# **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Stephanie Kronenberg

aus Soest

Tag der mündlichen Prüfung:

Untersuchungen zur Lokalisation und Zugänglichkeit der N-Termini der Strukturproteine VP1 und VP2 im Kapsid des Adeno-assoziierten Virus Typ 2

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Jürgen Kleinschmidt Priv.-Doz. Dr. Gabriele Petersen

Für meine Mutter

# Summary

Adeno-associated virus type 2 (AAV-2) is a human parvovirus which has attended much interest as a general gene transfer vector. The AAV-2 capsid is composed of three structural proteins VP1, VP2 and VP3 which have relative molecular masses of 87 kDa, 72 kDa and 62 kDa with a unique N-terminus of VP1 and a common C-terminal region. The VP1 N-terminus contains a phospholipase A domain which is required for virus infectivity and gene transduction activity of AAV vectors at a post-entry step. VP1, VP2 and VP3 are incorporated in the capsid with a likely molar ratio of 1:1:8 and form icosahedral shells composed of 60 subunits in which they occupy symmetrically equivalent positions.

In this work the structural features of the AAV-2 capsid have been investigated. For this reason empty AAV-2 capsids were produced by means of recombinant adenoviruses and analysed by electron-cryomicroscopy and 3D-image reconstruction. The three-dimensional map at 10.5 Å resolution showed sets of three elongated spikes surrounding the three-fold symmetry axes and narrow empty channels at the five-fold axes. Globular structures at the inner surface of the capsid at the two-fold symmetry axes were identified as possible positions for the N-terminal extensions of VP1 and VP2. Although the x-ray structure of AAV-2 has been determined recently. the localisation of these extensions is still not defined.

To proof the hypothesis that the globular structures represent the N-terminal regions of the VP proteins, mutant empty capsids were generated where either VP1 or VP2 were deleted. electron-cryomicroscopy and 3D-image reconstruction of the mutant capsids revealed that there is no difference regarding the outer surfaces, but the globular structures at the two-fold symmetry axes at the inner surface are missing when VP1 or VP2 was deleted. Additionally in both reconstructions there is a supplementary density at the inner part of the channels at the five-fold symmetry axes. To proof if the rearrangement at the inner surface of the capsids correlates with the accessibility of the N-terminal stretches of VP1 and VP2 on the capsid surface two monoclonal antibodies recognizing specific N-terminal epitopes were used. There was no reaction visible with wt empty capsids and capsids missing VP1, but capsids where VP2 was deleted show a strong reaction with both N-terminus specific antibodies. Controls with an antibody detecting intact capsids showed the presence of equal amounts of capsids. This means that in contrast to wt empty capsids the N-termini of VP1 in the capsids devoid of VP2 must be accessible from outside.

Empty wt AAV capsids and DNA-containing wt capsids presented principally the same structural features, although DNA-containing capsids showed a weak reaction with the antibodies.

In order to investigate the conditions under which the VP1 N-termini of wt capsids become accessible on the capsid surface, capsids were treated with increased temperature and low pH. Biochemical analyses showed that the N-termini of full particles, but not of empty particles, seem to become accessible to the N-terminal specific antibodies after incubation at 65°C and at pH 4,5. In addition to that the DNA

of full particles became susceptible to DNase I digestion after virus incubation at 65°C or at pH 4,5. If this is due to a conformational change of the capsid or a partial dissociation is not clear. However, structural investigations of the capsids after treatment at 65°C suggest that there is a conformational change, visible by the reduction of the globules at the two-fold symmetry axes.

These results indicate that under certain conditions during infection a conformational change of the capsid shell might occur that make the N-termini become exposed to the outer surface of the capsids to develop their phospholipase activity which is involved in an efficient infection process.

# Zusammenfassung

Bei dem Adeno-assoziierten Virus Typ 2 (AAV-2) handelt es sich um ein Parvovirus, das aufgrund seiner für den Menschen apathogenen Eigenschaften als Vektor für die Gentherapie genutzt wird. Das AAV-2 Kapsid wird von den drei Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 gebildet. Diese weisen ein Molekulargewicht von 87 kDa, 72 kDa und 62 kDa auf und besitzen überlappende Aminosäuresequenzen, die sich nur am N-terminalen Ende unterscheiden. Im N-Terminus von VP1 befindet sich eine Phospholipase A-Domäne, die bei der Infektion von AAV eine Rolle spielt. VP1, VP2 und VP3 liegen im Kapsid, das aus 60 Untereinheiten besteht, mit einer Stöchiometrie von 1:1:8 vor und besetzen symmetrisch äquivalente Positionen.

In dieser Arbeit wurde das AAV-2 Kapsid auf struktureller Ebene untersucht. Dazu wurden leere AAV-2 Kapside mittels rekombinanter Adenoviren produziert und mit Hilfe von elektronenkryomikroskopischen Untersuchungen und dreidimensionaler Bildrekonstruktion analysiert. Die resultierende Rekonstruktion mit einer Auflösung von 10,5 Å weist charakteristische Erhebungen an den 3-fachen Symmetrieachsen, leere Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen und globuläre Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen auf. Diese Globuli wurden als mögliche Positionen für die bisher, auch in der später erschienenen Röntgenstruktur von AAV-2, nicht lokalisierten N-terminalen Bereiche von VP1 und VP2 identifiziert.

Zur Überprüfung der Hypothese, dass es sich bei den globulären Strukturen um die N-Termini handelt, wurden VP1- bzw. VP2-Deletionsmutanten hergestellt. Den mutanten Kapsiden fehlen die globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen. Dafür treten innen an den Kanälen der 5-fachen Symmetrieachsen zusätzliche Proteindichten auf. Die Zugänglichkeit der N-Termini von VP1 bzw. VP2 auf der Kapsidoberfläche wurde mit zwei monoklonalen Antikörpern analysiert, die ihre Epitope im N-terminalen Bereich von VP1 bzw. VP1 und VP2 haben. Während leere wt AAV-Kapside und Kapside ohne VP1 keine Reaktion zeigten, war eine deutliche Reaktion bei den Kapsiden ohne VP2 sichtbar. Also muss in VP2 deletierten Kapsiden der N-Terminus von VP1 von außen zugänglich sein.

Bei DNA-haltigen wt Kapsiden liegen, wie bei den leeren, globuläre Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen vor. Jedoch zeigen sie eine leichte Reaktion mit den N-terminalen Antikörpern.

Um herauszufinden, unter welchen Bedingungen die N-Termini von VP1 auf dem wt AAV-Kapsid zugänglich werden, wurden die Kapside bei unterschiedlichen Temperaturen und abnehmenden pH-Werten inkubiert. Die biochemischen Analysen zeigen, dass die N-Termini von DNA-haltigen, jedoch nicht von leeren wt AAV-Kapsiden nach Inkubation bei 65°C und bei pH 4,5 zugänglich werden. Außerdem ist der Abbau der enkapsidierten DNA nach Behandlung bei 65°C und bei pH 4,5 durch DNase I möglich. Ob dies durch eine Konformationsänderung oder eine partielle Dissoziation der Kapside zustande kommt, kann nicht eindeutig unterschieden werden. Strukturelle Untersuchungen der Kapside nach Inkubation bei 65°C deuten jedoch auf eine konformative Veränderung hin, die sich in der Reduktion der Globuli an den 2-fachen Symmetrieachsen bei den DNA-haltigen Kapsiden äußert.

Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass unter gewissen Umständen eine Konformationsänderung des Kapsids eintritt, durch die die N-terminalen Bereiche von VP1 und VP2 auf der Kapsidoberfläche zugänglich werden. Dabei könnte die Phospholipase aktiv werden, wodurch ein erfolgreicher Infektionsprozess mit AAV-2 ermöglicht wird.

# Inhalt

1	Einleitung	1
	1.1 Adeno-assoziierte Viren	1
	1.1.1 Klassifizierung	1
	1.1.2 Lebenszyklus von AAV-2	2
	1.2 Gentherapie	3
	1.3 Genomorganisation von AAV-2	4
	1.4 Eigenschaften der AAV-Proteine	6
	1.4.1 Nicht-Strukturproteine (Rep-Proteine)	6
	1.4.2 Strukturproteine (VP-Proteine)	7
	1.5 AAV-Kapside	8
	1.5.1 Struktur von AAV-2 Kapsiden	8
	1.5.2 Assemblierung	9
	1.5.3 Infektionsverlauf	10
	1.5.4 Funktionelle Domänen	13
	1.5.4.1 Heparansulfat-Bindedomäne	13
	1.5.4.2 Phospholipase A <sub>2</sub>	15
	1.5.4.3 Basische Regionen	16
	1.6 Strukturuntersuchungen von Viren	18
	1.6.1 Allgemeines	18
	1.6.2 Transmissionselektronenmikroskopie	18
	1.6.3 Dreidimensionale Bildrekonstruktion	20
	1.6 Ziel der Arbeit	22
2	Abkürzungen	23
3	Material	26
	3.1 Viren, humane Zelllinien, Bakterienstämme	26
	3.1.1 Viren	26
	3.1.2 Humane Zelllinien	27
	3.1.3 Bakterienstämme	27
	3.2 Plasmide	27
	3.3 Oligonukleotide	29

V

	3.4 Antikörper	30
	3.4.1 Erstantikörper	30
	3.4.2 Zweitantikörper	30
	3.5 DNA-Sonde	31
	3.6 Enzyme	31
	3.7 DNA- und Protein-Größenstandards	31
	3.7.1 DNA- Größenstandard	31
	3.7.2 Protein- Größenstandard	31
	3.8 Radioaktive Nukleotide	32
	3.9 Kits	32
	3.10 Medien und Zusätze	32
	3.10.1 Zellkultur- Medien und Zusätze	32
	3.10.2 Bakterienkultur- Medienzusätze	33
	3.11 Geräte	33
	3.12 Materialien	35
	3.13 Chemikalien	36
	3.14 Häufig vorwondete Puffer und Lösungen	37
	3.14 Haung verwendete Funer und Losungen	
	5.14 Haung verwendete Funer und Losungen	
4	Methoden	
4	Methoden	
4	Methoden         4.1 Mikrobiologische Methoden         4.1.1 Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien	<b>38</b> <b>38</b> 38
4	<ul> <li>Methoden</li></ul>	<b>38</b> 38 38 38
4	<ul> <li>Methoden</li></ul>	38 38 38 38 38
4	<ul> <li>Methoden</li></ul>	38 38 38 38 38 38 38 38
4	<ul> <li>Methoden</li></ul>	38 38 38 38 38 38 38 39 39
4	Methoden         4.1 Mikrobiologische Methoden         4.1.1 Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien         4.1.1.1 Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter Bakterien         4.1.2 Transformation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter Bakterien         4.2 Präparation und Analyse von Plasmid-DNA         4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien         4.2.1.1 Plasmid-Minipräparation	
4	Methoden         4.1 Mikrobiologische Methoden         4.1.1 Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien         4.1.1.1 Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter Bakterien         4.1.1.2 Transformation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter Bakterien         4.2 Präparation und Analyse von Plasmid-DNA         4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien         4.2.1.2 Plasmid-Minipräparation         4.2.1.2 Plasmid-Maxipräparation	38 38 38 38 38 38 39 39 39 39 39
4	<ul> <li>Methoden</li> <li>4.1 Mikrobiologische Methoden</li> <li>4.1.1 Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien</li> <li>4.1.1.1 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterien</li> <li>4.1.1.2 Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterien</li> <li>4.2 Präparation und Analyse von Plasmid-DNA</li> <li>4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien</li> <li>4.2.1.1 Plasmid-Minipräparation</li> <li>4.2.1.2 Plasmid-Maxipräparation</li> <li>4.2.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA</li> </ul>	38 38 38 38 38 39 39 39 39 39 40 40
4	<ul> <li>Methoden</li> <li>4.1 Mikrobiologische Methoden</li> <li>4.1.1 Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien</li> <li>4.1.1.1 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterien</li> <li>4.1.1.2 Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterien</li> <li>4.2 Präparation und Analyse von Plasmid-DNA</li> <li>4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien</li> <li>4.2.1.1 Plasmid-Minipräparation</li> <li>4.2.1.2 Plasmid-Maxipräparation</li> <li>4.2.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA</li> <li>4.2.3 Restriktionsverdauung von Plasmid-DNA mit Endonukleasen</li> </ul>	38 38 38 38 38 39 39 39 39 39 39 40 40 40
4	<ul> <li>Methoden</li></ul>	38 38 38 38 38 39 39 39 39 39 39 40 40 41
4	<ul> <li>Methoden</li></ul>	38 38 38 38 38 39 39 39 39 39 39 39 40 40 41 42
4	Methoden         4.1 Mikrobiologische Methoden         4.1.1 Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien         4.1.1.1 Herstellung CaCl2-kompetenter Bakterien         4.1.1.2 Transformation CaCl2-kompetenter Bakterien         4.1.2 Transformation CaCl2-kompetenter Bakterien         4.2 Präparation und Analyse von Plasmid-DNA         4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien         4.2.1.2 Plasmid-Minipräparation         4.2.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA         4.2.3 Restriktionsverdauung von Plasmid-DNA mit Endonukleasen         4.2.4 DNA-Gelelektrophorese         4.2.5 Sequenzierung von DNA         4.2.5.1 Sequenzierung mit S <sup>35</sup>	38 38 38 38 38 39 39 39 39 39 39 39 40 40 41 42 42

4.3 Klonierung von DNA-Fragmenten	43
4.3.1 Reinigung von DNA-Fragmenten	43
4.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion	43
4.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	45
4.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten	45
4.4 Zellbiologische Methoden	45
4.4.1 Kultivierung humaner Zellen	45
4.4.2 Bestimmung der Anzahl lebender Zellen	46
4.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	46
4.4.3.1 Einfrieren von humanen Zellen	46
4.4.3.2 Auftauen von humanen Zellen	46
4.4.4 Transfektion von Zellen	47
4.5 Protein-biochemische Methoden	47
4.5.1 Zellextrakt	47
4.5.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
4.5.3 Coomassie-Färbung	48
4.5.4 Western-Blot Analyse	49
4.6 Virologische Methoden	50
4.6.1 Infektion von humanen Zellen	50
4.6.2 Produktion und Präparation von wt AAV-2	50
4.6.2.1 Produktion von wt AAV-2	50
4.6.2.2 Reinigung des AAV-2 Stocks mittels lodixanol-Stufengradienten	51
4.6.2.3 Reinigung von AAV-2 Kapsiden mittels Heparin-Agarose	
Chromatographie	51
4.6.2.4 Aufkonzentrieren der AAV-2 Kapside mittels Vivaspin-	
Konzentratoren	52
4.6.3 Produktion und Präparation von Adenovirus Typ 5	52
4.6.3.1 Produktion von Adenovirus 5	52
4.6.3.2 Reinigung des Adeno-5 Stocks mittels CsCI-Dichtegradienten	53
4.7 Immunologische Methoden	53
4.7.1 Immundetektion transferierter Proteine	53
4.7.2 A30-Titration zur Bestimmung des infektiösen Titers	54
4.7.3 A20-"capture" ELISA zur Kapsidtiter-Bestimmung	55
4.7.4 Biotinylierung von Antikörpern	56

4.7.5 Antikörperbindungstest	56
4.7.5.1 auf beschichteten Platten	56
4.7.5.2 auf nicht-beschichteten Platten	57
4.7.6 Nicht-radioaktiver Dot-Blot Assay	57
4.7.7 Nicht-radioaktiver Zellbindungstest	58
4.7.8 Indirekte Immunfluoreszenz	59
4.7.9 Fotografieren von Immunfluoreszenzen	60
4.8 Präparation und Analyse von viraler DNA	60
4.8.1 Präparation der viralen DNA	60
4.8.1.1 Isolierung von rekombinanter Adeno-DNA für die Sequenzierung	60
4.8.1.2 Isolierung von wt AAV-DNA für die Southern-Blot Analyse	61
4.8.2 Southern-Blot Analyse	62
4.8.2.1 Transfer von DNA	62
4.8.2.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	63
4.8.2.3 Hybridisierung und Detektion immobilisierter DNA	64
4.9 Herstellung und Vermehrung von rekombinanten Adenoviren	64
4.9.1 Synthese der rekombinaten Adenoviren	65
4.9.1.1 Synthese mittels Plaque-assay	65
4.9.1.2 Synthese mittels Clonetech-Protokoll	66
4.9.2 Vermehrung der rek. Adenoviren	67
4.10 Produktion und Präparation von AAV-Partikeln	68
4.10.1 Produktion von rek. AAV-Partikeln	68
4.10.2 Präparation von rek. AAV-Partikeln	68
4.11 Elektronenmikroskopische Methoden	69
4.11.1 Negativ-Kontrastierungsverfahren	69
4.11.1.1 Herstellung der kohlebeschichteten Kupfernetzchen	70
4.11.1.2 Negatives Kontrastieren und Fotografieren der Proben	70
4.11.2 Auszählen von AAV-Partikeln	71
4.11.3 Elektronenkryomikroskopie	71
4.11.3.1 Herstellung der Netzchen	71
4.11.3.2 Frieren der Proben	73
4.11.3.3 Mikroskopieren und Fotografieren der Proben	74
4.11.4 Auswahl und Digitalisierung der Kapsid-Aufnahmen	77
4.11.5 Bildverarbeitung und dreidimensionale Bildrekonstruktion	77

5	Erę	gebi	niss	e	79
	5.1	Str	uktu	irelle Analysen von AAV-2 Kapsiden	.79
	5	.1.1	Ana	alyse von leeren AAV-2 Kapsiden	.79
		5.1	.1.1	Genomaufbau des rekombinanten Adenovirus Ad-VP für	
				die Produktion von leeren AAV Kapsiden	.79
		5.1	.1.2	Produktion und Präparation von leeren AAV-2 Kapsiden	.80
		5.1	.1.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen von leeren AAV	
				Kapsiden	.81
	5	.1.2	Ana	alyse von vollen wt AAV Kapsiden	.85
		5.1	.2.1	Produktion und Präparation von vollen wt AAV-2 Kapsiden	.85
		5.1	.2.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen von DNA-haltigen	
				AAV Kapsiden	.86
	5	.1.3	Her	stellung und Analyse von AAV-2-Kapsidmutanten, bei denen	
			eine	es der drei VP-Proteine deletiert ist	.88
		5.1	.3.1	Herstellung von Plasmiden mit mutierten AAV-Sequenzen	.89
		5.1	.3.2	Synthese von adenoviralen Transferplasmiden und rekombinanten	
				Adenogenomplasmiden mit integrierten mutierten cap-Genen	.91
		5.1	.3.3	Produktion und Vermehrung der rekombinanten mutierten	
				Adenoviren	.96
		5.1	.3.4	Produktion und Präparation von mutanten AAV-Kapsiden	.98
	5	.1.4	Her	stellung und Analyse von einer AAV-2 Kapsidmutante, bei der	
			SOW	vohl VP1 als auch VP2 deletiert sind1	01
		5.1	.4.1	Synthese der NLSVP3 (Δ VP1+2)-Mutante1	01
	5.2	Bio	che	mische Untersuchung zur Lokalisation der N-Termini der	
		<b>VP</b> <sup>·</sup>	1- ur	nd VP2-Proteine im AAV-2 Kapsid1	06
	5	.2.1	Ant	ikörperbindungstest von wt AAV-2 Kapsiden mit den monoklo-	
			nale	en Antikörpern A1, A69, B1 und A201	07
	5	.2.2	Ant	ikörperbindungstest von VP1 bzw. VP2 defizienten AAV-2	
			Kap	osiden mit den Antikörpern A1, A69, B1 und A201	10
	5	.2.3	Ant	ikörperbindungstest von DNA-enthaltenden und leeren wt AAV-2	
			Kap	osiden nach Inkubation bei 65°C mit den Antikörpern A1, A69, B1	
			und	I A201	11
	5	.2.4	Dot	-Blot Analyse von DNA-haltigen und leeren wt AAV-2 Kapsiden	
			nac	h Inkubation bei verschiedenen Temperaturen1	13

5.3 Str	ukturelle und biochemische Untersuchungen der Kapside	
nao	ch Inkubation unter verschiedenen Bedingungen	114
5.3.1	Negativ-Kontrastierung von wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei	
	verschiedenen Temperaturen	114
5.3.2	3D-Rekonstruktion von DNA-enthaltenden wt AAV-2 Kapsiden nach	
	Inkubation bei 65°C	115
5.3.3	Dot-Blot Analyse der DNA-haltigen und der leeren wt AAV-2	
	Kapsidpräparationen nach Inkubation bei verschiedenen pH-Werten	117
5.3.4	Southern-Blot Analyse von DNA-haltigen AAV-2 Kapsiden nach In-	
	kubation bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten zur Lo-	
	kalisation der DNA	119
5.4 Un	tersuchungen über den Einfluß von Heparin auf die AAV-2	
Ka	apside	121
5.4.1	Zellbindungstest von leeren wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation	
	mit verschiedenen Mengen von 6kDa großen Heparinmolekülen	121
5.4.2	3D-Rekonstruktion von vollen wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation	
	mit 6kDa großen Heparinmolekülen	122
6 Diskus	ssion	125
6.1 Str	uktur von AAV-2 Kapsiden	125
6.1.1	Strukturelle Analyse von leeren AAV-2 Kapsiden	125
6.1.2	Vergleich der elektronenkryomikroskopischen Rekonstruktion von	
	AAV-2 mit der Röntgenstruktur	128
6.1.3	Vergleichende Analyse von vollen und leeren AAV-2 Kapsiden	130
6.2 Au	swirkungen der Deletion eines der VP-Proteine	131
6.2.1	Strukturelle Auswirkungen der Deletion von VP1, VP2 oder VP3	131
6.2.2	Auswirkungen der Deletion von VP1 oder VP2 auf biochemischer	
	Ebene	133
6.2.3	Auswirkungen der Deletion von VP1 und VP2	134
6.3 Bio	ochemische Untersuchung zur Lokalisation der N-Termini der	
VP	1- und VP2-Proteine im wt AAV-2 Kapsid	134
6.3.1	Analyse der Zugänglichkeit der N-Termini von VP1 und VP2 nach	
	Inkubation bei verschiedenen Temperaturen	135
6.3.2	Strukturelle Analyse der AAV-2 Kapside nach Inkubation bei 65°C	138

6.3.3	Analyse der Zugänglichkeit der N-Termini von VP1 und VP2 nach		
	Inkubation bei verschiedenen pH-Werten	139	
6.3.4	Untersuchung der DNA-Zugänglichkeit in AAV-2 Kapsiden unter		
	verschiedenen Inkubationsbedingungen	142	
6.4 Untersuchungen über den Einfluss von Heparin auf AAV-2 Viren143			
6.4.1	Kompetition von Heparin um die Bindestellen an AAV-2 Kapsiden	143	
6.4.2	Strukturelle Auswirkungen von 6 kDa großen Heparinmolekülen auf	144	
AAV-	2 Kapside	144	

## 7 Literaturverzeichnis

### 147

8	Anhang	160
	8.1 Ad-VP DNA-Sequenz	.160
	8.2 Plasmidkarten	.162
	8.3 Publikation	.165

Das Adeno-assoziierte Virus Typ 2 (AAV-2) ist in den letzten Jahren zu einem immer interessanteren Objekt für die Gentherapie geworden. Dies liegt vor allem daran, dass es für den Menschen nicht pathogen ist und über ein breites Spektrum an Wirtszellen verfügt. Außerdem besitzt es onkosuppressive Eigenschaften, die es wertvoll für die Krebsforschung machen. Zur Verbesserung der AAV-2 Vektorkonstruktionen, z.B. zur Erkennung spezifischer Zelltypen und zum Verständnis des Gentransferprozesses, ist deshalb eine detaillierte Kenntnis der strukturellen Eigenschaften von AAV-2 Kapsiden, sowie des Infektionsweges von AAV-2 von großer Bedeutung.

#### 1.1 Adeno-assoziierte Viren

#### 1.1.1 Klassifizierung

Adeno-assoziierte Viren gehören zu der Familie der Parvoviridae (Siegl et al., 1985, Berns, 1990). Mitglieder dieser Familie sind die kleinsten bekannten DNA-Viren und bestehen aus ikosaedrisch geformten Kapsiden mit einem Durchmesser von 20-26 nm. Sie haben keine Hüllmembran und beinhalten ein lineares, einzelsträngiges Genom von 4,7 bis 6,0 Kilobasen. Parvoviridae sind außergewöhnlich stabil und haben ein breites Wirtsspektrum. Sie sind in der Lage, verschiedene Tierarten von Insekten bis hin zu den Säugetieren, einschließlich des Menschen, zu infizieren. Die Familie der Parvoviridae lässt sich in zwei Unterfamilien einteilen, die Parvovirinae, die nur in Wirbeltieren vorkommen und in die Densovirinae, die Insekten infizieren (van Regenmortel et al., 2000). Die Parvovirinae umfassen drei verschiedene Gattungen, die Parvoviren, die Erythroviren und die Dependoviren. AAV gehört zu den Dependoviren. Diese Virengattung sondert sich insofern von den anderen beiden Gattungen ab, als sich die zu ihr gehörenden Viren in Zellkultur nicht autonom replizieren können, sondern ein Helfervirus benötigen. Adeno-assoziierte Viren wurden zuerst in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Adenoviren entdeckt und für Vorstufen der Adenovirus-Kapside oder Abbauprodukte dieser gehalten (Kilham und Oliver, 1959). Später zeigte sich, dass es sich bei den Partikeln um eigenständige Viren handelte, die allerdings zu ihrer Vermehrung auf die Koinfektion von Adenoviren angewiesen sind, weshalb sie als Adeno-assoziierte Viren bezeichnet wurden (Atchison et al., 1965; Melnick et al., 1965; Hoggan et al., 1966). Außer den Adenoviren können auch Herpes simplex Virus Typ 1 und 2 (Buller et al., 1981), das humane Cytomegalievirus (McPherson et al., 1985), das humane Herpesvirus Typ 6 (Thomson et al., 1994) und wahrscheinlich auch das humane Papillomvirus Typ 16 (Ogston et al., 2000; Meyers et al., 2001) als Helferviren fungieren. Bislang sind acht verschiedene AAV Serotypen aus Menschen (AAV-2, AAV-3, AAV-5) und anderen Primaten (AAV-1, AAV-4, AAV-7, AAV-8) isoliert und ihre Genome sequenziert worden (Samulski et al., 1982; Laughlin et al., 1983; Muramatsu et al., 1996; Chiorini et al., 1997; Rutlege et al., 1998; Bantel-Schaal et al., 1999; Xiao et al., 1999, Gao et al., 2002). Die Aminosäuresequenz von AAV-6, dessen Ursprung nicht genau bekannt ist, unterscheidet sich dabei als einzige nicht eindeutig von den anderen, sondern weist mehr als 99% Homologie zu der Sequenz von AAV-1 auf. Aufgrund dessen handelt es sich bei AAV-6 wahrscheinlich um keinen eigenen Serotyp, sondern um eine Rekombination aus AAV-1 und AAV-2 (Xiao et al., 1999).

#### 1.1.2 Lebenszyklus von AAV-2

AAV-2, das von allen Adeno-assoziierten Viren am besten untersuchte Virus, benötigt für eine produktive Infektion von Zellen in Kultur eine Koinfektion mit Helferviren. Aus diesem Grund wurde AAV lange für ein defektes Virus gehalten (Berns und Giraud, 1996). Detaillierte Studien haben allerdings ergeben, dass sich AAV allein in gesunden Zellen latent integriert und eine produktive Vermehrung nur nach Zugabe eines Helfervirus eintritt. Somit gibt es zwei getrennte intrazelluläre Phasen in dem Lebenszyklus von AAV (Leonard und Berns, 1994): In Abwesenheit eines Helferviruses begrenzt eine limitierte Expression der viralen Gene die Replikation der viralen DNA. Dieser negative Effekt erhöht die stabile und ortsspezifische Integration des viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle. AAV-2 integriert in die Region g13-gter des Chromosoms 19 (Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1991). Berns et al. (1975) konnten zeigen, dass AAV-2 sogar nach etlichen Passagen noch in den Zellen nachgewiesen werden. Dabei waren keine Veränderungen der Zellen erkennbar. Diese spezifische Integration des AAV-Genoms ist einzigartig unter eukaryotischen Viren. In der zweiten intrazellulären Phase, die durch die Koinfektion mit dem Helfervirus eingeleitet wird (Atchinson et al., 1965; Hoggan et al., 1966; Buller et al., 1981), fin-

det die produktive AAV-Vermehrung statt. Dabei wird das Milieu der Wirtszelle durch Genprodukte der Helferviren dahingehend verändert, dass die Produktion von AAV-Viren ermöglicht wird. Dazu wird die AAV-DNA aus dem Wirtszellgenom wieder ausgeschnitten, repliziert, Virus-Kapside synthetisiert und die DNA dort hinein verpackt. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass die AAV-Vermehrung unter bestimmten Umständen auch ohne Koinfektion durch Helferviren stattfinden kann. So konnte gezeigt werden, dass in sich differenzierenden Keratinocyten eine autonome AAV-2 Replikation stattfindet (Meyers et al., 2000). Außerdem bewirken z.B. die Behandlung von infizierten Zellen mit UV-Strahlung oder karzinogenen Substanzen oder ein Hitzeschock die Produktion von AAV-Partikeln (Schlehofer et al., 1986; Yakobson et al., 1987; Yalkinoglu et al., 1988).

#### 1.2 Gentherapie

Adeno-assoziierten Viren weisen eine Vielzahl von günstigen Eigenschaften auf, die sie in den letzten Jahren zu vielversprechenden Kandidaten für die humane Gentherapie gemacht haben. Es gibt keine durch Infektion mit AAV verursachten Krankheiten und das Virus ist nicht in der Lage, sich selbst zu replizieren (Berns und Giraud, 1996). Das wt AAV-2 Genom kann sich gerichtet und stabil in das humane Chromosom 19 zu integrieren (Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1991). Fehlen die dafür notwendigen Proteine (Rep78 und Rep68), erfolgt die Integration zwar nicht sehr effizient und auch nicht spezifisch, aber es ist dennoch möglich, mitotische und nichtmitotische Zellen verschiedenster Organe, wie Lunge, Muskeln, Retina, Leber oder des zentralen Nervensystems zu transduzieren (Samulski et al., 1999).

Rekombinate AAV-2 Vektoren werden konstruiert, indem virale Gene durch eine therapeutische Genkassette ersetzt werden. Dabei können ein Teil oder sogar alle viralen Gene entfernt werden. Bei den sogenannten "gutless"-Vektoren wird das therapeutische Gen nur noch von den ITR-Regionen flankiert, die für die Enkapsidierung des Vektorplasmids notwendig sind (Samulski et al., 1989). Zusätzlich zu dem Vektorplasmid ist noch ein Helferplasmid notwendig, das die AAV *rep*- und *cap*-Gene, sowie die essentiellen Adenogene enthält. Auf diese Weise entsteht ein sicheres Vektorsystem, das den Anforderungen der klinischen Gentherapie entspricht. Allerdings gibt es auch noch immer eine große Zahl von Nachteilen bei der AAV-Vektorsynthese, wie die Begrenzung der Größe des therapeutischen Gens auf etwa

5 kb (Kay et al., 2001) oder das Problem, Vektorstocks in ausreichend hohen Konzentrationen zu produzieren. Zusätzlich lassen sich verschiedene Zelltypen nicht gleich effizient transduzieren und etwa 80% der Bevölkerung sind serumpositiv und besitzen neutralisierende Antikörper (Erles et al., 1999; Moskalenko et al., 2000) Es ist somit von großer Bedeutung, die der Infektion von AAV zugrundeliegenden Mechanismen so genau wie möglich zu kennen, um AAV-Vektoren effizient in der Gentherapie einsetzen zu können.

#### 1.3 Genomorganisation von AAV-2

AAV-Viren enthalten ein lineares einzelsträngiges DNA-Genom. Dabei kommt die DNA in fertigen Kapsiden mit Plusstrang- oder Minusstrang-Polarität in gleicher Häufigkeit vor. Das Genom von AAV-2 hat eine Größe von 4681 Nukleotiden (Srivastava et al., 1983; Cassinotti et al., 1988; Ruffing et al., 1994) und kodiert für zwei offene Leserahmen (ORF), die von palindromischen Sequenzen, den sogenannten "Inverted terminal repeats" (ITR) eingeschlossen werden (Abb.1-1). Der linke Leserahmen kodiert für die vier Nicht-Strukturproteine, die sogenannten "Rep-Proteine" (Hermonat et al., 1984; Tratschin et al., 1984). Diese werden aufgrund ihres Molekulargewichts als Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40 bezeichnet (Srivastava et al., 1983). Der rechte Leserahmen kodiert für die drei Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 (Rose et al., 1971). Die drei, für die Expression der Proteine verantwortlichen Promotoren, werden nach ihrer Position auf dem in 100 Karteneinheiten unterteilten Genom, als p5, p19 und p40 bezeichnet. Sowohl die Nicht-Strukturproteine, als auch die Strukturproteine haben überlappende Aminosäuresequenzen (Abb. 1-1). Rep78 und Rep68 werden von dem ungespleißten bzw. gespleißten Transkript des p5-Promotores translatiert (Laughlin et al., 1979), während die Transkription von Rep52 und Rep40 durch den p19-Promotor reguliert wird. Dabei wird bei Rep40 die gleiche C-terminale Intronsequenz wie bei Rep68 entfernt. VP1, VP2 und VP3 entstehen als zwei p40-Promotor-Transkripte durch alternatives Spleißen, wobei die Spleiß-Akzeptorstelle bei Nukleotid 2228 gegenüber der bei Nukleotid 2201 bevorzugt verwendet wird. Die einzelnen Proteine werden durch Benutzung von drei verschiedenen Startkodons synthetisiert. Alle Transkripte haben eine gemeinsame Polyadenylierungsstelle (poly A), die sich auf der Genkarte bei Position 96 (Nukleotid 4424 bis 4429) befindet (Srivastava et al., 1983).

4



A) Das Genom von AAV-2 hat eine Länge von 4681 Nukleotiden, die in 100 Karteneinheiten unterteilt werden, und wird von terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) flankiert. Die drei Promotoren p5, p19 und p40 (anhand der Karteneinheiten nach ihrer Position benannt), sowie die Polyadenylierungsstelle (poly A) sind in das schematische Genom eingezeichnet. Das Intron mit der Spleißdonorstelle bei Nukleotid (Nt) 1907 mit den beiden Spleißakzeptorstellen (Nt 2201 und Nt 2228) sind durch eine dachförmige Struktur gekennzeichnet. Schwarze Pfeile stellen die Transkripte der drei Promotoren dar und die Leserahmen für die AAV-2 Proteine sind blau (Rep-Proteine) bzw. rot (VP-Proteine) markiert.

B) Die ITR-Sequenz von AAV-2 besteht aus den Palindromen A, B, C und der Sequenz D. Die Rep-Bindestelle (RBS) ist durch eine schwarze Umrandung und die "terminal resolution site" (trs) mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet.

Die ITR-Sequenzen, die die Leserahmen beidseitig flankieren, sind bei AAV identisch, besitzen allerdings die umgekehrte Orientierung. Sie haben eine Größe von 145 Nukleotiden, von denen jeweils die ersten 125 Nukleotide im einzelsträngigen Genom eine T-förmige Haarnadelstruktur ausbilden, die aus drei Palindromen bestehen (A, B und C, Abb.1-1B) (Lusby et al., 1980). Die ITR-Sequenzen dienen als

"origin" für die virale DNA-Replikation und als Primer für den Start der DNA-Synthese (Lusby et al., 1980; Srivastava et al., 1987; Muzyczka 1992; Berns und Giraud, 1996). An der "terminal resolution site" (trs) am rechten Ende des Palindroms A wird bei der DNA-Replikation eine Rep-vermittelter Einzelstrangbruch erzeugt, durch den die Haarnadelstruktur in eine lineare Form überführt wird (Im und Muzyczka, 1990). Zusätzlich dazu sind die Palindromsequenzen zusammen mit Rep78 sowohl für die Integration des AAV-Genoms in das Wirtsgenom (Balagué et al., 1997), als auch die Exzision dessen aus dem Integrationszustand verantwortlich (Samulski et al., 1987). Die ITR-Sequenzen sind des weiteren für die Verpackung der DNA in die Kapside notwendig (Samulski et al., 1989). Die, an die Haarnadelstruktur angrenzende, 20 Nukleotide große D-Sequenz spielt dabei, aber auch bei der Replikation des viralen Genoms, eine entscheidende Rolle (Wang et al., 1998).

#### 1.4 Eigenschaften der AAV-Proteine

#### 1.4.1 Nicht-Strukturproteine (Rep-Proteine)

Bei den Rep-Proteinen handelt es sich um eine Familie von multifunktionellen regulatorischen Proteinen. Ihre regulatorische Aktivität wird von der An- bzw. Abwesenheit eines Helfervirus beeinflusst. In Abwesenheit eines Helferviruses vermitteln Rep78 und Rep68 die ortspezifische Bindung des AAV-2 Genoms an die chromosomale Integrationsstelle AAVS1 auf Chromosom 19 (Weitzman et al., 1994; Chiorini et al., 1996; Linden et al., 1996). Diese Integrationsstelle enthält eine "terminal resolution site"-ähnliche Seguenz (Abb. 1-1), die von Rep78 geschnitten werden kann, wodurch es zu einer gerichteten Integration des AAV-2 Genoms in das Wirtsgenom kommt (Chiorini et al., 1996; Linden et al., 1996). Außerdem hemmen sie die Promotoren p5 und p19 (Hörer et al., 1995; Kyöstiö et al., 1994; Pereira et al., 1997) und unterbinden somit die Expression der AAV-2 Proteine. In Anwesenheit eines Helferviruses induzieren die großen Rep-Proteine Rep78 und Rep68 die Transkription der drei AAV-Promotoren (Labow et al., 1986; Weger et al., 1997). Es wurde eine spezifische Bindung von Rep68 an die Rep-Bindestellen (RBS) in der ITR-Region (Abb. 1-1B) und den Promotoren p5 und p19 nachgewiesen (McCarty et al., 1994). Die Bindung an die RBS in der ITR-Region und dem p5-Promotor führt zu einer Aktivierung der Transkription des p19- und des p40-Promotors. Außerdem bewirkt die Bindung an die RBS in der ITR-Region eine Aktivierung der Transkription des p5-Promotors, während die Bindung an die RBS im p5-Promotor zur Inhibierung des p5-Promotors führt. Somit dient Rep68 gleichzeitig als Repressor und Aktivator (Pereira et al., 1997). Es wurde jedoch auch beobachtet, dass Rep52 und Rep40 in der Lage sind, die Inhibierung des p5-Promotors teilweise wieder aufzuheben.

Rep78 und Rep68 spielen zudem eine essentielle Rolle für die AAV DNA-Replikation (Hermonat et al., 1984; Tratschin et al., 1984). Sie sind ATP-abhängige Endonukleasen und besitzen DNA-Helikaseaktivität (Im and Muzyczka, 1990). Bei der DNA-Replikation binden Rep78 und Rep68 ortssspezifisch an die Rep-Bindestelle (RBS) in den ITRs (Abb.1-1B), schneiden strangspezifisch innerhalb der trs und binden kovalent an das 5'-Ende des ausgeschnittenen Strangs (Snyder et al., 1990a/b; Im und Muzyczka, 1990/1992). Das so entstandene freie 3'-Ende dient als Primer für die Neusynthese des AAV-2 Genoms (Im and Muzyczka, 1990).

Die Funktionen der kleinen Rep-Proteine (Rep52 und Rep40) sind bislang noch nicht so gut charakterisiert worden. Für die DNA-Replikation scheinen sie nicht notwendig zu sein (Ni et al., 1994), allerdings für die Verpackung der DNA in die Kapside (King et al. 2001). Sie sind unerlässlich für die Akkumulation von ssDNA in der Zelle, was auf den Beginn der DNA-Verpackung hinweist (Chejanovsky and Carter, 1989). Bei Rep52 ist zusätzlich eine ATPase- und DNA-Helikasefunktion festgestellt worden (Smith und Kotin, 1998). Außerdem kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den vier Rep-Proteinen, der AAV-DNA und den Kapsiden (Dubielzig et al., 1999).

Rep78 und Rep68 interagieren neben ihrer Rolle im Lebenszyklus von AAV auch mit vielen zellulären Proteinen, was die Hemmung der zellulären Transformation, DNA-Replikation und des Zellwachstums, sowie tumorsuppressive Eigenschaften zur Folge hat (Winocour et al., 1988; Rommelaere und Cornelis, 1991; Schlehofer, 1994; Yang et al., 1995; Weger et al., 1999).

#### **1.4.2 Strukturproteine (VP-Proteine)**

Die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 bilden das AAV-Kapsid. Sie werden von dem gleichen Leserahmen kodiert und besitzen überlappende Aminosäuresequenzen, die sich nur am N-terminalen Ende unterscheiden (Abb. 1-1). VP1 besteht aus 735 Aminosäuren (AS) und weist ein Molekulargewicht von 87 kDa auf, VP2 hat 598 Aminosäuren (72 kDa) und VP3 wird von 533 Aminosäuren (62 kDa) gebildet (John-

son et al., 1971). In einem AAV Kapsid, das aus 60 Untereinheiten besteht, liegen die VP-Proteine in einem molaren Verhältnis von etwa 1:1:8 vor (Johnson et al., 1971, Salo and Mayer, 1977) und besetzen symmetrisch äquivalente Positionen. Die unterschiedliche Expression der VP-Proteine resultiert aus zwei vom p40-Promotor ausgehenden Transkripten. Diese entstehen über einen ineffizienten alternativen Spleißvorgang (Cassinotti et al., 1988; Becerra et al., 1988). VP1 wird von dem eher seltenen, ungespleißten 2,6 Kb großen Transkript translatiert, während VP2 und VP3 von dem bevorzugt gebildeten, gespleißten 2,3 Kb großen Transkript synthetisiert werden. VP2 beginnt dabei allerdings mit einem bei eukaryotischen Startkodons ungewöhnlichen Kodon ACG (Becerra et al., 1985) und wird deshalb in geringeren Mengen exprimiert, als das weiter hinten mit ATG startende VP3.

### 1.5 AAV-Kapside

#### 1.5.1 Struktur von AAV-2 Kapsiden

Die Röntgenstruktur des AAV-2 Kapsids ist mit einer Auflösung von 3 Å bestimmt worden (Xie et al., 2002). AAV-Kapside weisen eine ikosaedrische Form auf und bestehen aus 60 Untereinheiten. Jede Untereinheit enthält eine  $\beta$ -Faltblattstruktur (Abb. 1-2), die bei viralen Kapsidproteinen weit verbreitet ist (Harrison, 2001).



Abb.1-2: Gebänderte Darstellung der Struktur einer AAV-2 Untereinheit (modifiziert nach Xie et al., 2002)

Die Positionen von drei benachbarten Symmetrieachsen zur Orientierung sind in blau markiert. Die  $\beta$ -Faltblattstruktur an der inneren Oberfläche des Kapsids ist rosa gefärbt. Die beiden Blätter sind dabei durch die Stränge A, I, D, B, G und C, H, E, F gekennzeichnet. Die Loops sind bezüglich der Stränge, die sie flankieren, benannt.

Bei der hier dargestellten Untereinheit von AAV-2 fehlen die N-terminalen Bereiche von VP1 und VP2, sowie die ersten 14 Aminosäuren des VP3-Proteins. Obwohl alle drei Proteine in den Kristallen nachzuweisen waren, war es nicht möglich, die Struktur der N-terminalen Bereiche zu bestimmen. Weitere Untersuchungen zur Lokalisation der N-Termini der VP-Proteine sind deshalb dringend notwendig.

#### 1.5.2 Assemblierung

Während der Infektion können die Kapsidproteine im Zytoplasma und im Nukleus nachgewiesen werden. Dies ist aufgrund eines "nuclear localization signals" (NLS) im *VP2*-Gen möglich, welches den Proteinen VP2 und VP1 ermöglicht, in den Zellkern zu gelangen, während der Transport von VP3 in den Zellkern von Komplexbildungen von VP3 mit VP1 oder VP2 abhängig ist (Ruffing et al., 1992; Hoque et al., 1999). AAV-2 Kapside sind bei einer produktiven Infektion zuerst in den Nukleoli nachweisbar, wobei die Menge der gebildeten Kapside direkt von der Menge der exprimierten VP-Proteine abhängt (Wistuba et al., 1997). Außerdem wird vermutet, dass humanes Nukleolin einer der, für den Start des Kapsidzusammenbaus notwendigen, nukleären Komponenten ist (Qiu and Brown, 1999).

Im späteren Verlauf der Infektion liegen die Kapside im Nukleoplasma verteilt vor und kolokalisieren mit Rep-Proteinen und DNA. Die Enkapsidierung des AAV-2 Genoms findet deshalb wahrscheinlich an dieser Stelle statt (Weitzman et al., 1996; Wistuba et al., 1997). Ruffing et al (1992) konnten zeigen, dass der Zusammenbau der Kapside unabhängig von VP1 möglich ist. Andere Untersuchungen ergaben sogar, dass VP3 alleine für den Zusammenbau ausreichend ist, wenn es in Baculoviren exprimiert und mit Hilfe eines NLS in den Zellkern transportiert wurde (Hoque et al., 1999). Das VP1-Protein ist jedoch notwendig für die Ausbildung von infektiösen AAV-Partikeln (Hermonat et al., 1984; Tratschin et al.; 1984 Smuda et al., 1991). Ohne VP1 ist die Infektiösität etwa um den Faktor 100 reduziert (King, unveröffentlichte Daten).

#### 1.5.3 Infektionsverlauf

Die virale Infektion ist ein komplexer Vorgang, bei dem das Virus mit der Zellmembran in Kontakt tritt, in die Zelle gelangt und zum Zellkern transportiert wird, wo es zur Expression der viralen Gene kommt.

#### Bindung des Virus an die Zelloberfläche

Der erste Schritt der Infektion durch AAV-2 ist die Adsorption des Virus an einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche der Wirtszelle. Mizukami et al. (1996) postulierten zunächst, dass es sich bei diesem Rezeptor um ein unbekanntes, membrangebundenes, 150 kDa großes Glykoprotein handelt. Aufgrund von weiteren Untersuchungen konnte aber von Summerford und Samulski (1998) Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) als primärer Rezeptor für AAV-2 identifiziert werden. Außer AAV-2 bindet auch AAV-3 an Heparansulfat-Proteoglykan, während die anderen AAV-Serotypen andere primäre Rezeptoren zu nutzen scheinen.

Die Bindungsaffinität von AAV-2 an Heparansulfat ist gering (Dissoziationskonstante  $K_d = 2,0$  nM). Aus diesem Grund gibt es noch weitere Rezeptoren mit einer höheren Affinität zu AAV-2, die die Bindung von AAV-2 an die Zelloberfläche verstärken. Bei diesen sogenannten "Ko-Rezeptoren" handelt es sich um den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (FGFR1) (Qing et al., 1999) und  $\alpha V\beta$ 5-Integrin (Summerford und Samulski, 1999) (Abb. 1-3A+B).

# Aufnahme des Virus in die Zelle und Freisetzung des Virusgenoms aus dem Kapsid

Für AAV-2 und die meisten anderen hüllenlosen Viren sind die Mechanismen von der Aufnahme in die Zelle bis hin zum Transport des Genoms in den Zellkern bisher noch nicht genau aufgeklärt worden (Whittaker et al., 2000; Greber, 2002). Bei vielen, wie z.B. Adenoviren, Reoviren, Polioviren und Rhinoviren, wird postuliert, dass der Eintritt in die Zelle, wie bei umhüllten Viren über rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt (Bartlett et al., 2000). Eine Ausnahme bilden die Rotaviren, die vermutlich direkt durch Interaktion mit der Plasmamembran in die Wirtszelle eindringen (Kaljot et al., 1988). Bei der Aufnahme von AAV-2 spielt vor allem  $\alpha V\beta 5$ -Integrin, für dessen  $\beta 5$ -Untereinheit eine direkte Interaktion mit dem Virus nachgewiesen werden konnte, eine wichtige Rolle (Summerford et al., 1999) (Abb. 1-3B).



