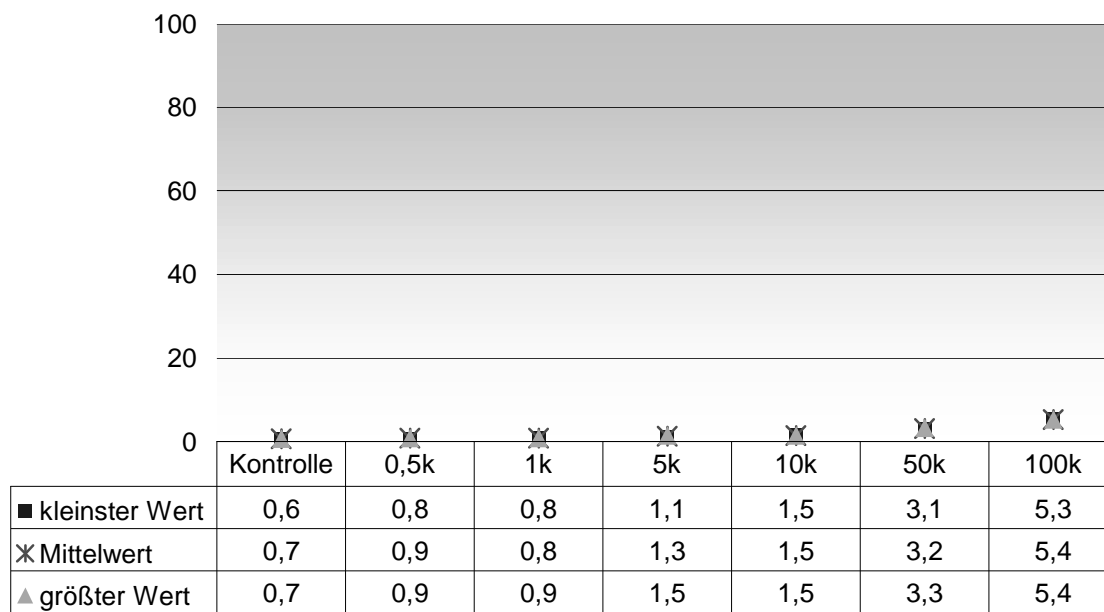


Abbildung 37: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der murinen Hepatozyten-Zelllinie H2.35

3.2.1.2.2.5 Myokardendothel MHEC-5T

Die murine Myokardendothel-Zelllinie MHEC-5T ergab eine maximale Transgen-Expressionsrate von 8,9% bei einer Anzahl von 100.000 genomischen Partikeln pro Zelle.

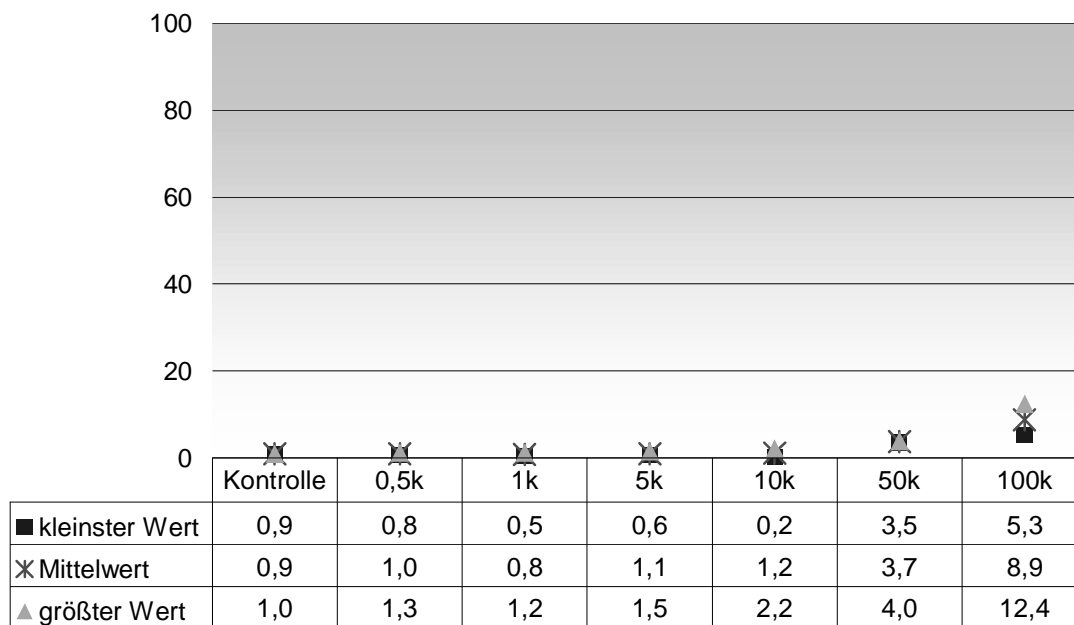


Abbildung 38: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der Myokardendothel-Zelllinie MHEC-5T

3.2.1.2.2.6 Nierenmesangium SV40 MES13

Die Nierenmesangiumzelllinie SV40 MES13 zeigte bereits ab einer Konzentration von 5.000 genomischen Partikeln rAAV-SIG(GFP) eine kontinuierliche Zunahme der GFP-Expressionsrate bis zu einem Maximalwert von 67,1% bei der Maximalkonzentration von 100.000 genomischen Partikeln pro Zelle.

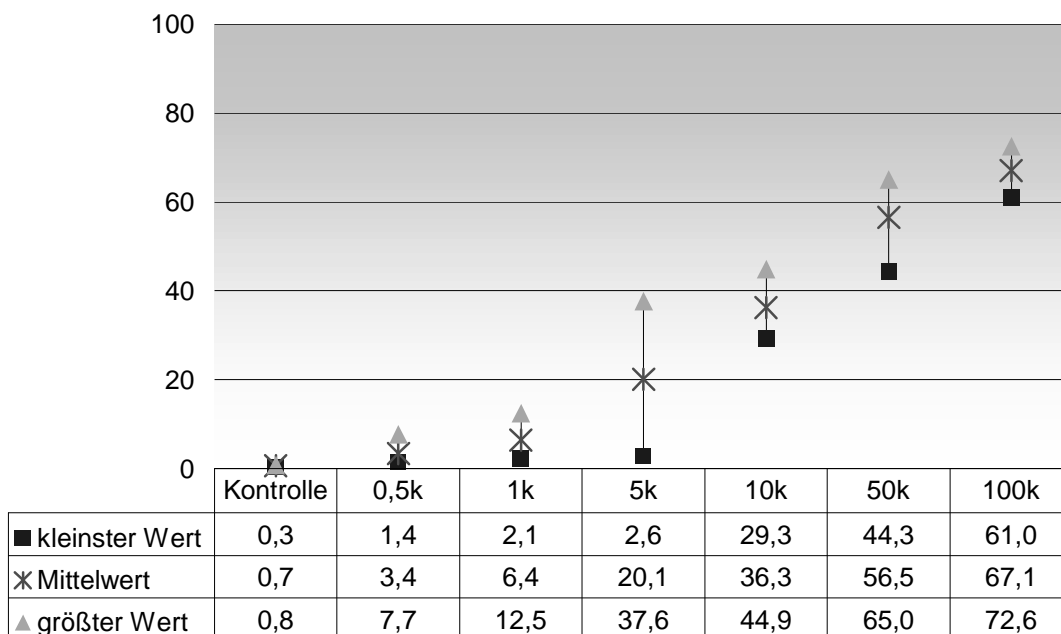


Abbildung 39: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der Nierenmesangium-Zelllinie SV40 MES13

3.2.1.2.2.7 Spermatogonien GC-1sg

Die Spermatogonienzelllinie GC-1sg wies bereits ab einer Konzentration von 5.000 genomischen Partikeln rAAV-SIG(GFP) eine kontinuierliche Zunahme der Transgen-Expressionsrate bis zu einem Maximalwert von 86,3% bei der Test-Maximalkonzentration von 100.000 genomischen Partikeln pro Zelle auf.

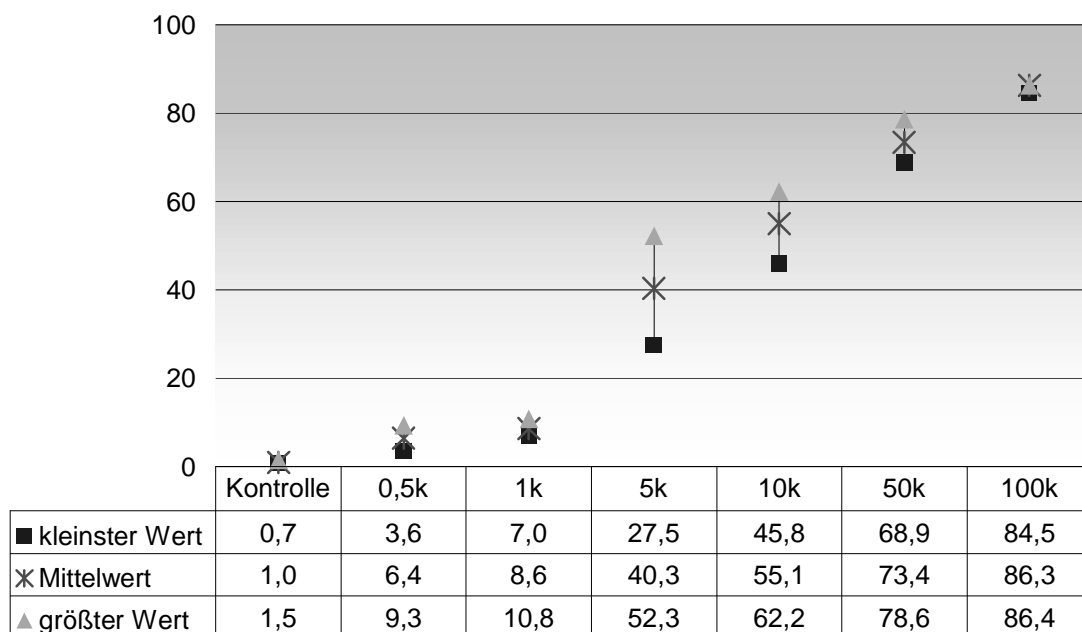


Abbildung 40: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der Spermatogonien-Zelllinie GC-1 sg

3.2.1.2.2.8 SV40-transformierte Endothel-Zelllinie SVEC 4-10

Die Auswertung der SV40-transformierte Endothel-Zelllinie ergab einen annähernd sigmoidalen Kurvenverlauf bei Zunahme der Konzentration an genomischen Partikeln. Bei dieser Zelllinie wurden versuchsweise Konzentrationen von bis zu 1.000.000 genomischen Partikeln pro Zelle verwendet, wobei gezeigt wurde, dass sich zumindest bei dieser Zelllinie durch eine weitere Steigerung der Anzahl transduzierender Partikel eine Augmentation des Anteils GFP-positiven Zellen herbeiführen ließ. Der Vergleichswert bei der Konzentration von 100.000 genomischen Partikeln pro Zelle beträgt 27,1%.

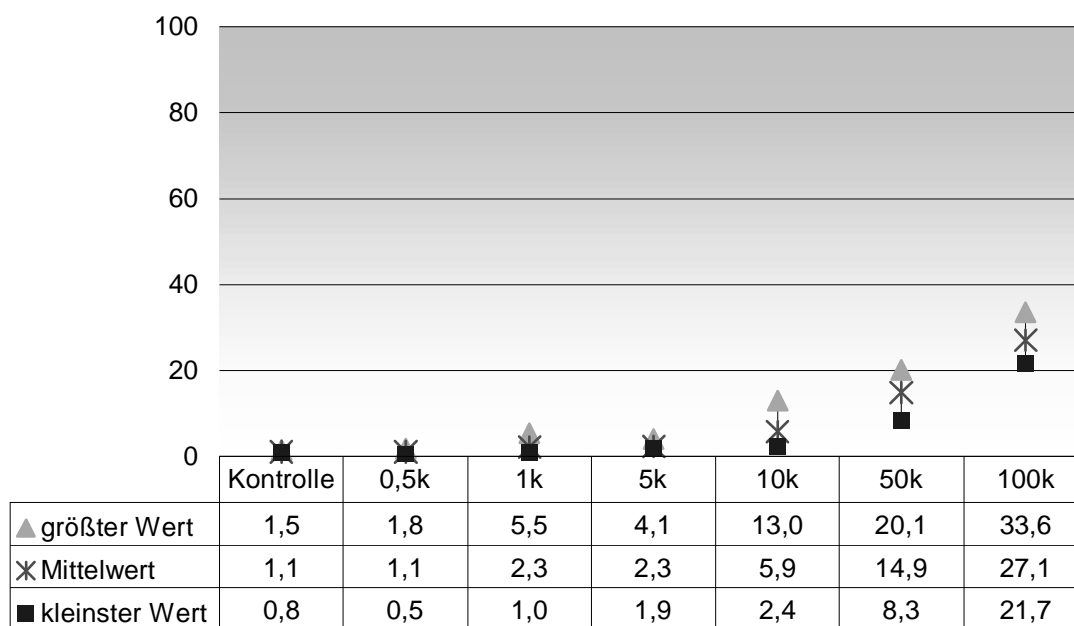


Abbildung 41: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der SV40-transformierten Endothel-Zelllinie SVEC4-10

3.2.1.2.2.9 Dottersackendothel C166

Die Dottersackendothel-Zellen C166 zeigten ab einer Konzentration von 50.000 genomischen Partikeln rAAV-SIG(GFP) pro Zelle eine Zunahme der Transfektionsrate. Diese stieg auf bis zu 42% GFP-produzierender Zellen bei einer Konzentration von 100.000 genomischen Partikeln.

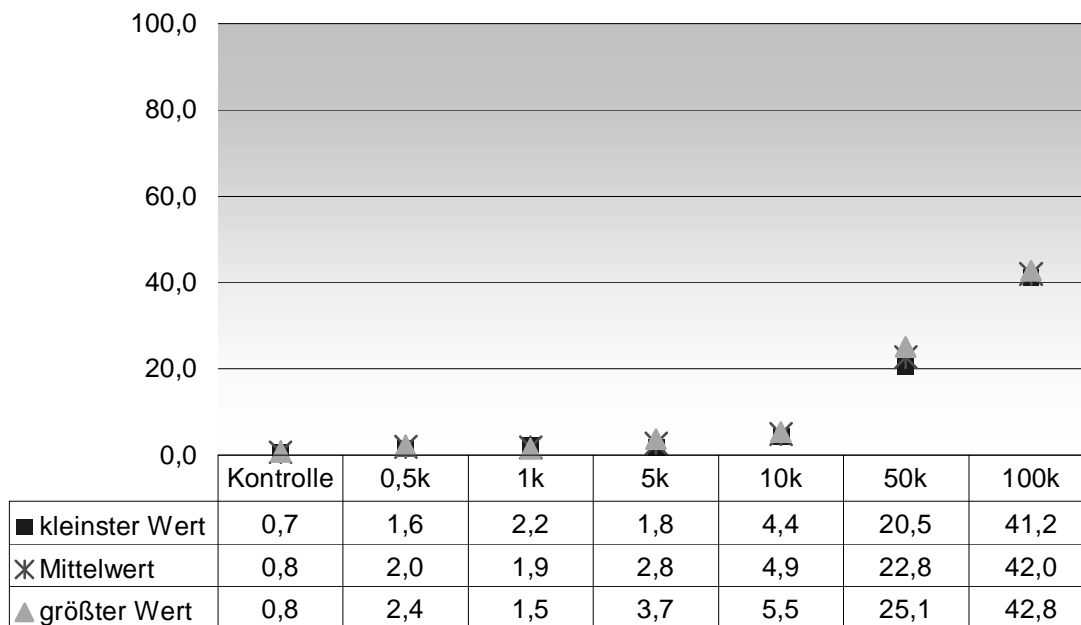


Abbildung 42: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der Dottersackendothel-Zelllinie C166

3.2.1.2.3 Direkter Vergleich von rAAV-wt(GFP) und rAAV-SIG(GFP)

Beim direkten Vergleich der beiden viralen Vektoren rAAV-wt(GFP) und rAAV-SIG(GFP) wurde deutlich, dass bei dem Targetingvektor rAAV-SIG(GFP) eine deutliche Verminderung der Transgen-Expressionsrate vor allem bei humanen Leberzellen, murinen Fibroblasten und murinen Nierenmesangiumzellen erreicht wurde. Demgegenüber stand eine 6,21-fach erhöhter Anteil Transgen-positiver Zellen bei der murinen Dottersackendothel-Zelllinie und eine Erhöhung bei den Spermato gonien. Die Makrophagen-Zelllinie IC-21, murine Myokardendothel-Zelllinie MHEC-5T, SV40 transformierte murine Endothel-Zelllinie SVEC 4-10 und Maushepatozyten-Zelllinie H2.35 zeigten nur geringfügige Unterschiede in der Transduktionseffizienz der beiden Vektoren.

