

3. METHODEN

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Zellkultivierung

Die verwendeten Säugerzelllinien HeLa und 293T wurden in DMEM-Vollmedium (1-fach Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM) mit 862 mg/l L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax-I), 1 g/l D-Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat, 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FKS), 100 mg/l Streptomycin, 10⁵ Einheiten/l Penicillin) bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert und zweimal pro Woche 1:3 bis 1:5 ausgedünnt.

3.1.2. Herstellung von Adenovirus Stocks

Von 10⁷ HeLa Zellen in einer 175 cm²-Zellkulturflasche wurde das Medium abgenommen und mit Adenovirus Typ 2 (Ad-2) mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,1 bis 0,2 für 2 h infiziert. 30 ml Medium wurden dazugegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis ein vollständiger cytopathischer Effekt zu beobachten war. Der cytopathische Effekt (CPE) äußert sich morphologisch in einem Abrunden der Zellen, Verklumpen und Ablösen von der Unterlage. Zellen und Überstand wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt, bei –80°C eingefroren, aufgetaut und 10 min bei 15.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei –80°C gelagert.

3.1.3. Bestimmung des Titers infektiöser Adenoviren

HeLa Zellen wurden in einer 96-Loch –Platte mit einer 10-fach seriellen Verdünnung des zu titrierenden Stocks infiziert. Die Verdünnungsstufe, bei der die Zellen deutliche Anzeichen einer Infektion zeigen (CPE), gibt Aufschluß über die Zahl initial eingesetzter Viren.

3.1.4. Präparation von AAV-2 Stocks und rAAV Vektorstocks

mittels Transfektion von AAV-2-Plasmid und Helferplasmid:

Dazu wurden 293T Zellen mit dem Plasmid pTAV2-0 und dem Helferplasmid pDG kotransfiziert. 293T Zellen exprimieren bereits die adenovirale Helferfunktion E1A. Die Transfektion erfolgte mit der CaPO₄-Methode nach dem Protokoll von Chen und Okayama (Chen and Okayama, 1987; Chen and Okayama, 1988) in leicht modifizierter Form:

Einen Tag vor der Transfektion wurden 20 Ø14 cm-Schalen mit 7x10⁶ 293T Zellen in 20 ml Medium pro Schale eingesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Transfektion wurden je Schale 18 µg pDG und 6 µg pTAV2-0 mit 990 µl 300 mM CaCl₂ und 660 µl 2x BES (N,N-bis(hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure) gepufferter Salzlösung (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 6,95) gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sich ein Ca-DNA-Präzipitat bildet. Dieses wurde auf die Zellen gegeben und während einer Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ aufgenommen. Nach 16 h wurde der Überstand abgezogen und durch 7 ml Medium mit 10% FKS ersetzt und weitere 2 Tage inkubiert.

Zur Produktion von rekombinanten AAV (rAAV) Vektorstocks wurde statt des Plasmids pTAV2-0 das Plasmid psubgfpneo, das ein Reporter- und ein Selektionsgen flankiert von den AAV terminalen Wiederholungen enthält, verwendet.

mittels Transfektion von AAV-2-Plasmid und Helferinfektion:

Alternativ wurden HeLa Zellen mit pTAV2-0 transfiziert und anschließend mit Adenovirus Typ 2 überinfiziert:

Dazu wurden in HeLa Zellen mit einer Dichte von 2x10⁶ Zellen pro Ø 14 cm-Schale eingesät. 7 h später wurden die Zellen mit einem Mix aus 25 µg pTAV2-0, 940 µl 200 mM CaCl₂ und 940 µl 2xBES gepufferter Salzlösung transfiziert. Nach 16 h wurde der Überstand abgenommen und mit Adenovirus Typ 2 (Ad-2) mit MOI=5 für 60 min infiziert. Ad-2 wurde entfernt, es wurde frisches Medium zugegeben und inkubiert, bis ein vollständiger cytopathischer Effekt zu beobachten war.

Eine AAV-negative Kontrollpräparation wurde in gleicher Weise hergestellt, nur ohne den Transfektionsschritt mit pTAV2-0 .

mittels AAV-2- und Helferinfektion:

Dazu wurden 80% konfluente HeLa-Zellen nacheinander mit AAV-2 MOI=10 und Ad-2 MOI=20 infiziert. Nach 3 Tagen wurde geerntet.

