

# „Quantifizierung infektiöser rekombinanter AAV9-Partikel mittels Real-Time PCR“

## **Bachelorarbeit**

Im Bachelor-Studiengang Biotechnologie der Technischen Universität Berlin

zum Erwerb des akademischen Grades

Bachelor of Science (B. Sc.)

Vorgelegt von

Johanna Best (Matr.-Nr: 332919)

Die Bachelorarbeit wurde angefertigt am Robert Koch-Institut zu Berlin  
Zentrum für HIV und Retrovirologie (FG 18)

Erste Begutachtung durch PD Dr. Norbert Bannert (Robert Koch-Institut)

Zweite Begutachtung durch Prof. Dr. Roland Lauster (Institut für medizinische Biotechnologie an der  
Technischen Universität Berlin)

Betreuung durch M. Sc. Katharina Fiddeke (Robert Koch-Institut)

Berlin, April 2015

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und eigenhändig sowie ohne unerlaubte fremde Hilfe und ausschließlich unter Verwendung der aufgeführten Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die selbstständige und eigenständige Anfertigung versichert an Eides statt:

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

# Inhaltsverzeichnis

<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>i</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>ii</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>v</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Influenzaviren .....	1
1.2 Auswirkungen der Influenzaerkrankung .....	2
1.3 Anforderungen an aktuelle Impfstoffe und Entwicklung eines universellen Impfstoffes .....	3
1.4 Zielstellung der Arbeit .....	4
<b>2. Materialien</b> .....	<b>5</b>
2.1 Geräte.....	5
2.2 Software .....	6
2.3 Enzyme .....	6
2.5 Oligonucleotide .....	7
2.6 Plasmide .....	8
2.7 Chemikalien .....	8
2.8 Puffer .....	9
2.9 Lösungen .....	11
2.10 Zelllinien .....	11
2.11 Wachstumsmedien.....	12
2.12 Antibiotika .....	12
2.13 Antikörper .....	12
<b>3. Methoden</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1 Zellkultur</b> .....	<b>13</b>
3.1.1 Wachstumsbedingungen.....	13
3.1.2 Splitten .....	13
3.1.3 Aussäen der Zellen .....	13
3.1.4 Transfektion von adhären wachsenden Zellen .....	14
3.1.4 Transfektion von Suspensionszellen .....	14
3.1.5 Transduktion der adhären wachsenden Zellen .....	14
3.1.6 Transduktion mit <i>ViraDuctin</i> <sup>TM</sup> .....	15
3.1.7 Transduktion mit <i>Adenovirus 5</i> .....	15
3.1.8 Zellyse.....	15
<b>3.2 Protein Analytik</b> .....	<b>15</b>
3.2.1 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS) –Page .....	15
3.2.2 Western Blot.....	16
3.2.3 Immunfluoreszenz.....	16
3.2.4 Durchflusszytometrie .....	17
3.2.5 ELISA .....	18
<b>3.3 DNA Analysen</b> .....	<b>18</b>
3.3.1 Mini-,Maxi-,Mega-Preps.....	18

3.3.2 Agarosegelelektrophorese .....	18
3.3.3 Aufreinigung der viralen DNA.....	19
3.3.4 S1-Verdau der ssDNA .....	19
3.3.5 Aufreinigung der Proben .....	20
3.3.6 Polymerase Ketten Reaktion .....	20
<b>3.4 Viruspartikelproduktion,-Aufreinigung, -Quantifizierung.....</b>	<b>21</b>
3.4.1 Aufreinigung des Pellets und des Überstandes .....	21
3.4.2 Erste Ultrazentrifugation .....	22
3.4.3 Zweite Ultrazentrifugation .....	22
3.4.4 Ultrafiltration.....	22
3.4.5 Quantifizierung der Viruspartikel mittels quantitativer Real-time PCR .....	23
3.4.5.2 Aufbrechen der rAAV-Partikel.....	23
3.4.5.3 Herstellung des Standards aus der CMV-Kassette .....	23
3.4.5.4 Quantifizierung der rAAV-Partikel.....	24
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Herstellung der rekombinanten AAV9–Partikel.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2 Bestimmung der Transduktionsbedingungen .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.1 Vergleich der Transduktionseffizienz des AAV2.9 in humanen und caninen Zelllinien .....</b>	<b>28</b>
4.2.1.1 Durchflusszytometrie .....	29
4.2.1.2 Immunfluoreszenz.....	29
4.2.1.3 Western Blot .....	31
<b>4.2.2 Verbesserung der Transduktionsrate durch <i>ViraDuctin™</i> und <i>Adenovirus 5</i>.....</b>	<b>32</b>
4.2.2.1 Durchflusszytometrie .....	33
4.2.2.2 Immunfluoreszenz.....	37
4.2.2.3 Western Blot .....	38
<b>4.3. Etablierung der qPCR.....</b>	<b>40</b>
4.3.1 Erste Experimente zum Test des Verfahrens .....	40
4.3.2 Bestimmung der Primer- und Sondenkonzentration .....	42
4.3.3 Isolierung und Aufreinigung der DNA-Proben.....	43
4.3.4 Amplifikation mittels NP–spezifischer Primer .....	45
<b>4.4 Etablierung einer Duplex qPCR .....</b>	<b>47</b>
<b>4.5 Etablierung eines Sandwich ELISA zur Detektion intakter AAV9-Partikel .....</b>	<b>49</b>
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>52</b>
5.1 Transduktionseffizienz in den drei Zelllinien .....	52
5.2 Wirkungsweise von <i>ViraDuctin™</i> und <i>Adenovirus 5</i> .....	53
5.3 Etablierung der qPCR.....	54
5.4 Duplex qPCR .....	55
5.5 Sandwich-ELISA .....	55
5.6 Zusammenfassung.....	56
5.7 Ausblick .....	56
<b>6. Anhang.....</b>	<b>58</b>
6.1 Abkürzungsverzeichnis .....	58
6.2 Tabellenverzeichnis .....	60
6.3 Abbildungsverzeichnis .....	61

6.4 Danksagung.....	62
<b>7.Literatur .....</b>	<b>63</b>

## Zusammenfassung

Saisonelle Grippewellen, ausgelöst durch den hoch adaptiven Influenzavirus, stellen die medizinische Versorgung jährlich vor eine große Herausforderung. Die schnelle und einfache Übertragung der Viren und ihre oft hohe Infektiosität führt zu einem großen Anteil an Influenza-assoziierten Krankenschreibungen und Todesfällen. Dadurch entstehen erhebliche Kosten in der Wirtschaft und Krankenversorgung. Derzeitige Impfstoffe können keinen universellen Schutz vor einer Infektion garantieren und müssen jährlich an die neu zirkulierenden Viren angepasst werden. Die stetige Veränderung der Viren durch Antigen-shift/drift birgt ein enormes Potential einer Pandemie. Um unter anderem Risikogruppen besser vor einer Infektion zu schützen und die Gefahr einer Pandemie zu verringern, wird an universellen Influenzaimpfstoffen geforscht.

Ein Ansatz für die Herstellung eines universellen Influenzaimpfstoffes ist es, das hoch konservierte Nukleoprotein über einen AAV-Shuttlevektor dem Immunsystem stabil zu präsentieren. In dem hier verwendeten Impfmodell wird das Nukleoprotein in den apathogenen Adeno-assoziierten Virus 9 kloniert. Die generierten Partikel werden einem Probanden injiziert. In Folge der Infektion baut der Proband eine T-Zell Immunantwort gegen das Nukleoprotein auf. So wäre er gegen diverse Subtypen der Influenza A-Viren geschützt.

Um die Qualität des Impfstoffes bezüglich der Infektiosität der rAAV-Partikel zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit eine Möglichkeit untersucht, die infektiösen Partikel mittels einer Real-Time PCR zu quantifizieren. Für die Bestimmung der infektiösen Partikel in einer Viruspräparation, wurde sich die Eigenschaft der Viren zu Nutze gemacht, dass ihr Genom nach der erfolgreichen Infektion einer Zelle doppelsträngig vorliegt. DNA-Moleküle nicht infektiöser Viren liegen weiterhin einzelsträngig vor. Mittels eines S1-Verdauers werden die einzelsträngigen DNA-Abschnitte verdaut. In der qPCR werden dann nur die doppelsträngigen DNA-Moleküle der infektiösen Viren quantifiziert. Die Rahmenbedingungen für die Transduktion der rAAV-Partikel bezüglich Menge und Zelllinie wurden bestimmt. Der Einfluss des Helfervirus *Adenovirus 5* und des kommerziell erwerblichen Mittels *ViraDuctin™* auf die Prozessierung der viralen DNA wurden über Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz und Western Blot analysiert. Weiter wurde die Etablierung einer Duplex-qPCR mittels verschiedener Referenzgene und eine Bestimmung intakter rAAV-Partikel über einen Sandwich-ELISA angestrebt. Für diesen sollte ein geeigneter Detektionsantikörper hergestellt werden.

Im Laufe der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die höchste Transduktionsrate in 293 T Zellen erreicht werden konnte, wenn sie mit  $10^5$ - $10^4$  Viruspartikel pro Zelle belastet wurden. *ViraDuctin™* konnte die Transduktionsrate effektiver steigern als *Adenovirus 5* und wirkte sich so positiv auf die Menge des Nukleoproteins in den infizierten Zellen aus. Die angestrebte Real-Time PCR konnte in ihrem Protokoll etabliert werden. Es bestehen jedoch Defizite in der Probenaufarbeitung, welche sich durch eine Kontamination in den naiven Zellen bemerkbar macht. Diese Kontamination macht die Auswertung der gemessenen Werte nicht möglich. Es konnte ein mögliches Referenzgen für eine Duplex-qPCR gefunden werden. Der Sandwich-ELISA konnte nicht etabliert werden, da der verwendete Capture-Antikörper nicht auf der Platte haften blieb. Die Funktionsfähigkeit des Detektionsantikörpers konnte nachgewiesen werden.

## Abstract

The highly adaptive Influenza virus causes yearly recurring seasonal flu epidemics. Its effects challenge the medical and the economic system. A high number of influenza associated deaths, sickness leaves and hospitalizations cause enormous costs in both areas. The ever changing influenza virus (due to antigenic shift and antigenic drift) bears a high risk of a pandemic outbreak. Current vaccines protect against the predicted most prevalent Influenza strains in each season only and have to be remodeled every year. To protect high risk groups and reduce the risk of a pandemic, research has been going on to find a universal influenza vaccine.

One way to realize the universal protection is to present the highly conserved nucleoprotein to the immune system in a stable and efficient way. In this work the presentation is achieved by cloning the nucleoprotein sequence into a non-pathogenic Adeno-associated Virus 9 shuttle vector. By injecting the generated particles into a subject group a T-cell mediated immune response against the nucleoprotein will be excited. Due to this response the subject will be protected against a variety of different influenza type A strains.

The aim of this work was to establish a quantitative Real-Time PCR to survey the amount of generated infectious rAAV-particles. To enable this, cells were transduced using the generated particles. In the course of the infection the formerly single stranded viral genome will be processed to a double stranded DNA segment. In performing a S1-digestion, the single stranded genome of the non infectious particles will be digested and only the double stranded genome of the infectious rAAV-particles can be detected in the qPCR. To enable a sufficient transduction, tests were performed regarding the amount of particles used in the transduction and to find the best transducible cell line in this model. Further experiments regarding the effect of the helpervirus *Adenovirus 5* and the commercially available Kit *Viraductin™* on the processing of the viral DNA in transduced cells were performed. This was achieved by analyzing the cells with flow cytometry, immunofluorescence and Western Blot. The finding of a suitable Duplex-qPCR reference gene and a quantification of intact particles with a Capture-ELISA and a self-produced detection antibody were intended.

In the course of this work it was shown that the 293 T cells proved to be the best transducible cell line, if they were infected with an amount of  $10^5$ - $10^4$  infectious viral particles per cell. A positive effect on the amount of the viral transgene product, when cells were treated with *Viraductin™*, and an increase of the number of transduced cells was observed. The protocol for the qPCR was established. Problems, however, still exist in the process of isolating the DNA and preparing the samples for measurement in the qPCR. The contamination of the naïve cells makes it impossible to quantify the amount of viral DNA in the transduced samples. Regarding the duplex-qPCR a possible candidate for a reference gene was found. The Capture-ELISA could not be established, as the Capture-antibody didn't bind to the surface of the plate.

## 1. Einleitung

Die Bestimmung der infektiösen AAV9-Partikel, die in dieser Arbeit mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) quantifiziert werden sollen, ist für die Überprüfung der Funktionsfähigkeit eines universellen Influenza-Impfstoffes von Bedeutung. Im Folgenden wird auf die Generierung des universellen Impfstoffes mittels der AAV9-Partikel eingegangen und die Wichtigkeit eines solchen Impfstoffes dargelegt.

### 1.1 Influenzaviren

Influenzaviren sind RNA-Viren und gehören zu der Familie der Orthomyxoviridae [1]. Sie werden in drei Typen eingeteilt. Typus A, B und C [2]. Das Genom der Viren liegt einzelsträngig, segmentiert und in negativer Polarität vor [3]. Influenzaviren können die sogenannte „echte Grippe“ hervorrufen. Dies ist eine respiratorische Erkrankung, die sich besonders leicht über Tröpfcheninfektion übertragen lässt [4].

Influenza Viren des Typ A besitzen acht RNA-Segmente. Jene codieren bis zu elf Proteine [3]. Die bekanntesten sind die Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). Auf ihnen basiert die große Vielfalt und die Klassifikation der Influenza A Subtypen [2]. Die serologische Klassifizierung erfolgt über die unterschiedlichen Antikörper, die bei einer Infektion im Wirt als Immunantwort generiert werden. Es gibt achtzehn HA und elf NA bekannte Immunantworten [5, 6]. Ein Influenzavirus des Typ A kann so aus jedem der achtzehn HA und elf NA Oberflächenantigene zusammengestellt sein. Die bekanntesten Linien des Typ A, die auch Menschen infizieren, sind H1N1 (Schweinegrippe) und H5N1 (Vogelgrippe). Die verschiedenen Subtypen infizieren unterschiedliche Wirte (Menschen, Schweine, Pferde) und können unterschiedliche Schweregrade der Erkrankung hervorrufen. Bevorzugt infizieren Influenza A-Viren allerdings Vögel [7]. Aus den möglichen Kombinationen der unterschiedlichen Oberflächenproteine ergibt sich die Vielfalt der Influenzaviren des Typ A. Die Kombinationen entstehen durch eine hohe Mutationsrate der Viren innerhalb einer infizierten Zelle. Diese Mutationen liegen dem Antigen shift (Gen-Austausch zwischen verschiedenen Subtypen) und Antigen drift (Punktmutationen im viralen Genom) zugrunde [8]. Die hohe Mutationsrate ermöglicht es dem Virus bereits bestehende Immunitäten zu umgehen [9]. Die immer wieder neu auftretenden neuen Subtypen erschweren die Herstellung der Impfstoffe. Diese richten sich in ihrer Immunantwort momentan gegen die spezifischen Oberflächenproteine [10].

Influenzaviren des Typ B besitzen ebenfalls acht RNA-Segmente und codieren ebenso bis zu elf Proteine [3]. Als bevorzugter Wirt gilt der Mensch [11]. Die Influenzaviren Typ B, werden in die *Victoria*- und die *Yamagata* – Linie unterteilt [12]. Die Immunantwort des Wirtes richtet sich hier ebenfalls gegen die Oberflächenproteine HA und NA.

Das Genom der Influenzaviren des Typ C besteht aus 7 RNA Segmenten. Ihnen fehlt die Neuraminidase [3]. Sie können, wie Typ A, unterschiedliche Wirte infizieren, jedoch verläuft der Krankheitsverlauf hier eher mild [13, 7].

## 1.2 Auswirkungen der Influenzaerkrankung

Das Krankheitsbild der durch die Influenzaviren hervorgerufenen Grippe äußert sich beim Menschen symptomatisch durch die Erkrankung der Atemwege und hohes Fieber [4]. Die angegriffene Schleimhaut der Atemwege macht es zudem leichter für andere pathogene Erreger einzudringen und den Wirt ebenfalls zu infizieren [14, 15]. Die leichte Übertragung der Influenzaviren über Tröpfchen-, Kontakt- oder Schmierinfektion ermöglicht es, dass jährliche epidemische saisonelle Grippewellen nicht ausbleiben [16, 17]. Allein in der Saison 2014/2015 (ab Oktober 2014 bis März 2015) wurden in Deutschland 55.212 labordiagnostisch bestätigte Influenzaerkrankungen gemeldet [18]. 8.785 der Erkrankten wurden hospitalisiert [18]. Die Zahl der durch Influenzaerkrankungen assoziierten Arbeitsunfähigkeitsmeldungen liegt deutlich höher. Diese Ausfälle können der Wirtschaft jährlich bis zu 2,2 Milliarden Euro [19, 20]kosten. Zudem kann die Mortalitätsrate, in Abhängigkeit von der Stärke der Influenza-Epidemie, auf bis zu 10.000 Influenza-assoziierte Todesfälle in Deutschland steigen [21].

Tritt eine Influenza Epidemie in der Nutztierhaltung (Vogelpest, Schweinegrippe) auf, so muss der gesamte Tierbestand nach dem Tierschutzgesetz getötet werden [22], auch wenn nur ein Teil der Tiere positiv auf eine Infektion getestet wurde. Im Dezember 2014 wurde allein in Niedersachsen ein Putenbestand mit 23.500 Tieren getötet [23]. Der daraus resultierende materielle Verlust für die Halter ist erheblich.

Neben der Herausforderung an die medizinische Versorgung und das Wirtschaftssystem in der betroffenen Region, bergen epidemische Grippewellen eine weitere Gefahr: Sie können sich, in Mensch und Tier, zu Pandemien entwickeln [16].

Dabei ist es entscheidend, ob der Virus sich durch einen Antigendrift oder einen Antigen shift verändert hat.

Kam die Veränderung durch Antigendrift zustande, reicht die bestehende Immunität in der Bevölkerung (bereits vorhanden oder durch Impfung erworben) trotzdem oft aus, die Zahl der Infektionen regional zu beschränken. Übertrifft die Zahl der tatsächlichen Infektionen die der prognostizierten Werte für eine Saison, spricht man von einer Epidemie anstatt einer jährlichen Grippewelle [21].

Liegt der Veränderung der Viren ein Antigen shift zu Grunde, so besteht keine Grundimmunität in der Bevölkerung. Das Virus kann sich sehr schnell vermehren und die Zahl der Infektionen steigt weltweit rasant an [16]. Die Anzahl der Erkrankungen und Todesfälle erreicht enorme Höhen. Die Infektionen sind schwer einzudämmen. Die bekannteste und schlimmste Pandemie in der menschlichen Population war 1918-1920 zu beobachten und ist als „Spanische Grippe“ bekannt. Der durch Antigen shift entstandene H1N1-Virus forderte weltweit 25-50 Millionen Opfer [24]. Viele davon in Risikogruppen. Zu Risikogruppen gehören Kinder unter 4 Jahre, Immungeschwächte Patienten, medizinisches Personal, Schwangere, sowie ältere Menschen (60+) [25, 17]. Bei letzteren verläuft eine Influenzaerkrankung oft schwer und tödlich [26].

Um diese Risikogruppen besser zu schützen wird eine jährliche Influenzaimpfung für Menschen [27] und teilweise auch für Tiere [28]angeboten. Die Grenzen dieser Impfung werden in 1.3 erläutert.

### 1.3 Anforderungen an aktuelle Impfstoffe und Entwicklung eines universellen Impfstoffes

Angesichts der in 1.2 erläuterten wirtschaftlichen und medizinischen Probleme gibt es eine anhaltende Nachfrage für Influenzaimpfstoffe [29]. Es besteht jedoch, mit einigen Ausnahmen, keine Impfpflicht für Menschen oder Tiere. Im Folgenden wird auf die Impfstoffe für Menschen eingegangen.

Jährlich kommen neue Impfstoffe gegen Influenzaviren auf den Markt. Es handelt sich bei diesen Impfungen nicht um Auffrischimpfungen, sondern im Prinzip um Erstimpfungen [29]. Der Impfstoff wird hauptsächlich als Totimpfstoff verabreicht und jährlich aus neuen Influenzaviren zusammengesetzt [30]. Die World Health Organisation (WHO) prognostiziert für jede Impfsaison die hauptsächlich zirkulierenden Viren des Typ A und B [31]. Der Impfstoff wird dann häufig aus einer Kombination jener (meistens zweimal Typ A, einmal Typ B) hergestellt [32]. Der Impfling baut eine spezifische Immunantwort gegen die Oberflächenproteine HA und NA dieser geimpften Viren auf [33]. Sollte er aber mit einem Virus infiziert werden, dessen Oberflächenproteine anders beschaffen sind, schützt ihn die durch den Impfstoff erreichte Immunantwort nur unzureichend oder gar nicht [9]. Vor diesem Hintergrund und den weitreichenden Auswirkungen einer Influenza-Epidemie/Pandemie, besteht eine große Nachfrage nach einem möglichst universell schützenden Impfstoff.

Die Realisierung eines universellen Impfstoffes kann auf unterschiedliche Art und Weise erreicht werden [34–36]. Im Folgenden wird auf eine mögliche Umsetzung mittels des hoch konservierten Nukleoprotein (NP) eingegangen.

Das Nukleoprotein ist ein weiteres im viralen Genom codiertes Protein der Influenzaviren [3]. Es unterliegt einem geringeren evolutionären Druck gegenüber den Oberflächenproteinen. Seine Zusammensetzung ist in allen Subtypen der Influenza hoch konserviert [37, 38]. Das Nukleoprotein übernimmt wichtige Funktionen in der Enkapsidierung des Virions und wird so dem Immunsystem des Wirtes ebenfalls als virales Protein präsentiert [39]. Dies macht es zu einem guten Kandidaten in der Entwicklung eines universellen Impfstoffes [40].

Dem Proband soll das virale Nukleoprotein als Impfstoff so präsentiert werden, dass er eine T-Zell Immunantwort aufbauen kann [41]. Hierfür wird das virale Nukleoprotein in das Genom des Adeno-assoziierten Virus (AAV) des Serologietyp 9 kloniert. Bis auf die ITR-Regionen wird das Genom des AAV mit der Sequenz des Nukleoproteins ersetzt, welches mit einem CMV-Promotor und einem V5-Tag versehen ist. Das Nukleoprotein stammte für diese Arbeit aus dem Virus *Influenza A/Mexico/4603/2009 (H1N1)*.

Adeno-assoziierte Viren sind bekannte Shuttle-Vektoren und werden bereits erfolgreich in der Gentherapie eingesetzt [42–44]. Sie gelten als apathogen und sehr sicher [45]. AAV9 Viren sind ebenfalls bekannt Muskelgewebe, welches als Zielgewebe für die Impfung vorgesehen ist, gut zu infizieren [46]. Die durch die Klonierung entstandenen rekombinanten AAV2.9-NPcosw-V5 Partikel sollen einem Probanden geimpft werden und ihn infizieren. In Folge der Infektion wird das virale Nukleoprotein dem Immunsystem präsentiert, welches dann eine T-Zell Immunantwort gegen das Protein aufbaut. So sollte der Proband gegen diverse Subtypen der Influenza geschützt sein [41]. Es ist wichtig zu bemerken, dass die generierten Partikel zwar Zellen infizieren, aber nicht replizieren können, da ihnen die Proteine für einen vollständigen Infektionszyklus fehlen.

## 1.4 Zielstellung der Arbeit

Zur Überprüfung der Qualität des Impfstoffes ist die Infektiosität der generierten Partikel zu bestimmen. Die Generierung der Viren und deren Aufarbeitung setzt nicht voraus, dass jeder Virus in der Viruspräparation auch in der Lage ist eine Zelle zu infizieren. Die Partikel könnten z.B. beschädigt worden sein und sind daher nicht infektiös. Für den Einsatz als Impfstoff ist es von Bedeutung, wie viele generierte rekombinante AAV2.9-NPcosw-V5 Partikel in einer Viruspräparation infektiös sind. Dadurch kann sichergestellt werden, dass dem Probanden immer eine gleiche Menge an infektiösen Viren injiziert wird.

Die Bestimmung der Infektiosität soll mittels einer Real-Time PCR (Polymerase Kettenreaktion) und eines Sandwich-ELISAs (eng.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) erfolgen, wobei die Etablierung der Real-Time PCR im Vordergrund steht. Mittels der Real-Time PCR soll das virale Genom nach erfolgreicher Infektion einer Zelle quantifiziert werden.