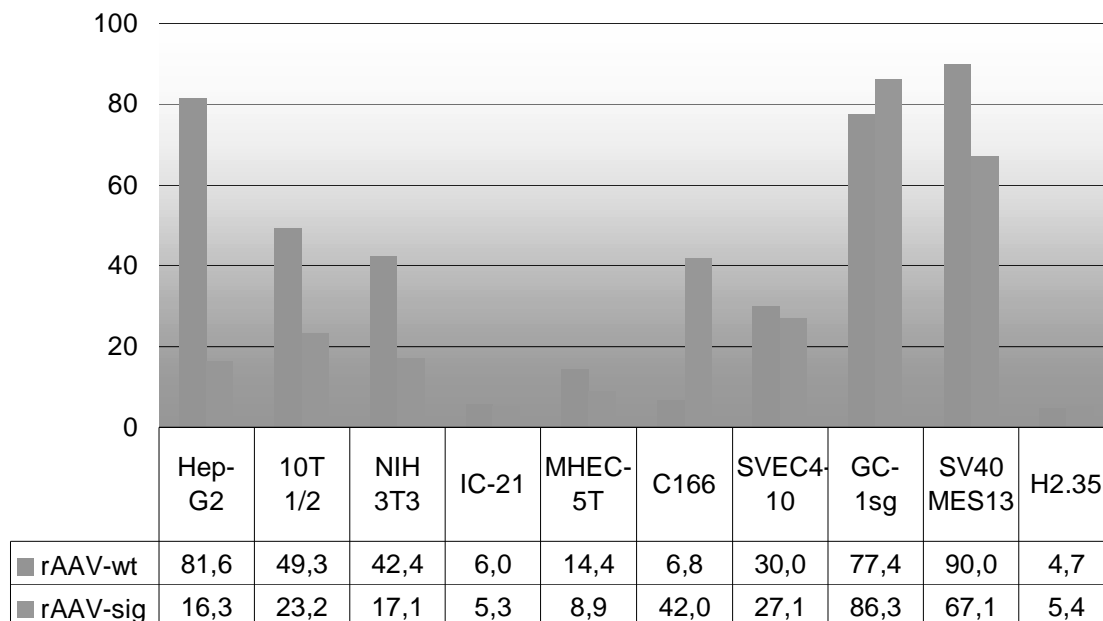


Abbildung 43: Direkter Vergleich rAAV-wt(GFP) vs. rAAV-SIG(GFP) bei 100.000 genomischen Partikeln pro Zelle. Hierzu verwendete Zelllinien sind: Hep-G2 (humane hepatozelluläre Karzinomzellen), 10T1/2 (humane Fibroblasten), NIH 3T3 (humane Fibroblasten), IC-21 (humane Makrophagen), MHEC-5T (murine Endothelzellen des Myokards), C166 (murines Dottersackendothel), SVEC4-10 (SV40-transformiertes murines Endothel), GC-1sg (murine Spermato gonien), SV40 MES13 (murines Nierenmesangium) und H2.35 (murine Hepatozyten)

3.2.1.2.4 Heparin als Kompetitor des Heparansulfat-Proteoglykans

Um das erfolgreiche Detargeting der Vektoren vom natürlichen Primärrezeptor darzustellen, wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Interaktion mit dem Primärrezeptor HSPG durch Zugabe von Heparin geblockt. Eine unveränderte Transfektionsrate würde eine Transduktionsfähigkeit unabhängig vom Primärrezeptor bedeuten.

Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, fiel bei rAAV-wt(GFP) nach Zugabe des Heparins die Transduktionsrate nahezu auf die Werte der Negativkontrolle ab. Dies bestätigte die bisherigen Forschungsergebnisse, dass HSPG den Primärrezeptor des rAAV-wt(GFP) darstellt. Bei rAAV-SIG(GFP) hingegen verminderte die Zugabe von Heparin die Transduktionseffizienz nur unerheblich. Teilweise wurde die Transduktion dadurch sogar verstärkt. Das bedeutet, daß rAAV-SIG(GFP) tatsächlich HSPG nicht mehr als Primärrezeptor nutzte.

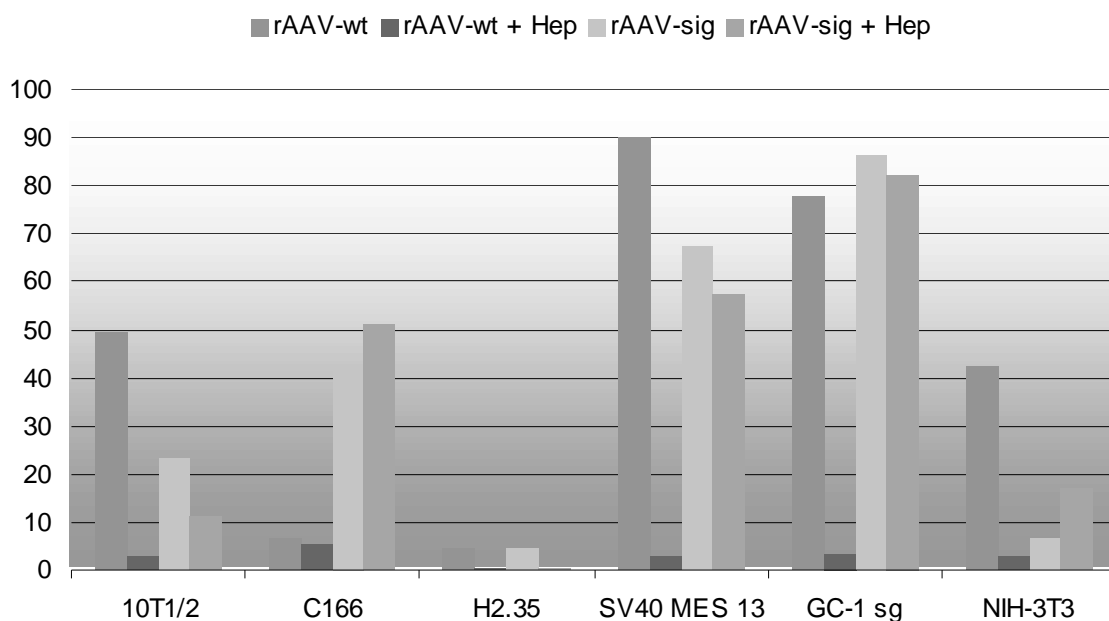


Abbildung 44: Heparin-Inhibitionsversuch: Fibroblasten 10T1/2, Dottersackendothel-Zellen C166, Hepatozyten H2.35, Nierenmesangiumzellen SV40 MES 13, Spermatozoen GC-1 sg und Fibroblasten NIH-3T3 wurden mit jeweils 100.000 genomischen Partikeln rAAV-wt(GFP) bzw. rAAV-SIG(GFP) transduziert. Gegenübergestellt sind die Ergebnisse ohne und mit Heparin.

3.2.1.3 Bestimmung der Transduktionseffizienz der neuen Mutanten rAAV-A3(GFP) und rAAV-1B(GFP)

Bei den *in vivo*-Versuchen sollten nicht nur rAAV-wt(GFP) und rAAV-SIG(GFP), sondern auch die entsprechende Weiterentwicklung rAAV-1B(GFP) eingesetzt werden. Bei dieser Mutante wurden zum inserierten SIG-Peptid zusätzlich die potentiellen HSPG-Bindungsstellen mutiert.

Als Kontrolle für rAAV-SIG(GFP) verwendeten wir rAAV-pRC99(GFP), eine Mutante, bei der an der Insertionsstelle I-587 statt der für das SIGYPLP-Protein kodierenden Gensequenz (zur Klonierung von pRC-SIG, dem Helferplasmid für die Herstellung von rAAV-SIG) als ein afunktionaler „Platzhalter“ die Sequenz ASGGSA inseriert war. In Heparinaffinitäts-Untersuchungen zeigte sich, dass rAAV-pRC99(GFP) eine schwächere Bindungsfähigkeit für HSPG besitzt als rAAV-wt(GFP).

Als Kontrolle für rAAV-1B(GFP) diente rAAV-A3(GFP), bei dem ausschließlich die HSPG-Bindungsstellen mutiert wurden.

Vektor	Sequenz	Literatur
rAAV-wt	NLQRG N ₅₈₇ RQAA	Girod <i>et al.</i> , 1999
rAAV-pRC99	NLQRGN ₅₈₇ ASGG SARQAA	Nicklin <i>et al.</i> , 2001
rAAV-SIG	NLQRGN ₅₈₇ ASIGYPLPARQAA	Nicklin <i>et al.</i> , 2001
rAAV-A3	NLQAGAAQAA	Wu <i>et al.</i> , 2000
rAAV-1B	NLQAGAASIGYLPAAQAA	unpublished data

Abbildung 45: Übersicht über die verwendeten Vektoren

Für jeden Vektor wurde dieselbe Anzahl genomischer Partikel pro Zelle (50.000) für die Transduktionsexperimente verwendet. Darüber hinaus wurde zusätzlich der Heparin-Inhibitionstest durchgeführt.

3.2.1.3.1 Spermatozoen GC-1 sg

Bei den Spermatozoen zeigte sich, dass die höchste Transgenexpressionsrate durch rAAV-wt(GFP) erreicht wurde. Bei rAAV-pRC99(GFP) und rAAV-SIG(GFP) ging der Wert bereits erheblich zurück, während rAAV-A3(GFP) und rAAV-1B(GFP) nur unwesentlich oberhalb der Negativkontrolle lagen.

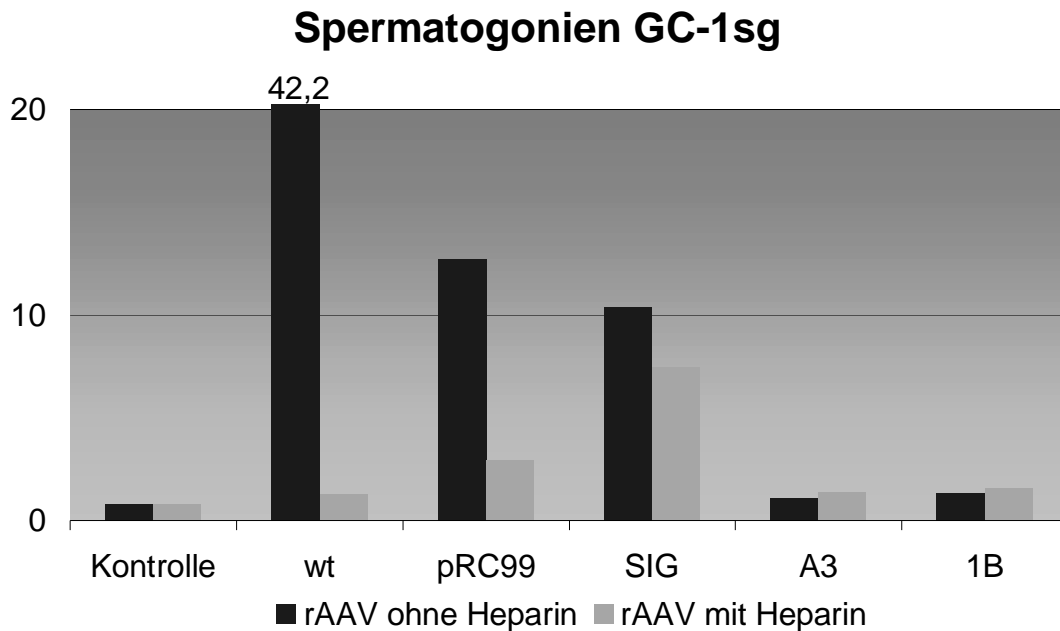


Abbildung 46: Vergleich aller Mutanten nach Transduktion der Spermatozoen-Zelllinie GC-1 sg. Darstellung in % des Anteils der erfolgreich transduzierten Zellen nach einer Transduktion mit jeweils 50.000 genomischen Partikeln pro Zelle. Als Kontrolle dienen nicht-transduzierte Spermatozoen.

3.2.1.3.2 Dottersackendothel C166

Bei dem Dottersackendothel zeigte sich eine leichte Dominanz des rAAV-SIG(GFP) und des rAAV-B1(GFP). Die Werte der übrigen Mutanten lagen nur unwesentlich über dem der Negativkontrolle.

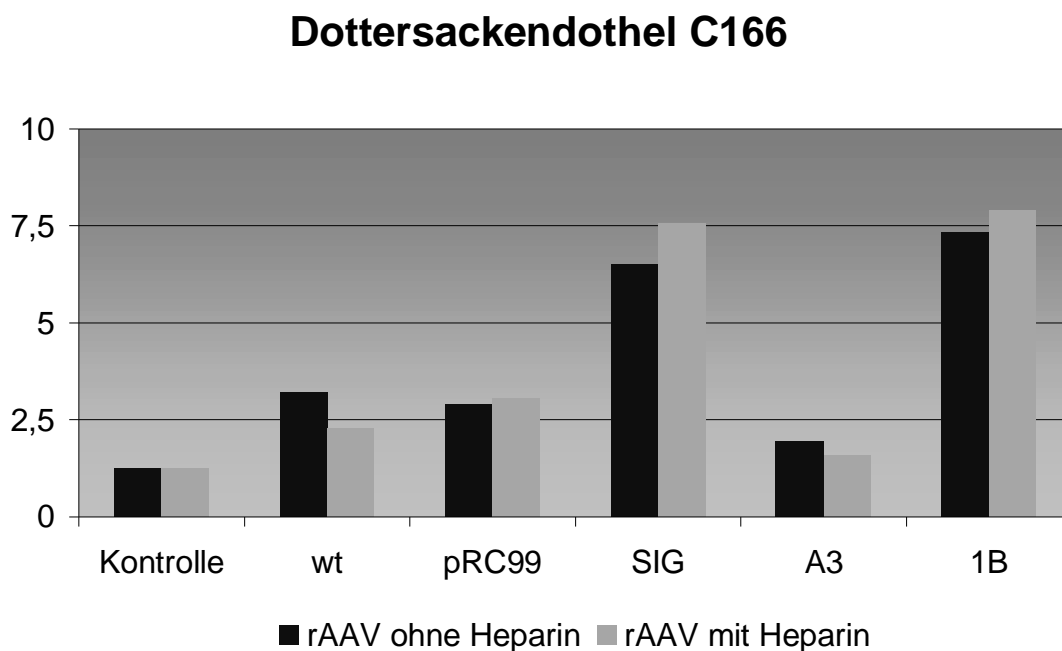


Abbildung 47: Vergleich aller Mutanten nach Transduktion der Dottersackendothel-Zelllinie C166. Darstellung der erfolgreich transduzierten Zellen nach einer Transduktion mit jeweils 50.000 genomischen Partikeln pro Zelle in %. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte Dottersackendothel-Zellen.