Für die Herstellung ungereinigter Stocks wurden Zellen und Überstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 3x eingefroren und aufgetaut und 15 min bei 1500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde im Falle der Verwendung von Helfervirus (mit HeLa Zellen) für 30 min bei 56°C inkubiert, um Adenovirus zu inaktivieren, anschließend aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.1.5. Aufreinigung der Virusstocks

Sollten die Stocks hochgereinigt werden, wurden folgende Reinigungsschritte nacheinander durchgeführt: Behandlung mit Benzonase zur Degradation unverpackter Nukleinsäuren, Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation, Heparin-Affinitätschromatographie und schließlich Dialyse. Da über 90% der Viren mit den Zellen assoziiert vorliegen und nur ein geringer Teil in den Überstand gelangt (Grimm et al., 1998; Xiao, Li, and Samulski, 1998), wurde der Zellüberstand nicht aufgearbeitet.

3.1.5.1. Benzonasebehandlung

Die Zellen wurden durch Niedergeschwindigkeitszentrifugation pelletiert, mit PBS gewaschen, in 10 ml PBS resuspendiert und auf 0,5% Desoxycholsäure (DOC) eingestellt. Freie Nukleinsäuren wurden durch Behandlung mit 5000 U Benzonase (Reinheitsgrad 2, Merck, Darmstadt) für 1,5 h bei 37°C abgedaut. Die Zellreste wurden pelletiert durch Zentrifugation bei 8100xg für 30 min. Der Überstand wurde eingefroren, aufgetaut und erneut zentrifugiert.

3.1.5.2. Iodixanol-Dichtegradient

Die Virussuspension wurde über einen diskontinuierlichen Iodixanolgradienten gereinigt, nach einer Methode modifiziert nach Zolotukhin et.al (Zolotukhin et al., 1999). Iodixanol ist ein nichtionisches inertes Gradientenmedium von relativ geringer Viskosität, das ursprünglich

als Röntgenkontrastmittel entwickelt wurde. Es verhindert die Aggregatbildung von AAV- und Zellproteinen im Zellysat. Iodixanol ist in 60% iger (w/v) Konzentration als OptiPrep™(Nycomed, Norwegen) erhältlich.

Der Überstand wurde in ein Optiseal™ Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer, 32,4 ml, Beckman, Unterschleißheim) gegeben und wie folgt unterschichtet:

- 6 ml 15% Iodixanol (5,5'-[(2-hydroxy-1-3-propandiyl)-bis(acetylamino)]bis[N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6-trijod-1,3-benzencarboxamid] in 1x PBS-MK (10x PBS-MK: 10x PBS, 10mM MgCl₂, 25mM KCl), 1M NaCl

Das NaCl destabilisiert ionische Interaktionen zwischen Makromolekülen und verhindert so die Aggregation von AAV-Partikeln mit Zellproteinen und damit eine Verteilung von AAV über den gesamten Gradienten.

- 4,5 ml 25% Iodixanol in 1x PBS-MK und 11 µl 0,5% Phenolrot
- 3,5 ml 40% Iodixanol in 1x PBS-MK
- 3,5 ml 54% Iodixanol in 1x PBS-MK und 7 µl 0,5% Phenolrot

Der Gradient wurde für 2 h bei 54.000 rpm und 18°C in einem 60Ti-Rotor zentrifugiert (Ultrazentrifuge L5-75, Beckman, Unterschleißheim).

Die Dichte von AAV entspricht ungefähr einer 50%igen Iodixanol-Konzentration. Es wurde mit einer Kanüle (0,8 x 30 mm) leicht unterhalb der 40% Fraktion eingestochen und die gesamte Fraktion abgezogen. AAV-Protein-Komplexe reichern sich bei etwas niedrigeren Konzentrationen an.

3.1.5.3. Heparin-Affinitätschromatographie

Als zellulärer Rezeptor von AAV wurde u.a. Heparansulfatproteoglykan (HSPG) identifiziert (Summerford and Samulski, 1998), wodurch eine Reinigung über eine Heparinsulfat-Affinitätssäule und eine Abtrennung von Adenovirus möglich ist.

