

Die Funktion der viralen Phospholipase A₂ während der Infektion des Adeno-assoziierten Virus 2

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Stefanie Stahnke geb. Schlemminger

aus Münster

Köln

2008

Berichtersteller/in: Prof. Dr. Jens Brüning
Prof. Dr. Herbert Pfister
PD Dr. Hildegard Büning

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 09.02.2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Dezember 2004 bis zum Dezember 2008 unter der Leitung von PD Dr. Hildegard Büning im Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität zu München und in der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums zu Köln angefertigt.

Im Verlauf dieser Arbeit entstanden folgende Publikationen:

Lux K., Goerlitz N., **Schlemminger S.**, Perabo L., Goldnau D., Endell J., Leike K., Kofler D.M., Finke S., Hallek M., Büning H. (2005) Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. *J Virol* 79(18):11776-11787

Stahnke S., Lux K., Kreppel F., Hallek M., Büning H. Endosomal escape of Adeno-associated Virus Serotype 2 requires Phospholipase A₂ domain. *in preparation*

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------------------|---|----|
| Abkürzungen | 1 | |
| Zusammenfassung | 4 | |
| Abstract | 5 | |
| 1 | Einleitung..... | 6 |
| 1.1 | Adeno-assoziiertes Virus | 6 |
| 1.1.1 | Klassifizierung des Adeno-assoziierten Virus..... | 6 |
| 1.1.2 | Genomstruktur des Adeno-assoziierten Virus | 8 |
| 1.1.3 | Infektionsbiologie des AAV | 10 |
| 1.1.3.1 | Virus-Zellmembran-Interaktion | 10 |
| 1.1.3.2 | Rezeptor-vermittelte Endozytose von AAV | 11 |
| 1.1.3.3 | Endosomaler Transport von AAV | 12 |
| 1.1.3.4 | Endosomenaustritt von AAV | 13 |
| 1.1.3.5 | Perinukleare Akkumulation und Kerneintritt von AAV | 15 |
| 1.1.3.6 | Produktive Virusvermehrung und latente Infektion | 17 |
| 1.2 | Visualisierung von AAV..... | 19 |
| 1.3 | Phospholipasen A ₂ | 20 |
| 1.3.1 | Klassifizierung von Phospholipasen A ₂ | 20 |
| 1.3.2 | Sekretorische Phospholipasen A ₂ (sPLA ₂) | 22 |
| 1.3.3 | Vergleich der viralen PLA ₂ und der sPLA ₂ aus Säugerzellen | 24 |
| 1.4 | Infektionsbiologie des Adenovirus..... | 25 |
| 1.4.1 | Virus-Zellmembran-Interaktion..... | 25 |
| 1.4.2 | Rezeptor-vermittelte Endozytose | 26 |
| 1.4.3 | Endosomaler Austritt | 26 |
| 1.4.4 | Cytoplasmatischer Transport und Kerneintritt | 27 |
| 1.4.5 | Produktion neuer Viruspartikel..... | 28 |
| 1.5 | Fragestellung..... | 28 |
| 2 | Material und Methoden | 30 |
| 2.1 | Material..... | 30 |
| 2.1.1 | Zellen..... | 30 |
| 2.1.2 | Viren (außer AAV) | 30 |
| 2.1.3 | Kompetente Bakterien | 30 |
| 2.1.4 | Plasmide..... | 31 |
| 2.1.5 | Primer..... | 36 |
| 2.1.6 | Kulturmedien und Zusätze | 37 |
| 2.1.6.1 | Zellkulturmedien und Zusätze | 37 |
| 2.1.6.2 | Bakterienmedien und Zusätze | 37 |
| 2.1.7 | Enzyme | 38 |
| 2.1.8 | Antikörper | 38 |
| 2.1.8.1 | Antikörper gegen zelluläre Antigene | 38 |
| 2.1.8.2 | Antikörper gegen AAV Proteine | 38 |
| 2.1.8.3 | Sekundäre Antikörper | 38 |
| 2.1.9 | Chemikalien und Reagenzien | 39 |
| 2.1.10 | Standard Kits | 41 |
| 2.1.11 | Größen- und Mengenstandards | 41 |
| 2.1.12 | Verbrauchsmaterial..... | 41 |
| 2.1.13 | Geräte | 42 |
| 2.1.14 | Daten verarbeitende Software | 43 |
| 2.2 | Methoden | 44 |
| 2.2.1 | Zellbiologische Methoden | 44 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.2.1.1 | Kultivierung von Säugerzellen..... | 44 |
| 2.2.1.2 | Einfrieren und Auftauen von Zellen | 44 |
| 2.2.1.3 | Bestimmung der Zellzahl..... | 45 |
| 2.2.1.4 | Kultivierung von Säugetierzellen auf Deckgläschen | 45 |
| 2.2.1.5 | Transfektion von Säugetierzellen | 45 |
| 2.2.1.5.1 | Transfektion von Plasmid-DNA in Säugetierzellen mittels Calcium-Phosphat-Methode..... | 45 |
| 2.2.1.5.2 | Transfektion von Plasmid-DNA in Säugetierzellen mittels Lipofectamine™ 2000 | 46 |
| 2.2.1.6 | Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie (FACS) | 46 |
| 2.2.1.7 | Aufreinigung von Gesamt-, Zytoplasma- und Kernfraktion | 46 |
| 2.2.2 | Virologische Methoden | 47 |
| 2.2.2.1 | Adenovirusfreie Produktion von Adeno-assoziierten Viren..... | 47 |
| 2.2.2.2 | Aufreinigung und Konzentration von Adeno-assoziierten Viren im Iodixanolgradienten..... | 48 |
| 2.2.2.3 | Bestimmung des Titers der viralen Präparationen..... | 49 |
| 2.2.2.3.1 | Bestimmung des genomischen Titers viraler Präparationen..... | 49 |
| 2.2.2.3.2 | Bestimmung des Kapsidtiters viraler Präparationen..... | 50 |
| 2.2.2.4 | Virusinfektionen von Säugerzellen | 51 |
| 2.2.3 | Mikrobiologische Methoden | 52 |
| 2.2.3.1 | Kultivierung und Konservierung von Bakterienstämmen | 52 |
| 2.2.3.2 | Herstellung chemisch kompetenter Bakterien | 52 |
| 2.2.3.3 | Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien..... | 53 |