3.2.2 *In vivo*-Infektion von Mäusen mit rAAV-Vektoren

Im Anschluss an die *in vitro*-Versuche wurde die Bioverteilung der verschiedenen Vektoren in Balb/c-Mäusen getestet. Hierzu wurden den Mäusen $1,5 \times 10^8$ genomische Partikel des jeweiligen Vektors in die Schwanzvene injiziert. Nach einer Stunde wurden die Mäuse durch CO₂-Intoxikation getötet und folgende Organe entnommen: Muskel (Musculus quadriceps), Lunge, Herz, Gehirn, Milz, Leber, Niere und Ovar. Diese wurden unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff gefroren. Die DNS wurde eluiert und mit Hilfe der PCR-Technologie auf Transgen-DNS untersucht.

Mit den Ovarien der Mäuse konnte auf Grund des geringen Gewichts des Organs jeweils nur eine Analyse durchgeführt werden. (siehe 2.2.8.3 Detektion der Anzahl zellinterner GFP-Sequenzen mittels PCR)

Die jeweiligen Messläufe wurden zusammengefasst und der Mittelwert aus ihnen gebildet. Mit Hilfe des aus den Standardwerten ermittelten Amplifikationskoeffizienten von 1,917 konnte ein Vergleichswert für die Anzahl genomischer Partikel errechnet werden.

3.2.2.1 Eingesetzte Vektoren

Es wurde die Bioverteilung folgender rAAV2-Vektoren im Maus-Modell untersucht:

Vektor	Anzahl genomischer Partikel	Anzahl transduzierender Partikel
rAAV-wt	$6,6 \times 10^6/\mu\text{l}$	$4 \times 10^6/\mu\text{l}$
rAAV-pRC99	$4,6 \times 10^6/\mu\text{l}$	$2,7 \times 10^6/\mu\text{l}$
rAAV-SIG	$1,1 \times 10^6/\mu\text{l}$	$2,9 \times 10^5/\mu\text{l}$
rAAV-A3	$8,4 \times 10^6/\mu\text{l}$	Nicht transduzierend auf HeLa
rAAV-1B	$1,8 \times 10^5/\mu\text{l}$	Nicht transduzierend auf HeLa

Abbildung 48: Übersicht über die im Mausmodell verwendeten Vektoren mit Angabe der Anzahl genomischer und transduzierender Partikel pro μl Lösung.

Die Menge der DNS-enhaltenden Partikeln wurde durch DotBlot bestimmt und mittels PCR überprüft. Die Menge der zur Transduktion befähigten Partikeln wurde auf HeLa-Zellen bestimmt.

Hinzu kam als Negativkontrolle rAAV-eon.

3.2.2.2 Transduktion mit rAAV-wt(GFP)

Bei rAAV-wt(GFP) zeigte sich eine bevorzugte Präsenz des Vektors im Milz (22,1 Zyklen)- und Lebergewebe (23,9 Zyklen). In der Niere, der Lunge und dem Herz ließ sich im Vergleich dazu nur etwa 1/32 detektieren (zwischen 28 bis 29 Zyklen). Ovar und Muskel lagen an dritter Stelle (31,3 und 31,7 Zyklen). Im Gehirn wurde die geringste Anzahl von Transgen-DNS pro 200ng muriner DNS nachgewiesen (33,8 Zyklen). Insgesamt wurden in den Proben mit je 200 ng DNS-Extrakt 139.893 GFP-Gensequenzen aufgefunden.

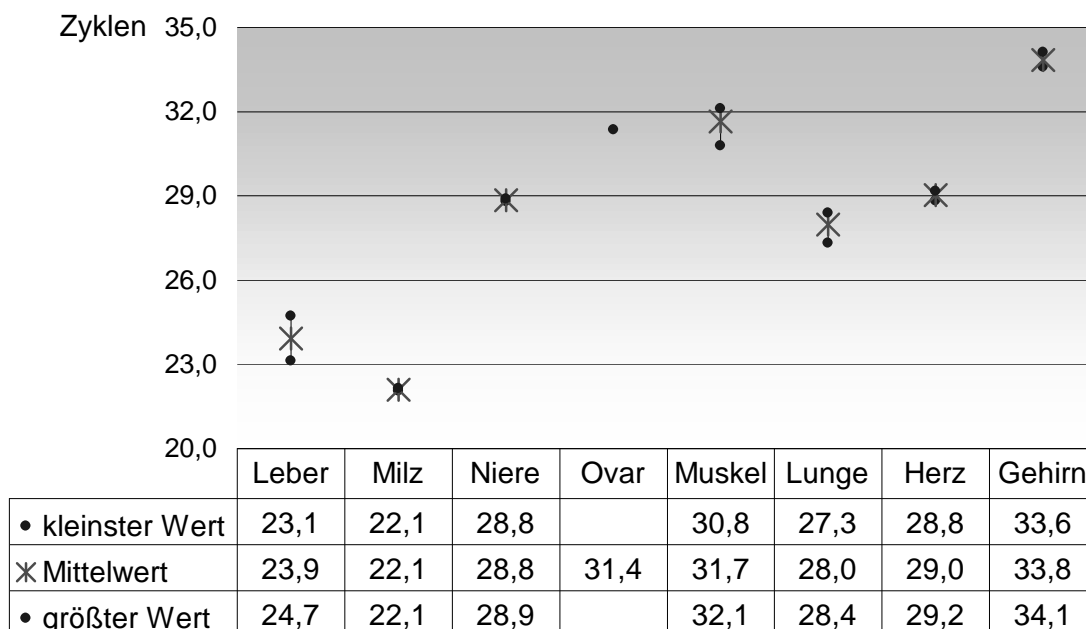


Abbildung 49: Transduktion mit rAAV-wt(GFP). Darstellung der Zyklen bis Überschreitung der Fluoreszenzgrenze.

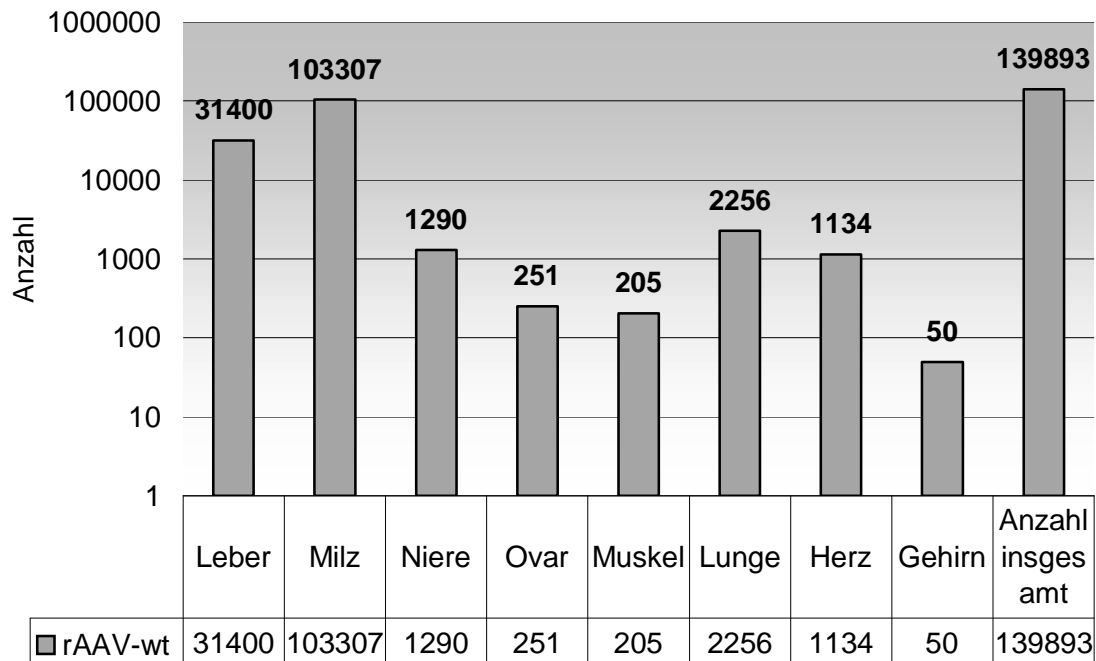


Abbildung 50: Anzahl genomischer Partikel nach Transduktion mit rAAV-wt(GFP) in je 200ng DNS-Extrakt aus dem angegebenen Organ.

3.2.2.3 Transduktion mit rAAV-pRC99(GFP)

Der rAAV-pRC99(GFP) zeigte eine „Vorliebe“ für die Organe Lunge und Leber, in welchen er besonders stark vertreten war. In absteigender Reihenfolge stellten sich Herz, Niere, Ovar, Milz und Gehirn dar. Die geringste Menge an viralen Partikeln fand sich im Muskelgewebe. Insgesamt konnten in den untersuchten Proben mit je 200 ng DNS-Extrakt 110.943 GFP-Gensequenzen detektiert werden.

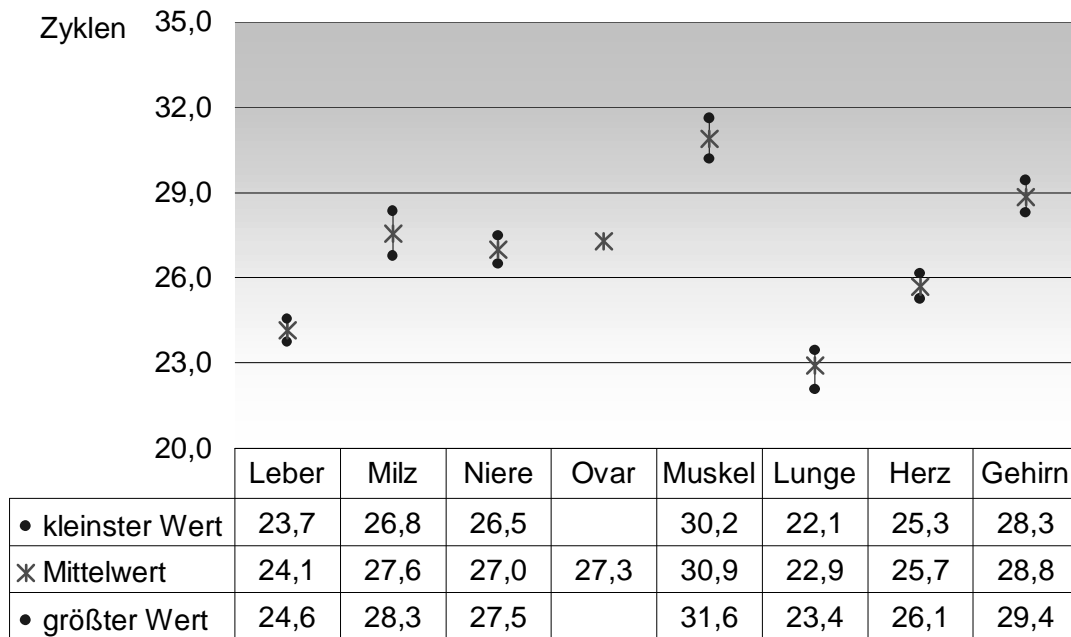


Abbildung 51: Transduktion mit rAAV-pRC99(GFP). Darstellung der Zyklen bis Überschreitung der Fluoreszenzgrenze.

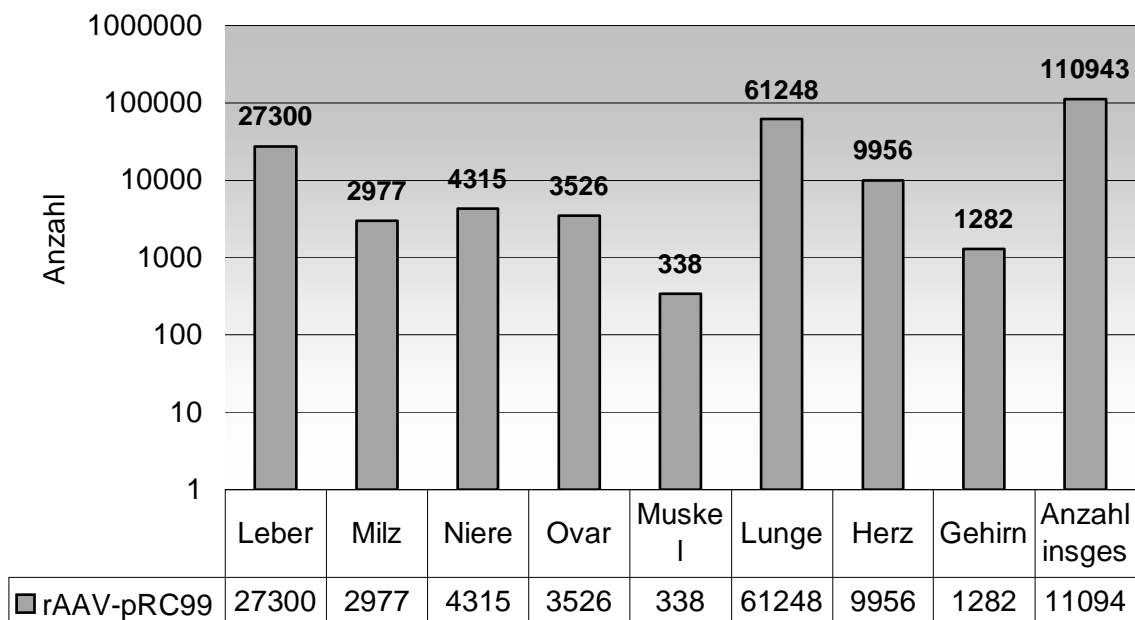


Abbildung 52: Anzahl genomischer Partikel nach Transduktion mit rAAV-pRC99(GFP) in je 200ng DNS-Extrakt aus dem angegebenen Organ.

3.2.2.4 Transduktion mit rAAV-SIG(GFP)

Bei rAAV-SIG(GFP) fand sich die meiste Transgen-DNS in Lunge (24,4 Zyklen), Herz (25 Zyklen) und Leber (25,3 Zyklen). An zweiter Stelle standen Milz, Gehirn, Niere und Ovar (zwischen 27,3 und 29,8 Zyklen). Die Muskelprobe enthielt die geringste Menge Transgen-DNS (32,6 Zyklen). Insgesamt wurden in den untersuchten Proben mit je 200 ng DNS-Extrakt 58.166 GFP-Gensequenzen aufgefunden.

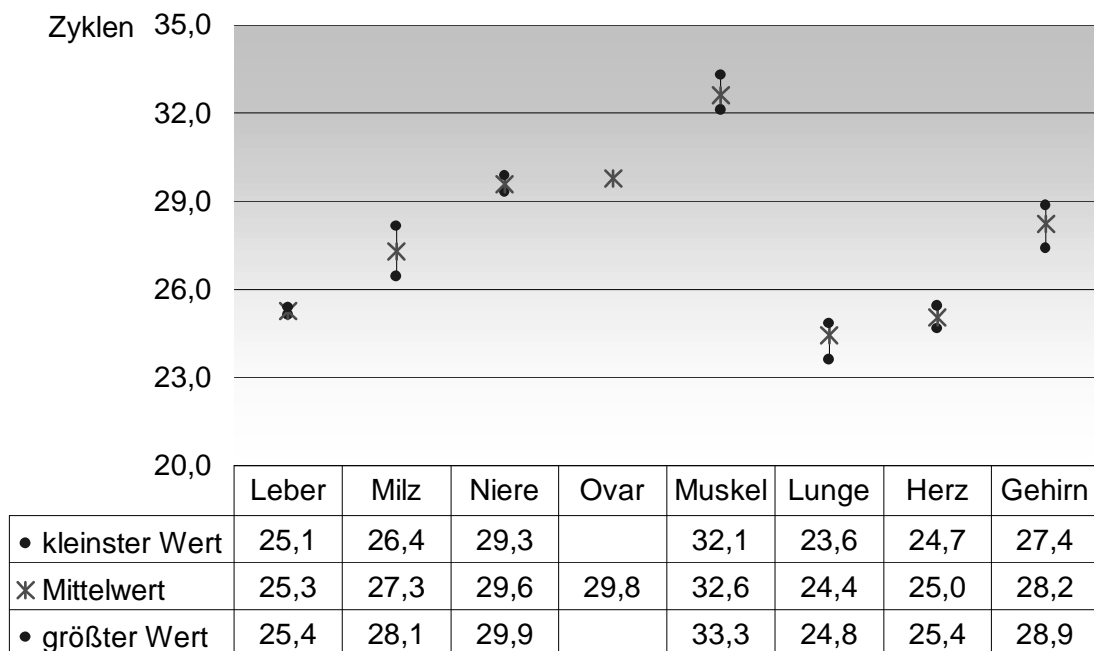


Abbildung 53: Transduktion mit rAAV-SIG(GFP). Darstellung der Zyklen bis Überschreitung der Fluoreszenzgrenze.

