

Aus dem Institut für Virologie  
Campus Benjamin Franklin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Rekombinante Adeno-assoziierte Virusvektoren für die  
Expression der  $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marc Alexander Plauth

aus Tübingen

Datum der Promotion: 22.06.2014

**Für meine Familie & Juliane**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abstrakt /Abstract</b>	<b>1</b>
<hr/>		
1.1	Abstrakt	1
1.2	Abstract	3
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<hr/>		
2.1	<b>Das Adeno-assoziierte Virus</b>	<b>5</b>
2.1.1	Übersicht	5
2.1.2	Vorkommen	5
2.1.3	Genomaufbau und AAV-Proteine	6
2.1.4	Lebenszyklus	7
2.1.4.1	Latente Infektion	7
2.1.4.2	Produktive Infektion	8
2.1.5	Virale Helferfunktionen	9
2.2	<b>Rekombinante AAVs als Vektorsystem für den Gentransfer</b>	<b>10</b>
2.2.1	Übersicht	10
2.2.2	Herstellung rekombinanter AAV-Vektoren	11
2.2.3	Selbstkomplementäre ( <i>sc</i> ) AAV-Vektoren	12
2.2.4	AAV-Vektoren für den Gentransfer ins ZNS	12
2.3	<b>Virale Vektoren und funktionelle Genanalyse</b>	<b>14</b>
2.3.1	Das Cre-Lox-System	14
2.3.2	RNA-Interferenz	15
2.4	<b>Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor</b>	<b>16</b>
2.4.1	Übersicht	16
2.4.2	Struktur	16
2.4.3	Pharmakologie	17
2.4.4	Die Benzodiazepinbindungsstelle	17
2.5	<b>Zielsetzung</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>Materialien &amp; Geräte</b>	<b>20</b>
<hr/>		
3.1	Geräte	20
3.2	Chemikalien & Reagenzien	21
3.3	Kits	22
3.4	Antikörper	22
3.5	Plasmide	23

<b>3.6</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>25</b>
<b>3.7</b>	<b>Bakterienstämme</b>	<b>25</b>
<b>3.8</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>26</b>
<b>3.9</b>	<b>Viren</b>	<b>26</b>
<b>3.10</b>	<b>Computersoftware</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
<hr/>		
<b>4.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>27</b>
4.1.1	Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien	27
4.1.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	27
4.1.3	Minipräparation von Plasmid-DNA	28
4.1.4	Präparation von Plasmid-DNA in größerem Maßstab	29
4.1.5	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	30
4.1.6	Ethanol-Fällung von DNA	30
4.1.7	Restriktionsverdau von DNA	30
4.1.8	Agarosegelelektrophorese	31
4.1.9	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
4.1.10	Ligation von DNA	33
4.1.11	Amplifikation von DNA mittels PCR	34
<b>4.2</b>	<b>Zellkulturtechnik</b>	<b>35</b>
4.2.1	Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien	35
4.2.2	Haltung, Passagieren und Aussäen von Zellen	35
4.2.3	Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Kopräzipitation	36
4.2.4	Transfektion mittels FuGENE® HD	37
4.2.5	Infektion von Zellen	37
4.2.6	Transfektion mit anschließender Infektion	37
4.2.7	Herkömmliche Proteinextraktion	38
4.2.8	Proteinextraktion mit Hilfe des NuPAGE-Systems	39
4.2.9	FACS-Analyse von 293-Zellen	39
<b>4.3</b>	<b>Herstellung und Aufreinigung rekombinanter AAVs</b>	<b>40</b>
4.3.1	Transfektion	40
4.3.2	Virusernte	41
4.3.3	Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation	41
4.3.4	Heparin-Agarose-Affinitätschromatographie	42
4.3.5	Ionenaustauschchromatographie	42
4.3.6	Quantifizierung von rAAV-Präparationen mittels quantitativer real-time PCR	43
4.3.7	Dialyse	44
<b>4.4</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>45</b>
4.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen	45

## Inhaltsverzeichnis

---

4.4.2	NuPAGE	47
4.4.3	Western Blot	48
4.4.4	Immunfluoreszenz und Autofluoreszenz	50
<b>4.5</b>	<b>Methoden zur Anwendung am Versuchstier</b>	<b>52</b>
4.5.1	Stereotaktische Injektion	52
4.5.2	Fixieren von Gehirnen durch transkardiale Perfusion mit 4% Paraformaldehyd	53
4.5.3	Einfrieren von Gehirnen	53
4.5.4	Anfertigung von Hirnschnitten	54
4.5.5	Färbung von Hirnschnitten mit Cresylviolett	54
4.5.6	Indirekte Immunhistochemie	55
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
<b>5.1</b>	<b>Herstellung eines rAAV-Vektors für die Expression der <math>\gamma 2</math>-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors als Fusionsprotein mit EGFP</b>	<b>58</b>
5.1.1	Herstellung eines rAAV-Vektors unter Verwendung des $\gamma 2$ EGFP-Leserahmens aus dem Plasmid $\gamma 2$ EGFP-pCi	58
5.1.1.1	Klonierung des Vektorplasmides für die rAAV-Herstellung	58
5.1.1.2	Expression des $\gamma 2$ EGFP-Fusionsproteins nach Transfektion des Vektorkonstruktes in Zellkultur	59
5.1.1.3	Verpackung des Vektorkonstruktes in rAAVs	63
5.1.2	Herstellung eines rAAV-Vektors mit optimiertem $\gamma 2$ EGFP-Leserahmen	65
5.1.2.1	Klonierung des Vektorkonstruktes mit optimiertem Leserahmen	65
5.1.2.2	Expression des $\gamma 2$ EGFP-Fusionsproteins nach Transfektion des Konstruktes mit optimiertem Leserahmen	66
5.1.2.3	Verpackung des Vektorkonstruktes mit optimiertem Leserahmen mit Kotransfektion eines Konstruktes zur Expression einer shRNA zur Suppression der $\gamma 2$ EGFP-Expression im Verpackungsansatz	67
5.1.2.4	Expression des $\gamma 2$ EGFP-Proteins durch den rAAV-Vektor mit optimiertem Leserahmen	69
<b>5.2</b>	<b>Herstellung eines AAV-Vektors für die Expression der Cre- Rekombinase</b>	<b>71</b>
5.2.1	Klonierung eines Vektorkonstruktes für die Expression der Cre-Rekombinase	71
5.2.2	Expression der Cre-Rekombinase nach Transfektion des Vektorkonstruktes	72
5.2.3	Verpackung des Vektorkonstruktes in rAAV-Vektoren	72
5.2.4	Expression der Cre-Rekombinase nach Infektion mit rAAV-Vektoren	73
<b>5.3</b>	<b>Herstellung eines AAV-Vektors für die kombinierte Expression des <math>\gamma 2</math>EGFP-Proteins und der Cre-Rekombinase</b>	<b>74</b>
5.3.1	Klonierung des Vektorkonstruktes	75
5.3.2	Expression der Transgene nach Transfektion des Vektorkonstruktes	77

## Inhaltsverzeichnis

---

5.3.2.1	Expression des $\gamma$ 2EGFP-Proteins	77
5.3.2.2	Expression der Cre-Rekombinase	78
5.3.3	Herstellung von bicistronischen rAAV-Vektoren	79
5.3.4	Expression der Transgene durch bicistronische rAAV-Vektoren nach Infektion in Zellkultur	79
5.3.4.1	Expression des $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins nach Infektion mit rAAVs in Zellkultur	80
5.3.4.2	Expression der Cre-Rekombinase nach Infektion mit rAAVs in Zellkultur	81
<b>5.4</b>	<b>Untersuchungen zur Funktionalität der exprimierten Proteine <i>in-vitro</i></b>	<b>82</b>
5.4.1	Lokalisation des $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins auf Einzelzellebene nach Plasmidtransfektion in Zellkultur	82
5.4.2	Überprüfung der Funktionalität der durch rAAV-Vektoren exprimierten Cre-Rekombinase	84
5.4.2.1	Klonierung des Reporterkonstruktes	85
5.4.2.2	FACS-Analyse	86
<b>5.5</b>	<b><i>In-Vivo</i> Expression des <math>\gamma</math>2EGFP-Fusionsproteins und der Cre-Rekombinase in der Maus</b>	<b>88</b>
5.5.1	<i>In-Vivo</i> Expression der Cre-Rekombinase	88
5.5.2	<i>In-Vivo</i> Expression von $\gamma$ 2EGFP	89
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>91</b>
<b>6.1</b>	<b>Beschleunigte Expressionskinetik durch AAV-Cre <i>in-vitro</i></b>	<b>91</b>
<b>6.2</b>	<b>Geringes Expressionsniveau durch AAV-Cre <i>in-vivo</i></b>	<b>93</b>
<b>6.3</b>	<b>Herstellung eines Vektors für die Expression des <math>\gamma</math>2EGFP-Fusionsproteins und der Cre-Rekombinase</b>	<b>96</b>
<b>6.4</b>	<b>Konzeption eines alternativen rAAV-Vektors für die Expression des <math>\gamma</math>2EGFP-Proteins und der Cre-Rekombinase</b>	<b>98</b>
6.4.1	Wahl des Promoters	98
6.4.2	Alternative Technologien für die Konstruktion bicistronischer Vektoren	99
6.4.3	Wahl des AAV-Serotyps	100
<b>6.5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>113</b>
<b>8.1</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>113</b>
<b>8.2</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>114</b>
<b>8.3</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>116</b>
<b>8.4</b>	<b>Danksagung</b>	<b>117</b>

## Abkürzungsverzeichnis

(E)GFP	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>
(r)AAV	(rekombinantes) Adeno-assoziiertes Virus
AAP	<i>assembly activating protein</i>
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
at	Technische Atmosphäre
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CBA	Chicken Beta-Aktin
CIP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CMV	Cytomegalievirus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMCV	Enzephalomyokarditis Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	fetales Kälberserum
GABA	Gammaaminobuttersäure
h	Stunde
HPV	Humanes Papillomvirus
HSV	Herpes Simplex Virus
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
M	molar
min	Minute
miRNA	<i>micro RNA</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-morpholino)Propansulfonsäure
NSE	Neuron-spezifische Enolase
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PolyA	Polyadenylierungsstelle
RBE	<i>rep binding element</i>
RISC	<i>rna-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
sc	selbstkomplementär
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ss	einzelsträngig
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
trs	<i>terminal resolution site</i>
UV	ultraviolett
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
$\gamma$ 2EGFP	Fusionsprotein aus $\gamma$ 2 -Untereinheit des GABA <sub>A</sub> -Rezeptors und EGFP



## 1. Abstrakt / Abstract

### 1.1 Abstrakt

Adeno-assoziierte Virusvektoren transduzieren postmitotische Zellen mit hoher Effektivität, bewirken eine stabile Langzeitexpression von Transgenen und gelten daher als besonders geeignet für den Gentransfer in das ZNS.

ILox-F77i-Mäuse sind durch eine Punktmutation im Gen der  $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors unempfindlich gegenüber den meisten Benzodiazepinen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten AAV-Vektoren generiert werden, die nach stereotaktischer Injektion, durch fokale Expression der Cre-Rekombinase, eine Exzision des punktmutierten Gens bewirken und parallel eine Expression der mit EGFP markierten Wildtyp- $\gamma 2$ -Untereinheit vermitteln können.

Auf diese Weise sollte es möglich werden, in definierten Hirnarealen von iLoxF77i-Mäusen die Benzodiazepinwirkung wiederherzustellen um so die Rolle der jeweiligen Strukturen und neuronalen Schaltkreise am Zustandekommen des anxiolytischen Effektes dieser Medikamentenklasse genauer zu definieren.

Für die Herstellung der Virusvektoren wurden drei Plasmide kloniert: eines für die Expression der  $\gamma 2$ -Untereinheit mit Codon-optimiertem Leserahmen, eines für die Expression der Cre-Rekombinase und eines für eine parallele Expression beider Transgene mit Hilfe einer IRES. Nach DNA-Transfektion der Vektorplasmide in kultivierte Zelllinien konnte in Western Blots die Expression der jeweiligen Transgene nachgewiesen werden. Mittels Immunfluoreszenz konnte ferner gezeigt werden, dass das zur Expression gebracht  $\gamma 2$ EGFP in die Plasmamembran integriert wird und damit an seinen Zielort in der Zelle gelangt.

Das AAV-Cre-Konstrukt konnte mit einem Titer von bis zu  $1,4 \cdot 10^{11}$  genomischen Partikeln je ml in AAV-2-Kapside verpackt und hochgereinigt werden (AAV-Cre). Unter transienter Suppression der  $\gamma 2$ EGFP-Expression mit Hilfe einer shRNA gelang dies auch für das  $\gamma 2$ EGFP-Konstrukt mit optimiertem Leserahmen (AAV- $\gamma 2$ Opt; Titer bis zu  $1,1 \cdot 10^{12}$ ) und das bicistronische Vektorkonstrukt (AAV- $\gamma 2$ Opt-Cre; Titer bis zu  $3,2 \cdot 10^{12}$ ).

Nach Infektion mit den hochgereinigten Vektoren AAV-Cre und AAV- $\gamma 2$ Opt war die erwartete Expression des jeweiligen Transgens in kultivierten Zellen nachweisbar. Im Fall des bicistronischen AAV-Vektors konnte ausschließlich eine Expression der Cre-Rekombinase

gezeigt werden. In FACS-Analysen nach Kotransfektion eines zu diesem Zweck generierten Reporterplasmides konnte die Funktionalität der AAV-Vektor-basierten Cre-Rekombinase nachgewiesen werden. *In-vivo* wurde die Expression von  $\gamma$ 2EGFP und Cre-Rekombinase nach stereotaktischer Injektion von AAV-Vektoren in den dorsalen Hippocampus von Wildtyp- bzw. iLoxF77i-Mäusen nachgewiesen. Die funktionellen Analysen der transduzierten Mäuse laufen (Kooperation AG Prof. Sperk, Innsbruck).

Die Arbeit zeigt, dass in zentral-nervalen Strukturen die fokale Wiederherstellung einer durch Punktmutation verlorenen Benzodiazepinbindung durch AAV-Vektor-Transduktion möglich ist. Einschränkend ist festzuhalten, dass die Effizienz der in dieser Arbeit hergestellten und eingesetzten Vektoren noch unbefriedigend ist. Unter Einsatz zwischenzeitlich entwickelter Vektortechnologien, wie der FMDV-2A-Sequenz für die bicistronische Genexpression und weiter optimierter Promoter könnte ein AAV-Vektor mit deutlich höherer Effizienz generiert werden.

## 1.2 Abstract

Adeno-associated viral vectors efficiently transduce post-mitotic cells, establish a stable long-term gene expression and are thus considered to be highly suitable for gene transfer to the CNS.

iLox-F77i-mice carry a point mutation rendering them insensitive towards most benzodiazepines.

The goal of this study was to construct AAV-Vectors that, following stereotactic injection, would be able to achieve an excision of the point-mutated gene through focal Expression of the Cre-recombinase and a parallel expression of the wild-type  $\gamma 2$ -subunit tagged with EGFP. Thus, one would become able to re-establish benzodiazepine-sensitivity in defined areas of the brain of iLoxF77i-mice in order to investigate the respective role of certain structures and neuronal circuits with respect to the anxiolytic effect of this substance class.

For the production of AAV-vectors, three plasmids were cloned: one for the expression of the  $\gamma 2$ EGFP fusion-protein with a codon-optimized ORF, one for the expression of the Cre-recombinase and one for the parallel expression of both transgenes using an IRES.

After DNA-transfection of the vector plasmids into cultured cells, expression of the respective transgenes could be detected by western blot analysis.

An immunofluorescence-assay showed that  $\gamma 2$ EGFP was incorporated into the plasma-membrane, thus reaching its place of action in the cell.

The AAV-cre-construct was packaged with a titre of  $1,4 \cdot 10^{11}$  genomic particles per ml into AAV-2 capsids and highly purified (AAV-Cre).

Transient suppression of  $\gamma 2$ EGFP-expression achieved by an shRNA enabled the same for the  $\gamma 2$ EGFP-construct (AAV- $\gamma 2$ Opt; titre up to  $1,1 \cdot 10^{12}$  genomic particles per ml) and the bicistronic vector-construct (AAV- $\gamma 2$ Opt-Cre; titre up to  $3,2 \cdot 10^{12}$  genomic particles per ml). Following infection of cultured cells with the highly purified vectors AAV-Cre and AAV- $\gamma 2$ Opt, expression of the respective transgene could be detected. In the case of the bicistronic vector, however, only cre-expression could be detected.

With the help of a reporter-plasmid, the functionality of AAV-vector-based cre-recombinase could be shown in a FACS-assay.

*In-vivo* expression of  $\gamma$ 2EGFP and Cre-recombinase following stereotactic injection of AAV-vectors into the dorsal hippocampus of mice could be demonstrated. Functional analysis of transduced mice is currently under way (Cooperation AG Prof. Sperk, Innsbruck).

This study shows, that focal re-establishing of benzodiazepine binding capability lost by point mutation in central nervous structures through AAV-vector transduction is possible.

However, the efficiency of the vectors produced in this study is still unsatisfying.

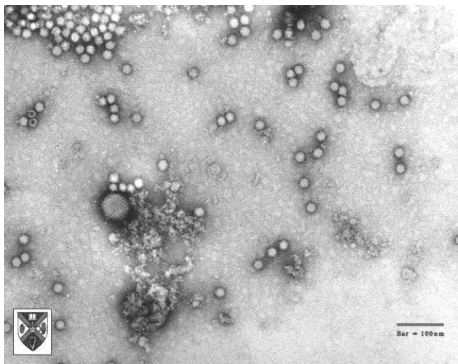
Using recent vector technologies, such as the FMDV-2A sequence for bicistronic gene expression or an optimised promoter, an AAV-vector with higher efficiency could be generated.

## 2. Einleitung

### 2.1 Das Adeno-assoziierte Virus

#### 2.1.1 Übersicht

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV) wurde erstmals 1965 als Kontamination von Adenoviruspräparationen bei deren elektronenmikroskopischer Analyse entdeckt<sup>1, 2</sup>. Es gehört zur Subfamilie Parvovirinae der Familie Parvoviridae und besitzt ein einzelsträngiges



**Abb. 2.1:**  
**Elektronenmikroskopische Aufnahme von AAV-Typ 2 und Adenovirus.**

Die zahlreichen kleineren Partikel sind AAVs. Der größere Partikel ist ein Adenovirus  
([www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/images/index.htm](http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/images/index.htm)).

DNA-Genom von ca. 4,7 Kilobasen (kB), welches in ein ikosaedrisches Kapsid ohne Lipidhülle verpackt ist<sup>3</sup>. Als Mitglied des Genus der Dependoviren benötigt AAV für einen produktiven Infektionszyklus die Ko-Infektion mit einem weiteren Virus. Als sogenanntes Helfervirus können dabei das Adenovirus, Herpes Simplex Virus (HSV) Typ 1, Typ 2 und Typ 6, Cytomegalievirus (CMV), sowie Humane Papillomviren (HPV) dienen<sup>1, 2, 4-7</sup>. In Abwesenheit eines Helfervirus etabliert AAV eine latente Infektion und integriert entweder in das Wirtsgenom oder persistiert extrachromosomal<sup>8-10</sup>.

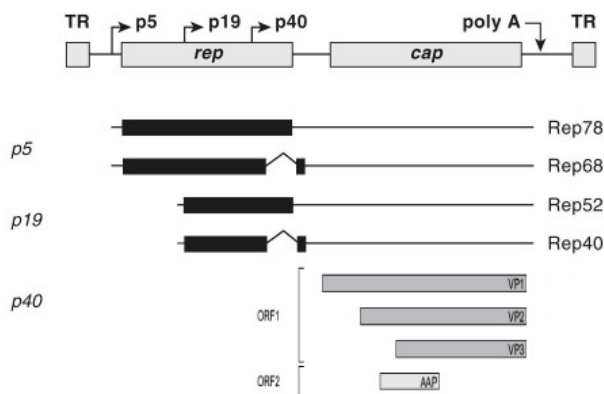
#### 2.1.2 Vorkommen

Bisher wurden 12 Serotypen von AAV identifiziert (AAV-1 bis AAV-12)<sup>3, 11</sup>. AAV-2 ist bisher am intensivsten untersucht und viele der Erkenntnisse über die Biologie des Virus beziehen sich streng genommen auf diesen Serotyp. Bis zu 80% der erwachsenen Bevölkerung weisen Antikörper gegen einen oder mehrere Serotypen von AAV auf, wobei die Serokonversion oft schon im Laufe der Kindheit eintritt<sup>12-15</sup>. Das Virus konnte beim Menschen in Muskelbiopsien, peripheren Blutzellen sowie in Zellen des Urogenitaltraktes nachgewiesen werden<sup>3, 15, 16</sup>. Trotz der hohen Seroprävalenz und seinem Vorkommen in den

unterschiedlichsten Geweben, konnte AAV bisher nicht mit einer Krankheit in Verbindung gebracht werden und gilt somit als apathogen<sup>17</sup>.

### 2.1.3 Genomaufbau und AAV-Proteine

Das lineare, einzelsträngige Genom von AAV-2 umfasst 4679 Basen, enthält drei *open reading frames* (ORF) und drei Promotoren. Der auf der Genkarte links gelegene ORF wird als *rep* bezeichnet. Mit Hilfe der Promotoren p5 und p19, sowie durch alternatives Spleißen kodiert er für die vier regulatorischen AAV-Proteine. Diese wurden nach ihrem scheinbaren Molekulargewicht im SDS-Polyacrylamidgel Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40 benannt<sup>18</sup>. Die Transkription des rechts gelegenen ORF, *cap*, steht unter Kontrolle des p40 Promoters.



Durch die Verwendung eines alternativen Startcodons und durch alternatives Spleißen kodiert dieser ORF für die drei Kapsidproteine VP1-VP3<sup>19</sup>. Der dritte ORF wurde erst kürzlich entdeckt und stellt einen alternativen Leserahmen im *cap*-Bereich dar. Er kodiert für das *assembly-activating protein* (AAP), welches die VP-Proteine zum Nucleolus der Wirtszelle dirigiert und die Bildung der AAV-Kapside ermöglicht<sup>20</sup>. Die ORFs werden von identischen, 145

**Abb. 2.2: Genomaufbau und Transkripte**

Im oberen Teil ist das AAV-Genom schematisch mit den beiden ORFs *rep* und *cap*, den Promotoren p5, p19 und p40, sowie den beiden ITRs abgebildet. Darunter sind die Transkripte dieser beiden, sowie des alternativen *cap*-ORFs dargestellt (Abb. modifiziert nach<sup>3,20</sup>).

Basenpaare (bp) umfassenden, repetitiven Sequenzen, den sogenannten *inverted terminal repeats* (ITRs) flankiert. Diese bilden durch selbstkomplementäre Basenpaarung eine T-förmige Sekundärstruktur aus<sup>21</sup>. Sie beinhalten die als *rep binding elements* bezeichneten Motive RBE & RBE' und die so genannte *terminal resolution site* (trs). Die ITRs sind essentiell für die DNA-Replikation, die Verpackung der Virusgenome in Kapside, die Integration ins Wirtsgenom und für die AAV-Genexpression<sup>3</sup>.

### 2.1.4 Lebenszyklus

Die Route einer natürlichen Infektion mit AAV ist bisher nicht geklärt, wobei eine Aufnahme des Virus über den respiratorischen oder gastrointestinalen Trakt diskutiert wird<sup>3</sup>. Wie bei den anderen Parvoviren erfolgt die Infektion einer Zelle durch AAV über rezeptorvermittelte Endozytose und *clathrin-coated pits*<sup>22</sup>. Für AAV-2 konnten Heparansulfatproteoglykan (HSPG) und *human fibroblast growth factor receptor 1*, für AAV-4 und -5 Sialinsäure als zelluläre Rezeptoren identifiziert werden<sup>23-25</sup>. Zusätzlich wurde 37/67 Kilodalton Laminin als weiterer Rezeptor für die AAV-Serotypen 8, 2, 3 und 9 beschrieben<sup>26</sup>. Die AAV-Partikel verlassen das Endosom über einen bisher unklaren Mechanismus und werden z. T. mit Hilfe tubulärer Motorproteine zum Zellkern transportiert. Hier erfolgt die Freisetzung des viralen Genoms („*uncoating*“) <sup>22,27</sup>.

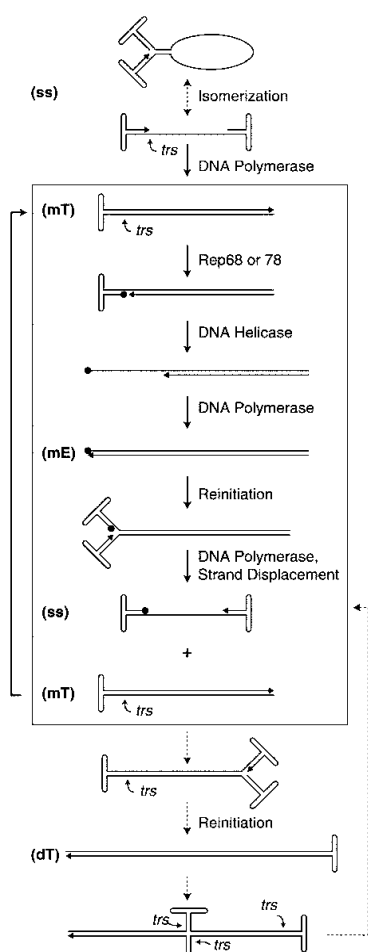
#### 2.1.4.1 Latente Infektion

In Abwesenheit eines Helfervirus etabliert AAV eine latente Infektion<sup>28</sup>. Nach dem *uncoating* und der Umwandlung des einzelsträngigen AAV-Genoms in die transkriptionskompetente, doppelsträngige Form, kommt es zur Synthese einer geringen Menge von Rep-Proteinen, welche in Folge den p5- und den p19-Promoter inhibieren und so eine weitere Genexpression verhindern<sup>29,30</sup>. Das virale Genom integriert in die DNA der Wirtszelle oder persistiert als stabiles Episom<sup>8,31</sup>. Kommt es zur Integration, so findet diese vorzugsweise an einigen *hotspots*, die als AAVS1 bis AAVS3 bezeichnet werden und auf den Chromosomen 19q13.3, 5p13.3 und 3p24.3 liegen, statt<sup>10</sup>. Im Falle einer Superinfektion von latent infizierten Zellen mit einem Helfervirus geht AAV wieder in den produktiven Zyklus über („*rescue*“) <sup>8,32</sup>.

2.1.4.2 Produktive Infektion

In Anwesenheit eines Helfervirus kommt es zur gesteigerten Synthese der Rep-Proteine, welche nun als Transaktivatoren der drei AAV-Promotoren agieren<sup>30, 33</sup>. Die im Zytoplasma synthetisierten Kapsidproteine werden in den Zellkern transportiert und mit Hilfe von AAP in den Nucleolus dirigiert. Dort kommt es zur Kapsidformation und Verpackung der replizierten viralen Genome<sup>20, 34</sup>. Das Helfervirus vermittelt die Lyse der Wirtszelle und ermöglicht so die Freisetzung der AAV-Virionen<sup>28</sup>.

Durch seine Haarnadelstruktur fungiert der ITR am 3'-Ende als Primer für die DNA-Synthese



**Abb. 2.3: Modell der AAV-DNA-Replikation.**

ss: single stranded genome, trs: terminal resolution site, mE: monomer extended form, mT: monomer turnaround form, dT: dimer turnaround form (Abb. aus<sup>3</sup>)

durch zelluläre Polymerasen<sup>21</sup>. Für die Replikation des zweiten ITRs wird dessen Haarnadelstruktur durch die Helicaseaktivität der Rep-Proteine entwunden<sup>35</sup>. Das Zwischenprodukt der Replikation, die *monomer turnaround form* (mt), besteht aus einem partiell doppelsträngigen DNA-Molekül, welches am 3'-ITR kovalent verknüpft ist. Um eine Replikation des 3'-ITRs zu ermöglichen wird an der *terminal resolution site* (trs) durch die Endonucleaseaktivität der großen Rep-Proteine ein Einzelstrangbruch gesetzt („*terminal resolution*“) <sup>36</sup>. Die 3'-OH-Gruppe an der Bruchstelle dient als Ausgangspunkt für die Replikation des 3'-ITR, dessen Sekundärstruktur wie beim 5'-ITR durch die Helicaseaktivität der Rep-Proteine entwunden wird. Es entsteht ein lineares doppelsträngiges DNA-Molekül (*monomer extended form*). In einem nächsten, als *reinitiation* bezeichneten Schritt kommt es zur Rückfaltung der ITRs mit Ausbildung der Haarnadelstruktur. Auf diese Art wird ein neuer Startpunkt für die zellulären DNA-Polymerasen geschaffen und

es kommt zur so genannten *displacement synthesis* als deren Endprodukt ein komplettes, einzelsträngiges DNA-Molekül und ein, über den 3'-ITR verknüpftes, doppelsträngiges Molekül entsteht. Das einzelsträngige DNA-Genom kann nun entweder in ein Kapsid verpackt werden oder als eine weitere Replikationsmatrize dienen<sup>3</sup>.



### 2.1.5 Virale Helferfunktionen

Die für die AAV-Replikation erforderlichen Funktionen der Helferviren konnten für das Adenovirus und das Herpes-Simplex-Virus bereits identifiziert werden. Für das Adenovirus handelt es sich hierbei um das *early region 1A transactivator protein* (E1A), das 34 Kilodalton (kDa) Protein des E4 ORF6, das 55-kD-E1B-Protein, das E2A DNA-binding Protein sowie die VA1-RNA<sup>37-39</sup>. Diese adenoviralen Helferfunktionen entfalten ihre Wirkung auf die AAV-Replikation, indem sie die virale Genexpression regulieren und indem sie die Wirtszelle dazu bringen in die S-Phase überzugehen, bzw. sie in dieser Phase zu arretieren<sup>40, 41</sup>. Die für das Herpes-Simplex-Virus identifizierten Helferfunktionen, der Helicase-Primase-Komplex (UL5/UL8/UL52) und das *single-strand DNA-binding protein* ICP8 sind im Gegensatz zu den adenoviralen Helferfunktionen Replikationsproteine<sup>42</sup>.

## 2.2 Rekombinante AAVs als Vektorsystem für den Gentransfer

### 2.2.1 Übersicht

Bereits seit der Mitte der 1980er Jahre wird AAV für den Gentransfer verwendet und zählt heute zu den am häufigsten angewandten Vektoren überhaupt<sup>43</sup>. Weiterhin konnte im Jahre 2008 mit Hilfe dieses Vektorsystems einer der größten Erfolge der Gentherapie bislang erreicht werden: zwei Arbeitsgruppen gelang es, die Sehfähigkeit von Patienten mit kongenitaler Leberscher Amaurose partiell wiederherzustellen<sup>44-46</sup>. Die weite Verbreitung von AAV als Vektor für den Gentransfer beruht auf einer Reihe günstiger Eigenschaften des Wildtyp-Virus.

Trotz einer hohen Durchseuchungsrate konnte AAV bisher nicht mit einer Krankheit assoziiert werden und gilt daher als apathogen<sup>3, 17, 47</sup>. Das Virus besitzt ein breites Wirtsspektrum und ist in der Lage sowohl sich teilende, als auch postmitotische Zellen zu infizieren. So konnte mit Hilfe von rekombinanten AAV-Vektoren (rAAV) eine stabile Langzeitexpression verschiedener Transgene in Geweben wie dem ZNS, der Retina, dem Skelettmuskel und der Leber gezeigt werden<sup>17</sup>. Die Vektoren liegen dabei überwiegend als stabiles Episom im Zellkern der transduzierten Zelle vor<sup>48</sup>. Das Risiko von Genotoxizität durch insertionelle Mutagenese ist daher gering<sup>49</sup>. AAV-Vektoren induzieren nur eine milde Antwort des angeborenen Immunsystems und es kommt im Allgemeinen nicht zur Ausbildung einer signifikanten inflammatorischen Reaktion nach Vektorapplikation<sup>50</sup>.

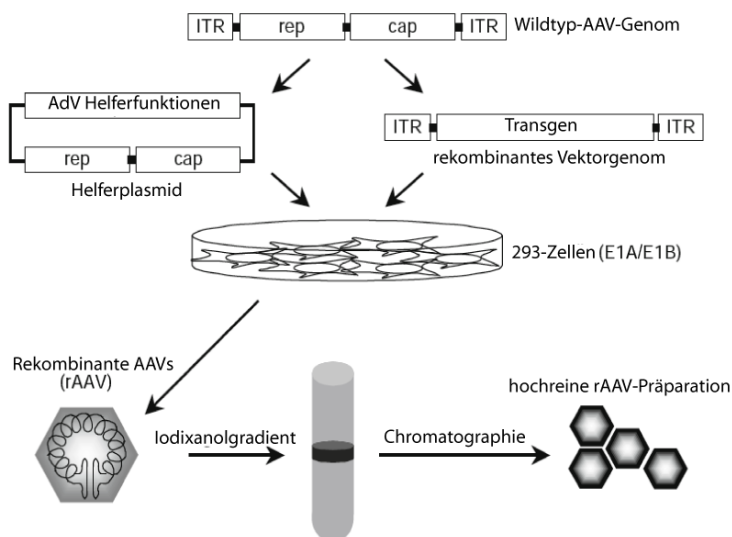
Neben diesen positiven Eigenschaften bestehen jedoch auch einige Problemen bei der Anwendung von AAV-Vektoren. Die relativ hohe Prävalenz von neutralisierenden Antikörpern in der Bevölkerung und die durch MHC-I Präsentation von Kapsidproteinen induzierte Bildung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit Elimination transduzierter Zellen sind mitunter limitierend für eine erfolgreiche therapeutische Anwendung<sup>47, 51</sup>. Die auf ca. 4,9 kB beschränkte Verpackungskapazität von AAV ist teilweise nicht ausreichend für die Expression mancher Gene<sup>52</sup>. Weiterhin weisen herkömmliche, einzelsträngige AAV-Vektoren in ruhenden oder postmitotischen Zellen eine langsame Expressionskinetik auf, da vor der Transgenexpression das einzelsträngige Vektorgenom durch zelluläre Polymerasen zur transkriptionskompetenten doppelsträngigen Form ergänzt werden muss<sup>53</sup>.

### 2.2.2 Herstellung rekombinanter AAV-Vektoren

Für die Verpackung des viralen Genoms in das AAV-Kapsid werden als einzige DNA-Sequenzen viralen Ursprungs *in cis* die ITRs benötigt<sup>54</sup>. Dies ermöglicht bei der Herstellung von rekombinanten AAVs (rAAVs) sämtliche DNA-Sequenzen zwischen den ITRs durch eine Expressionskassette für das gewünschte Transgen zu ersetzen.

Bei der gängigen Produktionsmethode im mittleren Maßstab werden die für die Verpackung benötigten Rep- und VP-Proteine, AAP, sowie die adenoviralen Helferfunktionen E2A und die VA-RNA durch Kotransfektion mit einem Helferplasmid zur Verfügung gestellt. Die Verpackungszelllinie (HEK293) ist stabil mit den beiden adenoviralen Helferfunktionen E1A und E1B transfiziert und ergänzt diese. Durch Vermeidung homologer Sequenzen zwischen Helfer- und Vektorplasmid ist bei dieser Methode die Bildung von replikationsfähigen Viren praktisch ausgeschlossen<sup>55</sup>. Für die Herstellung hochreiner AAV-Vektorpräparationen werden im Anschluss an die Virusernte eine Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation und eine Affinitätschromatographie durchgeführt.

Um eine Anwendung im ZNS von Versuchstieren *in-vivo* zu ermöglichen erfolgt zusätzlich eine Dialyse der Viruspräparation.



**Abb. 2.4: Schematische Darstellung der rAAV-Vektorproduktion**

Für die Herstellung von rekombinanten rAAV-Vektoren wird eine Expressionskassette für das gewünschte Transgen zwischen die *inverted terminal repeats* (ITR) kloniert. Ein Helferplasmid, welches die regulatorischen Rep-Proteine (rep) und die AAV Kapsidproteine (cap), sowie die adenoviralen Proteine E1A und E1B exprimiert, wird mit dem Vektorplasmid kotransfiziert und ermöglicht so die Bildung von rAAV-Partikeln. Im Anschluss an die Gewinnung eines Rohlysates wird diese per Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation und Affinitäts- bzw. Ionenaustauschchromatographie gereinigt (Abb. modifiziert nach<sup>17</sup>).