Mit einem Teil der vorher quantifizierten Viruspräparation, wird eine feste Anzahl an Zellen transduziert. Dabei werden die Zellen mit infektiösem rekombinanten AAV9-Partikeln infiziert. Das vorher einzelsträngig vorliegende virale Genom wird zu einem doppelsträngigen DNA-Abschnitt prozessiert [47]. Nicht infektiöse Viren liegen weiterhin mit einem einzelsträngigen Genom vor. Die Arbeitsgruppe um Rohr veröffentlichte 2005 eine Methode, welche die Quantifizierung infektiöser AAV2 Partikel mittels Real-Time PCR beschrieb [48]. Sie bediente sich an eben dieser Eigenschaft des doppelsträngigen Genoms der infektiösen Viren. Mittels eines S1-Nuklease Verdau wurde das Genom der nicht infektiösen Viren abgebaut. So lag in den transduzierten Proben nur doppelsträngiges virales Genom vor. Dieses konnte dann mit einer Real-Time PCR quantifiziert werden.

In der Arbeitsgruppe FG18 des RKI wurde bereits eine Real-time PCR zur Quantifizierung einzelsträngiger DNA der rAAV2.9-NPcosw-V5 Partikel etabliert. Diese PCR sollte nach dem S1-Verdau als Vorlage dienen, eine Real-Time PCR zu entwickeln, die es möglich macht die infektiösen Partikel auf Basis des doppelsträngigen Genoms zu quantifizieren. Die Anzahl der doppelsträngigen viralen DNA-Moleküle kann nach erfolgreicher Quantifizierung auf die Anzahl infektiöser Partikel in einer Viruspräparation zurück gerechnet werden. Um bestmögliche Transduktionsbedingungen zu schaffen, wurde die Transduktionseffizienz unterschiedlicher Zelllinien getestet. Weiterhin wurde die Auswirkung von *ViraDuctin™* und *Adenovirus 5* auf die Prozessierung des viralen Genoms in der Zelle untersucht.

Ein zusätzlicher Indikator für die Infektiosität der rekombinanten Partikel ist ihr intaktes Capsid. Nicht intakte Viren sind mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht infektiös. Mittels eines Sandwich-ELISAs soll die Anzahl intakter Partikel in einer Viruspräparation bestimmt werden. Für diesen ELISA soll der Detektionsantikörper eigens hergestellt werden.

Die Etablierung der beschriebenen Real-Time PCR zur Quantifizierung infektiöser rekombinanter AAV9-Partikel und die Etablierung des Sandwich-ELISAs zur Überprüfung der intakten rekombinanten Partikel ist das Ziel dieser Arbeit.

## 2. Materialien

In dieser Arbeit wurden folgende Geräte und Materialien verwendet.

### 2.1 Geräte

Die in Tabelle 1 gegebenen Geräte wurden zur Durchführung und Auswertung benutzt.

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Hersteller	Modell
Zentrifuge	Sigma	4K15
Tischzentrifuge	Thermo Scientific	Heraeus Fresco21 Centrifuge
Ultrazentrifuge (UZ)	Beckmann Coulter	Optima™ L-100k
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckmann Coulter	Quick Seal Tubes 25-89mm
Rotor UZ	Beckmann Coulter	70Ti
Ultrafiltrationsröhrchen	MerckMillipore	Amicon Ultra 15MWCO 100.000
Heizblock	Eppendorf	Thermomixer compact
Wasserbad	Köttermann	
Real Time PCR-cycler	Agilent Technologies	Stratagene Mx3000P
PCR-cycler	Bio-Rad	MJ Mini Personal Thermal cycler
Inkubator	Thermo Scientific	HeraCell 240
Zellzähler	Beckmann Coulter	Beckmann Coulter counter Z2
Mikroskop	Nikon	Nikon Eclipse TS 100
Kamera	Nikon	DSFI 2
Konfokales Lasermikroskop	Zeiss	LSM780
Spektrophotometer	peq-Lab	Nanodrop ND-1000
Sterilwerkbank	Thermo Scientific	Safe 2020
SDS-Page	Bio-Rad	
Western Blot	Bio-Rad	TransBlot® SD-cell
Membrandokumentation	Li-Cor	Odyssey
Filmentwickler	Agia-Gevuert	Curix-60
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad	
Filterpapier	Bio-Rad	Extra thick blotting Paper
Geldokumentation	Intas	Chemo-Cam
ELISA-Leser	Tecan	Sunrise
ELISA-Platten	Thermo Scientific	Nunc 96 well
Durchflusszytometer	Becton Dickinson	FACS Calibur E3476

## 2.2 Software

Folgende Software (Tabelle 2) wurde zur Auswertung und Darstellung der Ergebnisse verwendet.

Tabelle 2: Software

Software	Version
BioEdit	7.2.5.
FlowJo	9.6
Li-COR	3.0
Microsoft Office	2010
Zen2012	1.1.1.0.
MxPro	Mx300P
MegAligne	10.0.1.
ImageJ	1.48v
GraphPad Prism 5	5.04
SnippingTool	Windows 7
Paint	6.1

## 2.3 Enzyme

Die in Tabelle 3 angegebenen Enzyme wurden in den Versuchen benutzt.

Tabelle 3: Enzyme

Enzyme	Hersteller
Benzonase	Sigma Aldrich
DNase I	Thermo Scientific
TaqHotStart	Segetic
AmpliTaqGold	Roche
Pfu Turbo	Stratagene
Proteinase K	Sigma Aldrich
S1-Nuklease	Thermo Scientific

## 2.4 KITS

Die verwendeten Kits werden in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Kits

KITS	Hersteller
QIAprep® Spin Miniprep-Kit (250)	QIAGEN
Qiagen Plasmid Maxi Kit (25)	QIAGEN
Qiagen Plasmid Mega-Kit (25)	QIAGEN
Wizard®SV Gel and PCR Clean-up system	Promega
QIAquick Gel Extraction Kit (250)	QIAGEN
QIAmp DNA Mini and Blood Mini Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
<i>ViraDuctin™</i> AAV Transduction Kit	Cell Biolabs
RNase-Free DNase Set (50)	QIAGEN

## 2.5 Oligonucleotide

Die verwendeten Primer und Sonden, mit ihren Sequenzen, werden in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Oligonucleotide

Oligonucleotide	Primer Sequenzen 5' -> 3'
CMV- Primer for	TGGAGTTCGCGTTACATAACTTAC
CMV -Primer rev	CTATTGGCGTTACTATGGGAACATAC
CMV FAM Sonde	CCTGGCTGACCGCCCAACGAC
NP-Primer for	GTGATTCGCATGATGGAGAG
NP-Primer rev	AGAAGTAGCTGCCCTCGTTG
NP FAM Sonde	CCTGGCTGACCGCCCAACGAC
GAPDH-Primer for	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC
GAPDH-Primer rev	TGGTCCACACCCATGACGA
GAPDH HEX Sonde	CTTACCACCATGGAGAAGGCTGGG
Albumin-Primer for	TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT
Albumin-Primer rev	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT
cMyc-Primer for	GCCAGAGGAGGAACGAGCT
cMyc-Primer rev	GGGCCTTTTCATTGTTTTCCA
CCR5-Primer for	ATG ATT CCT GGG AGA GAC GC
CCR5-Primer rev	AGC CAG GAC GGT CAC CTT

## 2.6 Plasmide

Die verwendeten Plasmide und ihre Bezugsquelle für diese Arbeit werden in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6: Plasmide

Rekombinante Plasmide	Bezugsquelle
pET16b-Staufen	Dr. Kirsten Hanke
pAAV-NPcosw-(A/Mexico/4603/2009);(H1N1)	Dr. Isaac Sipo
pAAV-GFP	Dr. Isaac Sipo
pAAV-Leer	Dr. Isaac Sipo
pHelper	Agilent Technologies
p5E18VD2/9	Dr. Isaac Sipo

## 2.7 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden verwendet und werden in Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	Sigma-Aldrich
Agarose	peqLab
Ammoniumsulfat (APS)	Carl Roth
Carbonate-Bicarbonate Puffer	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Carl Roth
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich
Schwefelsäure	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth
Tween-20	Sigma-Aldrich
TritonX-100	Sigma-Aldrich
7-Aminoactinomycin (7-AAD)	Beckmann Coulter
Natriumchlorid	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Sodiumdodecylsulfate	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
o-Phenylenediamine tablet (OPD)	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (30%)	Merck

## 2.8 Puffer

Die in Tabelle 8 angegebenen Puffer wurden in dieser Arbeit verwendet. Einzelne Puffer werden in ihrer Zusammensetzung auch im Methodenteil (2.2) angegeben.

Tabelle 8: Puffer

Puffer	Zusammensetzung
PBS 0,2 M	175 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 150 mM NaCl In H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub>
PBS-MK	25 mM KCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> In PBS 0,2 M
PEG/NaCl	2,5 mM NaCl 20% PEG-6000 In H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub>
NaCl/HEPES	150 mM NaCl 50 mM HEPES 26 mM EDTA In H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub>
2,5 M CaCl <sub>2</sub>	2,5 M CaCl <sub>2</sub> In H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub>
Laufpuffer	25 nM Tris 192 mM Glycin 1 g/l Natriumlaugrylsulfat pH 8,3
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% (v/v) Ethanol 8,3 g/l SDS
Lysierungspuffer	1 % Triton X-100 50 mM TRIS HCL (pH 7,5) 150 mM NaCl

	5 mM EDTA Protease Inhibitor Immer frisch dazugeben, 1:25 aus 25x Konzentrat einsetzen
Blockingpuffer Western Blot	4 % Milchpulver 1 %-Tween in PBS
Blockingpuffer Immunfluoreszenz	4 % Milchpulver in PBS
Blockingpuffer ELISA	0,05 % Tween-20 1 % Milchpulver in PBS
Waschpuffer	0,1% Tween in PBS
PBS-T	0,05% Tween-20 in PBS
FACS-Färbungspuffer	0,1 % Triton X-100
FACS-Puffer	3 % Triton X-100 3 % Bovines Serumalbumin
Substratpuffer ELISA	1 Tablette Citratpuffer 60 mg OPD 40 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## 2.9 Lösungen

Folgende Lösungen wurden verwendet.

Tabelle 9: Lösungen

Lösungen	Hersteller
Fetales Bovines Serum	Biochrom
TEMED 89%	Carl Roth
Trypsin-EDTA 0,05%/0,02% (w/v) in PBS, w/o Ca <sup>++</sup> , w/o Mg <sup>++</sup>	Biochrom
Paraformaldehyd	Carl Roth
Acrylamid	Carl Roth
Iodixanol	Sigma Aldrich
Polyethylenimin (PEI)	Sigma Aldrich
Mowiol 4-88	Carl Roth
Roti®Load 3 (LDS)	Carl Roth
Orange Loading dye	Thermo Scientific

## 2.10 Zelllinien

Für die beschriebenen Versuche wurden folgende Zelllinien (Tabelle 10) verwendet.

Tabelle 10: Zelllinien

Zelllinien	Organismus	Ursprungsgewebe
HEK 293 T	Mensch	Niere
HEK 293sf-3f6 (Spinner Zellen)	Mensch	Niere
HeLa	Mensch	Epithelzellen Zervixkarzinom
MDCK	Hund	Niere

## 2.11 Wachstumsmedien

Die Medien und ihre Komponenten, die in der Zellkultur verwendet wurden, werden in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11: Wachstumsmedien und ihre Komponenten

Medium	Komponente	Konzentration
DMEM High glucose	stabiles L-Glutamin	
	Glucose	4,5 g/L
DMEM Low glucose	stabiles L-Glutamin	
	Glucose	1 g/L
RPMI 1640	stabiles L-Glutamin	
LB-Medium	Trypton	1 %
	NaCl	1 %
	YeastExtract	0,5 %
	pH 7 mit NaOH erreicht	

## 2.12 Antibiotika

Die Medien wurden für die Zellkultur mit 10000 µg/ml Penicillin/Streptomycin (PAA) versetzt. Die Zusammensetzung der Antibiotika für die bakterielle Kultivierung ist in Tabelle 12 gegeben.

Tabelle 12: Antibiotika

Antibiotika	Stockkonzentration	eingesetzte Konzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml

## 2.13 Antikörper

Zur Detektion wurden die in Tabelle 13 angegebenen Antikörper verwendet.

Tabelle 13: Antikörper

Antigen	Herkunft	Hersteller
Anti-V5 (Maus)	Maus	Serotec
Anti-Maus-IgG 680	Ziege	Invitrogen
Anti-Maus-IgG 488	Ziege	Invitrogen
Anti AAV9 IgA Intact Particels	Maus	Progen
Anti-Ratte-IgG HRP	Ziege	Bio Legend
Anti-Maus-IgA HRP	Ziege	Santa Cruz
Anti-β-Aktin HRPO	Maus	Sigma Aldrich

### **3. Methoden**

Die in dieser Arbeit ausgeführten Versuche und Arbeitsschritte wurden wie folgt durchgeführt.

#### **3.1 Zellkultur**

##### **3.1.1 Wachstumsbedingungen**

Alle Zellen wurden bei 37°C und angefeuchteter Luft, die 5 % CO<sub>2</sub> enthielt, kultiviert.

HEK 293 T Zellen wuchsen in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) welches 1 g/l Glucose sowie L-Glutamin enthielt und dem 10 % Fetales Bovines Serum und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden.

MDCK und HeLa Zellen wuchsen in Dulbecco's Modified Eagles Medium welches 4,5 g/l Glucose enthielt und mit den oben genannten Komponenten und Zusätzen sonst übereinstimmt .

Die HEK 293 T Spinner Zellen wuchsen in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) Medium welches ebenfalls L-Glutamin enthielt und dem ebenfalls 10 % Fetales Bovines Serum und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden.

##### **3.1.2 Splitten**

Alle drei Tage wurden die Zelllinien 1:10 gesplittet.

Die adhärent wachsenden Zelllinien 293 T, HeLa und MDCK wurden, nachdem das alte Medium entfernt wurde, mit Trypsin-EDTA behandelt und eine Minute bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden vorsichtig mit frischem Medium von der Flasche gelöst und bei 1500 rpm fünf Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem Medium resuspendiert, wovon 1/10 zurück in die Flasche überführt wurde, welche 9/10 frisches Medium enthielt. Die restlichen Zellen wurden verworfen oder ausgesät.

Jedem Split ging eine mikroskopische Betrachtung der Zellen voraus.

Den 293 T Spinner Zellen, welche in Suspension wuchsen, wurde 1/10 Suspension entnommen und der Rest verworfen oder weiter verwertet. Die Zellen wurden mikroskopisch untersucht, indem sie 1:1 mit Tryptophanblau gemischt und auf einem Objektträger ausgestrichen wurden. Die Flasche wurde mit Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gewaschen und 9/10 frisches Medium wurde zu den entnommenen 1/10 Zellen in Suspension gemischt und in die Flasche zurückgeführt.

##### **3.1.3 Aussäen der Zellen**

293 T, HeLa und MDCK Zellen wurden für die verschiedenen Analysen in 6 Well Zellkulturplatten von TPP zu  $3 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesät, um eine durchschnittliche Anzahl von  $9,5 \times 10^5$  Zellen/Well bei der

Ernte zu erreichen. Dazu wurden die Zellen im Beckmann Coulter-Counter gezählt und entsprechend mit frischem Medium verdünnt. Sollten die Zellen für eine Immunfluoreszenz ausgesät werden, wurden in die 6-Well Platten vorher noch sterile Deckgläser gelegt.

Die ausgesäten Zellen wurden dann entweder transduziert oder transfiziert.

293 T Spinner Zellen wurden für die Transfektion in 1000 ml Spinner Flaschen (Integra) bis zu einer Zelldichte von  $8 \times 10^5$  Zellen/ml kultiviert.

### **3.1.4 Transfektion von adhärent wachsenden Zellen**

Die Transfektion wurde mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI) durchgeführt. Am Tag der Transduktion sollte die Konfluenz der Zellen mindestens 60 % betragen. Die Angaben werden pro Kavität einer 6-Well gegeben. 2 µg DNA wurden in 150 µl Serumfreiem Medium verdünnt und gemischt. Dem Gemisch wurden 16 µg PEI zugesetzt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für 10 min wurde das alte Medium der Zellen abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen und mit 1 ml frischem Medium versetzt. Dem PEI-DNA Mix wurde ebenfalls 1 ml frisches Medium zugeführt und das Gemisch auf die Zellen gegeben.

### **3.1.4 Transfektion von Suspensionszellen**

Die Transfektion der in Suspension wachsenden 293 T Spinner Zellen diente zur Herstellung der rekombinanten AAV9-Partikel, welche später für Transduktionsversuche eingesetzt werden sollten. Die Aufreinigung dieser Partikel ist in 3.4 gegeben.

Die Transfektion der in Suspension wachsender Zellen wurde ebenfalls mit PEI durchgeführt. Um eine 1 L Kultur zu transfizieren, wurden 90 ml RPMI Serumfreies Medium, 7920 µg PEI und insgesamt 990 µg DNA vermischt.

Der PEI-DNA Mix wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nach der Inkubationszeit der 1 L Zellkultursuspension zugegeben. Die Zellen wurden bis zur Aufreinigung bei 37°C inkubiert.

Die transfizierten Zellen enthalten den fertiggestellten Virus. Jener wurde aufgereinigt und zur Transduktion verwendet.

### **3.1.5 Transduktion der adhärent wachsenden Zellen**

Zellen wurden in 6-Well Platten in entsprechender Konzentration ausgesät. Ein Tag nach der Aussaat wurde die Konfluenz der Zellen bestimmt. Rekombinanter AAV9 wurde in FKS-freiem DMEM Low Glucose auf die gewünschte Partikelzahl eingestellt. Das alte Medium wurde verworfen und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Der AAV9-Mix wurde auf die Zellen gegeben und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach diesen zwei Stunden wurde frisches Serum enthaltendes Medium auf die Zellen gegeben und weiter bei 37°C bis zum Tag der Ernte inkubiert.

### **3.1.6 Transduktion mit *ViraDuctin*<sup>TM</sup>**

Ein Tag nach Aussaat wurden die Zellen mit *ViraDuctin*<sup>TM</sup> (VD) nach Herstellerangabe behandelt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Transduktion nach 3.1.5 durchgeführt.

### **3.1.7 Transduktion mit *Adenovirus 5***

Ein Tag nach der Transduktion wurden die Zellen, mit *Adenovirus 5* belastet. Dazu wurden 1 µl Adenovirus (in Medium) pro Well dazugegeben und vermischt. Nach Zugabe wurde die Zellkultur weiter über Nacht bei 37°C inkubiert und dann nach 3.1.5 transduziert.

### **3.1.8 Zellyse**

Zuerst wurde das alte Medium abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und 200 µl/Well Lysispuffer wurden langsam zugetropft. Die Platte wurde dann 10 min bei 4°C inkubiert. Die Zusammensetzung des Zellysispuffers ist in Tabelle 8 gegeben.

Nach der Inkubation wurden die Zellen abgeschabt und in ein Eppendorf-Tube überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 min, bei 4°C und 5000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C weggefroren oder für die SDS-Page Analyse weiter verwendet.

## **3.2 Protein Analytik**

### **3.2.1 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS) –Page**

Die Idee hinter einer SDS-Page Analyse ist, dass das negative SDS an die positiv geladenen Proteine bindet und so zu einem Ladungsausgleich führt. Die Proteine werden so nach ihrer Größe und nicht nach ihrer Ladung aufgetrennt.

Der Überstand aus der Zellyse wurde mit 4x Ladepuffer Roti®-Load 3 (LDS ) versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt. Dies sollte eine Linearisierung der Proteine bewirken. Der restliche Überstand wurde bei -20°C weggefroren.

Nach der Erhitzung der Proben wurden 20-50 µl auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Zusammensetzung der SDS-Gele ist in Tabelle 14 gegeben. Proben sammelten sich bei 100 V für ca. 10 min und trennten sich dann bei 160 V.

Tabelle 14: Zusammensetzung der 15 % -igen SDS-Gele

Stoff	Sammelgel % (v/v)	Trenngel % (v/v)
H <sub>2</sub> O	57,39	23,45
Sammelgelpuffer 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	17	
Trenngel Puffer 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)		25
Rotiphorese® Gel 30 (37.5:1)	25	50
10% SDS	0,1	1
TEMED	0,5	0,05
APS	0,01	0,5

Anschließend wurden die Gele in Transferpuffer gelegt und für den Western Blot weiter verwendet.

### 3.2.2 Western Blot

Der Western Blot wurde mittels Semi-Dry-Blot von Bio-Rad durchgeführt. Hierfür wurden Blottingpapier und Nitrozellulose Membran entsprechend der Größe des Gels zugeschnitten und in Transferpuffer eingeweicht. Die Reihenfolge der Komponenten zum Blot war wie folgt: Blottingpapier-Membran-Gel-Blottingpapier. Das ganze wurde mit Transferpuffer angefeuchtet und lief 40 min bei 20 V.

Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in Blockingpuffer gelegt. Der erste Antikörper (Anti-V5 (Maus)) wurde in dem Blockingpuffer verdünnt, die Membran wurde nach dem Blocken in das Gemisch überführt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten drei-Waschzyklen mit Waschpuffer à zehn Minuten. Der zweite Antikörper (Anti-Maus-680 IgG) wurde ebenfalls in dem Blockingpuffer verdünnt und die Membran darin 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Fluoreszenz am Odyssey im Kanal 700 und 800 ausgelesen. Anschließend wurde die Membran noch mit Anti-β-Aktin (1:50.000 in Blockingpuffer, 1 h, RT) behandelt und auf Film entwickelt.

### 3.2.3 Immunfluoreszenz

Zwei Tage nach der Transduktion (s. 3.1.4) wurden die Zellen mit 1 ml/Well Paraformaldehyd (2 % in PBS) für 30 min, Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden sie dreimal in PBS à 5 min gewaschen, um dann mit 0,5 % Triton X-100 in PBS 15 min (1 ml/Well) permeabilisiert zu werden. Es folgten drei Waschzyklen mit PBS. Zum Blocken (1 h, 20 min, RT) verwendete man 1 % Milchpulver in PBS. Anschließend wurde der verdünnte (in Blockingpuffer, s.Tabelle 8) erste Antikörper (Anti-V5 (Maus)) zugegeben und es wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der ersten Antikörperzugabe wurden die Zellen wieder dreimal à 5 min mit PBS gewaschen. Der zweite Antikörper (Anti-Maus-IgG 488) wurde im Blockingpuffer verdünnt und zugegeben. Die Inkubationszeit beträgt 30 min bei Raumtemperatur.

Die Antikörperzugabe erfolgte in einer feuchten Kammer. Hierzu wurden die Deckgläser aus den Platten genommen und in mit nassem Zelltuch und Parafilm ausgelegte Glaskammer gelegt. 200 µl

des verdünnten Antikörpers wurden jeweils aufgetropft. Die Kammer wurde verschlossen und wie beschrieben inkubiert.

Nach der Zugabe des zweiten Antikörpers wurden die Zellen zur Färbung des Zellkerns zweimal mit PBS gewaschen, um dann mit 1 ml/Well Hoechst-Reagenz behandelt zu werden. Inkubation erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen wieder mit PBS wie beschrieben gewaschen.

Abschließend wurden die Deckgläschen mit Mowiol (je nach Größe des Deckglases 6-20 µl) auf einem Objektträger eingedeckt und zum Trocken bei 4°C gelagert.

Zur Analyse wurden sie dann unter dem dem LSM780 Mikroskop betrachtet

### **3.2.4 Durchflusszytometrie**

#### **3.2.4.1 Ernte und Fixierung**

Zwei Tage, nach der wie in 3.1.4 beschriebenen Transduktion, wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen einmal mit 1 ml/Well PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in frischem Medium resuspendiert und von der Oberfläche abgelöst. Sie wurden in ein neues Eppendorf-Tube überführt und bei 1800 rpm und 4°C für 5min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml 1 %iges PFA (in PBS) resuspendiert. Die Zellen wurden so für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Es folgte ein Waschschrift mit 1 ml PBS. Zentrifugiert wurde bei 1800 rpm, 4°C, 5min. Die Zellen wurden dann in 1 ml 0,5 %igem Triton X-100 für 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Anschließend wurden sie wieder mit 1ml PBS gewaschen und bei 2000 rpm, 5 min, 4°C zentrifugiert.