Eine Econosäule (Ø1,5cm, 14cm lang, Bio-Rad) wurde mit 5 ml Heparin-Agarose (1000 µg Heparin/ml, Typ 1, SIGMA) befüllt und mit 4x 10 ml PBS-MK äquilibriert. Anschließend wurde die Gradientenfraction aufgetragen, mit 4x 10 ml PBS-MK gewaschen und mit 5 ml PBS-MK, 1 M NaCl eluiert.

3.1.5.4. Dialyse

Das Eluat wurde in einem Dialyserahmen (Slide-A-Lyzer 0,5-3 ml, MWCO=10.000, Pierce, Rockford, USA) für 1 h gegen PBS dialysiert.

Der hochgereinigte Virusstock wurde in Cryoröhrchen bei -80°C gelagert.

3.1.6. Titration von AAV- und rAAV-Stocks

Der Titer infektiöser Viren wurde durch Endpunktverdünnung in Anwesenheit von Ad-2 ermittelt (Weindler and Heilbronn, 1991).

Wildtyp AAV wurde wie folgt titriert: Eine Mikrotiterplatte wurde mit 10^4 HeLa-Zellen/Vertiefung eingesät. Nach 4 h hatten sich die Zellen angeheftet und es wurden 10^5 pfu Ad-2 dazugegeben. Von dem AAV Stock wurde in den Vertiefungen eine 10-fach serielle Verdünnungsreihe hergestellt. Wenn der CPE vollständig war, wurde die Platte 3x eingefroren und aufgetaut und das infizierte Zelllysate mit Hilfe einer Dot-Blot-Apparatur (Bio-Rad) auf eine Nylonmembran aufgeblottet. Die Membran wurde zum Denaturieren für 5 min auf mit 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl –Lösung getränktes Whatman-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) gelegt und dann auf Whatman-Papier mit 20xSSC (3 M NaCl, 0,3 M tri-Na-Citrat-dihydrat pH 7), 0,5 M Tris pH7,5 neutralisiert. Die DNA wurde durch UV-cross-linking kovalent an die Membran gebunden. Die Membran wurde mit bidest gespült, leicht getrocknet und mit einem Digoxigenin-markierten Fragment (siehe 3.2.7.) des AAV-*cap* Genes hybridisiert (siehe 3.2.8.). Die Exposition auf einem Röntgenfilm zeigte die letzte Verdünnungsstufe, bei der noch AAV-Replikation stattfand und war Grundlage für die Berechnung des Titers (infektiöse Einheiten) des Virusstocks.

Zur Titration von **rekombinanten Virusstocks** wurden 293T Zellen am Vortag in eine Mikrotiterplatte eingesät. Je Vertiefung wurden 5×10^4 pfu Ad-2 und 10^6 iu AAV-2 Wildtyp zugegeben, um die Helferfunktionen für eine rAAV Replikation bereitzustellen. Rekombinantes AAV (rAAVsub*gfpneo*) wurde in einer 10-fach seriellen Verdünnung dazugegeben. Nach ca 30 h wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie anhand der *gfp*-Expression diejenige Verdünnungsstufe ermittelt, die bei Infektion noch mindestens einen rAAV-Partikel enthielt und der Titer (transduzierende Einheiten) berechnet.

Die Bestimmung des **Virus-Titers über die Quantifizierung der Virusgenomkopien** von AAV-2 und rAAVsubgfpneo wurde mittels quantitativer real time PCR durchgeführt. Dazu wurden 10 µl hochgereinigter Virusstock mit 1 µg Carrierplasmid in DNA-Lysepuffer (siehe 3.2.2.) mit Proteinase K (260µg/ml) 2 h bei 56°C verdaut, Phenol-extrahiert, präzipitiert und in 20 µl TE resuspendiert. Es folgte eine Reinigung mittels Adsorptionschromatographie über eine qiaquick spin-Säule (Qiagen, Hilden). 5 µl (1:100 oder 1:1000) der gereinigten DNA wurden in einer real time LightCycler PCR amplifiziert. Der Reaktionsmix enthielt die Polymerase mit Puffer (Mix Fast start DNA Master SYBR GreenI, Roche, Penzberg), 5 mM MgCl₂ sowie je 500 nM Primer AAV-F1 und AAV-W1 für die Amplifikation von AAV-Wildtyp bzw. AAV-F3 und AAV-B3 für rAAVsubgfpneo. Zu Beginn wurde die Polymerase für 10 min bei 95°C aktiviert. Es folgten 40 Zyklen von je 0 sec 95°C, 4 sec 60°C und 15 sec 72°C.