### 2.2.3 Selbstkomplementäre (sc) AAV-Vektoren

Die verzögerte Expressionskinetik einzelsträngiger rAAV-Vektoren kann umgangen werden indem man Vektor-Konstrukte für die AAV-Verpackung verwendet, die maximal 2,15 kB umfassen<sup>56</sup>. Diese werden dann bevorzugt als doppelsträngige AAV-Vektoren verpackt. Eine gezielte Mutation der *terminal resolution site* in einem der ITRs ermöglicht eine gezielte Verpackung von doppelsträngiger Vektor-DNA. Die auf diese Art hergestellten, sogenannten selbstkomplementären AAV-Vektoren zeigen ein deutlich beschleunigtes Einsetzen der Genexpression und eine effizientere Transduktion *in vitro* und *in vivo*<sup>57-59</sup>.

### 2.2.4 AAV-Vektoren für den Gentransfer ins ZNS

AAV-Vektoren sind nach stereotaktischer Applikation in der Lage, eine lang anhaltende Expression unterschiedlicher Transgene im ZNS ohne signifikante Toxizität zu bewirken<sup>11</sup>. Das mittels AAV-2-Vektoren transduzierte Zellvolumen ist dabei limitiert und fokal um den Injektionstrakt konzentriert<sup>60</sup>. Durch Verpackung von Vektorgenomen mit AAV-2 ITRs in Kapside anderer Serotypen (Pseudotypisierung) kann deren unterschiedlicher Zelltropismus ausgenutzt werden<sup>61</sup>. Mit Hilfe der Pseudotyp-Vektoren 2/1, 2/5, 2/7 und 2/8 ist es möglich, deutlich effizienter ein größeres Gewebenvolumen in verschiedenen Hirnarealen zu transduzieren<sup>62-64</sup>.

Trotz der Anwendung dieser Serotypen, und alternativer Applikationsrouten, wie intraventrikulärer oder intrathekaler Injektion konnte bislang keine globale Transduktion des Gehirns erreicht werden, wie es für eine erfolgreiche Gentherapie einiger neurologischer Erkrankungen, wie z.B. der lysosomalen Speicherkrankheiten, nötig wäre<sup>65</sup>. Berichte, nach denen unter Ausnutzung krankheitsbedingter Endothelveränderungen mit gezielter Modifikation des AAV-Kapsides ein Überschreiten der Blut-Hirnschranke möglich ist und somit eine Transduktion erkrankter Regionen des Gehirns nach intravenöser Vektorapplikation stattfinden kann, sind jedoch vielversprechend<sup>66, 67</sup>. Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass AAV-2/9-Vektoren ebenfalls in der Lage sind die Blut-Hirnschranke zu überwinden und nach intravenöser Applikation eine Transduktion von Motorneuronen im Rückenmark, bzw. eine phänotypische Besserung in einem Mausmodell zur Mucopolysaccharidose IIIB erreichen können<sup>68, 69</sup>. Für Krankheiten mit fokal umschriebener Pathologie konnten auch nach der stereotaktischen Vektorapplikation bereits

gute Ergebnisse erzielt werden. So konnten bereits mehrere klinische Phase-I-Studien zur Therapie des Morbus Parkinson mit Hilfe von AAV-Vektoren erfolgreich durchgeführt werden<sup>70-72</sup>. Auch im Falle des Morbus Alzheimer konnte eine phänotypische und pathologisch-anatomische Besserung des Krankheitsbildes nach stereotaktischer Vektorapplikation im Mausmodell gezeigt werden und eine erste klinische Studie begonnen werden<sup>73-75</sup>.

Nach der stereotaktischen Applikation von AAV-Vektoren ins ZNS kommt es nur zu einer geringen humoralen Immunantwort ohne signifikante Inflammation<sup>76, 77</sup>. Insbesondere wurde bislang keine Induktion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen beobachtet<sup>51</sup>.

Insgesamt stellt das ZNS also ein gut geeignetes Zielgewebe für den Gentransfer mit Hilfe von AAV-Vektoren dar, wobei insbesondere die Therapie fokaler Pathologien aussichtreich erscheint.

### 2.3 Virale Vektoren und funktionelle Genanalyse

Durch die Anwendung der Prinzipien der homologen Rekombination wurde es in den späten 1980er Jahren möglich, Keimzellen genetisch zu modifizieren und transgene Mäuse zu generieren<sup>78</sup>. Mit Hilfe von Mausmodellen, in denen die Expression eines bestimmten Gens ausgeschaltet wird (*knock-out*), ist es gelungen die Funktion einer Vielzahl von Genen *in-vivo* zu analysieren und die molekularen Mechanismen einer Reihe von Erkrankungen aufzuklären. Allerdings hat dieser Ansatz auch einige Limitierungen. So wirkt sich der Funktionsverlust mancher Gene bereits pränatal letal aus und eine Analyse der Genfunktion wird so unmöglich. Weiterhin ist es denkbar, dass der Verlust der Funktion eines bestimmten Gens durch veränderte Expression anderer Gene kompensiert wird und somit Rückschlüsse auf die Ursache eines beobachteten Phänotyps erschwert werden. Die Entwicklung von Systemen zur zeitlich und örtlich definierten Inaktivierung von Genen, dem so genannten *conditional knock-out*, ermöglicht es diese Probleme zu umgehen<sup>79</sup>.

#### 2.3.1 Das Cre-Lox-System

Die Cre-Rekombinase, ein 38 kDa Protein des Bacteriophagen P1, ist in der Lage DNA-Sequenzen, die von bestimmten, 34 bp langen Erkennungsmotiven, den sogenannten *loxP-Sites* flankiert sind, auszuschneiden und durch eine andere Sequenz zu ersetzen<sup>80</sup>. Das einbringen von *loxP-Sites* im Promoterbereich oder um bestimmte Exons eines Gens beeinflusst dessen Expression in Abwesenheit der Cre-Rekombinase zunächst nicht.

Mit Hilfe von viralen Vektoren kann zum gewünschten Zeitpunkt ortsspezifisch die Cre-Rekombinase exprimiert werden und so das Zielgen ausgeschnitten werden, wodurch dessen weitere Expression in den transduzierten Zellen unterbunden wird<sup>81</sup>.

### 2.3.2 RNA-Interferenz

Die Entdeckung des Phänomens der RNA-Interferenz (RNAi) 1998 eröffnete eine weitere Möglichkeit zur *in-vivo* Manipulation der Genexpression<sup>82</sup>. RNAi bezeichnet die

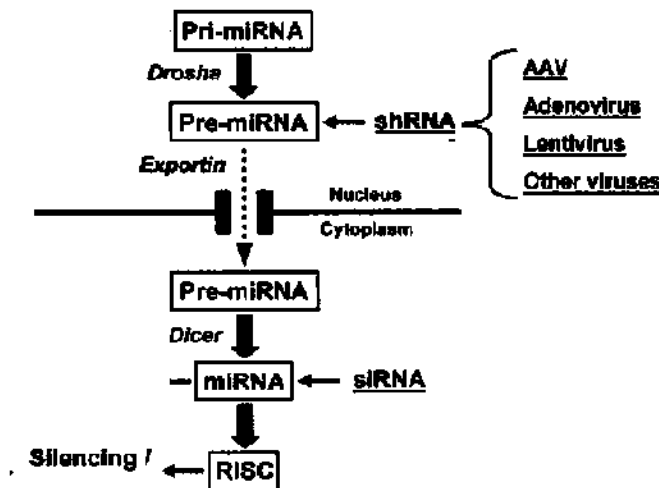


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der RNAi-Kaskade.

Die *primary microRNA* (pri-miRNA) wird durch das Enzym *Droscha* zur Pre-miRNA prozessiert. Nach dem Export in das Zytoplasma wird die Pre-miRNA durch *Dicer* zur reifen miRNA, welche in den *RNA induced silencing complex* (RISC) integriert wird. Durch Bindung an die mRNA des Zielgens kann im Anschluss deren Degradation und somit eine Suppression der Genexpression vermittelt werden. Durch virale Vektoren zur Expression gebrachte shRNAs imitieren die Pre-miRNAs (Abb. modifiziert nach<sup>83</sup>).

sequenzspezifische Inhibition der Genexpression durch doppelsträngige RNA-Moleküle in Eukaryoten. Dabei spielt sie sowohl als Abwehrmechanismus gegen Viren und Transposons, als auch für die Regulation der Expression zellulärer Gene eine Rolle. Bei Säugetieren beginnt die RNAi-Kaskade mit der

*primary microRNA* (pri-miRNA) im Zellkern. Diese wird durch das Enzym *Droscha* im Komplex mit einigen anderen Proteinen zu ca. 70 Nukleotide umfassenden pre-miRNAs prozessiert. Diese pre-miRNAs bilden eine charakteristische *stem-loop* Struktur

aus, werden in das Zytoplasma transportiert und dort durch das Enzym *Dicer* in ca. 20 Nukleotide umfassende miRNAs zerschnitten. Diese miRNAs werden dann in den *RNA induced silencing complex* (RISC) eingebaut und können nun an komplementäre mRNAs binden, die dann durch RISC degradiert werden<sup>83</sup>. Eine Möglichkeit sich der RNAi-Kaskade zur gezielten Inhibition eines bestimmten Gens zu bedienen ist die Expression von *short hairpin RNAs* (shRNA) durch Vektoren<sup>84</sup>. Dabei entsprechen die shRNAs einer 20-22 Nukleotide umfassenden Sequenz des Zielgens und einer invertierten Wiederholung ebendieser, die durch eine kurze Zwischensequenz verbunden sind und so durch Rückfaltung eine *stem-loop* Struktur ausbilden, die eine pre-miRNA imitiert. Die Anwendung von shRNAs ist dabei nicht auf die Funktionsanalyse von Genen beschränkt, sondern birgt das Potenzial zur Schaffung neuer Therapien für virale Infektionen, maligne oder neurodegenerative Erkrankungen<sup>83</sup>.

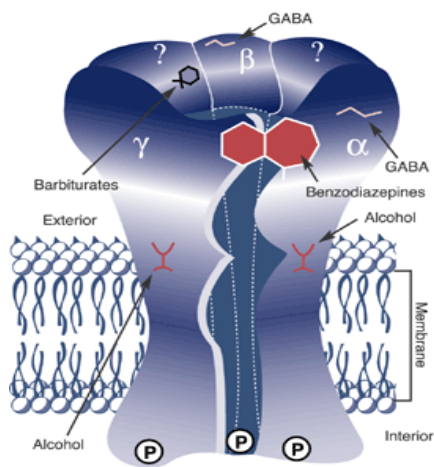
## 2.4 Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor

### 2.4.1 Übersicht

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Säugetierhirn und entfaltet seine Wirkung mit Hilfe von drei unterschiedlichen Rezeptoren, (GABA<sub>A,B,C</sub>)<sup>85</sup>. GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren gehören zur Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle<sup>86</sup>. Bindung von GABA an diesen Rezeptor bewirkt die Öffnung eines selektiven Chlorid-Ionenkanals, wodurch es in adulten Neuronen zum Einstrom von Chloridionen mit folgender Hyperpolarisation der Zellmembran kommt<sup>87,88</sup>. Auf diese Art vermitteln GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren an der Synapse ein schnelle, phasische Inhibition, während extrasynaptische Rezeptoren vermutlich eine langsamere, tonische Inhibition bewirken<sup>89</sup>.

### 2.4.2 Struktur

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren bestehen aus verschiedenen Untereinheiten die eine pentamere Struktur mit einer zentralen wassergefüllten Pore bilden<sup>90</sup>. Bisher konnten sechzehn verschiedene Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors identifiziert werden, die jeweils durch ein eigenes Gen codiert werden:  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ , und  $\theta$ <sup>91</sup>. Diese Vielfalt wird durch das Vorkommen mehrerer Spleißvarianten von einigen Untereinheiten noch vergrößert<sup>92</sup>. Die heterooligomere Struktur der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren ermöglicht eine Unterscheidung verschiedener Subtypen, je nach Zusammensetzung der verschiedenen Untereinheiten<sup>91</sup>. Die Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer physiologischen Funktion, ihrer Verteilung im Gehirn und ihrer pharmakologischen Eigenschaften<sup>93</sup>. Der häufigste Subtyp des Rezeptors besteht aus zwei  $\alpha_1$ -, zwei  $\beta_2$  und einer  $\gamma_2$ -Untereinheit<sup>94</sup>.



**Abb. 2.6 Schematische Darstellung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors.**

Der Rezeptor setzt sich aus fünf Untereinheiten zusammen. Hier sind eine  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit dargestellt. Die Bindungsstellen für Barbiturate, Benzodiazepine, Alkohol und GABA sind an ihrer mutmaßlichen Position abgebildet. Die Ps stellen regulatorische Phosphatgruppen dar (Abb. aus<sup>88</sup>).



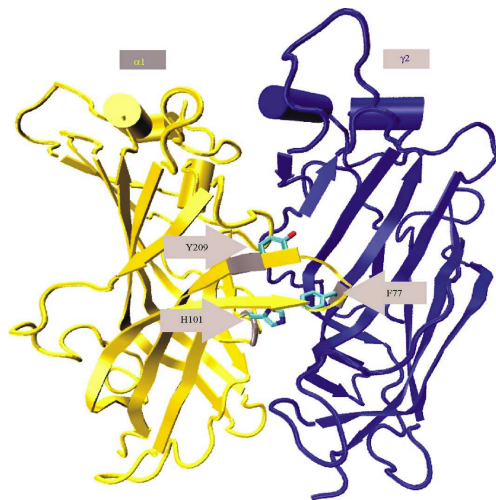
### 2.4.3 Pharmakologie

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind der Angriffspunkt einer Vielzahl von Pharmaka bzw. Genussmittel, wobei insbesondere die Benzodiazepine eine hohe klinische Bedeutung besitzen<sup>85, 95</sup>. Medikamente dieser Stoffgruppe wirken anxiolytisch, antikonvulsiv, sedativ-hypnotisch und muskelrelaxierend. Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie u.a. zugelassen für die Therapie von Epilepsien, Schlafstörungen und Angsterkrankungen<sup>96</sup>. Benzodiazepine entfalten Ihre Wirkung, indem sie durch allosterische Bindung an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor die Frequenz der durch GABA bewirkten Öffnung des mit dem Rezeptor assoziierten Chlorid-Kanals erhöhen<sup>97</sup>.

### 2.4.4 Die Benzodiazepinbindungsstelle

Die Bindungsstelle für Benzodiazepine und verwandte Pharmaka befindet sich an der Schnittstelle der  $\alpha$ -Untereinheiten mit der  $\gamma$ 2-Untereinheit<sup>98</sup>.

Durch gezielte Mutation (*knock-in*) konnte ein Phenylalaninrest an Position 77 der  $\gamma$ 2-



**Abb. 2.7: Modell der extrazellulären Domänen der  $\alpha$ 1- und der  $\gamma$ 2-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors.**

Die für die Bindung von Benzodiazepinliganden essentiellen Aminosäurereste sind Hervorgehoben. Auf Seiten der  $\alpha$ 1-Untereinheit sind dies ein Argininrest an Position 101 (H101) und ein Tyrosinrest an Position 209 (Y209). Auf Seiten der  $\gamma$ 2-Untereinheit ist dies ein Phenylalaninrest an Position 77 (F77) (Abb. aus<sup>102</sup>).

Untereinheit als essentiell für die Bindung diverser Liganden dieser Bindungsstelle identifiziert werden<sup>99, 100</sup>. *Knock-in* Mäuse, die an entsprechender Stelle eine Phenylalanin zu Isoleucin (F77I Mutation) tragen, sind diesen Medikamenten gegenüber unempfindlich, weisen jedoch eine normale Hirnstruktur auf und sind vom Verhalten her nicht von Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden<sup>101, 102</sup>. Wulff et al. entwickelten einen Mausstamm in dem die mutierte  $\gamma$ 2-Untereinheit von LoxP-Sites flankiert ist (iLoxF77I) und konnten zeigen, dass sich auch diese weitere Manipulation nicht im Verhalten der Tiere niederschlägt<sup>103</sup>. Durch Ko-Expression der Wildtyp-Variante des  $\gamma$ 2-Gens und der Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors gelang es einen Mausstamm zu entwickeln, in dem gezielt in

der Population der Purkinje-Zellen des Kleinhirns die Wildtyp-Variante des  $\gamma 2$ -Gens exprimiert wird und die mutierte Variante durch die Cre-Rekombinase entfernt wird. Auf diese Weise konnte gezielt und ausschließlich dieser Zelltyp durch einen Benzodiazepinliganden in seiner Funktion beeinflusst werden und die Auswirkungen auf das Verhalten der Mäuse registriert werden <sup>103</sup>. Eine Weiterentwicklung und Modifikation dieser Strategie ermöglicht es potentiell die Rolle von weiteren Zelltypen und Kerngebieten in neuronalen Netzwerken gezielt zu untersuchen.

### 2.5 Zielsetzung

Angsterkrankungen gehören zu den häufigsten Erkrankungen des Nervensystems und verursachen neben beträchtlichem individuellem Leid auch hohe Kosten für das Gesundheitssystem<sup>104, 105</sup>.

Die bislang zur Verfügung stehenden pharmakologische Therapieoptionen besitzen nur eine eingeschränkte Wirksamkeit und mitunter beträchtliche Nebenwirkungen, sodass die Therapie nicht selten durch den Patienten abgebrochen wird<sup>106</sup>.

Das Verständnis über die exakten Mechanismen der Angstentstehung und Anxiolyse im Gehirn ist immer noch limitiert, wobei eine Beteiligung sowohl klassischer Neurotransmittersysteme, als auch verschiedener Neuropeptide gezeigt werden konnte<sup>107, 108</sup>. Von den beteiligten Hirnstrukturen kommt der Amygdala und hier insbesondere GABAergen Schaltkreisen eine besondere Bedeutung zu<sup>109, 110</sup>.

Eine Erweiterung des Wissens auf diesem Gebiet birgt das Potenzial für die Entwicklung wirksamerer und besser verträglicher Therapeutika.

Ziel des Kooperationsprojektes „*The role of GABA<sub>A</sub>-Receptors in fear-related behaviour*“ ist es, die Rolle von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren bei der Entstehung und Modulation von Angst zu charakterisieren. Ein Teil dieses Projektes zielt darauf ab, eine Beteiligung GABAerger Schaltkreise im Bereich der Amygdala am Zustandekommen der Anxiolyse durch Benzodiazepine zu zeigen.

Analog zur Arbeit von Wulff et al. soll dies durch die selektive Wiederherstellung der pharmakologischen Wirkung dieser Medikamentenklasse im Zielbereich im iLoxF77I-Mausstamm erreicht werden<sup>103</sup>.

Im Unterschied zur zitierten Arbeit soll die Benzodiazepinwirkung dabei nicht durch zellspezifische Promotoren und Züchtung wiederhergestellt werden. Dies soll durch stereotaktische Injektion von rAAV-Vektoren, die am Ort der Injektion die Wildtyp-γ2-Untereinheit und die Cre-Rekombinase zur Expression bringen, ermöglicht werden. Um eine Unterscheidung der Punktmutierten von der Wildtyp-Variante bei Expressionsanalysen zu ermöglichen wurde die Wildtyp-Variante mit dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) n-terminal und damit funktionell still fusioniert<sup>111</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die für das Projekt benötigten rAAV-Vektoren konstruiert, ihre Funktionalität in Zellkultur und nach stereotaktischer Injektion in das Gehirn von Mäusen überprüft werden, um ein *proof-of-principle* für diese Strategie zu erbringen.

### 3. Materialien und Geräte

#### 3.1 Geräte

Neben der Standardausrüstung eines Labors wurden folgende Geräte verwendet:

Bezeichnung	Funktion	Hersteller
Geldokumentationssystem	Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen
Spektralphotometer DU-530	Konzentrationsbestimmung von DNA	Beckman, Krefeld
Sonifier 450	Homogenisierung von Zellextrakten	Branson, Danbury, USA
Brutschrank B6120	Bebrütung von Agarplatten	Heraeus Sepatech, Osterode
Inkubationsschüttler G25	Inkubation von Bakterien	New Brunswick Scientific Edison, USA
Crurix 60	Entwicklermaschine	AGFA, München
Gene Amp® PCR System 2400 & 9700	Thermocycler für die PCR	Applied Biosystems, Foster City, USA
LightCycler	Thermocycler für die quantitative realtime-PCR	Roche, Mannheim
Chroma 48	UV-Tisch	Vetter, Ravensburg
Avanti J25 mit JLA 16250	Zentrifuge Rotor	Beckman, Krefeld
Zentrifuge 5417 R	Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Speed Vac DNA 110	Vakuumzentrifuge	Savant, Waltham, USA
Megafuge 3.OR	Ausschwingzentrifuge	Heraeus Sepatech, Osterode
Sigma 3-10	Ausschwingzentrifuge	Sigma Labortechnik
Technoflow 2F 180-II GS	Sterilbank	Integra Biosciences, Fernwald
CK2	Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg
Axioskop 2	Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Kopf 950 Stereotaktischer Rahmen	Stereotaktische Injektionen	Kopf, Tujunga, USA

## Materialien & Geräte

---

Trend HD43 EM	Zahnbohrer zum Eröffnen des Schädels am Versuchstier	W&H, Laufen
Infusionspumpe	Infusion von rAAV-Vektor-Präparationen	Stoelting, Dublin, Irland
Odyssey® Imager	Infrarot-Scanner	Licor, Lincoln, USA
FACSCalibur	BD Biosciences	San Jose, USA

### 3.2 Chemikalien & Reagenzien

Die für diese Arbeit verwendeten Laborchemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) bezogen. Zellkulturmedien und fetales Kälberserum (FCS) wurden bei der Firma Gibco BRL (Karlsruhe) eingekauft. Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme, die Alkalische Calf Intestinal Phosphatase (CIP), die T4-DNA-Ligase, die Polynukleotidkinase und Rinderserumalbumin (BSA) wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen. Bacto™ Trypton, Bacto™ BBL Yeast Extract und granuliertes Agar-Agar stammten von Becton, Dickinson & Company (Sparks, USA). Penicillin/Streptomycin sowie Trypsin/EDTA wurden bei Biochrom (Berlin) bezogen. Der Full Range Rainbow™ protein molecular Marker 800 wurde von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen. Der Größenmarker Gene Ruler™ DNA Ladder Mix stammte von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Die Proteinase K wurde bei Roth (Karlsruhe) bestellt. RNase und Lysozym stammten von der Firma Sigma (Taufkirchen).

Sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen Lösungen, Puffer und Medien wurden mit zweifach destilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O bidest.) angesetzt. Zur Sterilisation wurden Lösungen, sofern die Bestandteile Hitzestabil waren, bei 121°C und 2 at für 20 min autoklaviert.

### 3.3 Kits

Für diese Arbeit wurden die folgenden Kits verwendet:

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
Qiagen Plasmid Midi und Maxi Kit	Präparation von Plasmid DNA	Qiagen, Hilden
QIAQuick PCR Purification Kit	Aufreinigung von DNA	Qiagen, Hilden
QIAQuick Gel Extraction Kit	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden
FuGENE® HD	Transfektion von Zellen	Roche, Mannheim
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green	Quantitative real-time PCR	Roche, Mannheim
Terminale Transferase Kit	Markierung von Oligonukleotiden mit <sup>35</sup> S-dATP	Roche, Mannheim
NuPAGE LDS Sample Puffer	Proteinextraktion	Invitrogen, Karlsruhe
SuperSignal® West Pico Luminol	Signaldetektion im Western Blot	Pierce, Rockford, USA

### 3.4 Antikörper

Für diese Arbeit kamen folgende Antikörper zum Einsatz:

Bezeichnung	Ursprung	Funktion	Hersteller
<b>Primärantikörper</b>			
Polyklonaler Anti-GFP Antikörper Cat. # sc-8334	Kaninchen	Nachweis des $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins im Western Blot	Dianova, Hamburg
Polyklonaler Anti-c-myc (a-14) Antikörper Cat. # sc-789	Kaninchen	Nachweis des $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins in der Immunfluoreszenz	Dianova, Hamburg

## Materialien & Geräte

Polyklonaler Anti-Cre Antikörper 69050	Kaninchen	Nachweis der Cre-Rekombinase im Western Blot und in der Immunfluoreszenz	Novagen, Madison, USA
Polyklonaler Anti-Cre Antikörper	Kaninchen	Nachweis der Cre-Rekombinase in der Immunhistochemie	Novagen, Madison, USA
Polyklonaler Anti- $\gamma$ 2 Antikörper	Kaninchen	Nachweis der $\gamma$ 2EGFP-Expression in der Immunhistochemie	Prof. W. Sieghart, Wien, Österreich
<b>Sekundärantikörper</b>			
IRDye 800 Anti-Rabbit Antikörper	Ziege	Sekundärantikörper für die Auswertung von Western Blots über den Odyssey® Imager	Licor, Lincoln, USA
IgG Anti-Rabbit (H+L) TRITC	Ziege	Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz	Dianova, Hamburg
Fab/Fc Anti-Rabbit IgG (H+L) mit Peroxidase konjugiert	Ziege	Sekundärantikörper in der Western Blot Analyse	Dianova, Hamburg
Polyklonaler Anti-Rabbit mit Peroxidase konjugiert	Ziege	Sekundärantikörper in der Immunhistochemie	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

### 3.5 Plasmide

Für diese Arbeit kamen folgende Plasmide zum Einsatz:

Name	Beschreibung	Herkunft
$\gamma$ 2EGFP-pCi	$\gamma$ 2EGFP-ORF unter Kontrolle des CMV-Promoters	Prof. William Wisden über Prof. W. Sieghart, Wien, Österreich
$\alpha$ 1-Lab-pCi	$\alpha$ 1-ORF (GABA <sub>A</sub> ) unter Kontrolle des CMV-Promoters	Prof. W. Sieghart, Wien, Österreich
$\beta$ 3-Lab-pCi	$\beta$ 3-ORF (GABA <sub>A</sub> ) unter Kontrolle des CMV-Promoters	Prof. W. Sieghart, Wien, Österreich

## Materialien & Geräte

---

pTR-UF5	GFP-ORF unter Kontrolle des CMV-Promoters flankiert von den AAV-2 ITRs	N. Muzyzcka, Gainesville, USA
pCatch	CMV-Promoter	AG Heilbronn
pBluescript II SK (+)	Leervektor	Stratagene, La Jolla, USA
pTR-UF3dNeo	CMV-Promoter, SV40 SD, IRES, GFP-ORF flankiert von den AAV-2 ITRs	AG Heilbronn
pYFP-C1	YFP-ORF unter Kontrolle des CMV-Promoters	BD Biosciences Clontech Heidelberg
pDA-siGFP	shRNA gegen GFP unter Kontrolle des H1-Promoters, Leserahmen für DsRed	AG Heilbronn Dr. Stefan Weger
pSuper GFP	shRNA gegen GFP unter Kontrolle des H1-Promoters	AG Heilbronn Dr. Stefan Weger
pAAV- $\gamma$ 2EGFP	$\gamma$ 2EGFP-ORF unter Kontrolle des CMV Promoters, flankiert von den AAV-2-ITRs	AG Heilbronn Alexander Plauth
pAAV-Cre-GFP	ORF für ein Fusionsprotein aus der Cre-Rekombinase und GFP unter Kontrolle des CMV-Promoters, flankiert von den AAV-2-ITRs	AG Heilbronn Dr. Stefan Weger
pAAV-Cre	Cre-ORF unter Kontrolle des CMV-Promoters, flankiert von den AAV-2-ITRs	AG Heilbronn Alexander Plauth
pAAV- $\gamma$ 2Opt	Optimierter $\gamma$ 2EGFP-ORF unter Kontrolle des CMV-Promoters, flankiert von den AAV-2-ITRs	AG Heilbronn Alexander Plauth
pAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre	Optimierter $\gamma$ 2EGFP-ORF, IRES und Cre-ORF unter Kontrolle des CMV-Promoters, flankiert von den AAV-2-ITRs	AG Heilbronn Alexander Plauth
pGFP/Red-Switch	Von LoxP-Sites flankierter GFP-ORF unter Kontrolle des CMV-Promoters, Rex-ORF ohne Promoter, flankiert von den AAV-2-ITRs	AG Heilbronn Alexander Plauth
pDG1	AAV-2 Rep- und Cap-ORFs. p5-Promoter durch MMTV-LTR-Promoter ersetzt. Adenovirale Helferfunktionen E2A, E4 und VA.	Plasmid Factory GmbH & Co. KG Bielefeld



### 3.6 Oligonukleotide

Sofern nicht anders gekennzeichnet wurden sämtliche für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide von der Firma MWG hergestellt. Im Einzelnen handelte es sich hierbei um:

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
Cre 1	5'- AAT AAT GCG GCC GCG GCC ATG CCC AAG AAG AAG - 3'	Amplifizierung des Cre-ORF mittels PCR für die Klonierung in die Konstrukte pAAV-Cre und AAV- $\gamma$ 2Opt-Cre
Cre 2	5' – AAT AAT GTC GAC TAA TCG CCA TCT TCC AGC AG – 3'	s. Cre 1
Lox-F1	5' – CCG GTA TAA CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CGA AGT TAT – 3'	Einfügen einer LoxP-Site in das Konstrukt pTR-UF5.
Lox-R1	5' – GGC CAT AAC TTC GTA TAA TGT ATG CTA TAC GAA GTT ATA – 3'	s. Lox-F1
Lox- F2	5' – TCG AAT AAC TTC GTA TAG CAT ACA TTA TAC GAA GTT ATT CCG GA – 3'	s. Lox-F1
Lox-R2	5' – CGC GTC CGG AAT AAC TTC GTA TAA TGT ATG CTA TAC GAA GTT AT – 3'	s. Lox-F1
Gamma-2	5' – CAT TTG AAT GGT TGC TGA TCT GGG ACG AAT ATC AAT GGT AGG GGC -3'	Sonde für die In-Situ-Hybridisierung zum Nachweis des $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins.
Cre	5' – GGC AAA ACA GGT AGT TAT TCG GAT CAT CAG CTA CAC CAG AGA CGG – 3'	Sonde für die In-Situ-Hybridisierung zum Nachweis der Cre-Rekombinase.

### 3.7 Bakterienstämme

Für Sämtliche Transformationen in dieser Arbeit wurden E. Coli SURE verwendet.

Genotyp: endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recBrecJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14-(mcrCBhdsSMR-mrr)171 F[ proAB+ lacIqlacZ M15 Tn10]

Hersteller: Stratagene, La Jolla, USA.

### 3.8 Zelllinien

HeLa-Zelllinie	humane Cervixkarzinomzellen erste etablierte permanente menschliche Zelllinie
HEK293-Zellen	humane embryonale Nierenzellen enthalten 4,5 kb des Genoms von Adenovirus Typ 5 und exprimieren die viralen Proteine E1A und E1B

### 3.9 Viren

Zur Ko- oder Überinfektion von Versuchsansätzen mit rAAVs wurden Adenovirus-Typ-2-Präparationen aus dem Labor AG Heilbronn mit einem Titer von  $5 \cdot 10^8$  *plaque forming units* pro ml verwendet.

### 3.10 Computersoftware

Sämtliche Abbildungen wurden mit Adobe Photoshop CS und Adobe Illustrator CS (Adobe Systems Inc.) erstellt. Textverarbeitung erfolgte mit Microsoft Office Mac (Microsoft). Für die Darstellung von Plasmiden für die Planung von Klonierungen wurde das Gene Construction Kit<sup>TM</sup> 2 Version 2.0.8 der Firma Textco Inc. verwendet. Die Auswertung von Immunfluoreszenzdaten erfolgte mit dem Programm IPLab Scientific Imaging Software Version 3.5 (Scanalytics Inc.).

## 4. Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien:

LB-Medium	1 %	BactoTrypton
(autoklaviert)	0,5 %	Bacto BBL Yeast Extract
	1 %	NaCl
LB-Medium mit Ampicillin	100 µg/ml	Ampicillin
LB-Platten	1,5 %	Agar in LB-Medium autoklaviert und in Petrischalen gegossen.
LB-Platten mit Ampicillin	100 µg/ml	Ampicillin zum Agar-LB-Medium nach Abkühlen auf 50°C
1xTE-Puffer pH 7,6	10 mM	Tris/HCl pH 7,6
	1 mM	EDTA

#### 4.1.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Transformation wurde angewandt um Plasmid-DNA zur Vervielfältigung in Bakterien einzubringen. Hierfür wurden 50 µl chemisch kompetenter Bakterienzellen für ungefähr 10 Minuten auf Eis aufgetaut, mit 1µg DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 90 sec. einem Hitzeschock (42°C) ausgesetzt und zum Abkühlen für 2 min auf Eis gelagert. Um eine Expression des über das Plasmid eingeführten Resistenzgens zu ermöglichen wurde das Gemisch nach Zugabe von 400µl vorgewärmten LB-Mediums für 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Je nach Anwendung wurde nach Ablauf dieser Zeit entweder LB-Medium mit Selektionsantibiotikum als Flüssigkultur mit dem Gemisch angeimpft oder dieses auf Agar-Platten ausplattiert.

### 4.1.3 Minipräparation von Plasmid-DNA

#### *Lösungen und Puffer:*

STET-Puffer	8%	Saccharose
	5%	Triton X-100
	50 mM	EDTA pH 8
	10 mM	Tris pH 8

Die DNA-Minipräparation diente dazu den Erfolg eines Klonierungsschrittes zu überprüfen, bevor das entsprechende Plasmid in größerem Maßstab hergestellt wurde. Hierzu wurden 3 ml mit Ampicillin versetzten LB-Mediums mit einer Kolonie von einer Agarplatte mit demselben Selektionsantibiotikum angeimpft und anschließend über Nacht bei 37°C unter schütteln inkubiert. 1 ml dieser Übernachtskulturen wurde entnommen und bei 14 000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 150 µl STET-Puffer gelöst und mit 12 µl Lysozym (10 mg/ml in bidest. H<sub>2</sub>O) versetzt. Nach Erhitzen in einem 90°C heißen Heizblock für 1 min erfolgte ein erneutes Zentrifugieren für 10 min mit 14 000 rpm bei 4°C. Das entstandene Bakterienpellet wurde mit einer Pipettenspitze entfernt und verworfen, der Überstand mit 150 µl Isopropanol versetzt und zwecks Nukleinsäure-Fällung für mindestens 20 min auf Eis gelagert. Im Anschluss erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation mit 14 000 rpm bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol versetzt. Nach einer analog zur Vorherigen durchgeführten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Nukleinsäurepellet für 10 min mittels Vakuumzentrifugation in der Savant DNA Speed Vac DNA 110 getrocknet und im Anschluss in 50 µl 1xTE-Puffer aufgenommen.

Von diesen 50 µl wurden 10 µl entnommen, mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und die gewonnenen DNA-Fragmente nach Zusatz von 10fach Ladepuffer mit RNase A (20 mg/ml) mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Entsprechend dem so gewonnenen Verdauemuster dem Erwarteten, wurde eine Transformation (s. 4.1.2) mit 10 µl der präparierten DNA durchgeführt und im Anschluss an diese 100 ml LB-Medium mit Ampicillin für eine Übernachtskultur mit dem Bakteriengemisch angeimpft.

