

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

Dissertation

**Rekombinante Adeno-assoziierte Viren zur
Expression des μ -Opioid-Rezeptors in neuronalen
Zellen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Mehrnousch Abbarin
aus Teheran

Gutachter/in:

1.: Prof. Dr. R. Heilbronn

2.: Prof. Dr. C. Spies

3.: Prof. Dr. C. Zöllner

Datum der Promotion:

19.11.2010

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Adeno-Assoziierte Viren	1
1.1.1 Einteilung der Adeno-assoziierten Viren	1
1.1.2 Genom und AAV-Proteine	1
1.1.3 Lebenszyklus der Adeno-assoziierten Viren	3
1.1.3.1 Latente Infektion	3
1.1.3.2 AAV-Replikationsmechanismus	3
1.1.4 Virale Helferfunktionen	4
1.1.5 Adeno-assoziierte Viren in der Gentherapie	5
1.1.6 Verwendung alternativer AAV-Kapside	6
1.1.7 Herstellung von AAV-Vektoren	7
1.1.8 Selbstkomplementäre (sc) AAV-Vektoren	7
1.2 Schmerztherapie	9
1.2.1 Opioide	9
1.2.2 Opioid-Rezeptoren (OR)	9
1.2.2.1 Der μ -Opioid-Rezeptor (μ -OR)	10
1.2.3 Zentrale und periphere Opioidanalgesie	12
1.2.4 Therapieansätze zur Bekämpfung chronischer Schmerzerkrankungen	13
1.2.5 Gentherapeutischer Ansatz für die Therapie chronischer Schmerzen	14
1.3 Zielsetzung	15
2. MATERIAL	16
2.1 Geräte	16
2.2 Chemikalien und Reagenzien	17
2.3 Fertige Reaktionssysteme/Kits	18
2.4 Antikörper	18
2.5 Zellkulturmedien und Zusätze	18
2.6 Oligonukleotide	19
2.7 Plasmide	20
2.8 Bakterienstämme und Medien zur Kultivierung	22
2.9 Zelllinien	23
2.10 Viren	23
2.11 Computersoftware	24
2.12 Häufig verwendete Puffer	24
3. METHODEN	25
3.1 Molekularbiologische Methoden	25
3.1.1 Restriktionsenzymverdau von Plasmid-DNA	25
3.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	25
3.1.3 Ethanolpräzipitation von DNA	25
3.1.4 Horizontale DNA-Agarosegelelektrophorese	25
3.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26

3.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten	27
3.1.7 Phosphorylierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden	27
3.1.8 Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen	28
3.1.9 Plasmid-Mini-DNA-Präparation (nach der Lysozym-Methode)	28
3.1.10 Konzentrationsbestimmung von DNA	29
3.1.11 PCR-Amplifikation von DNA-Sequenzen	29
3.2 Zellkultur	30
3.2.1 Passagieren von Zellen	30
3.2.2 Einfrieren von Zellen	31
3.2.3 Auftauen von Zellen	31
3.2.4 Transiente Transfektion eukaryoter Zellen mittels Calciumphosphatpräzipitation oder Lipofektion	31
3.2.5 Infektion von permanenten Zellen	32
3.2.6 Differenzierung und Transfektion von F11 Zellen	32
3.2.7 Produktion von rAAV-Vektoren	33
3.2.8 Herstellung eines hochgereinigten rAAV-Virusstocks	33
3.2.8.1 Aussäen und Transfektion von 293T Zellen	33
3.2.8.2 Herstellung der Rohlysate und Benzonasebehandlung	34
3.2.8.3 Iodixanol-Dichtegradient	34
3.2.8.4 Heparin-Affinitätschromatographie	35
3.2.8.5 Dialyse	36
3.2.8.6 Titerbestimmung der rAAV-Stocks	36
3.3 Proteinbiochemische Methoden	37
3.3.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen	37
3.3.2 Western-Blot und Immundetektion	39
3.4 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien	41
4. ERGEBNISSE	44
4.1 Suche eines geeigneten Promotors zur gewebespezifischen Expression des μ-Opioid-Rezeptors	44
4.1.1 Klonierung von Plasmidkonstrukten zur Generierung einzelsträngiger μ OR-AAV-Vektoren	46
4.1.2 Überprüfung der Transgenexpression nach Transfektion von HeLa Zellen mit den GFP und Flag- μ OR AAV-Vektoronstrukten	47
4.1.3 Optimierung des Gelsystems zum Western-Blot Nachweis von Flag- μ OR	48
4.1.4 GFP- und Flag- μ OR-Expression nach Infektion rekombinanter AAV-Vektoren	49
4.1.5 Herstellung hochgereinigter, rekombinanter AAV-Vektoren zur Expression des μ -OR	51
4.2 Etablierung eines neuronalen Zellsystems zur Überprüfung neuronenspezifischer Aktivität der rAAV-Konstrukte	53
4.2.1 rAAV vermittelte Transgenexpression in einer humanen Neuroblastomzelllinie	53
4.2.2 Die Hybridom-Zellen F11	54
4.2.3 Aktivitätsuntersuchungen der drei Promotoren nach Transfektion von F11 Zellen in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand	55
4.2.4 Infektion von F11 Zellen durch rAAV-Vektoren	57
4.3 Selbstkomplementäre rAAV-Vektoren zur optimierten Expression des Flag-μOR	60

4.3.1 Klonierung von Plasmidkonstrukten zur Generierung selbstkomplementärer rAAV-Vektoren	60
4.3.2 Generierung selbstkomplementärer rAAVs	62
4.3.3 Expressionsanalysen nach Plasmidtransfektion und Infektion sc-rAAV-Vektoren	62
4.3.4 Überinfektion mit Ad2 zur Verstärkung der Flag- μ OR Expression der sc-rAAV Vektoren	65
4.4 Optimierung der Verpackung der selbstkomplementären rAAV-μOR-Vektoren	66
4.4.1 Transiente Runterregulation der μ OR-Expression während der Vektorverpackung	66
4.4.2 RNAi Interferenz (RNAi)	67
4.4.3 Expressionssysteme für „small interfering“ (si)-RNA's	68
4.4.4 Entwicklung eines „small-hairpin“ (sh)-RNA-Vektors zur Runterregulation der μ OR- Expression	69
4.4.5 Sequenzanalysen	69
4.4.6 Austestung der sh-RNA-Vektoren	70
4.4.7 Reduktion des μ -OR Proteinlevels durch sh-RNA-Vektoren	70
4.4.8 Austestung der wirksamsten Konzentration der sh-RNA-Vektoren	71
4.4.9 Inhibition der μ OR-Expression während der Generierung von rAAV-Vektoren	72
4.5 Überprüfung der Funktionalität der rAAV-μOR-Konstrukte	73
4.5.1 Radioaktive Bindungsstudie in einem nicht-neuronalen Zellsystem	73
5. DISKUSSION	76
5.1 Verwendung von rekombinanten adeno-assoziierten Viren als Vektorsystem für die Expression des μ-Opioid-Rezeptors	76
5.2 Einzelsträngige (ss) rAAV-Vektoren zur gewebespezifischen Expression des μ-Opioid-Rezeptors	77
5.3 Expression des μ-Opioid-Rezeptors durch einen doppelsträngigen, selbstkomplementären (sc) rAAV-Vektor	83
5.4 Funktionelle Testung der rAAV-Vektoren zur Expression des μ-Opioid-Rezeptors	85
5.5 Ausblick	88
6. LITERATURVERZEICHNIS	90
7. ANHANG	99
7.1 Zusammenfassung	99
7.2 Summary	100
7.3 Lebenslauf	102
7.4 Publikationsliste	103
7.5 Selbstständigkeitserklärung	104
7.6 Danksagung	105

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(r)AAV	(rekombinantes) Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
a.bidest	zweifach destilliertes Wasser
Ad	Adenovirus
APS	Ammoniumpersulfat
at	Technische Atmosphäre
ATP	Adenosintriphosphat
BBS	“BES buffered saline”
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bp, kbp	Basenpaare, Kilobasenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
(d)cAMP	(dibutyryl-) cyclisches Adenosinmonophosphat
<i>cap</i>	“capsid”
CBA	“chicken-beta-actin”
(c)DNA	(complementary) Desoxyribonukleinsäure
(H)CMV	(humanes) Cytomegalie Virus
Ci	Curie
CIP	„Calf Intestinal Alkaline Phosphatase“
<i>cpm</i>	“counts per minute“
DMEM	Dulbecco’s modifiziertes Eagle Medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRG	Dorsal Root Ganglion = Hinterwurzelganglion
ds	doppelsträngig
DsRed	Rot Fluoreszierendes Protein
ECL	enhanced chemoluminescence
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	“fetal calf serum“
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie

ITR	invertierte terminale Wiederholungen
kDa	Kilodalton
LB	“lysogeny broth”
min	Minute
MOI	Multiplizität der Infektion
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
mRNA	“messenger“ RNA
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NSE	Neuronen spezifische Enolase
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
OR	Opioid-Rezeptor
ORF	offener Leserahmen
PBS	“Phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
RBE	“rep binding element”
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sc	selbstkomplementär
SD/SA	“splice donor/splice acceptor“
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sh-RNA	“small hairpin” RNA
si-RNA	“small interfering“ RNA
ss	einzelsträngig
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
trs	“terminal resolution site“
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	zentrales Nervensystem
[v/v]	Volumenprozent
[w/v]	Gewichtsprozent

1. EINLEITUNG

1.1 Adeno-Assoziierte Viren

1.1.1 Einteilung der Adeno-assozierten Viren

Adeno-assozierte Viren (AAV) gehören zur Familie der *Parvoviridae*. Parvoviren sind kleine, nicht umhüllte Viren mit einem einzelsträngigen DNA Genom (ssDNA), welches von einem ikosaedrischen Capsid mit einem Durchmesser von 18-26 nm umgeben wird (Berns, 1990). Die Familie der Parvoviren umfasst zwei Unterfamilien. *Densovirinae*, die ausschließlich Insekten infizieren, und *Parvovirinae*, welche bei verschiedenen Vertebraten einschließlich des Menschen vorkommen und in die Genera Parvoviren, Erythroviren und Dependoviren unterteilt werden. Zu den letzteren zählen die AAV mit den 14 derzeit bekannten Serotypen. AAV benötigt als Dependovirus für einen produktiven Infektionszyklus die Koinfektion mit einem Helfervirus (Muzyczka *et al.*, 2001). Als Helferviren können dabei Adenoviren (Atchison *et al.*, 1965, Richardson *et al.*, 1981), nahezu alle Herpesviren (Buller *et al.*, 1981) und humane Papillomviren (Walz *et al.*, 1997) dienen.

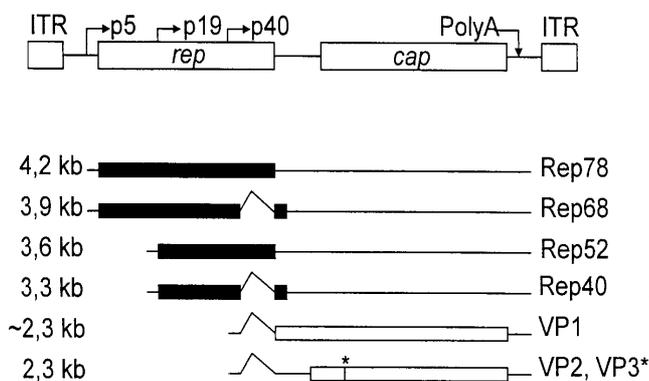


Abb. 1.1: Genomaufbau und Transkripte.

Oben dargestellt ist das AAV-Genom mit den zwei ORFs rep und cap, den Promotoren und der Polyadenylierungsstelle flankiert von den palindromischen ITR-Sequenzen. Darunter abgebildet sind die Transkriptionsprodukte. Die Balken stellen die codierenden Bereiche, die Linien die untranslatierten Bereiche und die Zacken die Introns dar. Rechts werden die Translationsprodukte angegeben (Muzyczka *et al.*, 2001).

1.1.2 Genom und AAV-Proteine

Das lineare, einzelsträngige AAV-DNA-Genom des am besten untersuchten Serotypes 2 umfasst 4860 Basenpaare (bp). Es enthält die zwei offenen Leserahmen (ORF) rep und cap flankiert von sogenannten invertierten terminalen Sequenzwiederholungen (ITRs).

Der linke Leserahmen codiert für die vier nichtstrukturellen Rep-Proteine (Mendelson *et al.*, 1986), der rechte für die drei Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 (Trempe *et al.*, 1988). Das Genom enthält weiterhin die drei Promotoren p5, p19 und

p40, die die Transkription der AAV-Gene steuern (s.Abb.1.1). Durch den Gebrauch der Promotoren p5 und p19 und alternativem Spleißen werden die Rep Gene von gleichen Leserahmen aus transkribiert und codieren die regulatorischen Proteine Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40. Diese werden nach ihrem ungefähren Molekulargewicht im SDS-PAGE benannt (Mendelson *et al.*, 1986). Vom p40 Promotor werden die Transkripte für die Kapsidproteine synthetisiert (Trempe *et al.*, 1988), wobei es zwei Spleißvarianten gibt, von denen eine für VP1 und eine für VP2 und VP3 codiert. Bei der Translation der mRNA für die Kapsidproteine VP2 und VP3 werden zudem alternative Startcodons verwendet. Die an den Genomenden positionierten, 145 bp langen ITRs können sich durch interne Basenpaarung zurückfalten und eine T-förmige Haarnadelstruktur ausbilden (Lusby *et al.*, 1980). Sie besitzen cis-regulatorische Sequenzen, die für die DNA-Replikation, die Verpackung einzelsträngiger AAV-Genome, die Integration ins Wirtsgenom in Abwesenheit eines Helfervirus (McLaughlin *et al.*, 1988) sowie für die AAV-Genexpression unerlässlich sind. Weiterhin befinden sich im Bereich der ITRs zwei *rep-binding elements* (RBE) und die *terminal resolution site* (trs) (Muzyczka *et al.*, 2001) (siehe Abb. 1.1).

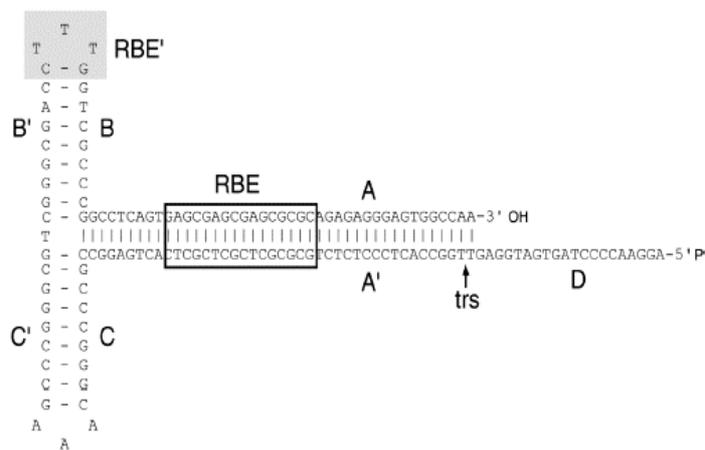


Abb. 1.2: Sekundärstruktur des AAV-2 ITR

Die AAV-ITRs befindet sich an beiden Genomenden und bestehen aus den vier Sequenzen A, B, C und D, welche eine T-förmige Haarnadelstruktur ausbilden. Diese setzt sich aus zwei inneren Palindromen (B-B' und C-C') und einem längeren äußeren Palindrom (A-A'), welches die Stammschleife der Sekundärstruktur bildet, zusammen. Die D-Sequenz liegt ungepaart vor. In der Box dargestellt ist das rep binding element (RBE) zur Bindung der Proteine Rep78 und Rep68. Ein weiteres Bindemotiv RBE' stabilisiert die Assoziation. An der terminal resolution site (trs) findet das strang- und sequenzspezifische „Nicking“ über die Helikaseaktivität der großen Rep Proteine im Rahmen der Replikation statt (Gonçalves *et al.*, 2005).

1.1.3 Lebenszyklus der Adeno-assoziierten Viren

Adeno-assoziierte Viren werden nach Bindung spezifischer Rezeptoren an der Oberfläche permissiver Zellen durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. Als primärer Rezeptor für AAV-2 wurde der Heparin-Sulfat-Proteoglycan-Rezeptor (Summerford & Samulski, 1998), als Korezeptoren der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (Qing *et al.*, 1999) und Integrin $\alpha_v\beta_5$ (Summerford *et al.*, 1999) identifiziert. Nach der Aufnahme gelangen die Viruspartikel in den Zellkern, wo die Freisetzung des Genoms (uncoating) erfolgt. Anschließend durchläuft AAV entweder eine latente oder eine produktive Infektion.

1.1.3.1 Latente Infektion

In Abwesenheit von Helferviren erfolgt eine begrenzte Expression regulatorischer Proteine von AAV. Diese bewirken eine Repression weiterer viraler Genexpression (Pereira *et al.*, 1997) und hemmen die virale Genomreplikation. AAV kann schließlich eine latente Infektion etablieren, bei der es entweder relativ ortsspezifisch in die Wirtszell-DNA integriert oder als stabiles Episom extrachromosomal verbleibt (Russell *et al.*, 2003). Die Integration erfolgt dabei häufig in eine Region des Chromosom 19 (19q13-qter) des humanen Genoms, die als AAVS1 bezeichnet wurde (Kotin *et al.*, 1990, 1991, 1992; Samulski *et al.*, 1991; Hüser *et al.*, 2003). Kommt es zu einer Superinfektion latent infizierter Zellen mit Helferviren wird das integrierte Provirus reaktiviert (rescue) und eine produktive Infektion eingeleitet (Hermonat *et al.*, 1984).

1.1.3.2 AAV-Replikationsmechanismus

In Gegenwart von Helferviren wird ein produktiver Infektionszyklus initiiert. Unter Einfluss der Helferfunktionen wird die Synthese regulatorischer Proteine erhöht, welche nun als Transaktivatoren an den AAV Promotoren fungieren (Berns *et al.*, 1995). Die Expression der großen Rep-Proteine ist zudem essenziell für die AAV-DNA-Replikation (Berns, 1990), welche über den sogenannten *single strand displacement*-Mechanismus erfolgt (Straus *et al.*, 1976; Tattersall *et al.*, 1976; Hauswirth & Berns, 1977). Die Replikation beginnt am freien 3'OH-Ende der T-förmigen ITR Struktur, welche als Primer für die Synthese des komplementären DNA-Strangs dient (Lusby *et al.*, 1980). Dieser wird nach Auflösung der Sekundärstruktur des zweiten ITR durch die Helikaseaktivität von Rep (Brister *et al.*, 1999)

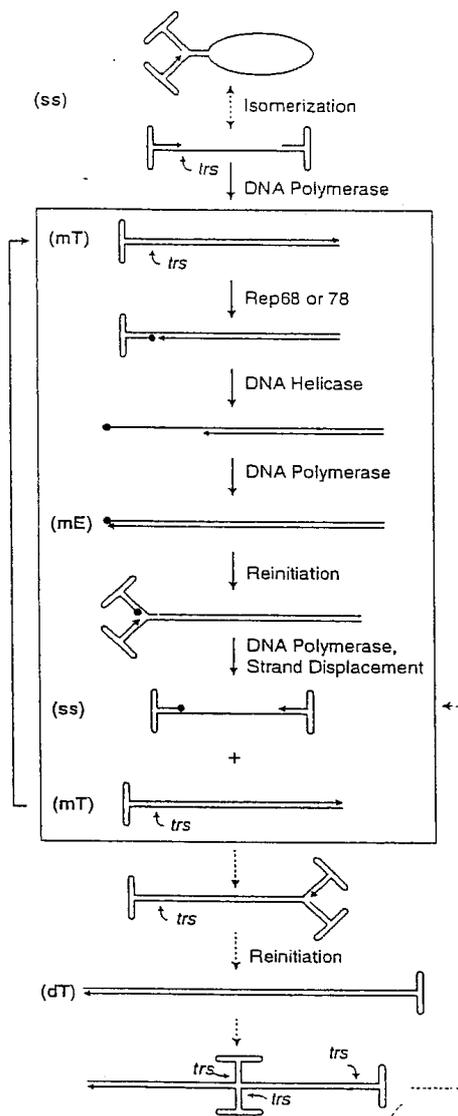


Abb. 1.3: AAV-Replikationsmodell
ss: single-stranded viral DNA, **trs**: terminal resolution site, **mE**: monomer extended replication form, **mT**: monomer extended form, **dT**: dimer turnaround replication form (Muzyczka *et al.*, 2001).

1.1.4 Virale Helferfunktionen

Für die AAV-Replikation ist ein geeignetes zelluläres Milieu notwendig, welches entweder durch die Infektion mit Helferviren oder durch Behandlung der Zellen mit UV-Strahlung oder karzinogenen Substanzen erreicht werden kann (Yakobson *et al.*, 1987, 1989; Yalkinoglu *et al.*, 1988). Als Helferviren können Adenoviren (Atchison *et al.*, 1965; Richardson *et al.*,

bis zum 5'Ende synthetisiert, wodurch die *monomer turnaround form* (mT, s.Abb.1.3) entsteht. Durch die ATP-abhängige Rep78/68-Endonukleaseaktivität wird anschließend ein Einzelstrangbruch im ursprünglichen 3'-ITR gesetzt (terminal resolution) (Im *et al.*, 1990), wobei ein freies 3'-OH-Ende entsteht. An diesem wird erneut die DNA-Synthese initiiert und bis zum Genomende fortgesetzt. Es entsteht ein über alle Bereiche doppelsträngiges DNA-Genom, die *monomer extended form* (mE, s.Abb.1.3).

Schließlich können sich die Genomenden erneut zu Haarnadelstrukturen falten, sodass es zu einer Reinitiation der DNA-Synthese kommt. Die erneute Zweitstrangsynthese hat die Verdrängung des komplementären Strangs zur Folge. Dieser gleicht dem Ausgangsprodukt, also einem einzelsträngigen AAV-Genom (ss), was in ein Kapsid verpackt werden kann. Der andere Strang (mT) dient der weiteren Replikation als Matrize oder bildet, wenn der Einzelstrangbruch durch Rep entfällt, eine doppelsträngige Replikationsform, die *dimer turnaround form* (dT) (Muzyczka *et al.*, 2001) aus.

1981), fast alle Herpesviren (Buller *et al.*, 1981) und humane Papillomviren (Walz *et al.*, 1997) fungieren, wobei die Helfereffekte auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen sind (Muzyczka *et al.*, 2001). Genauer eingegangen wird im Folgenden auf die für diese Arbeit relevanten adenoviralen Helferfunktionen.

Die für die AAV-Replikation essentiellen Faktoren können alle den frühen adenoviralen Funktionen zugeordnet werden; es handelt sich um die Genprodukte E1A, E1B, E4 ORF6 sowie E2A. Weiterhin scheint die Synthese Adenovirus-assoziiierter RNA (Ad VA-RNA) notwendig zu sein (Janik *et al.*, 1981; Muzyczka *et al.*, 2001). Das E1A Protein ist das erste Genprodukt und für die Transkription der weiteren frühen Regionen erforderlich (Richardson *et al.*, 1981). Es verstärkt die AAV-Genexpression über die Transaktivierung der drei AAV-Promotoren p5, p19 und p40 (Chang *et al.*, 1989; Berns *et al.*, 1995). Zudem induziert es den Eintritt der Zellen in die S Phase und die Produktion zellulärer Replikationsproteine, die für die AAV-Doppelstrangsynthese gebraucht werden (Muzyczka *et al.*, 2001). Zusätzlich zu E1A sind auch E1B und E4 für eine effiziente AAV-Replikation erforderlich (Laughlin *et al.*, 1982), die E4 ORF6 Funktion ist weiterhin an der Induktion der Zweitstrangsynthese (Ferrari *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 1996), aber auch an der Regulation der Genexpression (Samulski *et al.*, 1988) beteiligt. E2A stimuliert als ssDNA-bindendes Protein die Transkription von AAV Promotoren (Carter *et al.*, 1992) und die Ad VA-RNA ist an der Regulation der Synthese von AAV-Kapsidproteinen beteiligt (Janik *et al.*, 1989).

1.1.5 Adeno-assoziierte Viren in der Gentherapie

AAV gehören neben Adeno- und Retroviren zu den am häufigsten verwendeten viralen Vektoren in der Gentherapie. Sie bieten im Vergleich zu diesen auch gewisse Vorteile. So können AAV sowohl sich teilende als auch ruhende, postmitotische Zellen infizieren. Sie zeichnen sich weiterhin durch ein breites Wirtszellspektrum aus. Hierbei führt die Etablierung einer latenten Infektion in Abwesenheit von Helferviren, zum Großteil in Form episomaler Persistenz oder seltener in Form von Integration in das Wirtszellgenom zu langanhaltender Genexpression, bei gleichzeitig geringem Risiko für insertionale Mutagenese (Heilbronn & Weger, 2010). AAV ist apathogen, denn trotz der hohen Durchseuchungsrate von AAV beim Menschen (Seroprävalenz von 80% für AAV-2), konnte bisher kein Krankheitsbild ursächlich zugeordnet werden (Blacklow *et al.*, 1968; Gonçalves, 2005). Vorteilhaft ist auch, dass AAV-Vektoren nur zu einer schwachen zellvermittelten Immunreaktion führen (Monahan *et al.*, 2000). Ein Nachteil von AAV-Vektoren besteht in der limitierten Verpackungskapazität von

maximal 4,4 kbp, wodurch der Einsatz größerer Transgene ausgeschlossen ist. Ein weiterer Nachteil ist das einzelsträngige DNA-Genom von AAV, wodurch die Transgenexpression von AAV-Vektoren die Synthese des komplementären DNA-Strangs voraussetzt. Da die Zweitstrangsynthese vor allem in der S-Phase des Zellzyklus stattfindet, kann sie in ruhenden Zellen (z.B. Neuronen) nur sehr verzögert initiiert werden (Heilbronn & Weger, 2010).

1.1.6 Verwendung alternativer AAV-Kapside

In den bisherigen klinischen Studien wurden am häufigsten auf dem AAV Serotyp 2 basierende Vektoren eingesetzt, die eine Vielzahl verschiedener Zelltypen infizieren können. Allerdings kann durch die Verpackung von AAV-Genomen in Kapside alternativer Serotypen (Pseudotypisierung) der Zelltropismus verändert und für bestimmte Gewebe optimiert werden (Grimm *et al.*, 2002; Burger *et al.*, 2004; Taymans *et al.*, 2007). Die Verwendung der Kapside von AAV-1 und AAV-5 beispielsweise führte zu einer deutlich effektiveren Infektion verschiedener Areale im Gehirn, verglichen mit AAV-2 kapsidierten Vektoren (Burger *et al.*, 2004). Auch bewährten sich die Pseudosubtypen rAAV-2/1 und -2/5 (Genome von AAV-2 verpackt in Kapside der Serotypen 1 und 5) für die Infektion von Rückenmarksneuronen (Storek *et al.*, 2006) und führten zu einem retrograden Transport nach axonaler Aufnahme, was für rAAV-2/2 Vektoren (Genom und Kapsid von AAV-2) nicht gesehen wurde (Burger *et al.*, 2004). Hierbei war AAV-2/1 dem AAV-2/5 Vektor wiederum überlegen (Hollis *et al.*, 2008). Die Entdeckung neuer nicht-humaner AAV Serotypen aus Primaten, wie AAV-7 und AAV-8 aus Rhesusaffen (Gao *et al.*, 2002), brachte weitere Vorteile mit sich. Zum Einen sind diese weitestgehend vor präexistierenden Antikörpern gegen die humanen Serotypen geschützt (Gao *et al.*, 2002), zweitens erwiesen sie sich als sehr effizient in der Infektion der meisten Gewebearten, wie z.B. der Leber (Nathwani *et al.*, 2009), des Skelettmuskels (Louboutin *et al.*, 2005) und des ZNS (Broekman *et al.*, 2006). Klein *et al.* zeigten, dass rAAV-8 zu einer starken Transgenexpression in neuronalen Zellen *in vitro* und *in vivo* führt (Klein *et al.*, 2006). Eher zufällig wurde für den AAV Serotypen 8 eine sehr effiziente Infektion des Hinterhorn des Rückenmarks nachgewiesen (Foust *et al.*, 2008). Storek *et al.* konnten schließlich zeigen, dass die Infektion der sensorischen Hinterwurzelneurone des Rückenmarks durch rAAV-2/8 (Genom von AAV-2 im Kapsid des Serotypen 8) nicht nur sehr effizient (rAAV-2/8 > -2/1 > -2/5 > -2/2), sondern auch sehr selektiv ist (Storek *et al.*, 2008).

1.1.7 Herstellung von AAV-Vektoren

Für die Herstellung rekombinanter Gentherapievektoren werden alle AAV-Wildtypsequenzen bis auf die endständigen ITRs deletiert und durch das Transgen, samt vorgeschaltetem heterologen Promotor, ersetzt. Für die Vektorverpackung in mittelgroßem Labormaßstab wird das Vektorplasmid mit einem Helferplasmid kotransfiziert, welches sowohl die AAV-*rep/cap* Gene als auch die Gene für die adenoviralen Helferfunktionen trägt. Die *producer*-Zelllinie ist hierbei eine humane Nierenzelllinie, die die adenoviralen E1A und E1B Proteine bereits stabil exprimiert. Die Bildung von Wildtyp-AAV ist dabei durch Verzicht auf homologe Sequenzen zwischen dem AAV-Helferplasmid und dem zu verpackenden Vektorplasmid praktisch ausgeschlossen (Grimm *et al.*, 1998). Zum Erhalt hochkonzentrierter, aufgereinigter Vektorpräparationen für *in vivo* Anwendungen erfolgt in der Regel eine Dichtegradientenzentrifugation mit Iodixanol und eine Ligandenaffinitätschromatographie.

1.1.8 Selbstkomplementäre (sc) AAV-Vektoren

Wie bereits erwähnt, besitzt AAV ein einzelsträngiges DNA-Genom. Der wichtigste limitierende Schritt für die Transgenexpression eines rekombinanten AAV-Vektors ist die Zweitstrangsynthese zu einer transkriptionskompetenten, doppelsträngigen Form. Da die Vektoren hierfür auf den zellulären Replikationsapparat angewiesen sind, kann sich die Genexpression erheblich verzögern. Dadurch werden beispielsweise Untersuchungen an primären Zellen in Kultur wegen der begrenzten Lebensspanne deutlich erschwert. Dieses Problem der verzögerten Expressionskinetik kann durch Verwendung sogenannter selbstkomplementärer (sc) AAV-Vektoren umgangen werden. Diese verpacken bevorzugt doppelsträngige Genome, welche sofort nach Infektion der Vektoren exprimiert werden können. Zur Generierung von sc-AAVs muss die *terminal resolution site* in einem der genomflankierenden ITRs deletiert werden, wodurch die großen Rep-Proteine während der Replikation den Strang an diesem ITR nicht mehr schneiden können. Die Replikation läuft dann unter Verwendung des bereits synthetisierten Strangs als Vorlage weiter, so dass ein doppelsträngiges AAV-Genom mit einem inneren unaufgelösten ITR entsteht. Die Sequenzen zwischen dem internen deletierten ITR und den beiden äußeren ITRs sind dabei komplementär zueinander. Die komplementären Stränge hybridisieren miteinander zu einem Doppelstrang, der der RNA-Polymerase unmittelbar nach Infektion sc-AAV-Vektoren als Vorlage für die Transkription des Transgens dient (Heilbronn & Weger, 2010). Verschiedene Studien der letzten Jahre konnten zeigen, dass hierbei nicht nur eine schnellere Kinetik,

sondern auch eine höhere maximale Transgenexpression gegenüber einzelsträngigen Vektoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* resultiert (McCarty *et al.*, 2001 and 2003; Wang *et al.*, 2003). Der Nachteil ist, dass die Verpackungskapazität der sc-AAV-Vektoren gegenüber normalen AAV-Vektoren noch weiter reduziert ist, insgesamt dürfen sie zwischen den beiden ITRs maximal 2200 Basenpaare enthalten (Abb. 1.4. ss- vs. sc-AAVs).

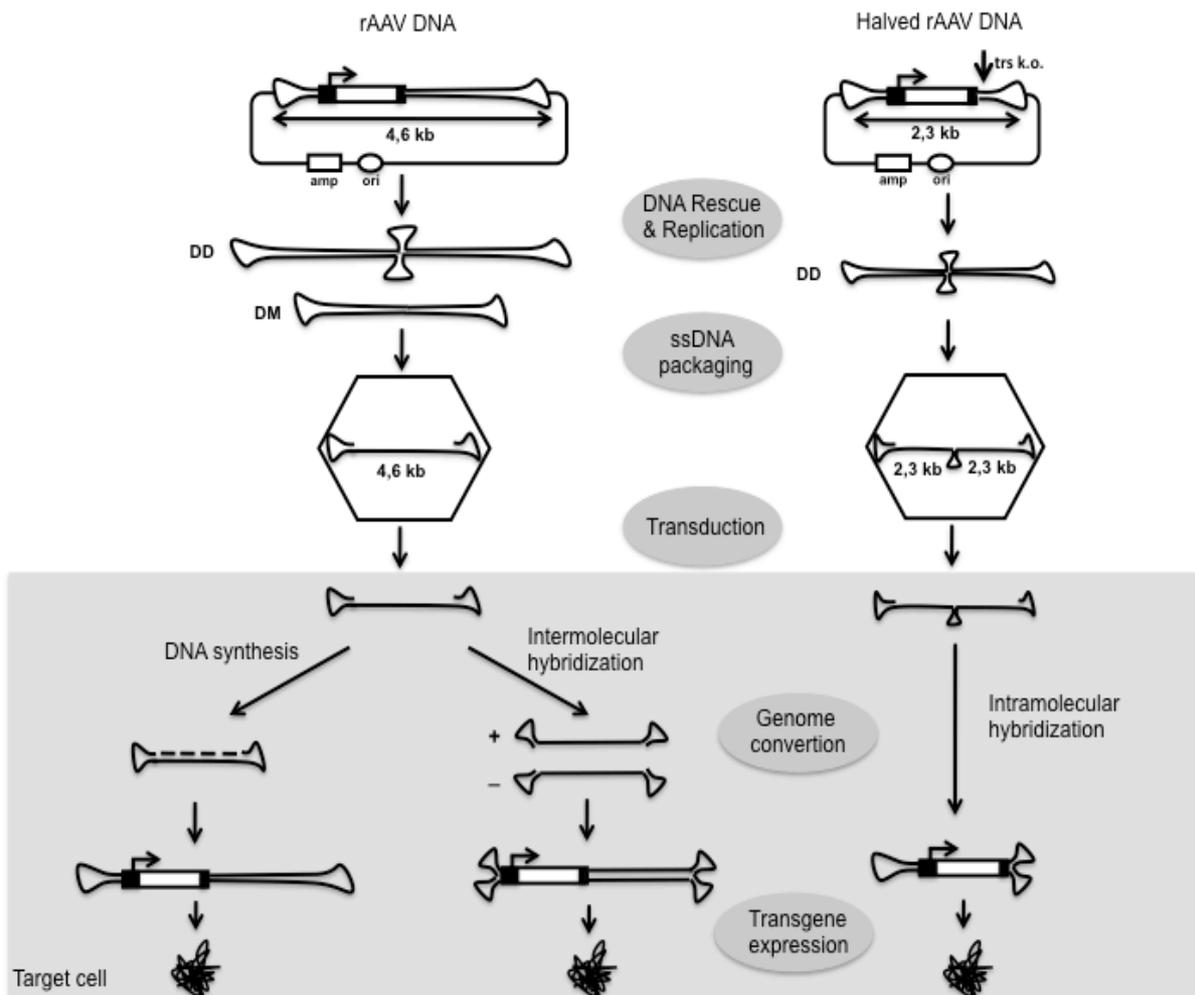


Abb. 1.4: Vergleichende Darstellung einzelsträngiger und selbstkomplementärer rAAVs.

A) Nach Infektion einzelsträngiger rAAV Vektoren muss zunächst die Umwandlung des Virusgenoms in eine doppelsträngige, replikationskompetente Form erfolgen. Dies geschieht durch die DNA-Synthese der Wirtszelle oder durch die Hybridisierung zweier einzelsträngiger Genome entgegengesetzter Polarität. Erst im Anschluss daran kommt es zur Transgenexpression.
 B) Bei der Verpackung selbstkomplementärer rAAVs werden DNS-Sequenzen halber Länge als Dimere repliziert. Durch Deletion der trs-site in einem der beiden ITRs wird das Schneiden des selbstkomplementären Moleküls in zwei kürzere, einzelsträngige Moleküle verhindert. Nach Infektion einer Zelle erfolgt durch Umfaltung die Bildung eines doppelsträngigen, replikationsaktiven Moleküls unabhängig vom Wirtszellmechanismus. Dieses steht der Transgenexpression sofort nach Infektion als Vorlage zur Verfügung (Abb. modifiziert, aus Gonçalves, 2005).

1.2 Schmerztherapie

1.2.1 Opioide

„Unter allen Mitteln, die es dem Allmächtigen gefallen hat uns zu geben, auf dass wir unsere Leiden lindern, ist keines so umfangreich anwendbar und so effizient in seiner Wirkung wie das Opium“ beschreibt Thomas Sydenham (1624-1680) bereits im 17ten Jahrhundert treffend die vielseitige Anwendbarkeit des potentesten aller Schmerzmittel, des Opiums.