3.1.7. Infektion von Zellen mit AAV-2

Für die Untersuchung der Integrationskinetik und –frequenz von AAV-2 wurden $1,7 \times 10^6$ HeLa-Zellen auf Ø10 cm Schalen eingesät. Für jeden Erntezeitpunkt wurden 3 Schalen angesetzt. Nach 4 h wurde das Medium abgenommen und mit in PBS verdünntem AAV-2 (virushaltiger Zellüberstand) bei einer MOI von 500 in einem Gesamtvolumen von 400 µl für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Virussuspension abgezogen und die Zellen mit frischem Medium versorgt. Die Zellen wurden direkt nach der Virusadsorption (0 h) sowie nach 8 h, 16 h, 24 h, 32 h, 48 h, 72 h, 96 h und nach 2 Wochen geerntet. Da AAV infizierte Zellen weiter proliferieren, wurden die Zellen der späten Erntezeitpunkte nach 48 h passagiert.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Modifikation und Rekombination von DNA

Standardmethoden wie Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Auffüllung 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten mit Klenow-Enzym, Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mittels Alkalischer Phosphatase und Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-DNA-Ligase erfolgten nach den bei Asubel et al. (Asubel et al., 1987) oder bei Sambrook et al. (Sambrook, Fritsch, and Maniatis, 1989) beschriebenen Methoden oder nach Angaben der jeweiligen Hersteller. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte über die Messung der Absorption bei 260 nm, wobei der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm als Maß für die Reinheit der DNA diente. Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 0,4 bis 2 %-igen Agarosegelen in TAE-Puffer. DNA-Fragmente wurden aus den Agarosegelen durch Assoziation an Glasmilch mit dem QiaEX II Kit (Qiagen, Hilden) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert. Ligationsprodukte oder Plasmid-DNA wurden entweder in chemisch kompetente *E. coli* nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983) oder in elektrokompente *E. coli* nach dem Protokoll von Asubel et al. (Asubel et al., 1987) transformiert. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium (1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl) oder auf LB-Agar-Platten (2 % (w/v)). Die Selektion transformierter *E. coli* erfolgte mit 100 µg/ml Ampicillin. Minipräparationen von Plasmid-DNA aus 1 ml *E. coli* Bakterienkultur wurden durch Kochlyse der Bakterien gemäß dem bei Sambrook et al. (Sambrook, Fritsch, and Maniatis, 1989) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Großpräparationen von Plasmid-DNA erfolgten unter Zuhilfenahme des Qiagen-Midi-Kits (tip100-Säulen) nach Anweisungen des Herstellers.

3.2.2. Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

Die Zellen einer Ø10 cm –Schale wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber von der Unterlage gelöst. Die Zellen wurden in 1 ml PBS aufgenommen und 10 sec bei 14.000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde in 300 µl TE resuspendiert und mit 150 µl 3xDNA-Lysepuffer (3% N-Laurylsarcosinat, 70 mM Tris-Cl pH8.5, 25 mM EDTA pH8.0) und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt. Das Lysat wurde 2 h bei 56°C oder alternativ bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend durch

Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Dazu wurden dem Lysat 50 µl 3 M NaAc pH9,2 und 500 µl H₂O-gesättigtes Phenol (QBiogene, USA) zugesetzt. Wässrige und organische Phase wurden durch 8 minütiges drehen auf dem Überkopfschwenker gemischt. Nach Zentrifugation (8 min 13.000 rpm Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde die wässrige DNA-haltige obere Phase abgenommen und mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) in gleicher Weise extrahiert. Eine dritte Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) schloß sich an, um restliches Phenol zu eliminieren. Anschließend wurde 1/10 Volumen 3 M NaAc, pH5,2 und 2,5-fach Volumen Ethanol zugegeben. Nach mehrmaligem Schwenken fiel die DNA als Knäuel aus und wurde sofort abzentrifugiert (8 min 13.000 rpm). Die DNA wurde mit 70% EtOH gewaschen und an der Luft getrocknet, bis das Pellet glasig erschien. Nach Zugabe von 50 µl TE wurde die DNA zum Resuspendieren mindestens über Nacht bei 4°C gelagert.