### 4.1.4 Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab

#### *Lösungen und Puffer:*

Puffer P1	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
Puffer P2	200 mM	NaOH
	1 %	SDS
Puffer P3	3 M	Kalium-Azetat pH 5,0
Puffer QBT	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS pH 7,0
	15 %	Isopropanol
	0,15 %	Triton X-100
Puffer QC	1 M	NaCl
	50 mM	MOPS pH 7,0
	15%	Isopropanol
Puffer QF	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris pH 8,5
	15%	Isopropanol
Puffer QN	1,6 M	NaCl
	50 mM	MOPS pH 7,0
	15 %	Isopropanol

Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde auf das Plasmid Midi- bzw. das Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen zurückgegriffen. 100 bzw. 250 ml Übernachtskultur wurden für 10 min mit 5000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Bakterienpellet wurde mit 4 bzw. 10 ml Puffer P1 resuspendiert und nach Zugabe von 4 bzw. 10 ml Puffer P2 gut gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 4 bzw. 10 ml Puffer P3 hinzugefügt und nach sorgfältigem Mischen für 10 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Qiagen-Säulen mit 4 bzw. 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation mit 10 000 rpm bei 4°C. Der so gewonnene Überstand wurde durch einen Faltenfilter auf die Säulen gegeben. Sobald das Lysat durchgelaufen war, wurden die Säulen zweimal mit 10 bzw. 30 ml Puffer QC gewaschen. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA mit 5 bzw. 15 ml Puffer QF eluiert, mit 3,5 bzw. 10,5 ml Isopropanol versetzt und zur Fällung für mindestens

15 min auf Eis gelagert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte eine weitere Zentrifugation wie zuvor. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 5 bzw. 15 ml 70% Ethanol versetzt und mit 3500 rpm für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen, das Pellet für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss in 50 bzw. 200 µl 1xTE-Puffer aufgenommen.

### **4.1.5 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA**

Die Phenol-Chloroform-Extraktion diente der Aufreinigung von DNA. Hierfür wurde die Probe mit einem Volumenanteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) versetzt und sorgfältig gemischt. Bei einem Volumen von unter 50 µl wurde die Probe zunächst mit 1xTE-Puffer auf 50 µl aufgefüllt. Nach Zentrifugation bei 13 000 rpm für 2 min bei Raumtemperatur wurde die Oberphase abpipettiert und im Anschluss eine Ethanol-Fällung (s. 4.1.6) durchgeführt. Die Fällung diente dem Entfernen von restlichem Phenol bzw. Chloroform aus der Probe.

### **4.1.6 Ethanol-Fällung von DNA**

Die Ethanolfällung diente der Aufreinigung von DNA. Zu diesem Zweck wurde die Probe zunächst mit 1/50 Volumen 5 molarer NaCl-Lösung und anschließend 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgte für 10 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder für 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Im Anschluss erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation mit 14 000 rpm bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für 10 min mittels Vakuumzentrifugation getrocknet und in 1xTE aufgenommen.

### **4.1.7 Restriktionsverdau von DNA**

Der Restriktionsverdau diente der Überprüfung von DNA-Sequenzen und der Herstellung von DNA-Fragmenten für Klonierungen. Hierfür wurde 1 µg DNA mit 1/10 Volumen des vom Hersteller empfohlenen 10xPuffers und 10 units des gewünschten Restriktionsenzym versetzt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Anteil der Enzyme am Gesamtvolumen betrug niemals mehr als 30%. Die Inkubation erfolgte im Regelfall für 1h bei

37°C, in Ausnahmen allerdings auch bei der für das jeweilige Enzym vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz mit 2 µl 10xDNA-Ladepuffer versetzt und per Agarosegelelektrophorese (s. 4.1.8) eine Auftrennung der verdauten DNA durchgeführt. Für einen Partialverdau wurde die DNA in fünf verschiedenen Ansätzen mit 0,05 bis 0,1 *units* Enzym versetzt. Die Reaktion wurde nach 1 h durch Zugabe von 2 µl 10xDNA-Ladepuffer mit 0,1M EDTA gestoppt. Ziel eines solchen Verdaus war es ein Schneiden des jeweiligen Restriktionsenzym an nur einer von mehreren Erkennungsstellen in der DNA herbeizuführen. PCR-Fragmente wurden für 2 h mit 10 units des jeweiligen Enzyms verdaut.

### 4.1.8 Agarosegelelektrophorese

#### *Lösungen und Puffer:*

50xTAE-Puffer pH 8,5	2 M	Tris
(Tris-acetat/EDTA-Puffer)	50 mM	EDTA
	5,71 %	100% Essigsäure
10xDNA-Ladepuffer	0,25%	Bromphenolblau
	25%	Ficoll Typ 400
	10 mM	EDTA
10xDNA-Ladepuffer mit EDTA	100 mM	EDTA
10xDNA-Ladepuffer mit RNase A	100 ng / µl	RNase A

Die Agarosegelelektrophorese diente dem Auftrennen von DNA nach Größe, Ladung und Konfiguration. Hierfür wurde zunächst ein Agarosegel in einer für die erwarteten DNA-Fragmente optimalen Stärke hergestellt. Zu diesem Zweck wurde 1xTAE-Puffer mit einer entsprechenden Menge Agarose aufgeköcht und nach kurzem Abkühlen in einen Gelschlitten oder direkt in die Elektrophoresekammer gegossen. Nach Einsetzen eines Kammes für die Aussparung von Taschen wurde bis zur Auspolymerisierung des Gels gewartet. Nach entfernen des Kammes wurde der Gelschlitten, falls vorhanden, in eine Elektrophoresekammer platziert und die Kammer soweit mit TAE-Puffer gefüllt, dass das Gel knapp überschichtet war. Im Anschluss wurden die mit 10xDNA-Ladepuffer versetzten Proben in die Taschen pipettiert. Je nach Größe des Gels wurde eine Spannung von 70 bis 120 V angelegt. Bevor die ersten DNA-Fragmente aus dem Gel ausliefen wurde die Apparatur ausgeschaltet, das Gel in ein Ethidiumbromidbad (1 µg/ml in H<sub>2</sub>O bidest.) überführt und dort

für 30 min belassen. Im Anschluss wurde das Gel für 10 min in einem Wasserbad entfärbt. Die Auswertung erfolgte unter kurzwelligem UV-Licht, welches das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz anregt. Sollten DNA-Fragmente für Klonierungen weiterverwendet werden, so wurden die entsprechenden Banden unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und dann mittels Freeze-Squeeze (s. 4.1.9) oder mit Hilfe des Qiagen Gel Extraction Kit (s. 4.1.9) aus dem Gel extrahiert.

### 4.1.9 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

#### *Lösungen und Puffer:*

Freeze-Squeeze-Puffer	0,3 M	Natriumactetat pH 7,0
	1 mM	EDTA

Das aus dem Agarosegel ausgeschnittene Fragment wurde für 30 min in Freeze-Squeeze-Puffer auf einem Überkopfschwenker äquilibriert. Währenddessen wurde in den Boden eines 0,5 ml Tubes mit einer heißen Kanüle ein Loch gestochen und dieses mit Glaswolle gestopft. Das Gelfragment wurde in das 0,5 ml Tube überführt und für mindestens 30 min bei -80°C eingefroren um die Gelmatrix zu zerstören. Im Anschluss wurde das 0,5 ml Tube in ein 1,5 ml Tube eingesetzt und noch während des Auftauens des Gelstückes mit 3500 rpm für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Glaswolle diente dabei als Filter um größere Gelreste in dem kleinen Tube zurückzuhalten, während die DNA in der Flüssigkeit den Filter passieren konnte um sich im größeren Tube zu sammeln. Das Volumen der DNA-Lösung wurde mit einer Pipette bestimmt und im Anschluss eine Ethanol-Fällung (s. 4.1.6) durchgeführt.

#### QIAQuick Gel-Extraction Kit

Das aus dem Agarosegel ausgeschnittene Fragment wurde gewogen und im Anschluss mit 1 Volumen Puffer QG versetzt. Hierbei wurde für 1 mg Gel 1 µl Puffer eingesetzt. Es folgte eine Inkubation bei 50°C für 10 min um die Agarose aufzulösen. Im Anschluss wurde 1 Gelvolumen Isopropanol hinzugefügt, die Probe auf eine QIAquick-Säule aufgetragen und für 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, die Säule mit 0,75 ml Puffer PE aufgefüllt und nach 2 bis 5 min erneut wie zuvor zentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, nachdem der Durchlauf erneut verworfen worden



war. Die Säule wurde nun in ein 1,5 ml Tube eingesetzt, mit 30 µl Elutionspuffer bestückt und erneut wie oben zentrifugiert. Die so gewonnene DNA wurde ohne zusätzliche Reinigungsschritte weiterverwendet.

### 4.1.10 Ligation von DNA

Die für die Ligationen verwendeten DNA-Fragmente wurden mittels Restriktionsverdau (s. 3.1.7) direkt aus Plasmiden gewonnen oder zunächst mittels PCR amplifiziert (s. 3.1.11) und dann einem Verdau unterzogen. Im Anschluss an eine Agarosegelelektrophorese wurden die Fragmente mit Hilfe des Freeze-Squeeze-Verfahrens oder mit dem Qiagen Gel Extraction Kit (s. 3.1.9) extrahiert. Um eine unspezifische Re-Ligation zu vermeiden wurde dabei das Vektorfragment vor der Elektrophorese mit alkalischer Phosphatase für 20 min bei 37°C inkubiert. Für die Ligation wurden die Vektor- und Insert-Fragmente im Verhältnis 1:3 gemischt und zusätzlich mit 1/10 Volumen 10xLigationspuffer und 200 units T4 DNA-Ligase versetzt. Als Kontrollansatz wurden statt dem Insert 10 µl 1xTE-Puffer eingesetzt. Im Anschluss an eine Inkubation für 3 bis 4 h bei Raumtemperatur oder für 20 h bei 12°C wurden die Ligrationsansätze in kompetente Bakterien transformiert (s. 4.1.2).

### Ligation von Oligonukleotiden in dephosphorylierte Vektoren

Ligationen mit Oligonukleotiden kamen dann zum Einsatz wenn nur eine kurze DNA-Sequenz, wie z.B. eine LoxP-Site, oder eine neue Restriktionsschnittstelle, in ein Plasmid eingebracht werden sollte. Um dies möglich zu machen mussten zunächst zwei komplementäre Oligonukleotide zu einem Doppelstrang *annealt* werden. Hierfür wurden jeweils 20 µl des phosphorylierten Oligonukleotids mit einer Konzentration von 2,5 pmol/µl gemischt, für 2 min auf 65°C erhitzt und für 30 min bei Raumtemperatur zum Abkühlen stehen gelassen. Für die eigentliche Ligrationsreaktion wurden 10 µl der *annealten* Oligonukleotide in einer Konzentration von 0,0125 pmol/µl mit 4 µl Vektor in einer Konzentration von 0,0125 pmol/µl gemischt und mit 1,6 µl 10xLigationspuffer und 5 Units T4-Ligase versetzt. Nach einer Inkubation von 2h bei RT wurde der Ligrationsansatz in kompetente Bakterien transformiert (s. 4.1.2).

### 4.1.11 Amplifikation von DNA mittels PCR

Die PCR wurde eingesetzt, um mit Hilfe von spezifischen Primern DNA-Sequenzen aus Plasmiden zu amplifizieren und diese nach Restriktionsverdau (s. 4.1.7) für eine Ligation in einen Vektor (s. 4.1.10) verwenden zu können. Zu diesem Zweck wurden 10 µl *template* mit einer Konzentration von 1 ng/µl mit jeweils 1,5 µl der beiden Primer in einer Konzentration von 10 pmol/µl gemischt, mit 5 µl 10xPfu-Puffer, 1 µl 10 mM dNTPs und 1,25 Units Pfu Turbo Polymerase versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl Endvolumen aufgefüllt. Die PCR wurde standardmäßig in Thermocyclern unter den folgenden Bedingungen durchgeführt, jedoch ggf. an angepasst:

Initiale Denaturierung für 3 min bei 94°C.

10 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 94°C, 30 sec Primer-Annealing für 37-55°C und 1 min Elongation bei 72°C.

20 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 94°C, 30 sec Primer-Annealing bei 37-55°C und 1 min Elongation bei 72°C plus 5 sec Verlängerung bei jedem Zyklus.

Auffüllen für 7 min bei 72°C

Abkühlen auf 4°C.

40 µl des PCR-Ansatzes wurden mit 10 µl 10xDNA-Ladepuffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen (s. 4.1.8).

## 4.2. Zellkulturtechnik

Für die Experimente mit Zellkulturen wurden HeLa-Zellen und HEK-293-Zellen verwendet. Die Zellen wurden in mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin versetztem Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten an einer Sterilbank.

### 4.2.1 Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien:

10xPBS pH 7,4 (Phosphate buffered saline)	80 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	20 mM	Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	1,5 M	NaCl
PBS-T	+ 0,1 %	Tween® 20
 Vollmedium	 500 ml	 Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)
	10%	fetales Kälberserum (FCS) hitzeinaktiviert
	100 U/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
 Trypsin/EDTA	 1x	 Trypsin/EDTA in autoklaviertem bidest. H <sub>2</sub> O

### 4.2.2 Haltung, Passagieren und Aussäen von Zellen

Zur Haltung der Zellen wurden Zellkulturflaschen verwendet. Die Zelldichte wurde unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Bildete sich ein konfluenter Zellrasen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit vorgewärmten Trypsin/EDTA überschichtet (5 ml bei einer 75cm<sup>2</sup>-Flasche und 10 ml bei einer 175 cm<sup>2</sup>-Flasche). Nach kurzem Schwenken wurde das überflüssige Trypsin/EDTA wieder abgenommen und die Zellen für 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch abklopfen gelöst und in vorgewärmtem Vollmedium resuspendiert. Hierbei wurden 10 ml Vollmedium für eine 75 cm<sup>2</sup>-Flasche und 20 ml für eine 175 cm<sup>2</sup>-Flasche verwendet. Sofern gewünscht, wurde nun

die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen auf die gewünschte Dichte eingestellt. Für die meisten Anwendungen wurde allerdings auf ein Zählen verzichtet und die Zellen 1:4 verdünnt.

### 4.2.3 Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Kopräzipitation

#### *Lösungen und Puffer:*

2xBBS pH 6,87 – 6,91	50 mM	N, N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES)
	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O

Die Calcium-Phosphat-Präzipitation diente dem Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen. Diese Transfektionsmethode beruht darauf, dass durch Mischung von Calcium- und Phosphathaltigen Lösungen mit DNA Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitate gebildet werden, die per Endozytose in die Zielzellen aufgenommen werden können.

Für die Transfektion von HeLa-Zellen wurden diese, wenn nicht anders angegeben, 1:4 verdünnt und ein Volumen von 3 bzw. 1 ml in 6 bzw. 3,5-cm-Zellkulturschalen ausgesät und für 3-4 h im Brutschrank kultiviert um ein Anheften der Zellen zu erlauben. Zur Transfektion wurden 4 bzw. 1,5 µg DNA mit 150 bzw. 60 µl 220mM CaCl<sub>2</sub> und 150 bzw. 60 µl 2xBBS gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise in die Zellkulturschale pipettiert, wobei diese permanent geschwenkt wurde um eine lokale Überkonzentration des Transfektionsansatzes zu vermeiden. Nach 20 h wurde das Medium ersetzt. Nach weiteren 20 h wurden die Zellen entweder geerntet und Proteinextrakte (s. 4.2.7 und 4.2.8) angefertigt oder für die Fluoreszenzmikroskopie bzw. Immunfluoreszenz (s. 4.3.4) fixiert. Für die Transfektion von 293-Zellen wurden diese wie oben ausgesät, allerdings wurde die Transfektion erst nach einer Weiterkultivierung von 20 h durchgeführt. Weiterhin wurde 300 mM statt 220 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung für den Transfektionsansatz verwendet. Das restliche Vorgehen entsprach dem bei der Transfektion von HeLa-Zellen.

### **4.2.4 Transfektion mittels FuGENE® HD**

Bei dieser Transfektionsmethode kommt es zur Bildung von DNA-Liposomen-Komplexen, welche mit der Zellmembran fusionieren. Sie wurde angewendet um eine höhere Transfektionseffizienz als mit der Calcium-Phosphat-Präzipitation zu erreichen. Zu diesem Zweck wurden HeLa oder 293-Zellen, wenn nicht anders angegeben, 1:4 verdünnt und in 6 bzw. 3,5-cm-Zellkulturschalen ausgesät. Die HeLa-Zellen wurden nach 3-4 h transfiziert, während die 293-Zellen zunächst 20 h weiter kultiviert wurden. Zur Bildung der DNA-Liposomenkomplexe wurde 6 bzw. 2 µg DNA in 300 bzw. 100 µl serum-freien Mediums verdünnt, 5 bzw. 15 µl FuGENE HD Reagenz hinzugefügt und das Gemisch nach Vortexen für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach 40 h wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte angefertigt (s. 4.2.7 und 4.2.8) oder für die Fluoreszenzmikroskopie bzw. Immunfluoreszenz fixiert (s. 4.3.4).

### **4.2.5 Infektion von Zellen**

Die zu infizierenden Zellen wurden mit 50% der zum Infektionszeitpunkt gewünschten Dichte in eine Zellkulturschale ausgesät. Nach 20-24 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit der gewünschten Verdünnung des Virusstocks in serum-freiem Medium mit einem Gesamtvolumen von 400 µl für eine 6-cm- bzw. 200 µl für eine 3,5-cm-Schale für 1 h im Brutschrank inkubiert. Alle 15 min wurden die Schalen geschwenkt um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Nach Ablauf der Stunde wurde das Medium abgenommen und durch frisches, vorgewärmtes Vollmedium ersetzt. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte angefertigt (s. 4.2.7 und 4.2.8) oder für die Immunfluoreszenz fixiert (s. 4.3.4).

### **4.2.6 Transfektion mit anschließender Infektion**

Die Transfektion mit anschließender Infektion wurde für die Versuche zum funktionellen Nachweis der Expression der Cre-Rekombinase durch rekombinante AAVs (s. 4.2.9) angewendet.

Hierbei wurden 293-Zellen 1:4 verdünnt und in 3,5-cm-Schalen ausgesät und nach 20 h mittels FuGENE HD transfiziert (s. 4.2.4). Weitere 20 h später wurde das Medium abgenommen und die Infektion durchgeführt (s. 4.2.5).

### 4.2.7 Herkömmliche Proteinextraktion

#### *Lösungen und Puffer:*

2xSDS-Proteinprobenpuffer	0,1 M	Tris/HCl pH 7,5
	2 mM	EDTA
	20 %	Glycerin
	4 %	SDS
	10 %	2-Mercaptoethanol
	0,02 %	Bromphenolblau

Die Proteinextraktion diente der Herstellung von Gesamtzellextrakten für die Western-Blot-Analyse (s. 4.3.4). Transfizierte Zellen (s. 4.2.3 und 4.2.4) wurden zweimal mit 1xPBS gewaschen, anschließend mit 200 µl 2xSDS-Proteinprobenpuffer für 10 min bei RT auf einem Schaukelschwenker inkubiert. Die so lysierten Zellen wurden anschließend mit einem Zellschaber abgeschabt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und für 10 min bei 95°C inkubiert. Infizierte Zellen (s. 4.2.5) wurden im Medium abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation bei 107 g für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 1xPBS resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. Diese Schritt wurde 2 Mal durchgeführt bevor das Pellet mit Hilfe von 200 µl 2xSDS-Proteinprobenpuffer lysiert wurde. Wie bei transfizierten Zellen wurden die Extrakte für 10 min bei 95°C inkubiert.

Um das Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel zu erleichtern wurden die Proteinextrakte bei Bedarf einer Ultraschallbehandlung mit dem Branson Sonifier 450 unterzogen.

### 4.2.8 Proteinextraktion mit Hilfe des NuPAGE-Systems

#### *Lösungen und Puffer:*

NuPAGE-Probenpuffer	25%	4xNuPAGE LDS Sample Puffer
	10%	10xNuPAGE Reducing Agent

Da Membranproteine wie die Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors bei herkömmlicher Proteinextraktion und SDS-PAGE zur Multimerisierung neigen, wurde für den Nachweis des  $\gamma$ 2EGFP-Proteins das NuPAGE-System zur Herstellung von Proteinextrakten und Ihrer anschließende elektrophoretische Auftrennung verwendet. Hierbei wurde der NuPAGE-Probenpuffer statt des herkömmlichen 2xSDS-Proteinprobenpuffers verwendet und die Zellextrakte wurden bei 70°C statt 90°C inkubiert. Das restliche Vorgehen entsprach dem unter 4.2.7 beschriebenen Protokoll.

### 4.2.9 FACS-Analyse von 293-Zellen

#### *Lösungen und Puffer:*

1xPBS/FCS	20%	FCS (fetales Kälberserum)
-----------	-----	---------------------------

Die FACS-Analyse diente dem funktionellen Nachweis einer Expression der Cre-Rekombinase durch die rAAV-Vektoren. Zu diesem Zweck wurden 293-Zellen in der gewünschten Dichte in 6-Well-Platten ausgesät und nach 20 h mit dem Konstrukt pTR-UF5-GFP/Rex-Switch transfiziert (s. 4.2.4). Weitere 20 h später erfolgte eine Infektion mit AAV-Cre oder AAV- $\gamma$ 2EGFP-Cre (s. 4.2.5). Nach einer entsprechenden Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 250  $\mu$ l Trypsin/EDTA überschichtet. Die Trypsin/EDTA-Lösung wurde abgenommen, die Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert und in 600  $\mu$ l 1xPBS/FCS aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des BD FACSCalibur.

### 4.3 Herstellung und Aufreinigung rekombinanter AAVs

#### *Lösungen und Puffer:*

10xPBS/MK-Puffer	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	25 mM	KCl in 10xPBS (s. 3.2.1)
Puffer A	20 mM	Tris pH 8,5
	15 mM	NaCl
Puffer B	20 mM	Tris pH 8,5
	500 mM	NaCl

Für die Herstellung rekombinanter AAVs wurde die Doppeltransfektionsmethode nach Grimm et al. angewendet<sup>55</sup>. Bei dieser Methode wird das Vektorplasmid mit einem Helferplasmid in die Verpackungszelllinie kotransfiziert. Das Helferplasmid bringt dabei die für die AAV-Replikation und Verpackung benötigten Adenoviralen Helferfunktionen E2A, E4 und die Adenovirus VA-RNA sowie die AAV-Gene Rep und Cap zur Expression. Die ebenfalls für die AAV-Replikation und Verpackung benötigten adenoviralen Helferfunktionen E1A und E1B sind bereits in denen als Verpackungszelllinie dienenden HEK293-Zellen vorhanden.

#### **4.3.1 Transfektion:**

Für einen Verpackungsansatz wurden 5 konfluent mit 293-Zellen bewachsene 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen im Verhältnis 1:4 verdünnt und jeweils 20 ml Zellsuspension in 20 14,5 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Nach 20 h wurden die Zellen mittels Calcium-Phosphat-Kopräzipitation (s. 4.2.3) transfiziert. Hierfür wurde das jeweilige Vektorplasmid im Verhältnis 1:3 mit dem Verpackungsplasmid gemischt, wobei eine Gesamtmenge von 480 µg DNA zum Einsatz kam. Die DNA wurde mit 19,8 ml 300 mM CaCl<sub>2</sub> und 13,2 ml 2xBBS vermischt und für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 1526 µl des Transfektionsansatzes auf je eine 14,5 cm-Schale pipettiert.

Nach 16 h wurde das alte Medium abgenommen und durch vorgewärmtes Vollmedium ersetzt. 40 bis 60 h nach der Transfektion wurde das Virus geerntet.



Transfektionsansatz für Viren mit dem  $\gamma$ 2EGFP-ORF:

Da das Genprodukt des  $\gamma$ 2EGFP-ORFs sich vermutlich inhibitorisch auf die rAAV-Verpackung auswirkte wurde neben dem Helfer- und dem Vektorplasmid das Konstrukt pSuper-GFP kotransfiziert, welches eine shRNA gegen GFP zur Expression brachte und so die Expression des Fusionsproteins über den Mechanismus der RNA-Interferenz während der Verpackung verhinderte. Dabei wurden 240  $\mu$ g Helferplasmid und jeweils 120  $\mu$ g pSuper-GFP und Vektorplasmid transfiziert (s. 4.2.3).

### 4.3.2 Virusernte:

Die Zellen wurden zunächst mit jeweils 20 ml 1xPBS pro Zellkulturschale gewaschen und im Anschluss in 5 ml 1xPBS mit 5mM EDTA mit einem Zellschaber abgeschabt. Dabei wurden die Zellen von je 10 Schalen in einem 50 ml Falcon-Tube zusammengeführt und anschließend für 5 min mit 5000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die beiden entstandenen Zellpellets wurde in je 10 ml 150 mM NaCl / 50 mM Tris-HCl mit einem pH von 8,5 aufgenommen. Im Anschluss wurden 3 Zyklen Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen in einem 37°C warmen Wasserbad durchgeführt um die Zellen aufzuschließen. Als nächstes wurden 4  $\mu$ l Benzonase mit 250 units/ $\mu$ l hinzugefügt und das Zelllysat für 30 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde eine 20-minütige Zentrifugation mit 6500 rpm bei 4°C durchgeführt und der Überstand abpipettiert. Der Überstand konnte entweder direkt weiter aufgereinigt werden oder zunächst bei -20°C gelagert werden.

### 4.3.3 Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation diente einer initialen Aufreinigung und Konzentration des virushaltigen Überstandes. Dabei wird die Dichte der AAV-Partikel genutzt, die bei Ultrazentrifugation zur Bildung einer spezifischen virushaltigen Bande in einem Gradienten aus unterschiedlich konzentrierten Iodixanol-Lösungen führt.

Maximal 11 ml des virushaltigen Überstandes wurden mit Hilfe einer Spritze und einer sterilen Kanüle in ein OptiSeal-Tube gegeben und im Anschluss mit 4 unterschiedlich konzentrierten Iodixanol/PBS/MK-Lösungen unterschichtet. Dabei wurden 6 ml Lösung mit 15%, 4,5 ml Lösung mit 25%, 3,5 ml Lösung mit 40% und 3,5 ml Lösung mit 54% Iodixanol verwendet. Die 25%- und die 54%-Lösungen waren zur besseren Orientierung mit 0,5 % Phenolrot versetzt worden. Das OptiSeal-Tube wurde mit 1xPBS/MK-Puffer aufgefüllt und

nach Austarieren in einem 60-TI-Rotor für 2h mit 54 000 rpm bei 18°C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Es kam zur Ausbildung einer virushaltigen farblosen Bande zwischen der 54%- und der 25%-Lösung. Diese Bande wurde mit einer Spritze und Kanüle abgezogen. Das so aufgereinigte Virus konnte entweder direkt einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen werden oder bei -20°C aufbewahrt werden.

### **4.3.4 Heparin-Agarose-Affinitätschromatographie**

Die Affinitätschromatographie mit Heparin-Agarose macht sich die Tatsache zu nutze, dass der AAV-Serotyp 2 Heparansulfatproteoglykan (HSPG) als Rezeptor für die Aufnahme in die Wirtszelle nutzt. Die rAAV-Partikel binden somit relativ stark an die Heparin-Agarose in der Chromatographiesäule, was ein auswaschen sämtlicher Verunreinigungen ermöglicht bevor die Viruspartikel mit Hilfe einer Lösung mit hoher Salzkonzentration eluiert werden.

Zunächst wurde eine Chromatographiesäule mit 8 ml Heparin-Agarose (1000 µg Heparin/ml, Typ 1, Sigma) bestückt, so dass ein Gelbettvolumen von ca. 4 ml resultierte. Die Säule wurde mit 50 ml 1xPBS/MK-Puffer äquilibriert und im Anschluss die rAAV-Präparation aufgetragen. Die Durchlaufgeschwindigkeit wurde auf 1 Tropfen in 6 sec eingestellt und der Durchlauf erneut aufgetragen. Der zweite Durchlauf wurde ebenfalls aufgefangen und bei -20°C aufbewahrt.

Es folgte ein Waschschriff mit 50 ml 1xPBS/MK-Puffer mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 1 Tropfen in 8 sec. Im Anschluss wurden die rAAV-Partikel mit 10 ml 1xPBS/MK mit NaCl bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 1 Tropfen in 10 sec in Fraktionen von je 1 ml eluiert. Die gereinigten Viruspräparationen wurden bei -20°C gelagert.

### **4.3.5 Ionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung von AAV-1 Vektoren**

Eine Aufreinigung von AAV-1-Vektoren über Heparin-Agarose-Affinitätschromatographie war nicht möglich, da AAV-1 nicht HSPG als Rezeptor verwendet. Alternativ wurde ein Protokoll für eine Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie angewendet.

Hierfür wurde eine Chromatographiesäule mit 2 ml Q-Sepharose bestückt. Die Säule wurde im Anschluss mit 10 ml Puffer A gefolgt von 15 ml Puffer B und erneut mit 15 ml Puffer A mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 Tropfen in 8 sec gewaschen. Die AAV-Präparation wurde 1:1 mit Puffer A verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Für den

Durchlauf wurde eine Geschwindigkeit von 1 Tropfen in 10 sec eingestellt. Im Anschluss wurde die Säule mit 20 ml Puffer A bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 1 Tropfen in 8 sec gewaschen. Die Elution der Viruspartikel erfolgte mit 10 ml Puffer B mit einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen in 10 sec. Die gereinigten Viruspräparationen wurden bei -20°C gelagert.

### 4.3.6 Quantifizierung von rAAV-Präparationen mittels quantitativer real-time PCR

#### *Lösungen und Puffer:*

3xDNA-Lysepuffer	3%	N-Lazryl-Sacrosin-Natriumsalz
	70 mM	Tris pH 8,5
	25 mM	EDTA pH 8

#### Proteinase K Verdau:

Um den genomischen Titer einer Viruspräparation per quantitativer real-time PCR feststellen zu können musste das Viruskapsid zunächst mit Proteinase K verdaut werden um das Virusgenom zugänglich zu machen. Zu diesem Zweck wurden 10 µl der Viruspräparation mit 50 µl 3xDNA-Lysepuffer, 87 µl 1xTE-Puffer und 2 µl Proteinase K (20mg/ml in H<sub>2</sub>O) versetzt. Als Carrier für die nach dem Verdau erfolgende Ethanol-Fällung wurde zusätzlich 1 µg des Plasmides pBluescript II SK hinzugefügt. Der Ansatz wurde 2 h bei 56°C inkubiert. Für den Proteinase K Verdau und die anschließende DNA-Extraktion und -aufreinigung wurden mit Silikon beschichtete Eppendorf-Tubes verwendet.

#### DNA-Extraktion und -Aufreinigung:

Zur Extraktion der DNA aus dem Reaktionsgemisch wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 4.1.5) mit anschließender Ethanol-Fällung (s. 4.1.6) durchgeführt und das resultierende DNA-Pellet in 20 µl 1xTE-Puffer aufgenommen. Im Anschluss wurde die DNA mit Hilfe des Qiagen PCR Purification Kit weiter aufgereinigt. Hierzu wurde 230 µl Puffer PB zu der DNA hinzugegeben und das Gemisch auf eine Qiagen Säule pipettiert. Nach einer Zentrifugation bei 13 000 rpm für 1 min wurde der durchlauf verworfen und 0,75 ml Puffer PE auf die Säule pipettiert. Es folgten zwei weitere gleichartige Zentrifugationsschritte, wobei zwischen den Zentrifugationen der Durchlauf verworfen wurde. Im Anschluss wurden 30 µl

H<sub>2</sub>O auf die Säule pipettiert und die DNA durch einen weiteren Zentrifugationsschritt eluiert. Für die anschließende PCR wurde die DNA 1:100 in H<sub>2</sub>O verdünnt.

Light-Cycler PCR:

Für die quantitative real-time PCR wurde der LightCycler von Roche und das LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green Kit von der gleichen Firma verwendet.

Je Probe wurden 2 µl Fast Starter Mix, je 1 µl der verwendeten Primer in einer Konzentration von 10 pmol/µl, 3,2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> und 7,8 µl H<sub>2</sub>O gemischt und in LightCycler Kapillaren pipettiert (15 µl pro Kapillare). Im Anschluss wurden jeweils 5 µl DNA pro Kapillare hinzugefügt. Dabei wurden für die Quantifizierung einer Viruspräparation des Subtyps 2 stets vier Standards mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$  und  $1 \times 10^2$  und die Primer B3 und F3, welche einen Teil der AAV-2-ITRs und des CMV-Promoters erkennen, verwendet.

Für den Leerwert wurden statt 5 µl DNA-Lösung 5 µl H<sub>2</sub>O in die Kapillare pipettiert.

### 4.3.7 Dialyse

Virusstocks, die für die stereotaktische Injektion in Versuchstiere vorgesehen waren wurden in einem Slide-A-Lyzer 0,5-3ml MWCO = 10 000 Dialyserahmen der Firma Pierce für 1 h gegen 1xPBS dialysiert.

## 4.4. Proteinbiochemische Methoden

### 4.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

*Gele:*

Tab. 4.1      Sammelgel nach Laemmli (10 ml Endvolumen)

Acrylamidkonzentration	4,5 %
Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid)	1,5 ml
Sammelpuffer pH 6,8 (0,75 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4 % SDS)	2,5 ml
Bidest. H <sub>2</sub> O	5,9 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS) in bidest. H <sub>2</sub> O	100 µl
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	20µl

Tabelle 4.2      Trenngel nach Kronberg (30 ml Endvolumen):

Acrylamidkonzentration	9%	10 %	12 %	15 %	18 %	20 %
Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid)	9 ml	10 ml	12 ml	15 ml	18 ml	20 ml
Trenngelpuffer pH 8,8 (1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4 % SDS)	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
bidest. H <sub>2</sub> O	13,3 ml	12,3 ml	10,3 ml	7,3 ml	4,3 ml	2,3 ml
10% APS in bidest. H <sub>2</sub> O	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	40 µl	40 µl	40 µl	20 µl	20 µl	10 µl

## Methoden

---

### *Lösungen und Puffer:*

5xSDS-Laufpuffer pH 8,8	0,25 M	Tris
	1,9 M	Glycin
	0,5 %	SDS

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli wurden Proteine nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Hierbei wurde ein Sammelgel vor das eigentliche Trenngel geschaltet um schärfere Banden zu erhalten.

### Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele:

Die Gele wurden mit Hilfe des Dual Gel Caster Mighty Small SE246 von Hoefer angefertigt. Zunächst wurden eine 10 x 8,3 cm Glasplatte und eine Aluminiumplatte gleichen Ausmaßes mit Glasreiniger gereinigt. Anschließend wurden die beiden Platten mit zwei 8,3 cm und 1mm dicken Abstandhaltern in die Gießapparatur eingespannt. Nach Zusatz von TEMED zu den restlichen in Tab. 3.2 aufgeführten Gelkomponenten, wurde das Trenngel zügig zwischen die Platten bis zu einer Höhe von ca. 5,5 cm pipettiert und anschließend mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min wurde das Isopropanol von dem nun polymerisierten Gel abgossen, das Sammelgel bis zum Rand der Platten pipettiert und ein Kamm eingesetzt um Taschen für die Probenbeladung im Gel auszusparen. Sobald das Sammelgel polymerisiert war konnte das Gel entweder sofort verwendet werden oder für späteren Gebrauch, in angefeuchteten Papiertüchern und Haushaltsfolie verpackt, bei 4°C gelagert werden.

### Gelelektrophorese:

Der Kamm wurde vorsichtig aus dem Gel entfernt und die obere Kante vorsichtig mit einem Stück Zellstoff von Gelresten gereinigt. Die Taschen wurden auf der Glasplatte mit einem Filzstift markiert, das Gel anschließend in eine vertikale Gelkammer eingespannt und diese mit 1xSDS-Laufpuffer aufgefüllt. Nach beladen der Geldaschen mit jeweils 15 µl Probe bzw. 5 µl Marker wurde ein Strom von 12 mA pro Gel angelegt, bis dass Sammelgel erreicht wurde. Im Anschluss wurde der angelegte Strom auf 16 mA erhöht. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrozellulose gebロットet (s. 4.4.3).

### 4.4.2 NuPAGE

*Gele:*

Tab. 4.3      Sammelgel (5 ml Endvolumen)

Acrylamidkonzentration	5 %
Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid)	850 µl
4xSammelgel-Puffer (0,5 M Bis-Tris pH 6,4 30% 4xTrenngel-Puffer)	1,25 ml
10% SDS	50 µl
Bidest. H <sub>2</sub> O	2,8 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS) in bidest. H <sub>2</sub> O	75 µl
TEMED	5 µl

Tab. 4.4      Trenngel (10 ml Endvolumen)

Acrylamidkonzentration	10 %
Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid)	3,3 ml
4xTrenngel-Puffer (1,5 M Bis-Tris pH 6,4)	2,5 ml
10% SDS	100 µl
Bidest. H <sub>2</sub> O	4 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS) in bidest. H <sub>2</sub> O	100 µl
TEMED	10 µl

## Methoden

---

### *Lösungen und Puffer:*

20xNuPAGE MOPS SDS-Laufpuffer	50 mM	MOPS
	50 mM	Tris
	1 mM	EDTA pH 7,7
	0,1 %	SDS

Die NuPAGE-Gelelektrophorese wurde angewendet um die nach herkömmlicher SDS-PAGE stets beobachtete Multimerisierung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten zu vermeiden und so einen eindeutigen Nachweis des  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins im Western Blot zu ermöglichen. Die Gelherstellung und die Elektrophorese erfolgten wie bei der herkömmlichen SDS-PAGE (s. 4.3.1). Der SDS-Laufpuffer wurde durch einen speziellen MOPS-SDS-Laufpuffer ersetzt.