Abb.1-3 Infektionsweg von AAV-2 (modifiziert nach Bartlett et al., 2000) Schematische Darstellung des Infektionsweges von AAV-2.

**A)** Bindung des AAV-2 Viruskapsids an Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) und den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (FGFR1).

**B)** Eintritt des Virus in die Zelle mittels Clathrin-coated pits. An diesem Vorgang ist  $\alpha V\beta$ 5-Integrin als Ko-Rezeptor beteiligt.

**C)** Endosomaler Weg von AAV-2, der aus mehreren Kompartimenten mit zunehmend sauer werdendem pH-Wert besteht.

**D)** Freisetzung der AAV-2 Viren aus den Endosomen in den perinukleären Bereich, wo es zur Anhäufung der Partikel kommt.

**E)** Transport der Viren durch die Kernporenkomplexe in den Zellkern. Dieser Schritt ist jedoch noch nicht endgültig aufgeklärt.

Nach der Bindung an die Zelle treten AAV-2 Partikel über sogenannte "Clathrincoated pits" in die Zelle eintreten (Duan et al., 1999; Bartlett et al., 2000), wie mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten AAV-2 Kapsiden nachweisbar war. Dieser Vorgang ist Dynamin-abhängig. Dynamin ist eine cytosolische GTPase, die zu einer für die Bildung von Clathrin-bedeckten Vesikeln und deren Abschnürung von der Zellmem-

bran notwendigen Ringstruktur oligomerisiert. Überexpression von dominant negativem Dynamin I führt zu einer deutlichen Reduktion der Internalisation von AAV-2, während die Bindung an die Zellen nicht beeinträchtigt wird (Duan et al., 1999; Bartlett et al., 2000). Nach den "Clathrin coated pits" durchwandern die AAV-2 Kapside den endosomalen Weg. Dieser Vorgang läuft offenbar unabhängig von der Anwesenheit von Adeno-Helferviren ab (Bartlett et al., 2000). Bei Immunfluoreszenzversuchen konnte keine Kolokalisation von Adenoviren und Adeno-assoziierten Viren gezeigt werden. Der endosomale Weg besteht aus mehreren Kompartimenten mit zunehmend sauer werdendem pH-Wert. Zuerst werden die "Clathrin coated pits" nach dem Ablösen von der Zellmembran zu Clathrin-bedeckten Vesikeln, die die AAV-2 Kapside in die frühen Endosomen (pH 5.9-6.0) überführen. Von den frühen Endosomen geht es dann über die späten Endosomen (pH 5,0-6,0) in die Lysosomen (pH 5,0-5,5) (Abb. 1-3C). Die pH-Abhängigkeit der Infektion von AAV-2 wurde mit Hilfe des lysosomotrophen Ammoniumchlorids und den Protonenpumpen-Inhibitor Bafilomycin A1 gezeigt. Durch beide Substanzen wird die Ansäuerung der membranumhüllten Vesikeln unterbunden, wodurch die AAV-2-Infektiösität inhibiert wird. Bartlett et al. (2000) postulieren, dass die niedrige pH-Umgebung in den Lysosomen notwendig ist, um die AAV-2 Kapside ins Cytosol zu entlassen. Der genaue pH-abhängige Mechanismus der Freisetzung ist allerdings noch nicht bekannt. AAV-2 Partikel bleiben im Vergleich zu anderen Viren relativ lange in den Endosomen, was für die Infektion den Vorteil hat, dass die Partikel direkt in den perinukleären Bereich transportiert werden (Douar et al., 2001). Im perinukleären Bereich ist etwa vierzig Minuten nach Beginn der Endozytose eine Anhäufung von AAV-2 Kapsiden zu erkennen (Bartlett et al., 2000) (Abb. 1-3D). Ob die Viren hierbei noch in den Endosomen vorliegen oder schon in das Cytoplasma entlassen wurden, konnte nicht genau festgestellt werden. Nicht geklärt ist bisher auch, ob die AAV-2 Partikel während des endosomalen Weges eine konformative Veränderung durchmachen oder in gänzlich unmodifiziertem Zustand in den Nukleus gelangen (Hansen et al., 2001). Es gibt Vermutungen, dass die N-terminale Region von VP1 bei der Freisetzung der Viren in das Zytoplasma eine Rolle spielt. Die Region beinhaltet eine Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)-Domäne (Zadori et al., 2001; Girod et al., 2002). Mutationen im Phospholipase A2-Motiv führen zu einer Reduktion der Infektiösität von AAV-2 in Korrelation mit der Abnahme der enzymatischen Aktivität der Phospholipase (s. auch Kap. 1.5.4.2). Es wurde daher ein Zusammenhang zwischen der Phospholipase A<sub>2</sub> und

dem Transfer der Virusgenome aus den späten Endosomen oder Lysosomen in den Kern postuliert. Die parvovirale PLA<sub>2</sub> könnte demnach bei der Hydrolyse der Phospholipide in der Membran der sauren Endosomen oder anderer Organellen beteiligt sein.

Vom perinukleären Bereich aus werden die Kapside schließlich in den Zellkern transportiert (Bartlett et al, 2000). Diese, mittels Immunfluoreszenz erworbenen Ergebnisse wurden für AAV-2 und CPV bestätigt (Sanlioglu et al., 2000; Vihinen-Ranta et al., 2000). Bantel-Schaal et al. (2002) dagegen konnten bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an AAV-5 keine Partikel im perinukleären Bereich oder im Zellkern nachweisen, so dass eventuell die AAV-Genome eventuell schon vor dem Eintritt in den Zellkern freigesetzt werden und als freie oder an Kapsidbruchstücke gebundene Genome in den Zellkern gelangen. Der genaue Mechanismus des Transports in den Kern ist ebenfalls noch nicht geklärt. Bartlett et al. (2000) postulieren, dass der Transport über die Kernporenkomplexe geschieht (Abb. 1-3E). Andere Untersuchungen zeigen jedoch, dass trotz Inhibierung des Kernporen-vermittelten Transports durch Weizenkeimagglutinin keine Reduktion der Menge an Kapsiden, die im Kern nachgewiesen werden konnte, stattfindet (Hansen et al., 2001). Es scheint also noch einen anderen, bisher unbekannten Weg des Eintritts von AAV in den Zellkern zu geben.

Im Zellkern selbst wird das AAV-Genom in doppelsträngige DNA umgewandelt und die viralen Gene werden transkribiert.

#### 1.5.4 Funktionelle Domänen

Bei den einzelnen Schritten während des Infektionsprozesses von AAV-2 spielen spezifische Domänen der Kapsidproteine entscheidende Rollen:

#### 1.5.4.1 Heparansulfat-Bindedomäne

Wie weiter oben schon erwähnt, ist der erste Schritt während einer Infektion durch AAV-2 die Bindung des Kapsids an die Zelle. Diese Bindung erfolgt über den primären Zellrezeptor Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) (Summerford und Samulski, 1998).

Proteoglykane bestehen aus langen unverzweigten polymeren Ketten sich wiederholender Disaccharideinheiten, den sogenanten Glukosaminoglykanen, die an ein Kernprotein gebunden sind. Bei den Kernproteinen handelt es sich im Falle von HSPG entweder um Syndecane (integrale Membranproteinen), oder um Glypicane (Glycosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine) (Bernfield et al., 1992). HSPG vermittelt eine Reihe physiologisch wichtiger Prozesse, wie Blutgerinnung, Zelladhäsion, Lipidstoffwechsel und Regulierung von Wachstumsfaktoren (Bernfield et al., 1999).

Durch das ubiquitäre Vorkommen von HSPG wird die breite Wirtsspezifität von AAV-2 ermöglicht. Allerdings konnten Qiu et al. (2000) und Handa et al. (2000) zeigen, dass Heparansulfat zwar bei der Infektion durch AAV-2 beteiligt ist, aber nicht der einzige Rezeptor ist, der die Bindung an die Zelle ermöglicht, da auch HSPGnegative Zellen durch AAV-2 infiziert werden können.

Die Bindung zwischen dem Virus und HSPG tritt durch elektrostatische Wechselwirkungen der positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin auf der Kapsidoberfläche mit den negativ geladenen Sulfatgruppen des HSPG ein (Qiu et al., 2000). Zunächst wurde vermutet, dass es sich bei der Bindestelle um eine Sequenz positiv geladener Aminosäuren im N-terminalen Bereich von VP1 handelt (Summerford and Samulski, 1998). Rabinowitz et al. (1999) konnten aber mit Hilfe einer Mutante, deren Kapsid nur aus VP3 besteht, nachweisen, dass das VP3-Protein für die Bindung an den zellulären Rezeptor verantwortlich ist. In späteren Versuchen war es mit Hilfe von Mutanten möglich, die Heparansulfat-Bindedomäne auf zwei Regionen zwischen den Aminosäuren 509-522 und 561-591 festzulegen (Wu et al., 2000). Diese Regionen befinden sich im sogenannten "Loop IV" der Sekundärstruktur der Kapsidproteine. Kürzlich gelang es mit Hilfe weiterer Mutanten, fünf Aminosäuren in den oben genannten Regionen zu identifizieren (Kern et al., 2003, Opie et al., 2003), die direkt für die Heparansulfat-Bindung verantwortlich sind. Mit Hilfe der AAV-2 Röntgenstruktur (PDB ID code: 1LP3) (Xie et al., 2002) wurden die Positionen dieser fünf Aminosäuren im AAV-2 Kapsid bestimmt und es konnte so gezeigt werden, dass sich die Heparansulfat-Bindedomäne seitlich der an der 3fachen Symmetrieachse aus der Kapsidhülle herausragenden Spitzen befindet (Abb. 1-4).



#### Abb. 1-4: Heparansulfat-Bindedomäne

A) Frontaler Blick auf eine 3-fache Symmetrieachse. B) Seitlicher Blick auf eine 3-fache Symmetrieachse. Mutationen der Aminosäuren R484, R487, K532, R585 und R588 (aus der Struktur hevorgehoben und durch Pfeile markiert) führten zu dem Ergebnis, dass diese Aminosäuren, die sich seitlich der Spitzen an den 3-fachen Symmetrieachsen befinden, an der Bindung von Heparansulfat beteiligt sind. Die Spitzen an der 3-fachen Symmetrieachse sind mittels ellipsenförmiger Strukturen gekennzeichnet.

#### 1.5.4.2 Phospholipase A<sub>2</sub>

Die meisten Parvoviren besitzen im N-terminalen Bereich des VP1-Proteins eine konservierte Domäne, in der einige Aminosäuren der katalytischen Domäne von sekretorischen Phospholipasen A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) entsprechen (Zadori et al., 2001) (Abb.1-5). Phospholipasen wurden in Protisten, Tieren und Pflanzen gefunden und sind unter anderem am Lipidmetabolismus und an der Signaltransduktion beteiligt. Sie katalysieren die Hydrolyse von Phospholipiden zu Lysophospholipiden und freien Fettsäuren, bei der spezifisch die 2-Acyl-Esterbindung des Phospholipids gespalten wird. Daher leitet sich auch der Name Phospholipase A<sub>2</sub> ab. Parvovirale Phospholipasen A<sub>2</sub> waren bis zu den Untersuchungen von Zadori et al. (2001) nicht bekannt und werden deshalb als neue Untergruppe der Phospholipase A<sub>2</sub>- Enzymfamilie klassifiziert.

Mutationen im katalytischen Zentrum oder der Calcium-Bindestelle der Phospholipase A<sub>2</sub> von AAV-2 führen zu einer stark reduzierten Enzymaktivität der PLA<sub>2</sub>, die mit einer Abnahme der Infektiösität der AAV-2 Viren korreliert (Girod et al., 2002). In weiteren Versuchen wurde festgestellt, dass die Mutationen weder die Bindung der AAV-2 Kapside an die Zelle, noch den Transport durch das Zytoplasma und die perinukleäre Ansammlung der Kapside beeinträchtigen. Allerdings findet eine drastische Abnahme der frühen Genexpression statt, die wiederum mit der verminderten Infektiösität korreliert. Es wird also angenommen, dass die virale PLA<sub>2</sub> zwischen der perinukleären Anhäufung und der frühen Genexpression wirksam ist.

Eine Enzymaktivität der viralen PLA<sub>2</sub> des Porcine Parvovirus (PPV) war im intakten Zustand der Kapside nicht messbar, sondern erst nach alkalischer Denaturierung oder Hitzebehandlung der Kapside (Zadori et al., 2001). Somit scheinen die PLA2-Domäne und damit der N-Terminus des VP1-Proteins von PPV in intakten Kapsiden im Inneren zu liegen. Die genaue Lokalisation der N-Termini der VP-Proteine von AAV-2 konnte bisher auch mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse (Xie et al., 2002) nicht bestimmt werden. Die Annahme, dass der N-Terminus des VP1-Proteins von PPV im Kapsidinneren liegt, steht aber im Einklang mit Untersuchungen an anderen Parvoviren, wie dem Minute Virus of Mice (MVM) oder dem Canine Parvovirus (CPV) (Cotmore et al., 1999; Vihinen-Ranta et al., 2002). Bei MVM- und bei CPV-Kapsiden konnte in in vitro Versuchen gezeigt werden, dass eine Inkubation der Kapside bei erhöhter Temperatur oder Harnstoffbehandlung eine Konformationsveränderung bewirkt, bei der die Kapside immer noch in einem intakten Zustand vorliegen, es aber zur Externalisierung des VP1 N-Terminus kommt. Dieser ist normalerweise in intakten Kapsiden für N-Terminus spezifische Antikörper nicht zugänglich ist. Die Konformationsänderung könnte in vivo durch das saure Milieu und spezielle zelluläre Faktoren in den Lysosomen bewirkt werden, so dass der N-Terminus an die äußere Oberfläche der Kapsidhülle gelangt (Zadori et al., 2001). Allerdings besitzt die Phospholipase ihr pH-Optimum bei pH 8,0, was sich nicht mit dem pH-Wert in den Lysosomen bzw. Endosomen deckt (pH 5,0-6,5).

#### 1.5.4.3 Basische Regionen

Außer der Phospholipase-Domäne gibt es im N-terminalen Bereich der VP-Proteine weitere auffällige Sequenzmotive, die sogenannten "basischen Regionen" (BR). Diese Regionen werden aus den positiv geladenen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K) gebildet. Sie kommen in allen AAV-Serotypen, sowie den meisten autonomen Parvoviren vor, jedoch in unterschiedlicher Anzahl und Anordnung (Tullis et al., 1993). AAV-2 besitzt vier basische Regionen: BR1 (Motiv KKR, AS 122-124) liegt im N-terminalen Bereich von VP1, BR2 (Motiv KKR, AS 142-144) und BR3 (Motiv RKR, AS 168-170) befinden sich in den N-terminalen Bereichen von VP1 und VP2 und

BR4 (Motiv RPKR, AS 307-310) kommt in allen drei Strukturproteinen vor (Sonntag, 2002) (Abb.1-5).



Abb.1-5: Lokalisation der Phospholipase  $A_2$  und der basischen Regionen in den AAV-2 VP-Proteinen

AAV-2 besitzt eine Phospholipase A<sub>2</sub>-Domäne (PLA) im N-terminalen Bereich von VP1. Außerdem konnten vier basische Regionen (BR1-4) auf den VP-Proteinen lokalisiert werden.

Die genaue Funktion dieser basischen Regionen ist bisher nicht bekannt. Summerford und Samulski (1998) postulierten, dass sie über elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Sulfatresten des Heparansulfat-Proteoglykans reagieren und so die Bindung des Kapsids an die Zelle ermöglichen. Mutationen in den entsprechenden Sequenzen haben jedoch keine Veränderung in der Fähigkeit der Kapside, an Heparin zu binden, ergeben (Wu et al., 2000). Durch die Ähnlichkeit der Sequenzen der basischen Regionen mit der von klassischen Kernlokalisationssignalen (NLS), könnten sie auch eine Rolle beim Kerntransport des Virus während der Infektion oder beim Kerntransport der neu synthetisierten Kapsidproteine spielen. VP1 und VP2, aber nicht VP3, besitzen ein Kernwanderungssignal, das die neu synthetisierten Strukturproteine zur Kapsidbildung in den Kern dirigiert (Ruffing et al., 1992). Durch Versuche, in denen VP2 N-terminal verkürzt wurde, konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aminosäuren 167 – 172 (PARKRL) im Bereich von BR3 genügen, um VP2 in den Kern zu dirigieren (Hoque et al., 1999). Ob die basischen Regionen beim Kerntransport der Virusgenome von Bedeutung sind, konnte bisher nicht ermittelt werden. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Mutationen in den basischen Regionen bei der Infektion keine Auswirkungen auf die Menge der gebildeten Kapside und die Enkapsidierung der viralen Genome haben (Sonntag, 2002). Allerdings ist eine drastische Reduktion der Infektiösität gegenüber wt AAV-2 Kapsiden festzustellen. Dies verstärkt die Hypothese, dass der N-terminale Bereich von VP1 während einer Infektion durch AAV-2 zugänglich werden muss.

### 1.6 Strukturuntersuchungen von Viren

#### 1.6.1 Allgemeines

Mit Hilfe von mikroskopischen Techniken ist es mittlerweile möglich, Organismenoberflächen, Zellen, Zellorganellen, Membranen und Makromoleküle sichtbar zu machen (Abb.1-6). Während die Anfänge der Mikroskopie schon in das 17. Jahrhundert zurückgehen, wurden entscheidende Fortschritte jedoch erst Mitte des 19. Jahrhundert durch Ernst Abbe gemacht, der die theoretischen Grundlagen der Lichtmikroskopie beschrieb. Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelten Max Knoll, Ernst Ruska und Bodo von Borries das erste Transmissionselektronenmikroskop, mit dessen Hilfe es heute möglich ist, die Raumstruktur von Makromolekülen zu bestimmen.



Abb.1-6: Auflösungsbereiche verschiedener mikroskopischer Untersuchungsmethoden

#### 1.6.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Das Transmissionselektronenmikroskop liefert ebenso wie das Lichtmikroskop eine Abbildung des zu untersuchenden Objekts. Das Auflösungsvermögen (minimaler Abstand zwischen zwei Punkten, der noch getrennt wahrnehmbar ist) eines Lichtmikroskops ist vor allem durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichtes ( $\lambda$  = 400 nm), aber auch durch die numerische Apertur der Linsen begrenzt (Gleichung 1-1). Aufgrund dieser Limitierung lassen sich Details in biologischen Objekten, wie z.B. Zellen, nur bis zu einer Größenordnung von wenigen hundert Nanometern auflösen.

$$d = \frac{0,6161 \cdot \lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

Gleichung 1-1: Auflösung von Mikroskopen

d = Auflösung

 $\lambda$  = Wellenlänge der verwendeten Strahlung

n•sin  $\alpha$  = numerische Apertur (>1 bei Lichtmikroskopie; = 0,01 bei Elektronenmikroskopie)

In Elektronenmikroskopen haben die Elektronen bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV im Hochvakuum eine Wellenlänge von 0,0037 nm. Durch die kleinere numerische Apertur (A) der Elektronenlinsen ist das Auflösungsvermögen eines Elektronenmikroskops jedoch auf ~ 0,1 nm beschränkt.

Die Abbildung des Objekts ist außer von der Auflösung noch von weiteren Parametern abhängig:

#### 1) Vakuum

Das zu untersuchende Objekt wird in der Elektronenmikroskopie einem hohen Vakuum ausgesetzt. Dies ist notwendig, damit die Elektronen ungestört auf das Objekt treffen können. Dabei muss das Objekt jedoch so gut wie möglich stabilisiert und geschützt werden. Eine gängige Präparationsmethode für elektronenmikroskopische Untersuchungen ist das Negativ-Kontrastierungsverfahren. Hierbei wird das Objekt an einen, auf einem Kupfernetz befindlichen, dünnen Kohlefilm gebunden und mit einer Schwermetallsalzlösung "gefärbt". Die Schwermetallsalze umlagern das Objekt und füllen gegebenenfalls Vertiefungen und Löcher aus. Somit wird das Objekt durch das Metallsalz, das aufgrund seiner höheren Dichte im Elektronenmikroskop dunkel erscheint, "negativ" sichtbar gemacht. Der Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass das Objekt durch das Schwermetallsalz denaturiert und dehydratisiert wird.

Eine weitere Präparationsmethode ist deshalb die Elektronenkryomikroskopie. Diese Methode ermöglicht es, biologisches Material im natürlichen ungefärbten Zustand zu untersuchen (Dubochet et al., 1988). Die Suspension, in der sich das Objekt befindet, wird schockgefroren, so dass das Objekt ohne störende Eiskristalle in einer vitrifizierten (glasartig-erstarrten) Umgebung vorliegt. Im Elektronenmikroskop ist dann, im Gegensatz zum Negativ-Kontrastierungsverfahren, das Objekt selbst sichtbar, da es eine höhere Dichte als die umgebende Flüssigkeit hat.

Mit Hilfe der Elektronenkryomikroskopie und nachfolgender dreidimensionalen Bildrekonstruktion ist es möglich virale Strukturen mit einer Auflösung von weniger als 1,0 nm (Böttcher et al., 1997; Conway et al., 1997) abzubilden.

Diese Methode ist oftmals die einzige Möglichkeit, biologische Komplexe zu analysieren, die sich für die Röntgenstrukturanalyse nicht kristallisieren lassen.

#### 2) Strahlenschaden

Wenn der Elektronenstrahl auf das Objekt trifft, kann die dabei übertragende Energie zu Veränderungen des Objekts führen. Es treten Brüche kovalenter Bindungen auf, die Massenverlust oder andere strukturelle Veränderungen des Objekts hervorrufen. Durch Kühlen der Probe kann der Strahlenschaden reduziert werden (Amos et al., 1982; Dubochet et al., 1988), da die Diffusion der Bruchstücke bei tieferen Temperaturen herabgesetzt ist (Siegel, 1971). Eine weitere Methode, den Strahlenschaden zu vermindern, ist die Verwendung einer Niedrig-Dosis-Einrichtung, bei der die Elektronendosis auf einige hundert bis tausend Elektronen pro Quadratnanometer reduziert wird. Diese Begrenzung wirkt jedoch ebenfalls negativ auf die Bildauflösung, allerdings in geringerem Maße.

#### 1.6.3 Dreidimensionale Bildrekonstruktion

Die dreidimensionale Bildrekonstruktion ermöglicht es, aus den bei der Elektronenkryomikroskopie erhaltenen zweidimensionalen Informationen des Objekts eine Nachbildung dessen räumlicher Struktur zu berechnen.

AAV-2 Kapside haben eine ikosaeder-ähnliche Form. Ein Ikosaeder besitzt eine definierte Anzahl von Symmetrieelementen: sechs 5-fache Symmetrieachsen zwischen den Eckpunkten, zehn 3-fache Symmetrieachsen zwischen den dreieckigen Flächen und fünfzehn 2-fache Symmetrieachsen jeweils zwischen den Kanten (Abb.1-7A).

Jedes symmetrische Objekt ist aus kleinen, identischen Elementen aufgebaut, den sogenannten "asymmetrischen Einheiten". Da es sich bei Proteinuntereinheiten um asymmetrische Strukturen handelt, muss die minimale Anzahl an Proteinuntereinheiten, die ein ikosaedrisches Viruskapsid bilden, der Menge der asymmetrischen Einheiten eines Ikosaeders entsprechen. Die Menge dieser Einheiten lässt sich wie folgt berechnen: Ein Ikosaeder besteht aus zwanzig dreieckigen Flächen, die sich jeweils in drei identische Untereinheiten unterteilen lassen (Abb.1-7B). D.h., ein Ikosaeder besteht aus 20 x 3 = 60 Untereinheiten. Diese 60 Untereinheiten entsprechen demnach 60 Proteinuntereinheiten (Abb.1-7, rote Figuren). In einem AAV-2 Kapsid setzen sich diese Proteinuntereinheiten, bei einem molaren Verhältnis der VP-Proteine von etwa 1:1:8, aus 6 VP1-Proteinen, 6 VP2-Proteinen und 48 VP3-Proteinen zusammen.

Für eine dreidimensionale Rekonstruktion werden die asymmetrischen Einheiten miteinander gemittelt. Durch die ikosaedrisch symmetrische Struktur der AAV-2 Kapside liegen, im Gegensatz zu nicht-symmetrischen Figuren, bei einem Partikel 60 äquivalente asymmetrische Einheiten vor, was die benötigte Anzahl an Partikeln und Zeit für die Berechnung einer Rekonstruktion vermindert. Ein Nachteil dieser Rekonstruktionsberechnung auf einer symmetrischen Grundlage ist jedoch, dass sich Abweichungen von der Symmetrie bei der Mittelung herausrechnen. D.h. da die Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 im Kapsid an symmetrisch äquivalenten Positionen sitzen, sind sie in der Rekonstruktion nicht differenziert, sondern nur gemittelt sichtbar.



#### Abb 1-7: Ikosaeder und asymmetrische Einheit (modifiziert nach Branden und Tooze, 1991) A) Darstellung eines Ikosaeders: Eine 2-fache, 3-fache und 5-fache Symmetrieachse wurden exemplarisch markiert.

**B) Einteilung der Oberfläche eines Ikosaeders in asymmetrische Einheiten:** Ein Ikosaeder besteht aus zwanzig dreieckigen Flächen. Jede davon lässt sich in drei identische, asymmetrische Untereinheiten teilen. Von diesen asymmetrischen Einheiten gibt es in einem Ikosaeder 20 x 3 = 60. Jede Einheit entspricht dabei einer Proteinuntereinheit (durch die roten Figuren dargestellt), die das AAV-2 Kapsid bilden.

#### 1.6 Ziel der Arbeit

Die Kapsidhülle des Adeno-assoziierten Virus Typ 2 wird aus den Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 gebildet. Diese liegen im Kapsid in einem Verhältnis von etwa 1:1:8 vor. Für VP1 konnte eine Mitwirkung bei der Infektion durch AAV-2 Partikel festgestellt werden. Mutationen in N-terminalen Bereich von VP1 führen zu einer geringeren Produktion von infektiösen Viruspartikeln. Im N-terminalen Bereich von VP1 befindet sich eine Phospholipase A -Domäne, die für eine effiziente Infektion mit AAV-2 notwendig ist. Ihre genaue Funktion im Lebenszyklus von AAV konnte jedoch auf molekularer Ebene noch nicht bestimmt werden. Zusätzlich ist bisher die Lokalisation der N-terminalen Bereiche von VP1 und VP2 auch mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse nicht möglich gewesen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, Angaben über die Lokalisation der N-terminalen Bereiche der VP1- und VP2-Proteine zu erhalten. Dazu sollten zuerst wt AAV-2 Kapside auf struktureller Ebene mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Verfahren untersucht werden. Anschließend sollten Mutanten hergestellt werden, bei denen jeweils eines der VP-Proteine deletiert ist. Zusätzlich dazu sollte noch eine weitere Mutante produziert werden, die nur das Hauptstrukturprotein VP3 exprimiert. Die Strukturen der Mutanten sollten ebenfalls bestimmt werden. Zusätzlich dazu sollte eine biochemische Analyse von wt und mutanten Kapsiden bezüglich der Zugänglichkeit der N-terminalen Bereiche der Strukturproteine VP1 und VP2 für monoklonale Antikörper erfolgen. Da für die Parvoviren CPV und MVM eine gleichzeitige Zugänglichkeit des VP1-N-Terminus und der enkapsidierten DNA postuliert wird, sollte dies auch für AAV-2 untersucht werden. Im dritten Teil der Arbeit sollte der Einfluß von Heparin, einem Strukturhomologon des natürlichen Zellbindungsrezeptors von AAV-2, Heparansulfat, auf die Struktur von AAV-Kapsiden getestet werden.
# 2 Abkürzungen

A	Alanin
Å	Angström
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AAV-2	Adeno-assoziiertes Virus Typ 2
Abb.	Abbildung
Ad-5, Adeno-5	Adenovirus Typ 5
ADP	Aleutian Mink Disease Virus
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BES	N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
BBS	BES buffered salt, BES gepuffertes Salz
Вр	Basenpaare
BSA	"bovine serum albumine", Rinderserumalbumin
сар	Kapsidgene von AAV
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CPE	cytopathischer Effekt
CPV	Canine Parvovirus, Hundeparvovirus
CsCl	Cäsiumchlorid
°C	Grad Celsius
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	Einheiten
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemoluminescense, Chemolumineszenzverstärker
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbent assay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FSK	Fourier-Schalen-Korrelation
g	Gramm
xg	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSPG	Heparansulfat Proteoglykan
К	Lysin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Leucin
I	Liter
LB	"Luria broth"-Medium
LaB <sub>6</sub>	Lanthanium-Hexaborid
μ (g,l,m)	Mikro- (gramm, liter, meter)
m (g,l,m)	Milli- (gramm, liter, meter)
Μ	Mol, molar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MOI	Multiplicity of infection, Zahl infektiöser Viren/Zelle
MVM	"Minute Virus of Mice"
MWCO	Molecular weight cut off
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
n (g,m)	Nano- (gramm, meter)
n.b.	nicht bestimmt
NLS	nuclear localisation signal, Kernwanderungssignal
Nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
ORF	"open reading frame", offener Leserahmen
р	Promotor
Р	Prolin

PBS	phophate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
рН	"pons hydrogenium"
PMSF	
PO	Peroxidase
PolyA	Polyadenylierungssignal
PPV	Porcine Parvovirus, Schweine-Parvovirus
r	rekombinant
R	Arginin
rep	Nicht-Strukturgene von AAV
Rep	Nicht-Strukturprotein(e) von AAV
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSV	"Rous Sarcoma Virus"
RT	Raumtemperatur
SAP	alkalische Shrimp Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SS	einzelsträngig
SSC	
SV-40	Simian (Affen) Virus Typ 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin
ТМВ	Tetramethylbenzidin
Tris	Trsihydroxymethylaminomethan
trs	terminal resolution site
UV	ultraviolettes Licht
VP	Strukturprotein(e) von AAV
W	Watt
wt	Wildtyp
Δ, delta	Deletion

# 3 Material

# 3.1 Viren, humane Zelllinien, Bakterienstämme

# 3.1.1 Viren

BEZEICHNUNG	BESCHREIBUNG	REFERENZ
AAV-2	Wildtyp adeno-assoziiertes Virus Typ 2	Laborbestand
Ad-5	Wildtyp Adenovirus Typ 5	Laborbestand
rAdVP	Rekombinantes Adenovirus, exprimiert die	zur Verfügung
	AAV-2 VP-Proteine mittels CMV-Promotor	gestellt von R.J.
		Samulski
rRSVVP	Rekombinantes Adenovirus, exprimiert die	hergestellt von D.
	AAV-2 VP-Proteine mittels RSV-Promotor	Grimm
rRSVVP ΔVP1	Rekombinantes Adenovirus, bei dem die	diese Arbeit
	Expression von VP1 durch Punktmutation	
	des ATG ausgeschaltet wurde. Besitzt RSV-	
	Promotor.	
rRSVVP ΔVP2	Rekombinantes Adenovirus, bei dem die	diese Arbeit
	Expression von VP2 durch Punktmutation	
	des ATG ausgeschaltet wurde. Besitzt RSV-	
	Promotor.	
rRSVVP	Rekombinantes Adenovirus, bei dem VP2	diese Arbeit
VP2ATG	durch Punktmutation des ACG in ATG	
	überexprimiert wird und die Expression von	
	VP3 abgeschwächt ist. Besitzt RSV-	
	Promotor.	
rRSVVP ΔVP3	Rekombinantes Adenovirus, bei dem die	diese Arbeit
	Expression von VP3 durch Punktmutation der	
	beiden ATG abgeschwächt ist. Besitzt RSV-	
	Promotor.	
rRSV NLSVP3	Rekombinantes Adenovirus, exprimiert VP3	diese Arbeit
	mittels RSV-Promotor	

# 3.1.2 Humane Zelllinien

BEZEICHNUNG	BESCHREIBUNG	REFERENZ
HeLa	Zervixkarzinom-Zelllinie, transformiert mit HPV18	ATCC-Nr.
	E6/E7	CCL-2
293T	Derivat der embryonalen Nieren-Zelllinie 293	Pear et al.,
	(transformiert mit Ad-5 E1A/B = Ad-5 Bp 1-4344),	1993
	enthält zusätzlich das große T-Antigen von SV-40	
911	Embryonale Retinoblasten-Zelllinie, transformiert	Fallaux et al.,
	mit Ad-5 E1A/B (Ad-5 Bp 79-5789)	1996

# 3.1.3 Bakterienstämme

BEZEICHNUNG	BESCHREIBUNG	REFERENZ
<i>E. coli</i> BJ5183	zur homologen Rekombination von Plasmiden	Hanahan,
		1983
		(Transgene)
<i>Ε. coli</i> Dh5α	zur Amplifikation von Plasmiden, die dam- und	Hanahan,
	dcm-positiv sind (Restriktionsschnittstellen, die	1983
	durch diese Enzyme methylierbar sind, liegen	(Gibco BRL)
	nach der Amplifikation methyliert vor)	
E. coli JM110	zur Amplifikation von Plasmiden, die dam- und	Yanish-
	dcm-negativ sind (Restriktionsschnittstellen, die	Perron et al.,
	durch diese Enzyme methylierbar sind, liegen	1985
	nach der Amplifikation nicht methyliert vor)	(Promega)

# 3.2 Plasmide

BEZEICHNUNG	BESCHREIBUNG	REFERENZ	
pTAV 2.0	Bluescript-Plasmid, enthält die gesamte	e Heilbronn et al.,	
	Wildtyp AAV-2 Sequenz	1990	
pAdRSVVP	Adenovirales Transferplasmid, enthält RSV	- Laborbestand	
	Promotor und cap-Kassette		

BEZEICHNUNG	BESCHREIBUNG	REFERENZ		
pAdRSVVP ΔVP1	Adenovirales Transferplasmid, enthält RSV- Promotor und cap-Kassette mit mutiertem VP1-ATG	diese Arbeit		
pAdRSVVP ΔVP2	AdenoviralesTransferplasmid, enthältRSV-dieseArbeitPromotorundcap-KassettemitmutiertemVP2-ATGVP2-ATG			
pAdRSVVP VP2ATG	Adenovirales Transferplasmid, enthält RSV- diese Arbeit Promotor und cap-Kassette mit mutiertem VP2-ATG			
pAdRSVVP ΔVP3	AdenoviralesTransferplasmid, enthältRSV-dieseArbeitPromotor und cap-Kassette mit zwei mutiertenVP3-ATGs			
pAdRSVßgal	Adenovirales Transferplasmid, enthält RSV- Laborbestand Promotor-lacZ-polyA-Kassette			
pAdRSV NLSVP3	AdenoviralesTransferplasmid, enthältRSV-dieseArbeitPromotor,AAV-VP3 undNLS vom großenSV40 T-Antigen			
pTG3602 ΔE3	Derivat von pTG3602, enthält Ad-5-Genom mit Laborbestand deletierter E3-Region			
ρΤG ΔVΡ1	rekombinantes Adenoplasmid aus pTG3602ΔE3 und VP-Kassette mit mutiertem VP1-ATG	diese Arbeit		
pTG ΔVP2	rekombinantes Adenoplasmid aus pTG3602ΔE3 und VP-Kassette mit mutiertem VP2-ATG	diese Arbeit		
pTG VP2ATG	rekombinantesAdenoplasmidausdiese ArbeitpTG3602ΔE3 und VP-Kassette mit mutiertemVP2-ATG			
ρΤG ΔVΡ3	rekombinantes Adenoplasmid aus pTG3602ΔE3 und VP-Kassette mit zwei mutierten VP3-ATGs	diese Arbeit		

BEZEICHNUNG	BESCHREIBUNG	REFERENZ
pTG NLSVP3	rekombinantes Adenoplasmid aus	diese Arbeit
	pTG3602 $\Delta$ E3 und AAV-VP3 und NLS vom	
	großen T-Antigen von SV40	
pUC	E.coli-Plasmid mit pBR322- und M13mp19-	Laborbestand
	Anteilen	
p ΔTR18	AAV-2 Helferplasmid, enthält AAV-2 rep und	Laborbestand
	сар	
pJ407	AAV-2 Helferplasmid, enthält AAV-2 rep und	Laborbestand
	cap, sowie Teile des <i>E.coli</i> -Plasmids pUC131	

# 3.3 Oligonukleotide

BEZEICHNUNG	AMINOSÄURESEQUENZ 5'-3'	REFERENZ
PM-1	TGA GCT TCC ACC AC	diese Arbeit
PM-2	CGA TGG TTA TCT TC	diese Arbeit
PM-3	TGT TAA GAC GGC TC	diese Arbeit
PM-4	TTT GGC TAC AGC AC	diese Arbeit
PM-5	CAG ATG CTG CGT AC	diese Arbeit
PM-6	GTT CTC ATC TTT GG	diese Arbeit
DIRD revers	CAG TTT TCT CAG GCC GGA GCG AGT GAC	Laborbestand
	ATT CGG GAC CAG TCT AGG AAC TGG CTT	
	CCT GGA	
	CCC	
VP3-NLS	ATG CAT CGA TTC GAT GGC ACC ACC AAA	diese Arbeit
5´-Primer	GAA GAA GCG AAA GGT TAT GGC TAC AGG	
	CAG TGG CGC	
VP3-NLS	GCT ACT TAT CTA CGT AGC CAT GGA AAC	diese Arbeit
3'-Primer		
Ad-VPA	CCG TAC CTC AAG TAC AAC	GATC,
		Konstanz
VP2B	CCT CTT TTT TCC CGG AGC CGT CTT AAC	Laborbestand
	AGG TTC CTC AAC C	

# 3.4 Antikörper

# 3.4.1 Erstantikörper

BEZEICHNUNG	SPEZIFITÄT	REFERENZ
A1	monoklonal, erkennt VP1 von	Laborbestand,
	AAV-2	Hybridomüberstand und
		gereinigt
A20	monoklonal, erkennt assemblierte	Laborbestand,
	AAV-2 Kapside	Hybridomüberstand und
		gereinigt
A30	monoklonal, erkennt vermutlich Ad-	Laborbestand,
	5 Kapsidproteine oder Strukturen	Hybridomüberstand
	von Ad-5 Kapsiden	
A69	monoklonal, erkennt VP1 und VP2	Laborbestand,
	von AAV-2	Hybridomüberstand und
		gereinigt
B1	monoklonal, erkennt VP1, VP2 und	Laborbestand,
	VP3 von AAV-2	Hybridomüberstand und
		gereinigt

# 3.4.2 Zweitantikörper

BEZEICHNUNG	REFERENZ
Ziege-anti-Maus IgG	Dianova, Hamburg
gekoppelt mit Peroxidase	
Ziege-anti-Maus IgG	Dianova, Hamburg
gekoppelt mit Cy3	
Ziege-anti-Maus IgG	Dianova, Hamburg
gekoppelt mit FITC	

# 3.5 DNA-Sonde

BEZEICHNUNG	LÄNGE IN BP	FRAGMENT
Rep-Sonde	1188	Xhol-BamHI aus ΔTR 18

# 3.6 Enzyme

ENZYM	REFERENZ
Alkalische Shrimp Phosphatase	Roche, Mannheim
DNase I	Roche, Mannheim
Klenow-Enzym (Fragment der DNA- Polymerase I)	Roche, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme und zugehörigen Enzympuffer wurden von den Firmen New England Biolabs (NEB), Schwalbach und Roche, Mannheim bezogen.

# 3.7 DNA- und Protein-Größenstandards

### 3.7.1 DNA- Größenstandard

BEZEICHNUNG	GRÖßEN (BP)	REFERENZ
SmartLadder	10.000, 8.000, 6.000. 5.000, 4.000, 3.000,	Eurogentec,
	2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 800, 600, 400,	Seraing, Belgien
	200	

### 3.7.2 Protein- Größenstandard

BEZEICHNUNG	GRÖßEN (KDA)	REFERENZ
Proteinmarker	94 (Phosphorylase B)	Laborbestand
(je 1μg / μl)	66 (Carboanhydrase)	
	44 (Ovalbumin)	
	30 (Albumin)	

# 3.8 Radioaktive Nukleotide

BEZEICHNUNG	REFERENZ
α <sup>32</sup> P-dATP	Amersham, Frankfurt
α <sup>35</sup> S-dCTP	Amersham, Frankfurt

## 3.9 Kits

BEZEICHNUNG	REFERENZ
AAV Titration ELISA	Progen Biotechnik, Heidelberg
Biotinylation Kit RPN 22	Amersham, Frankfurt
ECL <sup>™</sup> Chemilumineszenz-Kit	Perkin Elmer, Foster City, USA
Gel-Extraction Kit II	Qiagen, Hilden
GeneCleanII®-Kit	Bio101, La Jolla, USA
Maxi-Präp Kit	Qiagen, Hilden
Quick Change <sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis	Stratagene, Amsterdam,
Kit	Niederlande
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
T7-Sequenase Kit	Amersham, Frankfurt

# 3.10 Medien und Zusätze

### 3.10.1 Zellkultur- Medien und Zusätze

BEZEICHNUNG	REFERENZ
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Sigma, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco/BRL, Eggenstein
2x MEM	ICN, Meckenheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco/BRL, Eggenstein
L-Glutaminsäure	Gibco/BRL, Eggenstein
Trypsin-EDTA	Gibco/BRL, Eggenstein

# 3.10.2 Bakterienkultur- Medienzusätze

BEZEICHNUNG	REFERENZ
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Hamburg
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Hamburg
Bacto-Trypton	Difco, Hamburg

# 3.11 Geräte

GERÄT	BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Bedampfungsgerät	CED 030	BAL-TEC
	Edward 306	Edward
Beglimmungsgerät	SCD 004	BAL-TEC
	Eigenbau	EMBL, Heidelberg
Blot- Kammer (Western Blot)	SD1	CTI
Dot Blot-Apparatur	Hybri Dot Manifold	BRL
Einfrierbox		Nunc
Elektronenmikroskop	EM 10	Zeiss
	CM-120 Biotwin-ice	Phillips
Elektrophorese-Kammer, horizontal		Renner
(DNA, Mini-/ Midi-Gele)		
Elektrophorese-Kammer, horizontal		СТІ
(Protein, Mini-Gele)		
Entwicklermaschine	Classic E.O.S.	Agfa
ELISA-Reader	Emax	MWG Biotech
Fluoreszenzmikroskop	Dialux	Leitz
	Fotomikroskop	Zeiss
Geltrocken-Apparatur		Promega
Heizblock	Thermomixer	Eppendorf
Hybridisierungsofen	Тур 400 НҮ-Е	Bachofer
Inkubator	Тур В 5061 (ЕС-СО2)	Heraeus
Kamerasytem Land Kamera	Тур МРК	Polaroid

GERÄT	BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Kühl-/ Gefrierschränke	+4°C, -20°C, -80°C	Liebherr/Labotect
Lichtmikroskop	CK2	Olympus
Mikrowellengerät	600 W	Bosch
Multikanalpipette	Finnpipette	Labsystems
PCR-Gerät	DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer
pH-Meter	рН 538	WTW
Pipettierhilfe	P2, P20, P200, P1000	Gilson
Röntgenfilmkassette		Kodak
Scanner	Zeiss SCAI	Zeiss
Schüttler	Rockomat/ Reax 2	Tecnorama/
		Heidolph
Sequenzgel-Apparatur		CTI
Sonifier	Тур 250	Branson
Sorvall-Zentrifuge	RC-5C	DuPont
	Rotoren: SS-34, SA-600,	Instruments
	GS-3, SLA-1500	
Spannungsgeräte	EPS 500/400 und 600	Pharmacia
Speed-Vac Zentrifuge	Vacuum Concentrator	Bachofer
Spektrophotometer	Ultrospec III	Pharmacia
Sterile Werkbank	UVF 6.15 8	BDK
Ultrazentrifuge	Combi Plus	Beckmann
	Rotor: 50.2 Ti, TLS-55	
UV-Crosslinker	Stratalinker 1800	Stratagene
UV-Transilluminator	n90 LW 254 oder 366nm	Konrad Benda
Waage	Laborwaage 1216 MP	Sartorius
Wasserbad	Julabo UC/ Julabo SW	Bender und
	20C	Hobein
Zentrifugen für Eppendorf-Gefäße	5415 Rotor: F 48-18-11	Eppendorf
	2K15 Rotor: 12145	Sigma
Zentrifugen für Falcon-Gefäße	Variofuge F	Heraeus
	ZK 380	Hermle

# 3.12 Materialien

MATERIAL	ТҮР	HERSTELLER
Cryo-Tube	1,8 ml # 368632	Nunc
Deckgläschen	Ø 1,5 cm	Langenbrinck
Eppendorf-Gefäße	0,5/ 1,5/ 2,0 ml	Eppendorf
Falcon-Röhrchen	15/ 50 ml	Becton Dickinson
Faltenfilter	Ø 125 mm	Schleicher & Schüll
Filme	T MAX 400 pro	Kodak
	Ektachrome 400	
Filmplatten	SO-163	Kodak
	Micros F 4489	
Glimmer	2,5 x 7,6 cm	Plano, Wetzlar
Grids (Kupfer)	300mesh	Plano, Wetzlar
Grids(Kupfer+Rhodamin)	Maxtaform H26	Plano, Wetzlar
Kohlefaden		BAL-TEC
		Goodfellow, Cambridge
Konzentrator	Vivaspin 10kDa	Sartorius
Maxi-Präp Säulen	Tip 500	Qiagen
Mikrotiterplatten	# 167008	Nunc
Neubauer-Zählkammer	HBG	Neubauer
Nitrozellulosemembran	PROTRAn BA 85	Schleicher & Schuell
Nylonmembran	GeneScreen™	DuPont
Objektträger	76 x 26 mm	Langenbrinck
Pasteur-Pipetten	230 mm	WU Mainz
Petrischalen	Ø 10 cm	Greiner
Pipettenspitzen	2/10/100/200/1000 µl	Abimed/Eppendorf/Biozym
Quarzküvette	500 µl	Pharmacia
quick spin mini columns	# 1814419	Roche
Röntgenfilme	X-Omat AR	Kodak
Sephadex G25-Säulen		BioRad, Richmond
Sterilfilter	0,2 µm Porengröße	Schleicher & Schuell
Whatman-Papier	Whatman 3MM	Schleicher & Schuell

MATERIAL	ТҮР	HERSTELLER
Zellkulturflaschen	75/175 cm <sup>2</sup>	Greiner/Costar
Zellkulturplatten	6/12/24/48/96 well	Greiner/Nunc/Costar
Zellkulturschalen	Ø 3/6/10/15 cm	Greiner/Nunc
Zellschaber		Costar
Zentrifugenröhrchen	CsCl-Gradient: # 331374 lodixanol-Gradient: # 342414 Zuckerkissen: # 347357	Beckmann

# 3.13 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Biomol, Ilvesheim
- Gibco/BRL, Eggenstein
- Merck, Darmstadt
- Riedel-de Haen AG, Seelze
- Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
- Serva Feinbiochemika GmbH & Co.KG, Heidelberg
- Sigma Chemical Co., Deisenhofen

Spezielle Chemikalien und Reagenzien:

BEZEICHNUNG		HERSTELLER	
Entwickler	D-19 oder HRP	Kodak	
Fixierer	Fesago 51	Photo Shop, Heidelberg	
Formvar		Plano, Wetzlar	
Heparin 6 KDa		Sigma, Deisenhofen	
Heparin-Agarose		Sigma, Deisenhofen	
Repel Silan		LKB, Freiburg	
SeaPlaque Low Geling Agarose		Biozym, Oldendorf	
Uranylacetat		Polysciences	

# 3.14 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

10x DNA Ladepuffer	2x Probenpuffer für Proteingele	
50 mM EDTA pH 8,0	2 mM EDTA	
30 % Ficoll	100 mM Tris-HCl, pH 8,0	
2 % SDS	4 % SDS	
0,25 % Bromphenolblau	20 % Glycerol	
0,25 % Xylenzyanol	10 % ß-Mercaptoethanol	
	0,02 % Bromphenolblau	

### LB-Medium

1 % Bacto-Trypton	20x SSC
0,5 % Hefeextrakt	3 M NaCl
0,5 % NaCl	0,3 M Tri-Natriumcitrat

#### 1x PBS

18,4 mM Na2HPO4 10,9 mM KH2PO4 125 mM NaCl 40 mM Tris 1 mM EDTA, pH8,0

### 1x TE

1x TAE

#### 2x BBS

280mM NaCl 50mM BES 0,75mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,75mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,95 (ausgetestet) 10 mM Tris 1 mM EDTA, pH8,0

# 4 Methoden

### 4.1 Mikrobiologische Methoden

### 4.1.1 Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien

Um Plasmide zu amplifizieren benötigt man kompetente, das heißt auf die Aufnahme freier Plasmid-DNA vorbereitete, Bakterien. In diese wird dann die DNA transformiert.