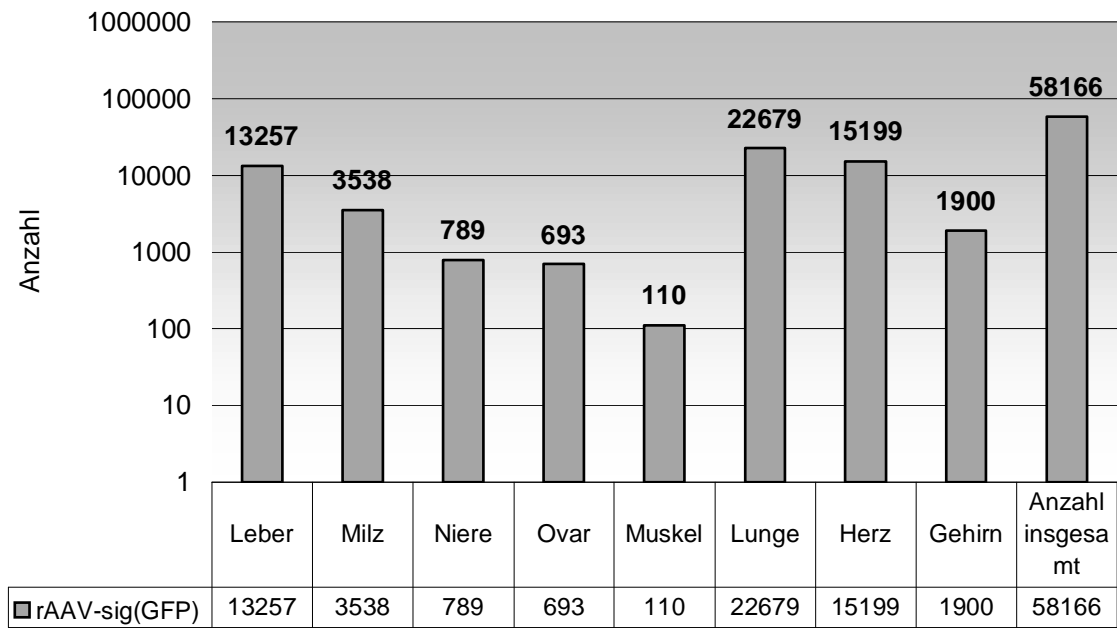


Abbildung 54: Anzahl genomischer Partikel nach Transduktion mit rAAV-SIG(GFP) in je 200ng DNS-Extrakt aus dem angegebenen Organ.

3.2.2.5 Transduktion mit rAAV-A3(GFP)

Bei rAAV-A3(GFP) lagen die Werte relativ dicht nebeneinander. So enthielt das Lungengewebe (24,1 Zyklen) nur ca. doppelt so viel Transgen-DNS wie Herz und Niere (je 25,4 Zyklen). Darauf folgten wieder nur um den Faktor 2 verringerte Werte für Gehirn, Muskel und Ovar (26,5 bis 26,9 Zyklen). Wiederum nur halb so viel zeigte sich in der Milz (28,1 Zyklen). Insgesamt wurden in den untersuchten Proben mit je 200 ng DNS-Extrakt 75.749 GFP-Gensequenzen aufgefunden.

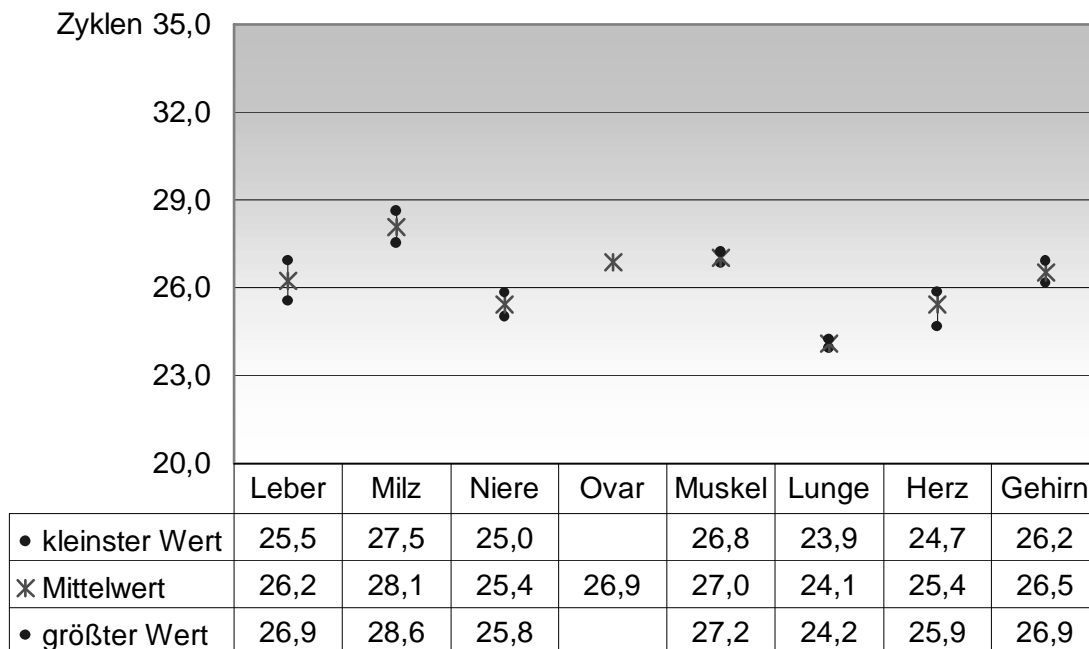


Abbildung 55: Transduktion mit rAAV-A3(GFP). Darstellung der Zyklen bis Überschreitung der Fluoreszenzgrenze.

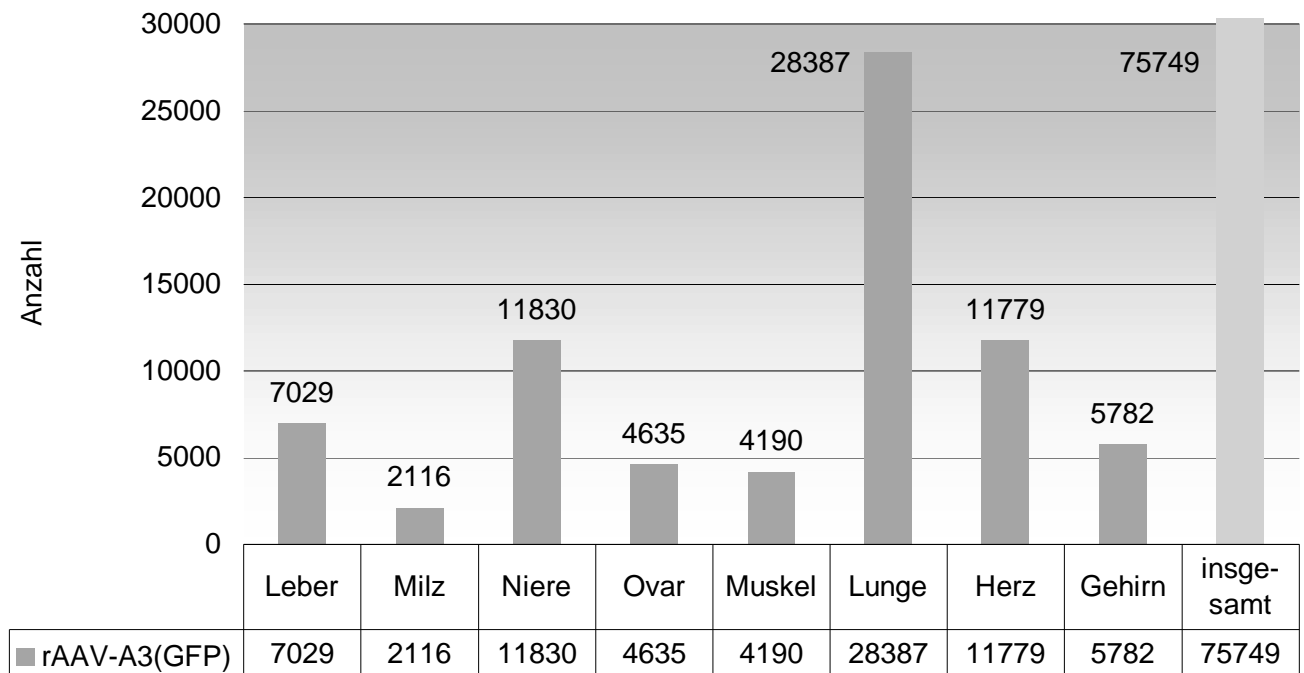


Abbildung 56: Anzahl genomischer Partikel nach Transduktion mit rAAV-A3(GFP) in je 200ng DNS-Extrakt aus dem angegebenen Organ.

3.2.2.6 Transduktion mit rAAV-1B(GFP)

Beim rAAV-1B(GFP) dominierte das kardiale Gewebe (25,1 Zyklen). Um das 4,5- bis 5fach geringere Werte zeigten der Reihe nach Leber, Niere und Lunge (27 bis 27,7 Zyklen). Dann folgten Milz, Ovar, Gehirn und Muskel (28,4 bis 29,4 Zyklen). Insgesamt wurden in den untersuchten Proben mit je 200 ng DNS-Extrakt 30.143 GFP-Gensequenzen aufgefunden.

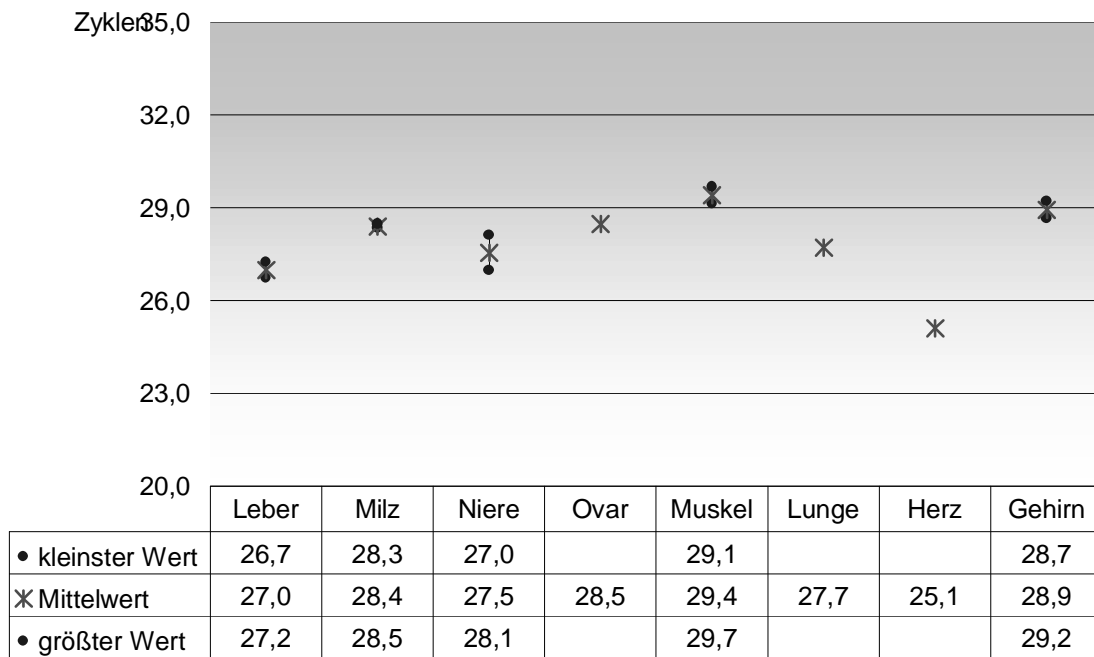


Abbildung 57: Transduktion mit rAAV-1B(GFP). Darstellung der Zyklen bis Überschreitung der Fluoreszenzgrenze.

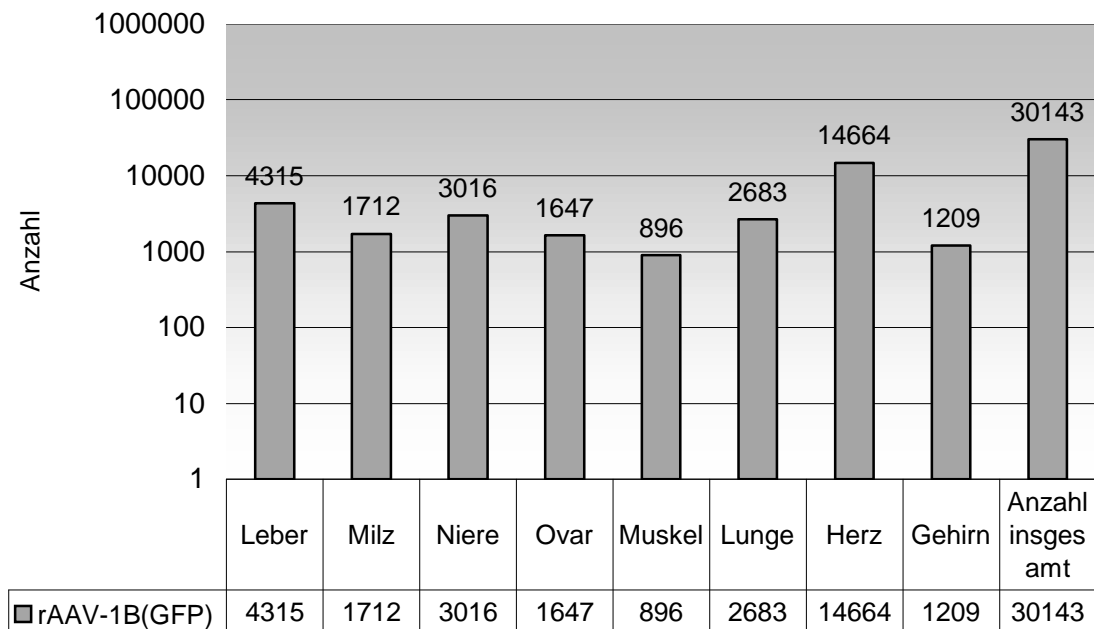


Abbildung 58: Anzahl genomischer Partikel nach Transduktion mit rAAV-1B in je 200ng DNS-Extrakt aus dem angegebenen Organ.

3.2.2.7 Vergleich der Mutanten

Beim direkten Vergleich fiel auf, dass durch die Mutationen und Insertionen in das virale Kapsid eine Verminderung der Transduktionseffizienz für die analysierten Gewebe zu beobachten war: Bei gleicher Anzahl genomischer Partikel der viralen Vektoren verringerte sich die Gesamtzahl der detektierten GFP-DNS-Sequenzen in je 200ng DNS-Extrakt aus den angegebenen Organen.

Aus den mit Hilfe des Amplifikationskoeffizienten errechneten Partikelangaben wird ersichtlich, dass Mutationen die Transduktionseffizienz auf den gesamten Organismus gesehen verringern. Hier angegeben ist jeweils die Anzahl der Partikel, die sich insgesamt in je 200ng DNS-Extrakt aus folgenden Organen fanden: Leber, Milz, Niere, Ovar, Muskel, Lunge, Herz und Gehirn. Somit aus insgesamt 1,6mg DNS-Extrakt.