3.2.3. Isolierung von DNA aus Virusstocks

Analog zur Präparation von DNA aus Zellen wurde ein Aliquot der Viruspräparation in DNA-Lysepuffer und 1 mg/ml Proteinase K mit 5 µg pBluescript II KS+ als Trägerplasmid für 2 h bei 56°C inkubiert. Die DNA wurde Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt, gewaschen und in TE aufgenommen.

3.2.4. Vorbereitung der DNA für die PCR

3.2.4.1. Restriktionsverdau

Zur Reduzierung der Viskosität wurden 18µl genomische DNA mit 40 U *Bam*HI (NEB) in Puffer *Bam*HI verdaut.

3.2.4.2. RNase Verdau

Noch vorhandene RNA wurde im 20µl Restriktionsansatz mit 4µl RNaseA (10mg/ml) für 30 min Raumtemperatur abgedaut.

3.2.4.5. Reinigung

Die genomische oder virale DNA-Lösung wurde zur Entfernung von Enzymen und Phenolresten mit dem PCR purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt und in 30 µl Elutionspuffer eluiert.

Die DNA-Konzentration und Reinheit wurde mittels $OD_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ -Messung in TE ermittelt. Nukleinsäuren absorbieren aufgrund der Spektralcharakteristika der in ihnen enthaltenen Basen ultraviolettes Licht zwischen 250 nm und 270 nm Wellenlänge und zeigen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei etwa 280 nm. Bei 260 nm und doppelsträngiger DNA entspricht ein Absorptionswert von 1,0 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm einer DNA-Konzentration von 50 µg / ml. Bei sehr reinen DNA-Lösungen liegt der Quotient aus Absorption bei 260 nm und 280 nm zwischen 1,8 und 1,95. Niedrigere Werte sind ein Indiz für die Anwesenheit von Proteinen und Verunreinigungen mit Phenol. Werte, die größer als 2,0 sind, können ein Hinweis auf die Anwesenheit von RNA sein.

3.2.5. Nested PCR-Assay

Zur Amplifizierung von AAV/AAVS1-Fusionssequenzen wurde eine nested PCR durchgeführt. Dazu wurden 0,5 µg genomische DNA in 50 µl Gesamtvolumen mit 200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 200 nM Primer Außen (AAVS1), 200 nM Primer 16s (ITR), 2,5 U Platinum Taq-Polymerase (Gibco, Karlsruhe) in 50 µl Polymerase-Puffer unter folgenden Bedingungen amplifiziert: eine initiale Denaturierung für 2 min bei 94°C und 30 Zyklen bestehend aus jeweils 1 min 94°C, 1 min 55°C Primer-Annealing und 2 min 72°C Elongation. 10 µl dieser PCR dienten als Template für eine zweite PCR, deren Reaktionsmix identisch war. Statt der oben genannten Primer fanden jedoch die weiter innen liegenden Primer Cr2 (AAVS1) und P3 (ITR) Verwendung. Die PCR-Bedingungen waren gleich, bis auf die Annealing-Temperatur, die hier bei 65°C lag.

Die PCR –Produkte wurden anschließend mit gleichem Volumen Chloroform gereinigt, auf ein 1,4%-iges Agarosegel aufgetragen und 2 h bei 120 V aufgetrennt.