### **4.4.3 Western Blot**

#### *Lösungen und Puffer:*

Milch	6 %	Milchpulver in 1xPBS
Milch + Tween	0,3%	Tween® 20
Proteintransferpuffer pH 8,0	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	20%	Methanol

Für den Western Blot wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus einem Acrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen.

#### Blotten:

Der Transfer der Proteine erfolgte mit Hilfe des Semi-Dry-Elektroblotting-Verfahrens. Dabei werden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes von dem Gel auf die Membran transferiert. Zunächst wurden 6 3MM-Filterpapiere (Whatmann) und eine Nitrozellulosemembran (Nitrozellulose-Transfermembran BA-85, Schleicher & Schüll) der Größe des Gels entsprechend zurechtgeschnitten und mit 1xProteintransferpuffer getränkt.



Drei Filterpapiere und die Membran wurden auf die Anode der Blotapparatur gelegt und das Trenngel nach abtrennen des Sammelgels auf der Membran platziert. Auf die Membran wurden 3 weitere mit Puffer getränkte Filterpapiere gelegt und im Anschluss etwaige Luftblasen in dem Stapel durch vorsichtiges Rollen mit einer Glaspipette entfernt sowie überschüssige Flüssigkeit mit Papiertüchern abgetupft. Der Deckel mit der Kathode wurde auf die Blotapparatur aufgesetzt. Der Blotvorgang erfolgte über 90 min bei 4°C mit einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche. Im Anschluss wurde der Größenmarker mit Kugelschreiber nachgezeichnet und die Membran zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen über Nacht bei 4°C in Milchlösung auf einem Schaukelschwenker inkubiert.

### Immundetektion:

Der Primärantikörper wurde nach den jeweiligen Erfordernissen in Milchlösung mit Tween verdünnt. Dabei wurde für den Nachweis des  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins ein polyklonaler Anti-GFP-Antikörper aus dem Kaninchen in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet (s. 3.4). Für die Detektion der Cre-Rekombinase wurde ein 1:10 000 verdünnter polyklonaler Anti-Cre Antikörper aus dem Kaninchen angewendet (s. 3.4). Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und für 90 min mit der Primärantikörperlösung auf einem Überkopfschwenker inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgten 3 Waschschrte für 5-10 min in 1xPBS-T um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde eine den Erfordernissen entsprechend verdünnte Lösung des Sekundärantikörpers in Milchlösung mit Tween zu der erneut in Folie eingeschweißten Membran hinzu gegeben. Sollte eine konventionelle Auswertung des Blots mit einem Röntgenfilm erfolgen, so wurde ein polyklonaler mit Peroxidase konjugierter Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Sollte eine Auswertung am Odyssey® Infrared Imager erfolgen, so wurde der IRDye 800 Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege in einer Verdünnung von 1: 25 000 verwendet. Es folgte eine 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) auf dem Überkopfschwenker. Anschließend wurde die Membran erneut 3 Mal für 5-10 min in 1xPBS-T gewaschen, wodurch nicht gebundener Sekundärantikörper entfernt wurde.

Kam ein mit Peroxidase konjugierter Sekundärantikörper zum Einsatz wurde dieses Enzym mit Hilfe des SuperSignal® West Pico Luminol Kits der Firma Pierce nachgewiesen.

Zu diesem Zweck wurden die beiden Komponenten des Kits, die Peroxidase-Lösung und die Enhancer-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Membran pipettiert und dort für 60 s belassen. Im Anschluss wurde die Lösung entfernt und die Membran in Plastikfolie gelegt.

Die durch die Peroxidase katalysierte Reaktion bewirkte eine Lichtemission durch das Luminol, welche verwendet wurde um einen Röntgenfilm zu belichten. Nach Entwicklung des Röntgenfilms wurde abschließend der Größenmarker von der Membran auf den Film übertragen.

Kam ein infrarotmarkierter Sekundärantikörper wie der IRDye800 zum Einsatz erfolgte die Auswertung mit Hilfe des Odyssey® Infrared Imager.

#### 4.4.4 Immunfluoreszenz und Autofluoreszenz

##### *Lösungen und Puffer:*

Elvanol pH 7,4	133 g/l	Polyvinylalkohol 30000-70000
	133 mM	Tris-HCl pH 8,5
	30%	Glycerin
	1%	1, 4 Diazobicyclo-2,2,2-octan (DABCO)

Die Immunfluoreszenz diente dem Nachweis und der Lokalisation von Proteinen auf Einzelzellniveau. Hierfür wurden HeLa- oder 293-Zellen in der gewünschten Verdünnung auf 18 x 18 mm Deckgläschen in 6 bzw. 3,5 cm-Zellkulturschalen ausgesät (s. 4.2.2). Nach Transfektion (s. 4.2.3 oder 4.2.4) oder Infektion (s. 4.2.5) und einer entsprechenden Inkubationszeit wurden die Deckgläschen entnommen, abgetropft und die Unterseite mit einem Papiertuch trocken gewischt. Im Anschluss wurden die Deckgläschen in ein Trägernetz platziert und für 10 min auf einem Horizontalschwenker in 1xPBS gewaschen. Um die Zellen zu fixieren wurden diese für 30 min in 3,7% Formaldehyd/1xPBS-Lösung getaucht und anschließend erneut für 10 min in 1xPBS gewaschen. Sollten die Zellen auf Autofluoreszenz untersucht werden, so wurden die Deckgläschen mit Elvanol auf einem Objektträger fixiert.

Für den Nachweis der Cre-Rekombinase wurde nun die Plasmamembran der Zellen durch 10-minütiges Inkubieren in 1% Triton X-100/1xPBS-Lösung permeabilisiert und anschließend in 1xPBS gewaschen. Für den Nachweis des  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins in der Zellmembran wurde auf diese beiden Schritte verzichtet. Nach Abtropfen wurden die Deckgläschen in eine

feuchte Kammer überführt. Diese bestand aus einer Plastikschiene, in die mit H<sub>2</sub>O befeuchtetes Filterpapier gelegt wurde und mit einer Lage Parafilm abgedeckt wurde. Der Primärantikörper wurde in 1xPBS/2 % FCS-Lösung im gewünschten Ausmaß verdünnt und 150 µl dieser Verdünnung vorsichtig auf jedes Deckglas pipettiert. Dabei kamen für den Nachweis der Cre-Rekombinase ein polyklonaler Anti-Cre-Antikörper aus dem Kaninchen und für den Nachweis des  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins ein polyklonaler Anti-c-myc-Antikörper, ebenfalls aus dem Kaninchen, in einer 1:500 Verdünnung zum Einsatz (s. 3.4). Es folgte eine Inkubation für 60 min bei RT. Im Anschluss wurden die Deckgläschen nach Abtropfen erneut in ein Trägernetz platziert und dreimal für 5 min in 1xPBS gewaschen. Abermals wurden die Deckgläschen abgetropft und in die feuchte Kammer überführt. Der Sekundärantikörper wurde in 1xPBS/2 % FCS-Lösung in gewünschtem Ausmaß verdünnt und erneut 150 µl der Lösung auf jedes Deckglas pipettiert.

Für die anschließende 60-minütige Inkubation wurde die Plastikschiene komplett in Aluminiumfolie eingehüllt um die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper vor Lichteinwirkung zu schützen und so ein frühzeitiges Ausbleichen zu vermeiden. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Deckgläschen in ein Trägernetz platziert und 3 Mal in 1xPBS gewaschen. Zum Schutz der Sekundärantikörper erfolgten die Waschschrirte in mit Aluminiumfolie eingewickelten Plastikschiene. Im Anschluss wurden die Deckgläschen abgetropft und mit Elvanol auf Objektträgern eingebettet.

Die Auswertung erfolgte nach ca. 20 h an einem Zeiss Axioskop 2 Fluoreszenzmikroskop.

### 4.5 Methoden zur Anwendung am Versuchstier

Die Züchtung, Haltung und Handhabung der Versuchstiere wurde von Dr. Yvan Peterschmitt und Dr. Ramon Tasan aus der AG von Prof. Dr. Günther Sperk des Pharmakologischen Institutes an der Medizinischen Universität Innsbruck übernommen und erfolgte in Übereinstimmung mit den bestehenden Richtlinien.

#### 4.5.1 Stereotaktische Injektion

Die Mäuse wurden aus ihren Heimatkäfigen genommen, gewogen und in einen neuen Käfig überführt.

Zur Einleitung der Anästhesie wurden 200 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Schoeller Chemie Produkte, Wien, Österreich) intraperitoneal injiziert. Sobald die Maus nicht mehr auf Schmerzreize reagierte, wurde sie in einen Stereotaktischen Rahmen (Kopf 957) eingespannt. In regelmäßigen Abständen wurde der Bewusstseinsstatus der Maus mittels Schmerzreiz überprüft und gegebenenfalls Sevofluran (Abott GmbH, Wien, Österreich) zur Aufrechterhaltung der Narkose per Inhalation appliziert.

Die Kopfhaut wurde mit einem Skalpell aufgeschnitten und das freigelegte Areal mit 70% Ethanol desinfiziert.

Als nächstes wurde überprüft, ob die beiden Orientierungspunkte Lambda und Bregma horizontal in einer Ebene lagen und falls dies nicht der Fall war, die Position des Kopfes entsprechend verändert. Der Schädel wurde mit einem W&H Trend HD43 EM Zahnbohrer geöffnet und die Dura mater vorsichtig mit einer sterilen Kanüle entfernt.

Die Injektionskanüle wurde mit Hilfe des Stereotaktischen Rahmens auf die gewünschten Zielkoordinaten (-0,2; -0,2; 0,2 für den dorsalen Hippocampus) eingestellt und 1 µl Viruspräparation mit 0,05 µl/min mit Hilfe einer Stoelting Infusionspumpe und einer Hamilton 1701 10 µl Syringe injiziert.

Nach abgeschlossener Injektion wurde die Kanüle für 5 min am Injektionsort gelassen und nach einer Verweildauer von je 2 min um jeweils 0,5mm herausgezogen.

Die Injektionen wurden an 4 iLox-Mäusen und 4 Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Dabei entsprach das injizierte Volumen je  $1 \times 10^8$  genomischen Partikel (GP) AAV-Cre-GFP des Pseudotyps 1 bei den iLox-Mäusen und  $3 \times 10^{10}$  GP AAV-γ2EGFP-Opt des Subtyps 2 bei den

Wildtyp-Mäusen. Der rAAV-Vektor AAV-Cre-GFP war von Dr. Stefan Weger kloniert und von Kerstin Winter hergestellt und präpariert worden. Er kam an Stelle des im Verlauf dieser Arbeit klonierten und hergestellten rAAV-Vektors AAV-Cre zum Einsatz, da dieser nach vorangehenden Versuchen nach stereotaktischer Injektion nur eine schwache *In-Vivo*-Expression (beurteilt Anhand von In-Situ-Hybridisierung an Hirnschnitten) bewirkte.

Um die verwendeten Zielkoordinaten zu Überprüfen wurde vor den Vektorinjektionen je eine Wildtyp-Maus mittels zervikaler Dislokation getötet und 1µl Methylenblau wie oben beschrieben injiziert. Das Gehirn wurde entnommen und bei -20°C eingefroren. Mit einem Microm Hm560 Kryotom wurden Schnitte mit einer Schichtdicke von 100 µm angefertigt und diese unter einer Zeiss Stemi DV40 Lupe analysiert.

Um eine Erholung der Tiere und eine Expression der Transgene durch die AAV-Vektoren zu gewährleisten wurden die Mäuse für 30 Tage in ihren Heimatkäfigen gehalten bevor die Auswertung Anhand von Hirnschnitten vorgenommen wurde.

### **4.5.2 Fixieren von Gehirnen durch transkardiale Perfusion mit 4% Paraformaldehyd**

Das Fixieren der Gehirne wurde von Yvan Peterschmitt durchgeführt. Die Mäuse wurden mit 100 mg/kg Ketaminhydrochlorid anästhesiert. Der Thorax wurde eröffnet, eine Kanüle durch den linken Ventrikel in die Aorta geschoben und die Gefäße neben der Wirbelsäule durchtrennt. Es folgte eine Perfusion mit 50 ml 1xPBS gefolgt von einer Perfusion mit 100 ml eiskalter 4 % Paraformaldehyd/PBS-Lösung. Im Anschluss wurde der Kopf der Maus abgetrennt, das Gehirn entfernt und für 90 min in eiskalter 4% Paraformaldehyd/PBS-Lösung weiter fixiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Gehirn für 20 h in 80 ml 20 % Sucrose-Lösung bei 4°C aufbewahrt. Im Anschluss wurde das Gehirn in frische Sucrose-Lösung überführt und dort für 1 h belassen.

### **4.5.3 Einfrieren von Gehirnen**

Das Einfrieren der Gehirne wurde von Yvan Peterschmitt durchgeführt und erfolgte entweder nach vorheriger Perfusion (s. 4.4.2) oder sofort nachdem die Mäuse per zervikaler Dislokation getötet und das Gehirn entnommen worden war.

Die Gehirne wurden für 3 min in 200 ml Isopentan mit einer Temperatur von  $-70^{\circ}\text{C}$  getaucht. Im Anschluss wurden die Gehirne in ein Tube überführt und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Um ein Abdampfen des Isopentans zu erlauben wurde das Tube zunächst für 48 h offen gelassen.

### 4.5.4 Anfertigung von Hirnschnitten

Die Gehirne wurden vor dem Schneiden für einige Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert, anschließend in Tissue-Tek eingebettet und in einem Zeiss Microm Hm560 mit der gewünschten Schichtdicke bei  $-20^{\circ}\text{C}$  geschnitten. Bei unperfundierten Gehirnen wurde stets darauf geachtet ein Auftauen zu vermeiden. Perfundierte Schnitte wurden frei flottierend in TBS-Azid bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 4.5.5 Färbung von Hirnschnitten mit Cresylviolett

*Lösungen und Puffer:*

Cresylviolett-Lösung	0,5 %	Cresylviolett
	100 mM	Natriumacetat
	566 mM	Essigsäure

Die Färbung von Hirnschnitten mit Cresylviolett diente der Beurteilung der Anatomie. Sie wurde entweder an unbehandelten Schnitten oder als Gegenfärbung nach der In-Situ-Hybridisierung durchgeführt. Unbehandelte Schnitte wurden zunächst für 10 min in 2 % Paraformaldehyd fixiert, für Schnitte bei denen bereits eine In-Situ-Hybridisierung durchgeführt worden war fiel dieser Schritt weg. Die Schnitte wurden für je 2 min in 70 %, 95 % und 2 Mal 100 % Ethanol getaucht. Im Anschluss wurden die Schnitte für 2 Mal 5 min in Butylacetat und für je 2 min 2 Mal in 100 %, 95 % und 70 % Ethanol getaucht. Nach kurzem Dippen in  $\text{H}_2\text{O}$  wurden die Schnitte für 40 sec in 1:6 verdünnter Cresylviolett-Lösung gefärbt und erneut in  $\text{H}_2\text{O}$  gedippt. Folgend wurden die Schnitte für je 1 min in 70 %, 95 % und 2 Mal 100 % Ethanol getaucht. Abschließend wurden die Schnitte 2 mal 5 min in Butylacetat inkubiert und mit Eukitt eingedeckt.

### 4.5.6 Indirekte Immunhistochemie

#### *Lösungen und Puffer:*

1xTBS-Puffer pH 7,2	50 mM	Tris
	0,85 %	NaCl
1xTBS/Azid	0,05 %	Azid
DAB-Stocklösung	1,25 g	3,3 – Diaminobenzidin- tetrahydrochlorid in 50 ml 1xTBS

Die indirekte Immunhistochemie diente dem Nachweis der In-Vivo-Expression der Transgene durch die rAAV-Vektoren nach stereotaktischer Injektion (s. 3.4.1) in den dorsalen Hippocampus von Mäusen. Als Untersuchungsmaterial dienten mit 4% Paraformaldehyd fixierte Hirnschnitte (s. 3.4.2 und 3.4.5) mit einer Schichtdicke von 30  $\mu\text{m}$ .

Die Schnitte wurden zunächst für 30 min in TBS-Triton eingelegt. Die Tritonkonzentration variierte dabei je nachdem welcher Antikörper verwendet werden sollte. Für den Nachweis des  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins wurde eine 0,2 % und für den Nachweis der Cre-Rekombinase eine 0,4 % TBS-Triton-Lösung verwendet. Wurden die Schnitte vor der Immunhistochemie weniger als 48 h in TBS-Azid gelagert, so wurde ein Peroxidaseblock durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die TBS-Triton-Lösung abpipettiert und die Schnitte für 15-20 min in TBS mit 20% Methanol und 0,6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert. Im Anschluss an den Peroxidaseblock wurden die Schnitte für 5 min in TBS-Triton gewaschen.

Wurden die Schnitte bereits mehr als 48 h in TBS-Azid gelagert, so konnte auf die beiden vorangehenden Schritte verzichtet werden. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurden die Schnitte für 90 min in 500  $\mu\text{l}$  eines 10% Blocking Serums inkubiert. Das Blocking Serum setzte sich dabei aus 10% Serum des Tieres, in dem der Sekundärantikörper generiert wurde und 1xTBS zusammen. Im Anschluss wurde der Primärantikörper im gewünschten Ausmaß in 10% Blocking Serum mit 0,1% Natrium-Azid verdünnt und die Schnitte in je 300  $\mu\text{l}$  der Antikörperverdünnung 18 h bei RT oder 48-72 h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Schnitte 3 Mal für 5 min in 2 ml TBS-Triton gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in gewünschtem Ausmaß in 10% Serum/TBS verdünnt und die Schnitte für 150 min bei RT in der Antikörperlösung inkubiert. Im Anschluss wurde 3 mal

## Methoden

---

mit 2 ml 1xTBS-Puffer gewaschen. Zur Färbung wurde 1 ml DAB-Stocklösung mit 50 ml 1xTBS-Puffer und 8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) gemischt, durch einen 0,2  $\mu$ m Filter filtriert und die Schnitte für 4-10 min in dieser Lösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte wieder in TBS-Puffer überführt. Das Aufziehen der Schnitte auf Objektträger erfolgte in 50% Ethanol. Im Anschluss wurden die Schnitte bei RT getrocknet und folgend für je 5 min in 50%, 75%, 95%, 2 Mal 100% Ethanol und 2 Mal in Butylacetat getaucht. Abschließend wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt.



### 5. Ergebnisse

Der iLoxF77I-Mausstamm trägt eine Punktmutation im Gen der  $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors, welche die Bindung einiger Benzodiazepine und verwandter Liganden aufhebt.

Als Teil des Kooperationsprojektes „*The role of GABA<sub>A</sub>-Receptors in fear-related behaviour*“ war es Ziel dieser Arbeit, rAAV-Vektoren herzustellen, die eine Identifikation des neuronalen Korrelats der Anxiolyse durch selektive Wiederherstellung der Benzodiazepinbindung an definierten Orten im Gehirn dieses Mausstammes ermöglichen sollten. Dazu mussten die Vektoren in der Lage sein, nach stereotaktischer Applikation zwei verschiedene Proteine zur Expression zu bringen: die Cre-Rekombinase sollte das mutierte, von LoxP-Sites flankierte  $\gamma 2$ -Gen ausschneiden und so dessen Expression unterbinden. Ein Fusionsprotein aus der Wildtyp- $\gamma 2$ -Untereinheit mit EGFP ( $\gamma 2$ EGFP) sollte die Bildung von benzodiazepinsensiblen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren ermöglichen und durch die Fluoreszenzmarkierung eine Unterscheidung zur mutierten Variante ermöglichen.

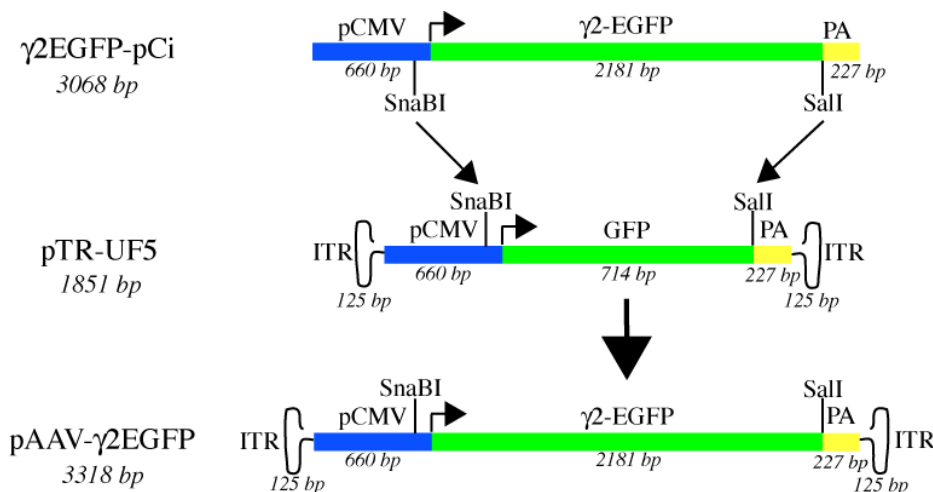
Für die rAAV-Vektorproduktion wurde ein Verfahren gewählt, bei dem ein Vektorplasmid und ein so genanntes Helferplasmid in die Verpackungszelllinie (HEK293-Zellen) kointransfiziert wurden (s. 4.3). Das Vektorplasmid besteht dabei aus einer Expressionskassette für das gewünschte Transgen und wird von den *inverted terminal repeats* (ITR) von AAV-2 flankiert. Das Helferplasmid exprimiert die für die Verpackung in rAAV-Vektoren benötigten AAV-Gene, sowie die benötigten adenoviralen Helferfunktionen (s. 2.1.5). Die Helferplasmide waren verfügbar, die jeweiligen Vektorplasmide wurden neu konstruiert. Zu diesem Zweck wurde eine Expressionskassette für das jeweilige Transgen zwischen die ITRs von AAV-2 kloniert. In sämtlichen für diese Arbeit hergestellten Konstrukten wird die Transkription der Transgene durch den frühen Promoter/Enhancer des humanen Cytomegalievirus (CMV) kontrolliert. Die Wahl fiel auf diesen Promoter, da er gut charakterisiert ist, eine starke konstitutive Expression in einer Vielzahl von Säugetierzelltypen ermöglicht und mit einer Größe von 660 Basenpaaren für eine Anwendung in rAAV-Vektoren geeignet ist<sup>112</sup>. Im Anschluss an die Klonierung der Vektorkonstrukte wurden diese auf Ihre Fähigkeit überprüft das jeweilige Transgen nach Transfektion in Zellkultur zur Expression zu bringen. Konnte dieses bestätigt werden, so wurden die Vektorkonstrukte in rekombinante AAV-Kapside verpackt und auf die Fähigkeit eine Transgenexpression in infizierten Zellen zu bewirken untersucht. Konnten sämtliche dieser Schritte erfolgreich durchgeführt werden, so wurden die rAAV-Vektoren *in-vivo* getestet.

## 5.1 Herstellung eines rAAV-Vektors für die Expression der $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors als Fusionsprotein mit EGFP

### 5.1.1 Herstellung eines rAAV-Vektors unter Verwendung des $\gamma 2$ EGFP-Leserahmens aus dem Plasmid $\gamma 2$ EGFP-pCi

#### 5.1.1.1 Klonierung des Vektorplasmides für die rAAV-Herstellung

Der ORF von  $\gamma 2$ EGFP wurde durch geeignete Restriktions-endonukleasen aus dem Plasmid  $\gamma 2$ EGFP-pCi (s. 3.5) aus dem Labor von Prof. William Wisden isoliert und in das AAV-Backbone-Konstrukt pTR-UF5 (s. 3.5) eingefügt. Das resultierende Konstrukt wurde pAAV- $\gamma 2$ EGFP genannt (s. Abb. 5.1). Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Restriktionsverdau (s. 4.1.7) und Agarosegelelektrophorese (s. 4.1.8) bestätigt (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Klonierung des Plasmides pAAV- $\gamma 2$ EGFP.**

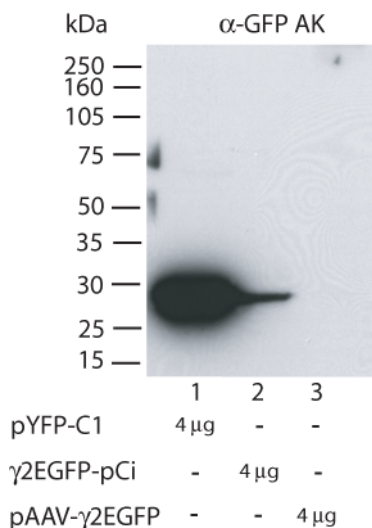
Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen SnaBI und Sall wurde der ORF des  $\gamma 2$ EGFP-Fusionsproteins mit Anteilen des CMV-Promoters aus dem Konstrukt  $\gamma 2$ EGFP-pCi isoliert, in das Plasmid pTR-UF5 eingefügt und so das AAV-Vektorkonstrukt pAAV- $\gamma 2$ EGFP generiert.

ITR = AAV-2 *inverted terminal repeat*; pCMV = CMV-Promoter; PA = *bovine Growth Hormone* Polyadenylierungssite;  $\gamma 2$ EGFP = Leserahmen für das Fusionsprotein aus der  $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors und EGFP; GFP = Leserahmen für das *green fluorescent protein*; Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen: SnaBI, Sall.

## 5.1.1.2 Expression des $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins nach Transfektion des Vektorkonstruktes in Zellkultur

### 5.1.1.2.1 Nachweis der $\gamma$ 2EGFP-Expression im Western Blot

Im Anschluss an die Klonierung wurde die Expression von  $\gamma$ 2EGFP durch das Vektorkonstrukt nach Transfektion in Zellkultur überprüft. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Kopräzipitation (s. 4.2.3) entweder mit dem Vektorkonstrukt (pAAV- $\gamma$ 2EGFP), dem Ausgangskonstrukt für die Klonierung ( $\gamma$ 2EGFP-pCi) oder einem Kontrollkonstrukt (pYFP-C1) transfiziert. 40 Stunden nach der Transfektion wurden Proteinextrakte hergestellt, per SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot analysiert (s. 4.2.7, 4.4.1 & 4.4.3). Zur Detektion der  $\gamma$ 2EGFP- bzw. YFP-Expression diente ein polyklonaler  $\alpha$ -GFP-Antikörper aus dem Kaninchen.



**Abb. 5.2: Western Blot zur Überprüfung der Expression von  $\gamma$ 2EGFP nach Transfektion von pAAV- $\gamma$ 2EGFP.**

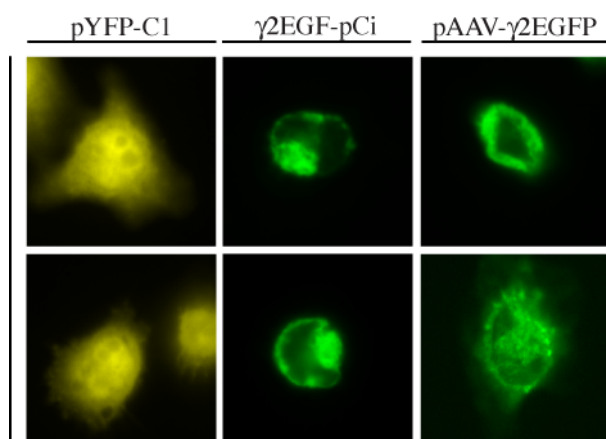
HeLa-Zellen wurden mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation transfiziert. Die Zusammensetzung der Transfektionsansätze ist unter der jeweiligen Spur angegeben. 40 h nach Transfektion wurden Proteinextrakte hergestellt und diese nach SDS-PAGE im Western Blot analysiert. Zur Detektion dienten ein  $\alpha$ -GFP-Antikörper aus dem Kaninchen und ein mit Peroxidase konjugierter  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper aus der Ziege. Der Pfeil markiert das Kontrollsignal in Spur 1.

Mit einer Länge von 727 Aminosäuren sollte sich das monomere  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsprotein als Bande bei 79,9 kDa darstellen. Weder für das Vektorkonstrukt, noch für das Ausgangskonstrukt konnten Banden im entsprechenden Bereich detektiert werden. Das als Transfektionskontrolle dienende Konstrukt, pYFP-C1 (s. 3.5), welches das *yellow fluorescent protein* (YFP) unter Kontrolle des CMV Promoters exprimiert, lieferte ein deutliches Signal (s. Abb. 5.2). Die reaktive Bande in Spur 2 auf Höhe des Kontrollsignals ist am ehesten durch *spill-over* aus Spur 1 zu erklären. Das deutliche Signal der Transfektionskontrolle schließt ein methodisches Problem bei der Transfektion weitgehend aus. Vermutlich war die Expression von  $\gamma$ 2EGFP in diesem Versuch zu gering um im Western Blot nachweisbar zu sein.

### 5.1.1.2.2 Nachweis der $\gamma$ 2EGFP-Expression unter Verwendung einer alternativen Zelllinie mittels Fluoreszenzmikroskopie

In Versuchen zur Expression des  $\gamma$ 2-EGFP-Proteins in Zellkultur durch eine andere Arbeitsgruppe waren HEK293-Zellen und nicht wie in dieser Arbeit HeLa-Zellen verwendet worden<sup>111</sup>. Zur Optimierung der Bedingungen wurden in einem erneuten Versuch HEK293-Zellen analog zum vorherigen Experiment transfiziert.

Um in der Lage zu sein, auch einzelne,  $\gamma$ 2EGFP-positive Zellen zu erfassen, wie es Western Blot nicht möglich ist, wurden die Transfektionsansätze per Fluoreszenzmikroskopie untersucht (s. 4.4.4). Hierfür wurden die Zellen 40 Stunden nach Transfektion fixiert und im Anschluss auf EGFP- bzw. YFP-Autofluoreszenz hin untersucht.



**Abb. 5.3: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der  $\gamma$ 2EGFP-Expression.**

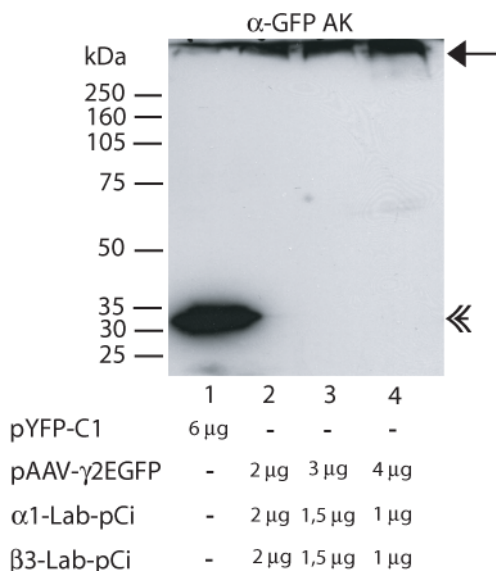
HEK293-Zellen wurden auf Deckgläschen in 6-cm-Schalen ausgesät und mittels Calcium-Phosphat-Kopräzipitation-Kopräzipitation mit je 4  $\mu$ g DNA der Konstrukte, pYFP-C1,  $\gamma$ 2EGFP-pCi oder pAAV- $\gamma$ 2EGFP transfiziert. 40 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und weitere 12 h später im grünen Kanal eines Fluoreszenzmikroskops auf Autofluoreszenz hin untersucht. YFP lässt sich auch im grünen Kanal detektieren.

Die YFP-Fluoreszenz der Zellen im Kontrollansatz verteilt sich relativ homogen bis in die Zellausläufer. Im Gegensatz dazu konzentriert sich die EGFP-Fluoreszenz perinukleär (s. Abb. 5.3). Dieses Verteilungsmuster ist gut mit einer Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zellen vereinbar, wie sie in Versuchen zur heterologen Expression der  $\gamma$ 2-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors von anderen Gruppen beschrieben ist<sup>113</sup>. Eine Retention im ER würde zur vermehrten Degradierung des Fusionsproteins und somit zu einem geringen Expressionsniveau beitragen und bietet somit eine Erklärung für die fehlende Nachweisbarkeit im Western Blot.

### 5.1.1.2.3 Kotransfektion von Konstrukten für die Expression der $\alpha$ 1- und $\beta$ 3-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors mit dem Vektorkonstrukt für eine verbesserte Expression des $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins

Die heterologe Koexpression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors mit  $\gamma$ 2EGFP führte in Versuchen anderer Arbeitsgruppen zur Bildung von Rezeptorpentameren, welche in die Plasmamembran der Zellen eingebaut werden<sup>113-115</sup>. Auf diese Weise ließe sich eine erhöhte Degradierung des Fusionsproteins durch Retention im ER aufheben und möglicherweise das Expressionsniveau von  $\gamma$ 2EGFP stabilisieren. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die Konstrukte  $\alpha$ 1-Lab-pCi und  $\beta$ 3-Lab-pCi (s. 3.5), welche die  $\alpha$ 1- bzw. die  $\beta$ 3-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors zur Expression bringen können, mit dem  $\gamma$ 2-Vektorkonstrukt (pAAV- $\gamma$ 2EGFP) kotransfiziert. Auf diese Weise sollte eine Expression sämtlicher, für einen Einbau in die Zellmembran benötigten GABA<sub>A</sub>-Untereinheiten bewirkt werden.

Zur weiteren Optimierung der Versuchsbedingungen wurde das, auf Lipofektion basierende, FuGENE HD® System verwendet, welches eine hohe Transfektionseffizienz versprach (s. 4.2.4).



**Abb. 5.4: Western Blot zum Nachweis der Expression des  $\gamma$ 2EGFP-Proteins nach Kotransfektion von Konstrukten für die Expression der  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 3-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors.**

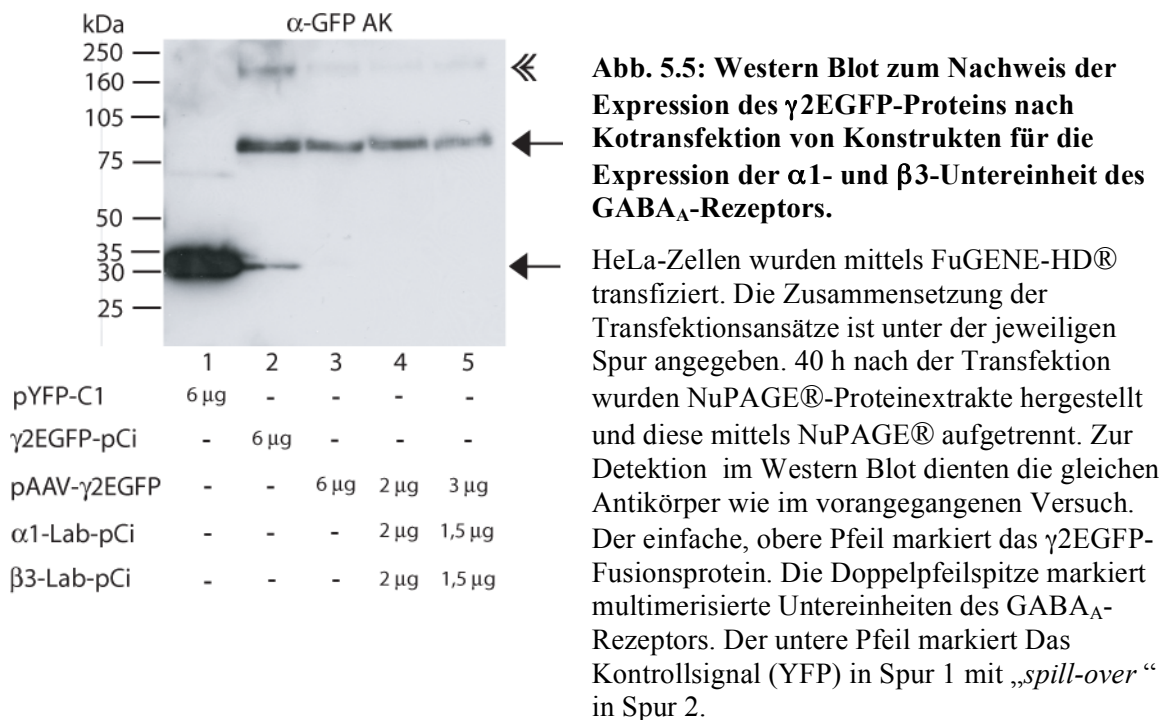
HEK293-Zellen wurden mit Hilfe des FuGENE-HD®-Systems transfiziert. Die Zusammensetzung der Transfektionsansätze ist unter der jeweiligen Spur angegeben. 40 h nach Transfektion wurden Proteinextrakte hergestellt und nach SDS-PAGE im Western Blot analysiert. Zur Detektion dienten ein polyklonaler  $\alpha$ -GFP Antikörper aus dem Kaninchen und ein mit Peroxidase konjugierter  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper aus der Ziege. Der Pfeil markiert reaktive Banden im Hochmolekularen Bereich, welche durch Multimerisierung der Rezeptoruntereinheiten entstanden sind. Auf Höhe der doppelten Pfeilspitze befindet sich in Spur 1 das Signal der Kontrolle (YFP). Am oberen Rand ist eine unspezifische Reaktion durch unvollständige Abtrennung des Sammelgels vor dem Blotten zu sehen.