#### **3.2.4.2 Intrazelluläre Färbung**

Der erste Antikörper (Anti-V5 (Maus)) wurde 1:100 in dem Färbungspuffer (Zusammensetzung in Tabelle 8) verdünnt. 400 µl dieser Verdünnung wurden benutzt, um das Pellet zu resuspendieren. Inkubiert wurde für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen bei 2000 rpm, 4°C für 5 min abgefugt. Die Zellen wurden in dem Färbungspuffer (1 ml) gewaschen. Der zweite Antikörper (Anti-Maus-IgG 488) wurde in dem Färbungspuffer verdünnt und das Pellet wurde in 400 µl resuspendiert. Inkubiert wurde 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde bei 2000 rpm, 4°C, 5 min zentrifugiert und das Pellet in dem Färbungspuffer gewaschen.

Wurde zusätzlich eine Totzellularfärbung durchgeführt, wurden die Proben mit jeweils 20 µl 7-AAD in Färbungspuffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Tubes bei 2000 rpm, 4°C, 5 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in ca. 600 µl FACS-Puffer (Zusammensetzung in Tabelle 8 gegeben) resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

### **3.2.5 ELISA**

Für die Etablierung des Sandwich-ELISA wurden verschiedene Konzentrationen des Beschichtungsantikörpers auf der Platte getestet. Ebenso wurde der Beladungsantikörper in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Genaue Konzentrationsangaben werden im Ergebnissteil angegeben.

Grundsätzlich wurde aber immer nach dem gleichen Schema verfahren, welches hier beschrieben wird.

Der Beschichtungs-Antikörper wurde in Carbonat-Puffer verdünnt und zu  $V_{ges}=50 \mu\text{l/Well}$  auf die Platte gegeben. Die Platte wurde über Nacht bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Platte dreimal mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurde mit Blockingpuffer 45 min für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  geblockt ( $100 \mu\text{l}$  pro Well). Der primäre Antikörper wurde in Blockingpuffer verdünnt und zu  $V_{ges}=50 \mu\text{l/Well}$  für 45 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Platte wurden anschließend mit PBS-T dreimal gewaschen.

Der sekundäre und Detektions- Antikörper wurden ebenso zugegeben. Dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernte überschüssigen Antikörper vor der Substratzugabe.

Für die Detektion wurden  $50 \mu\text{l/Well}$  Substratpuffer zugegeben und ca 5-10 min bei RT im Dunkeln inkubiert und beobachtet. War das Signal stark genug und die Negativkontrollen noch farblos, wurde die Reaktion mit  $20 \mu\text{l}$  25 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  Säure gestoppt. Die Platte wurde im ELISA-Leser bei 492/620nm ausgewertet.

## **3.3 DNA Analysen**

### **3.3.1 Mini-,Maxi-,Mega-Preps**

Die Mini-,Maxi-,Mega-Preps wurden nach dem Protokoll Herstellers (Tabelle 4) verwendet.

### **3.3.2 Agarosegelelektrophorese**

Zur qualitativen Bestimmung von DNA-Fragmenten, die nach ihrer Größe aufgetrennt werden können, diente die Agarosegelelektrophorese.

Proben der PCR und Aufreinigungsschritten wurden auf 1 % Agarosegel aufgetragen, welches mit 1 % Ethidiumbromid versetzt war. Die Proben wurden mit Ladepuffer Orange Dye versetzt und liefen bei 120 V für 15 -45 min. Anschließend wurde sie mit der ChemoCam von Intas ausgewertet.

### 3.3.3 Aufreinigung der viralen DNA

#### 3.3.3.1

Nach der Transduktion mit dem rAAV fand die Isolierung der viralen DNA zunächst wie folgt statt. Zwei Tage nach der Transduktion wurden die Zellen mit 1 ml PBS/Well gewaschen. Anschließend wurden sie in 50 µl PBS resuspendiert und mit 10 µg Proteinase K versetzt. Die Suspension wurde bei 50°C 1h lang inkubiert, anschließend wurde das Enzym bei 97°C für 15 min inaktiviert. Nach dem Zentrifugationsschritt von 11.600 rpm für 10 min bei Raumtemperatur wurde der S1 Verdau wie in 3.3.3 durchgeführt. Die Zellen wurden direkt als Probenmaterial für die qPCR (Quantitative Real-Time PCR) verwendet oder noch nach 3.3.4 aufgereinigt.

#### 3.3.3.2

Im Verlauf der Arbeit stellte sich diese Aufreinigung als ungenügend heraus und sie wurde wie folgt durchgeführt.

Zwei Tage nach der Transduktion, die wie in 3.1.4 beschrieben durchgeführt wurde, wurden die Zellen mit dem QIAmp DNA Mini and Blood Mini Kit von QIAGEN nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

### 3.3.4 S1-Verdau der ssDNA

AAV's enthalten einzelsträngige DNA als Genom. Die DNA wird nach Infektion in der Zelle zu doppelsträngiger DNA prozessiert. Bei AAV's ist dieser Schritt für die Expression des Transgens limitierend. Zellen wurden demnach nur erfolgreich transduziert, wenn die virale DNA auch prozessiert wurde. Um die Infektiosität der Viren zu ermitteln, wurde daher analysiert, bei wie viel Prozent der Viren es nach der Transduktion auch zur Prozessierung und nur so zur Expression des Transgens kommt. Die Behandlung transduzierter Zellen mit S1-Nuklease diente dabei dem Verdau einzelsträngiger (nicht prozessierter) viraler DNA. Die zu doppelsträngiger DNA prozessierten Genome im Zelllysat wurden anschließend mittels qPCR quantifiziert.

Für den Verdau mischt man folgende Komponenten wie folgt

Überstand des Überstandes aus 3.2.2	10µl
10 U S1-Nuklease	0,1 µl/Probe
S1-Puffer	5 µl/Probe

Dieser Mix wird 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei 97°C für 15 min deaktiviert.

### 3.3.5 Aufreinigung der Proben

Um den S1-Puffer, Reste der S1-Nuklease, Salze und Reste des Kits aus der Probe zu entfernen, werden die Proben mit dem Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up system von Promega nach Protokoll aufgereinigt. Nun liegt aufgereinigte reine dsDNA in der Probe vor.

### 3.3.6 Polymerase Ketten Reaktion

Die Polymerase Ketten Reaktion ermöglicht es DNA in vitro zu vervielfältigen. In dieser Arbeit wurde neben der klassischen qualitativen PCR auch eine quantitative PCR (qPCR) durchgeführt. Folgend sind die grundlegenden Zusammensetzungen des Mastermixes (Tabelle 15) und der Temperaturprofile (Tabelle 16) gegeben.

Für die Optimierung wurden die Primer- und Sondenkonzentrationen in den Ansätzen verändert. Weiterhin wurde für die Etablierung der Duplex-PCR eine Gradienten-PCR gefahren. Genaue Angaben zu den jeweiligen Ansätzen werden im Ergebnissteil geliefert.

Tabelle 15: Beispielhafter Mastermix für qPCR

Bestanteil	Eingesetztes Volumen [ $\mu$ l]
1x H <sub>2</sub> O	17.375
10x Taq Puffer	2.5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2.0
10 mM dNTPs	0.5
10 $\mu$ M Primer TaqMan for	0.5
10 $\mu$ M Primer TaqMan rev	0.5
800 nM FAM Sonde	0.5
Taq HotStart Polymerase	0.125
Probe	1

$V_{\text{ges}} = 25 \mu\text{l}$

Tabelle 16: Temperaturprofil für die qPCR

Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer	Zyklen	Reaktionsschritt
95	10 min	1	Initiale Denaturierung
95	30 sec	A	Denaturierung
60	30 sec	B	Annealing
72	30 sec	C	Elongation

A-C wurden 40x wiederholt

### 3.4 Viruspartikelproduktion,-Aufreinigung, -Quantifizierung

#### 3.4.1 Aufreinigung des Pellets und des Überstandes

Für die Viruspartikelproduktion wurden die 293 T Spinner Zellen nach 3.1.4 transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen folgendermaßen geerntet.

Die gesamte Zellsuspension wurde bei 4°C, 1200 rpm 5min zentrifugiert. Die Viren liegen in den Zellen vor, also im Pellet. Dennoch kann es durch Zelltod zur Virusabgabe vorkommen, sodass einzelne Viren und virenhaltige Zellen im Überstand vorzufinden sind. Überstand und Pellet wurden demnach wie folgt getrennt voneinander behandelt.

##### 3.4.1.1 Aufreinigung Pellet

Das Pellet wurde in je 10 ml PBS resuspendiert, in 50 ml Falcon-Röhrchen gepoolt und weitere 5 min bei 4°C, 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde zum Überstand der Zellkultur gegeben. Die Pellets wurden in 25 ml PBS resuspendiert und wieder bei gleichbleibenden Bedingungen zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde nun jedoch verworfen. Die Pellets wurden in 5 ml PBS resuspendiert und 4-mal in einem Ethanol/Trockeneis-Bad aufgebrochen. Nach dem letzten Wärmeschritt wurde das Gemisch bei 11.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die rekombinanten AAVs, welche entweder bei -80°C gelagert oder sofort weiter verarbeitet werden mussten.

Zu dem AAV haltigen Überstand wurde nun 125 U/ml Benzonase dazugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Das Gemisch wurde alle 15 min geschwenkt. Anschließend wurde wieder bei 11.000 rpm, 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand musste entweder bei -80°C gelagert oder weiter aufgereinigt werden. Nach diesem Schritt wurden die Suspensionen aus Pellet und Überstand wieder gleich behandelt.

##### 3.4.1.2 Aufreinigung Überstand

Nachdem der Überstand von der ersten und zweiten (aus der Aufreinigung des Pellets) Zentrifugation gesammelt wurde, wurden die Salze gefällt. Dies geschah über die Zugabe von 20 ml, einer 2,5 M Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>)-Lösung, pro Liter Überstand. Nach 1-stündiger Inkubation bei 4 °C wurde das Gemisch bei 4°C 30 min und 4300 rpm zentrifugiert. Durch Zugabe von 325 ml PEG/NaCl (Zusammensetzung siehe Tabelle 8) pro Liter Überstand wurden die Viruspartikel über Nacht bei 4°C gefällt. Hiernach wurde der Niederschlag aufgeschüttelt und die Lösung bei 4°C, 30 Minuten lang bei 3800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in 5 ml NaCl/HEPES resuspendiert und 125 U/ml Benzonase dazugegeben. Alle 15 Minuten wurde das Gemisch geschwenkt, und insgesamt eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das Gemisch musste auch hier bei -80°C gelagert oder sofort weiter verarbeitet werden.

### 3.4.2 Erste Ultrazentrifugation

Bei der Ultrazentrifugation handelt es sich um eine Gradientenzentrifugation mit Iodixanol. Die unterschiedlichen Gradienten in den QuickSeal Tubes werden mit unterschiedlich konzentriertem Iodixanol herbeigeführt. Die Zusammensetzung der jeweiligen Schichten ist in Tabelle 17 gegeben.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Iodixanolgradienten

	15 % Iodixanol	25 % Iodixanol	40 % Iodixanol	54 % Iodixanol
PBS-MK	37,5 ml	28 ml	16,5 ml	5 ml
60% Iodixanol	12,5 ml	20 ml	33 ml	45 ml
Phenolrot	-	100 µl	-	80 µl
Vol./UZ-Tube	9 ml	6 ml	5 ml	5 ml

Beide AAV-Suspensionen wurden jeweils auf 14 ml mit PBS-MK Puffer aufgefüllt. Jeweils 14 ml wurden auf den Boden der UZ-Röhrchen gespritzt und langsam mit den Iodixanol-Lösungen unterschichtet (aufsteigende Konzentration). Die Röhrchen mussten auf 10 mg mit PBS-MK austariert werden. Anschließend wurden die Röhrchen verschweißt und in den UZ Rotor 70Ti platziert. Die UZ wurde mit folgendem Programm gestartet. 18°C, 54.000 rpm, 2 Stunden, langsame Beschleunigung, keine Bremsung beim Herunterfahren.

Die AAV-Partikel sollten sich nach der UZ in der 40% Schicht befinden. Diese Schicht wurde mittels einer Kanüle vorsichtig abgesaugt und gegebenenfalls bei -80°C gelagert.

### 3.4.3 Zweite Ultrazentrifugation

Die abgesaugten Fraktionen aus (3.4.2) wurden vereint und auf 28 ml mit PBS-MK aufgefüllt. 28 ml wurden wieder in ein UZ-Röhrchen gespritzt und mit Iodixanol unterschichtet. Bei der zweiten Zentrifugation wurde allerdings nur mit 25%, 40% und 54% unterschichtet (Zusammensetzung siehe Tabelle 17). Austarierung und Programm waren hier die gleichen wie bei der ersten Ultrazentrifugation.

Wieder sollten sich die AAV-Partikel bei 40% Schicht angesammelt haben. Etwa 4 ml dieser Schicht wurden wieder mit einer Kanüle abgesaugt und gegebenenfalls bei -80°C gelagert.

### 3.4.4 Ultrafiltration

Die abgesaugte AAV-Suspension aus der zweiten UZ, wurden nun mit PBS-MK auf das 10-fache Volumen aufgefüllt und mittels Ultrafiltrationsröhrchen, welches Proteine größer 100.00 Da zurückhält, aufkonzentriert. Bei Raumtemperatur wurde nun 2 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde solange wiederholt bis ca. 500 µl Konzentrat vorlagen. Das Konzentrat wurde in ein Eppendorf-Tube umgefüllt und bei -80°C gelagert.

### 3.4.5 Quantifizierung der Viruspartikel mittels quantitativer Real-time PCR

Für die spätere Belastung *in vivo* und *in vitro* ist es wichtig die rekombinante Partikelanzahl in dem Ultrafiltrationsprodukt zu kennen. Bestimmt wird die Anzahl an Virusgenomen, die nach dem Aufbruch der Partikel frei werden. Um trotz Aufreinigung, zurückgebliebene Plasmide in der Virussuspension zu entfernen, wird die Lösung zunächst mit DNase-I behandelt. Sich im Partikel befindliches Virusgenom wird dadurch nicht verdaut. Durch Amplifikation im CMV-Promotor-Bereich und Vergleich mit einem Virusgenom-Standard werden so DNase-resistente Partikel (DRP) quantifiziert.

#### 3.4.5.1 DNase I Verdau

Um nicht aufgereinigte DNA der Zellen zu beseitigen, wurde das RNase-Free DNase Set (50) Kit von QIAGEN wie folgt angewendet.

H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub>	23,75 µl
RDD Puffer	5 µl
DNase-I (10 U/µl)	1,25 µl
Virussuspension	20 µl
	V <sub>ges</sub> = 50 µl

Das Gemisch wird bei 25°C eine Stunde lang inkubiert.

#### 3.4.5.2 Aufbrechen der rAAV-Partikel

Um die DNA aus den Partikeln freizusetzen, wird dem Ansatz aus 3.4.5.1 50 µl 1 M NaOH Lösung zugegeben. Nach schüttelnder Inkubation bei 65°C für 45 Minuten und Abkühlen auf Raumtemperatur, wurde der Mix mit 50 µl 1 M HCl neutralisiert.

#### 3.4.5.3 Herstellung des Standards aus der CMV-Kassette

Um die Anzahl der DRP/µl später genau bestimmen zu können, lief in der qPCR ein Standard mit bekannter Konzentration mit. Jener wurde aus der CMV-Kassette des pAAV-NP-Plasmids gewonnen.

Dazu wurde ein SmaI – Verdau des pAAV-NP-Plasmids durchgeführt. SmaI schneidet die CMV-Kassette aus dem Plasmid.

Plasmid DNA	1 µl
Puffer Tango	2 µl
SmaI	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	16,5 µl

Das Gemisch wurde 1-16 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Die Bande der CMV-Kassette wurde bei 1500 kDa erwartet. Mit einem Skalpell wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Über das Promega Kit wurde die DNA nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Konzentration des Aufreinigungsproduktes wurde im Nanodrop bestimmt. Zur Kontrolle wurden noch einmal 5 µl des Produktes auf ein Gel aufgetragen. War nur eine Bande bei 1500 kDa zu sehen, war der Verdau und die Aufreinigung erfolgreich. Die Konzentration des Standards wurde nun mit destilliertem Wasser auf 1 ng/µl eingestellt.

#### 3.4.5.4 Quantifizierung der rAAV-Partikel

Die Quantifizierung erfolgte, wie bereits erwähnt, über eine qPCR auf die CMV-Kassette. Die Messung der Proben erfolgte in technischen Triplikaten. Die rAAV Probe wurde hierfür in Zehner-Schritten auf  $10^{-3}$  verdünnt. Zusätzlich wurde ein CMV-Standard mit bekannter Konzentration eingesetzt, welcher vorher über Gelextraktion und Aufreinigung aus der CMV-Kassette des NP-Plasmids gewonnen wurde (siehe 3.4.5.3). Der Standard wurde bis  $10^{-4}$  verdünnt. Wasser und der Durchfluss der Ultrafiltration (bis  $10^{-2}$  verdünnt) wurden als Negativkontrollen eingesetzt.

Der Mastermix und das Temperaturprogramm sind in ihrer genauen Zusammensetzung in Tabelle 15 und Tabelle 16 gegeben.

Über den verdünnten Standard mit den dazugehörigen CT-Werten aus der qPCR, kann mittels exponentieller Regression die Formel bestimmt werden, die es ermöglicht, die DNase resistenten Partikel in der Probe zu bestimmen. Hierfür wurde vorab bestimmt wie viele Moleküle in 1ng des Standards vorhanden sind.

Hierfür bestimmte man das Molekulargewicht des CMV-Standards mittels folgender Formel.

**Molekulargewicht MW des DNA Fragmentes [g/mol]**

=

**$[(313,2 \cdot A) + (329,2 \cdot G) + (289,2 \cdot C) + (304,2 \cdot T)] - (62 \cdot 2) =$**

Tabelle 18 gibt die Häufigkeit der Nukleotide im Standard an

Tabelle 18: Häufigkeit der Nukleotide im Standard

Nukleotid	Häufigkeit
A	889
C	1247
G	394381,6
T	266479,2

Über die oben genannte Formel ergibt sich der MW des Standards zu 1311027 g/mol. 1 ng-Äquivalent ist somit  $7,3276 \cdot 10^{-16}$ . So errechnet sich über die Avogadro Konstante ( $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ) die Anzahl der Moleküle zu  $4,59 \cdot 10^8$  pro ng.

Tabelle 19 gibt beispielhafte CT-Werte, um die Berechnung der Geraden über exponentieller Regression zu demonstrieren. Der gegebene CT-Wert ist gemittelt. Aus der Triplikatenbestimmung wurden die CT-Werte generell so ausgewählt, dass unter ihnen keine größere Abweichung als 0,8 liegen durfte und CT-Werte über 33 nicht gewertet wurden.

Tabelle 19: Beispielhafte CT-Werte eine Real Time

Konzentration Standard	Gemittelter CT-Wert	Anzahl der Molkeüle
1 ng	20,26	4,59E+08
10 <sup>-1</sup>	23,65	4,59E+07
10 <sup>-2</sup>	27,02	4,59E+06
10 <sup>-3</sup>	30,47	4,59E+05
10 <sup>-4</sup>	34,51	4,59E+04

Die daraus resultierende Gerade mit exponentieller Regression. Bestimmtheitsmaß und Formel werden in Abbildung 1 gegeben

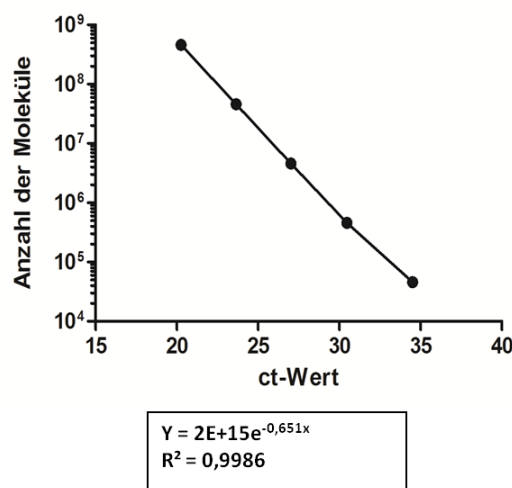


Abbildung 1: Beispielhafter Verlauf der CT-Werte aus Tabelle 19

Graphische Darstellung der in Tabelle 19 gegebenen Werte mit Bestimmtheitsmaß und Exponentieller Regressionsgeraden

Über die Regressionsgerade kann nun anhand der CT-Werte für die verdünnten Proben die Anzahl der Moleküle bestimmt und unter Berücksichtigung der Verdünnungen durch den DNase Verdau und den Aufbruch der Viren, die DRPs/μl errechnet werden. (DRPs/μl = Anzahl der Moleküle \* Verdünnungsfaktor (VF)) (Siehe Tabelle 20). Die Werte der 10<sup>-1</sup> und 10<sup>-2</sup> Verdünnung wurden in diesem Beispiel nicht gewertet, da ihre CT-Werte außerhalb des Standards liegen. Für die Probe würde sich eine Virusmenge von 5,10E+09 DRPs/μl ergeben.

Tabelle 20: Beispielhafte Berechnung der DRPs/μl

Konz. Probe	Gem.CT-Wert	Anzahl der Molkeüle	VF	DRPs/μl
10 <sup>1</sup>	22,88	6,80E+08	7,5	5,10E+09
10 <sup>-1</sup>	37,84	3,99E+04	75	
10 <sup>-2</sup>	36,62	8,86E+04	750	

## 4. Ergebnisse

Das Ziel der Arbeit war es mittels einer Real-Time PCR und eines Sandwich-ELISAs die generierten infektiösen rAAV2.9-NPcosw-V5 Partikel zu quantifizieren. Mit der qPCR soll die Infektiosität der Partikel genau bestimmt werden. Der Sandwich-ELISA soll die Anzahl intakter Partikel quantifizieren. Über die Menge der intakten Partikel kann so auch auf die Anzahl möglicher infektiöser Partikel rückgeschlossen werden.

Die Real-Time PCR macht sich die Eigenschaft der infektiösen Partikel zu Nutze, dass ihr Genom zu doppelsträngigen DNA-Molekülen umgewandelt wird [47], wenn sie eine Zelle infiziert haben. DNA-Moleküle nicht infektiöser Partikel liegen weiterhin einzelsträngig vor. So kann über die Real-Time PCR die Menge an infektiösen rekombinanten Partikeln in einer Viruspräparation genau bestimmt werden.

Neben der Etablierung der qRT-PCR wurden zudem die Transduktionsraten des rekombinanten Virus in unterschiedlichen Zelllinien getestet. Ebenso wurden Mittel zur Steigerung der Transduktionsrate und ihre Auswirkungen auf die Prozessierung der viralen DNA in der Wirtszelle untersucht.

Der Sandwich-ELISA soll über einen kommerziell erwerblichen Antikörper, der sich spezifisch gegen ein Oberflächenproteinepitop richtet, die intakten Partikel binden. Als Detektionsantikörper sollte ein polyklonaler Antikörper in Ratten hergestellt werden. Anhand dieses Sandwichs soll die Menge an intakten Partikeln in einer Viruspräparation bestimmt werden.

Die Ergebnisse werden im Folgenden zusammengefasst.

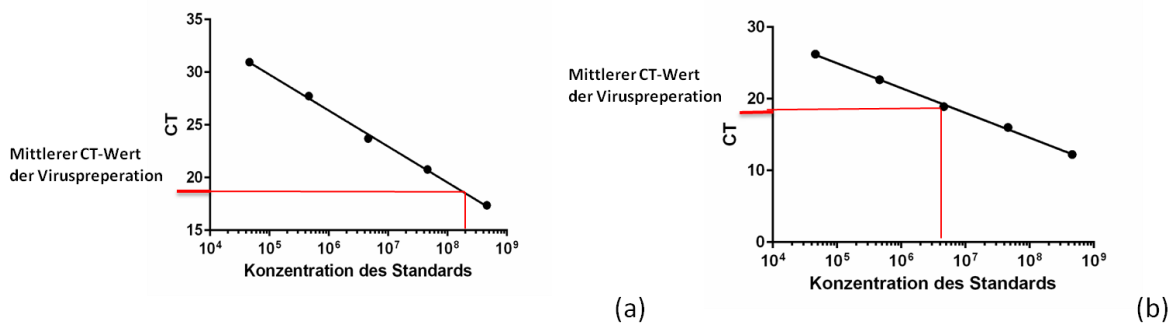
### 4.1 Herstellung der rekombinanten AAV9-Partikel.

