

## **2. MATERIAL**

### **2.1. Geräte**

Neben Geräten, die zur Standardausrüstung des Labors gehörten, kamen zum Einsatz: Der LightCycler der Firma Roche, Mannheim, das Spektral-Photometer DU-640 bzw. DU-530 (Beckman, Unterschleissheim), die Zentrifuge Avanti (Beckman), die Ultrazentrifuge L5-75 mit dem 60Ti Rotor der Firma Beckman und die Mini-Ultrazentrifuge RC M120 GX mit dem Ausschwingrotor S55S (Sorvall, Bad Homburg). Ferner wurden die PCR-Geräte GeneAmp 2400 (Perkin Elmer, Überlingen) und GeneAmp 9700 (Applied Biosystems), ein Gel-Dokumentationssystem (Pharmacia, Uppsala, Schweden), ein UV-Stratalinker 2400 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande) und ein inverses Fluoreszenz-Mikroskop DM IL (Leica, Bensheim) verwendet.

### **2.2. Chemikalien, Lösungen und Puffer**

Laborchemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) bezogen. Medium und fötales Kälberserum (FKS) stammten von Gibco (Karlsruhe), Selektionsmittel und Trypsin für die Zellkultur von Biochrom (Berlin). dNTPs wurden von Pharmacia (Uppsala, Schweden) bezogen. Als DNA-Fragmentgrößenmarker wurde die "1 kbp DNA Leiter" von MBI Fermentas (St.Leon-Rot) eingesetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Häufig verwendete Puffer wie TE, TAE und PBS wurden nach den Methodensammlungen von Sambrook et al. (Sambrook, Fritsch, and Maniatis, 1989) und (Asubel et al., 1987) hergestellt. Alle weiteren Puffer, Lösungen und Medien sind bei den jeweiligen Methoden angegeben. Zur Sterilisierung wurden die Lösungen, sofern die Bestandteile eine Hitzebehandlung erlaubten, bei 121°C und 2 at für 20 Minuten autoklaviert, ansonsten steril filtriert.

### 2.3. Enzyme

Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Klenow-Enzym, T4-Polynukleotidkinase und alkalische Phosphatase (CIP) wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Ribonuklease A, Proteinase K und Lysozym stammten von Sigma (Taufkirchen). Benzonase wurde von Merck (Darmstadt) bezogen. Für Heiß-Start PCRs wurden die Taq-Polymerasen PlatinumTaq™ von Gibco (Karlsruhe) und HotStarTaq™ von Qiagen (Hilden) verwendet. Der Einsatz der Enzyme erfolgte nach den Anweisungen der Hersteller in den mitgelieferten Puffern.

### 2.4. Fertige Reaktionssysteme (Kits)

Die in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommenen fertigen Reaktionssysteme (Kits) sind in Tabelle 2.1. zusammengefaßt.

Produktname	Verwendung	Hersteller
Qiaquick PCR purification Kit	a) Reinigung von verdauter genomischer DNA b)Reinigung von PCR Produkten	Qiagen (Hilden)
QiaEX II Gel Extraction Kit	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Qiagen (Hilden)
Plasmid Midi Kit	Präparation von Plasmid-DNA	Qiagen (Hilden).
Fast Start DNA Master Hybridization Probes	Real time LightCycler PCR	Roche (Mannheim)
Fast Start DNA Master SYBR Green I	Real time LightCycler PCR	Roche (Mannheim)
DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II	Markierung von DNA-Sonden	Roche (Mannheim)
TOPO TA Cloning Kit For Sequencing	Klonierung von PCR Produkten	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

Tabelle 2.1. Einsatz und Herstellerfirmen der verwendeten fertigen Reaktionssysteme (Kits).

## 2.5. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.2. zusammengefaßt und wurden von der Firma MWG BioTech AG (Ebersberg) oder TIBMolBiol (Berlin) synthetisiert.