#### 4.1.1.1 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterien

Bakterien wurden in einer Übernachtkultur von 100 ml LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika herangezogen. Nach einer Verdünnung von 1:100 in frischem LB-Medium wiederum ohne Antibiotika wurden die Bakterien bis zu einer optischen Dichte der Kultur bei 600 nm von 0,5 kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend 10 min bei 5000 xg und 4 °C abzentrifugiert, in 250 ml eiskaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert und in 10 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>/14 % Glycerin aufgenommen. Die Suspension wurde in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

#### 4.1.1.2 Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterien

#### Einfache Transformation von Plasmid-DNA

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurde ein Aliquot der Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 100 ng DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 2 min bei 42°C inkubiert, weitere 2 min auf Eis abgekühlt und schließlich mit 800 µl LB-Medium ohne Antibiotika vermischt. Die Suspension wurde 1,5 h unter Schütteln bei 37°C in einem Polypropylen-Röhrchen inkubiert, bevor 200 µl des Ansatzes auf einer 10 cm LB-Agar-Platte (LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar und 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

#### Homologe Rekombination

Bei der homologen Rekombination findet eine Neukombination von Genen statt. Dazu werden zwei lineare DNA-Fragmente (Vektor- und Insert-Fragment) kotransformiert. Aufgrund von homologen Sequenzen der beiden Fragmente kommt es zu einem Genaustausch, bei dem ein neues zirkuläres Plasmid entsteht. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Ansätzen wurde ein molares Verhältnis von Vektor-und Insert-DNA von 1:5 verwendet, wobei die Menge an Vektor-DNA immer 100 ng betrug.

## 4.2 Präparation und Analyse von Plasmid-DNA

### 4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Überprüfung der Plasmid-DNA nach Klonierungen erfolgte eine qualitative Präparation, eine sogenannte "Mini-Präp". Sollte Plasmid-DNA in größerem Maßstab, z.B. für Transfektionen von Zellen, produziert werden, war es sinnvoll, eine quantitative Präparation, die sogenannte "Maxi-Präp", zu verwenden.

#### 4.2.1.1 Plasmid-Minipräparation

Plasmid-DNA kann mittels der Schnellpräparation nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979) in modifizierter Form (Sambrook et al., 1989) isoliert werden. 5 ml einer ÜN-Kultur wurden bei 16.500 xg, RT, 30 sec in einem Eppendorfgefäß abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 300 µl P1-Puffer resuspendiert. Die Zell-Lyse erfolgte durch Zugabe von 300 µl P2-Puffer, kurzem Invertieren des Gefäßes und 5 Minuten Inkubation bei RT. Die Neutralisation mit 300 µl eiskaltem P3-Puffer (invertieren) führte bei 15 minütiger Inkubation auf Eis zum Ausfällen der genomischen DNA, während die Plasmid-DNA-Stränge korrekt renaturierten und bei der anschließenden Zentrifugation (17.600 xg, 4°C, 10 min) im Überstand blieben. Dieser wurde nun mit 800 µl Isopropanol versetzt und so die DNA gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (17.600 xg, 4°C, 10 min) und an der Luft getrocknet. Die getrocknete DNA konnte dann in 30-50 µl 1x TE-Puffer aufgenommen und bei –20°C gelagert werden.

P1-Puffer	P2-Puffer	P3-Puffer
50 mM Tris, pH 8,0	200 mM NaOH	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
10 mM EDTA, pH 8,0	1 % SDS	
RNase A (100 µg/ml)		

#### 4.2.1.2 Plasmid-Maxipräparation

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das Qiagen Maxi-Präp Kit nach dem dort angegebenen Protokoll verwendet. Dabei wurde eine 250 ml Übernachtkultur in LB-Medium mit Ampicillin (50  $\mu$ g/ml) eingesetzt und das entstandene DNA-Pellet in 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 4.2.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA wurde diese 1:100 in H<sub>2</sub>O verdünnt und in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, gegen H<sub>2</sub>O vermessen. Dabei wurden Meßküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet, so dass eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml doppelsträngiger DNA entsprach. Der Reinheitsgrad der DNA-Proben wurde ebenfalls bestimmt. Dafür wurde zusätzlich die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen. Bei einer reinen DNA-Präparation liegt der Quotient der gemessenen Werte bei 260 und 280 nm zwischen 1,8 und 1,95. Niedrigere Werte deuten auf eine Protein-, höhere Werte auf eine RNA-Verunreinigung hin. Außer doppelsträngiger DNA wurden auf diese Weise auch Oligonukleotide, kurze einzelsträngige DNA-Moleküle vermessen. Hierbei entsprach eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 33  $\mu$ g/ml DNA.

#### 4.2.3 Restriktionsverdauung von Plasmid-DNA mit Endonukleasen

Zur Analyse isolierter Plasmid-DNA wurden 0,5 bis 2 µg der DNA mit 3 bis 10 Einheiten einer bestimmten Restriktionsendonuklease und dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer versetzt und für eine Stunde unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen (Temperatur, BSA-Konzentration) inkubiert. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische Basensequenzen in einer DNA-Doppelhelix erkennen

Methoden

und schneiden. Für eine präparative Restriktionsverdauung zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurden analog bis zu 40 µg DNA mit bis zu 100 Enzym-Einheiten versetzt und mindestens 3 Stunden inkubiert. Waren bei einer Doppelrestriktionsverdauung, d.h. wenn zwei Restriktionsendonukleasen eingesetzt wurden, unterschiedliche Pufferbedingungen nötig, wurde zuerst das Enzym verwendet, welches die geringere Salzkonzentration benötigt. Anschließend wurde die für das zweite Enzym erforderliche Konzentration an Salz eingestellt und weiter inkubiert. Konnte eine Doppelrestriktion nicht in einem Ansatz durchgeführt werden, weil die Pufferbedingungen oder die Temperaturoptima zu verschieden waren, wurde die DNA erst mit einem Enzym verdaut, anschließend mit Hilfe des GeneCleanII- oder des QIAquick-Gelextraction-Kits (s. Kap. 4.3.1) aufgereinigt und danach mit dem anderen Enzym inkubiert. Bei den Reaktionen darf das Volumen des Enzyms (in Glycerin gelöst) höchstens 1/10 des Gesamtansatzes ausmachen, da sonst aufgrund des hohen Glycerinanteils die Enzymreaktion beeinträchtigt werden kann. Das Gesamt-Reaktionsvolumen betrug je nach DNA-Menge zwischen 20 und 150 µl. Jede Restriktionsreaktion wurde anschließend mittels eines Agarosegels überprüft (s. Kap. 4.2.4).

#### 4.2.4 DNA-Gelelektrophorese

Restringierte DNA-Proben wurden mit Hilfe von Agarosegelen aufgetrennt. Dabei wurde eine 0,8-1 %ige Agaroselösung in 1x TAE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlen auf etwa 55°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt und in einen Gelträger gegossen. In dem Träger steckte ein Kamm, der zur Ausbildung der Probentaschen führte. Nach der Auspolymerisation wurde das Gel in einer Flachgel-Kammer mit 1x TAE-Puffer überschichtet und die Proben, mit entweder 6x oder 10x DNA-Ladepuffer vermischt, in die Probentaschen aufgetragen. Das Gel lief mit einer konstanten Spannung von 10 V/cm, wobei die Gelbanden in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt wurden und distinkte Banden entstanden. Diese Banden konnten nach dem Lauf mittels UV-Licht aufgrund des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht werden. Gele zur Überprüfung einer analytischen Restriktionsverdauung wurden dabei kurzwelligem Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm ausgesetzt, während DNA-Banden einer präparativen Reaktion bei langwelligem Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm betrachtet wurden, um die DNA vor UV-

induzierten Stangbrüchen und Kreuzvernetzungen zu schützen. Die DNA-Konzentration der Banden ließ sich mit Hilfe eines Markers (z.B. SmartLadder) bestimmen, der ebenfalls auf das Gel aufgetragen wurde.

#### 4.2.5 Sequenzierung von DNA

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur DNA-Sequenzierung beruht auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977). Es wurde ausschließlich DNA aus Maxi-Präparationen verwendet, um eine ausreichende DNA-Menge zu gewährleisten. Die Sequenzierung erfolgte auf zwei Arten. Zuerst wurde noch mittels radioaktiver Markierung mit S<sup>35</sup> sequenziert, während später die Sequenzierreaktionen in Auftrag gegeben wurden.

#### 4.2.5.1 Sequenzierung mit S<sup>35</sup>

Bei der radioaktiven Sequenzierung wurde das T7-Sequenase Kit der Firma Amersham benutzt. Zuerst wurde ein 6 %iges Sequenziergel gegossen. Dazu wurde eine Ohrenplatte mit Repel Silan behandelt, um später ein leichteres Ablösen des Gels zu ermöglichen, und diese dann mit Abstandhaltern und einer normalen Glasplatte zusammen abgeklebt. Das Sequenziergel wurde luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und ein umgedrehter Haifischzahnkamm zur Ausbildung eines glatten Gelabschluß benutzt. Nach 1 h Polymerisation wurde der Haifischzahnkamm umgedreht und das Gel 1 h bei 50 W in 1x TBE laufen gelassen, um eine gleichmäßige Temperatur des Gels zu erhalten. Eine auf die Glasplatten geklemmte Metallplatte unterstützte die Temperaturverteilung. Unterdessen wurden die Sequenzreaktionen nach den Angaben des Sequenzier-Kits angesetzt. Dabei wurden 3-5 µg Ethanolgefällte DNA und 1 pmol Primer eingesetzt. Nach dem Vorlauf des Gels wurden je 2 µl der Sequenzreaktionen pro Geltasche aufgetragen und das Gel bei 50 W 1,5 h laufen gelassen, bis die Xylenzyanol-Bande am unteren Gelrand angekommen war. Das Gel wurde dann 1,5 h bei 80°C in einem Geltrocknungsapparat getrocknet, bevor ein Röntgenfilm über Nacht für 24 h aufgelegt wurde. Nach dem Entwickeln waren die einzelnen Nukleotide als schwarze Banden zu erkennen.

#### Sequenziergel 6 %

8 ml Sequenzgelkonzentrat 22 ml Verdünner 3,4 ml Pufferkonzentrat 300 µl 10 % APS 20 µl TEMED **1x TBE (pH 8,3)** 10,8 g Tris-HCl 4 ml 0,5 M EDTA 5,5 g Borsäure H<sub>2</sub>O ad 1l

#### 4.2.5.2 Sequenzierung durch Sequenzierlabor

Aufgrund der neueren Techniken und der damit verbundenen Zeiteinsparung wurden die DNA-Proben zuletzt immer in einem Sequenzierlabor behandelt. Dazu wurde etwa 1 µg DNA mit dem für die Sequezierreaktion notwendigen Primer, der vorher auf eine Konzentration von 10 pmol/µl eingestellt wurde, eingeschickt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte dann mittels unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe, die von einem Laser detektiert werden können.

## 4.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

#### 4.3.1 Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mittels dem GeneCleanII- oder dem QIAquick-Gelextraction-Kits nach Angaben des Herstellers gereinigt. Dabei handelte es sich sowohl um DNA-Fragmente aus Agarosegelen, als auch um frei in Lösung befindliche DNA-Fragmente. Bei großen DNA-Fragmenten (>15 Kb) wurde bei der Reinigung ein häufiges Auf- und Abpipettieren unterlassen, um eine Scherung der DNA zu vermeiden.

#### 4.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die von Saiki et al. 1985 entwickelte PCR stellt eine Standardmethode zur *in vitro* Amplifikation und Modifikation von DNA dar. Bei der PCR handelt es sich im Prinzip um die zyklische Amplifikation von DNA-Fragmenten, wobei die Zahl der Fragmente durch sukzessive Verdopplung exponentiell ansteigt. Eine PCR besteht aus den folgenden drei Schritten: 1. Denaturierung der DNA:

Die doppelsträngige DNA (dsDNA) wird bei einer Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) von 95°C in ihre Einzelstränge (ssDNA) denaturiert.

2. Anlagerung (Annealing) der Primer:

Die Probe wird auf die sog. Anlagerungstemperatur (T<sub>A</sub>) abgekühlt. Dabei lagern sich die Primer an die komplementären ssDNA-Sequenzen an und verhindern somit die Rückbildung des Doppelstranges.

Die hybridisierten Primer stellen mit ihrem 3'OH-Ende Startermoleküle für die DNA-Polymerase dar.

3. DNA-Synthese:

Die Verlängerung (Extension) der 3'OH-Enden der Primer erfolgt mittels der Taq-Polymerase, deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt.

Jede PCR benötigt ein spezifisches Temperaturprofil. Die  $T_A$  hängt vom GC-Gehalt der Primer ab und sollte 4°C unter der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer liegen. Die Schmelztemperatur berechnet sich nach der Formel:

$$T_m [°C] = 2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (C+G)$$

Die Dauer der Verlängerungsreaktion ( $t_V$ ) hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes ab. Die Taq-Polymerase synthetisiert pro Minute etwa 1000 Bp DNA. Nach 30 Zyklen liegt das zu amplifizierende Fragment in bis zu 10<sup>7</sup> Kopien vor. Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Ansätze bestanden normalerweise aus 100 ng der zu amplifizierenden DNA, je 100 ng der für die Amplifikation notwendigen Primer, 1µl dNTPs (20 mM/µl), 5 µl 10x Polymerase-Puffer und 1 µl Taq-Polymerase (5 E/µl). Dieser Ansatz wurde mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 50µl aufgefüllt und vor Beginn der PCR mit zwei Tropfen Mineralöl überschichtet.

Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese in 1 %igen Agarosegelen

#### 4.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Beim Klonieren von DNA muss die Vektor-DNA zuerst dephosphoryliert werden, um eine Rück-bzw. Selbstligation dieser DNA zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde der Vektor-DNA nach der Verdauung und vor der Ligation alkalische Shrimp-Phosphatase (SAP) zugesetzt, die die Phosphatgruppe am 5'-Ende abspaltet. Zur Dephosphorylierung wurden dabei 1  $\mu$ g DNA mit 1  $\mu$ l 10x SAP-Puffer und 1  $\mu$ l SAP in 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gemischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch 20 minütiges Erhitzen der Probe auf 65°C inaktiviert.

#### 4.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Unter Ligation versteht man die Verknüpfung von zwei DNA-Fragmenten mit Hilfe einer Ligase. Diese katalysiert in einer ATP-abhängigen Reaktion die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylende.

Der in dieser Arbeit eingesetzte Ligationsansatz bestand aus 1  $\mu$ l des Dephosphorylierungsansatzes (Vektor-DNA) (s. Kap. 4.3.3), 50 ng Insert-DNA, 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase und 1  $\mu$ l 10x Ligationspuffer. Dieser Ansatz wurde mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 10  $\mu$ l aufgefüllt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurden 2  $\mu$ l des Ligationsansatzes für die Transformation (s. Kap. 4.1.1.2) eingesetzt.

### 4.4 Zellbiologische Methoden

#### 4.4.1 Kultivierung humaner Zellen

Die Kultivierung von humanen, adhärenten 293T-, 911- und HeLa-Zellen erfolgte in Einschicht-Kulturen ("Monolayer"-Kulturen) in Plastik-Gewebekulturflaschen bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft von 5 %. Das dabei verwendete Nährmedium für die Zellen war DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), dem zusätzlich 10 % FKS (fötales Kälberserum), 1 % Penicillin/Streptomycin (Stammlösung 10 mg/ml) und 1% Glutamin (Stammlösung 50 mM) zugesetzt wurde. Zur Verdünnung der Zellen wurde bei 80-90 % Konfluenz das Medium abgenommen und die Zellen zuerst mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung kurz abgespült bevor sie mit 1-2 ml Trypsin/EDTA für 1 bis 5 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Nachdem sich die Zellen abgelöst hatten wurden sie in 10-20 ml DMEM aufgenommen, wodurch das Trypsin inaktiviert wurde, und

durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Anschließend erfolgte die Verdünnung der Zellen im Verhältnis 1:6 bis 1:12 in neue Gewebekulturflaschen.

#### 4.4.2 Bestimmung der Anzahl lebender Zellen

Nach dem Abtrypsinieren und Vereinzeln der Zellen wurden die Zellen entweder zur Weiterkultivierung verdünnt oder ausgezählt, um eine definierte Menge in Experimenten einsetzen zu können. Das Auszählen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, auf die ein kleines Aliquot der Zellsuspension aufgetragen wurde. Beim Zählen musste darauf geachtet werden, dass nur die lebenden ausgezählt wurden. Dabei ergab sich die Zellzahl/ml aus dem arithmetischen Mittel von vier ausgezählten Großquadraten (bestehend aus je sechzehn Kleinquadraten) multipliziert mit dem "Kammerfaktor" 10<sup>4</sup>. Anhand der Zellzahl/ml wurde dann das benötigte Volumen der abgelösten Zellsuspension ermittelt.

### 4.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

#### 4.4.3.1 Einfrieren von humanen Zellen

Da Zellen nur über eine bestimmte Anzahl von Passagen kultiviert werden sollten, wurden zur langfristigen Lagerung der Zellen Aliquots in Stickstoff eingefroren. Dazu wurde die Zellsuspension einer 90 % konfluenten mittleren Gewebekulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) 7 min bei 312 xg, RT abzentrifugiert, das Zellpellet in 0,6 ml FKS resuspendiert und 5 min bei -20°C vorgekühlt. Anschließend wurden die Zellen 1:1 mit Einfriermedium (80 % FKS, 20 % DMSO, gekühlt) gemischt und in einer mit Ethanol gefüllten Einfrierbox bei -80°C gelagert. Nach einer Woche wurden die Zellen zur längerfristigen Aufbewahrung in einen mit Flüssigstickstoff gekühlten Tank überführt.

#### 4.4.3.2 Auftauen von humanen Zellen

Zum Auftauen von Zellen wurden 15-20 ml DMEM ohne Zusätze bereitgestellt. Die Zellen wurden aus dem Flüssigstickstoff-Tank genommen, kurz in der Hand angetaut und im noch gefrorenen Zustand in das DMEM gegeben. Nach 7 minütigem Abzentrifugieren bei 312 xg, RT wurde das Zellpellet in 15 ml DMEM mit Zusätzen aufgenommen und in eine 75 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflasche überführt.

### 4.4.4 Transfektion von Zellen

Zur Transfektion wurde in dieser Arbeit die Transfektionsmethode mit Calciumphosphat modifiziert nach Chen und Okayama (1988) verwendet. Dafür wurden Zellen mit einer Konzentration von 2,5x  $10^5$  pro 6 cm-Gewebekulturschale ausgesät. Am folgenden Tag wurden pro Transfektionsansatz 6 µg DNA mit 15 µl 3 M CaCl<sub>2</sub> und 129 µl H<sub>2</sub>O gemischt. Nach Zugabe von 150 µl 2x BBS-Puffer pro Ansatz wurden diese erneut gemischt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch tropfenweise in die Kulturschalen mit den Zellen gegeben und diese leicht geschwenkt. Die Transfektionen wurden 16-18 h bei 35°C und 3 % CO<sub>2</sub> inkubiert bevor das Medium abgenommen und durch frisches ersetzt wurde. Anschließend wurden die Ansätze in Abhängigkeit vom Experiment 24-48 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter inkubiert. Wichtig bei dieser Methode ist der pH-Wert des 2x BBS. Dieser sollte auf exakt 6,95 eingestellt sein, da sonst die Transfektionseffizienz beeinträchtigt wird. Außerdem dürfen nur sterile Lösungen verwendet werden.

### 4.5 Protein-biochemische Methoden

#### 4.5.1 Zellextrakt

Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden Zellextrakte hergestellt. Hierbei wurden die Zellen nach der Transfektion oder Infektion mit dem Medium von den Schalen gelöst und ein Aliquot der Zellsuspension bei 555 xg für 7 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20-100 µl 2x Probenpuffer aufgenommen, für 5-10 min bei 95°C erhitzt und 15 sec mittels Ultraschall auf Stufe 5 behandelt. Anschließend wurden die Proben vor dem Auftrag auf ein SDS-Polyacrylamidgel auf Eis oder bei -20°C gelagert.

#### 4.5.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei den in dieser Arbeit verwendeten SDS-Polyacrylamidgelen wurden die Gelzusammensetzungen für Trenngele nach Thomas und Kornberg (1975) und für Sammelgele nach Laemmli (1970) eingesetzt, um eine optimale Auftrennung der untersuchten Proteine zu erhalten. Zur Herstellung wurden zuerst zwei Glasplatten mit Klebeband und einer Schicht aus 0,7 % Agarose abgedichtet, bevor das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet wurde. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol wieder abgenommen und das Sammelgel gegossen, in das ein Kamm zur Ausbildung von Probentaschen gesteckt wurde. Der Kamm wurde nach einer Stunde Polymerisation wieder entfernt, die Gele in eine vertikale Elektrophorese-Apparatur geklemmt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden 10-20 µl der Proteinproben pro Probentasche aufgetragen. Die Gele liefen zuerst bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, danach wurde die Elektrophorese bei 40 mA pro Gel weitergeführt bis die Bromphenolblau-Bande des Probenpuffers in die Agaroseschicht gewandert war.

#### 15 %iges Trenngel

2,5 ml Kornberg A-Lösung (30 % Acrylamid / 0,15 % Bisacrylamid) 1,25 ml Kornberg B-Lösung (1,5 M Tris-HCl pH 8,8 / 0,4 % SDS) 1,2 ml H<sub>2</sub>O 33,3  $\mu$ l 10 % APS 3,3  $\mu$ l TEMED

#### 5 %iges Sammelgel

250 µl Laemmli A-Lösung (30 % Acrylamid / 9,8 % Bisacrylamid) 625 µl Kornberg C-Lösung (0,75 M Tris-HCl pH 6,8 / 0,4 % SDS) 1,6 ml H<sub>2</sub>O 25 µl 10% APS 5 ml TEMED

#### Laufpuffer

50 mM Tris-HCl pH 8,8; 375 mM Glycin; 0,1% SDS

#### 4.5.3 Coomassie-Färbung

Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde das Proteingel nach der Elektrophorese für 15 min in Coomassie Brilliant Blue Färbelösung gelegt. Anschließend wurde es so lange mit Entfärberlösung behandelt, bis distinkte blaue Banden auf den Gel zu erkennen waren. Nach einer kurzen Inkubation in H<sub>2</sub>O wurde das Gel über Nacht in einer Geltrocknungs-Apparatur unter dem Abzug getrocknet. Als Größenstandard für die Banden wurde der Proteinmarker (s. Kap. 3.7.2) verwendet.

Coomassie Brilliant Blue Färbelösung	Entfärberlösung
1 % Coomassie Brilliant Blue	20 % Methanol
20 % Methanol	7 % Eisessig
7 % Eisessig	

#### 4.5.4 Western-Blot Analyse

Um ausschließlich bestimmte Proteine nachzuweisen, bietet sich statt der Coomassie-Färbung das sogenannte Western-Blot Verfahren an, bei dem die Proteine über eine spezifische Immundetektion nachgewiesen werden. Bei dem hier verwendeten Western Blot System handelte es sich um ein "Semi-Dry"-Verfahren, bei dem die Proteine mittels zweier Plattenelektroden aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert wurden. Dazu wurden sechs Stücke Whatman-Papier und ein Stück Nitrocellulosemembran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde ebenfalls, nach Abtrennung des Sammelgels, kurz in Transferpuffer getaucht. Anschließend wurden erst drei Papierstücke, dann die Membran, das Gel und nochmal drei Papierstücke unter Vermeidung von Luftblasen auf die Anode einer horizontalen Western-Blot Apparatur gelegt, die Kathode aufgesetzt und mit einem Gewicht von 1 kg beschwert. Der Proteintransfer erfolgte für 1 h bei einer Stromstärke von 60 mA pro Gel bei 4°C.

Anschließend wurde der Proteintransfer überprüft, indem die Membran für 5 min in einer Ponceau-Färbelösung inkubiert wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurden distinkte rote Banden auf der Membran sichtbar. Nach der Überprüfung des Transfers wurde die Membran für die Immundetektion vorbereitet. Als Marker wurde bei dieser Methode ein AAV-Extrakt benutzt, der die drei VP-Proteine aufweist.

#### Transferpuffer

250 mM Tris-HCl pH 8,0 192 mM Glycin 20 % Methanol

#### Ponceau S-Färbelösung

0,1 % Ponceau S 1,5 % TCA (Trichloracetat) 1,5 % Sulfosalicylsäure 4,75 % Essigsäure

## 4.6 Virologische Methoden

#### 4.6.1 Infektion von humanen Zellen

Für die Infektion von humanen Zellen mit Viren werden zu 70-80 % konfluent mit Zellen bewachsene Gewebekulturgefäße benutzt. Das Medium wird vollständig abgenommen und durch neues, mit einer bestimmten MOI an Viren versetztes, Medium ohne FKS ersetzt. Dabei wird das Mediumvolumen so gewählt, dass es gerade den Boden des Kulturgefäßes bedeckt (2-6 ml). Dadurch bekommt man eine möglichst große Virendichte pro Fläche und erhöht so die Infektionseffizienz. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> unter mehrmaligem leichten Schwenken inkubiert, bevor gegebenenfalls mit DMEM ohne FKS aufgefüllt und dann mit 20 % FKS-haltigem DMEM 1:1 verdünnt wurde. Das Endvolumen/Gefäß betrug je nach Größe des Kulturgefäßes 4-20 ml und die Endkonzentration an FKS 10 %. Die weitere In-kubation zur Vermehrung der Viren erfolgte normalerweise für 48 h.

#### 4.6.2 Produktion und Präparation von wt AAV-2

#### 4.6.2.1 Produktion von wt AAV-2

Zur Produktion von Wildtyp AAV-2 Viren wurden 10x 15 cm-Gewebekulturschalen mit 5x 10<sup>6</sup> HeLa-Zellen pro Schale ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion der Zellen mit AAV-2, wie unter 4.6.1 beschrieben. Dabei wurde eine MOI von 2 eingesetzt. Allerdings muss bei der Infektion mit wt AAV-2 auch eine Überinfektion mit Adenovirus 5 erfolgen, da AAV einen Helfervirus zur Replikation benötigt. Aus diesem Grunde wurde nach der Inkubation von 1 h mit wt AAV-2 in 6 ml Medium pro Schale 1 ml FKS-freies DMEM mit Adeno-5 (MOI = 1-2) zugegeben und die Schale eine weitere Stunde bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. 2 Tage später, bei einem CPE von 50 %, wurden die Viren geerntet. Dabei wurden alle noch am Boden haftenden Zellen mittels eines Zellschabers abgekratzt und dann die gesamte Zellsuspension abgenommen und in Falcon-Röhrchen überführt. Nach Abzentrifugieren der Zellsuspensionen bei 312 xg, 4°C für 10 min wurden die Zellpellets in insgesamt 10-12 ml Lysepuffer aufgenommen und es erfolgte eine Frier-/ Tau-Lyse, bei der die Suspension dreimal hintereinander in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend im 37°C-Wasserbad wieder aufgetaut wurde. Auf diese Weise wurden die Zellen aufgeschlossen und die Viruspartikel frei gesetzt. Nach der Lyse und erneuter Zentrifugation der Suspension bei 312 xg, 4°C für 10 min wurde dem Lysat Benzonase zugefügt (Endkonzentration 5 E/ml) und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die in der Lösung vorhandenen Adenoviren durch Inkubation der Probe bei 56°C für 30 min inaktiviert und die Suspension noch einmal bei 5422 xg, RT für 15 min zentrifugiert.

#### Lysepuffer

150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl pH 8,5

#### 4.6.2.2 Reinigung des AAV-2 Stocks mittels Iodixanol-Stufengradienten

Zur Reinigung des AAV-2 Zellysats wurde ein Iodixanol-Stufengradient nach Zolothukin et al. (1999) eingesetzt. Der Gesamtansatz eines Gradienten in einem Beckmann-Röhrchen (# 342414) bestand dabei von unten aus 4 ml 60 %-, 4 ml 40 %- 5 ml 25 %-, 7 ml 15 %-Iodixanollösung, sowie 20 ml PBS-MK und 6 ml Viruslysat. Die verschiedenen Iodixanol-Lösungen wurden mittels Verdünnung mit PBS-MK hergestellt (Ausgangskonzentration = 60 %ig) und zusätzlich noch zur besseren Unterscheidung mit Phenolrot eingefärbt (25 % = gelb, 60 % = rot). Anschließend wurden die Röhrchen zugeschweißt und in einem Beckmann Ti 50.2-Rotor 2 h bei 4°C und 226.000 xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die 40 %-Iodixanol-Lösung, in der die vollen AAV-2 Kapside angereichert sind, mit einer Kanüle vorsichtig abgezogen.

#### PBS-MK

1x PBS 1 mM MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM KCl

# 4.6.2.3 Reinigung von AAV-2 Kapsiden mittels Heparin-Agarose-Chromatographie

Um das Iodixanol und eventuelle zelluläre Verunreinigungen aus der Viruslösung zu entfernen, wurde diese über eine Chromatographie-Säule, gepackt mit Heparin-Agarose Typ I, nach Hauswirth et al. (2000) gereinigt. Dazu wurde eine Säule mit 2 ml Heparin-Agarose Typ I (1mg Heparin /ml) vorgepackt und mit 20 ml PBS-MK äquilibriert, bevor die Virusprobe auf die Säule gegeben wurde. Nach Waschen der Säule mit PBS-MK wurden die Virus-Partikel mit 10 ml 1 M NaCl in PBS-MK eluiert.

#### 4.6.2.4 Aufkonzentrieren der AAV-2 Kapside mittels Vivaspin-Konzentratoren

Da die Konzentration/ml des Eluats aus Kap. 4.6.2.3 viel zu gering ist und außerdem eine Lagerung des Virus in 1 M NaCl auf Dauer die Kapside instabilisiert, wurde das Eluat mit Hilfe von Vivaspin-Konzentratoren (6 ml, 10 KDa MWCO) aufkonzentriert und mit 1x PBS gewaschen. Dabei wurden die Konzentrator-Röhrchen zuerst mit H<sub>2</sub>O durch kurzes Zentrifugieren gespült, bevor das Eluat in die Röhrchen gegeben wurde. Das Aufkonzentrieren erfolgte bei 3000 xg bei 4°C so lange, bis das Gesamt-volumen etwa 1 ml betrug. Anschließend wurde der Konzentrator zum Entsalzen der Probe mit 1x PBS auf 5 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert, bis ein Volumen von 1 ml erreicht wurde. Nach nochmaligem Auffüllen mit 1x PBS auf 5 ml wurde die Zentrifugation bis zu einem Restvolumen von 200 µl durchgeführt. Danach wurde die Viruslösung vorsichtig in den Konzentrator-Röhrchen auf- und abpipettiert, um die Virus-Partikel, die an der Membran hängen, zu lösen, bevor sie in ein Eppendorf-Gefäß überführt wurde.

#### 4.6.3 Produktion und Präparation von Adenovirus Typ 5

#### 4.6.3.1 Produktion von Adenovirus 5

Die Präparation von Adeno-5 Viren erfolgte in 20x 15 cm-Gewebekulturschalen, in die 5x 10<sup>6</sup> 293-T Zellen ausgesät wurden. Am folgenden Tag nach Erreichen von 80 % Konfluenz (1x 10<sup>7</sup> Zellen/Schale) wurden die Zellen, wie unter 4.6.1 beschrieben, infiziert. Dabei wurde ein Infektionsvolumen von 6 ml/Schale gewählt und eine MOI an Ad-5 Viren von 1-2. 48 h später, bei einem CPE von 50 %, erfolgte die Ernte der Viren wie für wt AAV-2 unter 4.6.2.1 beschrieben. Das Zellpellet wurde hier allerdings nicht in Lysepuffer, sondern in TBS-Puffer resuspendiert. Nach der Frier-/ Tau-Lyse erfolgte die Zentrifugation bei 312 xg für 5 min, 4°C.

#### **TBS-Puffer**

25 mM Tris-HCl 30 mM KCl 140 mM NaCl 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 mM Dextrose

#### 4.6.3.2 Reinigung des Adeno-5 Stocks mittels CsCI-Dichtegradienten

Zur Reinigung des Adeno-5 Zellysats wurde ein Cäsiumchlorid-Dichtegradient eingesetzt. Dazu wurden in ein Beckmann-Röhrchen (# 331374) 3 ml CsCl-Lösung mit einer Dichte  $\sigma$  = 1,2 g/ml eingefüllt, mit 3 ml CsCl-Lösung mit  $\sigma$  = 1,4 g/ml unterschichtet und mit 5-6 ml Virussuspension überschichtet. Der Gradient wurde bei 160.000 xg 1 h bei 20°C in einem TST41.14-Rotor gefahren. Anschließend wurde die untere der beiden sichtbaren Banden mit einer Kanüle abgenommen, mit einer CsCl-Lösung ( $\sigma$  = 1,3 g/ml) auf ein Endvolumen von 11,5 ml aufgefüllt und in ein neues Beckmann-Röhrchen gegeben. Die Suspension wurde mit 0,5 ml CsCl-Lösung mit  $\sigma$ = 1,5 g/ml unterschichtet und der Gradient unter den gleichen Bedingungen wie der Erste über Nacht zentrifugiert. Am nächsten Morgen wurde die sichtbare Bande mit einer Kanüle abgenommen und der Virusstock bei -20°C gelagert. Wichtig bei diesem Versuch war, dass alle Schritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurden.

### 4.7 Immunologische Methoden

#### 4.7.1 Immundetektion transferierter Proteine

Die, wie unter 4.5.4 beschrieben, auf eine Nitrocellulose-Membran transferierten Proteine wurden mittels einer Immundetektion sichtbar gemacht. Dabei handelte es sich um eine Chemilumineszenz-Reaktion, für die ein Zweitantikörper benutzt wurde, der eine Peroxidase gebunden hat. Die Peroxidase ist in der Lage, ein sogenanntes Luminol unter Lichtemission zu oxidieren. Die Zugabe eines Verstärkers erhöht die Emission um ungefähr das 1000fache.

Zuerst wurde die Membran 1 h in Blockmilch (1x PBS, 0,05 % Tween 20, 6 % Milchpulver) bei RT oder bei 4°C über Nacht inkubiert, um unspezifische Bindestellen

Methoden

abzublocken. Anschließend wurde der Erstantiköper in Blockmilch verdünnt (B1 = 1:10), zu der Membran geben und 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in 1x PBS) für jeweils 20 min erfolgte die Inkubation der Membran mit dem 1:5000 in Blockmilch verdünnten Zweitantikörper (Ziege anti Maus-PO) für 1 h, gefolgt von nochmaligem 3x Waschen mit Waschpuffer. Alle Schritte erfolgten hierbei unter leichtem Schwenken. Zur Detektion wurde ein 1:1-Gemisch der Luminol- und der Verstärker-Lösung aus dem ECL-Kit (s. Kap. 3.9) hergestellt und die Membran nach kurzem Abtropfen auf Filterpapier 1 min darin inkubiert. Nach erneutem Abtropfen der Membran wurde diese in eine Folie gelegt. Durch unterschiedlich langes Auflegen von Röntgenfilmen (5 sec – 3 min) wurden die Proteine in Abhängigkeit der Emissionsstärke nachgewiesen. Anschließend wurde der Film in einer Entwicklermaschine entwickelt. Die Proteine waren nun als einzelne schwarze Banden erkennbar.

#### 4.7.2 A30-Titration zur Bestimmung des infektiösen Titers

Die Konzentration von infektiösen wt Adeno-5 und rekombinanten Adenoviren wurde mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Titration bestimmt. Eine 96 Loch-Mikrotiterplatte wurde mit 1x 10<sup>4</sup> HeLa-Zellen pro Loch ausgesät und am nächsten Tag mit den Viren infiziert. Dabei wurden, ohne das Medium von den Zellen zu nehmen, in die Löcher der ersten vertikalen Reihe (1) je 10 µl der Viruslösungen pipettiert und vermischt. Wichtig war, eine horizontale Reihe als Negativkontrolle mit nicht infizierten Zellen zu lassen und eine Reihe als Positivkontrolle mit einem schon austitrierten Virusstock zu infizieren. Aus den Löchern der Reihe 1 wurden mit einer Multikanalpipette je 11 µl für eine serielle 10fach-Verdünnung abpipettiert, in Reihe 2 hineinpipettiert und gemischt. Danach wurden aus den Löchern der Reihe 2 je 11 µl in die Löcher der Reihe 3 pipettiert und gemischt. Dieses Verdünnen erfolgte so lange, bis die Reihe 12 erreicht wurde. Anschließend wurde die 96 Loch-Platte 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach kurzer Kontrolle des CPE in den Löchern mit Hilfe eines Lichtmikroskopes wurde das Medium vorsichtig ausgeschüttelt, die Zellen 1x mit je 150 µl 1x PBS pro Loch gewaschen und 15 min mit 100 µl / Loch auf -20°C vorgekühltem Methanol fixiert. Das Methanol wurde wiederum vorsichtig ausgeschüttelt und die Platte über Kopf 2 h bei RT getrocknet. Als nächstes erfolgte die Inkubation der Zellen mit je 100 µl des Erstantikörpers A30 über Nacht bei 4°C oder 1 h bei 37°C. Nach

zweimaligem Waschen mit 150 µl 1x PBS/Loch inkubierten die Zellen 1 h mit je 25 µl des Zweitantikörpers Ziege anti Maus-Cy3, der 1:200 in PBS mit 1 % Milchpulver verdünnt worden war. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit 1x PBS wurden je 50 µl H<sub>2</sub>O in die Löcher pipettiert, die infizierten Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert und somit unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen die Konzentration der infektiösen Viruspartikel ermittelt.

### 4.7.3 A20-"capture" ELISA zur Kapsidtiter-Bestimmung

Für die Bestimmung der Konzentration der laut 4.10.2 gereinigten intakten AAV-Kapside wurde der A20-gekoppelte ELISA modifiziert nach Grimm et al. (1999) eingesetzt. Dabei wurden die Kapsidstocks und der Kapsidstandard (leere AAV-2 Kapside mit definierter Konzentration) in Waschpuffer (1x PBS mit 0,05 % Tween 20) verdünnt (Doppelbestimmungen) und anschließend je 100 µl /Loch in eine A20gekoppelte 96 Loch-Mikrotiterplatte (Progen) gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt, die Löcher dreimal mit 200 µl Waschpuffer/Loch gewaschen und 100 µl in Waschpuffer verdünnter biotinylierter Erstantikörper A20 (1 µg/ml) pro Loch aufgetragen. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde der Erstantikörper ausgeklopft, die Löcher erneut dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und mit 100 µl Streptavidin-Peroxidase (0.8 µg/ml, in Waschpuffer verdünnt) gefüllt. 1 h später erfolgte die Detektion nach nochmaligem 3x Waschen durch Zugabe von 100 µl TMB-Reagenz pro Loch. Die durch die Reaktion der Peroxidase mit dem TMB entstandene Blaufärbung wurde mit 100 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Loch abgestoppt. Die Farbintensität wurde bei 450 nm in einem ELISA-Reader gemessen und anhand der Standardkurve die Konzentration an intakten Kapsiden ermittelt. Zuerst wurden die Reagenzien für den ELISA aus dem Laborbestand verwendet, später aus dem A20-ELISA Kit von Progen. Die Konzentration der leeren AAV-Partikel, die als Standard verwendet wurden, wurde ebenfalls mit Hilfe des A20-ELISAs bestimmt. Zusätzlich dazu wurde aber die Konzentration und Reinheit der Probe auch noch bestimmt, indem die Kapside mittels des Negativ-Kontrastierungsverfahrens (s. Kap. 4.11.1) im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht und anschließend ausgezählt wurden (s. Kap. 4.11.2).

### 4.7.4 Biotinylierung von Antikörpern

Die in Kap. 4.7.3 und Kap. 4.7.5 bis 4.7.7 verwendeten biotinylierten Antikörper wurden alle mit Hilfe des Biotinylierungs-Kits von Amersham hergestellt. Biotinylierte Antikörper erleichtern die Immunreaktionen, indem zwei Inkubationsschritte (die Erstantikörperreaktion und die Reaktion mit Biotin, das an den Erstantikörper bindet und vom Zweitantikörper erkannt wird) in einem Schritt zusammengefasst werden. Die gereinigten Antikörper (A1, A69, B1 und A20, Laborbestand) wurden mit 1x Bicarbonat-Puffer (Stock 1:20 mit H<sub>2</sub>O verdünnt) auf die Konzentration 1mg /ml verdünnt. Je 2 ml der Verdünnungen wurden mit 80 µl Biotinylierungsreagenz versetzt und 1 h bei RT rotiert. Die Ansätze wurden nun auf vorher mit 25 ml 1x PBS äquilibrierte SephadexG25-Säulen gegeben und von dort mit 5 ml PBS eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt und die Säulen mit weiteren 5 ml PBS und 10 ml PBS mit 0,01 % Natrium-Azid gewaschen, um sie bei 4°C zu lagern. Die einzelnen Fraktionen wurden pur bei einer Wellenlänge von 280 nm spektrophotometrisch gegen PBS vermessen und alle Fraktionen mit einer OD  $\leq$  0,4 verworfen. Die Bestimmung der Proteinmenge in den Fraktionen konnte durch Multiplikation des OD-Wertes bei 280 nm mit 1,35, dem Umrechnungsfaktor für IgG, durchgeführt werden. Wichtig dabei war, dass die errechnete Gesamtproteinmenge nach der Biotinylierung mehr als die eingesetzten 2 mg betrug, da das Biotin die OD beeinflusst. Für die Versuche wurden die Antikörper dann so verdünnt, dass eine Konzentration von 100 ng/100 µl eingesetzt werden konnte.

#### 4.7.5 Antikörperbindungstest

#### 4.7.5.1 auf beschichteten Platten

Um die Zugänglichkeit der N-termini für monoklonale Antikörper, die ihr Epitop im Nterminalen Bereich von VP1 und VP2 haben, zu überprüfen, wurde ein Antikörperbindungstest benutzt, der als Grundlage den A20- ELISA aus Kap. 4.7.4 hat. Die Viruskapside wurden mit Lagerungspuffer auf die Konzentrationen  $10^9$  Kapside/100 µl,  $10^8$  Kapside/100 µl,  $10^7$  Kapside/100 µl und  $10^6$  Kapside/100 µl verdünnt und je 100 µl/Loch auf eine A20-gekoppelte 96 Loch-Mikrotiterplatte (Progen) aufgetragen. Dabei wurde pro Antikörper eine Doppelbestimmung durchgeführt und zusätzlich eine doppelte Leerwertbestimmung. Der Versuchsablauf erfolgte genau, wie unter Kap. 4.7.4 beschrieben, nur dass außer dem biotinylierten A20 als Erstantikörper auch die biotinylierten Antikörper A1, A69 und B1 eingesetzt wurden. Außerdem wurden bei den Leerwerten keine Erstantikörper, sondern stattdessen Waschpuffer aufgetragen. Nach der Detektion bei 450 nm im ELISA-Reader wurden die gemittelten Leerwerte für jede Verdünnung jeweils von den gemittelten Probenwerten/ Antiköper subtrahiert und somit konnte die Zahl der von den Antikörpern erkannten Kapside berechnet werden.

#### Lagerungspuffer

0,1 M NaCl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM MgCl<sub>2</sub>

#### 4.7.5.2 auf nicht-beschichteten Platten

Zur Untersuchung von denaturierten AAV-Kapsiden im Vergleich zu nativen wurden die Kapside für 10 min bei 70°C erhitzt und anschließend auf eine 96 Loch-Mikrotiterplatte, wie unter Kap. 4.7.5.1 beschrieben, aufgetragen. Hier konnte keine A20-gekoppelte Platte benutzt werden, da der dort schon vorher aufgetragene A20-Antikörper nur intakte Kapside erkennt. Die Kapside liegen jedoch nach der Denaturierung nicht mehr im intakten Zustand vor. Um eine effiziente Bindung der denaturierten Kapside an die Mikrotiterplatte zu gewährleisten, wurden die Kapside über Nacht bei 4°C inkubiert, bevor mit dem Antikörperbindungstest wie unter Kap. 4.7.5.1 erklärt, fortgefahren wurde. Nach der Detektion konnte wiederum die Zahl der von den Antikörpern erkannten Kapside durch Subtraktion der Leerwerte berechnet werden.

#### 4.7.6 Nicht-radioaktiver Dot-Blot Assay

Ein weiterer Versuch, die Bindung von N-terminus- und C-Terminus-spezifischen Antikörpern an AAV-Kapside zu überprüfen, war die Durchführung eines Dot-Blot Assays. Dabei wurden eine Nitrocellulosemembran und ein Whatman-Papier in der Größe einer Dot-Blot Apparatur (9x12cm) ausgeschnitten, in 1x PBS getaucht und anschließend erst das Papier und dann die Membran unter Vermeidung von Luftbla-

Methoden

sen auf das Unterteil der Blot Apparatur gelegt. Nach Auflegen des Oberteils wurden die Schrauben festgezogen und die Apparatur an eine Vakuumpumpe angeschlossen. Viruskapside wurden mittels Lagerungspuffer oder Citrat-/Phosphatpuffern mit definierten pH-Werten auf eine Konzentration von 5x 10<sup>9</sup> Kapside/50 µl gebracht, 30 min bei definierten Temperaturen und/oder pH-Werten oder mit Heparin inkubiert und anschließend je 50 µl/Loch in der Dot-Blot Apparatur luftblasenfrei aufgetragen. Danach wurde die Vakuumpumpe angestellt und die Proben somit auf die Nitrocellulosemembran gesaugt. Dann wurde die Apparatur wieder auseinander gebaut und die Membran für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockmilch inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Streifen geschnitten und in die in Blockmilch verdünnten Erstantikörper für 1 h bei RT gelegt (A1 und A20 1:10 verdünnt, A69 und B1 1:20). Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 15 min wurden die Membranstreifen in den 1:5000 in Blockmilch verdünnten Zweitantikörper Ziege anti Maus-PO gelegt und 1 h bei RT auf den Schüttler gestellt. Der Nachweis der Proteine erfolgte, wie bei den transferierten Proteinen unter Kap. 4.7.1, mit Hilfe des ECL-Kits von Amersham.