Wie zuvor konnte das als Transfektionskontrolle dienende YFP bei ca. 30 Kilodalton detektiert werden. Am oberen Rand der Spur der Transfektionskontrolle zeigte sich eine

## Ergebnisse

unspezifische Reaktion durch dort verbliebene Reste des Sammelgels (s. Abb. 5.4, Spur 1). Für keinen der Ansätze zeigten sich Banden, die dem monomeren  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsprotein entsprechen. Allerdings konnten im hochmolekularen Bereich über 250 kDa reaktive Banden detektiert werden, die vermutlich Multimeren aus den Rezeptoruntereinheiten entsprechen (s. Abb. 5.4, Spuren 2-4). Die Reaktivität der Banden nimmt mit steigender Menge des Konstruktes pAAV- $\gamma$ 2EGFP zu, was im Sinne einer vermehrten Expression des Fusionsproteins durch höhere Mengen des Vektorkonstruktes erklärbar ist. Die Multimerisierung wurde vermutlich durch das zur Proteinextraktion verwandte Verfahren begünstigt.

Um auch monomeres  $\gamma$ 2EGFP eindeutig nachzuweisen, wurde in einem erneuten Versuchsansatz statt des herkömmlichen Verfahrens zur Proteinextraktion und SDS-PAGE das NuPAGE®-System eingesetzt, welches durch Reduktion intermolekularer Disulfidbindungen einer Multimerisierung entgegenwirken sollte (s. 4.2.8 & 4.4.2).

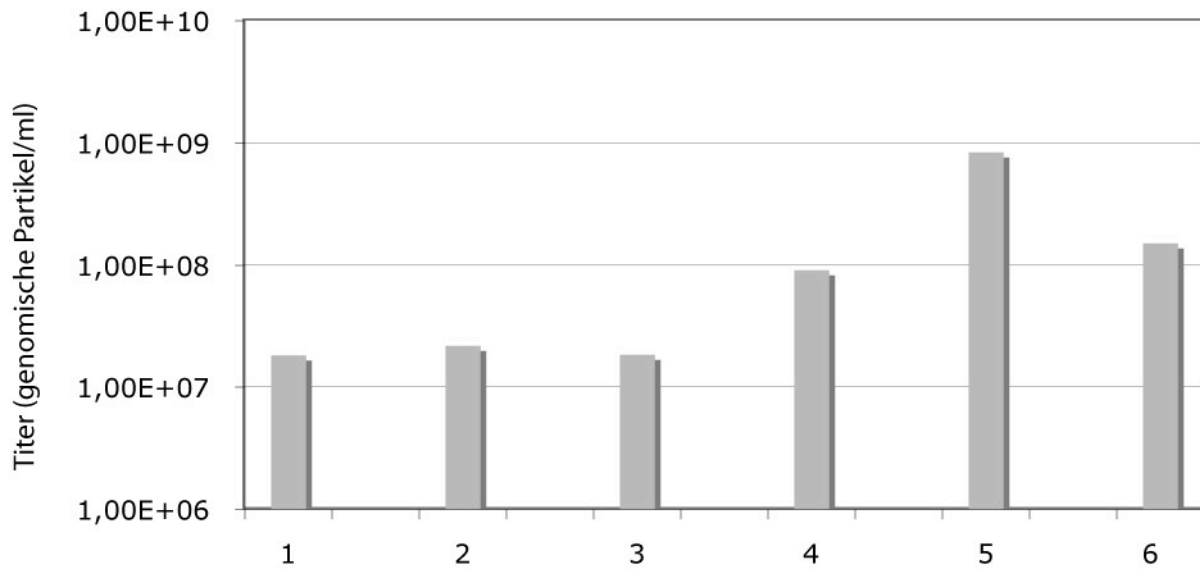


Erstmalig stellten sich nun im Western Blot neben dem Signal der Transfektionskontrolle (pYFP-C1), reaktive Banden im für das monomere  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsprotein zu erwartenden Molekulargewichtsbereich bei ca. 80 kDa dar. Die Expression von  $\gamma$ 2EGFP durch das Ausgangskonstrukt für die Klonierung der Vektorkonstrukte ( $\gamma$ 2EGFP-pCi) war dabei am stärksten (s. Abb 5.5, Spur 2). Der Ansatz mit alleiniger Transfektion des AAV-Vektorkonstruktes lieferte ein gleichstarkes Signal wie der Ansatz, in dem die Konstrukte für

die Expression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten gemeinsam mit dem Vektorkonstrukt im Verhältnis 1:1:1 kotransfiziert wurden (s. Abb 5.5, Spuren 3 & 4). Der Ansatz, in dem die transfizierten DNA-Mengen von AAV-Vektorkonstrukt : Konstrukt zur Expression der  $\alpha$ -Untereinheit : Konstrukt zur Expression der  $\beta$ -Untereinheit 2 : 1 : 1 betrug, lieferte ein schwächeres Signal (s. Abb. 5.5, Spur 5). Die Kotransfektion von Konstrukten für die Expression der  $\alpha$ 1- und der  $\beta$ 3-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors konnte eine Stabilisierung der Expression des  $\gamma$ 2EGFP-Proteins bewirken: Trotz der insgesamt reduzierten Menge an transfiziertem Vektorkonstrukt wurde ein vergleichbares Expressionsniveau erreicht, wie nach ausschließlicher Transfektion des Vektorkonstruktes (vgl. Abb. 5.5, Spur 3 & 4). Trotz des Einsatzes des NuPAGE®-Proteinextraktions- und Elektrophoreseverfahrens zeigten sich reaktive Banden in Bereichen höheren Molekulargewichts, die vermutlich auf Multimerisierung der Rezeptoruntereinheiten zurückzuführen sind (s. Abb. 5.5, Markierung mit Doppelpfeil). Die Expression des  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins durch das klonierte AAV-Vektorkonstrukt (pAAV- $\gamma$ 2EGFP) konnte in diesem Versuch nachgewiesen werden und somit die Intaktheit des Plasmides bestätigt werden.

### 5.1.1.3 Verpackung des Vektorkonstruktes in rAAVs

Im Anschluss an die Bestätigung der Intaktheit des Vektorkonstruktes sollte dieses in AAV-Kapside verpackt werden. Die Herstellung von rAAV-Vektoren ist detailliert im Methodenteil beschrieben (s. 4.3). In Kürze wurden 293-Zellen mit dem Vektorkonstrukt (pAAV- $\gamma$ 2EGFP) und dem Helferplasmid pDG1 transfiziert. Nach 40-60 h wurden die transfizierten Zellen durch mehrere Frier-Tau-Zyklen aufgeschlossen und die Zelllysate zur Elimination nicht verpackter DNA mit Benzonase verdaut. Um eine spätere Anwendung *in-vivo* zu erlauben erfolgte eine Aufreinigung der Viruspräparation per Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation und Heparin-Agarose-Affinitätschromatographie (s. 4.3). Der mittels LightCycler-PCR ermittelte Titer der Viruspräparation fiel mit  $1,82 \cdot 10^7$  genomischen Partikeln pro ml gering aus. Im Anschluss an diesen ersten Versuch wurde eine Reihe weiterer Verpackungsansätze durchgeführt, die freundlicherweise von Kerstin Winter übernommen wurden. Leider erbrachten auch diese nur geringe Virusausbeuten (s. Abb. 5.6).



**Abb. 5.6: Virustiter sechs konsekutiver rAAV-Vektorpräparationen**

Die Herstellung, Aufreinigung und Titerbestimmung der Viruspräparationen erfolgte wie im Methodikteil beschrieben (s. 3.3). Als Vektorplasmid wurde pAAV- $\gamma$ 2EGFP und als Helferplasmid wurde pDG1 eingesetzt. Die Verpackungsansätze 2-6 wurden von Kerstin Winter durchgeführt.

Eine denkbare Erklärung für die Probleme bei der Virusherstellung bietet eine, im Rahmen der Klonierung oder Vervielfältigung des Vektorplasmides aufgetretene, Beschädigung der für die Verpackung des Vektorgenoms in AAV-Kapside essentiellen ITRs. Die Restriktionsendonukleasen SphI und KpnI besitzen eine Erkennungssequenz die ein gezieltes Herausschneiden der ITRs aus dem Vektorkonstrukt und somit deren Größenbeurteilung im Gel ermöglicht. Auf diese Weise konnten mittels Restriktionsverdau (s. 4.1.7) und Agarosegelelektrophorese (s. 4.1.8) Deletionen dieser essentiellen DNA-Abschnitte ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Das Auflösungsvermögen eines Restriktionsverdau ist allerdings begrenzt, sodass Punktmutationen im Bereich der ITRs nicht sicher ausgeschlossen werden konnten. Aufgrund ihrer gefalteten Struktur ist die DNA-Sequenzierung der ITRs fehleranfällig. Eine genauere Analyse der Integrität war also nicht möglich. Das erste Teilziel der Arbeit, einen rAAV-Vektor für die Expression der  $\gamma$ 2-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors als Fusionsprotein mit EGFP herzustellen, konnte somit zunächst nicht erreicht werden.

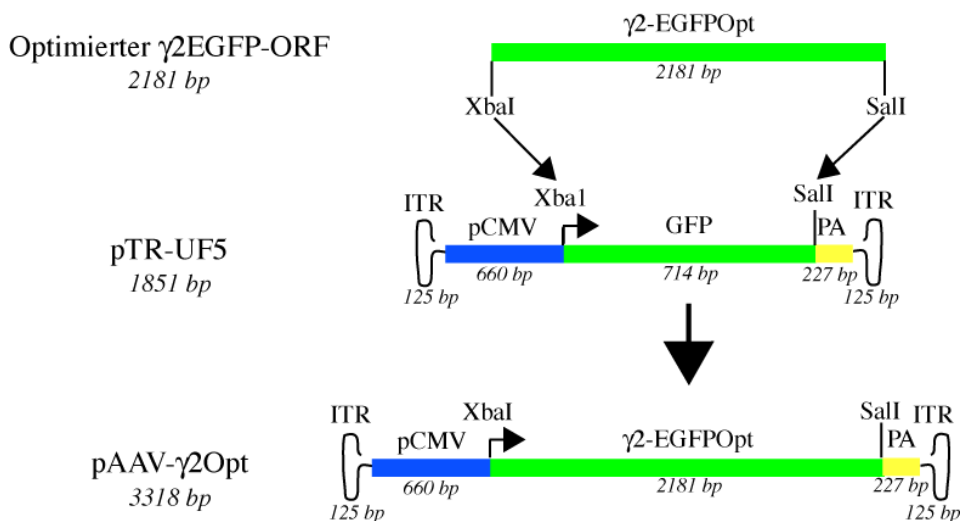


### 5.1.2 Herstellung eines rAAV-Vektors mit optimiertem $\gamma$ 2EGFP-Leserahmen

Mit dem ersten im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Vektorkonstrukt für die Expression des  $\gamma$ 2EGFP-Proteins konnte in Transfektionsversuchen in Zellkultur nur ein niedriges Expressionsniveau erreicht werden und der Nachweis mittels Western Blot war erst nach Optimierung der Versuchsbedingungen möglich (s. 5.1.1.2.1-3). Eine Codon-Optimierung des  $\gamma$ 2EGFP-Leserahmens sollte dessen Expression erhöhen. Diese wurde durch die Firma GeneArt durchgeführt. Der optimierte  $\gamma$ 2EGFP-ORF wurde in das Plasmid pGA4 kloniert und in dieser Form geliefert (s. 3.5).

#### 5.1.2.1 Klonierung des Vektorkonstruktes mit optimiertem Leserahmen

Mit Hilfe geeigneter Restriktionsendonukleasen wurde der codonoptimierte  $\gamma$ 2EGFP-ORF in das Plasmid pTR-UF5 (s. 3.5) kloniert und so das Vektorkonstrukt pAAV- $\gamma$ 2Opt erzeugt (s. Abb. 5.7). Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Restriktionsverdau (s. 4.1.7) und Agarosegelelektrophorese (s. 4.1.8) bestätigt (Daten nicht gezeigt).



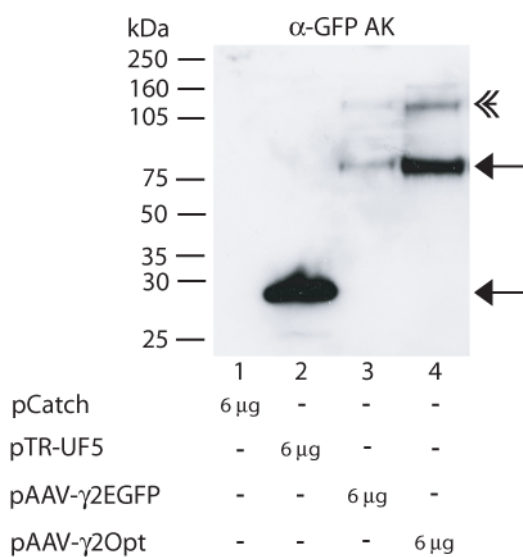
**Abb. 5.7 Schematische Darstellung der Klonierung des Konstruktes pAAV- $\gamma$ 2Opt.**

Der optimierte  $\gamma$ 2EGFP-ORF wurde über die Restriktionsschnittstellen XbaII und SalI in das Plasmid pTR-UF5 eingefügt und so das Konstrukt pAAV- $\gamma$ 2Opt generiert.

Legende: ITR = AAV-2 *inverted terminal repeat*; pCMV = CMV-Promoter; PA = *bovine Growth Hormone* Polyadenylierungssite; GFP = Leserahmen für das *green fluorescent protein*; Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen: XbaI, SalI; Kursiv: Größe der Vektoren bzw. Klonierungselemente in Basenpaaren (bp).

## 5.1.2.2 Expression des $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins nach Transfektion des Konstruktes mit optimiertem Leserahmen

Analog zur Vorgehensweise bei dem zuvor klonierten Vektorplasmid sollte auch für das Konstrukt mit optimiertem Leserahmen eine Expression des  $\gamma$ 2EGFP-Proteins nach Transfektion in Zellkultur gezeigt werden. Um einen Vergleich des Expressionsniveaus vor und nach Codon-Optimierung zu ermöglichen, wurden HeLa-Zellen mit den Konstrukten pAAV- $\gamma$ 2Opt und pAAV- $\gamma$ 2EGFP transfiziert (s. 4.2.4). Als Transfektionskontrolle diente das Plasmid pTR-UF5, welches das *green fluorescent protein* (GFP) unter Kontrolle des CMV-Promoters zur Expression bringt (s. 3.5). Als Negativkontrolle diente das Plasmid pCatch (s. 3.5). Die Versuchsansätze wurden mit dem NuPAGE®-Verfahren aufgeschlossen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 4.2.8, 4.4.2). Im Anschluss erfolgte ein Western Blot (s. 4.4.3).



**Abb. 5.8: Western Blot zum Nachweis der Expression des  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins durch das Konstrukt pAAV- $\gamma$ 2Opt.**

HeLa-Zellen wurden mit Hilfe des FuGENE HD® Systems transfiziert. Die Zusammensetzung der Transfektionsansätze ist unter der jeweiligen Spur angegeben. 40 h nach der Transfektion wurden mittels des NuPAGE®-Verfahrens Proteinextrakte hergestellt und aufgetrennt. Zur Detektion im anschließenden Western Blot dienten ein  $\alpha$ -GFP Antikörper aus dem Kaninchen und ein mit Peroxidase konjugierter  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper aus der Ziege. Der obere Pfeil markiert die Banden für das  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsprotein. Die doppelte Pfeilspitze markiert durch Multimerisierung des Fusionsproteins entstandene Banden. Der Untere Pfeil markiert das Kontrollsignal in Spur 2 (GFP).

Das als Transfektionskontrolle dienende Konstrukt pTR-UF5 lieferte ein deutliches Signal. Auch in beiden Versuchsansätze mit den  $\gamma$ 2EGFP-Vektorkonstrukten konnten Banden im erwarteten Bereich detektiert werden (s. Abb. 5.8). Dabei zeigte das Konstrukt pAAV- $\gamma$ 2Opt eine wesentlich stärkere Expression als das Konstrukt pAAV- $\gamma$ 2EGFP. Die Codon-Optimierung hatte somit das Problem der geringen  $\gamma$ 2EGFP-Expression beseitigen können.

### 5.1.2.3 Verpackung des Vektorkonstruktes mit optimiertem Leserahmen mit Kotransfektion eines Konstruktes zur Expression einer shRNA zur Suppression der $\gamma$ 2EGFP-Expression im Verpackungsansatz

Die bisherigen Versuche das Vektorkonstrukt pAAV- $\gamma$ 2EGFP in rAAV-Kapside zu verpacken, hatten Viruspräparationen mit niedrigen Titern erbracht (s. 5.1.1.3).

Aufgrund dieser Resultate wurde die Hypothese aufgestellt, dass das  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsprotein inhibitorisch auf die AAV-Verpackung wirkt. Sollte dies der Fall sein, so könnte eine transiente Unterdrückung der  $\gamma$ 2EGFP-Expression während der Verpackung des Vektors in rAAV-Kapside eine effiziente Virusherstellung ermöglichen.

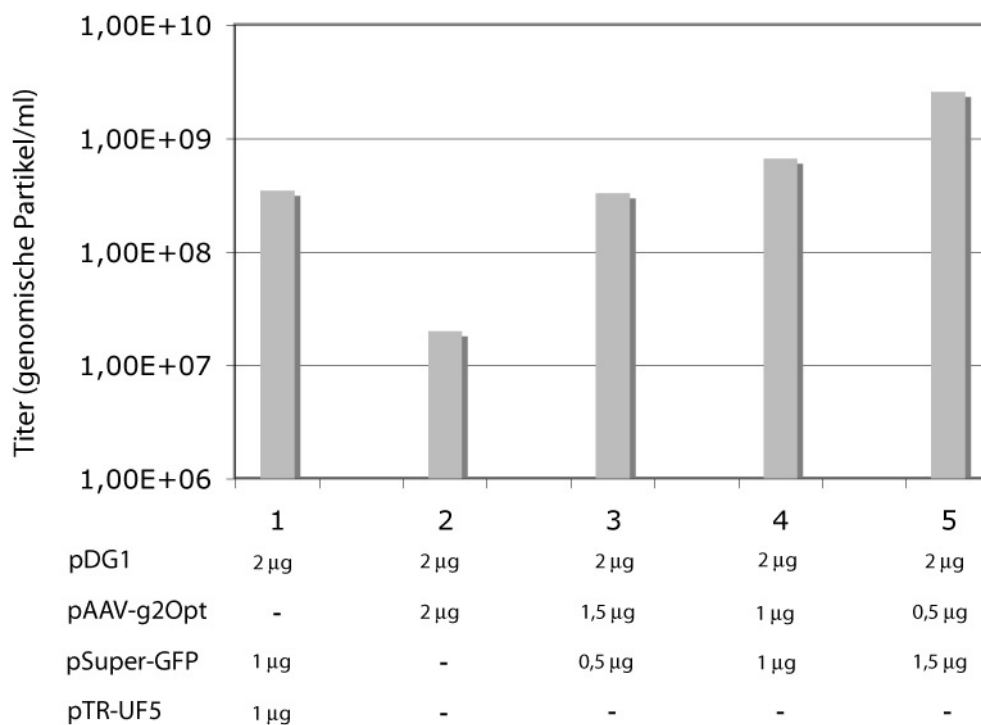
Die Expression von speziell auf die Sequenz des Zielgens abgestimmten so genannten *small Hairpin RNAs* (shRNAs) mit Hilfe von Vektoren bietet eine potente Methode zur hochspezifischen Suppression eines nahezu beliebigen Gens durch Aktivierung der RNAi-Kaskade <sup>116</sup>. Die shRNAs bestehen aus zwei komplementären Strängen von ca. 20 Nukleotiden die einer Sequenz des jeweiligen Zielgens entsprechen und durch eine kurze Schleife von ca. 7 Nukleotiden verbunden sind. Durch ihre gefaltete Struktur imitieren sie die endogen vorkommenden *micro*-RNAs (miRNAs) und werden nach Prozessierung durch das zelluläre Enzym *Dicer* in den so genannten *rna induced silencing complex* (RISC) integriert. Dieser ist dann durch komplementäre Basenpaarung des Antisense-Strangs der shRNA in der Lage an die mRNA des Zielgens zu binden und deren Degradation über die *Argonaut*-Endonuklease zu vermitteln <sup>117</sup>.

Im folgenden Versuch sollte durch Kotransfektion des Konstruktes pSuper-GFP, welches eine gegen GFP gerichtete shRNA exprimiert, über eine Reaktion mit dem EGFP-Anteil der mRNA des Fusionsproteins dessen Expression im Verpackungsansatz unterdrückt werden. Durch die hohe Spezifität dieser Methode würden dabei die für die Verpackung in rAAV-Kapside benötigten Helferfunktionen unbehindert exprimiert werden können.

Auf diese Weise sollte es möglich sein die hypothetisch vorhandene Inhibition des  $\gamma$ 2EGFP-Proteins auf die AAV-Verpackung zu umgehen und höhere Virusausbeuten zu erzielen.

Für ein Pilotexperiment wurden die Konstrukte pSuper-GFP, pAAV- $\gamma$ 2Opt und pDG1 in 293-Zellen kotransfiziert. Dabei wurden von dem Helferplasmid (pDG1) gleichbleibend 2  $\mu$ g DNA eingesetzt. In drei Versuchsansätzen kamen steigende Mengen des shRNA-Konstruktes (0,5  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 1,5 $\mu$ g DNA) bei abnehmenden Mengen des Vektorkonstruktes (1,5  $\mu$ g, 1 $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g) zur Anwendung. Die Kontrollansätze wurden mit pDG1 und den Konstrukten pTR-

UF5 (Positivkontrolle) bzw. pAAV- $\gamma$ 2Opt (Negativkontrolle) transfiziert. Es wurden Frier-Tau-Lysate angefertigt und deren Virustiter nach Benzonaseverdau mittels *Light-Cycler-PCR* ermittelt (s. 4.3). Ohne shRNA wurde ein Virustiter von  $2,01 \cdot 10^7$  genomischen Partikeln je ml erzielt, der ungefähr eine Logstufe unter dem der Positivkontrolle pTR-UF5 mit  $3,47 \cdot 10^8$  genomischen Partikeln je ml lag. In den Ansätzen mit shRNA und Vektorkonstrukt wurden mit steigender Menge shRNA höhere Titer erreicht. Dabei lag der niedrigste Titer im Bereich der Positivkontrolle und der höchste zwei Logstufen oberhalb des Ansatzes ohne shRNA (s. Abb. 5.9). Somit konnte gezeigt werden, dass die Kotransfektion des shRNA-Konstruktes pSuper-GFP in den Verpackungsansatz eine Steigerung der Virusausbeute bewirkt.



**Abb. 5.9: Virustiter von Verpackungsansätzen mit Kotransfektion von pSuper-GFP**

293-Zellen wurden mittels Calcium-Phosphat-Kopräzipitation mit insgesamt 4  $\mu$ g DNA transfiziert. Die Zusammensetzung der verschiedenen Transfektionsansätze ist der jeweiligen Bildunterschrift zu entnehmen. Die Zellen wurden 72 h nach der Transfektion geerntet und durch mehrere Frier-Tau-Zyklen aufgeschlossen. Nach Benzonaseverdau erfolgte die Titerbestimmung der Verpackungsansätze mittels *Light-Cycler-PCR*.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde im Anschluss ein Verpackungsversuch im größeren Maßstab durchgeführt (s. 4.3). Dabei wurden neben dem Helferplasmid pDG1 die Konstrukte pAAV- $\gamma$ 2Opt und pSuper-GFP in gleichen Mengen in die Verpackungszelllinie transfiziert. Nach Anfertigung von Frier-Tau-Lysaten und Benzonaseverdau erfolgte die Aufreinigung der Viruspräparation per Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation und Heparin-Agarose-Affinitätschromatographie. Der mittels LightCycler-PCR berechnete Titer der jeweils 1 ml

umfassenden Fraktionen der Viruspräparation lag zwischen  $1,1 \times 10^{12}$  und  $3,8 \times 10^{13}$  genomischen Partikeln pro ml (s. Tab. 5.1) und somit 4-5 Logstufen über dem Titer der zuvor angefertigten Viruspräparationen (s. 5.1.1.3).

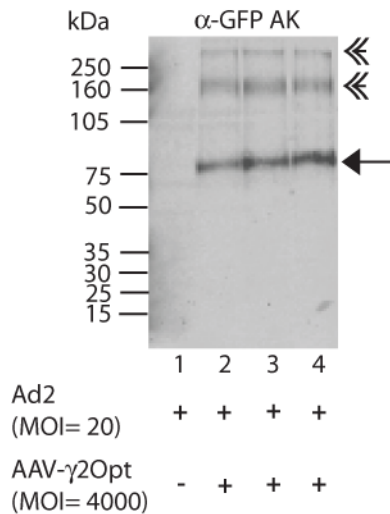
**Tabelle 5.1: Virustiter nach rAAV-Herstellung mit dem Konstrukt pAAV- $\gamma$ 2Opt unter Kotransfektion des shRNA-Konstruktes pSuper-GFP zum *knockdown* der  $\gamma$ 2EGFP-Expression**

Vektorplasmid	Helferplasmid	Zusatz	Titer (genomische Partikel/ml)
pAAV- $\gamma$ 2Opt	pDG1	pSuper-GFP	Fraktion 1: $3,80 \times 10^{13}$ Fraktion 2: $4,90 \times 10^{12}$ Fraktion 3: $1,10 \times 10^{12}$
-	pDG1		$2,31 \times 10^7$

Die Hypothese einer Inhibition der rAAV-Verpackung durch das  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsprotein schien sich bestätigt zu haben.

#### 5.1.2.4 Expression des $\gamma$ 2EGFP-Proteins durch den rAAV-Vektor mit optimiertem Leserahmen

Um zu überprüfen, ob die hergestellten rAAV-Vektoren in der Lage sind, Zellen zu transduzieren, wurden HeLa-Zellen mit AAV- $\gamma$ 2Opt mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 4000 infiziert. Die Genexpression nach Transduktion mit herkömmlichen AAV Vektoren setzt erst nach DNA-Replikation mit Ergänzung des einzelsträngigen Vektorgenoms zur transkriptionskompetenten doppelsträngigen Form ein. Dieser Schritt kann bis zu mehrere Tage benötigen. Zur Beschleunigung der Zweitstrangsynthese wurde eine Ko-Infektion mit Adenovirus Typ 2 (MOI = 20) durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit Adenovirus infiziert wurden. Nach NuPAGE®-Proteinextraktion und Gelelektrophorese wurde ein Western Blot durchgeführt (s. 4.2.8, 4.4.2 & 4.4.3). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Odyssey Infrared Imager.



**Abb. 5.1: Western Blot zum Nachweis der Expression von  $\gamma$ 2EGFP durch AAV- $\gamma$ 2Opt nach Infektion in Zellkultur.**

HeLa-Zellen wurden mit AAV- $\gamma$ 2Opt und Adenovirus Typ 2 (Ad2) koinfiziert. Die MOI ist unter der jeweiligen Spur angegeben. Der Kontrollansatz wurde nur mit Adenovirus Typ 2 (Ad2) infiziert.

40 h nach der Infektion wurden mittels des NuPAGE®-Verfahrens Proteinextrakte hergestellt und aufgetrennt. Im Anschluss wurde ein Western Blot durchgeführt. Dabei wurde ein  $\alpha$ -GFP Antikörper aus dem Kaninchen und der infrarot markierte IRDye800®  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Odyssey Infrared Imager (Licor). Der Pfeil markiert das Expressionssignal von  $\gamma$ 2EGFP. Die doppelten Pfeilspitze markieren Multimeren des Fusionsproteins.

In Spur 1 (Kontrollansatz) ließ sich erwartungsgemäß kein Signal detektieren. In den Spuren 2-4 zeigten sich deutliche Banden im Molekulargewichtsbereich von  $\gamma$ 2EGFP (s. Abb. 5.10). Wie zuvor in den Transfektionsversuchen waren Banden mit höherem Molekulargewicht erkennbar, die Multimeren des Fusionsproteins entsprechen dürften.

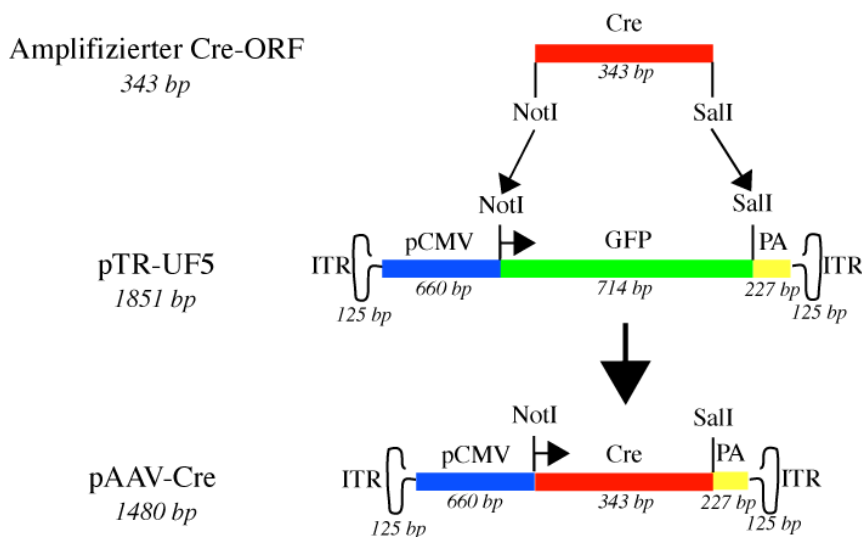
Das erste Teilziel dieser Arbeit, einen rAAV-Vektor herzustellen, der in der Lage ist das  $\gamma$ 2EGFP-Protein zu Expression zu bringen, war erfüllt.

## 5.2 Herstellung eines AAV-Vektors für die Expression der Cre-Rekombinase

Neben dem rAAV-Vektor für die Expression von  $\gamma 2$ EGFP, wurde ein Vektor benötigt, der die Cre-Rekombinase exprimieren kann. Dieser sollte nach stereotaktischer Applikation in das Gehirn von iLoxF77I-Mäusen eine Exzision des punktmutierten Gens der  $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors bewirken.

### 5.2.1 Klonierung eines Vektorkonstruktes für die Expression der Cre-Rekombinase

Der ORF der Cre-Rekombinase wurde mit Hilfe der Primer Cre1 und Cre2 (s. 3.6) per PCR aus dem Plasmid pAAV-Cre-GFP (s. 3.5) amplifiziert (s. 4.1.11) und durch geeignete Restriktionsendonukleasen in das Plasmid pTR-UF5 (s. 3.5) eingefügt. Das so generierte Vektorkonstrukt wurde pAAV-Cre genannt (s. Abb. 5.11). In der Sequenz für die Cre-Rekombinase ist ein Kernlokalisierungssignal enthalten. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Restriktionsverdau (s. 4.1.7) und Agarosegelelektrophorese (s. 4.1.8) bestätigt (Daten nicht gezeigt).

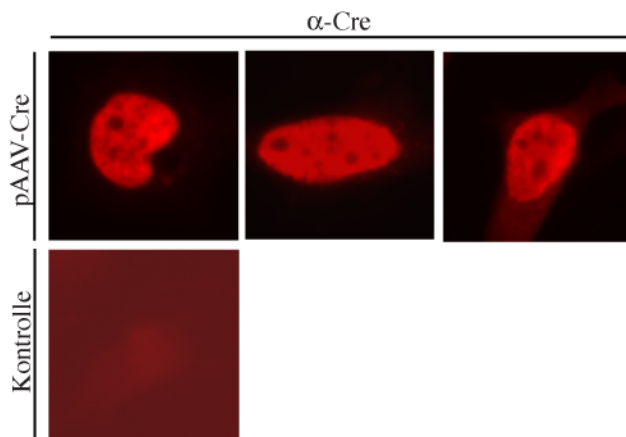


**Abb. 5.2: Schematische Darstellung der Klonierung des Konstruktes pAAV-Cre.**

Der ORF der Cre-Rekombinase wurde aus dem Konstrukt pAAV-Cre-GFP mit Hilfe der Primer Cre1 und Cre2 per PCR amplifiziert, über die Restriktionsschnittstellen NotI und SalI in das Plasmid pTR-UF5 eingefügt und so das Konstrukt pAAV-Cre generiert. Legende: ITR = AAV-2 *inverted terminal repeat*; pCMV = CMV-Promoter; PA = *bovine Growth Hormone* Polyadenylierungssite; Cre = Leseraster die Cre-Rekombinase; GFP = Leseraster für das *green fluorescent protein*; Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen: NotI, SalI; Kursiv: Größe der Vektoren bzw. Klonierungselemente in Basenpaaren (bp).

### 5.2.2 Expression der Cre-Rekombinase nach Transfektion des Vektorkonstruktes

Im Anschluss an die Klonierung sollte die Expression der Cre-Rekombinase nach Transfektion des Vektorkonstruktes in Zellkultur überprüft werden. Hierfür wurden HeLa-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Kopräzipitation (s. 4.2.3) mit dem Konstrukt pAAV-Cre transfiziert. Um zeigen zu können, dass die Cre-Rekombinase mit Hilfe des Kernlokalisierungssignals tatsächlich im Zellkern exprimiert wird, wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzanalyse (s. 4.4.4) unterzogen. Die Transfektionsansätze mit dem Vektorkonstrukt zeigten ein deutliches Signal im Zellkern (s. Abb. 5.12).



**Abb. 5.3: Nachweis der Expression der Cre-Rekombinase nach Transfektion mittels Immunfluoreszenz.**

HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen in 6-cm- Schalen ausgesät und mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation mit 4 µg DNA des Konstruktes pAAV-Cre transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem α-Cre Antikörper aus dem Kaninchen inkubiert. Im Kontrollansatz wurde kein Primärantikörper verwendet. Zur Detektion diente ein mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff TRITC konjugierter α-Kaninchen Antikörper aus der Ziege.

### 5.2.3 Verpackung des Vektorkonstruktes in rAAV-Vektoren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Vektorkonstrukt pAAV-Cre die Cre-Rekombinase nach Transfektion in Zellkultur zur Expression bringen kann, sollte das Konstrukt in AAV-Kapside verpackt werden. Hierfür wurden 293-Zellen mit dem Helferplasmid pDG1 und dem Konstrukt pAAV-Cre transfiziert. Nach Anfertigung von Frier-Tau-Lysaten und Benzonaseverdau erfolgte die Aufreinigung der Viruspräparation per Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation und Heparin-Agarose-Affinitätschromatographie (s. 4.3). Der mittels *Light-Cycler-PCR* ermittelte Titer der jeweils 1 ml umfassenden Fraktionen der Viruspräparation lag zwischen  $8,9 \cdot 10^{10}$  und  $1,4 \cdot 10^{11}$  genomischen Partikeln je ml (s. Tab. 5.2).