Opium, das Extrakt aus dem getrockneten Milchsaft des Schlafmohns *Papaver somniferum*, wird seit Jahrtausenden vom Menschen zur Schmerzlinderung eingesetzt. 1803/4 gelang es dem deutschen Apotheker Sertürner aus dem Opium das analgetisch wirkende Alkaloid Morphin zu isolieren, welches nach dem griechischen Gott der Träume, Morpheus, benannt wurde (Klockgether-Radke, 2002). Bis heute gehört Morphin zum Therapiestandard bei starken Schmerzen. Unter dem Begriff „Opioid“ wird eine chemisch heterologe Gruppe natürlicher und synthetischer Substanzen zusammengefasst, die die Gemeinsamkeit besitzen an Opioid-Rezeptoren wirksam zu sein. Es werden endogene, körpereigene, von exogenen Opioiden unterschieden, d.h. solchen, die von außen zugeführt werden. Unter den körpereigenen Peptiden differenziert man die Endorphine, Enkephaline und Dynorphine (Przewlocki & Przewlocka, 2001). Als bekannte Beispiele für exogene Opioide seien Morphin und Fentanyl genannt. Sie werden als Analgetika bei starken bis sehr starken Schmerzzuständen per os, intravenös oder auch transdermal verabreicht. Opioide entfalten nach Bindung an ihren spezifischen Rezeptor multiple Effekte. Als wichtigster gilt im Zusammenhang dieser Arbeit die Analgesie, also die Schmerzhemmung durch Inhibition schmerzweiterleitender Neurone. Weiterhin verursachen Opioide eine Reihe von Nebenwirkungen, die den klinischen Einsatz limitieren. Bereits in analgetischen Dosen führen diese zu Atemdepression, Übelkeit, Erbrechen, Sedierung und Konstipation. Bei längerfristiger Anwendung, z.B. im Zusammenhang mit Tumorschmerzen, neuropathischen Schmerzen und anderen chronischen Schmerzzuständen entstehen Toleranz und physische Abhängigkeit (Christoffers *et al.*, 2003).

1.2.2 Opioid-Rezeptoren (OR)

Opioid-Rezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), welche extrazelluläre Signale über GTP-bindende Proteine in das Zellinnere weiterleiten.

Sie zeichnen sich durch ein extrazelluläres Aminoende, ein intrazelluläres Carboxyende und sieben, die Membran durchspannende, α -Helices aus (Christoffers *et al.*, 2003). Aufgrund dieser von der Hefe bis zum *Homo sapiens* unverändert konservierten Struktur werden die Mitglieder dieser Proteinfamilie auch als 7-Helix-Transmembranrezeptoren bezeichnet (Pierce *et al.*, 2002) (s.Abb. 1.5, der μ -OR als Beispiel für einen GPCR). Durch die Agonistenbindung an den Opioid-Rezeptoren kommt es intrazellulär zur Aktivierung eines inhibitorischen G-Proteins, das wiederum die Adenylatcyclase hemmt. Es resultiert ein Abfall des Botenstoffes cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), eine Reduktion des Ca^{2+} - und Na^{+} - Einstroms und ein vermehrter K^{+} -Ausstrom (s.Abb.1.6). In primär afferenten Neuronen führt dies letztlich zu einer Hemmung der Erregungsbildung und -ausbreitung schmerzhafter Impulse (Akins & McCleskey, 1993; Taddese *et al.*, 1995) und einer Inhibition der Freisetzung exzitatorischer, proinflammatorischer Neuropeptide (wie z.B. Substanz P). Klinisch kommt es zu einer Schmerzlinderung (Analgesie) und einer Abnahme vermehrter Schmerzsensibilität (Hyperalgesie). Bei längerer Wirkung von Agonisten kommt es zu einer Desensibilisierung und Runterregulation von Opioid-Rezeptoren. Mechanismen wie die Rezeptor-Phosphorylierung und -Internalisierung, aber auch die Runterregulation der Rezeptor-Genexpression führen letztlich zu einer reduzierten Anzahl verfügbarer Rezeptoren an der Zelloberfläche. Diese molekularen Mechanismen erklären teilweise die im Laufe einer Opioidtherapie auftretenden Nebenwirkungen, beispielsweise die der Toleranzentwicklung, also der Notwendigkeit immer höhere Dosen zur Aufrechterhaltung des therapeutischen Effektes einsetzen zu müssen (Walwyn *et al.*, 2004).

Man unterscheidet μ -, δ - und κ -Opioid-Rezeptoren (Minami & Satoh, 1995), die die Effekte endogener und exogener Opioide im zentralen, peripheren und enterischen Nervensystem vermitteln. Sie weisen untereinander große Homologien (60-70%) auf. Regionen mit vermehrter Variabilität sind besonders das aminoternale Ende, welches für die Ligandenbindung verantwortlich ist (Raynor *et al.*, 1994), sowie die dritte intrazelluläre Schleife und das Carboxyende, welche an der Kopplung intrazellulärer *second messenger* Moleküle beteiligt sind (Gudermann *et al.*, 1996).

1.2.2.1 Der μ -Opioid-Rezeptor (μ -OR)

Die Klonierung und der Nachweis der cDNA Nukleotidsequenz des μ -OR (Chen *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993) haben das Protein in seiner Aminosäuresequenz eindeutig identifiziert.

Das Gen, das im menschlichen Genom den μ -OR kodiert, konnte auf Chromosom 6q24-25 lokalisiert werden (Wang *et al.*, 1994). Die Effekte exogener Opioiden, wie Morphin, Fentanyl aber auch der Droge Heroin werden nahezu ausschließlich über den μ -OR vermittelt (Chaturvedi *et al.*, 2000). Matthes *et al.* konnten zeigen, dass es in μ OR-knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nach Applikation von Morphin weder zur Analgesie noch zur Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit kommt. Sie schlossen daraus, dass das μ -Opioid-Rezeptor Genprodukt das molekulare Target von Morphin *in vivo* ist (Matthes *et al.*, 1996). Das synthetisch hergestellte Peptid D-Ala²-N-MePhe⁴-Gly⁵-ol-enkephalin (DAMGO) besitzt ebenfalls eine hohe Affinität zum μ -OR. DAMGO bindet selektiv am μ -OR und wird daher häufig für pharmakologische Studien eingesetzt, um die μ -OR vermittelte Wirkung nachzuweisen.

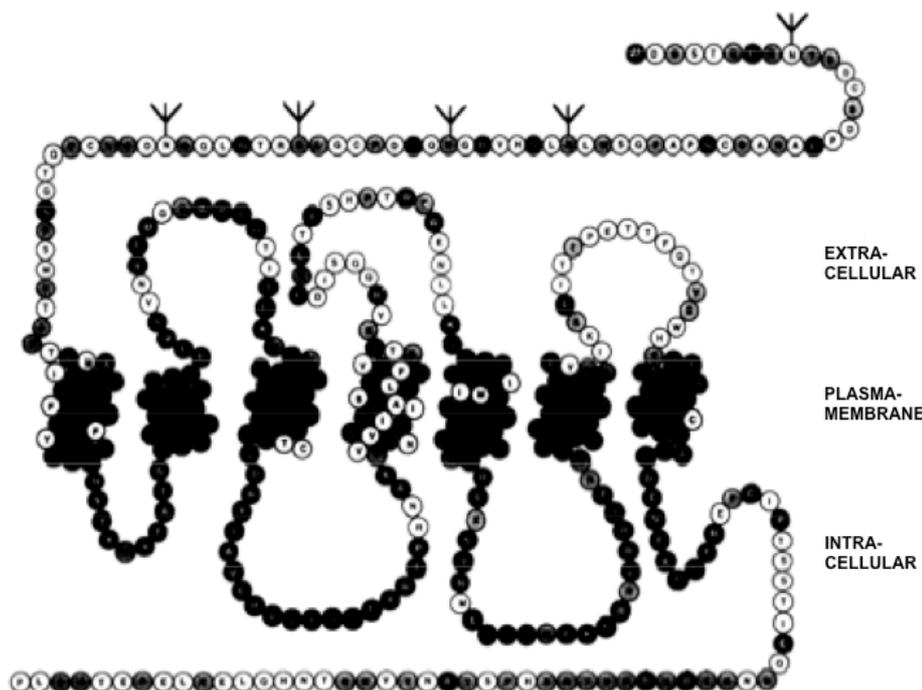


Abb. 1.5: Die Aminosäuresequenz des Ratten μ -Opioid-Rezeptors.

Zu erkennen sind 7 transmembranäre Domänen, eine extrazelluläre Schleife zur Ligandenbindung und der intrazelluläre Bereich für die Signaltransduktion. Konservierte Bereiche mit Homologien sowohl zu δ - als auch κ -OR sind schwarz, mit Homologie zu einem der anderen Rezeptorsubtypen sind grau dargestellt. Weiß sind die ausschließlich im μ -OR vorkommenden Aminosäuresequenzen, die sich extrazellulär häufen (Abb. aus Minami & Satoh, 1995).

1.2.3 Zentrale und periphere Opioidanalgesie

μ -, δ - und κ -Opioid-Rezeptoren konnten in bestimmten Strukturen des zentralen Nervensystem (ZNS) mittels radioaktiv markierten Liganden identifiziert werden (Pert & Snyder, 1973). Sie befinden sich bevorzugt im Kortex, Thalamus, Hypothalamus, in Strukturen des limbischen Systems und des Hirnstamms (Duncan, 1999). In nachfolgenden Bindungsstudien konnten ORs nicht nur im Gehirn, sondern auch im Rückenmark identifiziert werden (Kuhar *et al.*, 1973). Hier wurden μ -, δ - und κ -ORs bevorzugt im Hinterhorn des Rückenmarks nachgewiesen (Honda & Arvidsson, 1995), wo die synaptische Umschaltung vom ersten sensorischen Neuron auf das Zweite erfolgt. ORs befinden sich sowohl auf den prä- als auch auf den postsynaptischen Neuronen. In den rückenmarksnahen Spinalganglien, den Zellkörperansammlungen der Hinterwurzelneurone, erfolgt die Synthese der ORs; von hier aus werden diese intraaxonal an die peripheren Nervenendigungen und ins ZNS transportiert. An den peripheren Nervenenden können nach Expression der ORs körpereigene Opiode beispielsweise aus Immunzellen (Stein *et al.*, 2003) oder exogene Opiode (z.B. Morphin) binden (s.Abb. 1.6).

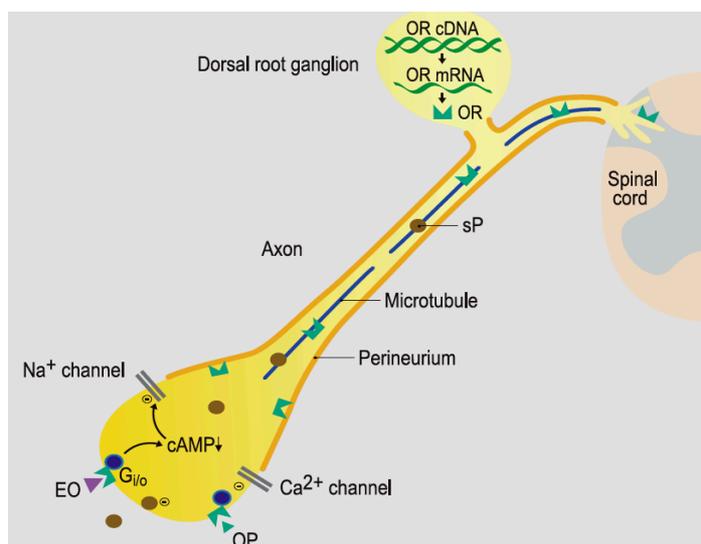


Abb. 1.6: Opioid-Rezeptorsynthese, Transport und Signaltransduktion in primär afferenten Neuronen.

Opioid-Rezeptoren (OR) und Neuropeptide wie Substanz P (sP) werden in den Hinterwurzelganglien (dorsal root ganglion) von Rückenmarksneuronen synthetisiert und entlang intraaxonaler Mikrotubuli an periphere und zentrale Endigungen der primär afferenten Neurone transportiert. Nach Expression der Rezeptoren an der neuronalen Zellmembran können endogene (OP) und exogene Opiode (EO) binden. Agonistenbindung führt über inhibitorische G-Proteine ($G_{i/o}$) zum Abfall des intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) Spiegels. Es resultiert eine Reduktion des Ca^{2+} - und Na^+ -Einstrom über die Ionenkanäle und eine reduzierte sP Ausschüttung (aus Stein *et al.*, 2003).

1.2.4 Therapieansätze zur Bekämpfung chronischer Schmerzerkrankungen

Chronischer Schmerz gehört zu den häufigsten und belastendsten medizinischen Problemen, wovon allein über die Hälfte der an malignen Tumoren erkrankten Patienten betroffen sind (Beutler *et al.*, 2005). In Deutschland leiden nach Angaben des Bundesministeriums für Bildung und Forschung mindestens vier Millionen Menschen an chronischen Schmerzen.

Chronischer Schmerz bedeutet hierbei, dass ein Patient länger als 6 Monate dauernd oder wiederkehrend unter Schmerzen leidet. Die derzeitige Schmerztherapie (nach dem WHO Stufenschema für Tumorschmerzen) erreicht bei einem wesentlichen Anteil chronisch Schmerzkranker keine ausreichende Einstellung der Schmerzsituation. Besonders unbefriedigend scheint die Situation bei Tumorpatienten zu sein. Verschiedene Studien berichten von Versagerraten zwischen 12-66% bezüglich der Schmerztherapie (Beutler & Reinhardt, 2009). Opioide sind weiterhin die potentesten Mittel zur Bekämpfung starker bis sehr starker chronischer Schmerzzustände. Deren zunehmende Anwendung hat das „Outcome“ generell verbessert (Levy *et al.*, 1996), die bereits erwähnten Nebenwirkungen limitieren allerdings oftmals den notwendigen Einsatz. Kurzfristig auftretende Nebenwirkungen, wie z.B. Sedierung, Atemdepression, Euphorie, aber auch die bei längerfristiger Anwendung auftretenden Phänomene wie die physische und psychische Abhängigkeit sind zu einem Großteil durch die Wirkung der Opioide im Gehirn bedingt. In den letzten Jahren ist daher auf dem Gebiet der Schmerzforschung die periphere Opioidanalgesie in den Mittelpunkt der Untersuchungen gerückt. Neuere wissenschaftliche Erkenntnisse zeigten, dass eine analgetische Wirkung auch durch lokale Applikation von Opioiden (Stein *et al.*, 2003) und der Wirkung von Opioiden an peripheren Nervenendigungen erzeugt werden kann. Durch die periphere Applikation von Opioiden können die zentral bedingten Nebenwirkungen vermieden werden. Ein weiterer Vorteil der peripheren Opioidanalgesie ist, dass eine zentralwärts gerichtete Weiterleitung der Schmerzimpulse entfällt und dadurch einer Schmerzchronifizierung durch Ausbildung eines Schmerzgedächtnisses entgegengewirkt wird (Woolf & Salter, 2000). Im Sinne der peripheren Opioidanalgesie ist auch das Wirken auf der Ebene der schmerzweiterleitenden Hinterwurzelganglion-Neurone (DRG-Neurone) des Rückenmarks zu beurteilen. Eine Opioidanalgesie, die durch selektives Wirken auf Rückenmarksebene erzeugt wird, führt ebenfalls zu einer effektiven Schmerzbekämpfung ohne die Entstehung bereits genannter unerwünschter Nebeneffekte im Gehirn.

1.2.5 Gentherapeutischer Ansatz für die Therapie chronischer Schmerzen

Ziel der Gentherapie ist es ebenfalls möglichst selektiv unter Umgehung systemischer Nebenwirkungen auf das Schmerzgeschehen einzuwirken. Hierbei stellen die sensorischen Rückenmarksneurone, welche an der Entstehung und Weiterleitung schmerzhafter Impulse beteiligt sind, einen wichtigen Angriffspunkt für die Gentherapie dar. Rekombinante Vektoren können hierbei einerseits für eine langanhaltende Expression von Opioiden andererseits auch für eine verstärkte Expression von Opioid-Rezeptoren eingesetzt werden.

Storek *et al.* konnten unter Verwendung von rAAV-Vektoren des Pseudosubtyps 8 eine selektive Infektion von sensorischen RM-Neuronen (DRG-Neuronen) nach Einbringen der rAAVs mittels Lumbalpunktion erreichen (Storek *et al.*, 2008). Sie injizierten dabei Vektoren zur Expression von prepro- β -Endorphin (pp β EP), einem Vorläuferprotein des β -Endorphin. In einem neuropathischen Schmerzmodell der Ratte führte die verstärkte β -Endorphin-Expression tatsächlich zu einer Umkehr der Hyperalgesie über den beobachteten Zeitraum von 3 Monaten (Storek *et al.*, 2008). Eine durch rekombinante Vektoren erzielte Erhöhung lokaler Opioidexpression bringt allerdings bei Verwendung konstitutiver Promotoren den Nachteil mit sich, dass die Expression und der damit verbundene analgetische Effekt nach Injektion der Vektoren nicht mehr steuerbar ist.

Ein alternativer gentherapeutischer Ansatz für die Schmerztherapie besteht daher darin, die Anzahl der Opioid-Rezeptoren an peripheren Neuronen durch rekombinante Vektoren zu erhöhen. Die erhöhte Rezeptoranzahl erzeugt nur dann einen Effekt, wenn Opioiden exogen zugeführt werden, was nur geschieht, wenn Schmerz vorhanden ist. In diesem Fall können die rekombinanten ORs den analgetischen Effekt exogener Opioiden auf Rückenmarksebene, wo sie exprimiert werden, verstärken. Dadurch können geringere Mengen von Opioiden appliziert werden und gleichzeitig die zentral bedingten Nebenwirkungen minimiert werden.

Weiterhin kann eine erhöhte Rezeptordichte durch die transgenen ORs einer durch Rezeptorabbau bedingten Toleranzentwicklung bei längerem Einsatz von Opioiden entgegenwirken (Walwyn *et al.*, 2004).

1.3 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es auf dem adeno-assoziierten Virus (AAV) basierende Gentherapievektoren für eine optimierte Expression des μ -Opioid-Rezeptors (μ -OR) in neuronalen Zellen herzustellen. Die längerfristige Zielstellung besteht dabei in einer Erhöhung der μ -Opioid-Rezeptordichte an den Endigungen peripherer Nerven *in vivo*. Dies würde zu einer dauerhaften Verstärkung der peripheren Opioid-Analgesie bei gleichzeitiger Vermeidung von Nebenwirkungen der Opioide im zentralen Nervensystem führen.

Im Rahmen der Arbeit sollten hierzu drei unterschiedliche Promotoren im Kontext von rekombinanten AAVs auf ihre Eignung für die spezifische Expression des μ -OR in neuronalen Zellen untersucht werden. Es handelt sich um den humanen Cytomegalievirus immediate early Enhancer/Promotor (CMV), den Chicken β -actin Promotor (CBA) und den Neuronen spezifischen Enolase Promotor (NSE). Die hergestellten Konstrukte sollten sowohl als Plasmide transfiziert als auch nach Infektion mit verpackten rekombinanten AAV-Vektoren hinsichtlich der Aktivität der Promotoren vergleichend untersucht werden. Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen sollte in nicht-neuronalen und in neuronalen Zellen die μ -OR Expression nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte zusätzlich ein selbstkomplementärer (sc) AAV-Vektor zur Expression des μ -OR hergestellt werden, der sich sowohl durch eine schnellere Expressionskinetik als auch durch eine insgesamt höhere Expressionsstärke von den einzelsträngigen (ss) AAV-Vektoren unterscheiden würde. Aufgrund der reduzierten Verpackungskapazität für sc-rAAV-Vektoren von ca. 2200 bp konnte von den vorher verwendeten Promotoren ausschließlich der CMV-Promotor zur Regulierung der Genexpression eingesetzt werden. Das sc-AAV-Konstrukt, das den μ -OR unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthielt, sollte anschließend ebenfalls in Zellkultur getestet und mittels Western-Blot-Analysen überprüft werden.

In einem letzten Schritt sollten alle Konstrukte, die in der Lage waren den μ -OR zu exprimieren, auf ihre Ligandenbindungsfähigkeit untersucht werden. Hierfür sollte die Bindung des μ -OR spezifischen, radioaktiv markierten Liganden DAMGO an das von den jeweiligen rAAV-Konstrukten exprimierte μ -OR nachgewiesen werden.

2. MATERIAL

2.1 Geräte

Neben den Geräten, die zur Standardausrüstung eines Labores gehören, wurden verwendet:

Ausschwingzentrifuge 3-10	Sigma
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Geldokumentationssystem	Intras
Gelfotodrucker	Mitsubishi
HPLC-Gerät ÄKTA purifier	GE Health Care
Inkubationsschüttler Model G25	New Brunswick Scientific
Inkubator HERAcell 150i	Thermo Scientific
Inkubator Water Jacket Model 3121	Forma Scientific
Inverses Fluoreszenz-Mikroskop DMIL	Leica
Kühlzentrifuge Mikro 22	Hettich
Lichtmikroskop CK2	Olympus
Light Cycler	Roche
Liquid Scintillation Counter 1414	Perkin Elmer Wallac GmbH
M-48 Harvester	Brandel
Megafuge 3.OR und Multifuge 4K	Heraeus Sepatech
Odyssey Scanner	Licor Biosciences
PCR-Geräte Gene Amp® 2400 und 9700	Applied Biosystems
Spektralphotometer DU-530	Beckmann
SPECTRAmax® Spectrophometer	Molecular Devices
Sterilbank S-1500	BDK Luft- und Reinraumtechnik
Sterilbank Technoflow 2F 120-II GS	Integra Biosciences
Tissumizer Ultra-Turrax T8	IKA® -Werke GmbH und Co. KG
Ultraschall-Desintegrator Sonifier 450	Branson
Ultrazentrifugen Optima™ L-90 K und LE-80 K (Rotoren SW 28- und 70 Ti)	Beckman
Vakuum-zentrifuge DNA Speed Vac 110	Savant
Zentrifugen Avanti™ J-25 (Rotoren JLA 16250 und JLA 25,50)	Beckmann

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Die Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders aufgelistet, bei den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bestellt.

Restriktionsendonukleasen T4-DNA-Ligase T4 Polynukleotidkinase Klenow CIP (Calf Intestinal Alkalische Phosphatase)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Lysozym Proteinase K RNase Bovines Serum Albumin (BSA) Naloxon (NLX) Polyethylenimmin (PEI)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Größenmarker Gene Ruler DNA Ladder Mix oder 1Kb Ladder Proteinmarker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Roth)
Der Rainbow recombinant protein molecular weight marker (RPN 800)	Amersham Biosciences (Freiburg)
Bacto™ Trypton Bacto™ BBL Yeast-Extract granuliertes Difco™ Agar	Becton, Dickinson & Company (Sparks, USA)
Photochemikalien	Agfa (München)
Tritiummarkiertes D-Ala ² -N-MePhe ⁴ -Gly ⁵ - ol-enkephalin (DAMGO)	GE Healthcare (Buckinghamshire, GB)
Protein Assay Dye Reagenz	Bio-Rad Laboratories (München)
Szintillationsflüssigkeit „High Safe 3“	PerkinElmer (Wellesley, USA)

Fertige Reaktionssysteme, Antikörper, Zellkulturmedien und Zuätze sind gesondert aufgelistet. Zum Ansetzen aller Lösungen, Medien und Puffer wurde zweifach destilliertes Wasser (aqua bidest) verwendet. Häufig verwendete Puffer sind im Materialteil aufgelistet,

Sonstige werden bei den jeweiligen Methoden beschrieben. Hitzestabile Lösungen wurden autoklaviert (bei 121°C und 2 at für 20 min), hitzelabile Lösungen sterilfiltriert.

2.3 Fertige Reaktionssysteme/Kits

Expand High Fidelity PCR Kit	Roche
Light Cycler R Fast Start DNA Master SYBR R Green I	Roche
FuGene HD Transfection Reagent	Roche
PCR Purification Kit	Qiagen
Plasmid DNA Purification Kit (Midi, Maxi)	Qiagen
Jet Star Plasmid Purification Kit (Midi, Maxi)	Genomed

2.4 Antikörper

Primärantikörper:

Anti-Flag M2 Monoklonaler Antikörper (aus Maus)	Sigma-Aldrich
Polyklonaler-anti-rabbit-GFP-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology
Polyklonaler-anti-rabbit-Flag-Antikörper	Sigma-Aldrich

Sekundärantikörper:

Goat-anti-mouse-POX	Dianova
Goat-anti-rabbit-POX	Dianova
Alexa Fluor 680 Goat-anti-mouse IgG	Invitrogen
IRDye 800CW Goat Anti-Rabbit IgG	Licor Biosciences

2.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Benzonase (Reinheitsgrad 2, 250U/μl)	Merck
Db-cAMP (N ⁶ ,2' -O-Dibutyryladenosine 3'5'-Cyclic)	Sigma-Aldrich
DMEM + GlutaMax (Dulbecco's Modified Eagle Media + L-Glutamin)	Gibco BRL
DMEM/Ham's F12 (1:1) (+L-Glutamin)	Biochrom AG
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
DOC	Fluka Analytics

(Desoxycholsäure)	
FCS (fetales Kälberserum)	Gibco BRL
NEA (nicht essentielle Aminosäuren-100x-Konzentrat)	Biochrom AG
NGF (Nerve Growth Factor-2.5S)	Sigma-Aldrich
Penicillin/ Streptomycin (10.000 E/10.000 µg/ml)	Biochrom AG
Trypsin/ EDTA (10x)	Biochrom AG

2.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG in Ebersberg synthetisiert.

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
Verwendete Primer für die Klonierung von Plasmidkonstrukten:		
OR-2 (NotI-Primer mit Stopcodon)	TATATAGCGGCCGCTTAG GGCAATGGAGCAGTTTC	Klonierung des Plasmidkonstruktes
OR-4 (XbaI-Primer mit Startcodon)	ATATTCTAGAAGTACCAT GGACTACAAGGAC	pTR-UF5-µOR
OR-2	s.oben	Klonierung der Plasmid-Konstrukte pTR-UF11-µOR und pTR-NSE-µOR
OR-3 (NotI-Primer mit Startcodon)	TATATAGCGGCCGCGAGTA CCATGGACTACAAGGAC	
Verwendete Primer für die Light Cycler PCR:		
BGA 1	CTAGAGCTCGCTGATCAGCC	Zur Bestimmung der rAAV-Virustiter, Amplifikation der
BGA 2	TGTCTTCCCAATCCTCCCC	bGH (bovine growth hormone) polyA-site

Verwendete Primer für die Generierung der Vektorplasmide mit si-RNA-Expressionskassete :

MUM-A1 Schnittstelle)	(5'-BglII	GATCCCCGGCTCAACTTG TCCCACGTTTC	Zur Generierung des sh-RNA-Vektors
MUM-A2 5'Überhang)	(interner	CTCTTGAAACGTGGGACA AGTTGAGCCGGG	pSup-MUM-A
MUM-A3 5'Überhang)	(interner	AAGAGAACGTGGGACAAG TTGAGCCTT TTTGGAAA	
MUM-A4 Schnittstelle)	(5'-HindIII	AGCTTTTCCAAAAAGGCT CAACTTGTTCCACGTT	
MOR-B1 Schnittstelle)	(5'-BglII	GATCCCCCAAGATCGTGA TCTCAATATTC	Zur Generierung des sh-RNA-Vektors
MOR-B2 5'Überhang)	(interner	CTCTTGAATATTGAGATC ACGATCTTGGGG	pSup-MOR-B
MOR-B3 5'Überhang)	(interner	AAGAGATATTGAGATCAC GATCTTGTTTTTGGAAA	
MOR-B4 Schnittstelle)	(5'-HindIII	AGCTTTTCCAAAAACAAG ATCGTGATCTCAATAT	
MOR-C1 Schnittstelle)	(5'-BglII	GATCCCCGACCGTTTCCT GGCACTTCTTC	Zur Generierung des sh-RNA-Vektors
MOR-C2 5'Überhang)	(interner	CTCTTGAAGAAGTGCCAG GAAACGGTC GGG	pSup-MOR-C
MOR-C3 5'Überhang)	(interner	AAGAGAGAAGTGCCAGGA AACGGTCTT TTTGGAAA	
MOR-C4 Schnittstelle)	(5'-HindIII	AGCTTTTCCAAAAAGACC GTTTCCTGGCACTTCT	

2.7 Plasmide

Name	Beschreibung	Herkunft (Referenz)
pBluescript II SK(+)	eingesetzt zur Klonierung und als Leervektor	Stratagene (Amsterdam)
pD-CMV-Red	codiert das DsRed Gen unter Kontrolle des CMV-Promotors; AAV-basiertes Plasmid, linker ITR mit Deletion in der trs (terminal resolution site)	AG Heilbronn

pD-CMV- μ OR (1)	codiert den Flag-getaggten μ -Opioid-Rezeptor (Flag- μ OR) unter CMV-Promotor-Kontrolle; AAV-basiertes Plasmid, linker ITR mit Deletion in der trs; Größe zwischen ITRs (Größe-ITRs): 2260bp	AG Heilbronn
pD-CMV- μ OR-dSA/SD	wie pD-CMV- μ OR mit deletierter SV40 SD/SA-Site (EcoRI/XbaI); Größe zwischen ITRs: 2080bp	kloniert aus pD-CMV- μ OR
pDG1	enthält die AAV Rep/Cap Gene und die adenoviralen Helferfunktionen E2A, E4, VA	Plasmid Factory (Bielefeld)
pD- μ OR-N2	codiert den Flag- μ OR unter CMV-Promotor-Kontrolle; AAV-basiertes Plasmid, linker ITR mit Deletion in der trs; Größe zwischen ITRs: 2276bp	kloniert aus pD-CMV-Red (mit EcoRI/SalI Flag- μ OR aus (1) in pB II SK+, mit NotI/SalI in pD-CMV-Red-NotI/SalI)
pD- μ OR-N3	codiert den Flag- μ OR unter CMV-Promotor-Kontrolle; AAV-basiertes Plasmid, linker ITR mit Deletion in der trs; Größe zwischen ITRs: 2096bp	kloniert aus pD-CMV-Red (mit XbaI/SalI Flag- μ OR aus (1) in pD-CMV-Red-XbaI/SalI)
pd-trs-GFP	codiert das green fluorescent protein (GFP) unter CMV-Promotor-Kontrolle; AAV-basiertes Plasmid, linker ITR mit Deletion in der trs; Größe zwischen ITRs: 1965bp	AG Heilbronn
pEYFP-C1	codiert das yellow fluorescent protein (YFP) unter CMV-Promotor-Kontrolle	BD Biosciences Clontech (Heidelberg)
pTR-UF5	codiert das GFP unter CMV-Promotor-Kontrolle; AAV-basiertes Plasmid	N.Muzyczka, Gainesville, USA (Zolotukhin <i>et al.</i> , 1996)
pTR-UF11	codiert das GFP unter CBA-Promotor-Kontrolle; AAV-basiertes Plasmid	N.Muzyczka, Gainesville USA
pTR-NSE	codiert das GFP unter NSE-Promotor-Kontrolle; AAV-basiertes Plasmid	N.Muzyczka, Gainesville USA
pTR-UF5- μ OR	codiert den Flag- μ OR unter CMV-Promotor-Kontrolle; AAV-basiertes Plasmid	kloniert aus pTR-UF5
pTR-UF11- μ OR	codiert den Flag- μ OR unter CBA-Promotor-Kontrolle; AAV-basiertes Plasmid	kloniert aus pTR-UF11 (Flag- μ OR-PCR in pB II SK+, mit NotI in pTR-UF11-NotI)

pTR-NSE-μOR	codiert den Flag-μOR unter NSE-Promotor-Kontrolle; AAV-basiertes Plasmid	kloniert aus pTR-NSE (Flag-μOR-PCR in pB II SK+, mit NotI in pTR-NSE-NotI)
pSuper	enthält den H1 RNA Polymerase III Promotor, der die Transkription kurzer, doppelsträngiger RNA-Sequenzen initiiert	Brummelkamp, Amsterdam, Netherlands (Brummelkamp <i>et al.</i> , 2002)
pSuper-MUM-A	codiert für das si-RNA-Transkript 5'-GGCUCAACUUGUCCCACGUdTdT-3' (Sequenz aus Zhang <i>et al.</i> , 2009) unter H1-Promotor-Kontrolle	Oligo's MUM-A1-4 in pSuper-Vektor kloniert (über BglII + Hind III Schnittstellen)
pSuper-MOR-B	codiert für das si-RNA-Transkript 5'-CAAGAUCGUGAUCUCAAUAdTdT-3' (Sequenz aus Zhang <i>et al.</i> , 2009) unter H1-Promotor-Kontrolle	Oligo's MOR-B1-4 in pSuper-Vektor kloniert (über BglII + Hind III Schnittstellen)
pSuper-MOR-C	codiert für das si-RNA-Transkript 5'-GACCGUUUCCUGGCACUUCdTdT-3' (Sequenz aus Lasek <i>et al.</i> , 2007 mit Modifizierung der 4-ten Base) unter H1-Promotor-Kontrolle	Oligo's MOR-C1-4 in pSuper-Vektor kloniert (über BglII + Hind III Schnittstellen)

2.8 Bakterienstämme und Medien zur Kultivierung

E. coli sure

Stratagene

(Mutationen im Reparatursystem, geeignet für Plasmide mit instabilen DNA-Strukturen, insbesondere den "inverted terminal repeats" (ITR) von AAV)

Genotyp: e14-(mcrA-)Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^R) uvrC F' [proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R)]

E. coli HB101

AG Heilbronn

Genotyp: F' leu B6 proA2 rec A13 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20 supE44 hsdS20

LB-Medium

10 g/l Bacto Trypton, 5g/l Bacto BBL Yeast Extract, 10 g/l NaCl, autoklavieren

LB-Agar

1,5% (w/v) Agar in LB-Medium

Ampicillin versetzte LB-Medien oder LB-Agarplatten enthalten 100 μg/ml Ampicillin.

2.9 Zelllinien

HeLa (Humane Zervixkarzinomzellen):

HeLa sind die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde, nachdem 1951 einige Karzinomzellen aus dem Gebärmutterhals der 31-jährigen **Henrietta Lacks** entfernt wurden.

HEK-293T/293-T (Humane embryonale Nierenzellen):

In das Erbgut der Zellen wurden 4,5 kbp des viralen Genoms vom menschlichen Adenovirus 5 eingebaut. Dadurch exprimieren 293-Zellen die adenoviralen Proteine E1A und E1B.

SH-SY5Y (Humane Neuroblastomzellen):

Dreifach klonierte Sublinie der bei einer Knochenmarksbiopsie entnommenen Zellen (SK-N-SH -> SH-SY -> SH-SY5 -> SH-SY5Y) eines metastasierten Neuroblastoms bei einem 4-jährigen Mädchen; 1970 isoliert (Biedler *et al.*, 1978; Ross *et al.*, 1983).

F11 (neuronale Hybridomzelllinie):

Hybridom aus Neuroblastomzellen der Maus (N18T62) und Hinterwurzelganglienzellen (DRG-Neuronen) der Ratte. F11 Zellen weisen einige Eigenschaften differenzierter Neurone, insbesondere von DRG-Neuronen auf. Sie gleichen diesen durch das Vorhandensein von μ - und δ - Opioid- (Fan *et al.*, 1992), Prostaglandin- und Bradykininrezeptoren auf der Zelloberfläche. Weiterhin schütten F11 Zellen als neuronales Merkmal einen Substanz P ähnlichen Transmitter aus (Francel *et al.*, 1987). Durch dibutyryl-cyclisches Adenosinmonophosphat (db-cAMP) und den Nervenwachstumsfaktor (NGF) ist die Differenzierung von F11 Zellen induzierbar (Francel *et al.*, 1987).

2.10 Viren

Adenovirus vom Subtyp 2 (Ad2), Virustiter von 5×10^8 PFU (plaque forming units) pro ml.

2.11 Computersoftware

Microsoft Office XP (Microsoft) wurde zur Text- und Bildbearbeitung verwendet. Zeichnungen und Abbildungen wurden mit den Programmen Adobe Photoshop CS und Adobe Illustrator CS (Adobe Systems Inc.) erstellt. Zur Planung von Klonierungen und zur Erstellung von Plasmidkarten wurde das Programm Gene Construction Kit der Firma Textco verwendet. Die Light Cycler Daten wurden mit der Light Cycler Software Data Analysis ausgewertet. Zur Analyse der HPLC Daten diente die Software Unicorn 5.1. Die Odyssey Western-Blot-Analysen wurden mit der Odyssey Software Version 2.1 bearbeitet. Die Prism 4, Graph Pad Software diente der Auswertung des Liganden-Rezeptor-Bindungsexperiments. DNA-Sequenzdaten wurden mithilfe der Homepage des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ausgewertet.