| 2.2.4 | Molekularbiologische Methoden..... | 53 |
| 2.2.4.1 | Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> | 53 |
| 2.2.4.2 | Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration..... | 54 |
| 2.2.4.3 | DNA-Restriktionsspaltung | 54 |
| 2.2.4.4 | Agarosegelelektrophorese | 54 |
| 2.2.4.5 | Polymerase-Ketten-Reaktion | 55 |
| 2.2.4.5.1 | Nicht-quantitative PCR..... | 55 |
| 2.2.4.5.2 | Quantitative PCR..... | 55 |
| 2.2.4.6 | Sequenzierung..... | 58 |
| 2.2.4.7 | Extraktion von DNA aus Säugerzellen | 58 |
| 2.2.4.8 | Extraktion von DNA aus Gewebe..... | 58 |
| 2.2.4.9 | Extraktion von zellulärer RNA | 59 |
| 2.2.4.10 | cDNA-Synthese | 59 |
| 2.2.5 | Proteinanalytik | 60 |
| 2.2.5.1 | Herstellung von Gesamtproteinextrakten | 60 |
| 2.2.5.2 | Proteinfällung mittels Trichloressigsäure (TCA) | 60 |
| 2.2.5.3 | Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford | 60 |
| 2.2.5.4 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)..... | 61 |
| 2.2.5.5 | Protein-Transfer (Western Blot) | 62 |
| 2.2.5.6 | Immunologischer Proteinnachweis..... | 62 |
| 2.2.5.6.1 | Western Blot Analyse..... | 62 |
| 2.2.5.6.2 | Detektion von GFP mittels Durchflusszytometrie (FACS)..... | 63 |
| 2.2.5.6.3 | Immunfluoreszenz | 63 |
| 3 | Ergebnisse..... | 64 |
| 3.1 | AAV vermittelte Transduktion von Hepatozyten | 64 |
| 3.1.1 | AAV8 zeigt trotz deutlich schlechterer Internalisierung eine äquivalent hohe Anzahl Transgen-exprimierender Zellen wie AAV2 in H2.35-Zellen | 64 |
| 3.1.2 | Fusionsproteine zur genetischen Markierung Adeno-assoziiierter Viruskapside | 67 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.1.3 | Die Substituierung von VP2 durch Fluoreszenzprotein-VP2 ermöglicht die Produktion von fluoreszenzmarkierten, rekombinanten AAV2 und AAV8 Vektoren | 70 |
| 3.1.4 | Neue Anwendungsmöglichkeiten markierter AAV-Vektoren zur Untersuchung der Infektionsbiologie von AAV | 73 |
| 3.1.5 | MG132 führt zu einer deutlichen Steigerung der Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in AAV2 und AAV8 transduzierten H2.35-Zellen | 76 |
| 3.2 | Die virale Phospholipase A ₂ und ihre Funktion während einer AAV-Infektion | 79 |
| 3.2.1 | AAV2 und PLA ₂ -Mutante zeigen dieselbe Effizienz beim Eintritt in HeLa-Zellen | 79 |
| 3.2.2 | AAV2 und PLA ₂ -Mutante kolokalisieren 30 min und 1h nach Infektion | 80 |
| 3.2.3 | PLA ₂ -Mutante zeigt trotz perinukleärer Akkumulation nur eine schwache, verspätete Transgenexpression in HeLa-Zellen | 82 |
| 3.2.4 | Aphidicolin-arretierte HeLa-Zellen zeigen eine verstärkte Genexpression von AAV2 und PLA ₂ -Mutante | 85 |
| 3.2.5 | Die Stabilisierung der Kernmembran von HeLa-Zellen verhindert weder für AAV2 noch für die PLA ₂ -Mutante den Transport von Vektor DNA in den Zellkern..... | 89 |
| 3.2.6 | Brefeldin A induziert einen dramatischen Abfall in der Anzahl GFP-exprimierender Zellen in AAV2 und mit der PLA ₂ -Mutante transduzierten HeLa-Zellen | 91 |
| 3.2.7 | Bafilomycin A1 verursacht für AAV2 und die PLA ₂ -Mutante eine dramatische Reduktion der Anzahl Transgen-exprimierender Zellen | 93 |
| 3.2.8 | Koinfektionen mit Adenoviren beeinflussen die Anzahl GFP-exprimierender Zellen in mit AAV2 bzw. der PLA ₂ -Mutante transduzierten HeLa-Zellen..... | 94 |
| 3.2.8.1 | Koinfektion mit Adenovirus 5 Wildtyp steigert die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in mit AAV2 oder der PLA ₂ -Mutante transduzierten HeLa-Zellen | 95 |
| 3.2.8.2 | Kotransduktion mit rekombinantem Adenovirus 5 steigert die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in mit der PLA ₂ -Mutante, aber nicht in AAV2 transduzierten HeLa-Zellen..... | 96 |
| 3.2.8.3 | Die Koinfektion mit Adenovirus 2 ts-1 hat keinen Einfluss auf die Menge Transgen-exprimierender Zellen in AAV2 und mit der PLA ₂ -Mutante transduzierten HeLa-Zellen..... | 98 |
| 3.2.8.4 | Visualisierung der Koinfektion von AAV2 und PLA ₂ -Mutante mit Adenovirus 5 in HeLa-Zellen | 100 |
| 3.2.9 | Proteasomeninhibitor MG132 und rekombinantes Adenovirus 5 steigern die Anzahl GFP-exprimierender Zellen in mit der PLA ₂ -Mutante transduzierten HeLa-Zellen in additiver Weise | 101 |
| 3.2.10 | Die Koinfektion der PLA ₂ -Mutante mit AAV2wt führt zu keiner signifikanten Erhöhung des Anteils Transgen-exprimierender Zellen..... | 103 |
| 4 | Diskussion | 105 |
| 4.1 | Die AAV:Hepatozyten Interaktion..... | 105 |
| 4.2 | Die intrinsische Phospholipase-Aktivität ermöglicht die endosomale Freisetzung von Parvoviren..... | 109 |
| 4.3 | Zusammenfassung und Ausblick | 114 |
| 5 | Literaturverzeichnis..... | 116 |

Abkürzungen

Aminosäuren

| | |
|---|----------------|
| A | Alanin |
| D | Asparaginsäure |
| H | Histidin |
| N | Asparagin |