Die Herstellung der rekombinanten AAV9-Partikel, welche für die unterschiedlichen Versuche eingesetzt wurden, erfolgte zweimal in einer 1L Kultur. Die Zellen wurden mit 3 Plasmiden transfiziert:

pAAV-NPcosw-V5	codiert für das Nukleoprotein des pandemischen Influenza A-Virus (A/Mexico/4603/2009 (H1N1)), welches von einem CMV-Promotor getrieben und von einem pA-Terminator begrenzt wird. Promoter und NP-Gen sind von <i>inverted terminal repeats</i> (ITR) umflankt. Diese sind für die Verpackung des Genoms in das Capsid und für die Prozessierung in der Zelle notwendig. Co = codon-optimiert, sw = eng. Swine, V5 = engl. V5-flag
pHelper	enthält für die Produktion der Viruspartikel notwendige adenovirale Helfergene: E2A, E4 und VA. E1 ist im Genom der 293 T Zellen enthalten.
p5E18VD2/9	enthält die Strukturproteine für das AAV-Capsid

Die Transfektion erfolgte wie in 3.1.4 beschrieben. Die DNA setzte sich dabei aus 264 µg ,pAAV-NPcosw-V5, 264µg p5E18VD2.9 und 462µg pHelper zusammen. Der entstehende Virus ist in der Lage Zellen zu infizieren, kann aber nicht replizieren, da weiterhin Proteine fehlen, welche für die Knospung und Entstehung des Capsids zuständig sind.

Die Aufreinigung und Quantifizierung (s. 3.4) der entstandenen Viren über die qPCR erbrachte eine Ausbeute von  $8,99 \times 10^9$  DRP/µl in der ersten Präparation und  $5,13 \times 10^8$  DRPs/µl in der Zweiten. Die graphische Darstellung der CT-Werte ist in Abbildung 2 gegeben.



**Abbildung 2: Graphische Auswertung der Viruspartikel Quantifizierung**

(a) zeigt die graphische Darstellung der gemittelten CT-Werte der Proben gegenüber der Standardkonzentration in der ersten Viruspartikelproduktion, (b) die Werte der Zweiten. Beide zeigen einen mittleren CT-Wert von ca. 19 und so errechnet sich die Anzahl der DRPs/µl zu von  $8,99 \times 10^9$  DRP/µl in der ersten Präparation und zu  $5,13 \times 10^8$  DRPs/µl in der Zweiten.

Für die Transduktion wurden die Zellen pro Well mit einer unterschiedlichen Anzahl der Viruspartikel belastet. Die Partikelanzahl wurde auf die jeweilige Konfluenz des Wells abgestimmt. Auf ein Well wurde bei 100 % Konfluenz  $10^5$  Viruspartikel/Zelle (Vp/Zelle) appliziert, auf ein anderes Well  $10^4$  Vp/Zelle.

So sollte ein möglicher Trend in der Menge der nötigen Viruspartikel für die Transduktionsrate ermittelt werden.

## 4.2 Bestimmung der Transduktionsbedingungen

Für die Etablierung der qPCR war es von Vorteil eine hohe Anzahl von infizierten Zellen nach der Transduktion vorliegen zu haben. Da Adeno-assoziierte Viren verschiedene Gewebszellen unterschiedlich gut infizieren können [46], sollte untersucht werden, welche der zu Beginn der Arbeit kultivierten Zelllinien sich am besten mit dem rekombinanten AAV9 transduzieren ließ.

Weiter wurden kommerziell erwerbliche Mittel (*ViraDuctin™* und *Adenovirus 5*) auf ihre Auswirkung bezüglich der Prozessierung des viralen Genoms in der Zelle untersucht. In der Literatur wurde ein positiver Effekt auf die Steigerung der prozessierten DNA durch *ViraDuctin™* und *Adenovirus 5* bereits beobachtet [49, 50].

Das kommerziell erwerbliche *ViraDuctin™* Kit von *Cell Biolabs* wirkt sich laut Hersteller positiv auf die Synthese des zweiten viralen Stranges der AAVs aus [50]. Dieser Schritt im Infektionszyklus der AAVs ist laut Literatur als limitierende Konstante bekannt [51, 52]. Das Kit soll so die Menge an transgenem Nukleoprotein in den transduzierten Zellen steigern. Zusätzlich wird die Transduktionsrate ebenfalls gesteigert. Eine genaue Wirkung und Zusammensetzung der Reagenzien wird nicht angegeben.

Adenoviren des Serologietyp 5 (*Adenovirus 5*) sind bekannte Helferviren der Adeno-assoziierten Viren. Laut Literatur liefern sie Proteine, die zu einer höheren Transkriptionsrate des AAV-Genoms führen [53]. Der genaue Mechanismus ist auch hier noch nicht erforscht. Es ist bekannt, dass die Helferproteine aus der frühen/E Region des viralen Adenovirusgenoms abgelesen werden [54]. Allgemein sind Adenovirenproteine, die mit dieser Region assoziiert sind, unter anderem auch für die Synthese des zweiten viralen Stranges und der Prozessierung der späteren viralen *Adenovirus 5* Proteine wichtig [55, 56].

Welches der beiden Produkte einen besseren Effekt auf die Menge des transgenen Nukleoproteins hat und welche Zelllinie für die folgenden Versuche am vorteilhaftesten war wird im Folgenden dargestellt.

### 4.2.1 Vergleich der Transduktionseffizienz des AAV2.9 in humanen und caninen Zelllinien

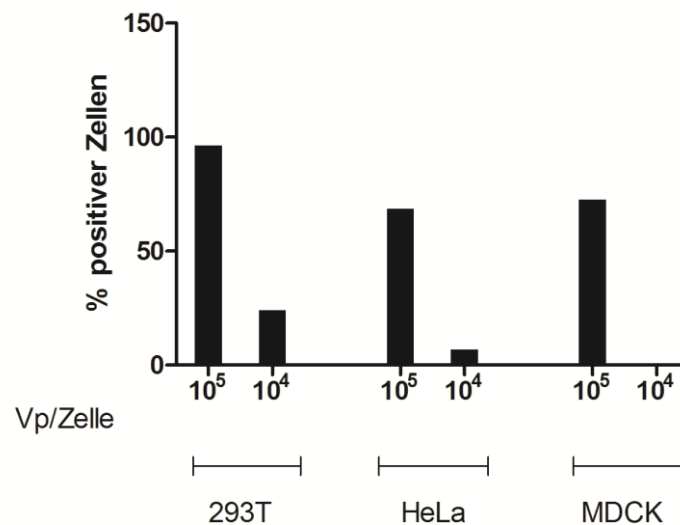
Zu Beginn der Arbeit wurden die zwei humanen Zelllinien HEK 293 T, HeLa und die canine Zelllinie MDCK kultiviert. Die Zelllinie, die die größte Anzahl an infizierten Zellen nach der Transduktion aufwies, sollte für weitere Versuche verwendet werden. Für die Untersuchung der erfolgreichen Transduktion wurde auf die Eigenschaft zurückgegriffen, dass infizierte Zellen das im viralen Genom codierte Transgen exprimieren.

Eine positiv transduzierte Zelle exprimierte demnach das mit dem V5-Tag markierte virale Nukleoprotein. Die Anzahl der Protein exprimierenden Zellen konnte mittels Durchflusszytometrie, Western Blot und Immunfluoreszenz bestimmt werden. Dies erlaubte Rückschlüsse auf die individuelle Transduktionsrate der Zelllinien.

Für die Transduktion wurde jede Zelllinie in zwei Gruppen aufgeteilt. Ein Well pro Platte wurde mit einer Partikelanzahl von  $10^5$  Partikel/Zelle und die andere Gruppe wurde mit  $10^4$  Partikel/Zelle belastet. Zusätzlich blieb eine Gruppe unbelastet (naive Zellen/Negativkontrolle). Die Positivkontrolle stellte eine mit dem pAAV-NPcosw-V5-Plasmid transfizierte Gruppe da.

#### 4.2.1.1 Durchflusszytometrie

Zwei Tage nach der Transduktion mit dem rAAV2.9-NPcosw-V5 wurden die Zellen permeabilisiert und fixiert. Der Anteil transduzierter Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie an dem FACS Calibur gemessen. Die Markierung des transgenen Nukleoproteins erfolgte intrazellulär mit dem primären Anti-V5 (Maus) Antikörper und dem sekundären Anti-Maus-IgG 488. Positiv transduzierte Zellen fluoreszierten im FL-2/FITC Kanal nach Anregung bei 488 nm. Die Zählung lieferte folgende Ergebnisse.



**Abbildung 3: Graphische Auswertung der Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie**

Dargestellt werden die Prozentzahlen der positiv transduzierten Zellen (fluoreszierende Zellen). Es wurden 10<sup>5</sup> oder 10<sup>4</sup> Viruspartikel des AAV2.9-NPcosw-V5 pro Zelle (Vp/Zelle) auf die adhären wachsenden Zellen appliziert.

Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transduktion geerntet. Intrazelluläre Färbung des NPcosw-V5 erfolgte mit dem primären Anti-V5 (Maus) (1:100) und dem sekundären Anti-Maus-IgG 488 (1:100) Antikörper. Es wurden jeweils 100.000 Zellen gezählt, wobei apoptotische Zellen nicht ausgewertet wurden.

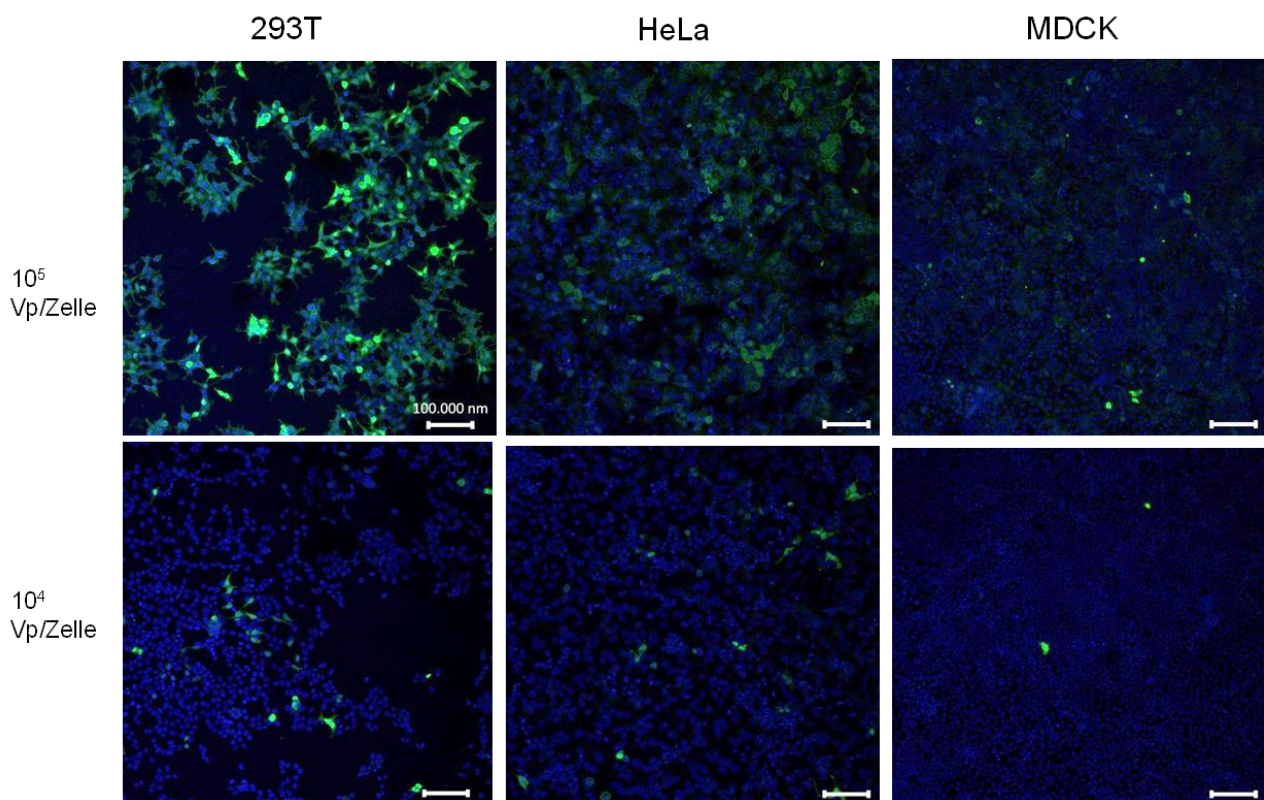
In Abbildung 3 ist zu sehen, dass die Anzahl der transduzierten Zellen in der 293 T Zelllinie mit 96,3 %, bei einer Viruslast von 10<sup>5</sup> Vp/Zelle, die höchste Transduktionsrate der drei Zelllinien erreichte. Auch bei der Belastung mit 10<sup>4</sup> Vp/Zelle, erreichte die 293 T Zelllinie mit 24 % die höchste Rate. In der HeLa und MDCK Zelllinie konnte eine Transduktionsrate von 68 % und 72 % erzielt werden, wenn sie mit 10<sup>5</sup> Vp/Zelle belastet wurden. Lediglich 6 % positive Zellen konnten in der HeLa Zelllinie bei einer Belastung von 10<sup>4</sup> Vp/Zelle gezählt werden. In den MDCK Zellen lag die Rate bei unter 1 %.

#### 4.2.1.2 Immunfluoreszenz

Die Transduktion wurde wie in 3.1.5 beschrieben durchgeführt. Belastung der Zellen erfolgte wieder mit 10<sup>5</sup> und 10<sup>4</sup> Vp/Zelle des rAAV2.9-NPcosw-V5. Zwei Tage nach der Transduktion wurden die Zellen fixiert. Intrazelluläre Färbung erfolgte mit Anti-V5 (Maus), Anti-Maus-IgG 488 und Hoechst-Reagenz. Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenz Mikroskop analysiert (siehe Abbildung 4). Das

transgene Nukleoprotein war im FITC – Kanal nach Anregung bei 488 nm detektierbar (grün). Mittels der Färbung mit Hoechst – Reagenz konnten die Zellkerne blau dargestellt werden.

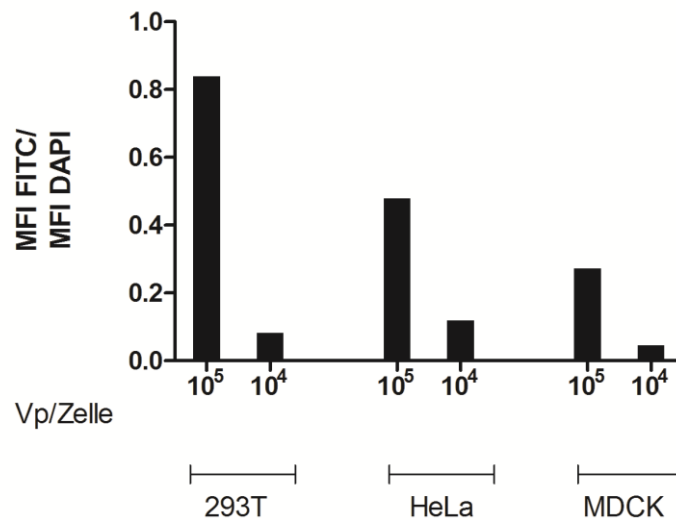
Die MDCK Zellen zeigten die geringste Anzahl an fluoreszierenden Zellen in beiden Belastungsgruppen. 293 T Zellen fluoreszierten stärker, wenn sie mit  $10^5$  Vp/Zelle belastet wurden, im Vergleich zu der HeLa Zelllinie. Wenn die Zellen mit  $10^4$  Vp/Zelle belastet wurden, war es bildlich schwer einzuschätzen, welche der beiden Zelllinien eine größere Anzahl von infizierten Zellen aufwies. Um die Bilder in ein besseres Verhältnis zueinander setzen zu können, wurden die gemittelten Intensitäten bestimmt. Die Auswertung wird in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 4: Immunfluoreszenz der drei Zelllinien**

Intrazelluläre Färbung des NPcosw-V5, zwei Tage nach der Transduktion der 293 T, HeLa, und MDCK Zellen mit dem rAAV2.9–NPcosw-V5 ( $\approx 10^5$  und  $10^4$  Vp/Zelle appliziert). Die Färbung erfolgte mittels primärem Anti-V5 (Maus) (1:250) und sekundärem Anti-Maus-IgG 488 (1:250) Antikörper. Zellkerne wurden mit Hoechst-Reagenz (1:30.000) gefärbt. 293 T Zellen zeigten die höchste Transduktionsrate. MDCK Zellen zeigten die geringste Transgenexpression nach Transduktion. Die naiven Zellen zeigten keine Fluoreszenz (nicht gezeigt). Die Bilder wurden bei zehnfacher Vergrößerung aufgenommen.

Abbildung 5 zeigt den Quotient der gemittelten Fluoreszenzintensitäten von grün (NPcosw-V5) und blau (Zelle). Je höher dieser Quotient lag, desto größer war demnach der Anteil des Transgens in den Zellen.



#### Abbildung 5: Intensitätsauswertung der Immunfluoreszenzquotienten

Intensitätsauswertung der Immunfluoreszenzquotienten der mittleren Intensität des grün fluoreszierenden NP-cosw-V5 und der blau erscheinenden Zellkerne. 293 T Zellen, HeLa Zellen und MDCK Zellen wurden mit  $10^5$  oder mit  $10^4$  Vp/Zelle des rAAV2.9-NP-cosw-V5 transduziert. NP-cosw-V5 wurde mittels Anti-V5 (Maus) primärer Antikörper (1:250) und Anti-Maus-IgG 488 sekundärer Antikörper (1:250) detektiert. Zellkerne wurden mittels Hoechst-Reagenz (1:30.000) gefärbt. Bei der Transduktion mit  $10^5$  Vp/Zelle zeigt sich eine verschieden starke Expression des Transgens. Dieser Unterschied zwischen den Zelllinien ist nicht erkennbar wenn sie mit  $10^4$  Vp/Zelle transduziert wurden.

Anhand der graphischen Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität ist zu sehen, dass die 293 T Zellen den größten Quotienten in der  $10^5$  Vp/Zelle Gruppe erzielten (0,8 im Vergleich zu 0,4 HeLa und 0,2 MDCK). Zellen, die mit  $10^4$  Vp/Zelle belastet wurden, erreichten Werte von 0,1 (HeLa), 0,08 (293 T) und 0,04 (MDCK).

#### 4.2.1.3 Western Blot

Um die Menge des transgenen Nukleoproteins (NPcosw-V5) pro Belastungsgruppe quantifizieren zu können, wurde ein Western Blot, nach der SDS-Page Proteinauftrennung durchgeführt (siehe 3.2.2/3). Abbildung 6 zeigt die Auswertung über Li-Cor Odyssey und der Anti- $\beta$ -Aktin Färbung (a). Die Intensitäten der Banden aus beiden Färbungen wurden mittels *ImageJ* berechnet und als Quotient (Banden des Nukleoproteins/Intensität der Aktin-Bande) graphisch dargestellt (b).



#### Abbildung 6: Western Blot der drei Zelllinien

Darstellung der Ergebnisse des Western Blots. Zwei Tage nach der Transduktion mit dem rAAV2.9-NPcosw-V5 wurden die Zellen nach 3.1.8 lysiert. **(a)** Western Blot von den Zellysaten der 293 T, HeLa und MDCK Zelllinie die mit jeweils 10<sup>5</sup> Vp/Zelle oder 10<sup>4</sup> Vp/Zelle transduziert wurden. Das transgene NPcosw-V5 wurde mit dem primären Anti-V5 (Maus) (1:5000) und dem sekundären Anti-Maus-IgG- 680 (1:5000) markiert. Als Ladekontrolle diente Aktin, welches mit einem Anti-β-Aktin-HRPO Antikörper (1:50.000) detektiert wurde. Die Banden des Npcosw-V5 wurden bei 57 kDa detektiert, die Aktin-Bande bei 42 kDa.

In **(b)** wurde graphisch, mittels *ImageJ* das Verhältnis der Intensitäten der NPcosw-V5 Bande und der β-Aktin Bande dargestellt. Man kann erkennen, dass die 293 T Zellen das transgene Nucleoprotein am stärksten exprimierten, wenn die Zellen mit 10<sup>5</sup> Vp/Zelle belastet wurden.

In Abbildung 6 (a) ist zu sehen, dass die 293 T Zellen nach Transduktion mit 10<sup>5</sup> Vp/Zelle die größte Menge Transgen, relativ zu der Zellmenge, produzierten. (Faktor 1,8 bei 293 T gegenüber 1,5 für HeLa Zellen und 1,21 für MDCK Zellen). Bei der Transduktion der Zellen mit 10<sup>4</sup> Vp/Zelle ergab sich zwischen den Zelllinien keinen erkennbaren Unterschied in Hinsicht auf die Stärke der Transgenexpression (Faktor 0,1). Die naiven Zellen zeigten keine transgene NPcosw-V5 Bande.

In jeder Methode erzielten die 293 T Zellen, wenn mit 10<sup>5</sup> Vp/Zelle belastet, die höchste Anzahl an positiv transduzierten Zellen. Wenn die Zellen mit 10<sup>4</sup> Vp/Zelle belastet wurden, war kein großer Unterschied zu erkennen. Für die kommenden Versuche sollte demnach die 293 T Zelllinie weiter verwendet werden. Weitere Beobachtungen werden ausführlich in 5.0 diskutiert.

#### 4.2.2 Verbesserung der Transduktionsrate durch *ViraDuctin™* und *Adenovirus 5*

*ViraDuctin™* und *Adenovirus 5* sind laut Literatur, wie in 4.2 beschrieben, Kandidaten zur Steigerung der Transduktionsrate und zur Steigerung der Menge des transgenen NPcosw-V5. Letzteres indem sie die Prozessierung der DNA in der Zelle beeinflussen. Der genaue Effekt auf die Prozessierung der DNA ist in beiden Fällen nicht bekannt.

In diesem Abschnitt sollte untersucht werden ob *ViraDuctin™* und *Adenovirus 5* auch die Prozessierung des rAAV2.9-NPcosw-V5 positiv beeinflussen können, wenn humane HEK 293 T Zellen mit dem rekombinanten Virus transduziert werden.

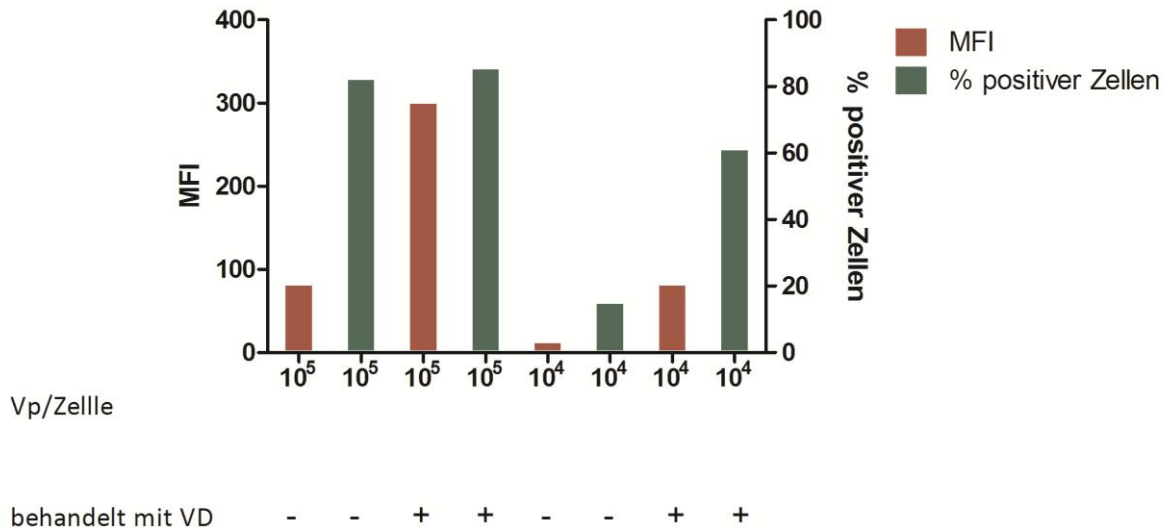
Dazu wurden die 293 T Zellen einen Tag vor der Transduktion entweder mit *ViraDuctin™* behandelt oder es fand eine Superinfektion mit *Adenovirus 5* statt. Einen Tag später wurden  $10^5$  oder  $10^4$  Vp/Zelle auf ein vorher behandeltes Well und ein nicht behandeltes Well appliziert.