2.12 Häufig verwendete Puffer

2 x BBS	50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 6,9
10 x DNA-Ladepuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 25 % Ficoll Typ 400 10 mM EDTA
10 x PBS	2,8 g/l NaH ₂ PO ₄ 14,2 g/l Na ₂ HPO ₄ 87,7 g/l NaCl pH 7,4
5 x SDS Laufpuffer	0,25 M Tris 1,9 M Glycin 0,5 % (w/v) SDS
50 x TAE-Laufpuffer	2 M Tris 50 mM EDTA 57,1 ml Essigsäure 100 % pH 8,5
1 x TE-Puffer	10 mM Tris/ HCL pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0

3. METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Restriktionsenzymverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Schnittstellen oft anhand palindromischer Basenpaarmuster und schneiden innerhalb des DNA-Doppelstrangs eines Plasmids oder genomischer DNA. Solche Enzyme sind in der Molekularbiologie unerlässlich, sie werden z.B. zur Kontrolle eines Plasmidmusters als analytische Testverdaus angesetzt oder um ein DNA-Fragment zur Weiterklonierung zu gewinnen. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 1-2 µg DNA mit 1 µl eines vom Hersteller empfohlenen 10 x Reaktionspuffer und 1 µl eines oder mehrerer Restriktionsenzyme versetzt. Der Ansatz wurde mit aqua (a.) bidest auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Eine Inkubation von 1-2 h bei 37 °C folgte.

3.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Um Proteine aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurde dem wässrigen Gemisch Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 zugefügt, gut gemischt und bei 10.000 rpm 2 min lang zentrifugiert. Nukleinsäuren verbleiben aufgrund ihrer Hydrophilie in der wässrigen, oberen Chloroformphase, während sich Proteine in der unteren Phenolphase sammeln. Die DNA-haltige Oberphase wurde abpipettiert.

3.1.3 Ethanolpräzipitation von DNA

Nukleinsäuren können aus salzhaltigen Lösungen durch Zugabe von absoluten Ethanol (EtOH) präzipitiert werden. Dazu wurde das Volumen der Probe bestimmt und 5 M NaCl (1/50 Volumen) zugegeben. Nach Zugabe von absolutem EtOH (2,5 faches Volumen) und anschließendem Vortexen des Ansatzes, wurde die DNA entweder bei -80 °C für 10-30 min oder bei -20 °C länger als 30 min gefällt. Die Probe wurde dann bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 70% EtOH wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet und anschließend in TE-Puffer aufgenommen.

3.1.4 Horizontale DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele verwendet. Agarose bildet ein Fasernetz, das Moleküle je nach Größe unterschiedlich weit passieren lässt. Aufgrund ihres

negativen Rückgrates wandern die Nukleinsäuren der DNA durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an das Agarosegel in Richtung positiv geladener Anode. Je größer ein DNA-Fragment ist, desto stärker wird es im Gel zurückgehalten. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden 1-2 %ige Gele verwendet. Höherprozentige Gele wurden zur besseren Beurteilung kleinerer Fragmente gegossen. Hierzu wurde TAE-Puffer mit unterschiedlichen Agarosekonzentrationen aufgeköcht, bis sich die Agarose löste. Nach kurzem Abkühlen wurde die Agaroselösung blasenfrei in einen Gelschlitten gegossen. Zur Aussparung von Taschen wurde zusätzlich ein Kamm in die Gelvorrichtung eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit je 2 µl eines bromphenolblauhaltigen 10 x DNA-Ladepuffers versetzt und in die Geltaschen eines erstarrten Agarosegels pipettiert. Zusätzlich wurde ein DNA-Marker (5 µl) mitgeführt. Nach dem Anlegen einer adäquaten Spannung wurde die DNA in einem Zeitraum von ca. 1h aufgetrennt. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde das Gel für 30 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und anschließend in a. bidest entfärbt. Das Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und fluoresziert unter UV-Licht.

3.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Freeze-Squeeze-Methode:

Ein unter langwelligem UV-Licht ausgeschnittenes Agarosegelstück, welches die gewünschte DNA enthielt, wurde mit 1 ml eines „Freeze-Squeeze-Puffers“ äquilibriert. Unterdessen wurde ein 0,5 ml Eppendorfcup gelöchert. Dieses Loch wurde mit Glaswolle gestopft. Das äquilibrierte Gelfragment wurde in das präparierte Reaktionsgefäß überführt, welches wiederum in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß gesetzt wurde. In dieser Konstruktion wurde das Gelstück zur Zerstörung der Gelmatrix für mindestens 1 h bei -80°C eingefroren. Im Anschluss wurde das Gelstück während des Auftauens bei 2000 rpm 15 min lang abzentrifugiert. Hierbei passierte die DNA die Glaswolle und sammelte sich im größeren Eppendorfcup, während das Agarosegel von der Glaswolle zurückgehalten wurde.

Zur Aufreinigung und Konzentrierung der DNA wurde eine EtOH-Fällung in Gegenwart von 0,1M NaCl durchgeführt und das Pellet in 20 µl TE-Puffer gelöst. Alternativ wurde das PCR Purification Kit von Qiagen verwendet und nach dem Gelextraktionsprotokoll verfahren.

<i>Freeze-Squeeze-Puffer</i>	0,3 M	Natriumacetat pH 7,0
	1 mM	EDTA

3.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Fragmente für die Ligation wurden aus einem Restriktionsenzymverdau oder einer PCR-Amplifizierung gewonnen. Sowohl die Insert- als auch die Vektorfragmente wurden dann über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert.

Um eine Selbstligation (Selbstrezirkularisierung) des Vektors zu vermeiden, wurde dieser vor der Elektrophorese am 5'Ende dephosphoryliert. Dazu wurde die Vektor-DNA mit 10 Units/ μg DNA einer Alkalischen Phosphatase (CIP) für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Für die Ligationsreaktion wurden 100-200 ng des dephosphorylierten Vektors mit einem 2,5-fachen Überschuss des Inserts sowie mit 10 x Ligationspuffer (1/10 Volumen) und 200 *units* T4 DNA Ligase in einem Endvolumen von 8 bis 16 μl für 2-4 h bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend in chemisch kompetente Bakterienzellen transformiert.

3.1.7 Phosphorylierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden

Um Oligonukleotide in einen Vektor klonieren zu können, mussten zunächst einige vorbereitende Schritte unternommen werden. Erst wurden die Oligonukleotide auf eine Ausgangskonzentration von 10 pmol/ μl eingestellt und an den 5'Enden phosphoryliert.

<i>Phosphorylierungsansatz</i>	2,5 μl Oligonukleotid
	1 μl 10 x Polynukleotid-Kinase-Puffer
	0,5 μl 50 mM ATP
	0,5 μl T4 Polynukleotid-Kinase
	5,5 μl H ₂ O

Der Ansatz wurde zunächst 30 min bei 37°C und anschließend 10 min bei 68°C zur Inaktivierung der Kinase inkubiert. Die Konzentration der Oligonukleotide betrug an dieser Stelle 2,5 pmol/ μl .

Annealing-Reaktion:

Dann wurden die beiden einzelsträngigen, komplementären Oligonukleotide miteinander hybridisiert. Hierzu wurden je 5 μl beider Primer gemischt, auf 65 °C erhitzt und anschließend 30 min auf RT abgekühlt. Die Konzentration der einzelnen Oligonukleotide in der Mischung betrug nun 1,25 pmol/ μl . Für die Ligationsreaktion wurden die nun doppelsträngigen Oligonukleotide 1:100 oder 1:1000 vorverdünnt.

Ligationsreaktion:

Für die Ligation wurden ca. $2,5\text{--}5 \times 10^{-2}$ pmol eines vorher dephosphorylierten Vektors (s. 3.1.6), je $6,25 \times 10^{-2}$ bis 10^{-3} pmol der zwei Primerpaare, 200 Units der T4 DNA-Ligase und 1/10 Volumen eines 10 x Ligationspuffers eingesetzt und für ca. 2 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in E.coli sure.

3.1.8 Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente Bakterienzellen (E.coli sure, E.coli HB101) transformiert. Dabei wurden 1-2 µg DNA mit 50 µl kompetenten Bakterienzellen vermischt und 20-30 min auf Eis inkubiert. Nach 90 sec Hitzeschockbehandlung bei 42 °C, wurde der Ansatz wieder 2 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl antibiotikafreiem LB-Medium zur Suspension. Durch eine 30 minütige Inkubation bei 37 °C unter Schütteln wurde die Expression der Antibiotika-Resistenz-Gene der Plasmide angeregt. Der gesamte Ansatz wurde anschließend auf eine antibiotikaversetzte LB-Agarplatte ausgestrichen oder zu antibiotikahaltigem LB-Flüssigmedium zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.9 Plasmid-Mini-DNA-Präparation (nach der Lysozym-Methode)

Zunächst wurde eine Einzelkolonie von einer ampicillinhaltigen Agarplatte in 3 ml ampicillinhaltigem LB-Medium angeimpft und ü.N. bei 37 °C geschüttelt. Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen wurde 1 ml einer 3 ml Über-Nacht-Kultur bei 14.000 rpm 5 min zentrifugiert, das Pellet mit 150 µl STET-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 12 µl Lysozym (Konzentration 10 mg/ml) für 60 s bei 90 °C aufgekocht. Lysozym zerstört die Bakterienwand. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (14.000 rpm, 10 min) konnten die pelletierten Zelltrümmer mit einer Pipettenspitze entfernt werden. Der Überstand wurde mit 150 µl Isopropanol versetzt, 20 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach der EtOH-Fällung wurde das DNA-Pellet durch eine Vakuumzentrifugation getrocknet. Anschließend wurde die pelletierte DNA in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die so isolierte DNA wurde durch einen Restriktionsenzymtestverdau überprüft. Um die unerwünschte RNA zu entfernen, wurde RNase A (20 mg/ml) zur Präparation zugefügt.

Zur Gewinnung größerer Mengen reiner Plasmid-DNA wurde das Plasmid Purification Kit der Firma Qiagen oder alternativ das Jet Star Plasmid Purification Kit der Firma Genomed verwendet. Dabei dienten 100 bzw. 250 ml einer Über-Nacht-Kultur als Ausgangsmaterial.

Das weitere Vorgehen kann den Angaben der Hersteller entnommen werden.

STET-Puffer
(*sodium chlorid, Tris, EDTA,*
Triton-buffer)

8 % Saccharose
5 % Triton X-100
50 mM 0,5 M EDTA pH 8
10 mM 1 M Tris pH 8

3.1.10 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung kann durch Absorptionsspektroskopie bestimmt werden. Hierzu wurde die DNA 1:50 mit TE-Puffer auf ein Volumen von 100 μ l verdünnt. Als Leerwert diente 100 μ l TE-Puffer. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die optische Dichte (OD) dieser verdünnten Lösung photometrisch bestimmt. Nukleinsäuren besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, während Proteine Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren. OD 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA. Der Koeffizient OD_{260nm}/OD_{280nm} gibt Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäurelösung. Eine Lösung ohne Proteinkontamination weist im Idealfall ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 auf.

3.1.11 PCR-Amplifikation von DNA-Sequenzen

Die Polymerasekettenreaktion dient der Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes. Durch die Wahl zweier geeigneter, spezifischer Primer (Oligonukleotide), die gegenläufig an die DNA-Matrize binden, kann der zu amplifizierende Bereich definiert werden.

In dieser Arbeit wurde das Expand-PCR System der Firma Roche verwendet, das einen Enzymmix aus einer hitzestabilen Taq-Polymerase und einer Polymerase mit Fehler-Korrektur-Aktivität enthält.

Der PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 μ l setzte sich wie folgt zusammen:

- 10 ng einer Template DNA
- je 15 pmol von zwei spezifischen Primern
- 1/10 Volumen eines 10 x Expand-PCR-Puffers
- 200 μ M dNTPs
- 0,6 μ l des Expand-PCR-Enzym-Mixes

Im Thermocycler wurde die DNA-Matrize initial 3 min lang bei 94 °C denaturiert, es folgten insgesamt 30 Zyklen, in denen jeweils 30 s Denaturierung (94 °C), 30 s Primer-Annealing (42 °C) und 1 min Elongation (72 °C) durchgeführt wurden. Dabei dient die Hitzedenaturierung

dem Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA Doppelsträngen. Durch die anschließende Abkühlung können die Primer an die einzelsträngige DNA binden. Schließlich kann die Taq-Polymerase die Primer als Startpunkt nutzen und den komplementären Strang, von der jeweiligen Matrize, synthetisieren. Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine Inkubation von 7 min bei 72 °C, bis schließlich auf 4 °C abgekühlt wurde. Im Laufe einer angesetzten PCR mit 30 Zyklen wird eine bis zu 10⁷-fache Vervielfältigung des definierten DNA-Abschnittes erreicht.

3.2 Zellkultur

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zellen wurden in Zellkulturflaschen oder Schalen in geeignetem Medium konstant bei 37 °C, 5 % CO₂-Begasung und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

HeLa, 293T und F11 Zellen wurden in DME-Medium unter Zusatz von 10 % FCS (hitzeinaktiviert) und 1 % Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) gehalten.

Für die Kultivierung von SH-SY5Y Zellen wurden dem DME-Medium/Ham's F12 (1:1) 10 % FCS (hitzeinaktiviert), 1 % Penicillin/Streptomycin und zusätzlich 1 % NEAs zugefügt.

3.2.1 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden in 75 cm² oder 175 cm² Zellkulturflaschen gehalten und weiterpassagiert. Zum Splitten und Aussäen wurde der gesamte Zell-Monolayer kurz mit 5-10 ml Trypsin benetzt. Nach Abnahme des Trypsins und 5-minütiger Inkubation bei 37 °C konnten die Zellen abgeklopft und in frisches Vollmedium aufgenommen werden.

Je nach gewünschter Verdünnung wurde weiteres Medium zugegeben und die Zellen wurden auf neue Zellkulturflaschen oder für Transfektions- oder Infektionsversuche auf Zellkulturschalen ausgesät. In die Vertiefungen einer 12-well-Platte wurden Zellen in einem Volumen von 1 ml, in die einer 6-well-Platte in 1,5-2 ml, in einer Ø 6 cm-Kulturschale in 3 ml und in Ø 10 cm-Kulturschalen in einem Volumen von 10 ml ausgesät. Die Zellen wurden 3-5 h (HeLa Zellen) bzw. einen Tag (293T-, F11- und SH-SY5Y-Zellen) vor der Transfektion/Infektion ausgesät.

3.2.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellen von zwei 175 cm²-Zellkulturflaschen (je 10⁷ HeLa Zellen) wurden mit 1 x PBS gewaschen und abtrypsiniert, in frisches Medium aufgenommen und 5 min bei 900 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium, welches die Kristallbildung verhindert, resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in Kryotubes aliquotiert und in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter langsam auf 70 °C abgekühlt, um sie dann in einen Flüssigstickstofftank für längere Zeit aufzubewahren.

<i>Einfriermedium</i>	20 % FCS (hitzeinaktiviert)
	10 % Dimethylsulfoxid
	70 % Vollmedium

3.2.3 Auftauen von Zellen

Tiefgefrorene Zellen wurden zügig im 37° C Wasserbad aufgetaut, anschließend 5 min bei 900 rpm zentrifugiert, in frischem Vollmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Sobald sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde ein Mediumswechsel vorgenommen, um die zelltoxischen Dimethylsulfoxid-Reste zu entfernen.

3.2.4 Transiente Transfektion eukaryoter Zellen mittels Calciumphosphatpräzipitation oder Lipofektion

DNA bildet mit Calciumphosphat ein Präzipitat, welches durch Endozytose von vielen Zellen aufgenommen werden kann (Chen, Okamaya, 1987 und 1988). Für die Transfektion von HeLa Zellen in 6 Ø cm Zellkulturschalen wurden 4 µg DNA mit 150 µl 220 mM CaCl₂ und 150 µl 2 x BBS-Puffer (pH 6,9) gemischt und nach genau 15 min vorsichtig unter Schwenken der Zellkulturschale auf die Zellen gegeben. Für die Transfektion von 293T-Zellen wurde 280 mM CaCl₂ verwendet, der pH-Wert des 2 x BBS-Puffers (pH 7,4) variiert ebenso, ansonsten ist das Verfahren identisch. Alternativ kann die Transfektion mit kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien durchgeführt werden. Dabei sind die Angaben des Herstellers zu beachten. Das Prinzip beruht auf einer Komplexbildung der DNA mit Lipiden zu sogenannten Liposomen, die durch Fusionierung mit der Zellmembran in die Zelle aufgenommen werden können. In dieser Arbeit wurde das FuGene HD Transfektionsreagenz von der Firma Roche für die Transfektion von SH-SY5Y und F11 Zellen verwendet.

3.2.5 Infektion von permanenten Zellen

Für die Infektion von permanenten Zellen wurde zunächst das Medium (3 ml bei 6 Ø cm Schalen, 1,5 ml in 6-well, 1 ml in 12-well Platten) der jeweiligen Zellkulturschale abpipettiert und die aufgereinigte Viruspräparationen in entsprechender Menge, nach berechneter MOI (Multiplizität der Infektion), vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Damit die Zellen während der Infektion nicht austrocknen, wurde das Virus mit einer geringen Menge Vollmedium gemischt (Infektionsvolumen von ca. 500 µl bei 6 Ø cm Schalen, 350 µl bei 6-well und 200 µl bei 12-well Platten), so dass die Zelloberfläche gerade mit Flüssigkeit benetzt war. Bei einer Infektion mit Frier-Tau-Überständen wurde ein definiertes Volumen ohne Bestimmung von Virustiter und ohne Festlegung der MOI eingesetzt. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C mit der Virussuspension inkubiert. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurden die Zellkulturschalen alle 10 min per Hand geschwenkt. Nach der Inkubation wurde die jeweilige Zellkulturschale mit Vollmedium auf das übliche Volumen aufgefüllt. 24 h später wurde ein Mediumswechsel durchgeführt.

Bei einer zusätzlichen Adenovirusüberinfektion wurde das Virus entweder gleichzeitig oder 24 h nach rAAV-Infektion nach dem gleichen Verfahren hinzugefügt. Die Proteine für die Western-Blot-Analyse wurden in der Regel 24-48 h nach Infektion geerntet.

3.2.6 Differenzierung und Transfektion von F11 Zellen

F11 Zellen können durch Zugabe von dibutyryl-cyclischem Adenosinmonophosphat (db-cAMP) und Nervenwachstumsfaktor (NGF) zur Differenzierung angeregt werden (Francel *et al.*, 1987). Hierzu wurden die Zellen einen Tag vorher ausgesät. Bei nahezu vollständiger Konfluenz wurde das Wachstumsmedium durch Differenzierungsmedium ersetzt. Nach 4 Tagen Inkubation war die maximale Differenzierung der Zellen zu beobachten.

Sollten F11 Zellen transfiziert werden, so wurde die Transfektion einen Tag nach Aussäen der Zellen mit dem FuGeneHD Transfektionskit durchgeführt und die Differenzierung 24-36 h später induziert (Ghil *et al.*, 2000; Hwang do *et al.*, 2008).

Differenzierungsmedium

DMEM + Glutamax
+ 1 % FCS
+ 1 % Pen/Strep
+ 50 ng/ml NGF
+ 0,5 mM db-cAMP

3.2.7 Produktion von rAAV-Vektoren

293T Zellen, die bereits die adenoviralen Helferfunktionen E1A und E1B exprimieren, wurden mit einem Helfer- und einem AAV-Verpackungsplasmid kotransfiziert. Dabei liefert das Verpackungsplasmid das in den Vektor klonierte Transgen und die unerlässlichen inverted terminal repeats (ITRs) von AAV, während das Helferplasmid pDG1 die rep/cap Gene von AAV und adenovirale Helferfunktionen (E2, E4, VA-Gene) bereitstellt. Die Transfektion erfolgte nach der weiter oben beschriebenen CaPO₄-Methode von Chen und Okayama (Chen, Okayama, 1987 und 1988).

Zur Herstellung von rAAV-Frier-Tau-Virusüberständen wurden 293-T Zellen in Ø 6 oder Ø 10 cm Schalen eingesät und einen Tag später bei einer Konfluenz von 25-30 % transfiziert. Hierbei wurden das pDG1 Helferplasmid und das entsprechende Verpackungsplasmid im Verhältnis 3 zu 1 eingesetzt. 24 h später wurde ein Mediumswechsel vorgenommen und weitere 24 h bis 48 h später wurden die Zellen durch 3 x Frier-Tau-Behandlung (-80 °C im Gefrierschrank und 37 °C im Brutschrank) lysiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch 10-minütige Zentrifugation bei 4500 rpm pelletiert, der Überstand abgenommen und für anfängliche Infektionsversuche verwendet.

3.2.8 Herstellung eines hochgereinigten rAAV-Virusstocks

3.2.8.1 Aussäen und Transfektion von 293T Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden in 20 x Ø 14,5 cm-Schalen 293T Zellen in 30-40 % Konfluenz in 20 ml Medium eingesät und bei 37 °C inkubiert.

Für die Transfektion wurde der Ansatz für 20 Schalen vorsichtig gemischt und nach 15 min wurden jeweils 1824 µl unter Schwenken vorsichtig auf die Zellen einer Schale gegeben.

<i>Transfektionsansatz für 20 Schalen</i>	378 µg Helferplasmid-DNA
	126 µg AAV-Plasmid-DNA
	18,8 ml 300 mM CaCl ₂
	18,8 ml 2 x BBS

Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel.

aufgrund dessen gut zur Durchführung einer Dichtegradientenzentrifugation. Iodixanol ist in 60 % iger Konzentration (w/v) erhältlich (Zolotukhin *et al.*, 1999).

Das zuvor gewonnene DOC-Lysat bzw. das Frier-Tau-Lysat nach alternativer Methode wurde in ein Optiseal™ Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer, 32,4 ml, Beckman) gegeben und wie folgt von verschiedenen konzentrierten Iodixanol-Lösungen unterschichtet:

6 ml 15 % Iodixanol
4,5 ml 25 % Iodixanol (Phenolrot)
3,5 ml 40 % Iodixanol
3,5 ml 54 % Iodixanol (Phenolrot)

Die 15 % ige Iodixanollösung enthält 1 M NaCl, das ionische Interaktionen zwischen rAAV-Partikeln und Zellproteinen und somit eine Verteilung des Virus über den gesamten Gradienten verhindert. Die 25 % ige und die 54 % ige Lösung sind mit Phenolrot versetzt, was die optische Unterscheidung der Banden ermöglicht.

Die Viruspräparation wurde bei 54.000 rpm und 18 °C für 2 h in einem 70 Ti-Rotor in einer Ultrazentrifuge (Beckman) zentrifugiert. Die farblose Virusbande befand sich nach der Zentrifugation zwischen der 54 % - und 25 % - Iodixanolfraktion, da die Dichte von AAV etwa einer 50 % igen Iodixanol-Konzentration entspricht. Mit Hilfe einer 10 ml-Spritze wurde kurz unterhalb der 40 % igen Bande durchgestochen und die gesamte Fraktion (3-4 ml) abgezogen (Zolotukhin *et al.*, 1999).

3.2.8.4 Heparin-Affinitätschromatographie

Heparin-Agarose-Chromatographiesäule (manuell):

Heparansulfatproteoglykan (HSPG) wurde als zellulärer Rezeptor von AAV2 identifiziert (Summerford and Samulski, 1998), so dass eine Reinigung der adeno-assoziierten Viren des Subtypes 2 über eine Heparinsulfataffinitätssäule möglich ist.

Eine Flüssigchromatographiesäule (Luer Lock, 1,5x10 cm; Volumen 18 ml) von Sigma-Aldrich wurde hierbei mit 8 ml Heparin-Agarose (Sigma-Aldrich) bestückt. Nach dem Absetzen der Agarose wurde die Säule mit insgesamt 50 ml 1 x PBS/MK-Puffer äquilibriert.

Anschließend wurde die Iodixanolgradientenfraktion auf die Säule pipettiert und nach dem ersten Durchlauf (1 Tropfen/6 sec) erneut aufgetragen. Nach der Bindung des Virus an die Säule wurde diese mit 50 ml 1 x PBS/MK-Puffer gewaschen (1 Tropfen/8 sec), wobei

ungebundenes Material entfernt wurde. Zuletzt wurde das Virus mit 10 ml 1 x PBS/MK + 1M NaCl-Elutionspuffer von der Säule eluiert und in 10 x 1 ml Fraktionen (E1-10) aufgefangen.

<i>10 x PBS-MK</i>	25 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ in 10 x PBS
<i>1 x PBS-MK-NaCl</i>	<i>1 x PBS-MK + 1 M NaCl</i>

Alternativ: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Alternativ wurde die Heparin-Agarose-Affinitätschromatographie über eine HPLC durchgeführt. Hierbei erfolgte zunächst die Äquilibration der HiTrap Säule (von GE Healthcare) mit 1 x PBS-MK, dann wurde die Virus-Gradientenfraction aufgesogen und auf die Chromatographiesäule geladen. Es kam es zur spezifischen Bindung der Viruskapside an die Chromatographiematrix. Das ungebundene Material wurde durch automatische Zugabe von PBS-MK ausgewaschen. Zuletzt wurde durch 1 M NaCl im Elutionspuffer die Bindung zwischen den Kapsidproteinen und den Heparinmolekülen an der Säulenmatrix wieder gelöst. Die rAAVs wurden in wenigen Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen. Die Titerbestimmung der einzelnen Fraktionen erfolgte schließlich in der Light-Cycler-PCR.

3.2.8.5 Dialyse

Die Dialyse dient dazu, den Virusstock zu entsalzen. Dabei wurden die Fraktionen mit ausreichend hohen Virustitern in einem Dialyserahmen (Slide-A-Lyzer, 0,5-3 ml Capacity, Pierce) für 1,5 h gegen 1 x PBS dialysiert.

3.2.8.6 Titerbestimmung der rAAV-Stocks

Proteinase K Verdau:

Der Virustiter der hochgereinigten rAAVs wurde mittels Light Cycler PCR durch Quantifizierung der Virusgenomkopien bestimmt. Zur Isolierung der genomischen DNA wurden 10 µl des Virusstocks mit 1 µg des Carrierplasmids pBlueskript II SK+, 50 µl 3 x DNA-Lysepuffer und 40 µg Proteinase K versetzt und für 2 h bei 56 °C inkubiert. Dabei baute die Proteinase K die Kapsidproteine der rekombinanten Viren ab, wodurch die genomische DNA freigesetzt wurde. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender EtOH-Fällung wird die DNA über das Qiagen Purification Kit weiter

aufgereinigt. Zuletzt wurde die DNA in 30 µl a.bidest eluiert. Für die PCR wurden 5 µl einer 1:100 Verdünnung des Eluats eingesetzt.

Light Cycler PCR:

Bei diesem quantitativen Real-Time-PCR-Verfahren wird kontinuierlich das mit der Menge des Amplifikationsproduktes an Intensität zunehmende Fluoreszenzsignal gemessen, d.h. die Amplifikation kann in Echtzeit nachvollzogen werden. Die Detektion erfolgt über die Bindung des SYBR Green I Farbstoffes an doppelsträngige DNA. Dieser emittiert Licht bei einem Emissionsmaximum von 521 nm, wenn er von der Diode mit 470 nm angeregt wird.

Der Light Cycler PCR Reaktionsmix setzt sich zusammen aus Fast Starter Mix, der die Polymerase mit Puffer, dNTP's, MgCl₂ und den SYBR Green I Farbstoff enthält. Hinzugegeben wurden je 10 pmol entsprechender Primer, MgCl₂ (zu einer Endkonz. von 5 mM) und 5 µl der zu quantifizierenden Virus-DNA. Durch unterschiedlich starke Verdünnungen eines Referenzplasmids (10³ bis 10⁶ fach) wurde weiterhin eine Standardkurve erstellt, anhand derer die Konzentration der Proben abgelesen werden konnte. Im Anschluss an jeden Lauf wird eine Schmelzkurvenanalyse zur Unterscheidung von spezifischem PCR-Produkt und Primer-Dimeren durchgeführt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

Die Proteinexpression wurde mittels Western-Blot analysiert. Hierzu wurden aus den Zellen nach einer Transfektion oder Infektion Proteinextrakte hergestellt.

3.3.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Proteinextraktion und Gelelektrophorese nach der Laemmli Methode:

Zur Gewinnung von Proteinextrakten wurden die Zellen in den Zellkulturschalen zunächst zweimal mit 1 x PBS gewaschen, in 2 x Proteinprobenpuffer aufgenommen, abgeschabt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Das Mercaptoethanol im Puffer dient dem Aufbrechen von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken. Das Aufkochen dient demselben Zweck. Das SDS als anionisches Detergens bindet Proteine und überdeckt deren Eigenladung, so dass diese nur noch nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamid-Gel unter denaturierenden Bedingungen. (Sambrook *et al.*, 1989). Dabei wurden 15-18 µl der Extrakte aufgetragen. Die Größe der

aufzutrennenden Proteine bestimmt die Wahl des Acrylamidanteils im Gel. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich 10%ige Proteingele verwendet.

Lösungen und Puffer für Tris-Glycin SDS-PAGE:

2 x SDS –Proteinprobenpuffer	0,1 M Tris/HCL pH 7,5 2mM EDTA 20 % (w/v) Glycerin 4 % (w/v) SDS 10 % (w/v) Mercaptoethanol 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
Sammelgelpuffer	0,75 M Tris/ HCL pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
4,5% iges Sammelgel nach Laemmli: (Ansatz für 6 Mini-Gele)	5,9 ml a. bidest 2,5 ml Sammelgelpuffer 1,5 ml Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid) 100 µl APS (10 % w/v in a. bidest) 20 µl TEMED
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCL pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
10 %iges Trenngel nach Kornberg: (Ansatz für 6 Mini-Gele)	12,3 ml a. bidest 7,5 ml Trenngelpuffer 10 ml Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid) 200 µl APS (10% w/v in a. bidest) 40 µl TEMED
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

Alternatives Gelsystem mit Bis-Tris SDS-PAGE:

Bei diesem Verfahren handelt es sich ebenfalls um ein diskontinuierliches SDS-PAGE System, das sich im Vergleich zum standardmäßig angewendeten Tris-Glycin System u.a. durch neutrale pH-Werte im Gel und im Probenpuffer auszeichnet, was eine größere Protein stabilität gewährleisten soll. Weiterhin wurden, dem Herstellerprotokoll folgend, die Proteinproben unter milderer Bedingungen aufgearbeitet, woraus sich eine sichere Reduktion intermolekularer Disulfidbrücken ergeben sollte. Zudem sollte der Laufpuffer mit seinen antioxidativen Eigenschaften Protein oxidationen während der Elektrophorese verhindern und zu einem verbesserten Proteintransfer durch Elimination von Disulfidbrücken beitragen. Der Probenpuffer wurde vor jeder Anwendung neu hergestellt. Er setzt sich zusammen aus

1 x Probenpuffer, 1/4 Volumen 4 x NuPAGE® LDS Probenpuffer, 1/10 Volumen 10 x NuPAGE Reducing Agent sowie a. bidest. Die Zellen wurden zweimal mit 1 x PBS gewaschen, in 1 x Probenpuffer aufgenommen und abgeschabt. Anschließend wurden die Proben bei 70 °C 10 min inkubiert. Die Trennung der Proteine erfolgte in NuPAGE® SDS-Polyacrylamid-Gelen. Dem NuPAGE® Laufpuffer wurden vor Gebrauch etwa 500 µl NuPAGE® Antioxidans zugefügt. Es wurden 18 µl der Proben auf das Gel aufgetragen. Das weitere Vorgehen entspricht dem der Standardmethode.

Lösungen und Puffer für Bis-Tris SDS-PAGE:

20 x NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer	50 mM MOPS 50 mM Tris 0,1 % SDS 1 mM EDTA, pH 7,7
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Bis-Tris, pH 6,4
4x Trenngelpuffer	1,5 M Bis-Tris, pH 6,4
10%iges Trenngel: (für 2 Mini-Gele)	4 ml a. bidest 2,5 ml 4 x Trenngelpuffer 3,3 ml Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid) 100 µl 10 % SDS 100 µl APS (10 % w/v in a. bidest) 10 µl TEMED
5%iges Sammelgel: (für 2 Mini-Gele)	5,6 ml a. bidest 2,5 ml 4 x Sammelgelpuffer 1,7 ml Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid) 50 µl 10% SDS 150 µl APS (10 % w/v in a. bidest) 10 µl TEMED

NuPAGE® Antioxidans, NuPAGE® LDS Probenpuffer und das 10 x NuPAGE® Reducing Agent wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

3.3.2 Western-Blot und Immundetektion

Der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Whatmann) erfolgte mittels Semi-Dry-Elektroblotting (Towbin *et al.*, 1979). Dabei wurden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf die Membran übertragen. Hierzu wurden drei Lagen in Transferpuffer getränkter 3MM-Filterpapiere (Whatmann) auf die untere Elektrode der Blotkammer, der Anode, gestapelt. Darauf wurde die ebenfalls mit Puffer benetzte Membran gelegt. Auf die Membran wurden das Gel und drei weitere Lagen

getränkten Filterpapiers geschichtet. Der Deckel der Kammer, die Kathode, wurde aufgesetzt und die Proteine bei einer Stromstärke von 1 mA/cm^2 für 1,5 h geblottet. Nach dem Transfer wurden freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran, durch das Schwenken in einer Milchlösung (6 % Milchpulver in 1 x PBS) für mind. 1 h, abgesättigt. Danach wurde die Membran mit einem spezifischen Primärantikörper (1:500 bis 1:2000 in Milchlösung + 0,3 % Tween verdünnt) behandelt. Die Inkubation der Membran mit dem Antikörper erfolgte entweder bei RT für 1,5 h oder bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ü. N. Anschließend wurde die Membran 3 x für 5 min in PBS-T (1 x PBS + 0,1 % Tween) gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:2000 verdünnt) für 1 h bei RT. Schließlich wurde die Membran nochmals 3 x für 15 min in PBS-T gewaschen.

ECL-System:

Zur Sichtbarmachung der Immunreaktion wurde das Enhanced Chemiluminescence Analysis Kit (ECL) verwendet. Die Membran wurde mit dem ECL-Kit 60 sec inkubiert. Hierbei katalysiert die Peroxidase des zweiten Antikörpers die Oxidation von Luminol (einem zyklischen Diacylhydrazid) und löst somit unter dem Beisein von verschiedenen Verstärkern eine Chemilumineszenz aus. Das entstehende Licht führt zur Schwärzung eines Röntgenfilms und konnte so gemessen werden.

Odyssey-System:

Das Odyssey Infrarot-Imaging System von Licor Biosciences ist ein Fluoreszenzdetektionssystem, das im Nahinfrarotbereich zwei Wellenlängen detektieren kann (700 nm und 800 nm) und die Quantifizierung von Western-Blot-Signalen ermöglicht.

Das Blotten, Blocken und die Inkubation des Primärantikörpers erfolgten analog zum ECL-System. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde 1:20.000 vorverdünnt und 1-1,5 h bei RT im Dunkeln mit der Membran inkubiert. Es wurde dann 4 x 5 min mit 1 x PBS-T gewaschen und zum Schluss einmal nur mit 1 x PBS. Nach dem Scannen der Membran erfolgte die Quantifizierung der Signale durch Messung der „integrated intensities“. Als „integrated intensities“ (I.I) wird die Summe der Intensitätswerte aller sich innerhalb einer Fläche befindenden Pixel bezeichnet; dabei wurde stets der Hintergrund abgezogen, sodass der I.I-Wert der Intensität der entsprechenden Bande entsprach.

3.4 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien

Allgemeines Prinzip:

Um die μ -Opioid-Rezeptor (μ -OR) Expression der mittels rAAV infizierten Zellen zu bestimmen, sowie die Funktionalität des Rezeptors auf Ebene der Ligandenbindung zu überprüfen, wurde eine Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudie durchgeführt. Hierbei bindet der radioaktiv markierte Ligand [^3H]DAMGO spezifisch an den membranständigen μ -OR. Durch Messung der Radioaktivität in einem Sättigungsexperiment kann indirekt auf die Rezeptorkonzentration geschlossen werden. Allerdings muss beachtet werden, dass [^3H]DAMGO trotz der hohen Selektivität für den μ -OR wie jeder andere Agonist auch unspezifisch an andere biologische, aber auch künstliche Materialien (wie an eingesetzte Röhrchen, Filter usw.) binden kann. Eine direkte Bestimmung der spezifischen Bindung ist nicht möglich. Daher wird im Sättigungsexperiment die Gesamtbindung des Agonisten in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration bestimmt.

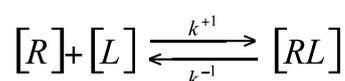
Zusätzlich erfolgt die Bestimmung unspezifischer Bindung durch den Einsatz von Naloxon, einem Opioid-Rezeptorantagonisten. Dieser wird in ca. 1000-fachem Überschuss zum Radioliganden und der Membranpräparation zugegeben und ist nicht radioaktiv markiert. Das „kalte“ Naloxon besetzt die spezifischen Bindungsstellen, während [^3H]DAMGO nur noch unspezifisch binden kann. Die unspezifische Bindung kann nun von der Gesamtbindung abgezogen werden. Die dadurch bestimmte spezifische Bindung unterliegt einer Sättigungskinetik. Sie erreicht bei zunehmender Konzentration des Radioliganden [^3H]DAMGO einen Maximalwert. Die unspezifische Bindung hingegen ist nicht sättigbar.

Chemische Grundlagen:

Die Interaktion des Liganden (L) mit seinem Rezeptor (R) unterliegt dem Massenwirkungsgesetz (Motulsky & Christopoulos, 2003).

Die Dissoziationsreaktion ist in der Formel 3.1 dargestellt, wobei k^{+1} und k^{-1} die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation darstellen.