3.2.6. Southern Blot

Um die Spezifität der PCR-Produkte festzustellen, wurde die DNA auf eine Nylon-Membran übertragen und ein Southern-Blot durchgeführt. Zunächst wurde das Gel für 4 min in 0,25 N HCl depuriniert und anschließend 2 mal 25 min in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl denaturiert. Dann wurde das Gel 2 mal 25 min in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris, 3 M NaCl pH 7,0) gewaschen. Für den Transfer wurde in eine Glaswanne 20xSSC (3 M NaCl, 0,3 M tri-Na-Citrat-dihydrat pH 7) gefüllt und eine Glasplatte daraufgelegt. Zwei lange mit SSC getränkte Streifen Whatman-Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) wurden so über die Glasplatte gelegt, daß die Enden an beiden Seiten in den Puffer tauchten. Dann wurde das Gel mit der Oberseite nach unten darauf gelegt, anschließend die auf Gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran (GeneScreen Plus, Du Pont, Bad Nauheim) und 2 getränkte sowie 2 trockene Filterpapiere in Gelgröße. Es wurde darauf geachtet, daß keine Luftblasen vorhanden waren. Auf die Filterpapiere kam noch ein Stapel Papierhandtücher und eine Glasplatte mit einem Gewicht von etwa 500 g. Nach dem DNA-Transfer über Nacht wurde die Membran kurz in bidest gespült. In noch feuchtem Zustand wurde die DNA durch UV-Crosslinking in einem Stratalinker (Stratagene, Heidelberg) auf der Membran fixiert.

3.2.7. Nicht-radioaktive Markierung von DNA

Zur Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde wurde 1 µg DNA in 16 µl bidest durch 10 minütiges Erhitzen und schnelles Abkühlen denaturiert. Es wurden 4 µl DIG High Prime (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche, Mannheim) addiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch 10 minütige Inkubation bei 65°C.

3.2.8. Hybridisierung von DNA auf Nylonmembranen

Die Membran wurde eingeschweißt und 2 h mit 35 ml Hybridisierungspuffer (45% Formamid, 5xSSC (siehe 3.2.6.), 50 mM Na PO₄ pH7, 2% Blocking Reagenz (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II), 0,1% Sodiumlaurylsarcosinat, 7% Sodiumdodecylsulfat) prähybridisiert. Die DIG-markierte Sonde wurde 5 min in kochendem

Wasser denaturiert und im NaCl-Eisbad abgekühlt. Der Blot wurde mit 20-100 ng der Probe in 4 ml Hybridisierungspuffer über Nacht bei 42°C schüttelnd hybridisiert.

Dann wurde 2x 5min bei Raumtemperatur in 2x SSC, 0,1% SDS und anschließend 2x 15 min bei 68°C in 0,1x SSC, 0,1% SDS gewaschen. Die Detektion beruht auf einer Lumineszenzreaktion und erfolgte nach Herstellerangaben (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II).

3.2.9. Real time PCR-Assay zum Nachweis ortsspezifischer Integration

Mit Hilfe des real time PCR-Assays kann Integration von AAV-2 in die AAVS1-Sequenz auf humanem Chromosom 19 quantitativ nachgewiesen werden. Dazu werden die Virus/Chr. 19-Fusionssequenzen amplifiziert und in Echtzeit detektiert. Da die genaue Integrationsstelle in einem Pool von genomischer DNA je nach Integrationsereignis variiert, variiert ebenfalls die Länge der PCR-Produkte um einige 100 bp. Dieser Umstand macht eine herkömmliche quantitative PCR mit anschließendem visuellem Vergleich der Bandenstärken von Probe und Standard unmöglich. Werden zur Detektion spezielle Hybridisierungsoligonukleotide verwendet, bekommt man ein Signal, daß proportional zur Konzentration der Produkte jedoch unabhängig von deren Länge ist. Die LightCycler Technologie stellt das Detektionsformat der Hybridisierungsproben zur Verfügung und verbindet es gleichzeitig mit den Vorzügen einer real time PCR, die eine Quantifizierung in sehr kurzer Zeit ermöglicht. Zudem kann mit diesem Format sehr wenig Template auf einem hohen Hintergrund von genomischer DNA amplifiziert und detektiert werden.

3.2.9.1. Nachweis der Fusionssequenzen von Chromosom 19 mit der cap-nahen (rechten) ITR

Um die Sensitivität des Assays zu erhöhen, wurden die Proben in einem Perkin-Elmer 9600 cyclor präamplifiziert.