Während sich beim Wildtyp noch 139.893 Sequenzen fanden, war die Anzahl bei rAAV-pRC99 bereits auf 110.013, bei der HSPG-knock-out Mutante rAAV-A3(GFP) auf 75.749 und den getargeteten Vektoren rAAV-SIG(GFP) und rAAV-1B(GFP) mit 58.166 und 30.143 genomischen Partikeln noch weiter abgefallen.

Aufgrund dessen wurde zum direkten Vergleich der prozentuale Wert (im Organ vorgefundene / Gesamtanzahl GFP-Gensequenzen des jeweiligen Vektors) bestimmt, um eine bessere Vergleichsmöglichkeit zu erhalten.

Hierbei zeigte sich, dass die Leber relativ konstant um 20%-25% der insgesamt aufgefundenen GFP-Sequenzen bei rAAV-wt(GFP), rAAV-pRC99(GFP) und rAAV-SIG(GFP) aufwies. Nur die beiden neuen Vektoren rAAV-A3(GFP) und rAAV-1B(GFP) wiesen eine geringere Transfektionsrate auf.

Die Milz schien das Hauptzielorgan des rAAV-wt(GFP) zu sein, da dort 73,85% der GFP-Sequenzen aufgefunden wurden.

Die Niere wiederum wurde fast ausschließlich von rAAV-A3(GFP) und rAAV-1B(GFP) transduziert, das mit einem Anteil zwischen 10% und 15% jedoch nicht das primäre Target dieser Vektoren war.

Ovar- und Muskelgewebe wurde von keinem der Vektoren favorisiert, es fanden sich jeweils nur geringfügige Transduktionsraten durch rAAV-A3(GFP) und rAAV-

1B(GFP). Während die Lunge vom rAAV-wt nur mit 1,61% transfiziert wurde, schien sie das Primärziel von rAAV-pRC99(GFP) (55,21%), rAAV-SIG(GFP) (38,99%) und rAAV-A3(GFP) (37,48%) zu sein.

Auch das kardiale Gewebe wurde von rAAV-wt kaum transfiziert (0,81%), dort zeigte sich ebenfalls eine Dominanz von rAAV-1B(GFP) mit 48,65%. rAAV-SIG(GFP) war mit 26,13% vertreten, seiner zweithöchsten Transduktionsrate. rAAV-A3(GFP) wies 15,55% auf und rAAV-pRC99(GFP) noch 8,97%.

Das Gehirn ist allgemein kaum transduziert worden. Die maximale Anzahl von GFP-Sequenzen wurde für rAAV-A3(GFP) detektiert.

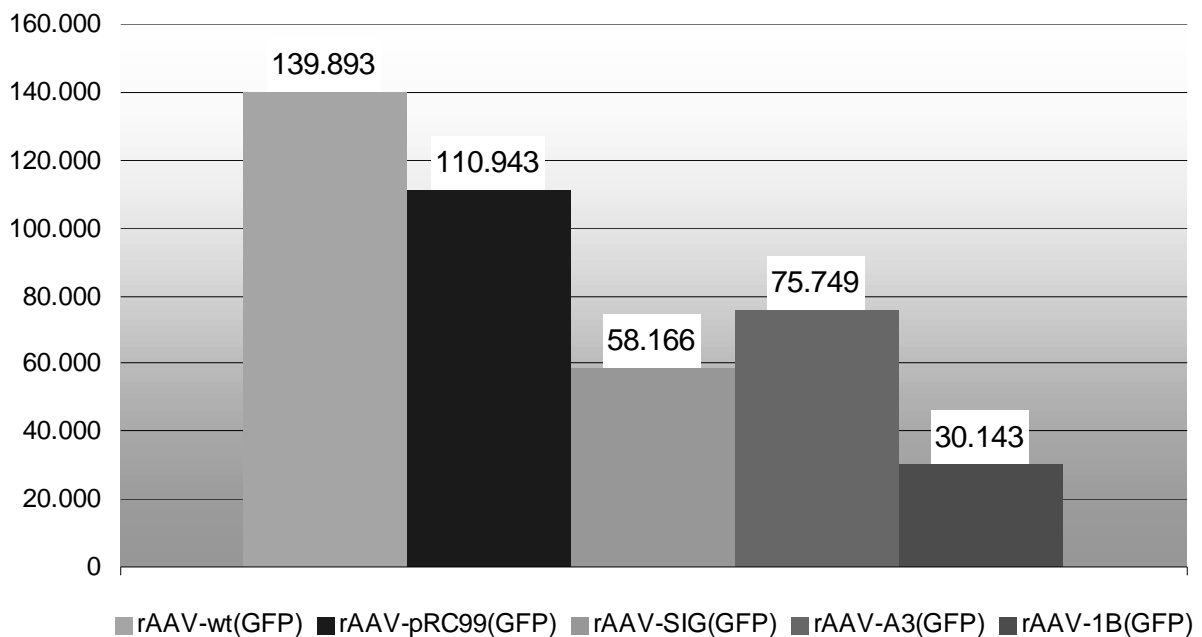


Abbildung 59: Anzahl der in den Proben insgesamt aufgefundenen GFP-Gensequenzen.

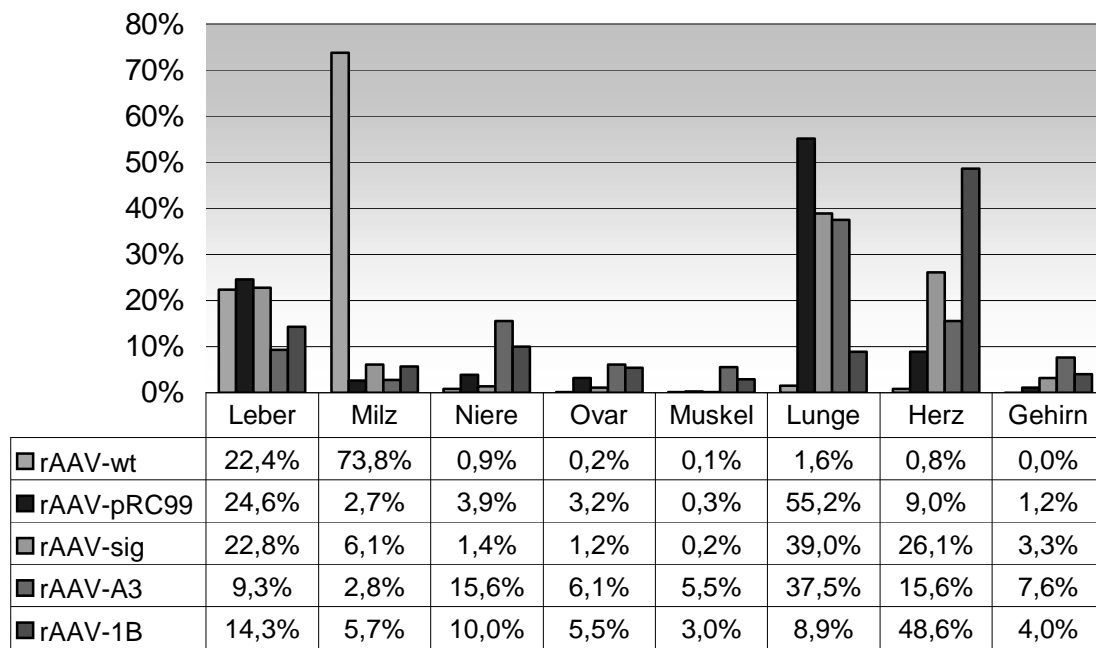


Abbildung 60: Verhältnis in Prozent der in den Proben gefundenen Anzahl von GFP-Sequenzen zu den insgesamt in einer Maus gefundenen

4 Diskussion

Zur Therapie von Erkrankungen wie etwa Mukoviszidose oder Hämophilie werden bereits Studien mit rAAV-Vektoren an Patienten durchgeführt. Bis dato konnten jedoch nur diejenigen Therapieansätze verwirklicht werden, bei denen eine Expression des Transgens in der Leber erwünscht und sinnvoll ist. Da AAV bei unverändertem Kapsid und systemischer Applikation primär dort transduziert, sind darüber hinausgehende Ansätze zur Expression in anderen Organen noch nicht durchführbar.

Als logische Weiterführung sollte nun überlegt werden, wie man diese Vektoren auch bei Pathologien nutzen könnte, die eine gezielte Transduktion in anderen Organen benötigen.

Der erste Versuch dieser Doktorarbeit untersuchte die Möglichkeit, rekombinanten AAV mit unmodifiziertem Kapsid (rAAV-wt(lacZ)) lokal in venöse Bypässe zu applizieren, um dort Endothelzellen mit einem Transgen auszustatten. Es zeigte sich jedoch, dass diese Methodik nicht ausreichend dirigierbar und damit nicht effizient genug war.

Im Anschluß daran wurden Experimente durchgeführt, rekombinante AAV-Vektoren mittels Targeting spezifisch auf Zielzellen zu konditionieren. Endothelzellen stellen hierbei ein interessantes Ziel dar, da sie aufgrund ihrer Nähe zum Blutfluss für intravenös applizierte Vektoren eine gute Kontaktmöglichkeit aufweisen. Dadurch wird eine Transduktion erleichtert. Da das Endothel darüber hinaus bei vielen Pathologien des Menschen involviert ist (ischämische Herzkrankheiten sind in Deutschland die häufigsten Todesursachen (Statistisches Bundesamt, Stand 16.09.2004)), ist das Interesse an einer gezielten Therapiemöglichkeit groß. Aber auch für systemische Transduktionen wären derart veränderte Vektoren reizvoll, da sich dadurch die Gelegenheit bietet therapeutisch wirkende Proteine in Endothelzellen synthetisieren zu lassen, um sie anschließend in die Blutbahn abzugeben und somit systemisch verfügbar zu machen.

In Kooperation mit Andrew Baker (Nicklin *et al.*, 2001) wurde ein endothel-spezifischer Vektor (rAAV-SIG(GFP)) generiert. Weiterhin wurden rAAV-A3(GFP) und rAAV-1B(GFP) als Weiterentwicklungen getestet.

Diese Vektoren sollten nun auf ihre Spezifität untersucht werden.

Um einen Überblick über den Tropismus dieser Mutanten zu bekommen, wurden diese zuerst *in vitro* bei ausgewählten humanen und murinen Zelllinien getestet. Weiterführend wurde dann *in vivo* bei der Maus die Übereinstimmung mit den zuvor gewonnenen Daten geprüft.

Als zu testende Mutanten waren vorgesehen:

- rAAV-wt rAAV mit unverändertem Kapsid
- rAAV-pRC99 Spezifitätskontrolle; Platzhaltersequenz in I-587
- rAAV-SIG siehe Nicklin *et al.*, 2001
- rAAV-A3 siehe Wu *et al.*, 2000
- rAAV-1B Kombination aus Insertion des SIG-Peptides (Nicklin *et al.*, 2001) und der HSPG-knock-out-Mutation A3 (Wu *et al.*, 2000)

Diese Vektoren kodierten für das Transgen GFP.

4.1 Diskussion der *in vivo*-Daten der Kaninchen

Bei den *in vivo*-Daten der Kaninchen zeigte sich eine geringere Transduktion als erwartet. Histologisch konnten in der Tunica media weder des venösen Bypasses noch der Arteria carotis konzentriert lacZ nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die allgemein schlechte Transfektion zum Teil an der elastischen Gefäßwand liegt, die die Penetration des AAV zur Media behindert. In einigen Studien, in denen ein rAAV-vermittelter Gentransfer *ex vivo* in Rattenaorta stattfand, sah man eine effiziente Transduktion in Adventitia und Intima, die glatten Muskelzellen der Media wurden jedoch nicht transfiziert (Maeda *et al.*, 1997). In einer anderen Studie, die an Cynomolgus-Affen durchgeführt wurde, konnte ausschließlich eine Transduktion der Adventitia kleiner Mikrogefäße festgestellt werden. Die Intima und Media wiesen hierbei keine Transduktion auf (Lynch CM *et al.*, 1997). Die Gruppe um Rolling (Rolling F *et al.*, 1997) dagegen fand vergleichbare Werte bei Adventitia und Media in der Ratte. Die Diskrepanz dieser Untersuchungen mag zum einen in unterschiedlichen Applikationsweisen, zum anderen in Unterschieden des Vektors selbst, wie etwa divergente Aufreinigungsmethoden oder verschiedene Zusammensetzungen der Expressionskassette liegen. Einig ist man sich jedoch, dass durch ein vorhergehendes Trauma der Gefäßwand, etwa durch eine Ballondilatation, die Transduktion erleichtert wird (Rolling F *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 1997), was bei folgenden Studien eventuell noch eingehender zu berücksichtigen wäre.

4.2 Diskussion der *in vitro*-Daten

Bei den mittels FACS-Analysen gewonnenen Werten zeigte der Wildtyp des rAAV (rAAV-wt(GFP)), wie in der Literatur beschrieben (Nicklin *et al.*, 2001), eine gute Transduktionseffizienz in der humanen hepatozellulären Karzinom-Zelllinie Hep-G2.

Im Hinblick auf murine Gewebe-/Zelltypen wurde die Nieren-Zelllinie analog zu Ponnazhagan *et al.* (Ponnazhagan *et al.*, 1997), sehr gut infiziert (90%). Danach folgten die Fibroblasten, die Endothel-Zelllinie und die Spermatogonien relativ gleich auf. Die deutliche Transduktion der Spermatogonien mit 45% muss noch genauer untersucht werden, da eine mögliche Transduktion der Gonaden bei einer Gentherapie durch die Gefahr einer Teratogenität unbedingt auszuschließen ist.

Die Maushepatozyten ließen sich nicht signifikant transduzieren, wie im übrigen auch nicht von den anderen Mutanten. Ebenfalls sehr geringe Transduktionswerte wurden bei IC-21-Makrophagen, murinen Herzendothelzellen und Dottersackendothelzellen erzielt.

Sämtliche mit rAAV-wt(GFP) mit unmodifiziertem Kapsid durchgeführten Transduktionen ließen sich mit einer Heparin-Natrium-Zugabe inhibieren. Da hierbei die Interaktion mit HSPG blockiert wird, ließ sich mit diesem Versuch bestätigen, dass bei rAAV-wt-Transduktionen dieses Glykoprotein essentiell ist.

Im Vergleich zu den oben genannten Werten zeigte die rAAV-SIG(GFP) Targeting-Mutante eine deutlich verminderte Transduktion von Hep-G2, murinem Nierenmesangium und Fibroblasten. Die Zelllinie SVEC zeigte keinen deutlichen Unterschied der Menge Transgen-positiver Zellen im Vergleich zu den Ergebnissen der Transduktion mit rAAV-wt(GFP) (rAAV-wt(GFP):rAAV-SIG(GFP)=30:27,1).

Weitere Versuche in unserem Labor zeigten jedoch, dass sich durch Zugabe des Proteasomeninhibitors MG132 die Transduktion mit rAAV-SIG(GFP) um ein Vielfaches steigern ließ, während sich bei rAAV-wt kaum eine Augmentation provozieren ließ. Die Aufgaben und Wirkweisen der Proteosomen sind bis heute nicht vollständig geklärt. Die Ergebnisse lassen nach aktuellem Wissensstand jedoch vermuten, dass sie zum einen für eine Degradation fremder Proteine (hier: Virus-

kapsid) mittels des Ubiquitin-Proteasomen-Komplexes verantwortlich sind (Duan *et al.*, 2000). Zum anderen sollen sie ebenfalls Regulatoren der Endozytose sein (Strous *und* Govers, 1999). Dies könnte bedeuten, dass das Targeting theoretisch weitaus erfolgreicher war, als dies die praktisch erzielten Ergebnisse vermuten lassen. Falls rAAV-SIG(GFP) bevorzugt an endotheliale Zellen andocken würde, durch die Proteasomen jedoch nicht erfolgreich transduzieren könne, hieße das, dass das primäre Ziel des Targetings erreicht worden wäre.

Ein gewünschtes Ergebnis ist die starke Transduktionseffizienz in der Dottersack-endothelzelllinie, was vielversprechend für einen Endothel-gerichteten Vektor ist.

