

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

DISSERTATION

Herstellung optimierter Sf9-Zelllinien für die Baculovirus-
basierte Produktion rekombinanter AAV5-Vektoren mit hoher
Infektiosität

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Vincent Casteleyn

Datum der Promotion: 4. März 2022

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in: <Mietzsch M, Casteleyn V, Weger S, Zolotukhin S, Heilbronn R. OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV5 Vectors with Enhanced Infectivity and Minimal Encapsidation of Foreign DNA. Human Gene Therapy 2015;26:688-97.>/ <02.07.2015>.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	11
Zusammenfassung.....	12
Abstract.....	13
1. Einleitung.....	14
1.1 Adeno-assoziierte Viren und ihre Verwendung als gentherapeutische Vektoren	14
1.1.1 AAV-Wildtyp.....	14
1.1.1.1 Genom von AAV.....	14
1.1.1.2 Kapsid von AAV.....	17
1.1.1.3 Lebenszyklus von AAV.....	18
1.1.1.4 Replikationszyklus von AAV.....	20
1.1.1.5 AAV-Serotyp 5.....	21
1.1.2 AAV als gentherapeutischer Vektor.....	22
1.2 Herstellung von AAV-Vektoren.....	24
1.2.1 Herstellung von AAV-Vektoren in Säugierzellen.....	24
1.2.2 Herstellung von AAV-Vektoren in Insektenzellen.....	24
1.2.2.1 Entwicklung des Baculovirus-Insektenzellsystems zur rAAV-Produktion	
.....	25
1.2.2.2 Das OneBac-System nach Aslanidi und Mietzsch.....	26
1.2.2.2.1 OneBac: Plasmide.....	27
1.2.2.2.2 OneBac: rep- und cap-Open Reading Frames (ORF).....	30
1.2.2.2.3 OneBac: Rekombinantes Baculovirus – Bac-rAAV-GFP.....	30
1.2.2.2.4 OneBac: Vektor-Produktion.....	31
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	32
2. Materialien und Methoden.....	33
2.1 Materialien.....	33
2.1.1 Antibiotika/ Antimykotika.....	33
2.1.2 Antikörper.....	33
2.1.3 Bakterien.....	34
2.1.4 Chemikalien.....	34
2.1.5 DNA.....	35
2.1.6 Enzyme.....	38
2.1.7 Geräte.....	38
2.1.8 Kitsysteme.....	39
2.1.9 Lösungen und Puffer.....	40
2.1.10 Marker.....	42
2.1.11 Medien.....	42
2.1.12 Software.....	43
2.1.13 Verbrauchsmaterialien.....	43
2.2 Methoden.....	45
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	45
2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	45
2.2.1.2 Restriktionsverdau von DNA.....	46
2.2.1.3 Ligation von DNA.....	47
2.2.1.4 Herstellung von chemisch-kompetenten Bakterien.....	47
2.2.1.5 Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien.....	47
2.2.1.6 Gelelektrophorese.....	48
2.2.1.7 DNA-Isolation aus Agarosegelen unter Verwendung der „Freeze-Squeeze“-Methode.....	48

2.2.1.8 Phenol-Chloroform-Extraktion	49
2.2.1.9 DNA-Fällung mit Ethanol/ Isopropanol	49
2.2.1.10 Plasmid-Präparation	50
2.2.1.10.1 Lysozym-Methode.....	50
2.2.1.10.2 Midi-/Maxi-Präparation.....	50
2.2.1.11 Photometrische Analyse der DNA-Konzentration	51
2.2.1.12 Sequenzierung von DNA	51
2.2.2 Proteinnachweis.....	51
2.2.2.1 SDS-Polyacrylamidgel: Herstellung und Gelelektrophorese.....	51
2.2.2.2 Western Blot.....	52
2.2.3 Zellbiologische Methoden	53
2.2.3.1 Sf9-Zellen	53
2.2.3.1.1 Kultivierung von Sf9-Zellen in Zellkulturflaschen.....	54
2.2.3.1.2 Kultivierung von Sf9-Zellen in Suspension.....	54
2.2.3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	54
2.2.3.1.4 Transfektion von Sf9-Zellen	55
2.2.3.1.5 Selektion transfizierter stabiler Sf9-Zellen.....	56
2.2.3.2 C12-Zellen.....	56
2.2.3.2.1 Kultivierung von C12-Zellen in Zellkulturflaschen	57
2.2.3.3 HEK 293-Zellen	57
2.2.3.4 Produktion von Baculoviren und AAV-Vektoren	57
2.2.3.4.1 Baculovirus-Produktion	57
2.2.3.4.2 Produktion von AAV-Vektoren	59
2.2.3.5 Analyse von AAV-Vektoren	59
2.2.3.5.1 Ernte von AAV-Vektoren.....	59
2.2.3.5.2 Light Cyclor PCR – quantitative Analyse	60
2.2.3.5.3 Transduktionsassay – qualitative Analyse	62
3. Ergebnisse.....	64
3.1 Hintergrund: OneBac2.0	64
3.1.1 Veränderung des AAV5- <i>cap</i> auf Basis eines artifiziellen Introns.....	64
3.1.2 Deletion der Rep-Bindestelle (RBE)	66
3.2 Produktion der AAV5-Vektoren.....	66
3.2.1 Herstellung von pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE ⁺	66
3.2.2 Herstellung von pIR-Cap-AAV5-Intron- Δ RBE und pIR-Rep78-AAV2-hr2- Δ RBE	70
3.2.3 Pooltestung	70
3.2.4 AAV5-RBE ⁺ -Zellklone	72
3.2.5 AAV5- Δ RBE-Zellklone	73
3.3 Analyse der AAV5-Intron-RBE ⁺ -Vektoren	74
3.3.1 Western Blot.....	74
3.3.2 Quantitative PCR.....	79
3.3.3 Transduktionsassay: Infektiositätstestung.....	82
3.4 Analyse der AAV5-Intron- Δ RBE-Vektoren	87
3.4.1 Western Blot.....	87
3.4.2 Quantitative PCR.....	89
3.4.3 Transduktionsassay: Infektiositätstestung.....	92
4. Diskussion	95
4.1 Bedeutung von VP1	95
4.2 Bedeutung der Rep-Bindestelle (RBE)	97
4.3 Vor- und Nachteile des OneBac2.0-System	99
4.4 Klinische Anwendung von rAAV5	101

4.5 Ausblick	104
5. Literaturverzeichnis.....	105
Eidesstattliche Versicherung	113
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	114
Publikationsliste	115
Lebenslauf	116
Danksagung	117

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
APS	Ammoniumpersulfat
Bac	Baculovirus
bGH	englisch bovine growth hormone
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BV	englisch budding virus
bsd	Blasticidin-Resistenzgen
bzw.	beziehungsweise
bspw.	beispielsweise
Cap	Kapsidproteine von AAV
<i>cap</i>	Kapsidgene von AAV
ca.	circa
CBA	englisch chicken beta actin
cDNA	komplementäre DNA (englisch complementary DNA)
cm	Centimeter
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ECL	englisch enhanced chemilumineszenz
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	englisch fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (englisch green fluorescent protein)
ggf.	gegebenenfalls
gp	genomische Partikel
HEK-293	humane embryonale Nierenzellen (englisch human embryonal kidney cells)

HeLa	Immortalisierte Zellen eines Zervixkarzinom der Patientin <i>Henrietta Lacks</i>
hr	homologe Region
ITR	invertierte terminale Wiederholungen (englisch inverted terminal repeats)
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
mA	Miliampere
mAb	Monoklonaler Antikörper (englisch monoclonal antibody)
µl/ml/l	Mikro-/ Milli-/ -Liter
mm	Millimeter
mM/M	Milli-/ -Molar
MOI	Multiplizität der Infektion (englisch multiplicity of infection)
mRNA	messenger RNA
NEB	New England Biolabs
ng/µg/mg/g	Nano-/ Mikro-/ Milli-/ -Gramm
OB	englisch occlusion body
OD	optische Dichte
ODV	englisch occlusion derived virus
ORF	offener Leserahmen (englisch open reading frame)
ORI	Replikationsursprung (englisch origin of replication)
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch polymerase chain reaction)
pmol	Picomol
polh	Polyhedrin
PolyA	Poly-Adenylierungssignal
rAAV	rekombinanter Adeno-assoziiertes (Virus) Vektor
RBE	Rep-Bindestelle (englisch Rep binding element)
Rep	Replikationsprotein von AAV
<i>rep</i>	Replikationsgene von AAV
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
s.	siehe

sc	englisch self-complementary
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gel
Sf9-Zellen	Immortalisierte Zellen aus den Ovarien von Spodoptera frugiperda
ssDNA	Einzelstrang-DNA
STET	Saccharose-Triton-EDTA-Tris-Puffer
s.u.	siehe unten
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRS	Terminal resolution site
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
VR	variable Regionen
VA-RNA	viral-assoziierte RNA
[v/v]	Volumenprozent
[w/v]	Gewichtsprozent
WPRE	englisch Woodchuck posttranscriptional regulatory element
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: AAV2-ITR Sekundärstruktur.
- Abbildung 2: AAV2-Genom.
- Abbildung 3: AAV-Replikationszyklus.
- Abbildung 4: OneBac: pIR-Plasmide.
- Abbildung 5: OneBac: *rep*- und *cap*-ORF.
- Abbildung 6: OneBac: rAAV-Kassette.
- Abbildung 7: *cap*-ORF von AAV-Wildtyp, OneBac und OneBac2.0 im Vergleich.
- Abbildung 8: Herstellung des pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺-Plasmids.
- Abbildung 9: pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺-Plasmid.
- Abbildung 10: pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺ und pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE⁺.
- Abbildung 11: Herstellung der pIR- Δ RBE-Plasmide.
- Abbildung 12: Selektionsverfahren der transfizierten Sf9-Zellklone.
- Abbildung 13: Western Blot der Kapsidproteine und Replikationsproteine von AAV5-Vektoren im Vergleich.
- Abbildung 14: Western Blot der Kapsidproteine von AAV5-Vektoren aus 35 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen im Vergleich zu nativen Sf9-Zellen und AAV5-Vektoren aus 293-Zellen.
- Abbildung 15: Western Blot der Kapsidproteine von AAV5-Vektoren aus 20 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen im Vergleich zu AAV5-Vektoren aus dem Sf9-Zellklon #6 und 293-Zellen.
- Abbildung 16: Western Blot der Kapsidproteine und Replikationsproteine von AAV5-Vektoren aus 3 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen im Vergleich.
- Abbildung 17: AAV5-Vektor Gewinn aus 20 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen im Vergleich zu AAV5 Vektor Gewinn aus dem Sf9-Zellklon #6 und 293-Zellen.
- Abbildung 18: AAV5-Vektor Gewinn aus 3 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen - Zellklon D7B, D8B und E5B im Vergleich mit AAV5 Vektor Gewinn aus HEK-293 Zellen und #6.
- Abbildung 19: Transduktionseffizienz der AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen des stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklons D7B im Vergleich mit AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen des

Sf9-Zellklons #6 und 293-Zellen im Transduktionsassay mit C12-Zellen.

Abbildung 20: Relative Transduktionseffizienz der AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen von 20 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen im Vergleich mit AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen des Sf9-Zellklons #6 und 293-Zellen im Transduktionsassay mit C12-Zellen.

Abbildung 21: Relative Transduktionseffizienz der AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen von 3 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen im Transduktionsassay mit C12-Zellen.

Abbildung 22: Western Blot der Kapsidproteine von AAV5-Vektoren aus 12 stabilen AAV5- Δ RBE-Zellklonen im Vergleich.

Abbildung 23: Western Blot der Kapsidproteine und Replikationsproteine von AAV5-Vektoren aus 3 stabilen AAV5- Δ RBE-Zellklonen im Vergleich.

Abbildung 24: AAV5-Vektor Gewinn aus 11 stabilen AAV5- Δ RBE-Zellklonen im Vergleich mit dem stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklon E5B.

Abbildung 25: AAV5-Vektor Gewinn aus 3 stabilen AAV5- Δ RBE-Zellklonen – Zellklone 1, 7 und 10 im Vergleich.

Abbildung 26: Relative Transduktionseffizienz der AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen von 11 stabilen AAV5- Δ RBE-Zellklonen im Vergleich mit AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen des AAV5-RBE⁺-Zellklons E5B im Transduktionsassay mit C12-Zellen.

Abbildung 27: Relative Transduktionseffizienz der AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen von 3 stabilen AAV5- Δ RBE-Zellklonen im Transduktionsassay mit C12-Zellen.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Oligonukleotide
Tabelle 2:	Plasmide
Tabelle 3:	Lösungen und Puffer
Tabelle 4:	PCR Ansatz
Tabelle 5:	PCR Temperaturprogramm
Tabelle 6:	Ansatz für SDS-Polyacrylamidgele
Tabelle 7:	Ansatz für 5 Schalen Agarose-Medium-Gelmatrix
Tabelle 8:	Ansatz für einen Proteinase K-Verdau
Tabelle 9:	Ansatz für die Light Cyclers PCR
Tabelle 10:	Light Cyclers PCR Temperaturprogramm
Tabelle 11:	Herleitung des Faktors zur Bestimmung der genomischen Partikel pro Frier-Tau-Überstand
Tabelle 12:	Herleitung des Transduktionsvolumens pro Frier-Tau-Überstand [μ l]
Tabelle 13:	Durchschnittliche Vektorausbeute der Zellklone 1, 7 und 10

Zusammenfassung

In der Produktion von Adeno-assoziierten Virus (AAV) Vektoren (rAAV) mittels Sf9-Insektenzell basierten Produktionssystemen (OneBac) können hohe rAAV-Ausbeuten erzielt werden, jedoch schwankt die Transduktionseffizienz je nach rAAV-Serotyp. Besonders gering zeigte sich die Infektiosität von rAAV5. Zudem fiel im Rahmen der OneBac-Publikation eine gegenüber Vergleichsvektoren aus HEK 293-Zellen gesteigerte rAAV Fremd-DNA-Verpackung auf. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Herstellung stabiler Sf9-Zelllinien zur Produktion transduktionsoptimierter rAAV5 auf Basis eines erhöhten VP1-Anteils im rAAV5 Kapsid. Im Verlauf der Arbeit wurde die erhöhte Verpackung von Fremd-DNA auf die Rep-Bindestelle (RBE) der AAV-Replikationsgene (*rep*) und AAV-Kapsidgene (*cap*) beinhaltenden pIR-Plasmide zurückgeführt, sodass die weitere Zielsetzung in der Herstellung ebenfalls optimierter rAAV5 trotz RBE-Deletion bestand. Durch Klonierung eines artifiziellen Introns mit zusätzlichem Polyhedrin-Promoter konnte ein neuartiges pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺-Plasmid erstellt werden, welches mit pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE⁺ in Sf9-Zellen kotransfiziert wurde. Im Verlauf wurde RBE aus den pIR-Cap und pIR-Rep-Plasmiden deletiert und diese ebenfalls in Sf9-Zellen kotransfiziert. Nach Anzucht unter Blasticidin-Selektion, Ernte und Aufbereitung der rAAV5 wurden diese auf Expression der Kapsid- und Replikationsproteine mittels Western Blot, auf Vektorausbeute pro Sf9-Zelle mittels quantitativer PCR und auf Infektiosität mittels eines Transduktionsassays mit C12-Zellen untersucht. Der VP1-Anteil der rAAV5-Kapside konnte gegenüber den OneBac-rAAV5 deutlich gesteigert werden. Darüber hinaus gelang es rAAV5 mit hoher Vektorausbeute und gegenüber den Vergleichs-rAAV5 (OneBac) ca. 100-fach gesteigerter Infektiosität zu generieren. Trotz RBE-Deletion konnten ebenfalls hochinfektiöse Δ RBE-rAAV5 in hohem Maßstab hergestellt werden. Eine Optimierung des VP1-Anteils ist der Schlüssel zu einer erfolgreichen Produktion hoher Mengen, transduktionsoptimierter rAAV5 im Sf9-Zellproduktionssystem (OneBac2.0). Zudem beeinflusst eine RBE-Deletion nicht die Ausbeute und Transduktionseffizienz der gewonnenen rAAV5. Im Rahmen weiterer Experimente der OneBac2.0-Publikation zeigte sich nach RBE-Deletion eine minimale rAAV5-Fremd-DNA-Verpackung. Damit stellt das OneBac2.0-System das erste Insektenzell-basierte Produktionsmodell dar, das eine Herstellung hochinfektiöser rAAV5 in großem Maßstab mit minimaler Fremd-DNA garantiert und somit eine effiziente und sichere gentherapeutische Anwendung ermöglicht.

Abstract

Production of recombinant adeno-associated virus vectors (rAAV) in Sf9-cell systems (OneBac) guarantees high levels of vectors though transduction potency varies according to rAAV-subtype. Especially rAAV5 shows low infectivity. Furthermore, rAAV produced with the OneBac-system showed enhanced encapsidation of foreign DNA compared to rAAV from HEK293-cells. Aim of this study was to boost rAAV5 infectivity with a new AAV5-capsid coding plasmid enhancing expression of VP1. Encapsidation of foreign DNA was associated to prevalence of Rep binding element (RBE) on pIR-plasmids. Thus, we aimed to generate rAAV5 in large numbers with high infectivity despite deletion of RBE. The use of an artificial intron containing an additional polyhedrin promoter enabled cloning of a new pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺ plasmid which was cotransfected with pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE⁺ in Sf9-cells. In the course of the study RBE was deleted from pIR-Cap and pIR-Rep-plasmids and cotransfected in Sf9-cells, too. After blasticidin-controlled growth, harvest and preparation rAAV5 were analyzed by western blot analysis for expression of replication and capsid proteins, by quantitative PCR for vector generation per sf9 cell and by transduction assay for infectivity. In comparison to OneBac-rAAV5 VP1-levels of the novel rAAV5 capsids were significantly higher and infectivity could be boosted up to a 100-fold increase. Despite RBE-deletion Δ RBE-rAAV5 were generated in large numbers and showed high infectivity. Optimization of VP1-levels is the key to a production of highly infectious rAAV5 and deletion of RBE enables minimal encapsidation of foreign DNA as showed in further analysis (OneBac2.0-publication). OneBac2.0 is the first insect cell-based production system that guarantees high levels of highly infectious rAAV5 for efficient and safe clinical appliance.

1. Einleitung

1.1 Adeno-assoziierte Viren und ihre Verwendung als gentherapeutische Vektoren

1.1.1 AAV-Wildtyp

Adeno-assoziierte Viren (AAV) gehören zur Familie der Parvoviren. Parvoviren sind kleine DNA-Viren mit ca. 25 nm großen Virionen.^{1,2} Es handelt sich somit um unbehüllte Viren, die erstmals 1965 von Atchinson et al. in elektronenmikroskopischen Bildern von Adenovirus-Präparationen aus Nierenzellkulturen von Rhesusaffen beschrieben wurden.³ Innerhalb der Familie der Parvoviren gehören AAV zu den Dependoviren, da sie replikationsdefekt sind und nur in Anwesenheit eines Helfervirus replizieren.² Als Helferviren fungieren beispielsweise (bspw.) Adeno- oder Herpesviren.^{3,4} Ohne das Vorliegen eines Helfervirus persistiert AAV episomal oder integriert in das Genom des Wirtes.⁵ Zum aktuellen Zeitpunkt sind 12 AAV-Serotypen bekannt.⁶ Hiervon konnten die Serotypen 2, 3, 5 und 6 aus menschlichem Gewebe isoliert werden.⁷⁻⁹ Die Serotypen 1, 4, 7, 8, 9, 10 und 11 wurden aus Gewebeproben von Primaten teils im Zusammenhang einer adenoviralen Koinfektion gewonnen.⁹⁻¹¹ In 80% gesunder Probanden können Antikörper gegen AAV 1 bis 3 und AAV5 nachgewiesen werden.^{12,13} Hierbei liegt die Prävalenz von Immunglobulin G (IgG)-Antikörpern bei ca. 70% für AAV1 und 2 und bei 40% für AAV5.¹⁴ Aktuelle Erkenntnisse zeigen ein mittels spezifischer PCR detektiertes Vorkommen von AAV von 34% in gesunden Blutspendern. Hierbei wurde AAV2 zu 77% und AAV5 zu 19% nachgewiesen. In dieser Studie waren immunsupprimierten Patienten zu 76% AAV-positiv, sodass geschlossen wurde, dass Immunsuppression die AAV-Replikation einhergehend mit der Reaktivierung humaner Herpesviren verstärkt. Des Weiteren konnten mittels Zelltrennung CD3⁺ T-Lymphozyten als Orte der AAV-Persistenz nachgewiesen werden.¹⁵ AAV werden heutzutage überwiegend als apathogene Viren angesehen, jedoch konnte zuletzt durch Nault et al. eine Assoziation zwischen AAV2 und dem Auftreten von hepatozellulären Karzinomen festgestellt werden.^{15,16}

1.1.1.1 Genom von AAV

Im Laufe der Charakterisierung der AAV wurde AAV2 am intensivsten untersucht. Deshalb wird das AAV2-Genom als Prototyp im Folgenden beispielhaft vorgestellt.

AAV2 hat ein ca. 4,7 Kilobasen (kb) langes Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure-Genom (ssDNA), welches an beiden Enden durch „inverted-terminal repeats“ (ITR) abgeschlossen wird.^{9,17} Bei diesen handelt es sich um 145 Basen enthaltende, T-förmig aufgebaute Haarnadelstrukturen, welche die für die Replikation und Virusverpackung (Assembly) notwendigen cis-Elemente enthalten (s. Abbildung 1).⁹ Die außen anliegenden 125 Basen der palindromischen ITR-Sequenz können als Basenpaare (bp) vorliegen und so einen DNA-Doppelstrang formen. Zwei interne Palindrome der ITR-Sequenz bedingen die typische T-Form.¹⁸ Des Weiteren beinhalten die ITRs jeweils eine Rep-Bindestelle (Rep binding element, RBE) und eine Terminal resolution site (TRS). Die Rep-Bindestelle wird im Laufe der Replikation durch die Replikationsproteine 78 und 68 als Interaktionspunkt genutzt, um an der TRS einen Einzelstrangsschnitt durchzuführen, der die Haarnadelstruktur der ITRs öffnet (s. 1.1.1.3).¹⁸

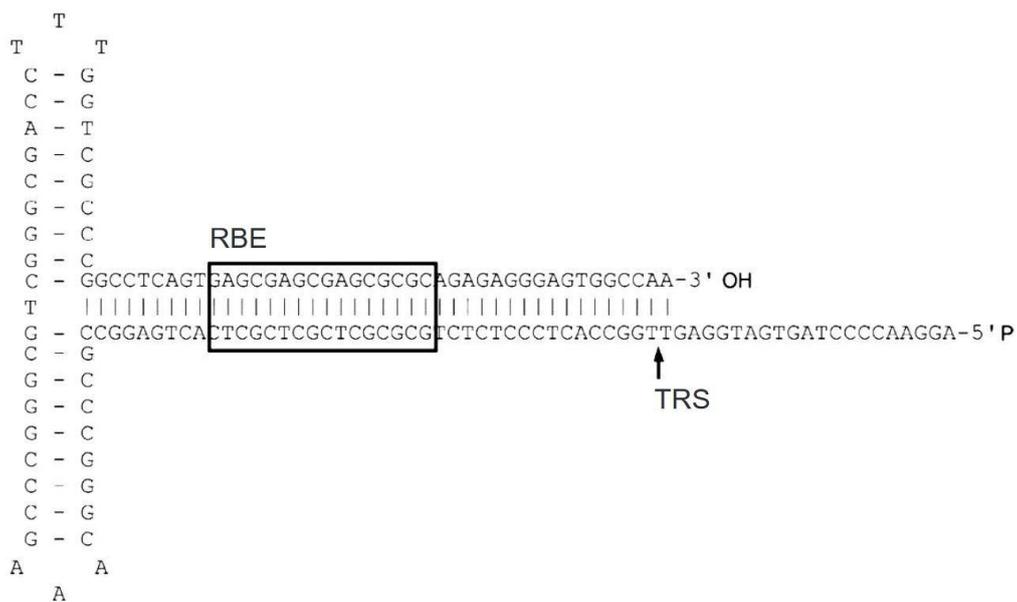


Abbildung 1: **AAV2-ITR Sekundärstruktur.** Die Inverted-terminal repeats (ITR) umfassen 145 Basen in einer T-förmig aufgebauten Haarnadelstruktur. Die Rep-Bindestelle (RBE) dient der Bindung von Rep78/68 während der Replikation, um an der Terminal resolution site (TRS) eine Endonukleation durchführen zu können. Modifiziert nach Goncalves 2005.¹⁹

Zwischen den ITRs befinden sich u.a. (unter anderem) das Replikations- (*rep*) und das Kapsidgen (*cap*). Das Replikationsgen kodiert für 4 Replikationsproteine (Rep), während das Kapsidgen für 3 virale Proteine (VP) und AAP kodiert.

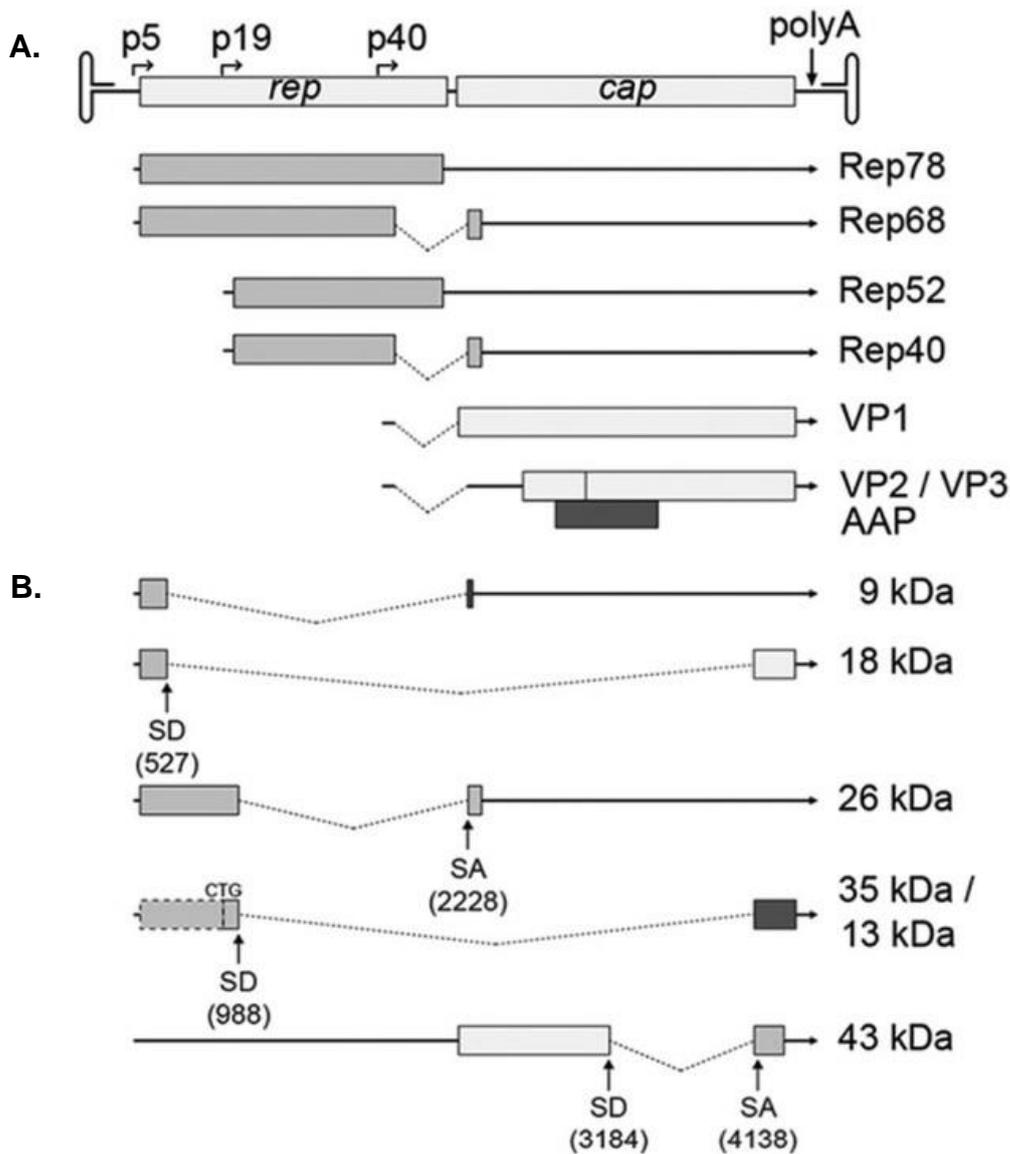


Abbildung 2: **AAV2-Genom nach Stutika et al.²⁰** (A) Dargestellt sind *rep*- und *cap*-Sequenzen von AAV2, die vier Rep-Proteine (Rep78, 68, 52, 40), die drei Cap-Proteine (VP1, 2, 3) und der AAP-Leserahmen (Assembly activating protein). Die schmalen Linien stellen die Primärtranskripte und die gezackten Linien die Intronsequenzen dar, die ausgespleißt werden. Die Pfeile (P) zeigen die drei Promotoren (p5, 19, 40) an. Stromabwärts vom *cap*-ORF befindet sich ein Polyadenylierungssignal (PolyA). Beidseitig abgeschlossen wird das AAV2-Genom durch die ITRs. (B) Durch Stutika et al. konnten 2016 weitere Spleißvarianten identifiziert werden, deren Größe in kDa angegeben ist. SD = Splice-Donorsite, SA = Splice-Acceptorsite.

Die Namensgebung der 4 Replikationsproteine erfolgte hierbei gemäß ihrer molaren Masse in kilo Dalton (kDa): Rep78, 68, 52 und 40.^{17,21} Die Expression von Rep78 und Rep68 wird vom p5-Promoter und die Expression von Rep52 und Rep40 vom p19-Promoter reguliert. Die prä-mRNA von Rep78 und Rep50 enthält jeweils ein Intron, welches am C-terminal kodierenden Bereich lokalisiert ist. In der Regel wird

die gemeinsame prä-RNA nicht gespleißt, sodass Rep78 und Rep50 gebildet werden. Seltener kommt es zum Spleißen und zur Bildung von Rep68 und Rep40.^{2,22} Zwar steigt der Spleißanteil gegen Ende der Replikation an, jedoch scheint insgesamt der Großteil der p5 und p19-Transkripte nicht gespleißt zu werden. Interessanterweise werden 90% der p40-Transkripte während der Replikation gespleißt.²³ Während Rep78 und 68 u.a. die virale Replikation, die spezifisch-lokalisierte Integration ins Wirtsgenom und die Regulation zellulärer und viraler Promoter steuern, scheinen die kleineren Rep52 und 40 für die Akkumulation und Verpackung einzelsträngiger Genome notwendig zu sein.⁹ Die Transkription von *cap* und folglich die Expression der viralen Proteinen 1-3 wird durch den p40 Promoter gesteuert.²² Hierbei ermöglichen zwei unterschiedliche „splice acceptor sites“ die Bildung von zwei Transkripten. Das längere Transkript („minor splice acceptor site“) beginnt mit einem ATG-Startcodon und kodiert VP1.²⁴ Deutlich häufiger entsteht das kürzere Transkript („major splice acceptor site“), welches VP2 und 3 kodiert. Hierbei wird für VP2 ein alternatives ACG-Startcodon verwendet. Für VP3 liegt ein häufiger initiiertes ATG-Startcodon vor.^{19,24,25} In der Nähe der *cap*-ORF flankierenden ITR befindet sich ein von allen Transkripten genutztes Polyadenylierungssignal.¹⁷ Ein weiteres Gen, das im *cap*-ORF lokalisiert ist, ist das sogenannte Assembly-activating protein Gen (AAP-Gen). AAP ist für das AAV-Kapsid-Assembly notwendig, da ohne AAP VP1 – 3 rasch proteosomal degradieren.²⁶ Lediglich bei AAV4 und 5 scheint ein Kapsidassemble in Abwesenheit von AAP, wenngleich auf niedrigem Niveau, möglich.²⁶ Neuere RNA-Sequenzierungs-Untersuchungen zeigen weitere Spleißvarianten, u.a. ein Rep-VP-Fusionsprotein, welches eine Rolle bei der frühen AAV-Genexpression spielen könnte.²⁰

1.1.1.2 Kapsid von AAV

Das AAV-Kapsid ist ikosaedrisch aufgebaut und setzt sich aus den drei viralen Proteinen (VP) VP1, VP2 und VP3 zusammen. Diese liegen quantitativ im Verhältnis 1:1:10 zueinander.⁹ 60 Proteine (Kapsomere) bilden das Kapsid, welches über Interaktionen mit Zellmembranstrukturen die Aufnahme von AAV in die Wirtszelle ermöglicht.²⁷ Der Zelltropismus und die damit verbundene Effizienz der gewebespezifischen Transduktion unterscheiden sich zwischen den einzelnen AAV-Serotypen. Dies wird über eine individuelle Beschaffenheit der Serotyp-spezifischen Kapside vermittelt.^{2,6}

Die Übereinstimmung der in den Kapsiden enthaltenen Aminosäuren liegt zwischen den Serotypen bei rund 40%, wobei AAV4 und 5 die höchste Abweichung aufweisen. Die höchste Aminosäuren-Varianz zeigt sich an der für die Zellinteraktion zuständigen Kapsidoberfläche der verschiedenen Serotypen.² Neutralisierende Antikörper gegen AAV-Kapside, die in der menschlichen Population eine hohe Prävalenz zeigen (s. 1.1.1), können Kreuzreaktionen zwischen den Kapsiden der Serotypen zeigen.⁹ Allerdings scheint eine gewisse Epitopvarianz vorzuliegen, da bspw. neutralisierende Antikörper gegen AAV2-Vektoren keine Wirkung gegen AAV5-Vektoren aufweisen.²⁸ Den drei viralen Proteinen werden unterschiedliche Funktionen zugeschrieben. Aufgrund eines einzigartigen, im Kapsidinneren lokalisierten N-Terminus, der eine Phospholipase-Domäne und weitere essentielle Sequenzen enthält, scheint VP1 für das Verlassen der Endosome sowie das virale Eindringen in den Zellkern zuständig zu sein.²⁹⁻³² Hierbei scheint die Aktivität der Phospholipase A2 (PLA2) von pH-Wert und Temperatur abhängig zu sein (s. 1.1.1.3).^{33,34} Auch VP2 verfügt über einen im Kapsidinneren lokalisierten N-Terminus.³⁵ Dennoch ist die Rolle von VP2 zurzeit noch unklar, da weder das Virusassembly noch die Transduktionseffizienz bei Änderung der VP2-Sequenz durch Insertionen entscheidend beeinflusst wird.³⁶ Aufgrund des quantitativen Verhältnisses der viralen Proteine stellt VP3 den Großteil des Kapsids dar und beeinflusst so Zelltropismus und Antigenität der AAV.

1.1.1.3 Lebenszyklus von AAV

Der Anstieg der Prävalenz von neutralisierenden Anti-AAV-Antikörpern in der Kindheit könnte auf eine respiratorische Transmission durch AAV analog zu Adenoviren hinweisen.^{13,15} Auch eine sexuelle Transmission durch AAV scheint möglich.^{15,37} Für die Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Wirtszelle scheint der VP3-Anteil des Kapsids entscheidend zu sein. Hierbei interagieren die Kapside der verschiedenen Serotypen mit unterschiedlichen Glykanen (Polysaccharide) der Zelle.³⁸ Dabei erfolgt die Bindung vornehmlich an Sialinsäuren und Heparansulfate.³⁹ Für die endosomale Zellaufnahme sind Serotyp-spezifische Kofaktoren nötig z.B. für AAV2 u.a. der Hepatozyten growth factor Rezeptor (HGFR), der Fibroblast growth factor Rezeptor 1 (FGFR-1) und der Laminin Rezeptor.⁴⁰ Bei sinkendem pH-Wert wird VP1 an der Kapsidoberfläche exponiert, sodass über die Phospholipase A₂ Phospholipide der Endosomenmembran hydrolytisch gespalten werden und die Viren

in das Zytoplasma freigesetzt werden.^{33,41} Die nukleäre Aufnahme scheint über spezifische Regionen des N-Terminus von VP1 und möglicherweise VP2 vermittelt zu werden.⁴² Die AAV-DNA persistiert nach Freisetzung aus dem Kapsid im Zellkern (Uncoating) episomal oder kann in das Wirtsgenom integrieren.^{2,43} Bei AAV2 erfolgt die Integration in das Chromosom 19.⁴⁴ Die Integrationsstelle wird als AAVS1 bezeichnet und besteht aus einer 33 bp umfassenden, der Rep-Bindestelle ähnlichen Sequenz.^{19,45} Bedeutend für eine spezifische virale Integration scheinen der p5-Promoter und die *rep*-Gene zu sein.⁴⁶ In der Latenzphase werden durch die Rep-Proteine 78 und 68 in Interaktion mit der Rep-Bindestelle die AAV-Promotoren vor allem (v.a.) der p5-Promoter reprimiert.⁴⁷ Bei Koinfektion mit einem Helfervirus, wie z.B. dem Adenovirus, setzt die AAV-Replikation und damit perspektivisch die Zelllyse ein.⁴⁰ Auch bei UV-vermitteltem oder toxischem Einfluss auf die Wirts-DNA kann es in kleinerem Umfang zur AAV-Replikation kommen.¹⁹ Die ITRs dienen hierbei als Replikationsstartpunkt (Origin of replication, ORI) (s. 1.1.1.4). Durch die Expression der frühen adenoviralen Gene, u.a. das E1a-Gen, wird der p5-Promoter aktiviert.⁴⁸ Konsekutiv werden die Transkripte des p5 und p19- Promoters amplifiziert. Durch die hochamplifizierten Rep78 und 68 kommt es zur intrinsischen Verstärkung der Aktivierung der p19- und p40-Promotoren und zur Reprimierung des p5-Promoters.⁴⁸ Weitere relevante adenovirale Helfergene sind E1b55K, E2a und E4orf6. Zudem verstärkt die viral-assoziierte RNA (VA-RNA) des Adenovirus die AAV-Proteinexpression.⁹ Nach Expression der AAV-Gene erfolgt die Verpackung der viralen DNA im Kapsid (Assembly) und die Freisetzung der Viren aus der Wirtszelle.¹⁹

Während AAV im Rahmen einer adenoviralen Koinfektion hochgradig repliziert, wird parallel die Replikation der adenoviralen DNA stark reprimiert. So konnte gezeigt werden, dass AAV im Gegensatz zu durch UV-Licht inaktivierte AAV und AAV-Vektoren die adenovirale DNA-Replikation inhibieren.⁴⁹ Ursächlich scheinen Interaktionen zwischen den adenoviralen Genen und v.a. Rep78 zu sein.⁵⁰ U.a. scheint das adenovirale E2a Gen reprimiert zu werden.⁴⁹ Neueste Erkenntnisse heben auch die Bedeutung einer regulatorischen Sequenz am 3'-OH-Ende der AAV-*rep*-Gene im Zusammenspiel mit dem AAV-p40-Promoters hervor.⁵¹

1.1.1.4 Replikationszyklus von AAV

Wie bereits beschrieben, kommt es unter bestimmten Umständen zur Initiation der AAV-Replikation (s. 1.1.1.3 und Abbildung 3).