Basen

| | |
|---|---------|
| A | Adenin |
| C | Cytosin |
| G | Guanin |
| T | Thymin |

| | |
|-------------------|---|
| A | Ampere |
| AAV | Adeno-assoziiertes Virus |
| AAVS1 | AAV Integriationsstelle 1 |
| Ab | Antikörper |
| Abb | Abbildung |
| Ad | Adenovirus |
| ATTC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| bp | Basenpaar |
| BAF | Bafilomycin A1 |
| BFA | Brefeldin A |
| BR | basische Region |
| BSA | bovines Serum Albumin |
| CAR | Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor |
| cDNA | complementäre DNA |
| CFP | <i>cyan fluorescent protein</i> (cyan fluoreszierendes Protein) |
| CMV | Cytomegalievirus |
| cPLA ₂ | cytosolische Phospholipase A ₂ |
| CPV | canines Parvovirus |
| Dapi | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DEPC | Diethylidicarbonat |
| DMEM | <i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTP | <i>deoxyribonucleotid triphosphat</i> (Desoxyribonukleotidtriphosphat) |
| DOC | Deoxycholate |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | <i>ethylene-diamin-tetraacetat</i> (Ethylamindiamintetraessigsäure) |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzymgekoppelter Immunadsorptions-test) |
| FACS | <i>fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie) |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum) |
| FGFR-1 | <i>fibroblast growth factor receptor 1</i> (Fibroblastenwachstumsfaktor Rezeptor 1) |
| for | <i>forward</i> (vorwärts) |
| FP | Fluoreszenzprotein |
| g | Gramm |
| <i>g</i> | relative Zentrifugalbeschleunigung |
| gp | genomische Partikel |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein) |

| | |
|-------------------|--|
| GOI | <i>genomic particle of infection</i> (Infektionsverhältnis Genom-enthaltender Viren/Zelle) |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-Ethansulfonsäure) |
| HGFP | <i>hepatocyte growth factor receptor 1</i> (Hepatozytenwachstumsfaktor Rezeptor1) |
| HSPG | Heparansulfat-Proteoglykan |
| IP | infektiöse Partikel |
| iPLA ₂ | Ca ²⁺ - independent Phospholipase A ₂ (Ca ²⁺ - unabhängige Phospholipase A ₂) |
| ITR | <i>inverted terminal repeats</i> (invertierte terminale Wiederholungen) |
| kDa | Kilodalton |
| LamR | 37/67 kDa Laminin Rezeptor |
| M | molar |
| m | milli |
| MFI | <i>mean fluorescent intensity</i> (durchschnittliche Fluoreszenzintensität) |
| min | Minute |
| MOI | <i>multiplicity of infection</i> (Infektionsverhältnis Viren/Zelle) |
| MOPS | 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure |
| MTOC | <i>microtubule organization center</i> (Mikrotubuli-Organisationszentrum) |
| MVB | <i>multi vesicular bodies</i> (multivesikuläre Endosomen) |
| MVM | <i>minute virus of mice</i> |
| n | nano |
| NEAA | <i>non essentiell amino acids</i> (nicht essentielle Aminosäuren) |
| NLS | <i>nuclear localization signal</i> (Kernlokalisierungssignal) |
| NPC | <i>nuclear pore complex</i> (Kernporenkomplex) |
| nt | Nukleotid |
| ORF | <i>open reading frame</i> (offener Leserahmen) |
| p | piko |
| PA | <i>phosphatidic acid</i> (Phosphatidsäure) |
| PAF-AH | <i>platelet-activating factor</i> (Plättchenaktivierender Faktor) Acetylhydrolasen |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung) |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PDGFP | <i>platelet derived growth factor receptor</i> (Blutplättchen-Wachstumsfaktor Rezeptor) |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PI | <i>propidium iodid</i> (Propidiumjodid) |
| p.i. | <i>post infection</i> (nach Infektion) |
| PI3K | Phosphoinositol-3-Kinase |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PL | Phospholipase |
| PLA ₁ | Phospholipase A ₁ |
| PLA ₂ | Phospholipase A ₂ |
| PLB | Phospholipase B |
| PLC | Phospholipase C |
| PLD | Phospholipase D |
| POD | Peroxidase |
| polyA | Polyadenylierungssignal |
| p.t. | <i>post transduction</i> (nach Transduktion) |
| rev | <i>reverse</i> (rückwärts) |
| rpm | <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| RBS | <i>rep binding site</i> (Rep Bindestelle) |
| RFP | <i>red fluorescent protein</i> (rot fluoreszierendes Protein) |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure) |
| RT | Raumtemperatur |
| RRX | <i>rhodamine-red-x</i> |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat) |
| sec | <i>seconds</i> (Sekunden) |
| SEM | <i>standard error of the mean</i> (durchschnittlicher Standardfehler) |
| sn | stereospezifische Nummerierung |

| | |
|-------------------|---|
| sPLA ₂ | sekretorische Phospholipase A ₂ |
| SV | Simian Adenovirus |
| TCA | <i>trichlor acetic acid</i> (Trichloressigsäure) |
| TMB | 3,3', 5, 5', Tetramethylbenzidine |
| TRS | <i>terminal resolution site</i> (terminale Schnittstelle) |
| Vol | Volumen |
| VP | virales Protein (von AAV) |
| v/v | <i>volume / volume</i> (Volumen pro Volumen) |
| w/v | <i>weight / volume</i> (Gewicht pro Volumen) |
| wt | Wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | zentrales Nervensystem |
| μ | mikro |

Zusammenfassung

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV), ein Vertreter der Parvoviridae, wurde zu einem sehr erfolgreichen Vektorsystem entwickelt. Einen wichtigen Beitrag hierzu hat die Verfügbarkeit der verschiedenen Serotypen geleistet. Zwei dieser Serotypen, AAV2 und AAV8, wurden in dieser Arbeit näher untersucht. Beide Serotypen akkumulieren nach intravenöser Gabe in der Leber, aber nur AAV8 vermittelt eine effiziente Transgenexpression. In meiner Arbeit konnte ich deutlich zeigen, dass AAV2 im Gegensatz zu AAV8 in Hepatozyten einen intrazellulären Block erfährt. So wurde AAV2 zwar signifikant effizienter als AAV8 in humane (HepG2) und murine (H2.35) Hepatozyten aufgenommen, aber im Vergleich zu AAV8 waren deutlich mehr intrazelluläre AAV2-Partikel nötig, um in Hepatozyten eine Genexpression zu erreichen. Die Identifizierung des limitierenden Schritts könnte durch die Visualisierung der Transduktion erleichtert werden. Bis zu meiner Arbeit waren mikroskopische Analysen für AAV8 jedoch nicht möglich, da keine Antikörper zur Verfügung stehen. Um diese Limitation zu überwinden, markierte ich das AAV-Kapsid genetisch mit Fluoreszenzproteinen. Hierzu verwendete ich GFP, CFP, DsRed und mCherry, die ich genetisch an den N-Terminus des VP2 fusionierte. Bei der Vektorherstellung werden die Fusionsproteine dann in das Kapsid eingebaut. Die Vektorpräparationen wiesen genomische Titer auf, die mit denen von nicht-markierten Viren vergleichbar waren und konnten erfolgreich zur Visualisierung verwendet werden. Durch diese technische Entwicklung können – wie hier gezeigt - nun auch Ko-Transduktionen mit genetisch-markierten AAV2 und AAV8 Vektoren durchgeführt werden.