Diese Werte zeigen, dass das Modell Maus durchaus vergleichbar mit dem menschlichen Organismus ist. Die Nabelschnur entwickelt sich über den Zwischenschritt des Ductus omphaloentericus aus dem Dottersack (Moore, 1985). Da die Mutante rAAV-SIG(GFP) durch Phage-Display auf menschlichen Nabelschnurzellen entstanden ist, überrascht der Tropismus des rAAV-SIG für diese Zellen nicht.

Zu beachten ist auch, dass die Mutante rAAV-SIG(GFP) eine stärkere Transduktion der Spermatogonien bewirkt als rAAV-wt(GFP). Dies ist ein unerwünschtes Resultat, da es die Sicherheit bei einer Behandlung mit diesem Vektor in Frage stellt. Eine Transduktion der Gonaden könnte durch eine mögliche teratogene Wirkung katastrophale Folgen haben. Andererseits ist das Ergebnis auch verständlich, wenn man bedenkt, dass auch die humanen Urgeschlechtszellen zuerst im Entoderm des Dottersackes beobachtet werden können (Moore, 1985). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Transduktionseffizienz in diesen Zellen könnte das Vorhandensein des entsprechenden Rezeptors sein.

Insgesamt zeigt sich die beste Transduktionseffizienz bei der Nierenmesangium-Zelllinie und den Spermatogonien, so dass man sich die Frage stellen muß, ob den *in vitro* Daten nach dies ein geeigneter Vektor für eine systemisch applizierte Gentherapie darstellt.

Der Heparin-Inhibitionstest zeigte hier, dass die Insertion des Peptids mit der HSPG-Liganden-Interaktion interferiert. Zum Teil (Dottersackendothel und NIH-3T3-Zellen) kam es durch die Zugabe von Heparin sogar zu einer Zunahme der Transfektionsrate.

4.3 Diskussion der *in vivo*-Daten der infizierten Mäuse

In vivo wurden die in Zellkulturen gewonnenen Daten (siehe oben) mit den Werten des infizierten Gesamtorganismus verglichen. Bei rAAV-wt(GFP) zeigten sich erwartungsgemäss hohe Werte in der Leber, gefolgt von Lunge, Niere und Herz, wie auch schon durch Ponnazhagen *et al.* gezeigt wurde (Ponnazhagen *et al.*, 1997). Dass die Milz diese Werte noch übertraf, mag daran liegen, dass sie als Erythrozytenfilterorgan mit sehr kleinen Kapillaren und dadurch einer grossen Kontaktfläche ideale Bedingungen für eine Transduktion darstellt (Jooss *et al.*, 1998). Im Vergleich zu den *in vitro*-Daten der Nierenmesangium-Zelllinie zeigte die Niere an sich relativ geringe Transduktionsraten. Die Niere besteht allerdings nur zu einem gewissen Teil aus mesangialen Zellen. Hinzu kommen Urothelgewebe, Tubuli, etc., die das Ergebnis verzerren können. Ovar, Muskel und Gehirn zeigten kaum Transfektionen, was durchaus wünschenswert ist. Durch die geringe Transduktion bei den Ovarien zeichnet sich eine relativ geringe Gefahr einer Teratogenität ab. Bei zerebralem Gewebe kann man davon ausgehen, dass keinerlei Transduktion stattgefunden hat. Da dort jedoch sowohl *in vitro* als auch nach lokaler Applikation *in vivo* eine gute Transduktionsfähigkeit festgestellt wurde (Kaplitt MG *et al.*, 1994; McCown TJ *et al.*, 1996; Bartlett JS *et al.* 1998; During MJ *et al.*, 1998), kann man davon ausgehen, dass der Vektor bei systemischer Applikation die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann. Die an der Nachweisgrenze liegende Anzahl von GFP-Partikeln stammt vermutlich von infizierten Endothelien der Hirngefässe. Das Gehirn wurde als Ganzes entnommen inklusive der Hirnhäute und der dazugehörigen Gefässe, wodurch es zu endothelialen Verunreinigungen der Proben kommen kann.

Die einzigen Mutanten, bei denen ein effektiver Rückgang in der Transduktion der Leber zu messen war, waren rAAV-A3(GFP) und rAAV-1B(GFP).

Dafür gelang es bei allen Mutanten, eine deutliche Reduktion der infizierten Zellen in der Milz zu erreichen.

Das gewünschte Ergebnis des endothelzell-spezifischen Targetings war bei der Mutante rAAV-1B(GFP) zu erkennen, da diese bei dem an Endothel reichen Herzen

eine starke Transduktion hervorrief. Allerdings wurden keine Gewebsschnitte angefertigt, so dass man nur davon ausgehen kann, dass die relativ hohe Menge an GFP im myokardialen Gewebe durch den hohen Anteil an Endothel-Zellen bedingt ist.

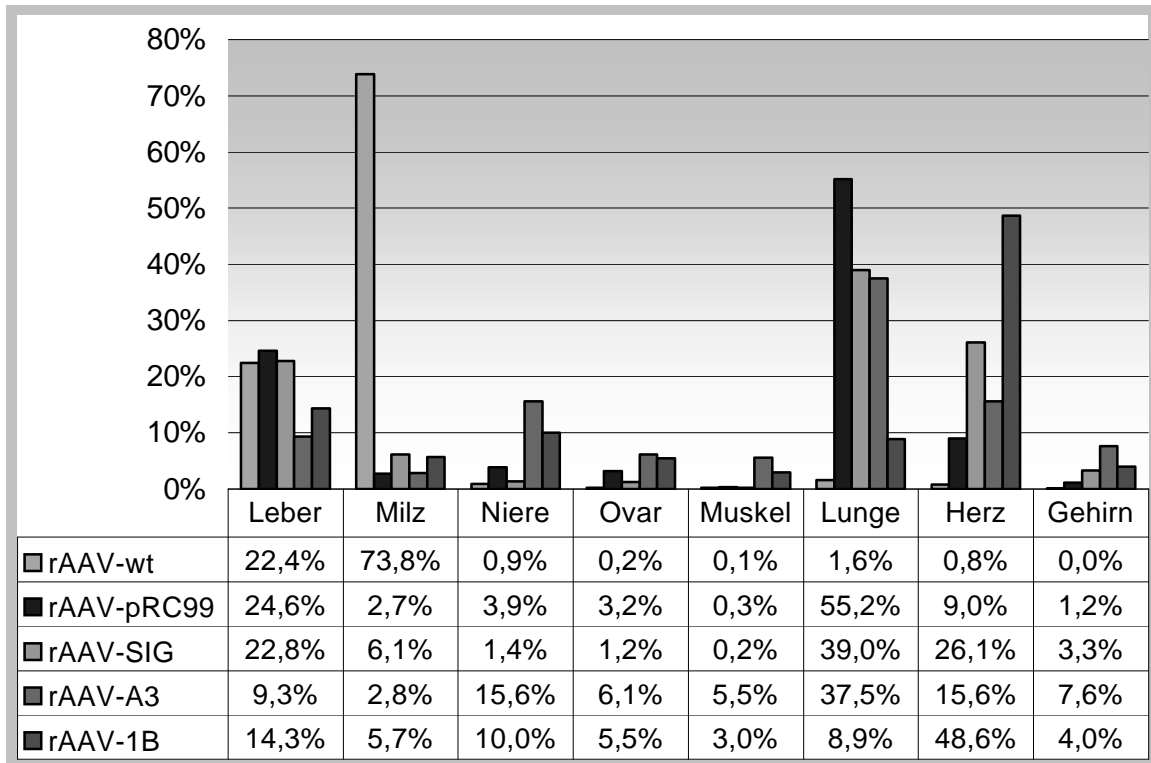


Abbildung 61: Vergleich: prozentualer Anteil genomischer GFP-Partikel im Vergleich zur insgesamt in den Proben detektierten. Es wurden mittels PCR die Gesamtzahl der in den Proben (je 200ng) einer Maus detektierten genomischen Partikel errechnet. Die Anzahl der Partikel der einzelnen Proben wurden dazu ins Verhältnis gesetzt.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Möglichkeit, den natürlichen Tropismus adeno-assoziiierter Viren mittels Insertion unterschiedlicher Gensequenzen zu verändern. Hierbei wurde versucht, ein Targeting auf Endothel-Zellen zu erzielen. Es wurden vorab *in vivo* venöse Bypässe von New-Zealand-Kaninchen mit rAAV-wt(GFP) mit unverändertem Kapsid transduziert, anschließend *in vitro* murine Zellkulturen im Vergleich mit rAAV-wt(GFP) und mit rAAV-SIG(GFP) infiziert, um dann *in vivo* Balb/c-Mäuse mit den Mutanten rAAV-wt(GFP), rAAV-SIG(GFP), rAAV-A3(GFP) und rAAV-1B(GFP) zu transduzieren.

Die Versuchsreihe der lokalen Applikation des rAAV-wt(lacZ) in die venösen Bypässe der New-Zealand-Kaninchen lieferte diesbezüglich keine verwertbaren Informationen. Aufgrund der relativ niedrigen Effizienz der Transduktion konnte keine sichere Aussage im Hinblick auf eine erfolgreiche Transduktion der gewünschten Zellen gemacht werden.

Die zur Vorbereitung der *in vivo* Experimente in der Maus erfolgten *in vitro* Experimente zeigten ein teilweise erfolgtes Detargeting des rAAV-SIG(GFP) im Vergleich zum rAAV-wt(GFP) aus der Niere heraus und ein erfolgreiches Targeting auf Dottersack-Derivate als Ursprung endothelialer Strukturen. Die daraufhin erfolgten *in vivo*-Versuche in der Maus zeigten für rAAV-A3(GFP) und rAAV-1B(GFP) ein erfolgreiches Detargeting der Leber. Die Lunge zeigte sich als primäres Ziel für rAAV-SIG(GFP) und rAAV-A3(GFP). Während alle Mutanten im Vergleich zu rAAV-wt(GFP) eine stärkere Transduktion des Herzens hervorriefen, war es für rAAV-1B(GFP) sogar das primäre Ziel.

Abschließend kann gesagt werden, dass es uns gelungen ist, ein Detargeting der Leber zu erreichen. Dies ermöglicht eine systemische Verfügbarkeit der Vektoren. Darüberhinaus konnten wir zeigen, dass es mit Hilfe dieser Vektoren ebenfalls möglich ist, relativ spezifisch gewünschte Zielzellen zu infizieren (siehe Abschnitt 4.2 und Abschnitt 4.3).

Als nächsten Schritt gilt es nun diese Ergebnisse in einer größeren Tiergruppe zu verifizieren und eventuell auf andere Tiermodelle auszuweiten. Parallel dazu sollte jedoch stets nach weiteren Liganden Ausschau gehalten werden, die eventuell noch bessere Eigenschaften versprechen.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AAV	adeno-assoziiertes Virus
AAV1-AAV6	adeno-assoziiertes Virus der Serotypen 1-6
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
bzw.	beziehungsweise
Ca ₃ (PO ₄) ₂	Kalziumphosphat
CsCl	Cäsiumchlorid
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleotinsäure
ds	Doppelstrang („double-strain“)
et al.	et altri
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FGFR-1	Fibroblast-Growth-Factor-Receptor-1
GFP	green fluorescent protein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor Receptor
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HUVEC	human-umbilical-vein-endothelial-cells
kb	Kilobasen
nm	Nanometer
PCR	Polymerase chain reaction
rAAV	rekombinantes adeno-assoziiertes Virus
rAAV	rekombinantes adeno-assoziiertes Virus mit unmodifiziertem Kapsid
rAAV1-rAAV6	rekombinantes adeno-assoziiertes Virus der Serotypen 1-6

rAAV-SIG (GFP)	rAAV-SIG mit GFP als Transgen
rAAV-SIG	rekombinantes adeno-assoziiertes Virus mit für SIGYPLP kodierender Aminosäuresequenz
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
ss	Einzelstrang („single-strain“)
β-Gal	β-Galaktosidase
transf.	transformiert
v. a.	vor allem
ΔT	Temperaturänderungsrate

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturmodell des AAV2 nach Xie <i>et al.</i> , 2002	1
Abbildung 2:	Das AAV-Genom (schematisch)	3
Abbildung 3:	Infektionsweg des AAV2 (nach Bartlett <i>et al.</i> , 2000)	5
Abbildung 4:	AAV-wt-Genom (Genom und Struktur schematisch dargestellt)	9
Abbildung 5:	Helferplasmid (Gensequenz und Struktur schematisch dargestellt)	9
Abbildung 6:	Vektorplasmid (Gensequenz und Struktur schematisch dargestellt)	9
Abbildung 8:	Auflistung der rAAV-Vektoren nach ihren Gensequenzen einschließlich der Referenzen.....	29
Abbildung 9:	Linke Graphik: Hind III-Verdau von λ -DNS zur Abschätzung von DNA-Fragment-längen, Angabe in Kilobasen	33
Abbildung 10:	Ansatz zur Herstellung Digoxigenin-markierter DNS-Sonden.....	36
Abbildung 11:	Dot-Blot-Ansatz.....	37
Abbildung 12:	SYBR®Green-Ansatz	40
Abbildung 13:	PCR-Programm	41
Abbildung 14:	Bei der Negativkontrolle der Fluoreszenz einer Zellart wird die Nachweisgrenze eingestellt, um nach einer Transduktion die neu aufgetretene Fluoreszenz bewerten zu können. Links Negativkontrolle, rechts nach Infektion mit 100.000 genomischer Partikel rAAV-wt(GFP). In der x-Achse ist die Stärke der Fluoreszenz aufgetragen.	45
Abbildung 15:	PCR-Ansatz	47
Abbildung 16:	PCR-Datensatz: Dargestellt wird die Zunahme der zu detektierenden DNS-Fragmente. Die x-Achse zeigt die Anzahl der Zyklen, die y-Achse die Intensität der Fluoreszenz.....	48
Abbildung 17:	Schmelzkurve. Im oberen Diagramm ist die Abnahme der Fluoreszenz im Zeitverlauf zu sehen, im unteren deren 1. Ableitung. Die x-Achse zeigt die Anzahl der Zyklen, die y-Achse die Intensität der Fluoreszenz.	49
Abbildung 18:	Linke Graphik: 1 kb-Leiter als Größen-/Längenstandard	50
Abbildung 19:	Prüfung der Durchgängigkeit des Bypasses.....	51

Abbildung 20: Querschnitt der Arteria Carotis mit Elastica-van-Gieson-Färbung bei 15-facher Vergrößerung.....	53
Abbildung 21: Bestimmung des genomischen Titers von rAAV-wt(GFP) und rAAV-SIG(GFP) mittels Dot-Blot. (1. Spalte: GFP-Positivkontrolle mit $c_{\max} = 3,2 \times 10^9/\mu\text{l}$, 2. Spalte: Negativkontrolle, 3. Spalte: rAAV-SIG(GFP), 4. Spalte: rAAV-wt(GFP)).....	55
Abbildung 22: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der humanen Hepatozelluläre-Karzinoma-Zelllinie Hep G2.....	57
Abbildung 23: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der humanen Hepatozelluläre-Karzinoma-.....	58
Abbildung 24: Auflistung und Einteilung der Zelllinien.....	59
Abbildung 25: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der Fibroblasten-Zelllinie 10T1/2.....	60
Abbildung 26: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 ...	61
Abbildung 27: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der Makrophagen-Zelllinie IC 21	62
Abbildung 28: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der murinen Hepatozyten-Zelllinie H2.35	63
Abbildung 29: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der murinen Myokardendothel-Zelllinie MHEC-5T	64
Abbildung 30: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der Nierenmesangium-Zelllinie SV40 MES 13.....	65
Abbildung 31: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der Spermatogonien-Zelllinie GC-1 sg	66
Abbildung 32: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der SV40-transformierten Endothel-Zelllinie (SVEC 4-10)	67
Abbildung 33: rAAV-wt(GFP)-Transduktion der Dottersackendothel-Zelllinie C166	68
Abbildung 34: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der Fibroblasten-Zelllinie 10T1/2.....	69
Abbildung 35: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion von der Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3	70
Abbildung 36: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der Makrophagen-Zelllinie IC-21	71
Abbildung 37: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der murinen Hepatozyten-Zelllinie H2.35	72