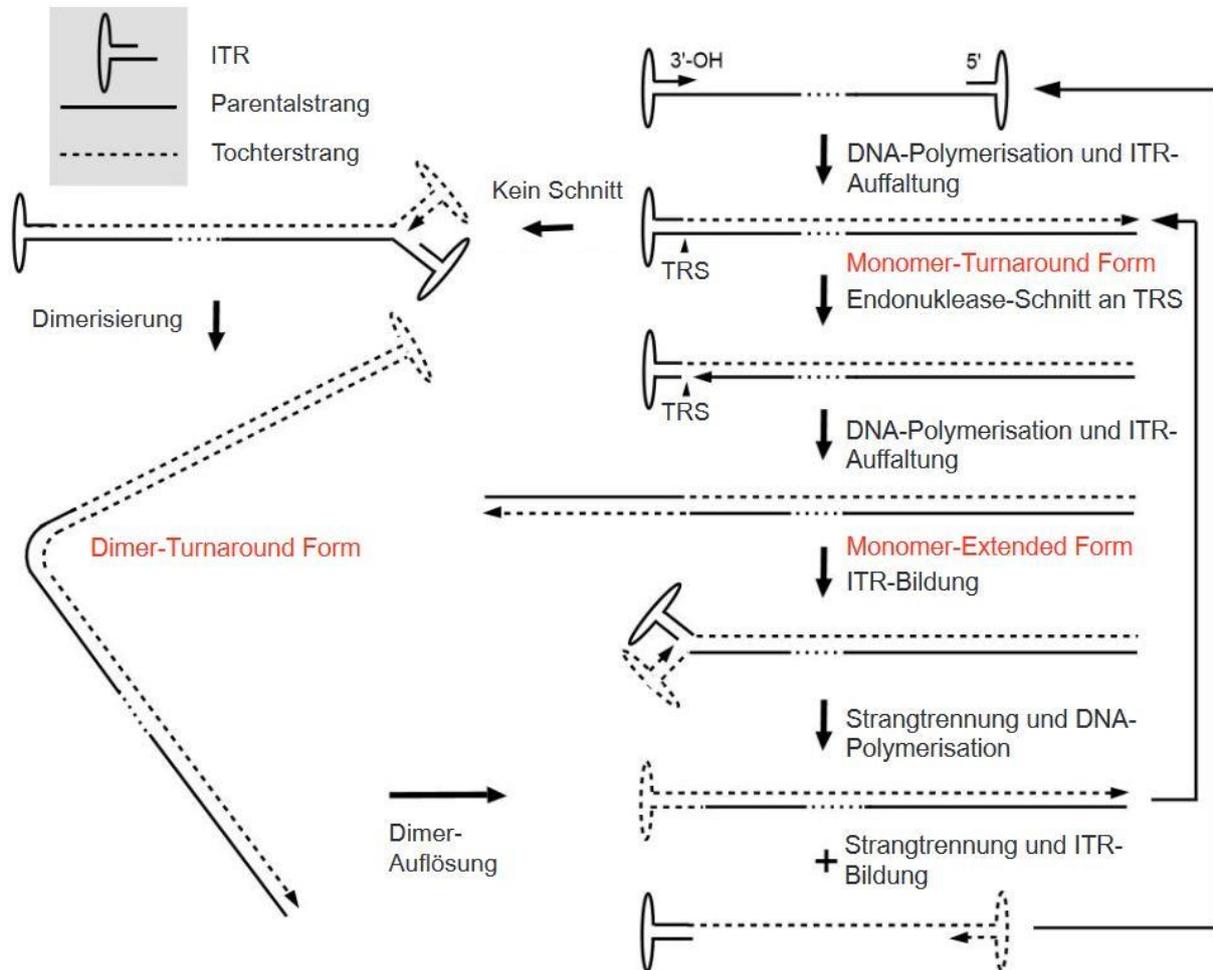


Abbildung 3: **AAV-Replikationszyklus.** Startpunkt der Replikation ist das 3'-OH-Ende einer ITR. Nach Synthese des Tochterstranges unter Auffaltung der gegenüberliegenden ITR entsteht die Monomer-Turnaround Form, die durch Rep78/68 an der TRS geschnitten wird, sodass der Rest der DNA-Sequenz synthetisiert werden kann (Monomer-Extended Form). Aus der Monomer-Extended Form entstehen unter ITR-Bildung zwei Einzelstränge. Es kommt entweder zur erneuten DNA-Polymerisation am 3'-OH-Ende der ITR oder zur Ausbildung der zweiten ITR am gegenüberliegenden Strangende und zur anschließenden Kapsidverpackung des Stranges. Erfolgt kein Schnitt an der TRS bildet sich die Dimer-Turnaround Form, die bei Endonukleation in zwei Monomere übergehen kann. Modifiziert nach Goncalves 2005.¹⁹

Die Replikation startet an einem 3'-OH-Ende einer ITR. Dieses wird von einer zellulären DNA-Polymerase als Primer genutzt.^{52,53} Im Folgenden kommt es zur Synthese des Tochterstranges und zur Auffaltung der Haarnadelstruktur der gegenüberliegenden ITR. Zu diesem Zeitpunkt weist die Sequenz einen durchgehenden Doppelstrang auf. Dieser ist an einem Ende kovalent geschlossen

und wird als Monomer-Turnaround Form bezeichnet.⁵⁴ Aufgrund einer parallelen Expression der Rep-Proteine 78 und 68 kommt es zur Interaktion mit der Rep-Bindestelle und durch die Endonuklease-Funktion von Rep78 und 68 zum Einzelstrangsschnitt an der Terminal resolution site.⁵⁵ Da so ein neues 3'-OH-Ende entstanden ist, kann dieses als zweiter Primer genutzt werden, sodass die DNA-Polymerase den Rest der DNA-Sequenz in einen Doppelstrang überführen kann.⁵⁴ In diesem Zustand wird die Sequenz als Monomer-Extended Form bezeichnet. Die ITR-Regionen von Tochterstrang und Parentalstrang können die Haarnadelstrukturen ausbilden und die Einzelstränge daraufhin in Kapside verpackt werden. Des Weiteren können die Einzelstränge aus der Monomer-Extended Form durch erneute DNA-Polymerisation ausgehend vom 3'OH-Ende einer neu gefalteten ITR in die Monomer-Turnaround Form übergehen.¹⁹ Schließlich kommt bei ausbleibendem Schnitt an der Terminal resolution site durch fortlaufende DNA-Synthese eine Dimer-Turnaround Form vor, welche 2 Genome und eine intrinsische ITR enthält. Aus dieser können durch die Endonuklease-Funktion von Rep78 und 68 erneut zwei Monomere entstehen.¹⁹

1.1.1.5 AAV-Serotyp 5

AAV5 wurde erstmals 1984 von Bantel-Schaal und zur Hausen beschrieben. Das Material eines menschlichen Kondyloms wurde in eine humane Fibroblastenkultur inokuliert. Unter Adenovirus Typ 12 Koinfektion konnte ein neuartiger AAV gewonnen werden, der anschließend als AAV5 bezeichnet wurde.⁷ Im Gegensatz zu anderen AAV-Serotypen, bei denen eine positive Serokonversion (Nachweis von IgG) im Kindesalter nachgewiesen werden kann, scheint die AAV5-Serokonversion zwischen dem 15. und 20. Lebensjahr analog zur HSV-Serokonversion stattzufinden.⁵⁶ Somit liegt die Vermutung nahe, dass HSV als natürlicher Helfervirus von AAV5 fungiert.⁵⁷ Im Vergleich zu anderen Serotypen zeigt AAV5 mit über 60% die höchste Aminosäurevarianz des Kapsids.⁵⁸ Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass das AAV5-Kapsid im Vergleich mit Kapsiden anderer Serotypen einzigartige variable Regionen (VR) der Kapsidoberfläche aufweist.⁵⁹ Hierbei wurden die VRII und VRIX identifiziert. Diese scheinen im Rahmen der Transduktionseffizienz und antigenetischen Eigenschaften der AAV relevant zu sein und könnten bspw. zur Erklärung unterschiedlicher Zelltropismen und fehlenden Kreuzreaktionen von neutralisierenden IgG zwischen AAV2 und AAV5 beitragen (s.

1.1.1.2). Darüber hinaus scheint das AAV5-Kapsid eine kürzere HI-Schleife aufzuweisen, welche sich so von der in allen anderen Serotypen gleich ausgeprägten HI-Schleife unterscheidet.⁵⁹ Die an der Zelloberfläche lokalisierte HI-Schleife wiederum scheint eine wichtige Rolle beim Kapsid-Assembly und bei der Genomverpackung der AAV zu spielen.³⁴ Wie bei den meisten Serotypen, erfolgt auch bei AAV5 eine Glykan-vermittelte Zellaufnahme (s. 1.1.1.3). AAV5 bindet hierbei an zelluläre N-glykosylierte Sialinsäuren (α 2-3 und α 2-6 N-linked sialic acid).^{38,39} Als Korezeptor der Internalisierung fungiert bei AAV5 der Platelet-derived growth factor Rezeptor.⁶⁰ Zelltropismen von AAV5 sind für Lunge, Leber und Epithel der Retina beschrieben.⁶¹⁻⁶³ Aufgrund dieser Bandbreite an möglichen Zielstrukturen bietet AAV5 als Vektor eine Diversität an gentherapeutischer Verwendung (s. 1.1.2).

1.1.2 AAV als gentherapeutischer Vektor

Die ersten AAV-Vektoren wurden in den 1980er Jahren erfolgreich im Zellmodell erprobt. Seitdem wurde die Gentherapie mit AAV-Vektoren stetig weiterentwickelt und weist viele Vorteile auf. Aufgrund des unterschiedlichen Zelltropismus der einzelnen AAV-Serotypen bietet der Einsatz von rekombinanten Adeno-assoziierten viralen Vektoren (rAAV) viele Möglichkeiten (s.u.). Des Weiteren ermöglicht die individuelle Beschaffenheit der Kapsidoberflächen der verschiedenen Serotypen einen Schutz vor Markierung und anschließender Degradation durch die am weitesten verbreiteten Anti-AAV2-IgG-Antikörper. Wie beschrieben ist der AAV-Wildtyp weitgehend apathogen, was AAV-Vektoren für einen sicheren Einsatz am Menschen prädestiniert. Da den rAAV im Gegensatz zum Wildtyp-Virus die Rep-Proteine und der p5-Promoter fehlen, liegt der Großteil der Vektor-DNA episomal vor, auch wenn ein sehr geringer Anteil spontan und zufällig zu integrieren scheint.^{9,46} Dies bedingt eine ebenfalls geringe Kanzerogenese-Wahrscheinlichkeit.⁶⁴ AAV-Vektoren vom Typ 1, 2, 5, 8 und 9 wurden bereits sicher am Menschen in klinischen Phase I/II Studien getestet.⁶⁴ Weiterhin sind rAAV physikochemisch stabil und können unproblematisch aufgereinigt werden.⁶⁵ Da ausschließlich ruhende Zellen von AAV infiziert werden, resultiert eine langanhaltende und stabile Genexpression.⁶⁶ Rekombinante AAVs beinhalten im Gegensatz zu den Wildtyp-Viren nicht den *rep*- und *cap*-ORF. Zwischen den für die Replikation und DNA-Verpackung essentiellen viralen ITRs befindet sich stattdessen ein beliebiges Gen. Allerdings darf dieses nicht größer als 4,5 kb sein, was jedoch für viele cDNA-Sequenzen (komplementäre DNA,

gewonnen aus mRNA durch reverse Transkription) ausreicht. Da den Vektoren *rep* und *cap* fehlen, werden zur rAAV-Herstellung diese bspw. in Form von Plasmiden bereitgestellt, die in verschiedene Zellsysteme (s. 1.2) transfiziert werden. Hierbei enthalten die Plasmide Adenovirus-Helfergene und die AAV-Gene *rep* und *cap* (s. 1.2.2). Um die Anwendungsmöglichkeiten der AAV-Vektoren zu erweitern, können AAV2-ITRs und *rep*-Gene mit dem *cap*-ORF anderer Serotypen kombiniert (Pseudotypisierung) und Modifikationen durch zielgerichtete Mutagenese des *cap*-ORF an den Kapsiden vorgenommen werden.⁶⁷ Anwendungsfelder bieten AAV-Vektoren zurzeit in verschiedenen Bereichen. So gelang 2011 ein Durchbruch in der Therapie der Hämophilie B. Durch eine einzige Infusion einer rAAV-Lösung mit AAV8-pseudotypisierten-AAV2-Vektoren konnten die Faktor IX Werte von einigen Patienten der Studie soweit angehoben werden, dass die regelmäßige, prophylaktische Faktorexposition beendet werden konnte.⁶⁸ Des Weiteren stand eine zugelassene, wenngleich wenig verwendete Behandlung mit AAV1-Vektoren für Patienten mit familiärer Lipoproteinlipase-Defizienz zur Verfügung.⁶⁹ Auch für die Leber'sche kongenitale Amaurose wurde eine erfolgreiche Gentherapie mit Hilfe einer einmaligen subretinalen Injektion eines AAV2-Vektors etabliert, die eine langfristig stabile Visusverbesserung der Patienten zeigte.⁷⁰

Vielversprechende weitere klinische und tierexperimentelle Versuche, könnten in der Zukunft die Therapien u.a. neuromuskulärer Erkrankungen wie Muskeldystrophie Duchenne, cystische Fibrose sowie Stoffwechselkrankheiten wie Morbus Pompe grundlegend verändern.⁷¹⁻⁷³ Wie bereits beschrieben, weisen AAV5-Vektoren einen Tropismus für Lunge, Leber und Epithel der Retina auf. Die Verpackungsgröße von AAV2 und AAV5 scheint vergleichbar und ermöglicht somit die Verpackung entsprechender Gene.⁵⁹ So konnte gezeigt werden, dass durch Verabreichung eines AAV5-Vektors mit dem Gen eines regulatorischen Proteins (Smad7) bei kornealer Vernarbung beim Hasen mit TGF- β -Mangel, z.B. in Folge von Trauma oder Infektion des Auges, eine korneale Vernarbung verhindert werden kann.⁷⁴ Des Weiteren zeigen rAAV5 eine höhere Transduktionseffizienz von verletztem murinem Rückenmark als rAAV2.⁷⁵ Schließlich weisen AAV5-Vektoren im Vergleich zu AAV2-Vektoren eine divergente Kapsidoberfläche und damit einen anderen Zelltropismus und eine andere Antigenität auf (s. 1.1.1.5).

1.2 Herstellung von AAV-Vektoren

1.2.1 Herstellung von AAV-Vektoren in Säugerzellen

Der Ursprung der Herstellung von AAV-Vektoren liegt in Säugerzellen, wobei besonders die adhären kultivierten HeLa-Zellen und HEK 293-Zellen genutzt werden (s. 2.2.3.2 und 2.2.3.3). Wie schon beschrieben bedarf es für die Vektorproduktion dreier integraler Bestandteile: 1. ein *rep* und *cap* tragendes Plasmid, 2. ein Plasmid mit von AAV-ITRs flankiertem Transgen sowie 3. ein Plasmid mit Helfervirusgenen, die die AAV Replikation steuern (s. 1.1.1.3). Als Helferviren können z.B. Adeno- oder auch Herpes simplex Viren fungieren. Bei Adenoviren wurden E1A, E1B55K, E2A und E4ORF6 sowie die viral-assoziierte RNA (VA-RNA) als Helfergene identifiziert.⁹ Helferfunktionen können ebenfalls durch HSV-1 Replikationsproteine, wie den Helikase/Primase-Komplex (kodiert durch die UL5, UL8 und UL52-Gene), übernommen werden.⁹ Allerdings zeigte sich die Produktionsausbeute von Vektoren auf Basis dreier transfizierter Plasmide nicht zufriedenstellend.

Nach heutiger Ansicht stellt das Produktionsmodell von Grimm et al. 1998 den bis dato entscheidenden Durchbruch hinsichtlich Vektorausbeute dar. Das auf HEK-293-Zellen beruhende Modell, in dem zwei Plasmide kotransfiziert werden, wird bis heute als Goldstandardverfahren in der AAV-Vektorproduktion angesehen. Genutzt wurde ein neuartiges Plasmid, pDG, welches *rep* und *cap* sowie die adenoviralen Helfergene E2A, E4 und VA enthält. HEK-293-Zellen (s. 2.2.3.3) wurden mit pDG und einem weiteren Plasmid, welches das von den ITRs flankierte Transgen enthält, transfiziert. Durch die Kotransfektion von Transgen und adenoviralen Helfergenen konnte eine effektive Vektorproduktion erzielt werden.⁷⁶ Nachteil der Produktion von rAAV in Säugerzellen ist v.a. deren adhären Wachstum, was eine Skalierung der AAV-Vektorproduktion für die klinische Anwendung limitiert. So sind bis zu 10^{15} rAAV pro Patient für die systemische Applikation beim Mensch nötig.⁷⁷ Lösungsansätze bieten hier modifizierte Säugerzellsysteme, die in Suspension kultiviert werden können oder die im Folgenden beschriebene Produktion von rAAV in Insektenzellen.^{66,77}

1.2.2 Herstellung von AAV-Vektoren in Insektenzellen

Insektenzellensysteme zur Produktion von rekombinanten Proteinen bieten entscheidende Vorteile. Die Inkubation kann gegenüber Säugerzellensystemen energiesparend bei niedrigen Temperaturen erfolgen. Zudem wird keine Zufuhr von

CO₂ benötigt. Für die klinische Anwendung müssen AAV-Vektoren ohne den Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) produziert werden, da u.a. ein Kontaminationsrisiko des FCS durch Mykoplasmen droht. Ein grundsätzlicher Vorteil der Insektenzellen besteht darin, dass diese auch FCS-frei kultiviert werden können. Insgesamt können so kostengünstig große Mengen an rekombinanten Proteinen produziert werden. Für die Herstellung von rAAV in Insektenzellen werden rekombinante Baculoviren als Helferviren genutzt. Bei rekombinanten Baculoviren handelt es sich u.a. um Derivate des *Autographa californica nuclear polyhedrosis Virus*, das hauptsächlich Mottenlarven infiziert. Die Virionen des *Autographa californica nuclear polyhedrosis Virus* kommen in zwei Zuständen vor - als Occlusion Derived Virus (ODV), der für die initiale Infektion des Wirtes essentiell ist, und als Budding Virus (BV), der bei Zellyse freigesetzt wird und die weitere Infektion innerhalb des Wirtes vermittelt.⁷⁸ Aus den ODV können sich größere Okklusionskörper (OB) bilden, die mit vielen Partikeln gefüllt sind und hauptsächlich aus Polyhedrin-Proteinen bestehen.⁷⁹ Die beiden Formen unterscheiden sich in ihrer Lipidhülle. Die BV-Hülle entstammt der Zellmembran und die ODV-Hülle der Kernmembran lysierter Zellen.⁷⁸ Die Genomgröße innerhalb der Baculovirus-Gruppe ist divers und kann zwischen 80 bis 180 kb liegen. Dabei enthält die zirkuläre, doppelsträngige Supercoiled-DNA zwischen 90 bis 180 Gene.^{79,80} 1970 gelang es erstmals Baculoviren in Insektenzelllinien zu vermehren.⁸¹ Diese stammen von Ovarialzellen des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* (Sf9-Zellen) und können ohne CO₂ und in FCS-freiem Medium sowohl adhärent als auch mit hoher Zelldichte in Suspension gezüchtet werden. Zusammengefasst bietet das Baculovirus-Insektenzellsystem neben der Kultivierung der Zellen in Suspension eine hohe Ausbeute an rekombinanten Proteinen und posttranskriptionellen Modifikationen, die denen in Säugetierzellen zu einem Großteil entsprechen.⁶⁶

1.2.2.1 Entwicklung des Baculovirus-Insektenzellsystems zur rAAV-Produktion

2002 gelang es Urabe et al. erstmals signifikante Ausbeuten an rAAV2 aus Sf9-Zellen zu gewinnen, die mit drei rekombinanten Baculoviren infiziert worden waren. Hierbei wurde je ein Baculovirus für AAV *rep* (kodierend für Rep 78 und 52), für AAV *cap* (kodierend für VP1-3) sowie für ein ITR-flankiertes Transgen benötigt.⁷⁷ Als problematisch erwies sich die Stabilität der verwendeten Baculoviren, da sich die Genexpression über mehrere Passagen kontinuierlich verringerte.⁸² Ursächlich war

eine abnehmende Rep78- und Rep52-Expression, die sich durch eine Duplikation der *rep* kodierenden Sequenzen innerhalb des *rep* tragenden Baculovirus-Genom erklären ließ. Innerhalb des *rep* tragenden Baculovirus-Genom lag je eine Sequenz für die Expression von Rep78 und Rep52 vor. Smith et al. konnten das System 2009 vereinfachen und bezüglich der Vektorausbeute verbessern, indem ein Baculovirus erstellt wurde, das sowohl modifizierte *rep*- als auch *cap*-Gene beinhaltete.⁸³ Durch die Modifikation von *rep*, wobei nun Rep78 und Rep52 von einer gemeinsamen mRNA translatiert wurden, konnte eine stabile Rep und VP-Expression über 8 Passagen erzielt werden.⁸³

1.2.2.2 Das OneBac-System nach Aslanidi und Mietzsch

Eine alternative Methode der Baculovirus-basierten Produktion von rAAV in Insektenzellen wurde von Aslanidi et al. 2009 beschrieben. Hierbei wurden zunächst stabile Sf9-Zelllinien mit Plasmiden für *rep* und *cap* generiert. Nur bei Infektion mit einem die AAV-ITRs und das Transgen tragendem Baculovirus (Bac-GOI, Gene of interest), kam es daraufhin zur Bildung von rAAV2.⁸⁴ Bac-GOI enthält hierbei den immediate-early trans-regulator, dessen Genprodukt IE-1 die Transkription von *rep* und *cap* über die homologe Region 2 des Autographa Californica Nucleopolyhedrovirus aus der Baculovirus-Familie steuert (s. 1.2.2.2.4).⁸⁴ Der entscheidende Vorteil des OneBac-Modells ist, dass die Infektion der Sf9-Zellen deutlich erfolgreicher verläuft, wenn nur ein Baculovirus (Bac-GOI) verwendet wird, da in den vorherigen Modellen die Wahrscheinlichkeit einer parallelen Infektion durch 3 Baculoviren pro Sf9-Zelle bei nur 1,1% lag und somit nur geringe Mengen an Vektoren gewonnen werden konnten.⁸⁴ Die bisher etablierten rAAV-Produktionssysteme werden u.a. an der Zahl genomischer Partikel, die pro Produktionszelle gewonnen werden (Burst Size), beurteilt. Im AAV2-basierten Säugerzellensystem mit HEK-293 Zellen konnten bislang bis zu 2×10^5 genomische Partikel pro Zelle gewonnen werden.⁸⁵ Im von Urabe et al. 2002 beschriebenen AAV2-basierten Sf9-Zellsystem mit 3 Baculoviren lagen die Burst Sizes bei bis zu 5×10^4 genomische Partikel pro Zelle.⁷⁷ Aslanidi et al. konnten 2009 im AAV2-basierten OneBac-System die Vektorausbeute mit $1,4 \times 10^5$ genomische Partikel pro Zelle steigern.⁸⁴ Im weiteren Verlauf konnten 2014 durch Mietzsch et al. stabile Sf9-Zelllinien für die rAAV-Produktion der AAV-Serotypen 1-12 etabliert werden.⁶ Hierbei wurde AAV2 *cap* durch *cap* des jeweiligen Serotyps

ersetzt.⁶ Gegenüber dem HEK-293-Zellsystem konnten vergleichbare oder höhere Burst Sizes mit bis zu 5×10^5 genomische Partikel pro Zelle erreicht werden.⁶

1.2.2.2.1 OneBac: Plasmide

Für das OneBac-System werden zwei pIR-Plasmide verwendet, die stabil in Sf9-Zellen unter Blasticidin-Selektion integriert wurden. pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE⁺ enthält *rep* für die Expression von Rep78 und 52 und wurde bei der Herstellung aller Serotypen verwendet. pIR-Cap-AAV2-RBE⁺ enthält *cap* für die Expression von VP1, 2, und 3 und wurde spezifisch für die einzelnen Serotypen modifiziert, indem *cap* von AAV2 gegen *cap* des jeweiligen Serotyps getauscht wurde.

Die pIR-Plasmide enthalten neben *rep* und *cap* weitere für die AAV-Produktion unerlässliche Sequenzen. Hierbei sind die hr2-09-Sequenz (im weiteren Verlauf als hr2 bezeichnet), die Rep-Bindestelle und der Polyhedrin-Promoter hervorzuheben. Die besondere Bedeutung von hr2 zeigt sich daran, dass bei Sf9-Produktionssystemen, in denen die Transkription von *rep* und *cap* lediglich mit stromaufwärts lokalisierten baculoviralen Promotern wie z.B. dem Polyhedrin-Promoter gesteuert wird, keine suffiziente AAV-Produktion (bei baculoviraler Infektion) möglich wird. Die Polyhydringene werden in der Spätphase der baculoviralen Replikation durch Aktivierung der Polyhydrin-Promoter hyperexprimiert.⁷⁹ Folglich bedarf es zur gezielten Expression von *rep* und *cap* in einem divergenten Insektenzell-Baculovirus-Umfeld zusätzlicher spezifischer Transkriptionsaktivatoren. Im Baculovirusgenom sind 8 homologe Regionen, welche als Replikationsstartpunkte und Transkriptionsaktivatoren fungieren, bekannt.^{86,87} Hierbei wurde von Aslanidi et al. die homologe Region 2 mit einer zusätzlichen IE-1-Bindestelle modifiziert und schließlich erfolgreich genutzt.⁸⁴ Zusammenfassend kommt es bei baculoviraler Infektion durch Bindung des IE-1 Protein an hr2 zur Aktivierung der Polyhedrin-Promoter, wodurch die zielgerichtete Transkription der auf den pIR-Plasmiden stromabwärts lokalisierten *rep* und *cap* erfolgen kann.⁸⁴ Die Rep-Bindestelle (RBE) wurde entsprechend der in den AAV-ITRs vorkommenden RBE in die Plasmide kloniert. Hierbei kommt es einerseits durch Bindung von Rep78 an RBE zur p19-Promoter-Aktivierung, andererseits scheint die Rep-vermittelte Aktivierung der RBE eine Amplifikation der nachgeschalteten *rep*- und *cap*-tragenden Sequenzen und damit eine Verstärkung von deren Expression zu bewirken.⁸⁸

Durch den Einsatz von RBE konnte im OneBac-System nach Aslanidi et al. v.a. die Expression des p19-Promoters und im Folgenden die Expression von Rep52 gesteigert werden.⁸⁴ Des Weiteren weisen die pIR-Plasmide Gene für eine Ampicillin- und Blastocidinresistenz auf. Das Blastocidinresistenzgen, welches für das Selektionsverfahren transfizierter Sf9-Zellen essentiell ist, wird hierbei vom EM7 und OpIE1Promoter aktiviert (s. 2.2.3.1.5).

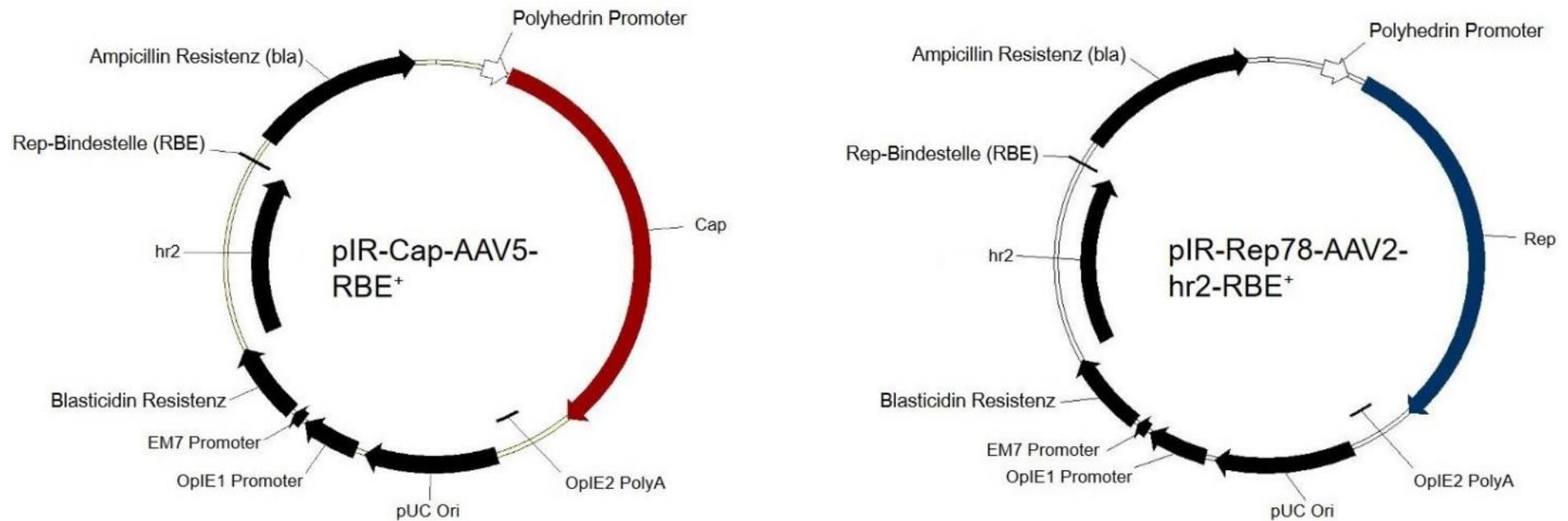


Abbildung 4: **OneBac: pIR-Plasmide.** Die pIR-Plasmide enthalten die *rep*- oder *cap*-ORFs, die durch einen vorgeschalteten Polyhedrin-Promoter gesteuert werden. Das Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) ermöglicht das Wachstum von transfizierten Sf9-Zellklonen in Ampicillin-haltigem Medium. Das Blastocidin-Resistenzgen ermöglicht die Selektion von transfizierten Sf9-Zellklonen. Die homologe Region 2 (*hr2*) in Interaktion mit dem baculoviralen Faktor IE-1 aktiviert die Polyhedrin-Promotoren und somit die *Rep*- und *Cap*-Expression. Die *Rep*-Bindestelle erhöht die Synthese der *Rep*- und *Cap*-Proteine. EM7- und OpIE1-Promoter steuern die Expression der Blastocidin Resistenz. Die pUC Ori-Sequenz fungiert als Replikationsstartpunkt (ORI, englisch origin of replication), die OpIE2 PolyA-Sequenz als Polyadenylierungssignal (PolyA).

1.2.2.2.2 OneBac: rep- und cap-Open Reading Frames (ORF)

Der *rep*-ORF enthält *rep78* und *52* und wird über den vorgeschalteten Polyhedrin-Promoter kontrolliert. Die *rep52*-Sequenz wird über den internen AAV p19-Promoter reguliert.

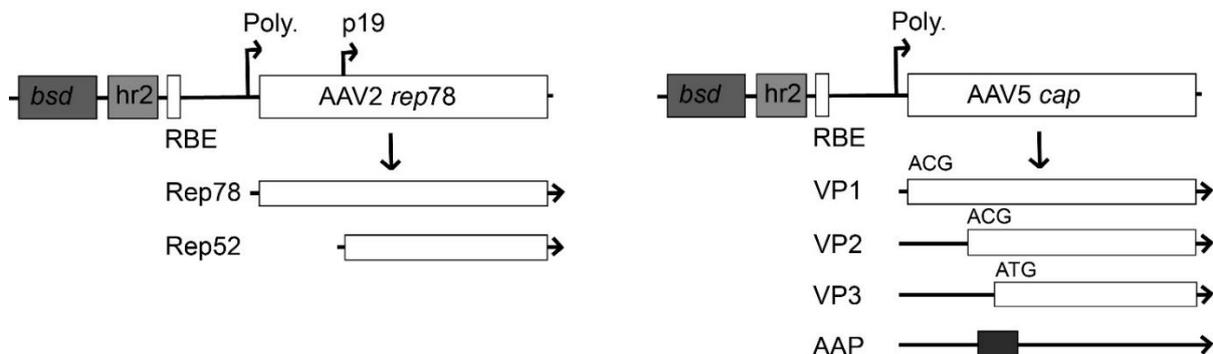


Abbildung 5: **OneBac modifiziert nach Mietzsch et al.⁶: AAV2 *rep*- und AAV5 *cap*-ORF.** Dargestellt sind die auf den pIR-Plasmiden enthaltenen Open-reading frames (ORF) der Replikations- und Kapsidgene von rAAV5 und die zwei Rep-Transkripte (Rep78, 52) sowie die drei Cap-Transkripte (VP1, 2, 3) und das AAP-Transkript. Die Startcodons von VP2 und 3 entsprechen den ursprünglichen Startcodons der Wildtypvirus-DNA, während das Startcodon von VP1 zu ACG mutiert wurde, um das quantitative Kapsidprotein-Verhältnis zu wahren. Die schmalen Linien stellen die Primärtranskripte dar. Die Pfeile (P) zeigen die Promotoren (Polyhedrin- und p19-Promoter) an. Die Polyhedrin-Promotoren steuern die Transkription der gesamten *rep*- und *cap*-Sequenz, während der p19-Promoter die Expression von Rep52 regelt. Vorgeschaltet sind den ORFs das Blastizidin-Resistenzgen (*bsd*), die *hr2*-Sequenz und die RBE-Sequenz.

Das *cap*-Gen, das für VP1, 2 und 3 kodiert, wird vom heterologen Polyhedrin-Promoter kontrolliert. VP2 und 3 besitzen hierbei das Wildtyp-Startcodon, während das Startcodon von VP1 von ATG zu dem schwachen Startcodon ACG mutiert wurde, um aufgrund des fehlenden alternativen Splicings das relative Mengenverhältnis der VP zu erhalten.⁷⁷

1.2.2.2.3 OneBac: Rekombinantes Baculovirus – Bac-rAAV-GFP

Essentiell für die Produktion von rAAV ist im Insektenzellsystem das Baculovirus. Dieses enthält einerseits das rAAV-Genom (rAAV-Kassette) inklusive der für die Replikation notwendigen ITRs und andererseits als Transgen ein unter der HCMV Enhancer und Chicken Beta Aktin (CBA) Promoterkontrolle stehendes green fluorescent Protein (GFP). Im weiteren Verlauf wird das rekombinante Baculovirus des OneBac-Systems deshalb als Bac-rAAV-GFP bezeichnet. Das Baculovirus IE-1-Gen ist, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, für die rAAV-Replikation

unerlässlich (s. 1.2.2.2.4). Neben GFP enthält die rAAV-Kassette einen Baculovirus-spezifischen p10-Promoter, der die GFP-Expression/ Transgenexpression während der Infektion von Sf9-Zellen mit Baculoviren ermöglicht.⁷⁷ Hierbei aktivieren baculovirale und zelluläre Proteine den p10-Promoter.