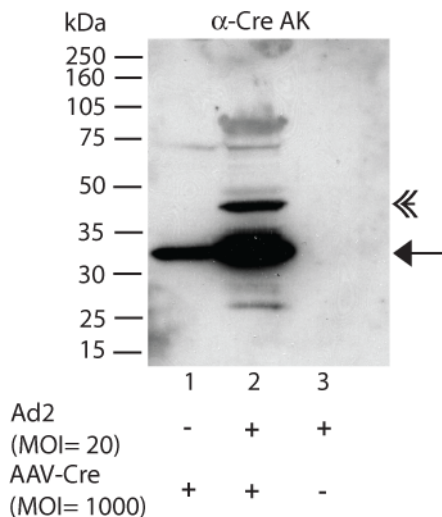


**Tabelle 5.2 Virustiter nach rAAV-Herstellung mit dem Konstrukt pAAV-Cre**

Vektorplasmid	Helferplasmid	Titer (genomische Partikel/ml)
pAAV-Cre	pDG1	Fraktion 1: $8,9 \cdot 10^{10}$ Fraktion 2: $1,1 \cdot 10^{11}$ Fraktion 3: $1,4 \cdot 10^{11}$
-	pDG1	$1,4 \cdot 10^7$

**5.2.4 Expression der Cre-Rekombinase nach Infektion mit rAAV-Vektoren**

Um zu überprüfen, ob die hergestellten rAAVs in der Lage sind Zellen zu transduzieren, wurden HeLa-Zellen mit einer MOI von 1000 mit AAV-Cre infiziert (s. 4.2.5). Zur Beschleunigung der Zweitstrangsynthese wurde ein Ansatz mit Ad 2 (MOI = 20) koinfiziert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit Ad2 infiziert wurden. Es erfolgten eine Proteinextraktion, eine SDS-PAGE und ein Western Blot (s. 4.2.7, 4.4.1 & 4.4.3). Bereits die Infektion mit dem AAV-Vektor allein lieferte ein deutliches Expressionssignal im Bereich zwischen 30 und 35 kDa. Im Ansatz mit Ko-Infektion von Adenovirus Typ 2 fiel dieses erwartungsgemäß noch stärker aus (s. Abb. 5.13).



**Abb. 5.4: Western Blot zum Nachweis der Expression der Cre-Rekombinase nach Infektion mit AAV-Cre in Zellkultur.**

HeLa-Zellen wurden mit AAV-Cre und Adenovirus Typ 2 (Ad2) koinfiziert. Die MOI ist unter der jeweiligen Spur angegeben. Der Kontrollansatz wurde nur mit Ad2 infiziert. 40 h nach der Infektion wurden Proteinextrakte hergestellt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluss wurde ein Western Blot durchgeführt. Dabei kamen ein  $\alpha$ -Cre Antikörper aus dem Kaninchen und ein mit Peroxidase konjugierter  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper aus der Ziege zur Anwendung. Der Pfeil markiert das Expressionssignal der Cre-Rekombinase. Die doppelte Pfeilspitze markiert Multimere der Cre-Rekombinase.

Weiterhin zeigten sich in diesem Ansatz zusätzliche Banden, die am ehesten Multimerisierungs- und Degradationsprodukten der Cre-Rekombinase entsprechen.

Das zweite Teilziel dieser Arbeit, einen rAAV-Vektor für die Expression der Cre-Rekombinase herzustellen, war erfüllt.

### 5.3 Herstellung eines AAV-Vektors für die kombinierte Expression des $\gamma$ 2EGFP-Proteins und der Cre-Rekombinase

Die ursprünglich entwickelte Strategie zur Wiederherstellung der Benzodiazepinwirkung in umschriebenen Hirnregionen sah die aufeinander folgende stereotaktische Injektion von zwei rAAV-Vektoren vor, von denen einer die Cre-Rekombinase und einer  $\gamma$ 2EGFP zur Expression bringen soll.

Bei dieser Strategie musste das, aufgrund der geringen Größe des Zielgebietes im Mäusegehirn ohnehin stark begrenzte, maximal infundierbare Volumen auf beide rAAV-Vektoren verteilt werden. Als Folge konnten weniger Partikel des jeweiligen rAAV-Vektors eingebracht werden, was eine geringere Genexpression zu Folge haben könnte.

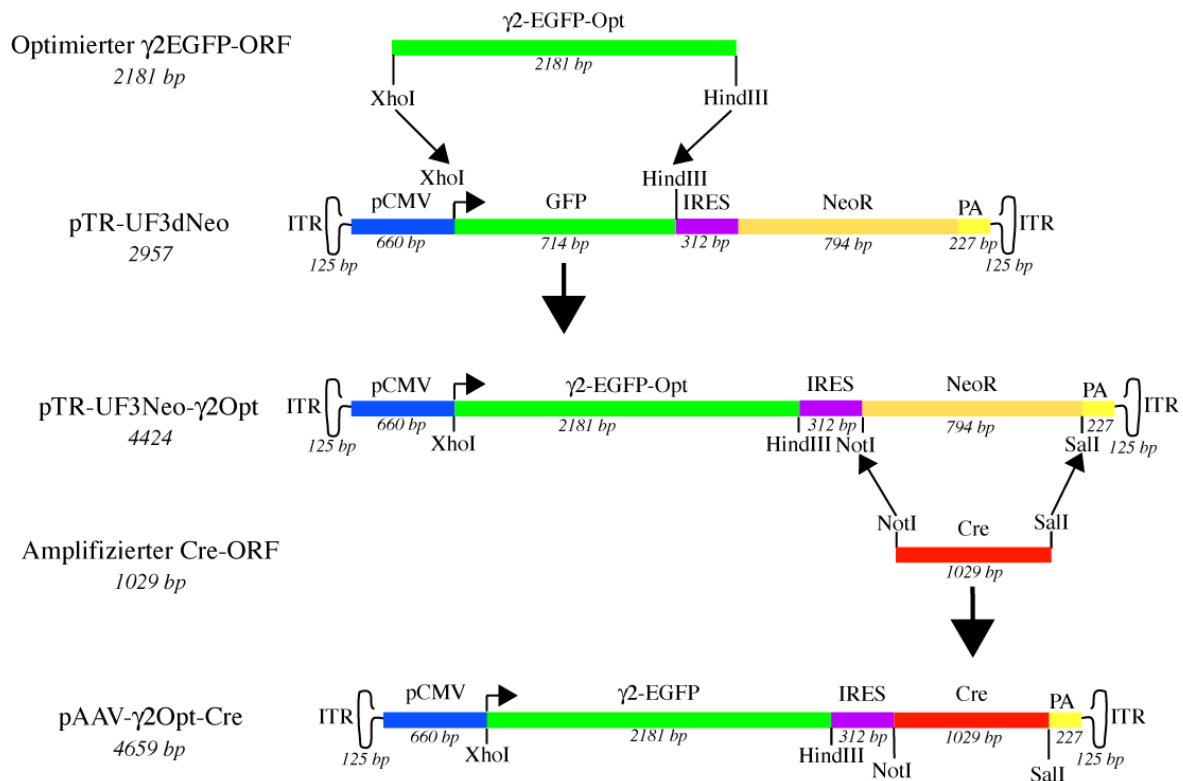
Weiterhin musste bei diesem Verfahren die Infusionsnadel zweimal in das Zielgebiet eingebracht werden. Um diese potenziellen Probleme zu umgehen wurde in weiteren Klonierungen versucht, ein Vektorkonstrukt zu generieren, welches die Herstellung eines rAAV-Vektors ermöglichen sollte, der sowohl die Cre-Rekombinase, als auch das  $\gamma$ 2EGFP-Protein zur Expression bringen kann. Dieses sollte durch Verwendung einer sogenannten *internal ribosome entry site* (IRES) möglich werden. IRESs sind spezifische Nukleotidsequenzen, die erstmals in Picornaviren beschrieben wurde, aber auch in anderen Viren (z.B. dem Hepatitis-C-Virus) und sogar in eukaryoter mRNA vorkommen<sup>118, 119</sup>. Im Falle der Viren ermöglichen sie eine Translation viraler RNA, während gleichzeitig durch unterschiedliche Mechanismen die herkömmliche Translation in der Wirtszelle unterdrückt wird. Auf diese Weise wird die infizierte Zelle komplett auf die Herstellung viraler Proteine umgestellt. Die Funktion von IRESs in eukaryoter mRNA ist weniger gut verstanden. Im Kontext von rekombinanten Vektorsystemen bieten IRESs die Möglichkeit mehrere Gene ohne Verwendung separater Promoter durch einen Vektor zur Expression zu bringen (polycistronische Vektoren). Auf diese Weise kann, was insbesondere für AAV-Vektoren mit ihrer limitierten Verpackungskapazität von Interesse ist, Platz gespart werden und eine etwaige Promoter-Interferenz umgangen werden. Wird eine IRES zwischen zwei Gene platziert, so wird zunächst eine bicistronische mRNA transkribiert, welche die Sequenzinformationen für beide Genprodukte enthält. Die anschließende Translation der Proteine erfolgt über zwei getrennte Mechanismen. Das erste auf der mRNA codierte Protein wird über den konventionellen Mechanismus translatiert, wobei die Erkennung der 5' – Cap-

Struktur durch die kleine Untereinheit des Ribosoms die Translation initiiert. Das zweite auf der mRNA codierte Protein wird, unabhängig von der 5' – Cap-Struktur startend, von der IRES-Sequenz translatiert.

### **5.3.1 Klonierung des Vektorkonstruktes**

Um ein entsprechendes Vektorkonstrukt zu generieren, wurde der optimierte  $\gamma$ 2EGFP-ORF mit Hilfe geeigneter Restriktionsendonukleasen in das Plasmid pTR-UF3dNeo (s. 3.5) vor die in diesem Konstrukt vorhandene IRES des Enzephalomyokarditis-Virus eingefügt. In einem nächsten Schritt wurde der ORF für die Cre-Rekombinase hinter die IRES kloniert. Dies geschah analog zur Vorgehensweise bei der Klonierung des Konstruktes pAAV-Cre (s. 5.2.1). Das so entstandene Vektorkonstrukt wurde pAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre genannt (s. Abb. 5.14). Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Verdau durch Restriktionsenzyme (s. 4.1.7) und Agarosegelelektrophorese (s. 4.1.8) bestätigt (Daten nicht gezeigt).

## Ergebnisse



**Abb. 5.14: Schematische Darstellung der Klonierung des Konstruktes pAAV-γ2Opt-Cre.**

Der optimierte γ2EGFP-ORF wurde über die Restriktionsenzymchnittstellen XhoI und HindIII in das Plasmid pTR-UF3dNeo eingefügt und so das Konstrukt pTR-UF3dNeo-γ2Opt generiert.

Der ORF der Cre-Rekombinase wurde aus dem Konstrukt pAAV-Cre-GFP mit Hilfe der Primer Cre1 und Cre2 per PCR amplifiziert, über die Restriktionsschnittstellen NotI und Sall in das Plasmid pTR-UF3dNeo-γ2Opt eingefügt und so das Konstrukt pAAV-γ2Opt-Cre generiert.

Legende: ITR = AAV-2 *inverted terminal repeat*; pCMV = CMV-Promoter; PA = *bovine Growth Hormone* Polyadenylierungssite; Cre = Leserahmen die Cre-Rekombinase; GFP = Leserahmen für das *green fluorescent protein*; NeoR = Gen für Neomycinresistenz; IRES = *internal ribosome entry site*; Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen: XhoI, HindIII, NotI, Sall; Kursiv: Größe der Vektoren bzw. Klonierungselemente in Basenpaaren (bp).

### 5.3.2 Expression der Transgene nach Transfektion des Vektorkonstruktes

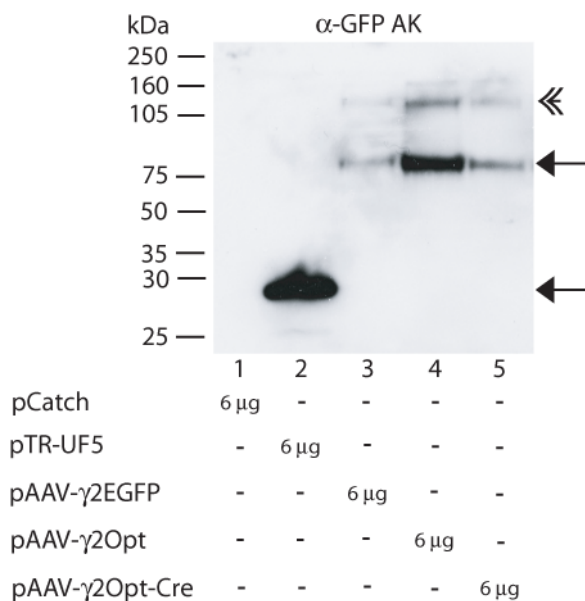
Wie bei den zuvor klonierten Vektorkonstrukten sollte auch für das bicistronische Vektorkonstrukt zunächst eine Expression der Transgene nach Transfektion des Plasmides in Zellkultur gezeigt werden.

#### 5.3.2.1 Expression des $\gamma$ 2EGFP-Proteins

Für den Nachweis der  $\gamma$ 2EGFP-Expression wurden HeLa-Zellen mit den Konstrukten pAAV- $\gamma$ 2Opt, pAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre oder dem Konstrukt pAAV- $\gamma$ 2EGFP transfiziert (s. 4.2.4). Als Transfektionskontrolle diente das Plasmid pTR-UF5 (s. 3.5), als Negativkontrolle das Plasmid pCatch (s. 3.5). Die Versuchsansätze wurden mit dem NuPAGE® Verfahren aufgeschlossen und aufgetrennt (s. 4.2.8 & 4.4.2) und im Anschluss einem Western Blot unterzogen (s. 4.4.3). Die Kontrollansätze lieferten erwartungsgemäß kein Signal (pCatch) bzw. ein deutliches Signal im Molekulargewichtsbereich von GFP (pTR-UF5).

Die Ansätze mit den Vektorkonstrukten lieferten Banden im für das monomere Fusionsprotein zu erwartenden Molekulargewichtsbereich (s. Abb. 5.15).

Das Signal von pAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre fiel dabei schwächer aus als das des Konstruktes pAAV- $\gamma$ 2Opt, war jedoch noch stärker als das Signal des Versuchsansatzes mit pAAV- $\gamma$ 2EGFP.



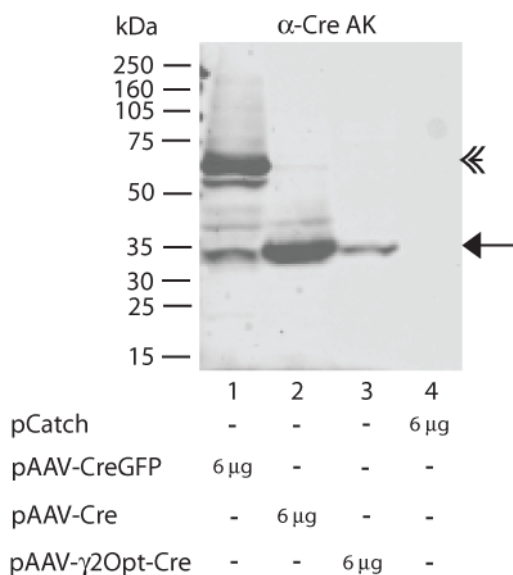
**Abb. 5.15: Western Blot zum Nachweis der Expression von  $\gamma$ 2EGFP durch das Konstrukt pAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre.**

HeLa-Zellen wurden mit Hilfe des FuGENE HD® Systems transfiziert. Die Zusammensetzung der Transfektionsansätze ist unter der jeweiligen Spur angegeben. 40 h nach der Transfektion wurden mittels des NuPAGE®-Verfahrens Proteinextrakte hergestellt und aufgetrennt. Zur Detektion im anschließenden Western Blot dienten ein  $\alpha$ -GFP Antikörper aus dem Kaninchen und ein mit Peroxidase konjugierter  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper aus der Ziege.

Der Pfeil markiert die Banden für das  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsprotein. Die doppelte Pfeilspitze markiert durch Multimerisierung des Fusionsproteins entstandene Banden.

5.3.2.2 Expression der Cre-Rekombinase

Analog zum Vorgehen für die Überprüfung der Expression von  $\gamma$ 2EGFP sollte die Expression der Cre-Rekombinase durch das bicistronische Vektorkonstrukt gezeigt werden. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit Hilfe des FuGENE® HD Systems mit den Konstrukten pAAV-Cre und pAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre transfiziert. Das Konstrukt pAAV-Cre-GFP, welches ein Fusionsprotein aus der Cre-Rekombinase und GFP zur Expression bringt diente als Positivkontrolle, das Konstrukt pCatch diente als Negativkontrolle. Die Auswertung des Versuchs erfolgte nach Proteinextraktion und SDS-PAGE im Western Blot mit Hilfe des Odyssey Infrared Imager (s. 4.2.7, 4.4.1 & 4.4.3).



**Abb. 5.16: Western Blot zum Nachweis der Expression der Cre-Rekombinase durch das Konstrukt pAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre.**

HeLa-Zellen wurden mit Hilfe des FuGENE HD® Systems transfiziert. Die Zusammensetzung der Transfektionsansätze ist unter der jeweiligen Spur angegeben. 40 h nach der Transfektion wurden Proteinextrakte hergestellt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion im anschließenden Western Blot dienten ein  $\alpha$ -Cre Antikörper aus dem Kaninchen und der IRDye800®  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper. Die Auswertung erfolgte am Odyssey Infrared Imager (Licor). Der Pfeil markiert die Banden im Molekulargewichtsbereich der Cre-Rekombinase. Der Doppelpfeil markiert das durch das Konstrukt pAAV-Cre-GFP zur Expression gebrachte Fusionsprotein aus der Cre-Rekombinase und GFP.

Für die Negativkontrolle konnte erwartungsgemäß kein Signal nachgewiesen werden. Die Versuchsansätze mit den Konstrukten pAAV-Cre und pAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre lieferten ein Signal im erwarteten Molekulargewichtsbereich (s. Abb. 5.16). Das Expressionssignal durch das bicistronische Vektorkonstrukt fiel allerdings deutlich geringer aus.

Im Ansatz der Positivkontrolle ließ sich eine Bande im Bereich des für das Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase und GFP erwarteten Molekulargewichtes nachweisen. Zusätzlich zeigten sich in diesem Ansatz weitere Banden, von denen eine dem Molekulargewicht der Cre-

Rekombinase entspricht. Diese Banden entstanden vermutlich durch Degradation des Fusionsproteins.

In Zusammenschau mit den unter 5.3.2.1 beschriebenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass das bicistronische Vektorkonstrukt pAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre in der Lage ist, die einklonierten Transgene zur Expression zu bringen. Das Expressionsniveau ist jedoch im Vergleich zu den monocistronischen Konstrukten reduziert.

### 5.3.3 Herstellung von bicistronischen rAAV-Vektoren

Aufgrund der guten Ergebnisse bei der Verpackung des Konstruktes pAAV- $\gamma$ 2Opt wurde für das bicistronische Vektorkonstrukt pAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre erneut ein Verpackungsansatz mit Kotransfektion des shRNA-Konstruktes pSuper-GFP durchgeführt. Die Arbeitsschritte erfolgten wie zuvor beschrieben (s. 4.3). Erneut ließ sich eine hohe Virusausbeute erzielen (s. Tab 5.3).

**Tabelle 5.3 Virustiter nach rAAV-Herstellung mit dem Konstrukt pAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre unter Kotransfektion des shRNA-Konstruktes pSuper-GFP zum *knockdown* der  $\gamma$ 2EGFP-Expression.**

Vektorplasmid	Helferplasmid	Zusatz	Titer (genomische Partikel/ml)
pAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre	pDG1	pSuper-GFP	$3,21 \cdot 10^{12}$
-	pDG1		$1,00 \cdot 10^7$

### 5.3.4 Expression der Transgene durch bicistronische rAAV-Vektoren nach Infektion in Zellkultur

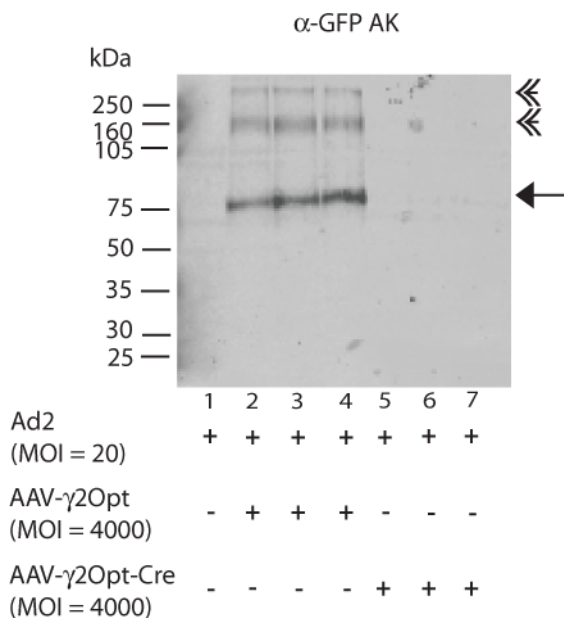
Nachdem die Transfektion des Vektorplasmides pAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre die erwartete Expression der beiden Transgene bewirkt hatte und dieses erfolgreich in AAV-Kapside verpackt worden war, sollte nun überprüft werden, ob die hergestellten rAAV-Vektoren nach Infektion ebenfalls in der Lage wären eine Transgenexpression in Zellkultur zu bewirken.

5.3.4.1 Expression des  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins nach Infektion mit rAAVs in Zellkultur

HeLa-Zellen wurden mit einer MOI von 4000 AAV- $\gamma$ 2Opt und AAV- $\gamma$ 2Opt-Cre infiziert. Für beide rAAV-Vektoren wurden drei parallele Ansätze angefertigt. Der Kontrollansatz wurde *mock*-infiziert. Alle Ansätze wurden zusätzlich mit Adenovirus Typ 2 mit einer MOI von 20 koinfiziert. Nach NuPAGE®-Proteinextraktion und Elektrophorese wurde ein Western Blot durchgeführt (s. 4.2.8, 4.4.2 & 4.4.3). Die Expression von  $\gamma$ 2EGFP durch rAAV- $\gamma$ 2Opt war deutlich nachweisbar (s. Abb. 5.17). Wie in den Transfektionsversuchen waren auch hier Banden mit höherem Molekulargewicht erkennbar, die Multimeren des Fusionsproteins entsprechen dürften.

Für die Infektionsansätze mit dem bicistronischen Vektor rAAV- $\gamma$ 2Opt-Cre konnte keine Expression des  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins nachgewiesen werden.

Bereits auf Plasmidebene hatte das Expressionsniveau von  $\gamma$ 2EGFP durch das bicistronische Konstrukt deutlich unter dem des monocistronischen Konstruktes gelegen. Möglicherweise war die Expression auf Ebene des rAAV-Vektors nun zu gering um im Western Blot nachgewiesen zu werden.



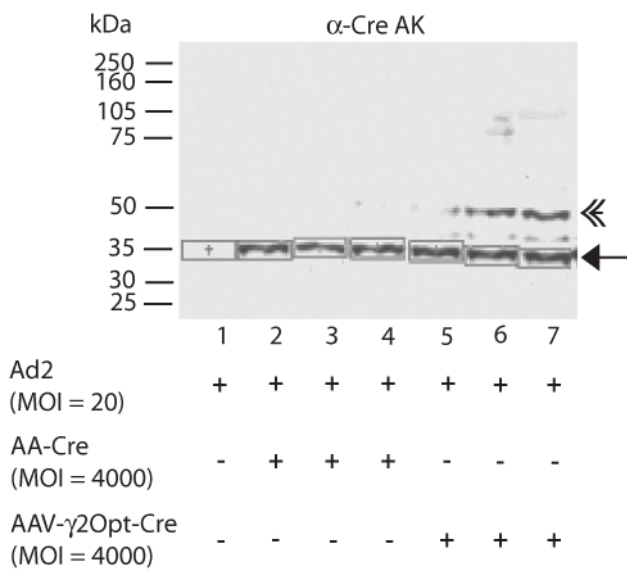
**Abb. 5.17: Western Blot zum Nachweis der Expression von  $\gamma$ 2EGFP durch rekombinante AAVs nach Infektion in Zellkultur.**

HeLa-Zellen wurden mit AAV- $\gamma$ 2Opt oder AAV- $\gamma$ 2Opt-Cre und Adenovirus Typ 2 (Ad2) koinfiziert. Die MOI ist unter der jeweiligen Spur angegeben. Der Kontrollansatz wurde nur mit Ad2 infiziert. 40 h nach der Infektion wurden mittels des NuPAGE®-Verfahrens Proteinextrakte hergestellt und aufgetrennt. Zur Detektion im anschließenden Western Blot dienten ein  $\alpha$ -GFP Antikörper aus dem Kaninchen und der IRDye800®  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Odyssey Infrared Imager (Licor). Der Pfeil markiert die Banden für das  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsprotein. Die doppelte Pfeilspitze markiert durch Multimerisierung des Fusionsproteins entstandene Banden.



5.3.4.2 Expression der Cre-Rekombinase nach Infektion mit rAAVs in Zellkultur

Zum Nachweis der Expression der Cre-Rekombinase durch AAV- $\gamma$ 2Opt-Cre wurden parallel zum vorangehenden Ansatz (5.3.6.1) HeLa-Zellen mit dem Vektor AAV-Cre mit einer MOI von 4000 und Adenovirus Typ 2 mit einer MOI von 20 koinfiziert. Als Negativkontrolle dienten wiederum Proteinextrakte *mock*-infizierter Zellen. Sowohl für AAV-Cre, als auch für AAV- $\gamma$ 2Opt-Cre konnte eine Expression der Cre-Rekombinase gezeigt werden (s. Abb. 5.18).



**Abb. 5.18: Western Blot zum Nachweis der Expression der Cre-Rekombinase durch rekombinante AAVs nach Infektion in Zellkultur.**

HeLa-Zellen wurden mit AAV- $\gamma$ 2Opt oder AAV- $\gamma$ 2Opt-Cre und Adenovirus Typ 2 (Ad2) koinfiziert. Die MOI ist unter der jeweiligen Spur angegeben. Der Kontrollansatz wurde nur mit Ad2 infiziert 40 h nach der Infektion wurden Proteinextrakte hergestellt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion im Western Blot wurden ein  $\alpha$ -Cre Antikörper aus dem Kaninchen und der infrarot markierte IRDye800®  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Odyssey Infrared Imager (Licor). Der Pfeil markiert die Banden für die Cre-Rekombinase. Die doppelte Pfeilspitze markiert durch Multimerisierung des Enzyms entstandene Banden.

Aufgrund der fehlenden Nachweisbarkeit von einer  $\gamma$ 2EGFP-Expression durch den bicistronischen Vektor in Zellkultur wurde dieser nicht *in-vivo* getestet.

Das Ziel einen AAV-Vektor zu generieren, der sowohl  $\gamma$ 2EGFP, als auch die Cre-Rekombinase zur Expression bringt, konnte somit nicht erreicht werden.

### 5.4 Untersuchungen zur Funktionalität der exprimierten Proteine *in-vitro*

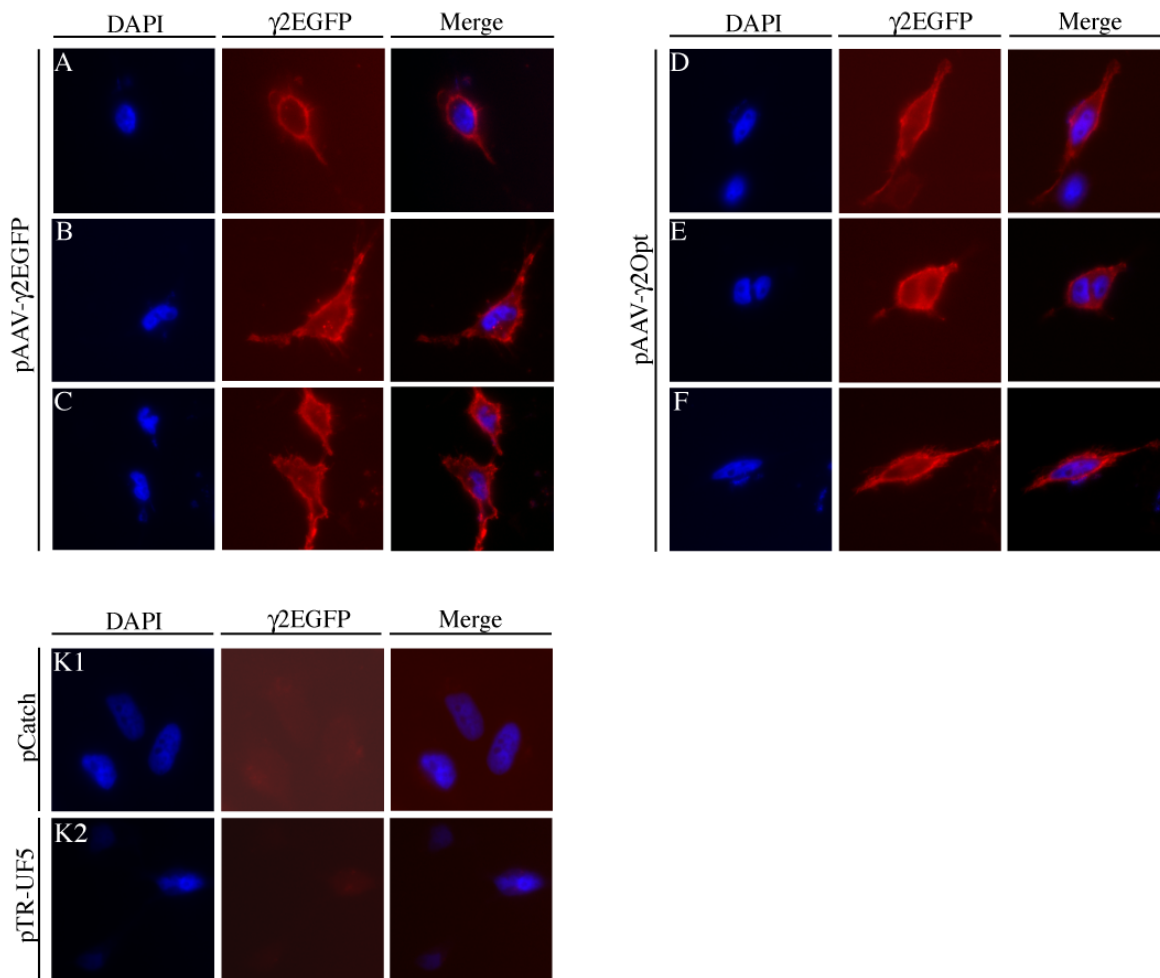
Nachdem es gelungen war AAV-Vektoren für die Expression von  $\gamma$ 2EGFP und der Cre-Rekombinase zu generieren und die Expression beider Proteine durch die Vektoren nachzuweisen, sollte nun deren Funktionalität *in-vitro* überprüft werden.

#### 5.4.1 Lokalisation des $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins auf Einzelzellebene nach Plasmidtransfektion in Zellkultur.

Benzodiazepinsensible GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren bestehen aus einem Pentamer welches sich aus zwei  $\alpha$ -, zwei  $\beta$ , und einer  $\gamma$ 2-Untereinheit zusammensetzt<sup>113, 120</sup>. Um Ihre Funktion zu erfüllen, müssen die Rezeptoren in die Plasmamembran der Zelle integriert werden. In Übereinstimmung mit der Literatur hatte sich bei ausschließlicher Expression von  $\gamma$ 2EGFP ein perinukleäres Verteilungsmuster in der Fluoreszenzmikroskopie gezeigt, welches mit einer Lokalisation im ER vereinbar ist (s. 5.1.1.2.2). Der folgende Versuch wurde unternommen, um zu überprüfen, ob das durch die Vektorkonstrukte zur Expression gebrachte Fusionsprotein aus  $\gamma$ 2-Rezeptoruntereinheit und EGFP in Anwesenheit von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten korrekt in die Plasmamembran integriert wird und somit die Voraussetzung für die Bildung funktioneller GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in den weiterführenden Experimenten im Rahmen des Kooperationsprojektes gegeben ist.

Zu diesem Zweck wurde ein Immunfluoreszenz-Assay durchgeführt, bei dem auf eine Permeabilisierung der Zellen verzichtet wurde und somit nur die in die Plasmamembran der Zellen integrierten Proteine nachgewiesen werden (s. 4.4.4). Die Versuchsansätze wurden mit dem Konstrukt pAAV- $\gamma$ 2EGFP und pAAV- $\gamma$ 2Opt transfiziert. Eine Expression der  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 3-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors sollte durch Kotransfektion der Konstrukte  $\alpha$ 1-Lab-pCi und  $\beta$ 3-Lab-pCi erreicht werden. Als Kontrollen dienten Ansätze, die mit den Konstrukten pTR-UF5 bzw. pCatch transfiziert wurden. In allen Ansätzen wurde der Zellkern mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Aufgrund der negativen Resultate in einem Pilotexperiment (Daten nicht gezeigt) kam statt des bislang verwendeten  $\alpha$ -GFP-Antikörpers ein polyklonaler anti-c-myc-Antikörper aus dem Kaninchen für den Nachweis des Fusionsproteins als Primärantikörper zum Einsatz. Dieses war möglich, da eine c-myc-Markersequenz im ORF des  $\gamma$ 2EGFP-Proteins vorhanden ist. Als Sekundärantikörper für die

Immunfluoreszenz wurde ein mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff TRITC konjugierter  $\alpha$ -Kaninchenantikörper aus der Ziege verwendet.



**Abb. 5.19: Lokalisation des  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins auf Einzelzellebene mittels Immunfluoreszenz nach Transfektion der Konstrukte pAAV- $\gamma$ 2EGFP und pAAV- $\gamma$ 2Opt.**

HeLa-Zellen wurden mit Hilfe des FuGENE HD Systems mit 2  $\mu$ g DNA der Konstrukte pCatch (K1), pTR-UF5 (K2), pAAV- $\gamma$ 2EGFP (A-C) und pAAV- $\gamma$ 2Opt (D-E) transfiziert. Jeweils 2  $\mu$ g der Konstrukte  $\alpha$ 1-Lab-pCi und  $\beta$ 3-Lab-pCi wurden zusätzlich in jeden Ansatz kotransfiziert. Die Ansätze mit den Konstrukten pCatch und pTR-UF5 dienten als Kontrolle. Der  $\gamma$ 2EGFP-Leserahmen enthält ein myc-tag. 40 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und ohne Permeabilisierungsschritt mit einem  $\alpha$ -c-myc Antikörper aus dem Kaninchen inkubiert. Zur Detektion diente ein mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff TRITC konjugierter anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege. Die Zellkerne wurden mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Die Auswertung erfolgte 24 h nach Fixation am Zeiss Axioskop-2 Fluoreszenzmikroskop im roten und im blauen Kanal. Dargestellt sind jeweils die Aufnahmen aus dem blauen (DAPI) und roten Kanal ( $\gamma$ 2EGFP), sowie eine Fusion beider Bilder (Merge).