Abbildung 38: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der Myokardendothel-Zelllinie MHEC-5T.....	73
Abbildung 39: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der Nierenmesangium-Zelllinie SV40 MES13.....	74
Abbildung 40: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der Spermatogonien-Zelllinie GC-1 sg.....	75
Abbildung 41: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der SV40-transformierten Endothel-Zelllinie SVEC4-10.....	76
Abbildung 42: rAAV-SIG(GFP)-Transduktion der Dottersackendothel-Zelllinie C166.....	77
Abbildung 43: Direkter Vergleich rAAV-wt(GFP) vs. rAAV-SIG(GFP) bei 100.000 genomischen Partikeln pro Zelle. Hierzu verwendete Zelllinien sind: Hep-G2 (humane hepatozelluläre Karzinomzellen), 10T1/2 (humane Fibroblasten), NIH 3T3 (humane Fibroblasten), IC-21 (humane Makrophagen), MHEC-5T (murine Endothelzellen des Myokards), C166 (murines Dottersack-endothel), SVEC4-10 (SV40-transformiertes murines Endothel), GC-1sg (murine Spermatogonien), SV40 MES13 (murines Nierenmesangium) und H2.35 (murine Hepatozyten)	78
Abbildung 44: Heparin-Inhibitionsversuch: Fibroblasten 10T1/2, Dottersackendothel-Zellen C166, Hepatozyten H2.35, Nierenmesangiumzellen SV40 MES 13, Spermatogonien GC-1 sg und Fibroblasten NIH-3T3 wurden mit jeweils 100.000 genomischen Partikeln rAAV-wt(GFP) bzw. rAAV-SIG(GFP) transduziert. Gegenübergestellt sind die Ergebnisse ohne und mit Heparin.	79
Abbildung 45: Übersicht über die verwendeten Vektoren	80
Abbildung 46: Vergleich aller Mutanten nach Transduktion der Spermatogonien-Zelllinie GC-1 sg. Darstellung in % des Anteils der erfolgreich transduzierten Zellen nach einer Transduktion mit jeweils 50.000 genomischen Partikeln pro Zelle. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte Spermatogonien.....	81

Abbildung 47: Vergleich aller Mutanten nach Transduktion der Dottersackendothel-Zelllinie C166. Darstellung der erfolgreich transduzierten Zellen nach einer Transduktion mit jeweils 50.000 genomischen Partikeln pro Zelle in %. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte Dottersackendothel-Zellen.	82
Abbildung 48: Übersicht über die im Mausmodell verwendeten Vektoren mit Angabe der Anzahl genomischer und transduzierender Partikel pro μ l Lösung.	83
Abbildung 49: Transduktion mit rAAV-wt(GFP). Darstellung der Zyklen bis Überschreitung der Fluoreszenzgrenze.	84
Abbildung 50: Anzahl genomischer Partikel nach Transduktion mit rAAV-wt(GFP) in je 200ng DNS-Extrakt aus dem angegebenen Organ.	85
Abbildung 51: Transduktion mit rAAV-pRC99(GFP). Darstellung der Zyklen bis Überschreitung der Fluoreszenzgrenze.	86
Abbildung 52: Anzahl genomischer Partikel nach Transduktion mit rAAV-pRC99(GFP) in je 200ng DNS-Extrakt aus dem angegebenen Organ.	86
Abbildung 53: Transduktion mit rAAV-SIG(GFP). Darstellung der Zyklen bis Überschreitung der Fluoreszenzgrenze.	87
Abbildung 54: Anzahl genomischer Partikel nach Transduktion mit rAAV-SIG(GFP) in je 200ng DNS-Extrakt aus dem angegebenen Organ.	88
Abbildung 55: Transduktion mit rAAV-A3(GFP). Darstellung der Zyklen bis Überschreitung der Fluoreszenzgrenze.	89
Abbildung 56: Anzahl genomischer Partikel nach Transduktion mit rAAV-A3(GFP) in je 200ng DNS-Extrakt aus dem angegebenen Organ.	90
Abbildung 57: Transduktion mit rAAV-1B(GFP). Darstellung der Zyklen bis Überschreitung der Fluoreszenzgrenze.	91
Abbildung 58: Anzahl genomischer Partikel nach Transduktion mit rAAV-1B in je 200ng DNS-Extrakt aus dem angegebenen Organ.	91
Abbildung 59: Anzahl der in den Proben insgesamt aufgefundenen GFP-Gensequenzen.	93

Abbildung 60: prozentualer Wert der in den Proben gefundenen Menge von GFP-Sequenzen zu den insgesamt in einer Maus gefundenen94

Abbildung 61: Vergleich: prozentualer Anteil genomischer GFP-Partikel im Vergleich zur insgesamt in den Proben detektierten. Es wurden mittels PCR die Gesamtzahl der in den Proben (je 200ng) einer Maus detektierten genomischen Partikel errechnet. Die Anzahl der Partikel der einzelnen Proben wurden dazu ins Verhältnis gesetzt.

101

6.3 Literaturverzeichnis

- **Afione S, Conrad C, Kearns W, Chunduru S, Adams R, Reynolds T, Guggino W, Dutting G, Carter B, Flotte T:** In vivo model of adeno-associated virus vector persistence and rescue. *J Virol* 70: 3235-3241, 1996
- **Ali RR, Reichel MB, Thrasher AJ, Levinsky RJ, Kinnon C, Kanuga N, Hunt DM, Bhattacharya SS:** Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector. *Hum Mol Genet* 5: 591-594, 1996
- **Aumailley M, Gerl M, Sonnenberg A, Deutzmann A und Timpl R:** Identification of the Arg-Gly-Asp sequence in laminin A chain as a latent cell-binding site being exposed in fragment P1. *FEBS Letts* 262: 82-86, 1990
- **Auricchio A, Kobinger G, Anand V, Hildinger M, O'Connor E, Maguire AM, Wilson JM und Bennett:** Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum Mol Gene* 10: 3075-3081, 2001
- **Balagué C, Kalla M und Zhang W-W:** Adeno-associated virus Rep 78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J Virol* 71: 3299-3306, 1997
- **Bantel-Schaal, Delius R, Schmidt, zur Hausen H:** Human adeno-associated virus type 5 is only distantly related to other known primate helper-dependent parvoviruses. *J. Virol.* 73: 939-947, 1999
- **Bartlett JS, Kleinschmidt J, Boucher RC und Samulski RJ:** Targeted adeno-associated virus vector transduction of non-permissive cells mediated by a bi-specific F(ab \prime gamma)(2) antibody. *Nat Biotechnol* 17: 181-186, 1999
- **Bartlett JS, Samulski RJ, McCown TJ:** Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain. *Hum Gene Ther* 9: 1181-1186, 1998
- **Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ:** Infectious Entry Pathway of Adeno-Associated Virus and Adeno-Associated Virus Vectors. *J of Viro* 74(6): 2777-2785, 03/2000
- **Batchu RB, Shamma MA, Wang JY und Munshi NC:** Interaction of adeno-associated virus Rep78 with p53: implications in growth inhibition. *Cancer Res* 59: 3592-3595, 1999
- **Beaton A, Palumbo P und Berns KI:** Expression from the adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in trans by the rep protein. *J Virol* 63: 4450-4454, 1989

- **Becerra SP, Koczot F, Fabisch P, Rose JA:** Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J Virol* 62: 2745-2754, 1988
- **Bennett J, Duan D, Engelhardt JF, Maguire AM:** Real-time non-invasive in vivo assessment of aden-associated virus-mediated retinal-transduction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13: 2857-2863, 1997
- **Berns KI, Kotin RM, Labow MA:** Regulation of adeno-associated virus DNA replication. *Biochim Biophys Acta* 951: 425-429, 1988
- **Berns KI, Pinkerton TC, Thomas GF, Hoggan MD:** Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 68 : 556-560, 1975
- **Berns KI:** Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 54: 316-329, 1990a
- **Blacklow NR, Hoggan MD und Rowe WP:** Serologic Evidence for human infection with adenovirus-associated viruses; *J Natl Cancer Inst* 40: 319-327, 1968
- **Blacklow NR, Hoggan MD, Sereno MS, Brandt CD, Kim HW, Parrott RH, Chanock RE:** A seroepidemiologic study of adenovirus-associated virus infection in infants and children. *Am J Epidemiol* 94: 359-366; 1971
- **Bueler H:** Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. *Bio Chem* 380: 613-622, 1999
- **BurgueteT, Rabreau M, Fontanges-Darriet M, Roset E, Hager HD, Koppel A, Bischof P, Schlehofer JR:** Evidence for infection of the human embryo with adeno-associated virus in pregnancy. *Hum Reprod* 14: 2396-2401, 1999
- **Carter und Samulski :** Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles (review) ; *Int J of Mol Med* 6 :17-27, 2000
- **Chang LS, Shi Y, Shenk T:** Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J Virol* 63: 3479-3488, 1989
- **Chejanovski N und Carter BJ:** Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus rep gene: effects on viral DNA replications. *Virology* 173: 120-128, 1989
- **Chen CA und Okayama H:** Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6: 642-648, 1988
- **Chen CA und Okayama H:** High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7: 2745-2752, 1987

- **Cheung AK, Hoggan MD, Hauswirth WW, Berns KI:** Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA. in latently infected human Detroit 6 cells. *J Virol* 33: 739-748, 1980
- **Chirmule N, Xiao W, Truneh A, Schnell M, Hughes J, Zoltick P und Wilson:** Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle. *J Virol* 74: 2420-2425, 2000
- **Chou HJ, Samulski RJ, Bellinger D, Monahan PE, Nichols T und Walsh CE:** Persistent expression of canine factor IX in hemophilia canines. *Gene Ther* 19: 1695-1704, 1999
- **Daly TM, Vogler C, Levy B, Haskin ME, Sands MS:** Neonatal gene transfer leads to widespread correction of pathology in a murine model of lysosomal storage disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2296-2300, 1999
- **Davidson BL, Stein CS, Heth JA, Martins I, Kotin RM, Derksen TA, Zabner J, Ghodis A und Chiorini JA:** Recombinant adeno-associated virus type 2, 4 and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3428-3432, 2000
- **Duan D, Sharma P, Dudus L, Zhang Y, Sanlioglu S, Yan Z, Yue Y, Lester R, Yang J, Fisher KJ, Engelhardt JF:** Formation of adeno-associated virus circular genomes is differentially regulated by adenovirus E4 ORF6 and E2a gene expression. *J Virol* 73: 161-169, 1999
- **Duan D, Yan Z, Yue Y, Ding W und Engelhardt JF:** Enhancement of muscle gene delivery with pseudotyped adeno-associated virus. *J Clin Invest* 105: 1573-1587, 2000
- **During MJ, Samulski RJ, Elsworth JD, Kaplitt MG, Leone P, Xiao X, Li J, Freese A, Taylor JR, Roth RH, Sladek JR Jr, O'Malley KL, Redmond DE Jr:** In vivo expression of therapeutic human genes for dopamine production in the caudates of MPTP-treated monkeys using an AAV vector. *Gene Ther* 5: 820-827, 1998
- **During MJ, Xu R, Young D, Kaplitt MG, Sherwin RS, Leone P:** Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat Med* 4: 1131-1135, 1998
- **Einhard MPW, Antoniou M, Zolotukhin S, Muzyczka N, Berns KI, Grosveld F, Valerio D:** Regulated high-level human β -globin gene expression in erythroid cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2: 336-343, 1995
- **Ferrari FK, Xiao X, McCarty D, Samulski RJ:** New developments in the generation of Ad-free high titer rAAV gene therapy vectors. *Nat Med* 3: 1295-1297, 1997

-
- **Fisher KJ, Jooss K, Alston J, Yang Y, Ehlen-Haecker S, High K, Pathak R, Raper SE, Wilson JM:** Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med* 3: 306-312, 1997
 - **Flotte TR, Afione SA, Conrad C, McGrath SA, Solow R, Oka H, Zeitlin PL, Guggino WB, Carter BJ:** Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10613-10617, 1993
 - **Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM:** Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11854-11859, 2002
 - **Girod A, Ried M, Wobus C, Lahm H, Leike K, Kleinschmidt J, Deleage G und Hallek M:** Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med* 5: 1052-1056, 1999
 - **Grimm D und Kleinschmidt D:** Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use. *Human Gene Therapy* 10: 2445-2450, 1999
 - **Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA:** Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* 9: 2745-2760, 1998
 - **Grimm D:** Adeno-associated (AAV) serotypes as vectors for human gene therapy. *Res. Adv. Virol.* 1: 91-114, 2000
 - **Grimm D:** Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes. *Methods* 28: 146-157, 2002
 - **Halbert CL, Rutledge EA, Allen JM, Russell DW und Miller AD:** Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol* 74: 1524-1532, 2000
 - **Halbert CL, Standaert TA, Aitken ML, Alexander IE, Russell DW, Miller AD:** Transduction by adeno-associated virus vectors in the rabbit airway: efficiency, persistence and readministration. *J Virol* 71: 5932-5941, 1997
 - **Hansen J, Qing K, Kwon HJ, Mah C, Srivastava A:** Impaired Intracellular Trafficking of Adeno-Associated Virus Type 2 Vectors Limits Efficient Transduction of Murine Fibroblasts. *J Virol* 74: 992-996, 2000
 - **Harris JD und Lemoine NR:** Strategies for targeted gene therapy. *Trends Genet* 12: 400-405, 1996

- **Heilbronn R, Schlehofer JR, Yalkinoglu AO, Zur Hausen H:** Selective DNA-Amplification induced by carcinogens initiators: evidence for a role of proteases and DNA polymerase alpha. *Int J Cancer* 36: 85-91, 1985
- **Hermonat PL:** Inhibition of H-ras expression by the adeno-associated virus Rep78 transformation suppressor gene product. *Cancer Res* 51: 3373-3377, 1991
- **Hermonat PL:** The adeno-associated virus Rep78 gene inhibits cellular transformation induced by bovine papillomavirus. *Virology* 172: 253-261, 1989
- **Huttner NA, Girod A, Schnittger S, Schoch C, Hallek M, Büning H:** Analysis of site-specific transgene integration following cotransduction with recombinant adeno-associated virus and a rep encoding plasmid. *J Gene Med* 5: 120-129, 2002
- **Im DS und Muzycka N:** The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 61: 447-457, 1990
- **Jiang A, Chu TH, Nocken F, Cichutek K, Dornburg R:** Cell-type-specific gene transfer into human cells with retroviral vectors that display single-chain antibodies. *J Virol* 72: 10148-10156, 1998
- **Jooss K, Yang Y, Fisher KJ, Wilson JM:** Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J Virol* 72: 4212-4223, 1998
- **Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, Xiao X, Pfaff DW, O'Malley KL, During MJ:** Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet* 8: 148-153, 1994
- **Kaplitt MG, Xiao X, Samulski RJ, Li J, Ojamaa K, Klein IL, Makimura H, Kaplitt MJ, Strumpf RK, Diethrich EB :** Long-term gene transfer in porcine myocardium after coronary infusion of an adeno-associated virus vector. *Ann Thorac Surg* 62 : 1669-1676, 1996
- **Kashiwakura Y, Kenji T, Kazuhisa I, Yukihiko H, Takashi S, Kunio M, Toshikazu N, Masami W, Kazuo O, Hiroyuki D:** Hepatocyte Growth Factor Receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 79:609-614, 2005
- **Kearns WG, Afione SA, Pang MC, Erikson D, Egan M, Landrum MJ, Flotte TR, Cutting GR:** Recombinant adeno-associated virus (AAV-CFTR) vectors do not integrate in a site-specific fashion in an immortalized epithelial cell line. *Gene Ther* 3: 748-755; 1996
- **Koeberl D, Alexander IE, Halbert CL, Russell DW, Miller D:** Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1426-1431, 1997