Im zweiten Teil meiner Arbeit konnte ich die Rolle der Phospholipase A₂ (PLA₂)-Domäne, die sich in der *unique region* des VP1 befindet, aufklären. Eine Mutation im katalytischen Zentrum der PLA₂ führt zu einer signifikanten Abnahme des infektiösen Titers (Girod et al., 2002). Diese Abnahme begründet sich nicht in einer ineffizienten zellulären Aufnahme, wie ich durch quantitative Bestimmung der intrazellulären Partikel zeigen konnte. Auch werden sowohl die Mutante als auch das AAV2 effizient in die perinukleäre Region transportiert. Da der intrazelluläre Transport von AAV innerhalb von Endosomen erfolgt und späte Endosomen in der perinukleären Region zu detektieren sind, könnte die Phospholipaseaktivität an der Freisetzung der viralen Partikel aus den Endosomen und/oder am Kerneintritt beteiligt sein. Meine Ergebnisse sprachen gegen letztere Hypothese. Dagegen konnte ich zeigen, dass die Inhibierung des proteasomalen Abbaus sowie die Verwendung der endosomolytischen Aktivität des Adenovirus die Transduktionseffizienz der Mutante deutlich steigerte. Daraus lässt sich ableiten, dass die Mutante innerhalb von Endosomen zurückgehalten wird und dass die PLA₂ Aktivität für die Freisetzung von AAV aus den Endosomen benötigt wird.

Abstract

Adeno-associated virus (AAV), a member of the parvovirus family, has gained increasing attention as vector platform due to the availability of a number of different serotype which differ in their tropism. Two of these serotypes, AAV2 and AAV8, are of interest for this work. Both serotypes accumulate in liver following intravenous injection into mice, but only AAV8 elicits a successful gene expression. Within this work, I provided evidence that AAV2 mediated gene transfer into hepatocytes - in contrast to AAV8 - is limited at a post entry step. AAV2 was superior to AAV8 in cell entry into a human (HepG2) and a murine (H2.35) hepatocyte cell line, but in comparison to AAV8 significant fewer intracellular particles of AAV2 successfully contributed to vector genome expression. To investigate the AAV hepatocyte cell interaction in more detail, visualization of the infection process ought to be auxiliary. However, up to my work, imaging studies could not be performed with AAV8 since anti-AAV8 antibodies were lacking. I circumvented this limitation by genetic-labelling of the viral capsid. Briefly, the fluorescent proteins GFP, CFP, DsRed and mCherry, respectively, were fused to the N-terminus of VP2, the second largest of the AAV capsid proteins, and incorporated as fusion protein into the AAV capsid during vector packaging. Viral vector preparation of genetically labelled AAV particles were produced to titers comparable to AAV with unmodified capsids, and viral preparation were used successfully for imaging studies. Due to this development co-infection studies of genetically labelled AAV2 and AAV8 can now be performed as shown here in proof-of-principle experiments.

The second part of my work allows to clarify the role of the secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) domain located in the unique region of the largest AAV capsid protein (VP1) in AAV2 infection biology. A mutation in the catalytic center of the PLA₂ motif causes a dramatic drop in infectivity (Girod et al., 2002) which is not due to impaired cell entry as shown by qPCR analysis of intracellular vector genomes. Both vectors, AAV2 with unmodified capsid and the mutant, were also efficiently transported towards the perinuclear area. Since AAV is transported within endosomes and late endosomes are located in the perinuclear area, phospholipase activity could be involved in endosomal escape and/or nuclear entry. For the latter hypothesis no evidence could be provided. In contrast, mutant could be rescued by inhibiting proteasomal degradation and by applying the endosmolytic activity of adenovirus revealing that the mutant is trapped within this compartment and that PLA₂ activity permits endosomal escape.

1 Einleitung

1.1 Adeno-assoziiertes Virus

1.1.1 Klassifizierung des Adeno-assoziierten Virus

Parvoviren zählen mit einem Durchmesser von 18 - 26 nm zu den kleinsten bekannten Viren (lat. *parvus* = klein). Viren dieser Familie weisen ein einzelsträngiges DNA-Genom von etwa 5 kb auf, welches von einem nicht umhüllten ikosaedrischen Kapsid umschlossen wird. Die Familie der *Parvoviridae* wird in zwei Unterfamilien unterteilt: *Densovirinae*, welche Viren umfasst, die Insekten infizieren, und *Parvovirinae*, welche Viren umfasst, die Vertebraten infizieren. Die *Parvovirinae* werden wiederum in die drei Genera *Parvo-*, *Erythro-* und *Dependovirus* geteilt.

In die Gattung Parvovirus sind bislang nur tierpathogene Parvoviren eingeordnet, etwa das *feline*, *canine* oder *porcine* Parvovirus aber auch das *minute virus of mice* (MVM). Der Gattung *Erythrovirus* wird das einzige bislang bekannte humanpathogene Virus der *Parvoviridae* zugeordnet, das Parvovirus B19. Parvovirus B19 verursacht die Kinderkrankheit Ringelröteln (*Erythema infectiosum*). Bei einer Infektion von Frauen im zweiten oder dritten Schwangerschaftstrimester kann das Virus diaplazentär auf den Fötus übertragen werden und *Hydrops fetalis* und den Abgang des Fötus verursachen (Brown, 2000; Vafaie und Schwartz, 2004). AAV gehört zum Genus *Dependovirus*. AAV wurde 1965 entdeckt, als mehrere Gruppen kleine, gleichmäßig geformte virusähnliche Partikel beschrieben, die sie bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Simian Adenovirus Typ 15 (SV15) entdeckten (Atchison et al., 1965; Melnick et al., 1965). Die beschriebenen Partikel waren 20 nm groß und zeigten eine ikosaedrische Symmetrie. Da diese Partikel aus Protein und DNA zusammengesetzt waren, wurde angenommen, dass es sich um Viren handelt (Atchison et al., 1965; Mayor et al., 1965). Die Partikel konnten sich nur in Anwesenheit von Adenovirus replizieren und wurden deshalb Adenovirus-assoziierte defekte Viren genannt (Atchison et al., 1965).