Formel 3.1



Die Dissoziationskonstante K_d [mol/l] beschreibt das Gleichgewicht einer Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung und ist definiert als die Ligandenkonzentration, bei der 50 % der Rezeptoren gebunden sind. Je größer der K_d -Wert, desto stärker liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf Seiten der dissoziierten Form, wie in der Formel 3.2 dargestellt (Motulsky & Christopoulos, 2003).

Formel 3.2

$$K_d = \frac{k^{-1}}{k^{+1}}$$

Der K_d -Wert ist ein Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor und kann ebenso wie die maximale Rezeptorkonzentration (B_{\max}) im Rahmen des Sättigungsexperimentes bestimmt werden. Das Sättigungsexperiment kann anhand der folgenden Gleichung beschrieben werden. Sie beschreibt die spezifische Ligandenbindung an den Rezeptor als eine Funktion der steigenden Ligandenkonzentration.

Formel 3.3

$$[RL] = \frac{B_{\max} \times [L_R]}{K_d + [L_R]}$$

In Abbildung 3.1 ist eine Sättigungskurve graphisch dargestellt.

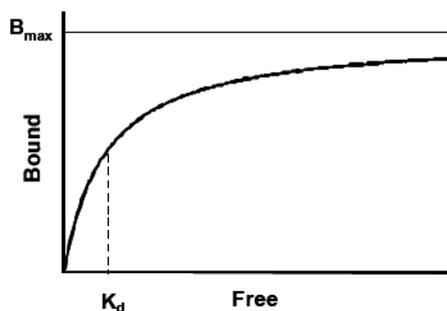


Abb. 3.1: Darstellung einer Sättigungskurve. Aufgetragen ist die Menge des spezifisch gebundenen Radioliganden (Bound) gegen die Konzentration des freien Radioliganden (Free). Die Dissoziationskonstante K_d wird an der x-Achse, die maximale Rezeptorkonzentration B_{\max} an der y-Achse abgelesen.

Membranpräparation der infizierten HeLa Zellen:

HeLa Zellen wurden in \varnothing 14,5 cm Schalen ausgesät und mit entsprechenden, rekombinanten AAV-Viruspräparationen infiziert. Zur Verstärkung der Transgenexpression wurde eine Überinfektion mit Adenovirus vom Subtyp 2 durchgeführt. Nach mindestens 36 h Infektionszeit wurden die Zellen dreimal mit 4 °C kaltem, 50 mM Tris-HCL, pH 7,4 gewaschen und in gleichem Volumen Trispuffer abgeschabt. Anschließend wurden die Zellen im Gewebezerkleinerer homogenisiert, bei 42.000 rpm und 4 °C 20 min lang abzentrifugiert, erneut mit Trispuffer gewaschen und wieder zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Trispuffer

resuspendiert und konnte entweder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren oder direkt für Bindungsanalysen weiterverwendet werden.

Proteingehaltsbestimmung:

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Membranpräparationen wurde die Methode nach Bradford angewendet. Hierzu wurden $5\text{ }\mu\text{l}$ der Probe mit $795\text{ }\mu\text{l}$ a. bidest und $200\text{ }\mu\text{l}$ Bio-Rad Reagenz gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Zur Erstellung der Standardkurve wurden $0,1,2,3,4,5,6$ und $7\text{ }\mu\text{l}$ BSA ($c= 1,3\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$) pipettiert und jeweils mit a. bidest auf $800\text{ }\mu\text{l}$ Volumen aufgefüllt, zum Schluss wurde überall $200\text{ }\mu\text{l}$ des Bio-Rad Farbstoffes zugegeben. Es wurde eine Standardkurve im Photometer erstellt. Anschließend wurde die OD der Proben bei 595 nm gemessen. Ein Vergleich mit der Absorption des Standards bei 595 nm lieferte die Proteinkonzentration der Proben.

DAMGO-Verdünnungsreihe und Messung der Radioaktivität:

$400\text{ }\mu\text{l}$ Membransuspension (ca. $100\text{ }\mu\text{g}$ Protein) und $50\text{ }\mu\text{l}$ DAMGO ($49,6\text{ Ci}/\text{mmol}$) wurden in einem Ansatz mit $50\text{ }\mu\text{l}$ Trispuffer (50 mM , $\text{pH } 7,4$), in einem zweiten mit $50\text{ }\mu\text{l}$ Naloxon (Endkonzentration $10\text{ }\mu\text{M}$) für $1,5\text{ h}$ bei RT inkubiert. Der Naloxon-Ansatz diente der Bestimmung unspezifischer Bindung. Im Anschluss erfolgte die Trennung membrangebundener von frei vorliegender Radioaktivität durch Vakuumfiltration mit Hilfe von GF/C Whatman Glasfibrfiltern. Nach der Filtration wurden die Filter in ein Szintillationsgefäß gegeben und in 3 ml Szintillationsflüssigkeit bei RT ü.N. inkubiert.

24 h später wurde die membrangebundene Tritiumaktivität (Zerfälle pro Minute = cpm) der Proben in einem Flüssigszintillationszähler mit einer Countereffizienz von $69\text{ }\%$ gemessen.

Berechnung der Bindungsparameter:

Zunächst wurde die cpm der unspezifischen Bindung von der cpm der Gesamtbindung abgezogen, um die spezifische Bindung zu erhalten: $\text{cpm}_{\text{spezifisch}} = \text{cpm}_{\text{gesamt}} - \text{cpm}_{\text{unspezifisch}}$.

Anhand der spezifischen cpm Werte wurde die Anzahl der Bindungsstellen in fmol/mg ermittelt. Dies erfolgte unter Berücksichtigung der spezifischen Radioaktivität des Liganden (hier: $49,6\text{ Ci}/\text{mmol}$), der Countereffizienz und der eingesetzten Proteinmenge. Für die Umrechnung wurde die Graph Pad Quick Cals Software verwendet. Mit freundlicher Unterstützung von V. Spahn (Doktorandin, Klinik für Anästhesie, CBF) wurde mit der nicht linearen Regression mit Hilfe des Graph Pad Prism Programms sowohl die hyperbole Sättigungskurve erstellt als auch die Bindungsparameter B_{max} und K_{d} ermittelt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Suche eines geeigneten Promotors zur gewebespezifischen Expression des μ -Opioid-Rezeptors

Rekombinante AAV-Vektoren (rAAV) sind in einigen wenigen tierexperimentellen Untersuchungen bereits zur Expression des μ -Opioid-Rezeptors (μ -OR) eingesetzt worden. Diese exprimierten den μ -OR unter der Kontrolle des Neuronen spezifischen Enolase Promotors (NSE) (Xu *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2005). Die Expression der rekombinanten μ -ORs war sehr schwach und konnte *in vivo* nur nach direkter Injektion hoher Vektordosen in die schmerzweiterleitenden DRGs oder direkt in den freipräparierten Ischiasnerv nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es die durch rAAVs vermittelte Expression des μ -Opioid-Rezeptors in neuronalen Zellen zu optimieren und die Effizienz zu steigern. Dies sollte durch Verwendung alternativer Promotoren, weiterentwickelter AAV-Vektortypen (einzelnsträngig vs. selbstkomplementär) und durch Variation von AAV-Kapsiden gelingen.

Zunächst wurden drei verschiedene Promotoren bezüglich ihrer Eignung für die Expression des μ -OR in nicht-neuronalen und neuronalen Zellen untersucht. Im Einzelnen handelte es sich dabei um den humanen Cytomegalievirus immediate early Enhancer/Promotor (CMV), um einen mit zusätzlichen regulatorischen Sequenzen aus dem Geflügel β -Aktin Promotor modifizierten CMV-Promotor, der CMV Enhancer/Chicken β -Actin Promotor (CBA) und um den Neuronen spezifischen Enolase Promotor (NSE).

Cytomegalievirus Promotor/Enhancer (CMV)

Für die regulatorische Region der frühen Gene des humanen Cytomegalievirus (CMV) ist in zahlreichen Publikationen eine ubiquitäre und starke Aktivität beschrieben worden. Neben einer typischen TATA-Box enthält der Promotor ein starkes Enhancer Element, das Bindestellen für eine ganze Reihe von zellulären Transkriptionsfaktoren enthält (Paterna *et al.*, 2002). Auch für die Infektion neuronaler Zellen durch virale Vektoren wird der CMV-Promotor häufig eingesetzt und führt zu hohen Genexpressionsraten. Seine relativ geringe Größe von 700 bp stellt gerade im Zusammenhang mit AAV-Vektoren, die nur eine begrenzte Verpackungskapazität besitzen, einen wichtigen Vorteil dar. Allerdings wurde in einigen Studien zur Untersuchung der *in vivo* Langzeitexpression in neuronalem Gewebe eine

Abnahme der Transgenexpressionsraten unter CMV-Promotorkontrolle bereits nach wenigen Wochen beobachtet (Fitzsimons *et al.*, 2002).

Chicken β -actin Promotor (CBA)

Der *chicken β -actin Promotor (CBA)* kontrolliert die Expression der β -Untereinheit des Proteins Aktin im Huhn. β -Aktin wird als Bestandteil des Zytoskeletts in praktisch allen Zelltypen konstitutiv exprimiert. Die ubiquitäre Aktivität des Promotors und eine hohe Expressionsrate ermöglichen es den hohen Bedarf an β -Aktin in den unterschiedlichen Zelllinien zu decken (Quitschke *et al.*, 1989). Der CBA-Promotor hat eine Größe von 300 bp, zur vollen Aktivität werden allerdings zusätzliche Sequenzen aus dem ersten Intron (Kawamoto *et al.*, 1988) und dem ersten Exon des β -Aktin Gens benötigt. Im ersten Intron befindet sich eine CArG-Box, im Promotorbereich befindet sich für den Transkriptionstart eine TATA-Box, weiterhin einige Sp1 Bindestellen, eine CArG-Box und eine CAAT-Box zur Regulation der Transkription (Quitschke *et al.*, 1989). Zur weiteren Verstärkung der Genexpression ist der in dieser Arbeit verwendete CBA-Promotor mit einem CMV-Enhancer Element fusioniert, so dass sich eine Gesamtgröße von 1,8 kbp für den Hybridpromotor ergibt. Während die Aktivität des CBA-Promotors beispielsweise in 293-T Zellen schwächer ist als die des CMV-Promotors (Chung *et al.*, 2002), führt der CBA-Promotor in anderen Zelllinien zu einer stärkeren Genexpression als der CMV-Promotor. Vor allem für eine stabile *in vivo* Langzeitexpression (> 6 Monate) in neuronalem Gewebe ist der CBA- dem CMV-Promotor deutlich überlegen (Fitzsimons *et al.*, 2002).

Neuronen spezifischer Enolase Promotor (NSE)

Die Neuronen spezifische Enolase ist eine Isoform des glykolytischen Enzyms Enolase, das in neuronalen und neuroendokrinen Zellen exprimiert wird (Navarro *et al.*, 1999). Frühere Untersuchungen haben bereits eine neuronenspezifische Genexpression durch Verwendung des NSE-Promotors nachgewiesen (Forss-Petter *et al.*, 1990). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete NSE-Promotor aus Ratten hat eine Größe von ca. 1,8 kbp. Dem Promotor fehlt eine typische TATA-Box. Es wurde allerdings eine TATA-Box ähnliche Sequenz, die nicht vollständig mit der Konsensussequenz übereinstimmt, identifiziert. Eine CAAT Box ist nicht vorhanden. Stattdessen sind im Promotorbereich GC-reiche Areale und GC-Box ähnliche Sequenzen zu finden, die transkriptionsregulierende Funktionen übernehmen können.

Weiterhin existieren Sequenzmotive für die Transkriptionsfaktoren AP1, AP2 und CREB (Forss-Petter *et al.*, 1990; Sakimura *et al.*, 1995). Der Ratten-NSE Promotor ist der im Zusammenhang mit rAAV vermittelter Expression im Gehirn am besten untersuchte neuronale Promotor. Neben hohen Expressionsraten im Gehirn konnte auch eine effektive Infektion von Neuronen im Rückenmark nachgewiesen werden. Weiterhin erwies sich der NSE- bezüglich der *in vivo* Langzeitexpression und der Expressionsstärke im Gehirn dem CMV-Promotor deutlich überlegen (Klein *et al.*, 1998; Fitzsimons *et al.*, 2002). Eine vergleichende Studie von CBA- und NSE-Promotor im Ratten Hippocampus zeigte aber eine 3-fach schwächere Transgenexpression bei den NSE-basierten Vektoren (Klein *et al.*, 2002).

4.1.1 Klonierung von Plasmidkonstrukten zur Generierung einzelsträngiger μ OR-AAV-Vektoren

Ausgehend von vorhandenen AAV-Basis-Konstrukten (pTR-UF5, pTR-UF11 und pTR-NSE), welche das „green fluorescent protein“(GFP)-Gen unter der Kontrolle dieser verschiedenen Promotoren enthielten, wurde das GFP-Gen gegen eine DNA-Kassette für den μ -Opioid-Rezeptor ausgetauscht. Zur spezifischen Detektion des Transgens war dieses mit einem aminoterminalen Flag-Tag Epitop versehen. Hierbei wurde eine freundlicherweise von C. Zöllner (Klinik für Anästhesie, CBF, Charité Berlin) zur Verfügung gestellte Flag- μ OR-cDNA mittels einer Polymerase Ketten Reaktion (PCR) amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass geeignete Schnittstellen für die Klonierung generiert wurden. Für die Herstellung der Konstrukte pTR-UF11- μ OR und pTR-NSE- μ OR war eine Zwischenklonierung der Flag- μ OR-Kassette in das Plasmid Bluescript II SK+ mit anschließender Umklonierung in den AAV-Vektor notwendig. Die hergestellten AAV-Plasmidkonstrukte mit dem Flag- μ -Opioid-Rezeptor wurden als pTR-UF5- μ OR (CMV-), pTR-UF11- μ OR (CBA-) und pTR-NSE- μ OR (NSE-Promotor) bezeichnet (Abb. 4.1).

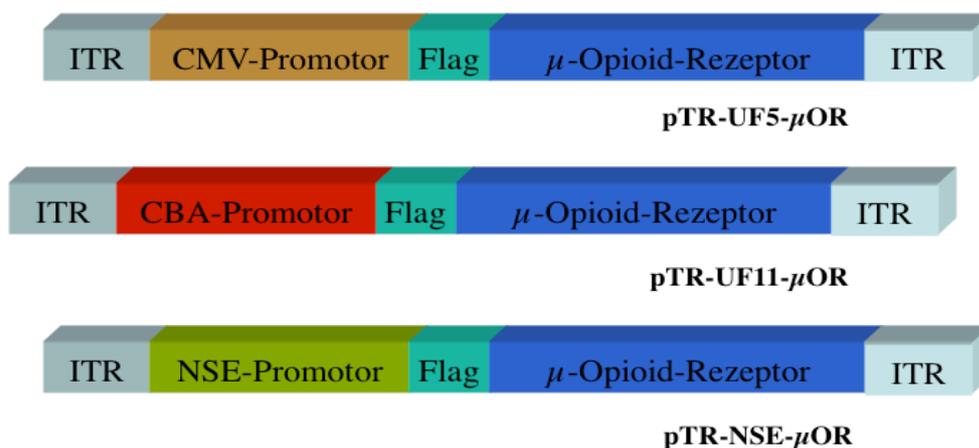


Abb. 4.1: Flag- μ OR Plasmidkonstrukte

4.1.2 Überprüfung der Transgenexpression nach Transfektion von HeLa Zellen mit den GFP und Flag- μ OR AAV-Vektorkonstrukten

Zur Untersuchung der Expression des GFP-Markergens und des Flag-getaggten μ -Opioid-Rezeptors wurden HeLa Zellen mit den AAV-Verpackungsplasmiden (pTR-UF5, -UF11, -NSE und pTR-UF5-, -UF11-, -NSE- μ OR) mittels CaPO_4 -Präzipitation transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden Proteinextrakte hergestellt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. GFP wurde durch einen polyklonalen anti-GFP Kaninchen-Antikörper und Flag- μ OR durch einen monoklonalen anti-Flag Antikörper aus der Maus detektiert. Sowohl für das μ OR-Konstrukt UF5 mit dem CMV-Promotor als auch für das Konstrukt UF11 mit dem CMV-chicken β -Actin (CBA) Hybridpromotor konnte eine starke Expression des μ -OR bei Transfektion hoher Konzentrationen der jeweiligen DNA-Konstrukte (4 μg der Plasmid-DNA pro \varnothing 6 cm Zellkulturschale) detektiert werden. Für das Konstrukt UF11- μ OR konnte bereits bei Zugabe geringerer DNA-Mengen (2 μg) ein Expressionssignal nachgewiesen werden. Für das Konstrukt mit dem Neuronen spezifischen Enolase Promotor konnte keine Transgenexpression in HeLa Zellen detektiert werden (s. Abb. 4.2).

Bei den GFP-Kontrollvektoren zeigte sich für die beiden Konstrukte mit dem CMV- und dem CBA-Promotor eine deutliche anti-GFP reaktive Bande auf der erwarteten Höhe von ca. 27 kDa, während sich für den neuronenrestriktiven NSE-Promotor auch hier keine Proteinexpression nachweisen ließ (ohne Abbildung). Aufgrund der Neuronenspezifität war in HeLa Zellen auch keine Aktivität des NSE-Promotors zu erwarten.

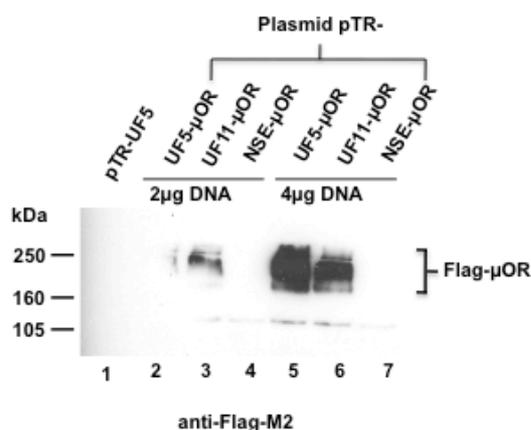


Abb. 4.2: Kontrolle der Flag- μ OR-Expression in HeLa Zellen nach Transfektion von AAV-Verpackungsplasmiden

Die AAV-Verpackungsplasmide pTR-UF5- (CMV-), -UF11- (CBA-) und -NSE- μ OR (NSE-Promotor) wurden in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen transfiziert. Als Negativkontrolle diente das GFP-exprimierende Konstrukt pTR-UF5. Die korrekte Expression des μ -OR wurde über dessen aminoterminalen Flag-Tag mit einem monoklonalen Maus anti-Flag Primärantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. Der Flag- μ OR ist in multimerisierter Form bei ca. 200 kDa detektierbar.

4.1.3 Optimierung des Gelsystems zum Western-Blot Nachweis von Flag- μ OR

Opioid-Rezeptoren neigen als G-Protein gekoppelte Rezeptoren durch Bildung von Dimeren und Oligomeren zur Formierung höhermolekularer Aggregate (George *et al.*, 2000). Die theoretische Molekulargröße des μ -OR ohne posttranslationale Modifizierung beträgt etwa 50 kDa (Christoffers *et al.*, 2003). In einigen Arbeiten wurde weiterhin eine glykosylierte Form, die in der SDS/PAGE Gelelektrophorese auf einer Höhe von ca. 80 kDa läuft, nachgewiesen (Chaturvedi *et al.*, 2000; Christoffers *et al.*, 2003). George *et al.* wiesen μ -Opioid-Rezeptoren als Monomere, Dimere, Tetramere und höhere Oligomere nach (George *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurde, wie in Abb. 4.2 zu erkennen ist, mit der SDS-PAGE Standardmethode nach Laemmli das μ OR-Expressionssignal auf einer Höhe von >160 kDa detektiert. Dies spricht für den Nachweis von μ -OR Multimeren oder glykosylierten Dimeren. Um die Formierung dieser höhermolekularen Aggregate zu unterdrücken und definierte niedere μ OR-Mono- bzw. -Oligomere eindeutig nachweisen zu können, wurde das NuPage® Bis-Tris Gelsystem von Invitrogen als Alternative zum Gelsystem nach Laemmli herangezogen. Dieses alternative Verfahren sollte nach Angaben des Herstellers zu einer sicheren Reduktion intermolekularer Disulfidbrücken führen und eine größere Proteinstabilität gewährleisten. Parallel transfizierte HeLa Zellen wurden zum Einen entsprechend den Vorgaben des Tris-Glycin SDS-PAGE Systems nach Laemmli und zum Anderen mit den Reagenzien des NuPAGE®Bis-Tris System aufgeschlossen und im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Es folgte eine Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen anti-Flag Primärantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper.

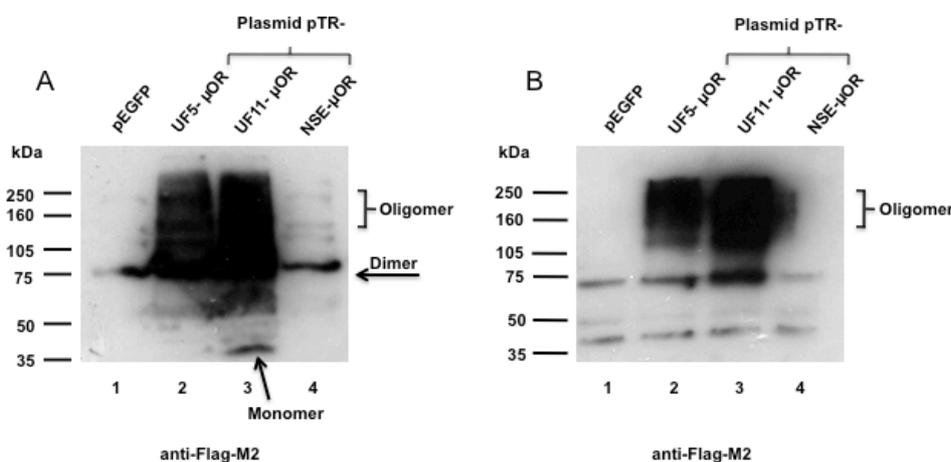


Abb. 4.3: Optimierung des Gelsystems zum Western-Blot Nachweis des Flag-getaggen μ -OR

Das A) NuPAGE Bis-Tris System von Invitrogen wurde mit dem B) SDS-PAGE Tris-Glycin Standardsystem nach Laemmli bezüglich seiner Eignung zur Detektion von monomeren Flag- μ OR Polypeptiden in der Western-Blot-Analyse verglichen.

Wie der Abb. 4.3 zu entnehmen ist, wurde mit Hilfe der NuPAGE® Methode (A) im Ansatz mit dem Konstrukt pTR-UF11- μ OR (CBA-Promotor) ein schwaches Signal auf Monomer-Höhe bei ca. 40 kDa (Spur 3) und sowohl für -UF11- als auch für UF5- μ OR (CMV-Promotor) eine prominente Bande bei ca. 80 kDa detektiert. Die Letztere kann auf Grund ihres Laufverhaltens mit hoher Wahrscheinlichkeit als Dimer interpretiert werden. (Die Bande bei 80 kDa bei der Negativkontrolle in Spur 1 ist höchstwahrscheinlich durch ein Überlaufen der Probe aus Spur 2 bedingt.) Auch beim NuPage® Verfahren bleiben jedoch höhermolekulare Aggregate sichtbar, wenn auch wesentlich schwächer als beim Standardsystem. Das Expressionssignal streut im Invitrogen System (A) insgesamt über einen größeren Bereich als beim herkömmlichen Verfahren (B). Im Vergleich lieferte das herkömmliche System von Laemmli (B) ein besser abgrenzbares Signal als das alternative Verfahren. Da sich also für die optische Beurteilung und Interpretation des Flag- μ OR-Signals in der Western-Blot-Analyse keine Vorteile durch das alternative Gelverfahren ergeben haben und auch das Vorgehen aufwendiger ist, wurde in den weiteren Versuchen wieder auf das Tris-Glycin SDS-PAGE System von Laemmli zurückgegriffen.

4.1.4 GFP- und Flag- μ OR-Expression nach Infektion rekombinanter AAV-Vektoren

Für erste Untersuchungen zur rAAV-vermittelten Transgenexpression wurden ungereinigte Vektorpräparationen (Frier-Tau-Lysate) verwendet. Diese wurden, wie unter 3.2.7 beschrieben, hergestellt. In HeLa Zellen wurden dabei zunächst die rAAV-Präparationen mit dem GFP-Markergen untersucht, um erste Aufschlüsse über die Aktivität der verschiedenen Promotoren zu gewinnen. Die GFP-Expression der Zellen wurde hierbei zum Einen unter einem inversen Fluoreszenzmikroskop, zum Anderen in einer Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper und einem Peroxidase- markierten Zweitantikörper, beurteilt. Die rAAV-haltigen Frier-Tau-Lysate wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (100 bzw. 400 μ l pro \varnothing 6 cm Schale) eingesetzt. In einem separaten Ansatz wurde bei der höheren rAAV-Konzentration zusätzlich mit Adenovirus Typ 2 (Ad2) in einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 50 überinfiziert. Die Ad2-Überinfektion diente der Steigerung der Expressionsstärke, die über die Induktion der Zweitstrangsynthese der einzelsträngig vorliegenden AAV-Monomervektoren (Ferrari *et al.*, 1996) und die transaktivierenden Eigenschaften des adenoviralen E1A Proteins auf die Promotoren vermittelt wird.

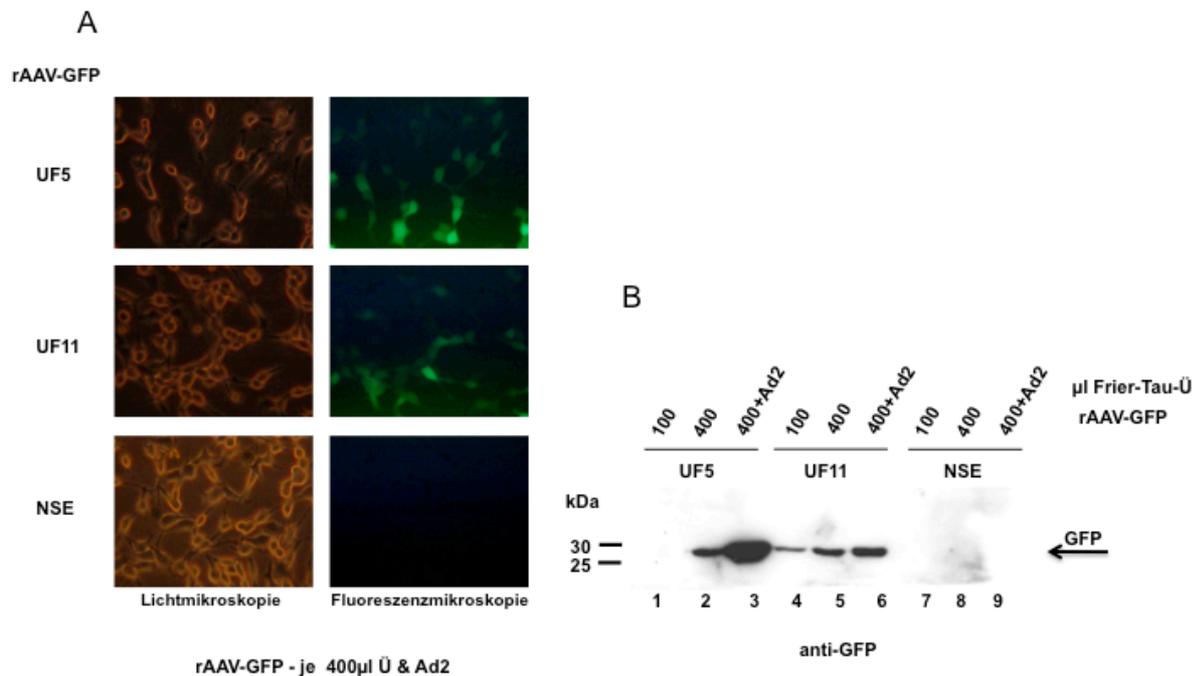


Abb. 4.4: GFP-Expressionsanalyse nach Infektion von HeLa Zellen mit rAAVs

HeLa Zellen wurden mit rAAV-haltigen Frier-Tau-Lysaten (rAAV-UF5-, -UF11- und -NSE-GFP) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (je 100 und 400 µl auf Ø 6cm Schalen) infiziert und in einem separaten Ansatz bei der höheren rAAV-Konzentration zusätzlich mit Adenovirus vom Typ 2 (MOI 50) überinfiziert.

A) Mikroskopische Fluoreszenz-Analyse auf GFP-positive Zellen

B) GFP-Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper und einem Peroxidase markierten Zweitantikörper mit anschließender ECL-Detektion.

Abb. 4.4 A) zeigt bei der höheren Konzentration an eingesetztem Frier-Tau Überstand nahezu 100% GFP positive HeLa Zellen für die mit Ad2 überinfizierten Ansätze rAAV-UF5 (CMV-) und -UF11 (CBA-Promotor). Für das Konstrukt mit dem NSE-Promotor war erwartungsgemäß keine GFP-Expression in den HeLa Zellen nachzuweisen. In der Western-Blot-Analyse (Abb. 4.4 B) konnte bei der höheren rAAV-Konzentration (400 µl) für die Konstrukte UF5 und UF11 ein ähnlich starkes Signal detektiert werden (Spur 2 und 5). Für das Konstrukt UF5 (Spur 1) war im Gegensatz zu dem Konstrukt UF11 (Spur 4) bei den Infektionsansätzen mit der geringeren Konzentration an Überstand (100 µl) keine Expression nachweisbar. Die Expression des CMV-getriebenen Konstruktes UF5 wird durch die Überinfektion mit Ad2 weitaus stärker induziert (Spur 3) als die des CBA-getriebenen Konstruktes UF11 (Spur 6). Dieses unterschiedlich starke Ausmaß der Transaktivierung für verschiedene Promotoren im gleichen Vektor-Kontext deutet darauf hin, dass der Effekt vor allem auf Promotor aktivierende Eigenschaften von Ad2 zurückzuführen und nur in untergeordnetem Maß durch die Induktion der Zweitstrangsynthese bedingt ist.

Für das NSE-Konstrukt konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der mikroskopischen Fluoreszenzanalyse keine GFP-Expression gezeigt werden. Der Neuronen spezifische Promotor ist den Erwartungen entsprechend auch im Kontext von rAAV-Vektoren in HeLa Zellen nicht aktiv. Gleichmaßen konnte für die Flag- μ OR-Konstrukte in der Immunoblot-Analyse eine deutliche Expression nach Koinfektion von HeLa Zellen mit Ad2 und den rAAVs UF5- und UF11- μ OR nachgewiesen werden. Wie erwartet, lag das Expressionsniveau des NSE-Promotor getriebenen Konstruktes auch in diesem Fall unterhalb der Nachweisgrenze (ohne Abbildung, s. Experimente mit den aufgereinigten Vektoren, Abb. 4.5). Übereinstimmende Ergebnisse lieferte die Infektion von 293-T Zellen. Auch hier war die Transgenexpression von GFP und Flag- μ OR nur für die Konstrukte UF5 und UF11 eindeutig nachweisbar (ohne Abbildung).

4.1.5 Herstellung hochgereinigter, rekombinanter AAV-Vektoren zur Expression des μ -OR

Für eine nicht-toxische *in vivo* Applikation werden rAAV-Vektoren über eine Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation mit anschließender Heparin-Agarose-Affinitätschromatographie (für Serotyp 2 Vektoren) aufgereingt (Zolotukhin *et al.*, 1999). Dieses Aufreinigungsverfahren liefert konzentrierte, hochreine Vektoren, die erfolgreich für eine stabile Langzeitexpression in tierexperimentellen, aber auch ersten klinischen Studien eingesetzt werden können. In dieser Arbeit wurden ebenfalls solch hochaufgereinigte rAAV-Stocks hergestellt (s. 3.2.8), die nach Bestimmung der Virustiter in der Light Cycler gestützten quantitativen PCR, auf ihre Funktionalität bezüglich der Transgenexpression zunächst in Zellkultur ausgetestet wurden. Hierzu wurden HeLa Zellen in aufsteigenden MOIs mit den rAAV-GFP- und rAAV- μ OR-Vektoren UF5 (CMV-) bzw. UF11 (CBA-Promotor) infiziert. Es wurden Doppelansätze durchgeführt, wobei ein Ansatz mit Ad2 in einer MOI von 50 überinfiziert wurde. Es folgte eine Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen anti-Flag bzw. einem polyklonalen anti-GFP Primärantikörper und Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern. Da keine Aktivität des neuronenspezifischen NSE-Promotors in HeLa Zellen zu erwarten war, wurde das rAAV-NSE-Konstrukt in diesen Versuchen nicht eingesetzt. Wie in Abb. 4.5 dargestellt, konnte für die GFP-Vektoren eine Expression über den gesamten getesteten Bereich der MOIs von ca. $1,5 \times 10^5$ bis $2,4 \times 10^6$ Genomischen Partikeln pro Zelle (GP/c) nachgewiesen werden. Da sowohl für das Konstrukt UF5-GFP (CMV-) als auch für UF11-GFP (CBA-Promotor) die Expressionsstärke mit zunehmender MOI eher ab- als zunahm, ist von einem Sättigungseffekt bereits bei niedrigen

Konzentrationen auszugehen. Durch die Überinfektion mit Adenovirus konnte eine geringfügige Verstärkung der Expression induziert werden. Die Flag- μ OR Expression war schwieriger nachweisbar und wurde im Western-Blot erst bei Überinfektion mit Ad2 deutlich sichtbar. Die Infektion von etwa 1×10^5 physikalischen Viruspartikeln pro Zelle lieferte für beide Konstrukte das beste Expressionssignal. Der Vektor UF5- μ OR (CMV-Promotor) wies dabei mit steigenden MOIs auch ein stärker werdendes Expressionssignal auf. Für den Vektor UF11- μ OR (CBA-Promotor) nahm die Signalstärke zunächst auch zu, bis im Bereich einer MOI von ca. 1×10^5 das Optimum erreicht wurde. Bei noch höheren MOIs nahm die Signalstärke hingegen wieder ab. Dieser Sättigungseffekt ist möglicherweise durch zelltoxische Effekte der Überexpression des μ OR bedingt.

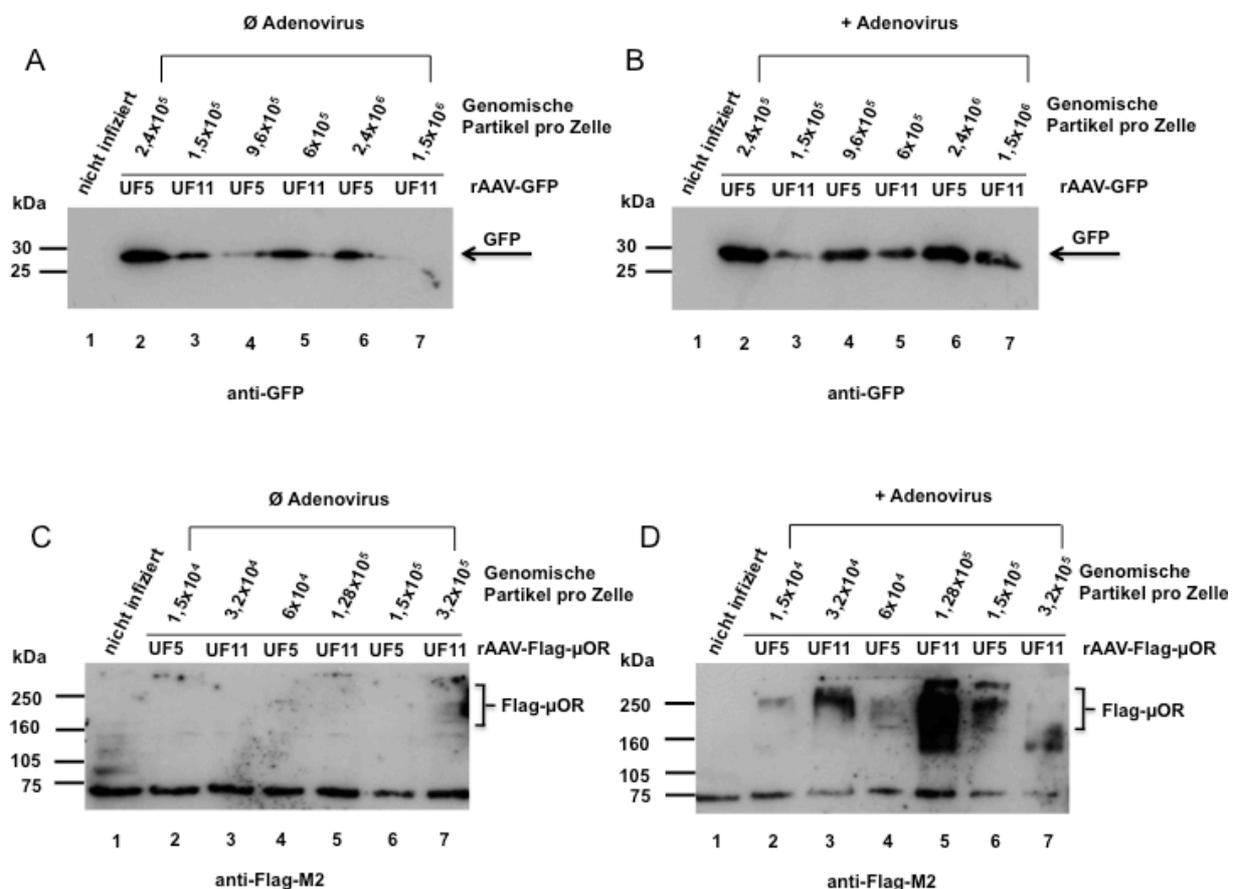


Abb. 4.5: GFP- und Flag- μ OR-Expressionsanalyse nach Infektion von HeLa Zellen mit hochgereinigten rAAV-Vektorpräparationen

HeLa Zellen wurden mit den rAAV-GFP- und den rAAV- μ OR-Vektoren UF5 (CMV-) bzw. UF11 (CBA-Promotor) in aufsteigenden MOIs transduziert (A+C). In einem zweiten Ansatz wurde mit Adenovirus vom Typ 2 (MOI 50) überinfiziert (B+D). Es folgte eine Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen GFP Primärantikörper und einem monoklonalen anti-Flag Primärantikörper und Peroxidase-markierten Sekundärantikörpern.