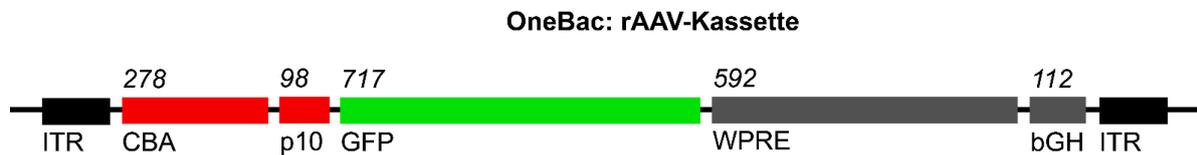


Abbildung 6: **OneBac: rAAV-Kassette**. Dargestellt ist die in den rekombinanten Baculoviren enthaltene rAAV-Kassette. Die Sequenzlänge der einzelnen regulatorischen Elemente ist über den Elementen in Basenpaaren visualisiert. Die rAAV-Kassette enthält den Chicken Beta Aktin Promoter (CBA) und den p10-Promoter, die die Expression von GFP in Säugerzellen (CBA) und Insektenzellen (p10) erhöhen. Während das Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory Element (WPRE) die GFP-Expression erhöht, stabilisiert das Bovine growth hormone (bGH)-Polyadenylierungssignal die bei der Transkription entstehende mRNA durch Polyadenylierung.

Des Weiteren enthält die rAAV-Kassette das Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory Element (WPRE). WPRE verstärkt als cis-aktives RNA Element posttranskriptionell u.a. RNA-Polyadenylierung und Translation.⁸⁹ WPRE erhöht dadurch die Expression von Transgenen – in diesem Fall von GFP – sowohl bei Infektion mit Baculoviren als auch nach rAAV-Transduktion von Säugetierzellen.⁹⁰ Schließlich weist die AAV-Kassette ein Bovine growth hormone (bGH)-Polyadenylierungssignal auf. Dieses erhöht über Polyadenylierung u.a. die mRNA-Stabilität gegenüber Nukleasen und sichert so die Genexpression.⁹¹

1.2.2.2.4 OneBac: Vektor-Produktion

Bei Infektion der stabilen Sf9-Zellen mit Bac-rAAV-GFP kommt es zur Expression des baculoviralen frühen IE-1-Gens. Das IE-1-Protein dimerisiert, interagiert mit der hr2-Sequenz und aktiviert die Polyhedrin-Promoter, was wiederum die Transkription von *rep* und *cap* induziert. Es gibt Hinweise, dass der Polyhedrin-Promoter durch eine vom Baculovirus exprimierte α -Aminitin-resistente RNA-Polymerase transkribiert wird und dabei zelluläre Faktoren, wie das 30 kDa große Polyhedrin-Promoter-bindende Protein, involviert sind.^{92,93} Das gebildete Rep78 bindet die Rep-Bindestelle und aktiviert den p19-Promoter mit konsekutiver Erhöhung der Rep52-Expression. Zelluläre DNA-Polymerasen amplifizieren die rAAV-Kassette. In Abhängigkeit von Rep78 kommt es zur Bildung der ITR-flankierten Einzelstrang-rAAV-Genome (s.

1.1.1.4), die daraufhin mit Unterstützung von Rep52 in Kapside verpackt werden. Die Baculovirus-abhängige Induktion des p10-Promoters führt parallel zur Bildung von GFP, sodass die infizierte Sf9-Zellsuspension sich zunehmend grün färbt.⁹⁴

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Bedeutung von AAV5-Vektoren in der Gentherapie ist integral. Folglich besteht die Notwendigkeit einer effizienten Produktion an infektiösen und sicheren Vektoren. Im Rahmen der Arbeiten von Mietzsch et al. stellte sich heraus, dass für die Serotypen rAAV4 und rAAV5 zwar hohe Ausbeuten an Vektoren erzielt werden konnten, diese aber nur eine geringe Infektiosität aufwiesen und damit in der klinischen Anwendung keinen Nutzen bieten würden.⁶ Damit bestand der dringende Bedarf einer Optimierung der AAV5-Vektorproduktion. Um dieses Ziel zu erreichen, entstand die Überlegung, ein modifiziertes AAV5-*cap* tragendes Plasmid zu klonieren und mit einem AAV2-*rep* tragendem Plasmid in Sf9-Zellen zu transfizieren. Die Infektion der generierten, stabilen Sf9-Zellen mit Baculoviren wiederum würde die Produktion von optimierten, hochinfektiösen AAV5-Vektoren ermöglichen und somit ein für die klinische Anwendung optimiertes rAAV5-Produktionssystem (OneBac2.0) etablieren.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antibiotika/ Antimykotika

Antibiotic-Antimycotic (100X)	Antibiotischer Ansatz der Firma Gibco, der Amphotericin B, Penicillin und Streptomycin beinhaltet und Zellkultursuspensionslösungen hinzugegeben wird, um bakteriellen und mykotischen Kontaminationen vorzubeugen
Ampicillin	Antibiotikum; Ampicillin behindert als Beta-Laktam Antibiotikum die Neubildung der bakteriellen Zellwand durch irreversible Blockade der D-Alanin-Transpeptidase und wirkt somit bakteriostatisch
Amphotericin B	Antimykotikum; Amphotericin B wirkt antimykotisch durch eine Erhöhung der Zellmembranpermeabilität durch eine Interaktion mit Ergosterin, welches als Membranprotein in Pilzzellen vorkommt
Blasticidin	Blasticidin bindet an tRNA an der P-Stelle von Ribosomen und hemmt so die Proteinsynthese von Pro- und Eukaryonten
Penicillin	Antibiotikum; Penicillin wirkt als Beta-Laktam Antibiotikum analog zu Ampicillin bakteriostatisch
Streptomycin	Antibiotikum; Streptomycin interagiert mit der 30S Untereinheit der prokaryontischen Ribosomen und hemmt so die bakterielle Proteinsynthese

2.1.2 Antikörper

Primärantikörper

Maus monoklonaler Antikörper (mAb) gegen AAV2 Cap (B1)	PROGEN
Maus monoklonaler Antikörper gegen AAV2 Rep (303.9)	PROGEN

Sekundärantikörper

Peroxidase-gekoppelter Ziege anti Maus Antikörper	Dianova
---	---------

2.1.3 Bakterien

E.coli HB101 Bei Typ HB101 handelt es sich um einen Hybrid zwischen E.coli K12 und E.coli B

Genotyp: supE44, ara14, galK2 lavY1 Δ (gtp-proA)62
rpsL20(Strr) xyl-5 mtl-1 redA13 Δ (mcrC-mar) HsdS-(r-m-)

2.1.4 Chemikalien

Agar	AppliChem
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ampicillin-Natriumsalz	Roth
Antibiotic-Antimycotic	Gibco
Bacto™ BBL Yeast-Extract	AppliChem
Bacto™ Trypton	AppliChem
Blasticidin	Invitrogen
Bromphenolblau	Roth
Calciumchlorid	Sigma
Cellfectin II Reagent	Invitrogen
Chloroform	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) + GlutaMAX™-I	Gibco
Entwicklerlösung	Agfa
Essigsäure 100%	Roth
Ethanol (> 99,8%)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Ficoll Typ 400	Sigma
Fixierlösung	Agfa
Formaldehyd 37%	Roth
Glycerin (86%)	Roth
Glycin	Roth

Isopropanol (2-Propanol)	Roth
2-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
Midori Green Advance	Nippon
Milchpulver	Roth
Natriumcarbonat	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS, 20%)	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Neutralrotlösung	Roth
N-Laurylsarcosylat	Merck
Penicillin-Streptomycin (10.000 µg/ml)	Biochrom
Roti®-Phenol/C/I	Roth
Rotiphorese® Gel 30	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Sf-900™ Medium 1,3 X	Gibco
Spodopan Insektenzellmedium	PAN
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
Triton® X 100	Roth
Tween® 20	Roth

2.1.5 DNA

Ultrapure dNTP Set	PeqLab
Oligonukleotide (s. Tab. 1)	
Plasmide (s. Tab 2)	

Tabelle 1: Oligonukleotide

Name	Sequenz	Herkunft
BGA-1	CTAGAGCTCG CTGATCAGCC	Im Labor vorhanden
BGA-2	TGTCTTCCCA ATCCTCCCC	Im Labor vorhanden
VP1-Intron Fwd	AATTAAGAT CCGCCACCAT GTCTTTTGT GATCACCTC CAGGTAAGTA CTCCTATCA GTGATAGAG	MWG- Biotech/ Eurofins Genomics
VP1-Intron Rev	ATTACTGCAG GCTCTTCGAA TCTGAAACAA TAGGAAGGGA GTGG	MWG- Biotech/ Eurofins Genomics
VP2/3 Fwd	AATTAAGAAT TCGCTCTTCG ATTGGTTGGA AGAAGTTGGT GAAGG	MWG- Biotech/ Eurofins Genomics
PA-1	AATTAATGAT CAGATACATT GATGAGTTTG GAC	Im Labor vorhanden
Artifizielles Intron nach Chen ⁹⁵	GTAAGTACTC CCTATCAGTG ATAGAGATCT ATCATGGAGA TAATTAATAA GATAACCATC TCGCAAATAA ATAAGTATTT TACTGTTTTT GTAACAGTTT TGTAATAAAA AAACCTATAA ATATTCCGGA TTATTCATAC CGTCCCACCA TCGGGCGCGA AGGGGAAGA CCTGTAGTCA GAGCCCCG GCAGCACACA CTGACATCCA CTCCCTTCCT ATTGTTTCAG	Chen et al. ⁹⁵
VP1-Intron- Fragment (modifiziert nach Chen ⁹⁵ mit VP1- Anteil (Rot markiert))	ATGTCTTTTG TTGATCACCC TCCAG GTAAG TACTCCCTAT CAGTGATAGA GATCTATCAT GGAGATAATT AAAATGATAA CCATCTCGCA AATAAATAAG TATTTTACTG TTTTCGTAAC AGTTTTGTAA TAAAAAACC TATAAATATT CCGGATTATT CATACCGTCC CACCATCGGG CGCGAAGGGG GAAGACCTGT AGTCAGAGCC CCCGGGCAGC ACACACTGAC ATCCACTCCC TTCTATTGT TTCAG	MWG- Biotech/ Eurofins Genomics

Tabelle 2: Plasmide

Name	Beschreibung	Herkunft
pDP5	Enthält den <i>cap</i> von AAV5 und <i>rep</i> von AAV2	Grimm et al. ⁷⁶
pBluescript II SK (+)	Leerplasmid mit Ampicillin-Resistenz	Stratagene
pUC 131	Leerplasmid mit Ampicillin-Resistenz	Modifiziertes Plasmid auf Basis der pUC-Plasmide von Viera und Messing ⁹⁶
pTR-Bac-UF26	Plasmid mit bGH-Polyadenylierungssignal	Aslanidi et al. ⁸⁴
pIR-Cap-AAV2-RBE ⁺	Enthält den <i>cap</i> -ORF von AAV2 und u.a. die Rep-Bindestelle sowie Blastocidin- und Ampicillin-Resistenzgene	Aslanidi et al. ⁸⁴
pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE ⁺	Enthält den <i>rep</i> -ORF von AAV2 und u.a. die Rep-Bindestelle sowie Blastocidin- und Ampicillin-Resistenzgene	Aslanidi et al. ⁸⁴
pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE ⁺	Enthält den mit einem artifiziellen Intron modifizierten <i>cap</i> -ORF von AAV5 und u.a. die Rep-Bindestelle sowie Blastocidin- und Ampicillin-Resistenzgene	Modifiziert nach Mietzsch et al. ⁶
pIR-Rep78-AAV2-hr2- Δ RBE	Enthält den <i>rep</i> von AAV2, keine Rep-Bindestelle und u.a. die Blastocidin- und Ampicillin-Resistenzgene	Modifiziert nach Aslanidi et al. ⁸⁴
pIR-Cap-AAV5-Intron- Δ RBE	Enthält den mit einem artifiziellen Intron modifizierten <i>cap</i> -ORF von AAV5, keine Rep-Bindestelle und u.a. die Blastocidin- und Ampicillin-Resistenzgene	Modifiziert von pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE ⁺

2.1.6 Enzyme

Benzonase	Merck
Lysozym	Sigma
Phusion-Polymerase	NEB
Proteinase K	Roth
Restriktionsendonukleasen	NEB
RNase	Genomed
T4 DNA-Ligase	NEB
10 x Ligationspuffer	NEB
10 x NEB-Puffer	NEB
10 x BSA	NEB
5 x Phusion-Reaktionspuffer	NEB

2.1.7 Geräte

Horizontalgelapparatur für Agarosegele	MPI Eigenbau
Autoklav	Webeco
Ausschwingzentrifuge (Megafuge 3.0 R)	Heraeus Sepatech
Brutschrank	Heraeus Sepatech
Bunsenbrenner	Tecnomara
DNA-Speed Vac (DNA 110)	Savant
Eismaschine	Ziegra
Entwicklermaschine	Agfa
Elektronische Präzisionswaage	Sartorius
Feinanalysewaage	Sartorius
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch
Gefrierschrank (-80°C)	Forma
Geldokumentation	Intas
Gelfotodrucker	Mitsubishi
Geltrockner	BioRad
Heizblock	Störk-Tronic
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific
Inkubator	Thermo Life Science
Inverses Fluoreszenzmikroskop	Leica
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr

Kühlzentrifuge (Mikro 22R)	Hettich
Lichtmikroskop (CK2)	Olympus
Light-Cycler	Roche
Magnetrührer	Ikamag
Mikropipetten	Eppendorf / Gilson
Mikrowelle	Toshiba
Spannungsgerät (Power Pac 300)	BioRad
pH-Meter (761 Calimatic)	Knick
Photometer (DU 530)	Beckmann
PipetBoy	IBS
Polyacrylamidgelelektrophorese-Apparatur	Eigenbau
Schweißgerät (Polystar 243)	Bachofer
Schwenker (Rockomat)	Tecnomara
SemiDry Blotter	Eigenbau
S2-Sterilbank	BDK
Überkopfschüttler (Reax 2)	Heidolph
Thermocycler	Applied Biosystems
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge (5415C)	Eppendorf
Ultrazentrifuge (L5-75) mit 60Ti-Rotor	Beckmann
Vortexer (Rotamixer deluxe)	Hook & Tucker Ltd.
Wasserbad	GFL
Hochgeschwindigkeitszentrifuge (Avanti J-25)	Beckman

2.1.8 Kitsysteme

Finnzymes F 420 Light Cycler 2x DyNAmo Master Mix	Finnzyme
JETstar 2.0 Plasmid Purification Midi Kit / 50	Genomed
Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I	Roche
Western Lightning Plus-ECL	PerkinElmer

2.1.9 Lösungen und Puffer

Tabelle 3: Lösungen und Puffer

Lösung/ Puffer	Konzentrationen	Zusammensetzung
10 x DNA-Ladepuffer	0,25% [w/v] 25% [w/v] 10 mM	Bromphenolblau Ficoll Typ 400 EDTA
3 x DNA-Lysepuffer	70 mM 25 mM 3% [w/v]	Tris/HCl (pH 8,5) EDTA (pH 8,0) N-Laurylsarcosylat
Agarosegellösung (Gelelektrophorese)	0,8 - 1,0% [w/v]	Agarose in 1 x TAE (Tris, Acetat, EDTA)
Agarosegellösung (Baculovirus Plaque- Assay)	3% (w/v)	Agarose in H ₂ O bidest.
Ammoniumpersulfat	10% [w/v]	APS
Ampicillin	100 mg/ml	Ampicillin
Blasticidin	25 mg/ml	Blasticidin
Blocklösung	6% [w/v]	Milchpulver in 1 x PBS
Calciumchlorid-Lösung	3 M	CaCl ₂
Entwicklerlösung	140 mM 16 nM 0,02%	Na ₂ CO ₃ Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O Formaldehyd
Färbelösung	2,4mM 0,03%	AgNO ₃ Formaldehyd
Fixierlösung	50% [v/v] 10% [v/v] 0,02% [v/v]	Ethanol Essigsäure Formaldehyd
Freeze-Squeeze-Puffer	0,3 M 1 mM	Natriumacetat (pH 7,0) EDTA

Fortsetzung Tabelle 3: Lösungen und Puffer

Lösung/ Puffer	Konzentrationen	Zusammensetzung
Lysepuffer	10 mM 150 mM 1 mM 1%	Tris-HCl (pH 8,8) NaCl MgCl ² Triton® X 100
Lysozym	10 mg/ml	Lysozym
Milchlösung (Antikörper)	6% [w/v] 0,3% [w/v]	Milchpulver Tween® 20 in 1 x PBS
Neutralrotlösung	1 ml 9 ml	Neutralrotlösung 1 x PBS
PBS (pH 7,4)	8 mM 2 mM 150 mM	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaCl
PBS-T	0,1% [w/v]	Tween® 20 in PBS
Proteinase K	20 mg/ml	Proteinase K
Protein-Transferpuffer (pH 8,0)	25 mM 192 mM 20% [v/v]	Tris Glycin Methanol
SDS-Laufpuffer (pH 8,8)	50 mM 380 mM 0,1% [w/v]	Tris Glycin SDS
SDS-Proteingellösung B (pH 8,8)	1,5 M 0,4% [w/v]	Tris/HCl SDS
SDS-Proteingellösung C (pH 6,8)	0,75 M 0,4% [w/v]	Tris/HCl SDS

LB-Platten mit Ampicillin	100 µg/ml 1,5% [w/v]	Ampicillin Agar in LB-Medium
<u>Eukaryonten</u>		
Spodopan	100 µg/ml 100 µg/ml 25 µg/ml (10% [v/v])	Penicillin Streptomycin Amphotericin B FCS im Rahmen der Selektion)
Einfrier-Medium [DMEM]	10% [v/v] 10% [v/v]	DMSO FCS
DMEM + GlutaMAX™-I	100 µg/ml 100 µg/ml 10%	Penicillin Streptomycin FCS

2.1.12 Software

Adobe Photoshop 2020
 Adobe Illustrator 2020
 Intas Gel Capture Software
 LightCycler Software 3.5
 Microsoft Office Word 2020
 Vector NTI Software | Thermo Fisher Scientific

2.1.13 Verbrauchsmaterialien

Bechergläser (100, 200, 1000 ml)	Schott
Deckgläser	Menzel – Thermo Scientific
Einwegpipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt
Erlenmeyerkolben (300, 500, 1000 ml)	Schott
Falcon Tubes (15, 50 ml)	BD
Filterpapier	Macherey-Nagel
Glasflaschen (100, 200, 500, 1000, 2000 ml)	Schott

Glaspipetten	Hirschmann
Glaswolle	Merck
Handschuhe (Nitril)	Ansell
Light-Cycler-Kapillaren	Roche
Löffelspatel	Bochem
Medizinischer Röntgenfilm	Fuji
Messzylinder	Simax
Nitrocellulose-Transfermembran	Whatman
Objektträger	Brand
PCR-Reaktionsgefäße	Applied Biosystems
Petrischalen (100 x 15 mm)	Sarstedt
Pinzetten	Bochem/Wironit
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2,0 ml)	Sarstedt
Papier	Tork
Scheren	Bochem
Schlauchfolie	VWR
Skalpell	Feather
Spritzen	BD
Spritzwasserflasche	Nalgene
Stickstoffbehälter	Isotherm
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann
Wasserkarister	Nalgene
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Falcon
Erlenmeyerkolben	Schott
6-Well-Zellkulturplatten	Falcon
12-Well-Platten	Costar
24-Well-Platten	Falcon
96-Well-Platten	Sarstedt
Whatman-Papier	Whatman
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturschalen (60 x 15 mm)	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugenbecher	Beckmann

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Sequenzen genutzt. Bei der PCR werden spezifische DNA-Abschnitte mit Hilfe von Primern, die die Startpunkte der zu vervielfältigen Sequenz markieren und DNA-Polymerasen, die die Synthese gewährleisten, amplifiziert. Als Ausgangspunkt für weitere Versuche diente die PCR der Vervielfältigung einer 255 bp langen künstlichen Intronsequenz. Diese enthielt einen baculoviralen Polyhedrin-Promoter sowie *cap*-Sequenzen, die anteilig VP1 kodieren. In den folgenden Tabellen sind der Ansatz und das Temperaturprogramm der durchgeführten PCR aufgeführt.

Tabelle 4: PCR Ansatz

Komponenten	Volumen in μl
Template DNA (1 ng/ μ l)	10
Puffer (5 x NEB Phusion Puffer)	10
Primer 1 (Vorwärts, 10 pmol/ μ l)	1,5
Primer 2 (Rückwärts, 10 pmol/ μ l)	1,5
dNTPs (10 mM)	1
Polymerase (NEB Phusion)	0,5
Aqua bidest.	25,5
Gesamtvolumen	50

Tabelle 5: PCR Temperaturprogramm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	94	180	1
2. Amplifikation			10
2.1 Denaturierung	94	30	
2.2 Annealing	42	30	
2.3 Elongation	72	90	
3. Amplifikation			20
3.1 Denaturierung	94	30	
3.2 Annealing	42	30	
3.3 Elongation	72	90 + 5 Verlängerung pro Zyklus	
4. Abschließende Elongation	72	420	1
5. Kühlen	4		1

Nach Abschluss der PCR erfolgte eine Gelelektrophorese mit 5 µl des PCR-Ansatzes. Anschließend wurde optisch kontrolliert, ob die Bande des PCR-Produkts der erwarteten Größe entsprach. Der Rest des PCR-Ansatzes wurde durch eine Phenol-Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung aufgereinigt. Die gefällte DNA wurde in 20 µl 1 x TE-Puffer resuspendiert.

2.2.1.2 Restriktionsverdau von DNA

Bei Restriktionsverdau-Versuchen erfolgt mittels spezifischer Enzyme ein zielgerichteter Schnitt von DNA-Strängen. Diese wurde zur Vorbereitung von Ligationen (Präparation kompatibler DNA-Enden) und zum analytischen Restriktionsverdau genutzt. Durch analytische Restriktionsverdau-Versuche kann der Erfolg von Klonierungen, PCR und Ligationen anhand der entstandenen DNA-Fragmente bzw. ihrer Größe nach gelelektrophoretischer Auftrennung abgeschätzt werden. Bei einem Restriktionsverdau wurden im Rahmen dieser Arbeit stets jeweils 1 µg DNA und 10 Units der Restriktionsenzyme genutzt und Restriktionspuffer analog zu den Angaben des Herstellers (Suggested NEBuffers) verwendet. Die Inkubationszeit bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur betrug mindestens eine Stunde.

2.2.1.3 Ligation von DNA

Um DNA-Fragmente zu verbinden wurden Ligationen durchgeführt. Ligasen verknüpfen hierbei 3'-OH- und 5'-Phosphat-Enden der Fragmente kovalent über Phosphodiesterbindungen. Verwendet wurde ausschließlich die aus Enterobakteriophagen gewonnene T4-DNA-Ligase, welche als Cofaktor ATP benötigt. Neben 1 µl T4-DNA-Ligase beinhaltete der mit einem Volumen von 10 µl angelegte Versuchsansatz 1 µl Ligationspuffer sowie je nach DNA-Volumen ein Restvolumen an 1 x TE-Puffer. Um einen optimalen Ligationserfolg zu erzielen, wurde das Verhältnis zwischen Plasmid und dem einzufügenden DNA-Fragment variiert. Hierbei wurden Verhältnisse von 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4 genutzt. Um das entstandene Produkt zu amplifizieren, erfolgte anschließend eine Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien.

2.2.1.4 Herstellung von chemisch-kompetenten Bakterien

Um chemisch-kompetente Bakterien herzustellen, wurde 400 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur eines ausgewählten Bakterienstammes versetzt und über Nacht bei 37°C auf einem Flachbrettschüttler bei 300 rpm geschüttelt. Die Kultur wurde bis zu einer $OD_{595\text{ nm}}$ von 0,6 amplifiziert. Dies dauerte in der Regel 3 bis 4 Stunden. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Als erstes erfolgte eine Zentrifugation für 5 min. bei 3000 g. Anschließend wurde das Pellet in 100 ml CaCl_2 -Lösung aufgenommen, erneut zentrifugiert, abermals in 100 ml CaCl_2 -Lösung aufgenommen und wieder zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 10 ml CaCl_2 -Lösung/14%-Glyzerin aufgenommen und in 200 µl Aliquots bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.1.5 Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien

Um DNA in Bakterien einzubringen, wurde die Calciumchlorid-Methode zur Transformation von E.coli Hb 101 Bakterien verwendet. Die chemisch-kompetenten E.coli Bakterien wurden im Eisbad aufgetaut und 50 µl der Kultur mit dem Ligationsansatz vermischt. Der entstandene Ansatz wurde 30 min. auf Eis gelagert und anschließend einem 90 Sekunden Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Nach Zugabe von 200 µl Ampicillin freien Mediums wurde der Ansatz für 30 min. bei 37°C und 1000rpm geschüttelt und abschließend auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte ausplattiert, die bei 37°C über Nacht inkubiert wurde.

2.2.1.6 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe dient die Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,4%- oder 0,8%-haltige Agarosegele genutzt. Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurde Agarose in 1 x TAE-Puffer aufgelöst. Nach Erhitzen des Gemisches in der Mikrowelle erfolgte die rasche Zugabe von 1 µl Midori Green Advance. Midori Green bindet hierbei an DNA-Moleküle und kann sie so unter UV-Licht visualisieren. Die flüssige Gelmischung wurde daraufhin in eine vorbereitete Form (Gelschlitten) gegossen. Durch einen vorher eingesetzten Spacer, der nach Aushärtung der Gele entnommen wurde, entstanden befüllbare Taschen. Vor Beginn der eigentlichen Gelelektrophorese wurden die Schlitten zusätzlich mit 1 x TAE-Puffer und die Taschen mit den DNA-Proben befüllt. Zur Vorbereitung der Proben erfolgte stets eine Mischung dieser mit 10 x DNA-Ladepuffer. Der DNA-Ladepuffer enthielt das Copolymer Saccharose-Epichlorhydrin (Ficoll™), welches die Dichte der Probe erhöht, das Absinken in der Tasche des Agarosegels beschleunigt und ein dortiges Verbleiben verlängert. In der ersten Tasche wurde stets der Marker, 2 µl GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas), aufgetragen. Nach Aufbau der Gelelektrophoreseapparatur wurde ein Netzgerät angeschlossen, welches eine definierte Spannung erzeugte, die zur Auftrennung der DNA entsprechend ihrer Größe im Gel führte. Hierbei wanderte die negativ geladene DNA zur Anode. Die Gelelektrophorese erfolgte mit einer Laufzeit von ca. einer Stunde bei 70 Volt. Nach Auftrennung der DNA wurde das Gel aus dem Schlitten entnommen und das Ergebnis unter kurzweiligem UV-Licht fotografisch beurteilt. Anschließend erfolgte ggf. eine Extraktion einer oder mehrerer Banden aus dem Gel unter langwelligem UV-Licht, welches weniger DNA-Schäden verursacht.

2.2.1.7 DNA-Isolation aus Agarosegelen unter Verwendung der „Freeze-Squeeze“-Methode

Um DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu extrahieren, eignet sich die „Freeze-Squeeze“-Methode. Zur Vorbereitung wurden 0,5ml Eppendorfgefäße mit einer im Bunsenbrenner erhitzten Stahlnadel am unteren Pol durchstoßen, mit Glaswolle, welche nach manueller Kompression circa ein Drittel des Gefäßes ausfüllt, befüllt und abschließend in ein größeres 1,5ml Eppendorfgefäß eingefügt. Nach optischer Identifikation der gesuchten DNA-Bande unter kurzweiligem UV-Licht, wurde diese in

einem kleinen umgebenden Gelblock mit einem Skalpell unter langwelligem UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Das herausgeschnittene Gelstück wurde in das vorbereitete Gefäßkonstrukt (auf die Glaswolle) transferiert und für circa eine Stunde bei minus 80°C tiefgefroren. Nach Entnahme des Gefäßes aus dem Eisschrank wurde eine Zentrifugation bei 2000 rpm für 15 min. durchgeführt. Während das Agarosematerial in der Glaswolle hängen bleibt, werden die DNA-Fragmente durch die Glaswolle hindurch in das 1,5ml Eppendorfgefäß zentrifugiert. Im Anschluss wurde eine Ethanol-Fällung genutzt, um die DNA-Probe zu reinigen (siehe Abschnitt 2.2.1.6).

2.2.1.8 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um DNA aus lysierten Zellen zu gewinnen, müssen bei der Zellyse anfallende Proteine entfernt werden. Hierbei kommt die Phenol-Chloroform-Extraktion zum Einsatz. Das Volumen der Probe wurde im Verhältnis 1:1 mit Rotiphenol (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol) gevortext und anschließend für 2 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Von den drei entstehenden Phasen, beinhaltet die Untere Phenol-Chloroform, die Mittlere denaturiertes Protein und die Obere gereinigte DNA. Letztere kann in ein neues Eppendorfgefäß abpipettiert werden.

2.2.1.9 DNA-Fällung mit Ethanol/ Isopropanol

Ziel einer Ethanol-/Isopropanol-Fällung ist die Aufreinigung und Konzentration von DNA. Durch eine Verringerung der Löslichkeit der DNA in einer Ethanollösung lässt sich eine Fällung erreichen. Diese wird durch die Zugabe von Natriumacetat (0,3 M konzentriert) verstärkt. Hierbei wird der pH-Wert der Lösung abgesenkt und die DNA leicht protoniert. Zu Beginn wurde der DNA-Probe das 2,5-fache Volumen an 100%igen Ethanol hinzugefügt. Im Anschluss wurde die Probe für 20 min. bei -80°C gelagert und für 10 min. bei 15000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer großvolumigen Pipette abgesaugt und verworfen.

Bei einer Isopropanol-Fällung wurde der Probe das 0,7-fache Volumen Isopropanol hinzugefügt. Die Probe wird bei -80°C für 20 min. gelagert und anschließend für 10 min. bei 15000 rpm sowie 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die gemeinsame Endstrecke der beiden Fällungen beinhaltete jeweils ein Waschen des Pellets in 70%igen Ethanol, eine erneute, wie oben beschriebene, Zentrifugation, ein Verwerfen des Überstandes, ein vorsichtiges Lufttrocknen des Pellets und eine

weitere zweiminütige Trocknung in der Speed-Vac. Abschließend wurden die DNA-Pellets in 20 µl 1 x TE-Puffer resuspendiert.

2.2.1.10 Plasmid-Präparation

Um Plasmide aus rekombinanten *E. coli* zu isolieren, bedarf es einer Zellyse der Bakterien und Isolation des Plasmids. Im Folgenden werden die Lysozym-Methode und Midi-/Maxi-Präparation beschrieben. Zur Vorbereitung wurden Klone von der Petri-Schale mit Hilfe einer Pipettenspitze gepickt und die Pipettenspitze in 3ml (Lysozym-Methode) oder 10ml (Midi-/Maxi-Präparation) LB-Medium mit Ampicillin transferiert. Über Nacht wurden die Kulturen bei 37°C und 120 rpm geschüttelt.

2.2.1.10.1 Lysozym-Methode

Um die Identität eines neuen Plasmids zu verifizieren, sollte zunächst eine Präparation in kleinem Volumen mit anschließendem analytischen Restriktionsverdau erfolgen. Hierfür wurde die Lysozym-Methode verwendet. Nach Kultivierung über Nacht wurden jeweils 1,5ml der Kulturen abgenommen und bei 4°C und 10000 rpm für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge: Hettich MIKRO 22R). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200ml Stet-Puffer aufgenommen. Um die Zellwand aufzubrechen wurde den Proben jeweils 20µl Lysozym (10mg/ml) hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben gevortext und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einminütigen Hitzeschock bei 95°C im Heizblock erfolgte eine Zentrifugation für 10 min. bei 14000 rpm und 4°C (Zentrifuge: Hettich MIKRO 22R). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch Isopropanol-Fällung isoliert. Zur Verifizierung wurde die Plasmid-DNA mittels eines Restriktionsverdaus und Gelelektrophorese analysiert.

2.2.1.10.2 Midi-/Maxi-Präparation

Die Midi-/Maxi-Präparation wird zur Aufbereitung von Bakteriensuspensionen mit höheren Volumina bzw. Plasmidmengen verwendet. Hierbei erfolgt die Zellyse auf Basis einer alkalischen Lösung. Die DNA wird an eine Ionenaustauschersäule gebunden und schließlich aus dieser durch eine Elutionslösung ausgewaschen. In dieser Arbeit wurde das Jetstar 2.0 Plasmid Midi/Maxi Kit von Genomed verwendet und die Versuche entsprechend der Gebrauchsanweisung durchgeführt.⁹⁷ Im Anschluss wurden die Proben durch Ethanol-fällung gereinigt und die DNA in 100µl

(Medi-Präparation) oder 200µl (Maxi-Präparation) 1 x TE-Puffer resuspendiert. Durch eine abschließende photometrische Analyse wurden die Proben hinsichtlich ihrer DNA-Konzentration und möglicher Verunreinigungen durch Proteine untersucht.

2.2.1.11 Photometrische Analyse der DNA-Konzentration

Durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) einer DNA-Probe im UV-Photometer lässt sich die Nukleinsäurekonzentration errechnen. Hierbei absorbiert DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm, während Proteine bei 280 nm absorbieren. Dies ermöglicht auch eine Beurteilung der Reinheit einer Probe. Der Quotient von $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ sollte bei 1,8 – 2,0 liegen, was für eine geringe Verunreinigung durch Proteine spricht. Vor Bestimmung der DNA-Konzentration einer Probe wurde eine 1:50 Konzentration mittels 1 x TE-Puffer hergestellt. Eine ermittelte OD von 1,0 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Über diesen Referenzwert lässt sich die DNA-Konzentration einer Probe bestimmen.

2.2.1.12 Sequenzierung von DNA

Zur Überprüfung der gewünschten DNA-Modifikationen klonierter Plasmide wurden diese sequenziert. Die Sequenzierung wurde durch Eurofins MVG Operon durchgeführt. Zur Vorbereitung der Probe wurde 1 µg der Plasmid-DNA in 15 µl TRIS (pH 8, 5 mM) aufgenommen. Die übermittelte DNA-Sequenz wurde mittels des Programms „Vektor NTI“ kontrolliert.

2.2.2 Proteinnachweis

2.2.2.1 SDS-Polyacrylamidgel: Herstellung und Gelelektrophorese

Um Proteine entsprechend ihrer molaren Masse aufzutrennen wird die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Natrium-Dodecyl-Sulfat führt zu einer negativen Ladung aller Proteine, sodass sich bei Anlage einer Spannung die Proteine zum Positivpol bewegen. Vorab wurden Sammel- und Trenngele vorbereitet (s. Tabelle 6). Als Vorlage für die Herstellung des Sammelgels wurde die Methode nach Laemmli genutzt.⁹⁸ Zur Herstellung des Trenngels diente die Methode nach Kronberg.⁹⁹

Tabelle 6: Ansatz für SDS-Polyacrylamidgele

Komponenten	Sammelgel (ml)	Trenngel (ml)
Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid)	3	10
Lösung B	-	7,5
Lösung C	5	-
H ₂ O bidest	11,8	12,3
10% APS	0,2	0,2
TEMED	0,04	0,04

Das fertige Trenngelgemisch wurde zügig in die vorbereiteten Gelkammern gegossen und nach Aushärtung, um das Sammelgelgemisch ergänzt. Hierbei wurde zur Taschenvorbereitung ein Kamm Luftblasen-frei eingesetzt. Nach Polymerisation des Gels wurde SDS-Laufpuffer in die Kammern gefüllt. Anschließend wurden die Proben und 5 µl des Markers, Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas), aufgetragen. Daraufhin erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteingemische im Bereich des Sammelgels mit einer Stromstärke von 12 mA pro Gel und im Bereich des Trenngels von 18 mA pro Gel. Nach erfolgreicher Auftrennung der Proteine wurde im Anschluss ein Western Blot durchgeführt.

2.2.2.2 Western Blot

Das Prinzip des Western Blots besteht darin, dass nach elektrophoretischer Auftrennung im Trenngel, ein Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Semi-Dry Verfahren verwendet. Auf der Membran werden die Zielproteine mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper wird in einem zweiten Schritt durch einen gegen ihn gerichteten Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper detektiert. Bei Zugabe von Wasserstoffperoxid und Luminol kommt es im Rahmen einer Redoxreaktion zur Photonenemission, die auf einen Film projiziert werden kann. Initial erfolgte der Aufbau des Semi-Dry-Verfahrens im Blotgerät. Zur Kathode hin wurden drei Lagen Whatman-Papier, die Nitrocellulosemembran, das Trenngel sowie weitere drei Lagen Whatman-Papier platziert. Das Whatman-Papier und die Nitrocellulosemembran wurden vorab in 1x Methanol-haltigen Proteinlaufpuffer befeuchtet. Nach erfolgter Schichtung erfolgte bei 4°C das Blotverfahren. Hierbei wurde je Gel eine Stromstärke von 50 mA gewählt. Nach 90 Minuten wurde die Nitrocellulosemembran entnommen

und zur Blockade freier Bindungsstellen der Membran für eine Stunde in Milcheiweißlösung (6%) bei Raumtemperatur gelagert. Hierbei und in allen folgenden Schritten erfolgte die Inkubation auf einem Horizontalkippschüttler. Anschließend wurde die Milchlösung verworfen und die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimalig für je 15 min mit 1 x PBS-Tween gewaschen und danach für zwei Stunden mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Abermals erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang mit 1 x PBS-Tween für jeweils 5 min. Anschließend wurde die Membran mit der vorab angesetzten Chemolumineszenzlösung Western Lightning Plus-ECL von PerkinElmer (Verhältnis der beiden Komponenten 1:1) für eine Minute inkubiert und die Photonenemission auf einem Film in der Dunkelkammer festgehalten. Daraufhin konnte der Film mit unterschiedlichen Expositionszeiten (3 s bis 2 min) entwickelt, eingescannt und die dargestellten dunklen Banden beurteilt werden.