Es sind keine Symptome oder Krankheiten mit einer AAV-Infektion assoziiert, obwohl 80 – 90% der erwachsenen Bevölkerung seropositiv für AAV sind (Berns und Linden, 1995). Es konnte sogar gezeigt werden, dass AAV in der Lage ist, eine Adenovirus, bovine Papillomvirus oder SV40 bedingte zelluläre Transformation zu inhibieren (De la Maza und Carter, 1981; Hermonat, 1989; Khleif et al., 1991) und dass es einen zytotoxischen Effekt auf maligne Zellen ausübt (Raj et al., 2001).

Die Genera Parvo- und Erythrovirus umfassen autonome Viren, anders als AAV, welches eingeordnet in die Gattung Dependovirus nicht-verwandte Helferviren für seine Replikation benötigt. Als Helfervirus kann Adenovirus, Herpes-simplex-Virus, Vacciniavirus, das humane Cytomegalievirus oder das humane Papillomvirus fungieren (Cockley and Rapp, 1987; McPherson et al., 1985; Richardson and Westphal, 1981; Schlehofer et al., 1986). Es wurde jedoch gezeigt, dass die Replikation von AAV auch durch genotoxischen Stress, hervorgerufen von chemikalischen und physikalischen Karzinogenen, induziert werden kann (Schlehofer et al., 1986; Yakobson et al., 1987; Yakobson et al., 1989; Yalkinoglu et al., 1988). AAV ist in der Lage bei Abwesenheit eines Helfervirus in einen latenten Zustand überzugehen, indem es sein Genom stabil in das Wirtszellgenom integriert. Bei Anwesenheit eines Helfervirus kann dieses integrierte Genom dazu dienen, neue AAV Partikel zu generieren (Berns, 1990).

Bis heute sind 12 Serotypen von AAV beschrieben. Die Serotypen AAV1 – 4 und 6 wurden als Kontaminationen in adenoviralen Präparationen entdeckt. AAV1 und AAV3 wurden aus einer Adenovirus Typ 7 Präparation isoliert, AAV2 aus einer Adenovirus Typ 12 Präparation (Hoggan et al., 1966). AAV4 wurde in mit Simian Adenovirus Typ 15 infizierten afrikanischen Grünen Meerkatzen gefunden (Parks et al., 1967). AAV6 entdeckte man in einer Adenovirus Typ 5 Präparation. Es scheint sich dabei um eine Rekombination von AAV1 und AAV2 zu handeln (Rutledge et al., 1998; Xiao et al., 1999). AAV5 wurde aus einem penilen *Condylomata lata* extrahiert und unterscheidet sich erheblich in seiner Sequenz und in seinen serologischen Eigenschaften von den anderen Serotypen (Bantel-Schaal und zur Hausen, 1984; Chiorini et al., 1999). AAV7 – 11 wurden mittels PCR isoliert, AAV7 und AAV8 aus Gewebe von Rhesusaffen (Gao et al., 2002), AAV9 aus humanem Gewebe (Gao et al., 2004) und AAV10 und AAV11 aus Gewebe von Javaneraffen (Mori et al., 2004). AAV12 wurde in einer Simian Adenovirus 18 Präparation der ATCC entdeckt (Schmidt et al., 2008). AAV9 wurde bislang nur in humanem Gewebe gefunden (Gao et al., 2004). Seroepidemiologischen Studien nach sind AAV2, 3 und 5 endemisch im Menschen, während man Affen für den natürlichen Wirt von AAV 1, 4, 7 und 8 hält (Chiorini et al., 1997; Gao et al., 2002; Grimm und Kay, 2003; Xiao et al., 1999).

AAV Serotypen unterscheiden sich in ihrem Tropismus. In der Maus findet man AAV2 nach systemischer Injektion in einer ganzen Reihe von Geweben z.B in Leber, Lunge, Muskel, Bauchspeicheldrüse, Auge und dem zentralen Nervensystem (ZNS). Vergleicht man allerdings die Effizienz der Transgenexpression, dann stellt man fest, dass die Transgenexpression anderer Serotypen wie AAV5 im ZNS und AAV8 in Leber und Muskel deutlich besser ist (Davidson et al., 2000; Gao et al., 2002; Grimm und Kay, 2003; Wang et al., 2005; Zabner et al., 2000).

1.1.2 Genomstruktur des Adeno-assoziierten Virus

Das einzelsträngige DNA-Genom von AAV2 hat eine Länge von 4679 Nucleotiden (Srivastava et al., 1983). Es wird in drei funktionelle Einheiten unterteilt, der offene Leserahmen (ORF) *rep*, der ORF *cap* und die *inverted terminal repeats* (ITR), welche die beiden ORF's flankieren. Das Genom weist drei Promotoren auf (p5, p19 und p40) sowie ein Polyadenylierungssignal (polyA), das für alle Transkripte des Genoms verwendet wird.

Der 5'-ORF *rep* kodiert für vier Rep-Proteine. Alle vier Rep-Proteine sind multifunktionelle Nicht-Strukturproteine und wurden nach ihrem Molekulargewicht benannt (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40). Die Transkription der größeren Rep-Proteine (Rep78, Rep68) wird durch den p5-Promotor kontrolliert, die Transkription der kleineren (Rep52, Rep40) durch den p19-Promotor (Lusby und Berns, 1982). Rep68 ist eine Spleißvariante von Rep78, Rep40 ist eine Spleißvariante von Rep52, die durch Herausspleißen eines jeweils gemeinsamen Introns entsteht. Die größeren Rep-Proteine sind wichtig für die ortsspezifische Integration in das Wirtsgenom, für die Transkription der viralen ORF's und die Kontrolle der Replikation. Rep78 und Rep68 zeigen ATPase- und Helikase-Aktivität (Im und Muzyczka, 1990; Im und Muzyczka, 1992; Philpott et al., 2002a/b; Zhou et al., 1999). Zudem weisen beide Proteine im gemeinsamen C-terminalen Abschnitt ein Kernlokalisationsignal (NLS) auf (Cassell und Weitzman, 2004). Die kleineren Proteine Rep52 und Rep40 scheinen an der Akkumulation und der Verpackung der viralen DNA in die vorgefertigten Kapside beteiligt zu sein (Dubielzig et al., 1999; King et al., 2001). Die Rep-Proteine können in Anwesenheit eines Helfervirus als Transaktivator und in Abwesenheit eines Helfervirus als Repressor der Transkription der Promotoren p5 und p19 agieren (Kyöstiö et al., 1994; Pereira et al., 1997). Zudem können die größeren Rep-Proteine sogar die Prozessierung der *cap* Transkripte regulieren (Qiu und Pintel, 2002).