4.2 Etablierung eines neuronalen Zellsystems zur Überprüfung neuronenspezifischer Aktivität der rAAV-Konstrukte

4.2.1 rAAV vermittelte Transgenexpression in einer humanen Neuroblastomzelllinie

Zur Untersuchung der Eignung der verschiedenen Konstrukte für die Infektion neuronaler Zellen wurde die von humanen Neuroblastomzellen abgeleitete permanente Zelllinie SH-SY5Y eingesetzt, die freundlicherweise von C. Zöllner (Klinik für Anästhesie, CBF, Charité Berlin) zur Verfügung gestellt wurde. Es wurden sowohl die rAAV-Vektoren (UF5-, UF11- und NSE-) zur Expression von GFP, als auch die zur Expression von Flag- μ OR eingesetzt. Die GFP-Expression wurde mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper, die Flag- μ OR Expression mit einem monoklonalen anti-Flag Antikörper nachgewiesen. Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper dienten dem Nachweis der Expression. Da die NSE-Promotor getriebene Transgenexpression weder in HeLa, noch in 293-T Zellen nachweisbar war, sollte in den SH-SY5Y insbesondere diese überprüft werden. Weiterhin sollten erste Hinweise zum Vergleich der Aktivität der drei Promotoren in einer neuronalen Zelllinie gewonnen werden.

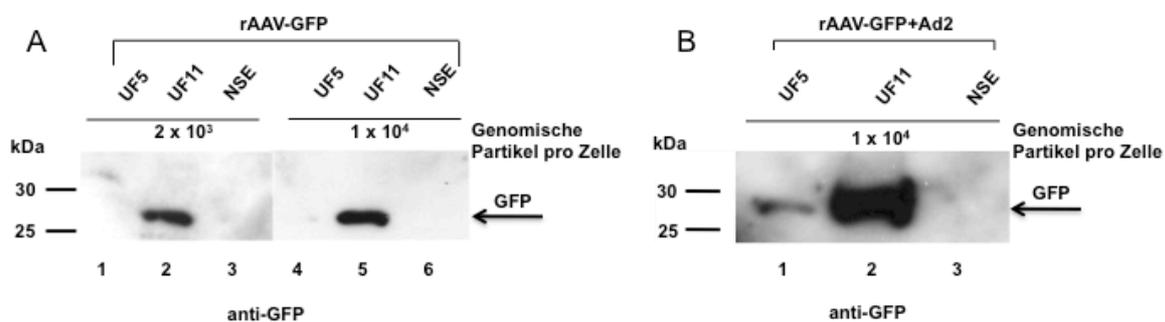


Abb. 4.6: rAAV-vermittelte GFP-Expression in humanen Neuroblastomzellen

Die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y wurde mit gereinigten rAAV-Vektoren UF5- (CMV-), UF11- (CBA-) und NSE-GFP (NSE-Promotor) infiziert.

A) Infektion mit zwei unterschiedlichen MOIs der jeweiligen rAAV-Vektoren

B) Zusätzliche Überinfektion mit Adenovirus vom Typ 2 (MOI 50) bei der höheren Konzentration der rAAVs aus (A). Die GFP-Expression wurde mit einem polyklonalen GFP-Antikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper mittels ECL-Reaktion detektiert.

Wie in Abb. 4.6 anhand der GFP-Expression dargestellt, erwiesen sich die SH-SY5Y Zellen als ungeeignet für den Nachweis der Aktivität des NSE-Promotors. Nach Infektion der rAAVs in unterschiedlichen MOIs (von 2×10^3 bis 1×10^4) war in den Western-Blot-Analysen keine Expression nachweisbar, während für die Konstrukte UF5 und UF11 mit

CMV- bzw. CBA-Promotor eine GFP-Expression nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass der NSE-Promotor auch in Neuronen nicht uneingeschränkt aktiv ist. Wahrscheinlich ist die Aktivität, wie auch im Zusammenhang mit adenoviralen Vektoren beschrieben (Navarro *et al.*, 1999), auf differenzierte Neuronen beschränkt. Die Expression von Flag- μ OR ließ sich für keines der drei Konstrukte zweifelsfrei detektieren. Somit verstärkte auch die insgesamt sehr schwache Expression des Flag-getaggen- μ OR in dieser Zelllinie die Notwendigkeit weitere neuronale Zelllinien auszutesten.

4.2.2 Die Hybridom-Zellen F11

F11 ist eine Hybrid-Zelllinie aus Neuroblastomzellen der Maus (N18T62) und Hinterwurzelganglienzellen (DRG-Neuronen) der Ratte. F11 Zellen weisen einige Eigenschaften differenzierter Neurone, insbesondere von DRG-Neuronen, auf. Sie gleichen diesen durch das Vorhandensein von μ - und δ -Opioid- (Fan *et al.*, 1992), Prostaglandin- und Bradykininrezeptoren auf der Zelloberfläche. Weiterhin schütten F11 Zellen als neuronales Merkmal einen Substanz P ähnlichen Transmitter aus (Francel *et al.*, 1987). Ein Vorteil dieser Zellen ist die Induzierbarkeit der Differenzierung durch NGF und db-cAMP (Francel *et al.*, 1987; Hwang do *et al.*, 2008), wodurch die Aktivität des NSE-Promotors in ausdifferenzierten neuronalen Zellen untersucht werden konnte. Abb. 4.7 zeigt undifferenzierte (A) und nach 4 Tagen maximal differenzierte F11 Zellen (B). Unter normalen Wachstumsbedingungen bilden die F11 Zellen kurze Neuriten-ähnliche Ausläufer aus (Abb.4.7 A). Im Zustand maximaler Differenzierung weisen die F11 Zellen die Morphologie neuronaler Zellen auf. Die Ausbildung langer Neuriten geht mit einer Reduktion der Zellteilungsrate einher. Die F11 Zellen wurden freundlicherweise von E. Guhl (Arbeitsgruppe Prof. Cathomen, im Hause) zur Verfügung gestellt.

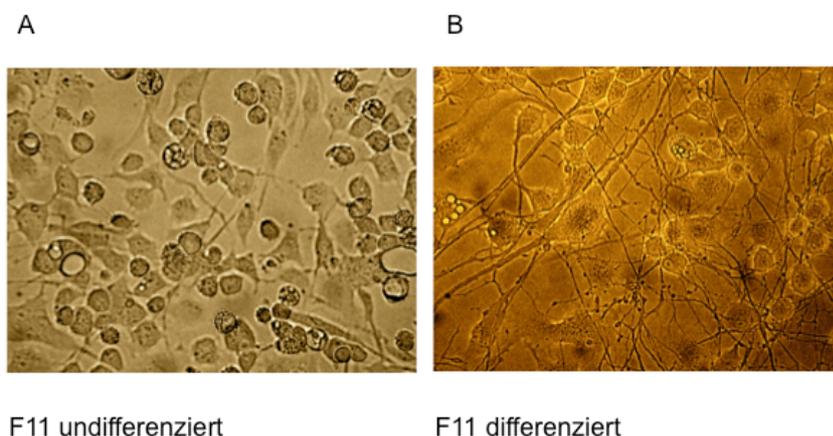


Abb. 4.7: Differenzierung von F11 Zellen durch Gabe von db-cAMP und NGF

A: Undifferenzierte F11 Zellen
 B: F11 Zellen wurden durch Zugabe von db-cAMP (0,5mM) und NGF (50ng/ml) zur Differenzierung angeregt. Nach 4 Tagen wurde eine maximale Differenzierung der Zellen durch Ausbildung langer Nervenäusläufer und einer deutlichen Wachstumsverlangsamung beobachtet.

4.2.3 Aktivitätsuntersuchungen der drei Promotoren nach Transfektion von F11 Zellen in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand

Zunächst wurde die Differenzierungs-abhängige Expression der verwendeten Promotoren nach Transfektion von F11 Zellen überprüft. Hierzu wurden die Zellen mit den AAV-Plasmidkonstrukten pTR-UF5- (CMV-Promotor), -UF11- (CBA-Promotor) und -NSE- μ OR (NSE-Promotor) zur Expression des Flag- μ OR und den entsprechenden GFP-Markergenkonstrukten transfiziert und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Die Immundetektion wurde für das GFP-Protein mit dem polyklonalen anti-GFP Antikörper und für den Flag- μ OR mit dem monoklonalen anti-Flag Antikörper durchgeführt. Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper dienten der Sichtbarmachung der Reaktion. In den undifferenzierten F11 Zellen konnte weiterhin mit keinem der beiden Transgene eine Aktivität des NSE-Promotors nachgewiesen werden (Abb. 4.8, A+B). In einem zweiten Ansatz wurde 24 h nach Transfektion die Differenzierung der F11 Zellen induziert (Hwang *et al.*, 2008). Nach 4-tägiger Inkubation der Zellen in Differenzierungsmedium wurden Proteinextrakte für die Western-Blot-Analyse gewonnen. Wie in Abb. 4.8 C+D zu erkennen ist, konnte dabei nach Differenzierung erstmals eine Aktivität des verwendeten NSE-Promotors nachgewiesen werden. Sowohl für das NSE-GFP- als auch das NSE- μ OR-Konstrukt konnte die korrekte Expression des entsprechenden Transgens in der Western-Blot-Analyse detektiert werden. Beim Vergleich aller drei Promotoren ist die starke Aktivität des CBA-Promotors hervorzuheben, während der CMV-Promotor deutlich schwächer aktiv ist als in nicht-neuronalen Zellen.

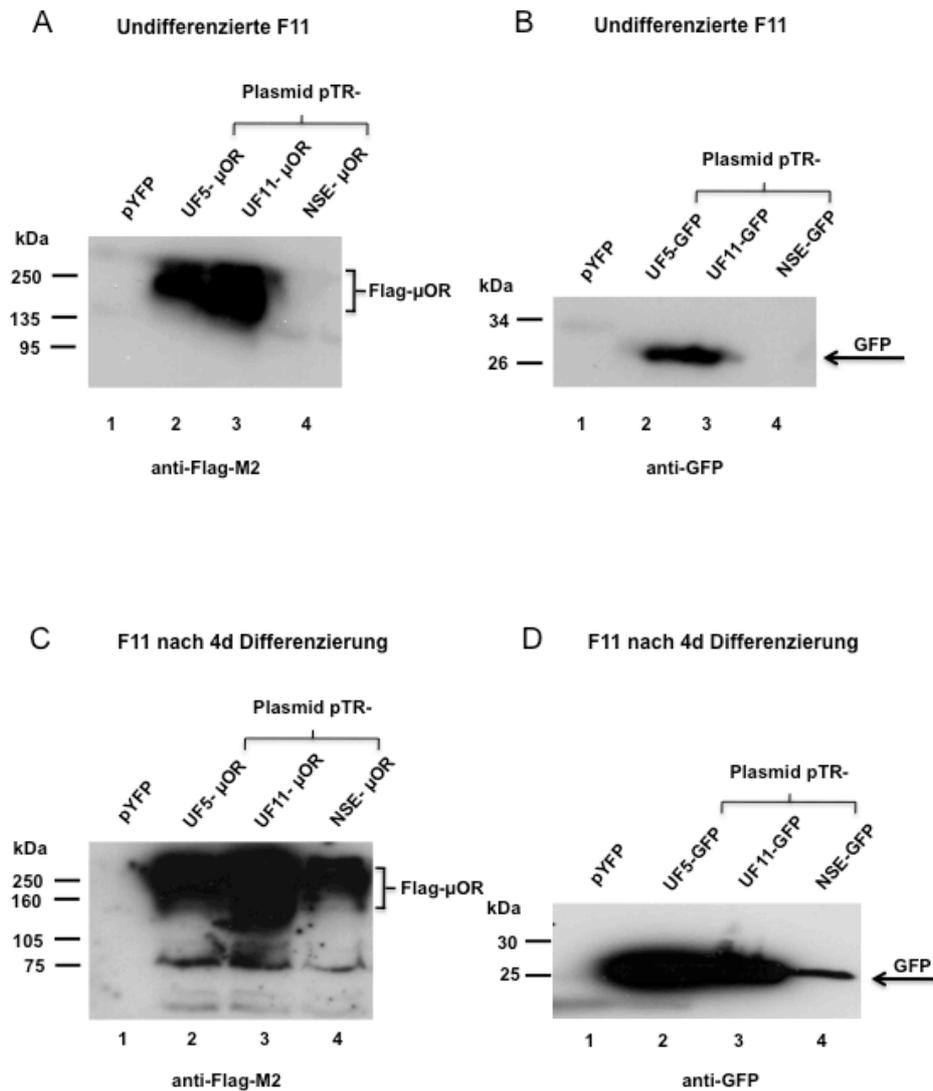


Abb. 4.8: Aktivitätsuntersuchungen der verwendeten Promotoren in undifferenzierten und differenzierten F11 Zellen

F11 Zellen wurden mit den AAV-basierten Plasmiden pTR-UF5- (CMV-), -UF11 (CBA-) und -NSE (NSE-Promotor) zur Expression des Flag-μOR und des GFP-Markergenkonstruktes transfiziert.

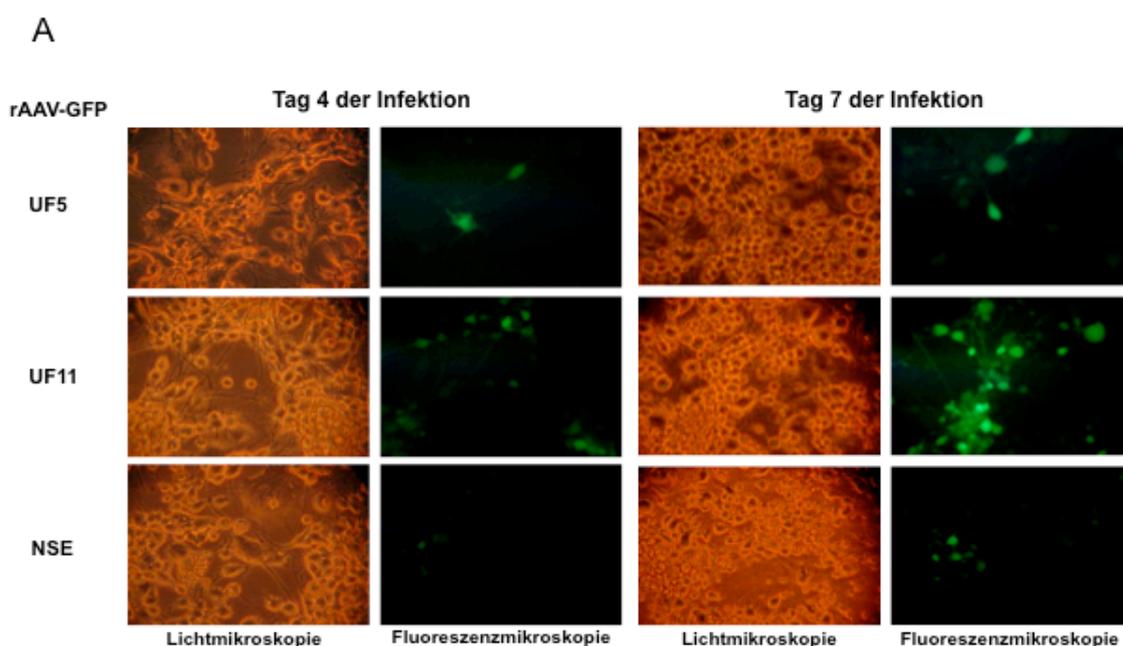
A+B) Western Blot Analyse ohne Differenzierung der F11 Zellen: 48 h nach Transfektion wurden Proteinextrakte für eine Western-Blot-Detektion hergestellt. Die Expression des Flag-μOR wurde mit einem monoklonalen anti-Flag Primärantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen (A+C). Die GFP-Expression wurde mit einem polyklonalen GFP Primärantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert (B+D).

C+D) Western Blot Analyse nach Differenzierung der F11 Zellen: 24 h nach Transfektion wurde die Differenzierung der Zellen induziert. Am fünften Tag wurden Proteinextrakte hergestellt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

4.2.4 Infektion von F11 Zellen durch rAAV-Vektoren

Um das NSE-Promotor getriebene rAAV-Konstrukt austesten und die verschiedenen rAAV-Vektoren in differenzierten F11 Zellen miteinander vergleichen zu können, musste zunächst die Frage geklärt werden, ob F11 Zellen sich prinzipiell durch rAAV-2 Vektoren infizieren lassen. Dieses wurde über die Infektion von rAAV-haltigen Frier-Tau-Medienüberständen mit dem GFP-Reporter gen untersucht. Hierbei wurden 2 Versuchsansätze durchgeführt. Zum Einen wurden F11 Zellen zunächst differenziert (3 Tage lang), um im Anschluss mit rAAV-Virusüberständen (200 µl pro Vertiefung einer 6 well-Platte) infiziert zu werden (7 Tage Infektionsdauer). Im alternativen Versuchsansatz wurden die F11 Zellen zunächst mit den Virusüberständen (200 µl pro Vertiefung einer 6 well-Platte) infiziert (4 Tage Infektionsdauer) und dann die Differenzierung induziert (4 Tage lang). Zum ersten Ansatz stellte sich im Vorfeld die Frage, ob es nach Infektion differenzierter F11 Zellen tatsächlich zu einer nachweisbaren Expression des Markergens kommen würde. Eine Voraussetzung für die Transgen-Expression bei Einzelstrang-DNA-Vektoren ist die Zweitstrangsynthese, die vor allem in der S-Phase des Zellzyklus durch zelluläre DNA-Replikations- und Reparatur-Enzyme vermittelt wird. In differenzierten, ruhenden Zellen sind diese weitaus weniger abundant als in schnell proliferierenden, undifferenzierten Zellen. Im zweiten Ansatz, bei welchem der Infektionsschritt mit den undifferenzierten Neuronen durchgeführt wurde, sollte die Zweitstrangsynthese also nicht so stark eingeschränkt sein, der NSE-Promotor vermutlich aber auch nicht so stark aktiv. Beim Ansatz 1 wurde nach Ablauf der insgesamt 10-tägigen Inkubationsperiode zunächst eine fluoreszenzmikroskopische Analyse durchgeführt. Im Anschluss wurden Proteinextrakte für eine Western-Blot-Detektion des GFP-Proteins hergestellt. Dieses wurde mit einem anti-GFP Antikörper und einem Peroxidase-markierten Zweitantikörper nachgewiesen. Der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zufolge führte das Konstrukt UF11 mit CBA-Promotor in etwa 50% der Zellen zu einer GFP-Expression, das Konstrukt UF5 mit CMV-Promotor hingegen führte nur in ca. 5 % der Zellen zu einer detektierbaren GFP-Expression (s. Abb. 4.9 A). Mit dem NSE- war der Prozentsatz positiver Zellen (ca. 10%) zwar höher als mit dem UF5-Konstrukt, allerdings war das Signal auf Einzelzellebene sehr schwach, was im Western-Blot zu einem schwächeren Signal als für UF5-GFP führte (s. Abb. 4.9 B). Ansatz 2 konnte aufgrund des sehr schwachen Expressionsniveaus ausschließlich unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden. Hierbei führte das Konstrukt mit CMV-Promotor zur Infektion von maximal 10% der Zellen, das Konstrukt mit CBA-Promotor zur Infektion von ca. 30% der Zellen. Für das NSE-Konstrukt

waren nur vereinzelt fluoreszierende Zellen zu erkennen (ohne Abbildung). Die insgesamt stärkere GFP-Expression im ersten Ansatz ist vermutlich auch auf die 3 Tage längere Infektionsdauer zurückzuführen. Grundsätzlich konnte eine Infektion sowohl differenzierter als auch undifferenzierter F11 Zellen mit rAAV-GFP Markergen-Vektoren nachgewiesen werden, allerdings auf einem sehr schwachen Expressionsniveau. Dies galt insbesondere für die Konstrukte mit CMV- (UF5) und NSE-Promotor. Der CBA-Promotor (UF11) eignet sich noch am ehesten für die Infektion der neuronalen F11 Zelllinie, sowohl im differenzierten als auch im undifferenzierten Zustand. In einem dritten Versuchsansatz wurden zunächst 3 Tage lang differenzierte F11 Zellen mit den rAAVs und Adenovirus vom Subtyp 2 (MOI 50) zur Verstärkung der Expression koinfiziert. Nach weiteren 3 Tagen wurden Proteinextrakte für eine Western-Analyse gewonnen. In Abb. 4.9 C ist der Effekt der Ad2 Überinfektion dargestellt. Trotz eines deutlich zytopathischen Effektes der Ad2 Überinfektion, der sich in einer lichtmikroskopisch nachweisbaren Abrundung und Ablösung der F11 Zellen äußerte, konnten transaktivierende Effekte nachgewiesen werden. Während vorrangig die CMV- und mit Einschränkungen auch die CBA-Promotor vermittelte Expression von GFP zunahm, blieb ein transaktivierender Einfluss der Ad2 Überinfektion auf den NSE-Promotor aus. Vielmehr kann eher von einem repressiven Effekt auf die Aktivität des Neuronen spezifischen Promotors ausgegangen werden, da in der Fluoreszenzmikroskopie nur noch sehr vereinzelt GFP-exprimierende Zellen detektiert werden konnten und die Genexpression auf ein im Western-Blot nicht mehr nachweisbares Niveau sank (vgl. Abb. 4.9 B und C).



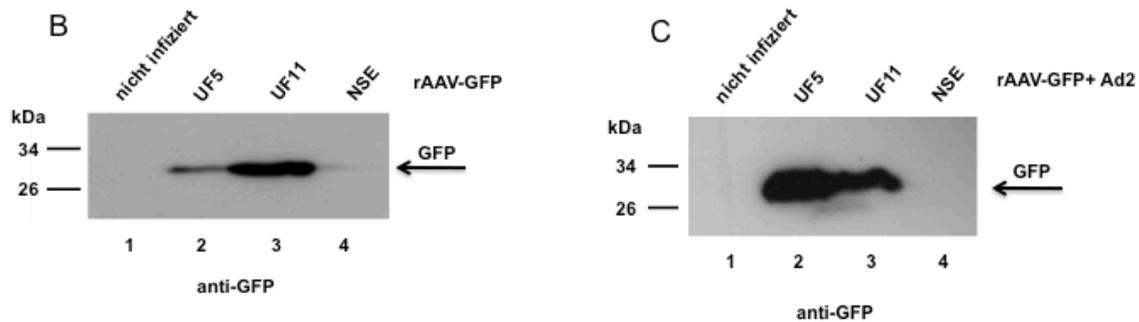


Abb. 4.9: Infektion von differenzierten F11 Zellen mit rAAV-Überständen

F11 Zellen wurden zunächst drei Tage in Differenzierungsmedium inkubiert und anschließend mit den rAAV-haltigen Frier-Tau-Medienüberständen infiziert.

A) Die GFP-Markergenexpression wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen nach Infektion unter einem inversen Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

B) Nach Ablauf der 7-tägigen Inkubationsperiode wurden Proteinextrakte für eine Western-Blot-Detektion des infizierten Markergens GFP hergestellt, das mit einem polyklonalen GFP Primärantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert wurde.

C) Die Zellen wurden wie vorher differenziert und mit rAAV-Überständen infiziert. Zur Induktion der Zweitstrangsynthese und zur Verstärkung der Transgenexpression wurde zusätzlich mit Adenovirus vom Subtyp 2 (MOI 50) überinfiziert. Die Immundetektion erfolgte wie bei (B) beschrieben.

Nachdem die Vorversuche mit GFP bereits ein sehr schwaches Expressionsniveau in den F11 Zellen im Vergleich zu HeLa Zellen gezeigt hatten, musste davon ausgegangen werden, dass die Expression von Flag- μ OR nach rAAV-Infektion der F11 Zellen unterhalb des Detektionslimits lag. Dies vor allem vor dem Hintergrund, dass sich in den Versuchen mit HeLa Zellen bereits große Differenzen in der Nachweisbarkeit von GFP- und Flag- μ OR zugunsten der GFP-Expression gezeigt hatten. In einem Versuchsansatz, bei dem die rAAV-Konstrukte UF5, UF11 und NSE in einer MOI von 1×10^4 und das NSE-Konstrukt zusätzlich in MOIs von 2×10^4 und 1×10^5 infiziert und anschließend 4 Tage lang differenziert wurden, konnte, wie vermutet, keine Flag- μ OR-Expression detektiert werden. Auch in einem Ansatz ohne Induktion der Differenzierung konnte die Flag- μ OR Expression für keines der drei Konstrukte detektiert werden. Weiterhin führte auch eine Koinfektion mit Ad2 zu keinem ausreichend hohen Expressionslevel für eine Detektion in der Western-Analyse, zumal dieser Tool zur Expressionsverstärkung im Zusammenhang mit dem NSE-Konstrukt ohnehin nicht genutzt werden konnte, weil sich gezeigt hatte, dass der NSE-Promotor, vermutlich aufgrund fehlender TATA-Box, im Gegensatz zu CMV- und CBA-Promotor nicht von Ad2 transaktiviert wurde. Aufgrund der Transfektionsdaten und der nachgewiesenen GFP-Expression nach Infektion kann auch von einer Expression des Flag- μ OR in den F11 Zellen ausgegangen werden, allerdings deutet alles auf ein für den Western-Blot-Nachweis zu schwaches Expressionsniveau hin.

4.3 Selbstkomplementäre rAAV-Vektoren zur optimierten Expression des Flag- μ OR

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein selbstkomplementärer (sc) rAAV-Vektor zur Expression des Flag- μ OR generiert werden, welcher im Gegensatz zu den einzelsträngigen Vektoren bereits in einer transkriptionskompetenten Form vorliegen würde. Bei den einzelsträngigen rAAV Vektoren ist der limitierende Faktor für die Expression eines Transgens die S-Phase abhängige Synthese des komplementären DNA-Strangs nach der Transduktion. Dafür sind die Vektoren auf den zellulären Replikationsapparat angewiesen. Gerade in ruhenden Zellen, wie Neuronen, kann sich dadurch der Beginn der Transgenexpression erheblich verzögern, so dass die maximale Genexpression erst nach Tagen bis Wochen die Plateauphase erreicht. Dieses Problem der verzögerten Expressionskinetik kann durch Verwendung selbstkomplementärer (sc) AAV-Vektoren umgangen werden. Diese verpacken bevorzugt doppelsträngige Genome, welche sofort nach Infektion der Vektoren exprimiert werden können (Heilbronn & Weger, 2010). Verschiedene Studien der letzten Jahre konnten zeigen, dass hierbei nicht nur eine schnellere Kinetik, sondern auch eine höhere maximale Transgenexpression gegenüber einzelsträngigen Vektoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* resultiert (McCarty *et al.*, 2001 and 2003; Wang *et al.*, 2003). Diese vorteilhaften Eigenschaften von sc-AAVs sollten für die Expression des Flag- μ OR genutzt werden. Der Nachteil ist, dass die Verpackungskapazität der sc-AAV-Vektoren gegenüber normalen AAV-Vektoren noch weiter reduziert ist, insgesamt dürfen sie zwischen den beiden ITRs maximal 2200 Basenpaare enthalten (Abb. 1.4. ss- vs. sc-AAVs). Dies hatte zur Folge, dass aufgrund der Größe von den vorher verwendeten Promotoren ausschließlich der CMV-Promotor zur Regulierung der Genexpression eingesetzt werden konnte.

4.3.1 Klonierung von Plasmidkonstrukten zur Generierung selbstkomplementärer rAAV-Vektoren

Hierzu wurde das Plasmidkonstrukt pd-CMV- μ OR-dSA/SD (s. 2.7) von Dr. Stefan Weger zur Verfügung gestellt, welches die Flag- μ OR Expressionskassette unter Kontrolle des CMV-Promotors enthielt. Eine Deletion in der „terminal resolution site“ des linken ITR führt dabei zur Verpackung von sc-AAV-Vektoren, wenn die Sequenzen zwischen den ITRs eine Gesamtlänge von 2,2 kbp nicht überschreiten. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Verpackung dieses Konstruktes im rAAV-Kontext wurden im Verlauf weitere Umklonierungen erforderlich, die im Folgenden dargestellt sind.

Ausgehend von dem Vektorkonstrukt pD-CMV-Red, welches das DsRed-Gen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors enthielt und ebenfalls eine Deletion im linken ITR für die Generierung von sc-rAAV-Vektoren trug, wurden die Plasmide pD- μ OR-N2 und pD- μ OR-N3, generiert. Für die Generierung von pD- μ OR-N2 wurde die DsRed-Sequenz mit den Restriktionsenzymen NotI und SalI ausgeschnitten und durch die Flag- μ OR cDNA aus dem Konstrukt pD-CMV- μ OR (s. 2.7), die nach einer Subklonierung im Bluescript II SK+ Vektor mit den Restriktionsschnittstellen NotI und SalI flankiert war, ersetzt. Für die Klonierung von pD- μ OR-N3 wurde die DsRed-Sequenz inklusive der SV40 SD, SA Site mit den Restriktionsenzymen XbaI und SalI ausgeschnitten und durch die Flag- μ OR cDNA, die mit den gleichen Restriktionsschnittstellen flankiert war, ersetzt. Die Sequenz zwischen den ITRs ist im N2-Konstrukt ca. 2,2 kbp lang, für das N3-Konstrukt konnte sie durch die Deletion der SD/SA-Site um ca. 200 bp reduziert werden. Die drei verwendeten Plasmidkonstrukte (pD-CMV- μ OR-dSA/SD, pD- μ OR-N2, pD- μ OR-N3) zur Generierung sc-rAAV-Vektoren enthalten alle den Flag- μ OR unter der Kontrolle des CMV-Promotors (s.Abb. 4.10).

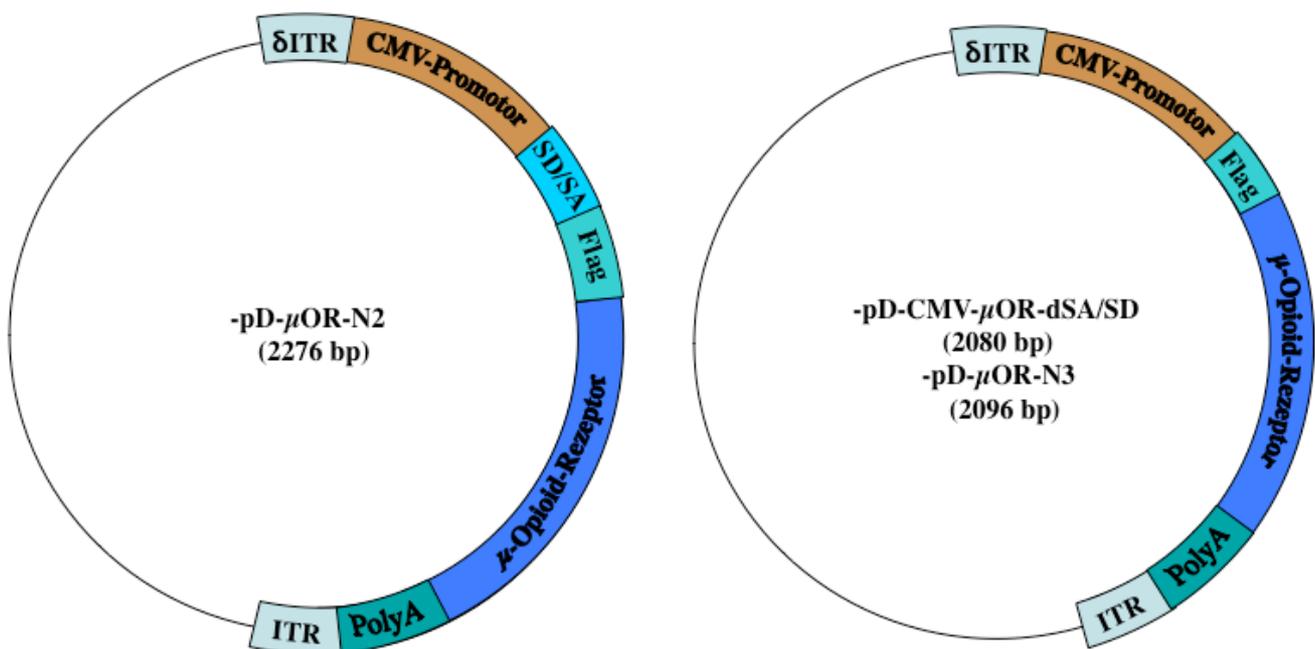


Abb. 4.10: Flag- μ OR Plasmide zur Generierung selbstkomplementärer rAAV-Konstrukte

4.3.2 Generierung selbstkomplementärer rAAVs

Als erstes Ausgangskonstrukt für die Generierung von sc-rAAV-Vektoren wurde das Plasmid pD-CMV- μ OR-dSA/SD verwendet. Dieses wurde wie im Methodenteil beschrieben als rAAV Serotyp 2 Vektor in einem Großansatz verpackt und über Frier-Tau-Lyse/Benzonase, Iodixanol-Gradient und Heparin-Agarose Affinitätschromatographie hochgereinigt. Dabei wurden jedoch in mehreren Ansätzen nur physikalische Vektortiter erreicht, welche mehrere 10-log Stufen unter den mit anderen dimerischen Vektorkonstrukten erreichten Titern lagen. Während mit anderen Vektoren Titer im Bereich von 10^{11} bis 10^{13} genomischen Partikeln/ml (GP/ml) gemessen wurden, lagen diese für die dimerischen Flag- μ OR Vektoren unterhalb von 10^9 GP /ml. Das Plasmidkonstrukt wurde auf Unversehrtheit des rechten ITR durch einen Restriktionsenzymverdau mit PstI/SphI untersucht. Hierbei konnte der vollständige ITR nicht eindeutig nachgewiesen werden. Daher wurde die isolierte Flag- μ OR-Kassette mit zwei alternativen Klonierungsstrategien wie unter 4.3.1 beschrieben nochmals in einen dimerischen AAV-Vektor mit nachweisbar intakten ITRs umkloniert. Der verwendete Ausgangsvektor mit dem DsRed-Markergen führte in Verpackungsansätzen zu einer hohen Ausbeute an rekombinanten Viruspartikeln. Das Konstrukt μ OR-N2 konnte einmalig mit einem Titer von $1,2 \times 10^{10}$ GP/ml verpackt werden, allerdings konnte in mehrfach durchgeführten Infektionsversuchen keine Expression des Flag- μ OR gezeigt werden (siehe 4.3.5). Eine mögliche Ursache für die relativ schlechte Verpackung des μ OR-N2-Konstruktes war die für die Verpackung als Dimer grenzwertige Größe von 2,2 kbp im Bereich zwischen den ITRs. Daher wurde das im Bereich zwischen den AAV-ITRs durch das Fehlen der SV40 Splice-Donor/Akzeptor-Sequenz um 200 bp verkürzte Konstrukt μ OR-N3 ebenfalls in Standard Verpackungsansätze für die Generierung von Serotyp 2 Vektoren eingesetzt. Trotz intakter ITRs und einer eigentlich unproblematischen Größe von 2 kbp zwischen den ITRs konnten auch hier nur Virustiter von maximal $1,2 \times 10^{10}$ Gp/ml erreicht werden.

4.3.3 Expressionsanalysen nach Plasmidtransfektion und Infektion sc-rAAV-Vektoren

In Abb. 4.11 sind Western-Blot-Analysen nach Transfektion von HeLa Zellen mit den Flag- μ OR-Plasmidkonstrukte für sc-rAAVs sowie nach Infektion von HeLa Zellen mit den eigentlichen rekombinanten Viren dargestellt. Ein sc-AAV-Verpackungsplasmid mit dem GFP-Markergen und die entsprechenden rekombinanten Viruspartikel wurden als Kontrollen eingesetzt. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen anti-Flag bzw. einem polyklonalen anti-GFP Primärantikörper und Peroxidase-markierten Sekundärantikörpern.