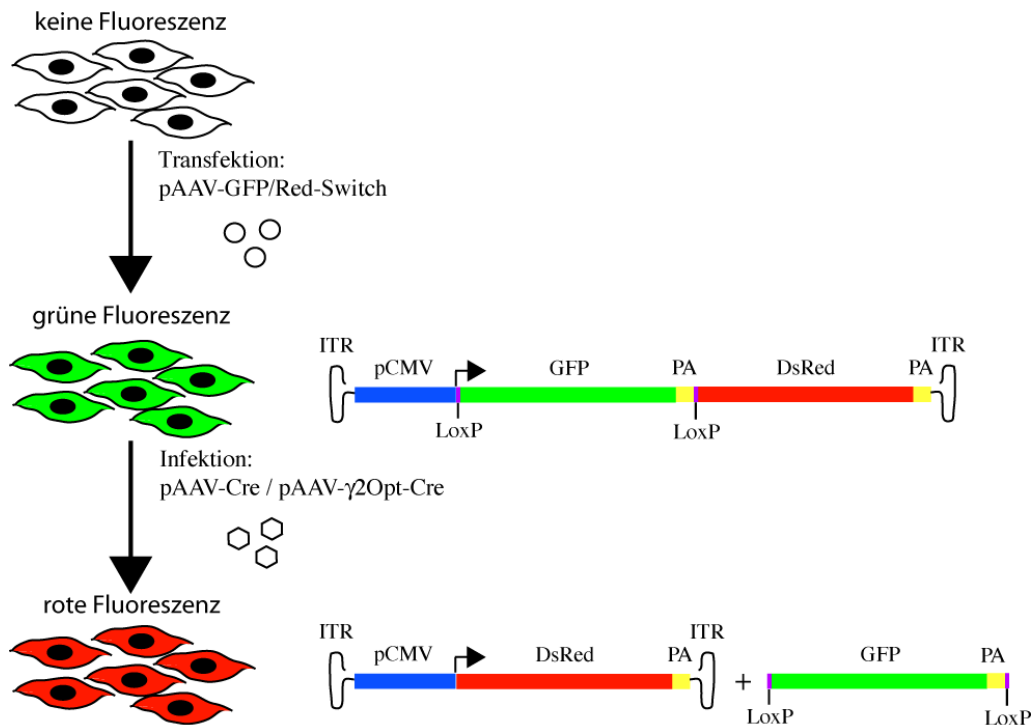
In den beiden Negativkontrollen ließ sich erwartungsgemäß nur der mit DAPI gefärbte Zellkern darstellen (Abb. 5.19 K1 & K2). Sowohl für das optimierte AAV-Vektorkonstrukt pAAV- $\gamma$ 2Opt, als auch für das nicht optimierte Vektorkonstrukt pAAV- $\gamma$ 2EGFP konnte ein

deutliches Signal im roten Fluoreszenzbereich detektiert werden (s. Abb. 5.19 D-E und A-C). Dabei konzentrierte sich die Fluoreszenz auf einen schmalen Bereich in der Zellperipherie. Ein Befund, der gut mit einer Lokalisation in der Plasmamembran zu vereinbaren ist. Eine Integration von  $\gamma 2EGFP$  in die Plasmamembran ist nur als Pentamer mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des  $GABA_A$ -Rezeptors möglich (s. 6.4.1). Die Lokalisation der Fluoreszenz im Bereich der Zellmembran in diesem Versuch beweist indirekt die Expression der  $\alpha 1$ - und  $\beta 3$ -Untereinheit und zeigt, dass es zur Bildung von Pentameren kommt. Diese Voraussetzung für die Bildung funktioneller  $GABA_A$ -Rezeptoren unter Beteiligung des durch die rAAV-Vektorkonstrukte zur Expression gebrachten  $\gamma 2EGFP$ -Proteins war somit erfüllt.

### **5.4.2 Überprüfung der Funktionalität der durch rAAV-Vektoren exprimierten Cre-Rekombinase**

Im folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob die durch die rAAV-Vektoren exprimierte Cre-Rekombinase funktionell ist, d.h. ob sie in der Lage ist, eine von *LoxP-Sites* flankierte DNA-Sequenz auszuschneiden. Um dieses zu ermöglichen wurde ein Reporter-Plasmid generiert, welches einen, unter Kontrolle des CMV-Promoters stehenden, von *LoxP-Sites* flankierten ORF für das grün fluoreszierende GFP mit Poly-A-Site gefolgt von einem ORF für das rot fluoreszierende Protein DsRed mit Poly-A-Site enthält (s. Abb. 5.20).

Nach Transfektion dieses Reporterplasmids kommt zunächst das grün fluoreszierende GFP zur Expression. Wird nun in den transfizierten Zellen z.B. durch Infektion mit einem AAV-Vektor die Cre-Rekombinase exprimiert, so wird der GFP-Leserahmen aus dem Reporterplasmid herausgeschnitten („herausgeflox“t“) und der Leserahmen für DsRed gelangt unter die Kontrolle des CMV-Promoters, was zu einer Expression des rot fluoreszierenden Proteins führt (s. Abb. 4.20). Mittels eines *fluorescence-activated cell sorters* (FACS) ist es dann leicht möglich die Anzahl der roten Zellen in einer großen Stichprobe zu ermitteln und so die Funktionalität der Cre-Rekombinase nachzuweisen.



**Abb. 5.5:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufes zur Überprüfung der Funktionalität der durch die AAV-Vektoren exprimierten Cre-Rekombinase.

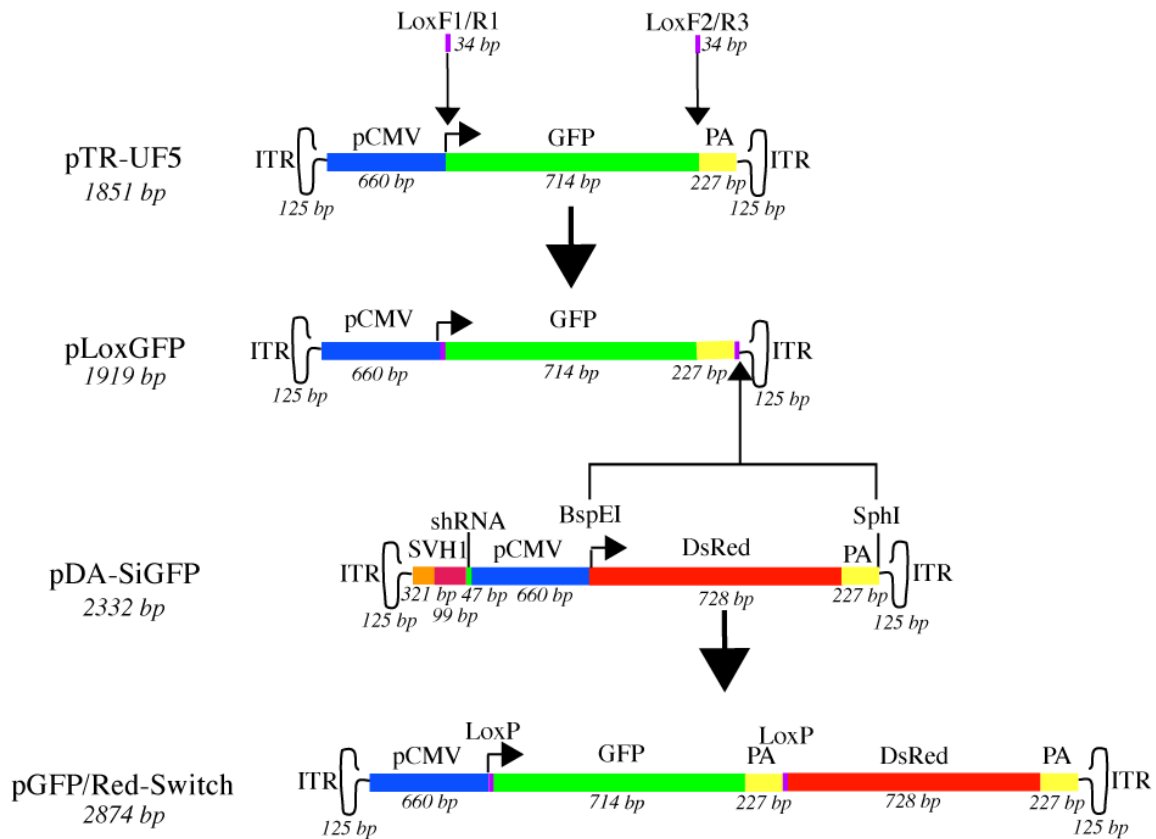
293-Zellen, die zunächst keine Fluoreszenz besitzen werden mit dem Reporterkonstrukt pAAV-GFP/Red-Switch transfiziert. Es kommt zur Expression des grün fluoreszierenden Proteins GFP. In einem weiteren Schritt werden die Zellen mit einem AAV-Vektor infiziert, der die Cre-Rekombinase zur Expression bringt. Die Cre-Rekombinase schneidet den von *LoxP*-Sites flankierten GFP Leserahmen mitsamt Poly-A-Signal auf dem Reporterplasmid aus. Der nachgeschaltete Leserahmen für das rot fluoreszierende Protein DsRed gelangt so unter Kontrolle des Promoters. Die Fluoreszenz der Zellen wird mittels FACS überprüft.

Legende: ITR = AAV-2 *inverted terminal repeat*; pCMV = CMV-Promoter; PA = *bovine Growth Hormone* Polyadenylierungssite; GFP = Leserahmen für das *green fluorescent protein*; DsRed = Leserahmen für das *red fluorescent protein*; LoxP = *LoxP*-Site.

#### 5.4.2.1 Klonierung des Reporterkonstruktes

Zwei *LoxP*-Sites wurden mit Hilfe der Oligonukleotidpaare LoxF1 und LoxR1 sowie LoxF2 und LoxR2 (s. 3.6) um den GFP-ORF in dem Konstrukt pTR-UF5 (s. 3.5) gruppiert. In einem weiteren Schritt wurde der ORF für das rot fluoreszierende Protein DsRed über geeignete Restriktionsschnittstellen eingefügt und so das Konstrukt pGFP/Red-Switch generiert (s. Abb. 5.21). Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Restriktionsverdau (4.1.7) und Agarosegelelektrophorese (4.1.8) bestätigt (Daten nicht gezeigt).

## Ergebnisse



**Abb. 5.6: Schematische Darstellung der Klonierung des Konstruktes pGFP/Red-Switch.**

*LoxP*-Sites wurden mit Hilfe der Oligonukleotidpaare LoxF1/R1 und LoxF2/R2 um den GFP-ORF des Konstruktes pTR-UF5 eingefügt und so das Zwischenkonstrukt pLoxGFP hergestellt.

Der ORF von DsRed und die bGH-Poly-A-Site wurden aus dem Konstrukt pDA-siGFP mit Hilfe der Restriktionsenzyme BspEI und SphI ausgeschnitten und hinter die zweite *LoxP*-Site in das Konstrukt pLoxGFP eingefügt und so das Konstrukt pGFP/Red-Switch generiert.

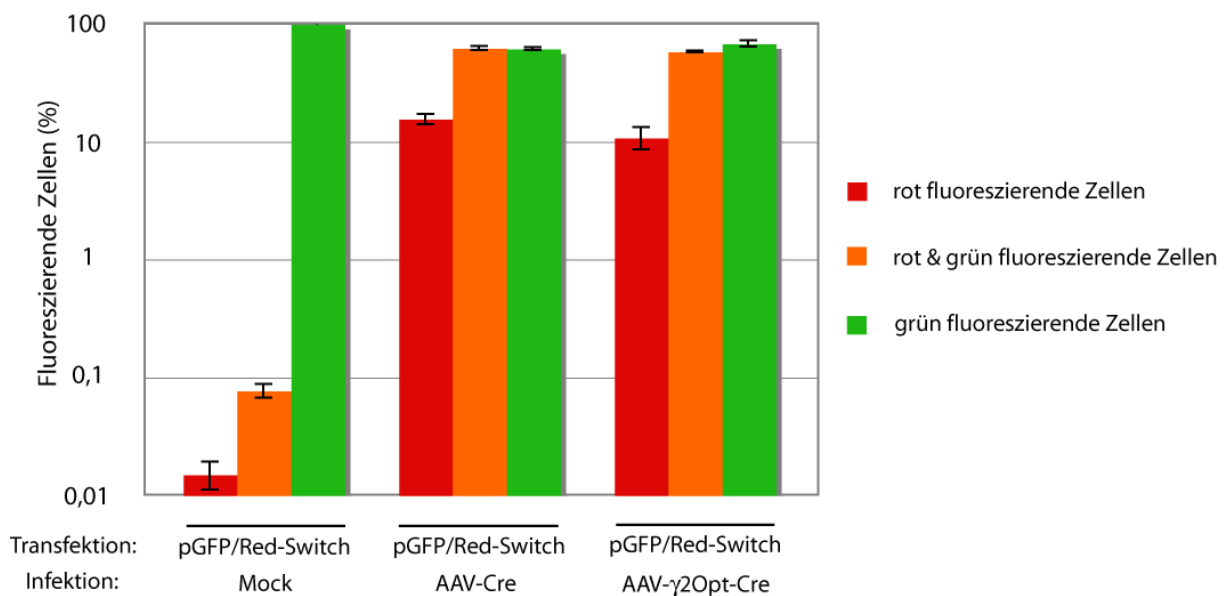
Legende: ITR = AAV-2 *inverted terminal repeat*; pCMV = CMV-Promoter; PA = *bovine Growth Hormone* Polyadenylierungssite; GFP = Leserahmen für das *green fluorescent protein*; DsRed = Leserahmen für das *red fluorescent protein*; SV = SV40 Polyadenylierungssite; H1 = H1-Promoter; shRNA = gegen GFP gerichtete shRNA; Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen: BspEI, SphI; Kursiv: Größe der Vektoren bzw. Klonierungselemente in Basenpaaren (bp).

### 5.4.2.2 FACS-Analyse

Für das Experiment wurden 293-Zellen mit Hilfe des FuGENE® HD Systems mit dem Reporterkonstrukt pGFP/Red-Switch transfiziert. 20 h nach der Transfektion wurden die Ansätze mit den Vektoren AAV-Cre bzw. AAV-γ2Opt-Cre (MOI = 1000), sowie mit Adenovirus Typ 2 (MOI = 20) koinfiziert (s. 4.2.6). Als Kontrolle erfolgte eine *mock*-Infektion. 3 Tage nach der Infektion wurden eine Stichprobe von 50 000 dieser Zellen mittels FACS-Analyse auf grüne und rote Fluoreszenz hin untersucht (s. 4.2.9).

In den mit dem Reporterkonstrukt transfizierten und *mock*-infizierten Ansätzen waren nahezu ausschließlich grün fluoreszierende Zellen nachweisbar, sodass von einer geringen *leakiness* des Systems ausgegangen werden konnte (s. Abb. 5.22). Die Ansätze mit transfiziertem Reporterkonstrukt und Infektion mit AAV-Cre bzw. AAV- $\gamma$ 2Opt-Cre wiesen neben ausschließlich rot fluoreszierenden Zellen auch solche mit ausschließlich grüner Fluoreszenz, sowie Zellen mit grüner und roter Fluoreszenz auf. Dabei machten die doppelt fluoreszierenden Zellen den überwiegenden Teil aus.

Insgesamt war nach Infektion mit AAV-Cre bzw. AAV- $\gamma$ 2Opt-Cre bei  $61 \pm 2,5$  % bzw.  $57 \pm 1,0$  % der Zellen rote Fluoreszenz nachweisbar. Die mittels der AAV-Vektoren exprimierte Cre-Rekombinase war somit eindeutig funktionell.



**Abb. 5.7: FACS-Analyse zur Überprüfung der Funktionalität der durch AAV-vektoren exprimierten Cre-Rekombinase**

293-Zellen wurden mit Hilfe des FuGENE® HD Systems mit dem Reporterkonstrukt pGFP/Red-Switch transfiziert. 20 h nach der Transfektion wurden die Ansätze mit den Vektoren AAV-Cre bzw. AAV- $\gamma$ 2Opt-Cre (MOI = 1000), sowie mit Adenovirus Typ 2 (MOI = 20) koinfiziert (s. 3.2.6). Als Kontrolle diente ein Ansatz mit pGFP/Red-Switch, der *mock* infiziert wurden. 3 Tage nach der Infektion wurden 50 000 dieser Zellen mittels FACS-Analyse auf grüne und rote Fluoreszenz hin untersucht.

## 5.5 *In-Vivo* Expression des $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins und der Cre-Rekombinase in der Maus

Ziel der in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente war es, die Funktionalität der AAV-Vektoren *in-vivo* zu überprüfen. Sofern nicht anders vermerkt, wurden sie unter Anleitung der Mitarbeiter von Prof. Dr. Günther Sperk, Institut für Pharmakologie der Medizinischen Universität Innsbruck, durchgeführt. Aufzucht, Haltung und Handhabung der Versuchstiere, sowie die stereotaktischen Injektionen, die Perfusionsfixierung und die Anfertigung serieller Hirnschnitte wurden von Dr. Yvan Peterschmitt und Dr. Ramon Tasan übernommen.

### 5.5.1 *In-Vivo* Expression der Cre-Rekombinase

Der im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Vektor für die Expression der Cre-Rekombinase (AAV-Cre) hatte in *in-vivo* Vorversuchen von Dr. Yvan Peterschmitt ein schwaches Signal in der *in-situ*-Hybridisierung erreicht (Daten nicht gezeigt). Um eine solide Expression der Cre-Rekombinase erreichen zu können, wurde auf den zuvor von Dr. Stefan Weger hergestellten Pseudotyp-1 Vektor AAV-Cre-GFP zurückgegriffen. Dieser bringt ein Fusionsprotein aus der Cre-Rekombinase und GFP unter Kontrolle des CMV-Promoters zur Expression und ist in ein Kapsid des AAV-Serotyps 1 verpackt. Vektoren des Pseudotyps 1 sind in der Lage ein größeres Zellvolumen zu transduzieren und eine stärkere Expression in neuronalem Gewebe zu bewirken als AAV-Vektoren des Serotyps 2<sup>121</sup>.

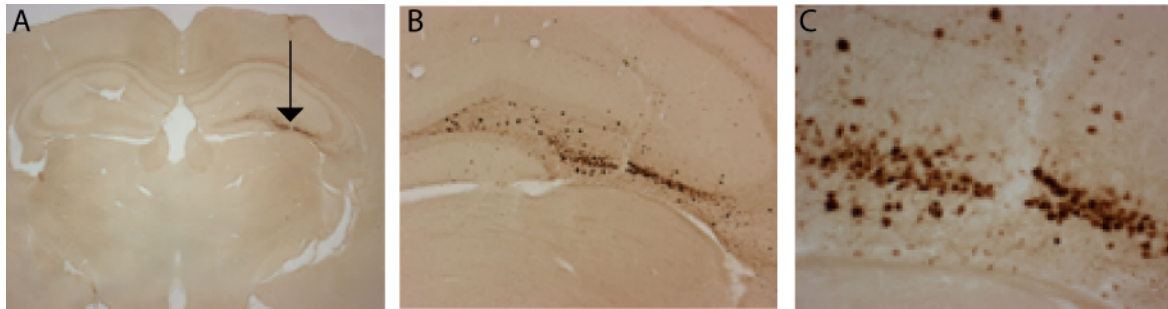
Für den Nachweis zur Expression der Cre-Rekombinase *in-vivo* wurde mittels stereotaktischer Injektion und unter Allgemeinanästhesie mit Ketamin und Sevofluran jeweils 1  $\mu$ l AAV-Cre-GFP in den linken dorsalen Hippocampus von vier iLoxF77I-Mäusen appliziert. Die hierfür verwendeten Koordinaten lauteten: Bregma-DV -0,2; Bregma-RC -0,2; Bregma-lat +0,2 (s. 4.5.1). Eines der Tiere verstarb 2 Wochen nach der Prozedur an deren Folgen.

Nach 4-wöchiger Inkubationszeit wurde das Gehirn eines Versuchstieres durch Perfusion mit 4% Paraformaldehyd fixiert, entnommen und zunächst tiefgefroren (s. 4.5.2 & 4.5.3). Im Anschluss wurden serielle Hirnschnitte (Schichtdicke 30  $\mu$ m) angefertigt und mittels Immunhistochemie angefärbt (4.5.4 & 4.5.6).

Dabei kamen ein  $\alpha$ -Cre Antikörper aus dem Kaninchen und ein mit Meerrettichperoxidase konjugierter  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper zum Einsatz.



In der, als Negativkontrolle fungierenden, rechten Hirnhälfte konnte erwartungsgemäß keine Cre-Expression nachgewiesen werden. Im linken dorsalen Hippocampus zeigte sich jedoch ein deutliches Signal. Dabei verteilten sich die reaktiven Zellen erwartungsgemäß in einem relativ großen Areal um den Injektionsbereich (s. Abb. 5.23). Der bereits zuvor erfolgreich *in-vivo* verwendete Vektor konnte also auch in diesem Versuchssetting eine Expression der Cre-Rekombinase bewirken.



**Abb. 4.8:** Nachweis der Expression der Cre-Rekombinase nach Stereotaktischer Injektion von AAV-Cre-GFP in den Hippocampus von iLoxF77I-Mäusen mittels Immunhistochemie.

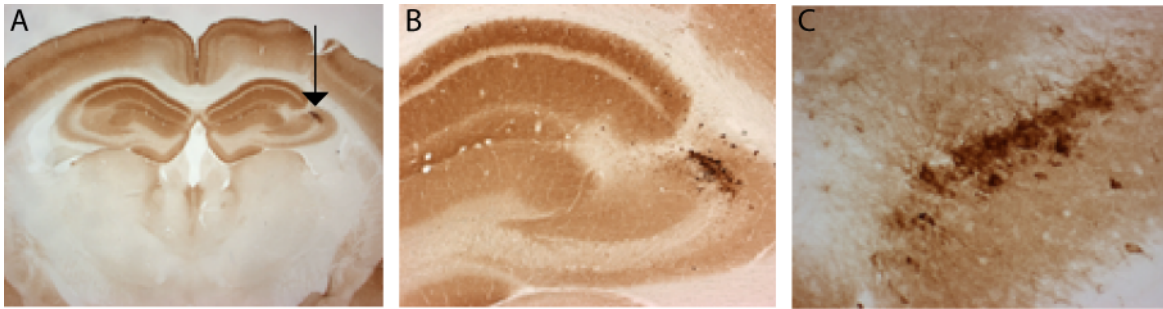
**Durchgeführt von Dr. Yvan Peterschmitt und Alexander Plauth.**

Unter Allgemeinanästhesie mit Ketamin und Sevofluran wurde 1  $\mu$ l AAV-Cre-GFP stereotaktisch in den linken dorsalen Hippocampus (Bregma-DV -0,2; Bregma-RC -0,2; Bregma-lat +0,2) von vier iLoxF77I-Mäusen injiziert. Nach 4 Wochen wurden das Gehirn einer Maus durch Perfusion mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, eingefroren und anschließend serielle Schnitte mit einer Schichtdicke von 30  $\mu$ m angefertigt. Die Schnitte wurden mit einem  $\alpha$ -Cre Antikörper aus dem Kaninchen und einem mit Meerrettichperoxidase konjugiertem  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper inkubiert und durch Zugabe des Chromogens DAB gefärbt. Dargestellt ist das Gehirn des Versuchstieres auf Höhe des dorsalen Hippocampus in zunehmender Vergrößerung: A: 12,5x; B: 50x; C: 200x. Der Pfeil in A markiert den Injektionsstrakt und zeigt auf die reaktiven Zellen.

### 5.5.2 *In-Vivo* Expression von $\gamma$ 2EGFP

Für den Nachweis zur *in-vivo* Expression des  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins wurde analog zum vorangegangenen Versuch jeweils 1  $\mu$ l AAV- $\gamma$ 2Opt in den linken dorsalen Hippocampus von vier Wildtyp-Mäusen appliziert (s. 4.5.1). Wie zuvor wurde nach 4-wöchiger Inkubationszeit das Gehirn eines Versuchstieres fixiert, entnommen und tiefgefroren (s. 4.5.2 & 4.5.3). Nach Anfertigung serieller Hirnschnitte (Schichtdicke 30  $\mu$ m) wurden diese mittels Immunhistochemie angefärbt (4.5.4 & 4.5.6). Dabei kamen ein  $\alpha$ - $\gamma$ 2Antikörper aus dem Kaninchen und wie zuvor, ein mit Meerrettichperoxidase konjugierter  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper zum Einsatz.

Die als Kontrolle fungierende rechte Hirnhälfte wies keine fokal verstärkte Expression der  $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA-A-Rezeptors. Auf der linken Seite zeigten sich in einem eng umschriebenen Areal im Injektionsbereich Zellen mit deutlich erhöhter  $\gamma 2$ -Reaktivität (s. Abb. 5.24). Der Vektor AAV- $\gamma 2$ Opt war somit auch *in-vivo* in der Lage eine deutliche Expression des Fusionsproteins zu bewirken.



**Abb. 5.24: Nachweis der Expression des  $\gamma 2$ EGFP-Fusionsproteins nach Stereotaktischer Injektion von AAV- $\gamma 2$ Opt in den Hippocampus von Wildtyp-Mäusen mittels Immunhistochemie.**

**Durchgeführt von Dr. Yvan Peterschmitt und Alexander Plauth.**

Unter Allgemeinanästhesie mit Ketamin und Sevofluran wurde 1  $\mu$ l AAV- $\gamma 2$ Opt stereotaktisch in den linken dorsalen Hippocampus (Bregma-DV -0,2; Bregma-RC -0,2; Bregma-lat +0,2) von vier Wildtyp-Mäusen injiziert. Nach 4 Wochen wurde das Gehirn einer Maus durch Perfusion mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, eingefroren und anschließend serielle Schnitte mit einer Schichtdicke von 30  $\mu$ m angefertigt. Die Schnitte wurden mit einem  $\alpha$ - $\gamma 2$  Antikörper aus dem Kaninchen und einem mit Meerrettichperoxidase konjugiertem  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper inkubiert und durch Zugabe des Chromogens DAB gefärbt. Dargestellt ist das Gehirn des Versuchstieres auf Höhe des dorsalen Hippocampus in zunehmender Vergrößerung: A: 12,5x; B: 50x; C: 200x. Der Pfeil in A markiert den Injektionstrakt und zeigt auf die reaktiven Zellen.

### 6. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst zwei AAV-Vektoren hergestellt, die in der Lage sein sollten nach stereotaktischer Injektion in das Gehirn von iLoxF77I-Mäusen eine Expression der Cre-Rekombinase sowie eines Fusionsproteins aus der  $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors zu bewirken. Trotz erfolgreicher Testung der Vektoren *in-vitro* konnte dieses Ziel jedoch nur zum Teil erfüllt werden. Ein erster im Anschluss hergestellter bicistronischer Vektor konnte bereits in den *in-vitro* versuchen keine ausreichende Expression der gewünschten Transgene bewirken. Unter Anwendung aktueller Technologien sollte es jedoch möglich sein die im Rahmen dieser Arbeit aufgetauchten Probleme zu umgehen.

#### 6.1 Beschleunigte Expressionskinetik durch AAV-Cre *in-vitro*

Bei den mit den gängigen Methoden hergestellten rAAV-Vektoren wird üblicherweise, wie auch bei der Replikation des Wildtyp-Virus, ein einzelsträngiges DNA-Molekül in das Viruskapsid verpackt. Nach Adsorption, Penetration und *uncoating* im Rahmen der Infektion einer Zelle muss das Virusgenom erst repliziert werden, da Transkription nur auf doppelsträngiger DNA möglich ist. Dieser Prozess benötigt eine aktive zelluläre DNA-Replikations- und –Reparaturmaschinerie, wie sie nicht zu jedem Zeitpunkt im Zellzyklus gegeben ist und kann mehrere Tage in Anspruch nehmen<sup>53</sup>.

Bei einer hohen Anzahl von vorhandenen Vektorkopien in der Zelle, wie es nach Infektion mit einer hohen MOI der Fall ist, kann dieser Schritt durch *re-annealing* zweier Vektorgenome mit unterschiedlicher Polarität umgangen werden<sup>122</sup>.

Die Zweitstrangsynthese kann durch Ko-Infektion mit Adenovirus deutlich beschleunigt werden. Dies führt zu einer beschleunigten Expressionskinetik was in Zellkultur zu einer erhöhten Transduktionseffizienz von AAV-Vektoren führt<sup>56</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit war 48 h nach Infektion von kultivierten HeLa-Zellen mit dem Vektor AAV-Cre eine starke Expression der Cre-Rekombinase auch ohne den Zusatz von Adenovirus nachgewiesen worden (s. 5.2.4 & 5.3.6.2). Die dabei verwendete MOI von 1000 genomischen Partikeln entspricht dabei den gängigen Vektordosierungen. Das von Nakai et al. beschriebene Phänomen des Re-Annealing ist also als Erklärungsansatz unwahrscheinlich

<sup>122</sup>

Werden Vektorplasmide, die maximal die Hälfte des Wildtyp-AAV Genoms umfassen in rAAVs verpackt, so kann es zur Bildung von doppelsträngigen, sogenannten *self-complementary* (sc) Vektoren kommen. Diese sind nach *uncoating* sofort transkriptionskompetent und besitzen im Vergleich zu konventionellen AAV-Vektoren neben einer schnelleren Expressionskinetik auch eine deutlich erhöhte Transduktionseffizienz<sup>56</sup>.

Mit einer Größe von 1480 bp entspricht das Vektorplasmid pAAV-Cre den Voraussetzungen zur Bildung von scAAVs. Die beobachtete starke Expression der Cre-Rekombinase 48 h nach AAV-Transduktion ohne Ko-Infektion mit Adenovirus lässt sich somit auf diese Art erklären.

### 6.2 Geringes Expressionsniveau durch AAV-Cre *in-vivo*

Die Ergebnisse nach Infektion mit AAV-Cre *in-vitro*, konnten durch Kooperationspartner von der Medizinischen Universität Innsbruck *in-vivo* nicht bestätigt werden. Die In-Situ Hybridisierung mit einer Cre-spezifischen Sonde in Hirnschnitten von iLoxF77I-Mäusen, die 1 Monat zuvor mittels stereotaktischer Injektion AAV-Cre in den Hippocampus erhalten hatten, lieferte nur ein äußerst schwaches Signal (persönliche Mitteilung Dr. Yvan Peterschmitt, Innsbruck).

Sowohl das menschliche Genom, als auch die Genome anderer Säugetiere, wie z.B. der Maus, enthalten kryptische LoxP-Sites, welche eine Cre-vermittelte Rekombination bewirken können<sup>123</sup>. In Versuchen mit kultivierten Zellen wurde eine deutliche Genotoxizität der Cre-Rekombinase beobachtet und auf *off-site* Aktivität des Enzyms an diesen kryptischen LoxP-Sites zurückgeführt<sup>124</sup>. Auch *in-vivo* ist eine Toxizität der Cre-Rekombinase beschrieben. So kam es in einer Arbeit nach Injektion von lentiviralen Vektoren in das Gehirn von Mäusen zu persistierenden Gewebeschäden<sup>125</sup>. Sowohl die *in-vitro*, als auch die *in-vivo* beobachteten Effekte waren abhängig von der Dosis der exprimierten Cre-Rekombinase und der Dauer der Expression.

Das in dieser Arbeit beobachtete *in-vitro* Expressionsniveau der Cre-Rekombinase durch den AAV-Cre-Vektor war hoch (s. 5.2.4), sodass mit einer erheblichen Toxizität *in-vivo* zu rechnen war. In den entsprechenden Hirnschnitten war jedoch kein offenkundiger Anhalt für einen vermehrten Zelluntergang zu finden gewesen, eine eingehendere Untersuchung hierauf war jedoch nicht erfolgt (persönliche Mitteilung Dr. Yvan Peterschmitt, Innsbruck).

In mehreren Arbeiten wurde bereits eine stabile, lang anhaltende Expression der Cre-Rekombinase nach stereotaktischer Injektion von AAV-Vektoren in das Gehirn von Mäusen ohne Anzeichen von Toxizität beschrieben<sup>81, 126</sup>. In der ersten Arbeit kam dabei jedoch ein AAV-Vektor zum Einsatz der ein Fusionsprotein der Cre-Rekombinase mit GFP exprimiert und aufgrund der Größe dieses Transgens sehr wahrscheinlich nicht als *sc*-Vektor (s. 6.2.1) verpackt wurde. Das Expressionsniveau des Enzyms dürfte somit niedriger ausgefallen sein, was die fehlende Toxizität erklären könnte.

In der zweiten Arbeit wurden Vektorplasmide verpackt, die vermutlich ebenfalls zur Bildung von *sc*-Vektoren geführt hatten<sup>81</sup>. Der Titer der Vektorpräparationen betrug  $1 \cdot 10^8$  infektiöse Partikel pro ml, wobei 0,8  $\mu$ l einer 1:1 Mischung dieser Vektors mit einem Vektor zur Expression von GFP injiziert wurden. Es wurden demnach  $4 \cdot 10^4$  Partikel appliziert.

Im Rahmen dieser Arbeit war 1 µl einer Vektorpräparation mit einem Titer von ca.  $1 \cdot 10^{11}$  genomischen Partikeln pro ml appliziert worden. Dies entspricht ungefähr einer Dosis von  $1 \cdot 10^6$  infektiösen Partikeln und liegt damit etwas höher als in der zitierten Arbeit.

Eine toxische Wirkung der Cre-Rekombinase bei höherem Expressionsniveau erscheint also denkbar, ist jedoch aufgrund eines fehlenden morphologischen Korrelats in den untersuchten Hirnschnitten nicht zu beweisen.

Einen gänzlich anderen Erklärungsansatz für die geringe *in-vivo* Transgenexpression durch AAV-Cre bieten die von McCown et al. und Klein et al. veröffentlichten Beobachtungen zum Expressionsniveau von Transgenen nach stereotaktischer Injektion von rAAV-Vektoren in verschiedene Gebiete des Gehirns von Mäusen.

Dabei kam es in der ersten Arbeit drei Monate nach Vektorapplikation und anfänglich hohem Expressionsniveau zu einer massiven Abnahme der Transgenexpression im Bereich des Hippocampus, nicht jedoch in anderen Arealen des Gehirns der Versuchstiere<sup>127</sup>. Auch hier konnte kein Hinweis auf vermehrte Zelluntergänge gefunden werden, sodass eine Reduktion der Menge transduzierter Zellen als Ursache für die Abnahme der Expression des eingebrachten Gens unwahrscheinlich erschien.

Klein et al. beobachteten wenig später das gleiche Phänomen. Auch hier kam es nach stereotaktischer Injektion von AAV-Vektoren in den Hippocampus von Mäusen nach zunächst starker Transgenexpression zu einer massiven Reduktion, sodass nach drei Monaten die Expression des eingebrachten Gens im Vergleich zum Wert nach einem Monat um 96% reduziert war<sup>128</sup>. Beide Autoren führten eine zuvor in Versuchen mit kultivierten Zellen beobachtete Inaktivierung des CMV-Promoters durch Methylierung als wahrscheinliche Ursache für die Abnahme der Transgenexpression im Bereich des Hippocampus an<sup>127-129</sup>.

Wie in den zitierten Veröffentlichungen kam auch in dieser Arbeit ein auf AAV basierender Vektor zum Einsatz, bei dem die Genexpression durch den CMV-Promoter angetrieben wird und der mittels stereotaktischer Injektion in den Hippocampus von Mäusen appliziert wurde. Eine Abnahme der Transgenexpression durch Methylierung des CMV-Promoters ist also auch hier prinzipiell denkbar. Allerdings müsste diese im vorliegenden Fall eine deutlich schnellere Kinetik als in den zitierten Arbeiten besitzen, da bereits nach einem Monat nur eine geringe Expression der eingebrachten Cre-Rekombinase zu beobachten war. In einer kürzlich erschienenen Arbeit beschreiben jedoch Gray et al. eine deutlich reduzierte Transgenexpression im Hippocampus von Mäusen durch einen rAAV-Vektor mit CMV-Promoter nach bereits vier Wochen, was dem Zeitraum dieser Arbeit entspricht<sup>130</sup>. Zusätzlich

beschrieben Everett et al. in einer Arbeit von 2004 eine deutlich unterschiedliche Kinetik in der Deaktivierung des CMV-Promoters in Abhängigkeit vom verwendeten Mausstamm<sup>131</sup>. Es ist also denkbar, dass die Inaktivierung im für diese Arbeit verwendeten iLoxF77I-Mausstamm besonders schnell vonstatten geht.

Die Tatsache dass 4 Wochen nach stereotaktischer Injektion des AAV-2/1-Vektors AAV-Cre-GFP mittels Immunhistochemie eine deutliche Expression der Cre-Rekombinase nachweisbar war lässt sich durch die höhere Transduktionseffizienz von AAV-Vektoren dieses Pseudotyps im Hippocampus erklären (Persönliche Mitteilung Sperk & Heilbronn).

### **6.3 Herstellung eines Vektors für die Expression des $\gamma$ 2EGFP-Fusionsproteins und der Cre-Rekombinase**

Unter Verwendung der EMCV IRES war es im Verlauf dieser Arbeit gelungen, ein bicistronisches Vektorplasmid zu klonieren (pAAV- $\gamma$ 2EGFP-Cre ) und dieses erfolgreich in rAAV-Vektoren zu verpacken (s. 5.3).