Der 3'-ORF *cap* kodiert für die drei Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3. Die Transkription dieses ORF wird durch den p40-Promotor kontrolliert. Drei Kapsidproteine bilden im Verhältnis 1:1:10 das aus 60 Untereinheiten bestehende Kapsid (Kronenberg et al., 2001). Alle drei Kapsidproteine weisen die gleichen C-terminalen Sequenzen auf, unterscheiden sich jedoch in ihren N-terminalen Sequenzen. Die Translation von VP1 wird durch alternatives Spleißen des p40-Transkripts reguliert (Becerra et al., 1988). Die Translation von VP2 erfolgt durch Benutzung eines ungewöhnlichen, alternativen Startcodons (ACG) (Becerra et al., 1985). Die Molekulargewichte der Kapsidproteine betragen 90 kDa (VP1), 72 kDa (VP2) und 60 kDa (VP3). VP3 allein ist ausreichend, um Kapside zu bilden. VP1 wird jedoch zur Bildung infektiöser Partikel benötigt (Warrington et al., 2004). VP2 scheint *in vitro* weder zur Kapsidbildung noch zur Bildung infektiöser Partikel unabdingbar zu sein (Lux et

al., 2005; Warrington et al., 2004). Die Formierung des Kapsides aus den einzelnen Kapsidproteinen findet im Zellkern statt (Wistuba et al., 1995; Wistuba et al., 1997).

Die 145 nt langen ITR`s bilden das 5`- und das 3`-Ende des viralen Genoms. Aufgrund ihrer palindromischen Sequenz bilden sich diese zu einer typischen Haarnadelstruktur aus. Die ITR`s werden benötigt, um die viralen Genome in die aus den Kapsidproteinen vorgeformten Kapside zu verpacken. Sie weisen eine Rep-Bindestelle (RBS) und eine *terminal resolution site* (TRS) auf, an der die größeren Rep-Proteine spezifisch mittels Endonukleaseaktivität schneiden (Im und Muzyczka, 1990; McCarty et al., 1994a/b). Die ITR`s enthalten zudem den Replikationsursprung, sind entscheidend bei der ortsspezifischen Integration des viralen Genoms in das humane Chromosom 19 und sind auch an der Reaktivierung des Provirus beteiligt (Berns, 1990; Feng et al., 2006; Hauswirth und Berns, 1977; Labow und Berns, 1988; McLaughlin et al., 1988; Samulski et al., 1987).

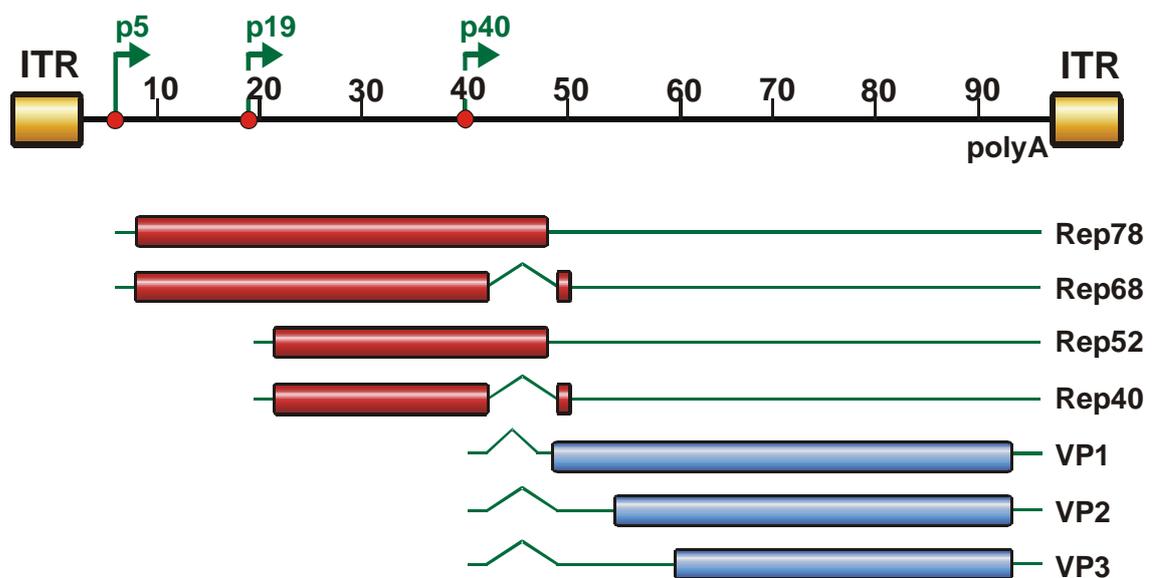


Abb. 1-1: Genomstruktur des Adeno-Assoziierten-Virus 2 (AAV2).

Das AAV2 Genom umfasst 4680 Nukleotide, die hier in 100 Karteneinheiten unterteilt sind. Das Genom wird von den *inverted terminal repeats* (ITRs) flankiert und weist drei virale Promotoren an den Karteneinheiten 5 (p5), 19 (p19) und 40 (p40) sowie ein Polyadenylierungssignal an der Karteneinheitsstelle 96 (poly A) auf. Die offenen Leseraster (ORF) werden als rote und blaue Rechtecke dargestellt, nichttranslatierte Bereiche als durchgehende Linien und Introns als Unterbrechungen dieser Linien. Der p5 Promotor kontrolliert die Expression der großen Rep Proteine (Rep78, Rep68) während der p19 Promotor die der kleinen Rep Proteine kontrolliert (Rep52, Rep40). Rep68 und Rep40 sind Spleißvarianten von Rep78 bzw. Rep52. Der p40 Promotor kontrolliert die Expression der Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3. Diese Abbildung wurde freundlicherweise von N. Huttner zur Verfügung gestellt.

Bei Betrachtung der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen AAV2 und den anderen Serotypen zeigt sich bei Analyse der Aminosäuresequenz von VP1 folgende Homologie: AAV1 (83 %), AAV3 (88 %), AAV4 (60 %), AAV6 (83 %), AAV7 (82 %), AAV8 (83 %), AAV10 (84 %) und AAV11 (65 %) (Gao et al., 2002; Mori et al., 2004). AAV5 unterscheidet sich phylogenetisch am stärksten und weist nur eine Homologie von 58 % auf (Bantel-Schaal et al., 1999).