#### 4.7.7 Nicht-radioaktiver Zellbindungstest

Um die Hemmung der Bindung der AAV-Viren an die Zellen durch Zugabe von Heparin zu messen, wurde ein nicht-radioaktiver Zellbindungstest durchgeführt. Dazu wurde eine 96 Loch-Gewebekulturplatte mit 1x 10<sup>4</sup> HeLa-Zellen/Loch ausgesät. Am nächsten Tag wurden wt AAV-2 Kapside mit DMEM ohne FKS auf eine Konzentration von 1x 10<sup>10</sup> Kapside/50 µl verdünnt und 6 KDa große Heparinmoleküle (10 mg/ml) in den Konzentrationen 0,1 µg, 1 µg, 5 µg, 10µg, 50 µg und 100 µg pro Ansatz zugegeben. Wichtig war, dass alle Ansätze als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Als Negativkontrolle dienten Ansätze nur mit Medium ohne FKS und als Positivkontrolle Ansätze mit Medium und Viren ohne Heparin. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT, während der das Heparin an die Viren binden konnte, wurden 50 µl/Loch in eine V-Form Mikrotiterplatte vorgelegt und auf Eis vorgekühlt. Anschließend wurde den Zellen vorsichtig das Medium abgezogen, die Zellen auf Eis gestellt und die Virus-/Heparin-Ansätze mit einer Multikanalpipette aus der V-Form Platte auf die Zellen pipettiert. Das Ganze inkubierte 1 h bei 4°C auf Eis, damit sich die Viren, wenn möglich, an die Zellen anlagerten. Anschließend wurden die Zellen mit 200
Methoden

µl/Loch eiskaltem 1x PBS gewaschen und sofort danach mit 100 µl auf -20°C vorgekühltem Methanol pro Loch für 20 min bei -20°C fixiert. Nach Trocknung der Platte über Nacht bei RT über Kopf wurden die Zellen drei Mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend für 2 h mit 200 µl Blockpuffer pro Loch abgeblockt. Der weitere Versuchsablauf entsprach den unter Kap. 4.7.3 gemachten Angaben für den A20-ELISA und es wurde das A20-ELISA Kit der Firma Progen benutzt. Der Nachweis der Absorption erfolgte bei 450 nm im ELISA-Reader. Die Menge an gebundenen Viren konnte nach Abzug des Leerwertes angegeben werden.

#### Blockpuffer

1x PBS; 0,2 % Casein; 0,05 % Tween 20

#### 4.7.8 Indirekte Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurden die Expression von Proteinen und ihre subzelluläre Lokalisation nachgewiesen. 293T- oder 911-Zellen wurden auf Deckgläschen in einer 6 cm-Gewebekulturschale kultiviert und am nächsten Tag, bei etwa 60-70 % Konfluenz transfiziert oder infiziert. Als Negativkontrolle fungierten nicht transfizierte bzw. infizierte Zellen. Nach 48 h wurden die Deckgläschen einmal mit 1x PBS gewaschen und dann 10 min mit Methanol und 5 min mit Aceton (alles bei -20°C und auf -20°C vorgekühlt) fixiert. Nach anschließendem Trocknen der Gläschen an der Luft konnten sie entweder bei -20°C gelagert oder direkt weiter verwendet werden, indem 150 µl Erstantikörper (B1 und A20) unverdünnt auf die Gläschen gegeben wurde. Die Inkubation erfolgte dann über Nacht bei 4°C auf Parafilm in einer feuchten Kammer, bevor am nächsten Tag die Deckgläschen zweimal unter leichtem Schwenken für 10 min in 1x PBS gewaschen wurden und anschließend mit 100 µl Zweitantikörper (Ziege anti Maus-Cy3 gekoppelt, 1:200 verdünnt in PBS/1% BSA) im Dunkeln bei RT erneut inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS für je 10 min unter leichtem Schwenken wurden die Deckgläschen kurz in Ethanol getaucht, an der Luft getrocknet und dann mit Permafluor auf Objektträgern eingebettet. Die Präparate wurden zum Aushärten des Einbettmittels über Nacht bei 4°C stehen gelassen und dann mit einem Immunfluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert.

# 4.7.9 Fotografieren von Immunfluoreszenzen

Die Präparate der indirekten Immunfluoreszenz wurden mit 400 oder 1000facher Vergrößerung entweder auf Ektachrome 400-Filme aufgenommen und als Dias eingescannt oder mit Hilfe einer Computersoftware (Openlab, Improvision) direkt fotografiert und gespeichert.

# 4.8 Präparation und Analyse von viraler DNA

# 4.8.1 Präparation der viralen DNA

Die Präparation von viraler DNA erfolgte in dieser Arbeit nach zwei verschiedenen Protokollen, einmal für Adeno-DNA und einmal für AAV-DNA.

# 4.8.1.1 Isolierung von rekombinanter Adeno-DNA für die Sequenzierung

Zur Überprüfung der Sequenz des von Richard Samulski zur Verfügung gestellten rekombinanten Adenoviruses (rAdVP) wurde das Virus, wie unter Kap. 4.6.3 für wt Adeno-5 beschrieben, produziert und über einen CsCI-Dichtegradienten gereinigt. Anschließend wurde die Viruslösung in Aliquots à 200 µl aufgeteilt und pro Aliquot je 2 Volumen H<sub>2</sub>O und 6 Volumen 100 % Ethanol zugegeben. Die DNA präzipitierte darin 30 min bei -80°C bevor sie 10 min bei 7826 xg bei RT abzentrifugiert wurde. Die Pellets trockneten über Kopf und wurden anschließend in 500 µl Puffer (10 mM Tris pH 7,8, 5 mM EDTA, 0,5 % SDS) resuspendiert. Nach Zugabe von 2,5 µl Proteinase K (Endkonzentration 50 µg/ml) wurde die Suspension 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit Phenol/Chloroform gefällt. Dazu wurden 500 µl Phenol/Chloroform-Lösung zu der Suspension gegeben, alles gut geschüttelt (nicht vortexen) und 5 min bei 17600 xg, RT abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und nochmal mit Phenol/Chloroform versetzt und zentrifugiert, bevor die dann vorhandene wässrige Phase abgenommen, mit 2 Volumen 100% Ethanol versetzt und die DNA über Nacht bei -20°C gefällt wurde. Nach Zentrifugation bei 7826 xg, 4°C für 30 min wurden die Pellets über Kopf getrocknet und anschließend je in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Wichtig war, alle Pipettierschritte mit abgeschnittenen Spitzen zu machen, um die 36 kb große Adeno-DNA nicht zu zerstören. Nach Konzentrationsbestimmung der DNA mittels eines DNA-Agarosegels und dem SmartLadder-Marker wurde die DNA zum Sequenzieren gegeben.

#### 4.8.1.2 Isolierung von wt AAV-DNA für die Southern-Blot Analyse

WT AAV-2-DNA wurde isoliert, um zu sehen, ob die DNA durch Inkubation der Kapside bei verschiedenen Temperaturen, pH-Werten oder mit Heparin für den Abbau durch DNase I zugänglich wird. Dafür wurden wt AAV-Kapside so verdünnt, dass 1x 10<sup>10</sup> Kapside in 100 µl Ansätzen mit Lagerungspuffer oder Citrat-/Phosphat-Puffern mit definierten pH-Werten vorlagen. Die Citrat-/Phosphat-Puffer bestanden aus 0,01 M Citratsäure-Lösung und 0,02 M dibasischer Natriumphosphat-Lösung (53,65 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x 7 H<sub>2</sub>O, 71,7 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x 12 H<sub>2</sub>O in 1I) plus 0,1 M NaCl und 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Die beiden Lösungen wurden in einer bestimmten Mischung zusammengegeben, um definierte pH-Werte zu erhalten. Insgesamt wurden 7 Proben angesetzt und 30 min inkubiert. Die Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 4-1 ersichtlich.

Probe	Puffer	Inkubationstemperatur
1	Lagerungspuffer	37°C
2	Lagerungspuffer	65°C
3	Lagerungspuffer	65°C
4	рН 4,5	37°C
5	рН 3,0	37°C
6	Lagerungspuffer plus 600 ng Heparin	37°C
7	pH 4,5 plus 600 ng Heparin	37°C

Tab.4-1: Inkubationsbedingungen der wt AAV-2 Kapside für die Untersuchung der Zugänglichkeit der DNA

Nach der Inkubation wurden allen Ansätzen 0,5  $\mu$ I MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 5 mM) und, außer Probe 3, 2,5  $\mu$ I DNase I (Endkonzentration 500  $\mu$ g/mI) zugefügt. Bei Probe 3 sollte die durch das Erhitzen auf 65°C zugänglich gewordene DNA als Kontrolle nicht abgedaut werden. Dafür wurden dieser Probe schon jetzt zur Stabilisierung 6  $\mu$ I EDTA (Endkonzentration 30 mM) zugegeben, den anderen Proben erst nach der folgenden Inkubation von 1 h bei 37°C. Nach dem DNase-Verdau wurden alle Proben kurz auf Eis gelagert, bis jeder Probe 1 Volumen 2x Proteinase-Puffer, 7  $\mu$ I Proteinase K (Endkonzentration 320  $\mu$ g/mI) und 0,5  $\mu$ I Heringssperma-DNA (Kon-

zentration 10 mg/ml), als Hilfs-DNA zur Fällung, hinzugefügt wurden. Der Proteinase K-Verdau erfolgte für 3 h bei 37°C, wobei die Gefäße alle 30 min kurz invertiert wurden. Anschließend lagerten die Proben über Nacht bei -20°C. Am nächsten Tag wurde die DNA-Extraktion mittels Phenol/Chloroform-Fällung durchgeführt. Dazu wurden 400  $\mu$ I Phenol/Chloroform-Lösung zu den Proben gegeben, gut geschüttelt und 5 min bei 17.600 xg, RT abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, mit 40  $\mu$ I 3 M Natriumacetat (NaAc), 2  $\mu$ I Glycogen und 800  $\mu$ I 100% Ethanol gemischt und 30 min bei -80°C zur Fällung der DNA inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 30 min bei 17.600 xg, 4°C wurde der Überstand abgenommen, die Pellets in 600  $\mu$ I 70 % Ethanol aufgenommen und erneut für 20 min bei 17.600 xg, 4°C zentrifugiert. Dann wurden die Pellets über Kopf getrocknet, in 10  $\mu$ I H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20°C bis zum Einsatz in der Southern-Blot Analyse gelagert.

#### 2x Proteinase-Puffer

20 mM Tris-HCl pH 8,0 20 mM EDTA 1 % SDS

# 4.8.2 Southern-Blot Analyse

# 4.8.2.1 Transfer von DNA

Die in Kap. 4.8.1.2 präparierte DNA wurde in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Bande im unteren Drittel des Gels angelangt war. Als Marker lief ein etwa 4,7 Kb großes DNA-Fragment mit, was aus pTAV2.0 mit den Restriktionsenzymen Xbal und Clal ausgeschnitten und mittels Agarosegel und Gel-Extraction Kit II von Qiagen aufgereinigt wurde. Nach dem Lauf wurde das Gel im langwelligen UV-Licht (366 nm) zurecht geschnitten und zum Äquilibrieren in 0,4 M NaOH, dem Transferpuffer, gelegt. Für den Transfer der DNA wurde eine große Glasschale mit 0,4 M NaOH gefüllt und eine quadratische Glasplatte so auf die Glasschale gelegt, dass ein Whatman-Papier als "Brücke" über diese Platte gelegt werden konnte und mit beiden Enden im Transferpuffer hing. Das Whatman-Papier musste dabei 1-2 cm breiter sein, als das Agarosegel. Während sich das Papier nun voll Transferpuffer sog, wurden eine Gene-Screen Nylonmembran und vier Whatman-Papiere in der Größe des Agaroselgels ausgeschnitten. Zusätzlich dazu ein Papier, das 1-2 cm länger und 1-2 cm breiter war. Das größere Papier wurde in Transferpuffer getränkt und mittig auf die "Brücke" gelegt. Auf dieses Papier wurde zuerst das Gel mit der Oberseite nach unten, dann die Nylonmembran, zwei in Transferpuffer getränkte und zwei trockene Whatman-Papiere gelegt. Um das Gel herum wurde Frischhaltefolie gelegt, um eine Beeinträchtigung des Transfers zu vermeiden. Als letztes wurde ein etwa 10 cm dicker Stapel Papiertücher auf die Whatman-Papiere gelegt, gefolgt von einer weiteren quadratischen Glasplatte und einem etwa 500 g schweren Gewicht. Die Glasplatte wurde zusätzlich noch mit Klebestreifen auf der Laborbank befestigt, um eine Umfallen des Stapels zu vermeiden. Der Transfer der DNA-Moleküle erfolgte über Nacht bei RT. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut und die Membran nach kurzem Trocknen an der Luft zur Fixierung der DNA in einem UV-Crosslinker UV-Strahlung ausgesetzt.

#### 4.8.2.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Zur Detektion von immobilisierter DNA wurde ein 1188 Bp großes DNA-Fragment (Rep-Fragment) genommen, das mit den Restriktionsenzymen Xhol und BamHI aus dem Plasmid ATR 18 ausgeschnitten und nach der Aufreinigung mit Hilfe des Random-Primed-Labeling Kits von Roche und  $\alpha^{32}$ P-dCTP radioaktiv markiert wurde. Dazu wurden 50 ng (1 µl) DNA-Fragment und 2 µl Hexanukleotid-Gemisch in 11 µl H<sub>2</sub>O durch Erhitzen auf 100°C für 10 min denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und dann mit je 1  $\mu$ l dATP, dGTP und dTTP, sowie 5  $\mu$ l  $\alpha^{32}$ P-dCTP (50  $\mu$ Ci) gemischt und nach Zugabe von 1 µl Klenow-Enzym (8 Einheiten) 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 150 µl PBS zugefügt. Zur Reinigung der Sonde wurde ein vorgepacktes Quick-spin Säulchen verwendet. Dieses wurde für 30 sec gevortext, der Deckel etwas hochgezogen, die Spitze unten abgebrochen und das Säulchen 1 min bei 1000 xg abzentrifugiert. Dann wurde die Sonde vorsichtig auf die Säule pipettiert und diese nochmal 3 min bei 1000 xg zentrifugiert. Die gereinigte Sonde wurde nach Denaturierung durch Erhitzen für 10 min auf 95°C und Abkühlen auf Eis kurz in einem Szintillationsmessgerät auf ihre Radioaktivität überprüft und dann gemischt mit Hybridisierungslösung zu der Membran mit der immobilisierten DNA gegeben.

# 4.8.2.3 Hybridisierung und Detektion immobilisierter DNA

Zur Hybridisierung wurde die Membran mit der immobilisierten DNA mit 10 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung in einer Glasröhre für mindestens 30 min unter ständigem Drehen bei 42°C in einem Hybridisierungsofen prähybridisiert. Anschließend wurde die unter Kap. 4.8.2.2 hergestellte und denaturierte Sonde zu der Hybridisierungslösung und der Membran gegeben und über Nacht unter Drehen bei 42°C inkubiert. Danach wurde die Hybridisierungslösung mit der Sonde abgenommen und die Membran zuerst in der Glasröhre 5x 10 min bei 42°C mit Waschlösung I und dann 3x 60 min bei 68°C in einem flachen Gefäß mit Waschlösung II unter leichtem Schütteln gewaschen. Die Detektion der hybridisierten DNA-Sonde erfolgte mittels Röntgenfilm, der für ein paar Stunden bis zu mehreren Tagen auf die Membran aufgelegt und dann entwickelt wurde. Die DNA-Fragmente waren als deutliche schwarze Banden zu erkennen.

Die radioaktive Sonde wurde bei -20°C gelagert und konnte innerhalb von zwei Wochen bis zu dreimal verwendet werden.

Hybridisierungslösung

125 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 125 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 M NaCl 1 mM EDTA 7 % SDS 45 % Formamid Waschlösung I 2x SSC 0,1 % SDS Waschlösung II 0,1x SSC 0,1 % SDS

# 4.9 Herstellung und Vermehrung von rekombinanten Adenoviren

Um leere wt- und Mutanten-AAV Kapside zu produzieren war es sinnvoll, mittels homologer Rekombination (s. Kap. 4.3.5) rekombinante Adeno-Plasmide herzustellen. Durch diese Plasmide vereinfachte sich die Produktion, da so nur noch eine Infektion mit den rekombinanten Plasmiden und keine Transfektion des AAV-Plasmids mit wt Adeno-5 Überinfektion notwendig war.

### 4.9.1 Synthese der rekombinaten Adenoviren

Die Synthese von rekombinanten Adenovieren erfolgte in dieser Arbeit zuerst mittels eines Plaque-Assays. Da dieser allerdings sehr aufwendig und nur zu einem geringen Prozentsatz erfolgreich war, wurde die Synthese später nach dem Protokoll der Firma Clonetech durchgeführt.

#### 4.9.1.1 Synthese mittels Plaque-assay

Zur Synthese von rekombinanten Adenoviren wurden 6 cm-Gewebekulturschalen mit 2.5x 10<sup>5</sup> 293T-Zellen ausgesät und das rekombinante Adenoplasmid (s. Kap. 4.3) einer Restriktionsverdauung (s. Kap. 4.2.3) mit Pacl ausgesetzt. Dabei wurden 40 µg DNA eingesetzt, da der DNA-Verlust bei der späteren Aufreinigung immer sehr hoch war. Durch die Restriktion wurde die DNA linearisiert und alle für die Transfektion unwichtigen DNA-Fragmente entfernt. Am nächsten Tag wurden die restringierten, etwa 34 Kb großen, Adeno-DNA-Moleküle mittels Agarose-Gelelektrophorese und Gel-Extraktion Kit von Qiagen aufgereinigt (s. Kap. 4.2.4 und 4.3.1) und durch nochmalige Agarose-Gelelektrophorese die Konzentration des gereinigten DNA-Fragments bestimmt. Anschließend wurden die 293T-Zellen mit den gereinigten DNA-Fragmenten transfiziert (s. Kap. 4.4). Allerdings wurden statt 6 µg Plasmid-DNA nur 3 µg eingesetzt und mit 3 µg Blueskript-DNA aufgefüllt und es wurde beim Mediumwechsel 16-18 h später kein frisches DMEM zugegeben, sondern die Zellen wurden vorsichtig mit 4 ml eines 1:1 Gemisches aus 2x MEM und 2 % Seaplaque-Agarose überzogen. Dazu wurde die Agarose durch Erhitzen geschmolzen, auf etwa 40°C abgekühlt und dann schnell mit dem auf 37°C vorgewärmten 2x MEM gemischt, bevor es auf die Zellen gegeben wurde. Der Überzug trocknete 5 min unter der Sterilbank, bis die Agarose gehärtet war und anschließend wurden die Gewebekulturschalen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Überschichten der Zellen war notwendig, da es die Zellen immobiler macht und somit, wenn die Zellen rekombinante Adenoviren produzieren, diese aus Einzelkolonien vermehrt werden können. Da die Produktion der rekombinanten Viren 4-8 Tage dauerte, wurden die Zellen, um sie mit ausreichenden Mengen an Nährstoffen zu versorgen, alle 2 Tage erneut mit einem 2x MEM/2 % Agarose-Gemisch überzogen, bis die ersten sogenannten "Plaque-Bildungen" im Lichtmikroskop zu erkennen waren. Diese "Plagues", die an den Stellen entstehen, wo die synthetisierten Viren die Zellen zum Absterben bringen,

wurden nun vorsichtig mit einer Pipette in die Pipettenspitze aufgezogen und in ein mit 300 µl DMEM/2 % FKS gefülltes Eppendorf-Gefäß gegeben. Hier war es wichtig, um die Viren vermehren zu können, Medium mit 2 % FKS zu verwenden, da FKS zwar von den Zellen zum Wachstum benötigt wurde, die Vermehrung der Viren aber durch FKS verlangsamt wurde. Die Virus-Suspension wurde einer dreifachen Frier-/Tau-Lyse unterzogen, bei 17.600 xg für 10 min, 4°C abzentrifugiert und der Über-stand anschließend bei -20°C gelagert.

#### 4.9.1.2 Synthese mittels Clonetech-Protokoll

Bei diesem Versuch wurden die ersten Schritte genauso ausgeführt, wie unter Kap. 4.9.1.1 beschrieben. Allerdings wurden nur 10 µg Plasmid-DNA in einem 70 µl-Ansatz für die Restriktionsverdauung eingesetzt, da hier das Adeno-DNA-Fragment nicht über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, sondern der Gesamtansatz benutzt wurde. Die restringierte DNA wurde einer Phenol-/Chloroform-Fällung unterzogen, indem ihr 30 µl 1x TE und 100 µl Phenol-/Chloroform-Lösung zugegeben wurde. Der Ansatz wurde gut gemischt und 5 min bei 17.600 xg, 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die obere wässrige Phase in eine neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 400 µl 100 % Ethanol, 1 µl Glycogen (20 mg/ml) und 20 µl 3 M NaAc vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 30 min bei -80°C zur Fällung der DNA wurde die DNA 30 min bei 17.600 xg, 4°C abzentrifugiert, in 500 µl 70 % Ethanol resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde das entstandene Pellet für etwa 30 min über Kopf getrocknet, bevor es in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen wurde. 2 µl der DNA-Lösung wurden zur Kontrolle der Restriktionsverdauung auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen. Mit den restlichen 18 µl konnten zwei 6 cm- Schalen mit 293T-Zellen transfiziert werden (s. Kap. 4.4). Allerdings wurde vor der Transfektion das Medium von den Zellen abgenommen und durch 4 ml DMEM/2 % FKS ersetzt. Dieses Medium wurde nicht 16-18 h nach der Transfektion gewechselt, sondern es wurden nach 3-4 Tagen weitere 2 ml DMEM/2 % FKS zur Versorgung der Zellen zugegeben. Die Ansätze wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, bis sich ein CPE der Zellen zeigte, was auf die Produktion von rekombinanten Adenoviren hinweist. Daraufhin wurden alle Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Gewebekulturschale entfernt und die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt, einer dreifachen Frier-/ Tau-Lyse unterzogen, abzentrifugiert bei 555 xg für 10 min bei 4°C und der Überstand schließlich bei -20°C gelagert.

Insgesamt handelt es sich hier um ein modifiziertes Protokoll der Firma Clonetech zur Synthese von rekombinanten Adenoviren.

### 4.9.2 Vermehrung der rek. Adenoviren

Um die rekombinanten Adenoviren für eine Großproduktion an AAV-Kapsiden einsetzen zu können, mussten diese zuerst sukzessive vermehrt werden. Dazu wurde eine 24 Loch-Gewebekulturplatte mit 3x 10<sup>4</sup> 293T-Zellen pro Loch ausgesät und 24 h später, nach Entfernen des Mediums, mit entweder 100 µl des Virusüberstandes aus Kap. 4.9.1.1 (+900 µl DMEM/2 % FKS) oder 1 ml des Überstandes aus Kap. 4.9.1.2 infiziert. 48 h später, nach Erreichen eines CPE der Zellen von 50-100 %, wurde die Zellsuspension abgenommen, dreimal Frier-/Tau-lysiert, abzentrifugiert (siehe oben) und 500 µl des Überstandes mit 500 µl DMEM/2 % FKS auf eine neue, mit 293T versehene 24 Loch-Platte gegeben. Weitere 48 h später wurden die Viren auf die gleiche Art und Weise geerntet und schließlich 1 ml des Überstandes mit 3 ml DMEM/2 % FKS für die Infektion einer tags zuvor mit 3,5x 10<sup>5</sup> 293T oder 911-Zellen ausgesäten 6 cm-Kulturschale eingesetzt. Von diesem Vermehrungsschritt an konnten sowohl 293T-, als auch 911-Zellen verwendet werden. 293T-Zellen weisen eine höhere Infektionseffizienz auf, aber die Möglichkeit einer Rückmutation zur Produktion von wt statt rekombinanten AAV-Kapsiden ist in 911-Zellen geringer, weshalb meistens diese Zellen verwendet wurden. Nach einer weiteren Ernterunde nach 48 h wurde eine 2x 10<sup>6</sup> Zellen enthaltende 10 cm-Kulturschale mit 3 ml Virusüberstand und 7 ml DMEM/10 % FKS infiziert. Mit dem dabei entstandenen Virusüberstand wurde eine 15 cm-Kulturschale mit 1x 10<sup>7</sup> Zellen infiziert (6 ml Überstand + 14 ml DMEM/10 % FKS) und mit dem folgenden Überstand dann 3x 15 cm-Schalen (6 ml Überstand + 14 ml DMEM/10 % FKS). Diese Zellen wurden 48 h später bei einem CPE von nicht mehr als 50 % geerntet, indem die Zellen gelöst, in ein Falcon-Tube überführt und 10 min bei 555 xg, RT abzentrifugiert wurden und das Zellpellet in 1 ml TBS resuspendiert wurde. Nach dreimaliger Frie-/Tau-Lyse wurde die Zellsuspension wieder bei 555 xg, RT für 10 min zentrifugiert und das Lysat in einem Cryo-Röhrchen bei -20°C aufbewahrt. Dieses Lysat enthielt eine hohe Viruskonzentration, die mittels A30-Titration (s. Kap. 4.7.2) ermittelt und dann für eine Großproduktion an AAV-Kapsiden eingesetzt wurde.

# 4.10 Produktion und Präparation von AAV-Partikeln

Um AAV-Kapside für die Elektronenmikroskopie und im Besonderen für die Cryo-Elektronenmikroskopie einsetzen zu können, ist ein hoher Kapsidtiter in einem möglichst kleinen Volumen (≥1x 10<sup>12</sup> Kapside/ml) notwendig. Zu diesem Zweck wurden die rekombinanten AAV-Kapside wie folgt produziert und gereinigt:

# 4.10.1 Produktion von rek. AAV-Partikeln

10x 15 cm-Gewebekulturschalen wurden mit je 5x 10<sup>6</sup> 293T-Zellen ausgesäet, infiziert etc. (s. Kap. 4.6.1). Dabei wurde eine MOI der rekombinanten Adenoviren von 2 eingesetzt und ein Infektionsvolumen von 6 ml (Virus in DMEM/0 % FKS), das nach 1 h mit 4 ml DMEM/0 % FKS und 10 ml DMEM/20 % FKS aufgefüllt wurde. 48 h später, bei einem CPE von 50 %, wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und die Zellsuspension für 7min bei 555 xg, 5°C abzentrifugiert. Nach Resuspension der Zellpellets in 5 ml PBS wurden je 2 Pellets in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gefüllt und erneut wie oben zentrifugiert. Die daraus resultierenden Zellpellets wurden je in 1 ml PBS aufgenommen, in eine Eppendorf-Gefäß überführt und 5 min bei 1252 xg, RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets kurz gevortext und dann bei -20°C gelagert.

# 4.10.2 Präparation von rek. AAV-Partikeln

Zur Präparation der AAV-Kapside wurden die Zellpellets aus 4.10.1 aufgetaut, je mit 1 ml PBS, 2  $\mu$ l PMSF (17,4 mg/ml in Isopropanol), 3  $\mu$ l Pepstatin (3 mg/ml in Isopropanol) und 2  $\mu$ l Leupeptin (3 mg/ml) gemischt und alles zusammen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gefüllt. Nach Ultraschall-Behandlung für 3x 10 sec von innen auf Stufe 5 wurde die Suspension auf acht Eppendorf-Gefäße verteilt, nochmal von außen 15 sec mit Ultraschall Stufe 5 bearbeitet und bei 17.600 xg, 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Pellets wurden je in 1 ml frisch angesetztem Puffer D gut resuspendiert, mit RNase A und DNase I (Enkonzentration 25  $\mu$ g/ml bzw. 50  $\mu$ g/ml) gemischt und 3 h bei 12°C inkubiert. Anschließend wurden die 8 Proben auf 2x 15 ml Falcon-Röhrchen verteilt, mit 500  $\mu$ I 5 M NaCl, 50  $\mu$ I 1 M DTT und 20  $\mu$ I 0,5 M EDTA und H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt und nochmal mit Ultraschall von innen für 3x 10 sec auf Stufe 5 behandelt. Danach wurden die Proben auf acht Eppendorf-Gefäße verteilt, 30 min bei RT geschüttelt, 20 min mit 1585 xg, 4°C zentrifugiert und der Überstand dann vorsichtig auf ein Succhrose-Zuckerkissen gegeben. Dieses Zuckerkissen bestand aus 200 µl 30 % Succhrose in einem Beckmann-Röhrchen (# 347357), die mit 200 µl 50 % Succhrose unterschichtet worden waren. Die Proben wurden austariert und in einer Tischultrazentrifuge in einem TLS 55-Rotors für 2,5 h bei 145.000 xg und 4°C zentrifugiert. Die dabei entstandenen Pellets wurden je in 300 µl DNase/NaCl-Puffer resuspendiert, in acht Eppendorf-Gefäße gefüllt, 30 min bei RT geschüttelt und schließlich mit RNase A und DNase I (Endkonzentration 25 µg/ml bzw. 50 µg/ml) 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit EDTA (10 mM Endkonzentration) abgestoppt und die Proben über Nacht bei 4°C gelagert. Als nächstes wurden je zwei Proben zusammen erneut auf ein Succhrose-Zuckerkissen gegeben und unter den gleichen Bedingungen wie vorher zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in insgesamt 100 µl Lagerungspuffer gut resuspendiert und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Die Konzentration der Kapside wurde mittels A20-ELISA bestimmt (s. Kap. 4.7.3) und die Kapside anschließend in Aliquots à 11 µl aufgeteilt und für eine kurzfristige Lagerung von ein paar Wochen bei 4°C aufbewahrt. Für eine längerfristige Lagerung wurde die Aufbewahrung bei -20 °C vorgezogen. Dieses Protokoll ist modifiziert nach Steinbach (1998).

Puffer D 150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0 5 mM MgCl<sub>2</sub> DNase/NaCI-Puffer

5 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM MnCl<sub>2</sub>

0,05 M NaCl

50 mM Tris-HCl pH 7,5

#### Lagerungspuffer

0,1 M NaCl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM MgCl<sub>2</sub>

# 4.11 Elektronenmikroskopische Methoden

# 4.11.1 Negativ-Kontrastierungsverfahren

Um die unter Kap. 4.10.2 gereinigten Kapside für die Elektronenmikroskopie einsetzen zu können, musste überprüft werden, ob sie intakt, vereinzelt und in einer sauberen Präparation ohne Kontaminationen vorliegen. Dazu wurde das Negativ-Kontrastierungsverfahren angewandt, bei dem kleine Kupfernetze als Objektträger verwendet wurden, die mit einer kontinuierlichen Kohleschicht überzogen waren.

# 4.11.1.1 Herstellung der kohlebeschichteten Kupfernetzchen

Zur Herstellung der Kohleschicht wurde eine Glimmerplatte (Plano) mit einer Pinzette frisch gespalten und mit der frischen Seite nach oben in eine Bedampfungsapparatur (Bal-Tec) gelegt. Ein 8 cm langer Kohlefaden (Plano) wurde etwa 1 cm über der Glimmerplatte in dem Bedampfungsapparat befestigt und dann der Apparat bis zu 10<sup>-1</sup> mbar evakuiert. Der Kohlefaden wurde zuerst bei einer schwachen Stromstärke 3x kurz vorgeglüht, wobei die Glimmerplatte durch eine Metallscheibe vor dem Abscheiden von Kohlepartikeln abgeschirmt wurde. Anschließend wurde die Metallscheibe entfernt und die Kohle bei der höchsten Stromstärke auf den Glimmer abgeschieden. Zur Stabilisierung der Kohleschicht wurden diese Glimmer mindestens drei Tage bei RT gelagert.

Um die Kohleschicht auf die Kupfernetzchen zu übertragen, wurden die Netze (300 mesh, Plano) auf einem unter der Wasseroberfläche eines Wasserbades stehendes Drahtgestell nebeneinander mit der matten Seite nach oben angeordnet. Die kohlebeschichtete Glimmerplatte wurde mit der Kohleschicht nach oben vorsichtig in einem Winkel von 45° in das Wasserbad eingetaucht, so dass der Kohlefilm auf der Wasseroberfläche abschwimmen konnte. Danach wurde der Wasserspiegel langsam abgesenkt, bis sich die Kohleschicht auf die Netzchen legte. Anschließend wurden die Trägernetzchen auf dem Drahtgestell mindestens 24 Stunden bei RT getrocknet.

# 4.11.1.2 Negatives Kontrastieren und Fotografieren der Proben

Unmittelbar vor dem Auftrage der Probe auf die kohlebeschichteten Kupfernetze wurden diese beglimmt, damit die Kapside auf der Kohleschicht besser adsorbiert wurden. Die Glimmentladung wurde im evakuierten Beglimmungsgerät (Bal-Tec) für 60 sec bei einer Stromstärke von 30 mA durchgeführt. Die Beglimmung wirkte nur etwa 30 min, weshalb direkt 2 µl der meist 1:10 verdünnten Kapsidproben aufgetragen wurden. Nach einer Inkubation von 2 min, in der die Kapside absinken und an der Kohle binden, wurden die Proben mit Hilfe eines Whatman-Papier No.1 vorsichtig abgesaugt. Nach Waschen der Netze mit H<sub>2</sub>O und anschließend 8 µl 2 % Uranylacetat 30 sec – 1 min auf die Netze gegeben. Wichtig war, dass bei diesen Schritten die Netze niemals ganz trocken wurden. Das Uranylacetat wurde mit einem Whatman-Papier ganz abgesaugt und die Proben konnten mit einem Zeiss EM 10-Elektronenmikroskop bei 80 KV betrachtet werden. Norma-

lerweise wurde bei dem Mikroskop eine Vergrößerung von 20.000 oder 40.000fach gewählt, bei der die Kapside gut zu erkennen waren. Uranylacetat ist ein Schwermetalsalz, das sich an die Proteine anlagert und sie somit im Elektronenmikroskop sichtbar macht. Deshalb wird diese Methode auch als Negativ-Kontrastierungsverfahren bezeichnet, da eigentlich nicht das Protein, sondern das Uranylacetat zu sehen ist.

Zum Fotografieren der Proben wurden Filmplatten (Kodak) verwendet. Diese wurden in einem Drahtgestell nach dem Belichten 4 min in Entwicklerlösung, 5 min in H<sub>2</sub>O, 10 min in Fixiererlösung und 20 min in H<sub>2</sub>O inkubiert, bevor sie über Nacht in einem Trockenschrank gelagert wurden. Abzüge der Filmplatten wurden von Frau Ackermann im Fotolabor gemacht.

# 4.11.2 Auszählen von AAV-Partikeln

Zusätzlich zur Konzentrationsbestimmung der AAV-Kapside mittels A20-"capture" ELISA (s. Kap. 4.7.3) kann die Konzentration auch durch Auszählen der mittels Negativ-Kontrastierungsverfahren sichtbar gemachten Kapside bestimmt werden. Dazu werden die Kapside auf vier willkürlich aufgenommenen Fotos ausgezählt und ein Mittelwert gebildet. Ein Foto entspricht dabei einer Filmplatte. Aus diesem Mittelwert wurde unter der Annahme, dass bei einer Vergrößerung von 20.000fach 4640 ausgezählte Kapside einer Konzentration von 8x 10<sup>12</sup> Kapsiden/ml entsprechen, die Konzentration der Kapsidprobe berechnet.

# 4.11.3 Elektronenkryomikroskopie

#### 4.11.3.1 Herstellung der Netzchen

Um die AAV-Kapside mittels Elektronenkryomikroskopie zu untersuchen, wurden Netzchen mit Lochfilm nach dem Verfahren von Bradley (1965) hergestellt.

Für die Lochfolie wurden 0,125 g Formvar in 25 ml Chloroform in einem verschließbaren Glasgefäß vollständig gelöst. Danach wurden mit einer langen Pasteurpipette 10 Tropfen einer 50 % Glycerin-Lösung zugegeben und kräftig geschüttelt. Das Glycerin diente später als "Platzhalter" für die Löcher, da sich an den Stellen, an denen sich das Glycerin befand, ein dünnerer Plastikfilm bildete, der mit Methanol wieder herausgelöst werden konnte. Die milchige Lösung wurde in ein Becherglas umgefüllt und auf Eis in einem Ultraschallgerät (13 mm Spitze) auf Stufe 5 6-10 Mal für 30 sec mit 60 sec Pause behandelt. Anschließend wurden Glasobjektträger in die beschallte Lösung getaucht und schnell, aber gleichmäßig aus der Lösung herausgezogen. Dabei war es wichtig, die Lösung nach etwa zwei Minuten erneut zu beschallen, damit die Anzahl und vor allem die Größe der Löcher im Plastikfilm konstant blieben. Als Nächstes wurden die Objektträger zum Trocknen schräg an einen Reagenzglasständer gelehnt. Die Objektträger konnten so mehrere Monate gelagert werden. Zum Beschichten der Kupfernetzchen mit der Plastikfolie wurden zuerst alle Kanten der Plastikfolie auf dem Objektträger mit Hilfe eines leeren Objektträgers angeritzt. Anschließend wurde der Objektträger mit der Markierung nach oben möglichst flach

Anschließend wurde der Objektrager mit der Marklerung nach oben möglichst nach in ein Becherglas mit Wasser eingetaucht, damit die Plastikfolie auf der Wasseroberfläche abschwamm. Die Netzchen, die eine Kupfer- und eine Rhodiumseite besitzen (Plano), wurden vorsichtig mit einer Pinzette mit der Rhodium-beschichteten Seite nach unten auf die Plastikfolie gelegt, bevor die Plastikfolie zusammen mit den Kupfernetzen mit einem Filterpapier von der Wasseroberfläche aufgefischt und über Nacht bei Raumtemperatur in einer Petrischale getrocknet wurde.

Um den Plastikfilm an den dünneren Stellen aufzulösen, wurde das Filterpapier mit den Kupfernetzen für 30 Minuten in eine Petrischale mit Methanol getaucht und anschließend zum Trocknen über Nacht in einer offenen Petrischale im Abzug stehen gelassen. Nach dem Trocknen konnten die Trägernetzchen unter dem Lichtmikroskop auf Größe und Anzahl der Löcher kontrolliert werden. Normalerweise war nach diesem Verfahren das gesamte Trägernetzchen dicht mit Löchern unterschiedlicher Größen überzogen. Auf die gleiche Weise wie beim Negativ-Kontrastierungsverfahren wurde nun eine dünne Kohleschicht auf die Trägernetzchen direkt aufgedampft (s. Kap. 4.11.1.1). Allerdings wurde hier zum Bedampfen ein anderes Gerät (Edward 306) und auch ein anderer Kohlefaden (Goodfellow) verwendet. Außerdem wurden vier Kohlefäden statt einem zum Bedampfen verwendet, die etwa 15 cm über den Netzchen eingespannt wurden. Danach wurde auch der restliche, dickere Plastikfilm entfernt, indem das Kupfernetzchen für 2-3 sec in Chloroform getaucht wurde. Da die AAV-Kapside sehr gut auf dem Kohlefilm absorbieren, und sich nicht, wie zum Mikroskopieren notwendig, in den durch den Plastikfilm entstandenen Löchern verteilen, wurden die Netzchen anschließend mit einem sehr dünnen zusätzlichen kontinuierlichen Kohlefilm versehen. Dabei wurde ein frisch gespaltener Glimmer, mit dem gleichen Gerät wie die Kupfernetzchen, bedampft. Um die Kohle-

Methoden

schicht äußerst dünn zu halten, damit beim Mikroskopieren so wenig Hintergrund wie möglich vorhanden ist, wurden hier nur 2/3 der Dicke eines Kohlefadens bedampft. Der Kohlefilm wurde vorsichtig auf eine Wasseroberfläche abschwimmen gelassen (s. Kap. 4.11.1.1), das Trägernetzchen mit einer Pinzette leicht am Rand gefasst und mit der Kupferseite nach oben unterhalb des Kohlefilms in das Wasser eingetaucht. Indem das Trägernetzchen langsam und gleichmäßig durch den Kohlefilm hoch gezogen wurde, blieb eine Kohleschicht auf dem Netz hängen. Danach wurde das Netzchen vorsichtig zum Trocknen auf ein Stück Filterpapier abgelegt.

#### 4.11.3.2 Frieren der Proben

Die in dieser Arbeit verwendete spezielle Einfrierapparatur war mit einer Feuchtigkeitskammer ausgestattet (Bellare et al., 1988), in der zwei nasse Schwämme für eine gleichbleibend hohe Luftfeuchtigkeit sorgten (Abb.4-1A). Dies hatte den Vorteil, dass der nach Absaugen der Kapsidlösung durch ein Filterpapier zurückbleibende dünne Feuchtigkeitsfilm nicht verdunstete. Dadurch ließen sich gut definierte und reproduzierbare Proben erzeugen.

Zuerst wurden zwei mit einem Durchmesser von etwa 4 cm zugeschnittene Scheiben Whatman No.1-Filterpapiere über eine Schraube an einem Metallstab befestigt. Danach wurden die beiden Schwämme mit heißem Leitungswasser durchnässt und in die vorgesehenen Bechergläser der Kammer eingesetzt. Die Tür der Kammer wurde geschlossen und die Einfrierkiste unterhalb der Feuchtigkeitskammer bis zur Höhe des Ethanbehälters mit flüssigem Stickstoff gefüllt. Anschließend wurde die Heizung des Ethanbehälters eingeschaltet und Ethan über eine Gasflasche kondensiert. Als Nächstes die Kupfernetze, wie bei wurden ebenso dem Negativ-Kontrastierungsverfahren (s. Kap. 4.11.1.2), beglimmt (Luft), allerdings mit einem anderen Gerät (EMBL), bei dem es keine Vakuum- und keine Stromspannungsanzeige gab. Aus diesem Grunde wurden die Proben einfach 1 min nach Anschalten der Vakuumpumpe für 30 sec beglimmt. Danach wurden die Trägernetzchen mit einer Pinzette vorsichtig am Rand eingeklemmt, vertikal in die Einfrierapparatur eingespannt, auf der Rhodiumseite mit 2 µl Kapsidsuspension (s. Kap. 4.10.2) versehen und in die Feuchtigkeitskammer hochgezogen. Mit einem von außen beweglichen Metallstab, an dem die Filterpapierscheiben befestigt waren, wurden diese 15 sec

lang gegen das Netzchen mit der Viruslösung gedrückt und die Lösung so bis auf einen dünnen Film abgesaugt (Abb.4-1B).



Abb.4-1: Einfrierapparatur mit Feuchtigkeitskammer und geheiztem Ethanbehälter
A) Frontalansicht der Einfrierapparatur.
B) Nahaufnahme des Inneren der Feuchtigkeitskammer, in der mit Hilfe eines Filterpapieres die überschüssige Flüssigkeit vom Trägernetzchen abgezogen wird.

Dann wurden die Filterpapiere schnell entfernt und gleichzeitig die Pinzette mit dem Netz durch Auslösen des Pinzettenhalters über eine Federbeschleunigung der Einfrierapparatur in flüssiges Ethan geschossen. Ethan wurde als Einfriermittel genutzt, weil es im Gegensatz zu flüssigem Stickstoff eine höhere Abkühlrate besitzt und somit das das Netz umgebende Wasser beim Einfrierprozess nicht kristallisiert, sondern glasartig erstarrt (vitrifiziert). Das Netz mit der gefrorenen Probe wurde vom flüssigen Ethan in eine Netzbox zur Aufbewahrung im flüssigen Stickstoff transferiert und so in einem Flüssigstickstoff-Tank gelagert.

# 4.11.3.3 Mikroskopieren und Fotografieren der Proben

Die zum Mikroskopieren vorbereiteten Proben wurden am Philips CM-120 Biotwin-ice (EMBL) mit einer LaB<sub>6</sub>-Kathode und einer Beschleunigungsspannung von 100 kV untersucht. Wichtig bei der Elektronenkryomikroskopie ist, dass die Probe unter Stickstoff in einen speziellen Probenhalter transferiert wird, der die Probe während

der gesamten elektronenmikroskopischen Untersuchung über einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälter kühlt.

Als Probenhalter wurde ein Gatan-626-Kryohalter verwendet. Dieser ist so konstruiert, dass die Probe am Ende des Halters durch einen Klemmring in der Probenkammer fixiert wird. Über einen Metallstab, der am anderen Ende mit dem Stickstoffbehälter verbunden und durch einen Metallmantel isoliert ist, wird die Probenkammer gekühlt (Abb.4-2).



Deckel

Abb.4-2: Gatan-626-Kryoprobenhalter

# Transfer der Probe aus der Netzbox in den Probenhalter

Um die Probe in das Mikroskop zu schleusen, wurde als erstes der Probenhalter mit dem Ende, in das die Probe geklemmt wird, in eine ebenfalls kühlbare Transferstation gesteckt (Abb.4-2) und der Stickstoffbehälter des Probenhalters mit flüssigem Stickstoff gefüllt. Nach dem ersten starken Aufkochen des Stickstoffes, wurde auch die Transferstation mit flüssigem Stickstoff versehen. Abwechselnd wurde nach Bedarf die Stickstoffhöhe in der Transferstation und dem Probenhalter nachreguliert. Über einen Thermofühler wurde die Temperatur der Probenkammer kontrolliert bis eine Arbeitstemperatur von –185°C erreicht wurde. Währenddessen konnte die Netzbox mit den Proben in einer separaten Styroporschachtel unter flüssigem Stickstoff geöffnet werden. Nach Erreichen der Arbeitstemperatur wurde die Netzbox mit einer vorgekühlten Pinzette in die Transferstation gebracht und diese mit dem vorgesehenen Deckel geschlossen. Durch eine im verschlossenen Deckel der Transferstation angelegte Öffnung wurde der Klemmring an einem speziellen Werkzeug im flüssigen Stickstoff gekühlt. War das Stickstoffniveau unter die Höhe des Probenhalters abgesunken, wurde ein Trägernetzchen mit einer vorgekühlten Pinzette aus der Netzbox entnommen und in die vorgesehene Aussparung im Probenhalter gelegt. Die Probe wurde mit dem Klemmring im Probenhalter festgeklemmt. Dann wurde die Probe mit einem Schieber am Probenhalter abgedeckt und die Transferstation wieder mit flüssigem Stickstoff aufgefüllt.

#### Schleusen des Probenhalters in das Mikroskop

Das Goniometer des Mikroskops wurde über die Computersteuerung auf 60° gegen den Uhrzeigersinn gekippt und der Schleusenraum vorgepumpt. Der Halter wurde möglichst rasch von der Transferstation in die Vakuumschleuse überführt. Wenn die Pumpkontrollleuchte erlosch, wurde das Goniometer wieder auf die 0° Position zurückgesetzt, der Probenhalter gegen den Uhrzeigersinn gedreht und vollständig in das Mikroskop eingeführt. Der Stickstoffbehälter des Probenhalters wurde wieder mit flüssigem Stickstoff aufgefüllt. Dabei war es wichtig, dass der Stickstoff nicht mehr siedete und sich das Stickstoffniveau unterhalb des Metallstabes befand.

#### Mikroskopieren

Zu Beginn des Mikroskopierens wurde der Schieber des Probenhalters geöffnet und das Mikroskop justiert (Astigmatismus, Beleuchtungsbedingungen, Blenden, Fokus, goniometrische Höhe, Strahlkippung, Vergrößerungen usw.).

Anschließend wurden bei einer Vergrößerung von 1.000x mit Hilfe der Niedrig-Dosis-Einrichtung im *Search-Modus* geeignete Stellen auf dem Trägernetzchen gesucht. War eine geeignete Stelle gefunden, wurde auf eine Vergrößerung von 180.000x im *Focus-Modus* umgeschaltet. Um die Elektronen-Dosis auf der zu fotografierenden Stelle so gering wie möglich zu halten, wurde im *Focus-Modus* der Elektronenstrahl wahlweise auf zwei benachbarte Stellen umgelenkt. Diese schließen mit der zu fotografierenden Stelle einen Winkel von 180° ein und sind jeweils 4 µm von der Bildmitte entfernt. Auf einer der beiden Positionen wurde anhand der Kohlekörnung fokussiert und dann zwischen 1,44 µm und 3,46 µm unterfokussiert. Die Aufnahme wurde mit einer Belichtungszeit von 1,5 sec bei einer manuell eingestellten Belichtungszeit zwischen 3,26 sec und 4,78 sec gemacht. Die Niedrig-Dosis-Einrichtung schaltete dabei automatisch an die ausgewählte Stelle im *Exposure-Modus*, wobei die elektronenmikroskopische Aufnahme bei einer eingestellten Vergrößerung von nominell 52.000x ausgelöst wurde. Die Aufnahmen wurden auf Filmplatten gemacht, die anschließend in einem Plastikgestell 10 min in Entwicklerlösung, 5 min in H<sub>2</sub>O, 10 min in Fixiererlösung und 20 min in H<sub>2</sub>O gewässert wurden, bevor sie über Nacht in einem Trockenschrank gelagert wurden.