Die Primär- und Sekundärantikörper wurden in Milch-Tween aufgenommen und verdünnt. Im Folgenden sind die verwendeten Antikörper in ihren entsprechenden Verdünnungen aufgeführt.

Primäre und sekundäre monoklonale Antikörper (mAb)

Primärer mAb (Maus) gegen AAV-Kapsidproteine (B1)	1:10
Primärer mAb (Maus) gegen AAV2-Replikationsproteine (303.9)	1:5
Sekundärer mAb (Ziege) gegen murine mAb	1:2500

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Sf9-Zellen

Bei Sf9-Zellen handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, die ursprünglich aus den Ovarien des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* gewonnen wurde.^{100,101} Die Kultivierung kann sowohl adhärent als auch in Suspension erfolgen. Der optimaler pH-Wert liegt bei 6,2 bei einer optimalen Inkubationstemperatur von 27°C ohne Zugabe von CO₂. Als Wachstumsmedium wird Spodopan-Medium verwendet. Diesem wird Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B im Verhältnis 1:1000 und bei Bedarf fetales Kälberserum im Verhältnis 1:100 als Wachstumsfaktor hinzugefügt. Sterile Arbeit ist mit Sf9-Zellkulturen unerlässlich, da die Zellkulturen

trotz Zugabe von antibiotischen und antimykotischen Substanzen leicht kontaminieren.

2.2.3.1.1 Kultivierung von Sf9-Zellen in Zellkulturflaschen

Sf9-Zellen wachsen adhärent. Die Passage kann bei Konfluenz mittels sanften Abspülens mit einer großvolumigen Pipette oder Abschabens mit einem Zellschaber erfolgen. Die so gewonnene Zellsuspension kann z.B. im Verhältnis 1:10 oder 1:5 verdünnt und in eine neue mit Spodopan-Medium befüllte Zellkulturflasche transferiert werden.

2.2.3.1.2 Kultivierung von Sf9-Zellen in Suspension

Sf9-Zellen können zudem in Suspension kultiviert werden. Abhängig vom Volumen erfolgt die Kultivierung in sterilen Erlenmeyer-Kolben, deren Öffnungen mit Alufolie verschlossen werden, in einem Inkubator mit Schüttelfunktion bei 27°C. Regelmäßig muss hierbei die Zellzahl bzw. Zelldichte überprüft werden. Dies geschieht mittels einer langen Pipette mit der ein kleines Volumen der Zellsuspension entnommen und in einer Zellkammer gezählt werden kann. Bei 3 bis 4 x 10⁶ Zellen/ml muss die Passage erfolgen. Es sollte eine Verdünnung zwischen 0,5 bis 1 x 10⁶ Zellen/ml erreicht werden.

2.2.3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellkulturen (Sf9- und C12-Zellen) wurden stets in Kryogefäßen gelagert. Das Einfrieremedium wurde mit einem Volumen von 1ml bestehend aus DMEM und 10% Dimethylsulfoxid sowie 10% FCS angesetzt. Dimethylsulfoxid verhindert die Bildung von Eiskristallen, führt in flüssigen Aggregatzustand allerdings zum Zelltod. Beim Auftauen muss die eingefrorene Zellkultur deshalb im Wasserbad bei 37°C schnell erwärmt werden. Sobald die noch kalte Kultur flüssig war, wurde sie aus dem Kryogefäß in einen 15 ml Tube mit 1 ml frischen Medium (Spodopan bei Sf9- oder DMEM bei C12-Zellen) transferiert und anschließend für 5 min bei 600 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 9 ml Medium (Spodopan oder DMEM) und 1 ml FCS resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (75 cm²) transferiert. Zur späteren Verwendung wurden wiederholt Zellkulturen eingefroren. In der Regel wurden 1 x 10⁷ Zellen als Suspension in ein 15 ml Tube transferiert und für 5 min bei 600 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml

Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryogefäß transferiert. Das Kryogefäß wurde daraufhin in einem zur Hälfte mit Isopropanol gefüllten Kryo-Einfrier-Container bei -80°C eingefroren. Die Isopropanolfüllung bewirkt hierbei eine gleichmäßige Abkühlung um 1°C pro Minute.

2.2.3.1.4 Transfektion von Sf9-Zellen

Um AAV-Rep und –Cap exprimierende Sf9-Helferzelllinien für die AAV-Vektorproduktion zu generieren, müssen Expressionsvektoren für die Cap und Rep-Expression in Sf9-Zellen eingebracht werden. Die entsprechenden Plasmide wurden in Sf9-Zellen mittels Cellfectin von Invitrogen transfiziert. Hierbei wird die zu transfizierende DNA von Liposomen umschlossen. Die Liposomen fusionieren wiederum mit der Zellmembran und schleusen so Plasmide in die Zellen.

Transfektionsansatz (für eine 6 cm Schale) *rAAV5-RBE⁺-Zellklone*

1. pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺/pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE (15 µg DNA im molaren Verhältnis 2,5:1) in Antibiotika freien Spodopan-Medium (Gesamtvolumen 150 µl)
+
2. 20 µl Cellfectin II + x Antibiotika freies Spodopan-Medium (Gesamtvolumen 150 µl)

Transfektionsansatz (für eine 6 cm Schale) *rAAV5-ΔRBE-Zellklone*

3. pIR-Cap-AAV5-Intron-ΔRBE/pIR-Rep78-AAV2-hr2-ΔRBE (15 µg DNA im molaren Verhältnis 2,5:1) in Antibiotika freien Spodopan-Medium (Gesamtvolumen 150 µl)
+
4. 20 µl Cellfectin II + x Antibiotika freies Spodopan-Medium (Gesamtvolumen 150 µl)

Vorbereitend wurden in 6 cm Schalen je 3×10^6 Sf9-Zellen in Suspension ausgesät und nach Adhärenz der Zellen das Spodopan-Medium gegen 1 ml Antibiotika-freies Spodopan-Medium ausgetauscht. Daraufhin wurde der Plasmid-Cellfectin-Ansatz tröpfchenweise auf die Schalen pipettiert und für 3 Stunden bei 27°C inkubiert. Anschließend wurde das Antibiotika-freie Medium entfernt, durch 2,5 ml Spodopan-Medium ersetzt und die Zellen bis zur Selektion bei 27°C inkubiert.

2.2.3.1.5 Selektion transfizierter stabiler Sf9-Zellen

Das Prinzip der Selektion von transfizierten Sf9-Zellen beruht darauf, dass die eingebrachten Plasmide eine Resistenz gegen das Antibiotikum Blastocidin vermitteln. Sollte die Integration der Plasmide in das Sf9-Zell-Genom fehlgeschlagen sein, kommt es zum Zelltod. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die adhärennten Sf9-Zellen aus den Zellschalen abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in unterschiedlichen Verdünnungen (1:500, 1:250, 1:125, 1:50, 1:25) auf 10 mit 3 ml Blastocidin-haltigen Spodopan-Medium befüllte 6 cm Schalen gegeben und bei 27°C bis zur Ausbildung von Einzelkolonien inkubiert. Isolierte Einzelkolonien wurden bei ausreichender Größe (ca. 0,5 mm) mit einer Pipettenspitze abgesaugt und in einzelne Vertiefungen einer 96-Well-Platte transferiert. Vorab wurden die einzelnen Vertiefungen der 96-Well mit 0,5 ml Blastocidin-haltigen Spodopan-Medium befüllt. Die äußersten Partitionen wurden mit destilliertem Wasser befüllt, welche einer übermäßigen Verdunstung des Mediums im Inkubator vorbeugen soll. Im Rahmen der pIR-Cap-Intron-AAV5-RBE Versuchsreihe wurden insgesamt 90 Einzelkolonien auf drei 96-Well-Platten verteilt. Bei der pIR-Cap-Intron-AAV5-RBE-Δ Versuchsreihe wurden 30 Zellklone auf eine 96-Well-Platte transferiert. Bei Konfluenz der Zellen erfolgte der sukzessive Transfer in jeweils größere Vertiefungen einer 12-Well, 6-Well, 6 cm Schale, 75cm²-Zellkulturflasche, 10 ml Zellsuspension im Erlenmeyerkolben und schließlich 30 ml Erlenmeyer Kolben. Im Rahmen der Passage in größere Volumina bzw. Gefäße wurde der Anteil an FCS von initial 10% auf schließlich 0% reduziert. Blastocidin wurde ab der Passage der Sf9-Zellen in Zellkulturflaschen weggelassen. Die Zellkulturen wurden stets bei 27°C inkubiert. In Suspension erfolgte die Inkubation im New Brunswick Scientific Schüttelinkubator bei 50 rpm.

2.2.3.2 C12-Zellen

Um das Infektionspotenzial von AAV-Vektoren zu testen, wurden in dieser Arbeit C12-Zellen verwendet. Bei diesen handelt es sich um modifizierte HeLa-Zellen, die erstmals von Clark et al. 1996 beschrieben wurden.¹⁰² HeLa-Zellen wiederum sind eine immortalisierte Zellreihe, die ursprünglich von Dr. George Otto Gey aus dem Gewebe eines Zervixkarzinoms der Patientin Henrietta Lacks am John Hopkins Hospital in Baltimore 1951 generiert wurde.¹⁰³ C12-Zellen enthalten stabil ins Genom

integriert *rep* und *cap*, sodass es bei Infektion durch rAAV zur Amplifikation des rAAV-Genoms kommt.

2.2.3.2.1 Kultivierung von C12-Zellen in Zellkulturflaschen

C12-Zellen wachsen adhärent in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂. Als Medium wurde Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) mit Glutamat (GlutaMAX), angereichert mit 10% FCS sowie 100 µg Penicillin und Streptomycin/ ml, verwendet. Bei ca. 80% Konfluenz erfolgte eine Passage mit einer Verdünnung der Zellen im Verhältnis 1:6 in eine neue Zellkulturflasche, üblicherweise alle 48 Stunden.

2.2.3.3 HEK 293-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden AAV5-Vektoren verwendet, die aus Plasmid-transfizierten HEK 293-Zellen gewonnen wurden. Die Vektoren wurden als Frier-Tau-Überständen vom Labor zur Verfügung gestellt. Bei HEK 293-Zellen (human embryonic kidney cells) handelt es sich um eine immortalisierte Zellreihe, die von humanen embryonalen Nierenzellen stammt und erstmals von Graham et al 1977 beschrieben wurde und die die frühen adenoviralen Helfergene E1A und E1B Genen stabil exprimieren.¹⁰⁴ Die Kultivierung und Passage erfolgt bei HEK 293-Zellen analog zu C12-Zellen (s. 2.2.3.2).

2.2.3.4 Produktion von Baculoviren und AAV-Vektoren

2.2.3.4.1 Baculovirus-Produktion

Sf9-Zellen werden von Baculoviren infiziert und für ihre Vermehrung genutzt. Das im Labor vorhandene rekombinante Baculovirus besitzt eine ins Genom integrierte AAV-Vektor-Kassette mit dem Reportergen für das „green fluorescent protein“ (GFP). Für die Produktion von AAV-Vektoren sollten replikationskompetente Baculoviren verwendet werden. Diese können in einem wie folgend beschriebenen Baculovirus-Plaqueassay gewonnen werden. Vom Ursprungslysat wurden Verdünnungen (10^{-2} bis 10^{-7}) erstellt. Zur Vorbereitung wurden Sf9-Zellen in Suspension bis 2×10^6 Zellen/ml gezüchtet und dann auf 6 cm Schalen in einem Volumen von 3 ml und einer Konzentration von 3×10^6 Zellen pro Schale ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen wurde das Medium entfernt und 500 µl der Baculovirus-Verdünnungen 10^5 bis 10^7 auf die jeweiligen Schalen tröpfchenweise pipettiert. Für die darauffolgende Stunde wurden die Schalen bei Raumtemperatur inkubiert und alle 15 min ausgiebig

geschwenkt. Nach einer Stunde wurden die Virusverdünnungen entfernt und 6 ml einer Agarose-Medium Matrix pro Schale auf die Zellen gegossen.

Tabelle 7: Ansatz für 5 Schalen Agarose-Medium-Gelmatrix

Material	Volumen [ml]
1,3 x Sf900 Medium	20
3 % Agarose in A. dest.	11
100 x Anti-Anti	0,15
FCS	1,65

Bevor die Materialien für die Agarose-Medium-Gelmatrix gemischt wurden, wurde die Agarose aufgeköcht. Nach Aushärtung der Gelmatrix wurde je Schale 2 ml Spodopan-Medium auf die Matrix pipettiert. Anschließend wurden die Schalen für 72 Stunden bei 27°C inkubiert. Nach drei Tagen wurde das Spodopan-Medium entfernt und eine steril-filtrierte Neutralrot-Lösung zur Verfärbung der entstandenen Baculoviren-Plaques genutzt. Die Färbelösung wurde nach zweistündiger Inkubation bei 27°C wieder entfernt. Plaques die unter dem Fluoreszenz-Mikroskop grün fluoreszierten wurden unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Pasteur-Pipette mitsamt der Gelmatrix in ein Eppendorfgefäß gefüllt mit 1 ml Spodopan-Medium transferiert (Passage 1). Dieses wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Titer-Bestimmung wurde die Virusverdünnung mit der Anzahl der Plaques sowie der Zahl 5 multipliziert. Die ermittelte Einheit wurde mit plaque forming units/ml angegeben. Zur Erzeugung von Baculoviren im höheren Maßstab wurde 500 µl des Volumens am folgenden Tag auf eine Schale mit adhären Sf9-Zellen gegeben und für 72 Stunden bei 27°C inkubiert (Passage 2). Bei grüner Fluoreszenz vieler Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop, erfolgte die Mobilisierung der Zellen mittels Abschaber und der Transfer der Lösung in einen vorbereiteten Kolben mit frischen Sf9-Zellen in Suspension. Nach weiteren 72 Stunden und Prüfung der grünen Fluoreszenz konnten die Suspensionen schließlich in 50 ml Tubes transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Dunklen lichtgeschützt z.B. durch einen Aluminiumfolienmantel gelagert werden. Die in den Suspensionen befindlichen Sf9-Zellen sinken im Tube rasch ab und aus dem Überstand können jederzeit Baculoviren entnommen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden stets Baculoviren der Passage 2 verwendet.

2.2.3.4.2 Produktion von AAV-Vektoren

Um AAV-Vektoren aus stabilen Sf9-Zellen zu gewinnen, bedarf es einer Infektion durch Baculoviren. Baculovirale Helfergene induzieren hierbei die Expression von *rep* und *cap* und somit die Produktion von AAV-Vektoren (s. 1.2.2.2.4). 30 ml Sf9-Zellkultursuspensionen mit mutmaßlich stabil integrierten *rep* und *cap* wurden bei einer Dichte von 2×10^6 mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 5 mit 1 ml Baculovirensuspension infiziert. Als Negativkontrolle wurden begleitend native Sf9-Zellen ebenfalls mit Baculoviren infiziert. Die infizierten Zellsuspensionen wurden anschließend für insgesamt 72 Stunden bei 27°C inkubiert. Nach 48 Stunden erfolgte eine orientierende optische Kontrolle eines kleinen Volumens der Zellkultur auf einem Objektglasträger bzw. einer Zellzählkammer unter dem Fluoreszenzmikroskop. Bei erfolgreicher Infektion konnte hierbei eine Fluoreszenz der Zellen festgestellt werden. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet.

2.2.3.5 Analyse von AAV-Vektoren

2.2.3.5.1 Ernte von AAV-Vektoren

72 Stunden nach Infektion mit Baculoviren wurden die Zellkulturen der verschiedenen Reihen geerntet. Von den 30 ml Zellsuspensionen wurden 27 ml in 50 ml Tubes transferiert und für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert (Ausschwingzentrifuge Megafuge 3.0 R). Das Pellet wurde in 1,5 ml Lysepuffer resuspendiert und in ein Eppendorf Gefäß transferiert. Zur Freisetzung der AAV-Vektoren aus den Sf9-Zellen erfolgten drei Frier-Tau-Zyklen mit Hilfe des minus 80°C Tiefkühlschranks und einem 37°C Wasserbades. Das wechselnde Einfrieren und Auftauen führt zur Zellyse. Anschließend wurde freie DNA und RNA durch 250 Units der DNase/RNase Benzonase (1 µl auf das Gesamtvolumen von 1,5 ml des Frier-Tau-Überstandes) bei 37°C für eine Stunde degradiert. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 10.000 g. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß transferiert und konnte im Folgenden u.a. zur Quantifizierung der gewonnenen rAAV genutzt werden. Für die Western Blot Analyse (s. 2.2.2.2) wurden 3 ml der Zellsuspensionen in 15 ml Tubes transferiert und bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert (Ausschwingzentrifuge Megafuge 3.0 R). Das Zellpellet wurde in 500 µl Proteinprobenpuffer resuspendiert und bei 95°C für 5 Minuten aufgeköcht.

2.2.3.5.2 Light Cycler PCR – quantitative Analyse

Für die Quantifizierung der rAAV, die pro Sf9-Zellklon gewonnen werden konnten, wurde eine quantitative PCR im Light Cycler System durchgeführt. Im Genom der AAV-Vektoren befindet sich ein bGH-Polyadenylierungssignal, welches durch die Primer BGA-1 und BGA-2 gebunden wird. Die so entstandene doppelsträngige DNA wird durch den Farbstoff SYBR Green gebunden. Der DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert gelbes Licht bei 494 nm und emittiert wiederum grünes Licht bei 521 nm. Letzteres wird vom Gerät gemessen und ermöglicht die Quantifizierung der freigesetzten AAV-DNA (genomische Partikel) pro Sf9-Zellklon. Dabei muss berücksichtigt werden, dass auch die für die Sf9-Zell-Infektion eingesetzten Baculoviren ein bGH-Polyadenylierungssignal der rAAV-Kassette tragen und somit auch quantifiziert werden. Da die einzelnen Sf9-Zellklone mit der gleichen Menge Baculoviren infiziert wurden, ergibt sich hinsichtlich der Anzahl entstandener rAAV eine Vergleichbarkeit. Zudem wurden als Negativkontrolle native Sf9-Zellen mit Baculoviren infiziert. Um Kapsidproteine der AAV-Vektoren und der Baculoviren zu eliminieren wurden je 50 µl eines Frier-Tau-Überstandes, wie in Tabelle 4 dargestellt, eingesetzt. Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei 56°C inkubiert.

Tabelle 8: Ansatz für einen Proteinase K-Verdau

Material	Volumen [µl]
Frier-Tau-Überstand	50
TE-Puffer	47
3 x DNA-Lysepuffer	50
Proteinase K (20 mg/ml)	2
pBluescript II SK (+)	1
Gesamtvolumen	150

Anschließend wurde eine Aufreinigung der DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.2.1.8) sowie eine Ethanol-Fällung (s. 2.2.1.9) durchgeführt. Das Bluescript-Plasmid wird hierbei co-präzipitiert und fungiert so als Carrier-DNA. Dies erhöht die Gesamteffizienz der DNA-Fällung insbesondere bei kleinen DNA-Mengen der zu untersuchenden Probe. Schließlich wurden die Pellets in 50 µl A. dest. resuspendiert. Zur Vorbereitung der Light Cycler PCR wurde die DNA zusätzlich 1:100 in A. dest. verdünnt. Als Konzentrationsstandard wurde ein bGH-

Polyadenylierungssignal aufweisendes pTR-Bac-UF26-Plasmid in den Konzentrationen 10^5 , 10^6 und 10^7 verwendet. Die Ansätze wurden, wie in Tabelle 9 dargestellt, erstellt und in Glaskapillaren gefüllt. Die Glaskapillaren wurden für wenige Sekunden zentrifugiert, um die Flüssigkeit im Hals der Kapillaren zu nivellieren.

Tabelle 9: Ansatz für die Light Cyclers PCR

Material	Volumen [µl]
PCR-Mix	2,5
Primer BGA-1	0,25
Primer BGA-2	0,25
A. dest.	0,75
25 mM MgCl ₂	1
DNA aus Frier-Tau-Überstand (1:100)	1,25
Gesamtvolumen	6

Nachfolgend ist das Light-Cycler PCR Programm aufgeführt.

Tabelle 10: Light Cyclers PCR Temperaturprogramm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Geschwindigkeit [°C/s]	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	95	600		1
2. Amplifikation				40
2.1 Denaturierung	95	0		
2.2 Annealing	60	4		
2.3 Elongation	72	15	20	
3. Schmelzkurve	95	0		1
	60	60	20	
	95	0	0,1	

Um die tatsächliche Konzentration der AAV-Vektoren in den Frier-Tau-Überständen zu berechnen, mussten die in der Light Cyclers PCR ermittelten Werte, die sich auf das Volumen in den Glaskapillaren bezieht, hochgerechnet werden. Hierfür wurde

folgender Faktor (s. Tabelle 11) bestimmt. Die einzelnen Light Cycler Werte wurden mit dem Faktor 4800 verrechnet und die bestimmten Konzentrationen der AAV-Vektoren pro Frier-Tau-Überstand für den anschließend durchgeführten Transduktionsassay (s. 2.2.3.5.3) verwendet.

Tabelle 11: Herleitung des Faktors zur Bestimmung der genomischen Partikel pro Frier-Tau-Überstand

Verdünnungsschritt	Faktor
Light Cycler PCR Wert	1
1,25 µl in PCR-Ansatz (6 µl gesamt)	4,8
1 : 100 Verdünnung	480
1 : 3 Verdünnung im Rahmen der DNA Aufreinigung	~1400
Verbleibendes Restvolumen des Frier-Tau-Überstandes 1 ml =	2400
Faktor x 2 rAAV-Partikel (ssDNA), Standard-Plasmide (dsDNA)	4800

2.2.3.5.3 Transduktionsassay – qualitative Analyse

Um die Infektiosität der generierten AAV-Vektoren zu prüfen, wurde ein im OneBac-System etabliertes Modell mit C12-Zellen genutzt, welches im Folgenden als Transduktionsassay bezeichnet wird. Hierbei beruht das Prinzip darauf, dass bei erfolgreicher Infektion der C12-Zellen mit rAAV das im Genom codierte Green fluorescent protein exprimiert wird. Die emittierte Fluoreszenz kann mit Hilfe der fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Analyse detektiert werden.

Um das Volumen an Frier-Tau-Überstand für die Transduktion zu bestimmen, wurden die in der quantitativen PCR ermittelten und hochgerechneten Werte genutzt. Anhand folgender Formel wurde das Volumen an Frier-Tau-Überstand für die Transduktion berechnet.

Tabelle 12: Herleitung des Transduktionsvolumens pro Frier-Tau-Überstand [µl]

C12-Zellen/ Wellfeld (24-Well Schale)	MOI	
400.000 x	1000	/ Vektorkonzentration in
	10.000	gp/µl

Zur Vorbereitung wurden in einer 24-Well Schale C12-Zellen ausgesät. 500µl DMEM wurden vorgelegt und um 100 µl C12-Zellen ergänzt. Am folgenden Tag konnte der

Transduktionsassay begonnen werden. Zu Beginn des Transduktionsassays wurde das DMEM bis auf 100 µl entfernt. Als MOI für die Infektion der C12-Zellen mit rAAV5-GFP wurde ein Wert von 1000 oder 10.000 angesetzt. Das jeweilige Volumen aus den Frier-Tau-Überständen oder gereinigten Vektorkonzentraten wurde auf die C12-Zellen gegeben. Zusätzlich wurden die C12-Zellen mit den hierbei als Helferviren fungierenden Adenoviren Typ 2, die vom Labor bereitgestellt wurden, bei einer MOI von 10 überinfiziert. Die 24-Well Schale wurde für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und alle 15 min geschwenkt, um eine suffiziente Verteilung der Virussuspension zu erreichen. Im Anschluss wurde das Volumen mit DMEM auf 600 µl je Well-Feld erhöht und die Schale für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte eine erste visuelle Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop. Bei erfolgreicher Infektion der C12-Zellen konnte eine grüne Fluoreszenz der Zellen festgestellt werden. 48 Stunden nach der Infektion wurden die C12-Zellen abgespült und die Suspensionen in Eppendorf Gefäße transferiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet schließlich in 4% Formaldehyd-haltigen PBS resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen transferiert. Bis zur Verwendung in der FACS-Analyse wurden die FACS-Röhrchen auf Eis gelagert. Unmittelbar vor der FACS-Analyse wurden die FACS-Röhrchen kurz gevortext. Darüber hinaus wurde das Protokoll der FACS-Analyse der Firma Becton & Dickinson für das Gerät FACS Calibur befolgt.¹⁰⁵ Für die FACS-Analyse wurden 100.000 Zellen pro Probe gezählt. Der Anteil GFP-positiver Zellen wurde entsprechend den Herstellerprotokollangaben festgelegt.¹⁰⁵ Zellen, die über 30 im FL1-H Kanal erreichten, wurden als positiv gezählt. Der FL1-H Kanal detektiert Licht bei 530 nm (grünes Licht).

3. Ergebnisse

3.1 Hintergrund: OneBac2.0

In der Arbeit von Mietzsch et al. zeigte sich ein grundsätzliches Problem von rAAV5 – eine ineffiziente Transduktionseffizienz.⁶ Da VP1 mit seiner Phospholipase-Domäne essentiell für das Verlassen der Endosome nach viraler Infektion bzw. vektorieller Transduktion ist, liegt die Vermutung nahe, dass die verminderte VP1-Expression die schwache Infektiosität der AAV5-Vektoren im OneBac-System verursacht. Ziel dieser Arbeit war deshalb eine Steigerung der VP1-Expression zur Optimierung der Transduktionseffizienz der AAV5-Vektoren bei weiterhin hohen Vektorausbeuten im OneBac-Produktionssystem. Hierfür wurde auf Basis eines artifiziellen Introns ein verändertes *cap*-tragendes pIR-Plasmid hergestellt (pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺) und mit dem bereits vorhandenen pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE⁺ in Sf9-Zellen kotransfiziert. Im Anschluss wurden beide pIR-Plasmide durch das Entfernen der Rep-Bindestelle modifiziert, um die Herstellung transduktionseffizienter AAV5-Vektoren bei möglichst geringer verpackter viraler DNA zu ermöglichen.

3.1.1 Veränderung des AAV5-*cap* auf Basis eines artifiziellen Introns

Da das von Mietzsch et al. verwendete Expressionsplasmid für AAV5-*cap* nur zu minimaler VP1-Expression führte, wurde die Expression der VP-Gene mithilfe einer artifiziellen Intronsequenz verändert, die in einem anderen zellulären Kontext zu einer erhöhten VP1-Expression bei rAAV1, 2, 6 und 8 geführt hatte.⁹⁵

Zudem wurde im Gegensatz zum AAV5-*cap* von Mietzsch et al. das Startcodon von VP1 analog zu der Publikation von Chen et al. von ACG zu ATG geändert.

Das artefizielle Intron enthält hierbei einen zusätzlichen Polyhedrin-Promoter. Der erste Polyhedrin-Promoter, der *cap* vorgeschaltet ist, steuert nun die Expression von VP1 während der zweite, in der Intronsequenz lokalisierte Polyhedrin-Promoter, die Synthese von VP2/3 regelt. Nach Transkription des VP1-Gens wird die Intronsequenz aus der VP1-mRNA gespleißt. Die VP2/3-mRNAs werden wie beim Wildtyp-Virus stromaufwärts gespleißt (s. Abbildung 7). Die erwartete Steigerung der VP1-Expression sollte die Infektiosität der AAV5-Partikel und die Transduktionseffizienz durch rAAV5 steigern. In der vorliegenden Arbeit wurde auf Basis der von Chen et al. beschriebenen Intronsequenz eine neue Intronsequenz samt N-terminalem VP1-Anteil synthetisiert und für die folgenden Klonierungen von pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺ genutzt (s. Tabelle 1).

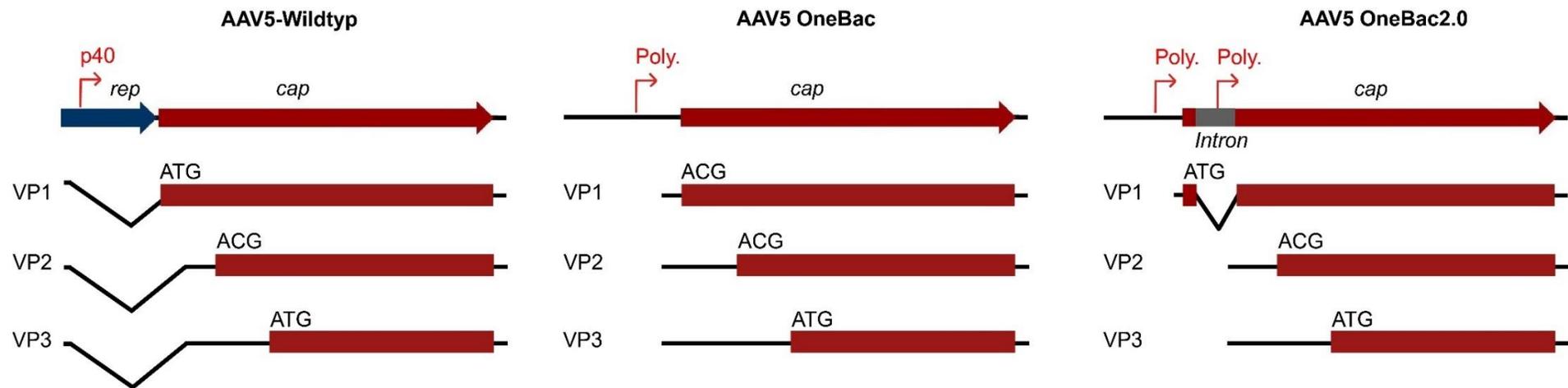


Abbildung 7: **cap von AAV5-Wildtyp, OneBac und OneBac2.0 im Vergleich.** Dargestellt sind die Kapsidgene des AAV5-Wildtyp-Genoms des in der OneBac-Publikation verwendeten pIR-Cap-AAV5-RBE⁺-Plasmids sowie des neuartigen pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺-Plasmids. Ebenfalls abgebildet sind die jeweiligen drei *cap*-Transkripte (VP1, 2, 3) mit den korrespondierenden Startcodons. Das Startcodon von VP1 wurde im Rahmen der Herstellung des pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺-Plasmids wieder zu ATG mutiert. Die schmalen Linien stellen die Primärtranskripte, die gezackten Linien die Intronsequenzen dar. Die roten Pfeile zeigen die Promotoren (Polyhedrin- und P40-Promoter) an. Die Expression der gesamten *cap*-Sequenz wird beim AAV5-Wildtyp-Genom über den P40-Promoter und beim pIR-Cap-AAV5-RBE⁺-Plasmid der OneBac-Publikation über den Polyhedrin-Promoter gesteuert. Die Expression der *cap*-Sequenz des pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺-Plasmids wird über zwei Polyhedrin-Promotoren geregelt. Hierbei steuert der vor *cap* gelegene Polyhedrin-Promoter die VP1-Synthese, während die VP2- und VP3-Synthese durch den zweiten in der *cap*-Sequenz lokalisierten Polyhedrin-Promoter geregelt wird. Die Sequenz des zweiten Polyhedrin-Promoters befindet sich dabei in einem Intron, welches aus dem VP1-Primärtranskript ausgespleißt wird.

3.1.2 Deletion der Rep-Bindestelle (RBE)

Im Verlauf der Analyse mehrten sich Hinweise, dass durch die Präsenz der Rep-Bindestelle vor den *rep*- und *cap*-Sequenzen der ursprünglichen pIR-Plasmide von Aslanidi et al. nicht nur – wie gewünscht – die *rep*- und *cap*-Genexpression hochreguliert wird, sondern durch die Plasmidamplifikation Teile der Plasmid-DNAs insbesondere *rep*- bzw. *cap*-Gensequenzen in die rAAVs verpackt werden. Das gehäufte Vorkommen von Fremd-DNA in AAV-Vektoren des OneBac-Systems wurde von Mietzsch et al. beobachtet.⁶ Ursächlich könnte die auf den Plasmiden vorhandene Rep-Bindestelle sein, die auch als Verpackungssignal für AAV-Vektoren dient.²⁵ Einer der wichtigsten Ansprüche an virale Vektoren ist, dass sie möglichst wenig Fremd-DNA enthalten. Um diese Annahme zu verifizieren und zu testen, ob das Verpackungssystem auch ohne RBE Signal funktioniert, wurde aus den Plasmiden pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺ und pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE⁺ die Rep-Bindestelle mittels Restriktionsenzymen entfernt.

3.2 Produktion der AAV5-Vektoren

3.2.1 Herstellung von pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺

Für die Herstellung des pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺-Plasmids wurde das VP1-Intron-Fragment mit den Primern VP-1-Intron-Fwd und VP-1-Intron-Rev mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurde das VP-1-Intron-Fragment PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I geschnitten und mit dem pBluescript II SK (+) (pBS)-Plasmid, welches vorab ebenfalls mit *Bam*HI und *Pst*I geschnitten wurde, ligiert. Das entstandene pBS-VP1-Intron-Plasmid wurde im Rahmen der Plasmidpräparation vervielfältigt und aufgereinigt. Daraufhin wurde das VP-1-Intron-Fragment aus dem Plasmid mit Hilfe von *Sap*I geschnitten und abschließend mit *Bam*HI verdaut. Somit lag das fertige VP-1-Intron-Insert vor (s. Abbildung 8 A). Das VP2/3-Fragment wurde mit den Primern VP2/3-Fwd und PA-1 aus dem Plasmid pDP5, welches die AAV5 *cap*- und *rep*-Gene enthält, mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurde das VP2/3-Fragment PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Xba*I geschnitten und mit dem pUC 131 (pUC)-Plasmid, welches vorab ebenfalls mit *Eco*RI und *Xba*I geschnitten wurde, ligiert. Das entstandene pUC-VP2/3-Plasmid wurde im Rahmen der Plasmidpräparation vervielfältigt und aufgereinigt. Daraufhin wurde das VP-2/3-Fragment aus dem

Plasmid mit Hilfe von *AseI* geschnitten und abschließend mit *SapI* und *XbaI* verdaut. Somit lag auch das fertige VP-2/3-Insert vor (s. Abbildung 8 B). Für die Ligation des pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺-Plasmids wurde die *cap*-Sequenz mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamHI* und *XbaI* aus dem pIR-Cap-AAV2-RBE⁺-Plasmids geschnitten. Im Anschluss wurden das VP1-Intron-Fragment, das VP2/3-Fragment und der vorbereitete pIR-Rahmen zusammen ligiert (s. Abbildung 8 C). Abschließend wurde das gewonnene Plasmid sequenziert und als pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺ bezeichnet. Die gewünschte DNA-Sequenz konnte in der Sequenzierung des gesamten Plasmids bestätigt werden.

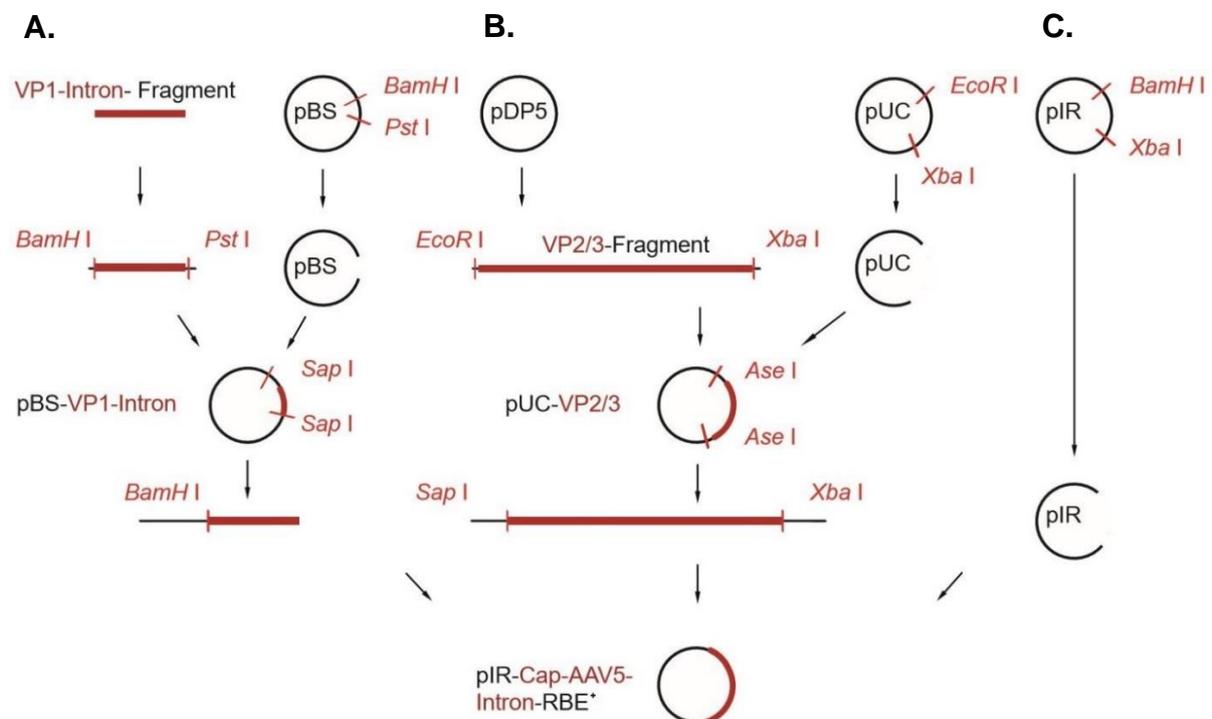


Abbildung 8: **Herstellung des pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺-Plasmids.** **A.** Das VP1-Intron-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert, mit *BamHI* und *PstI* geschnitten und mit dem pBluescript II SK (+)-Plasmid (pBS)- ligiert. Anschließend wurde das VP-1-Intron-Fragment mit *SapI* aus dem pBS-VP1-Intron-Plasmid geschnitten und mit *BamHI* verdaut. **B.** Das VP2/3-Fragment wurde aus dem Plasmid pDP5 mittels PCR amplifiziert, mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten und mit dem pUC 131-Plasmid (pUC) ligiert. Daraufhin wurde das VP-2/3-Fragment aus dem pUC-VP2/3-Plasmid mit *AseI* geschnitten und abschließend mit *SapI* und *XbaI* verdaut. **C.** Die *cap*-Sequenz wurde mit *BamHI* und *XbaI* aus dem pIR-Cap-AAV2-RBE⁺-Plasmids (pIR) geschnitten und stattdessen das VP1-Intron-Fragment und das VP2/3-Fragment in den pIR-Rahmen kloniert.