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
Linker Xba I – Bgl II	CTA GAT CAG AAG CTT CCG A	Klonierung psubgfpneo
Linker Bgl II - Xba I	GAT CTC GGA AGC TTC TGA T	Klonierung psubgfpneo
Not I_AAVS1	ATA TAG CGG CCG CAC AGA CTA GAG AGG TAA GG	PCR-Klonierung
Bgl I_AAVS1	ATA TAG CCG CCC GGG CTG ACC CAT CGA GTC CTC CT	PCR-Klonierung
16s	GTA GCA TGG CGG GTT AAT CA	Integration, nested PCR, äußere
Paußen	AGA GAC GGC ACG GCA GCG TTA	Integration, nested PCR, äußere
Cr2	ACA ATG GCC AGG GCC AGG CAG	Integration, nested PCR, innere
P3	TTA ACT ACA AGG AAC CCC TAG TGA TGG	Integration, nested PCR, innere
P LC assay 17s	TCA GAG GAC ATC ACG TG TTA ACT ACA AGG AAC CCC TA	Integration, quantitative PCR, rechte ITR Integration, quantitative PCR, rechte ITR
IntegrAAVS1	ATC CGC TCA GAG GAC ATC AC	Integration, quantitative PCR, linke ITR
AAV2-LTR Donor	CTC CAG GAA CCC CTA GT TGT TGC TGC CCA AGG ATG CT-Flu	Integration, quantitative PCR, linke ITR LightCycler PCR, Donor (am 3'-Ende Fluorescein modifiziert)
Akzeptor	LC Red640-TTT CCG GAG CAC TTC CTT CTC G-ph	LightCycler PCR, Akzeptor (am 5'-Ende LCRed640 modifiziert, 3'-phosphoryliert)
AAV-F1	GCC AAC TCC ATC ACT AGG GG	Titration AAV-2 Wildtyp, quantitative PCR
AAV-W1	CCC GCT TCA AAA TGG AGA CC	Titration AAV-2 Wildtyp, quantitative PCR
AAV-F3	TGG GCG TGG ATA GCG GTT TG	Titration rAAVsubgfpneo, quantitative PCR
AAV-B3	AAC AGC GTG GAT GGC GTC TC	Titration rAAVsubgfpneo, quantitative PCR
M13universal	GTA AAA CGA CGG CCA G	Sequenzierung
M13reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Sequenzierung

Tabelle 2.2. Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

## 2.6. Plasmide

Folgende Plasmide kamen zum Einsatz:

Name	Beschreibung	Herkunft
pRVK	AAVS1-Sequenz	M. Linden, New York, USA (Kotin, Linden, and Berns, 1992)
pTAV2-0	AAV Genom, Wildtyp	AG Heilbronn (Heilbronn et al., 1990)
psub201(+)	AAV Genom, Schnittstellen insertiert	R.J. Samulski, Chapel Hill, USA (Samulski, Chang, and Shenk, 1987)
pDG	AAV <i>repcap</i> und adenovirale Helferfunktionen E2A, E4 und VA	J. Kleinschmidt, Heidelberg (Grimm et al., 1998)
pTR-UF5	<i>gfpneo</i> Kasette (Reportergen für Green Fluorescent Protein ( <i>gfp</i> ) und dominanter Marker: Neomycinresistenzgen für Aminoglycosid-Phosphotransferase ( <i>neo</i> )) flankiert von AAV terminalen Wiederholungen	N. Muzyczka, Gainesville, USA (Zolotukhin et al., 1996)
pCR4-TOPO	Leervektor mit 3' Thymidin-Überhang und kovalent gebundener Topoisomerase	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pBluescript II KS+ ΔTR18	Leervektor	Stratagene, Heidelberg
pRep78	AAV <i>repcap</i> Kasette ohne ITR	Labor AG Heilbronn
psubgfpneo	große Rep-Proteine, CMV-Promotor	Labor AG Heilbronn
	<i>gfpneo</i> Kasette flankiert von AAV terminalen Wiederholungen	kloniert aus psubgfpneo und pTR-UF5 <sup>a</sup>
pAAVS1-TR	Primerbindungsstellen des AAV-rechten TR und von AAVS1	kloniert aus psubgfpneo, pRVK und pBluescript II KS+ <sup>b</sup>
pAAVS1-LTR	Primerbindungsstellen des AAV-linken TR und von AAVS1	kloniert aus pTAV2-0, pRVK und pBluescript II KS+ <sup>c</sup>
psubgfpneorepcap	psubgfpneo mit AAV <i>repcap</i> Kasette	kloniert aus psubgfpneo und psub201(+)
psubgfpneorepcap-	psubgfpneo mit AAV <i>rep</i>	kloniert aus psubgfpneorepcap, Deletion in <i>cap</i>
psubgfpneorep68tr	psubgfpneo mit C-terminal verkürztem <i>rep</i>	kloniert aus psubgfpneorepcap, <i>repcap</i> ab Spleiß-Donor deletiert
psubgfpneorep52	psubgfpneo mit AAV <i>rep</i> und stop nach p5	kloniert aus psubgfpneorepcap-

Tabelle 2.3. Plasmide.