- **Kotin RM, Menninger JC, Ward DC, Berns KI** : Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* 10: 831-834, 1991
- **Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI** : Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 2211-2215, 1990
- **Laughlin CA, Westphal H, Carter BJ**: Spliced adenovirus-associated virus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5567-5571, 1979
- **Leppard**: E4 gene function in adenovirus, adenovirus vector and adeno-associated virus infections. *J Gen Virol* 78: 2131-2138, 1997
- **Linden RM, Ward P, Giraud C, Wincour E und Berns KI** : Site-specific integration by adenoassociated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11288-11294, 1996a
- **Linden RM, Wincour E und Berns KI**: The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7966-7972, 1996b
- **Loiler S, Conlon T, Song S, Tang Q, Warrington K, Agarwal A, Kapturczak M, Li C, Ricordi C, Atkinson M, Muzyczka M, Flotte T**: Targeting recombinant adeno-associated virus vectors to enhance gene transfer to pancreatic islets and liver. *Gene Ther* 10: 1551-1558, 2003
- **Lux K, Goerlitz N, Schlemminger S, Perabo L, Goldnau D, Endell J, Leike K, Kofler M, Finke S, Hallek M, Büning H**: Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. *J Virol* 79: 11776-11787, 2005
- **Maass G, Bogedain C, Scheer U**: Recombinant adeno-associated virus for the generation of autologous, gene-modified tumor vaccines: evidence for a high transduction efficiency into primary epithelial cancer cells. *Hum Gene Ther* 9: 1049-1059, 1998
- **Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF** : Molecular cloning : laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1989
- **Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L, Kurtzman GJ, Iwaki Y, Colosi P**: Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 5: 938-945, 1998
- **Mayor HD, Houlditch GS und Mumford DM**: Influence of adeno-associated satellite virus on adenovirus-induced tumors in hamsters. *Nature* 241: 44-46, 1973
- **McCown TJ, Xiao X, Li J, Breese GJ, Samulski RJ**: Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector. *Brain Res* 713: 99-107, 1996

- **McLaughlin SK, Collis P, Hermonat PL, Muzyczka N:** Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* 62: 1963-1973, 1988
- **Mebatsion T, Finke S, Weiland F, Conzelmann KK:** A CXCR4/CD4 pseudotype rhabdovirus that selectively infects HIV-1 envelope protein-expressing cells. *Cell*. 5: 841-847, 1997
- **Miller AD:** Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11407-11413, 1996
- **Mizukami H, Young NS, Brown KE:** Adeno-associated virus type 2 binds to a 150-kilodalton cell membrane glycoprotein. *Virology* 217: 124-130, 1996
- **Mizuno M, Yoshida J, Colosi P, Kurtzmann G:** Adeno-associated virus vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene causes complete regression of intracerebrally implanted human gliomas in mice, in conjunction with ganciclovir administration. *Jpn Cancer Res* 89: 76-80, 1998
- **Monahan PE, Samulski RJ, Tazelaar J, Xiao X, Nichols TC, Bellinger DA, Read MS und Walsh CE:** Direct intramuscular injection with recombinant AAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia. *Gene Ther* 5: 40-49, 1998
- **Monahan PE, Samulski RJ:** Adeno-associated virus vectors for gene therapy: More pros than cons? *Mol Med Today* 6: 430-440, 2000
- **Moore KL:** Embryologie, Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen. Schattauer, Stuttgart, New York, 1985
- **Mori S, Wang L, Takeudin T, Kandu T:** Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping and characterization of capsid protein. *J Virol* 330: 375-383; 2004
- **Murphy JE, Zhou S, Giese K, Williams LT, Escobedo JA, Dwarki VJ:** Long-term correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by a single intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus encoding mouse leptin. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13921-13926, 1997
- **Muzyczka N:** Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 158: 97-129, 1992
- **Nicklin SA, Büning H, Dishart KL, de Alwis M, Girod A, Hacker U, Thrasher AJ, Ali RR, Hallek M, Baker AH:** Efficient and selective AAV-2 mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. *Mol Ther* 4: 174-181, 2001

- **Nicklin SA, White SJ, Watkins SJ, Hawkins RE und Baker AH:** Selective targeting of gene transfer to vascular endothelial cells by use of peptides isolated by phage display. *Circulation* 102: 231-237, 2000
- **Ostrove J, Duckworth DH und Berns KI:** Inhibition of adeno-virus-transformed cell oncogenicity by adeno-associated virus; *Virology* 113: 521-533, 1981
- **Owens RA, Weitzman MD, Kyostio SR und Carter BJ:** Identification of a DNA-binding domain in the amino terminus of adeno-associated virus Rep proteins. *J Virol* 67: 997-1005, 1993
- **Paleyanda R, Welander W, Lee T, Scandella D, Gwazdauskas F, Knight J, Hoyer L, Drohan W, Lubon H:** Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nat Biotechnol* 15/10: 971-975, 1997
- **Podsakoff G, Wong KJ, Chatterjee S :** Efficient gene transfer into non-dividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J Virol* 68 : 5656-5666, 1994
- **Ponnazhagan S, Mukherjee P, Yoder MC, Wang XS, Zhen Zhou S, Kaplan J, Wadsworth S, Srivastava A:** Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in vivo: organ-tropism and expression of transduced sequences in mice. *Gene* 190: 203-210, 1997
- **Ponnazhagan S, Yoder MC, Srivastava A:** Development of human parvovirus B19 vectors: erythroid cell-specific delivery and expression of transduced genes. VIIth .Parvovirus workshop. Program and Abstracts, Heidelberg, Germany P35, 1997
- **Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A :** Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nature medicine* 5: 71-77, 1999
- **Qiu J, Braun KE:** A 110-kDa nuclear shuttle protein, nucleolin, specifically binds to adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid. *Virology* 257: 373-382, 1999
- **Qiu J, Handa A, Kirby M, Brown KE :** The interaction of heparin sulfate and adeno-associated virus 2. *Virology* 269: 137-147, 2000
- **Rabinowitz JE, Samulski RJ:** Building a better vector : The manipulation of AAV virions. *Virol* 278: 301-308, 2000
- **Ried MU, Girod A, Leike K, Büning H, Hallek M:** Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. *J Virol* 76: 4559-4566, 2002
- **Riordan J, Rommens J, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J:** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of comp

- **Rohde V, Erles K, Sattler HP, Derout H, Wullich B, Schlehofer JR** : Detection of adeno-associated virus in human semen : does viral infection play a role in the pathogenesis of male infertility ? *Fertil Steril* 72 : 814-816, 1999
- **Russell DW, Miller AD, Alexander IE** : Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 8915-8919, 1995
- **Rutledge EA und Russell DW**: Adeno-associated virus vector integration junctions. *J Virol* 71: 8429-8436, 1997
- **Salvetti A, Oreve S, Chadeuf G, Favre D, Cherel Y, Champion-Arnaud P, David-Ameline J, Moullier P**: Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum. Gene Ther* 9: 695-706, 1998
- **Samulski RJ, Chang LS, Shenk T** : Helper-free stocks of adeno-associated viruses : Normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63 : 3822-3828, 1989
- **Samulski RJ, Zhu S, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N und Hunter LA** : Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 10: 3941-3950, 1991
- **Samulski RJ**: Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus. *Curr Opin Genet Dev* 3: 74-80, 1993
- **Sanlioglu S, Benson PK, Yang J, Atkinson EM, Reynolds T und Engelhardt JF**: Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3-kinase activation. *J Virol* 74: 9184-9196, 2000
- **Schlehofer JR, Ehrbar M, zur Hausen H**: Vaccinia virus, herpes simplex virus and carcinogen induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helper virus dependent parvovirus. *Virology* 152:110-117; 1986
- **Schlehofer JR**: The tumor suppressive properties of adeno-associated viruses. *Mutat Res* 305: 303-313, 1994
- **Schnierle BS, Groner B**: Retroviral targeted delivery. *Gene Ther* 3: 1069-1073, 1996
- **Siegl G, Bates RC, Berns KI, Carter BJ, Kelly DC, Kurstak E und Tattersall P**: Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23: 61-73, 1985
- **Smith GP**: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-1317, 1985
- **Smith RH und Kotin RM**: The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to 5' polarity. *J Virol* 72: 4874-4881, 1998

- **Snitkovsky S, Young JAT:** Cell-specific viral targeting mediated by a soluble retroviral receptor-ligand fusion protein. *PNAS* 95: 7063-7068, 1998
- **Snyder R, Miao C, Patijn G, Spratt S, Danos O, Nagy D, Gown A, Winter B, Meuse L, Cohen L, Thompson A, Kay M:** Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 16: 270-276, 1997
- **Song S, Morgan M, Ellis T:** Sustained secretion of human alpha-1-antitrypsin from murine muscle transduced with adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14383-14388, 1998
- **Stilwell JL und Samulski RJ:** adeno-associated virus vectors for therapeutic Gene Transfer. *BioTechniques*: 80-87, 2003
- **Strous GJ und Govers R:** The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci* 112: 1417-1423, 1999
- **Su H, Lu R, Chang JC, Kan YW:** Tissue-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase gene delivered by adeno-associated virus inhibits the growth of human hepatocellular carcinoma in athymic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13891-13896, 1997
- **Summerford C und Samulski RJ:** Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72: 1438-1445, 1998
- **Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ:** $\alpha_v\beta_5$ integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nature medicine* 5: 78-82, 1999
- **Surosky RT, Urabe M, Godwin SG, McQuiston SA, Kurtzman GJ, Ozawa K und Natsoulis G:** Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J Virol* 71: 7951-7959, 1997
- **Thomson BJ, Weindler FW, Gray D, Schwaab V, Heilbronn:** HHV-6 is a helper virus for adeno-associated virus type 2 and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* 204:304-311; 1994
- **Walsh CE, Nienhuis AW, Samulski RJ:** Phenotypic correction of Fanconi anemia in human hematopoietic cells with a recombinant adeno-associated virus vector. *J Clin Invest* 94: 1440-1448, 1994
- **Walters RW, Yi SM, Keshavjee S, Brown KE, Welsh MJ, Chiorioni JA und Zabner J:** Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem* 276: 20610-20616, 2001
- **Walther W, Stein U:** Cell type specific and inducible promoters for vectors in gene therapy as an approach for cell targeting. *J Mol Med* 74: 379-392, 1996

- **Walz C, Deprez A, Dupressoir T, Durst M, Rabreau M, Schlehofer JR:** Interaction of HPV 16 and AAV2 co-infecting human cervical epithelium. *J Gen Virol* 78:1441-1452; 1997
- **Wang B, Li J und Xiao X:** Adeno-associated virus vector carrying minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in *mdx* mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA* 97/25: 13714-13715, 2000
- **Weitzman MD, Kyostio SR, Kotin RM und Owens RA:** Adenoassociated virus (AAV) rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5808-5812, 1994
- **Wistuba A, Kern A, Weger S, Grimm D und Kleinschmidt JA:** Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol* 71: 1929-1937, 1997
- **Wistuba A, Weger S, Kern A, Kleinschmidt JA:** Intermediates of adeo-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins. *J Virol* 69: 5311-5319, 1995
- **Wu P, Xiao W, Conlon T, Hughes J, Agbandje-McKenna M, Ferkol T, Flotte T, Muzyczka N:** Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism. *J Virol* 74(6): 2936-2942, 2000
- **Xiao X, Li J, Samulski RJ:** Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 70: 8098-8108, 1996
- **Xiao X, Li J, Samulski RJ:** Production of high titer rekombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72: 2224-2232, 1998
- **Xie Q, Bu W, Bhatia S, Hare J, Somasundaram T, Azzi A und Chapman M:** The atomic structure pf adeno-associated virus (AAV-2), a vector of human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99/16: 10405-10410, 2002
- **Yakobson B, Hrynko TA, Peak MJ und Winocour E:** Replication of adeno-associated virus in cells irradiated with UV light at 254nm. *J Virol* 63: 1023-1030, 1989
- **Yakobson B, Koch T und Winocour E:** Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. *J Virol* 61 : 972-981, 1987
- **Yalkinoglu AO, Zentgraf H und Hubscher U :** Origin of adeno-associated virus-DNA replication is a target of carcinogen-inducible DNA amplification. *J Virol* 65 : 3175-3184, 1991
- **Yang CC, Xiao X, Zhu X, Ansardi DC, Epstein ND, Frey MR, Matera AG und Samulski RJ:** Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are

sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro. *J Virol* 71: 9231-9247, 1997

- **Yang QC, Mamounas M, Yu G, Kennedy s, Leaker B, Merson J, WongStaal F, Yu M und Barber JR:** Development of novel cell surface CD34-targeted recombinant adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 9: 1929-1937, 1998
- **Yang Y, Li Q, Ertl HC und Wilson JM:** Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol* 69: 2004-2015, 1995
- **Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM:** Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4407-4411, 1994
- **Zabner J, Seiler M, Walters R, Kotin RM, Fulgeras W, Davidson BL, Chiorini JA:** Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol* 74: 3852-3858, 2000
- **Zentrale Kommission für biologische Sicherheit (ZKBS):** Allgemeine Stellungnahme. Az: 6790-10-73, Oktober 2001
- **Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, Summerford C, Samulski RJ, Muzyczka N :** Recombinant Adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Therapy* 6 : 973-985, 1999

6.4 Lebenslauf

Marcus Aicher

Untere Hauptstrasse 3; 85461 Bockhorn

Telefon: 08122 / 22 94 555

Handy: 0163 / 28 79 351

marcusaicher@gmx.de



persönliche Angaben

Geburtsdaten: 17.01.1977 in Prien am Chiemsee

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1987 bis 1996 Gymnasium Bad Aibling (Abiturnote 2,2)

Studium

1997 bis 2005 Studium der Humanmedizin an der LMU München

Studiumsabschluss:

November 2004 mit der Note 2,33

Arbeitsverhältnis:

Seit Januar 2005: Assistenzarzt der unfallchirurgischen Abteilung
Amperklinken Dachau

6.5 Danksagung

Bedanken möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Reichenspurner, der es mir flexibel und unbürokratisch ermöglicht hat, die hier vorliegende Doktorarbeit zu erstellen. Zu gleichen Teilen gilt mein Dank auch Herrn Prof. Hallek, der mich kurzentschlossen mit ins Boot genommen hat. Dadurch war es mir möglich, meine Arbeit erfolgreich zu Ende zu bringen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mentorin und unermüdlichen Unterstützerin Frau Dr. Hildegard Büning, die mir mit großer Geduld immer wieder aufs Neue die Grundlagen der Biochemie und der Gentechnologie erklärt hat. Sie unterwies mich in den grundlegenden Techniken und führte mich durch meine Arbeit, wobei sie mir stets den Freiraum ließ, eigene Ideen zu verfolgen.

Große Teile meiner Doktorarbeit verdanke ich auch dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Hallek, die mir vereint immer wieder weiterhalfen und mich unterstützten. Insbesondere danken möchte ich Kristen Leike, Daniela Goldnau, Nadja Huttner, Kerstin Lux, Franz Gerner, Bernhard Kaess, Jan Endell und Andreas Riederer.

Auch arbeitsgruppenübergreifende Hilfe wurde mir zuteil. So möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Dr. Frankenberger und Miran Javorovich bedanken, die es mir ermöglichten die PCR-Auswertung durchzuführen.

Den Arbeitsgruppen Kosinowski und Grosschedl danke ich für die zur Verfügung gestellten Zelllinien, der Arbeitsgruppe Wolf für die Unterstützung in Form des Spektralphotometers.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Dr. Kilian und seinem Team für die Hilfe bei den Kaninchenexperimenten, und insbesondere Frau Haas für die Anfertigung der Schnitte.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Groer, der es schaffte, jeden Tag für mich zum Abenteuer werden zu lassen.