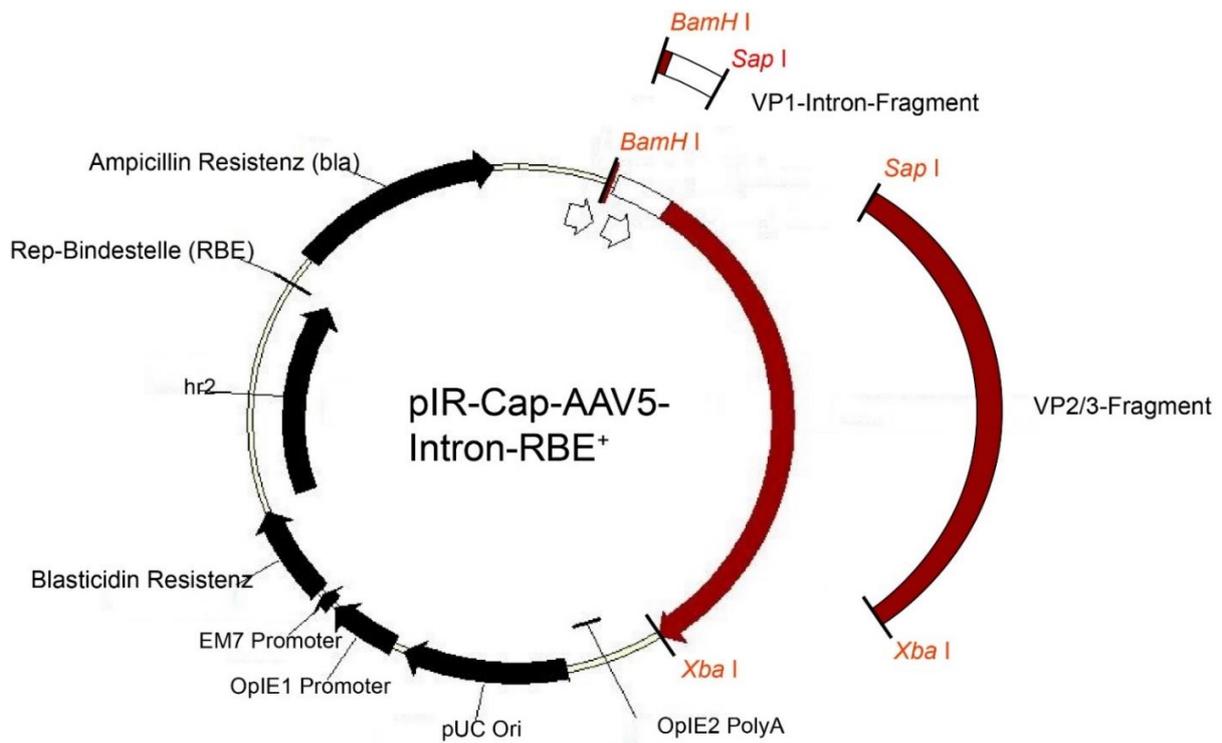


Abbildung 9: **pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺-Plasmid**. Das fertige Plasmid in der Blow-Up-Darstellung mit dem VP1-Fragment, dem VP2/3-Fragment und den Schnittstellen der Restriktionsenzyme.

In Abbildung 10 sind die Plasmide pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺ und pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE⁺ dargestellt.

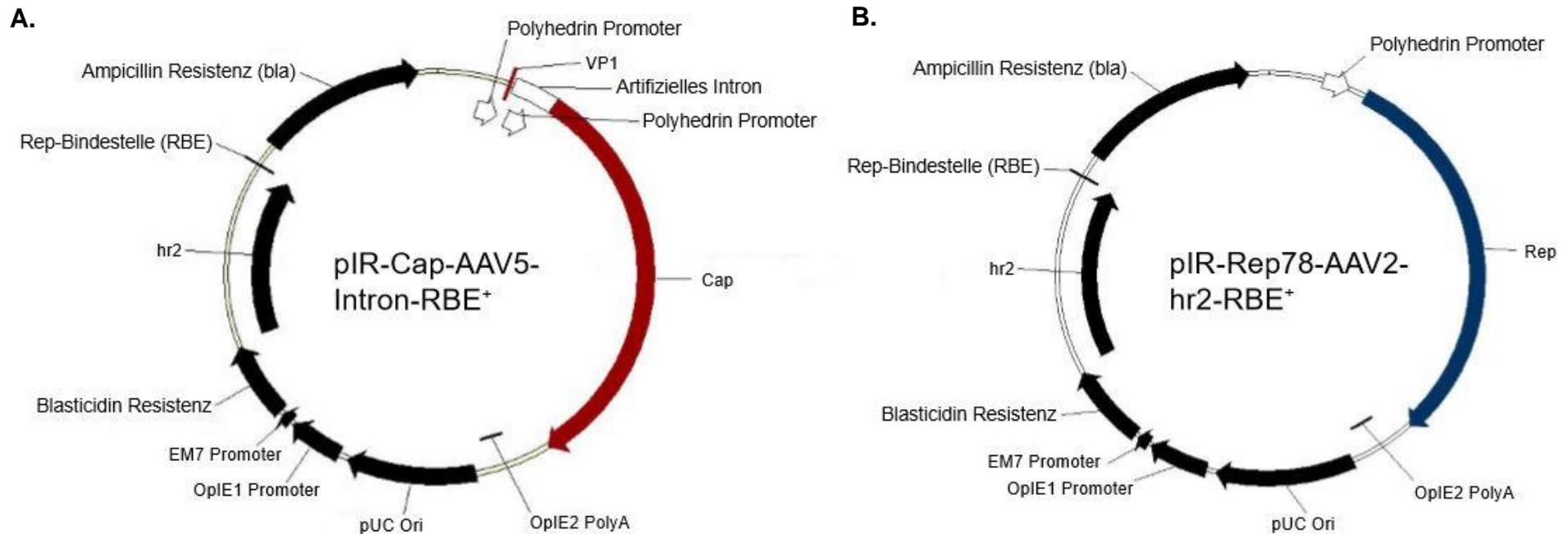


Abbildung 10: **pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺** und **pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE⁺**. Die pIR-Plasmide enthalten die *rep*- oder *cap*-ORFs, die durch einen vorgeschalteten Polyhedrin-Promoter gesteuert werden. Zudem enthält das pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺-Plasmid einen zusätzlichen im *cap*-ORF in Form eines Introns lokalisierten Polyhedrin-Promoters, der die Expression von VP2 und VP3 steuert. Das Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) ermöglicht das Wachstum von transfizierten Sf9-Zellklonen in Ampicillin-haltigem Medium. Das Blastocidin-Resistenzgen ermöglicht die Selektion von transfizierten Sf9-Zellklonen. Die homologe Region 2 (*hr2*) in Interaktion mit dem baculoviralen Faktor IE-1 aktiviert die Polyhedrin-Promotoren und somit die *Rep*- und *Cap*-Expression. Die *Rep*-Bindestelle erhöht die Synthese der *Rep*- und *Cap*-Proteine. EM7- und OpIE1-Promoter steuern die Expression der Blastocidin Resistenz. Die pUC Ori-Sequenz fungiert als Replikationsstartpunkt (ORI, englisch origin of replication), die OpIE2 PolyA-Sequenz als Polyadenylierungssignal (PolyA).

3.2.2 Herstellung von pIR-Cap-AAV5-Intron- Δ RBE und pIR-Rep78-AAV2-hr2- Δ RBE

Die Plasmide pIR-Cap-AAV5-Intron- Δ RBE und das pIR-Rep78-AAV2-hr2- Δ RBE wurden aus den vorab hergestellten pIR-Cap/Rep78-AAV5-(Intron)-RBE⁺-Plasmiden gewonnen. Mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bgl*II wurde die Rep-Bindestelle aus beiden pIR-Cap/Rep78-AAV5-(Intron)-RBE⁺-Plasmiden geschnitten. Anschließend erfolgte eine Ligation sowie abschließend eine Sequenzierung des gesamten Plasmids. Die Plasmide wurden als pIR-Cap-AAV5-Intron- Δ RBE und pIR-Rep78-AAV2-hr2- Δ RBE bezeichnet (s. Abbildung 11).

3.2.3 Pooltestung

Zur Herstellung stabiler Insektenzelllinien (AAV5-RBE⁺-Zellklone und AAV5- Δ RBE-Zellklone) wurden die *rep*- und *cap*-tragenden Plasmide mit Lipofektin in Sf9-Zellen kotransfiziert. Während anschließend Verdünnungsreihen unter Blasticidin-Selektion erstellt wurden, erfolgte parallel eine Pooltestung der AAV5-RBE⁺-Zellklon-Testreihe ohne Blasticidin-Selektion. Hierfür wurde eine Teilmenge der kotransfizierten, unselektierten Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren (Bac-rAAV-GFP) infiziert und die Rep- und Cap-Expression im Western Blot untersucht. Als Vergleich wurden AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen des OneBac Sf9-Zellklons #6, der keinen zusätzlichen Polyhedrin-Promoter (in Form eines artifiziellen Introns) besitzt sowie AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen von pDG-Plasmid-transfizierten HEK 293-Zellen genutzt. Diese wurden im Rahmen der OneBac-Publikation hergestellt und waren im Labor vorhanden.⁶ In Abbildung 12 zeigt sich eine stärkere Expression der VP1- und VP2-Kapsidproteine der AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren (in Abbildung 12 als Art. Intron bezeichnet) im Vergleich zu den Kapsidproteinen der AAV5-Vektoren, die aus Sf9-Zellklon #6 und aus HEK 293-Zellen gewonnen wurden. Aus diesem Ergebnis leitet sich ab, dass durch Einbringen des artifiziellen Introns mit zusätzlichem Polyhedrin-Promoter tatsächlich eine höhere VP1-Expression möglich ist.

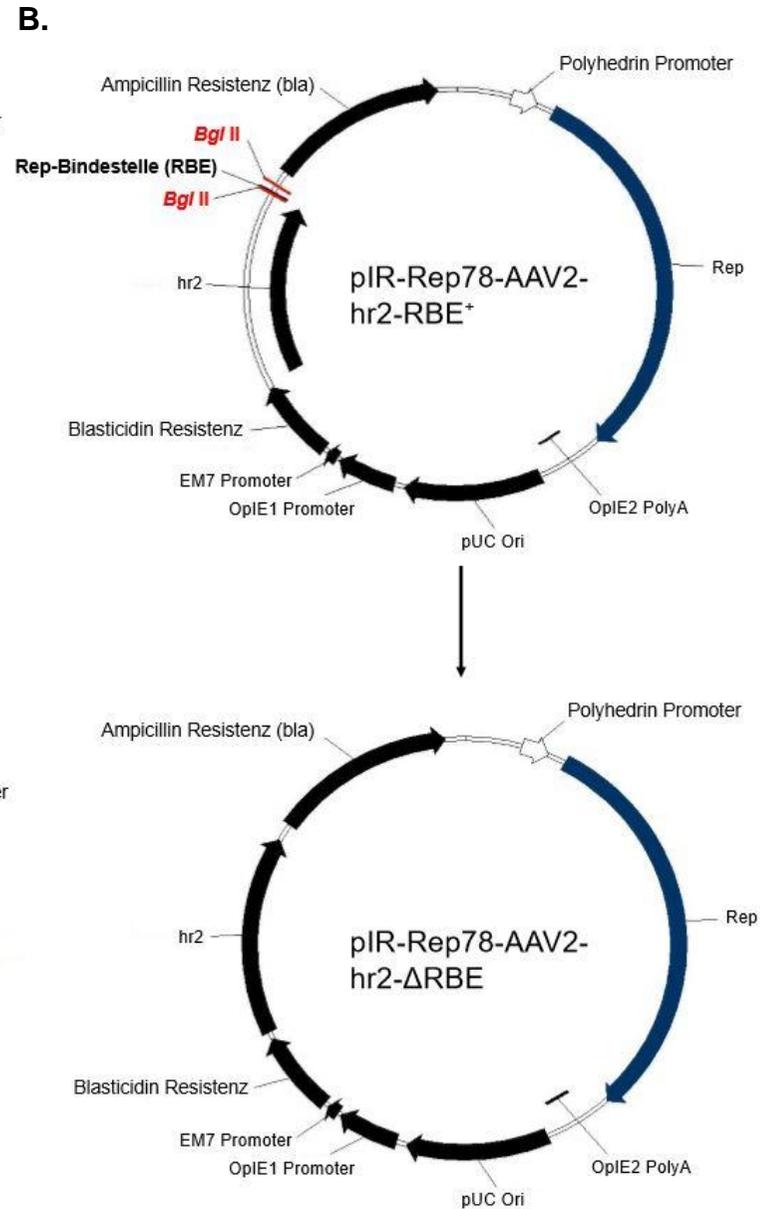
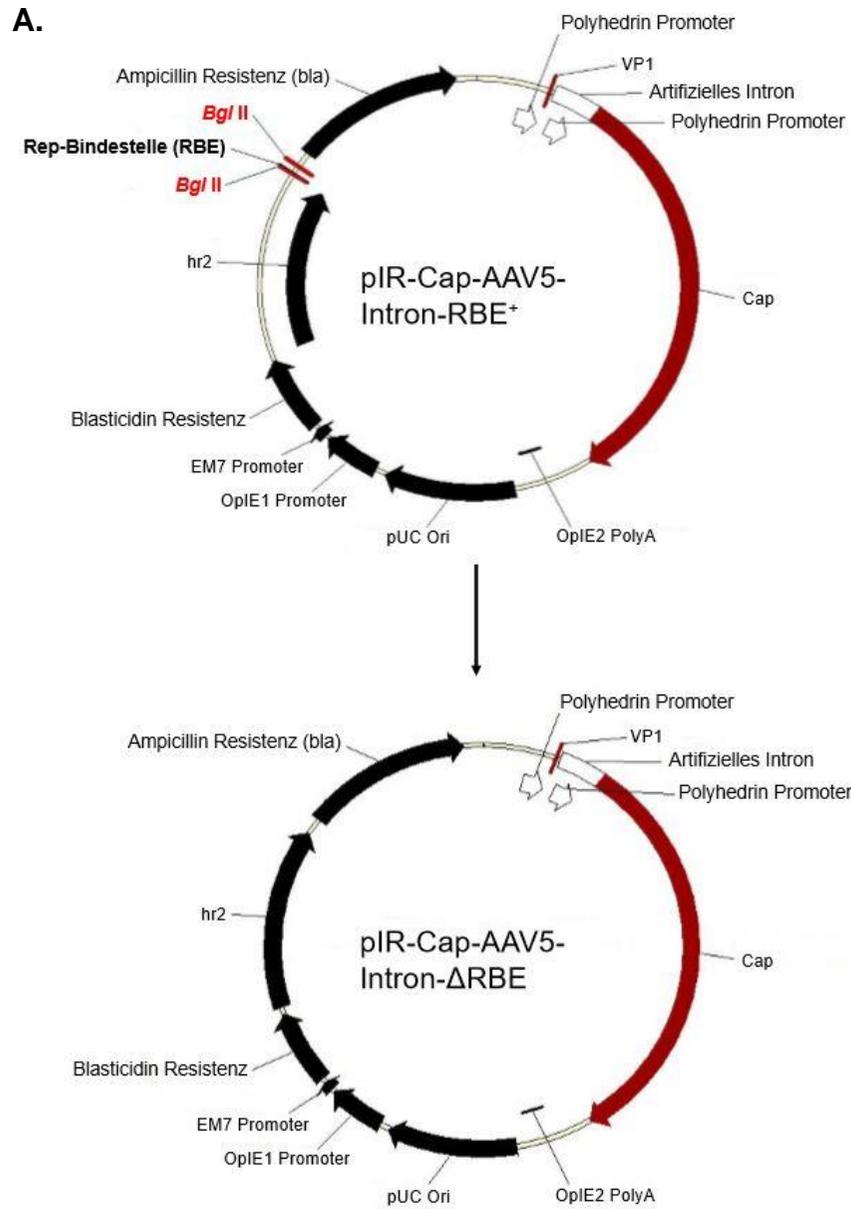
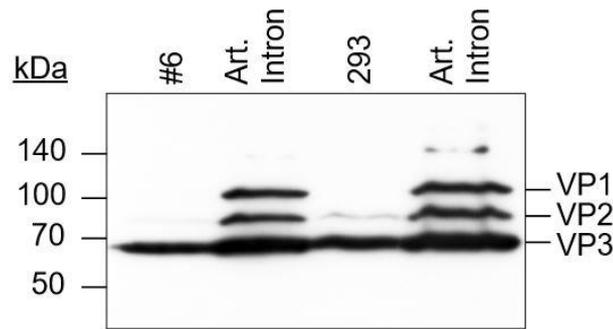


Abbildung 11:
Herstellung der pIR- Δ RBE-Plasmide.

A. Die Rep-Bindestelle (RBE) wurde mit *Bgl* II aus dem pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺-Plasmid geschnitten.

B. Die Rep-Bindestelle (RBE) wurde ebenfalls mit *Bgl* II aus dem pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE⁺-Plasmid geschnitten.

A.



B.

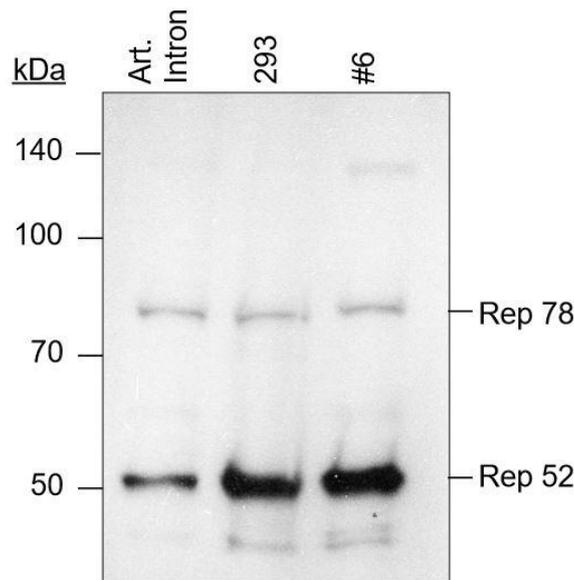


Abbildung 12: **Western Blot der Kapsidproteine und Replikationsproteine von AAV5-Vektoren im Vergleich.** Eine 6cm² Zellkulturschale mit Sf9-Zellen nach Transfektion mit pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺ wurde mit Bac-rAAV-GFP infiziert und nach 3 Tagen geerntet. Die Suspension wurde in ein 15 ml Tube transferiert und bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl Proteinprobenpuffer resuspendiert sowie bei 95°C aufgeköcht. Für die Western Blot Analyse wurden die Proteinproben in einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Membrantransfer mit dem monoklonalen B1 Antikörper (**A**) oder dem monoklonalen 303.9 Antikörper (**B**) inkubiert. Abschließend konnten die Banden mittels Western Lightning Plus-ECL detektiert werden. Art. Intron entspricht der unselektierten Zellsuspension aus Sf9-Zellen transfiziert mit pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺ und pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE⁺. Im Vergleich sind die Kapsid- und Replikationsproteine aus den stabilen Zellklonen #6 und 293 dargestellt.

3.2.4 AAV5-RBE⁺-Zellklone

Das Selektionsverfahren, welches im Anschluss an die Kotransfektion mit pIR-Cap-AAV5-Intron-RBE⁺ mit pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE⁺ angewandt wurde (s. Abbildung 13), basiert auf einem auf beiden Plasmiden enthaltenen OpIE1-Promoter. Dieser exprimiert die Blastocidin S Deaminase, welche das Antibiotikum Blastocidin inaktiviert.⁸⁵ Durch Zugabe von Blastocidin in das Medium sterben Zellen ohne

Blasticidin S Deaminase ab. 90 Einzelklone wurden isoliert und unter Blasticidin-Selektion (bis zur Suspension in Kolben) weiterpassagiert. 47 Zellklone überlebten den Selektionsprozess und konnten schließlich in 30 ml Suspensionen transferiert werden. Von den Suspensionen wurden 2 Proben von jeweils 1×10^7 Zellen entnommen und eingefroren (s. 2.2.3.1.3). 35 Zellklone wurden bei einer Dichte von 2×10^6 pro ml mit Bac-rAAV-GFP infiziert. Nach 72 Stunden konnten die entstandenen AAV5-RBE⁺-Vektoren mittels Frier-Tau-Verfahren geerntet werden.

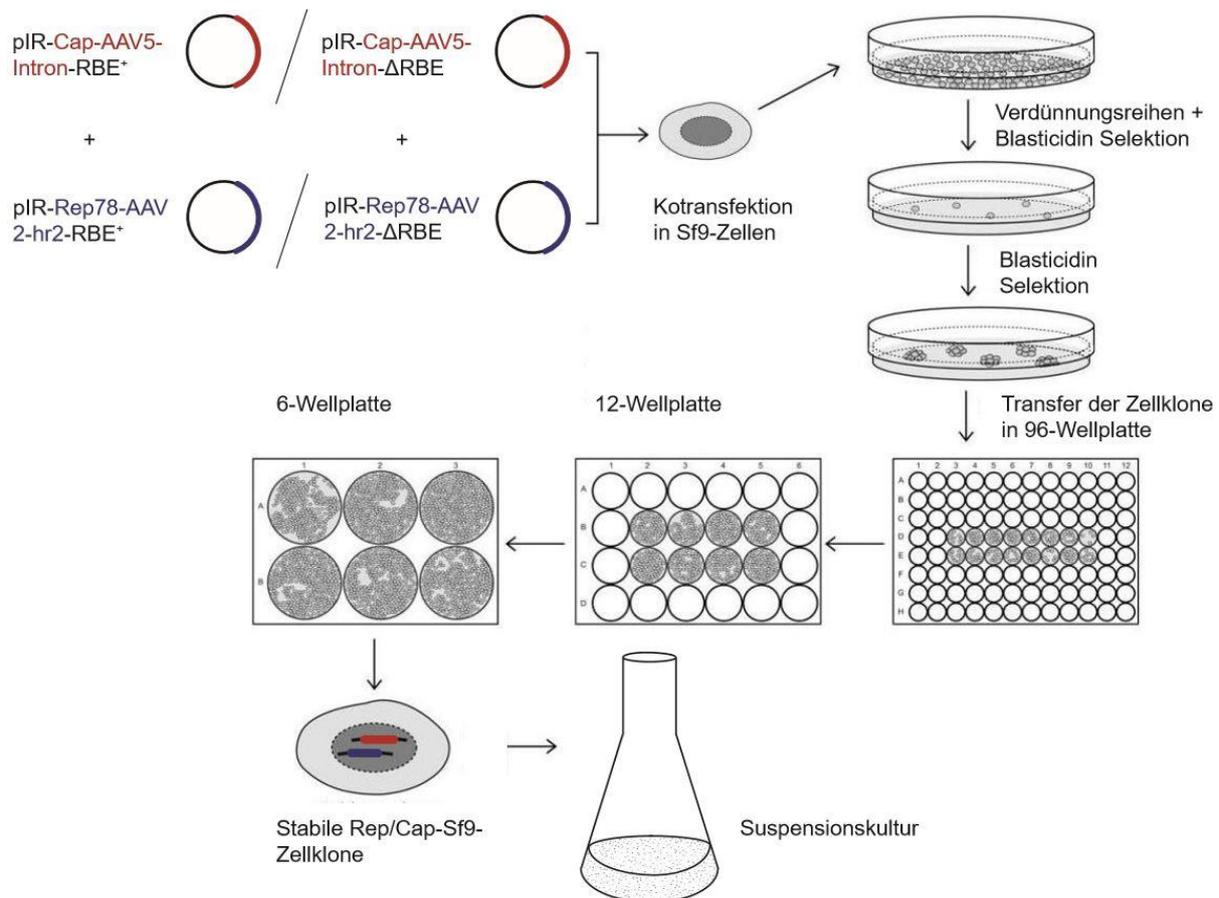


Abbildung 13: **Selektionsverfahren der transfizierten Sf9-Zellklone.** Die pIR-Cap-AAV5 bzw. -Rep-AAV5-Plasmide wurden in den RBE⁺ und ΔRBE-Versuchsreihen in Sf9-Zellen kointransfiziert. Verschiedene Verdünnungsreihen wurden unter Blasticidin-Zugabe angesetzt und von diesen Einzelzellklone in 96-well-Platten transferiert. Unter Blasticidin-Selektion wurden die Zellklone bis zur 6-Wellplatte passagiert. Anschließend wurden die stabilen *rep/cap*-Sf9-Zellklone in Suspension kultiviert. Modifiziert nach Mietzsch et al. 2017.¹⁰⁶

3.2.5 AAV5-ΔRBE-Zellklone

Nach Lipofektin-Kointransfektion von pIR-Cap-AAV5-Intron-ΔRBE pIR-Rep78-AAV2-hr2-RBE⁺ wurden 20 Einzelklone analog zu den AAV5-RBE⁺-Zellklonen passagiert. 12 Zellklone überlebten den Selektionsprozess und konnten in Suspension gebracht

werden. Von den Suspensionen wurden 2 Proben von jeweils 1×10^7 Zellen entnommen und eingefroren (s. 2.2.3.1.3). 12 Zellklone wurden bei einer Dichte von 2×10^6 pro ml mit Bac-rAAV-GFP infiziert. Nach 72 Stunden konnten die entstandenen AAV5- Δ RBE-Vektoren mittels Frier-Tau-Verfahren geerntet werden.

3.3 Analyse der AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren

3.3.1 Western Blot

Die aufbereiteten AAV5-Vektoren aus 47 AAV5-RBE⁺-Zellklonen wurden mittels Western Blots untersucht. Aus Kapazitätsgründen erfolgte der erste Western Blot-Durchgang mit 35 Vektoren (s. Abbildung 14). 18 Vektoren (C3A, C5A, C6A, C6B, C9B, C10B, D2C, D3B, D6A, D5B, D7A, D9A, E5B, E10B, F2C, F3B, F5C, F9A) zeigten eine starke Expression von VP1, 2 und 3. Bei 4 Vektoren (D4B, D8B, E4B, E7A) war die VP1- und VP2-Expression reduziert und bei weiteren 4 Vektoren (D5A, D7B, E2C, F10A) war lediglich VP3 über der Nachweisgrenze. Bei 9 Vektoren (C8A, C8B, D3A, D6B, E5C, F5A, F6C, F7A, F8C) konnte keine VP-Expression nachgewiesen werden. Ursächlich könnte hierbei z.B. ein Verlust der Transgenkassette des Bac-rAAV-GFP gewesen sein. Wie aus den Ergebnissen mit den Zellpools zu erwarten, zeigte sich bei der überwiegenden Anzahl der getesteten AAV5-Vektoren eine erhöhte VP1- und VP2-Konzentration gegenüber den aus Plasmid-transfizierten HEK 293-Zellen gewonnenen AAV5-Vektoren. Die Spezifität des Antikörper-Nachweis ist hoch, es zeigten sich keine kreuzreagierenden Proteinbanden bei Proben aus nativen Sf9-Zellen, die als Negativkontrolle dienen. Im zweiten Durchgang wurden 8 bereits getestete AAV5-Vektoren und die ungetesteten 12 Vektoren mit AAV5-Vektoren aus dem OneBac Sf9-Zellklon #6 (ohne zusätzlichen Polyhedrin-Promoter) mittels Western Blot verglichen (s. Abbildung 15). Bei 17 Vektoren (C6B, D3A, D5A, D7B, D8B, D8C, E4C, E5B, E8B, E9C, F4A, F4C, F5B, F6A, F8B, F8C, F10A) zeigte sich eine starke Expression aller Kapsidproteine im Vergleich zu einer geringeren VP1-Expression der Vektoren aus dem OneBac Vergleichszellklon #6 und Vektoren aus Plasmid-transfizierten HEK 293 Zellen. Bei 3 Vektoren (D3C, D10C, E3C) zeigte sich eine geringere VP1- und VP2-Expression. Bei den 8 bereits getesteten Vektoren bestätigte sich die starke Kapsidproteinexpression. Bei den Vektoren D3A, D5A, D7B, F8C und F10A hatte sich im ersten Durchgang kaum oder keine Expression der Kapsidproteine gezeigt. In der in Abbildung 15 gezeigten zweiten Testung wiesen diese Vektoren, die aus

erneut in Suspension gebrachten und abermals mit Bac-rAAV-GFP infizierten AAV5-RBE⁺-Zellklone gewonnen wurden, nun allesamt eine starke Kapsidproteinexpression auf. Dies könnte bei erneuter Kultivierung in Suspension und Baculovirus-Infektion der Zellklone auf den nun regelrechten Erhalt der Transgenkassette des Bac-rAAV-GFP zurückzuführen sein.

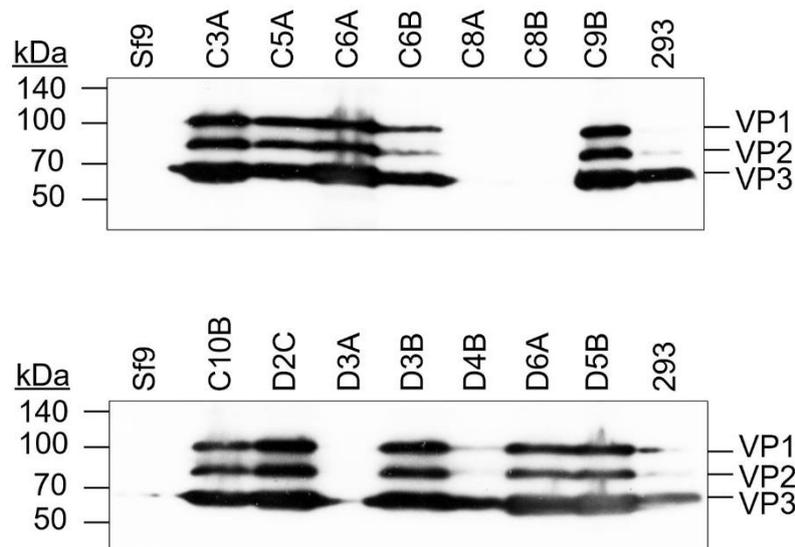
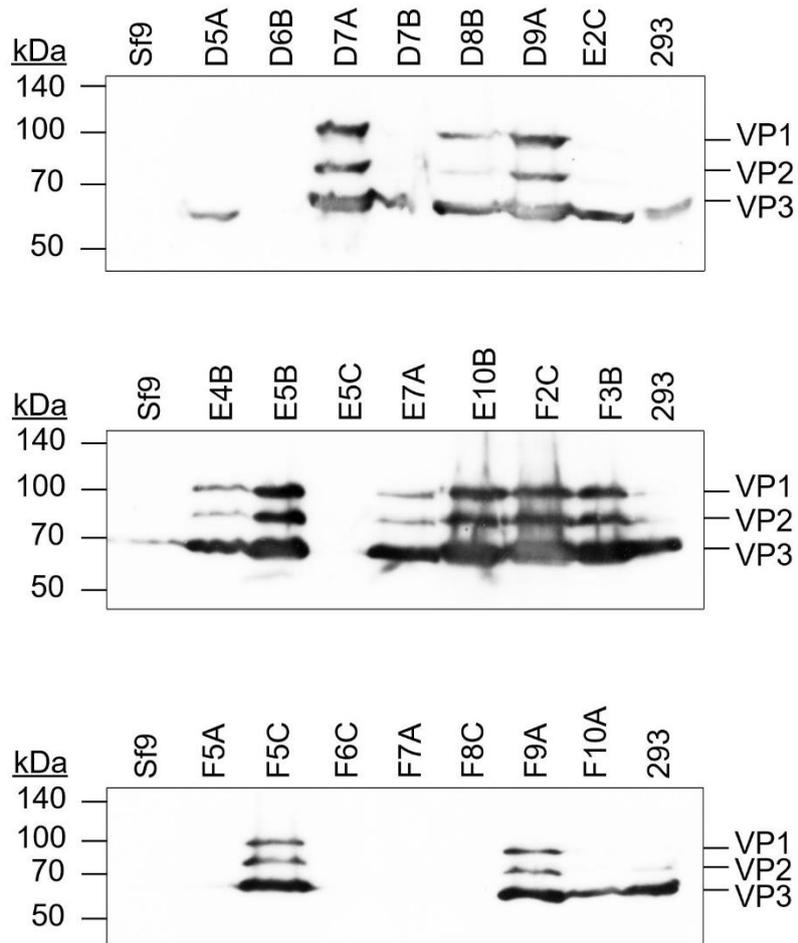


Abbildung 14: Western Blot der Kapsidproteine von AAV5-Vektoren aus 35 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen im Vergleich zu nativen Sf9-Zellen und AAV5-Vektoren aus 293-Zellen. 30 ml Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit Bac-rAAV-GFP infiziert (MOI=5) und nach 3 Tagen geerntet. Je 3 ml der Kultur wurden in 15 ml Röhrchen transferiert und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 μ l Proteinprobenpuffer resuspendiert und bei 95°C aufgeköcht. Die μ l-Menge der verwendeten Proteinproben wurde zur besseren Vergleichbarkeit anhand der in der quantitativen PCR ermittelten rAAV5-Konzentrationen festgelegt. Für die Western Blot Analyse wurden die Proteinproben in einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Membrantransfer mit dem monoklonalen B1 Antikörper inkubiert. Abschließend konnten die Banden mittels Western Lightning Plus-ECL detektiert werden. Sf9 entspricht einer nativen Zellsuspension aus Sf9-Zellen als Negativkontrolle. 293 entspricht den rAAV5 aus HEK-293-Zellen, die mitanalysiert wurden.



Fortsetzung Abbildung 14: **Western Blot der Kapsidproteine von AAV5-Vektoren aus 35 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen im Vergleich zu nativen Sf9-Zellen und AAV5-Vektoren aus 293-Zellen.**

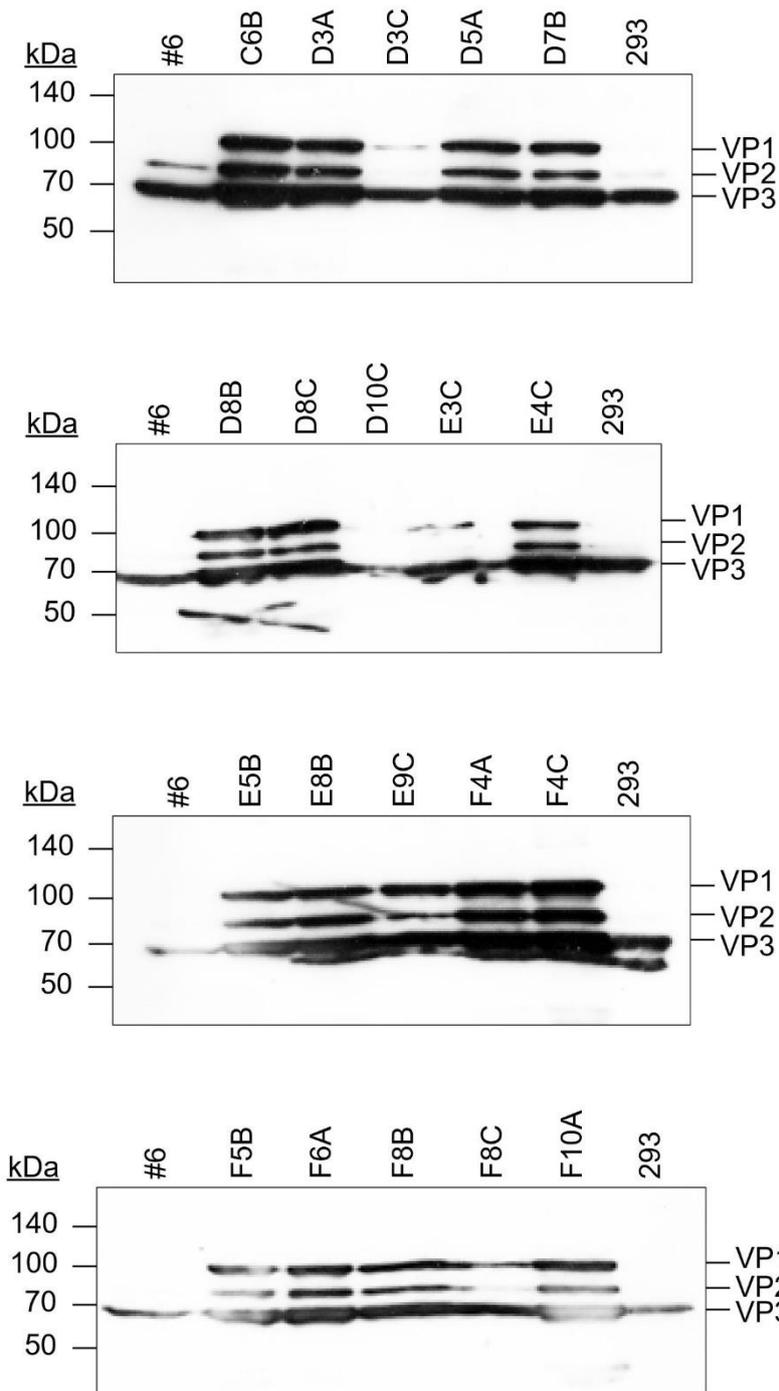


Abbildung 15: **Western Blot der Kapsidproteine von AAV5-Vektoren aus 20 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen im Vergleich zu AAV5-Vektoren aus dem Sf9-Zellklon #6 und 293-Zellen.** 30 ml Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit Bac-rAAV-GFP infiziert (MOI=5) und nach 3 Tagen geerntet. Je 3 ml der Kultur wurden in 15 ml Röhrchen transferiert und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 μ l Proteinprobenpuffer resuspendiert und bei 95°C aufgekoacht. Die μ l-Menge der verwendeten Proteinproben wurde zur besseren Vergleichbarkeit anhand der in der quantitativen PCR ermittelten rAAV5-Konzentrationen festgelegt. Für die Western Blot Analyse wurden die Proteinproben in einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Membrantransfer mit dem monoklonalen B1 Antikörper inkubiert. Abschließend konnten die Banden mittels Western Lightning Plus-ECL detektiert werden. Sf9 entspricht einer nativen Zellsuspension aus Sf9-Zellen als Negativkontrolle. 293 entspricht den rAAV5 aus HEK-293-Zellen, die mitanalysiert wurden.