Für die Bestimmung der Transduktionsraten und Einfluss der Mittel wurde das transgene NPcosw-V5 mittels Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz und Western Blot quantifiziert. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

#### 4.2.2.1 Durchflusszytometrie

Der Anteil positiv transduzierter Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie an dem FACS Calibur gemessen. Zusätzlich fand eine Bestimmung des MFI (engl: mean fluorescence intensity=MFI) der Zellen statt. Das transgene Nukleoprotein wurde intrazellulär mit dem primären Anti-V5 (Maus) und dem sekundären Anti-Maus-IgG 488 Antikörper markiert. Positiv transduzierte Zellen fluoreszierten im FL-2/FITC Kanal nach Anregung bei 488 nm. Die Zählung erfolgte zu 10.000 Zellen.

In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass sich die Anzahl positiv transduzierter Zellen, wenn mit *ViraDuctin™* behandelt nicht erhöhen ließ, wenn die Zellen mit  $10^5$  Vp/Zelle belastet wurden (ohne *ViraDuctin™* 82 % positive Zellen, mit *ViraDuctin™* 85 % positive Zellen). Bei der Transduktion mit  $10^4$  Vp/Zelle, konnte eine Steigerung der Transduktionseffizienz gemessen werden (ohne *ViraDuctin™* 14 % positive Zellen, mit *ViraDuctin™* 60 % positive Zellen). Wurden die Messergebnisse nicht nach der Anzahl der positiven Zellen, sondern nach der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) ausgewertet, konnte eine Steigerung der Fluoreszenz auch bei den mit *ViraDuctin™* behandelten und mit  $10^5$  Vp/Zelle belasteten Zellen nachgewiesen werden (ohne *ViraDuctin™*: MFI = 80, mit *ViraDuctin™*: MFI = 299). Bei Zellen, die mit  $10^4$  Vp/Zelle transduziert wurden, stieg die MFI von 11, wenn nicht behandelt auf 80, wenn behandelt, an.

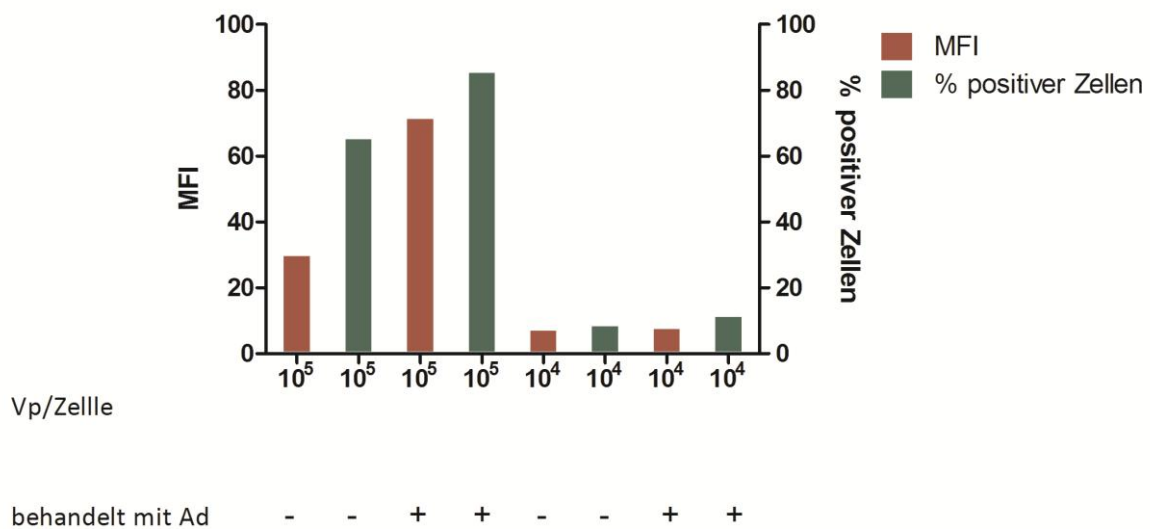


**Abbildung 7: Durchflusszytometrie der mit *ViraDuctin*<sup>™</sup> behandelten Zellen**

Transduktionsraten der 293 T Zellen nach Transduktion mit 10<sup>5</sup> oder 10<sup>4</sup> Vp/Zelle des rAAV2.9-NPcosw-V5 mit oder ohne vorherige Behandlung mit *ViraDuctin*<sup>™</sup>. Die Behandlung mit *ViraDuctin*<sup>™</sup> erfolgte einen Tag vor der Transduktion. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transduktion geerntet. Intrazelluläre Färbung des transgenen NPcosw-V5 erfolgte über den primären Anti-V5 (Maus) (1:100) und den sekundären Anti-Maus-IgG 488 (1:100) Antikörper. Zusätzlich wurde eine Färbung toter Zellen mit 7-AAD durchgeführt. Gezählt wurden 10.000 Zellen.

Der Graph zeigt die „Anzahl positiver Zellen“ in grün und die MFI in rot. Ein Anstieg der Transduktionsrate nach Behandlung der Zellen mit *ViraDuctin*<sup>™</sup> ist zu erkennen, wenn die Zellen mit 10<sup>4</sup> Vp/Zelle belastet wurden. Eine Steigerung der Transduktionsrate ist im Fall der Belastung mit 10<sup>5</sup> Vp/Zelle nicht zu erkennen. Jedoch ist ein Anstieg in dem MFI-Faktor der Zellen zu beobachten.

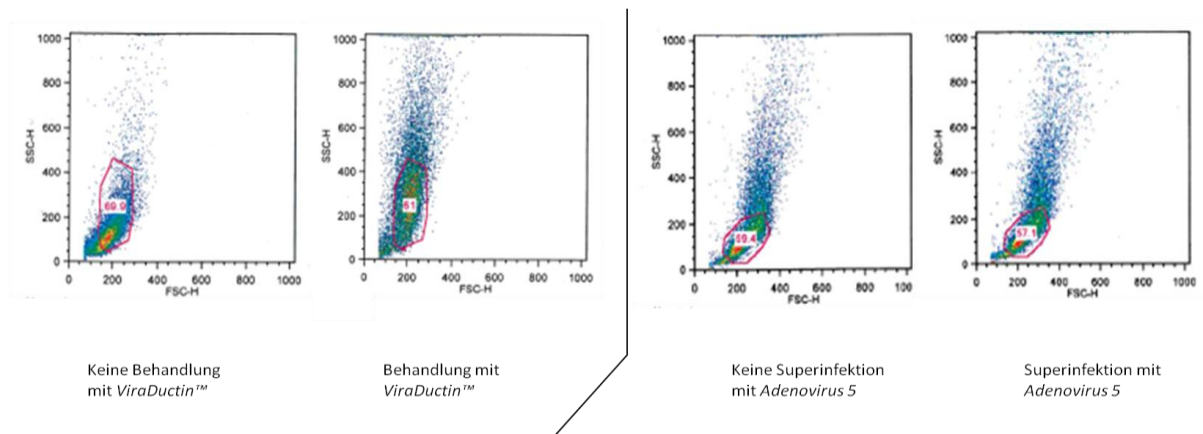
Bei der Superinfektion der 293 T Zellen mit *Adenovirus 5* konnte ein Anstieg, bei den mit 10<sup>5</sup> Vp/Zelle belasteten und mit *Adenovirus 5* infizierten Zellen gegenüber jenen, die nicht mit *Adenovirus 5* behandelt wurden, bezüglich ihrer Transduktionsrate beobachtet werden. Die Anzahl der positiv transduzierten Zellen stieg von 65 % auf 85 % an. Bei der Belastung mit 10<sup>4</sup> Vp/Zelle war ein Anstieg von 8% auf 11% positiver Zellen zu beobachten. Die MFI veränderte sich von 65 auf 85 bei der Transduktion mit 10<sup>5</sup> Vp/Zelle. Der MFI zeigte kaum eine Veränderung wenn die Zellen mit 10<sup>4</sup> Vp/Zelle belastet wurden (ohne *Adenovirus 5*: MFI = 6, mit *Adenovirus 5*: MFI = 7).



**Abbildung 8: Durchflusszytometrie der mit Adenovirus 5 superinfizierten Zellen**

Transduktionsraten der 293 T Zellen nach Zugabe von  $10^5$  oder  $10^4$  Vp/Zelle des rAAV2.9-NPcosw-V5 mit oder ohne Superinfektion durch Adenovirus 5. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transduktion geerntet. Intrazelluläre Färbung des transgenen NPcosw-V5 erfolgte über den primären Anti-V5 (Maus) (1:100) und den sekundären Anti-Maus-IgG 488 (1:100) Antikörper. Zusätzlich fand eine Färbung toter Zellen mit 7-AAD statt. Der Graph zeigt die „Anzahl positiver Zellen“ in grün und die MFI in rot. Ein Anstieg der Transduktionsrate nach Superinfektion mit Adenovirus 5, ist zu erkennen, wenn man die mit  $10^5$  Vp/Zelle belastete Gruppe betrachtet. Ein geringer Anstieg im MFI oder in der Menge der transduzierten Zellen ist zu erkennen, wenn die Zellen mit  $10^4$  Vp/Zelle belastet wurden.

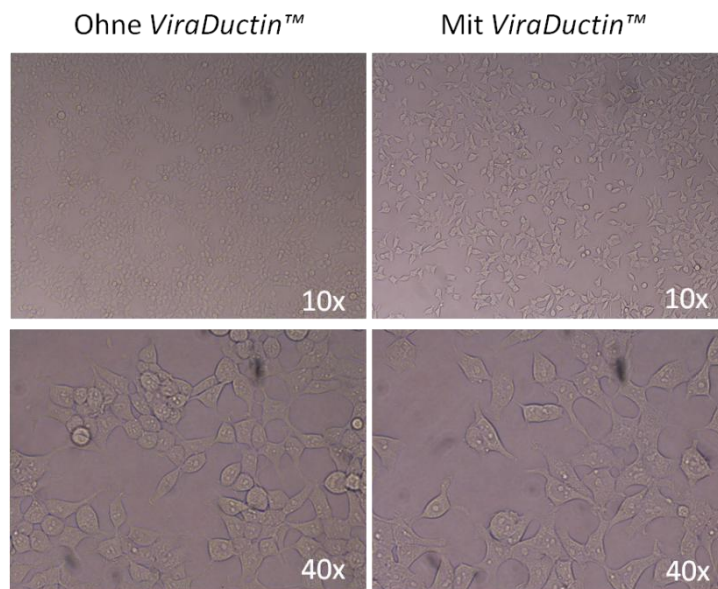
Bei der Behandlung mit *ViraDuctin™* war auffällig, dass die mit *ViraDuctin™* behandelten Zellen bei einer Anregung von 488 nm stärker im SSC/FITC Kanal strahlten (Seitwärtsstreulicht/Vorwärtsstreulicht). Diese Verschiebung zum Kanal des Seitwärtsstreulicht lässt darauf schließen, dass die Zellen granulöser, also apoptotisch waren. Zellen, denen eine Superinfektion mit Adenovirus 5 vorausging, zeigten diesen Effekt zwei Tage nach der Transduktion nicht.



**Abbildung 9: Verschiebung im SSC/FSC Kanal**

Durchflusszytometrie der mit  $10^5$  Vp/Zelle rAAV2.9-NPcosw-V5 transduzierten Zellen mit oder ohne vorherige Behandlung mit ViraDuctin (links) oder Superinfektion mit *Adenovirus 5* (rechts) im SSC/FSC Kanal. Zellen, die mit Viraductin behandelt wurden, zeigten eine Verschiebung der Population im Seitwärtsstreulicht

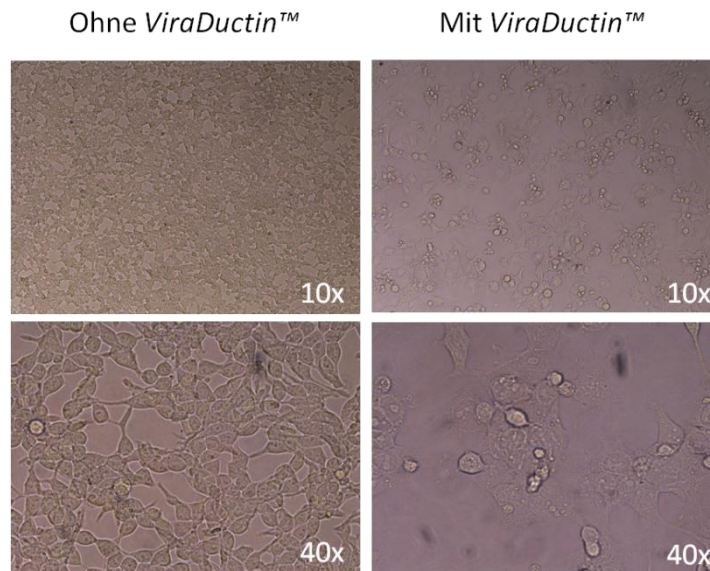
Die Veränderung der Zellstruktur nach der Behandlung mit *ViraDuctin™* und Transduktion mit dem rAAV2.9-NPcosw-V5 war auch mikroskopisch zu beobachten. Einen Tag nach der Behandlung mit *ViraDuctin™* zeigten die Zellen im Vergleich keine mikroskopische Veränderung (Abbildung 10). An diesem Tag wurde auch die Transduktion durchgeführt. Einen Tag nach der Transduktion konnte jedoch eine mikroskopische Veränderung beobachtet werden (Abbildung 11).



**Abbildung 10: Mikroskopische Beobachtung der Zellen**

Aufnahme ein Tag nach *ViraDuctin™*- Behandlung, vor der Transduktion mit den rAAV-Partikeln. 10x vergrößert in der oberen Spalte, 40x vergrößert in der unteren Spalte. Links unbehandelte Zellen, rechts mit *ViraDuctin™* behandelte Zellen. Die behandelten Zellen zeigten keine Vergrößerung und Veränderung ihrer Form.

Die Veränderung der Zellen ein Tag nach der Transduktion und vorangegangener Behandlung mit *ViraDuctin™* gleicht einem zytopathischem Effekt (Abbildung 11). Die mit *Adenovirus 5* behandelten Zellen zeigten keine mikroskopische Veränderung (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 11: Mikroskopische Beobachtung der Zellen**

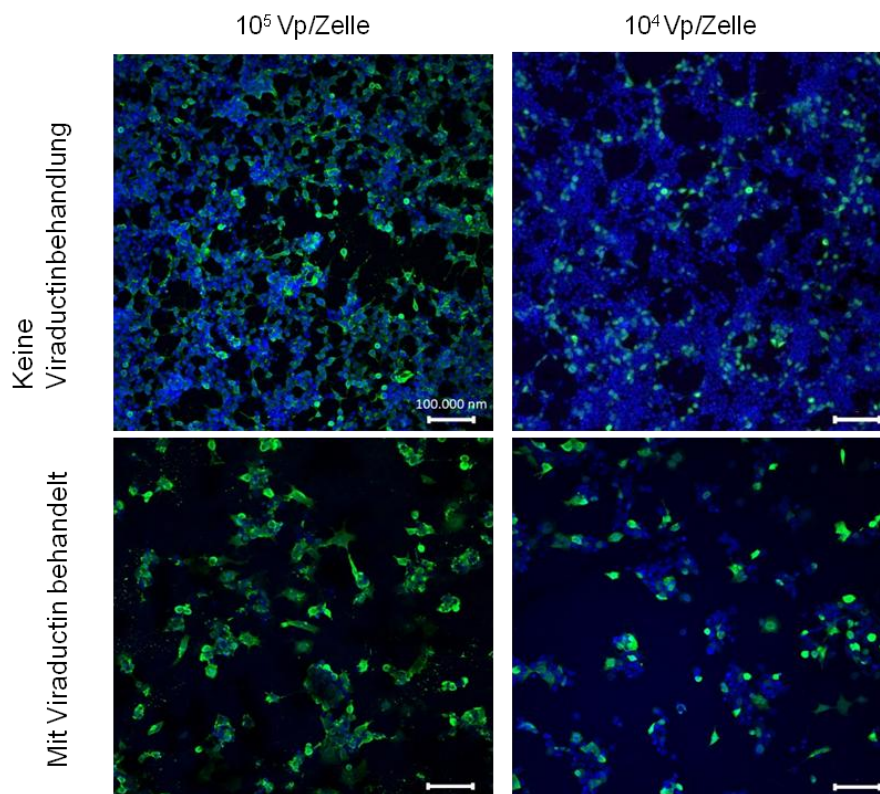
Aufnahme ein Tag nach der Transduktion mit rAAV2.9-NPcosw-V5, zwei Tage nach *ViraDuctin™* Behandlung. 10x vergrößert in der oberen Spalte, 40x vergrößert in der unteren Spalte. Links unbehandelte Zellen, rechts mit *ViraDuctin™* behandelte Zellen. Die behandelten Zellen zeigten eine Vergrößerung und Veränderung ihrer Form.

Mit Betrachtung dieser Ergebnisse wurde entschieden die weiteren Versuche für die Verbesserung der Transduktionsrate nur noch mit *ViraDuctin™* durchzuführen. Genauere Gründe hierfür werden im Diskussionsteil erläutert.

#### 4.2.2.2 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde nach 3.2.4 durchgeführt. Vor der Transduktion mit dem rAAV2.9-NPcosw-V5 wurden die Zellen mit *ViraDuctin™* behandelt. Das transgene Nukleoprotein wurde mit dem primären Anti-V5 (Maus) und dem sekundärem Anti-Maus-IgG 488 Antikörper markiert. Das transgene NPcosw-V5 fluoresziert nach Anregung bei 488 nm grün im FITC - Kanal. Zellkerne wurden mit dem Hoechst Reagenz sichtbar gemacht (blau). Analyse der Zellen erfolgte zwei Tage nach der Transduktion unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Aufnahmen sind in Abbildung 12 zu sehen.

In Abbildung 12 ist der gleiche zytopathische Effekt des *ViraDuctin™*, wie schon in 4.2.2.1 beschrieben, auf die Zellen zu erkennen. Zudem sind mehr Zellen transduziert, wenn sie mit *ViraDuctin™* behandelt wurden. Dies gilt für die Belastung mit  $10^5$  und  $10^4$  Vp/Zelle.



**Abbildung 12: Immunfluoreszenz der mit *ViraDuctin*<sup>™</sup> behandelten Zellen**

Immunfluoreszenz der mit  $10^5$  und  $10^4$  Vp/Zelle rAAV2.9-NPcosw-V5 transduzierten Zellen. Unten die vorher mit *ViraDuctin*<sup>™</sup> behandelten Zellen, oben die unbehandelten. Intrazelluläre Färbung erfolgte mit dem primären Anti-V5 (Maus) (1:250) und dem sekundären Anti-Maus-IgG 488 Antikörper (1:250). Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Reagenz (1:30.000) eingefärbt und erscheinen blau. Die Bilder wurden bei zehnfacher Vergrößerung aufgenommen. Bei zehnfacher Vergrößerung ist ein Unterschied in der Größe und Anzahl der mit *ViraDuctin*<sup>™</sup> behandelten und unbehandelten Zellen zu erkennen. Behandelte Zellen liegen in einer geringeren Anzahl pro Sichtfeld vor und sind in beiden Fällen der Belastung ( $10^5$  und  $10^4$  Vp/Zelle) deutlich vergrößert. Es ist zu erkennen, dass mehr Zellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen, wenn sie mit *ViraDuctin*<sup>™</sup> behandelt wurden.

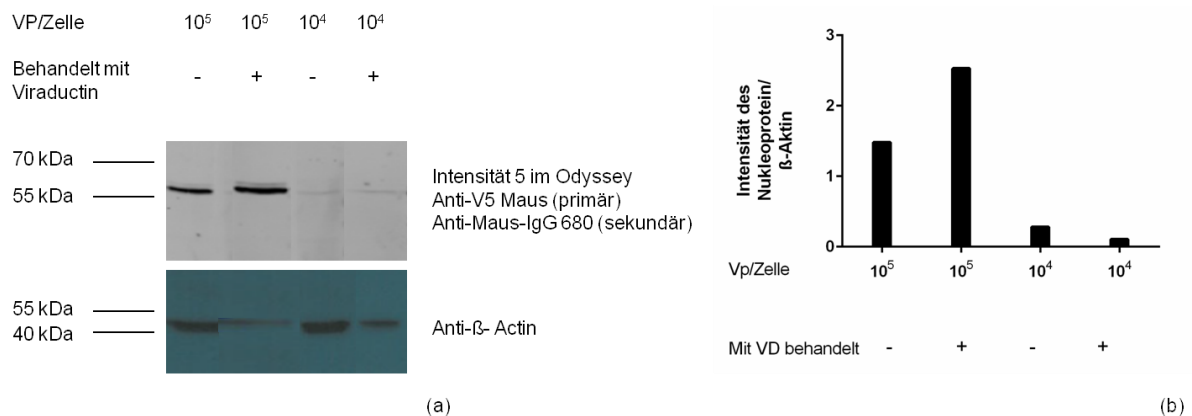
#### 4.2.2.3 Western Blot

Der Western Blot wurde wie in 3.2.3 nach vorangegangener SDS-Page beschrieben durchgeführt. Zwei Tage nach der Transduktion wurden die mit *ViraDuctin*<sup>™</sup> behandelten, unbehandelten und mit dem rAAV2.9-NPcosw-V5 transduzierten Zellen lysiert.

Intrazelluläre Färbung erfolgte mit dem primären Anti-V5 (Maus) und dem sekundären Anti-Maus-IgG 680 Antikörper. Zusätzlich erfolgte auch hier eine Färbung von Aktin, mittels Anti- $\beta$ -Aktin-HRPO, als Ladekontrolle. Nach Auswertung des Gels mit dem Li-Cor Odyssey wurden die Intensitäten der Banden aus den beiden Färbungen mittels *ImageJ* bestimmt und in ein Verhältnis gesetzt (Abbildung 13).

Die Auswertung der Membran zeigt, dass die Banden in der mit  $10^5$  Vp/Zelle belasteten Gruppe gleich dick sind. Auch in ihrer Intensitätsauswertung über *ImageJ* erreichten sie ähnliche Werte. In der mit  $10^4$  Vp/Zelle belasteten Gruppe wurden ebenfalls gleiche Werte erreicht. Anhand der Aktin-

Färbung war zu erkennen, dass in beiden Belastungsgruppen deutlich dünnere Banden vorlagen, wenn die Zellen behandelt wurden. Dünnere Banden deuten auf eine geringere Quantität der Zellen hin. Abbildung 13 stellt graphisch das Verhältnis aus der Intensität der Nukleoprotein-Bande und der Aktin-Bande dar. Es ist zu erkennen, dass die mit  $10^5$  Vp/Zelle transduzierten und mit *ViraDuctin™* behandelten Zellen einen Quotienten von 2,5, im Gegensatz zu den unbehandelten von 1,4 erzielten. Wurden die Zellen mit  $10^4$  Vp/Zelle belastet, lag der Quotient bei 0,2 unbehandelt und 0,1 behandelt.



#### Abbildung 13: Western Blot der mit *ViraDuctin™* behandelten Zellen

(a) Die bildliche Darstellung der Färbung Anti-V5 (Maus) (1:5000), Anti-Maus-IgG 680 (1:5000) und Anti-β-Aktin (1:50.000).

(b) die graphische Auswertung der Ergebnisse über *ImageJ*. Dargestellt wurde der Quotient aus der Stärke der Bande des transgenen Nukleoproteins und der Aktin-Bande. Die Banden des V5-getaggten Nukleoprotein waren bei 57 kDa zu erwarten, die Aktin Banden bei 42 kDa. Die zu erwartenden Banden waren zu sehen. Restliche Banden lagen dem unspezifischen Binden des Antikörpers zugrunde, da sie in jeder Probe, auch in den naiven Zellen, sichtbar waren. Die mit *ViraDuctin™* behandelten Zellen zeigen eine deutlich dünnere Bande in der Aktin Färbung, aber eine ähnliche Intensität und Dicke der Banden des Nukleoproteins.

Der Quotient der mit  $10^5$  Vp/Zelle transduzierten Zellen lag bei 1,4, wenn nicht mit *ViraDuctin™* behandelt, wenn behandelt bei 2,5. Die Quotienten der  $10^4$  Vp/Zelle Gruppe lagen bei 0,2 unbehandelt und bei 0,1 behandelt.