Präamplifikation

1 µg der gereinigten DNA wurden in 50 µl Polymerase-Puffer mit 2,5 U Platinum Taq Polymerase (Gibco, Karlsruhe) und 200 µM dNTP (Pharmacia Biotech, USA), 1,5 mM MgCl₂, 200 nM Primer 17s (AAV-ITR) und 200 nM Primer LCAssay (AAVS1) präamplifiziert. Die Bedingungen waren folgende: 2 min 94 °C Prädenaturierung, 20 Zyklen je 1 min 94 °C, 1 min 56 °C und 3 min 72 °C sowie eine finale Elongation von 10 min 72 °C.

Das linearisierte Plasmid pAAVS1-TR diente als externer homologer Standard und wurde bei jedem PCR-Lauf in Verdünnungen von 10², 10³, 10⁴ und 10⁵ Kopien/Ansatz (siehe 3.2.9.1.1.) jeweils mit 1µg genomischer HeLa-DNA als Hintergrund in gleicher Weise wie die Proben amplifiziert.

Real-time LightCycler PCR

Mit einem Aliquot von 2 µl der Präamplifikation wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl eine real-time PCR durchgeführt. Der Reaktionsmix enthielt die Polymerase mit Puffer (Mix Fast start hybridization probes, Roche, Penzberg), 4 mM MgCl₂, 500 nM Primer 17s, 500 nM Primer LCAssay, 200 nM Donoroligonukleotid (TIB Molbiol, Berlin) und 200 nM Akzeptoroligonukleotid (TIB Molbiol). Zu Beginn wurde die Polymerase für 10 min bei 95°C aktiviert. Es folgten 45 Zyklen von je 10 sec 95°C, 8 sec 56°C und 30 sec 72°C.

Bei beiden PCR-Amplifikationen war die Annealing-Temperatur höher als die Schmelztemperatur der Primer, um sehr stringente Bedingungen zu schaffen und Nebenprodukte möglichst auszuschließen.

Die Zeit für die Elongation wurde verhältnismäßig hoch gewählt, damit auch Integrationsereignisse, die weiter entfernt vom AAVS1-Primer stattfanden, ausreichend effizient amplifiziert wurden.

3.2.9.1.1. *Berechnung der Kopiezahl des Standardplasmides anhand der optischen Dichte*

Die Quantifizierung der Integrationsereignisse wurde anhand des eine künstliche ITR/AAVS1-Fusionssequenz tragenden Standardplasmides pAAVS1-TR vorgenommen. Es kam in linearisierter Form als homologer externer Standard zum Einsatz. Die Konzentration der Plasmidlösung wurde über die Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt. Bei doppelsträngiger DNA entspricht 1 OD_{260 nm} einer Konzentration von 50 µg/ml. Auf die Kopiezahl pro Volumeneinheit wurde wie folgt umgerechnet: Das Molekulargewicht von doppelsträngiger DNA wird mit dem durchschnittlichen Gewicht eines Basenpaares von 660 Dalton berechnet. Daraus ergibt sich, daß 1 µg von 1000 bp 1,52 pmol bzw. 1 µg von 3990 bp 0,381 pmol= $3,81 \times 10^{-13}$ mol entsprechen. Da ein Mol zu $6,23 \times 10^{23}$ Molekülen definiert ist, ergibt sich Folgendes: 1 µg von 3990 bp= $3,81 \times 10^{-13} \times 6,23 \times 10^{23}$ Kopien= $2,4 \times 10^{11}$ Kopien. Anhand dieser Kalkulation wurden entsprechende serielle Verdünnungen des Standards mit bekannten Kopiezahlen hergestellt.

3.2.9.2. Nachweis der Fusionssequenzen von Chromosom 19 mit der rep-nahen (linken) ITR

Um zu determinieren, ob AAV-2 bei der ortspezifischen Integration eine Orientierung präferiert, wurde ein zweiter PCR-Assay etabliert, der die linke AAV-ITR detektiert.

Die Amplifikation erfolgte hier ebenfalls in zwei Schritten. Es wurden jedoch die Primer AAV2-LTR und IntegrAAVS1 eingesetzt. Damit änderte sich auch die Annealing-Temperatur, die hier bei 62°C lag.

Präamplifikation

Die sonstigen Reaktionsbedingungen blieben denen der Amplifikation der rechten ITR/AAVS1-Fusionssequenzen identisch. Als Standardplasmid wurde pAAVS1-LTR eingesetzt.