3 AAV5-RBE⁺-Zellklone (D7B, D8B und E5B) mit starker Kapsidproteinexpression der Vektoren wurden in je 3 Kolben à 30 ml (Dreifachbestimmung) in Suspension gebracht und erneut mit Bac-rAAV-GFP infiziert. Die Auswahl der Vektoren bzw. Zellklone erfolgte hierbei nach der im Folgenden beschriebenen quantitativen PCR und Infektiositätstestung. Ziel der Dreifachbestimmung war die Reproduzierbarkeit der Kapsidproteinexpression zu validieren. Alle aus den Zellklonen D7B, D8B und E5B gewonnene AAV5-Vektoren zeigten eine erhöhte Expression der Kapsidproteine mit Ausnahme von D7B III. Bei D7B III zeigte sich im Vergleich zu den anderen Vektoren eine geringere VP1-Konzentration und eine nicht nachweisbare VP2-Konzentration. Alle Vektoren zeigten eine regelrechte Expression der Replikationsproteine (s. Abbildung 16). Im Vergleich von D7BI bis III ließ sich allerdings eine abnehmende Rep78 und 52 Konzentration darstellen.

Zusammenfassend wurden 47 AAV5-RBE⁺-Zellklone bzw. die aus ihnen gewonnenen Vektoren hinsichtlich ihrer Kapsidproteinexpression getestet. Überwiegend zeigte sich gegenüber den AAV5-Vektoren aus den zu vergleichenden Produktionssystemen eine erhöhte VP1-Expression. Bei 3 Zellklonen konnte die gesteigerte VP1-Konzentration in Dreifachbestimmung reproduziert werden.

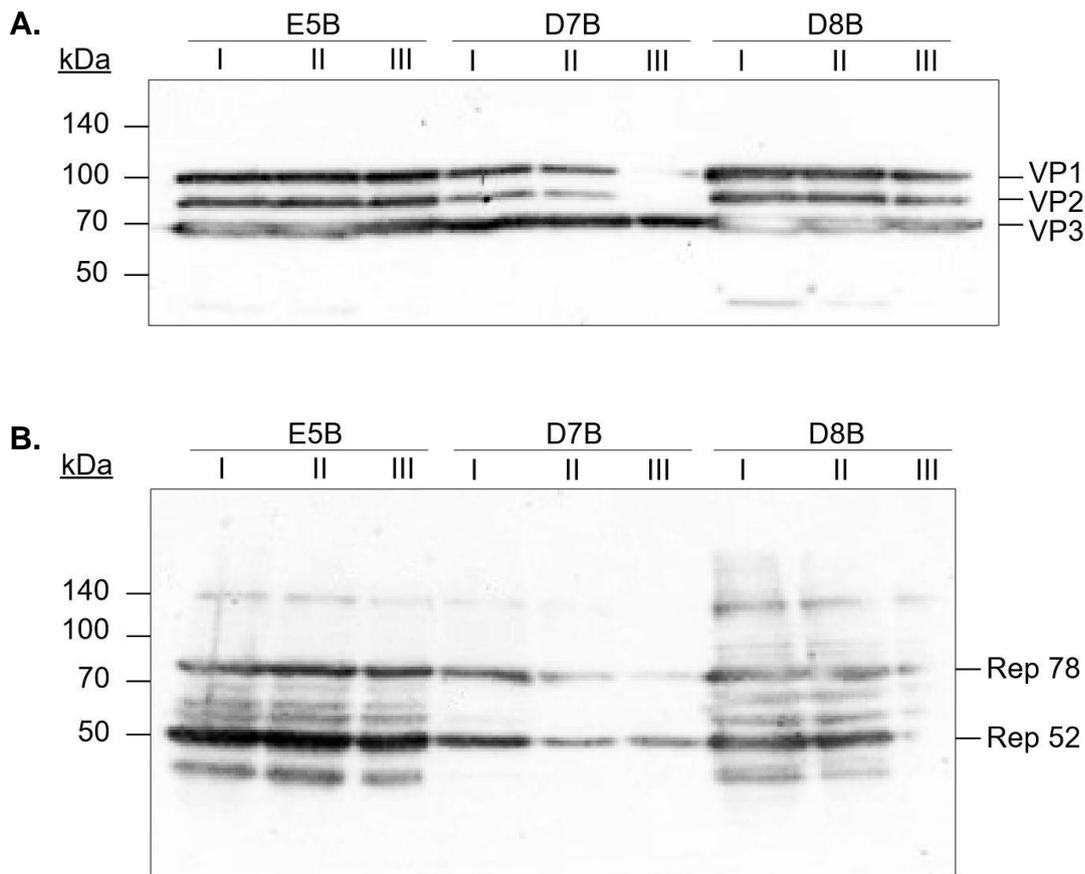


Abbildung 16: **Western Blot der Kapsidproteine und Replikationsproteine von AAV5-Vektoren aus 3 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen im Vergleich.** Von jedem Zellklon wurden jeweils 3 Zellsuspensionen angefertigt (Dreifachbestimmung). Die 30 ml Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit Bac-rAAV-GFP infiziert (MOI = 5) und nach 3 Tagen geerntet. 3ml der Kultur wurden in 15 ml Tubes transferiert und bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 μ l Proteinprobenpuffer resuspendiert sowie bei 95°C aufgeköcht. Die μ l-Menge der verwendeten Proteinproben wurde zur besseren Vergleichbarkeit anhand der in der quantitativen PCR ermittelten rAAV5-Konzentrationen festgelegt. Für die Western Blot Analyse wurden die Proteinproben in einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Membrantransfer mit **(A)** dem monoklonalen B1 Antikörper gegen die Cap-Proteine oder **(B)** dem monoklonalen 303.9 Antikörper gegen die Rep-Proteine inkubiert. Abschließend konnten die Banden mittels Western Lightning Plus-ECL detektiert werden.

3.3.2 Quantitative PCR

Mittels der Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass die VP1-Konzentration bei den hergestellten AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren deutlich höher ist. Im Weiteren wurde evaluiert, wie viele Vektoren aus den AAV5-RBE⁺-Zellklonen gewonnen werden konnten. Einerseits erwarteten wir im hocheffizienten OneBac-System eine hohe Vektorausbeute pro Sf9-Zelle, andererseits musste die Anzahl an Vektoren pro Frier-Tau-Überstand bzw. ihre Konzentration für die unter 3.3.3 beschriebene Infektiositätstestung bekannt sein. Dafür wurde mit den Vektoren aus

den Frier-Tau-Überständen von 20 Zellklonen nach Benzonase- und Proteinase K-Verdau eine LightCycler PCR durchgeführt. Der Benzonase-Verdau dient zur Eliminierung von DNA in den Frier-Tau-Lysaten, da in der quantitativen PCR nur die DNA, die in den AAV-Vektoren enthalten ist, gemessen werden soll. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass durch den Benzonase-Verdau nicht alle freie DNA eliminiert wird und die Ergebnisse der quantitativen PCR dementsprechend interpretiert werden. Eine absolute Beurteilung der Vektorkonzentration bzw. der Vektorausbeute pro Zelle im Produktionssystem ist nur nach einer weiteren Aufbereitung bspw. einer Affinitätschromatographie möglich. Bei paralleler Durchführung der Vektor-Produktions- und Analyseschritte ergibt sich unter den Proben jedoch eine grobe Vergleichbarkeit, die insbesondere für die anschließende Infektiositätstestung entscheidend ist.

Zum Vergleich mit den AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren wurden im Labor vorhandene Frier-Tau-Überstände mit AAV5-Vektoren der HEK 293-Zellreihe ebenfalls für einen Proteinase K-Verdau genutzt und die Vektorkonzentration in der quantitativen PCR mitbestimmt. Die Konzentration der AAV-Vektoren wird im Folgenden in genomische Partikel pro ml angegeben. Genomischer Partikel bedeutet hierbei die DNA pro Vektor, die im Kapsid, welches im Proteinase K Verdau zerstört wird, enthalten ist. Aus dem Zellklon D7B konnten $8,34 \times 10^{10}$ gp/ml AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren gewonnen werden. Bei dem Zellklon D8B betrug die Vektor-Konzentration $6,50 \times 10^{11}$ gp/ml und bei dem Zellklon E5B $9,6 \times 10^{11}$ gp/ml. Im Vergleich konnten aus dem Zellklon #6 $4,60 \times 10^{10}$ gp/ml und aus der HEK 293-Zellreihe $1,90 \times 10^{10}$ gp/ml gewonnen werden. Damit lag die Vektorausbeute der 3 genannten stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklone über der Vektorausbeute des Sf9-Zellklons #6 und der HEK 293-Zellreihe. In Abbildung 17 ist die Vektorausbeute der 20 AAV5-RBE⁺-Zellklone im Vergleich mit dem Zellklon #6 und der HEK 293-Zellreihe dargestellt.

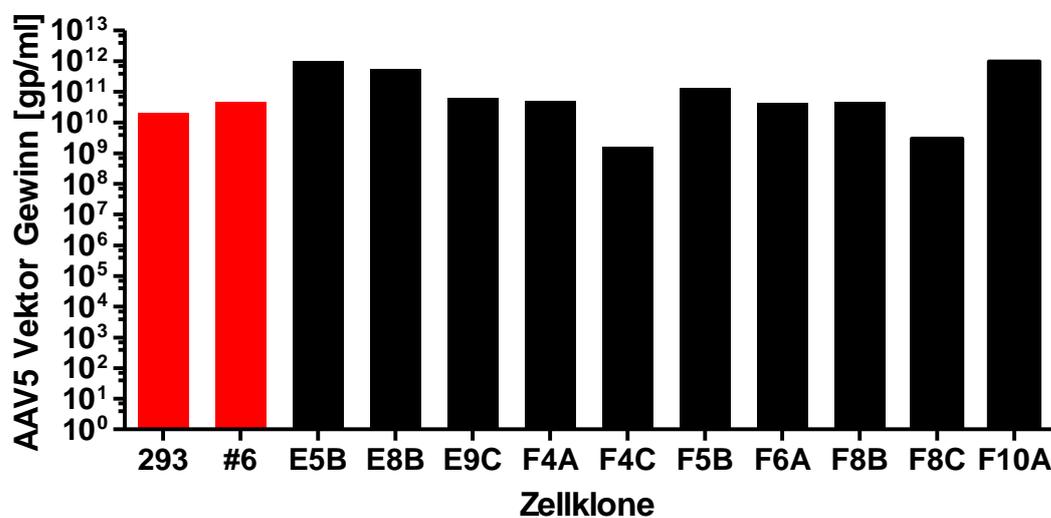
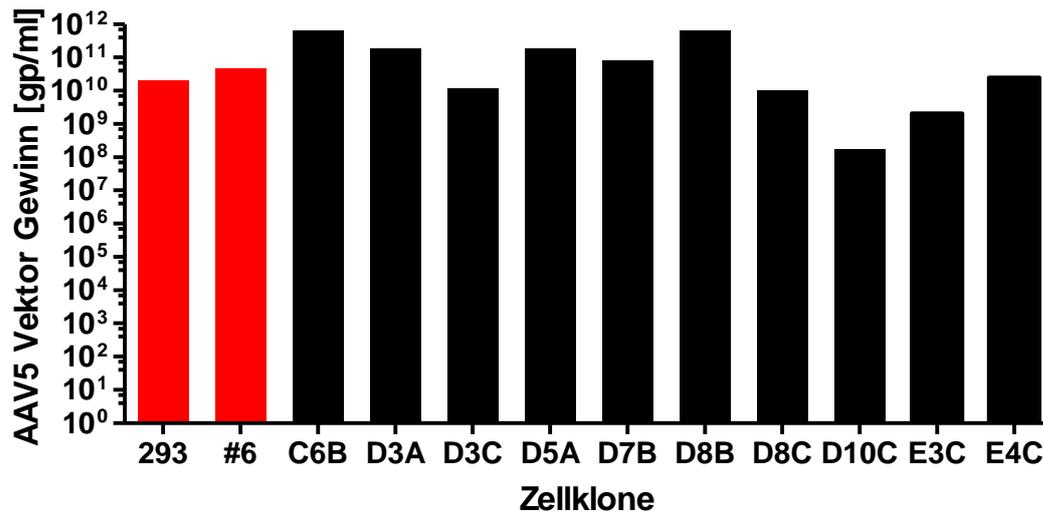


Abbildung 17: **AAV5-Vektorausbeute aus 20 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen im Vergleich zu AAV5-Vektorgewinn aus dem Sf9-Zellklon #6 und 293-Zellen.** 30 ml Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) der 20 stabilen Zellklone sowie des Zellklons #6 wurden mit Bac-rAAV-GFP infiziert und nach 3 Tagen geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach 3 Frier-Tau-Zyklen, Benzonase- und Proteinase K-Verdau erfolgte eine quantitative PCR (s. 2.2.3.5.2). Hier zur Übersichtlichkeit in 2 Diagrammen veranschaulicht. Frier-Tau-Überstände von Plasmid-transfizierten HEK 293-Zellen wurden durch das Labor zur Verfügung gestellt, parallel zu den anderen Sf9 Zell Präparationen aufbereitet und analysiert. gp, Genomische Partikel.

Die drei Zellklone (D7B, D8B und E5B), die in der im Folgenden beschriebenen Infektiositätstestung gute Ergebnisse gezeigt hatten, wurden ausgewählt und parallel zum OneBac-Zellklon #6 erneut in Suspensionskultur angezchtet, mit Bac-rAAV-GFP infiziert, wie oben beschrieben geerntet und aufbereitet. In der folgenden quantitativen PCR dienten AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen der HEK-293-Zellreihe erneut als Vergleich. In Abbildung 11 ist die durchschnittliche

Vektorausbeute sowie Mittelwerte der Vektorausbeute und Standardabweichung in genomischen Partikel pro ml optisch dargestellt. Es zeigt sich, dass aus allen Zellklonen AAV5-Vektoren in ähnlichem Maßstab gewonnen werden konnten.

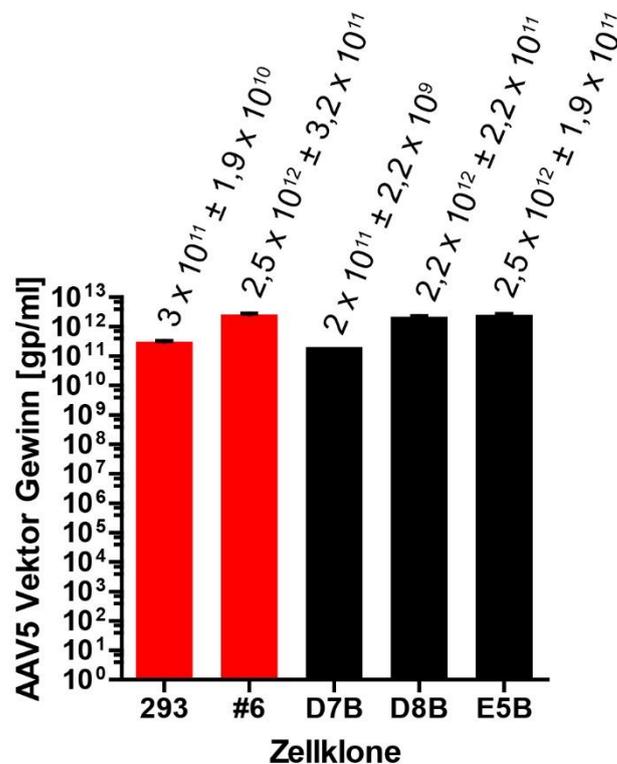


Abbildung 18: **AAV5-Vektorgewinn aus 3 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen - Zellklone D7B, D8B und E5B im Vergleich mit AAV5-Vektorgewinn aus HEK-293 Zellen und #6 - Mittelwert \pm Standardabweichung in gp/ml.** Von den Zellklonen D7B, D8B, E5B und #6 wurden jeweils 3 Zellsuspensionen angefertigt (Dreifachbestimmung). Die 30 ml Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit Bac-rAAV-GFP infiziert und nach 3 Tagen geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach 3 Frier-Tau-Zyklen, Benzonase- und Proteinase K-Verdau erfolgte eine quantitative PCR (s. 2.2.3.5.2). Frier-Tau-Überstände aus 3 Präparationen von HEK 293-Zellen wurden durch das Labor zur Verfügung gestellt und parallel zu den anderen Präparationen vorbereitet und mit Hilfe der quantitativen PCR hinsichtlich Vektorausbeute analysiert. gp, Genomische Partikel.

3.3.3 Transduktionsassay: Infektiositätstestung

Um die Infektiosität der AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren zu testen, wurde ein im OneBac-System etabliertes Modell mit C12-Zellen, im Folgenden Transduktionsassay genannt, genutzt. Dieses simuliert an modifizierten HeLa-Zellen (C12-Zellen) die Wirkung bzw. Infektiosität der Vektoren auf menschliches Gewebe in vitro. C12-Zellen enthalten stabil ins Genom integriert *rep* (und *cap*), sodass es bei Infektion durch AAV-Vektoren zur Amplifikation des AAV-Vektor-Genoms kommt.

Das AAV5-Intron-RBE⁺-Vektor-Genom codiert das Green fluorescent protein (GFP), sodass bei erfolgreicher Infektion der C12-Zellen AAV-Vektoren und GFP gebildet werden. Die dann emittierte Fluoreszenz kann mit Hilfe der FACS-Analyse detektiert werden. Daraus lässt sich ein Infektionspotential des Vektors ableiten. Anhand der in der quantitativen PCR bestimmten Konzentration der gewonnenen AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren (Frier-Tau-Überstände) aus den 20 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen wurde das Transduktionsvolumen (s. Tabelle 12) festgelegt und anschließend der Transduktionsassay durchgeführt. Hierfür wurden 16 Zellklone (C6B, D3A, D3C, D5A, D7B, D8B, D8C, E4C, E5B, E8B, E9C, F4C, F5B, F6A, F8B, F10A) ausgewählt, deren in der quantitativen PCR ermittelten Vektorkonzentrationen über 1×10^{10} gp/ml lagen. Die C12-Zellen wurden mit den AAV5-Vektoren aus den Zellklonen mit einer MOI von 1000 transduziert. Parallel wurden C12-Zellen mit AAV5-Vektoren aus dem Sf9-Zellklon #6 und mit AAV5-Vektoren aus HEK 293-Zellen ebenfalls mit einer MOI von 1000 transduziert. Als Helfervirus wurden Adenoviren Typ 2 mit einer MOI von 10 genutzt. Nach Ernte der C12-Zellen wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. In Abbildung 19 sind exemplarisch C12-Zellen dargestellt, die mit AAV5-Vektoren aus den Zellklonen D7B, #6 und 293 transduziert wurden. Wie hier zu sehen, zeigen die mit AAV5-Vektoren aus #6 transduzierten C12-Zellen kaum GFP-Expression, während der Anteil an GFP-Expression bei denen mit AAV5-Vektoren aus HEK 293-Zellen und dem AAV5-RBE⁺-Zellklon D7B Transduzierten deutlich höher ist.

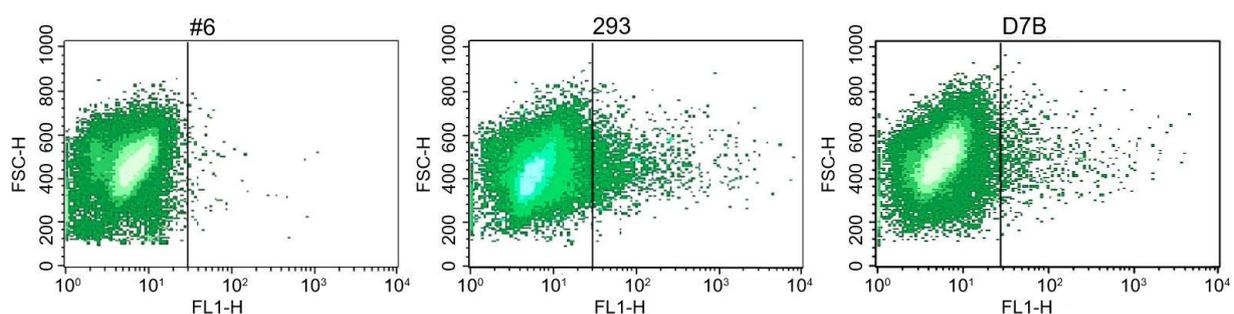


Abbildung 19: **Transduktionseffizienz der AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen des stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklons D7B im Vergleich mit AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen des Sf9-Zellklons #6 und 293-Zellen im Transduktionsassay mit C12-Zellen.** Im Rahmen des Transduktionsassay (s. Abbildung 7) hier exemplarisch Ergebnisse der FACS-Analyse der rAAV5 aus den Zellklonen #6, 293 und D7B. Für die FACS-Analyse wurden 100.000 Zellen pro Probe gezählt. Zellen, die über 30 im FL1-H Kanal erreichten, wurden als positiv gezählt. FSC-H, Vorwärtsstreulicht (englisch forward scattered light). FL1-H, Lesekanal, der bei 530 nm detektiert (grünes Licht).

Von den getesteten AAV5-Vektoren zeigten die aus den Zellklonen D7B und D8B gewonnenen Vektoren ein rund 10-fach höheres Transduktionspotenzial als die AAV5-Vektoren aus dem Vergleichszellklon #6. Aus dem Zellklon E5B gewonnene AAV5-Vektoren zeigten ein 3-fach und AAV5-Vektoren aus HEK 293-Zellen ein 20-fach höheres Transduktionspotenzial. In Abbildung 20 sind alle im Transduktionsassay getesteten AAV5-Vektoren relativ ihrer Transduktionseffizienz gegenüber den AAV5-Vektoren aus dem Zellklon #6 dargestellt. Die Vektoren aus den Zellklonen D7B, D8B und E9C zeigten eine etwa 10-fache höhere Transduktionseffizienz, die Anderen eine mindestens so effektive Transduktion wie die Vektoren aus dem Vergleichsklon #6. Die deutlich höhere Transduktionseffizienz der AAV5 aus den HEK-293 Zellen ist überraschend angesichts des erhöhten VP1-Anteils der AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren, jedoch kann eine Variabilität zwischen den nicht zeitgleich durchgeführten Präparationen nicht ausgeschlossen werden. Folglich ist bspw. eine zu hoch berechnete AAV5-Intron-RBE⁺-Vektorkonzentration möglich. Deshalb wurde das Experiment parallel mit AAV5-Vektoren aus den zwei besten AAV5-Intron-RBE⁺-Zellklonen (D7B, D8B), dem weiteren guten AAV5-Intron-RBE⁺-Zellklon (E5B), dem OneBac Vergleichs-Zellklon #6 und AAV5-Vektoren aus Plasmid-transfizierten HEK 293-Zellen in Dreifachbestimmung wiederholt.

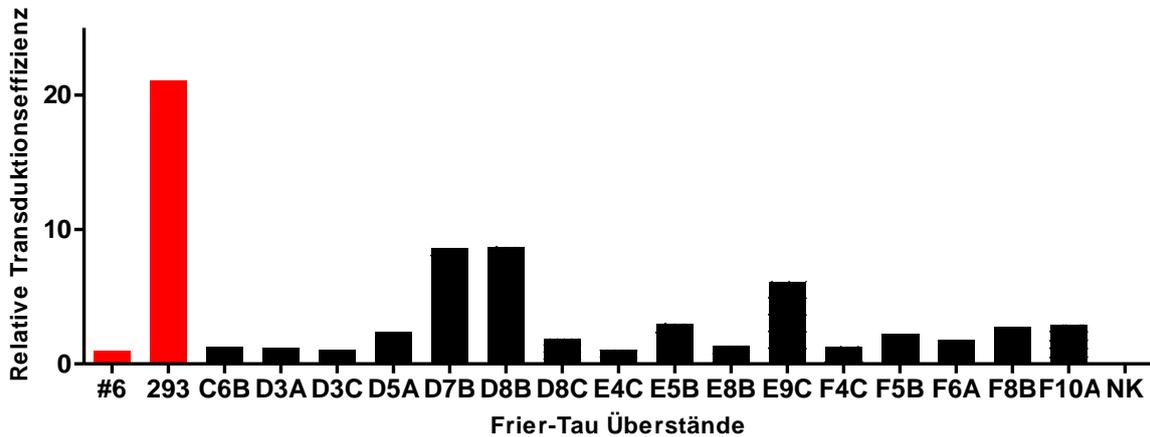


Abbildung 20: **Relative Transduktionseffizienz der AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen von 20 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen im Vergleich mit AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen des Sf9-Zellklons #6 und 293-Zellen im Transduktionsassay mit C12-Zellen.** 30 ml Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit Bac-rAAV-GFP infiziert und nach 3 Tagen geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach 3 Frier-Tau-Zyklen und Benzonase-Verdau konnte entsprechend der in der quantitativen PCR ermittelten Vektorausbeute bei einer MOI von 1000 C12-Zellen transduziert werden. Als Helferviren wurden bei einer MOI von 10 Adenoviren Typ 2 eingesetzt. 48 Stunden nach Transduktion erfolgte die C12-Zellernte und abschließend wurde eine durchflußzytometrische Analyse (s. 2.2.3.5.3) durchgeführt. Dabei wurde bei erfolgreicher Infektion der C12-Zellen das Green fluorescent protein exprimiert und die Fluoreszenz mit Hilfe der fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Analyse detektiert. Für die FACS-Analyse wurden 100.000 Zellen pro Probe gezählt. Zellen, die über 30 im FL1-H Kanal erreichten, wurden als positiv gezählt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung der jeweiligen rAAV5 der korrespondierenden Zellklone. Die Transduktionseffizienz der rAAV5 aus Zellklon 10 wurde als 1 gesetzt, die Werte der anderen rAAV5 wurden diesbezüglich prozentual dargestellt. NK entspricht Negativkontrolle mit Adenoviren ohne rAAV5.

Hierfür wurden die AAV5-Intron-RBE⁺-Zellklone und Zellklon #6 parallel in 3 Kolben à 30 ml (Dreifachbestimmung) in Suspension gebracht und wie bereits beschrieben bei einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml mit Bac-rAAV-GFP infiziert, geerntet und aufbereitet (Frier-Tau). Quantifizierte AAV5 Frier-Tau-Überstände aus HEK-293 dienten als Kontrolle. Nach Benzonase- und Proteinase K-Verdau erfolgte zur Konzentrationsbestimmung eine quantitative PCR. Für die vergleichende Infektiositätstestung der AAV5-Vektoren wurde der Transduktionsassay in C12-Zellen wie bereits beschrieben durchgeführt. Basierend auf den ermittelten Konzentrationen in gp/ml erfolgte eine Transduktion der C12-Zellen mit den AAV5-Vektoren aus den Zellklonen D7B, D8B, E5B, Vergleichszellklon #6 und den Vektoren aus den HEK 293-Zellen bei einer MOI von 10.000. Als Helfervirus diente abermals das Adenovirus Typ 2 mit einer MOI von 10. In der FACS-Analyse bestätigte sich, dass alle AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren eine deutliche höhere Transduktionseffizienz

als die Vektoren aus dem Vergleichszellklon #6 aufwiesen (s. Abbildung 21). Interessanterweise wiesen die AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren zudem eine 2,5 bis 3-fache höhere Transduktionseffizienz im Vergleich zu den AAV5-Vektoren aus den HEK 293-Zellen auf. Dies lässt sich am ehesten auf die hohe Variabilität im Vorversuch bei insgesamt hoher Probenanzahl zurückführen. Zusammenfassend konnte bei nun erfolgter Dreifachbestimmung die deutlich höhere Transduktionseffizienz der AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren gegenüber den AAV5-Vektoren aus Vergleichszellklon #6 bestätigt werden. Zudem konnte durch eine im Rahmen der Dreifachbestimmung streng parallel durchgeführte Anzucht und Ernte bei einer definierten Zelldichte von 2×10^6 Sf9-Zellen/ml der AAV5-RBE⁺-Zellklone eine höhere Transduktionseffizienz der AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren gegenüber den AAV5-Vektoren aus HEK 293-Zellen festgestellt werden. Für die optimierten bzw. gegenüber dem Vorversuch besser standardisierten Produktionsbedingungen spricht auch die nun höhere Transduktionseffizienz der AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren aus Zellklon E5B gegenüber den Vektoren aus HEK 293-Zellen und der vergleichbaren Transduktionseffizienz der AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren untereinander.

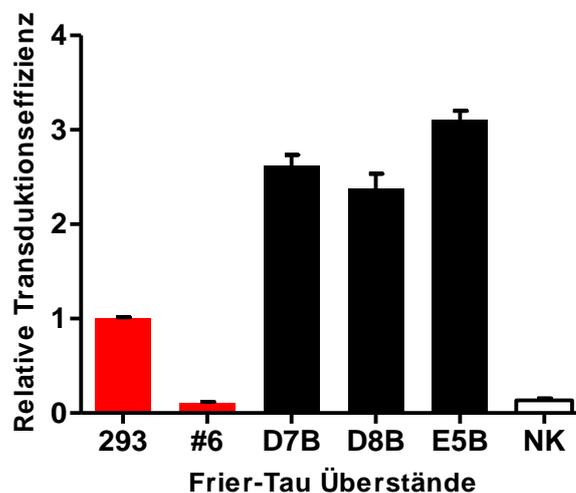


Abbildung 21: **Relative Transduktionseffizienz der AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen von 3 stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklonen im Transduktionsassay mit C12-Zellen.** Von jedem Zellklon wurden jeweils 3 Zellsuspensionen angefertigt (Dreifachbestimmung). Die 30 ml Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit Bac-rAAV-GFP infiziert und nach 3 Tagen geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach 3 Frier-Tau-Zyklen und Benzonase-Verdau konnte entsprechend der in der quantitativen PCR ermittelten Vektorausbeute C12-Zellen bei einer MOI von 10.000 mit rAAV5 transduziert werden. Als Helferviren wurden bei einer MOI von 10 Adenoviren Typ 2 eingesetzt. 48 Stunden nach Transduktion erfolgte die C12-Zellernte und abschließend wurde eine durchflußzytometrische Analyse (s. 2.2.3.5.3) durchgeführt.

Fortsetzung Abbildung 21: Dabei wurde bei erfolgreicher Infektion der C12-Zellen das Green fluorescent protein exprimiert und die Fluoreszenz mit Hilfe der fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Analyse detektiert. Für die FACS-Analyse wurden 100.000 Zellen pro Probe gezählt. Zellen, die über 30 im FL1-H Kanal erreichten, wurden als positiv gezählt. NK entspricht Negativkontrolle mit Adenoviren ohne rAAV5. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung der jeweiligen rAAV5 der korrespondierenden Zellklone. Die Transduktionseffizienz der rAAV5 aus HEK 293-Zellen wurde als 1 gesetzt, die Werte der anderen rAAV5 wurden diesbezüglich prozentual dargestellt.

3.4 Analyse der AAV5-Intron- Δ RBE-Vektoren

Ein essentieller Anspruch an virale Vektoren ist, dass sie möglichst wenig Fremd-DNA enthalten. Im Rahmen der OneBac-Publikation unseres Labors fiel auf, dass die hochgereinigten AAV5-Vektoren noch geringe Mengen an Fremd-DNA enthalten. Bei dieser handelte es sich um mittels quantitativer PCR detektierte *rep*-, *cap*-, Blastidicinresistenzgen- und *hr2*-Sequenzen, die auf den pIR-Plasmiden enthalten sind.²⁵ Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Vermutung gestellt, dass die in den pIR-Plasmiden integrierte, als Verpackungssignal fungierende Rep-Bindestelle dabei eine führende Rolle spielt. Aufgrund dieser Annahme entfernten wir in den Vorversuchen die auf den pIR-Plasmiden vorhandene Rep-Bindestelle. Um zu testen, ob das Verpackungssystem bzw. die AAV5-Vektorproduktion auch ohne RBE gelingt, analysierten wir die von uns generierten AAV5-Intron- Δ RBE-Vektoren analog zu den AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren.

3.4.1 Western Blot

12 stabile AAV5-Intron- Δ RBE-Zellklonen wurden auf VP-Expression analysiert wie unter 3.3.1 beschrieben. Im Western Blot (s. Abbildung 22) zeigten die Zellklone 1, 3, 10, 7 eine ausgeprägte Expression von VP1. Schwächer fiel die VP1-Expression bei den Zellklonen 2, 4, 8, 9, 12 aus. Die Zellklone 5, 6 und 11 zeigten eine kaum detektierbare VP1-Expression. Bei allen Zellklonen wurden die Kapsidproteine VP 2 und 3 stark exprimiert.

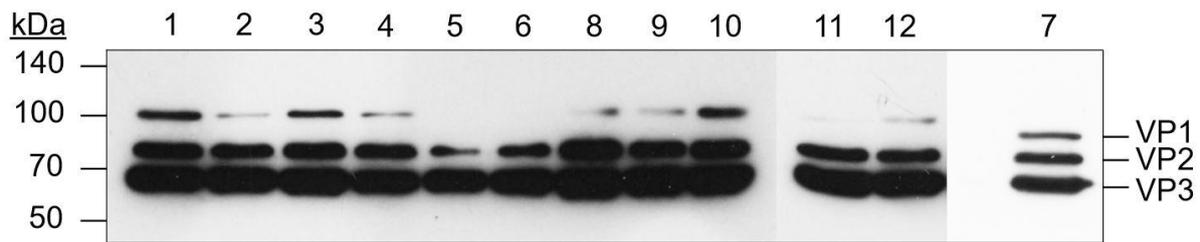


Abbildung 22: **Western Blot der Kapsidproteine von AAV5-Vektoren aus 12 stabilen AAV5- Δ RBE-Zellklonen im Vergleich.** 30 ml Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit Bac-rAAV-GFP infiziert (MOI=5) und nach 3 Tagen geerntet. 3 ml der Kultur wurden in 15 ml Tubes transferiert und bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 μ l Proteinprobenpuffer resuspendiert sowie bei 95°C aufgeköcht. Anschließend erfolgte ein Western Blot. Die μ l-Menge der verwendeten Proteinproben wurde zur besseren Vergleichbarkeit anhand der in der quantitativen PCR ermittelten rAAV5-Konzentrationen festgelegt. Für die Western Blot Analyse wurden die Proteinproben in einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Membrantransfer mit dem monoklonalen B1 Antikörper inkubiert. Abschließend konnten die Banden mittels Western Lightning Plus-ECL detektiert werden. Zur Übersichtlichkeit wurden hier drei Gele bzw. Membranen parallel dargestellt.