Nach Transfektion der AAV-basierten Plasmidkonstrukte konnte die Expression des Flag- μ OR für alle drei Konstrukte (pD-CMV- μ OR-dSA/SD, pD- μ OR-N2 und pD- μ OR-N3) und die GFP-Expression des als Kontrolle mitgeführten Plasmids pD-trs-GFP eindeutig nachgewiesen werden. Nach Verpackung in sc-rAAVs und anschließender Infektion ist die GFP-Expression für rAAV-trs-GFP weiterhin gut detektierbar, die des Flag- μ OR jedoch für keines der drei untersuchten Konstrukte (rAAV-CMV- μ OR-dSA/SD, - μ OR-N2 und - μ OR-N3). Hierbei wurden in verschiedenen Versuchen sowohl Frier-Tau-Medienüberstände als auch aufgereinigte Vektorpräparationen (bis zu 5×10^4 GP/Zelle) der Flag- μ OR-Vektorkonstrukte eingesetzt. Für den in Abb. 4.11 gezeigten Versuch wurden 200 μ l der jeweiligen rAAV-Frier-Tau-Medienüberstände auf je eine Vertiefung einer 6-well-Platte eingesetzt. Zur Detektion des Transgens über den aminoterminalen Flag-Tag wurden die identischen Antikörper wie in den Transfektionsversuchen eingesetzt. Die drei untersuchten Plasmidkonstrukte zur Expression des Flag- μ OR und das Plasmidkonstrukt zur GFP-Expression waren funktionell und führten zu einer deutlich nachweisbaren Transgenexpression in der Western-Blot-Analyse. Alle Plasmide tragen eine Deletion in einem der ITRs, wodurch doppelsträngige rAAV-Genome verpackt werden sollten. Nach der Verpackung war eine Transgenexpression für das rAAV-GFP Konstrukt nachweisbar. Hingegen konnte für die sc-rAAV-Flag- μ OR Konstrukte keine Transgenexpression gezeigt werden. Ein Grund für die fehlende Nachweisbarkeit der Flag- μ OR Expression nach Infektion der sc-rAAV-Konstrukte in verschiedenen Versuchsansätzen könnte gewesen sein, dass zu geringe Virusmengen eingesetzt wurden. Die geringen Infektionsmultiplizitäten (MOI) konnten jedoch bedingt durch die niedrigen Titer der Viruspräparationen nicht weiter gesteigert werden.

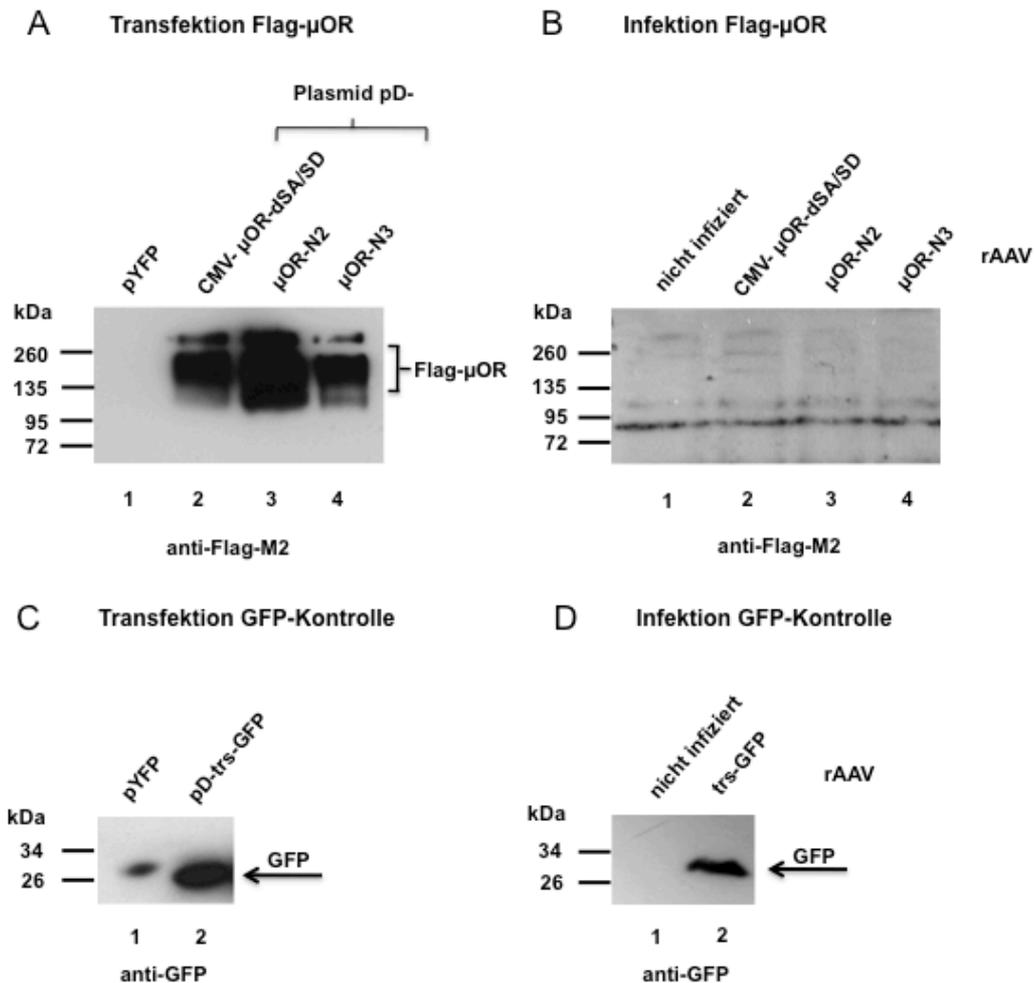


Abb. 4.11: Vergleich der Transgenexpression nach Transfektion von AAV Dimerplasmiden und Infektion der entsprechenden dimerischen, selbstkomplementären (sc) rAAV-Vektoren.

A) Transfektion von HeLa Zellen mit den Verpackungskonstrukten pD-CMV- μ OR-dSA/SD, - μ OR-N2 und - μ OR-N3 für die Herstellung selbstkomplementärer rAAV- μ OR-Vektoren. Alle drei Konstrukte zeigen eine korrekte Flag- μ OR-Expression in der Western-Blot-Detektion mit einem monoklonalen Maus anti-Flag Primärantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper. B) Nach Verpackung der Konstrukte in rAAV-Vektoren wurden HeLa Zellen mit den selbstkomplementären rAAVs infiziert. Die Expression des Flag- μ OR konnte nicht detektiert werden. C+D) Zum Vergleich ist die GFP-Expression nach C) Transfektion des Plasmidkonstruktes pD-trs-GFP für die Herstellung eines selbstkomplementären, rekombinanten AAV-GFP-Vektors und D) die Infektion des entsprechend verpackten, selbstkomplementären rAAV Vektors, dargestellt. Die GFP-Expression konnte sowohl nach Transfektion als auch nach Infektion mittels eines polyklonalen GFP-Primär- und eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers detektiert werden.

4.3.4 Überinfektion mit Ad2 zur Verstärkung der Flag- μ OR Expression der sc-rAAV Vektoren

Nachdem es in verschiedenen Ansätzen nicht gelungen war, die Expression des Flag μ -OR nach Infektion der sc-rAAV-Vektoren nachzuweisen, wurden die Versuche unter zusätzlicher Überinfektion der Zellen mit Adenovirus vom Subtyp 2 in einer MOI von 50 wiederholt. In den vorangegangenen Versuchen mit den monomerischen (einzelnsträngigen) Vektoren hatte sich gezeigt (s. Abschnitt 4.1.4.), dass der verstärkende Einfluss von Ad2 auf das Expressionsniveau vorrangig auf der Ebene der Aktivierung des jeweiligen Promotors vermittelt wurde, wobei der CMV-Promotor sich im Vergleich zu CBA- und NSE-Promotor besonders stark aktivieren ließ. Da die Induktion der Zweitstrangsynthese eine eher untergeordnete Rolle spielte, war anzunehmen, dass dieser Effekt auch bei den bereits doppelsträngigen, selbstkomplementären Vektoren wirksam sein sollte. 48 h nach Koinfektion der rAAV-Vektoren und Ad2 wurden Proteinextrakte hergestellt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen, die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen anti-Flag Antikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper. Tatsächlich konnte ein schwaches, aber reproduzierbares Signal für das rAAV- μ OR-N3 Konstrukt, das aufgrund geringer Titer der Vektorpräparation in einer sehr niedrigen MOI von 150 eingesetzt wurde, detektiert werden (s. Abb. 4.12). Für die anderen zwei Konstrukte (MOI 2200) konnte hingegen keine Transgenexpression nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Flag- μ OR-Expressionskassette in einen selbstkomplementären rAAV-Vektor (μ OR-N3) verpackt werden konnte, der prinzipiell in der Lage ist, den Rezeptor nach Infektion zu exprimieren.

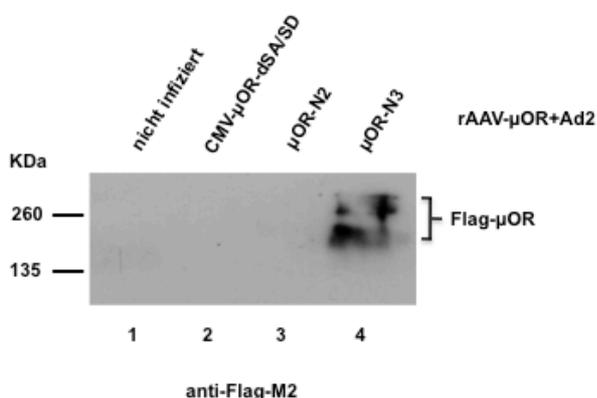


Abb. 4.12: Infektion von HeLa Zellen mit selbstkomplementären rAAVs zur Flag- μ OR Expression mit Überinfektion von Adenovirus vom Subtyp 2

HeLa Zellen wurden mit den selbstkomplementären rAAV Vektoren CMV- μ OR-dSA/SD, μ OR-N2 und μ OR-N3 infiziert und zur Verstärkung der Transgenexpression mit Adenovirus vom Subtyp 2 (MOI 50) überinfiziert. Von rAAV-CMV- μ OR-dSA/SD und - μ OR-N2 wurden etwa 2200, von rAAV- μ OR-N3 150 genomische Partikel pro Zelle eingesetzt. Nach 48 h wurden Proteinextrakte für eine Western-Blot-Detektion des infizierten Flag- μ OR hergestellt, der mit einem monoklonalen anti-Flag Primärantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen wurde.

4.4 Optimierung der Verpackung der selbstkomplementären rAAV- μ OR-Vektoren

4.4.1 Transiente Runterregulation der μ OR-Expression während der Vektorverpackung

Aufgrund der wiederholt niedrigen Virustiter bei der Generierung der sc-rAAV Vektoren zur Expression des Flag- μ OR wurde die Möglichkeit diskutiert, ob eine starke Expression des μ -Opioid-Rezeptors durch die Inhibition eines oder mehrerer Teilschritte während der Verpackung die Ausbeute an rAAVs beeinträchtigt. Mögliche Ursachen für einen solchen inhibitorischen Effekt wären z.B. Interferenzen des μ -OR mit den AAV-Proteinen oder den adenoviralen Helferfunktionen. Die Inhibition der Produktion rekombinater AAVs durch das während der Virusproduktion exprimierte Transgen war in unserer Arbeitsgruppe mit einem anderen Transmembranrezeptorprotein bereits beobachtet worden (Alexander Plauth, persönliche Mitteilung; Anne Müller, Diplomarbeit). Bei diesem Transmembranrezeptorprotein handelte es sich um die γ 2-Untereinheit des GABA-A Rezeptors, deren Expression ebenfalls unter der Kontrolle des CMV-Promotors stand und deren zugehöriges Verpackungsplasmid zunächst mit einem Standardansatz nach Kotransfektion mit dem Helferplasmid überhaupt nicht verpackt werden konnte. Da die γ 2 Transmembran-Untereinheit (UE) mit GFP fusioniert vorlag, konnte durch Nutzung des Mechanismus der RNA Interferenz mittels vorhandener sh-RNA-Vektoren, die gegen das GFP-Protein gerichtet waren, auch die Expression der GABA-A γ 2-UE im Fusionsprotein runterreguliert und während der Verpackung selektiv inhibiert werden. Und tatsächlich konnte mit einem Dreifachtransfektionsansatz, der zusätzlich zum üblichen Verpackungsansatz ein sh-RNA Plasmid für den GFP-Knockdown enthielt, die Verpackung der Rezeptor-UE mit ausreichend hohen Titern erreicht werden. Bei der Verpackung der Flag- μ OR-Konstrukte in die dimerischen rAAV-Vektoren könnte es zu einem ähnlichen Effekt kommen, aber offensichtlich erst bei höheren Expressionsraten des Rezeptors. Dies ist daran zu erkennen, dass die monomerischen, einzelsträngigen Vektoren erfolgreich verpackt werden konnten, während die Verpackung der dimerischen, selbstkomplementären rAAVs wiederholt zu sehr niedrigen Titern an rekombinanten Viren führte. In einem Parallelansatz zeigten die Verpackungsplasmide für die Dimervektoren (pD-CMV- μ OR-dSA/SD, - μ OR-N2, - μ OR-N3) im Vergleich zu den Plasmiden für die Monomer-Vektoren (pTR-UF5- μ OR und -UF11- μ OR) eine höhere Transgenexpression (ohne Abbildung), weshalb auch von einem höheren Expressionsniveau während der Verpackung ausgegangen werden kann. Weiterhin war im Rahmen der Virusproduktion der rAAV- μ OR-Monomer-Vektoren aufgefallen, dass der

Virustiter für das rAAV-NSE-Konstrukt am höchsten, für das rAAV-CMV-Konstrukt am niedrigsten, gewesen war. Auch dies deutete auf eine umgekehrte Korrelation zwischen Transgenexpression während der Verpackung und den zu erzielenden Virustitern hin. Denn der neuronenspezifische NSE-Promotor ist, wie bereits gezeigt, in der Verpackungszelllinie 293-T kaum aktiv, während der CMV-Promotor zu einer sehr starken Expression führt. Die Verpackung des dritten Konstruktes mit dem CBA-Promotor lieferte Werte, die zwischen denen mit NSE- und CMV-Promotor lagen, entsprechend der relativen Aktivitäten der drei Promotoren in 293-T Zellen. Vergleichende Untersuchungen der Genexpressionsrate durch den CBA- hatten eine etwa halb so starke Expression in 293T-Zellen im Vergleich zum CMV-Promotor gezeigt (Chung *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen stützten die Annahme, dass eine starke Expression des μ -OR störend auf den effektiven Verpackungsablauf Einfluss nehmen könnte. Da also eine Interferenz des μ -OR mit AAV-Verpackungsproteinen oder Helferfunktionen angenommen wurde, stellte sich die Frage, ob eine transiente Runterregulation des Rezeptors während der Vektorgenerierung einen positiven Effekt auf die Verpackungseffizienz haben könnte. Eine Möglichkeit zur Inhibition der Rezeptorexpression während der Verpackung war eine transiente Expression interferierender RNA-Moleküle.

4.4.2 RNAi Interferenz (RNAi)

RNA Interferenz (RNAi) wurde ursprünglich in *Caenorhabditis elegans* entdeckt und als evolutionär konservierter Mechanismus der Genabschaltung durch lange doppelsträngige (ds) RNA Moleküle beschrieben (Fire *et al.*, 1998). Seither spielt der RNAi Mechanismus eine hervorragende Rolle für die funktionelle Analyse einzelner Gene, aber auch als therapeutische Strategie zum „Knockdown“ krankheitsassoziierter Gene (Leung & Whittaker, 2005). Ursprünglich handelt es sich bei der RNAi um einen natürlichen Abwehrmechanismus der Zelle gegen Fremd-RNA, z.B. aus Viren. Sequenzspezifisches posttranskriptionelles *gene silencing* durch ds-RNA Moleküle ist demnach ein weit verbreiteter Mechanismus, auch bei Säugern (Meister & Tuschl, 2004). In Säugerzellen führen lange dsRNA Moleküle allerdings zu unspezifischer Hemmung der Genexpression durch Induktion einer Interferon γ Antwort und durch Aktivierung der Protein Kinase R. Diese Abwehrmechanismen können aber durch die Anwendung kurzer doppelsträngiger „small interfering“ RNAs (si-RNAs) umgangen werden. Diese si-RNA Effektormoleküle sind 21-22 Nukleotid (nt) lange ds-RNA Fragmente mit charakteristischen 3'-Dinukleotidüberhängen und induzieren intrazellulär eine Kaskade biochemischer Folgereaktionen (Bernstein *et al.*, 2001). Sie werden wie die endogenen

vorkommenden micro-RNAs von einer zytoplasmatischen Ribonuklease III, namens Dicer, prozessiert. Anschließend erfolgt der Einbau der si-RNAs in einen Multiproteinkomplex, dem „RNA induced silencing complex“ (RISC). Nach Denaturierung der doppelsträngigen Fragmente kann der mit dem RISC assoziierte antisense Strang der si-RNA spezifisch mit einem entsprechenden messenger RNA (mRNA) Molekül hybridisieren. Es folgt die Degradierung der spezifisch erkannten mRNA durch die „Argonaute“ Endonuklease des RISC, wodurch keine Translation von dieser mRNA mehr erfolgt (Leung & Whittaker, 2005).

4.4.3 Expressionssysteme für „small interfering“ (si)-RNA's

Die si-RNA-Moleküle können entweder direkt durch Lipofektion, Elektroporation oder Kopplung an Peptide in die Zelle gebracht werden oder alternativ in Plasmid basierte Expressionssysteme eingebettet werden. Die Plasmidvektoren enthalten dabei RNA Polymerase III Promotoren (H1 oder U6), die entweder sense und antisense Strang von getrennten Promotoren exprimieren (Tandemtyp) oder zur Expression sogenannter „small hairpin“ RNAs (sh-RNA) führen (Haarnadeltyp). Bei Letzteren wird ein Transkript synthetisiert, das beide komplementären Stränge der si-RNA über eine kurze Schleife aus 5-9 nt miteinander verbindet. Durch Rückfaltung und Hybridisierung der komplementären Stränge kommt es zur Ausbildung der sh-RNA, die über die zytoplasmatische Ribonuklease Dicer zur aktiven si-RNA prozessiert wird (s.Abb. 4.13). Siolas *et al.* konnten sogar zeigen, dass sh-RNAs wirksamere Induktoren des RNAi Mechanismus sind als si-RNAs (Siolas *et al.*, 2005).

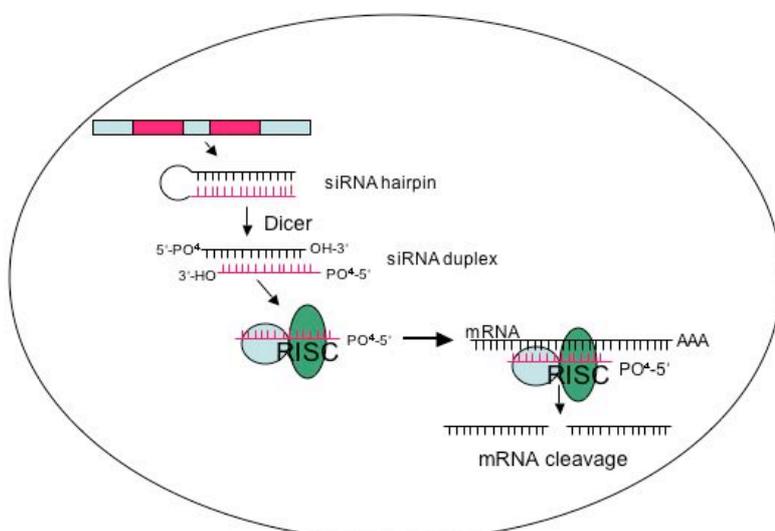


Abb. 4.13: Zytoplasmatische Prozessierung der small hairpin RNA (sh-RNA) zur small interfering RNA (si-RNA).

Nach Transfektion des sh-RNA Plasmidvektors werden sense und antisense Strang, verbunden durch eine, wenige Nucleotide lange, Schleife, als ein Molekül exprimiert, das eine Hairpinstruktur ausbildet. Es erfolgt die Prozessierung durch die zytoplasmatische Nuklease Dicer zur effektiven small interfering RNA (si-RNA). Assoziiert mit dem „RNA induced silencing complex“ (RISC) erkennt der antisense Strang der si-RNA spezifisch das passende mRNA Molekül, das durch Nukleaseaktivität des RISC schließlich degradiert wird.

4.4.4 Entwicklung eines „small-hairpin“ (sh)-RNA-Vektors zur Runterregulation der μ OR- Expression

In dieser Arbeit wurde zur Generierung von sh-RNA-Vektoren ein erstmalig von Brummelkamp *et al.* beschriebenes pSuper Ausgangsplasmid verwendet, das den RNA Polymerase III Promotor H1 zur Expression der sh-RNA enthält (Brummelkamp *et al.*, 2002). Die „Oligonukleotidsequenzen“ für die Expression von sh-RNAs zur Runterregulation des μ -Opioid-Rezeptors wurden den Veröffentlichungen von Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2009) und Lasek *et al.* (Lasek *et al.*, 2007) entnommen. Hierbei wurde die Sequenz aus letzterem Paper nach einem Alignment bei der Datenbank NCBI durch einen Basenaustausch verändert und somit bezogen auf die in dieser Arbeit verwendeten Ratten-DNA-Sequenz des μ -OR optimiert. Für die Klonierung wurde das pSuper Ausgangsplasmid mit BglIII und Hind III geschnitten und dephosphoryliert. 4 Oligonukleotide mit den entsprechenden Überhängen und den sense und antisense si-RNA Sequenzen wurden bei der Firma MWG bestellt, anschließend gepaart und in den pSuper Vektor ligiert. Es wurden insgesamt drei Konstrukte generiert, die durch den jeweiligen „antisense“ Strang die Flag- μ OR mRNA an drei unterschiedlichen Stellen erkennen und degradieren sollten. In Abb. 4.14 sind die Zielsequenzen der unterschiedlichen si-RNAs schematisch dargestellt.



Abb. 4.14: Schematische Darstellung der Zielsequenzen der drei sh-RNA-Vektoren pSuper-MUM-A, -MOR-B und -MOR-C an der Flag- μ OR mRNA

Die von C.Zöllner erhaltene, in dieser Arbeit verwendete Rattensequenz des aminoterminal Flag-getaggten μ -Opioid-Rezeptors ist hier stark vereinfacht dargestellt. Weiterhin sind die Basenpositionen eingetragen, die von den si-RNA-Sequenzen MUM-A (A), MOR-B (B) und MOR-C (C) spezifisch erkannt werden und zur Degradation auf mRNA Ebene führen sollten.

4.4.5 Sequenzanalysen

Nach Sequenzierung der „sh-RNA Plasmide“ unter Verwendung des Standardprimers T7 bei der Firma MWG konnte die Sequenzierung mit den erwarteten Sequenzen durch die

Alignfunktion in NCBI (Blast 2 Sequences-Programm) verglichen werden. Es konnte die korrekte Klonierung dreier Konstrukte bestätigt werden, die als pSuper-MUM-A, pSuper-MOR-B und pSuper-MOR-C bezeichnet wurden. Diese wurden anschließend auf ihre Fähigkeit zur Inhibition der Flag- μ OR Expression untersucht.

4.4.6 Austestung der sh-RNA-Vektoren

Zur Überprüfung der Funktionalität der sh-RNA-Vektoren bezüglich der Inhibition der Flag- μ OR Expression wurden Kotransfektionsversuche in 293-T und HeLa Zellen durchgeführt. Kotransfiziert wurden dabei eines der bereits beschriebenen rAAV-Vektorkonstrukte zur Expression des Flag- μ OR mit den pSuper-basierten sh- μ OR-Vektoren. Ferner einhielten die Ansätze ein GFP-exprimierendes rAAV-Vektorkonstrukt zum Abgleich der Transfektionseffizienzen der einzelnen Ansätze. Für die Negativkontrolle wurde statt eines sh-RNA-Vektors der pSuper-Leervektor in gleicher DNA-Konzentration kotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurden Proteinextrakte hergestellt und die μ OR- und GFP-Expression mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Die quantitative Auswertung der Western-Analyse erfolgte am Licor Odyssey Fluoreszenz-Scanner unter Verwendung eines monoklonalen anti-Flag und eines polyklonalen anti-GFP Primärantikörpers sowie Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörpern. Die Sekundärantikörper waren hierbei an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, welche bei 700 bzw. 800 nm fluoreszierten. Durch separate Messung der Intensität der Infrarotfluoreszenz bei 700 und 800 nm konnte die Proteinkonzentration sowohl für Flag- μ OR als auch für GFP bestimmt werden. Durch Verrechnung jedes einzelnen Wertes der Flag- μ OR Expression mit der dazugehörigen GFP-Expression, konnten Fehleinschätzungen aufgrund von Schwankungen in der Transfektionseffizienz vermieden werden.

4.4.7 Reduktion des μ -OR Proteinlevels durch sh-RNA-Vektoren

Die drei unterschiedlichen sh-RNA-Vektoren wurden jeweils einzeln, aber auch in verschiedenen Kombinationen getestet. Hierbei wurde stets 1 μ g eines AAV-basierten Flag- μ OR Plasmids und 1 μ g eines AAV-basierten GFP-Plasmids kotransfiziert. Die dritte Komponente wurde wie folgt variiert: Bei ausschließlicher Verwendung eines sh-RNA-Konstruktes wurden 1-2 μ g der DNA eingesetzt. Bei der Kombination zweier Konstrukte betrug die DNA-Menge pro Konstrukt 1 μ g, bei der Kombination aller drei Konstrukte 0,5 μ g. Die Gesamt-DNA-Menge betrug in jedem Ansatz 4 μ g, wenn nötig wurde mit einem

Leervektor aufgefüllt. Mit allen generierten sh-RNA-Plasmidkonstrukten konnte eine deutliche Inhibition der μ OR-Proteinexpression beobachtet werden. Das Plasmidkonstrukt pSuper-MOR-B erwies sich hierbei als besonders wirksam, auch der Kombination mit den beiden anderen sh-RNA-Konstrukte A und/oder C war es einzeln überlegen. In Abb. 4.15 ist eine exemplarische Auswertung am Odyssey Scanner dargestellt.

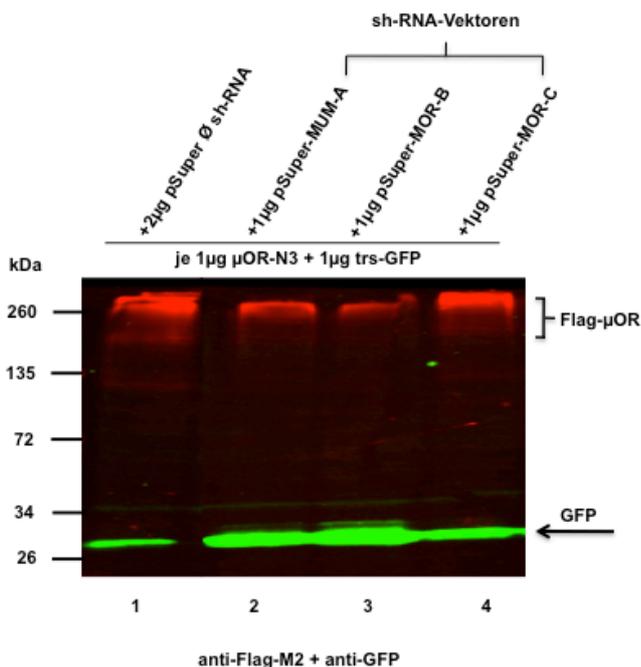


Abb. 4.15: Odyssey Scan zur Quantifizierung der Flag- μ OR-Expression

293-T Zellen wurden mit den AAV-basierten Plasmidkonstrukten pD- μ OR-N3 zur Expression des Flag- μ OR, pD-trs-GFP zur GFP Expression sowie verschiedenen sh-RNA-Konstrukten kotransfiziert. Zur Runterregulation der Flag- μ OR Proteinexpression wurden die drei sh-RNA-Konstrukte p-Super-MUM-A (2), -MOR-B (3) und -MOR-C (4) eingesetzt. Zur Kontrolle (1) wurde das pSuper Plasmid ohne sh-RNA Sequenz eingesetzt. 48 h nach Transfektion wurden Proteinextrakte hergestellt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen anti-Flag und einem polyklonalen anti-GFP Primärantikörper. Für die Quantifizierung über den Odyssey Scanner wurden Fluoreszenzmarkierte anti-Maus und anti-Kaninchen Sekundärantikörper verwendet. Der Flag- μ OR wird in multimerisierter Form bei 200-260 kDa, GFP bei ca. 27 kDa nachgewiesen. Die Fluoreszenzintensitäten konnten für Flag- μ OR bei 700 und für GFP bei 800 nm gemessen werden und korrelieren mit der Expressionsstärke der Proteine. Jeder Intensitätswert für die Flag- μ OR-Expression wurde mit dem zugehörigen GFP Wert abgeglichen.

4.4.8 Austestung der wirksamsten Konzentration der sh-RNA-Vektoren

Das Konstrukt pSuper-MOR-B, welches in den Vorversuchen von den drei getesteten Konstrukten am besten wirksam war, wurde im nächsten Schritt in unterschiedlichen Konzentrationen ausgetestet. Hierzu wurden 293-T Zellen mit einem Flag- μ OR- und einem GFP-exprimierenden AAV-basiertem Konstrukt (je 1 μ g) transfiziert, weiterhin wurde das Konstrukt pSuper-MOR-B in steigenden Mengen (0,2-0,5-1-2 μ g) kotransfiziert, in jedem Ansatz wurde auf eine Gesamt-DNA Menge von 4 μ g mit dem pSuper-Leervektor aufgefüllt. In Abb. 4.16 ist die Runterregulation der μ -Opioid-Rezeptor-Expression in Abhängigkeit von der eingesetzten sh-RNA-Vektorkonzentration dargestellt. Mit allen eingesetzten

Vektorkonzentrationen war eine etwa 90%ige Inhibition des Flag- μ OR Expressionslevels zu erreichen, dieser Effekt ließ sich durch den Einsatz zunehmender Mengen von pSuper-MOR-B konzentrationsabhängig auf etwa 98% steigern.

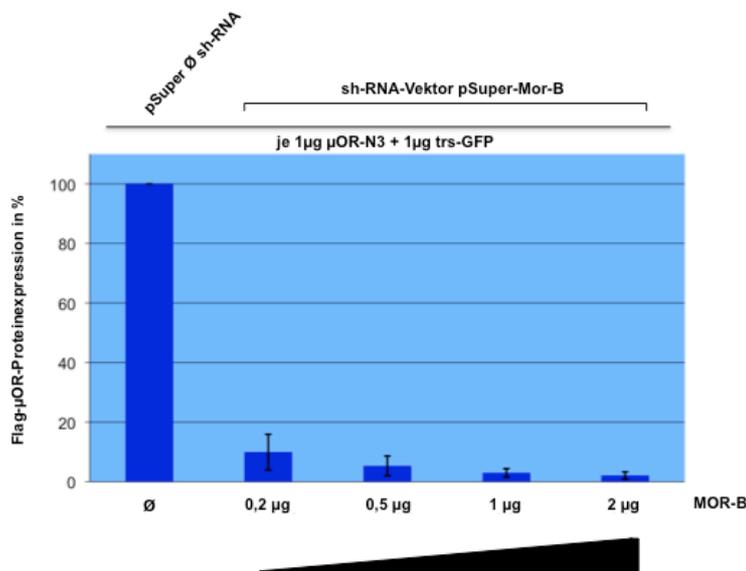


Abb. 4.16: Konzentrationsabhängige Runterregulation des Flag- μ OR Proteinlevels in 293-T Zellen

293-T Zellen wurden mit jeweils 1 μ g der Verpackungsplasmide pD- μ OR-N3 zur Expression des Flag- μ OR und pD-trs-GFP zur GFP-Expression sowie steigenden Konzentrationen (0,2-0,5-1-2 μ g) des Vektors pSuper-MOR-B mit si-RNA Expressionskassette zur Runterregulation des Flag- μ OR kotransfiziert. Die Expression eines Ansatzes ohne si-RNA (Positivkontrolle) wurde gleich 100% und die anderen Werte dazu in Relation gesetzt. Eine etwa 90%ige Abnahme der Proteinexpression des Flag-getaggten μ -OR konnte bei allen eingesetzten Konzentrationen des sh-RNA-Vektors MOR-B nachgewiesen werden. Der Inhibition ließ sich mit zunehmender sh-RNA-Vektor Konzentration auf etwa 98% steigern.

4.4.9 Inhibition der μ OR-Expression während der Generierung von rAAV-Vektoren

Um den Effekt der Inhibition des μ -OR auf die Virusverpackung zu überprüfen, wurde dem üblichen Doppelansatz für die Verpackung mit AAV-Plasmid (μ OR-N3) und Helferplasmid (pDG1) das pSuper basierte Plasmid mit si-RNA Expressionskassette (pSuper-MOR-B) zugesetzt. Nach Abzentrifugation der Zellreste wurden die infektiösen Überstände in der Light Cycler PCR analysiert und die Viruspartikelzahl bestimmt. In einem ersten Versuchsansatz wurden die drei Plasmide pDG1, μ OR-N3 und pSuper-MOR-B unterschiedlich kombiniert, so dass das Verhältnis von μ OR-N3 zu pSuper-MOR-B 1:1, 1:3 oder 3:1 betrug. Zu jeder einzelnen Kombination existierte ein Parallelansatz ohne sh-RNA, aber mit dem pSuper-Leervektor als Ausgangskontrolle. Die Gesamt-DNA Menge (4 μ g) und die Menge an pDG1 Helferplasmid (2 μ g) wurden konstant gehalten. Es konnte durch Zugabe des sh-RNA-Vektors kein positiver Effekt auf die Verpackung und die Virustiter nachgewiesen werden. Vielmehr führte die reduzierte Menge von 2 μ g an pDG1 Helferplasmid in den Ansätzen mit sh-RNA-Vektor zu geringeren Virustitern als der

Standardansatz mit 3 µg pDG1- und 1 µg AAV-Plasmid. In einem zweiten Versuch wurde die pDG1 Menge bei mindestens 2,5 µg gehalten, µOR-N3 und pSup-MOR-B wurden in den Verhältnissen 2:1, 1:1, 1:2 kotransfiziert. Wieder wurden für alle Kombinationen direkte Kontrollansätze mit einem Leervektor statt der wirksamen sh-RNA analysiert. Hier waren die Virustiter aufgrund der korrigierten pDG1 Menge auf insgesamt höherem Level, vergleichbar mit dem Standardansatz (3:1 Verhältnis von Helfer- und AAV-Plasmid). Ein zusätzlich positiver Effekt durch Zugabe der sh-RNA-Vektoren ergab sich allerdings nicht. Die transiente Runterregulation der Flag-µOR Expression während der Virusverpackung hatte keinen positiven Effekt auf die Verpackungseffizienz bei der Generierung von sc-rAAVs zur Expression des Flag-getaggen µ-Opioid-Rezeptors. Somit konnte eine störende Interaktion des überexprimierten µ-OR mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ursache für die relativ schlechte Verpackungseffizienz ausgeschlossen werden.

Bei der üblichen Verpackung (ohne sh-RNA) des selbstkomplementären rAAV-Vektor µOR-N3 lag der maximal erreichte Virustiter bei $1,2 \times 10^{10}$. Dieser ist nicht sehr hoch, könnte aber für lokale *in vivo* Anwendungen ausreichend sein. Dies ist auch vor dem Hintergrund zu sehen, dass mit diesem sc-rAAV-Vektor eine Flag-µOR Expression in Western-Blot-Analysen nach Überinfektion mit Ad2 im Vergleich zu den beiden anderen sc-rAAVs schon bei sehr niedriger MOI nachgewiesen werden konnte.

4.5 Überprüfung der Funktionalität der rAAV-µOR-Konstrukte

4.5.1 Radioaktive Bindungsstudie in einem nicht-neuronalen Zellsystem

In den bisherigen Versuchen konnte die Expression des Flag-µOR nach Transfektion aller Plasmidkonstrukte und nach rAAV-Infektion mit den einzelsträngigen Konstrukten UF5-µOR (CMV), UF11-µOR (CBA) und des selbstkomplementären rAAV-Konstruktes µOR-N3 nachgewiesen werden. Während in den Western-Blot-Analysen nur die rAAV vermittelte Genexpression von µ-OR nachgewiesen werden konnte, sollte mit Hilfe einer Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudie belegt werden, dass die Rezeptoren auch tatsächlich an der Zelloberfläche exprimiert werden und zur spezifischen Ligandenbindung führen. In einem Sättigungsexperiment wurde der µ-OR spezifische radioaktiv markierte Ligand [³H]DAMGO in steigender Konzentration eingesetzt, so dass es zu einer Absättigung der Bindungsreaktion kommen sollte. Unspezifische Bindung wurde durch den Einsatz von Naloxon, einem Antagonisten am µ-OR, bestimmt. HeLa Zellen eigneten sich als nicht-neuronale Zelllinie zur Durchführung der Bindungsstudie, da sie endogen keine µ-Opioid-Rezeptoren exprimieren.