1.1.3 Infektionsbiologie des AAV

Die Infektion von Zellen durch AAV ist ein mehrstufiger Prozess. Der Bindung des Viruskapsids an die Zellmembran folgt die Aufnahme des Virus in die Zelle und der intrazelluläre Transport. Das Genom gelangt in den Zellkern, wo es zur Replikation des Virusgenoms kommt. Die Infektionsbiologie von AAV ist im Detail immer noch nicht verstanden. Abbildung 1-3 zeigt das derzeitige Modell für AAV2, den am besten untersuchten Serotyp.

1.1.3.1 Virus-Zellmembran-Interaktion

Single Virus Tracing Untersuchungen zeigen diffuse Bewegungen von AAV2 außerhalb der Zelle und eine Verlangsamung der Bewegungen bei Annäherung an die Zellmembran. Die Bewegungen stoppen bei Kontakt mit der Membran. Meist kommt es zu mehreren Kontakten bevor AAV2 in die Zelle aufgenommen wird (Seisenberger et al., 2001).

Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) wurde als Primärrezeptor von AAV2 beschrieben (Summerford und Samulski, 1998). Die Bindung von AAV2 an HSPG erfolgt über fünf Aminosäurereste (R484, R487, K532, R585, R588), die sich in allen Kapsidproteinen finden (VP3-Bereich). Mutationsanalysen zeigten, dass vor allem R585 und R588 essentiell für die Interaktion mit HSPG sind (Kern et al., 2003; Opie et al., 2003; Wu et al., 2000). Erstaunlicherweise konnte dennoch beobachtet werden, dass AAV2 auch in Zellen eindringen kann, auf deren Zellmembran kein HSPG vorhanden ist (Duan et al., 2000). Auch für AAV3 wurde HSPG als Primärrezeptor beschrieben, AAV4 und AAV5 binden hingegen an 2,3-O- bzw. an 2,3-N-Sialinsäuren (Rabinowitz et al., 2002; Kaludov et al., 2001; Walters et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass α 2,3- und α 2,6-N-Sialinsäuren Rezeptoren für AAV1 bzw. AAV6 sind (Wu et al., 2006). Die Bindung an Sialinsäuren durch AAV6 ist allerdings abhängig vom Zelltyp und Differenzierungsstatus der Zelle (Seiler et al., 2006). AAV6 bindet auch an Heparin, ein lösliches HSPG Analogon. Dennoch scheint HSPG für

AAV6 nicht als Primärrezeptor zu fungieren, weil eine Inhibierung der HSPG Bindung durch Blockierung der HSPG Bindestellen durch Heparin keinen Einfluss auf die Infektionseffizienz durch das Virus hat (Halbert et al., 2001). Für die Infektion durch AAV8 scheint der 37/67-kDa Laminin Rezeptor (LamR) wichtig zu sein. Die Überexpression dieses Rezeptors verstärkt allerdings auch die Transduktion durch andere Serotypen wie AAV2, AAV3 und AAV9 (Akache et al., 2006). Die Primärrezeptoren für AAV7 und AAV10-12 sind noch nicht bekannt. Die Infektion von Zellen durch AAV12 scheint allerdings unabhängig von Sialinsäuren und HSPG zu sein (Schmidt et al., 2008).

AAV benötigt für eine erfolgreiche Internalisierung neben den oben genannten Primärrezeptoren auch Co-Rezeptoren. Für AAV2 sind bislang fünf Co-Rezeptoren beschrieben. Die Bindung an den *fibroblast growth factor receptor 1* (FGFR-1), den *hepatocyte growth factor receptor* (HGFR oder *c-met*) und den Laminin-Rezeptor (LamR) scheinen den Virus:Zell-Kontakt zu verstärken (Akache et al., 2006; Kashiwakura et al., 2005; Qing et al., 1999). Ferner wurden Integrine ($\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$) als Co-Rezeptoren beschrieben. Diese sind an der Induktion der Endozytose beteiligt (Asokan et al., 2006; Sanlioglu et al., 2000; Summerford et al., 1999). Der Co-Rezeptor FGFR-1 wurde auch für AAV3 als ein möglicher Co-Rezeptor beschrieben (Blackburn et al., 2006). *Platelet derived growth factor receptor* (PDGFR) wurde als Co-Rezeptor von AAV5 identifiziert (Di Pasquale et al., 2003). Es wurde diskutiert, ob PDGFR auch alleine als Rezeptor agieren kann, da es sich hierbei um ein Sialo-Glykoprotein handelt (Daniel et al., 1987; Hosang, 1988).

1.1.3.2 Rezeptor-vermittelte Endozytose von AAV

Der Endozytoseprozess ist für AAV2 und AAV5 untersucht worden. Nach Bindung an seinen Rezeptor dringt AAV2 durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in Clathrin-bedeckten Vesikeln in Dynamin-abhängiger Weise in die Zelle ein (Bartlett et al., 2000; Duan et al., 1999). Mittels der *Single Virus Tracing*-Methode konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme einzelner Viren innerhalb von 64 ms erfolgen kann (Seisenberger et al., 2001). Auch AAV5 konnte hauptsächlich in Clathrin-bedeckten Vesikeln nachgewiesen werden. Allerdings hat man AAV5 auch in seltenen Fällen in nichtbedeckten Vesikeln, eventuell Caveoli, gefunden (Bantel-Schaal et al., 2002). Integrine sind in der Lage, die Organisation des Zytoskeletts zu beeinflussen und mechanische Stimuli in biochemische Signale übersetzen zu können (Ingber et al., 2003; Parsons, 1996; Tapon und Hall, 1997). Die Bindung von AAV2 an seine Co-Rezeptoren ($\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$) führt durch intrazelluläre Signalweiterleitung zur Aktivierung von Rac1, welches an endozytotischen Prozessen beteiligt ist. Zusätzlich zur Steuerung der Endozytose wird durch dieses kleine GTP-bindende Protein die Phosphoinositol-3-Kinase

(PI3K) aktiviert (Bokoch et al., 1996; Sanlioglu et al., 2000). PI3K ist am Transport von Vesikeln und der Organisation des Zusammenbaus von Mikrotubuli und Mikrofilamenten beteiligt (Kapeller und Cantley, 1994). Die Integrine $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$ vermitteln so letztendlich die Endozytose und den Transport von AAV2 in Endosomen aus der Peripherie der Zelle in perinukleare Bereiche. Eine Depolymerisierung der Mikrofilamente, welche bei der Endozytose benötigt werden, durch Cytochalasin B reduziert die perinukleare Akkumulation von AAV fast vollständig (Sanlioglu et al., 2000). Interessanterweise dringt auch das Adenovirus, Helfervirus von AAV, mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in Clathrin-bedeckten Vesikeln in die Zelle ein. Auch für dieses Virus ist die Aktivierung von PI3K und Rac1 ein entscheidender Faktor für die Internalisierung und den intrazellulären Transport, allerdings wird bei einer Adenovirusinfektion Rac1 durch PI3K aktiviert (Li et al., 1998b).