#### Aufwärmen des Probenhalters

Am Ende des Mikroskopierverfahrens wurde zuerst der Schieber geschlossen. Anschließend wurde der Probenhalter bis zum ersten Widerstandspunkt aus dem Mikroskop heraus gezogen, um 120° im Uhrzeigersinn gedreht und dann vollständig entnommen. Der Halter wurde in die Transferstation eingesetzt und mit trockenem Stickstoffgas gewärmt. Nach dem Aufwärmen wurde der Stickstoffbehälter des Probenhalters bis zum nächsten Gebrauch mit Hilfe eines Pumpsystems evakuiert.

# 4.11.4 Auswahl und Digitalisierung der Kapsid-Aufnahmen

Nach dem Trocknen der Fotos wurden sie grob visuell auf ihre Qualität für die dreidimensionale Bildrekonstruktion untersucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kapside auf den Negativen gut zu erkennen waren, der Kohlefilm nicht allzu viel Hintergrund machte, keine Strahlenschäden oder Driftverschiebungen zu erkennen und keine sonstigen Kontaminationen aufgetreten waren. Anschließend wurden die ausgewählten Bilder mit dem Zeiss SCAI Scanner mit dem Programm PHODIS (Zeiss) mit einer Pixelgröße von 21 µm digitalisiert. Auf der Objektebene entsprach dies bei einer Vergrößerung von 52.000x einer Pixelgröße von 0,4 nm. Die Bilder wurden zur weiteren Verarbeitung im TIF-Format (Option scanlined) abgespeichert.

# 4.11.5 Bildverarbeitung und dreidimensionale Bildrekonstruktion

Die an die Digitalisierung der Kapsid-Aufnahmen angeschlossene Überprüfung der Aufnahmen in Hinsicht auf ihre Qualität für die weitere Verarbeitung, die Bildverarbeitung und die gesamte dreidimensionale Bildrekonstruktion wurde von Frau PD Bettina Böttcher am EMBL in Heidelberg durchgeführt.

Um die Auflösung der Rekonstruktion zu ermitteln, wird der aus den ausgewählten AAV-2 Kapsiden gewonnene Datensatz halbiert und von jedem Teildatensatz eine dreidimensionale Bildrekonstruktion ermittelt. Danach wird jeweilige FourierTransformation ( $F_1$  und  $F_2$ ) der Bildrekonstruktionen berechnet. Diese werden dann mit Hilfe einer Fourier-Schalen-Korrelation (FSK) (Gleichung 4-1) verglichen (Harauz und van Heel, 1986).

$$FSK(k,\Delta k) = \frac{\sum_{(k,\Delta k)} F_1(k) F_2^{*}(k)}{\left[\sum_{(k,\Delta k)} |F_1(k)|^2 \sum_{(k,\Delta k)} |F_2(k)|^2\right]^{\frac{1}{2}}}$$

**Gleichung 4-1: Fourier-Schalen-Korrelation** 

(k, Δk)	= Fourierhülle
F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub>	= Fourier-Transformationen
*	= konjugiert komplex
k	= Fourier-Raumfrequenz

Anschließend wird die FSK gegen die Fourier-Raumfrequenzen aufgetragen. Die Auflösung der Rekonstruktion kann dann auf zwei Arten abgelesen werden. Zum einen kann die Raumfrequenz als Auflösungswert genommen werden, bei der die FSK einen Wert von 50% unterschreitet (Böttcher et al., 1997). Zum anderen besteht die Möglichkeit, diejenige Raumfrequenz als Auflösung anzugeben, bei der die FSK die  $3\sigma$ -Kurve schneidet. Bei der  $3\sigma$ -Kurve handelt es sich um eine Korrelation des dreifachen Wertes von reinem Rauschen (Gleichung 4-2).

$$3\sigma = \frac{3}{\sqrt{N}}$$

Gleichung 4-2: 3σ-Kurve

N = Anzahl der dreidimensionalen Pixel in einer gegebenen Fourier-Schale

Da keine einheitlichen Kriterien für die Festsetzung der Auflösung existieren (Grigorieff, 2000), werden immer beide Werte im Diagramm dargestellt. Die in dieser Arbeit angegebenen Auflösungen beziehen sich jedoch auf den 50%-Wert.

# 5 Ergebnisse

# 5.1 Strukturelle Analysen von AAV-2 Kapsiden

Die Kenntnis der strukturellen Eigenschaften von Kapsiden des Adeno-assoziierten Virus Typ 2 ist eine wichtige Voraussetzung für ein besseres Verständnis der AAV-2 Infektion, der Freisetzung des Genoms während der Infektion und der Genomverpackung nach der Neubildung der AAV-Kapside.

Aus diesem Grund ging es im ersten Teil dieser Arbeit um Untersuchungen von AAV-2 Kapsiden auf struktureller Ebene. Dazu wurden als erstes leere AAV-2 Partikel eingesetzt, die in großen Mengen produziert werden konnten und leicht aufzureinigen waren.

# 5.1.1 Analyse von leeren AAV-2 Kapsiden

# 5.1.1.1 Genomaufbau des rekombinanten Adenovirus Ad-VP für die Produktion von leeren AAV Kapsiden

Als Ausgangsbasis für die Untersuchungen der AAV-2 Kapsidstruktur lag ein rekombinantes Adenovirus vor, das das AAV-2 *cap*-Gen enthielt. Das AAV-2 cap-Gen wird unter der Kontrolle des humanen Cytomegalivirus (CMV)-Promotors exprimiert. Die CMV-AAV-2 *cap*-Genkassette ist in der deletierten E1-Region des adenoviralen Vektors lokalisiert. Mit Hilfe dieses rekombinanten Adenoviruses, das im Folgenden als Ad-VP bezeichnet wird, war es möglich, leere AAV Kapside zu produzieren. Das Virus wurde unserem Labor von Richard Samulski (Chapel Hill, USA) zur Verfügung gestellt.

Da von dem rekombinanten Ad-VP Virus keine genaue Genkarte vorhanden war, wurde die Virus-DNA extrahiert, um sie sequenzieren zu lassen (s. Kap. 4.8.1.1). Aufgrund sehr geringer DNA-Ausbeuten bei der Extraktion konnten nur die ersten 950 Basenpaare des 2121 Basenpaar großen AAV-2 *cap*-Gens, sowie der 5`-gelegene Übergang zum CMV-Promotor, mit den Primern Ad-VPA und VP2B (s. Kap. 3.3) sequenziert werden (s. Kap. 4.2.5 und Kap. 8.1). Somit wurde sichergestellt, dass keine zusätzlich eingeführten oder spontan aufgetretenen Mutationen in den N-terminalen Bereichen der drei AAV-2 VP-Proteine vorhanden waren. In Abb. 5-1 ist die Zusammensetzung des Ad-VP Genoms dargestellt.



Abb. 5-1: Schematische Darstellung des Ad-VP Genoms

Das Genom der rekombinanten Ad-VP Viren, mit deren Hilfe leere wt AAV-2 Kapside produziert werden können, besteht aus adenoviralen Sequenzen des Adenovirus Typ 5, einschließlich der terminalen Wiederholungssequenzen (ITR), dem CMV-Promotor, sowie der 2121 Basenpaare umfassenden *cap*-Genkassette von Adeno-assoziierten Viren Typ 2.

# 5.1.1.2 Produktion und Präparation von leeren AAV-2 Kapsiden

Zur Produktion von leeren AAV Kapsiden wurden 293T-Zellen mit den rekombinanten Ad-VP Viren mit einer MOI = 2, wie unter Kapitel 4.10.1 beschrieben, infiziert. Die Aufreinigung der Kapside erfolgte gemäß Kapitel 4.10.2. Die mit Hilfe eines A20-ELISAs (s. Kap. 4.7.3) bestimmte Konzentration der Kapsidpräparation betrug 2x  $10^{13}$  Kapside/ml.



#### Abb. 5-2: Überprüfung der Expression und der Reinheit der mit Hilfe des rekombinanten Adenovirus Ad-VP produzierten AAV-2 VP- Proteine

A) Western-Blot Analyse der VP-Protein-Zusammensetzung in leeren wt AAV-2 Kapsiden. Die zwei Nebenproteine VP1 und VP2 und das Hauptprotein VP3 von Adeno-assoziierten Viren Typ 2 werden in nicht DNA-enthaltenden Kapsiden im Verhältnis von ungefähr 1:1:8 exprimiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Western-Blot Analyse und Immundetektion mit dem Hybridomüberstand des Antikörpers B1, der alle drei VP-Proteine erkennt.

**B)** Coomassie-Färbung der VP-Proteine von leeren wt AAV-2 Kapsiden. Die in einem Proteingel aufgetrennten AAV-2 Kapsidproben wurden mit Hilfe einer 1 %igen Coomassie Brilliant Blue-Farblösung sichtbar gemacht, um die Expression der VP-Proteine und die Reinheit der Kapsidpräparation zu überprüfen.

Ergebnisse

Zur Überprüfung der VP-Protein-Zusammensetzung in den Kapsiden und der Reinheit der Kapsidpräparationen wurden eine Western-Blot Analyse mit B1-Hybridomüberstand als erstem Antikörper, sowie eine Coomassie-Färbung der Proteine durchgeführt (Abb. 5-2). Der Antikörper B1 besitzt sein Epitop im C-terminalen Bereich aller drei VP-Proteine. Die Expression von VP1, VP2 und VP3 im Western-Blot zeigt ein Verhältnis von etwa 1:1:8 (Salo und Mayor, 1977). Bei der Coomassie-Färbung sind ebenfalls alle drei VP-Proteine zu erkennen. Bei der oberhalb von VP1 auftretenden Bande handelt es sich um eine immer wieder in AAV-2 Kapsidpräparationen auftretende Proteinbande. Bisherige Untersuchungen dieser Bande haben ergeben, dass es sich nicht um ein AAV-2 VP-Protein handelt, die genaue Funktion ist jedoch noch unklar.

# 5.1.1.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von leeren AAV Kapsiden

# Negatives Kontrastierungsverfahren

Die Reinheit der Kapsid-Probe wurde zusätzlich mit Hilfe des Negativ-Kontrastierungsverfahrens (s. Kap. 4.11.1) überprüft. Dazu wurde 1 µl der Suspension 1:10 mit Lagerungspuffer verdünnt und 5 µl der Verdünnung auf ein Kupfernetz aufgetragen. Nach Anfärbung der Kapside mit 2 %iger Uranylacetat-Lösung wurde die Probe im Elektronenmikroskop betrachtet und fotografiert. Abb. 5-3A zeigt einen Bildausschnitt der in dieser Arbeit verwendeten Probe leerer AAV-Kapside. Die Kapside liegen vereinzelt vor. Der schwarze Punkt in der Mitte der Kapside ist ein deutliches Indiz dafür, dass es sich um leere Kapside handelt. Hier konnte das Uranylacetat in den Innenraum der Kapside eindringen und macht ihn somit im Elektronenmikroskop sichtbar.



Abb. 5-3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von leeren AAV-2 Kapsiden A) Negatives Kontrastierungsverfahren: Leere AAV-2 Kapside wurden mittels 2 %iger Uranylacetat-Lösung sichtbar gemacht.

B) Elektronenkryomikroskopie: Leere AAV-2 Kapside im gefrorenen, ungefärbten Zustand.

#### Elektronenkryomikroskopie

Genauere Aussagen über die Struktur der Kapside lassen sich mit Hilfe der Elektronenkryomikroskopie und Bildverarbeitung machen. Bei diesem Verfahren werden die Kapside schockgefroren, elektronenmikroskopisch abgebildet und anschließend die dreidimensionale Bildinformation rekonstruiert (s. Kap. 4.11.3). Abb. 5-3B zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Kapsiden im gefrorenen ungefärbten Zustand. Von diesen homogen verteilten, als dunkle Ringe sichtbaren Partikeln, wurden 1800 einzeln ausgewählt und für die Berechnung der dreidimensionalen (3D)-Rekonstruktion eingesetzt. Die resultierende 3D-Rekonstruktion ist in Abb. 5-5 zu sehen. Ihre Auflösung liegt bei 10,5 Å, da bei dieser Raumfrequenz die Fourier-Schalen-Korrelation die 50%-Marke unterschreitet (Abb. 5-4)(s. Kap.4.11.5).



**Abb. 5-4: Bestimmung der Auflösung der 3D-Rekonstruktion von leeren AAV-2 Kapsiden** Um die Auflösung der dreidimensionalen Rekonstruktion leerer AAV-2 Kapside zu bestimmen, wird die Fourier-Schalen-Korrelation (FSK) gegen die Raumfrequenzen aufgetragen. Die Raumfrequenz, bei der die FSK-Kurve (rote Linie) den 50 %-Wert unterschreitet, wird als Auflösung angesehen. Die grau-gepunktetet Linie kennzeichnet die 3σ-Kurve, die die Signifikanz des Fourier-Schalen-Korrelationskoeffizienten über dem dreifachen Wert von einfachem Rauschen angibt.

Bei Betrachtung der äußeren Hülle in Abbildung A sind 5-fache, 3-fache und 2-fache Symmetrieachsen zu erkennen (durch schwarze Zahlen beispielhaft markiert). Betrachtet man die Oberfläche des Kapsids fallen die markanten Spitzen auf (rot eingefärbt), die an den 3-fachen Symmetrieachsen aus dem Kapsid herausstehen und ein Loch umschließen (Abb. 5-5A+C).



Abb. 5-5: Oberflächenpräsentation der dreidimensionalen Rekonstruktion von AAV- 2 Kapsiden A, C und E zeigen Ansichten der äußeren Kapsidoberfläche, B, D und F der inneren. Die Rekonstruktion wurde so eingefärbt, dass Strukturen, die weiter außen liegen, gelb bis rot sind, und weiter innen liegende Strukturen eine blaue Farbe haben. In A und B ist die Ansicht auf eine 2-fache Symmetrieachse, in C und D auf eine 3-fache Symmetrieachse dargestellt. E und F zeigen den Blick auf eine 5-fache Symmetrieachse. Der schwarze Pfeil in D deutet auf einen der drei Vorsprünge, die in das Loch an der 3-fachen Symmetrieachse hineinragen und in E ist der Wall, der den Kanal an der 5-fachen Symmetrieachsen mit einem Kreis und je eine der Symmetrieachsen mit schwarzen Zahlen gekennzeichnet. Der Kreis in B umrahmt eine der globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen im Kapsidinneren.

Die Spitzen befinden sich ca. 2 nm über der Kapsidhülle und sind in einem sphärischen Querschnitt des Kapsids als einzige Proteindichte bei einem äußeren Radius von 13,2 nm zu erkennen (Abb. 5-6I, schwarzer Pfeil). Weiter innen sind die Spitzen mit drei kleinen Vorsprüngen verbunden, die in die Löcher an den 3-fachen Symmetrieachsen hineinragen (Abb. 5-5D und 5-6G, jeweils durch schwarze Pfeile gekennzeichnet).

An den 5-fachen Symmetrieachsen sind ebenfalls Löcher zu erkennen, die von kleinen Wällen umgeben werden, die 1,2 nm aus der umgebenden flachen Proteinoberfläche herausragen (Abb. 5-5E, schwarzer Pfeil). Diese Wälle umgeben leere Kanäle, die das Innere des Kapsids mit dem Äußeren verbinden, wie in dem Äquatorialschnitt durch das Kapsid in Abb. 5-6B (schwarzer Pfeil) zu erkennen ist. Der Durchmesser der Kanäle ist an der äußeren Oberfläche mit 0,8 nm am geringsten und verbreitert sich zur inneren Oberfläche hin auf 1,6 nm.



Abb. 5-6 Verschiedene Schnitte durch die 3D-Rekonstruktion von leeren AAV-2 Kapsiden A)-C) Orthogonale Schnitte durch die 3D-Rekonstruktion, die im Abstand von 0,44 nm gemacht wurden. B stellt einen Äquatorialschnitt dar, bei dem in weiß die Symmetrieachsen eines Quadranten der Rekonstruktion eingezeichnet sind. Bei D-I handelt es sich um sphärische Schnitte, die im Abstand von 1,32 nm gemacht wurden, beginnend bei einem inneren Radius von 6,6 nm. Die globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen sind in A mit weißen Pfeilköpfen markiert. Der schwarze Pfeil in B kennzeichnet einen leeren Kanal an den 5-fachen Symmetrieachsen und in E eine der Verdickungen, die entlang der 2-fachen Symmetrieachsen in das Kapsid hineinragen. Der Pfeil und der Kreis in G weisen auf Vorsprünge hin, die den Kanal an den 3-fachen Symmetrieachsen verschließen und in I ist eine der Spitzen, die an der 3-fachen Symmetrieachse aus der Kapsidhülle herausragen, markiert.

An den 2-fachen Symmetrieachsen liegen auf der äußeren Oberfläche kleine benachbarte Erhebungen (Abb. 5-5A, schwarzer Kreis) vor, während auf der inneren Oberfläche nach innen hineinragende glatte Verdickungen zu erkennen sind. Diese Verdickungen befinden sich genau zwischen den benachbarten Erhebungen entlang den 2-fachen Symmetrieachsen bei einem Radius von 7,9 nm (Abb. 5-6E, schwarzer Pfeil). Exakt an den 2-fachen Symmetrieachsen sind auf der Innenseite des Kapsids in Abb. 5-5B, D und F dunkelblau eingefärbte globuläre Strukturen zu sehen (s. schwarzer Kreis in Abb. 5-5B), die sich an den Verdickungen befinden und am weitesten in das Kapsidinnere hineinreichen (Abb. 5-6D, weiße Strukturen). Diese globulären Strukturen sind auch in Abb. 5-5A-C in den Querschnitten durch das Kapsid zu erkennen (weiße Pfeilköpfe in A), aber im Vergleich zu den anderen Proteindichten sind diese schwächer und weniger scharf abgegrenzt.

# 5.1.2 Analyse von vollen wt AAV Kapsiden

Um sicherzustellen, dass die bei leeren AAV-Kapsiden gefundenen strukturellen Details auch nach der Verpackung des Genoms in die Kapside noch vorhanden sind, wurden DNA-enthaltende wt AAV-2 Kapside ebenfalls untersucht.

#### 5.1.2.1 Produktion und Präparation von vollen wt AAV-2 Kapsiden

Zur Produktion von DNA-haltigen wt AAV Kapsiden wurden HeLa-Zellen, wie unter Kap. 4.6.2 beschrieben, mit AAV-2 und Ad-5 koinfiziert und geerntet. Die aufgereinigten wurden bei einer kurzzeitigen Lagerung für einige Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Eine längerfristige Lagerung erfolgte bei -20 °C. Die Konzentration der Kapside wurde durch einen A20-ELISA ermittelt (s. Kap. 4.7.3) und betrug 9x 10<sup>13</sup> Partikel/ml. Die Expression der VP-Proteine wurde überprüft und mit der von leeren Kapsiden verglichen, indem 1 µl der Kapsidsuspension 1:10 mit Lagerungspuffer verdünnt wurde und 1 µl davon für eine Western-Blot Analyse (s. Kap. 4.5.4) eingesetzt wurde (s. Kap. 4.5.3). Die immundetektierten Proteine (s. Kap. 4.7.1) sind in Abb. 5-7A zu erkennen. Wie bei den leeren Kapsiden liegen die VP-Proteine ungefähr im Verhältnis 1:1:8 vor. Zusätzlich dazu wurde die Reinheit der Kapsidpräparation mit Hilfe einer Coomassie Brilliant Blue-Färbung überprüft (Abb. 5-7B). Die Coomassie-Färbung zeigt bei den vollen Kapsiden ebenfalls die unbekannte Proteinbande oberhalb von VP1. VP1 und VP3 sind deutlich zu erkennen, während die VP2-Bande im Original nur schwach zu erkennen war und hier durch das Scannverfahren fast nicht mehr sichtbar ist.



# Abb. 5-7: Western-Blot Analyse und Coomassie Brilliant Blue-Färbung der DNA-haltigen wt AAV-2 Kapside

A) Die Expression der Kapsidproteine von DNA-haltigen AAV-2 Partikeln wurde mit Hilfe einer Western-Blot Analyse überprüft. Das Verhältnis von VP1:VP2:VP3 beträgt etwa 1:1:8. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des B1-Antikörpers, dessen Epitop im C-terminalen Bereich aller drei VP-Proteine liegt.

**B)** Die Reinheit der DNA-haltigen wt AAV-2 Kapsidpräparation wurde mit Hilfe einer Coomassie-Färbung der VP-Proteine überprüft. Dabei wurden die in einem Proteingel aufgetrennten AAV-2 Kapsidproben mit einer 1 %igen Coomassie Brilliant Blue-Farblösung sichtbar gemacht.

# 5.1.2.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von DNA-haltigen AAV Kapsiden

# Negativ-Kontrastierung der vollen Kapside

Mit Hilfe des Negativ-Kontrastierungsverfahrens (s. Kap. 4.11.1) wurde zusätzlich die Reinheit der Kapsidprobe überprüft. 1 µl der Probe wurde 1:10 in Lagerungspuffer verdünnt und 5 µl davon negativ kontrastiert abgebildet (Abb. 5-8A). Die Kapside liegen vereinzelt und in intaktem Zustand vor. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Aufreinigungstechnik der AAV-Kapside lassen sich volle, also DNA-haltige, und leere Kapside nicht voneinander trennen, so dass immer ein gewisser Anteil (30-50 %) an leeren Kapsiden in den Präparationen vorhanden ist. Die leeren Kapside sind bei der negativen Kontrastierung von den vollen dadurch zu unterscheiden, dass das Uranylacetat in sie eindringen kann und somit als dunkler Punkt in den Kapsiden sichtbar ist. Zusätzlich zu den vollen und leeren gibt es aber noch eine weitere Art von Kapsiden, die sogenannten "Verpackungs-Intermediate". Diese Kapside, die im Elektronenmikroskop "halbvoll" erscheinen, repräsentieren eventuell Zwischenstufen der DNA-Enkapsidierung und wurden schon früher in AAV-2 Präparationen gefunden (Ruffing et al., 1994).



Abb. 5-8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Präparation DNA-haltiger wt AAV-2 Kapside

**A) Negatives Kontrastierungsverfahren:** 5 µl einer 1:10 verdünnten wt AAV-2 Kapside enthaltenden Probe wurden mit 2 %iger Uranylacetat-Lösung kontrastiert. Schwarze Pfeile markieren sowohl volle und leere Kapside, als auch DNA-Enkapsidierungs-Intermediate.

B) Elektronenkryomikroskopie: 2 µl unverdünnter wt AAV-2 Partikel in vitrifiziertem Zustand.

#### Elektronenkryomikroskopie

Für die elektronenkryomikroskopischen Untersuchungen wurden 2 µl der Virussuspension eingesetzt und gemäß Kap. 4.11.3 präpariert. Die Kapside wurden im gefrorenen, nicht gefärbten Zustand mit 52.000-facher Vergrößerung fotografiert und sind als gleichmäßig verteilte schwarze, kreisförmige Strukturen zu erkennen (Abb. 5-8B). DNA-haltige und leere Kapside, sowie die Enkapsidierungs-Intermediate lassen sich bei der Kryo-Präparation aufgrund des Kohlefilm-Hintergrundes nur schwer unterscheiden, da der Kontrast sehr gering ist. Um eine möglichst große Anzahl an DNAhaltigen Partikeln für die Berechnung einer 3D-Rekonstruktion zu haben, wurden 13.790 Teilchen ausgewählt. Die aus denen resultierende 3Ddeshalb Rekonstruktion ist in Abb. 5-9 (unten) mit einer Auflösung von 10,5 Å (s. Kap. 4.11.5) zu sehen. An der äußeren Oberfläche scheinen die Kanäle gegenüber der Rekonstruktion der leeren Kapside, die als Vergleich ebenfalls in Abb. 5-9 (oben) dargestellt ist, an den 5-fachen Symmetrieachsen verschlossen zu sein (schwarzer Pfeil), während die Kanäle der 3-fachen Symmetrieachsen weiter offen stehen (Abb. 5-9A, weißer Pfeil). Die globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen im Kapsidinneren sind auch hier zu erkennen (Abb. 5-9B, schwarzer Pfeil) und scheinen gegenüber denen in der Rekonstruktion der leeren Kapside vergrößert zu sein. Bei der Analyse des Äquatorialschnitts der vollen Kapside lassen sich ebenfalls eindeutig die Globuli an den 2-fachen Symmetrieachsen erkennen (Abb. 5-9C, schwarzer Pfeil) und eventuell sind die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen, wie schon aufgrund der Struktur der äußeren Hülle gedacht, an der Außenseite verschlossen.



#### Abb. 5-9: 3D-Rekonstruktion von leeren und vollen wt AAV-2 Kapsiden

**A)** Außenansichten der leeren (oben) und vollen (unten) wt AAV-2 Kapside. Beide Rekonstruktionen haben eine Auflösung von 10,5 Å. Der schwarze Pfeil markiert einen Kanal an der 5-fachen, der weiße an der 3-fachen Symmetrieachse.

**B)** Innenansichten der leeren (oben) und vollen (unten) wt AAV-2 Kapside. Die globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen sind bei beiden Rekonstruktionen deutlich zu erkennen (schwarzer Pfeil). Bei den DNA-haltigen Kapsiden sind sie sogar größer, als bei den leeren.

**C)** Äquatorialschnitte der leeren (oben) und vollen (unten) wt AAV-2 Kapside. An den 2-fachen Symmetrieachsen befinden sich jeweils globuläre Strukturen, die verschwommener aussehen, als der Rest der Kapsidhülle. Der schwarze Pfeil markiert einen der Globuli an den 2-fachen Symmetrieachsen. Die Kanäle an den 5-fach Symmetrieachsen sind in der Rekonstruktion der leeren Kapside leer (weißer Pfeil) und offen, während sie bei den DNA-haltigen Kapsiden eventuell an der Außenseite verschlossen sind.

# 5.1.3 Herstellung und Analyse von AAV-2-Kapsidmutanten, bei denen eines der drei VP-Proteine deletiert ist

Ein AAV-Kapsid ist aus 60 Untereinheiten aufgebaut, in denen die VP-Proteine im Verhältnis 1:1:8 vorkommen. Bei den bisher vorhandenen Röntgenstrukturen oder 3D-Rekonstruktionen von Parvoviren, wie dem "porcine parvovirus" (PPV), dem "canine parvovirus" (CPV), dem "aleutian mink disease parvovirus" (ADP) oder dem "minute virus of mice" (MVM) (Simpson et al., 2002; Xie und Chapman, 1996; Mc-Kenna et al., 1999; Agbandje-McKenna et al., 1998) und auch bei der von AAV-2 (Xie et al., 2002) konnte die Lage der N-Termini der VP-Proteine nicht genau lokalisiert werden. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Deletion eines der drei Proteine zu einer Veränderung der Kapsidstruktur führt oder sogar einen Hinweis auf die Lokalisation der N-Termini gibt. Dazu wurden Mutanten hergestellt, bei denen die Expression jeweils eines der drei Proteine durch Punktmutationen ausgeschaltet war.

#### 5.1.3.1 Herstellung von Plasmiden mit mutierten AAV-Sequenzen

Als Ausgangsplasmid für die Herstellung der Kapsidmutanten diente das 7643 Bp große Plasmid pTAV2.0, das Teile des Bluescript-Plasmids 3.0 und die gesamte AAV-2 Sequenz enthält. In dieses Plasmid waren DNA-Fragmente hineinligiert worden, die mittels der Restriktionsendonukleasen Hin dlll und Eco NI (bei der Punktmutation in VP1) oder Eco NI und Bsi WI (bei den Punktmutationen in VP2 und in VP3) aus dem Plasmid pJ407 herausgeschnitten worden waren. In pJ407, das aus den AAV-2 rep- und cap-Sequenzen, sowie Teilen des Bluescript-Plasmides pUC131 besteht, waren vorher mittels gerichteter Mutagenese in PCR-Reaktionen Punktmutationen eingeführt worden. Die Punktmutationen führten dazu, dass jeweils das Startcodon eines der VP-Proteine verändert war, so dass das zugehörige Protein nicht mehr bzw. überexprimiert wurde. Die nach der Klonierung in pTAV2.0 entstandenen mutierten Plasmide wurden als pTAV2.0/VP1-, pTAV2.0/VP2-, pTAV2.0/VP2ATG und pTAV2.0/VP3- bezeichnet (Abb. 5-10). Bei den Plasmiden pTAV2.0/VP2ATG, und pTAV2.0/VP3-, handelt es sich um zwei Mutanten, bei denen die Expression des Hauptproteins VP3 verhindert werden sollte. Bei pTAV2.0/VP2ATG wurde das Startcodon ACG von VP2 in ATG umgewandelt, wodurch es zu einer Überexpression von VP2 und einer stark verminderten VP3-Expression kommt. In pTAV2.0/VP3- wurden zwei der drei in VP3 vorhandenen ATGs mutiert, um die Expression von VP3 auszuschalten. Das Startcodon von VP1 im Plasmid pTAV2.0/VP1- wurde von ATG in TTG verwandelt und das Startcodon von VP2 in pTAV2.0/VP2- von ACG in GCG. Die mutierten pTAV2.0-Plasmide wurden von Jason King und Kristin Schmidt (Arbeitsgruppe Kleinschmidt) zur Verfügung gestellt.



Abb. 5-10: Schematische Darstellung der Punktmutationen, die in das *cap*-Gen von AAV-2 eingeführt wurden und die zur Deletion jeweils eines der drei VP-Proteine führen

Die Punktmutationen zur Deletion je eines der drei VP-Proteine waren mittels gerichteter Mutagenese in das Plasmid pJ407 eingeführt worden. Dabei war jeweils eine Base des Startcodons bzw. von zwei Startcodons im VP3-Gen verändert worden, so dass die Expression des entsprechenden Proteins unterbunden bzw. bei VP2ATG erhöht wurde. Bei der Deletion von VP1 wurde das ATG in TTG geändert, während VP2 durch Austausch des ACG in GCG ausgeschaltet wurde. Zur Deletion von VP3 wurden zwei Mutanten synthetisiert. Bei der einen wurde das ACG von VP2 in ATG verändert, so dass es zur Überexpression von VP2 und verminderter Expression von VP3 kommt. Bei der anderen wurden zwei ATGs im Anfangsbereich des VP3-Gens zu TTGs umgewandelt. Die jeweilige mutierte *cap*-Genkassette wurde anschließend in das Plasmid pTAV2.0 kloniert, wodurch die dargestellten Plasmide entstanden.

# 5.1.3.2 Synthese von adenoviralen Transferplasmiden und rekombinanten Adenogenomplasmiden mit integrierten mutierten *cap*-Genen

#### Klonierung der adenoviralen Transferplasmide

Zur Herstellung adenoviraler Transferplasmide mit integrierten mutierten *cap*-Genen wurde das 8951 Bp große Plasmid pAdRSVVP benutzt, das von Dirk Grimm (Arbeitsgruppe Kleinschmidt) zur Verfügung gestellt wurde. Dieses enthält die AAV-2 *cap*-Genkassette mit dem "Rous Sarcoma Virus" (RSV)-Promotor, die von adenoviralen Sequenzen flankiert ist. Bei den adenoviralen Sequenzen handelt es sich um das 5'-gelegene ITR von Adeno-5 mit der Verpackungssequenz  $\Psi$ , die im Adeno-5 Genom stromaufwärts der E1-Region liegen, sowie um DNA-Sequenzen, die stromabwärts in der E1-Region lokalisiert sind.

Die Umklonierung der mutierten AAV-Sequenzen in pAdRSVVP erfolgte mit Hilfe der Restriktionsenzyme Swa I und Bsi WI (s. Kap. 4.2.3), die ein 1064 Bp großes Fragment ausschneiden, das die N-terminalen Bereiche der drei VP-Proteine enthält. Die so entstandenen Transferplasmide (s. Kap. 4.3.1-4.3.4) wurden als pAdRSVVP/ΔVP1, pAdRSVVP/ΔVP2, pAdRSVVP/VP2ATG und pAdRSVVP/ΔVP3 bezeichnet. Die Herstellung des rekombinanten adenoviralen Transferplasmids pAdRSVVP/ΔVP1 ist in Abb. 5-11A exemplarisch für alle Plasmide dargestellt.



#### Abb. 5-11: Schema der Herstellung der rekombinanten Transfer- und Adenogenomplasmide am Beispiel für die ΔVP1-Mutante

**A) Synthese des adenoviralen Transferplasmides.** Zur Synthese eines adenoviralen Transferplasmides wurde ein 1064 Bp großes DNA-Fragment aus der mutierten *cap*-Genkassette des Plasmids pTAV2.0/VP1- mittels der Restriktionsenzyme Swa I und BsiW I isoliert und in das adenovirale Transferplasmid pAdRSVVP hineinkloniert. Das dabei entstandene rekombinante adenovirale Transferplasmid wurde als pAdRSVVP/ΔVP1 bezeichnet. Es besteht aus der 5`-gelegenen adenoviralen terminalen Wiederholungssequenz (ITR) und adenoviralen Sequenzen einschließlich der Verpackungssequenz Ψ, die im Adeno-5 Genom stromaufwärts der E1-Region liegen, sowie DNA-Sequenzen, die stromabwärts in der E1-Region lokalisiert sind. Außerdem kodiert es für das mutierte AAV-2 *cap*-Gen und den "Rous Sarcoma Virus" (RSV)-Promotor.

**B)** Homologe Rekombination zur Produktion des rekombinanten Adenogenomplasmids. Um mit Hilfe des adenoviralen Transferplasmids pAdRSVVP/ $\Delta$ VP1 ein rekombinantes Adenogenomplasmid herzustellen, wurde das mit Msc I geschnittene und gereinigte Transferplasmid mit einem nach Cla I-Restriktionsverdau isolierten linearen DNA-Fragment aus dem Adenogenomplasmid pTG3602 $\Delta$ E3 in *E. coli* BJ5183-Bakterien kotransformiert. Aufgrund der homologen Sequenzen in den beiden Plasmid-Fragmenten kommt es zur homologen Rekombination, bei der ein rekombinantes Adenogenomplasmid (pTG3602 $\Delta$ E3/ $\Delta$ VP1) entsteht, dass sowohl das Adenogenom, als auch die notwendigen AAV-Sequenzen zur Produktion von AAV-Kapsiden enthält.

#### Herstellung rekombinanter Adenogenomplasmide

Rekombinante adenovirale Genomplasmide sollten mit Hilfe des Adenogenomplasmids pTG3602∆E3 (von Dirk Grimm, Arbeitsgruppe Kleinschmidt, zur Verfügung gestellt) hergestellt werden. Dieses Plasmid enthält das gesamte Genom vom Adenovirus Typ 5, außer der E3-Region. Diese Deletion hat keine Auswirkungen auf die Produktion infektiöser Adenoviren, da die von der E3-Region kodierten Proteine ohne Einfluß auf den Infektionsverlauf von Adenoviren in Zellkultur sind. Die adenoviralen Transferplasmide enthalten auf beiden Seiten der cap-Kassette adenovirale Sequenzen. Dabei handelt es sich um das 5'-gelegene adenovirale ITR mit nachfolgender Verpackungssequenz Ψ, sowie um DNA-Sequenzen, die stromabwärts in der E1-Region lokalisiert sind. Eine Kotransformation von pTG3602∆E3 und einem der Transferplasmide kann somit aufgrund der homologen Sequenzen zu einer homologen Rekombination führen (s. Kap. 4.1.1). Für die Kotransformation, die mit speziellen Rekombinationsbakterien (*E. coli* BJ5183-Zellen) durchgeführt wurde, wurde das Adenogenomplasmid pTG3602 $\Delta$ E3 mit dem Restriktionsenzym Cla I geschnitten, das eine Schnittstelle in der E1-Region von Adeno-5 besitzt und somit das Plasmid linearisiert und dessen Vermehrung unterbindet. Die verwendeten adenoviralen Transferplasmide wurden mit der Restriktionsendonuklease Msc I verdaut, die ein 5,5 Kb großes lineares DNA-Fragment entstehen lässt, das die notwendigen adenoviralen Sequenzen inklusive der mutierten AAV-2 cap-Kassette enthält. Die nach der homologen Rekombination neu entstandenen rekombinanten Adenoplasmide enthalten anstelle der E1-Region die mutierte cap-Kassette. Die deletierte E1-Region ist in allen von 293-Zellen abgeleiteten Zellinien stabil vorhanden (Graham und Smiley, 1977) und wird somit bei der Transfektion von 293T-Zellen mit den rekombinanten Adenogenomplasmiden komplementiert. Die rekombinanten Adenoplasmide wurden pTG3602ΔE3/ΔVP1.  $pTG3602\Delta E3/\Delta VP2$ , pTG3602AE3/VP2ATG als und

Ergebnisse

pTG3602 $\Delta$ E3/ $\Delta$ VP3 bezeichnet. Abb. 5-11B zeigt schematisch die Konstruktion von pTG3602 $\Delta$ E3/ $\Delta$ VP1.

Da die Plasmidausbeuten in *E. coli* BJ5183-Zellen sehr gering sind, wurden die mittels EcoRI-Restriktionsverdaus ermittelten positiven Transformationsklone (Abb. 5-12) in *E. coli* Dh5α-Zellen umtransformiert und Maxi-Präparationen der Plasmide durchgeführt (s. Kap. 4.2.1).



Abb. 5-12: Eco RI Restriktionsverdau der mutierten rekombinanten Adenogenomplasmide Die mutierten rekombinanten Adenogenomplasmide pTG3602 $\Delta$ E3/ $\Delta$ VP1 (Spur 1), pTG3602 $\Delta$ E3/ $\Delta$ VP2 (Spur 2), pTG3602 $\Delta$ E3/VP2ATG Spur 3) und pTG3602 $\Delta$ E3/ $\Delta$ VP3 (Spur 4) wurden nach der homologen Rekombination in *E. coli* BJ5183-Zellen mit den Restriktionsenzym Eco RI geschnitten, um die durch die Rekombination entstandenen positiven Klone zu ermitteln. Die in den Spuren 1-4 abgebildeten Klone zeigen das erwartete Restriktionsmuster von 6 Banden mit den Größen 24021 Bp, 6738 Bp, 2528 Bp, 1994, 984 Bp und 206 Bp, wobei die kleinste Bande aufgrund des schon zu weit nach oben gelaufenen Ethidiumbromids nicht mehr zu sehen ist. Als Größenvergleich (Spur M) wurden 5 µl des SmartLadder-Markers (Eurogentec) aufgetragen.

Nach der Präparation der Plasmide wurden jeweils diejenigen VP-Bereiche der rekombinanten Plasmide, in denen die Punkmutationen vorliegen sollten, mit den Primern PM1 und PM3 (s. Kap. 3.3) übersequenziert, um das Vorhandensein der Mutationen zu überprüfen. Anschließend wurde die Expression der VP-Proteine durch die rekombinanten Adenoplasmide untersucht. Dazu wurden 293T-Zellen transfiziert (s. Kap. 4.4.4) und eine Western-Blot Analyse (s. Kap. 4.5.4) der Zellextrakte durchgeführt, die in Abb. 5-13 zu sehen ist. Bei der  $\Delta$ VP1- und der  $\Delta$ VP2-Mutante (Spuren 1 und 2) sind im Vergleich zum Marker in Spur M die Deletionen eindeutig zu erkennen. Die Mutation in der VP2ATG-Mutante (Spur 3) führt zu einer
Überexpression von VP2 und einer stark verminderten VP3-Produktion, während die Doppelmutation im Gen von VP3 die VP3-Expression ausschaltet (ΔVP3-Mutante, Spur 4). Allerdings tritt hier eine zusätzliche Bande auf, die etwas unterhalb von VP3 läuft. Diese stellt vermutlich ein verkleinertes VP3-Protein dar, das durch Translationsinitiation an einem weiter stromabwärts gelegenen ATG entstanden ist.



Abb. 5-13: Western-Blot der von den mutierten rekombinanten Adenogenomplasmiden exprimierten VP-Proteine

Die Expression der mutanten VP-Proteine wurde mittels Western-Blot Analyse untersucht. Dafür wurden Zellextrakte von 293T-Zellen verwendet, die mit den mutierten rekombinanten Adenogenomplasmiden transfiziert worden waren. Die Proteine wurden mit Hilfe des B1-Antikörpers detektiert, der den C-Terminus aller drei VP-Proteine erkennt. Spur 1 zeigt die Expression von pTG3602 $\Delta$ E3/ $\Delta$ VP1, Spur 2 die Expression von pTG3602 $\Delta$ E3/ $\Delta$ VP2, Spur 3 die Expression von pTG3602 $\Delta$ E3/ $\Delta$ VP2ATG und Spur 4 die Expression von pTG3602 $\Delta$ E3/ $\Delta$ VP3. Als Marker (Spur M) wurde ein wt AAV-Zellextrakt eingesetzt, der aus HeLa-Zellen nach Koinfektion mit AAV-2 und Adeno-5 gewonnen wurde und alle drei VP-Proteine aufweist.

Nachdem nachgewiesen war, dass die mutanten Adenoplasmide die gewünschten VP-Proteine exprimierten, wurde überprüft, ob mit ihrer Hilfe AAV-Kapside produziert werden konnten. Ausschnitte aus einem Immunfluoreszenztest, bei dem mit den rekombinanten Adenoplasmiden transfizierte 293T-Zellen nach Reaktion mit dem Antikörper B1, der freie VP-Proteine erkennt (Wistuba et al., 1997; Wobus et al., 2000), sind in Abb. 5-14 zu sehen. Der Test zeigt deutlich, dass alle VP-Mutanten in der Lage sind, VP-Proteine zu produzieren (Abb. 5-14 B1-Reaktion). Die Fähigkeit der von den mutanten Adenoplasmiden exprimierten VP-Proteine, sich zu Kapsiden zusammenzusetzen, wurde mit Hilfe des A20-Antikörpers überprüft. Dieser Antikörper erkennt ein konformatives Epitop, das erst bei der Kapsidbildung entsteht (Wistuba et al., 1997; Wobus et al., 2000). Nur bei der Expression der  $\Delta$ VP1- und der  $\Delta$ VP2-Mutanten waren eine große Anzahl kapsidbildender Zellen zu erkennen (Abb. 5-14,  $\Delta$ VP1 und  $\Delta$ VP2 A20-Reaktion). Die Mutanten, bei denen die VP3-Expression ausgeschaltet bzw. vermindert ist (Abb. 5-14, VP2ATG und  $\Delta$ VP3 A20-Reaktion),

wiesen nur ganz vereinzelt Reaktionen mit dem A20-Antikörper auf. Diese Zellen sind in den kleinen Quadraten gezeigt.



Abb. 5-14: Immunfluoreszenztest der VP-Mutanten zum Nachweis der Proteinexpression und Kapsidbildung

293T-Zellen wurden mit den Plasmiden pTG3602ΔE3/ΔVP1, pTG3602ΔE3/ΔVP2, pTG3602ΔE3/VP2ATG und pTG3602ΔE3/ΔVP3 transfiziert. Die Immundetektion erfolgte mit Hilfe der Antikörper-Hybridomüberstände A20 und B1. A20 erkennt Kapside. Das Epitop von B1 liegt im Cterminalen Bereich aller drei VP-Proteine. Bei allen verwendeten rekombinanten Adenoplasmiden ist eine Expression der VP-Proteine nachweisbar (B1-Reaktion). Die Zusammenlagerung der VP-Proteine zu Kapsiden ist in einer größeren Anzahl transfizierter Zellen nur bei mit den Plasmiden pTG3602ΔE3/ΔVP1 und pTG3602ΔE3/ΔVP2 zu Erkennen (A20-Reaktion). Die von den Plasmiden mit überexprimiertem VP2 (VP2ATG) und ohne VP3 produzierten, in vereinzelten Zellen sichtbaren, Kapside sind in den kleinen Quadraten dargestellt.

#### 5.1.3.3 Produktion und Vermehrung der rekombinanten mutierten Adenoviren

Nach der Überprüfung der VP-Proteinexpression mit Hilfe der mutierten rekombinanten Adenogenomplasmide wurden diese zur Herstellung rekombinanter Adenoviren eingesetzt. Dazu war zuerst ein Restriktionsverdau der Plasmide mit dem Enzym Pac I notwendig. Pac I ermöglicht das Ausschneiden des rekombinanten adenoviralen Genoms aus dem Plasmid, da es zwei Schnittstellen, vor und hinter den adenoviralen ITRs, hat. Diese Linearisierung des rekombinanten Adenogenomplasmid ist notwendig, da das Plasmid im zirkulären Zustand nicht in der Lage ist, rekombinante Adenoviren entstehen zu lassen (Chartier et al., 1996). Nach Aufreinigung der 34 Kb großen DNA-Fragmente (s. Kap. 4.3.1) wurden diese zur Produktion von rekombinanten Adenoviren eingesetzt (s. Kap. 4.9). Dabei wurde die Synthese mittels Plaque-Assay (s. Kap. 4.9.1.1) verwendet, bei der nach 4-6 Tagen Zellhaufen (Abb. 5-15A schwarzer Pfeil) zu erkennen waren, die sich 24 h später aufgrund abgestorbener Zellen zu Löchern im Zellrasen entwickelten (Abb. 5-15B+C). Dies gilt als Zeichen für die Produktion von rekombinanten Adenoviren.



Abb. 5-15: Plaque-Assay zur Produktion von rekombinanten Adenoviren Die Synthese von rekombinanten Adenoviren erfolgte mit Hilfe des Plaque-Assay Verfahrens. Dabei werden 911-Zellen nach der Transfektion mit SeaPlaque Agarose überschichtet und so lange inkubiert, bis kleine Zellhaufen zu erkennen sind (**A**, schwarzer Pfeil). Aus diesen entstehen 24 h später Löcher (**B**, schwarzer Pfeil) im Zellrasen, da die entstandenen Viren die Zellen zum Absterben bringen. Je länger die Ansätze inkubiert werden, desto größer werden die Löcher (**C**).

Aus diesen Löchern wurden die rekombinanten Viren geerntet und sukzessive auf 293T- und 911-Zellen vermehrt (s. Kap. 4.9.2). Dabei erfolgte die Vermehrung der Viren zuerst nur bis zur Infektion von 3x 15cm-Gewebekulturschalen. Dann wurde der Überstand zur Produktion und Präparation von leeren Kapsiden verwendet. Bei der anschließenden Überprüfung der Produktion von Kapsiden konnten sowohl mittels negativem Kontrastierungsverfahren, als auch in der Western-Blot Analyse leere Kapside nur nach Expression der Mutanten  $\Delta VP1$  oder  $\Delta VP2$  nachgewiesen werden. Die rekombinanten Adenoviren, die aus den rekombinanten Adenogenomplasmiden pTG3602AE3/VP2ATG und pTG3602AE3/AVP3 entstanden waren, zeigten in beiden Analysemethoden keine Anzeichen für eine Kapsidbildung. Aus diesem Grund wurden nur die Kapsidmutanten, denen VP1 oder VP2 fehlte, für die weiteren Kapsidanalysen verwendet. Allerdings waren die bei der negativen Kontrastierung sichtbaren Kapsidkonzentrationen dieser Proben nicht ausreichend, um eine elektronenkryomikroskopische Untersuchung durchzuführen. Aus diesem Grund wurde das bisher bestehende Produktions-Protokoll so optimiert, dass die Zellen mit einer definierten MOI infiziert und ein, für diese Art der Präparation nicht notwendiger, Zentrifugationsschritt bei der Aufreinigung unterlassen wurden. Um eine Infektion mit einer definierten MOI durchführen zu können, wurden die rekombinanten Adenoviren so lange weiter vermehrt, bis mittels A30-Titration (s. Kap. 4.7.2) ein infektiöser Titer der 10<sup>8</sup>-10<sup>10</sup> Kapsiden/ml ermittelt wurde, bevor eine Kapsid-Zellysate von Großproduktion erfolgte.