<sup>a</sup> Vektor: psub201(+) wurde Xba I, Pst I verdaut und dephosphoryliert (CIP) → 3,99 kb-Fragment

Insert: pTR-UF5 wurde Bgl II, Sca I verdaut → 3,09 kb-Fragment *gfpneo*

10 pmol des Oligonukleotides Linker Xba I – Bgl II wurden mit 10 U T4 Polynukleotidkinase 30 min bei 37°C phosphoryliert und 15 min bei 68°C hitzeinaktiviert

mit je 10 pmol Linker Xba I – Bgl II / PNK und Linker Bgl II – Xba I wurde in einem Volumen von 11 µl 30 min bei 37°C ein Annealingschritt durchgeführt

bei der Ligation wurde der Linker in 10-fach molarem Überschuß im Verhältnis zum Vektor zugegeben

<sup>b</sup> Vektor: pBluescript II KS+/ Not I, Hind III, CIP → 2,96 kb-Fragment

2 Inserts: psubgfpneo/ Bgl I, Hind III → 156 bp-Fragment

pRVK/ PCR mit Primern Not I\_AAVS1 und Bgl I\_AAVS1 → 914 bp-Fragment/ Not I, Bgl I → 900 bp-Fragment

<sup>c</sup> Vektor: pBluescript II KS+/ Not I, Hind III, CIP → 2,96 kb-Fragment

2 Inserts: pTAV2-0/ Hind III → 1,92 kb-Fragment/ Partialverdau Bgl I → 1,8 kb-Fragment

pRVK/ PCR mit Primern Not I\_AAVS1 und Bgl I\_AAVS1 → 914 bp-Fragment/ Not I, Bgl I → 900 bp-Fragment

## 2.8. Bakterienstämme

Zur Transformation von Ligationsprodukten und zur Retransformation von Plasmid-DNA wurden folgende *E.coli*-Stämme eingesetzt: SURE, HB101, CJ236 oder TOP10.

Name	besonderes Merkmal	Herkunft	Genotyp
SURE	Mutationen im Reparatursystem, für instabile DNA-Strukturen	Stratagene, Heidelberg	e14-(mcrA-) $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5(Kan <sup>R</sup> ) uvrC F' [proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]
HB101		AG Heilbronn	F <sup>-</sup> leuB6 proA2 recA13 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20 supE44 hsdS20
CJ236	Uracil-N-Glycosidase-negativ	BioWhittaker Europe, Taufkirchen	dut1 ung1 thi-1 recA1 / pCJ105 (cam <sup>r</sup> F')
TOP10		Invitrogen, Groningen, Niederlande	F <sup>-</sup> mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 deoR araG139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG

Tabelle 2.4. *E.coli*-Stämme für die Transformation

## 2.9. Zelllinien

HeLa: humane Cervixcarcinomzellen

293T: Derivat der humanen embryonalen Nierencarcinomzellen 293, welches zusätzlich das große SV40 T-Antigen exprimiert; exprimiert ebenso wie 293 adenovirales E1A und E1B

## 2.10. Viren

adeno-assoziiertes Virus Typ 2 (AAV-2)

rekombinantes adeno-assoziiertes Virus (rAAVsubgfpneo)

Adenovirus Typ 2 (Ad-2)

## **2.11. Computerprogramme**

Alle Arbeiten erfolgten an Macintosh-Computern. Zur Text- und Bildbearbeitung sowie zur Tabellenkalkulation wurden die gängigen Programme der Firmen Microsoft und Adobe eingesetzt. Zeichnungen wurden mit FreeHand (Macromedia) oder Illustrator (Adobe) erstellt. Zur Planung von Klonierungen und zur Erstellung von Plasmidkarten wurde das Programm Gene Construction Kit der Firma Textco (New Hampshire, USA) verwendet. Geeignete Primer für die PCR wurden mit Hilfe des Programms Oligo der Firma National Biosciences (Plymouth, USA) ausgewählt. Die Auswertung der Sequenzierungsdaten erfolgte mittels der Homepage des National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA). Die LightCycler-Daten wurden mit der LightCycler Software Data Analysis ausgewertet.