Nach Transfektion kultivierter HeLa-Zellen mit diesem Plasmid konnte sowohl eine Expression des  $\gamma$ 2EGFP-Proteins, als auch der Cre-Rekombinase im Western Blot nachgewiesen werden (s. 5.3.2 & 5.3.3). Das jeweilig erreichte Expressionsniveau fiel dabei jedoch im Vergleich mit den zuvor hergestellten monocistronischen Vektorkonstrukten geringer aus.

Im Gegensatz zu diesen Versuchen auf Plasmidebene konnte nach Infektion kultivierter Zellen mit dem konsekutiv hergestellten Vektor AAV- $\gamma$ 2Opt-Cre ausschließlich eine Expression der Cre-Rekombinase detektiert werden (s. 5.3.6.1-2).

Die IRES-Sequenzen der Picornaviren besitzen aufgrund ihrer komplexen Sekundärstruktur eine hohe Affinität für zelluläre Ribosomen <sup>132</sup>. Dies führt im Rahmen einer Infektion zur vermehrten Produktion viraler Proteine durch die Synthesemaschinerie der Wirtszelle. Im Zusammenspiel mit einer Spaltung zellulärer Initiationsfaktoren durch virale Proteasen kann es sogar dazu kommen, dass ausschließlich virale Proteine synthetisiert werden (*virus-host shutoff*) <sup>132</sup>. Durch das Fehlen der viralen Proteasen im Kontext eines rAAV-Vektors mit IRES kommt dieses Phänomen sicher nicht als Erklärungsansatz für die fehlende Nachweisbarkeit von  $\gamma$ 2EGFP im Western Blot in Frage. Die hohe Affinität der IRES zur zellulären Proteinsynthesemaschinerie könnte jedoch durchaus eine vermehrte Translation der Cre-Rekombinase auf Kosten des  $\gamma$ 2EGFP-Proteins bewirken.

In der Literatur wird beschrieben, dass es im Rahmen der Anwendung in viralen Vektoren je nach verwendeter Zelllinie zu einer unterschiedlich starken Expression des mittels IRES translatierten Gens und somit zu beträchtlichen Differenzen im Expressionsniveau zwischen den jeweils im Vektor enthaltenen Genen kommen kann <sup>133, 134</sup>. Eine nicht minder wichtige Rolle spielen die exakte IRES-Sequenz und die Aminosäuresequenz der benachbarten Gene: Bochkov und Palmberg beschrieben hier eine bis zu zehnfach höhere Translation des hinter der IRES gelegenen Gens je nach verwendeter Sequenz <sup>135</sup>. Ein um ein derart Vielfaches höheres Expressionsniveau des stromabwärts gelegenen Gens bietet einen potenziellen



Erklärungsansatz für die fehlende Nachweisbarkeit von  $\gamma$ 2EGFP bei robuster Cre-Expression nach Infektion mit dem bicistronischen Vektor.

## 6.4 Konzeption eines alternativen rAAV-Vektors für die Expression des $\gamma$ 2EGFP-Proteins und der Cre-Rekombinase

Im Verlauf dieser Arbeit ergaben sich mehrere Probleme, die eine Umsetzung der avisierten Strategie zur selektiven Wiederherstellung der Benzodiazepinwirkung in definierten Hirnarealen mittels stereotaktischer Injektion von rAAV-Vektoren letzten Endes nicht zuließen. Unter Einbezug neuester Erkenntnisse und Technologien ließen sich diese jedoch mit Hilfe eines entsprechend aufgebauten Vektors vermutlich umgehen.

### 6.4.1 Wahl des Promoters

Nach Applikation des AAV-Cre-Vektors in den dorsalen Hippocampus von iLoxF77I-Mäusen konnte in dieser Arbeit nach 4 Wochen nur eine geringe Transgenexpression nachgewiesen werden. Die Deaktivierung des in dem Vektor verwendeten CMV-Promoters bietet hierfür eine mögliche Erklärung (s. 6.2.2). Um dieses mehrfach beschriebene Problem zu umgehen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen alternative Promoter entwickelt und erfolgreich *in-vivo* getestet<sup>136</sup>. Für die Transduktion neuronaler Zellen durch rAAV-Vektoren hat sich in mehreren Arbeiten der Neuronspezifische Enolase (NSE) Promoter bewährt<sup>60, 128, 137</sup>. Dieser bietet den Vorteil, dass ausschließlich Neuronen transduziert werden und er ermöglicht eine stabile Langzeitexpression *in-vivo*<sup>136</sup>. Der Vorteil der ausschließlichen Aktivität des Promoters in neuronalen Zellen stellt jedoch für *in-vitro* Versuche einen Nachteil dar. Für die Testung eines Vektors in Zellkultur können bei diesem Promoter ausschließlich neuronale Zelllinien verwendet werden, die mitunter nur unter erheblichem Aufwand zu halten sind. Weiterhin ist dieser Promoter mit einer Länge von 1,8 kb verhältnismäßig groß, was gerade in rAAV-Vektoren, die eine begrenzte Verpackungskapazität besitzen, einen wesentlichen Nachteil darstellt.

Unter Verwendung des NSE-Promoters würde ein bicistronisches Vektorkonstrukt für die Expression von  $\gamma$ 2EGFP und Cre-Rekombinase eine Größe von 5599 kb erreichen und somit eine effiziente Verpackung in rAAV-Vektoren erschweren.

Durch Fusion des *Chicken  $\beta$ -actin Promoters* (CBA) mit dem CMV-Enhancer und Intronsequenzen des  $\beta$ -Aktin-Gens konnte ein Hybridpromoter mit starker ubiquitärer Aktivität generiert werden<sup>138</sup>. Mit Hilfe dieses Promoters konnten mehrere Arbeitsgruppen

eine stabile Langzeitexpression verschiedener Transgene im ZNS nach Transduktion mit entsprechenden rAAV-Vektoren zeigen<sup>139, 140</sup>. In der ursprünglichen hybriden Form umfasst der CBA Promoter jedoch 1,6 kb und kommt somit nicht als Alternative für den CMV-Promoter in einem bicistronischen Vektor für die Expression des  $\gamma$ 2EGFP-Proteins und der Cre-Rekombinase in Frage. Durch Austausch der Intronsequenz des  $\beta$ -Aktin-Gens mit einer verkürzten Intronsequenz aus dem *simian virus 40* (SV40) konnte eine auf 800 bp verkleinerte Variante des hybriden CBA-Promoters generiert werden und erfolgreich für die *in-vivo* Transduktion der Leber mit scAAV-Vektoren eingesetzt werden<sup>59</sup>. Eine weitere Variante des hybriden CBA-Promoters konnte durch Austausch des SV40-Introns mit einem Intron aus dem *minute virus of mice* (MVM) generiert werden. Für beide Varianten konnte eine dem CMV-Promoter überlegene Langzeitexpression eines Reportergens nach Transduktion verschiedener Areale des ZNS durch rAAV-Vektoren gezeigt werden<sup>130</sup>. Inzwischen wurde in der Arbeitsgruppe Heilbronn ebenfalls eine verkürzte, 900bp lange CBA-Promotorvariante generiert, die unter Erhalt der vollen Aktivität in scAAV-Vektoren eine stabile Langzeitexpression im ZNS transduzierter Mäuse zeigt (persönliche Mitteilung Mietzsch, Tasan, Heilbronn, Sperk).

### 6.4.2 Alternative Technologien für die Konstruktion bicistronischer Vektoren

Neben der in dieser Arbeit verwendeten IRES gibt es weitere Möglichkeiten polycistronische Vektoren herzustellen. Das Einbringen von spezifischen Signalsequenzen für die im Golgi-Apparat vorhandene Protease Furin *in frame* zwischen zwei oder mehreren Genen stellt eine solche dar. Dabei wird zunächst ein Fusionsprotein synthetisiert, das dann posttranslationell in die jeweiligen einzelnen Proteine gespalten wird<sup>141</sup>.

Eine ähnliche Methode wird durch das *in-frame* Einfügen des *foot and mouth virus* (FMDV) 2A Peptids zwischen zwei Genen im Vektor vermittelt. Dabei wird zunächst der große Leserahmen mit der Sequenzinformation beider Gene auf konventionelle Weise transkribiert. Anders als bei der zuvor beschriebenen Technologie kommt es jedoch bereits im Ribosom zu einer Spaltung in zwei einzelne Proteine<sup>142, 143</sup>.

Beide Methoden bieten gegenüber den mit 450-500 bp recht großen IRESs den Vorteil dass lediglich die Sequenz für ein, wenige Aminosäuren umfassendes, Peptid eingefügt werden muss, und sind somit besonders für die Anwendung in AAV-Vektoren attraktiv.

Weiterhin sind beide Systeme im Gegensatz zur IRES in der Lage ein nahezu gleich hohes Expressionsniveau der jeweiligen Transgene zu bewirken, wobei dieses für das 2A-System im AAV-Kontext bereits erfolgreich sowohl *in-vitro* und *in-vivo* demonstriert werden konnte<sup>144, 145</sup>. Die Herstellung eines AAV-Vektors unter Anwendung der FMDV 2A Sequenz bietet somit theoretisch die Möglichkeit, das mittels der IRES-Technologie in dieser Arbeit nicht erreichte Ziel der Co-Expression sowohl des  $\gamma$ 2EGFP-Proteins, als auch der Cre-Rekombinase durch nur einen Vektor umzusetzen.

### 6.4.3 Wahl des AAV-Serotyps

In den ersten Arbeiten zum rAAV-vermittelten Gentransfer ins ZNS kamen vornehmlich Vektoren des Serotyps 2 zur Anwendung. Für diese konnte nach stereotaktischer Injektion in verschiedene Hirnareale von Nagetieren eine effiziente Transduktion vornehmlich neuronaler Zellen über lange Zeiträume gezeigt werden<sup>127, 128, 140</sup>. Wie in dieser Arbeit waren dabei jedoch die transduzierten Zellen stets auf einen kleinen Bereich um den Stichkanal der Injektion begrenzt und das Volumen transduzierter Zellen fiel eher gering aus (s. Abb. 4.16). Bei der Gentherapie generalisierter ZNS-Erkrankungen muss für eine erfolgreiche Therapie ein möglichst ausgedehnte Vektor- Transduktion erreicht werden<sup>65</sup>. Im Gegensatz zu AAV-2, das nur umschriebene Areale transduziert, können AAV-1-Vektoren, aber auch Vektoren des Pseudotyps 5, 7 und 8 nach stereotaktischer Injektion deutlich größere ZNS-Areale effizient transduzieren<sup>62-64</sup>. Auch in dieser Arbeit zeigte sich nach Injektion des in AAV-1- Kapside verpackten Vektors AAV-Cre-GFP ein im Vergleich zu AAV-2 deutlich größeres Areal transduzierter Zellen.

Im Rahmen des Kooperationsprojektes zur Identifikation des neuronalen Korrelats der Anxiolyse durch Benzodiazepine, wird eine fokale begrenzte Transduktion angestrebt, sodass trotz der überlegenen Transduktionseffizienz alternativer Serotypen für diese Anwendung herkömmliche AAV-Vektoren des Serotyps 2 am besten geeignet erscheinen.

### 6.5 Ausblick

Angsterkrankungen besitzen eine hohe Prävalenz, sind mit erheblicher Komorbidität vergesellschaftet, und verursachen neben beträchtlichem individuellem Leid hohe Kosten für das Gesundheitssystem<sup>146</sup>. Nichtsdestotrotz existiert bislang keine zufrieden stellende pharmakologische Therapie<sup>105</sup>.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe von AAV-Vektoren möglich ist das  $\gamma$ 2EGFP-Fusionsprotein und die Cre-Rekombinase an definierten Orten im Gehirn von Mäusen zur Expression zu bringen.

Nach stereotaktischer Injektion der Vektoren in Kerngebiete der Amygdala von iLoxF77I-Mäusen könnte auf diese Art die Benzodiazepinwirkung lokal wiederhergestellt werden.

Nach entsprechender Inkubationszeit sollte es dann möglich sein, Verhaltensexperimente mit diesen Tieren durchzuführen. Zur Messung des Angstniveaus im Tierexperiment haben sich dabei insbesondere der *light-dark-test*, das *elevated plus maze* und der *open field test* etabliert<sup>108</sup>. Ein anxiolytischer Phänotyp nach Benzodiazepinapplikation in diesen Versuchen ließe Rückschlüsse auf die beteiligten Hirnstrukturen zu. Auf diese Art sollte es möglich sein den neuronalen Schaltkreis der Anxiolyse besser zu charakterisieren.

Ein exakteres Verständnis der neuronalen Korrelate von Angstentstehung und vor allem auch Anxiolyse könnte es in Zukunft ermöglichen, Pharmaka für eine effektive Therapie der Angsterkrankungen zu entwickeln und somit die Situation der betroffenen Patienten maßgeblich verbessern.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 1965; **149**(3685): 754-6.
2. Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1966; **55**(6): 1467-74.
3. Muzyczka N, Berns K. Parvoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P, eds. *Fields Virology*, Vol 2. Philadelphia: Lippincott; 2001: 2327–59.
4. Buller RM, Janik JE, Sebring ED, Rose JA. Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *Journal of virology* 1981; **40**(1): 241-7.
5. McPherson RA, Rosenthal LJ, Rose JA. Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* 1985; **147**(1): 217-22.
6. Ogston P, Raj K, Beard P. Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV-16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV-16 E2 protein. *Journal of virology* 2000; **74**(8): 3494-504.
7. Thomson BJ, Weindler FW, Gray D, Schwaab V, Heilbronn R. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* 1994; **204**(1): 304-11.
8. 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. *Journal of virology* 1980; **33**(2): 739-48.
9. Hoggan MD. Adenovirus associated viruses. *Progress in medical virology Fortschritte der medizinischen Virusforschung Progres en virologie medicale* 1970; **12**: 211-39.
10. Huser D, Gogol-Doring A, Lutter T, et al. Integration preferences of wildtype AAV-2 for consensus rep-binding sites at numerous loci in the human genome. *PLoS pathogens* 2010; **6**(7): e1000985.
11. Burger C, Nash K, Mandel RJ. Recombinant adeno-associated viral vectors in the nervous system. *Human gene therapy* 2005; **16**(7): 781-91.
12. Blacklow NR, Hoggan MD, Kapikian AZ, Austin JB, Rowe WP. Epidemiology of adenovirus-associated virus infection in a nursery population. *American journal of epidemiology* 1968; **88**(3): 368-78.
13. Blacklow NR, Hoggan MD, Rowe WP. Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *Journal of the National Cancer Institute* 1968; **40**(2): 319-27.

14. Calcedo R, Morizono H, Wang L, et al. Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2011; **18**(9): 1586-8.
15. Grossman Z, Mendelson E, Brok-Simoni F, et al. Detection of adeno-associated virus type 2 in human peripheral blood cells. *The Journal of general virology* 1992; **73** ( Pt 4): 961-6.
16. Friedman-Einat M, Grossman Z, Mileguir F, et al. Detection of adeno-associated virus type 2 sequences in the human genital tract. *Journal of clinical microbiology* 1997; **35**(1): 71-8.
17. Heilbronn R, Weger S. Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics. *Handbook of experimental pharmacology* 2010; (197): 143-70.
18. Mendelson E, Trempe JP, Carter BJ. Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. *Journal of virology* 1986; **60**(3): 823-32.
19. Trempe JP, Carter BJ. Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein. *Journal of virology* 1988; **62**(9): 3356-63.
20. Sonntag F, Schmidt K, Kleinschmidt JA. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; **107**(22): 10220-5.
21. Lusby E, Fife KH, Berns KI. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *Journal of virology* 1980; **34**(2): 402-9.
22. Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *Journal of virology* 2000; **74**(6): 2777-85.
23. Kaludov N, Brown KE, Walters RW, Zabner J, Chiorini JA. Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *Journal of virology* 2001; **75**(15): 6884-93.
24. 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* 1999; **5**(1): 71-7.
25. Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Journal of virology* 1998; **72**(2): 1438-45.
26. Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H, Kay MA. The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *Journal of virology* 2006; **80**(19): 9831-6.
27. Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Buning H, Hallek M, Brauchle C. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* 2001; **294**(5548): 1929-32.
28. Berns KI, Linden RM. The cryptic life style of adeno-associated virus. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 1995; **17**(3): 237-45.

29. Kyostio SR, Owens RA, Weitzman MD, Antoni BA, Chejanovsky N, Carter BJ. Analysis of adeno-associated virus (AAV) wild-type and mutant Rep proteins for their abilities to negatively regulate AAV p5 and p19 mRNA levels. *Journal of virology* 1994; **68**(5): 2947-57.
30. Pereira DJ, McCarty DM, Muzyczka N. The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *Journal of virology* 1997; **71**(2): 1079-88.
31. Laughlin CA, Cardellicchio CB, Coon HC. Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *Journal of virology* 1986; **60**(2): 515-24.
32. Samulski RJ, Berns KI, Tan M, Muzyczka N. Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982; **79**(6): 2077-81.
33. Weger S, Wistuba A, Grimm D, Kleinschmidt JA. Control of adeno-associated virus type 2 cap gene expression: relative influence of helper virus, terminal repeats, and Rep proteins. *Journal of virology* 1997; **71**(11): 8437-47.
34. Ruffing M, Zentgraf H, Kleinschmidt JA. Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *Journal of virology* 1992; **66**(12): 6922-30.
35. Brister JR, Muzyczka N. Rep-mediated nicking of the adeno-associated virus origin requires two biochemical activities, DNA helicase activity and transesterification. *Journal of virology* 1999; **73**(11): 9325-36.
36. Im DS, Muzyczka N. The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 1990; **61**(3): 447-57.
37. Janik JE, Huston MM, Rose JA. Locations of adenovirus genes required for the replication of adenovirus-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981; **78**(3): 1925-9.
38. Richardson WD, Westphal H. Requirement for either early region 1a or early region 1b adenovirus gene products in the helper effect for adeno-associated virus. *Journal of virology* 1984; **51**(2): 404-10.
39. Richardson WD, Westphal H. Adenovirus early gene regulation and the adeno-associated virus helper effect. *Current topics in microbiology and immunology* 1984; **109**: 147-65.
40. Grifman M, Chen NN, Gao GP, Cathomen T, Wilson JM, Weitzman MD. Overexpression of cyclin A inhibits augmentation of recombinant adeno-associated virus transduction by the adenovirus E4orf6 protein. *Journal of virology* 1999; **73**(12): 10010-9.
41. Samulski RJ, Shenk T. Adenovirus E1B 55-Mr polypeptide facilitates timely cytoplasmic accumulation of adeno-associated virus mRNAs. *Journal of virology* 1988; **62**(1): 206-10.



42. Weindler FW, Heilbronn R. A subset of herpes simplex virus replication genes provides helper functions for productive adeno-associated virus replication. *Journal of virology* 1991; **65**(5): 2476-83.
43. Hermonat PL, Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984; **81**(20): 6466-70.
44. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine* 2008; **358**(21): 2231-9.
45. Maguire AM, High KA, Auricchio A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2009; **374**(9701): 1597-605.
46. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine* 2008; **358**(21): 2240-8.
47. Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *The Journal of infectious diseases* 2009; **199**(3): 381-90.
48. Russell DW. AAV loves an active genome. *Nature genetics* 2003; **34**(3): 241-2.
49. Li H, Malani N, Hamilton SR, et al. Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood* 2011; **117**(12): 3311-9.
50. Zaiss AK, Liu Q, Bowen GP, Wong NC, Bartlett JS, Muruve DA. Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *Journal of virology* 2002; **76**(9): 4580-90.
51. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Current gene therapy* 2011; **11**(4): 321-30.
52. Dong B, Nakai H, Xiao W. Characterization of genome integrity for oversized recombinant AAV vector. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2010; **18**(1): 87-92.
53. Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *Journal of virology* 1996; **70**(5): 3227-34.
54. Samulski RJ, Chang LS, Shenk T. Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *Journal of virology* 1989; **63**(9): 3822-8.
55. Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Human gene therapy* 1998; **9**(18): 2745-60.

56. McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene therapy* 2001; **8**(16): 1248-54.
57. McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene therapy* 2003; **10**(26): 2112-8.
58. Nathwani AC, Gray JT, Ng CY, et al. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* 2006; **107**(7): 2653-61.
59. Wang Z, Ma HI, Li J, Sun L, Zhang J, Xiao X. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene therapy* 2003; **10**(26): 2105-11.
60. Mastakov MY, Baer K, Xu R, Fitzsimons H, During MJ. Combined injection of rAAV with mannitol enhances gene expression in the rat brain. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2001; **3**(2): 225-32.
61. Grimm D, Kay MA. From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Current gene therapy* 2003; **3**(4): 281-304.
62. Markakis EA, Vives KP, Bober J, et al. Comparative transduction efficiency of AAV vector serotypes 1-6 in the substantia nigra and striatum of the primate brain. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2010; **18**(3): 588-93.
63. McFarland NR, Lee JS, Hyman BT, McLean PJ. Comparison of transduction efficiency of recombinant AAV serotypes 1, 2, 5, and 8 in the rat nigrostriatal system. *Journal of neurochemistry* 2009; **109**(3): 838-45.
64. Taymans JM, Vandenberghe LH, Haute CV, et al. Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Human gene therapy* 2007; **18**(3): 195-206.
65. Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature reviews Genetics* 2011; **12**(5): 341-55.
66. Chen YH, Chang M, Davidson BL. Molecular signatures of disease brain endothelia provide new sites for CNS-directed enzyme therapy. *Nature medicine* 2009; **15**(10): 1215-8.
67. Gray SJ, Blake BL, Criswell HE, et al. Directed evolution of a novel adeno-associated virus (AAV) vector that crosses the seizure-compromised blood-brain barrier (BBB). *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2010; **18**(3): 570-8.
68. Duque S, Joussemet B, Riviere C, et al. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2009; **17**(7): 1187-96.

69. Fu H, Dirosario J, Killedar S, Zaraspe K, McCarty DM. Correction of neurological disease of mucopolysaccharidosis IIIB in adult mice by rAAV9 trans-blood-brain barrier gene delivery. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2011; **19**(6): 1025-33.
70. Christine CW, Starr PA, Larson PS, et al. Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 2009; **73**(20): 1662-9.
71. Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 2007; **369**(9579): 2097-105.
72. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, et al. A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2010; **18**(9): 1731-5.
73. Hudry E, Van Dam D, Kulik W, et al. Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2010; **18**(1): 44-53.
74. Kiyota T, Okuyama S, Swan RJ, Jacobsen MT, Gendelman HE, Ikezu T. CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010; **24**(8): 3093-102.
75. Ryan DA, Mastrangelo MA, Narrow WC, Sullivan MA, Federoff HJ, Bowers WJ. Abeta-directed single-chain antibody delivery via a serotype-1 AAV vector improves learning behavior and pathology in Alzheimer's disease mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2010; **18**(8): 1471-81.
76. Mastakov MY, Baer K, Symes CW, Leichtlein CB, Kotin RM, During MJ. Immunological aspects of recombinant adeno-associated virus delivery to the mammalian brain. *Journal of virology* 2002; **76**(16): 8446-54.
77. McPhee SW, Janson CG, Li C, et al. Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease. *The journal of gene medicine* 2006; **8**(5): 577-88.
78. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989; **244**(4910): 1288-92.
79. Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, et al. Conditional gene targeting. *The Journal of clinical investigation* 1996; **98**(3): 600-3.
80. Kanegae Y, Lee G, Sato Y, et al. Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic acids research* 1995; **23**(19): 3816-21.

81. Ahmed BY, Chakravarthy S, Eggers R, et al. Efficient delivery of Cre-recombinase to neurons in vivo and stable transduction of neurons using adeno-associated and lentiviral vectors. *BMC neuroscience* 2004; **5**: 4.
82. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **391**(6669): 806-11.
83. Grimm D, Kay MA. RNAi and gene therapy: a mutual attraction. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 2007: 473-81.
84. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; **296**(5567): 550-3.
85. Sieghart W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacological reviews* 1995; **47**(2): 181-234.
86. Grenningloh G, Gundelfinger E, Schmitt B, et al. Glycine vs GABA receptors. *Nature* 1987; **330**(6143): 25-6.
87. Bormann J. Patch-clamp analysis of GABA- and glycine-gated chloride channels. *Advances in biochemical psychopharmacology* 1988; **45**: 47-60.
88. Mihic SJ, Harris RA. GABA and the GABAA receptor. *Alcohol health and research world* 1997; **21**(2): 127-31.
89. Banks MI, Pearce RA. Kinetic differences between synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors in CA1 pyramidal cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2000; **20**(3): 937-48.
90. Nayeem N, Green TP, Martin IL, Barnard EA. Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *Journal of neurochemistry* 1994; **62**(2): 815-8.
91. Barnard R, Wolff RC. Analysis and application of an equilibrium model for in vitro bioassay systems with three components: receptor, hormone and hormone-binding-protein. *Journal of theoretical biology* 1998; **190**(4): 333-9.
92. Bateson AN, Lasham A, Darlison MG. gamma-Aminobutyric acidA receptor heterogeneity is increased by alternative splicing of a novel beta-subunit gene transcript. *Journal of neurochemistry* 1991; **56**(4): 1437-40.
93. Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 2000; **101**(4): 815-50.
94. McKernan RM, Whiting PJ. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends in neurosciences* 1996; **19**(4): 139-43.

95. Korpi ER, Grunder G, Luddens H. Drug interactions at GABA(A) receptors. *Progress in neurobiology* 2002; **67**(2): 113-59.
96. Licata SC, Rowlett JK. Abuse and dependence liability of benzodiazepine-type drugs: GABA(A) receptor modulation and beyond. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 2008; **90**(1): 74-89.
97. Study RE, Barker JL. Diazepam and (--)pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981; **78**(11): 7180-4.
98. Sigel E. Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABA(A) receptors. *Current topics in medicinal chemistry* 2002; **2**(8): 833-9.
99. Buhr A, Baur R, Sigel E. Subtle changes in residue 77 of the gamma subunit of alpha1beta2gamma2 GABAA receptors drastically alter the affinity for ligands of the benzodiazepine binding site. *The Journal of biological chemistry* 1997; **272**(18): 11799-804.
100. Buhr A, Sigel E. A point mutation in the gamma2 subunit of gamma-aminobutyric acid type A receptors results in altered benzodiazepine binding site specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; **94**(16): 8824-9.
101. Cope DW, Wulff P, Oberto A, et al. Abolition of zolpidem sensitivity in mice with a point mutation in the GABAA receptor gamma2 subunit. *Neuropharmacology* 2004; **47**(1): 17-34.
102. Ogris W, Poltl A, Hauer B, et al. Affinity of various benzodiazepine site ligands in mice with a point mutation in the GABA(A) receptor gamma2 subunit. *Biochemical pharmacology* 2004; **68**(8): 1621-9.
103. Wulff P, Goetz T, Leppa E, et al. From synapse to behavior: rapid modulation of defined neuronal types with engineered GABAA receptors. *Nature neuroscience* 2007; **10**(7): 923-9.
104. Andlin-Sobocki P, Wittchen HU. Cost of anxiety disorders in Europe. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 2005; **12 Suppl 1**: 39-44.
105. Zwanzger P, Deckert J. [Anxiety disorders. Causes, clinical picture and treatment]. *Der Nervenarzt* 2007; **78**(3): 349-59; quiz 60.
106. Stein MB, Cantrell CR, Sokol MC, Eaddy MT, Shah MB. Antidepressant adherence and medical resource use among managed care patients with anxiety disorders. *Psychiatric services* 2006; **57**(5): 673-80.
107. Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in neurobiology* 2003; **70**(2): 83-244.

108. Tasan RO, Nguyen NK, Weger S, et al. The central and basolateral amygdala are critical sites of neuropeptide Y/Y2 receptor-mediated regulation of anxiety and depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2010; **30**(18): 6282-90.
109. LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1988; **8**(7): 2517-29.
110. Shen Q, Lal R, Luellen BA, Earnheart JC, Andrews AM, Luscher B. gamma-Aminobutyric acid-type A receptor deficits cause hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity and antidepressant drug sensitivity reminiscent of melancholic forms of depression. *Biological psychiatry* 2010; **68**(6): 512-20.
111. Kittler JT, Wang J, Connolly CN, Vicini S, Smart TG, Moss SJ. Analysis of GABAA receptor assembly in mammalian cell lines and hippocampal neurons using gamma 2 subunit green fluorescent protein chimeras. *Molecular and cellular neurosciences* 2000; **16**(4): 440-52.
112. Doll RF, Crandall JE, Dyer CA, Aucoin JM, Smith FI. Comparison of promoter strengths on gene delivery into mammalian brain cells using AAV vectors. *Gene therapy* 1996; **3**(5): 437-47.
113. Connolly CN, Krishek BJ, McDonald BJ, Smart TG, Moss SJ. Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *The Journal of biological chemistry* 1996; **271**(1): 89-96.
114. Connolly CN, Uren JM, Thomas P, et al. Subcellular localization and endocytosis of homomeric gamma2 subunit splice variants of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Molecular and cellular neurosciences* 1999; **13**(4): 259-71.
115. Gorrie GH, Vallis Y, Stephenson A, et al. Assembly of GABAA receptors composed of alpha1 and beta2 subunits in both cultured neurons and fibroblasts. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1997; **17**(17): 6587-96.
116. Siolas D, Lerner C, Burchard J, et al. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nature biotechnology* 2005; **23**(2): 227-31.
117. Leung RK, Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & therapeutics* 2005; **107**(2): 222-39.
118. Mokrejs M, Masek T, Vopalensky V, Hlubucek P, Delbos P, Pospisek M. IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic acids research* 2010; **38**(Database issue): D131-6.
119. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 1988; **334**(6180): 320-5.
120. Connolly CN, Kittler JT, Thomas P, et al. Cell surface stability of gamma-aminobutyric acid type A receptors. Dependence on protein kinase C activity and subunit composition. *The Journal of biological chemistry* 1999; **274**(51): 36565-72.

121. Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, et al. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2004; **10**(2): 302-17.
122. Nakai H, Storm TA, Kay MA. Increasing the size of rAAV-mediated expression cassettes in vivo by intermolecular joining of two complementary vectors. *Nature biotechnology* 2000; **18**(5): 527-32.
123. Thyagarajan B, Guimaraes MJ, Groth AC, Calos MP. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* 2000; **244**(1-2): 47-54.
124. Loonstra A, Vooijs M, Beverloo HB, et al. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; **98**(16): 9209-14.
125. Pfeifer A, Brandon EP, Kootstra N, Gage FH, Verma IM. Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; **98**(20): 11450-5.
126. Kaspar BK, Vissel B, Bengoechea T, et al. Adeno-associated virus effectively mediates conditional gene modification in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; **99**(4): 2320-5.
127. McCown TJ, Xiao X, Li J, Breese GR, Samulski RJ. Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector. *Brain research* 1996; **713**(1-2): 99-107.
128. Klein RL, Meyer EM, Peel AL, et al. Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors. *Experimental neurology* 1998; **150**(2): 183-94.
129. Prosch S, Stein J, Staak K, Liebenthal C, Volk HD, Kruger DH. Inactivation of the very strong HCMV immediate early promoter by DNA CpG methylation in vitro. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 1996; **377**(3): 195-201.
130. Gray SJ, Foti SB, Schwartz JW, et al. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Human gene therapy* 2011; **22**(9): 1143-53.
131. Everett RS, Evans HK, Hodges BL, Ding EY, Serra DM, Amalfitano A. Strain-specific rate of shutdown of CMV enhancer activity in murine liver confirmed by use of persistent [E1(-), E2b(-)] adenoviral vectors. *Virology* 2004; **325**(1): 96-105.
132. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Picornaviren. *Molekulare Virologie*. 3 ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010: 145-75.

133. Borman AM, Le Mercier P, Girard M, Kean KM. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic acids research* 1997; **25**(5): 925-32.
134. Zhou Y, Aran J, Gottesman MM, Pastan I. Co-expression of human adenosine deaminase and multidrug resistance using a bicistronic retroviral vector. *Human gene therapy* 1998; **9**(3): 287-93.
135. Bochkov YA, Palmenberg AC. Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *BioTechniques* 2006; **41**(3): 283-4, 6, 8 passim.
136. Fitzsimons HL, Bland RJ, During MJ. Promoters and regulatory elements that improve adeno-associated virus transgene expression in the brain. *Methods* 2002; **28**(2): 227-36.
137. Xu R, Janson CG, Mastakov M, et al. Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes. *Gene therapy* 2001; **8**(17): 1323-32.
138. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 1991; **108**(2): 193-9.
139. Kaemmerer WF, Reddy RG, Warlick CA, Hartung SD, McIvor RS, Low WC. In vivo transduction of cerebellar Purkinje cells using adeno-associated virus vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2000; **2**(5): 446-57.
140. Klein RL, Hamby ME, Gong Y, et al. Dose and promoter effects of adeno-associated viral vector for green fluorescent protein expression in the rat brain. *Experimental neurology* 2002; **176**(1): 66-74.
141. Gaken J, Jiang J, Daniel K, et al. Fusogene vectors: a novel strategy for the expression of multiple genes from a single cistron. *Gene therapy* 2000; **7**(23): 1979-85.
142. de Felipe P, Hughes LE, Ryan MD, Brown JD. Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *The Journal of biological chemistry* 2003; **278**(13): 11441-8.
143. Donnelly ML, Hughes LE, Luke G, et al. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *The Journal of general virology* 2001; **82**(Pt 5): 1027-41.
144. Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, et al. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; **106**(1): 157-62.
145. Furler S, Paterna JC, Weibel M, Bueler H. Recombinant AAV vectors containing the foot and mouth disease virus 2A sequence confer efficient bicistronic gene expression in cultured cells and rat substantia nigra neurons. *Gene therapy* 2001; **8**(11): 864-73.
146. Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of general psychiatry* 2005; **62**(6): 617-27



## 8. Anhang

### 8.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marc Alexander Plauth versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Adeno-assoziierte Virusvektoren für die Expression der  $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

21.09.2013

Unterschrift

## **8.2 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



### 8.3 Publikationsliste

Peterschmitt Y, Weger S, Plauth MA, Heilbronn R, Wisden W, Sperk G and Sieghart W. Establishing a new mouse model for investigating the function of amygdala neurons in anxiety. *BMC Pharmacology* 2008, **8**(Suppl 1):A35. 14th Scientific Symposium of the Austrian Pharmacological Society (APHAR).

### 8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Regine Heilbronn, die mir durch die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, das Überlassen des spannenden Themas und ihre fachliche Betreuung die Erarbeitung dieser Dissertation möglich machte.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Stefan Weger für seine unermüdliche Unterstützung bei der praktischen Durchführung und theoretischen Planung der Experimente, sowie sein geduldiges Beantworten all meiner Fragen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Günther Sperk und all seinen Mitarbeitern, insbesondere Dr. Yvan Peterschmitt und Dr. Ramon Tasan, danke ich für ihre umfangreiche Unterstützung und die Möglichkeit, mich an den *in-vivo*-Versuchen in Innsbruck zu beteiligen. Ein ganz besonders herzlicher zusätzlicher Dank gilt Herrn Dr. Yvan Peterschmitt für seine Gastfreundschaft.

Frau Kerstin Winter danke ich für das Anfertigen zahlreicher rAAV-Präparationen. Außerdem waren sie und Frau Eva Hammer sowohl fachlich als auch menschlich eine große Stütze während meiner Zeit im Labor, wofür ich mich ebenfalls herzlich bedanken möchte. Bei Frau Ruth Joncker möchte ich mich für ihre geduldige und stets freundliche Hilfe in sämtlichen organisatorischen Belangen bedanken.

Martin Wannack und Christoph Seifert danke ich für Ihr kritisches Korrekturlesen und ihre langjährige Freundschaft.

Juliane Stöckel hat mich vom Anfang dieser Arbeit an begleitet und mir durch ihr Vertrauen und ihre liebevolle Unterstützung in sämtlichen Lebenslagen ein sicheres Umschiffen diverser Klippen ermöglicht. Danke!

Meiner Familie danke ich für die bedingungslose Unterstützung und Liebe, die ich Zeit meines Lebens von Ihr erfahren habe und die mich zu dem Menschen gemacht hat, der ich heute bin.