### 5.1.3.4 Produktion und Präparation von mutanten AAV-Kapsiden

Bei ausreichender Konzentration an infektiösen Partikeln in den Zellysaten wurden 293T-Zellen mit einer MOI = 2 zur Produktion von AAV-Kapsiden infiziert (s. Kap. 4.10.1). Nach Ernte der Zellen und Präparation der AAV Kapside gemäß Kapitel 4.10.2 wurden die Kapside durch eine Western-Blot Analyse auf die Zusammensetzung der VP-Proteine untersucht (Abb. 5-16 schwarze Banden). Dabei sind die Deletionen von VP1 (Spur 1) und VP2 (Spur 3) eindeutig zu erkennen. Die zusätzlich, zur Überprüfung der Reinheit der Kapsidproben, durchgeführte Coomassie-Färbung (Abb. 5-16 blaue Banden) zeigt jedoch, dass nicht nur VP-Proteine in den Proben vorhanden sind. Bei der  $\Delta VP1$  Probe (Spur 2) zeigt sich eine Bande genau auf der Höhe des deletierten VP1-Proteins. Außerdem tritt, wenn auch nur sehr schwach, die auch bei den wt AAV-2 Kapsiden vorhandene Proteinbande oberhalb von VP1 auch. Im Western-Blot dieser Probe war allerdings eindeutig keine Proteinbande auf der Höhe von VP1 erkennbar, so dass die Probe für die folgenden Experimente verwendet wurde. Bei dem Coomassie-gefärbten Proteingel der ΔVP2 Kapsidprobe (Spur 4) fehlt die Proteinbande oberhalb von VP1. Da aber hier die Auftrennung der Proteinbanden insgesamt nicht sehr gut war und die Bande in allen anderen Kapsid-Präparationen sichtbar war, wurde dies nicht weiter berücksichtigt.



#### Abb. 5-16: Nachweis der VP-Proteine in den $\Delta$ VP1- und $\Delta$ VP2-Mutanten

Die Zusammensetzung der VP-Proteine in den mutanten Kapsiden wurde mittels einer Western-Blot Analyse überprüft (schwarze Banden). Dabei wurde der Antikörper B1, der den C-Terminus aller drei VP-Proteine erkennt, für die Immundetektion verwendet. Spur 1 kennzeichnet die  $\Delta$ VP1 Kapside und Spur 3 die  $\Delta$ VP2 Kapside. Als Marker M wurde ein wt AAV-2 Zellextrakt verwendet, der durch Koinfektion von HeLa-Zellen mit AAV-2 und Ad-5 hergestellt wurde. Zusätzlich dazu wurde die Reinheit der Kapsidproben mit Hilfe einer Coomassie-Färbung geprüft (blaue Banden). Spur 2 zeigt die  $\Delta$ VP1 Kapside und Spur 4 die  $\Delta$ VP2 Kapside.

Die Konzentration der Kapsidproben wurde durch einen A20-ELISA ermittelt. Die  $\Delta VP1$ -Probe hatte eine Konzentration von 1x 10<sup>14</sup> Kapsiden/ml und die  $\Delta VP2$ -Probe enthielt 2x 10<sup>12</sup> Kapside/ml.

### Negative Kontrastierung der Kapsid-Mutanten

Zur Überprüfung der Reinheit und der Struktur der Kapsid-Proben wurden diese negativ kontrastiert (s. Kap. 4.11.1). Dazu wurden je 1  $\mu$ l der Proben 1:10 mit Lagerungspuffer verdünnt und 5  $\mu$ l der Verdünnungen für die mikroskopischen Untersuchungen eingesetzt. Auf den Fotos in Abb. 5-17 sind die Kapside durch die schwarzen Punkte in der Mitte als leer zu identifizieren. Sowohl die  $\Delta$ VP1-, als auch die  $\Delta$ VP2-Kapside weisen die gleiche Größe auf, wie die wt leeren Kapside und zeigen keine mit Hilfe dieses Verfahrens nachweisbaren strukturellen Unterschiede.



**Abb. 5-17: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von ΔVP1- und ΔVP2-Kapsiden** A) Negative Kontrastierung von ΔVP1-Kapsiden, B) Negative Kontrastierung von ΔVP2-Kapsiden. Die Kapside wurden mit 2 %iger Uranylacetat-Lösung gefärbt.

#### Elektronenkryomikroskopische Analyse der Kapsidmutanten

Um eine detailliertere Analyse der Struktur der  $\Delta$ VP1- und der  $\Delta$ VP2-Kapside machen zu können, wurden 3D-Rekonstruktionen von elektronenkryomikroskopischen Aufnahmen der Kapside berechnet. Im Vergleich zu den leeren wt Kapside unterscheiden sich die Kapsidmutanten zunächst nicht. Auch sie sind homogen verteilt und als dunkle Ringe sichtbar (Abb. 5-18A+B). Von diesen Teilchen wurden von den  $\Delta$ VP1 Kapsiden 3140 und von den  $\Delta$ VP2 Kapsiden 2730 Partikel ausgewählt und für die in den Abb. 5-18C-E abgebildeten 3D-Rekonstruktionen der Kapside ohne VP1 bzw. ohne VP2 verwendet.



Abb. 5-18: Elektronenkryomikroskopische Aufnahmen und 3D-Rekonstruktionen von den Kapsiden ohne VP1 bzw. ohne VP2

A)+B) Elektronenkryomikroskopische Aufnahmen der  $\Delta$ VP1- (A) und  $\Delta$ VP2-(B) Kapside. Die Kapside sind in gefrorenem, ungefärbtem Zustand dargestellt und als dunkle Ringe erkennbar. C) Außenansichten der 3D-Rekonstruktionen der  $\Delta$ VP1- (oben) und  $\Delta$ VP2- (unten) Kapside. Beide Rekonstruktionen liegen mit einer Auflösung von 10,5 Å vor. Die Ansicht ist jeweils auf eine 2-fache Symmetrieachse.

**D** Innenansichten der 3D-Rekonstruktionen der ΔVP1- (oben) und ΔVP2- (unten) Kapside. In beiden Kapsiden fehlen die globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen, die in den leeren und vollen wt AAV-2 Kapsiden vorhanden sind und die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen, haben an den inneren Kapsidoberflächen einen geringeren Durchmesser (schwarzer Pfeil).

**E)** Äquatorialschnitte durch  $\Delta VP1$ - (oben) und  $\Delta VP2$ - (unten) Kapside. In beiden Rekonstruktionen sind eindeutig keine globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen zu erkennen (schwarzer Pfeil). Die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen weisen jeweils an den inneren Kapsidoberflächen zusätzliche Proteindichten auf, die die Kanäle enger erscheinen lassen (weißer Pfeil).

Die Rekonstruktionen haben beide eine Auflösung von 10,5 Å (s. Kap.4.11.5). Die äußere Hülle der Kapside (Abb. 5-18C) zeigt keinen deutlichen Unterschied im Vergleich zu der der wt Kapside (Abb. 5-5A, 5-9A). Bei der inneren Oberfläche der Kapside ist jedoch sowohl bei der Rekonstruktion von  $\Delta$ VP1-Kapsiden, als auch bei der Rekonstruktion von  $\Delta$ VP2-Kapsiden (Abb. 5-18D) ein Unterschied zu den leeren Kapsiden (Abb. 5-9B) zu erkennen. Beiden Rekonstruktionen fehlen die globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen. Dieses wird noch deutlicher bei den

Ergebnisse

Äquatorialschnitten in Abb. 5-18E. Auch hier sind die 2-fachen, 3-fachen und 5fachen Symmetrieachsen zu erkennen und in beiden Rekonstruktionen fehlen die globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen (schwarzer Pfeil). Demnach könnten die globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen der wt leeren und vollen Kapside zumindest Teile der N-Termini von VP1 und VP2 darstellen. Bei den Äquatorialschnitten (Abb. 5-18E) sind außerdem in beiden Rekonstruktionen zusätzliche Proteindichten an der inneren Oberfläche der Kanäle an den 5fachen Symmetrieachsen sichtbar (weißer Pfeil). Es scheint also bei den Mutanten eine Konformationsänderung stattgefunden zu haben, die zu einer Abnahme der Proteindichte an den 2-fachen Symmetrieachsen und einer Zunahme der Proteindichte an den 5-fachen Symmetrieachsen führt.

## 5.1.4 Herstellung und Analyse von einer AAV-2 Kapsidmutante, bei der sowohl VP1 als auch VP2 deletiert sind

### 5.1.4.1 Synthese der NLSVP3 (Δ VP1+2)-Mutante

Die Deletion der AAV-2 VP-Proteine VP1 oder VP2 führt zu einer strukturellen Veränderung im Inneren des AAV-Kapsids an der 2-fachen Symmetrieachse (s. Kap. 5.1.3). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde zusätzlich zu den VP-Mutanten, bei denen je eines der VP-Proteine deletiert war, eine Doppelmutante hergestellt, bei der sowohl VP1 als auch VP2 fehlten. Dabei wurde das AAV-2 *cap*-Gen dahingehend mutiert, dass es nur noch für das Hauptprotein, dem VP3-Protein kodiert. Die Expression des VP3-Proteins erfolgte in dieser Mutante unter der Kontrolle des RSV-Promotors. Zusätzlich dazu enthielt die Mutante das N-terminal an das VP3-Gen fusionierte Kernwanderungssignal (NLS) des großen T-Antigens von SV40 (Hoque et al., 1999). Die Herstellung der Doppelmutante ist in Abb. 5-19 dargestellt.



Abb. 5-19: Schematische Darstellung der NLSVP3-Sequenz, sowie der Synthese des adenoviralen Transfer- und des rekombinanten Adenogenomplasmids

**A)** Synthese des adenoviralen Transferplasmids. Zur Konstruktion eines adenoviralen Transferplasmids wurde ein mittels PCR synthetisiertes, aus dem Kernwanderungssignal (NLS) des großen T-Antigens von SV40 und dem Gen für VP3 des adeno-assoziierten Virus Typ 2 bestehendes, DNA-Fragment mit Hilfe der Enzyme Cla I und SnaB I geschnitten und in das adenovirale Transferplasmid pAdRSVβGal hineinkloniert. Dieses Plasmid wurde vorher mit den Restriktionsendonukleasen Cla I und Eco RV verdaut, wodurch ein 3215 Bp großes DNA-Fragment entfernt wurde. Das adenovirale Transferplasmid pAdRSV/NLSVP3 besitzt ein eigenes poly-Adenylierungssignal aus dem VP3-Gen. Außerdem enthält es die 5'-gelegene adenovirale terminale Wiederholungssequenz mit der anschließenden adenoviralen Verpackungssequenz  $\Psi$ , sowie den RSV-Promotor und stromabwärts im E1-Gen gelegene adenovirale Sequenzen.

**B)** Herstellung des rekombinanten Adenogenomplasmids. Für die Produktion eines rekombinanten Adenogenomplasmids wurde das Adenogenomplasmid pTG3602ΔE3 mit dem Enzym Pac I geschnitten und das dabei entstandene etwa 34 Kb große DNA-Fragment isoliert. Bei der Kotransformation dieses Plasmidrests mit dem Msc I verdauten und gereinigten adenoviralen Transferplasmid pAdRSV/NLSVP3 in *E. coli* BJ5183-Bakterien kommt es aufgrund der homologen Sequenzen in den beiden Plasmid-Fragmenten zur homologen Rekombination. Dabei entsteht das rekombinante Adenogenomplasmid pTG3602ΔE3/NLSVP3. Dieses enthält das Adeno-5 Genom, außer den Genen E1 und E3, sowie den RSV-Promotor und die NLSVP3-Sequenz.

Als Ausgangsplasmid für die Herstellung der Doppelmutante diente das 7643 Bp große Plasmid pTAV2.0, das aus Teilen des Bluescript-Plasmids 3.0 und der gesamten AAV-2 Sequenz besteht. Aus diesem Plasmid wurde mittels PCR ein 1800 Basenpaar großes Fragment herausamplifiziert, das das VP3-Gen enthält. Durch die für die PCR verwendeten Primer (s. Kap. 3.3) wurden zusätzlich eine Clal-Restriktionsschnittstelle und das Kernwanderungssignal des großen T-Antigens von SV40 in das DNA-Fragment eingebracht. Das Kernwanderungssignal ist notwendig, da der Kapsidzusammenbau bei AAV-2 im Zellkern stattfindet und die Kapsid-proteine somit dorthin transportiert werden müssen (Myers und Carter, 1980). Für das NLS von AAV kodiert normalerweise das Gen von VP2 (Hoque et al., 1999). Bei der Primersynthese wurden die Bestimmungen der sogenannten "Kozak-Sequenzen" eingehalten, wobei sich für die effiziente Translation einer mRNA eine Purinbase in der DNA-Sequenz an Position -3 vor dem Startcodon befinden muss (Kozak, 1989). Zusätzlich dazu ist es von Vorteil, wenn an der Position +4 die Base Guanin vorliegt, was bei dem VP3-Protein von AAV-2 der Fall ist.

#### Synthese des adenoviralen Transferplasmids

Für die Herstellung eines adenoviralen Transferplasmids wurde das 9793 Bp große Plasmid pAdRSVβgal verwendet (Abb. 5-19). Dieses Plasmid enthält eine LacZ-Expressionskassette, die von adenoviralen Sequenzen flankiert wird. Die LacZ-Kassette besteht aus dem RSV-Promotor, dem offenen Leserahmen (ORF) für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase und der poly-Adenylierungsregion aus dem Gen für das große T-Antigen aus SV40. Bei den die LacZ-Kassette einschließenden adenoviralen Sequenzen handelt es sich um das 5'-gelegene ITR von Adeno-5 mit der Verpackungssequenz  $\Psi$ , die im Adeno-5 Genom stromaufwärts der E1-Region liegen, sowie um DNA-Sequenzen, die stromabwärts in der E1-Region lokalisiert sind. Aus dem Plasmid pAdRSV $\beta$ gal wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme Cla I und Eco RV die LacZ-Expressionskassette ohne den RSV-Promotor herausgeschnitten (3215 Bp) und das vorher Cla I und Sna BI geschnittene PCR-Fragment mit dem Plasmidrest ligiert (s. Kap. 4.3 und Abb. 5-19). Eco RV und Sna BI schneiden in ihren Erkennungssequenzen beide "blunt", d.h., es gibt keine überstehenden Enden, so dass das DNA-Insert problemlos mit der Vektor-DNA ligieren kann. Die bei der Transformation des neu gewonnenen Plasmids pAdRSV/NLSVP3 in *E. coli* Dh5 $\alpha$ -Zellen produzierten Klone wurden mittels Ssp I-Restriktionsverdau auf ihr Bandenmuster überprüft und von den positiven Klonen anschließend Maxi-Präparationen durchgeführt.

Zur Kontrolle der Expression des VP3-Proteins wurden 293T-Zellen mit dem adenoviralen Transferplasmid transfiziert (s. Kap. 4.4.4) und eine Western-Blot Analyse durchgeführt (Abb.5-20A). Außerdem wurde mittels eines Immunfluoreszenztests die Bildung von Kapsiden untersucht.



#### Abb. 5-20: Western-Blot und Immunfluoreszenztest der exprimierten VP-Proteine mit Hilfe des adenoviralen Transferplasmids pAdRSV/NLSVP3

A) Western-Blot Analyse der VP-Expression von pAdRSV/NLSVP3. Die Immundetektion erfolgte mit Hilfe des B1-Antikörpers, der den C-Terminus des VP3-Proteins erkennt. Als Marker (M) wurde ein wt AAV-2 Zellextrakt verwendet.

**B) Immunfluoreszenztest zur Überprüfung der VP-Expression von pAdRSV/NLSVP3.** 293T-Zellen wurden mit dem Plasmid transfiziert und fixiert. Der Immunfluoreszenztest wurde mit A20- und B1-Hybridomüberständen durchgeführt. Die Reaktion mit dem Antikörper B1 zeigt deutlich, dass VP3 produziert und in den Kern transportiert wird. Mit A20 ist keine Reaktion zu sehen. Es werden keine mit dem Antikörper nachweisbaren Kapside gebildet.

Wie in Abb. 5-20A eindeutig zu sehen ist, exprimiert das Plasmid pAdRSV/NLSVP3 ein mit dem Antikörper B1 detektierbares Pro-tein, welches genau auf der Höhe von

VP3 läuft. Bei der weiter oben sichtbaren Bande handelt es sich um ein Dimer oder Trimer von VP3-Proteinen, das aufgrund unzureichender Denaturierung der Probe durch den Probenpuffer auftreten kann (Wistuba et al., 1995). Im Immunfluoreszenztest (Abb. 5-20B) zeigt sich, dass VP3 zwar synthetisiert und in den Zellkern transportiert wird (B1-Reaktion), aber keine durch den Antikörper A20 detektierbaren Kapside entstehen.

#### Herstellung eines rekombinanten Adenogenomplasmids

Trotz des Ergebnisses der Immunfluoreszenz wurde mit Hilfe des adenoviralen Transferplasmides pAdRSV/NLSVP3 ein rekombinantes Adenogenomplasmid konstruiert. Bei dem für die homologe Rekombination verwendeten Adenogenomplasmid handelt es sich um das auch schon bei der Herstellung der rekombinanten Adenoviren der VP-Mutanten (s. Kap. 5.1.3.2) verwendete pTG3602∆E3. Bei der Kotransformation der beiden Plasmide (pAdRSV/NLSVP3 und pTG3602ΔE3) kommt es zu einem Austausch der homologen Sequenzen durch homologe Rekombination (s. Kap. 4.1.1). Für die Kotransformation in speziellen Rekombinationsbakterien (E. coli BJ5183-Zellen), wurde das Adenogenomplasmid pTG3602AE3 mit dem Restriktionsenzym Cla I geschnitten. Cla I erkennt eine Schnittstelle in der E1-Region von Adeno-5, wodurch das Plasmid linearisiert wird und nicht mehr vermehrt werden kann. Das adenovirale Transferplasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease Msc I verdaut, wodurch ein 4800 Basenpaar großes DNA-Fragment entsteht, das die notwendigen adenoviralen Seguenzen inklusive des NLSVP3-Genkonstrukts enthält. Nach der homologen Rekombination liegt ein rekombinantes Adenoplasmid (pTG3602∆E3/NLSVP3) vor, das anstelle der E1-Region das NLSVP3-Genkonstrukt besitzt (Chartier et al., 1996). Die deletierte E1-Region wird bei der Transfektion von 293T-Zellen mit dem rekombinanten Adenoplasmid komplementiert, da die E1-Region in allen 293-Zellen abgeleiteten Zellinien stabil vorhanden ist. In E. coli BJ5183-Zellen ist die Plasmidausbeute immer sehr gering. Demzufolge wurde der mittels Sca I-Restriktionsverdau ermittelte positive Klone (Abb. 5-21) in E. coli Dh5a-Zellen umtransformiert, bevor eine Maxi-Präparation durchgeführt wurde.

Mit den rekombinanten Adenoplasmiden wurden erneut 293T-Zellen transformiert und mittels Immunfluoreszenz auf die Produktion von intakten Kapsiden untersucht. Die transfizierten Zellen wiesen jedoch auch hier keine Fluoreszenz nach Inkubation mit dem Antikörper A20 auf. Eventuell ist es aber möglich, nach Synthese von rekombinanten Adenoviren mittels des rekombinanten Adenogenomplasmids pTG3602  $\Delta$ E3/NLSVP3 durch Infektion von Zellen mit einer hohen MOI doch eine Kapsidbildung zu sehen.



Abb. 5-21: Sca I-Restriktionsverdau des mutierten rekombinanten Adenogenomplasmids pTG3602ΔE3/NLSVP3

Das mutierte rekombinante Adenogenomplasmid pTG3602ΔE3/NLSVP3 (Spur 1) wurde nach der homologen Rekombination in *E. coli* BJ5183-Zellen mit dem Restriktionsenzym Sca I geschnitten, um die durch die Rekombination entstandenen positiven Klone zu ermitteln. Der in der Spur 1 abgebildete Klon zeigt das erwartete Restriktionsmuster von 7 Banden mit den Größen 23252 Bp, 4187 Bp, 3068 Bp, 2221, 1053 Bp, 957 Bp und 822 Bp. Als Größenvergleich (Spur M) wurden 5 µl des SmartLadder-Markers (Eurogentec) aufgetragen.

# 5.2 Biochemische Untersuchung zur Lokalisation der N-Termini der VP1- und VP2-Proteine im AAV-2 Kapsid

Nach den bisherigen Ergebnissen aufgrund der strukturellen Untersuchungen des AAV-2 Kapsids scheinen die N-Termini von VP1 und VP2 im Inneren des Kapsids lokalisiert zu sein. Untersuchungen von Zadori et al. (2001) haben ergeben, dass VP1 für eine katalytische Domäne kodiert. Mutationen in der katalytischen Domäne führen sowohl bei dem Schweine-Parvovirus (PPV), als auch bei AAV-2 zu einer deutlichen Reduktion der Infektiösität (Zadori et al., 2001; Girod et al., 2002). Außerdem zeigen intakte Viruspartikel von PPV keine Phospholipase-Aktivität, was mit der Lokalisation des N-Terminus von VP1 im Inneren des Kapsids übereinstimmen würde. Da aber diese Aktivität während der Infektion eine Rolle spielt, war es von Interesse, zu untersuchen, unter welchen Bedingungen die N-Termini der VP1-Proteine

von außen am Kapsid zugänglich werden. Biochemische Tests dazu wurden im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführt.

### 5.2.1 Antikörperbindungstest von wt AAV-2 Kapsiden mit den monoklo nalen Antikörpern A1, A69, B1 und A20

Die Zugänglichkeit der N-Termini der VP-Proteine VP1 und VP2 am AAV-2 Kapsid wurde mit Hilfe eines Antikörperbindungstests überprüft. Für diesen Test wurden die vier, von Wistuba et al. (1997) und Wobus et al. (2000) charakterisierten, monoklonalen Antikörper A1, A69, B1 und A20 eingesetzt (Abb. 5-22A).





A) Schematische Zeichnung der Lokalisation der Epitope von den monoklonalen Antikörpern A1, A69, B1 und A20. A1 besitzt ein Epitop am N-Terminus von VP1. Das Epitop von A69 liegt im N-terminalen Bereich von VP1 und VP2. B1 erkennt sein Epitop am C-Terminus von VP1, VP2 und VP3 und A20 weist ein konformatives Epitop auf dem Kapsid nach.

B) Auftragsschema des Antikörperbindungstest und schematische Darstellung der Reaktion bei A20-beschichteten und unbeschichteten Mikrotiterplatten. Für den Antikörperbindungstest

werden die Kapside in verschiedenen Konzentrationen in die Löcher pipettiert, bevor sie mit je einem der vier Antikörper (Ak) A1, A69, B1 oder A20 inkubiert werden. Die Antikörper liegen in biotinyliertem Zustand vor, so dass das Streptavidin in der nachfolgenden Reaktion an sie binden kann. Mittels der an das Streptavidin gebundenen Peroxidase entsteht eine Farbreaktion, deren Intensität photometrisch gemessen werden kann. Die Kapside wurden entweder an mit dem Antikörper A20 beschichtete oder unbeschichtete Platten gebunden. Die Beschichtung mit A20 gewährleistet, dass nur "ganze" Kapside getestet werden, während bei den unbeschichteten Platte alle Proteine an die Platte gebunden werden können.

Der Antikörper A1 erkennt sein Epitop innerhalb des N-Terminus von VP1, während das A69-Epitop im N-terminalen Bereich von VP1 und VP2 liegt. Bei dem Epitop des A20-Antikörpers handelt es sich um ein konformatives Epitop, das sich erst bei der Zusammensetzung der Kapside bildet. Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Antikörper nicht nur an intakte Kapside bindet, sondern auch an Subfragmente, die schon das spezifische Epitop ausgebildet haben (Wistuba et al., 1997). Die Erkennungssequenz des Antikörpers B1 befindet sich im C-terminalen Bereich von VP1, VP2 und VP3.

Für den Antikörperbindungstest (s. Kap. 4.7.5.1) wurde eine mit dem Antikörper A20 beschichtete 96 Loch-Mikrotiterplatte verwendet. Durch die Beschichtung wurde sichergestellt, dass bei dem Test nur "ganze" Kapside überprüft werden. Die Mikrotiterplatte wurde gemäß dem Auftragsschema in Abb. 5-22B mit auf Raumtemperatur erwärmten leeren und vollen wt AAV-2 Kapsidproben in den Konzentrationen 10<sup>9</sup>-10<sup>6</sup> Kapside/Loch versehen und inkubiert. Nachfolgend wurden die Kapside zuerst mit den vier biotinylierten Erstantikörpern (Ak) A1, A69, B1 und A20 und anschließend mit Streptavidin (SPO) inkubiert (s. schematische Darstellung in Abb. 5-22B). Die an das Streptavidin gekoppelte Peroxidase zeigt eine Farbreaktion mit Tetramethylbenzidin (TMB), deren Intensität mit Hilfe eines Photometers gemessen werden kann. Das Ergebnis des Antikörperbindungstests ist in Abb. 5-23 zu sehen. Dabei ist mit dem Antikörper A20 (orange) in den Diagrammen die stärkste Reaktion zu erkennen. Sowohl bei leeren (A), als auch bei vollen (B) AAV-2 Kapsiden war eine OD von etwa 2.7 messbar. Mit abnehmender Kapsidkonzentration wird auch die Antikörperreaktion geringer. Die Antikörper A1 (blau) und A69 (braun) lassen bei den leeren Kapsiden keine Reaktionen erkennen (Ausschlussgrenze OD = 0,35). Volle Kapside weisen eine leichte Reaktion mit A69 auf, während der Wert für A1 an der Ausschlussgrenze liegt. Der Antikörper B1 (grün) zeigt weder mit vollen, noch mit leeren Kapsiden eine Reaktion.



Abb. 5-23: Antikörperbindungstest von leeren und DNA-haltigen wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei Raumtemperatur und bei 70°C

A) Reaktion der biotinylierten Antikörper A1, A69, B1 und A20 mit leeren wt AAV-2 Kapsiden. Die Kapside wurden nach Erwärmung auf Raumtemperatur an A20 beschichtete Mikrotiterplatten gebunden. Der Nachweis der Antikörperreaktionen erfolgte mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin und einer darauf aufbauenden Farbreaktion, deren optische Dichte (OD) bei 450 nm gemessen wurde.

**B)** Reaktion der biotinylierten Antikörper A1, A69, B1 und A20 mit vollen wt AAV-2 Kapsiden. Der Nachweis wurde, wie unter A) beschrieben, durchgeführt.

**C)** Reaktion der biotinylierten Antikörper A1, A69, B1 und A20 mit erhitzten leeren wt AAV-2 **Kapsiden.** Die Kapside wurden nach Inkubation bei 70°C für 10 min über Nacht an unbeschichtete Mikrotiterplatten gebunden. Dadurch werden nicht nur ganze Kapside, sondern alle Proteine nachgewiesen. Der anschließende Nachweis der Antikörperreaktionen erfolgte wie unter A) beschrieben.

D) Reaktion der biotinylierten Antikörper A1, A69, B1 und A20 mit erhitzten vollen wt AAV-2 Kapsiden. Die Inkubation der Kapside, sowie der Nachweis der Antikörperreaktionen, wurden, wie unter C) beschrieben, durchgeführt.

In allen Diagrammen sind jeweils die Mittelwerte aus drei verschiedenen Versuchsansätzen, sowie die ermittelten Standardabweichungen dargestellt.

Zur Sicherstellung, dass die monoklonalen Antikörper wirklich in der Lage sind, ihre Epitope effizient zu erkennen, wurde ein weiterer Antikörperbindungstest durchgeführt, allerdings auf unbeschichteten Mikrotiterplatten (s. Kap. 4.7.5.2). Zusätzlich dazu wurden die eingesetzten Kapside, in der Annahme sie zu denaturieren, für 10 min auf 70°C erhitzt. In denaturierten Kapsiden müssten alle Antikörper, außer dem

A20, ihre Epitope eindeutig erkennen können. Abb. 5-23C+D zeigen das Ergebnis dieses Tests. Während die Reaktion mit dem Antikörper A20 bei leeren (C) Kapsiden in etwa gleich bleibt, ist eine deutliche Zunahme der A69-Bindung festzustellen. Auch die Reaktionen mit dem Antikörper A1 und vor allem mit dem B1-Antikörper erhöhen sich eindeutig. – Bei vollen Kapsiden ist eine leichte Abnahme der Reaktion mit dem A20-Antikörper zu erkennen, während die Reaktionen mit den N- und C-terminalen Antikörpern, ebenso wie bei den leeren Kapsiden, deutlich zunehmen.

Insgesamt ist bei den in Abb. 5-23 dargestellten Ergebnissen festzustellen, dass die N- und C-terminalen Antikörper in bei Raumtemperatur inkubierten leeren Kapsiden ihre Epitope nicht und bei DNA-haltigen Kapsiden leicht erkennen können. Das heisst, die N-Termini und auch die C-Termini liegen in "intakten" Viren zum größten Teil im Kapsidinneren. Durch das Erhitzen der Kapside auf 70°C werden jedoch die Epitope der Antikörper A1, A69 und B1 zugänglich, während die Möglichkeit für den Antikörpers A20, an sein Epitop zu binden, erhalten bleibt.

## 5.2.2 Antikörperbindungstest von VP1 bzw. VP2 defizienten AAV-2 Kapsiden mit den Antikörpern A1, A69, B1 und A20

Im Vergleich zu den leeren wt Kapsiden wurden auch die Kapside der VP-Mutanten dem Antikörperbindungstest unterzogen, indem sie an mit dem Antikörper A20 beschichteten Mikrotiterplatten gebunden wurden (s. Kap. 4.7.5.1). Die Kapside, bei denen VP1 deletiert worden war, zeigen in etwa das gleiche Reaktionsmuster mit den Antikörpern, wie die leeren wt Kapside (Abb. 5-24A). Bei den Kapsiden, denen VP2 fehlt, ist jedoch eine deutliche Reaktion mit dem Antikörper A69 zu messen (Abb. 5-24B) und auch mit A1 ist eine schwache Bindung erkennbar. Die A20-Reaktion ist ebenso stark, wie bei den VP1-defizienten Kapsiden und der Antikörper B1 kann nicht an sein Epitop binden.

Dies zeigt, dass durch die Deletion des VP2-Proteins Teile von VP1 einschließlich des Epitops von A69 von außen durch Antikörper zugänglich werden.



#### Abb. 5-24: Antikörperbindungstest von VP1- bzw. VP2- defizienten Kapsiden A) Reaktion der biotinylierten Antikörper A1, A69, B1 und A20 mit VP1 defizienten AAV-2 Kapsiden. Die Kapside wurden nach Erwärmung auf Raumtemperatur an A20 beschichtete Mikrotiterplatten gebunden und mit biotinylierten Antikörpern inkubiert. Der Nachweis der Antikörperreaktionen erfolgte mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin und einer darauf aufbauenden Farbreaktion, deren optische Dichte (OD) bei 450 nm gemessen wurde. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte aus drei verschiedenen Versuchsansätzen und den zugehörigen Standardabweichungen.

B) Reaktion der biotinylierten Antikörper A1, A69, B1 und A20 mit VP2 defizienten AAV-2 Kapsiden. Der Versuch wurde, wie unter A) beschrieben, durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus vier verschiedenen Versuchsansätzen mit den zugehörigen Standardabweichungen.

## 5.2.3 Antikörperbindungstest von DNA-enthaltenden und leeren wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei 65°C mit den Antikörpern A1, A69, B1 und A20

Die Tatsache, dass in Kapsiden, denen VP2 fehlt, der N-Terminus von VP1 von außen für die Antikörper A1 und A69 zugänglich wird, führte zu der Überlegung, unter welchen Bedingungen der VP1 N-Terminus der leeren und / oder vollen wt Partikel aus dem Kapsid heraustreten könnte. Ein erster Versuch dazu war, die Kapside einem zusätzlichen Stress auszusetzen, indem sie stark erhitzt wurden. Wie schon in Abb. 5-23C+D zu sehen ist, werden die N- und C-terminal gelegenen Epitope durch Erhitzen für die jeweiligen Antikörper zugänglich. Allerdings kann mit Hilfe der Inkubation auf unbeschichteten Mikrotiterplatten kein direkter Vergleich mit dem Antikörperbindungstest auf A20-gekoppelten Mikrotiterplatten gemacht werden und es konnte auch nicht eindeutig gezeigt werden, ob die AAV-2 Kapside durch Inkubation bei 70°C denaturiert werden. Deshalb wurden die leeren und vollen AAV-2 Kapside noch einmal auf die Zugänglichkeit für die Antikörper nach Erhitzen getestet. Zu diesem Zweck wurden die Kapside, wie unter 5.2.1 beschrieben, auf mit dem

Antikörper A20 beschichteten Mikrotiterplatten gebunden, jedoch vor dem Auftragen auf die Platte für 30 Minuten bei einer Temperatur von 65°C inkubiert. Nach Abstoppen der durch die an Streptavidin gekoppelten Peroxidase entstandenen Farbreaktion ließen sich folgende Ergebnisse für die einzelnen Antikörper ermitteln:



Abb. 5-25: Antikörperbindungstest von leeren und DNA-enthaltenden wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei 65°C

A) Reaktion der biotinylierten Antikörper A1, A69, B1 und A20 mit leeren wt AAV-2 Kapsiden. Die Kapside wurden nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 65°C an mit A20 beschichtete Mikrotiterplatten gebunden und mit den biotinylierten Antikörpern A1, A69, B1 und A20 inkubiert. Der Nachweis der Antikörperreaktionen erfolgte mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin und einer darauf aufbauenden Farbreaktion, deren optische Dichte (OD) bei 450 nm gemessen wurde. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte aus drei verschiedenen Versuchsansätzen und den zugehörigen Standardabweichungen.

B) Reaktion der biotinylierten Antikörper A1, A69, B1 und A20 DNA-haltigen wt AAV-2 Kapsiden. Der Versuch wurde, wie unter A) beschrieben, durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse sind ebenfalls Mittelwerte aus drei verschiedenen Versuchsansätzen und deren Standardabweichungen.

Sowohl bei der Reaktion mit den vollen, als auch mit den leeren Kapsiden zeigt sich nach der Inkubation bei 65°C (Abb. 5-25A+B) gegenüber der Inkubation bei Raumtemperatur (Abb. 5-23A+B) keine signifikante Veränderung der Reaktion mit dem A20-Antikörper. Auch die N- und C-terminalen Antikörper weisen im Vergleich zu der Inkubation bei Raumtemperatur bei beiden Kapsid-Präparationen keine eindeutigen Unterschiede auf.

Dies zeigt, dass durch die Inkubation bei 65°C keine Veränderung der Zugänglichkeit der N-Termini eintritt.

# 5.2.4 Dot-Blot Analyse von DNA-haltigen und leeren wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen

Als Vergleich zu dem Antikörperbindungstest auf Mikrotiterplatten mit und ohne Beschichtung mit dem Antikörper A20 wurde die Zugänglichkeit der N-Termini von VP1 und VP2 mit Hilfe eines Antikörperbindungstests auf einer Nitrocellulosemembran untersucht (s. Kap. 4.7.6). Bei diesem Versuch wurden dieselben Antikörper verwendet, wie bei dem Test in Mikrotiterplatten, jedoch wurden nicht nur die Kapside, die nach der Inkubation noch an den auf die Platte gekoppelten A20-Antikörper binden können, eingesetzt, sondern die gesamten Versuchsansätze, indem sie mit Hilfe einer "Dot-Blot"-Apparatur auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen wurden.



Abb. 5-26: Dot-Blot Analyse von wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen

A) Reaktion der Antikörper A1, A69, B1 und A20 mit leeren wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei drei verschiedenen Temperaturen.

B) Reaktion der Antikörper A1, A69, B1 und A20 mit DNA-haltigen wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei drei verschiedenen Temperaturen.

Die Kapside wurden bei beiden Versuchen für 30 min bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Die Immunreaktion erfolgte mit Hybridomüberständen der Antikörper und wurde mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham) sichtbar gemacht. Die Abbildung zeigt ein Beispiel von vier durchgeführten Versuchen.

In Abb. 5-26 sind die mittels Immundetektion (s. Kap. 4.7.1) sichtbar gemachten Proben dargestellt. Bei den leeren Kapsiden ist nach Inkubation bei 37°C und 65°C nur mit dem Antikörper A20 eine Reaktion zu erkennen. Die Inkubation bei 75°C, bei der die Kapside vollständig denaturiert werden, hat zur Folge, dass mit dem A20-Antikörper keine Bindung mehr stattfindet, während nun die Antikörper A1, A69 und B1 ihre Epitope erkennen. Dies bedeutet, dass unter diesen Testbedingungen die Nbzw. C-terminal gelegenen Epitope der Antikörper erst nach Denaturierung der Kapside zugänglich werden - Die vollen Kapside reagieren schon bei 37°C leicht mit

Ergebnisse

den Antikörpern A1 und A69. Diese Reaktionen verstärken sich nach der Inkubation bei 65°C, während die Bindung durch den A20-Antikörper in etwa gleich bleibt. Zusätzlich dazu tritt eine schwache Erkennung des B1-Epitops auf. Dies zeigt, ebenso wie ein Antikörperbindungstest auf Mikrotiterplatten (ohne A20-Beschichtung, Abb. 5-23C und D), dass bei vollen AAV-Partikeln bei der Inkubation bei 65°C entweder eine konformative Veränderung des Kapsids stattfindet und / oder ein Teil der Kapside liegt im dissoziierten Zustand vor, so dass die N- und C-terminalen Epitope für die entsprechenden Antikörper zugänglich werden. Die Inkubation bei 75°C resultiert ebenso wie bei den leeren Kapsiden in starken Reaktionen mit A1, A69 und B1, während die A20-Epitope nicht mehr detektierbar sind. Diese Reaktionen sind also ebenfalls, wie bei den leeren Kapsiden, auf die Denaturierung der Viruspartikel zurückzuführen.

# 5.3 Strukturelle und biochemische Untersuchungen der Kapside nach Inkubation unter verschiedenen Bedingungen

## 5.3.1 Negativ-Kontrastierung von wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen

Wenn volle wt Kapside auf biochemischer Ebene eine Veränderung in der Antikörperbindung nach Inkubation bei 65°C und 75°C zeigen, ist diese möglicherweise auch auf struktureller Ebene nachweisbar. Um dies zu überprüfen, wurden 2,5x 10<sup>11</sup> Kapside nach Inkubation bei 37°C, 65°C und 75°C mit Hilfe des Negativ-Kontrastierungsverfahrens (s. Kap. 4.11.1) im Elektronenmikroskop betrachtet. Abb. 5-27A zeigt die vollen wt Kapside nach Inkubation bei 37°C. Es sind deutlich volle (schwarzer Pfeil) und auch die immer in DNA-haltigen wt AAV-Präparationen auftretenden leeren Kapside zu erkennen. Nach Inkubation bei 65°C sind fast nur noch leere Kapside auf dem Foto zu sehen (Abb. 5-27B) und nach 75°C-Behandlung der Probe sind keine Kapside mehr zu erkennen (Abb. 5-27C). Dieses Ergebnis bestätigt das Vorhandensein von Kapsiden nach Erhitzen auf 65°C. Allerdings scheinen dabei die DNA-Genome größtenteils freigesetzt zu werden.



Abb. 5-27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen DNA-haltiger wt AAV-2 Kapside nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen

A) Negativ-Kontrastierung der AAV-Kapside nach Inkubation bei 37°C.

B) Negativ-Kontrastierung der AAV-Kapside nach Inkubation bei 65°C.

C) Negativ-Kontrastierung der AAV-Kapside nach Inkubation bei 75°C.

Bei dem Versuch wurden die Kapside 30 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert und anschließend mit 2 %iger Uranylacetat-Lösung gefärbt. Volle Kapside sind beispielhaft mit schwarzen Pfeilen markiert.

### 5.3.2 3D-Rekonstruktion von DNA-enthaltenden wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei 65°C

Elektronenkryomikroskopische Untersuchungen und eine dreidimensionale Rekonstruktion DNA-haltiger wt Kapside nach Inkubation bei 65°C ermöglichen genauere Aussagen über eventuelle Veränderungen der Kapsidhülle auf struktureller Ebene. Dazu wurden 2x 10<sup>13</sup> Kapside wie unter Kap. 4.11.2 beschrieben für die elektronenkryomikroskopische Analyse präpariert, fotografiert und nach Überprüfung der Qualität der Bilder 7400 der eingescannten AAV-Partikel für die Rekonstruktion verwendet. Die Äquatorialschnitte der bei 65°C inkubierten AAV-Kapside (oben) sind in Abb. 5-28 im Vergleich zu den bei Raumtemperatur untersuchten Kapsiden (unten) dargestellt. Beide Rekonstruktionen haben eine Auflösung von 10,5 Å (s. Kap. 4.11.5).

Da sowohl vor, als auch nach der Inkubation bei 65°C ein mehr oder weniger großer Anteil der Kapside ohne DNA vorlag, war es notwendig, die auf den Bildern sichtbaren Kapside jeweils in 4 Klassen zu unterteilen, um DNA-enthaltende und leere Partikel voneinander und von den Zwischenstufen unterscheiden zu können. Die Unterteilung erfolgte mit Hilfe des Bildverarbeitungscomputerprogramms IMAGIC V. Beim Vergleich der bei Raumtemperatur behandelten Kapside mit den bei 65°C inkubierten lässt sich feststellen, dass die grundsätzliche Struktur der Kapside durch das Erhitzen nicht verändert wird. Betrachtet man jedoch die globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen, scheinen sie bei den erhitzten vollen Kapsiden im Vergleich zu den bei Raumtemperatur behandelten zu verschwinden (schwarze Pfeile). Auch bei den leeren Kapsiden ist eine geringe Abnahme sichtbar. Außerdem sieht es so aus, als wäre in den Kanälen an den 5-fachen Symmetrieachsen sowohl bei den DNA-haltigen, als auch bei den leeren Kapsiden nach Inkubation bei 65°C eine zusätzliche Proteindichte vorhanden, die die Kanäle verengt (weiße Pfeile oben).



Abb. 5-28: Äquatorialschnitte von wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei 65°C und bei Raumtemperatur

Die Kapside wurden für 30 min entweder bei 65°C (oben) oder bei Raumtemperatur (unten) inkubiert, bevor sie vitrifiziert und im Elektronenmikroskop fotografiert wurden. Nach Überprüfung der Qualität der Aufnahmen wurden für beide Ansätze 3D-Rekonstruktionen berechnet. Dabei sind die Kapside jeweils in 4 Klassen unterteilt worden, um DNA-haltige und leere Kapside voneinander und von den Zwischenstufen unterscheiden zu können. Von jeder Klasse wurde anschließend eine einzelne 3D-Rekonstruktion berechnet. Schwarze Pfeile markieren die vorhandenen (unten) bzw. nicht vorhandenen (oben) globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen. Weiße Pfeilen markieren die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen der erhitzen vollen und leeren Kapsiden.

Beim Vergleich der Außen- und Innenansichten der Kapsidhüllen (Abb. 5-29) scheinen sich die Ergebnisse der Äquatorialschnitte zu bestätigen. Die generelle Struktur der Kapside ist unverändert und die Globuli an den 2-fachen Symmetrieachsen sind bei der Rekonstruktion der bei 65°C inkubierten Kapside etwas kleiner als bei den bei Raumtemperatur behandelten Partikeln (B) (weiße Pfeile). Außerdem wirken die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen bei den erhitzten Kapsiden etwas schmaler (graue Pfeile) und die Kapsidhülle insgesamt etwas dicker und runder, als die der bei Raumtemperatur inkubierten Kapside. Beim Vergleich der äußeren Kapsidoberflächen (A) ist auffällig, dass die Kanäle an den 3-fachen Symmetrieachsen bei der RT-Rekonstruktion offen sind, während sie bei der 65°C-Rekonstruktion verschlossen aussehen. – Jedoch muss hier beachtet werden, dass es sich bei den Außen- und Innenansichten jeweils um die Rekonstruktionen der gesamten ausgewählten Kapside handelt, d.h., es sind keine Klasseneinteilungen durchgeführt worden.-



Abb. 5-29: 3D-Oberflächenrekonstruktion von DNA-haltigen AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei 65°C und bei Raumtemperatur

**A)** Außenansichten der 3D-Rekonstruktionen. B) Innenansichten der 3D-Rekonstruktionen. Beide Rekonstruktionen haben eine Auflösung von 10,5 Å und zeigen die Ansichten mit Blickrichtung auf eine der 2-fachen Symmetrieachsen. Weiße Pfeile markieren die globulären Strukturen an den 2fachen Symmetrieachsen, graue die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen.

## 5.3.3 Dot-Blot Analyse der DNA-haltigen und der leeren wt AAV-2 Kapsidpräparationen nach Inkubation bei verschiedenen pH-Werten

Zusätzlich zu den Untersuchungen der Kapside bei unterschiedlichen Temperaturen wurden die Kapside auch in Puffern mit verschiedenen pH-Werten inkubiert, um einen physiologisch relevanten Stresszustand herbeizuführen, der im Verlauf einer Infektion beim Durchgang durch die Endosomen (Bartlett et al., 2000) auf die Kapside einwirkt. Die dabei auf eine Nitrocellulosemembran (s. Kap. 4.7.6) aufgetragenen Ansätze wurden mit Hilfe einer Immunreaktion (s. Kap. 4.7.1) nachgewiesen und sind in Abb. 5-30 zu sehen.



Abb. 5-30: Dot-Blot Analyse von DNA-haltigen Kapsiden nach Inkubation in Puffern mit verschiedenen pH-Werten

A) Reaktion der Antikörper A1, A69, B1 und A20 mit leeren wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation mit verschiedenen pH-Werten.

B) Reaktion der Antikörper A1, A69, B1 und A20 mit DNA-haltigen wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation mit verschiedenen pH-Werten.

Die Kapside wurden in beiden Versuchen für 30 min in den jeweiligen Puffern bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Die Immunreaktion erfolgte mit Hybridomüberständen der Antikörper und wurde mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham) sichtbar gemacht. In der Abbildung ist je ein Beispiel von vier durchgeführten Versuchen zu sehen. Die unter **B**) mit A1\* bezeichnete Spur stellt eine längere Exposition der Spur A1 dar.

Bei den Ansätzen nach Inkubation mit verschiedenen pH-Werten zeigt sich ein ähnliches Bild wie nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen (s. Kap. 5.2.4). Während leere Kapside bei keinem der verwendeten pH-Werte zwischen pH 7,0 und pH 3,0 eine Reaktion mit den Antikörpern A1, A69 oder B1 zeigen, erkennt der A20-Antikörper seine Epitope immer in gleichem Maße. Das heißt, dass leere Kapside unter diesen Bedingungen weder zerfallen, noch eine Konformationsänderung erfahren, so dass die Epitope der Antikörper A1, A69 und B1 von außen erkannt werden können. - Volle Kapside hingegen binden schon bei pH 7,0 leicht, und ab pH 4,0 verstärkt an den Antikörper A69. Auch der Antikörper B1 erkennt ab pH 4,5 deutlich sein Epitop. Eine geringe Reaktion des Antikörpers A1 (besser sichtbar in einer längeren Exposition in Spur A1\*) tritt ebenfalls schon bei pH 7,0 ein und verstärkt sich ab pH 4,0. Die Bindung des Antikörpers A20 an die Kapside scheint mit abnehmendem pH etwas geringer zu werden. Volle Kapside könnten somit bei niedrigen pH-Werten entweder eine konformative Veränderung durchmachen oder sie sind partiell dissoziiert.

## 5.3.4 Southern-Blot Analyse von DNA-haltigen AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten zur Lokalisation der DNA

Das Ergebnis, dass sowohl beim Negativ-Kontrastierungsverfahren, als auch bei der Elektronenkryomikroskopie in der Probe voller AAV Partikel nach Inkubation bei 65°C vermehrt leere Kapside zu sehen waren, ließ die Frage aufkommen, unter welchen Bedingungen die DNA in den Kapsiden zugänglich wird. Zu diesem Zweck wurden volle Kapside nach verschiedenen Inkubationsbedingungen mittels eines Southern-Blots analysiert (s. Kap. 4.8.2). Die Proben wurden dabei entweder in einem Puffer mit pH 7,5, pH 4,5 oder pH 3,0 und zusätzlich bei 37°C oder 65°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Virus-Präparationen mit DNase I behandelt, um die freigesetzte DNA zu entfernen. Nach Extraktion der noch vorhandenen, geschützten DNA gemäß Kapitel 4.8.1.2 wurden die Proben in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und mittels einer Southern-Blot Analyse nachgewiesen. Der Blot ist in Abb.5-31 abgebildet.