Um die Reproduzierbarkeit des Vorversuchs zu testen wurden drei Zellklone (1, 7 und 10) ausgewählt und in Suspension vermehrt. Von jedem Zellklon wurden 3 Kolben à 30 ml (Dreifachbestimmung) angesetzt und bei einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml mit Bac-rAAV-GFP infiziert, geerntet und hinsichtlich der Expression der Kapsid- und Replikationsproteine der gewonnenen AAV5-Intron- Δ RBE-Vektoren mittels Western Blot untersucht. Alle Vektoren zeigten eine starke VP2- und VP3-Expression. Die Vektoren der Zellklone 7 und 10 zeigten ebenfalls eine erhöhte VP1-Expression, während die Vektoren aus Zellklon 1 eine kaum detektierbare VP1-Expression zeigten (s. Abbildung 23 A). Dies ist überraschend, da die Vektoren aus Zellklon 1 im Vorversuch eine starke VP1-Expression aufwiesen. Ursächlich könnte bei insgesamt schwächerer Kapsidproteinkonzentration aller Vektoren im Vergleich zum Vorversuch eine zu geringe Belichtungszeit des Films sein. Eine niedrigere Vektorkonzentration konnte in der anschließenden quantitativen PCR ausgeschlossen werden. Im Western Blot der Replikationsproteine (s. Abbildung 23 B) zeigte sich einerseits eine regelrechte Expression von Rep78 und 52, andererseits eine erhöhte Konzentration unspezifischer Banden. Bei nicht parallel mitanalysierter nativer Sf9-Zellkontrolle ist eine Antikörper-Kreuzreaktivität nicht beweisbar, jedoch denkbar.

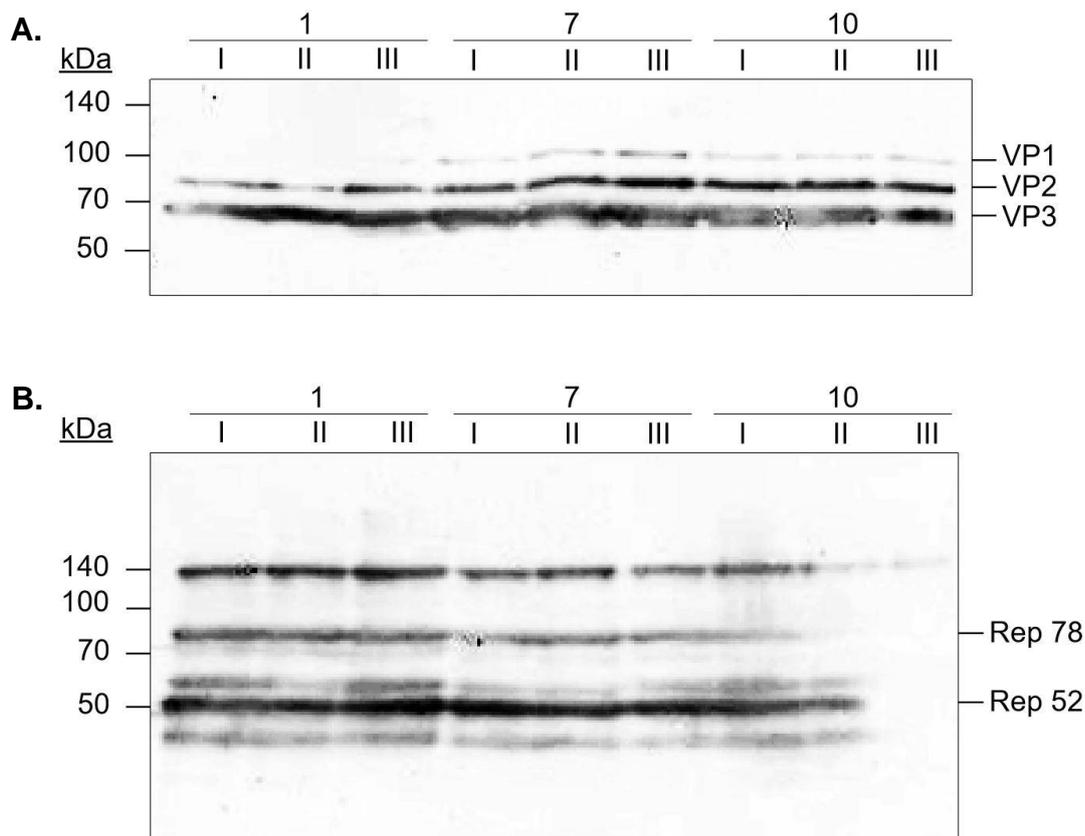


Abbildung 23: **Western Blot der Kapsidproteine und Replikationsproteine von AAV5-Vektoren aus 3 stabilen AAV5-ΔRBE-Zellklonen im Vergleich.** Von jedem Zellklon wurden jeweils 3 Zellsuspensionen angefertigt (Dreifachbestimmung). Die 30 ml Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit Bac-rAAV-GFP infiziert (MOI=5) und nach 3 Tagen geerntet. 3 ml der Kultur wurden in 15 ml Tubes transferiert und bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 μ l Proteinprobenpuffer resuspendiert sowie bei 95°C aufgeköcht. Die μ l-Menge der verwendeten Proteinproben wurde zur besseren Vergleichbarkeit anhand der in der quantitativen PCR ermittelten rAAV5-Konzentrationen festgelegt. Für die Western Blot Analyse wurden die Proteinproben in einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Membrantransfer mit (A) dem monoklonalen B1 Antikörper gegen die Cap-Proteine oder (B) dem monoklonalen 303.9 Antikörper gegen die Rep-Proteine inkubiert. Abschließend konnten die Banden mittels Western Lightning Plus-ECL detektiert werden.

3.4.2 Quantitative PCR

Vektoren aus 11 AAV5-ΔRBE-Zellklone sowie aus dem AAV5-RBE⁺-Zellklon E5B wurden analog zu den AAV5-RBE⁺-Zellklonen gezüchtet, geerntet und für die anschließende quantitative PCR aufbereitet (Benzonase- und Proteinase K-Verdau). Aus dem Zellklon 1 konnten $6,50 \times 10^{10}$ gp/ml AAV5-Intron-ΔRBE-Vektoren gewonnen werden. Bei dem Zellklon 7 betrug die Vektor-Konzentration $5,33 \times 10^{10}$ gp/ml und bei dem Zellklon 10 $1,26 \times 10^{11}$ gp/ml. Im Vergleich konnten aus dem Zellklon E5B $5,54 \times 10^{10}$ gp/ml Vektoren gewonnenen werden. Damit lag die

Vektorausbeute der 3 genannten stabilen AAV5- Δ RBE-Zellklone auf dem Niveau der Vektorausbeute des Zellklons E5B trotz vorheriger Entfernung der Rep-Bindestelle. In Abbildung 24 ist die Vektorausbeute aus allen 11 Zellklonen im Vergleich mit dem Zellklon E5B abgebildet. Die Probe von Zellklon 4 erbrachte in der quantitativen PCR keinen Wert, ist hier deshalb nicht dargestellt und wurde folglich auch nicht im Transduktionsassay verwendet.



Abbildung 24: **AAV5-Vektorgewinn aus 11 stabilen AAV5- Δ RBE-Zellklonen im Vergleich mit dem stabilen AAV5-RBE⁺-Zellklon E5B.** 30 ml Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit Bac-rAAV-GFP infiziert und nach 3 Tagen geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach 3 Frier-Tau-Zyklen, Benzonase- und Proteinase K-Verdau erfolgte eine quantitative PCR (s. 2.2.3.5.2). gp, Genomische Partikel.

Nach der Charakterisierung der 12 stabilen Zellklone mittels Westen Blot, quantitativer PCR und Transduktionsassay (s. 3.4.3) wurden drei Zellklone (1, 7 und 10) ausgewählt und erneut in Suspension gebracht, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu testen. Von jedem Zellklon wurden 3 Kolben à 30 ml (Dreifachbestimmung) angesetzt und bei einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml mit Bac-rAAV-GFP infiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellklone wie oben beschrieben geerntet, aufbereitet und hinsichtlich der Vektor-Ausbeute mittels quantitativer PCR untersucht. In der folgenden Tabelle (s. Tabelle 13) sind die Mittelwerte der Vektorausbeute sowie Standardabweichung in genomischen Partikel pro ml und pro Zelle aufgeführt.

Tabelle 13: Durchschnittliche Vektorausbeute der Zellklone 1, 7 und 10

Zellklon	Mittelwert \pm Standardabweichung in gp/ml	Mittelwert \pm Standardabweichung in gp/Zelle
1	$2,2 \times 10^{12} \pm 1,6 \times 10^{12}$	$8,4 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^4$
7	$6,3 \times 10^{11} \pm 2,2 \times 10^{11}$	$3,3 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$
10	$2,4 \times 10^{12} \pm 1,2 \times 10^{12}$	$8,5 \times 10^4 \pm 4,4 \times 10^4$

In Abbildung 25 ist die durchschnittliche Vektorausbeute optisch dargestellt. Es zeigt sich, dass aus den drei Zellklonen Vektoren in ähnlichem Maßstab gewonnen werden konnten. Somit konnte trotz Entfernung der Rep-Bindestelle Vektoren in hohem Maßstab reproduzierbar hergestellt werden. Beachtet werden muss, dass es sich nicht um aufgereinigte rAAV5 handelt. Bei üblicherweise nicht vollständigem Benzonase-Verdau aller DNA (außerhalb der rAAV5-Kapside) werden von Bac-rAAV5-GFP eingebrachte rAAV5-Transgenkassetten mitbestimmt. Bei strenger Paralleltestung mit Einsatz einer stets gleichen Bac-rAAV5-GFP-Menge ergibt sich jedoch eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Zellklonen.

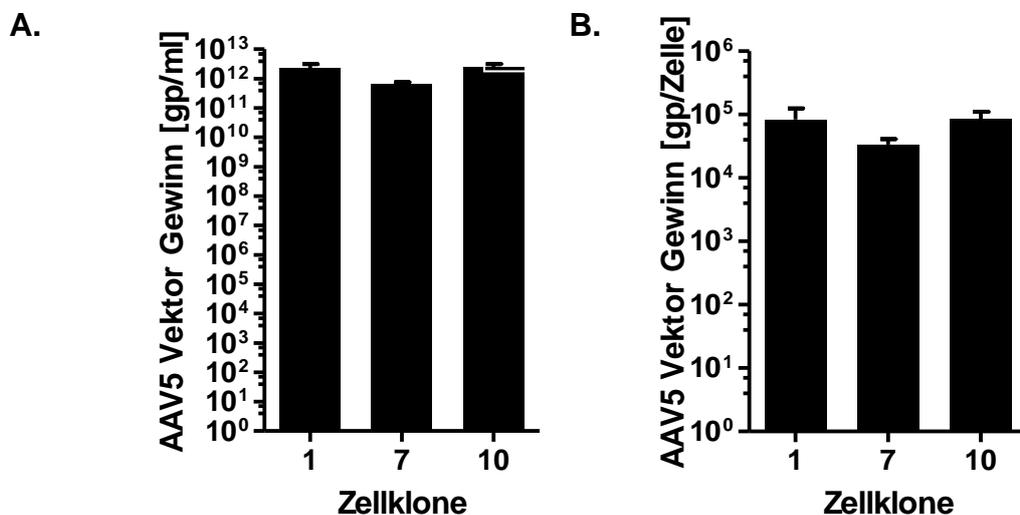


Abbildung 25: **AAV5-Vektorausbeute aus 3 stabilen AAV5- Δ RBE-Zellklonen - Zellklon 1, 7 und 10 im Vergleich.** Von jedem Zellklon wurden jeweils 3 Zellsuspensionen angefertigt (Dreifachbestimmung). Die 30 ml Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit Bac-rAAV5-GFP infiziert und nach 3 Tagen geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach 3 Frier-Tau-Zyklen, Benzonase- und Proteinase K-Verdau erfolgte eine quantitative PCR (s. 2.2.3.5.2). gp, Genomische Partikel.

A. Dargestellt sind die Zellklone 1, 7 und 10 in Dreifachbestimmung in gp/ml.

B. Dargestellt sind die Zellklone 1, 7 und 10 in Dreifachbestimmung in gp/Zelle.

3.4.3 Transduktionsassay: Infektiositätstestung

Nach Bestimmung der Konzentration (quantitativen PCR) der gewonnenen Vektoren (Frier-Tau-Überstände) aus den 11 stabilen AAV5- Δ RBE-Zellklonen und Ermittlung des Transduktionsvolumens (s. Tabelle 12) erfolgte der Transduktionsassay. Ziel war die Beurteilung des Infektionspotenzials der AAV5-Intron- Δ RBE-Vektoren zu den AAV5-Intron-RBE⁺-Vektoren aus dem Zellklon E5B. Hierfür wurden alle 11 Zellklone verwendet. Vorab wurden C12-Zellen wie beschrieben in einer 24-Wellenschale vorbereitet und anschließend mit den Vektoren aus den Zellklonen mit einer MOI von 1000 transduziert. Parallel wurden C12-Zellen mit Vektoren aus dem AAV5-RBE⁺-Zellklon E5B ebenfalls mit einer MOI von 1000 transduziert. Als Helferviren wurden Adenoviren Typ 2 mit einer MOI von 10 genutzt. 48 Stunden nach Transduktion wurden die C12-Zellen geerntet und wie oben beschrieben für eine FACS-Analyse vorbereitet. Bei erfolgreicher Transduktion kam es zur GFP-Expression der C12-Zellen. Die Vektoren aus den Zellklonen 1, 3, 8, 10 zeigten gegenüber denen aus dem Zellklon E5B eine gleichwertige Transduktionseffizienz. Aus dem Zellklon 7 gewonnene Vektoren zeigten sogar ein zweifach höheres Transduktionspotenzial. In Abbildung 26 sind alle im Transduktionsassay getesteten Vektoren relativ ihrer Transduktionseffizienz gegenüber den Vektoren aus dem Zellklon E5B dargestellt.

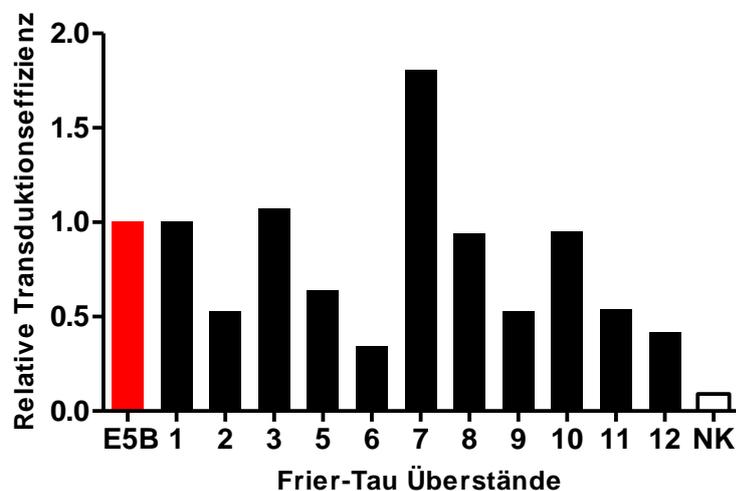


Abbildung 26: **Relative Transduktionseffizienz der AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen von 11 stabilen AAV5- Δ RBE-Zellklonen im Vergleich mit AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen des AAV5-RBE⁺-Zellklons E5B im Transduktionsassay mit C12-Zellen.** 30 ml Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit Bac-rAAV-GFP infiziert und nach 3 Tagen geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach 3 Frier-Tau-Zyklen und Benzonase-Verdau konnte entsprechend der in der quantitativen PCR ermittelten Vektorausbeute bei einer MOI von 1000 C12-Zellen transduziert werden. Als Helferviren wurden bei einer MOI von 10 Adenoviren Typ 2 eingesetzt. 48 Stunden nach Transduktion erfolgte die C12-Zellernte und abschließend wurde eine durchflußzytometrische Analyse (s. 2.2.3.5.3) durchgeführt.

Fortsetzung Abbildung 26: Dabei wurde bei erfolgreicher Infektion der C12-Zellen das Green fluorescent protein exprimiert und die Fluoreszenz mit Hilfe der fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Analyse detektiert. Für die FACS-Analyse wurden 100.000 Zellen pro Probe gezählt. Zellen, die über 30 im FL1-H Kanal erreichten, wurden als positiv gezählt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung der jeweiligen rAAV5 der korrespondierenden Zellklone. Die Transduktionseffizienz der rAAV5 aus Zellklon E5B wurde als 1 gesetzt, die Werte der anderen rAAV5 wurden diesbezüglich prozentual dargestellt. NK entspricht Negativkontrolle mit Adenoviren ohne rAAV5.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu testen, wurden nach Charakterisierung der Vektoren aus den AAV5- Δ RBE-Zellklone und Ermittlung des Transduktionsvolumens (s. Tabelle 12) drei Zellklone (1, 7 und 10) ausgewählt und erneut in Suspension gebracht. Von jedem Zellklon wurden 3 Kolben à 30 ml (Dreifachbestimmung) angesetzt und bei einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml mit Bac-rAAV-GFP infiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellklone geerntet und hinsichtlich der Vektorausbeute-Ausbeute mittels quantitativer PCR untersucht. Im Anschluss konnte der Transduktionsassay erfolgen. Vorab wurden C12-Zellen wie beschrieben in einer 24-Wellenschale vorbereitet und anschließend mit den Vektoren aus den Zellklonen mit einer MOI von 10.000 und 1000 transduziert. Als Helferviren wurden Adenoviren Typ 2 mit einer MOI von 10 genutzt. 48 Stunden nach Transduktion wurden die C12-Zellen geerntet und für eine FACS-Analyse vorbereitet. Bei erfolgreicher Transduktion kam es wie beschrieben zur GFP-Expression der C12-Zellen. Von den getesteten Vektoren zeigten die aus dem Zellklon 7 gewonnenen Vektoren gegenüber denen aus den Zellklonen 1 und 10 durchschnittlich sowohl bei einer MOI von 10.000 als auch einer MOI 1000 eine höhere Transduktionseffizienz (s. Abbildung 27). Damit ließen sich die Ergebnisse wie erhofft in Dreifachbestimmung reproduzieren. Zusammenfassend konnten trotz der Deletion der Rep-Bindestelle reproduzierbar infektiöse AAV5-Vektoren in hohem Maßstab produziert werden. Hierbei zeigten sich die Vektoren aus AAV5-Intron- Δ RBE Zellklon 7 sogar infektiöser als die Vektoren aus dem AAV5-Intron-RBE⁺-Zellklon E5B.

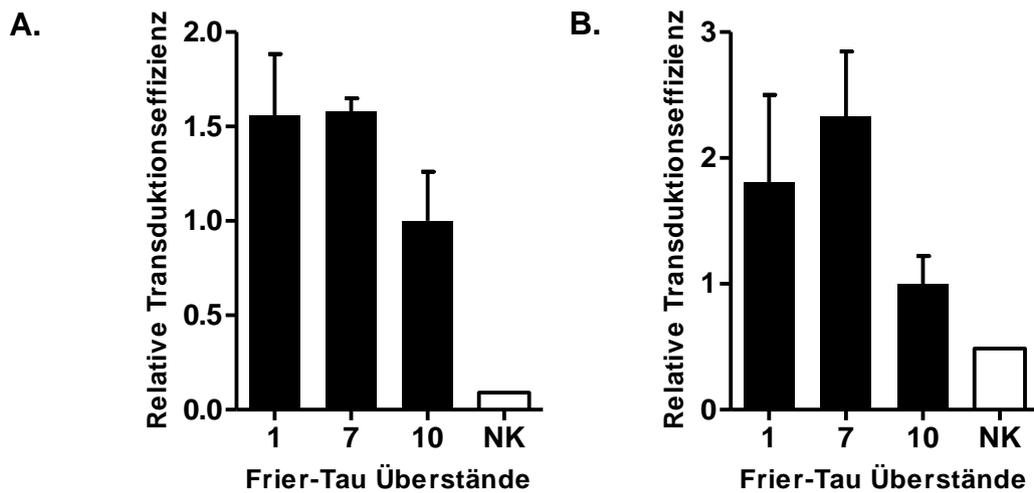


Abbildung 27: **Relative Transduktionseffizienz der AAV5-Vektoren aus Frier-Tau-Überständen von 3 stabilen AAV5- Δ RBE-Zellklonen im Transduktionsassay mit C12-Zellen.** Von jedem Zellklon wurden jeweils 3 Zellsuspensionen angefertigt (Dreifachbestimmung). Die 30 ml Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit Bac-rAAV-GFP infiziert und nach 3 Tagen geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach 3 Frier-Tau-Zyklen und Benzonase-Verdau konnte entsprechend der in der quantitativen PCR ermittelten Vektorausbeute C12-Zellen transduziert werden. Als Helferviren wurden bei einer MOI von 10 Adenoviren Typ 2 eingesetzt. 48 Stunden nach Transduktion erfolgte die C12-Zellernte und abschließend wurde eine durchflußzytometrische Analyse (s. 2.2.3.5.3) durchgeführt. Dabei wurde bei erfolgreicher Infektion der C12-Zellen das Green fluorescent protein exprimiert und die Fluoreszenz mit Hilfe der fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Analyse detektiert. Für die FACS-Analyse wurden 100.000 Zellen pro Probe gezählt. Zellen, die über 30 im FL1-H Kanal erreichten, wurden als positiv gezählt. NK entspricht Negativkontrolle mit Adenoviren ohne rAAV5. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung der jeweiligen rAAV5 der korrespondierenden Zellklone. Die Transduktionseffizienz der rAAV5 aus Zellklon 10 wurde als 1 gesetzt, die Werte der anderen rAAV5 wurden diesbezüglich prozentual dargestellt. **A.** Transduktion von C12-Zellen mit rAVV5 bei einer MOI von 10.000, **B.** Transduktion von C12-Zellen mit rAVV5 bei einer MOI von 1000.

4. Diskussion

AAV-Vektoren haben sich zu einem bedeutenden Bestandteil der gentherapeutischen Medizin entwickelt. Durch die Anwendung unterschiedlicher Serotypen-Kapside bieten sie für eine steigende Anzahl von vorwiegend genetischen Erkrankungen potentielle Therapiemöglichkeiten. Wie einleitend dargelegt, zeigte sich in der Vergangenheit jedoch die Produktion von Vektoren in biotechnologischem Maßstab als problematisch, da die Plasmidtransfektion von Säugerzellsystemen mit einem enormen Material- und Zeitbedarf einhergeht, um ausreichende Vektormengen für den in vivo-Einsatz zu generieren. Lösungsmöglichkeiten bieten das 2002 entwickelte, auf Koinfektion von drei Baculoviren basierende Sf9-Insektenzellsystem von Urabe et al. und das OneBac-System, welches 2009 von Aslanidi entwickelt und 2014 von Mietzsch et al. optimiert wurde.^{6,77,84} Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmalig zwei wesentliche Probleme im OneBac-Insektenzellproduktionssystem mit AAV5-Vektoren gelöst werden. Einerseits konnte durch Steigerung des VP1-Anteils die Infektiosität der gewonnenen Vektoren gegenüber den Vergleichsvektoren aus HEK 293-Zellen deutlich gesteigert werden. Andererseits gelang es im Weiteren, trotz Deletion der Rep-Bindestelle AAV5-Vektoren in hoher Konzentration und mit ebenfalls gesteigerter Infektiosität gegenüber den Vergleichsvektoren aus HEK 293-Zellen zu gewinnen. Im Rahmen unserer OneBac2.0-Publikation konnten wir darüber hinaus zeigen, dass sich durch Deletion von RBE die parallele Verpackung von nicht-Vektor-DNA in rAAV5 drastisch reduziert. Auf Basis dieser Verbesserungen lässt sich eine hohe Bedeutung dieser Arbeit für die Produktion und Anwendung von rAAV5 im Rahmen der klinischen Gentherapie ableiten.

4.1 Bedeutung von VP1

Bislang zeigten sich aus Baculovirus-Sf9-Insektenzellsystemen gewonnene rAAV5 weniger infektiös als rAAV5 aus Säugetiersystemen. Dies konnte in der OneBac-Publikation von Mietzsch et al. bestätigt werden; rAAV5 zeigte im Vergleich zu rAAV5 aus HEK 293-Zellen ein reduziertes Transduktionspotenzial trotz hoher Vektorausbeute pro Sf9-Zelle.⁶ Interessanterweise zeigte sich in Western Blot-Analysen eine verminderte VP1-Expression der OneBac rAAV5-Kapside im Vergleich zu rAAV5 aus HEK 293-Zellen. Durch die reduzierte VP1-Expression ist bei OneBac rAAV5 von einer Störung der initial für das AAV2 Wildtyp Kapsid

beschriebene, für alle Serotypen geltende, stöchiometrische Verhältnis von 1:1:10 zwischen VP1, VP2 und VP3 auszugehen. VP1 ist für das Kapsid-Assembly nicht notwendig, jedoch durch die N-terminal lokalisierte Phospholipase-Domäne PLA2 integral für die Vektorinfektiosität.²⁹ PLA2 ermöglicht hierbei das Verlassen der Vektoren aus den zellulären Endosomen. Die PLA2-Domäne ist unter den AAV-Serotypen nicht divergent mit Ausnahme von AAV5, was mit einer reduzierten Infektiosität einhergehen könnte.³² Im auf Koinfektion von drei Baculoviren beruhenden Sf9-Insektenzellsystem konnte eine erhöhte Infektiosität durch die Fusion der N-terminalen VP1-Domäne von AAV2 mit dem VP2-, VP3-ORF von AAV5 erzielt werden.¹⁰⁷ Das dadurch entstehende AAV5/2-Hybridkapsid divergiert allerdings durch eine veränderte Oberflächenbeschaffenheit vom ursprünglichen AAV5-Kapsid mit denkbaren Folgen für den in vivo Einsatz. Auf Basis dieser Feststellungen implementierten wir die Hypothese, dass die geringe Transduktionsfähigkeit am ehesten auf die reduzierte VP1-Expression zurückgeführt werden muss. Hierfür konnten wir das ursprüngliche VP1-Startcodon zum Wildtyp-Startcodon ATG ändern und ein neuartigen pIR-Cap-Plasmid mit artefiziellen Intron mit zusätzlichem Polyhedrin-Promoter für die Koexpression von VP1, 2 und 3 generieren. Nach Kotransfektion mit pIR-Rep in Sf9-Zellen, Hochzüchtung und Aufbereitung der Vektoren konnten wir die rAAV5 aus HEK 293-Zellen und dem OneBac-System mit den gewonnenen neuartigen rAAV5 durch Western Blot, quantitative PCR und C12-Transduktionsassay vergleichen. Aus unserer Sicht beweisend für die verbesserte Infektiosität durch einen erhöhten VP1-Anteil im rAAV5 Kapsid ist der direkte Vergleich zwischen rAAV5 aus HEK 293-Zellen und rAAV5 aus dem OneBac- sowie dem im Rahmen dieser Arbeit implementierten OneBac2.0-System im Transduktionsassay. Bei erhöhtem VP1-Anteil der rAAV5-Kapside im OneBac2.0-System zeigten sich die Vektoren (D7B, D8B und E5B) infektiöser als die Vektoren aus dem OneBac-System und interessanterweise infektiöser als rAAV5 aus dem HEK 293-System. Daraus leitet sich die biomedizinische Bedeutung dieser Arbeit ab, da durch die erhöhte Infektiosität der rAAV5 im OneBac2.0-System bei hoher Vektorausbeute pro Sf9-Zelle das rAAV5-Produktionssystem entscheidend verbessert werden konnte. Der dadurch mögliche Einsatz von weniger Vektoren bei höherer Infektiosität, damit erhöhter Expression des Transgens und schließlich geringen Produktionskosten gegenüber den Säugetier-Produktionssystemen ist aus unserer Sicht wegweisend.

Interessanterweise war die Infektiosität der rAAV5 OneBac2.0 gegenüber den rAAV5 aus HEK 293-Zellen erhöht. Möglich erscheint eine optimierte VP1-Konzentration der rAAV5 OneBac2.0 auch gegenüber der rAAV5 aus HEK 293-Zellen und ein damit einhergehendes verbessertes Endosomenescape. Um diese Annahme zu verifizieren müssten allerdings in Folgeexperimenten die absoluten VP1-Konzentrationen in einem quantitativen Western Blot untersucht werden. Aus unseren Ergebnissen folgte sich die Annahme, dass durch eine Optimierung des VP1-Anteils der rAAV-Kapside eine generelle Potenzierung der Transduktionseffizienz aller Serotypen erreichbar ist. Allerdings konnten Mietzsch et al. in der Anwendung des OneBac2.0-System bei rAAV1, 2 und 8 die VP1-Konzentration der rAAV-Kapside durch Einsatz des zusätzlichen Polyhedrin-Promoters nicht steigern.¹⁰⁶ Die Transduktionseffizienz stagnierte auf dem Niveau der ursprünglichen rAAV1, 2, und 8 des OneBac-Systems.¹⁰⁶ Daraus lässt sich schließen, dass rAAV5 im OneBac-System als einziger rAAV-Serotyp einen zusätzlichen Polyhedrin-Promoter zur suffizienten VP1-Synthese benötigt. Zusammenfassend konnten wir für rAAV5 im OneBac2-System erfolgreich zeigen, dass eine Erhöhung des VP1-Anteils im Kapsid mit einer gegenüber den Vergleichsvektoren aus dem OneBac-System und HEK 293-Zellen erhöhten Infektiosität bei hoher Vektorausbeute pro Sf9-Zelle einhergeht. Von einem Vorteil der Verwendung des OneBac2.0-Systems bei anderen rAAV-Serotypen lässt sich bislang allerdings nicht ausgehen.

4.2 Bedeutung der Rep-Bindestelle (RBE)

Ein grundsätzliches Problem in der Herstellung viraler Vektoren in der Gentherapie ist die Verpackung von nicht-Vektor DNA neben dem Transgen in den Vektor. Durch Mietzsch et al. konnte gezeigt werden, dass im OneBac-System Fremd-DNA gehäuft neben dem Transgen verpackt wird, die Koverpackung von *rep* und *cap* jedoch relativ gering ist. Im Verlauf der Arbeit am OneBac2.0-System bestätigten sich die Hinweise, dass durch die Präsenz der Rep-Bindestelle Teile der Plasmid-DNAs insbesondere *rep*- bzw. *cap*-Gensequenzen in die rAAVs verpackt werden. Ursprünglich wurde das RBE, welches sich beim AAV-Wildtypvirus im Bereich der ITRs befindet, auf den AAV2-*rep*-tragenden Plasmiden als Transkriptionssignal zur Steigerung der Amplifikation von *rep* und *cap* bzw. zur Steigerung der Vektorausbeute implementiert. Um zu beweisen, dass die Interaktion von hr2 und

dem baculoviralen Faktor IE-1 bzw. die konsekutive Polyhedrin-Promoter-Aktivierung für die Herstellung hoher Mengen infektiöser rAAV5 ausreicht, analysierten wir die gewonnenen Δ RBE-rAAV5 hinsichtlich ihrer Kapsidproteine, Vektormenge und Transduktionseffizienz. Im OneBac2.0 System konnten wir eine bspw. zum Aslanidi et al. System vergleichbare Δ RBE-rAAV5-Ausbeute erzielen.^{25,84} So lag diese bei Zellklon 7 bei $3,3 \times 10^4$ rAAV5 pro Sf9-Zelle im Vergleich zu der von Aslanidi et al. beschriebenen Vektorausbeute von $1,4 \times 10^5$ rAAV5 pro Sf9-Zelle.⁸⁴ Im Transduktionsassay konnten wir zeigen, dass die rAAV5 aus den Zellklonen 1, 3, 8 und 10 eine dem rAAV5 E5B gleichwertige Transduktionseffizienz aufwiesen. Interessanterweise zeigte rAAV5 aus Zellklon 7 gegenüber rAAV5 E5B sogar ein 2-fach erhöhtes Transduktionspotenzial, wobei dies bei Einfachbestimmung allerdings nur bedingt vergleichbar ist. In Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass die Rep-Bindestelle für die Verpackung der Transgenkassette in das Vektorkapsid nicht notwendig ist und trotz ihrer Deletion aus den pIR-Plasmiden hohe Vektormengen sowie transduktionseffiziente rAAV5 produziert werden können. Damit scheint die hr2-Sequenz im Zusammenspiel mit dem baculoviralen IE-1 Faktor und den Polyhedrin-Promotoren eine ausreichende Transkription von *rep* und *cap* bzw. rAAV5-Genese zu gewährleisten. Nach Abschluss dieser Arbeit wurden im Rahmen unserer OneBac2.0-Publikation weitere Experimente mit dem Nachweisziel durchgeführt, dass durch die Deletion von RBE die Verpackung von Fremd-DNA in die rAAV5 reduziert wird. Hierfür wurden zunächst die *rep*- und *cap*-tragenden pIR-RBE⁺-Plasmide und die *rep*- und *cap*-tragenden pIR- Δ RBE-Plasmide in Sf9-Zellen kotransfiziert. In der folgenden PCR-Analyse zeigten sich jeweils ca. 2 Kopien von *rep* und 5 Kopien von *cap* pro Sf9-Zelle - unabhängig vom Vorliegen von RBE. Nach Baculovirus Infektion stieg die *rep*- und *cap*-Expression beim RBE⁺-Zellklon E5B allerdings um das 10-fache im Vergleich zum Δ RBE-Zellklon 7 an.²⁵ Die *rep*-Kopienzahl nach Baculovirus-Infektion lag bei RBE⁺-Zellklon E5B bei 443 Kopien pro Sf9-Zelle gegenüber 41 Kopien bei Δ RBE-Zellklon 7.²⁵ Die *cap*-Kopienzahl lag bei Klon E5B bei 1434 und bei Klon 7 bei 208.²⁵ Trotz Deletion von RBE kam es zu einer ca. 65-fachen *rep*- und *cap*-Amplifikation.²⁵ Interessanterweise scheint eine Reduzierung der *rep*- und *cap*-Kopien die schließlich entstandene Vektormenge von $1,6 \times 10^{12}$ RBE⁺-rAAV5 (aus Zellklon E5B) gegenüber von $1,4 \times 10^{12}$ Δ RBE-rAAV5 (aus Zellklon 7) nicht zu beeinflussen bzw. eine 65-fache *rep/cap*-Amplifikation für eine hohe Vektormenge völlig ausreichend zu sein. Nach Ernte und Aufbereitung der

rAAV5 ließ sich darüber hinaus mittels quantitativer PCR nachweisen, dass die Menge verpackter Fremd-DNA (*rep*, *cap*, *bsd* (Blasticidin- Resistenzgen), *hr2*-Sequenz) in den Δ RBE-rAAV5 unter denen der RBE⁺-rAAV5 und sogar unter denen der rAAV5 aus HEK-293 Zellen lag.²⁵ Es zeigte sich, dass unter 0,001% der Δ RBE-rAAV5 *rep* und 0,02% *cap* enthielten, während 12,5% der RBE⁺-rAAV5 *rep* und 35,6% *cap* beinhalteten.²⁵ Ebenso lässt sich durch das Folgeexperiment die Rolle der *hr2*-Sequenz als Transkriptions-Enhancer und Startpunkt der DNA-Replikation unterstreichen, da die Anzahl der amplifizierten *bsd*-Sequenzen in etwa im Bereich der addierten Anzahl der *rep*- und *cap*-Kopien liegt und damit die Amplifikation der gesamten Expressionskassette der pIR-Plasmide durch *hr2* gesteuert scheint. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen folgern, dass die Rep-Bindestelle einerseits die Verpackung viraler DNA bzw. Fremd-DNA in rAAV5 vermittelt. Andererseits, dass eine RBE-Deletion die Verpackung von Fremd-DNA zwar drastisch reduziert, jedoch keine Reduktion der Vektorausbeute und der Transduktionseffizienz auftritt. Durch Mietzsch et al. konnte in einer Folgepublikation ebenfalls bei den rAAV-Serotypen 1, 2 und 8 durch Deletion der Rep-Bindestelle der genutzten pIR-Plasmide die Verpackung viraler DNA drastisch reduziert werden.¹⁰⁶

4.3 Vor- und Nachteile des OneBac2.0-System

Das OneBac2.0-System bietet gegenüber bisherigen rAAV5-Produktionssystemen viele Vorteile. So konnten gegenüber der rAAV5-Gewinnung aus HEK-293 Zellen und aus #6-Sf9-Zellen (OneBac-System) hohe Vektorausbeuten bei höherer Transduktionseffizienz und minimaler Fremd-DNA Verpackung erzielt werden. Fremd-DNA entspricht bspw. auf den verwendeten Plasmiden Elementen wie *cap*, *rep*, Antibiotikaresistenzgenen oder Promoter. Hauck et al. zeigten, dass in einem AAV2-Säugetierproduktionssystem die Menge von koverpackten *cap* in die rAAV2 zwischen 0.016 und 0.021% lag.¹⁰⁸ Dies entspricht den obig beschriebenen Werten im OneBac2.0-System. Damit besteht im OneBac2.0-System kein Nachteil hinsichtlich verpackter Fremd-DNA gegenüber Säugetierproduktionssystemen. Darüber hinaus besteht im Gegensatz zu Säugetierproduktionssystemen nach rAAV-Transduktion der Zielzelle keine Gefahr einer *rep* oder *cap*-Transkription, da der regulierende Polyhedrin-Promoter in Säugetierzellen nicht aktiv ist. Ein weiteres Problem in der rAAV-Herstellung besteht im sogenannten reversen Verpacken von Gensequenzen bspw. dem Ampicillin-Resistenzgen ausgehend von den ITRs, die das Transgen

flankieren.¹⁰⁹ Durch Einsatz einer verlängerten Plasmid-Sequenz, die die Füllkapazität von rAAV übersteigt, kann die reverse Verpackung reduziert werden. Im OneBac-System ist die rAAV-Kassette im 134 kb langen Baculovirus-Genom lokalisiert, welches für eine Verpackung in rAAV zu groß ist und damit reverser Verpackung vorbeugt. Eine weitere mögliche Quelle von verpackter Fremd-DNA ist das Genom der Produktionszelle. Hüser et al. konnten zeigen, dass chromosomale DNA-Sequenzen, die funktionelle Rep-Bindestellen besitzen, koverpackt werden.⁴⁵ In diesem Sinne ist es denkbar, dass in der rAAV-Herstellung auch Teile des Sf9-Zellgenoms koverpackt werden könnten. Eine im Rahmen unserer OneBac2.0 Publikation durchgeführte erste Suche nach RB-Elementen im Sf9-Genom zeigte kein Vorhandensein der vollständigen, 16 bp langen RBE-Sequenz der AAV2 ITRs.²⁵ Allerdings lässt sich bislang nicht ausschließen, dass Sequenzvariationen, die eine Rep78-Bindung ermöglichen, im Sf9-Zellgenom existieren.