Die im Radioaktivitätsassay gemessene Ligandenbindung ist also auf die Transgenexpression der transduzierten AAV-Konstrukte zurückzuführen, ohne Überlagerung durch endogene Expression. Eingesetzt wurden die rAAV-Vektoren, die in Western-Blot-Analysen zu einer nachweisbaren Flag- μ OR-Expression geführt hatten (rAAV-UF5- μ OR [ss], -UF11- μ OR [ss] und - μ OR-N3 [sc]). Alle Ansätze wurden zur Verstärkung der Genexpression mit Adenovirus vom Subtyp 2 (Ad2) überinfiziert, das Konstrukt UF11- μ OR wurde zusätzlich einmal ohne Ad2 Koinfektion eingesetzt, da es sich in einem Vorversuch bereits als funktionell erwiesen hatte. Für den Ansatz ohne Ad2 wurden 2×10^6 HeLa Zellen auf \varnothing 14,5cm Schalen ausgesät und 4-5 h später mit rAAV-UF11- μ OR in einer MOI von 1500 infiziert. Nach 60 h wurden dann Membranpräparationen hergestellt. Für die Ansätze mit Ad2 Überinfektion wurden $3,5 \times 10^6$ HeLa Zellen auf \varnothing 14,5cm Schalen ausgesät, mit den rAAV-Vektoren UF5- μ OR, UF11- μ OR und μ OR-N3 in einer MOI von 1000 infiziert, 15 h später wurde mit Ad2 in einer MOI von 50 überinfiziert. Weitere 24 h später wurden Membranpräparationen zur Durchführung der Bindungsexperimente hergestellt. Im Sättigungsexperiment konnte eine Absättigung der spezifischen [3 H]DAMGO Bindung an den μ -OR bei steigender Radioligandenkonzentration nachgewiesen werden (s.Abb. 4.17).

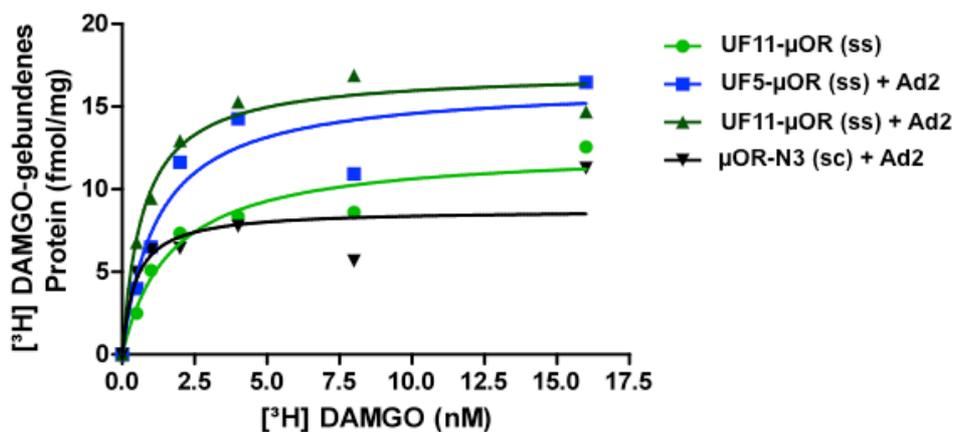


Abb. 4.17 [3 H]DAMGO spezifische Sättigungsbindung in Membranpräparationen rAAV- μ OR infizierter HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden mit den rAAV Konstrukten UF11- μ OR (CBA-Promotor), UF5- μ OR (CMV-Promotor) und μ OR-N3 (MOI ca. 1000) und Ad2 (MOI 50) koinfiziert. UF11- μ OR (1500) wurde in einem separaten Ansatz auch ohne Ad2 Überinfektion eingesetzt. Die Membranpräparationen der jeweiligen Ansätze wurden mit [3 H]DAMGO in 50mM Tris Puffer (pH 7,4) bei 37°C für 1 h inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit Naloxon (10 μ M) bestimmt. Dargestellt sind die Datenpunkte eines Experiments mit Doppelbestimmung der Messpunkte. In allen Ansätzen kommt es zu einer Bindung des μ -OR spezifischen Liganden DAMGO durch die an der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren.

Es konnte die μ -OR Expression der untersuchten Konstrukte bestätigt und erstmalig gezeigt werden, dass die μ -ORs an der Zelloberfläche exprimiert werden und ligandenbindungsfähig sind. Ferner konnten über das Sättigungsexperiment die Ligandenbindungsaffinität (K_d) und die maximale Anzahl von [3 H]DAMGO Bindestellen (B_{max}) bestimmt werden (s.Tab. 4.1).

	UF11-μOR	UF5-μOR+Ad2	UF11-μOR+Ad2	μOR-N3+Ad2
B_{max} (fmol/mg)	12,42	16,36	17,10	8,752
K_d (nM)	1,690	1,223	0,7160	0,4578

Tab. 4.1: Die maximale Anzahl von [3 H]DAMGO Bindestellen (B_{max}) und die Affinität (K_d) des Agonisten zum μ -Opioid-Rezeptor in rAAV (CBA- μ OR, CMV- μ OR+Ad2, CBA- μ OR+Ad2, μ OR-N3+Ad2) infizierten HeLa Zellen. Dargestellt sind die Datenpunkte eines Experiments mit Doppelbestimmung der Messpunkte.

Allerdings konnte eine statistische Auswertung aufgrund der zu geringen Anzahl von Experimenten nicht durchgeführt werden. Somit ist ein direkter Vergleich der Konstrukte nicht ohne weiteres möglich, da experimentelle Schwankungen nicht berücksichtigt werden können. Allerdings war im Zusammenhang mit dieser Arbeit die Quantifizierung der Rezeptorbindung ohnehin nachrangig, primär sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob die Rezeptoren bindungsaktiv sind oder nicht. Trotzdem ist zu sehen, dass DAMGO den μ -OR mit relativ hoher Affinität (K_d) bindet (s. Kap.5.4), die unterschiedlichen K_d -Werte für den gleichen Rezeptor in unterschiedlichem Vektorkontext ist vermutlich als experimentelle Variation zu erklären. Das Konstrukt UF11- μ OR zeigte eine große Anzahl exprimierter Rezeptoren im Vergleich zu den anderen Konstrukten. Dies konnte bereits in einem Vorversuch zur Radioligandenbindung gesehen werden und stimmt mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analysen überein. Auch hier war unter den einzelsträngigen Vektoren das Konstrukt UF11- μ OR (CBA-) dem Konstrukt UF5- μ OR (CMV-Promotor) überlegen. Der selbstkomplementäre Vektor μ OR-N3 zeigte in den Western-Blot-Analysen nur eine schwache Expression. Dies spiegelte sich auch im Liganden-Bindungsassay durch einen niedrigen B_{max} -Wert wider. Da aber ein Vergleich der Konstrukte in Zellkultur (gerade in den nicht-neuronalen HeLa Zellen) nicht repräsentativ für die *in vivo* Situation ist, muss letztlich die Austestung und Bewertung der einzelnen Konstrukte im Tiermodell erfolgen. Ferner ist der Vergleich eines selbstkomplementären rAAV-Vektors mit einzelsträngigen rAAV-Konstrukten aufgrund der unterschiedlichen Expressionskinetik *in vitro* mit limitiertem Zeitfenster nicht unproblematisch. Ziel der Bindungsstudie war letztendlich der Nachweis der μ OR-Expression an der Zelloberfläche und der Nachweis der Funktionalität bezüglich spezifischer Ligandenbindung für alle untersuchten Konstrukte. Dieser Nachweis war positiv.

5. DISKUSSION

5.1 Verwendung von rekombinanten adeno-assoziierten Viren als Vektorsystem für die Expression des μ -Opioid-Rezeptors

Adeno-Assoziierte Viren gehören zu den am häufigsten verwendeten viralen Vektoren in der Gentherapie. Die Vorteile gegenüber adeno- und retroviralen Vektoren sind neben der Apathogenität ihre Fähigkeit, auch ruhende, postmitotische Zellen zu infizieren. Diese Fähigkeit macht rAAVs zum hauptsächlich verwendeten Vektorsystem für Zellen des Nervensystems *in vivo*, sowohl für funktionelle Studien als auch für gentherapeutische Ansätze. Weiterhin gewährleisten AAV-basierte Vektoren eine langanhaltende Transgenexpression in den infizierten Zellen, zumeist in Form eines stabilen Episoms. Ein Nachteil von AAV-Vektoren ist neben der limitierten Verpackungskapazität von maximal 4,4 kbp für die Transgensequenzen die verzögerte Expressionskinetik. Diese liegt darin begründet, dass eine Voraussetzung für die Transgenexpression die Umwandlung des einzelsträngigen AAV-Genoms in eine transkriptionskompetente, doppelsträngige Form ist. Da die Zweitstrangsynthese von überwiegend S-Phase abhängigen zellulären Faktoren vermittelt wird, kann sie in ruhenden Zellen (z.B. Neuronen) einen Zeitraum von Tagen bis Wochen beanspruchen. Dieses Problem kann durch die Herstellung selbstkomplementärer, quasi doppelsträngiger AAV-Vektoren umgangen werden. Durch die Deletion der terminal solution site in einem der „terminal repeats“ werden dabei bevorzugt dimerische rekombinante Vektorgenome in einer "head to head" oder "tail to tail"-Konfiguration verpackt, welche nach Infektion des Vektors über den internen ITR zurückfalten und einen transkriptionskompetenten "Quasi-Doppelstrang" ausbilden können (Heilbronn & Weger, 2010).

In dieser Arbeit wurden sowohl einzelsträngige (ss) rekombinante AAV-Vektoren (rAAV) als auch ein dimerisches, selbstkomplementäres (sc) rAAV-Konstrukt generiert und ausgetestet. Das Problem der sc-rAAV-Vektoren ist allerdings die im Vergleich zu ss-rAAVs nochmals um die Hälfte reduzierte Verpackungskapazität. Im Zusammenhang mit dem in dieser Arbeit verwendeten Transgen, dem μ -Opioid-Rezeptor (μ -OR), der bereits eine Größe von etwa 1,25 kbp aufweist, ist die Verwendung sc-rAAV-Vektoren eher schwierig und auf den Einsatz zusammen mit kleinen Promotoren beschränkt. Die Expressionskassette, bestehend aus dem Promotor, dem Flag- μ OR Gen und einem Polyadenylierungssignal, durfte für die Verpackung in einen sc-rAAV-Vektor die Gesamtgröße von 2,2 kbp nicht überschreiten. Daher wurden für den ersten Teil dieser Arbeit, in welcher die Gewebespezifität von drei verschiedenen

Promotoren im Zusammenhang mit dem μ -OR untersucht werden sollte, zunächst nur ss-rAAVs hergestellt. Denn zwei der verwendeten Promotoren wiesen eine Größe von über 1,5 kbp auf, was zusammen mit dem μ -OR bereits den Verpackungsrahmen für sc-rAAV-Vektoren gesprengt hätte. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der kleinste der drei Promotoren, der Cytomegalievirus Promotor (CMV), zur Generierung eines sc-rAAV-Konstruktes eingesetzt.

5.2 Einzelsträngige (ss) rAAV-Vektoren zur gewebespezifischen Expression des μ -Opioid-Rezeptors

Rekombinante AAV-Vektoren (rAAV) sind in einigen wenigen tierexperimentellen Untersuchungen bereits zur Expression des μ -Opioid-Rezeptors (μ -OR) eingesetzt worden. Hierbei konnte durch die rekombinanten Vektoren die μ -Opioid-Rezeptordichte an peripheren Neuronen geringfügig erhöht werden und die durch Morphin erzeugte Schmerzreduktion gesteigert werden. Die bisher verwendeten Vektoren waren alle einzelsträngig und exprimierten den μ -OR ausschließlich unter der Kontrolle des Neuronen spezifischen Enolase Promotors (NSE) (Xu *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2005). Die Expression der rekombinanten μ -ORs war hierbei eher schwach und konnte ausschließlich nach direkter Injektion der Vektoren in die schmerzweiterleitenden DRGs oder in den freipräparierten Ischiasnerv nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es die durch rAAVs vermittelte Expression des μ -Opioid-Rezeptors in neuronalen Zellen zu optimieren und die Effizienz zu steigern. Hierzu sollten im ersten Abschnitt der Arbeit zunächst drei Promotoren bezüglich ihrer Aktivität in neuronalen Zellen verglichen werden. Es handelte sich dabei um den Cytomegalievirus Promotor (CMV), den Chicken β -actin Promotor (CBA) und den Neuronen spezifischen Enolase Promotor (NSE). Die Expressionskassetten der drei Konstrukte enthielten zum Einen den jeweiligen Promotor, die μ -OR DNA, die zur spezifischen Detektion mit einem aminoterminalen Flag-Tag Epitop versehen war und stromabwärts eine SimianVirus40 (SV40) Polyadenylierungsstelle. Aufgrund der Größe von 1,8 kbp sowohl des verwendeten CBA- als auch des NSE-Promotors, kam wie bereits erwähnt, nur die Verpackung in ss-rAAV-Vektoren in Frage. Zu allen drei Flag- μ OR Konstrukten existierten entsprechende Kontrollvektoren, die als Transgen das „green fluorescent protein“(GFP)-Gen enthielten. Nach der Klonierung der Plasmidkonstrukte wurde die Transgenexpression der Vektoren zunächst in nicht-neuronalen Standardzelllinien untersucht. Hierbei konnte in HeLa und 293-T Zellen nur eine Genexpression für die Konstrukte mit CMV- und CBA-Promotor nachgewiesen werden, der NSE-Promotor war in diesen Zelllinien nicht aktiv. Diese

Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen überein, die bereits eine neuronenspezifische Genexpression unter Verwendung des NSE-Promotors nachgewiesen hatten (Forss-Petter *et al.*, 1990; Sakimura *et al.*, 1995). Die Verwendung einer Hydridomzelllinie aus Hinterwurzelganglienzellen (DRG-Neuronen) der Ratte und Neuroblastomzellen der Maus führte zum Nachweis der Zelltyp-spezifischen Aktivität des NSE-Promotors. Diese sogenannte F11 Zelllinie zeigt nach induzierbarer Differenzierung ein neuronales Genexpressionsmuster (Francel *et al.*, 1987). In den differenzierten F11 Zellen konnte im Gegensatz zu undifferenzierten F11 Zellen schließlich eine Aktivität des neuronenspezifischen NSE-Promotors gezeigt werden, was die beschriebene Spezifität des NSE-Promotors für terminal differenzierte Neurone bestätigte. Ähnliche Daten, die eine Aktivitätszunahme des neuronenspezifischen Promotors in differenzierten im Vergleich zu undifferenzierten F11 Zellen zeigten, wurden von Hwang do *et al.* veröffentlicht (Hwang do *et al.*, 2008). Auch der CMV- und der CBA-Promotor waren in den differenzierten F11 Zellen aktiv, auch für diese schien die Aktivität in differenzierten im Vergleich zu undifferenzierten F11 Zellen zuzunehmen. Weiterführende Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe (Özcan Çiğdem, Diplomarbeit 2009) ließen jedoch offen, ob die höheren Expressionsraten dieser Promotoren in differenzierten F11 Zellen im Vergleich zum NSE-Promotor signifikant waren. Zusammenfassend war die Klonierung der drei rAAV-Plasmidkonstrukte erfolgreich. Ihre Funktionalität bezüglich der Expression des μ -ORs konnte gezeigt und hierbei die strenge Neuronenspezifität des NSE-Promotors und die ubiquitär starke Aktivität von CMV- und CBA-Promotor bestätigt werden.

Nach Verpackung der generierten Vektorkonstrukte in infektiöse rekombinante AAV-Virionen konnte gezeigt werden, dass diese prinzipiell in der Lage waren, nach Infektion den μ -Opioid-Rezeptor zu exprimieren. In den nicht-neuronalen Zelllinien (HeLa und 293-T) aber auch in Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) konnte jedoch nur für die rAAV-Konstrukte mit CMV- und CBA-Promotor eine Transgenexpression nachgewiesen werden (s. Abb. 4.6 B). Dieses bestätigte ein weiteres Mal, dass sich die Aktivität des NSE-Promotors auf terminal differenzierte Neurone beschränkt. Weiterhin wurde beobachtet, dass das Expressionsniveau des Flag-getaggten μ -OR verglichen mit dem des GFP-Markergens sehr niedrig war (s. Abb. 4.5). Die Expression des Flag- μ OR konnte in HeLa erst durch eine Überinfektion mit Adenovirus soweit verstärkt werden, dass die Signale in den Western-Blot-Analysen eindeutig nachweisbar wurden (s. Abb. 4.5 C vrgl. D). In SH-SY5Y konnte nach Überinfektion mit Ad2 eine CMV- und CBA-getriebene Expression des GFP-Markergens (s. Abb. 4.6 B) eindeutig nachgewiesen werden, die des Flag- μ OR hingegen nicht. Einer der Gründe für die

verminderte Expression des Flag- μ OR könnte in einer reduzierten Translationsrate liegen. Beim verwendeten EGFP handelt es sich um ein Kodon-optimiertes "humanisiertes" GFP, während der μ -OR der Original-Sequenz aus Ratten entspricht. Eine andere mögliche Erklärung für die geringen Flag- μ OR-Proteinmengen ist, dass die in Zellkultur (HeLa, SH-SY5Y) gebildeten μ OR-Proteine durch zelluläre Abbauprozesse degradiert wurden. Bekanntermaßen durchlaufen alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) nach ihrer Synthese im rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER) vielfältige posttranslationale Modifikationen und eine strenge Qualitätskontrolle bis sie für den Transport zur Plasmamembran freigegeben werden (Gurevich & Gurevich, 2008). Diese Modifikationen sind komplexer Art und umfassen bei vielen Mitgliedern der GPCR Glykosylierungen, Phosphorylierungen, Palmitoylierung und die Knüpfung von Disulfidbrücken. Wie vermutet wird, müssen diese Reaktionen für die korrekte Faltung der GPCR sehr präzise ablaufen. Das Zusammenkommen der komplexen Struktur der GPCRs und der Notwendigkeit für sehr genaue intramolekulare Interaktionen bedingen eine „langsame“ bzw. ineffiziente Faltungsrate und die Anfälligkeit für „Fehlfaltung“ der Membranproteine (Petaja-Repo *et al.*, 2001). Daten für den δ -Opioid-Rezeptor zeigten, dass manchmal ein großer Anteil des neusynthetisierten Wildtypproteins das ER nicht verlassen kann und abgebaut wird (Petaja-Repo *et al.*, 2000 & 2001). Als Ursache wurde ein ineffizienter Reifungsprozess des δ -OR und mangelnder Export aus dem ER genannt, denn nur 40 % der posttranslational unmodifizierten Vorläuferform wurden bis zum reifen Rezeptor umgewandelt. Der Rest wurde vom „Qualitätskontrollsystem“ des ER sozusagen retiniert und in Folge degradiert (Petaja-Repo *et al.*, 2001). Diese in 293-T Zellen erhobenen Daten von Petaja-Repo *et al.* bezüglich des δ -OR könnten auch zur Erklärung der in dieser Arbeit nachgewiesenen schwachen Expression des μ -OR herangezogen werden.

Hinzu kommt, dass das μ -OR Membranprotein in der Western-Analyse in dieser Arbeit vorwiegend in Form höhermolekularer Aggregate nachgewiesen wurde. Es wird angenommen, dass eine starke Aggregation von Membranproteinen fehlerhafte Modifizierungen verstärkt, so dass in Folge die Degradation durch zelluläre Abbauprozesse zunimmt. Im Zusammenhang mit anderen GPCR ist bekannt, dass denaturierende Bedingungen die Tendenz der GPCRs zur Aggregation verstärken. Die Tatsache, dass in dieser Arbeit der Zellaufschluss zur Gewinnung der Proteinextrakte, aber auch die weiteren Schritte zur Durchführung der Western-Blot-Analysen unter denaturierenden Bedingungen (Mercaptoethanol, Aufkochen bei 95°C, SDS-PAGE) durchgeführt wurden, ist neben einer bereits intrazellulär erfolgten Aggregation der Rezeptoren eine zusätzliche Erklärung für die

überwiegend hochmolekularen anti-Flag responsiven Banden, die in der Western-Analyse beobachtet wurden. Zuletzt könnte die schwache Expression dadurch bedingt sein, dass ein gewisser Anteil der μ -OR Proteine durch das heterologe Expressionssystem (HeLa) in das Medium sekretiert wurde, statt an die Zellmembran transportiert und an der Oberfläche exprimiert zu werden. Die Frage, ob Flag- μ OR ins Medium sekretiert wurde, könnte durch einen Nachweis der Proteine im Medium (z.B. durch ELISA) beantwortet werden. Mit Hilfe des ELISA-Nachweisverfahren können Proteine sensitiver als bei der Western-Blot-Analyse detektiert werden.

Eine Möglichkeit, die Expressionsrate und die Expressionskinetik von einzelsträngigen rAAV-Vektoren *in vitro* zu verbessern, besteht in der Überinfektion mit Adenovirus. Auf Grund des sehr niedrigen Expressionsniveaus von μ -OR, auch unter der Kontrolle von bekanntermaßen starken konstitutiv aktiven Promotoren, wurden entsprechende Versuche auch für die hier entwickelten einzelsträngigen μ OR-Vektoren durchgeführt. Der Adenovirus-induzierten Steigerung der Genexpression von rAAV-Monomer-Vektoren liegen zwei wesentliche molekulare Mechanismen zugrunde. Dies ist zum Einen die Induktion der Zweitstrangsynthese der einzelsträngig vorliegenden rAAVs (Ferrari *et al.*, 1996), die über den Offenen Leserahmen 6 der adenoviralen E4 Region vermittelt wird, und zum Anderen die Transaktivierung der viralen und zellulären Promotoren (Flint & Shenk, 1997) durch die E1A Funktion des Adenovirus. Für die hier verwendeten Vektoren wurde beobachtet, dass die Expression der CMV-getriebenen Konstrukte durch die Überinfektion mit Adenovirus wesentlich stärker induziert wurde als die der CBA-getriebenen Konstrukte (s. Abb. 4.4 B; s. Abb. 4.9 B und C). Dieses unterschiedlich starke Ausmaß der Transaktivierung für verschiedene Promotoren im gleichen Vektor-Kontext deutet darauf hin, dass der Effekt hauptsächlich durch Promotor aktivierende Eigenschaften von Ad2 und nur in untergeordnetem Ausmaß durch die Induktion der Zweitstrangsynthese bedingt war. Des Weiteren zeigte sich, dass der NSE-Promotor überhaupt nicht von Ad2 transaktiviert wurde, vielmehr kann von einem repressiven Effekt auf die Aktivität des neuronenspezifischen Promotors ausgegangen werden (vgl. Abb. 4.9 B und C). Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass das adenovirale E1A Protein mit zahlreichen Schlüsselproteinen, die die Genexpression und das Zellwachstum regulieren, interagiert. Hierbei bindet es an Komponenten der Transkriptionsmaschinerie, wie dem „TATA-binding protein“ (TBP) und verschiedenen TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) sowie vielen weiteren Transkriptionsfaktoren (Frisch & Mymryk, 2002). Die Wirkung ist meist eine Steigerung der transkriptionellen Aktivität und eine Förderung des Zellwachstums. Dem NSE-Promotor fehlt

im Vergleich zu CMV- und CBA-Promotor eine typische TATA-Box, was die indirekte Wechselwirkung des E1A Proteins über das TBP und TAFs eher ausschließt und vermutlich die fehlende Transaktivierung erklärt (s. Abb. 4.4). Gleichzeitig verfügt E1A aber auch über transreprimierende Domänen. Über die Bindung transkriptioneller Co-Aktivatoren wie p300 oder dem cAMP response element-binding protein (CREB) Bindungsprotein (CBP), kann es negativ auf die transkriptionelle Aktivität einiger Promotoren wirken (Green *et al.*, 2008; Pelka *et al.*, 2009). Ein solcher Mechanismus ist im Zusammenhang mit dem NSE-Promotor, in welchem Sequenzmotive für das CREB vorkommen, durchaus denkbar. Weiterhin kann E1A die zelluläre Differenzierung blockieren, wie dies im Zusammenhang mit der neuronalen Differenzierung von PC12 Zellen bereits beschrieben wurde (Boulukos & Ziff, 1993; Kalman *et al.*, 1993). Daher könnte die verminderte Expressionrate des NSE-getriebenen rAAV-Vektors auch durch eine mögliche Hemmung der Differenzierung der F11 Zellen erklärt werden (vgl. Abb. 4.9 B und C).

Im Zusammenhang mit den F11 Zellen konnte zunächst gezeigt werden, dass diese prinzipiell durch rAAV vom Subtyp 2 infizierbar sind, wie dies die Untersuchungen mit den GFP-Markergenkonstrukten belegen. Hierbei wurden sowohl undifferenzierte als auch differenzierte F11 Zellen eingesetzt. In beiden Fällen konnten mittels mikroskopischer Fluoreszenzanalyse infizierte Zellen für alle drei Konstrukte (mit CMV-, CBA- und NSE-Promotor) nachgewiesen werden (s. Abb. 4.9 A), allerdings auf einem sehr schwachen Expressionsniveau. Dies galt insbesondere für die Konstrukte mit CMV- und NSE-Promotor. Der CBA-Promotor eignete sich noch am ehesten für die Infektion der neuronalen F11 Zelllinie, sowohl im differenzierten als auch im undifferenzierten Zustand. Eine Überinfektion mit Ad2 führte, wie bereits erwähnt, ausschließlich für die Konstrukte mit CMV- und eingeschränkt für die mit CBA-Promotor zu einer Steigerung der Expression.

Nachdem die Vorversuche mit dem GFP-Markergen ein sehr schwaches Expressionsniveau in den F11 Zellen im Vergleich zu HeLa Zellen gezeigt hatten, musste davon ausgegangen werden, dass die Expression des Flag- μ OR nach Infektion der F11 Zellen mit den entsprechenden rAAV-Vektoren im Bereich des Detektionslimits lag. Dies vor allem vor dem Hintergrund, dass sich in den Versuchen mit HeLa Zellen bereits große Differenzen in der Nachweisbarkeit von GFP- und Flag- μ OR zugunsten der GFP-Expression gezeigt hatten.

Die Flag- μ OR Expression der rAAV-Konstrukte mit CMV- und CBA-Promotor war bereits in HeLa Zellen detektiert worden, in F11 Zellen sollte vor allem der neuronenspezifische NSE-Promotor ausgetestet werden, was sich aufgrund der sehr schwachen Expression als nicht möglich erwies. Zumal für diesen auch eine Ad2-Überinfektion aufgrund fehlender

Transaktivierung nicht zur Verstärkung der Expressionssignals genutzt werden konnte. Zusammenfassend kann zwar aufgrund der Transfektionsdaten (s.Abb. 4.8 C+D) mit großer Sicherheit von einer NSE-getriebenen Flag- μ OR Expression auch nach rAAV-Infektion ausgegangen werden. Der Nachweis muss jedoch nach neuronaler Infektion *in vivo* erbracht werden. Aus den genannten Gründen wird der NSE-Promotor in Zellkultur wenig angewendet, ist aber der für eine rAAV vermittelte Expression im Gehirn am besten untersuchte neuronale Promotor. Neben hohen Expressionsraten im Gehirn wurde auch eine effektive Infektion von Neuronen im Rückenmark nachgewiesen. Weiterhin erwies sich der NSE-Promotor bezüglich der *in vivo* Langzeitexpression und der Expressionsstärke im Gehirn dem CMV-Promotor deutlich überlegen (Klein *et al.*, 1998; Fitzsimons *et al.*, 2002). Daher sollte die funktionelle Analyse *in vivo* durchgeführt werden, wobei davon auszugehen ist, dass die hier hergestellte Expressionkassette unter Kontrolle des NSE-Promotors zur Expression von Flag- μ OR in entsprechenden neuronalen Zielzellen, wie den sensorischen DRG-Neuronen führen sollte. Der Vorteil der Verwendung des NSE-Promotors *in vivo* besteht vor allem in einer sehr selektiven Infektion von Neuronen, wie es in dieser Arbeit auch *in vitro* bestätigt werden konnte. Bezüglich des CBA-Promotors zeigte sich in den hier durchgeführten Zellkulturversuchen eine ubiquitäre, aber in neuronalen Zellen (SH-SY5Y und differenzierten/undifferenzierten F11 Zellen) dennoch starke Aktivität des Promotors. Aus früheren Untersuchungen ist bereits eine lang anhaltende und starke Transgenexpression unter der Kontrolle des CBA-Promotors in neuronalem Gewebe bekannt (Fitzsimons *et al.*, 2002). Für das CBA-Promotor getriebene rAAV-Konstrukt ist bei einem Einsatz zur Infektion sensorischer Neuronen im Tiermodell von einer starken Expression des μ -OR auszugehen. Der CMV-Promotor wurde bisher in vielen Gentherapievektoren verwendet. Dieser ist aufgrund seiner geringen Größe (700bp) und der starken Expression auch für die Kontrolle der Flag- μ OR-Expression geeignet. Jedoch wurde zum Einen in dieser Arbeit eine im Vergleich zum CBA-Promotor schwächere Aktivität in den verwendeten neuronalen Zellen beobachtet. Zweitens zeigte sich in einigen Langzeitexperimenten, in denen die CMV-Promotor getriebene Genexpression im Gehirn untersucht wurde, eine Abnahme der Expressionsraten bereits nach wenigen Wochen (Fitzsimons *et al.*, 2002). Als eine Ursache der Promotor-Abschaltung wird die DNA-Methylierung diskutiert, wie sie in anderen Geweben (z.B. Auge & Leber) für den CMV-Promotor bereits nachgewiesen wurde (Byrne *et al.*, 2006). Ob dies auch für die Infektion von neuronalen Rückenmarkszellen gilt, müssen künftige Untersuchungen zeigen. Unter Verwendung eines doppelsträngigen rAAV-Vektors mit Kapsid des Serotypen 8 konnte in DRG-Neuronen des Rückenmarks eine über 3 Monate

anhaltende Expression eines Opioidvorläuferproteins unter CMV-Promotor Kontrolle detektiert werden (Storek *et al.*, 2008). Durch die Verwendung ausgewählter AAV-Kapside (z.B. vom Subtyp 8 oder 1) könnte mit allen hier hergestellten Expressionskassetten eine gezielte und selektive Infektion neuronaler Zielzellen gewährleistet werden.

5.3 Expression des μ -Opioid-Rezeptors durch einen doppelsträngigen, selbstkomplementären (sc) rAAV-Vektor

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein selbstkomplementärer (sc) rAAV-Vektor zur Expression des Flag- μ OR generiert, wodurch das Problem der verzögerten Expressionskinetik der einzelsträngigen (ss) Vektoren umgangen werden sollte. Verschiedene Veröffentlichungen der letzten Jahre hatten zudem gezeigt, dass mit sc-rAAVs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein insgesamt höheres maximales Expressionsniveau erreicht werden kann als mit ss-rAAV-Vektoren (McCarty *et al.*, 2001 and 2003; Wang *et al.*, 2003).

Diese vorteilhaften Eigenschaften von sc-rAAVs sollten für die Expression des Flag- μ OR genutzt werden. Im Kontext der Schmerztherapie wurde von Storek *et al.* gezeigt, dass die effektive und vor allem selektive Infektion von DRG-Neuronen mit einem sc-rAAV-Vektor gut funktioniert (Storek *et al.*, 2008). Durch die Verwendung eines AAV-8 Kapsides und die Verpackung in sc-rAAV-Vektoren konnte die Transgenexpressionsrate optimiert und die Zielzellen hochselektiv infiziert werden. Weiterhin konnte unter Verwendung eines CMV-Promotors eine anhaltende Transgenexpression über den untersuchten Zeitraum von 3 Monaten nachgewiesen werden. Während Storek *et al.* ein Opioidvorläuferprotein als Transgen eingesetzt hatten, wurde bis heute von keinem sc-rAAV-Vektor zur Expression eines Opioid-Rezeptors berichtet. Ein solcher doppelsträngiger rAAV-Vektor zur Expression des μ -OR sollte im Rahmen der Arbeit hergestellt werden mit der Option, diesen durch die Verpackung in AAV-8 Serotyp-Vektoren für die selektive Infektion von DRG-Neuronen zu optimieren.

Wie im Ergebnisteil beschrieben, wurden insgesamt drei Plasmidkonstrukte mit Flag- μ OR-Expressionskassette unter Kontrolle des CMV-Promotors und einer Deletion in der terminal resolution site des linken ITRs zur Verpackung sc-AAVs, generiert. Bei der Verpackung dieser Konstrukte im rAAV-Kontext wurden allerdings in mehreren Ansätzen nur physikalische Vektortiter erreicht, die mehrere 10-log Stufen unter den mit anderen selbstkomplementären Vektorkonstrukten erreichbaren Titern lagen. Vermutlich dadurch bedingt, gelang auch der Nachweis der Expression von Flag- μ OR nach Infektion der sc-rAAV-Vektoren nicht. Erst nach Nutzung einer Ad2-Überinfektion als Tool zur Stimulation

des CMV-Promotors konnte für eines der drei sc-rAAV-Konstrukte, und zwar rAAV- μ OR-N3, die Transgenexpression auf sehr schwachem Niveau nachgewiesen werden. Nach Ausschluß einiger technischer Ursachen als mögliche Erklärung für die niedrigen Virustiter bei der Generierung der sc-rAAV-Vektoren (s. 4.3.1; 4.3.2), wurde schließlich die Inhibition eines oder mehrerer Teilschritte der Produktion von rekombinanten AAV-Virionen durch eine übermäßige Expression des μ -Opioid-Rezeptors in Betracht gezogen. Da der CMV-Promotor auch in den zur Verpackung eingesetzten 293-T Zellen eine starke Aktivität aufweist, werden während der Amplifikation und Verpackung des Vektorkonstruktes große Mengen an μ -OR produziert. Mögliche Ursachen für einen inhibitorischen Effekt wären beispielsweise Interferenzen des μ -OR mit den Rep- oder den Kapsidproteinen oder den adenoviralen Helferfunktionen. Die Inhibition der Produktion rekombinater AAVs durch das während der Virusproduktion exprimierte Transgen war in unserer AG mit einem anderen Transmembranrezeptorprotein bereits beobachtet worden (Alexander Plauth, persönliche Mitteilung; Anne Müller, Diplomarbeit). Es handelte sich hierbei um die γ 2-Untereinheit des GABA-A Rezeptors, dessen Expression ebenfalls unter der Kontrolle des CMV-Promotors stand. Das entsprechende AAV-Vektorplasmid konnte anfangs nach Kotransfektion mit dem Helferplasmid überhaupt nicht verpackt werden. Da die γ 2 Transmembran-Untereinheit (UE) als GFP-Fusionsprotein vorlag, konnte durch Nutzung des Mechanismus der RNA Interferenz mittels vorgetesteter, effizienter GFP-reprimierender sh-RNA-Vektoren die Expression der GABA-A γ 2-UE im Fusionsprotein während der Verpackung selektiv inhibiert werden und die Verpackung der Rezeptor-Untereinheit mit ausreichend hohen Titern erreicht werden.

Ein ähnlicher inhibitorischer Effekt auf die Vektorproduktion wurde im Zusammenhang mit der Verpackung der Flag- μ OR-Konstrukte in die doppelsträngigen, selbstkomplementären rAAV-Vektoren postuliert. Dieser scheint allerdings erst bei höheren Expressionsraten des Rezeptors wirksam zu werden. Dies ist daran zu erkennen, dass die einzelsträngigen Vektoren erfolgreich verpackt werden konnten, während die Verpackung der selbstkomplementären rAAVs wiederholt zu sehr niedrigen Titern an rekombinanten Viren führte. Zwei weitere Befunde erhärteten diese Vermutung: Zum Einen, dass in einem Parallelansatz die Verpackungsplasmide für die sc-rAAVs im Vergleich zu den Plasmiden für die ss-rAAVs eine höhere Transgenexpression zeigten, weshalb auch von einem höheren Expressionsniveau während der Verpackung ausgegangen werden kann. Zweitens war im Rahmen der Virusproduktion der ss-rAAV- μ OR-Vektoren aufgefallen, dass der Virustiter für das rAAV-NSE-Konstrukt am höchsten, für das rAAV-CMV-Konstrukt am niedrigsten, gewesen war.

Die Verpackung des dritten Konstruktes mit dem CBA-Promotor lieferte Werte, die zwischen denen mit NSE- und CMV-Promotor lagen, entsprechend der relativen Aktivitäten der drei Promotoren in 293-T Zellen. Auch dies deutete auf eine umgekehrte Korrelation zwischen Transgenexpression während der Verpackung und den zu erzielenden Virustitern hin. Diese Beobachtungen stützten die Annahme, dass eine starke Expression des μ -OR einen effektiven Verpackungsablauf stören könnte. Da also eine Interferenz des μ -OR mit Verpackungsproteinen oder Helferfunktionen angenommen wurde, stellte sich die Frage, ob eine transiente Runterregulation des Rezeptors während der Vektorgenerierung einen positiven Effekt auf die Verpackungseffizienz haben könnte. Daher wurden sh-RNA-Vektoren zur transienten Runterregulation der Flag- μ OR-Expression hergestellt. Nach der Austestung und dem Nachweis der Funktionalität der sh-RNAs bezüglich effektiver Inhibition der Expression des μ -OR in Transfektionsversuchen in der Verpackungszelllinie 293-T (s. Abb. 4.16), wurden diese dem Doppel-Transfektionsansatz für die Verpackung von AAVs zugefügt. In mehreren Ansätzen zeigte sich hierbei jedoch kein positiver Effekt der Inhibition der μ OR-Expression auf den zu erzielenden Virustiter. Eine störende Interaktion des überexprimierten μ -OR konnte also mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ursache für die schlechte Verpackungseffizienz ausgeschlossen werden.

Für das sc-rAAV-Konstrukt μ OR-N3 (mit insgesamt 2 kbp an Transgensequenzen) konnte bei der üblichen Verpackung immerhin ein Virustiter in Höhe von $1,2 \times 10^{10}$ Gp/c erreicht werden. Dieser ist nicht sehr hoch, sollte aber für lokale *in vivo* Anwendungen ausreichend sein. Dies ist auch vor dem Hintergrund zu sehen, dass mit diesem sc-rAAV-Vektor eine Flag- μ OR Expression in Western-Blot-Analysen nach Überinfektion mit Ad2 im Vergleich zu den beiden anderen sc-rAAVs schon bei einer sehr niedrigen MOI von 150 nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 4.12).