Bei dem Marker (M) in der Spur 1 handelt es sich um ein 4,7 Kb großes DNA-Fragment, das auf der Höhe von doppelsträngiger (ds) DNA läuft. Die Spuren 2 bis 4 zeigen die AAV-DNA nach Inkubation der Viren in Lagerungspuffer (pH 7,5) bei 37°C (Spur 2) bzw. 65°C (Spur 3+4). Während nach Inkubation bei 37°C die DNA für den DNase I Verdau nicht zugänglich wird und eine starke Bande auf der Höhe des einzelsträngigen DNA-Genoms (ss-DNA) auftritt, ermöglicht die 65°C-Behandlung eindeutig den Abbau der DNA durch DNase I (Spur 3). Dieser Abbau unterbleibt, wenn keine DNase I eingesetzt wird, was die DNA-Bande auf der Höhe von ss-DNA beweist (Spur 4). Ein Teil der DNA scheint jedoch bei der Inkubation bei 65°C aus den Kapsiden herauszutreten und sich zu doppelsträngiger DNA zusammenzulagern, wodurch es zu der Bande auf der Höhe von ds-DNA kommt. Inkubation der Probe bei 37°C und pH 4,5 bzw. pH 3,0 ermöglicht ebenfalls die Möglichkeit des DNA-Abbaus durch DNase I (Reihe 5+6). Dies zeigt, dass bei niedrigen pH-Werten oder Erwärmung auf 65°C entweder eine konformative Veränderung oder eine partielle Dissoziation der Kapside eintritt, so dass der Abbau der Virus-DNA durch DNase I ermöglicht wird.

## 5.4 Untersuchungen über den Einfluß von Heparin auf die AAV-2 Kapside

Heparansulfat-Proteoglykan ist ein natürlicher Zellbindungs-Rezeptor für AAV-2 (Summerford and Samulski, 1998). Diese Bindung kann durch Heparin kompetitiert werden, weshalb dieses *in vitro* häufig als Ersatz für Heparansulfat eingesetzt wird. In dieser Arbeit wurden 6 kDa große Heparinmoleküle verwendet.

### 5.4.1 Zellbindungstest von leeren wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation mit verschiedenen Mengen von 6kDa großen Heparinmolekülen

Die Bindungseigenschaften von Heparin an AAV-2 Kapside wurden mit Hilfe eines Zellbindungstests überprüft. Dazu wurden je 10<sup>10</sup> leere AAV Kapside für 30 min mit verschiedenen Heparinmengen (0,1-100 µg) inkubiert, bevor sie in gekühltem Zustand zu kurz auf Eis vorgekühlten HeLa- Zellen gegeben wurden. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 60 min, bevor die an die Zellen gebundenen Kapside mit Methanol fixiert wurden. Eine Inkubationstemperatur von 4°C bewirkt, dass die Kapside, die nicht mit den vorher zugegebenen Heparinmolekülen abgesättigt wurden, an die Zellen binden, jedoch nicht in sie hineingehen, so dass sie nach der Fixierung mit Hilfe des Antikörpers A20 nachgewiesen werden können (s. Kap. 4.7.3). Abb. 5-32 zeigt das Ergebnis des Bindungstests.



**Abb. 5-32: Kompetition der Zellbindung von AAV-2 Kapsiden durch Heparin** 10<sup>10</sup> leere AAV-2 Kapside wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen von 6kDa großen Heparinmolekülen für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zu HeLa-Zellen in Mikrotiterplatten gegeben und bei 4°C inkubiert, damit die nicht mit Heparin abgesättigten Kapside an die Zellen binden konnten. Diese Kapside wurden anschließend mit dem biotinylierten Antikörper A20 inkubiert und mittels an Streptavidin gekoppelter Peroxidase nachgewiesen. Die durch die Peroxidase katalysierte Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Die Anzahl der an die Zellen gebundenen Kapside nimmt mit zunehmender Heparinmenge ab. Jedoch sinkt der OD-Wert auch bei einer Zugabe von 100 µg Heparin/Ansatz nicht auf den Wert der Negativkontrolle (DMEM), sondern bleibt bei etwa 0,34. Das bedeutet, dass Heparin in der Lage ist, die Bindestellen an den AAV-2 Kapsiden zu besetzen und somit die Bindung der Viren an die Zellen zu hemmen.

## 5.4.2 3D-Rekonstruktion von vollen wt AAV-2 Kapsiden nach Inkubation mit 6kDa großen Heparinmolekülen

Die für die Bindung von Heparin an AAV-2 Kapsiden relevanten Aminosäuren befinden sich seitlich der Spitzen an den 3-fachen Symmetrieachsen (Kern et al., 2003, Opie et al., 2003). In dieser Arbeit sollte diese Bindestelle bestätigt und zusätzlich untersucht werden, ob Heparin eine strukturelle Veränderung der AAV-2 Kapside bewirkt. Dazu wurden volle AAV Kapside nach Zugabe von Heparin (Verhältnis Bindestelle am Kapsid zu Heparinmolekül = 1:100) elektronenkryomikroskopisch untersucht (s. Kap 4.11.2) und aus 4620 eingescannten Partikeln eine dreidimensionale



Rekonstruktion berechnet. Diese hat eine Auflösung von 10,5 Å (s. Kap. 4.11.5) und ist in Abb. 5-33C zu sehen.

Abb. 5-33: 3D-Rekonstruktionen von DNA-enthaltenden AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei Raumtemperatur, 65°C und mit 6 kDa großen Heparinmolekülen

A) 3D-Rekonstruktion nach Inkubation bei Raumtemperatur. B) 3D-Rekonstruktion nach Erhitzen auf 65°C. C) 3D-Rekonstruktion nach Zugabe von Heparin. Alle Rekonstruktionen weisen eine Auflösung von 10,5 Å auf. Die Ansichten der inneren (Mitte) und äußeren (unten) Kapsidoberflächen sind mit Blickrichtung auf eine der 2-fachen Symmetrieachsen. Der schwarze Pfeil deutet bei den Außenansichten auf den Kanal an einer 5-fachen Symmetrieachse. Bei den Innenansichten sind die Globuli an den 2-fachen Symmetrieachsen markiert. Die bei den Äquatorialschnitten der Kapside (unten) sichtbaren globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen sind mittels schwarzer Pfeile und die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen mittels weißer Pfeile gekennzeichnet.

Beim Vergleich der in Abbildung 5-33 sichtbaren Rekonstruktionen von AAV-2 Kapsiden nach Inkubation bei Raumtemperatur, 65°C und mit Heparin ist zu beachten, dass hier, wie in der Abbildung 5-29, die gesamten Daten ohne Klassifizierungen dargestellt sind. Die äußeren Oberflächen zeigen dabei nur an den 3-fachen Symmetrieachsen Unterschiede. Die Poren, die an der äußeren Kapsidoberfläche der unbehandelten Kapside offen sind (A, schwarzer Pfeil), weisen bei den mit Heparin inkubierten Kapsiden einen geringeren Durchmesser auf (C) und sind bei den auf 65°C erhitzten Kapsiden (B) geschlossen. Die Innenansichten der erhitzten Kapside und nach Inkubation bei 65°C unterscheiden sich auf den ersten Blick nicht. Gegenüber den bei Raumtemperatur behandelten Kapsiden scheinen jedoch in beiden Rekonstruktionen die globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen in verkleinertem Zustand vorzuliegen (schwarzer Pfeil) und die Kapsidhülle ist jeweils etwas dicker und runder. Der Vergleich der Äguatorialschnitte ermöglicht eine noch genauere Differenzierung. Die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen sind bei den Kapsiden nach Heparinzugabe leer, wie bei den unbehandelten Kapsiden, während bei den erhitzten Kapsiden eine zusätzliche Proteindichte in den Kanälen zu sehen ist (weiße Pfeile). Die Dichten der globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen der mit Heparin inkubierten Kapside sind stärker, als bei den erhitzten Kapsiden (schwarze Pfeile). Außerdem scheint die gesamte Proteindichte im Kapsidinneren der mit Heparin versetzten, wie auch bei den bei 65°C inkubierten Partikeln, schwächer zu sein, als bei den unbehandelten Kapsiden, was auf eine insgesamt geringere Menge an DNA-haltigen Kapsiden in der Probe schließen lässt. Insgesamt lässt sich somit sagen, dass bei Zugabe von Heparin im Vergleich mit der Innenansicht der erhitzten Kapside ebenfalls eine Konformationsänderung des Kapsids stattzufinden scheint, die sich jedoch anhand der Äguatorialschnitte, in denen die Details besser zu sehen sind, nicht bestätigen lässt. Eine Erwärmung der Kapside auf 65°C dagegen bewirkt eine konformative Veränderung, die zur Abnahme der globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen führt. Außerdem verengen sich die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen.

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kapsidhülle von AAV-2 auf struktureller und biochemischer Ebene analysiert. Während der Infektion spielt der N-terminale Bereich des VP1-Proteins eine wichtige Rolle. Er enthält eine Phospholipase A Domäne, deren Aktivität für eine effiziente Infektion mit AAV-2 notwendig ist. Der genaue Mechanismus und Zeitpunkt der Zugänglichkeit des VP1-N-Terminus im Laufe des AAV-Infektionsweges ist bisher noch nicht bekannt. Ebenso konnte die Position des N-terminalen Bereichs im Kapsid weder für VP1 noch für die beiden anderen Strukturproteine VP2 und VP3 bestimmt werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit versucht, mit Hilfe von Mutanten und unterschiedlichen Inkubationsbedingungen genauere Angaben über die Lokalisation der N-terminalen Bereiche der VP1- und VP2-Proteine, sowie deren Zugänglichkeit auf dem Kapsid zu erhalten.

### 6.1 Struktur von AAV-2 Kapsiden

### 6.1.1 Strukturelle Analyse von leeren AAV-2 Kapsiden

Die Struktur von leeren AAV-2 Kapsiden wurde mit Hilfe der Elektronenkryomikroskopie und anschließender dreidimensionaler Bildrekonstruktion ermittelt (Abb. 5-5A). Die Rekonstruktion, für deren Berechnung die ikosaedrische Symmetrie angenommen wurde, besitzt eine Auflösung von 10,5 Å. Im Vergleich mit anderen mittels Röntgenstrukturanalyse (Agbandje et al., 1994; Xie und Chapman, 1996; Agbandje-McKenna et al., 1998; Simpson et al., 1998, 2000) oder Elektronenkryomikroskopie (Chipman et al., 1996; McKenna, 1999) untersuchten Parvoviren ist auffällig, dass sich die Viruskapside an ihrer inneren Oberfläche sehr ähneln, während es bei den äußeren Oberflächen eine große Variabilität gibt. Die größte Ähnlichkeit bezüglich der äußeren Oberfläche besitzt AAV-2 mit dem "aleutian mink disease parvovirus (ADP) (Abb. 6-1), während das Hundeparvovirus (CPV) und das B19-Virus deutliche Unterschiede zeigen.



Abb. 6-1: Vergleich der Außenansichten verschiedener Parvoviren

Die Viruskapside sind alle mit einer Auflösung von 20 Å dargestellt. Die Rekonstruktionen wurden anhand der Röntgenstrukturdaten für CPV (Tsao et al., 1991) und der elektronenkryomikroskopischen Daten für B19 (Chipman et al., 1996), ADP (McKenna et al, 1999) und AAV-2 (diese Arbeit) berechnet.

Ein Sequenzvergleich zwischen AAV-2 und ADP ergab allerdings, dass sie nur zu 13 % identisch sind (Chapman und Rossmann, 1993). Bei dem Sequenzvergleich, in den noch weitere Parvoviren miteinbezogen wurden, konnte auch ermittelt werden. dass die Sequenzen von AAV-2 mit B19 zu 18 % und mit CPV zu 20 % identisch sind, so dass die Ähnlichkeit zwischen AAV-2 und ADP eventuell eher zufällig ist. Chapmann und Rossman konnten jedoch zeigen, dass die parvoviralen Sequenzen im Bereich der 3-fachen Symmetrieachsen große Unterschiede aufweisen, während es an den 5-fachen Symmetrieachsen stark konservierte Regionen gibt. Diese befinden sich an dem Wall, der die 5-fachen Symmetrieachsen umgibt (Abb. 5-5E, schwarzer Pfeil), sowie an der Innenseite der 5-fachen Symmetrieachsen (Abb. 5-5F). Für einen direkten Vergleich wurden die Röntgenstrukturdaten des Hundeparvovirus (CPV) (pdb 1C8D; Simpson et al., 2000) mit der in dieser Arbeit berechneten dreidimensionalen Rekonstruktion übereinander gelegt (Kronenberg et al., 2001). Die Sequenzen der beiden Viren sind zwar nur zu 20 % identisch (Chapman und Rossmann, 1993), aber um die 5-fachen Symmetrieachsen herum und an den β-Faltblatt-Strukturen stimmt die Struktur sehr gut überein.

In der Röntgenstruktur von AAV-2 (Xie et al., 2002), sowie in allen anderen bisher berechneten Strukturen von Parvoviren fehlt die exakte Lokalisation der N-terminalen Bereiche der Kapsidproteine. Da die Kapsidproteine nicht im gleichen Verhältnis in die Kapside eingebaut werden, ist es schwierig, die Position der N-Termini der Proteine, die nur in sehr geringer Anzahl im Kapsid vorliegen, genau zu bestimmen. Bei einigen Parvoviren gibt es jedoch Hinweise, dass die N-Termini durch die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen von innen nach außen gelangen (Tsao et al., 1991; Agbandje et al., 1994; Xie und Chapman, 1996; Agbandje-McKenna et al., 1998). Zur Ermittlung der dreidimensionalen Rekonstruktion von AAV-2 Kapsiden wurden in dieser Arbeit die Symmetrieelemente eines Ikosaeders verwendet. Dadurch ist es nicht möglich, die N-terminalen Bereiche der Kapsidproteine VP1 und VP2 individuell zu ermitteln. VP1 und VP2 besetzen symmetrisch äguivalente Positionen im Kapsid und bilden zudem bei einer Stöchiometrie der Kapsidproteine von etwa 1:1:8 (Johnson et al., 1971, Salo and Mayer, 1977) nur ein Fünftel der Gesamtproteinmenge. Zusätzlich dazu werden die Strukturen der VP1- und VP2-Proteine bei der Berechnung mit denen der VP3-Proteine gemittelt, wodurch die Unterschiede noch einmal geringer werden. Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Daten ist es jedoch im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse unter Umständen möglich, auch variable Regionen zu bestimmen. Die hier vorliegende 3D-Rekonstruktion weist globuläre Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen auf, die, im Gegensatz zur umgebenden Proteindichte, etwas weniger scharf abgegrenzt sind (Abb. 5-5B, schwarzer Kreis, Abb. 5-6A bis C, weiße Pfeilköpfe). Hierbei könnte es sich um die aus den N-Termini der drei VP-Proteine bestehenden variablen Regionen handeln. Zusätzlich dazu sind die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen, die in den Rekonstruktionen einiger Parvoviren teilweise gefüllt sind (Agbandje, 1994; Xie und Chapman, 1996; Agbandje-McKenna et al., 1998), in der hier vorliegenden Rekonstruktion von leeren AAV-2 Kapsiden eindeutig leer (Abb. 5-6B, schwarzer Pfeil). Bei den autonomen Parvoviren findet sich in dem N-terminalen Bereich, der durch den Kanal an die äußere Oberfläche geht, eine stark konservierte Glycin-reiche Region. Diese Region, die den anderen Viren den Durchgang durch den engen Kanal ermöglicht, fehlt in der Seguenz von AAV-2 (Chapman und Rossmann, 1993), so dass die N-Termini vermutlich nicht durch den Kanal hindurchkönnen. Die fehlenden Aminosäuren der VP1- und VP2-N-Termini könnten sich demnach in den globulären Strukturen an den 2-fachen Sym-

Diskussion

metrieachsen befinden. Diese Strukturen, sind in den Rekonstruktionen von CPV und B19 (Agbandje et al., 1994) nicht vorhanden.

Außerdem gibt es in einem AAV-2 Kapsid dreißig äquivalente Positionen an den 2fachen Symmetrieachsen und bei einer angenommenen Stöchiometrie der Strukturproteine von 1:1:8 aber nur zwölf N-Termini der VP1 und VP2 Proteine. Aus diesem Grund wäre eine variable Besetzung der 2-fachen Symmetrieachsen, die zu einer, im Vergleich zu der restlichen Proteindichte, weniger scharf begrenzten Struktur führt, durchaus denkbar.

Zusätzlich zu den Vergleichen mit den anderen Parvoviren und anhand theoretischer Überlegungen, kann die Hypothese, dass die N-Termini der VP1- und VP2-Proteine im Kapsidinneren liegen, mit Hilfe eines Antikörperbindungstests gestützt werden (Abb. 5-23A und B). Dabei wurden zwei monoklonale Antikörper verwendet, die VP1bzw. VP1/VP2-spezifische Epitope besitzen (Wistuba et al., 1997; Wobus et al., 2000). Die Antikörper sind bei intakten leeren Kapsiden nicht in der Lage, an ihre Epitope zu binden (Abb. 5-23A). Durch Erhitzen der Kapside auf 70°C wird diese Bindung jedoch möglich (Abb. 5-23C), da die Kapside im dissoziierten Zustand vorliegen.

# 6.1.2 Vergleich der elektronenkryomikroskopischen Rekonstruktion von AAV-2 mit der Röntgenstruktur

Um die Daten der Röntgenstrukturanalyse von AAV-2 (Xie et al., 2002) mit den in dieser Arbeit erhaltenen elektronenkryomikroskopischen Daten vergleichen zu können, wurden die jeweiligen dreidimensionalen Rekonstruktionen berechnet. Abb.6-2 zeigt die äußeren und inneren Oberflächen der beiden Darstellungen des AAV-2 Kapsids mit einer Auflösung von 10,5 Å. Die äußeren Oberflächen unterscheiden sich zwar dadurch, dass die Proteindichten bei der Röntgenstruktur (Abb. 6-2B) etwas exakter abgegrenzt sind, weisen aber ansonsten die gleichen strukturellen Formen auf. Beim Vergleich der inneren Oberflächen ist dagegen deutlich zu sehen, dass bei der Röntgenstruktur die globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen fehlen (schwarze Pfeile).



Abb. 6-2: Vergleich Elektronenkryomikroskopie versus Röntgenstruktur Oberflächendarstellung der äußeren und inneren Oberfläche des AAV-2 Kapsids. A) Rekonstruktion aus elektronenkryomikroskopischen Daten. B) Rekonstruktion mittels Röntgenstrukturdaten (Xie et al., 2002). Beide Rekonstruktionen besitzen eine Auflösung von 10,5 Å. Signifikante Unterschiede sind an den 2fachen Symmetrieachsen zu sehen. Dort fehlen die Globuli in der mittels Röntgenstrukturdaten ermittelten Rekonstruktion (schwarze Pfeile).

Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse von AAV-2 war es möglich, die Aminosäuren des VP3-Proteins nach Aminosäure 14 zu lokalisieren. Die Lage der N-Termini der VP1- und VP2-Proteine konnten nicht festgelegt werden, obwohl sich beide Proteine in den verwendeten Kristallen befanden (Xie et al., 2002). Wie weiter oben schon erwähnt, ist es schwierig, variable Strukturen mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse zu bestimmen. Betrachtet man die in Abbildung 1-2 dargestellte Struktur einer AAV-Untereinheit, lässt sich erkennen, dass der N-terminale Strang des VP3-Proteins von der β-Faltblattstruktur in Richtung der 5-fachen Symmetrieachse verläuft, kurz davor jedoch die Richtung ändert und auf die 2-fache Symmetrieachse zugeht. Somit ist es möglich, dass sich die N-Termini der VP-Proteine an der 2-fachen Symmetrieachse befinden, wodurch die Hypothese, dass die N-Termini in den globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen vorliegen, weiter unterstützt wird.

### 6.1.3 Vergleichende Analyse von vollen und leeren AAV-2 Kapsiden

Die Rekonstruktionen der leeren und der DNA-haltigen AAV-2 Kapside weisen beide die Globuli an den 2-fachen Symmetrieachsen auf (Abb. 5-9B und C). Bei den DNAhaltigen Kapsiden scheinen sie beim Betrachten der inneren Oberfläche vergrößert zu sein (Abb. 5-9B, schwarzer Pfeil). Wahrscheinlicher ist es jedoch, dass der Unterschied aufgrund der im Äquatorialschnitt in der Mitte der vollen Kapside sichtbaren DNA zustande kommt (Abb. 5-9C unten). Die Globuli ragen in die Dichte der DNA hinein (schwarzer Pfeil), wodurch es schwierig wird, die beiden Strukturen zu differenzieren. Außer dem Unterschied an den Globuli ist noch eine Veränderung an der Außenseite der Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen zu erkennen, durch die die Kanäle verschlossen zu sein scheinen. Jedoch tritt an der 5-fachen Symmetrieachse bei der Berechnung der dreidimensionalen Rekonstruktion immer ein Rauschen auf, wodurch eine exakte Differenzierung von Proteindichten erschwert wird. Somit lässt sich nicht genau sagen, ob an der Stelle eine Veränderung gegenüber den leeren Kapsiden vorliegt.

Im biochemischen Vergleich der beiden Kapsidtypen mit Hilfe eines Antikörperbindungstests wäre aufgrund der strukturellen Analyse ebenfalls zu erwarten, dass kein Unterschied zu erkennen ist. Jedoch zeigt der Antikörper A69, dessen Epitop im Nterminalen Bereich von VP1 und VP2 liegt, eine leichte Reaktion mit den vollen Kapsiden (Abb. 5-23B). Bei dem Antikörper A1, der sein Epitop nur im N-terminalen Bereich von VP1 hat, lässt sich dagegen nicht genau feststellen, ob eine Reaktion stattgefunden hat, da der gemessene Wert ungefähr an der Ausschlussgrenze (OD = 0,35) liegt. D.h., der N-terminale Bereich von VP2 und eventuell auch von VP1 ist bei den DNA-haltigen Kapsiden geringfügig von außen zugänglich.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen an CPV und MVM, bei denen die N-Termini der VP2-Proteine in DNA-enhaltenden Partikeln, jedoch nicht in leeren, von außen am Kapsid zugänglich sind (Tullis et al., 1993; Xie und Chapman, 1996; Cotmore et al., 1999). Dabei wird postuliert, dass die N-Termini durch die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen an die äußere Oberfläche gelangen, wodurch es sich bei den verschlossen aussehenden Kanälen an den 5-fachen Symmetrieachsen der DNA-haltigen Kaspide eventuell doch um eine Veränderung handeln könnte. Die Tatsache, dass die N-Termini in DNA-haltigen Kapsiden zugänglich sind und trotzdem die Globuli an den 2-fachen Symmetrieachsen vorhanden sind, steht allerdings
im Widerspruch zu der Hypothese, dass sich die N-terminalen Bereiche der VP-Proteine in diesen Regionen befinden. Beim Vergleich der Reaktionen der Antikörper mit den vollen Kapsiden nach Inkubation bei Raumtemperatur und bei 70°C wird jedoch deutlich, dass bei Raumtemperatur nur ein Teil der N-Termini zugänglich ist. Da aber die Globuli aus den N-terminalen Bereichen aller drei VP-Proteine bestehen, bleibt der Großteil der Struktur erhalten.

#### 6.2 Auswirkungen der Deletion eines der VP-Proteine

#### 6.2.1 Strukturelle Auswirkungen der Deletion von VP1, VP2 oder VP3

Um eventuell weitere Hinweise über die Lokalisation der N-Termini der VP-Proteine zu bekommen und um herauszufinden, ob die Deletion eines der VP-Proteine zu einer Veränderung der Kapsidstruktur führt, wurden Mutanten hergestellt. Bei denen die Expression jeweils eines der Kapsidproteine durch Punktmutation verändert worden war. Die Überprüfung der Proteinexpression mittels Western-Blot Analyse zeigte dabei, dass die Produktion von VP1 bzw. VP2 in den entsprechenden Mutanten unterbleibt (Abb. 5-13, Spur 1 und 2), während die Expression des VP3-Proteins entweder geschwächt (Abb. 5-13, Spur 3) oder, aufgrund der Punktmutationen von zwei der drei ATG-Kodons im Gen von VP3, ein verkürztes VP3-Protein vom dritten ATG an exprimiert wird (Abb. 5-13, Spur 4).

Die Fähigkeit der mutierten Plasmide, die entsprechenden VP-Proteine zu exprimieren wurde zusätzlich auch mit Hilfe eines indirekten Immunfluoreszenztests überprüft. Dabei konnte gleichzeitig die Zusammenlagerung der Proteine zu Kapsiden nachgewiesen werden. Bei den Plasmiden, die eine veränderte Expression des Hauptkapsidproteins VP3 aufweisen (pTG3602∆E3/VP2ATG und pTG3602AE3/AVP3) wird deutlich, dass eine Kapsidbildung ohne VP3 nicht möglich ist und die vereinzelten Kapside nur aufgrund der geringen VP3-Expression entstehen (Abb. 5-14, A20-Reaktion). Da die Menge der so gebildeten Kapside zu gering ist, um weitere Untersuchungen damit durchzuführen (s. Kap. 5.1.3.3), erfolgte eine Kapsidproduktion und -präparation nur mit den Plasmiden pTG3602AE3/AVP1 und pTG3602AE3/AVP2. Dabei zeigte sich zunächst bei der Herstellung und Aufreinigung der mutanten Kapside kein Unterschied im Vergleich zu den wt AAV-2 Kapsiden. Auch bei den elektronenmikroskopischen Analysen konnte zuerst nichts Auffälliges festgestellt werden (Abb. 5-17 A und B). Anhand der dreidimensionalen Bildrekonstruktionen der mutanten Kapside wird allerdings deutlich, dass die Form der Kapside und die äußere Oberfläche zwar mit der der wt AAV-Kapside übereinstimmen, an der inneren Oberfläche jedoch sowohl bei den VP1-defizienten Kapsiden, als auch bei den Kapsiden ohne VP2 die globulären Strukturen an den 2fachen Symmetrieachsen fehlen (Abb. 5-9B und C, Abb. 5-18D und E). Gemäß der Hypothese, dass es sich bei den Globuli an den 2-fachen Symmetrieachsen um die N-Termini der VP-Proteine handelt, entspricht das Ergebnis, dass die Deletion eines der VP-Proteine zum Verlust der Globuli führt, genau den Erwartungen.

Zusätzlich dazu tritt in beiden Rekonstruktionen eine zusätzliche Proteindichte an den Kanälen entlang der 5-fachen Symmetrieachsen auf (Abb. 5-18E, weißer Pfeil, Abb. 6-3B, schwarzer Pfeil), die in der Rekonstruktion der leeren wt Kapside fehlt (Abb. 5-9C, 6-3A). Diese veränderte Proteindichte stimmt mit den Proteindichten überein, die an den 5-fachen Symmetrieachsen der Rekonstruktion des CPV (PDB 1CD8) zu sehen sind (Abb. 6-3C, schwarzer Pfeil). Für das Hundeparvovirus wird postuliert, dass der N-terminale Bereich von VP2 durch den Kanal an der 5-fachen Symmetrieachse an die äußere Kapsidoberfläche gelangt (Tsao et al., 1991; Cotmore et al., 1999) und auch der N-Terminus von VP1 kann durch den Kanal an der 5-fachen Symmetrieachse (Xie und Chapman, 1996).



Abb. 6-3: Vergleich der Proteindichten an den Kanälen der 5-fachen Symmetrieachsen von wt AAV, AAV ΔVP2 und CPV

Dargestellt sind Ausschnitte der Äquatorialschnitte von leeren wt AAV-Kapsiden, leeren AAV-Kapsiden, bei denen VP2 deletiert ist, und von CPV-Kapsiden (1CD8.pdb, Simpson et al., 2000). Schwarze Pfeile markieren die zusätzlichen Proteindichten, die bei leeren VP2-defizienten AAV-2- und bei CPV-Partikeln vorhanden sind.

Beim Vergleich der Form der Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen ist auffällig, dass der Kanal bei AAV-2 im Gegensatz zu dem bei CPV an der inneren Oberfläche breiter ist, als an der äußeren Oberfläche. Wie weiter oben schon erwähnt, ermöglichen Glycin-reiche Regionen in den N-terminalen Bereichen von VP1 und VP2 von CPV den Durchtritt der Proteine durch den Kanal. Die Regionen sind bei AAV-2 nicht vorhanden. Aufgrund des breiteren Kanals an der 5-fachen Symmetrieachse, ist jedoch anzunehmen, dass die AAV-Proteine diese Regionen nicht benötigen, um an die Kapsidoberfläche zu gelangen.

# 6.2.2 Auswirkungen der Deletion von VP1 oder VP2 auf biochemischer Ebene

Aufgrund der auf struktureller Ebene sichtbaren Veränderungen der Globuli an den 2-fachen Symmetrieachsen und der Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen ist zu erwarten, dass die N-Termini der VP1- und VP2-Proteine an der äußeren Kapsidoberfläche zugänglich werden. Um das zu überprüfen, wurden die mutanten Kapside einem Antikörperbindungstest auf beschichteten Mikrotiterplatten ausgesetzt (Abb. 5-24). Dabei zeigten die  $\Delta$ VP1-Kapside allerdings in etwa das gleiche Reaktionsmuster, wie die leeren wt AAV-Kapside. Bei den  $\Delta$ VP2-Kapsiden hingegen konnte eine deutliche Bindung des Antikörpers A69, der sein Epitop im N-terminalen Bereich von VP1 und VP2 besitzt, nachgewiesen werden. Ebenso könnte eine leichte Reaktion mit dem VP1-N-terminalen Antikörper A1 eintreten, allerdings ist der gemessene Wert sehr nahe der Ausschlussgrenze, weshalb nicht genau gesagt werden kann, ob der Antikörper A1 sein Epitop erkennt.

Somit lässt sich insgesamt sagen, dass durch die Deletion von VP2 eine auf struktureller und biochemischer Ebene sichtbare konformative Veränderung des AAV-Kapsids statt, die zur Zugänglichkeit von zumindest Teilen des VP1-Proteins für die entsprechenden Antikörper führt. Die Deletion des VP1-Proteins dagegen bewirkt strukturell gesehen zwar eine ähnliche Konformationsänderung des Kapsids, jedoch kann der A69-Antikörper nicht an sein Epitop binden. Ein Grund dafür wäre, dass das VP2-Protein eventuell in die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen hineinragt, aber nicht weit genug, damit der Antikörper A69 an sein Epitop binden kann. Vielleicht kann es auch aufgrund einer strukturellen Veränderung, die die Deletion von VP1 bewirkt, nicht durch den Kanal hindurch.

#### 6.2.3 Auswirkungen der Deletion von VP1 und VP2

Außer den Mutanten, bei denen jeweils eins der VP-Proteine deletiert war, wurde in dieser Arbeit eine Mutante hergestellt, der die beiden Nebenstrukturproteine VP1 und VP2 fehlen, so dass nur VP3 exprimiert wird (Abb. 5-20A). Zusätzlich zu dem VP3-Protein enthält das Plasmid noch das Kernwanderungssignal des großen T-Antigens von SV40. Es wird benötigt, um die VP3 Proteine in den Zellkern zu transportieren, wo die Zusammenlagerung der AAV-Kapside stattfindet. Das Kernwanderungssignal der AAV-Strukturproteine ist im N-Terminus von VP2 lokalisiert (Hogue et al., 1999). In dieser Arbeit konnte nach Transfektion von 293T-Zellen mit dem mutierten Plasmid die Expression des VP3-Proteins mit Hilfe der Bindung des Antikörpers B1 gezeigt werden (Abb. 5-20B, B1-Reaktion). Ein Nachweis für die Entstehung von Kapsiden war jedoch nicht möglich (Abb. 5-20B, A20-Reaktion). Dieses Ergebnis steht somit im Widerspruch zu den Untersuchungen von Hogue et al. (1999). Dort ist es gelungen, Kapside nachzuweisen, die nur aus VP3 bestehen. Allerdings wurden die Kapside im Gegensatz zu dieser Arbeit in einem Baculovirus-System produziert, wodurch eventuell der Unterschied zustande kommen könnte. Da es vielleicht möglich ist, nach Infektion von 293T-Zellen mit einer sehr hohen MOI an rekombinanten Adenoviren, die das VP3-Protein exprimieren, Zellen zu sehen, in denen assemblierte Kapside vorliegen, wurden mit Hilfe des rekombinanten NLSVP3-Adenogenomplasmids rekombinante Adenoviren produziert und vermehrt. Allerdings war es aufgrund der zeitlichen Begrenzung der Arbeit nicht mehr möglich, die Viren in ausreichenden Konzentrationen für eine Infektion zu produzieren. Zu erwarten wäre jedoch, dass bei der Rekonstruktion von Kapsiden, die nur aus VP3 bestehen, ebenfalls die Globuli an den 2-fachen Symmetrieachsen fehlen.

# 6.3 Biochemische Untersuchung zur Lokalisation der N-Termini der VP1- und VP2-Proteine im wt AAV-2 Kapsid

Aufgrund der strukturellen Untersuchungen des wt AAV-2 Kapsids scheinen die Nterminalen Bereiche der VP1- und eventuell auch der VP2-Proteine größtenteils im Kapsidinneren zu liegen. Da VP1 aber bei der Infektion von AAV eine Rolle spielt (Hermonat et al., 1984; Tratschin et al., 1984; Smuda et al., 1991; Girod et al., 2002), muss es im Laufe des Infektionsweges zugänglich werden.

## 6.3.1 Analyse der Zugänglichkeit der N-Termini von VP1 und VP2 nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen

Bei vielen Viren befinden sich die Kapside in einem metastabilen Zustand, so dass, wenn sie einer externen Energieguelle (z.B. Hitze) ausgesetzt werden, eine limitierte konformative Veränderung stattfindet. Diese Veränderung imitiert die natürliche Veränderung, die infektiösen Viruspartikeln widerfährt, wenn sie in die Zelle eintreten (Meyer et al., 1992; Curry et al., 1996). Aufgrund dieser Annahme wurden leere und DNA-haltige MVM- und CPV-Kapside unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt und danach die Zugänglichkeit der N-terminalen Bereiche überprüft. Für MVM konnte dabei gezeigt werden, dass Erhitzen von DNA-haltigen Kapsiden bei einer Temperatur zwischen 52°C und 70°C zur Exposition des VP1-N-Terminus auf der Kapsidoberfläche führt. Die Kapside liegen dabei im intakten Zustand vor. Leere MVM-Kapside dagegen zeigen keine Veränderung der Zugänglichkeit des VP1-N-Terminus (Cotmore et al., 1999). Werden CPV-Kapside einer Temperatur von 65°C ausgesetzt, wird der N-Terminus von VP1 in DNA-haltigen und leeren Partikeln außen auf der Kapsidoberfläche zugänglich (Vihinen-Ranta et al., 2002). Der gleiche Effekt wird durch Inkubation mit 4 M Harnstofflösung erzielt. Der N-Terminus von VP2 ist im Gegensatz zu AAV-2 Kapsiden bei vollen Partikeln beider Virusarten immer von außen zugänglich.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Erhitzen von vollen und leeren AAV-2 Kapsiden auf 70°C und anschließender Inkubation in unbeschichteten Mikrotiterplatten die Antikörper A69 und A1 an ihre Epitope in den N-terminalen Bereichen von VP1 und VP2 binden können (Abb. 5-23C und D). Ebenso zeigen auch die Antikörper B1, dessen Epitop am C-Terminus der VP-Proteine liegt, und A20, der an ein konformatives Epitop auf der Kapsidoberfläche bindet, eine Reaktion. Der C-Terminus der VP-Proteine ist normalerweise, wie in Abbildung 1-2 zu sehen ist, im Inneren des Kapsids lokalisiert. Ob er aufgrund einer Konformationsänderung oder nur nach Denaturierung des Kapsides zugänglich werden kann, ist bisher nicht bekannt. Wistuba et al. (1997) konnten zeigen, dass das Epitop des Antikörpers B1 in assemblierten unbehandelten Kapsiden maskiert ist, während freie VP-Proteine eindeutig gebunden werden können. Allerdings konnten mit Hilfe des B1-Antikörpers auch Oligomere von VP-Proteinen immunpräzipitiert werden (Steinbach, 1998). Die Interpretation des Antikörpers A20 ist noch etwas schwieriger. Der Antikörper besitzt eine hohe Affinität für assemblierte Kapside, während freie VP-Proteine nicht von ihm erkannt werden. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass er auch an Subfragmente von Kapsiden bindet, die das spezifische Epitop ausgebildet haben. Die Größe dieser Subfragmente ist nicht bekannt, jedoch konnten Wistuba et al. (1997) nachweisen, dass nach Infektion von HeLa-Zellen mittels Sacharosegradienten aufgetrennte unbehandelte wt AAV Kapsidproteine durch den A20-Antikörper detektiert werden konnten, wenn sie sich in den 60S- bis 110S-Fraktionen befanden. In diesen Fraktionen liegen die assemblierten leeren und vollen AAV-2 Kapside vor (Myers und Carter, 1980). Zusätzlich dazu bindet der A20-Antikörper an Kapsidproteine, die bei etwa 40S sedimentieren, während die Antikörper A1, A69 und B1 nur die Fragmente präzipitieren, die bei 20S und weniger sedimentieren. Diese werden jedoch durch den A20-Antikörper nicht mehr erkannt.

Insgesamt lässt sich somit sagen, dass sowohl DNA-enthaltende, als auch leere AAV-2 Kapside durch das Erhitzen auf 70°C mit anschließender Inkubation auf unbeschichteten Mikrotiterplatten so verändert werden, dass die N- und C-terminalen Antikörper A1, A69 und B1 ihre Epitope erkennen können. Da aber auch der Antikörper A20 immer noch an sein Epitop binden kann, hat keine vollständige Denaturierung der Kapside stattgefunden, sondern es liegen entweder Kapsidfragmente oder sehr stark konformativ veränderte Kapside vor.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die AAV-Kapside zur Überprüfung der Zugänglichkeit der N-terminalen Bereiche von VP1 und VP2 an vollen und leeren wt Kapsiden auf 65°C erhitzt. Wie weiter oben schon erwähnt, konnte für CPV bei dieser Temperatur festgestellt werden, dass die Kapside noch in intaktem Zustand vorliegen, die N-Termini von VP1 jedoch von außen am Kapsid nachweisbar sind (Vihinen-Ranta et al., 2002). Um dies auch für AAV zu zeigen, wurden die Partikel nach dem Erhitzen auf mit dem Antikörper A20 beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Allerdings zeigt sich unter diesen Bedingungen weder bei den leeren noch bei den DNA-haltigen Kapsiden eine Veränderung der Reaktionen mit den Antikörpern gegenüber den bei Raumtemperatur inkubierten Kapsiden (Abb. 5-25A und B, 5-23A und B).

Zum Vergleich wurden nun die Kapside einem Antikörperbindungstest auf einer Nitrocellulosemembran ausgesetzt (Abb. 5-26). Bei diesem Test können alle konformativen Zustände und auch mögliche Kapsidfragmente erfasst werden und nicht nur diejenigen, die an den Antikörper A20 binden. Das Experiment ergab deutliche Unterschiede zwischen vollen und leeren Kapsiden. Leere Kapside zeigen keine Veränderung der Zugänglichkeit der N-Termini zwischen 37°C und 65°C (Abb. 5-26A), sondern reagieren erst bei einer Inkubationstemperatur von 75°C mit den Nterminalen Antikörpern. Hier ist auch eine deutliche Bindung des Antikörpers B1 zu sehen, während der Antikörper A20, der ein konformatives Epitop erkennt, nicht mehr binden kann. Bei den DNA-haltigen Kapsiden ist schon bei 37°C eine leichte Reaktion mit den N-terminalen Antikörpern A1 und A69 nachweisbar, die bei 65°C stark zunimmt (Abb. 5-26B). Bei dieser Temperatur ist mit dem Antikörper B1 ebenfalls eine schwache Reaktion zu erkennen. Die Inkubation bei 75°C führt, wie bei den leeren Kapsiden, zum Verlust der Bindefähigkeit des A20-Antikörpers. Die Reaktion des Antikörpers B1 nimmt zu, während die der Antikörper A1 und A69 gleich bleibt.

Somit lässt sich sagen, dass unter diesen Testbedingungen die N-Termini von VP1 und VP2 in DNA-haltigen AAV-2 Kapsiden schon bei 37°C teilweise für die N-Terminus spezifischen Antikörper A1 und A69 zugänglich sind. Dies stimmt sowohl mit den Ergebnissen des Tests auf Mikrotiterplatten, als auch mit Untersuchungen von Wu et al. (2000) überein, in denen Insertionen in N-terminale Bereiche von VP1 und VP2 mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden konnten. Durch die Inkubation bei 65°C könnte dann eine Konformationsänderung stattfinden, bei der alle N-Termini auf dem Kapsid zugänglich werden. Dieses Ergebnis würde sich mit den Untersuchungen an MVM und CPV decken. Bei diesen Viren ist ebenfalls keine oder eine sehr schwache Reaktion der leeren Kapside nachweisbar, während die VP1-N-Termini DNA-haltiger Kapside durch Erhitzen zusätzlich zu den VP2-N-Termini zugänglich werden.

Es könnte aber auch sein, dass bei dieser Temperatur zumindest teilweise die Dissoziation der Kapside einsetzt. Dieses lässt sich anhand der Daten nicht eindeutig entscheiden. Es ist nicht geklärt, ob der C-Terminus durch eine Konformationsänderung des Kapsids zugänglich wird, oder ob die Reaktion des B1-Antikörpers nur aufgrund der Dissoziation der Kapside eintreten kann. Ebenso kann anhand der A20-Reaktion keine eindeutige Aussage gemacht werden, ob sich die Kapside in intaktem oder partiell zerfallenem Zustand befinden. Sicher ist jedoch, dass sowohl die vollen, als auch die leeren Kapside während der Inkubation bei 75°C vollständig denaturiert werden.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse auf A20-beschichteten Mikrotiterplatten und auf Nitrocellulosemembranen liegt darin, dass die bei 65°C

konformativ veränderten oder partiell dissoziierten Kapside nicht mehr an die mit A20-beschichteten Mikrotiterplatten binden und damit für die Reaktion mit den Antikörpern, die N- oder C-terminale Epitope erkennen, verloren gehen. Diese Kapside wurden auf dem Nitrocellulose-Bindungstest und auch auf den Test mit unbeschichteten Mikrotiterplatten erfasst. Es könnte aber auch sein, dass die Kapside nach dem Erhitzen immer noch in ihrem ursprünglichen Zustand vorliegen und die Reaktion der N-terminalen Antikörper auf der Nitrocellulosemembran durch den zusätzlichen Stress der Bindung an die Membran zustande kommt.

Die AAV-2 Kapside könnten demnach bei 65°C in intakter ursprünglicher Form, konformativ verändert, partiell dissoziiert oder als denaturierte Kapside vorliegen. Eventuell handelt es sich aber auch um eine Mischung aus allen Formen und 65°C ist genau die Schwellenwert-Temperatur, bei der die Dissoziation der AAV-2 Kapside einsetzt. Um genauere Aussagen machen zu können, wäre es sinnvoll, die Bindung der Antikörper nach Erhitzen von DNA-enthaltenden Kapsiden in graduellen Abstufungen zwischen 60°C und 70°C zu testen. Zusätzlich könnte das Sedimentationsverhalten der erhitzten Kapside mittels eines Sacharosegradienten untersucht werden. Dadurch könnten eventuell vorhandene Fragmente von den Kapsiden getrennt werden und die Kapside dann auf ihre Zugänglichkeit für die N-terminalen Antikörper getestet werden.

#### 6.3.2 Strukturelle Analyse der AAV-2 Kapside nach Inkubation bei 65°C

Um weitere Anhaltspunkte zu erhalten, ob bei DNA-haltigen AAV-2 Kapside aufgrund einer Inkubation bei 65°C eine konformative Veränderung eintritt, wurden diese auch auf struktureller Ebene untersucht. Auffallend dabei war, dass nach Inkubation bei 65°C beim negativen Kontrastierungsverfahren fast ausschließlich leere Kapside sichtbar waren (Abb. 5-27). Durch das Erhitzen scheint die DNA aus den Kapsiden freigesetzt zu werden. Dieser Effekt würde mit Untersuchungen an MVM im Einklang stehen, bei denen eine Korrelation der Zugänglichkeit des N-Terminus von VP1 und der DNA im Kapsid postuliert wird (Cotmore et al., 1999). Es könnte aber auch sein, dass die DNA-haltigen Kapside instabiler sind, als die leeren und deshalb beim Erhitzen auf 65°C zerfallen, so dass nur die leeren Kapside übrig bleiben. Hier muss nun zusätzlich angemerkt werden, dass die negative Kontrastierung der bei 65°C inkubierten AAV-2 Kapside nicht mit verschiedenen Kapsidpräparationen reproduziert werden konnte. Bei den meisten Präparationen waren nach der Inkubation keine Kapside mehr elektronenmikroskopisch nachweisbar. Entweder setzt bei 65°C die Dissoziation der AAV-2 Kapside ein, oder die Kapside zeigen eine bisher noch nicht genauer untersuchte alters- oder lagerungsabhängige Instabilität.

Aufgrund der Tatsache, dass nach Inkubation bei 65°C die meisten Kapside ohne DNA vorliegen, wurden die auf den elektronenkryomikroskopischen Bildern sichtbaren AAV-Partikel in 4 Klassen unterteilt, um die DNA-enthaltenden Kapside zu isolieren. Somit konnten für die dreidimensionale Bildrekonstruktion ganz volle und ganz leere Kapside, sowie Zwischenstufen, unterschieden werden (Abb. 5-28). Bei allen Klassen ist zu sehen, dass die generelle Struktur des Kapsids auch nach Erhitzen erhalten bleibt. Jedoch nimmt die Dichte der globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen aufgrund der Hitzebehandlung bei den leeren Kapsiden leicht, und bei den vollen Kapsiden deutlich ab. Zusätzlich dazu scheinen sich die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen bei vollen und geringfügig auch bei den leeren Kapsiden zu verschließen (weiße Pfeile).

Dieses Ergebnis spricht sehr stark dafür, dass durch Inkubation bei 65°C tatsächlich eine konformative Veränderung der DNA-haltigen Kapside eintritt, bei der die globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen aufgelöst werden. Dagegen erscheint eine Proteindichte in den Kanälen der 5-fachen Symmetrieachsen, die auf die N-Termini der VP1- und VP2-Proteine zurückgeführt werden könnte.

# 6.3.3 Analyse der Zugänglichkeit der N-Termini von VP1 und VP2 nach Inkubation bei verschiedenen pH-Werten

Bei DNA-haltigen AAV-2 Kapsiden kommt es beim Erhitzen der Partikel auf 65°C zu einer Veränderung, durch die die N-Termini der VP1- und VP2-Proteine möglicherweise auf der Kapsidoberfläche zugänglich werden. Zur Überprüfung, ob diese Veränderung auch durch eine physiologisch relevante Bedingung hervorgerufen werden kann, wurde die Zugänglichkeit der N-Termini unter unterschiedlichen pH-Bedingungen getestet. Eine Veränderung des pH-Wertes durchlaufen die AAV-2 Kapside auch *in vivo* auf dem endosomalen Weg von der Zelloberfläche zum Zellkern.