Ob *ViraDuctin™* oder *Adenovirus 5* zur Steigerung der Transduktionsrate eingesetzt werden sollte und kann, wird in der Diskussion ausgeführt.

### 4.3. Etablierung der qPCR

Das Ziel der qPCR ist die Anzahl infektiöser rekombinanter AAV2.9-NPcosw-V5 Partikel in einer Viruspräparation zu quantifizieren. Die Bestimmung der Infektiosität dieser Partikel ist für den späteren Einsatz der Viruspartikelpräparation als Impfstoff von Bedeutung. Mit der qPCR soll garantiert werden, dass jeder Proband die gleiche Anzahl infektiöser rekombinanter Viren injiziert bekommt, selbst wenn die rAAV2.9-NPcosw-V5 aus unterschiedlichen Präparationen stammen. Nur so kann ein einheitlicher Schutz garantiert werden.

Für die Bestimmung der Infektiosität wird sich folgende Eigenschaft der rAAV2.9-NPcosw-V5 zu Nutze gemacht. Das virale Genom der rekombinanten Partikel liegt im Virus einzelsträngig vor. Infizieren die Viruspartikel eine Zelle, so werden die viralen einzelsträngigen DNA - Moleküle zu einem doppelsträngigen DNA – Strang prozessiert [47]. Den rekombinanten AAV2.9-NPcosw-V5 fehlt weiterhin die Möglichkeit ihren Infektionszyklus zu vervollständigen. Es kommt trotz Infektion zu keiner neuen Partikelbildung. So kann jede doppelsträngige DNA auf einen infektiösen rAAV-Partikel zurückgeführt werden. Die qPCR soll die Anzahl der doppelsträngigen viralen DNA-Moleküle des rekombinanten AAV9 in Zellen bestimmen. Bei bekannter rAAV – Partikel Anzahl (DRPs/ $\mu$ l) in einer Präparation kann die Anzahl der infektiösen Partikel bestimmt werden.

Die Möglichkeit die einzelsträngigen DNA-Moleküle anhand der DNase resistenten Partikel, des rAAV2.9-NPcosw-V5 zu quantifizieren, wurde bereits in 3.4 beschrieben.

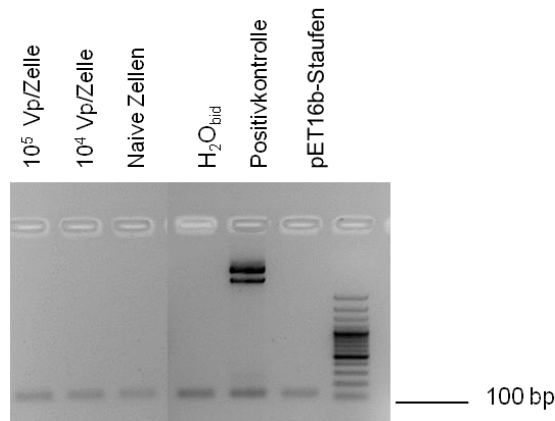
Die Verfahrensweise infektiöse AAV – Partikel auf Basis der doppelsträngigen DNA – Moleküle mittels Real Time – PCR zu quantifizieren, wurde in der Publikation von Rohr *et. al.* bereits für AAV2 – Partikel beschrieben [48]. Um die doppelsträngige DNA der infektiösen Viren, unabhängig von den einzelsträngigen DNA-Molekülen der nicht infektiösen Viren, quantifizieren zu können, wird ein S1-Nuklease Verdau durchgeführt. Die S1-Nuklease verdaut die einzelsträngige DNA. So ist es in der Real Time PCR später möglich nur die doppelsträngigen viralen DNA – Moleküle zu quantifizieren. Die Menge der DNA –Moleküle kann dann auf die Anzahl der infektiösen Viren zurück geführt werden.

Anhand des S1-Verdaus aus der Publikation von Rohr *et. al.* [48], sollte auf Basis der qPCR zur Quantifizierung einzelsträngiger rAAV-Partikel, die Real-Time PCR zur Quantifizierung infektiöser rekombinanter AAV9 – Partikel etabliert werden. Die bereits etablierte qPCR zur Quantifizierung des einzelsträngigen Abschnitts, bzw. der DRPs/ $\mu$ l, sollte so umgeformt werden, dass anhand dieser PCR doppelsträngige DNA des gleichen Genoms erfolgreich quantifiziert werden kann. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

#### 4.3.1 Erste Experimente zum Test des Verfahrens

Für einen ersten Lauf der qPCR erfolgte die Transduktion der 293 T -Zellen mit  $10^5$  Vp/Zelle und  $10^4$  Vp/Zelle. Zwei Tage nach der Transduktion wurde die DNA nach 3.3.4.1 isoliert. Die Zelllysate wurden, wie in 3.3.5 beschrieben, in der qPCR eingesetzt. In den Proben konnten keine CT-Werte DNA gemessen werden. Jedoch zeigte die Negativkontrolle Wasser einen Wert von 33. Eine weitere Negativkontrolle, der Plasmid pET16b-Staufen, der keinen CMV-Promoter enthält, erreichte ebenfalls einen CT-Wert von 29. Nach dem Lauf der qPCR wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen. Abbildung 14 zeigt, dass in jeder Probe eine Bande bei der Größe des zu erwartenden Amplikon von

111 bp nachgewiesen werden konnte. Diese Bande erschien unabhängig von einem vorher gemessenen oder nicht vorhandenen CT-Wert.

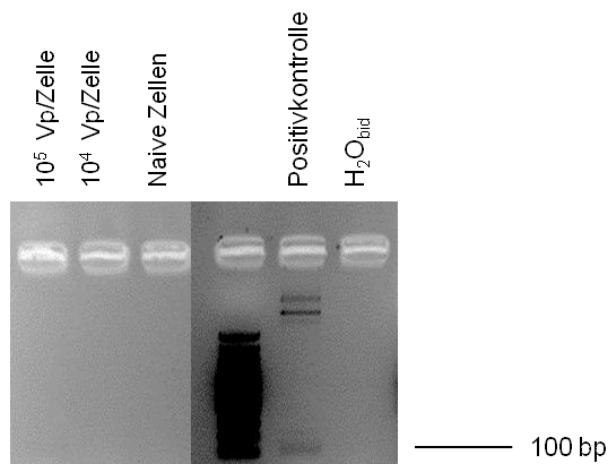


**Abbildung 14: Agarosegel**

Auftragung der vorher in der qPCR gemessenen Proben auf ein 1% Agarosegel. Auswertung des Gels mittels ChemoCam. In allen Proben ist eine Bande bei 111 bp zu sehen. Das zu erwartende Amplikon liegt ebenfalls bei 111 bp.

Dies zeigte, dass die Proben kontaminiert waren. Das Pipettieren des Mastermixes und der Negativkontrolle wurde folglich räumlich von dem Pipettieren der Zelllysate und des Standards getrennt. Außerdem wurden alle Reagenzien neu in der PCR-Werkbank geöffnet. Jedoch zeigten bei jeder folgenden PCR die Negativkontrollen ein Bandensignal und ein Signal in der qPCR.

Nach dem Überprüfen weiterer Kontaminationsquellen konnte mit einem Wechsel zur *AmpliTaq-Gold* erreicht werden, dass die Negativkontrollen kein Bandensignal mehr zeigte (Abbildung 15). Anhand dieser Untersuchungen wurde die *AmpliTaq-Gold* für die weiteren Versuche und die qPCR verwendet.



**Abbildung 15: Auftragung Proben nach einer qPCR auf ein 1% Agarosegel**

In der qPCR wurde die *AmpliTaq-Gold* verwendet. Bis auf die Positivkontrolle, welche der pAAV2.9-NPcosw-V5 darstellt, sind keine Banden zu sehen.



### 4.3.3 Isolierung und Aufreinigung der DNA-Proben

Parallel zu diesen Versuchsreihen wurde die Reinheit der Proben mittels Nanodrop ermittelt. Dabei war zu sehen, dass man nur eine geringe Ausbeute an DNA in den Proben vorfinden konnte, die nach 3.3.2.1 aufgereinigt worden waren (Tabelle 21). Das 260/280 Verhältnis, welches im Fall von DNA bei 1,8 liegen sollte, wurde in keiner der Proben erreicht. In jeder Probe war eine Abweichung von 0,2, oder größer, zu beobachten. Ähnliches zeigte auch das 260/230 Verhältnis. Ideale Werte dieses Quotienten liegen bei 2,0-2,2. Keine der gemessenen Proben erreichte ein Verhältnis >1.

Tabelle 21: Reinheitsmessungen über NanoDrop.

Vermessung der nach 3.3.2.1 aufgereinigten Proben. Ideale Bereiche für das 260/280 Verhältnis liegen bei 1,8 und bei 2,0-2,2 bei 260/230. Mit sehr geringen Ausbeuten von etwa 2 ng/μl und Reinheitsmessungen ausserhalb des idealen Bereichs, musste eine andere Isolierung der dsDNA aus den Zellen erarbeitet werden

Probe	ng/μl	260/280	260/230
10 <sup>5</sup> Vp/Zelle	245,92	1,72	0,91
10 <sup>5</sup> Vp/Zelle - 1:100	2,35	1,33	0,35
10 <sup>4</sup> Vp/Zelle -1:100	2,46	1,57	0,52
naive - 1:100	2,28	1,99	0,63
10 <sup>5</sup> Vp/Zelle - aufgereinigt	4,11	1,78	0,2
10 <sup>4</sup> Vp/Zelle - aufgereinigt	3,17	1,09	0,14
naive - aufgereinigt	3,1	1,93	0,15

Über eine neue Aufreinigung und Isolierung der DNA sollten bessere Werte erzielt werden. Hierfür wurde das *QIAmp DNA Mini and Blood Mini Kit* verwendet, welches nach zwei Tagen der Transduktion angewendet wurde. Die Reinheit der Proben nach Isolation, S1-Verdau und Aufreinigung werden in Tabelle 22 gegeben. Man kann erkennen, dass die Menge der vorhandenen DNA in allen Proben gesteigert werden konnte. (<4 ng/μl auf >8,0 ng/μl). Ebenfalls lagen die Werte näher an den vorgegebenen idealen Reinheitswerten.

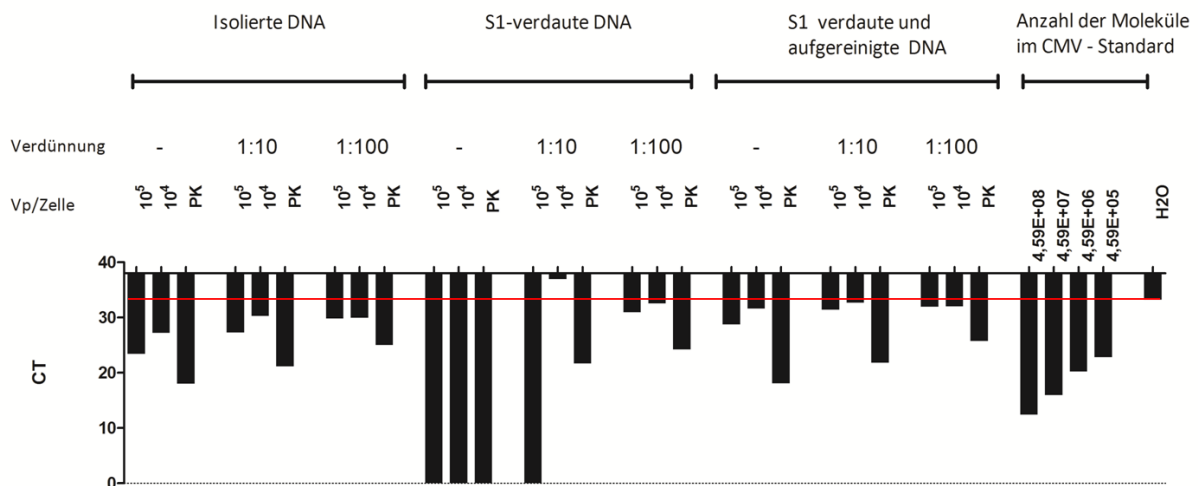
Tabelle 22: Reinheitsmessungen über NanoDrop

Messung der Reinheit der Proben nach der Isolation der dsDNA über das *QIAmp DNA Mini and Blood Mini Kit*, dem S1 (Probe x- S1) Verdau und der Aufreinigung über das *Kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up system* (Probe x- S1 – aufgereinigt), mittels NanoDrop. Es ist zu erkennen, dass eine höhere Ausbeute an DNA und bessere Verhältnisse im 260/280 Bereich vorlagen.

Probe	ng/μl	260/280	260/230
10 <sup>5</sup> Vp/Zelle	101,96	1,98	2,55
10 <sup>4</sup> Vp/Zelle	74,99	1,92	2,67
naive Zellen	113,99	1,96	2,55
Positivkontrolle	64,73	1,9	2,91
10 <sup>5</sup> Vp/Zelle - S1	76,18	1,86	1,55
10 <sup>4</sup> Vp/Zelle - S1	30,96	1,78	1,31
naive Zellen - S1	87,57	1,82	1,48
Positivkontrolle - S1	52,43	1,84	1,4
10 <sup>5</sup> Vp/Zelle-S1-aufgereinigt	10,74	1,37	5,87
10 <sup>4</sup> Vp/Zelle-S1-aufgereinigt	9,69	1,6	-10,35
naive-S1-aufgereinigt	8,23	1,28	5,63
Positivkontrolle-S1-aufgereinigt	8,37	1,79	56,92

Folglich wurde die DNA aus der Transduktion nun für die folgenden Messungen mit dem *QIAmp DNA Mini and Blood Mini Kit* isoliert. Anschließend fand wieder ein S1-Verdau statt, dem dann die Aufreinigung über das *Wizard®SV Gel and PCR Clean-up system* folgte. Dies sollte die Proben von überschüssigen Puffern und Enzymen befreien, die die PCR stören. Alle Proben wurden für die Messungen je 1:10 und 1:100 verdünnt. Dann wurden mit dem gegebenen Temperaturprofil und Zusammenstellung des Mastermixes alle Proben nach der Isolierung, nach dem S1-Verdau und nach der Aufreinigung vermessen. Die Werte werden in Abbildung 17 gegeben.

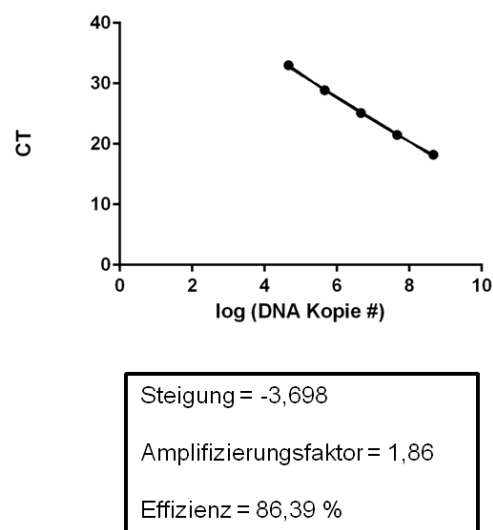
Das Wasser, welches als Negativkontrolle eingesetzt wurde, erreichte auch hier einen CT-Wert von 32. Dieser hohe CT-Wert der Negativkontrolle machte es nicht möglich, CT-Werte für die Quantifizierung zu nutzen, die darüber oder sehr nah daran lagen. Dies war bei fast allen Proben der Fall. Bei auswertbaren CT-Werten war zu beobachten, dass die unverdünnten S1-Proben keine CT-Werte lieferten. Die mit einer  $10^5$  Vp/Zelle behandelten Zellen zeigten in jeder Gruppe niedrigere CT-Werte als Gruppe 2. Die Positivkontrolle lag bei CT-Werten von 18 – 25.



**Abbildung 17:** Darstellung der CT-Werte

Darstellung der CT-Werte der qPCR nach 3.3.5. CMV-Primer wurden zu  $10\mu\text{M}$  eingesetzt. Die FAM-Sonde wurde in einer Konzentration von  $800\text{nm}$  verwendet. Die Proben wurden nach jedem Aufreinigungsschritt vermessen: nach Isolation, S1-Verdau und Aufreinigung über das *Wizard®SV Gel and PCR Clean-up system*-Kit. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die zuvor mit dem pAAV2.9-NPcosw-V5 transfiziert wurden. Als Negativkontrolle diente  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ . Die Proben wurden unverdünnt, 1:10 oder 1:100 verdünnt in der PCR eingesetzt. Mit einem CT-Wert von 32 in der Negativkontrolle können keine Proben die über diesem Wert (mit roter Linie eingezeichnet) gewertet werden. Aufgrund der Kontamination der Negativkontrolle konnten die Proben nicht bezüglich ihrer enthaltenden Menge an Virusgenomen ausgewertet werden.

Der CMV-Standard sollte hinsichtlich der Effizienz in der qPCR untersucht werden. Dafür wurden graphisch die CT-Werte gegen die logarithmische Anzahl der errechneten DNA-Kopien aufgetragen. Die Funktion der Korrelationsgeraden diente zur Berechnung der Primereffizienz. Die Berechnung erfolgte online bei ThermoScientific (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/qpcrefficiency/>). Die Effizienz der CMV-Primer lag demnach bei 86,39 % (Abbildung 18).



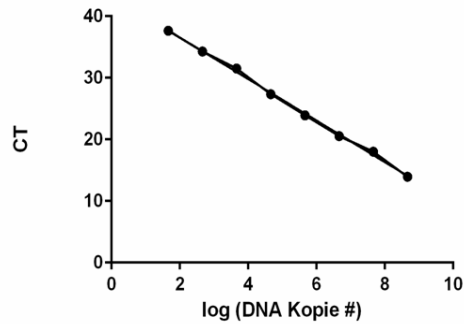
**Abbildung 18:** Sensitivitätsmessung mit CMV-Primern

Logarithmische Darstellung der CT-Werte in unterschiedlichen Standardkonzentrationen. Auf der X-Achse ist die berechnete Anzahl der DNA-Kopien gegeben. Mit dem online Programm von ThermoScientific konnte über die Korrelationsgerade eine Effizienz von 86,39% ermittelt werden. Der Amplifizierungsfaktor beträgt 1,86.

In der Diskussion werden die hohen CT-Werte der Negativkontrolle und die Werte der Effizienzberechnung hinsichtlich ihrer Auswirkung diskutiert. Um die Effizienz zu steigern und einer möglichen CMV-Kontamination des Arbeitsplatzes entgegenzuwirken wurden neue Primer erstellt.

#### 4.3.4 Amplifikation mittels NP-spezifischer Primer

Die neuen Primer sollen innerhalb des Nukleoproteingens binden. So sollte die PCR weniger anfällig für Kontaminationen sein, welche durch vielfach verwendete Plasmide, die den CMV-Promoter enthalten, verursacht wurde. Dementsprechend wurde eine neue Sonde bestellt. Die Primer wurden mittels des NP-Standards getestet und eine Sensitivitätsmessung durchgeführt. Hierbei sollte die Nachweisgrenze der qPCR überprüft werden. Die Ergebnisse dieser Sensitivitätsmessung werden in Abbildung 19 dargestellt.

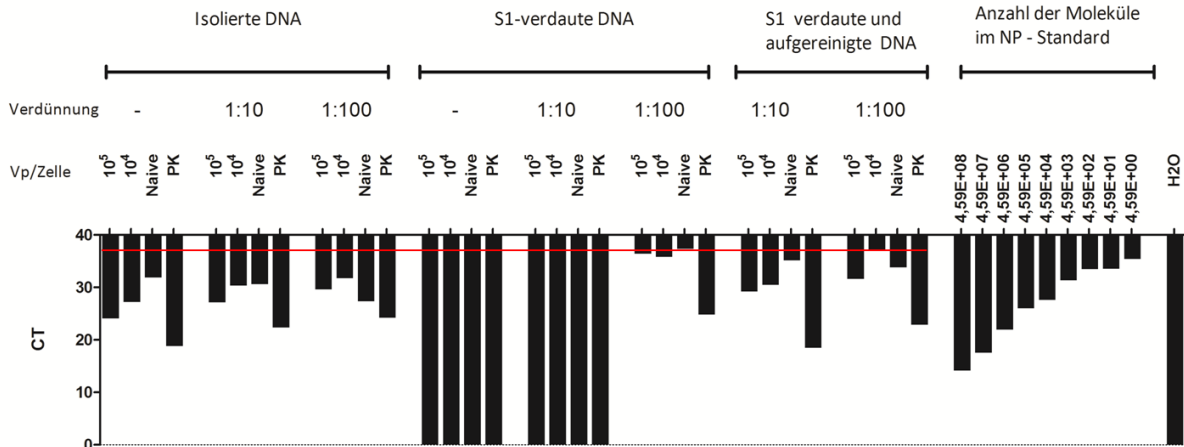


Steigung = -3,373  
 Amplifizierungsfaktor = 1,98  
 Effizienz = 97,91 %

**Abbildung 19:** Sensitivitätsmessung mit NP-Primern

Funktionsfähigkeit und Sensitivitätsmessung der NP-Primer. Gleiches Verfahren wie in 4.3.3 mit den CMV-Primern. Mit einer Effizienz von 97,91% konnte die Funktionsfähigkeit der NP-Primer nachgewiesen werden. Gute CT-Werte werden bis an die Nachweisgrenze der verwendeten Proben erreicht.

Anhand von Abbildung 19 ist zu erkennen, dass die Effizienz der NP-Primer mit 97,91% höher lag, als die der CMV-Primer (86,39%). Mit fallender Konzentration der DNA konnte ein gleichmäßiger Anstieg der CT-Werte beobachtet werden. Mit diesen Primern und der neu erstellten NP spezifischen FAM-Sonde wurde die PCR mit den bereits bekannten Rahmenbedingungen und Proben noch einmal durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 20 dargestellt.



**Abbildung 20:** Darstellung der CT-Werte

Darstellung der CT-Werte der qPCR nach 3.3.5. NP-Primer wurden zu 10 µM eingesetzt. Die FAM-Sonde wurde in einer Konzentration von 800 nm verwendet. Die Proben wurden nach jedem Aufreinigungsschritt vermessen. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die zuvor mit dem pAAV2.9-NPcosw-V5 transfektiert wurden. Als Negativkontrolle diente H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>. Die Proben wurden unverdünnt, 1:10 oder 1:100 verdünnt eingesetzt. In der Negativkontrolle konnte kein CT-Wert gemessen werden. In den naiven Zellen wurden CT-Werte von 27 bis 33 gemessen. Mittelwert mit roter Linie eingezeichnet. Aufgrund der Kontamination der naiven Zellen konnten die Proben nicht bezüglich ihrer enthaltenen Menge an Virusgenom ausgewertet werden. In den Proben, die nach der DNA Isolation und nach dem S1-Verdau vermessen wurden, liegen die CT-Werte der mit 10<sup>4</sup> Vp/Zelle behandelten Zellen über den mit 10<sup>5</sup> Vp/Zelle behandelten.

In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass  $H_2O_{bid}$  keinen CT-Wert zeigte. Demnach mussten dahingehend keine Proben von der Auswertung ausgeschlossen werden. Jedoch zeigten die naiven Zellen CT-Werte, die teilweise unter den Werte der Zellen lagen, die mit rAAV2.9-Npcosw-V5 behandelt wurden. Dies machte eine Auswertung der Proben, bezüglich der enthaltenden Menge an Virusgenom nicht möglich. Die Werte der behandelten Gruppen verhielten sich folgendermaßen: Die mit  $10^5$  Vp/Zelle transduzierten Zellen, zeigten niedrigere CT-Werte, als die mit  $10^4$  Vp/Zelle transduzierten Zellen. Auch die CT-Werte der Positivkontrolle stiegen mit einer höheren Verdünnung an. Keine CT-Werte konnten wieder bei den unverdünnten und 1:10 verdünnten S1-Proben beobachtet werden.