5.4 Funktionelle Testung der rAAV-Vektoren zur Expression des μ -Opioid-Rezeptors

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rAAV-Vektoren wurden zuletzt in einer Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudie hinsichtlich der Fähigkeit einen μ -OR spezifischen Liganden zu binden, überprüft. Dieses setzt die korrekte Konformation und Expression der Rezeptoren an der Zelloberfläche voraus. Bei der Auswahl der Zellen für die Durchführung der Bindungsstudie wurde abgewogen, ob die neuronalen F11 Zellen eingesetzt werden sollten oder nicht-neuronale HeLa Zellen. In den neuronalen Zellen hätte das vom neuronenspezifischen NSE-Promotor getriebene Konstrukt prinzipiell auch getestet werden

können. Der Nachteil der F11 Zellen ist allerdings der relativ hohe Spiegel an endogener μ -OR Expression (Fan *et al.*, 1992), welche die Expression des rekombinanten Rezeptors vermutlich weitgehend überlagert und maskiert hätte. Ferner hätten die F11 Zellen, um eine NSE-Promotor Aktivität nachzuweisen, differenziert werden müssen (s.Abb. 4.8). Die Induktion der Differenzierung über mindestens 72 h und eine anschließende Infektion über 48-72 h, hätten die Zellen vermutlich soweit geschädigt, dass sie für die Bindungsstudie nicht mehr geeignet wären. Zudem konnte im Zusammenhang mit dem NSE-Promotor keine Transaktivierung, also keine Verstärkung der Genexpression, durch Überinfektion mit Adenovirus erwartet werden. Daher war mit einer zu schwachen Flag- μ OR Expression des rAAV-Konstruktes mit NSE-Promotor zu rechnen, um in der Bindungsstudie die spezifische Ligandenbindung problemlos nachzuweisen. Aus diesen Gründen wurde letztlich auf den Einsatz von rAAV-NSE- μ OR verzichtet und auf HeLa Zellen zurückgegriffen. In diesen konnten die zwei ss-rAAV-Vektoren mit CMV- und CBA-Promotor, aber auch das sc-rAAV-Konstrukt μ OR-N3 mit CMV-Promotor überprüft werden. Eine Ad2-Überinfektion konnte zur Expressionssteigerung eingesetzt werden. Ferner war keine Überlagerung durch eine endogene Expression des μ -OR zu erwarten. In dem Sättigungsexperiment mit dem μ -OR spezifischen Liganden [3 H]DAMGO konnte die μ -OR Expression der untersuchten Konstrukte bestätigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die μ -Opioid-Rezeptoren an der Zelloberfläche exprimiert werden und auf Ebene der Ligandenbindung funktionell sind. Bemerkenswert war, dass die Affinität, mit der der Ligand DAMGO die rekombinanten μ -Rezeptoren gebunden hat, recht hoch war. Die Dissoziationskonstante K_d ist ein Maß für die Bindungsaffinität des Liganden zum Rezeptor (umgekehrte Korrelation). Sie lag im Bereich zwischen 0,46 und 1,69 nM für die rekombinanten μ -OR der drei untersuchten Konstrukte (s.Tab. 4.1). Dieser K_d -Wert für μ -OR ist einzuordnen zwischen der für DRG-Neuronen *in vivo* bestimmten K_d von 0,2nM (Mohammed Shaqura, Doktorarbeit 2004) und der für die Hydridomzelllinie F11 *in vitro* bestimmten K_d von 4,5 nM (Fan *et al.*, 1992). Bezüglich der im Sättigungsexperiment bestimmten maximalen Rezeptoranzahl (B_{max}) wurde für UF11- μ OR verglichen mit den anderen Konstrukten der höchste Wert bestimmt. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analysen, wo für dieses Konstrukt die stärkste μ -OR Expression nachgewiesen werden konnte.

Eine statistische Auswertung wurde aufgrund der zu geringen Anzahl von Experimenten nicht durchgeführt. Somit ist ein direkter Vergleich der Konstrukte aber nicht ohne weiteres möglich, da experimentelle Schwankungen nicht berücksichtigt werden können.

Einen limitierenden Faktor für weitere Untersuchungen stellte die Virusproduktion dar. Zur Durchführung eines Sättigungsexperimentes müssen relativ große Proteinmengen zur Verfügung stehen. Daher muss, gerade bei geringen Titern der Viruspräparation, viel Virus für die Infektion großer Zellkulturschalen (\varnothing 14,5cm) eingesetzt werden. Nachdem die Funktionalität des exprimierten μ -OR bereits in den initialen Versuchen nachgewiesen werden konnte, war es daher nicht sinnvoll die aufwendig hergestellten, hochaufgereinigten rAAV-Präparationen für weitere *in vitro* Versuche zu verwenden. Gerade im Hinblick darauf, dass ein quantitativer Vergleich in Zellkultur (gerade in den nicht-neuronalen HeLa Zellen) die *in vivo* Situation nicht sicher vorhersagen kann, in welcher die rAAVs zur Infektion neuronaler DRG-Neuronen eingesetzt werden sollen. Ferner ist der Vergleich von sc- und ss-Vektoren aufgrund der unterschiedlichen Expressionskinetik *in vitro* in einem limitiertem Zeitfenster nicht möglich. Letztlich muss die Austestung und Bewertung der einzelnen Konstrukte im Tiermodell erfolgen. In den Western-Blot-Analysen und den Ligandenbindungsstudien wurden die Konstrukte hinsichtlich der Fähigkeit den μ -OR zu exprimieren und einen spezifischen Liganden zu binden, untersucht. Die Ergebnisse bestätigten hierbei grundsätzlich die Funktionalität des Rezeptors. Gründe für die relativ schwache μ -OR Expression an der Zelloberfläche sind hierbei vermutlich zum Einen die geringen Infektionsmultiplizitäten (MOI) von ca. 1000, die für die Bindungsstudien eingesetzt wurden. In einem viralen Expressionssystem wird das Expressionsniveau zum größten Teil von der MOI beeinflusst. Mit höherer MOI hätte die maximale Anzahl von Rezeptoren (DAMGO-Bindestellen) sicherlich gesteigert werden können. Dabei stellt allerdings die Virusproduktion einen limitierenden Faktor dar, gerade weil für die Durchführung eines Sättigungsexperimentes große Virusmengen eingesetzt werden müssen. Ein weiterer Grund für die schwache Ligandenbindung könnte ein ineffizienter Membrantransport des rekombinanten μ -OR sein. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass nicht alle produzierten Rezeptoren korrekt gefaltet worden sind, was die Voraussetzung für den Transport an die Zellmembran darstellt. Ferner könnte es zu einer Überbelastung des intrazellulären Transportweges zur Plasmamembran durch die Überproduktion des rekombinanten Rezeptors gekommen sein. Eine intrazelluläre Retention oder verstärkte Degradation des rekombinanten Proteins könnte allerdings auf Besonderheiten der nicht-neuronalen Wirtszelllinie HeLa zurückzuführen sein, mit denen in neuronalen Zielzellen *in vivo* nicht zu rechnen wäre.

5.5 Ausblick

Alle hergestellten Verpackungsplasmide, sowohl zur Generierung einzelsträngiger als auch doppelsträngiger, selbstkomplementärer rAAV-Vektoren exprimierten den μ -OR nach Transfektion. Es folgte die Verpackung in AAV-2 Kapside, wobei Viruskonzentrationen von 1×10^{10} bis zu 1×10^{12} Genomischen Partikeln pro ml erreicht wurden. Die Infektion von HeLa Zellen mit den rekombinanten Vektoren führte zum Nachweis der Transgenexpression und der Ligandenbindungsfähigkeit der rekombinanten Rezeptoren (außer für das NSE-Promotor getriebene Konstrukt aufgrund eines zu schwachen Expressionslevels).

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rAAVs unterscheiden sich von bisher in anderen Arbeitsgruppen untersuchten Vektoren zur Expression des μ -OR zum Einen durch die Verwendung alternativer Promotoren im Kontext einzelsträngiger AAVs. Zum Anderen wurde hier ein selbstkomplementärer rAAV-Vektor für die μ -OR Expression hergestellt, der sich gegenüber den einzelsträngigen Vektoren durch eine schneller einsetzende und insgesamt höhere Transgenexpression *in vivo* auszeichnen sollte. Alle hergestellten Konstrukte stehen einer funktionellen Untersuchung im Tiermodell zur Verfügung. Hierbei sollen die Vektoren zur möglichst selektiven Infektion der Ganglien schmerzweiterleitender Hinterwurzelneurone (dorsal root ganglions = DRGs) eingesetzt werden. In den DRGs findet die körpereigene Synthese von Opioid-Rezeptoren statt mit anschließendem Transport an die Nervenperipherie, wo sie exprimiert werden (s.Abb. 1.6). Nach Bindung endogener oder exogener Agonisten entsteht letztendlich die schmerzhemmende Wirkung.

Exogene Opioide, wie das Morphin, die sehr häufig, vor allem zur Bekämpfung starker bis sehr starker Schmerzzustände eingesetzt werden, entfalten ihre Wirkung über den μ -OR. Die bei längerfristiger Anwendung exogener Opioide auftretenden, erheblichen zentralen Nebenwirkungen im Rahmen der Behandlung chronischer Schmerzzustände limitieren jedoch häufig den notwendigen Einsatz. Das langfristige Ziel der Arbeit ist es also eine verstärkte Opioidanalgesie bei verringerter exogen zugeführter Opioiddosis zu erreichen. Hierzu soll die μ -Opioid-Rezeptordichte an den peripheren Nervenendigungen durch die rekombinanten Vektoren erhöht werden und zu einer gesteigerten, durch Morphin erzeugten Schmerzreduktion führen. Dieser verstärkte Effekt des Morphins oder anderer exogener Opioide beruht auf einer lokalen Wirkungssteigerung und kann unter Umgehung zentral bedingter Nebenwirkung genutzt werden.

Die „Applikation“ der rekombinanten Viren kann hierbei über verschiedene Zugangswege erreicht werden. Es bietet sich einmal die direkte Injektion in DRGs oder in den Ischiasnerv

mit retrogradem Transport über die afferenten Nervenfasern an. Bei beiden Verfahren müssen die DRGs bzw. der Ischiasnerv zunächst chirurgisch freigelegt werden. Beide Verfahren führen zu vergleichbaren Infektionsraten in den DRGs (Wu *et al.*, 2003). Ein möglicherweise einfacher durchzuführendes Verfahren wurde von Storek *et al.* beschrieben. Die Injektion der rekombinanten Viren in den Intrathekalraum durch Katheterisierung des Liquorraumes über eine Lumbalpunktion wird hier als ein standardisierbares Verfahren beschrieben, was ebenfalls zu einer effektiven Infektion von DRGs führt (Storek *et al.*, 2008). Die Verpackung der hergestellten Konstrukte in AAV-8 Kapside könnte hierbei zur Steigerung der Selektivität und Effektivität der DRG-Infektion genutzt werden (Storek *et al.*, 2008). Die Transgenexpression kann durch immunohistochemische Methoden und der Effekt der gesteigerten μ -Opioid-Rezeptordichte schließlich durch Verhaltensuntersuchungen zur Schmerzmessung (wie Hargreaves- oder Randall-Sellito-Methode) überprüft werden. Hierbei kann die Wirksamkeit von Morphin vor und nach Injektion desselben im Vergleich zu gentherapeutisch unbehandelten Versuchstieren überprüft werden.

Im Hinblick auf die Schmerztherapie könnten von diesem gentherapeutischen Ansatz in Zukunft vor allem Patienten profitieren, die z.B. aufgrund einer malignen Tumorerkrankung unter chronischen Schmerzzuständen leiden. Die Applikation der rAAVs könnte zu einer verstärkten Opioidanalgesie unter Umgehung zentraler Nebenwirkungen führen und eine dauerhafte und ausreichend starke Schmerztherapie gewährleisten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Akins PT, McCleskey EW. 1993. Characterization of potassium currents in adult rat sensory neurons and modulation by opioids and cyclic AMP. *Neuroscience* 56(3):759-69.
- Atchinson RW, Casto BC, Hammon WMCD. 1965. Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 194:754-756.
- Berns KI, Linden RM. 1995. The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* 17(3):237-45.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409(6818):363-6.
- Beutler AS, Reinhardt M. 2009. AAV for pain: steps towards clinical translation. *Gene Ther* 16(4):461-9.
- Beutler AS, Banck MS, Walsh CE, Milligan ED. 2005. Intrathecal gene transfer by adeno-associated virus for pain. *Curr Opin Mol Ther* 7(5):431-9.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38(11 Pt 1):3751-7.
- Blacklow NR, Hoggan MD, Rowe WP. 1968. Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *J Natl Cancer Inst* 40(2):319-27.
- Boulukos KE, Ziff EB. 1993. Adenovirus 5 E1A proteins disrupt the neuronal phenotype and growth factor responsiveness of PC12 cells by a conserved region 1-dependent mechanism. *Oncogene* 8(2):237-48.
- Brister JR, Muzyczka N. 1999. Rep-mediated nicking of the adeno-associated virus origin requires two biochemical activities, DNA helicase activity and transesterification. *J Virol* 73(11):9325-36.
- Broekman ML, Comer LA, Hyman BT, Sena-Esteves M. 2006. Adeno-associated virus vectors serotyped with AAV8 capsid are more efficient than AAV-1 or -2 serotypes for widespread gene delivery to the neonatal mouse brain. *Neuroscience* 138(2):501-10.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296(5567):550-3.
- Buller RM, Janik JE, Sebring ED, Rose JA. 1981. Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* 40(1):241-7.
- Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, Peden CS, Williams P, Zolotukhin S, Reier PJ, Mandel RJ, Muzyczka N. 2004. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism

- after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther* 10(2):302-17.
- Byrne B. J., Boye S. L., Hauswirth W. W.; (2006); Double-stranded/self-complementary Vectors with a truncated CBA Promotor and Methods of Gene Delivery; *World Intellectual Property Organization*; WO/2007/127428
- Carter BJ, Antoni BA, Klessig DF. 1992. Adenovirus containing a deletion of the early region 2A gene allows growth of adeno-associated virus with decreased efficiency. *Virology* 191(1):473-6.
- Chang LS, Shi Y, Shenk T. 1989. Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J Virol* 63(8):3479-88.
- Chaturvedi K, Christoffers KH, Singh K, Howells RD. 2000. Structure and regulation of opioid receptors. *Biopolymers* 55(4):334-46.
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L. 1993. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44(1):8-12.
- Christoffers KH, Li H, Keenan SM, Howells RD. 2003. Purification and mass spectrometric analysis of the mu opioid receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 118(1-2):119-31.
- Chung S, Andersson T, Sonntag KC, Bjorklund L, Isacson O, Kim KS. 2002. Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 20(2):139-45.
- Çiğdem Ö. 2009. Entwicklung von dimerischen (selbstkomplementären) AAV (Adeno-assoziiertes Virus) Vektoren für die gewebespezifische Expression von small-hairpin-(sh) RNAs im Kontext von zellulären micro-(mi) RNAs (Diploma thesis). Berlin Charité Universitätsmedizin.
- Duncan JS. 1999. Positron emission tomography receptor studies. *Adv Neurol* 79:893-9.
- Fan SF, Shen KF, Scheideler MA, Crain SM. 1992. F11 neuroblastoma x DRG neuron hybrid cells express inhibitory mu- and delta-opioid receptors which increase voltage-dependent K⁺ currents upon activation. *Brain Res* 590(1-2):329-33.
- Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ. 1996. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 70(5):3227-34.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806-11.
- Fisher KJ, Gao GP, Weitzman MD, DeMatteo R, Burda JF, Wilson JM. 1996. Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J Virol* 70(1):520-32.

- Fitzsimons HL, Bland RJ, During MJ. 2002. Promoters and regulatory elements that improve adeno-associated virus transgene expression in the brain. *Methods* 28(2):227-36.
- Flint J, Shenk T. 1997. Viral transactivating proteins. *Annu Rev Genet* 31:177-212.
- Forss-Petter S, Danielson PE, Catsicas S, Battenberg E, Price J, Nerenberg M, Sutcliffe JG. 1990. Transgenic mice expressing beta-galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control. *Neuron* 5(2):187-97.
- Foust KD, Poirier A, Pacak CA, Mandel RJ, Flotte TR. 2008. Neonatal intraperitoneal or intravenous injections of recombinant adeno-associated virus type 8 transduce dorsal root ganglia and lower motor neurons. *Hum Gene Ther* 19(1):61-70.
- Francel PC, Harris K, Smith M, Fishman MC, Dawson G, Miller RJ. 1987. Neurochemical characteristics of a novel dorsal root ganglion X neuroblastoma hybrid cell line, F-11. *J Neurochem* 48(5):1624-31.
- Frisch SM, Mymryk JS. 2002. Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(6):441-52.
- Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. 2002. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18):11854-9.
- George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF. 2000. Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem* 275(34):26128-35.
- Ghil SH, Kim BJ, Lee YD, Suh-Kim H. 2000. Neurite outgrowth induced by cyclic AMP can be modulated by the alpha subunit of Go. *J Neurochem* 74(1):151-8.
- Goncalves MA. 2005. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology* 2:43.
- Green M, Panesar NK, Loewenstein PM. 2008. The transcription-repression domain of the adenovirus E1A oncoprotein targets p300 at the promoter. *Oncogene* 27(32):4446-55.
- Grimm D. 2002. Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes. *Methods* 28(2):146-57
- Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA. 1998. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* 9(18):2745-60.
- Gu Y, Xu Y, Li GW, Huang LY. 2005. Remote nerve injection of mu opioid receptor adeno-associated viral vector increases antinociception of intrathecal morphine. *J Pain* 6(7):447-54.

- Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G. 1996. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:429-59.
- Gurevich VV, Gurevich EV. 2008. GPCR monomers and oligomers: it takes all kinds. *Trends Neurosci* 31(2):74-81.
- Hauswirth WW, Berns KI. 1977. Origin and termination of adeno-associated virus DNA replication. *Virology* 78(2):488-99.
- Heilbronn R, Weger S. 2010. Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics. *Handb Exp Pharmacol* (197):143-70.
- Hermonat PL, Labow MA, Wright R, Berns KI, Muzyczka N. 1984. Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J Virol* 51(2):329-39.
- Hermonat PL, Muzyczka N. 1984. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(20):6466-70.
- Hollis ER, 2nd, Kadoya K, Hirsch M, Samulski RJ, Tuszynski MH. 2008. Efficient retrograde neuronal transduction utilizing self-complementary AAV1. *Mol Ther* 16(2):296-301.
- Honda CN, Arvidsson U. 1995. Immunohistochemical localization of delta- and mu-opioid receptors in primate spinal cord. *Neuroreport* 6(7):1025-8.
- Hüser D, Heilbronn R. 2003. Adeno-associated virus integrates site-specifically into human chromosome 19 in either orientation and with equal kinetics and frequency. *J Gen Virol* 84:133-137.
- Hwang do W, Kang JH, Jeong JM, Chung JK, Lee MC, Kim S, Lee DS. 2008. Noninvasive in vivo monitoring of neuronal differentiation using reporter driven by a neuronal promoter. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35(1):135-45.
- Im DS, Muzyczka N. 1990. The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 61(3):447-57.
- Janik JE, Huston MM, Cho K, Rose JA. 1989. Efficient synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both adenovirus DNA binding protein and VA I RNA. *Virology* 168(2):320-9.
- Janik JE, Huston MM, Rose JA. 1981. Locations of adenovirus genes required for the replication of adenovirus-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(3):1925-9.
- Kalman D, Whittaker K, Bishop JM, O'Lague PH. 1993. Domains of E1A that bind p105Rb, p130, and p300 are required to block nerve growth factor-induced neurite growth in PC12 cells. *Mol Biol Cell* 4(4):353-61.

- Kawamoto T, Makino K, Niwa H, Sugiyama H, Kimura S, Amemura M, Nakata A, Kakunaga T. 1988. Identification of the human beta-actin enhancer and its binding factor. *Mol Cell Biol* 8(1):267-72.
- Klein RL, Dayton RD, Leidenheimer NJ, Jansen K, Golde TE, Zweig RM. 2006. Efficient neuronal gene transfer with AAV8 leads to neurotoxic levels of tau or green fluorescent proteins. *Mol Ther* 13(3):517-27.
- Klein RL, Hamby ME, Gong Y, Hirko AC, Wang S, Hughes JA, King MA, Meyer EM. 2002. Dose and promoter effects of adeno-associated viral vector for green fluorescent protein expression in the rat brain. *Exp Neurol* 176(1):66-74.
- Klein RL, Mandel RJ, Muzyczka N. 2000. Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer to somatic cells in the central nervous system. *Adv Virus Res* 55:507-28.
- Klein RL, Meyer EM, Peel AL, Zolotukhin S, Meyers C, Muzyczka N, King MA. 1998. Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors. *Exp Neurol* 150(2):183-94.
- Klockgether-Radke AP. 2002. [F. W. Serturmer and the discovery of morphine. 200 years of pain therapy with opioids]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 37(5):244-9.
- Kotin RM, Linden RM, Berns KI. 1992. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *Embo J* 11(13):5071-8.
- Kotin RM, Menninger JC, Ward DC, Berns KI. 1991. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* 10(3):831-4.
- Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI. 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(6):2211-5.
- Kuhar MJ, Pert CB, Snyder SH. 1973. Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature* 245(5426):447-50.
- Lasek AW, Janak PH, He L, Whistler JL, Heberlein U. 2007. Downregulation of mu opioid receptor by RNA interference in the ventral tegmental area reduces ethanol consumption in mice. *Genes Brain Behav* 6(8):728-35.
- Leung RK, Whittaker PA. 2005. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther* 107(2):222-39.
- Levy MH. 1996. Pharmacologic treatment of cancer pain. *N Engl J Med* 335(15):1124-32.
- Louboutin JP, Wang L, Wilson JM. 2005. Gene transfer into skeletal muscle using novel AAV serotypes. *J Gene Med* 7(4):442-51.

- Lusby E, Bohenzky R, Berns KI. 1981. Inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA: independence of the orientation at either end of the genome. *J Virol* 37(3):1083-6.
- Lusby E, Fife KH, Berns KI. 1980. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J Virol* 34(2):402-9.
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P and others. 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383(6603):819-23.
- McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ. 2003. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* 10(26):2112-8.
- McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. 2001. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 8(16):1248-54.
- McLaughlin SK, Collis P, Hermonat PL, Muzyczka N. 1988. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* 62(6):1963-73.
- Meister G, Tuschl T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431(7006):343-9.
- Mendelson E, Trempe JP, Carter BJ. 1986. Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. *J Virol* 60(3):823-32.
- Minami M, Satoh M. 1995. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res* 23(2):121-45.
- Monahan PE, Samulski RJ. 2000. AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther* 7(1):24-30.
- Muzyczka N, Berns KI. 2001. Parvoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott. p 2327-2359.
- Nathwani AC, Cochrane M, McIntosh J, Ng CY, Zhou J, Gray JT, Davidoff AM. 2009. Enhancing transduction of the liver by adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 16(1):60-9.
- Navarro V, Millicamps S, Geoffroy MC, Robert JJ, Valin A, Mallet J, Gal La Salle GL. 1999. Efficient gene transfer and long-term expression in neurons using a recombinant adenovirus with a neuron-specific promoter. *Gene Ther* 6(11):1884-92.
- Pelka P, Ablack JN, Torchia J, Turnell AS, Grand RJ, Mymryk JS. 2009. Transcriptional control by adenovirus E1A conserved region 3 via p300/CBP. *Nucleic Acids Res* 37(4):1095-106.

- Pereira DJ, McCarty DM, Muzyczka N. 1997. 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* 71(2):1079-88.
- Pert CB, Snyder SH. 1973. Properties of opiate-receptor binding in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(8):2243-7.
- Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Bhalla S, Walker P, Bouvier M. 2001. Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J Biol Chem* 276(6):4416-23.
- Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Walker P, Bouvier M. 2000. Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor. *J Biol Chem* 275(18):13727-36.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9):639-50.
- Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A. 1999. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 5(1):71-7.
- Quitschke WW, Lin ZY, DePonti-Zilli L, Paterson BM. 1989. The beta actin promoter. High levels of transcription depend upon a CCAAT binding factor. *J Biol Chem* 264(16):9539-46.
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T. 1994. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45(2):330-4.
- Richardson WD, Westphal H. 1981. A cascade of adenovirus early functions is required for expression of adeno-associated virus. *Cell* 27(1 Pt 2):133-41.
- Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. 1983. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71(4):741-7.
- Russell DW. 2003. AAV loves an active genome. *Nat Genet* 34(3):241-2.
- Sakimura K, Kushiya E, Ogura A, Kudo Y, Katagiri T, Takahashi Y. 1995. Upstream and intron regulatory regions for expression of the rat neuron-specific enolase gene. *Brain Res Mol Brain Res* 28(1):19-28.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA. 1991. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *Embo J* 10(12):3941-50.

- Samulski RJ, Shenk T. 1988. Adenovirus E1B 55-Mr polypeptide facilitates timely cytoplasmic accumulation of adeno-associated virus mRNAs. *J Virol* 62(1):206-10.
- Shapura M. 2004. Molekulare Mechanismen der Opioid-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion unter Entzündungsbedingungen (Dissertation). Berlin Charité Universitätsmedizin.
- Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, Hannon GJ, Cleary MA. 2005. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* 23(2):227-31.
- Stein C, Schafer M, Machelska H. 2003. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 9(8):1003-8.
- Storek B, Reinhardt M, Wang C, Janssen WG, Harder NM, Banck MS, Morrison JH, Beutler AS. 2008. Sensory neuron targeting by self-complementary AAV8 via lumbar puncture for chronic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(3):1055-60.
- Storek B, Harder NM, Banck MS, Wang C, McCarty DM, Janssen WG, Morrison JH, Walsh CE, Beutler AS. 2006. Intrathecal long-term gene expression by self-complementary adeno-associated virus type 1 suitable for chronic pain studies in rats. *Mol Pain* 2:4.
- Straus SE, Sebring ED, Rose JA. 1976. Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(3):742-6.
- Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. 1999. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5(1):78-82.
- Summerford C, Samulski RJ. 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72(2):1438-45.
- Taddese A, Nah SY, McCleskey EW. 1995. Selective opioid inhibition of small nociceptive neurons. *Science* 270(5240):1366-9.
- Tattersall P, Ward DC. 1976. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* 263(5573):106-9.
- Taymans JM, Vandenberghe LH, Haute CV, Thiry I, Deroose CM, Mortelmans L, Wilson JM, Debyser Z, Baekelandt V. 2007. Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Hum Gene Ther* 18(3):195-206.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9):4350-4.
- Trempe JP, Carter BJ. 1988. Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein. *J Virol* 62(9):3356-63.
- Walwyn WM, Keith DE, Jr., Wei W, Tan AM, Xie CW, Evans CJ, Kieffer BL, Maidment NT. 2004. Functional coupling, desensitization and internalization of virally expressed

- mu opioid receptors in cultured dorsal root ganglion neurons from mu opioid receptor knockout mice. *Neuroscience* 123(1):111-21.
- Walz C, Deprez A, Dupressoir T, Durst M, Rabreau M, Schlehofer JR. 1997. Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J Gen Virol* 78 (Pt 6):1441-52.
- Wang JB, Johnson PS, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Uhl GR. 1994. Human mu opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett* 338(2):217-22.
- Wang JB, Imai Y, Eppler CM, Gregor P, Spivak CE, Uhl GR. 1993. mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21):10230-4.
- Wang Z, Ma HI, Li J, Sun L, Zhang J, Xiao X. 2003. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* 10(26):2105-11.
- Woolf CJ, Salter MW. 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288(5472):1765-9.
- Xu Y, Gu Y, Wu P, Li GW, Huang LY. 2003. Efficiencies of transgene expression in nociceptive neurons through different routes of delivery of adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* 14(9):897-906.
- Yakobson B, Hrynko TA, Peak MJ, Winocour E. 1989. Replication of adeno-associated virus in cells irradiated with UV light at 254 nm. *J Virol* 63(3):1023-30.
- Yakobson B, Koch T, Winocour E. 1987. Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. *J Virol* 61(4):972-81.
- Yalkinoglu AO, Heilbronn R, Burkle A, Schlehofer JR, zur Hausen H. 1988. DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res* 48(11):3123-9.
- Zhang Y, Landthaler M, Schlussman SD, Yuferov V, Ho A, Tuschl T, Kreek MJ. 2009. Mu opioid receptor knockdown in the substantia nigra/ventral tegmental area by synthetic small interfering RNA blocks the rewarding and locomotor effects of heroin. *Neuroscience* 158(2):474-83.
- Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, Summerford C, Samulski RJ, Muzyczka N. 1999. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 6(6):973-85.
- Zolotukhin S, Potter M, Hauswirth WW, Guy J, Muzyczka N. 1996. A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J Virol* 70(7):4646-54.

7. ANHANG

7.1 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Optimierung einer durch rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV) vermittelten spezifischen Expression des μ -Opioid-Rezeptors (μ -OR) in neuronalen Zellen. Für die Expression von μ -OR wurden Kombinationen verschiedener Promotoren sowie alternativer Vektortypen (einzelnsträngig vs. doppelsträngig) konstruiert und in nicht-neuronalen und neuronalen Zellen auf Expression getestet. Die übergeordnete Zielstellung für die *in vivo* Applikation besteht dabei in der lokalen Erhöhung der μ -Opioid-Rezeptordichte an den Endigungen peripherer Nerven. Dies würde zu einer selektiven Verstärkung der peripheren Opioidanalgesie bei gleichzeitiger Vermeidung von Nebenwirkungen der Opioide im zentralen Nervensystem führen.

Es wurden zunächst verschiedene Promotoren für die μ -OR Expression im Kontext einzelsträngiger (ss) rAAV-Vektor-Plasmide verglichen: die Enhancer/Promotor-Region des IE1-Gens des humanen Cytomegalievirus (CMV), der CMV-chicken- β -Actin Hybridpromotor (CBA) und der Promotor der Neuronen-spezifischen Enolase (NSE). Im Kontext eines selbstkomplementären (sc) rAAV-Vektors konnte aus Gründen der maximalen Verpackungsgröße nur der CMV-Promotor eingesetzt werden. Nach Transfektion nicht-neuronaler und neuronaler Zelllinien konnte mit den entsprechenden Plasmid-Konstrukten eine μ -OR Expression nachgewiesen werden, wobei die Expression durch den stark neuronenspezifischen NSE-Promotor nur in differenzierten neuronalen Zellen nachweisbar war. Alle Vektorkonstrukte konnten als rekombinante AAV-Vektoren verpackt werden. Die Viruspräparationen wurden über Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Affinitätschromatographie hochgereinigt. Dabei wurden Virustiter im Bereich von 1×10^{10} bis 1×10^{11} genomischen Partikel pro ml erreicht. Bei der Testung der μ OR-rAAV Vektoren nach Infektion in Zellkultur konnte eine Expression von μ -OR in Immunoblot-Analysen nachgewiesen werden. In Bindungsversuchen mit radioaktiv markierten Liganden für μ -OR wurde die korrekte Lokalisation und Funktionalität der rekombinant exprimierten μ -Opioid-Rezeptoren an der Oberfläche der infizierten Zellen nachgewiesen.

Das im Rahmen der Doktorarbeit hergestellte Panel an rAAV-Vektoren bietet sich je nach Fragestellung für eine zelltyp-unabhängige, breite (CMV- oder CBA-Promoter) oder selektiv neuronenspezifische (NSE-Promoter) Expression des μ -OR an. Ein klarer Fortschritt für die

Applikation *in vivo* ist die Konstruktion eines selbstkomplementären AAV-Vektors, da diese sich gegenüber einzelsträngigen AAV-Vektoren durch eine schneller einsetzende und insgesamt höhere Transgenexpression auszeichnen.

Alle hergestellten Konstrukte stehen der funktionellen Untersuchung im Tiermodell zur Verfügung. Bei selektiver Infektion schmerzweiterleitender Hinterwurzelneurone des Rückenmarks wird erwartet, dass der μ -OR nach Expression in der Nervenperipherie durch Bindung von Agonisten (z.B. Morphin) seine schmerzhemmende Wirkung entfalten kann. Vor allem chronische Schmerzpatienten, bei denen ein längerfristig notwendiger Einsatz von Opioiden durch die erheblichen, zentralen Nebenwirkungen limitiert ist, könnten in Zukunft von diesem gentherapeutischen Ansatz profitieren.

7.2 Summary

The topic of this work was the optimisation of recombinant adeno-associated virus (rAAV) mediated μ -opioid receptor (μ -OR) expression in neuronal cell lines. Combinations of different promoters and AAV vector types (single-stranded vs. self-complementary) were constructed and μ -OR expression was tested in non-neuronal and neuronal cell lines. The study aims at up-regulation of μ -opioid receptors in peripheral nerve terminals *in vivo*. This selective local increase is assumed to potentiate the antinoceptive effects of opioid analgetics, thus avoiding undesired systemic side effects. First, different promoters were compared in the context of the single-stranded (ss) AAV-vector design: The immediate-early promoter-enhancer region of human cytomegalovirus (CMV), the CMV-chicken- β -actin hybrid promoter (CBA) and the neuron-specific enolase promoter (NSE). In the context of self-complementary (sc) AAV vectors only the CMV promoter could be used due to the limited overall packaging size. Transfection of non-neuronal and neuronal cells led to detectable μ -OR expression for all AAV vector constructs; the expression driven by neuron-specific NSE-promoter, however, was restricted to differentiated neuronal cells. Highly purified rAAV vector stocks were produced and purified by density-gradient centrifugation and affinity chromatography. Vector titers of 1×10^{10} to 1×10^{11} genomic particles per ml could be achieved. Immunoblot analysis detected μ -OR expression upon AAV vector transduction in cell culture. The correct localisation and functionality of μ -OR on the cell surface of rAAV-infected cells could be demonstrated in a binding study with a specific radioactively-labelled ligand.

The μ -OR expressing AAV vectors generated here can be applied either for cell-type-independent, ubiquitous (CMV- or CBA-promoter) or for restricted, neuron-specific (NSE-Promoter) expression of μ -OR. A major achievement for high-level μ -OR expressing is the construction of a self-complementary AAV vector. These show faster onset and superior gene expression *in vivo* compared to ss-AAV vectors.

The newly constructed μ -OR expressing AAV-vectors are available for functional analysis in animal models. Upon selective infection of primary afferent neurons of the spinal cord, the μ -opioid receptors can execute their analgesic effects by enhanced binding of agonists (e.g. morphine) at the sensory nerve terminals. The approach is especially helpful in patients with chronic pain who depend on long-term treatment with opioids. Since dose escalation of the drugs is limited because of severe side effects, these patients would especially profit from a gene therapeutic approach of site-specific receptor enhancement.

7.3 Lebenslauf

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

7.4 Publikationsliste

Abbarin M., Feldmann C., Koschate J., Song W., Vogel A.
Rationale Wirkstoffentwicklung in der Onkologie am Beispiel des Tyrosinkinaseinhibitors
Imatinib für die chronische myeloische Leukämie
Oral presentation (Abschlußsymposium Benjamin Franklin Kolleg)

Abbarin M., Vogel A., Busch M., Segovia-Silvestre A. & Machelska H.
Analgetische Wirkung von Immunzellen durch Opioidproduktion
Poster presentation (Postersession Benjamin Franklin Kolleg)

7.5 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Mehrnousch Abbarin, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Rekombinante Adeno-assoziierte Viren zur Expression des μ -Opioid-Rezeptors in neuronalen Zellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 13.04.2010

Mehnousch Abbarin

7.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen herzlich bedanken, die mich fachlich und moralisch unterstützt und das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Regine Heilbronn für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas und die engagierte fachliche Betreuung.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Stefan Weger, der mir mit seinem umfangreichen Wissen und seiner langjährigen experimentellen Erfahrung stets zur Verfügung stand.

Bei Herrn Prof. Dr. C. Zöllner (AG Prof. Dr. C. Stein, Klinik für Anästhesie, CBF, Charité Berlin) bedanke ich mich für die Überlassung der Flag- μ OR cDNA und der SH-SY5Y Zellen. Ein Dankeschön geht auch an Viola Spahn (AG Prof. Dr. C. Stein, Klinik für Anästhesie, CBF, Charité Berlin), die mir bei der Durchführung der Bindungsstudie und der anschließenden Auswertung der Daten sehr geholfen hat. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Toni Cathomen für die schnelle Bereitstellung der F11 Zelllinie und für die freundliche Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe.

Ein großes Dankeschön geht an alle Kolleginnen und Kollegen, besonders an Frau Eva Hammer und Frau Kerstin Winter, für die schöne gemeinsame Zeit im Labor und die harmonische Arbeitsatmosphäre. Sie standen mir nicht nur fachlich, sondern auch bei den vielen, kleinen alltäglichen Problemen zur Seite. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Ruth Joncker herzlich danken für die geduldige Hilfe in allen organisatorischen Fragen.

Zuletzt, aber mit besonderem Nachdruck, danke ich meiner Familie, aber auch all den Freunden, die mich in verzweifelten Momenten aufgebaut und mir mit Rat zur Seite gestanden haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.