Der pH-Wert in den Endosomen und Lysosomen beträgt 6,5 bis 5,0. In diesem Bereich, wie auch bei niedrigeren pH-Werten, ist keine Reaktion der leeren wt AAV-2

Diskussion

Kapside mit den N- und C-terminalen Antikörpern in dem Nitrocellulose-Bindungstest zu erkennen (Abb. 5-30A). Die unveränderte Reaktion des Antikörpers A20 mit den Kapsiden unterstützt die Aussage, dass leere Kapside aufgrund abnehmender pH-Werte weder eine konformative Änderung, die die Zugänglichkeit der N-Termini ermöglicht, noch eine vollständige Denaturierung durchmachen. DNA-enthaltende Kapside hingegen zeigen im Bereich von pH 7,0 bis 5,0 eine leichte Reaktion mit den Antikörpern A1 und A69 (Abb. 5-30B), die der bei Inkubation bei 37°C auftretenden ähnelt. D.h., die N-Termini von VP1 und VP2 sind schon im pH-Bereich von 7,0 bis 5,0 teilweise auf dem Kapsid zugänglich. Ein pH-Wert von 4,5 führt entweder zu einer Konformationsänderung des Kapsids oder die Dissoziation der Kapside beginnt, so dass der B1-Antikörper sein Epitop erkennt. Die Tatsache, dass die Reaktion mit den Antikörpern A1, A69 und A20 unverändert bleibt, lässt eher auf eine konformative Veränderung des Kapsids schließen, die zur Zugänglichkeit des B1-Epitops führt. Bei pH 4,0 verstärkt sich diese Änderung noch, wodurch die Bindung der Antikörper an die N-terminalen Bereiche von VP1 und VP2 zunimmt. Wie schon bei den Temperaturversuchen lassen sich hier anhand der Antikörperreaktionen keine genaueren Angaben machen. Es könnte aber sein, dass durch den stark sauren pH-Wert Veränderungen des Kapsids eintreten, die in vivo, bei physiologisch relevanten pH-Werten, aufgrund zusätzlicher endosomaler Faktoren entstehen. Als nächste Untersuchung wäre deshalb auch hier eine Sedimentationsanalyse der Kapside im Sacharosegradienten anzuraten. Falls die Kapside in intaktem Zustand vorliegen, könnte anschließend dann eine dreidimensionale Bildrekonstruktion mittels Elektronenkryomikroskopie erfolgen.

Zusammenfassend, um eine Korrelation zwischen den strukturellen und biochemischen Ergebnissen in Bezug auf die Zugänglichkeit und Lokalisation der N-Termini von VP1 und VP2 zu überprüfen, sind die erzielten Informationen noch einmal in Tabelle 6-1 dargestellt:

	Inkubation	Glo-	Proteindichte im Kanal an der	Bindung der N-	Bindung der N-
	IIIKubatioII	buli	5 fachon	Antikörnor	Antikörpor
		buii	5-IdCHEII	Antikorper	Antikorper
			Symmetrieachse	(Mikrotiter-	(Nitrocellulose-
				platte)	membran)
volle wt	RT/37°C	+	-	+	+
Kapside	65°C	-	++	+	++
	75°C	n.b.	n.b.	n.b.	++
leere wt	RT/37°C	+	-	-	-
Kapside	65°C	+	+	-	-
	75°C	n.b.	n.b.	n.b.	++
leere ΔVP1					
Kapside	RT	-	++	-	n.b.
leere ΔVP2					
Kapside	RT	-	++	++	n.b.
volle wt	pH 7,0-5,0	n.b.	n.b.	n.b.	+
Kapside	pH 4,5-3,0	n.b.	n.b.	n.b.	++
leere wt	pH 7,0-5,0	n.b.	n.b.	n.b.	-
Kapside	pH 4,5-3,0	n.b.	n.b.	n.b.	-

Tab. 6-1: Zusammenfassung der strukturellen und biochemischen Ergebnisse in Bezug auf die Zugänglichkeit und Lokalisation der N-Termini von VP1 und VP2, die mit den in dieser Arbeit verwendeten AAV-2 Kapsiden erzielt wurden

Beim Vergleich der strukturellen Ergebnisse zeigt sich, dass ein Verlust der Globuli an den 2-fachen Symmetrieachsen immer mit einer Zunahme der Proteindichte an den Kanälen der 5-fachen Symmetrieachsen verbunden ist. Außer bei der ΔVP1 Mutante korreliert diese Zunahme auch immer mit der Möglichkeit der N-terminalen Antikörper A69 und A1, ihre Epitope zu erkennen. Somit ergab sich die Frage, ob die Länge des N-terminalen Bereichs von VP1 überhaupt ausreicht, um durch den Kanal an der 5-fachen Symmetrieachse nach außen zu gelangen und das A69-Epitop (AS 171-182, Wobus *et al.*, 2000) zu exponieren. Abb. 6-4 stellt ein Modell für die Zugänglichkeit von VP1 dar. Hierbei wurde mit Hilfe der Röntgenstrukturdaten von AAV-2 (Xie et al., 2002) ein Ausschnitt des Äquatorialschnitts eines AAV-2 Kapsids nachmodelliert und die Struktur des N-terminalen Bereichs von VP1 anhand der Röntgenstrukturdaten von homologen Proteinen an eine AAV-2-Untereinheit an der 2-fachen Symmetrieachse angeknüpft. In dem Modell sind alle Aminosäuren von VP1 nach AS 44 dargestellt, so dass die Phopholipasedomäne (PLA) (AS 45-103) das N-terminale Ende bildet. Es konnte gezeigt werden, dass VP1 an der Innenseite der 2-fachen Symmetrieachse eine globuläre Struktur ausbilden kann (Abb. 6-4A, hervorgehobene, blau-türkis-farbene Struktur). Wird diese globuläre Struktur am Nund C-terminalen Ende auseinandergezogen, lässt sich der Durchgang von VP1 durch den Kanal an der 5-fachen Symmetrieachse simulieren (Abb. 6-4B). Ob der N-Terminus von VP1 soweit aus dem Kanal heraustritt, dass das Epitop des Antikörpers A69 auf der Kapsidoberfläche exponiert wird, kann hier nicht genau ermittelt werden. Für das Modell wurde nur die prinzipielle Länge des VP1-Strangs bestimmt und nicht die mögliche strukturelle Form.

Insgesamt lässt sich also sagen, dass die Länge des N-terminalen Strangs von VP1 ausreicht, um sowohl eine globuläre Struktur an den 2-fachen Symmetrieachse zu bilden, als auch im gestreckten Zustand durch den Kanal an der 5-fachen Symmetrieachse an die Kapsidoberfläche zu gelangen.



Abb. 6-4: Modell zur Zugänglichkeit von VP1

A) VP1 befindet sich als globuläre Struktur an der 2-fachen Symmetrieachse im Kapsidinneren.
B) VP1 tritt durch den Kanal an der 5-fachen Symmetrieachse nach außen und ist somit auf der Kapsidoberfläche zugänglich.

In der Abbildung ist jeweils ein Ausschnitt des Äquatorialschnitts eines AAV-2 Kapsids dargestellt. Die relevanten Symmetrieachsen sind in **A**) markiert. Der VP1-N-terminale Strang wurde bis auf die ersten 44 Aminosäuren modelliert (hervorgehobene, blau-türkis-farbene Struktur). Somit stellt die Phospholipasedomäne (PLA) das N-terminale Ende dar.

# 6.3.4 Untersuchung der DNA-Zugänglichkeit in AAV-2 Kapsiden unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Für MVM und CPV konnte durch Erhitzen der Kapside *in vitro* eine Korrelation zwischen der Zugänglichkeit des VP1-N-Terminus und der DNA in intakten Kapsiden festgestellt werden (Cotmore et al., 1999; Vihinen-Ranta et al., 2002). Da auch die AAV-2 Kapside nach der Inkubation bei 65°C fast ausschließlich im leeren Zustand

Diskussion

vorlagen, wurde die DNA-Zugänglichkeit unter verschiedenen Bedingungen getestet (Abb. 5-31). Dabei stellte sich heraus, dass die DNA nach Inkubation bei 37°C bei neutralem pH nicht zugänglich ist. Durch Inkubation bei 65°C oder bei sauren pH-Werten (4,5 oder 3,0) wird jedoch der Abbau der AAV-DNA durch DNase I ermöglicht. Allerdings lässt sich anhand des DNA-Abbaus alleine nicht feststellen, ob die DNA nur aufgrund einer konformativen Veränderung oder der zusätzliche Dissoziation des Kapsids zugänglich wird. Elektronenmikroskopische Untersuchungen oder eine Analyse mit Hilfe von Sacharosegradienten könnten genauere Angaben ermöglichen.

#### 6.4 Untersuchungen über den Einfluss von Heparin auf AAV-2 Viren

#### 6.4.1 Kompetition von Heparin um die Bindestellen an AAV-2 Kapsiden

Die virale Infektion von Zellen wird durch die spezifische Bindung des Viruskapsids an einen zellulären Rezeptor eingeleitet. Für AAV-2 Kapside konnte Heparansulfat-Proteoglykan als einer dieser Rezeptoren ermittelt werden (Summerford und Samulski, 1998). In in vitro Experimenten wird allerdings häufig Heparin für Bindungsstudien verwendet. Dieses ist selbst keine Komponente der Zellmembran, stellt jedoch ein Strukturhomologon von Heparansulfat dar. In dieser Arbeit wurde in Anlehnung an Untersuchungen von Wobus (2000) ein Zellbindungstest durchgeführt, in dem gezeigt werden konnte, dass bei ansteigender Heparinkonzentration die Bindung der AAV-2 Kapside an HeLa-Zellen abnimmt (Abb. 5-32). Heparin ist also in der Lage, mit dem auf den Zelloberflächen befindlichen Heparansulfat um die Bindungsstellen an den Viruskapsiden zu kompetitieren.

Die Bindungsaffinität von AAV-2 und Heparin (Dissoziationskonstante  $\approx 2$  nM) ist allerdings im Vergleich zu anderen Heparin-/Molekül-Wechselwirkungen relativ gering (Qiu et al., 2000). Für HIV und das Dengue-Virus, die ebenfalls Heparansulfat als Rezeptormolekül nutzen, wurden jedoch ähnliche Bindungskonstanten ermittelt (Chen et al., 1997; Harrop und Rider, 1998). Mit Hilfe der Dissoziationskonstante lässt sich berechnen, dass in dem Zellbindungstest bei einer Heparinkonzentration von 17 nM ( $\approx$  100 µg) 6kDa großer Heparinmoleküle nur 40% aller Bindungsstellen an den Kapsiden besetzt sind. Um theoretisch alle Stellen mit Heparinmolekülen (Konzentration an Bindestellen = 20 nM) abzusättigen, müssten die Viren mit etwa 42 nM (≈ 250 µg) 6kDa großer Heparinmoleküle inkubiert werden.

# 6.4.2 Strukturelle Auswirkungen von 6 kDa großen Heparinmolekülen auf AAV-2 Kapside

Mit Hilfe von Mutanten, bei denen einzelne Aminosäuren durch Punktmutationen verändert wurden, konnte festgestellt werden, dass die basischen Aminosäuren R484, R487, K532, R585 und R588 als Vermittler an der Bindung von AAV-2 an Heparansulfat-Proteoglykan beteiligt sind (Kern et al., 2003; Opie et al., 2003). Diese Aminosäuren befinden sich an den 3-fachen Symmetrieachsen (Abb. 1-4). Um dieses Ergebnis zu bestätigen und die exakte Heparin-Bindedomäne sichtbar machen zu können, wurden AAV-2 Kapside mit Heparin inkubiert und anschließend elektronenkryomikroskopisch untersucht. Dabei wurden zuerst 15 kDa große Heparinmoleküle verwendet, die allerdings zum Verklumpen der Kapside führten, so dass keine elektronenmikroskopische Analyse möglich war (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden kleinere, 6 kDa große Moleküle eingesetzt. Dazu wurde ein Verhältnis von Bindestellen am Kapsid zu Heparinmolekülen von 1:100 verwendet. Die somit eingesetzte Konzentration an Heparin führt jedoch bei einer Dissoziationskonstante von 2 nM dazu, dass nur etwa 20 % aller Bindestellen an den Kapsiden besetzt sind. In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten deshalb aufgrund der zu geringen Konzentration an Heparin keine an die Kapside gebundenen Heparinmoleküle nachgewiesen werden. Zur Überprüfung, ob eventuell trotzdem eine Konformationsänderung des Kapsids stattgefunden hat, wurde eine dreidimensionale Rekonstruktion der Kapside berechnet. Beim Vergleich der äußeren Oberflächen von bei Raumtemperatur, bei 65°C oder mit Heparin inkubierten Kapsiden lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Die verschieden großen Kanalöffnungen an den 3-fachen Symmetrieachsen können aufgrund der geringen Proteindichten an diesen Stellen entstehen. Weisen die Dichten zusätzlich nur leichte, graduelle Unterschiede auf, ist es sehr schwierig, sie genau zu differenzieren, wodurch in der Oberflächendarstellung der Rekonstruktionen nicht signifikante Differenzen sichtbar werden können. Die Innenansicht der mit Heparin inkubierten AAV-2 Kapside zeigt jedoch gegenüber der der wt AAV-2 Kapside Unterschiede. Sie ähnelt sehr der der bei 65°C inkubierten Kapside, die Kapsidhülle ist dicker und die Globuli an den 2-fachen

Symmetrieachsen sind verkleinert. Diese Ähnlichkeit bestätigt sich teilweise auch im Vergleich der Äquatorialschnitte, in deren Inneren sowohl bei den erhitzten, als auch bei den mit Heparin inkubierten Kapsiden weniger Dichte vorhanden ist, als bei den bei Raumtemperatur behandelten Partikeln.

In Präparationen der DNA-haltigen AAV-2 Kapside ist immer ein gewisser Anteil an leeren Kapsiden enthalten. Somit wäre eine mögliche Erklärung, warum die hier vorliegende Rekonstruktion von Kapsiden nach Inkubation mit Heparin aus überwiegend leeren AAV-2 Partikeln berechnet wurde, dass in dieser Probe zufälligerweise ein sehr hoher Anteil an leeren Kapsiden vorlag. Da die Analyse der AAV-2 Kapside mit Heparin ein halbes Jahr später erfolgte, als die der bei Raumtemperatur inkubierten Kapside und über die Stabilität der Präparationen keine exakten Angaben gemacht werden können, könnte es auch sein, dass die DNA-haltigen Kapside instabiler sind, als die leeren und im Laufe der Zeit zerfallen. Somit würde aufgrund des Alterungseffekts ein erhöhter Anteil an leeren Kapside miteinander zu vergleichen, wurden die mit Heparin inkubierten Kapside, wie vorher auch schon die erhitzten und die bei Raumtemperatur behandelten Partikel klassifiziert. Der Äquatorialschnitt von ganz vollen Kapsiden nach Zugabe von Heparin ist in Abbildung 6-4 zu sehen:



Abb. 6-4: Äquatorialschnitt von nur DNA-haltigen Kapsiden nach Inkubation mit 6 kDa großen Heparinmolekülen

Die von den elektronenkryomikroskopischen Bildern ausgewählten Kapside wurden in 4 Klassen unterteilt, um DNA-enthaltende und leere Partikel voneinander und von den Zwischenstufen unterscheiden zu können. Bei der hier sichtbaren Rekonstruktion von ganz vollen Kapsiden sind die globulären Strukturen an den 2-fachen Symmetrieachsen sind durch einen schwarzen Pfeil markiert. Ein weißer Pfeil kennzeichnet die leeren Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen.

Vergleicht man diesen nun mit dem Äquatorialschnitt von ganz vollen unbehandelten wt AAV-2 Kapsiden (Abb. 5-28, Raumtemperatur), lässt sich eine große Ähnlichkeit

feststellen. Die Kanäle an den 5-fachen Symmetrieachsen sind leer (weißer Pfeil) und die deutlich erkennbaren Globuli an den 2-fachen Symmetrieachsen (schwarzer Pfeil) interagieren mit der enkapsidierten DNA.

Demnach lässt sich hier keine Veränderung der AAV-2 Partikel aufgrund der Heparinzugabe feststellen. Ein nächster Schritt wäre, AAV-2 Kapside mit einer höheren Konzentration an Heparinmolekülen zu inkubieren, so dass 100 % der Bindestellen an den Kapsiden besetzt sind. Möglicherweise könnte so am Kapsid gebundenes Heparin sichtbar gemacht werden und die exakte Heparin-Bindedomäne, sowie die Faltung des Heparins auf der Kapsidoberfläche festgelegt werden.

# 7 Literaturverzeichnis

- Agbandje M., Kajigaya S., McKenna R., Young N. S. and Rossmann M. G. (1994) The structure of human parvovirus B19 at 8 A resolution. *Virology* **203**, 106-15.
- Agbandje-McKenna M., Llamas-Saiz A. L., Wang F., Tattersall P. and Rossmann M. G. (1998) Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. *Structure* **6**, 1369-81.
- Amos L. A., Henderson R. and Unwin P. N. (1982) Three-dimensional structure determination by electron microscopy of two-dimensional crystals. *Prog Biophys Mol Biol* **39**, 183-231.
- Atchison R. W., Casto B. C. and Hammon W. M. (1965) Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* **149**, 754-6.
- Balague C., Kalla M. and Zhang W. W. (1997) Adeno-associated virus Rep78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J Virol* **71**, 3299-306.
- Bantel-Schaal U., Delius H., Schmidt R. and zur Hausen H. (1999) Human adenoassociated virus type 5 is only distantly related to other known primate helperdependent parvoviruses. *J Virol* **73**, 939-47.
- Bantel-Schaal U., Hub B. and Kartenbeck J. (2002) Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. *J Virol* **76**, 2340-9.
- Bartlett J. S., Wilcher R. and Samulski R. J. (2000) Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* **74**, 2777-85.
- Becerra S. P., Koczot F., Fabisch P. and Rose J. A. (1988) Synthesis of adenoassociated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J Virol* **62**, 2745-54.
- Becerra S. P., Rose J. A., Hardy M., Baroudy B. M. and Anderson C. W. (1985) Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7919-23.
- Bellare J. R., Davis H. T., Scriven L. E. and Talmon Y. (1988) Controlled environment vitrification system: an improved sample preparation technique. *J Electron Microsc Tech* **10**, 87-111.
- Bernfield M., Gotte M., Park P. W., Reizes O., Fitzgerald M. L., Lincecum J. and Zako M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68, 729-77.

- Bernfield M., Kokenyesi R., Kato M., Hinkes M. T., Spring J., Gallo R. L. and Lose E. J. (1992) Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 365-93.
- Berns K. I. (1990) Parvovirus replication. Microbiol Rev 54, 316-29.
- Berns K. I. and Giraud C. (1996) Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **218**, 1-23.
- Berns K. I., Pinkerton T. C., Thomas G. F. and Hoggan M. D. (1975) Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology* **68**, 556-60.
- Birnboim H. C. and Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- Böttcher B., Wynne S. A. and Crowther R. A. (1997) Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* **386**, 88-91.
- Bradley, D.E. (1965) The preparation of specimen support films. In Techniques for Electron Microscopy (Kay, D., ed.). *Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edingburgh*, 58-74.
- Branden, C. & Tooze, J. (1991) The structure of spherical viruses. In: Introduction to protein structure. Garland Publishing, Inc., New York and London, 161-78
- Buller R. M., Janik J. E., Sebring E. D. and Rose J. A. (1981) Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* **40**, 241-7.
- Cassinotti P., Weitz M. and Tratschin J. D. (1988) Organization of the adenoassociated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein 1. *Virology* **167**, 176-84.
- Chapman M. S. and Rossmann M. G. (1993) Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Virology* **194**, 491-508.
- Chartier C., Degryse E., Gantzer M., Dieterle A., Pavirani A. and Mehtali M. (1996) Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in Escherichia coli. *J Virol* **70**, 4805-10.
- Chejanovsky N. and Carter B. J. (1989) Mutagenesis of an AUG codon in the adenoassociated virus rep gene: effects on viral DNA replication. *Virology* **173**, 120-8.
- Chen C. A. and Okayama H. (1988) Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* **6**, 632-8.

- Chen Y., Maguire T., Hileman R. E., Fromm J. R., Esko J. D., Linhardt R. J. and Marks R. M. (1997) Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* **3**, 866-71.
- Chiorini J. A., Wiener S. M., Yang L., Smith R. H., Safer B., Kilcoin N. P., Liu Y., Urcelay E. and Kotin R. M. (1996) The roles of AAV Rep proteins in gene expression and targeted integration. *Curr Top Microbiol Immunol* **218**, 25-33.
- Chiorini J. A., Yang L., Liu Y., Safer B. and Kotin R. M. (1997) Cloning of adenoassociated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles. *J Virol* **71**, 6823-33.
- Chipman P. R., Agbandje-McKenna M., Kajigaya S., Brown K. E., Young N. S., Baker T. S. and Rossmann M. G. (1996) Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7502-6.
- Conway J. F., Cheng N., Zlotnick A., Wingfield P. T., Stahl S. J. and Steven A. C. (1997) Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryoelectron microscopy. *Nature* **386**, 91-4.
- Cotmore S. F., D'Abramo A M., Jr., Ticknor C. M. and Tattersall P. (1999) Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP1 N-terminus and viral genome without particle disassembly. *Virology* **254**, 169-81.
- Curry S., Chow M. and Hogle J. M. (1996) The poliovirus 135S particle is infectious. *J Virol* **70**, 7125-31.
- Douar A. M., Poulard K., Stockholm D. and Danos O. (2001) Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol* **75**, 1824-33.
- Duan D., Li Q., Kao A. W., Yue Y., Pessin J. E. and Engelhardt J. F. (1999) Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* **73**, 10371-6.
- Dubielzig R., King J. A., Weger S., Kern A. and Kleinschmidt J. A. (1999) Adenoassociated virus type 2 protein interactions: formation of pre-encapsidation complexes. *J Virol* **73**, 8989-98.
- Dubochet J., Adrian M., Chang J. J., Homo J. C., Lepault J., McDowall A. W. and Schultz P. (1988) Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys* **21**, 129-228.
- Erles K., Sebokova P. and Schlehofer J. R. (1999) Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol* **59**, 406-11.

- Fallaux F. J., Kranenburg O., Cramer S. J., Houweling A., Van Ormondt H., Hoeben R. C. and Van Der Eb A. J. (1996) Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **7**, 215-22.
- Gao G. P., Alvira M. R., Wang L., Calcedo R., Johnston J. and Wilson J. M. (2002) Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11854-9.
- Girod A., Wobus C. E., Zadori Z., Ried M., Leike K., Tijssen P., Kleinschmidt J. A. and Hallek M. (2002) The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol* **83**, 973-8.
- Graham F. L., Smiley J., Russell W. C. and Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.
- Greber, U.F. (2002) Signalling in viral entry. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 59, 608-26.
- Grigorieff N. (2000) Resolution measurement in structures derived from single particles. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56 (Pt 10), 1270-7.
- Grimm D., Kern A., Pawlita M., Ferrari F., Samulski R. and Kleinschmidt J. (1999) Titration of AAV-2 particles via a novel capsid ELISA: packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2. *Gene Ther* **6**, 1322-30.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Handa A., Muramatsu S., Qiu J., Mizukami H. and Brown K. E. (2000) Adenoassociated virus (AAV)-3-based vectors transduce haematopoietic cells not susceptible to transduction with AAV-2-based vectors. *J Gen Virol* 81, 2077-84.
- Hansen J., Qing K. and Srivastava A. (2001) Infection of purified nuclei by adenoassociated virus 2. *Mol Ther* **4**, 289-96.
- Harauz, G., van Heel, M. (1986) Exact filters for general geometry three dimensional reconstructions. *Optik* **73**,146-56.
- Harrison, S.C. (2001) In: Virology. Fields. Eds. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. *Lippincott, Philadelphia*, 53-86.
- Harrop H. A. and Rider C. C. (1998) Heparin and its derivatives bind to HIV-1 recombinant envelope glycoproteins, rather than to recombinant HIV-1 receptor, CD4. *Glycobiology* **8**, 131-7.
- Hauswirth W. W., Lewin A. S., Zolotukhin S. and Muzyczka N. (2000) Production and purification of recombinant adeno-associated virus. *Methods Enzymol* **316**, 743-61.

- Heilbronn R., Burkle A., Stephan S. and zur Hausen H. (1990) The adeno-associated virus rep gene suppresses herpes simplex virus-induced DNA amplification. *J Virol* **64**, 3012-8.
- Hermonat P. L. and Muzyczka N. (1984) Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6466-70.
- Hoggan M. D., Blacklow N. R. and Rowe W. P. (1966) Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**, 1467-74.
- Hoque M., Ishizu K., Matsumoto A., Han S. I., Arisaka F., Takayama M., Suzuki K., Kato K., Kanda T., Watanabe H. and Handa H. (1999) Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation. *J Virol* **73**, 7912-5.
- Hörer M., Weger S., Butz K., Hoppe-Seyler F., Geisen C. and Kleinschmidt J. A. (1995) Mutational analysis of adeno-associated virus Rep protein-mediated inhibition of heterologous and homologous promoters. *J Virol* **69**, 5485-96.
- Im D. S. and Muzyczka N. (1990) The AAV origin binding protein Rep68 is an ATPdependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 61, 447-57.
- Im D. S. and Muzyczka N. (1992) Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *J Virol* **66**, 1119-28.
- Johnson F. B., Ozer H. L. and Hoggan M. D. (1971) Structural proteins of adenovirus-associated virus type 3. *J Virol* **8**, 860-63.
- Kaljot K. T., Shaw R. D., Rubin D. H. and Greenberg H. B. (1988) Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol* 62, 1136-44.
- Kay M. A., Glorioso J. C. and Naldini L. (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* **7**, 33-40.
- Kern A., Schmidt K., Leder C., Muller O. J., Wobus C. E., Bettinger K., Von der Lieth C. W., King J. A. and Kleinschmidt J. A. (2003) Identification of a heparinbinding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *J Virol* 77, 11072-81.
- Kilham L. and Olivier L. J. (1959) A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology* **7**, 428-37.
- King J. A., Dubielzig R., Grimm D. and Kleinschmidt J. A. (2001) DNA helicasemediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *Embo J* **20**, 3282-91.

- Kotin R. M., Siniscalco M., Samulski R. J., Zhu X. D., Hunter L., Laughlin C. A., McLaughlin S., Muzyczka N., Rocchi M. and Berns K. I. (1990) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2211-5.
- Kozak M. (1989) The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* **108**, 229-41.
- Kronenberg S., Kleinschmidt J. A. and Böttcher B. (2001) Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids. *EMBO Rep* **2**, 997-1002.
- Kyöstiö, S.R., Owens, R.A., Weitzman, M.D., Antoni, B.A., Chejanovsky, N., Carter, B.J. (1994) Analysis of adeno-associated virus (AAV) wild-type and mutant Rep proteins for their abilities to negatively regulate AAV p5 and p19 mRNA levels. *J Virol.* 68, 2947-57.
- Labow M. A., Hermonat P. L. and Berns K. I. (1986) Positive and negative autoregulation of the adeno-associated virus type 2 genome. *J Virol* **60**, 251-8.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Laughlin C. A., Myers M. W., Risin D. L. and Carter B. J. (1979) Defective-interfering particles of the human parvovirus adeno-associated virus. *Virology* **94**, 162-74.
- Laughlin C. A., Tratschin J. D., Coon H. and Carter B. J. (1983) Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids. *Gene* **23**, 65-73.
- Linden R. M., Ward P., Giraud C., Winocour E. and Berns K. I. (1996) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11288-94.
- Lusby E., Fife K. H. and Berns K. I. (1980) Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J Virol* **34**, 402-9.
- McCarty, D.M., Pereira, D.J., Zolotukhin, I., Zhou, X., Ryan, J.H., Muzyczka, N. (1994) Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adenoassociated virus Rep protein. *J Virol.* **68**, 4988-97.
- McKenna R., Olson N. H., Chipman P. R., Baker T. S., Booth T. F., Christensen J., Aasted B., Fox J. M., Bloom M. E., Wolfinbarger J. B. and Agbandje-McKenna M. (1999) Three-dimensional structure of Aleutian mink disease parvovirus: implications for disease pathogenicity. *J Virol* **73**, 6882-91.
- McPherson R. A., Rosenthal L. J. and Rose J. A. (1985) Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* **147**, 217-22.
- Melnick, J.L., Mayor, H.D., Smith, K.O., Rapp, F. (1965) Association of 20 millimicron particles with adenoviruses. *J Bacteriol.* 90, 271-74.

- Meyer W. J., Gidwitz S., Ayers V. K., Schoepp R. J. and Johnston R. E. (1992) Conformational alteration of Sindbis virion glycoproteins induced by heat, reducing agents, or low pH. *J Virol* **66**, 3504-13.
- Meyers C., Alam S., Mane M. and Hermonat P. L. (2001) Altered biology of adenoassociated virus type 2 and human papillomavirus during dual infection of natural host tissue. *Virology* **287**, 30-9.
- Meyers C., Mane M., Kokorina N., Alam S. and Hermonat P. L. (2000) Ubiquitous human adeno-associated virus type 2 autonomously replicates in differentiating keratinocytes of a normal skin model. *Virology* **272**, 338-46.
- Mizukami H., Young N. S. and Brown K. E. (1996) Adeno-associated virus type 2 binds to a 150-kilodalton cell membrane glycoprotein. *Virology* **217**, 124-30.
- Moskalenko M., Chen L., van Roey M., Donahue B. A., Snyder R. O., McArthur J. G. and Patel S. D. (2000) Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol* **74**, 1761-6.
- Muramatsu S., Mizukami H., Young N. S. and Brown K. E. (1996) Nucleotide sequencing and generation of an infectious clone of adeno-associated virus 3. *Virology* **221**, 208-17.
- Muzyczka N. (1992) Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **158**, 97-129.
- Myers M. W. and Carter B. J. (1980) Assembly of adeno-associated virus. *Virology* **102**, 71-82.
- Ni T. H., Zhou X., McCarty D. M., Zolotukhin I. and Muzyczka N. (1994) In vitro replication of adeno-associated virus DNA. *J Virol* **68**, 1128-38.
- Ogston P., Raj K. and Beard P. (2000) Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV-16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV-16 E2 protein. *J Virol* **74**, 3494-504.
- Opie S. R., Warrington K. H., Jr., Agbandje-McKenna M., Zolotukhin S. and Muzyczka N. (2003) Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *J Virol* **77**, 6995-7006.
- Pear W. S., Nolan G. P., Scott M. L. and Baltimore D. (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8392-6.
- Pereira D. J., McCarty D. M. and Muzyczka N. (1997) The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol* **71**, 1079-88.

- Qing K., Mah C., Hansen J., Zhou S., Dwarki V. and Srivastava A. (1999) Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adenoassociated virus 2. *Nat Med* **5**, 71-7.
- Qiu J. and Brown K. E. (1999) A 110-kDa nuclear shuttle protein, nucleolin, specifically binds to adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid. *Virology* **257**, 373-82.
- Qiu J., Handa A., Kirby M. and Brown K. E. (2000) The interaction of heparin sulfate and adeno-associated virus 2. *Virology* **269**, 137-47.
- Rabinowitz J. E., Xiao W. and Samulski R. J. (1999) Insertional mutagenesis of AAV2 capsid and the production of recombinant virus. *Virology* **265**, 274-85.
- Rommelaere, J., Cornelis, J. (1991) Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods* **33**, 233-51.
- Rose J. A., Maizel J. V., Jr., Inman J. K. and Shatkin A. J. (1971) Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J Virol* **8**, 766-70.
- Ruffing M., Heid H. and Kleinschmidt J. A. (1994) Mutations in the carboxy terminus of adeno-associated virus 2 capsid proteins affect viral infectivity: lack of an RGD integrin-binding motif. *J Gen Virol* **75** ( **Pt 12**), 3385-92.
- Ruffing M., Zentgraf H. and Kleinschmidt J. A. (1992) Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J Virol* **66**, 6922-30.
- Rutledge E. A., Halbert C. L. and Russell D. W. (1998) Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol* **72**, 309-19.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A. and Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-4.
- Salo R. J. and Mayor H. D. (1977) Structural polypeptides of parvoviruses. *Virology* **78**, 340-5.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, New York.*
- Samulski R. J., Berns K. I., Tan M. and Muzyczka N. (1982) Cloning of adenoassociated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2077-81.
- Samulski R. J., Chang L. S. and Shenk T. (1987) A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J Virol* **61**, 3096-101.

- Samulski R. J., Chang L. S. and Shenk T. (1989) Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* **63**, 3822-8.
- Samulski R. J., Zhu X., Xiao X., Brook J. D., Housman D. E., Epstein N. and Hunter L. A. (1991) Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *Embo J* 10, 3941-50.
- Samulski, R. J., Sally, M., Muzyczka, N. (1999) Adeno-associated viral vectors. In: The development of human gene therapy. Friedman, T. (Ed.). *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor*, 132-72.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Sanlioglu S., Benson P. K., Yang J., Atkinson E. M., Reynolds T. and Engelhardt J. F. (2000) Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. J Virol 74, 9184-96.
- Schlehofer J. R., Ehrbar M. and zur Hausen H. (1986) Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. *Virology* **152**, 110-7.
- Schlehofer, J. R. (1994) The tumor suppressive properties of adeno-associated viruses. *Mutat Res.* **305**, 303-13.
- Siegel B. M. (1971) Current and future prospects in electron microscopy for observations in biomolecular structure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **261**, 5-14.
- Siegl G., Bates R. C., Berns K. I., Carter B. J., Kelly D. C., Kurstak E. and Tattersall P. (1985) Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* **23**, 61-73.
- Simpson A. A., Chandrasekar V., Hebert B., Sullivan G. M., Rossmann M. G. and Parrish C. R. (2000) Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids of canine and feline parvoviruses. *J Mol Biol* **300**, 597-610.
- Simpson A. A., Chipman P. R., Baker T. S., Tijssen P. and Rossmann M. G. (1998) The structure of an insect parvovirus (Galleria mellonella densovirus) at 3.7 A resolution. *Structure* **6**, 1355-67.
- Simpson A. A., Hebert B., Sullivan G. M., Parrish C. R., Zadori Z., Tijssen P. and Rossmann M. G. (2002) The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *J Mol Biol* **315**, 1189-98.
- Smith R. H. and Kotin R. M. (1998) The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity. *J Virol* **72**, 4874-81.

- Smuda J. W. and Carter B. J. (1991) Adeno-associated viruses having nonsense mutations in the capsid genes: growth in mammalian cells containing an inducible amber suppressor. *Virology* **184**, 310-8.
- Snyder R. O., Im D. S. and Muzyczka N. (1990a) Evidence for covalent attachment of the adeno-associated virus (AAV) rep protein to the ends of the AAV genome. *J Virol* **64**, 6204-13.
- Snyder R. O., Samulski R. J. and Muzyczka N. (1990b) In vitro resolution of covalently joined AAV chromosome ends. *Cell* **60**, 105-13.
- Sonntag, F. (2002) Funktionelle Charakterisierung von kurzen basischen Sequenzen in den Kapsidproteinen des adenoassoziierten Virus Typ 2. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Srivastava A. (1987) Replication of the adeno-associated virus DNA termini in vitro. Intervirology 27, 138-47.
- Srivastava A., Lusby E. W. and Berns K. I. (1983) Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* **45**, 555-64.
- Steinbach, S. (1998) Untersuchungen zur *In-vitro* Rekonstitution des Adenoassoziierten Virus Typ 2. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Summerford C., Bartlett J. S. and Samulski R. J. (1999) AlphaVbeta5 integrin: a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* **5**, 78-82.
- Summerford C. and Samulski R. J. (1998) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* **72**, 1438-45.
- Thomas J. O. and Kornberg R. D. (1975) An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 2626-30.
- Thomson B. J., Weindler F. W., Gray D., Schwaab V. and Heilbronn R. (1994) Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* **204**, 304-11.
- Tratschin J. D., Miller I. L. and Carter B. J. (1984) Genetic analysis of adenoassociated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J Virol* **51**, 611-9.
- Tratschin J. D., Tal J. and Carter B. J. (1986) Negative and positive regulation in trans of gene expression from adeno-associated virus vectors in mammalian cells by a viral rep gene product. *Mol Cell Biol* **6**, 2884-94.
- Tsao J., Chapman M. S., Agbandje M., Keller W., Smith K., Wu H., Luo M., Smith T. J., Rossmann M. G., Compans R. W. and et al. (1991) The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 251, 1456-64.

- Tullis G. E., Burger L. R. and Pintel D. J. (1993) The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J Virol* **67**, 131-41.
- Vihinen-Ranta M., Wang D., Weichert W. S. and Parrish C. R. (2002) The VP1 Nterminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. *J Virol* **76**, 1884-91.
- Vihinen-Ranta M., Yuan W. and Parrish C. R. (2000) Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. *J Virol* **74**, 4853-9.
- van Regenmortel, M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemin S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R., and Wickner R.B.(ed.) (2000) In: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, Calif.
- Wang X. S., Khuntirat B., Qing K., Ponnazhagan S., Kube D. M., Zhou S., Dwarki V. J. and Srivastava A. (1998) Characterization of wild-type adeno-associated virus type 2-like particles generated during recombinant viral vector production and strategies for their elimination. *J Virol* 72, 5472-80.
- Weger S., Wendland M., Kleinschmidt J. A. and Heilbronn R. (1999) The adenoassociated virus type 2 regulatory proteins rep78 and rep68 interact with the transcriptional coactivator PC4. *J Virol* **73**, 260-9.
- Weger S., Wistuba A., Grimm D. and Kleinschmidt J. A. (1997) Control of adenoassociated virus type 2 cap gene expression: relative influence of helper virus, terminal repeats, and Rep proteins. *J Virol* **71**, 8437-47.
- Weitzman M. D., Fisher K. J. and Wilson J. M. (1996) Recruitment of wild-type and recombinant adeno-associated virus into adenovirus replication centers. *J Virol* **70**, 1845-54.
- Weitzman M. D., Kyostio S. R., Kotin R. M. and Owens R. A. (1994) Adenoassociated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5808-12.
- Whittaker, G. R., Kann, M., Helenius, A. (2000) Viral entry into the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16**, 627-51.
- Winocour E., Callaham M. F. and Huberman E. (1988) Perturbation of the cell cycle by adeno-associated virus. *Virology* **167**, 393-9.
- Wistuba A., Kern A., Weger S., Grimm D. and Kleinschmidt J. A. (1997) Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol* **71**, 1341-52.

- Wistuba A., Weger S., Kern A. and Kleinschmidt J. A. (1995) Intermediates of adenoassociated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins. *J Virol* **69**, 5311-9.
- Wobus C. E., Hugle-Dorr B., Girod A., Petersen G., Hallek M. and Kleinschmidt J. A. (2000) Monoclonal antibodies against the adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-2-cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. *J Virol* 74, 9281-93.
- Wobus, C.E. (2000) Immunological targeting and cellular entry of adeno-associated virus type 2. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Wu P., Xiao W., Conlon T., Hughes J., Agbandje-McKenna M., Ferkol T., Flotte T. and Muzyczka N. (2000) Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism. *J Virol* **74**, 8635-47.
- Xiao W., Chirmule N., Berta S. C., McCullough B., Gao G. and Wilson J. M. (1999) Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* **73**, 3994-4003.
- Xie Q., Bu W., Bhatia S., Hare J., Somasundaram T., Azzi A. and Chapman M. S. (2002) The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10405-10.
- Xie Q. and Chapman M. S. (1996) Canine parvovirus capsid structure, analyzed at 2.9 A resolution. *J Mol Biol* **264**, 497-520.
- Yakobson B., Koch T. and Winocour E. (1987) Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. *J Virol* **61**, 972-81.
- Yalkinoglu A. O., Heilbronn R., Burkle A., Schlehofer J. R. and zur Hausen H. (1988) DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res* **48**, 3123-9.
- Yang Q., Chen F., Ross J. and Trempe J. P. (1995) Inhibition of cellular and SV40 DNA replication by the adeno-associated virus Rep proteins. *Virology* **207**, 246-50.
- Yanisch-Perron C., Vieira J. and Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-19.
- Zadori Z., Szelei J., Lacoste M. C., Li Y., Gariepy S., Raymond P., Allaire M., Nabi I. R. and Tijssen P. (2001) A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell* **1**, 291-302.
- Zolotukhin S., Byrne B. J., Mason E., Zolotukhin I., Potter M., Chesnut K., Summerford C., Samulski R. J. and Muzyczka N. (1999) Recombinant adeno-

associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* **6**, 973-85.

# 8 Anhang

## 8.1 Ad-VP DNA-Sequenz

In dieser Arbeit wurde die DNA von Ad-VP Viren isoliert und mit den Primern Ad-VPA und VP2B (s. Kap. 3.3) zum Teil sequenziert. Somit wurde sichergestellt, dass keine zusätzlich eingeführten oder spontan aufgetretenen Mutationen in den N-terminalen Bereichen der drei AAV-2 VP-Proteine vorhanden waren. Die identischen Sequenzen der Ad-VP-DNA und der wt AAV-2 DNA (Bp 2010-3153) sind hier abgebildet:

AdVP:	1	ggacagaaagactgtttagagtgctttcccgtgtcagaatctcaacccgtttctgtcgtc
AAV-2:	2010	ggacagaaagactgtttagagtgctttcccgtgtcagaatctcaacccgtttctgtcgtc
AdVP:	61	aaaaaggcgtatcagaaactgtgctacattcatcatatcatgggaaaggtgccagacgct
AAV-2:	2070	aaaaaggcgtatcagaaactgtgctacattcatcatatcatgggaaaggtgccagacgct
AdVP:	121	tgcactgcctgcgatctggtcaatgtggatttggatgactgcatctttgaacaataaatg
AAV-2:	2130	tgcactgcctgcgatctggtcaatgtggatttggatgactgcatctttgaacaataaatg
AdVP:	181	atttaaatcaggtatggctgccgatggttatcttccagattggctcgaggacactctctc
AAV-2:	2190	atttaaatcaggtatggctgccgatggttatcttccagattggctcgaggacactctctc
AdVP:	241	tgaaggaataagacagtggtggaagctcaaacctggcccaccaccaccaaagcccgcaga
AAV-2:	2250	tgaaggaataagacagtggtggaagctcaaacctggcccaccaccaaagcccgcaga
AdVP:	301	gcggcataaggacgacagcaggggtcttgtgcttcctgggtacaagtacctcggaccctt
AAV-2:	2310	gcggcataaggacgacagcaggggtcttgtgcttcctgggtacaagtacctcggaccctt
AdVP:	361	caacggactcgacaagggagagccggtcaacgaggcagacgccgcggccctcgagcacga
AAV-2:	2370	caacggactcgacaagggagagccggtcaacgaggcagacgccgcggccctcgagcacga
AdVP:	421	caaagcctacgaccggcagctcgacagcggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgc
AAV-2:	2430	caaagcctacgaccggcagctcgacagcggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgc
AdVP:	481	cgacgcggagtttcaggagcgccttaaagaagatacgtcttttggggggcaacctcggacg
AAV-2:	2490	$\verb cgacgcggagtttcaggagcgccttaaagaagatacgtcttttggggggcaacctcggacg  $

AdVP:	541	agcagtcttccaggcgaaaaagagggttcttgaacctctgggcctggttgaggaacctgt
AAV-2:	2550	agcagtcttccaggcgaaaaagagggttcttgaacctctgggcctggttgaggaacctgt
AdVP:	601	P <sup>VP2</sup> taagacggctccgggaaaaaagaggccggtagagcactctcctgtggagccagactcctc
AAV-2:	2610	taagacggctccgggaaaaaagaggccggtagagcactctcctgtggagccagactcctc
AdVP:	661	ctcgggaaccggaaaggcgggccagcagcctgcaagaaaaagattgaattttggtcagac
AAV-2:	2670	ctcgggaaccggaaaggcgggccagcagcctgcaagaaaagattgaattttggtcagac
AdVP:	721	tggagacgcagactcagtacctgacccccagcctctcggacagccaccagcagccccctc
AAV-2:	2730	tggagacgcagactcagtacctgaccccagcctctcggacagccaccagcagccccctc
AdVP:	781	P <sup>VP3</sup> tggtctgggaactaatacgatggctacaggcagtggcgcaccaatggcagacaataacga
AAV-2:	2790	tggtctgggaactaatacgatggctacaggcagtggcgcaccaatggcagacaataacga
AdVP:	841	gggcgccgacggagtgggtaattcctcgggaaattggcattgcgattccacatggatgg
AAV-2:	2850	gggcgccgacggagtgggtaattcctcgggaaattggcattgcgattccacatggatgg
AdVP:	901	cgacagagtcatcaccagcacccgaacctgggccctgcccacctacaacaaccacct
AAV-2:	2910	cgacagagtcatcaccaccagcacccgaacctgggccctgcccacctacaacaaccacct
AdVP:	961	ctacaaacaaatttccagccaatcaggagcctcgaacgacaatcactactttggctacag
AAV-2:	2970	ctacaaacaaatttccagccaatcaggagcctcgaacgacaatcactactttggctacag
AdVP:	1021	caccccttgggggtattttgacttcaacagannccactgncacttttcaccacgtgactg
AAV-2:	3030	caccccttgggggtattttgacttcaacagattccactgccacttttcaccacgtgactg
AdVP:	1081	gcaaagactcatcaacaactggggattccgacccaagagactcaacttcaagctctt
AAV-2:	3090	gcaaagactcatcaacaactggggattccgacccaagagactcaacttcaagctctt
AdVP:	1141	taac
AAV-2:	3150	taac

### 8.2 Plasmidkarten

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Transferplasmide und rekombinante Adenogenomplasmide hergestellt, um rekombinante Adenoviren zu produzieren (s. Kap. 3.2, 5.1.3.2, 5.1.4.1). Die Genkarten der Plasmide sind im Folgenden abgebildet (Transferplasmide links, Adenogenomplasmide rechts):

- amp kennzeichnet das Ampicillin-Resistenzgen
- bei *E1*, *E2A*, *E4 VA* handelt es ich um adenovirale Bereiche, deren Produkte von AAV-2 für eine Vermehrung benötigt werden
- *cap* kennzeichnet die *cap*-Genkassette von AAV-2 mit dem jeweiligen mutierten Protein
- RSV steht für den "Rous Sarcoma Virus"-Promotor
- ITR markiert die adenoviralen "inverted terminal repeats"





















# 8.3 Publikation

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Arbeit veröffentlicht:

#### Kronenberg S., Kleinschmidt J. A. and Böttcher B. (2001)

Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids. *EMBO Rep* **2**, 997-1002.

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor von Priv.-Doz. Dr. Jürgen Kleinschmidt in der Abteilung Tumorvirologie am Institut für Angewandte Tumorvirologie (ATV) des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg, sowie im Labor von Priv.-Doz. Dr. Bettina Böttcher in der Abteilung Strukturbiologie des Europäischen Labors für Molekularbiologie (EMBL) in Heidelberg im Zeitraum von August 2000 bis Juli 2003 angefertigt.

Dr. Jürgen Kleinschmidt danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Außerdem möchte ich mich herzlich für die stetige hilfreiche Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung, sowie die kritische Durchsicht von Teilen dieser Arbeit und dem Begutachten der gesamten Arbeit bedanken.

Dr. Gabriele Petersen danke ich für die freundliche Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Dr. Bettina Böttcher möchte ich für die Kooperation und die Einführung in die Elektronenkryomikroskopie danken. Außerdem bedanke ich mich herzlich für die Durchsicht dieser Arbeit und die vielen interessanten und hilfreichen Diskussionen in den letzten drei Jahren.

Petra Poberschin und Kristin Schmidt danke ich für die gute Zusammenarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft.

Meinen früheren und jetzigen Kollegen am DKFZ und am EMBL möchte ich sehr herzlich für angenehme Arbeitsatmosphäre, die wertvollen Ratschläge und hilfreichen Diskussionen danken.

Birgit Hub und Ken Goldie danke ich für die Einführung in die Elektronenmikroskopie, Thomas Holz für die Beseitigung der immer wieder aufgetretenen Computerprobleme und Dr. Willi von der Lieth für das VP1-Modell.

Mein größter Dank gilt meinem Bruder Winfried, der mich während dieser (nicht immer leichten) Zeit in vielerlei Hinsicht unterstützt hat und auf den ich mich jederzeit verlassen konnte.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern für ihren stetigen Glauben an mich bedanken, vor allem bei meiner Mutter, die das Ende meiner Dissertation leider nicht mehr miterleben kann.

### DANKE