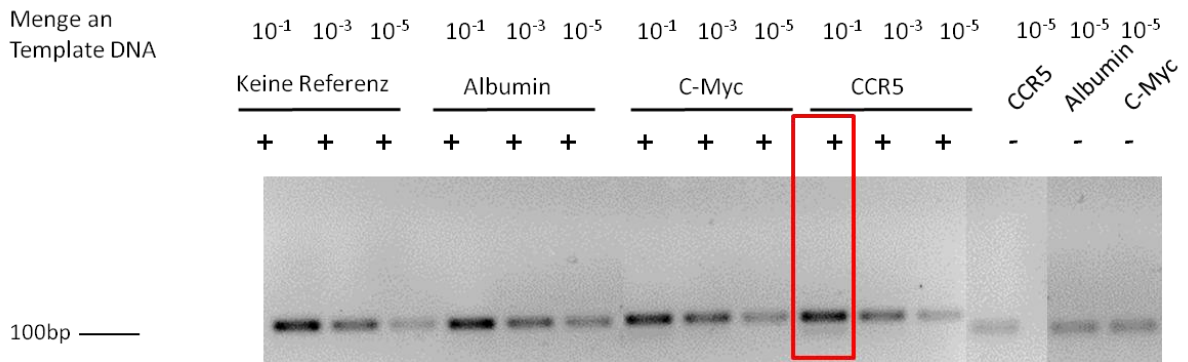
Wurde die qPCR wie beschrieben mit Zellen durchgeführt, die vorher mit *ViraDuctin™* behandelt worden waren, zeigte sich das gleiche Bild. Die Kontamination in den naiven Zellproben war zu hoch, um die Proben auswerten zu können (Daten nicht gezeigt).

Die Schlussfolgerungen aus diesen Betrachtungen werden im Diskussionsteil behandelt.

#### **4. 4 Etablierung einer Duplex qPCR**

Um inhibierende Faktoren bei der PCR auszuschließen, sollte eine interne Amplifikationskontrolle der CMV-spezifischen PCR hinzugefügt werden. Als interne Referenz diente zunächst das GAPDH-Gen. Um das richtige Verhältnis der Konzentrationen der unterschiedlichen Primer (hier CMV-Primer und GAPDH-Primer) und ihrer Arbeitstemperatur zu finden, wurde eine Gradienten-PCR gefahren. Zusätzlich wurden unterschiedliche Konzentrationen an Primern und Sonden getestet und die ideale Konzentration und Temperatur ausgewählt (Daten werden nicht gezeigt). Jedoch war es mit dem GAPDH und CMV nicht möglich eine Duplex-qPCR zu etablieren. Es konnten keine CT-Werte gemessen werden. Zusätzlich konnten keine Banden beider Produkte bei einer Gelauftragung gesehen werden (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurden weitere Referenzgene in der NP-spezifischen qPCR getestet. (cMyc, Albumin und CCR5). Die PCR wurde nach 3.3.5 durchgeführt, jedoch konnten auch hier in den meisten Fällen keine Doppelbanden bei Auftragung auf ein Agarosegel erkannt werden. (siehe Abbildung 21). Lediglich bei einer Konzentration von  $10^{-1}$  der Probe und dem CCR5-Primer konnte eine Doppelbande nachgewiesen werden.



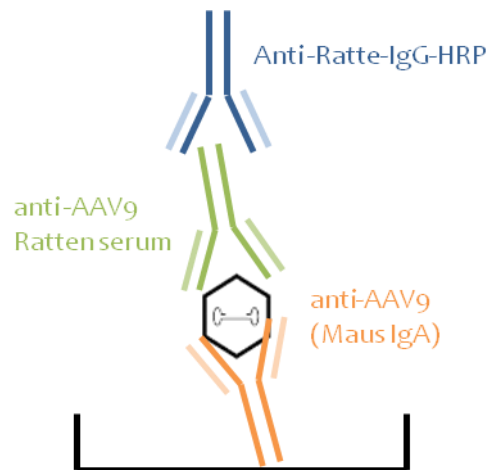
**Abbildung 21:** Duplex-PCR

Duplex-PCR mit Nukleoprotein spezifischen Primern und den internen Referenzgenen Albumin, C-Myc und CCR5. Amplifikation beider Regionen konnte nur bei CCR5 bei einer 1:10 Verdünnung des Virusgenomstandards beobachtet werden (roter Kasten).

Weitere Versuche zur möglichen Etablierung der Duplex-PCR mittels des CCR5 Referenzgenen wurden aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt.

#### 4.5 Etablierung eines Sandwich ELISA zur Detektion intakter AAV9-Partikel

Eine weitere Möglichkeit die rekombinanten AAV2.9-NPcosw-V5 bezüglich ihrer Infektiosität zu überprüfen ist es, sie hinsichtlich ihres intakten Capsids zu quantifizieren. Ein nicht intakter Partikel ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht infektiös. Durch die Aufarbeitung der rAAVs kann es zu Schädigungen der Hülle der Viren kommen. Um zu überprüfen, wie viele Partikel in einer Viruspräparation intakt und so mit hoher Wahrscheinlichkeit infektiös sind, sollte der Sandwich-ELISA etabliert werden.



**Abbildung 22:** Schema des Sandwich-ELISA

Die Platte wird mit dem Anti-AAV9 (Maus-IgA) beschichtet und mit dem rAAV2.9-leer (schwarz) beladen. Das Virus wird mit einem AAV9-spezifischen Rattenserum detektiert. Das Sandwich wird mit dem Anti-Ratte-IgG-HRP markiert. Die Platte wird bei 492/620 nm ausgewertet

Der Aufbau des Sandwich-ELISAs wird in Abbildung 22 dargestellt.

Die Platte wird mit dem Anti-AAV9 (Maus-IgA) beschichtet und mit dem rAAV2.9-leer (schwarz) beladen. Der Virus wird mit dem Anti-AAV9 detektiert. Das Sandwich wird mit dem Anti-Ratte-IgG-HRP markiert. Die Platte wird bei 492/620 nm ausgewertet.

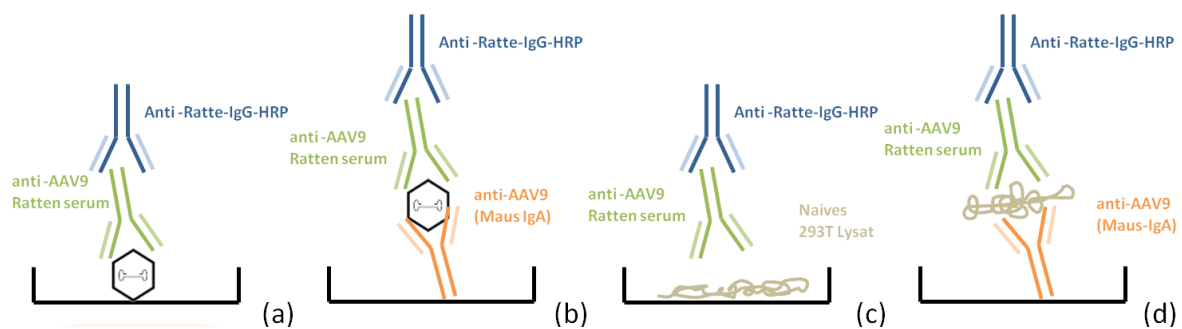
Die Platten sollten mit einem kommerziell erhältlicher Antikörper, welcher laut Hersteller spezifisch an ein Konformationsepitop der Oberflächenproteine intakter AAV9-Partikel bindet, beschichtet werden (Anti-AAV9-(intact Particles)- Maus-IgA von Progen). So binden nur intakte Partikel aus der Viruspräparation auf der Platte. Durch Waschen der Platten können dann defekte Partikel und Zellrückstände entfernt werden. Nach Zugabe der rAAV2.9-NPcosw-V5 sollten jene mit einem Detektionsantikörper markiert werden. Da kein weiterer AAV9-spezifischer Antikörper kommerziell erhältlich ist, sollte ein polyklonaler Detektionsantikörper in Ratten produziert werden. Dazu wurden zwei Wistar-Ratten mit einem rekombinanten AAV9 immunisiert, der das AAV2-Genom ohne Transgen enthält (rAAV2.9-leer).

Die Ratten wurden im Vorfeld auf eine bereits bestehende Immunität gegen den natürlich vorkommenden AAV9 untersucht. Dazu wurden ELISA-Platten mit dem rAAV2.9-leer beschichtet. Das Präimmenserum wurde anschließend auf der Platte austitriert. Existierende Anti-AAV9-Antikörper würden mit einem HRPO-markiertem Anti-Ratte-IgG Antikörper detektiert werden. Es zeigte sich

aber, dass keine der beiden Ratten bereits existierende Antikörper gegen den AAV9 besaßen. Es konnten keine Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Ratten wurden zur Produktion von Anti-AAV9 Antikörpern subcutan mit einer 22G Nadel, mit jeweils  $10^{12}$  Partikeln des rAAV2.9-leer immunisiert. Zur Steigerung der Antikörperproduktion wurde die AAV-Lösung 1:1 mit inkompletten Freund-Adjuvans gemischt. Es wurden pro Tier und Injektion 500  $\mu$ l verabreicht. Die Immunisierung wurde dreimal im Abstand von je zwei Wochen wiederholt. Zwei Wochen nach der dritten Immunisierung wurde den Ratten retrobulär nach Inhalationsnarkose mit Isofluran Blut entnommen. Das Blut wurde über Nacht im Kühlschrank inkubiert und das Serum nach Zentrifugation abgenommen.

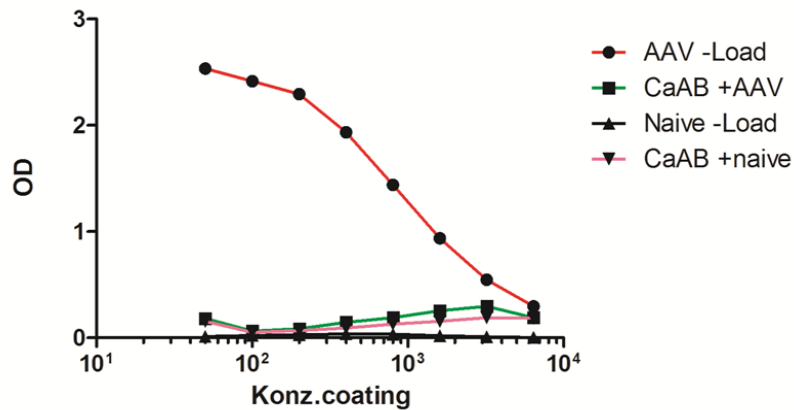
Die erhaltenen Seren wurden auf das Vorkommen der Anti-AAV9 Antikörper getestet. Da in der Viruspräparation, welche den Ratten injiziert wurde, auch Proteine der produzierenden Zellen (293 T) zurückbleiben konnte, sollte auch überprüft werden, ob im Serum Antikörper gegen Bestandteile des Lysats der Zellen vorhanden sind. Abbildung 23 zeigt den Aufbau des ELISAs, Abbildung 24 stellt die Ergebnisse dar.



**Abbildung 23:** Schema des Aufbaus

Schema des Aufbaus des ELISAs von links nach rechts. Beschichtung der Platten mit dem AAV2.9-leer (a), dem Capture-Antikörper Anti-AAV9 (Maus IgA) (b), naivem 293 T Lysat (c) und zuletzt wieder mit dem kommerziellen Capture Antikörper Anti-AAV9 (Maus IgA) (d). Platten (b) und (d) wurden beladen. (b) mit dem AAV2.9-leer, (d) mit naivem 293 T Lysat. Alle Platten wurden mit dem polyklonalen Detektionsantikörper Anti-AAV9 (Rattenserum) markiert.

Der ELISA wurde nach 3.2.6 durchgeführt. Genaue Konzentrationsangaben werden in Abbildung 24 gegeben.



**Abbildung 24: Auswertung des ELISAs**

Etablierung des Capture ELISA zur Detektion intakter AAV9-Partikel. Die Platten wurden entweder direkt mit rAAV2.9-leer (rote Linie), dem kommerziellen anti-AAV9 Antikörper (Maus IgA, intakte Partikel, Progen), (grüne und hellrote Linien) oder mit Lysat naiver Zellen (schwarze Linie) von einer initialen Verdünnung von 1:50 in Titration um 1:2 beschichtet und über Nacht inkubiert.

Den Proben, die mit dem anti-AAV9 als Capture-Antikörper beschichtet waren, wurde das Capture-Antigen rAAV2.9-leer in einer Verdünnung von 1:250 zugegeben. Überschüssiges Antigen wurde von der Platte gewaschen. Die Rattenserum wurden 1:2000 zur Detektion der gebundenen Viruspartikel hinzugegeben. Der sekundäre Anti-Ratte-IgG Antikörper wurde ebenfalls 1:2000 eingesetzt. Anschließend wurde bei 492/620 nm detektiert.

Es ist zu erkennen, dass das Serum der Ratten nicht an das naive 293 T Lysat gebunden hat und jenes auch nicht an den Capture Antikörper, da hier keine OD-Werte gemessen wurden. Weiterhin konnten auch keine OD-Werte für den Fall des beschichteten Capture-Antikörpers gemessen werden. Das Rattenserum aber band an den beschichteten rAAV2.9-leer.

Es ist zu erkennen, dass das Rattenserum die AAV9-Partikel nur detektieren konnte, wenn dieser direkt auf der Platte gebunden war. Der rAAV2.9-leer wurde hier bis zu einer Verdünnung von 1:6400 detektiert. Alle anderen Kombinationen erreichten, wie die Negativkontrolle, keine OD oberhalb der Basislinie von 0,2.

## 5. Diskussion

Dieser Arbeit wurde die Etablierung einer qPCR zur Quantifizierung infektiöser rekombinanter AAV9-Partikel zum Ziel gesetzt. Für die Etablierung sollten bestmögliche Rahmenbedingungen für die notwendige Transduktion der Zellen geschaffen werden. Hierfür wurde die Transduktionseffizienz der Partikel in drei Zelllinien, zwei humane und einer caninen Zelllinie, untersucht. Die Zelllinie, die die höchste Transduktionseffizienz zeigte, sollte für weitere Versuche verwendet werden. Zudem wurde die Wirkung von *ViraDuctin™* und *Adenovirus 5* auf die Prozessierung der viralen DNA in einer infizierten Zelle untersucht. Die Etablierung eines Sandwich-ELISA zur Quantifizierung intakter AAV9-Partikel wurde zusätzlich angestrebt.

Die Ergebnisse aus 4.0 werden im Folgenden diskutiert.

### 5.1 Transduktionseffizienz in den drei Zelllinien

Der Vergleich der Transduktionseffizienz in den unterschiedlichen Zelllinien zeigt, dass die 293 T Zellen, die am besten zu transduzierende Zelllinie in diesem Modell darstellen. Der Vergleich der Transduktionseffizienz in der caninen und den humanen Zelllinien zeigte, dass die humanen Zelllinien besser von dem rAAV2.9-NPcosw-V5 infiziert werden konnten. Die 293 T Zellen erreichten 24 % mehr positiv transduzierte Zellen in der Durchflusszytometrie. Andere Analysen bewiesen, dass die canine Zelllinie im Verhältnis keine guten Transduktionsraten bei gleicher viraler Belastung erreichen konnte.

Der Vergleich der beiden humanen Zelllinien (293 T, HeLa) zeigt, dass die 293 T Zelllinie nur dann eine höhere Transduktionsrate erreichte, wenn die Zellen mit einer hohen Viruspartikelzahl pro Zelle ( $10^5$  Vp/Zelle) belastet wurden. Bei einer Viruslast von  $10^4$  Vp/Zelle konnte kein Unterschied in der Transduktionseffizienz in den humanen Zelllinien gemessen werden

Die Beobachtung des Einflusses der Virusmenge auf die Transduktionseffizienz wurde unabhängig von der verwendeten Zelllinie beobachtet. Bei einer Belastung von  $10^5$  Vp/Zelle erreichten die Zellen Transduktionsraten bis zu 96 %. Bei einer Belastung von  $10^4$  Vp/Zelle fiel die Transduktionsrate in allen Zelllinien um 60 % ab. Dies lässt darauf zurückschließen, dass eine hohe Menge der generierten rAAV-Partikeln notwendig ist, um eine hohe Transduktionsrate zu erreichen. Die in der Literatur verwendete und empfohlenen MOIs (eng.: Multiplicity of Infection) liegen in einem Bereich von 100 bis zu  $5 \times 10^5$  [57, 58]. Die verwendeten Konstrukte der (r)AAVs variieren bezüglich ihres Serologietyps und der enthaltenden Transgene. Die eingesetzte Menge der Viren variiert auch in Bezug auf die verwendete Zelllinie [59]. Dies lässt darauf schließen, dass die nötige Viruslast für eine erfolgreiche Transduktion der unterschiedlichen rAAV-Partikel, für jede Zelllinie neu bestimmt werden muss. In diesem Modell können Viruslasten von  $10^5$ - $10^4$  Vp/Zelle in der 293 T Zelllinie die besten Transduktionsraten erreichen. Folglich wurden weitere Versuche mit einer Belastung von  $10^5$ - $10^4$  Vp/Zelle und der 293 T Zelllinie durchgeführt, um große Mengen an auswertbarem Material zu erhalten.

Die hier durchgeführten Analysen zur Transduktionseffizienz in humanen Zelllinien können keine konkrete Aussage bezüglich der Transduktionseffizienz der rAAV-Partikel als späteren Impfstoffeinsatz im Menschen treffen. In dem angestrebten Impfmodell, werden Muskelzellen als

Zielgewebe infiziert. Die hier verwendeten 293 T Zellen entstammen dem Nierengewebe. Folglich kann die Transduktionseffizienz bezüglich der Mengen variieren. Die Wahrscheinlichkeit ist dennoch hoch, dass eine hohe Transduktionsrate und somit gute Effizienz des Impfstoffes erreicht werden kann, denn die Partikel infizieren humane HeLa Zellen (Epithelzellen des Zervixkarzinoms) mit einer guten Rate. Das legt eine hohe Transduktionseffizienz in humanen Zellen nahe.

## 5.2 Wirkungsweise von *ViraDuctin™* und *Adenovirus 5*

Die Untersuchungen zum Einfluss von *ViraDuctin™* (VD) und *Adenovirus 5* (AD) auf die Prozessierung der viralen DNA innerhalb einer transduzierten Zelle zeigten einen größeren Effekt von VD. Die Menge an transgenem Nukleoprotein konnte deutlich gesteigert werden. Zudem stieg die Transduktionsrate der mit VD behandelten Zellen an. Ein großer Anstieg von 26 % positiv transduzierter Zellen konnte beobachtet werden, wenn die Zellen mit  $10^4$  Vp/Zelle belastet wurden. Ein vergleichsweise geringer Anstieg der Transduktionsrate von 3 % konnte in der mit  $10^5$  Vp/Zelle belasteten Gruppe erreicht werden. Da unbehandelte Zellen mit einer Belastung von  $10^5$  Vp/Zelle nahezu vollständig transduziert werden, kann diese Effizienz (positiv transduzierte Zellen) nicht mehr erhöht werden. Um dennoch einsehen zu können, ob *ViraDuctin™* dazu führt, dass mehr Virusgenome in den Zellen vorliegen, wurde die MFI betrachtet. Je höher die MFI, desto mehr Nukleoprotein wurde in den Zellen produziert, was darauf schließen lässt, dass mehr virale DNA in den Zellen vorliegen musste. Da VD die MFI der mit  $10^5$  Vp/Zelle transduzierten Zellen deutlich erhöhte, kann geschlussfolgert werden, dass VD die Transduktionseffizienz der Viren deutlich erhöht.

Abbildung 11 zeigt, dass durch die Behandlung mit VD ein zytopathischer Effekt eintritt. Der Ursprung dessen konnte im Umfang dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass VD toxisch auf die Zellen wirkt. Die Ergebnisse bezüglich der Steigerung der Transduktionsrate in der mit  $10^4$  Vp/Zelle belasteten Gruppe sind jedoch nicht auf die Tatsache eines veränderten Vp/Zelle Verhältnisses zurück zu führen. Dies macht Abbildung 10 deutlich. Am Tag der Transduktion lagen behandelte Zellen in gleicher Konfluenz wie unbehandelte Zellen vor. Um zusätzlich die gleiche Belastung pro Well zu garantieren, wurde die Zahl der Vp/Zelle in jeder Transduktion auf die Konfluenz abgestimmt.

VD zeigte in der Durchflusszytometrie den größeren Effekt auf die Menge des transgenen Nukleoproteins und somit auf die Prozessierung der DNA. Es konnte zusätzlich die Transduktionsrate effektiver steigern als *Adenovirus 5*. Weitere Versuche wurden so nur im Hinblick des Effektes des VD auf die Zellen untersucht. Der Western Blot und die Immunfluoreszenz zeigten, dass die Quantität der Zellen, wenn mit VD behandelt, verringert wurde (Aktin-Färbung und Immunfluoreszenz). Transduzierte und behandelte Zellen weisen auch hier eine größere Quantität an Nukleoprotein auf (gleiche Intensität der Nukleoproteinbande im Western Blot). In Zellen, die vor der Transduktion mit  $10^4$  Vp/Zelle mit VD behandelt wurden, konnte eine höhere Transduktionsrate beobachtet werden (Immunfluoreszenz).

Der Anstieg der Menge des transgenen Nukleoproteins wird auf die Wirkungsweise des VD zurückgeführt. Laut Hersteller, soll VD die Synthese des zweiten viralen Stranges positiv beeinflussen. Dieser Schritt im Infektionszyklus, wurde als limitierende Konstante beschrieben. Der positive Einfluss auf diese Konstante führt zu mehr viralem Genom, welches in der Zelle transkribiert werden kann, was zu mehr transgenem Nukleoprotein in den Zellen führt.

Angesichts dieser Untersuchungen ist das *ViraDuctin™* Kit unter bestimmten Bedingungen zu empfehlen. Durch die Behandlung kann eine größere Menge des transgenen Produkts erreicht werden, was für bestimmte Versuchsreihen von Vorteil ist. Zudem zeigt es einen größeren Effekt auf die Transduktionseffizienz. Es ist einfach zu verwenden und es besteht keine Gefahr einer Kreuzinfektion für andere Organismen. Ein großer Nachteil besteht in dem zytopathischen Effekt und der Intransparenz der Wirkungsweise des Produktes. Sollte eine große Anzahl von Zellen in ihrer natürlichen Form für eine Versuchsreihe nötig sein, so ist VD ein ungeeigneter Kandidat, da es die Morphologie der Zellen verändert. Durch die Intransparenz ist es auch nicht möglich, das Produkt bestimmten Versuchen gezielt und einfach anzupassen. Darüber hinaus handelt es sich bei VD um ein vergleichsweise teures Produkt. In einer langen Versuchsreihe wo die Anzahl der nötigen Behandlungen mit *ViraDuctin™* nicht abzusehen ist, sollte eine Kosten-Nutzenanalyse erfolgen.

*Adenovirus 5* ist verhältnismäßig einfacher zu handhaben und in seinem Anwendungsprotokoll transparenter. Auch erzeugt er erst nach längerer Inkubation einen zytopathischen Effekt. Er kann aber bei einer Überdosierung sehr schnell toxisch auf eine Zellpopulation wirken. Die Wirkungsweise ist schlechter als bei VD und es besteht eine hohe Gefahr der Kreuzinfektion. Das Produkt ist im Vergleich günstiger, da das Virus im Labor auch eigenständig produziert werden kann.

Sollte eine geringe Anzahl von Versuchen, in denen eine Steigerung der Transduktionseffizienz und der Menge an transgenem Nukleoprotein angestrebt ist, abzusehen sein wäre *ViraDuctin™* eine geeignete Wahl. Handelt es sich jedoch um eine hohe Anzahl an Versuchen, wo die Steigerung der Transduktionseffizienz im Vordergrund steht, wäre *Adenovirus 5* oder ein anderer Helfervirus der AAVs eine geeignetere Wahl.

### 5.3 Etablierung der qPCR

Die dargestellten Ergebnisse zeigten, dass das Protokoll der etablierten qPCR zur Quantifizierung der einzelsträngigen DNA mit geringen Modifikationen übernommen werden kann. Durch Einsatz der *AmpliTaq-Gold* konnten Abstufungen der Konzentration des DNA-Templates in der PCR besser herausgearbeitet und messbar gemacht werden. Ursache könnte eine geringere Effizienz der Polymerase oder langsamere Amplifikation sein. Veränderungen bezüglich der Arbeitskonzentrationen der eingesetzten Primer und Sonde mussten nicht vorgenommen werden, da in der qPCR unabhängig der verwendeten Konzentrationen einheitliche Werte, bzw. von den Konzentrationen unabhängige Werte gemessen werden konnten. Eine andere Modifikation erfolgte durch den Wechsel zu den NP-Primern. Die neuen Primer, die innerhalb des NP-Genoms binden, ermöglichen eine hohe Effizienz der qPCR und verhindern gleichzeitig den weiteren Einfluss von Kontaminationen. Dies ist zwar bezüglich der Probenauswertung von Vorteil, aber mit diesem Wechsel ist es nicht mehr möglich, andere AAV2.9-Konstrukte bezüglich ihrer Infektiosität zu vermessen, die ein anderes oder kein Transgen besitzen.