Das OneBac(2.0)-System weist gegenüber Säugetiersystemen geringere Produktionskosten und eine größere Produktionseffizienz auf, da hohe Vektorausbeuten pro Sf9-Zelle erzielt werden und Sf9-Zellen darüber hinaus in Suspension kultiviert werden können. Hierbei kann wiederum das gesamte Volumen der Kultur genutzt werden, während bei adhärent wachsenden Zellkulturen die Zellmenge bzw. konsekutiv die Vektorausbeute durch die Fläche der Kulturflasche begrenzt ist. Des Weiteren bietet das OneBac(2.0)-System den enormen Vorteil von stabilen, rAAV-Serotyp-Kapsid spezifischen Zellklonen, die konstante Kapsidoberflächen und Zelltropismen bei variablen Transgen ermöglichen. Die Zellklone können eingefroren, bei Bedarf aufgetaut, mit einem Transgen-spezifischen Baculovirus infiziert und so zur Herstellung eines Transgen-spezifischen rAAV genutzt werden. Dadurch lassen sich auf effiziente, Zeit und Kosten sparende Weise rAAV in großem Maßstab für den klinischen Einsatz generieren.

Ein Problem der Insektenzellproduktionssysteme ist die Transgeninstabilität in Abhängigkeit der Passageanzahl der verwendeten Baculoviren. Im ursprünglichen auf drei Baculoviren beruhenden Insektenzellsystem von Urabe et al. limitierte dieser Umstand die Vektorausbeute.^{77,107} Im OneBac-System reduziert sich die Problematik durch Verwendung eines einzelnen Baculovirus jedoch erheblich. Des Weiteren lässt sich die Transgen-Stabilität durch Verwendung frischer Baculoviren der zweiten Passage gewährleisten. Schließlich erfolgt die Vektorgewinnung im OneBac(2.0) nach Bac-rAAV-GFP Infektion bislang ausschließlich aus abzentrifugierten Zellen,

während Vektoren, die bereits in das Medium freigesetzt wurden, verworfen werden. Im HEK-293-System konnten transduktionseffiziente Vektoren aus dem Medium gewonnen werden, was eine ebensolche Möglichkeit im Insektenzellsystem nahelegt.¹¹⁰ Zusammenfassend stellt das OneBac2.0-System gegenüber Vorsystemen ein schnelles, kostengünstiges und effektives Verfahren zur Herstellung großer Mengen höchst transduktionseffizienter rAAV5 dar.

4.4 Klinische Anwendung von rAAV5

Der Gentransfer mit rAAV bietet eine stabile Zelltransduktion mit langanhaltender Genexpression und hat von anfänglich vorklinischen Versuchen bis zum klinischen Einsatz eine rasante Entwicklung erlebt. In der klinischen Anwendung hat sich rAAV in den vergangenen Jahren u.a. im Bereich der Hämophilie A und B Therapie etabliert. Bei der Hämophilie kommt es durch den Mangel an Faktor VIII (A) bzw. IX (B) u.a. zu rezidivierenden Spontanblutungen in Gelenke, Weichgewebe aber auch dem zentralen Nervensystem (intrakranielle Hämorrhagie). Ohne eine Faktor-Substitution, die üblicherweise drei- bis viermalig pro Woche erfolgen muss, kann ein an Hämophilie-Erkrankter nicht am Alltagsleben teilnehmen. Zunächst konnten Nathwani et al. 2011 über Therapieerfolge der Hämophile B berichten. Hierbei konnte durch eine einmalige Infusion mit AAV8-Vektoren zur Transduktion der Leber die Faktor IX-Defizienz von Patienten mit Hämophilie B langfristig behoben werden.^{68,111} Im Jahr 2017 konnten Rangarajan et al. auf Basis eines im OneBac Sf9-Insektenzellsystem entwickelten rAAV5 mit einem kodon-optimierten FVIII-Transgen ohne B-Domäne ebenfalls über eine erfolgreiche Behandlung bei der Hämophilie A berichten. Durch eine einmalige Infusion von rAAV5 bei 9 Patienten konnten die Serumspiegel von Faktor VIII langfristig normalisiert werden.¹¹² Auch im 3-Jahres Follow-Up zeigte sich eine drastische Reduktionen in Faktor VIII Substitutionen und Blutungsereignissen.¹¹³ Weitere interessante Entwicklungen in der Anwendung von rAAV5 gibt es im Bereich der rheumatoiden Arthritis (RA) zu berichten. Bei der RA kommt es durch autoimmune Vorgängen in deren Zentrum der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) steht unbehandelt v.a. zu Gelenkdestruktionen. Das Zytokin Interferon β stellt hierbei einen immunmodulierenden TNF α Gegenspieler dar und könnte therapeutisch eingesetzt zu einer Reduktion der entzündlichen Vorgänge führen. Aalbers et al. konnten in Tierversuchen zeigen, dass eine intraartikuläre Injektion von rAAV5 mit einem humanen Interferon β (hIFN β -Transgen) zu einer

hohen IFN β -Expression in den injizierten Gelenken führt und das über 93% der Vektor-DNA lokal im Gelenk verbleibt, was für die klinische Anwendung hoch relevant ist.¹¹⁴ Die per rAAV5 eingebrachte Expressionskassette bietet neben dem IFN β -Transgen einen Promoter (ART-102), der unter Kontrolle des zellulären nuklearen Faktors κ B steht, der bei inflammatorischen Prozessen hochreguliert wird. In vivo würde dieser interessante Ansatz bedeuten, dass es nur bei einer artikulären Inflammation zu einer Expression vom antiinflammatorischen IFN β kommen und konsekutiv die Gelenkentzündung unterbunden werden würde. Gerade bei monoartikulären Befall scheint eine einmalige gentherapeutische rAAV-Anwendung gegenüber einer lebenslangen Immunsuppression von entscheidendem Vorteil. Vielversprechende Ergebnisse zu potentiellen klinischen rAAV5-Anwendungen liegen im Bereich der Chorea Huntington (HD) Forschung vor. Bei HD handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die auf einer CAG-Trinukleotid-Wiederholung im Huntingtin-Gen beruht. Eine wirksame Therapie gegen die tödlich-verlaufende Erkrankung gibt es bislang nicht. Eine Reduktion der Huntingtin-Genexpression ist das primäre Ziel experimenteller Studien. Zuletzt (2018) konnte durch Evers et al. gezeigt werden, dass durch intrazerebrale Injektion eines rAAV5 mit einem Mikro-RNA-Transgen die Huntingtin-Expression im Tierversuch an Minischweinen drastisch reduziert werden konnte.¹¹⁵ Die Größe des rAAV-Genoms muss bei der Herstellung von Vektoren für genetische Erkrankungen besonders bei großen betroffenen Genen berücksichtigt werden. Hierbei scheint der rAAV-Serotyp keine Auswirkungen auf die Genomgröße zu haben. So hat bspw. rAAV5 die gleiche Verpackungskapazität wie rAAV2.⁵⁸ Jedoch gelingt eine Verpackung in rAAV selbst bei einem großen Gen wie dem des Faktors VIII durch Deletion der B-Domäne. In frühen klinischen Anwendungen stellte sich eine geringe Expression des Transgens als Problem dar. Um die Transgen-Expression zu erhöhen werden heutzutage häufig Kodon-optimierte Sequenzen verwendet. Auch finden bspw. scAAV-Vektoren (self-complementary AAV-Vektoren), die das Transgen in doppelter Ausführung enthalten und nach Transduktion einen DNA-Doppelstrang bilden, Anwendung.^{68,116} Somit ist im Gegensatz zu rAAV keine Synthese des Komplementärstrangs nötig. Die Verwendung von scAAV kann die Ausbeute an Transgen deutlich erhöhen, allerdings wird die mögliche Größe des Transgens auf ca. 2,4 kb reduziert.^{117,118} Neutralisierende Antikörper stellen in der klinischen Anwendung von rAAV weiterhin ein Hindernis dar, da wie beschrieben hohe Seroprävalenzen gegenüber AAV1 und 2

bestehen. Eine Lösung bietet hier u.a. die Verwendung von rAAV auf Basis von *rep* von AAV2 und *cap* von AAV5 oder 8 (Pseudotypisierung), da gegen die Kapside von AAV5 und AAV8 seltener neutralisierende Antikörper vorliegen. Wie bereits angeführt, besteht bei AAV5 zudem keine Kreuzreaktion mit gegen AAV2 gerichteten Antikörpern. Des Weiteren treten neutralisierende Antikörper gegen AAV5 zu einem späteren Zeitpunkt im menschlichen Leben auf, sodass ein gentherapeutischer Einsatz bei jungen Menschen erleichtert wäre.⁵⁶ Nach neueren Erkenntnissen scheint die Prävalenz von AAV in immunsupprimierten Patienten gegenüber der restlichen Population deutlich erhöht.¹⁵ Damit dürfte auch das Vorkommen von neutralisierenden Antikörpern steigen, was die Chancen einer erfolgreichen Transduktion mit rAAV-Einsatz z.B. bei therapeutisch immunsupprimierten Patienten wie z.B. der RA verringert. Im Rahmen der klinischen rAAV-Applikation scheint die kritische Phase die Immunantwort des Wirtes innerhalb von zwei Monaten nach Transduktion zu sein, da in dieser Zeit durch zelluläre Proteolyse Kapsidproteine der Vektoren an der Zelloberfläche präsentiert werden.⁶⁸ Hauck et al. konnten zeigen, dass eine zytotoxische T-Zell-Aktivierung auf die bei der Transduktion eingebrachten Kapsidproteine zurückzuführen ist, sofern die rAAV lediglich minimale *cap*-Mengen enthalten.¹⁰⁸ Bei höheren *cap*-Verunreinigungen der rAAV wäre eine Kapsidprotein-Expression der transduzierten Zellen denkbar mit konsekutiver Detektion und Zerstörung durch zytotoxische T-Zellen. Ein Einsatz von Immunsuppressiva zur Hemmung einer Antikörper-vermittelten AAV-Neutralisierung und T-Zell-vermittelten Lyse der transduzierten Zellen scheint sinnvoll und fand bspw. in Form einer begleitenden Prednisolon-Gabe im Rahmen der Hämophilie A Studie von Rangarajan et al. Anwendung. Abschließend bleibt zu bedenken, dass der Einsatz mit rAAV eines Serotyps nur einen einzigen Versuch ermöglicht, da im weiteren Verlauf neutralisierende Antikörper gegen die eingesetzten rAAV gebildet werden und somit ein weiterer Einsatz wirkungslos sein könnte.¹¹⁹

4.5 Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit konnte mit der Herstellung optimierter, transduktionseffizienter rAAV5 in hoher Menge und mit sehr wenig enthaltener Fremd-DNA erreicht werden. Im Rahmen der Vektorproduktion sollte die Charakterisierung von rAAV aus dem Insektenzellmedium vorangetrieben werden, um der Frage nachzugehen, ob es sich bei diesen um transduktionseffiziente Vektoren handelt. Des Weiteren bedarf es der steten Verbesserung der AAV-Verpackungskapazität bzw. des Transgen-Designs, um in Zukunft für möglichst viele Erkrankungen Gentherapie mit AAV anbieten zu können. Auch die Forschung der Interaktion von AAV und dem Immunsystem bzw. der Einsatz immunsuppressiver Substanzen zur Reduktion neutralisierender Antikörper und zur Hemmung T-Zell-vermittelter Zellyse im Rahmen von in vivo Transduktion sollte intensiviert werden, da ein Transduktionserfolg maßgeblich durch das Immunsystem des Wirtes beeinflusst wird. Die Erkenntnisse von Hüser et al. zur AAV-Persistenz in CD3⁺ T-Lymphozyten bieten zudem interessante Ansatzpunkte für weitere Forschung zum in vivo Verhalten und zur Epidemiologie von AAV beim Menschen und sollten auf eine gut definierte Patientenpopulation ausgedehnt werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Heilbronn R, Weger S. Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics. *Handb Exp Pharmacol* 2010;143-70.
2. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol* 2012;507:229-54.
3. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 1965;149:754-6.
4. Buller RM, Janik JE, Sebring ED, Rose JA. Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* 1981;40:241-7.
5. Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2211-5.
6. Mietzsch M, Grasse S, Zurawski C, Weger S, Bennett A, Agbandje-McKenna M, Muzyczka N, Zolotukhin S, Heilbronn R. OneBac: platform for scalable and high-titer production of adeno-associated virus serotype 1-12 vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 2014;25:212-22.
7. Bantel-Schaal U, zur Hausen H. Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* 1984;134:52-63.
8. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 2004;78:6381-8.
9. Weitzman MD, Linden RM. Adeno-associated virus biology. *Methods Mol Biol* 2011;807:1-23.
10. Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11854-9.
11. Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 2004;330:375-83.
12. Blacklow NR, Hoggan MD, Rowe WP. Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *J Natl Cancer Inst* 1968;40:319-27.
13. Erles K, Sebokova P, Schlehofer JR. Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol* 1999;59:406-11.
14. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF, Masurier C. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther* 2010;21:704-12.
15. Huser D, Khalid D, Lutter T, Hammer EM, Weger S, Hessler M, Kalus U, Tauchmann Y, Hensel-Wiegel K, Lassner D, Heilbronn R. High Prevalence of Infectious Adeno-associated Virus (AAV) in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Indicative of T Lymphocytes as Sites of AAV Persistence. *J Virol* 2017;91.
16. Nault JC, Datta S, Imbeaud S, Franconi A, Mallet M, Couchy G, Letouze E, Pilati C, Verret B, Blanc JF, Balabaud C, Calderaro J, Laurent A, Letexier M, Bioulac-Sage P, Calvo F, Zucman-Rossi J. Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 2015;47:1187-93.
17. Srivastava A, Lusby EW, Berns KI. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 1983;45:555-64.

18. Ward P, Berns KI. Minimum origin requirements for linear duplex AAV DNA replication in vitro. *Virology* 1995;209:692-5.
19. Goncalves MA. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology* 2005;2:43.
20. Stutika C, Gogol-Doring A, Botschen L, Mietzsch M, Weger S, Feldkamp M, Chen W, Heilbronn R. A Comprehensive RNA Sequencing Analysis of the Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Transcriptome Reveals Novel AAV Transcripts, Splice Variants, and Derived Proteins. *J Virol* 2015;90:1278-89.
21. Redemann BE, Mendelson E, Carter BJ. Adeno-associated virus rep protein synthesis during productive infection. *J Virol* 1989;63:873-82.
22. Lusby EW, Berns KI. Mapping of the 5' termini of two adeno-associated virus 2 RNAs in the left half of the genome. *J Virol* 1982;41:518-26.
23. Mouw MB, Pintel DJ. Adeno-associated virus RNAs appear in a temporal order and their splicing is stimulated during coinfection with adenovirus. *J Virol* 2000;74:9878-88.
24. Trempe JP, Carter BJ. Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein. *J Virol* 1988;62:3356-63.
25. Mietzsch M, Casteleyn V, Weger S, Zolotukhin S, Heilbronn R. OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV5 Vectors with Enhanced Infectivity and Minimal Encapsulation of Foreign DNA. *Hum Gene Ther* 2015;26:688-97.
26. Grosse S, Penaud-Budloo M, Herrmann AK, Borner K, Fakhiri J, Laketa V, Kramer C, Wiedtke E, Gunkel M, Menard L, Ayuso E, Grimm D. Relevance of Assembly-Activating Protein for Adeno-associated Virus Vector Production and Capsid Protein Stability in Mammalian and Insect Cells. *J Virol* 2017;91.
27. Xie Q, Bu W, Bhatia S, Hare J, Somasundaram T, Azzi A, Chapman MS. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10405-10.
28. Peden CS, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ. Circulating anti-wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain. *J Virol* 2004;78:6344-59.
29. Girod A, Wobus CE, Zadori Z, Ried M, Leike K, Tijssen P, Kleinschmidt JA, Hallek M. The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol* 2002;83:973-8.
30. Vihinen-Ranta M, Wang D, Weichert WS, Parrish CR. The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. *J Virol* 2002;76:1884-91.
31. Farr GA, Zhang LG, Tattersall P. Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17148-53.
32. Popa-Wagner R, Porwal M, Kann M, Reuss M, Weimer M, Florin L, Kleinschmidt JA. Impact of VP1-specific protein sequence motifs on adeno-associated virus type 2 intracellular trafficking and nuclear entry. *J Virol* 2012;86:9163-74.
33. Kronenberg S, Bottcher B, von der Lieth CW, Bleker S, Kleinschmidt JA. A conformational change in the adeno-associated virus type 2 capsid leads to the exposure of hidden VP1 N termini. *J Virol* 2005;79:5296-303.
34. DiPrimio N, Asokan A, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ. Surface loop dynamics in adeno-associated virus capsid assembly. *J Virol* 2008;82:5178-89.

35. Agbandje-McKenna M, Kleinschmidt J. AAV capsid structure and cell interactions. *Methods Mol Biol* 2011;807:47-92.
36. Warrington KH, Jr., Gorbatyuk OS, Harrison JK, Opie SR, Zolotukhin S, Muzyczka N. Adeno-associated virus type 2 VP2 capsid protein is nonessential and can tolerate large peptide insertions at its N terminus. *J Virol* 2004;78:6595-609.
37. Tobiasch E, Rabreau M, Geletneky K, Larue-Charlus S, Severin F, Becker N, Schlehofer JR. Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J Med Virol* 1994;44:215-22.
38. Walters RW, Yi SM, Keshavjee S, Brown KE, Welsh MJ, Chiorini JA, Zabner J. Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem* 2001;276:20610-6.
39. Huang LY, Halder S, Agbandje-McKenna M. Parvovirus glycan interactions. *Curr Opin Virol* 2014;7:108-18.
40. Buning H, Perabo L, Coutelle O, Quadt-Humme S, Hallek M. Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med* 2008;10:717-33.
41. Mani B, Baltzer C, Valle N, Almendral JM, Kempf C, Ros C. Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. *J Virol* 2006;80:1015-24.
42. Grieger JC, Snowdy S, Samulski RJ. Separate basic region motifs within the adeno-associated virus capsid proteins are essential for infectivity and assembly. *J Virol* 2006;80:5199-210.
43. Johnson JS, Samulski RJ. Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus. *J Virol* 2009;83:2632-44.
44. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 1991;10:3941-50.
45. Huser D, Weger S, Heilbronn R. Packaging of human chromosome 19-specific adeno-associated virus (AAV) integration sites in AAV virions during AAV wild-type and recombinant AAV vector production. *J Virol* 2003;77:4881-7.
46. Zhang C, Cortez NG, Berns KI. Characterization of a bipartite recombinant adeno-associated viral vector for site-specific integration. *Hum Gene Ther* 2007;18:787-97.
47. 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. *J Virol* 1997;71:1079-88.
48. Lackner DF, Muzyczka N. Studies of the mechanism of transactivation of the adeno-associated virus p19 promoter by Rep protein. *J Virol* 2002;76:8225-35.
49. Jing XJ, Kalman-Maltese V, Cao X, Yang Q, Trempe JP. Inhibition of adenovirus cytotoxicity, replication, and E2a gene expression by adeno-associated virus. *Virology* 2001;291:140-51.
50. Timpe JM, Verrill KC, Trempe JP. Effects of adeno-associated virus on adenovirus replication and gene expression during coinfection. *J Virol* 2006;80:7807-15.
51. Weger S, Hammer E, Gonsior M, Stutika C, Heilbronn R. A Regulatory Element Near the 3' End of the Adeno-Associated Virus rep Gene Inhibits Adenovirus Replication in cis by Means of p40 Promoter-Associated Short Transcripts. *J Virol* 2016;90:3981-93.

52. Straus SE, Sebring ED, Rose JA. Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73:742-6.
53. Nash K, Chen W, Muzyczka N. Complete in vitro reconstitution of adeno-associated virus DNA replication requires the minichromosome maintenance complex proteins. *J Virol* 2008;82:1458-64.
54. Hong G, Ward P, Berns KI. Intermediates of adeno-associated virus DNA replication in vitro. *J Virol* 1994;68:2011-5.
55. Ni TH, Zhou X, McCarty DM, Zolotukhin I, Muzyczka N. In vitro replication of adeno-associated virus DNA. *J Virol* 1994;68:1128-38.
56. Georg-Fries B, Biederlack S, Wolf J, zur Hausen H. Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology* 1984;134:64-71.
57. Chiorini JA, Kim F, Yang L, Kotin RM. Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *J Virol* 1999;73:1309-19.
58. Zinn E, Vandenberghe LH. Adeno-associated virus: fit to serve. *Curr Opin Virol* 2014;8:90-7.
59. Govindasamy L, DiMattia MA, Gurda BL, Halder S, McKenna R, Chiorini JA, Muzyczka N, Zolotukhin S, Agbandje-McKenna M. Structural insights into adeno-associated virus serotype 5. *J Virol* 2013;87:11187-99.
60. Di Pasquale G, Davidson BL, Stein CS, Martins I, Scudiero D, Monks A, Chiorini JA. Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* 2003;9:1306-12.
61. Lebherz C, Maguire A, Tang W, Bennett J, Wilson JM. Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. *J Gene Med* 2008;10:375-82.
62. Paneda A, Lopez-Franco E, Kaeppl C, Unzu C, Gil-Royo AG, D'Avola D, Beattie SG, Olague C, Ferrero R, Sampedro A, Mauleon I, Hermening S, Salmon F, Benito A, Gavira JJ, Cornet ME, del Mar Municio M, von Kalle C, Petry H, Prieto J, Schmidt M, Fontanellas A, Gonzalez-Asequinolaza G. Safety and liver transduction efficacy of rAAV5-cohPBGD in nonhuman primates: a potential therapy for acute intermittent porphyria. *Hum Gene Ther* 2013;24:1007-17.
63. Virella-Lowell I, Zusman B, Foust K, Loiler S, Conlon T, Song S, Chesnut KA, Ferkol T, Flotte TR. Enhancing rAAV vector expression in the lung. *J Gene Med* 2005;7:842-50.
64. Srivastava A, Carter BJ. AAV Infection: Protection from Cancer. *Hum Gene Ther* 2016.
65. Kattenhorn LM, Tipper CH, Stoica L, Geraghty DS, Wright TL, Clark KR, Wadsworth SC. Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease. *Hum Gene Ther* 2016;27:947-61.
66. Clement N, Grieger JC. Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2016;3:16002.
67. Buning H, Bolyard CM, Hallek M, Bartlett JS. Modification and labeling of AAV vector particles. *Methods Mol Biol* 2011;807:273-300.
68. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CY, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, Allay J, Coleman J, Sleep S, Cunningham JM, Srivastava D, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Gray JT, Reiss UM, Nienhuis AW, Davidoff AM. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 2011;365:2357-65.

69. Scott LJ. Alipogene tiparovec: a review of its use in adults with familial lipoprotein lipase deficiency. *Drugs* 2015;75:175-82.
70. Testa F, Maguire AM, Rossi S, Pierce EA, Melillo P, Marshall K, Banfi S, Surace EM, Sun J, Acerra C, Wright JF, Wellman J, High KA, Auricchio A, Bennett J, Simonelli F. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital Amaurosis type 2. *Ophthalmology* 2013;120:1283-91.
71. Han SO, Ronzitti G, Arnson B, Leborgne C, Li S, Mingozi F, Koeberl D. Low-Dose Liver-Targeted Gene Therapy for Pompe Disease Enhances Therapeutic Efficacy of ERT via Immune Tolerance Induction. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2017;4:126-36.
72. Kurosaki F, Uchibori R, Mato N, Sehara Y, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Sugiyama Y, Kume A. Optimization of adeno-associated virus vector-mediated gene transfer to the respiratory tract. *Gene Ther* 2017.
73. Wells DJ. Systemic AAV Gene Therapy Close to Clinical Trials for Several Neuromuscular Diseases. *Mol Ther* 2017;25:834-5.
74. Gupta S, Rodier JT, Sharma A, Giuliano EA, Sinha PR, Hesemann NP, Ghosh A, Mohan RR. Targeted AAV5-Smad7 gene therapy inhibits corneal scarring in vivo. *PLoS One* 2017;12:e0172928.
75. Peng SP, Kugler S, Ma ZK, Shen YQ, Schachner M. Comparison of AAV2 and AAV5 in gene transfer in the injured spinal cord of mice. *Neuroreport* 2011;22:565-9.
76. Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* 1998;9:2745-60.
77. Urabe M, Ding C, Kotin RM. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther* 2002;13:1935-43.
78. Airene KJ, Hu YC, Kost TA, Smith RH, Kotin RM, Ono C, Matsuura Y, Wang S, Yla-Herttuala S. Baculovirus: an insect-derived vector for diverse gene transfer applications. *Mol Ther* 2013;21:739-49.
79. Blissard GW, Rohrmann GF. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu Rev Entomol* 1990;35:127-55.
80. Rohrmann GF, Erlandson MA, Theilmann DA. The genome of a baculovirus isolated from *Hemileuca* sp. encodes a serpin ortholog. *Virus Genes* 2013;47:357-64.
81. Goodwin RH, Vaughn JL, Adams JR, Louloudes SJ. Replication of a Nuclear Polyhedrosis Virus in an Established Insect Cell Line. *Journal of Invertebrate Pathology* 1970;16:284-+.
82. Negrete A, Yang LC, Mendez AF, Levy JR, Kotin RM. Economized large-scale production of high yield of rAAV for gene therapy applications exploiting baculovirus expression system. *J Gene Med* 2007;9:938-48.
83. Smith RH, Levy JR, Kotin RM. A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. *Mol Ther* 2009;17:1888-96.
84. Aslanidi G, Lamb K, Zolotukhin S. An inducible system for highly efficient production of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors in insect Sf9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:5059-64.
85. Martin J, Frederick A, Luo Y, Jackson R, Joubert M, Sol B, Poulin F, Pastor E, Armentano D, Wadsworth S, Vincent K. Generation and characterization of adeno-associated virus producer cell lines for research and preclinical vector production. *Hum Gene Ther Methods* 2013;24:253-69.

86. Guarino LA, Summers MD. Interspersed Homologous DNA of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Enhances Delayed-Early Gene Expression. *J Virol* 1986;60:215-23.
87. Pearson M, Bjornson R, Pearson G, Rohrmann G. The *Autographa californica* baculovirus genome: evidence for multiple replication origins. *Science* 1992;257:1382-4.
88. Nony P, Tessier J, Chadeuf G, Ward P, Giraud A, Dugast M, Linden RM, Moullier P, Salvetti A. Novel cis-acting replication element in the adeno-associated virus type 2 genome is involved in amplification of integrated rep-cap sequences. *J Virol* 2001;75:9991-4.
89. Donello JE, Loeb JE, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 1998;72:5085-92.
90. Mahonen AJ, Airene KJ, Purola S, Peltomaa E, Kaikkonen MU, Riekkinen MS, Heikura T, Kinnunen K, Roschier MM, Wirth T, Yla-Herttuala S. Post-transcriptional regulatory element boosts baculovirus-mediated gene expression in vertebrate cells. *J Biotechnol* 2007;131:1-8.
91. Azzoni AR, Ribeiro SC, Monteiro GA, Prazeres DM. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. *J Gene Med* 2007;9:392-402.
92. Beniya H, Funk CJ, Rohrmann GF, Weaver RF. Purification of a virus-induced RNA polymerase from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells that accurately initiates late and very late transcription in vitro. *Virology* 1996;216:12-9.
93. Burma S, Mukherjee B, Jain A, Habib S, Hasnain SE. An unusual 30-kDa protein binding to the polyhedrin gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Biol Chem* 1994;269:2750-7.
94. Jain A, Hasnain SE. A 30-kDa host protein binds to two very-late baculovirus promoters. *Eur J Biochem* 1996;239:384-90.
95. Chen H. Intron splicing-mediated expression of AAV Rep and Cap genes and production of AAV vectors in insect cells. *Mol Ther* 2008;16:924-30.
96. Vieira J, Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 1982;19:259-68.
97. JetStar™ 2.0 Plasmid Purification Kits. 2010. (Accessed 17.04.2017, 2017, at http://www.genomed-dna.de/pdf/7015008_Jetstar%20Plasmid%20Mini,%20Midi,%20Maxi%20Manual,%2030%20March%202010_print.pdf.)
98. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
99. Sambrook J, Russell, D. W. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor; 2001.
100. Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 1977;13:213-7.
101. Goodwin RH. Insect cell culture: improved media and methods for initiating attached cell lines from the Lepidoptera. *In Vitro* 1975;11:369-78.
102. Clark KR, Voulgaropoulou F, Johnson PR. A stable cell line carrying adenovirus-inducible rep and cap genes allows for infectivity titration of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 1996;3:1124-32.
103. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human

- malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 1953;97:695-710.
104. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59-74.
 105. BD FACSCalibur Instructions for Use. 2007. (Accessed 15.04.2017, 2017, at http://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCalibur_instructions.pdf.)
 106. Mietzsch M, Hering H, Hammer EM, Agbandje-McKenna M, Zolotukhin S, Heilbronn R. OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV1, AAV2, and AAV8 Vectors with Minimal Encapsidation of Foreign DNA. *Hum Gene Ther Methods* 2017;28:15-22.
 107. Kohlbrenner E, Aslanidi G, Nash K, ShklyaeV S, Campbell-Thompson M, Byrne BJ, Snyder RO, Muzyczka N, Warrington KH, Jr., Zolotukhin S. Successful production of pseudotyped rAAV vectors using a modified baculovirus expression system. *Mol Ther* 2005;12:1217-25.
 108. Hauck B, Murphy SL, Smith PH, Qu G, Liu X, Zelenaia O, Mingozi F, Sommer JM, High KA, Wright JF. Undetectable transcription of cap in a clinical AAV vector: implications for preformed capsid in immune responses. *Mol Ther* 2009;17:144-52.
 109. Chadeuf G, Ciron C, Moullier P, Salvetti A. Evidence for encapsidation of prokaryotic sequences during recombinant adeno-associated virus production and their in vivo persistence after vector delivery. *Mol Ther* 2005;12:744-53.
 110. Vandenberghe LH, Xiao R, Lock M, Lin J, Korn M, Wilson JM. Efficient serotype-dependent release of functional vector into the culture medium during adeno-associated virus manufacturing. *Hum Gene Ther* 2010;21:1251-7.
 111. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, Della Peruta M, Lheriteau E, Patel N, Raj D, Riddell A, Pie J, Rangarajan S, Bevan D, Recht M, Shen YM, Halka KG, Basner-Tschakarjan E, Mingozi F, High KA, Allay J, Kay MA, Ng CY, Zhou J, Cancio M, Morton CL, Gray JT, Srivastava D, Nienhuis AW, Davidoff AM. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* 2014;371:1994-2004.
 112. Rangarajan S, Walsh L, Lester W, Perry D, Madan B, Laffan M, Yu H, Vettermann C, Pierce GF, Wong WY, Pasi KJ. AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *N Engl J Med* 2017;377:2519-30.
 113. Pasi KJ, Rangarajan S, Mitchell N, Lester W, Symington E, Madan B, Laffan M, Russell CB, Li M, Pierce GF, Wong WY. Multiyear Follow-up of AAV5-hFVIII-SQ Gene Therapy for Hemophilia A. *N Engl J Med* 2020;382:29-40.
 114. Aalbers CJ, Bevaart L, Loiler S, de Cortie K, Wright JF, Mingozi F, Tak PP, Vervoordeldonk MJ. Preclinical Potency and Biodistribution Studies of an AAV 5 Vector Expressing Human Interferon-beta (ART-102) for Local Treatment of Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 2015;10:e0130612.
 115. Evers MM, Miniarikova J, Juhas S, Valles A, Bohuslavova B, Juhasova J, Skalnikova HK, Vodicka P, Valekova I, Brouwers C, Blits B, Lubelski J, Kovarova H, Ellederova Z, van Deventer SJ, Petry H, Motlik J, Konstantinova P. AAV5-miHTT Gene Therapy Demonstrates Broad Distribution and Strong Human Mutant Huntingtin Lowering in a Huntington's Disease Minipig Model. *Mol Ther* 2018;26:2163-77.
 116. McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 2001;8:1248-54.
 117. Bell P, Wang L, Chen SJ, Yu H, Zhu Y, Nayal M, He Z, White J, Lebel-Hagan D, Wilson JM. Effects of Self-Complementarity, Codon Optimization, Transgene,

- and Dose on Liver Transduction with AAV8. *Hum Gene Ther Methods* 2016;27:228-37.
118. Wu J, Zhao W, Zhong L, Han Z, Li B, Ma W, Weigel-Kelley KA, Warrington KH, Srivastava A. Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity. *Hum Gene Ther* 2007;18:171-82.
119. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:583-93.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Vincent Casteleyn, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Herstellung optimierter Sf9-Zelllinien für die Baculovirus-basierte Produktion rekombinanter AAV5-Vektoren mit hoher Infektiosität/ Production of optimized Sf9 cell lines for baculovirus-based production of recombinant AAV5-vectors with high infectivity 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Vincent Casteleyn hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Mietzsch M, Casteleyn V, Weger S, Zolotukhin S, Heilbronn R, OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV5 Vectors with Enhanced Infectivity and Minimal Encapsulation of Foreign DNA, Human Gene Therapy, 2015

Beitrag im Einzelnen (bitte detailliert ausführen):

Beitrag Vincent Casteleyn: Plasmidklonierung, Plasmidtransfektion, Generierung stabiler Sf9-Zelllinien, Baculovirus-Infektion, Voruntersuchung auf AAV-Genexpression, rAAV-Produktion, Auswertung der Ergebnisse angeleitet von Dr. Mario Mietzsch.

Beiträge Dr. Mario Mietzsch und Prof. Dr. Regine Heilbronn: Entwicklung des Konzeptes der Arbeit. Die Daten in den Abbildungen 1 - 4 der Arbeit wurden von Dr. Mario Mietzsch aufbauend auf den Vorarbeiten von Vincent Casteleyn erstellt und gemeinsam mit Prof. Regine Heilbronn diskutiert. Die Publikation wurde von Dr. Mario Mietzsch und Prof. Dr. Regine Heilbronn geschrieben.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Publikationsliste

- 2015 OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV5 Vectors with Enhanced Infectivity and Minimal Encapsidation of Foreign DNA.
Mietzsch M, Casteleyn V, Weger S, Zolotukhin S, Heilbronn R.
Human Gene Therapy 2015;26:688-97
- 2018 Observational study and brief analysis of diagnostic criteria in relapsing polychondritis.
Rose T, Schneider U, Bertolo M, Klotsche J, Casteleyn V, Biesen R, Burmester GR, Hiepe F.
Rheumatol Int. 2018 Nov;38(11):2095-2101.
- 2018 IgG-4 related Myositis - a new entity.
Casteleyn V, Radbruch H, Diekhoff T, Rose T, Spengler L, Schneider U, Stenzel W.
Neuromuscul Disord. 2019 Jan;29(1):70-74.
- 2018 Rezidivierendes Fieber
Casteleyn V, Höppner J.
Dtsch Arztebl Int 2019; 116: 134
- 2019 Peripheral nerve involvement in rheumatic diseases
Casteleyn V, Hahn K, Stenzel W, Siegert E.
Z Rheumatol. 2019 May;78(4):339-351

Lebenslauf

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

Danksagung

Zuallererst möchte ich Frau Prof. Dr. Regine Heilbronn für die Bereitstellung des Themas dieser Doktorarbeit und die Möglichkeit in einer beeindruckenden Forschungsgruppe zu arbeiten sehr danken. Viele interessante Gespräche sind mir in Erinnerung geblieben und haben mein Wissen als Arzt und Wissenschaftler bereichert. Ich konnte stets auf ihre Hilfe bei Problemen, die im Prozess der Laborarbeit auftraten, zählen und blicke in Dankbarkeit auf die vergangenen Jahre zurück. Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. Mario Mietzsch für die Einführung in die praktische Arbeit mit AAV, seine Hilfe, wann immer ich sie brauchte, und seine unermüdliche Geduld danken. Auch den anderen Mitarbeitern unseres Labors: Eva-Maria Hammer, Dr. Catrin Stutika, Dr. Daniela Hüser und Prof. Dr. Stefan Weger sei an dieser Stelle für ihre Hilfe und Freundlichkeit gedankt. Ohne den unermüdlichen Antrieb meiner Ehefrau Dr. Tamara Casteleyn wäre ich im Schreibprozess ein ums andere Mal steckengeblieben. Deshalb möchte ich Ihr herzlich für ihre stete Zuversicht in mich danken. Nicht unerwähnt dürfen meine Eltern und Freunde bleiben, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben. Ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter Dr. Simone Casteleyn auf deren Hilfe ich in jeder Lebenslage zählen kann.