Real-time LightCycler PCR

Der Reaktionsmix enthielt 3 mM MgCl₂ und ansonsten die oben beschriebenen Bestandteile. Die Amplifikationsbedingungen waren bis auf die Annealing-Temperatur wie unter 3.2.9.1. beschrieben.

3.2.10. Klonierung der PCR Produkte

Die PCR-Produkte wurden mit dem qiaquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Anweisungen des Herstellers gereinigt. Sollten bestimmte Fragmentgrößen kloniert werden, wurden die Produkte über ein Agarosegel aufgetrennt, der interessierende Bereich ausgeschnitten und mit Qiaex II (Qiagen) gereinigt. 4 µl gereinigtes PCR-Produkt wurden mit 1 µl pCR4-TOPO (Invitrogen, Groningen, Niederlande)) nach Anweisungen des Herstellers fusioniert. Taq Polymerase hat eine templateunabhängige terminale Transferaseaktivität und hängt häufig an das 3'-Ende von PCR-Produkten Desoxyadenosin (A) an. Der verwendete linearisierte Vektor hat ein überhängendes 3'-Desoxythymidin- (T) Ende, an welches Topoisomerase I kovalent gekoppelt ist. Die 5'-Hydroxylgruppe des PCR-Produkts greift die kovalente Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des T-Endes und der Topoisomerase an, was zur Freisetzung der Topoisomerase und zur schnellen kovalenten Verknüpfung zwischen Vektor und PCR-Produkt führt.

Da in dem Fast start mix der real-time PCR das Nukleotid Desoxyuridintriphosphat (dUTP) statt Desoxythymidintriphosphat (dTTP) enthalten ist (ermöglicht „carry over“-Prävention in einer PCR durch Behandlung mit hitze-labiler Uracil-DNA Glycosylase), wurden die real-time PCR-Produkte in Uracil-N-Glycosidase (UNG)-negative *E.coli* CJ236 transformiert. UNG-positive *E.coli* würden die transformierte Uracil-enthaltende DNA abbauen. Wenn statt der real-time PCR zur Klonierung eine zweite Blockcycler-PCR durchgeführt wurde, wie im Falle der verpackten Fusionssequenzen und der rechten ITR/AAVS1-Fusionssequenzen, wurde laut Herstellerangaben in *E.coli* TOP10 transformiert.

3.2.11. Analyse der PCR Produkte

Die Bakterienkolonien wurden durch PCR auf Vorhandensein der ITR/AAVS1-Fusionssequenzen überprüft. Anschließend wurde Plasmid-DNA aus 25 ml Kultur im Midi-Maßstab präpariert.

Anhand eines *EcoRI* Restriktionsverdau und anschließender Analyse im Agarosegel, wurde die Größe der insertierten Fragmente bestimmt.

Mit den Plasmiden wurde eine DNA-Sequenzierung durchgeführt (MWG Biotech, Ebersberg).

3.2.12. Kontrolle der Effizienz des Benzonaseverdauschnittes bei der Reinigung von Virusstocks

Während der Reinigungsprozedur einer AAV-Präparation soll die Benzonase freie, nicht verpackte DNA effizient abbauen. Die Effizienz des Benzonaseverdauschnittes wurde durch enzymatischen Abbau von definiert zugegebener Plasmid-DNA zu einer AAV-negativen Kontrollpräparation evaluiert.

1 ml eines hochgereinigten AAV-2 Stocks und 1 ml einer AAV-negativen Kontrollpräparation, die mit 4×10^7 Kopien des linearisierten pAAVS1-TR versetzt wurde, wurden mit 250 U Benzonase für 30 min bei 37°C inkubiert.

Um die Benzonase abzutrennen, wurden die Virionen für 2 h bei 120.000xg in einer Mini-Ultrazentrifuge (Sorvall RC M120 GX, Ausschwingrotor S55S, Sorvall, Bad Homburg) pelletiert. Das Pellet wurde in 2 ml PBS aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Kontrollen ohne den Benzonaseschritt wurden in gleicher Weise durchgeführt. Nach dem aufnehmen in 300 µl TE, wurde die DNA isoliert und mit Hilfe des real-time PCR-Assays für die rechte ITR analysiert.