Um eine gute Reinheit der in der qPCR eingesetzten Proben zu garantieren, wurden Änderungen im Ablauf der Probenvorbereitung vorgenommen. Die Zellen werden nach der Transduktion mit dem *QIAmp DNA Mini and Blood Mini Kit* von *Qiagen* aufbereitet. Nach Anwendung des Kits ist eine bessere Reinheit und höhere Ausbeute der isolierten DNA in den Proben vorhanden. Weiter wurde gezeigt, dass die Proben nach dem S1-Verdau in jedem Fall verdünnt eingesetzt werden müssen. Produkte, Puffer und das S1-Enzym inhibieren die PCR. Um die Reinheit der Proben zu steigern und

störende Nebenprodukte des S1-Verdau zu beseitigen, wurde eine weitere Aufreinigung mittels des Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up system von Promega eingeführt.

Die finale Messung der Proben zeigt, dass die qPCR mit dem etablierten Protokoll funktioniert. Die doppelsträngige Positivkontrolle (pAAV-NPcosw-V5) konnte gemessen werden und erreichte gute Ergebnisse. Auch wurden in den Proben CT-Werte im Normbereich detektiert. Es ist zudem ein Trend zu erkennen, dass die mit  $10^4$  Vp/Zelle belasteten Zellen höhere CT-Werte erreichten, als die mit  $10^5$  Vp/Zelle belasteten Zellen. Dies deutet daraufhin, dass insgesamt weniger doppelsträngiges Virusgenom vorliegt, also weniger Zellen infiziert wurden, was mittels Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz und Western Blot bereits bestätigt wurde.

Die vorhandene Menge des viralen Genoms in den transduzierten Zellen konnte nicht quantifiziert werden, da CT-Werte in den naiven Zellen gemessen wurden. Diese gemessenen Werte der naiven Zellproben liegen im Bereich der transduzierten Proben. Im Hinblick auf die in 4.2 gezeigte hohe Sensitivität der PCR liegt hier die Vermutung nahe, dass die naiven Proben im Prozess der Probenaufarbeitung und Verarbeitung mit NP-Genom kontaminiert wurden. Die Proben wurden vom Moment der DNA-Isolation parallel mit den positiven Proben behandelt. Auch beim Pipettieren besteht die Möglichkeit, dass NP-Genom in die naiven Zellen (über die Luft) überführt wurde. Die vorherigen Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz und Western Blot zeigten, dass die naiven Zellen bezüglich der Infektion mit den rAAV-Partikeln negativ waren. Das Problem muss demnach in dem Aufreinigungsprozess der Proben liegen. Mögliche Lösungsansätze werden im Ausblick behandelt.

## 5.4 Duplex qPCR

Mit einer Duplex qPCR sollte eine interne Kontrolle zur Funktionsfähigkeit der qPCR etabliert werden.

Mit der Auswertung der Versuche zu der Duplex qPCR in 4.4 wurde gezeigt, dass das GAPDH nicht als Referenzgen in Frage kam, da keine Doppelbanden der beiden Amplifizierungsprodukte im Gel detektierbar waren. Da bei einer Duplex-qPCR zwei Amplifikationsansätze um die Reagenzien konkurrieren kann es sein, dass die Ansätze sich gegenseitig inhibieren. Außerdem können die vier Primer, die Sonden oder die Amplikons miteinander interagieren, was eine Amplifikation erschwert oder unmöglich macht.

In den weiteren getesteten Referenzgenen Albumin, C-Myc und CCR5 erfolgte lediglich die Detektion einer Doppelbande bei CCR5. Da der virale und der zelluläre Genabschnitt amplifiziert wurden könnte das CCR5 als Referenzgen genutzt werden.

## 5.5 Sandwich-ELISA

Anhand von Abbildung 23 ist zu erkennen, dass der Sandwich-ELISA nicht in der Form funktioniert, wie er in Abbildung 23b eingesetzt wurde, da kein Signal auf der Platte detektierbar war. Es konnte gezeigt werden, dass der produzierte Detektionsantikörper das Virus erkennen und an ihn binden kann (Abbildung 24, rote Linie), da die Konstellation aus Abbildung 23a ein Signal auf der Platte erzeugt. Zusätzlich wurde über das ausbleibende Signal in Konstellation Abbildung 23c /d, gezeigt,

dass die Ratten keine Immunität gegen die 293 T Zellen, in denen der gespritzte rAAV hergestellt wurde, aufbauten.

Unabhängig von dieser Arbeit wurde untersucht, ob das ausbleibende Signal einer möglichen Konkurrenz der beiden verwendeten Anti-AAV9 Antikörper zugrunde liegt. Dies konnte widerlegt werden. Ein weiterer Versuch zeigte, dass die Platte den Capture-Antikörper nicht stark genug band. Die Beschichtung der Platte war somit nicht vorhanden, der Capture-Antikörper wurde herunter gewaschen und das Konstrukt aus Abbildung 22 kann dann nicht detektiert werden.

## 5.6 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die höchste Transduktionseffizienz in diesem Modell in der 293 T Zelllinie erreicht wurde. Zudem kann die Transduktionseffizienz der rAAV-Partikel mit *ViraDuctin™* gesteigert werden. *ViraDuctin™* erhöht in Folge dessen die Menge des transgenen Nukleoproteins in infizierten Zellen.

Die Duplex-qPCR konnte in dieser Arbeit nicht etabliert werden, da beide Amplifikationen in einem Ansatz nicht stattfinden. Die qPCR zur Quantifizierung der rekombinanten AAV9-Partikel konnte jedoch etabliert werden. Es bestehen weiterhin Probleme in dem Prozess der Probenvorbereitung, wo eine Kontamination der naiven Zellen mit dem zu quantifizierenden DNA-Abschnitt vorliegt.

Der Sandwich-ELISA konnte nicht etabliert werden, da der vorgesehene Capture-Antikörper nicht auf der Platte bindet.

## 5.7 Ausblick

Die Probleme der möglichen NP-DNA Kontamination in den naiven Proben machte es nicht möglich die gemessenen Werte auszuwerten. Ein Lösungsansatz wäre die Aufarbeitung der naiven Zellproben räumlich von der Aufarbeitung der transduzierten Proben zu trennen, bzw. nacheinander durchzuführen. So wäre eine Kontamination zu verhindern. Eine kontaminationsfreie Probe wäre herstellbar. Die CT-Werte der Proben könnten dann bezüglich der Menge des enthaltenen Virusgenoms ausgewertet werden.

Ist die Auswertung der qPCR sicher gestellt, so kann eine Leerwertbestimmung angestrebt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass in den Proben doppelsträngige DNA vorliegt, die einen unvollständigen Teil des rAAV2.9-NPcosw-V5 Genoms trägt. Dies können Plasmide sein, die in der Aufreinigung der Partikel nicht beseitigt wurden, oder vorherig unvollständige einzelsträngige DNA-Abschnitte, die sich miteinander verbunden haben. Um auszuschließen, dass diese Werte die Messung beeinflussen, sollte eine Leerwertbestimmung vorgenommen werden. Dies wäre über eine Inaktivierung der rAAV-Partikel zu erreichen. Den rAAV-Partikeln kann mit einer Hitzebehandlung oder bestimmten Chemikalien (z.B. NaOH) die Fähigkeit zur Transduktion genommen werden. Der Prozess der Transduktion, DNA Isolation und Probenaufarbeitung wird dann mit den inaktivierten Partikeln durchgeführt und die Proben nach etabliertem Protokoll vermessen. Werte, die erreicht werden sollten, können dann als genereller Leerwert in die spätere Bestimmung der Anzahl der

Infektiösen Partikel eingehen. So kann die genaue Bestimmung der infektiösen rAAV-Partikel sichergestellt werden.

Weitere Versuche zur Überprüfung des möglichen Referenzgens in der Duplex-qPCR wurden aus zeitlichen Gründen nicht vorgenommen. Ein Lauf der PCR mit den spezifischen Primern in einer qPCR würde zeigen, ob als Referenzgen CCR5 in Frage käme.

Der angestrebte Sandwich-ELISA funktioniert in der ursprünglichen Auslegung nicht, da der Capture-Antikörper nicht an die Platte bindet. Sollte eine Möglichkeit gefunden werden, ihn an die Platte zu binden, sollte es möglich sein, die intakten Partikel zu quantifizieren. Eine Möglichkeit wird darin gesehen, den Capture-Antikörper mit Avidin oder Streptavidin zu markieren und ihn so an eine mit Biotin beladene Platte zu binden.

## 6. Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AD	Adenovirus 5
APS	Ammoniumsulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
Co	codon optimiert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DRP	DNase Resistente Partikel
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FSC	Forward Scatter
HA	Hämagglutinin
HEPES	Piperazineethanesulfonic acid
ITR	Inverted terminal repeats
MFI	Mean Frequent Intensity
MOI	Multiplicity of Infection
NA	Neuraminidase
NP	Nukleoprotein
OPD	o-Phenylenediamine
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
qPCR	quantitative Real-Time PCR
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur

SDS	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SSC	Side Scatter
Sw	swine
UZ	Ultrazentrifugation
VD	<i>Viraductin™</i>
VF	Verdünnungsfaktor
WHO	World Health Organisation

## 6.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: GERÄTE	5
TABELLE 2: SOFTWARE	6
TABELLE 3: ENZYME	6
TABELLE 4: KITS	7
TABELLE 5: OLIGONUCLEOTIDE	7
TABELLE 6: PLASMIDE	8
TABELLE 7: CHEMIKALIEN	8
TABELLE 8: PUFFER	9
TABELLE 9: LÖSUNGEN	11
TABELLE 10: ZELLINIEN	11
TABELLE 11: WACHSTUMSMEDIEN UND IHRE KOMPONENTEN	12
TABELLE 12: ANTIBIOTIKA	12
TABELLE 13: ANTIKÖRPER	12
TABELLE 14: ZUSAMMENSETZUNG DER 15 % -IGEN SDS-GELE	16
TABELLE 15: BEISPIELHAFTER MASTERMIX FÜR QPCR	20
TABELLE 16: TEMPERATURPROFIL FÜR DIE QPCR	20
TABELLE 17: ZUSAMMENSETZUNG DER IODIXANOLGRADIENTEN	22
TABELLE 18: HÄUFIGKEIT DER NUKLEOTIDE IM STANDARD	24
TABELLE 19: BEISPIELHAFTE CT-WERTE EINE REAL TIME	25
TABELLE 20: BEISPIELHAFTE BERECHNUNG DER DRPS/ $\mu$ L	25
TABELLE 21: REINHEITSMESSUNGEN ÜBER NANODROP.	43
TABELLE 22: REINHEITSMESSUNGEN ÜBER NANODROP	43

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: BEISPIELHAFTER VERLAUF DER CT-WERTE AUS TABELLE 19	25
ABBILDUNG 2: GRAPHISCHE AUSWERTUNG DER VIRUSPARTIKEL QUANTIFIZIERUNG	27
ABBILDUNG 3: GRAPHISCHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE AUS DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	29
ABBILDUNG 4: IMMUNFLUORESCENZ DER DREI ZELLINIEN	30
ABBILDUNG 5: INTENSITÄTSAUSWERTUNG DER IMMUNFLUORESCENZQUOTIENTEN	31
ABBILDUNG 6: WESTERN BLOT DER DREI ZELLINIEN	32
ABBILDUNG 7: DURCHFLUSSZYTOMETRIE DER MIT <i>VIRADUCTIN™</i> BEHANDELTEN ZELLEN	34
ABBILDUNG 8: DURCHFLUSSZYTOMETRIE DER MIT <i>ADENOVIRUS 5</i> SUPERINFIZIERTEN ZELLEN	35
ABBILDUNG 9: VERSCHIEBUNG IM SSC/FSC KANAL	36
ABBILDUNG 10: MIKROSKOPISCHE BEOBACHTUNG DER ZELLEN	36
ABBILDUNG 11: MIKROSKOPISCHE BEOBACHTUNG DER ZELLEN	37
ABBILDUNG 12: IMMUNFLUORESCENZ DER MIT <i>VIRADUCTIN™</i> BEHANDELTEN ZELLEN	38
ABBILDUNG 13: WESTERN BLOT DER MIT <i>VIRADUCTIN™</i> BEHANDELTEN ZELLEN	39
ABBILDUNG 14: AGAROSEGEL	41
ABBILDUNG 15: AUFTRAGUNG PROBEN NACH EINER QPCR AUF EIN 1% AGAROSEGEL	41
ABBILDUNG 16: ERGEBNISSE DER QPCR	42
ABBILDUNG 17: DARSTELLUNG DER CT-WERTE	44
ABBILDUNG 18: SENSITIVITÄTSMESSUNG MIT CMV-PRIMERN	45
ABBILDUNG 19: SENSITIVITÄTSMESSUNG MIT NP-PRIMERN	46
ABBILDUNG 20: DARSTELLUNG DER CT-WERTE	46
ABBILDUNG 21: DUPLEX-PCR	48
ABBILDUNG 22: SCHEMA DES SANDWICH-ELISA	49
ABBILDUNG 23: SCHEMA DES AUFBAUS	50
ABBILDUNG 24: AUSWERTUNG DES ELISAS	51

#### **6.4 Danksagung**

Auf diesem Weg möchte ich gerne ein herzliches Dankeschön an Herrn PD Dr. Norbert Bannert richten, der mir die Anfertigung der Arbeit in seiner Gruppe ermöglicht hat. Sowie an Prof. Dr. Roland Lauster, der die Arbeit an der TU Berlin betreut hat.

Ein großes Dankeschön geht an das gesamte Team des FG18, das mir immer mit Rat und Tat, vollem Körpereinsatz und einer Antwort auf jede Frage zur Seite stand. Vielen Dank, für die schöne und lehrreiche Zeit. Insbesondere gilt dies Katja, die immer ein offenes Ohr und ein aufmunterndes Wort fand. Vielen Dank für die intensive Betreuung!

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie für die liebevolle Unterstützung während meiner gesamten Studienzzeit bedanken. Ohne euch, wäre ich nie soweit gekommen.

## 7.Literatur

1. Samji T (2009) Influenza A: understanding the viral life cycle. *The Yale journal of biology and medicine* 82(4): 153–159
2. (1980) A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bulletin of the World Health Organization* 58(4): 585–591
3. Lamb RA, Choppin PW (1983) The gene structure and replication of influenza virus. *Annual review of biochemistry* 52: 467–506. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.002343
4. Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung-Infektionsschutz Grippe (Influenza). <http://www.infektionsschutz.de/erregersteckbriefe/grippe-influenza/#c60358>
5. Schrauwen EJA, Am Fouchier R (2014) Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. *Emerg Microbes Infect* 3(2): e9. doi: 10.1038/emi.2014.9
6. Tong S, Zhu X, Li Y et al. (2013) New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS pathogens* 9(10): e1003657. doi: 10.1371/journal.ppat.1003657
7. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza About Influenza. <http://www.influenzacentre.org/aboutinfluenza.htm#vaccination>
8. Treanor J (2004) Influenza vaccine--outmaneuvering antigenic shift and drift. *The New England journal of medicine* 350(3): 218–220. doi: 10.1056/NEJMp038238
9. Carrat F, Flahault A (2007) Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine*(25): 6852–6862
10. Fiore AE, Bridges CB, Cox NJ (2009) Seasonal influenza vaccines. *Current topics in microbiology and immunology* 333: 43–82. doi: 10.1007/978-3-540-92165-3\_3
11. Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA (2000) Influenza B virus in seals. *Influenza B virus in seals. Science (New York, N.Y.)* 288(5468): 1051–1053
12. Matsuzaki Y, Sugawara K, Takashita E et al. (2004) Genetic diversity of influenza B virus: the frequent reassortment and cocirculation of the genetically distinct reassortant viruses in a community. *Journal of medical virology* 74(1): 132–140. doi: 10.1002/jmv.20156
13. World Health Organisation Influenza. <http://www.who.int/biologicals/vaccines/influenza/en/>
14. Mark Roth What follows the flu is a real killer, studies find. <http://www.post-gazette.com/world/2009/06/15/What-follows-the-flu-is-a-real-killer-studies-find/stories/200906150105>
15. Barry JM (2004) *The great influenza. The epic story of the deadliest plague in history.* Viking, New York
16. Bundesärztekammer Influenza-Pandemie. <http://www.bundesaerztekammer.de/page.asp?his=1.306.7072>

17. World Health Organisation Influenza (seasonal). Fact Sheet on Seasonal Influenza.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
18. Arbeitsgemeinschaft Influenza - RKI, Buda S, Schweiger B, Buchholz U, Köpke K, Prahm K, Haar W (2015) Influenza-Wochenbericht, Kalenderwoche 11 (07.03.15 - 13.03.15).  
[https://influenza.rki.de/Wochenberichte/2014\\_2015/2015-11.pdf](https://influenza.rki.de/Wochenberichte/2014_2015/2015-11.pdf)
19. Anja Ettl Grippewelle kostet deutsche Wirtschaft 2,2 Milliarden.  
<http://www.welt.de/wirtschaft/article138039867/Grippewelle-kostet-deutsche-Wirtschaft-2-2-Milliarden.html>
20. Szucs T, Behrens M, Volmer T (2001) Volkswirtschaftliche Kosten der Influenza 1996 Eine Krankheitskostenstudie. 96, 2, Springer Verlag
21. Arbeitsgemeinschaft Influenza - RKI Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2013/14
22. Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz Rechtliche Bestimmungen zur Bekämpfung der Geflügelpest.  
[http://www.tierseucheninfo.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation\\_id=7720&article\\_id=21699&psmand=24](http://www.tierseucheninfo.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=7720&article_id=21699&psmand=24). EU-Recht, Bundesrecht, Landesrecht
23. Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz Befund einer niedrigpathogenen Form der Geflügelpest in einem konventionellen Putenmastbetrieb ohne Freilandhaltung.  
[http://www.ml.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation\\_id=1810&article\\_id=131723&psmand=7](http://www.ml.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=1810&article_id=131723&psmand=7)
24. Johnson, Niall P A S, Mueller J (2002) Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. Bulletin of the history of medicine 76(1): 105–115
25. Centers for Disease Control and Prevention People at High Risk of Developing Flu-Related Complications. [http://www.cdc.gov/flu/about/disease/high\\_risk.htm](http://www.cdc.gov/flu/about/disease/high_risk.htm)
26. Longini IM, Halloran ME (2005) Strategy for distribution of influenza vaccine to high-risk groups and children. American journal of epidemiology 161(4): 303–306. doi: 10.1093/aje/kwi053
27. Robert Koch Institut Influenza - Empfehlungen der STIKO.  
<https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/ImpfungenAZ/Influenza/Influenza.html>
28. Aktionsgemeinschaft für Tiere e.V. Impfung Hunde. <http://www.agtiere.de/index.php?id=240>
29. Paul-Ehrlich-Institut Saisonale Influenza 2014/2015. Influenza saisonal.  
[http://www.pei.de/DE/infos/fachkreise/impfungen-impfstoffe/influenza-grippeimpfstoffe-saisonal/influenza-grippeimpfstoffe-node.html;jsessionid=7DE7349793280136ECF5BD6252B42087.1\\_cid329](http://www.pei.de/DE/infos/fachkreise/impfungen-impfstoffe/influenza-grippeimpfstoffe-saisonal/influenza-grippeimpfstoffe-node.html;jsessionid=7DE7349793280136ECF5BD6252B42087.1_cid329)
30. World Health Organisation (2012) Weekly epidemiological record.  
<http://www.who.int/wer/2012/wer8747.pdf?ua=1>

31. World Health Organisation (2015) Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015-2016 northern hemisphere influenza season.  
[http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201502\\_recommendation.pdf?ua=1](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201502_recommendation.pdf?ua=1)
32. Centers for Disease Control and Prevention Key Facts about Seasonal Flu Vaccine.  
<http://www.cdc.gov/flu/protect/keyfacts.htm>
33. Lambert ND, Ovsyannikova IG, Pankratz VS, Jacobson RM, Poland GA (2012) Understanding the immune response to seasonal influenza vaccination in older adults: a systems biology approach. *Expert review of vaccines* 11(8): 985–994. doi: 10.1586/erv.12.61
34. Gerhard W, Mozdzanowska K, Zharikova D (2006) Prospects for universal influenza virus vaccine. *Emerging infectious diseases* 12(4): 569–574. doi: 10.3201/eid1204.051020
35. Nabel GJ, Fauci AS (2010) Induction of unnatural immunity: prospects for a broadly protective universal influenza vaccine. *Nature medicine* 16(12): 1389–1391. doi: 10.1038/nm1210-1389
36. Staneková Z, Varečková E (2010) Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Virology journal* 7: 351. doi: 10.1186/1743-422X-7-351
37. Lin J, Chiu S, Cheng J et al. (2011) Phylodynamics and molecular evolution of influenza A virus nucleoprotein genes in Taiwan between 1979 and 2009. *PloS one* 6(8): e23454. doi: 10.1371/journal.pone.0023454
38. Shu LL, Bean WJ, Webster RG (1993) Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990. *Journal of virology* 67(5): 2723–2729
39. Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S (2009) Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus research* 143(2): 147–161. doi: 10.1016/j.virusres.2009.05.010
40. Epstein SL, Kong W, Mispion JA et al. (2005) Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine* 23(46-47): 5404–5410. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.04.047
41. Sipo I, Knauf M, Fechner H et al. (2011) Vaccine protection against lethal homologous and heterologous challenge using recombinant AAV vectors expressing codon-optimized genes from pandemic swine origin influenza virus (SOIV). *Vaccine* 29(8): 1690–1699. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.037
42. Flotte TR, Carter BJ (1995) Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene therapy* 2(6): 357–362
43. Kotin RM (1994) Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Human gene therapy* 5(7): 793–801. doi: 10.1089/hum.1994.5.7-793
44. Daya S, Berns KI (2008) Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical microbiology reviews* 21(4): 583–593. doi: 10.1128/CMR.00008-08

45. Verma IM, Somia N (1997) Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389(6648): 239–242. doi: 10.1038/38410
46. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE (2008) Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16(6): 1073–1080. doi: 10.1038/mt.2008.76
47. Nakai H, Storm TA, Kay MA (2000) Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *Journal of virology* 74(20): 9451–9463
48. Rohr U, Heyd F, Neukirchen J et al. (2005) Quantitative real-time PCR for titration of infectious recombinant AAV-2 particles. *Journal of virological methods* 127(1): 40–45. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.03.006
49. Myers MW, Laughlin CA, Jay FT, Carter BJ (1980) Adenovirus helper function for growth of adeno-associated virus: effect of temperature-sensitive mutations in adenovirus early gene region 2. *Journal of virology* 35(1): 65–75
50. Cell Biolabs ViraDuctin(TM) AAV Transduction Kit - Product Manual
51. Sanlioglu S, Monick MM, Luleci G, Hunninghake GW, Engelhardt JF (2001) Rate limiting steps of AAV transduction and implications for human gene therapy. *Current gene therapy* 1(2): 137–147
52. 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. *Journal of virology* 70(5): 3227–3234
53. Matsushita T, Elliger S, Elliger C et al. (1998) Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene therapy* 5(7): 938–945. doi: 10.1038/sj.gt.3300680
54. Matsushita T, Okada T, Inaba T, Mizukami H, Ozawa K, Colosi P (2004) The adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based adeno-associated virus vector production. *The Journal of general virology* 85(Pt 8): 2209–2214. doi: 10.1099/vir.0.79940-0
55. Bridge E, Ketner G (1989) Redundant control of adenovirus late gene expression by early region 4. *Journal of virology* 63(2): 631–638
56. Halbert DN, Cutt JR, Shenk T (1985) Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *Journal of virology* 56(1): 250–257
57. SignaGen Laboratories Adeno-associated Virus (AAV) Protocol. Storage Instructions and Infection Protocol
58. Hamilton H, Gomos J, Berns KI, Falck-Pedersen E (2004) Adeno-associated virus site-specific integration and AAVS1 disruption. *Journal of virology* 78(15): 7874–7882. doi: 10.1128/JVI.78.15.7874-7882.2004

59. Li Z, Zeng Z, Chen Q, Luo S, Hu W (2006) Recombinant AAV-mediated HSVtk gene transfer with direct intratumoral injections and Tet-On regulation for implanted human breast cancer. *BMC cancer* 6: 66. doi: 10.1186/1471-2407-6-66