1.1.3.3 Endosomaler Transport von AAV

AAV wird innerhalb von Endosomen entlang von Mikrotubuli aus der Peripherie der Zelle in perinukleare Bereiche transportiert (Bartlett et al., 2000; Douar et al., 2001). Die Depolymerisierung von Mikrotubuli durch Nocodazole verhindert die perinukleare Akkumulation der Viren (Sanlioglu et al., 2000). Während des Transports in den Endosomen kommt es zur Prozessierung der Viren. Eine mangelnde Prozessierung in den Endosomen kann zu einer deutlich verminderten Transduktionseffizienz führen (Hansen et al., 2001a). Die Prozessierung von Viren (z.B. die Ubiquitylierung) kann jedoch auch ein limitierender Schritt für eine effiziente Transduktion der Zelle sein, wie Duan und Kollegen für die Infektion von polaren Atemwegsepithelzellen gezeigt haben (Duan et al., 2000). Es wurde außerdem beobachtet, dass AAV4, AAV5 und bovines AAV in der Lage sind Endothel- und Epithelzellen mittels Transzytose zu durchqueren. Dieser Vorgang ist serotyp- und zelltypspezifisch. Für AAV5 konnte zudem gezeigt werden, dass der Zelleintrittsmechanismus für die Transzytose sich von dem der Transduktion unterscheidet (Di Pasquale und Chiorini, 2006).

Beschreibungen für die subzelluläre Verteilung von AAV2 sind vielfältig und teilweise kontrovers. AAV2 scheint hauptsächlich in Endosomen transportiert zu werden und aus späten Endosomen in das Zytoplasma überzutreten. Diese These belegen zahlreiche Experimente mit Brefeldin A, welches die Transition von frühen zu späten Endosomen inhibiert, Bafilomycin A1, welches die Protonenpumpe V-ATPase inhibiert und Ammoniumchlorid, welches den endosomalen pH-Wert neutralisiert. Diese Substanzen unterbinden die Transduktionseffizienz von AAV2 erheblich (Bartlett et al., 2000; Douar et al., 2001; Hansen et al., 2001a). Weitere Versuche mit subzellulärer Fraktionen und bildlicher Darstellung bestätigen diese Vermutung (Ding et al., 2006; Seisenberger et al., 2001). Es

gibt jedoch auch Hinweise, dass das Virus schon aus den frühen Endosomen ins Zytoplasma eintritt (Xiao et al., 2002). Die subzelluläre Verteilung scheint auch abhängig von der Virusmenge zu sein. Ding und Kollegen haben gezeigt, dass die Viren bei geringeren Mengen (MOI 10^2 Genomen / Zelle) vorwiegend durch frühe und späte Endosomen transportiert werden, bei höheren Mengen (MOI 10^4 Genomen / Zelle) vorwiegend durch frühe Endosomen und das perinukleare Recycling Endosom (PNRE) (Ding et al., 2006). Diese Untersuchungen werden durch die Beobachtung gestützt, dass AAV2 kurz nach der Transduktion mit Transferrin kolokalisiert, da Transferrin wie AAV2 durch clathrin-abhängige Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen wird (Duan et al., 1999). Transferrin wird dann von den frühen Endosomen zum PNRE transportiert (Ren et al., 1998; Sönnichsen et al., 2000). AAV2 und AAV5 konnten außerdem auch im *trans*-Golgi-Netzwerk nachgewiesen werden (Bantel-Schaal et al., 2002; Pajusola et al., 2002).

1.1.3.4 Endosomenaustritt von AAV

Aufgrund der verschiedenen Aussagen hinsichtlich der subzellulären Verteilung von AAV und da auch der Mechanismus für den endosomalen Austritt noch nicht sicher aufgeklärt ist, ist immer noch unklar, wann, wo und wie AAV aus den Endosomen in das Cytoplasma übertritt. Der N-Terminus von VP1 weist eine virale Phospholipase A₂ auf (Abb. 1-2), die eine entscheidende Rolle für die Infektiösität von AAV und anderen Parvoviren spielt und deren Existenz in Viren vorher nicht bekannt war (Girod et al., 2002; Ros et al., 2006; Vihinen-Ranta et al., 2002; Zádori et al., 2001). Eine Mutation (HD/AN) im katalytischen Zentrum der PLA₂ verursacht einen dramatischen Abfall der Infektiösität von AAV und anderen Parvoviren (Girod et al., 2002; Zádori et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von VP1 - und bei AAV auch der von VP2 - auf der Innenseite des AAV-Kapsides verdeckt liegt. Der N-Terminus von VP1, im Fall von AAV möglicherweise auch der von VP2, kann *in vitro* mittels Hitze, Behandlung mit Harnsäure oder mit Lösungen, welche einen niedrigen pH-Wert aufweisen, durch Induzierung einer Konformationsänderung des Kapsids auf dessen Oberfläche exponiert werden (Cotmore et al., 1999; Kronenberg et al., 2005; Ros et al., 2006; Suikkanen et al., 2003; Vihinen-Ranta et al., 2002). Die Exponierung erfolgt durch die Poren der Fünffach-Symmetrie-Achsen des Kapsids (Bleker et al., 2005; Farr et al., 2006). Sonntag und Kollegen haben die Exponierung von VP1/VP2-N-Termini auch *in vivo* im Verlauf einer AAV-Infektion nachweisen können, wohingegen Viren, deren Fünffach-Symmetrie-Achsen mutiert sind, hierzu nicht in der Lage waren. Aufgrund des Zeitpunktes und des Ortes der Konformationsänderung vermuten die Autoren, dass diese in Endosomen stattfindet, wie es auch für MVM beschrieben worden ist (Mani et al., 2006; Sonntag et al.,

2006). Es konnte vielfach gezeigt werden, dass ein endosomaler Ansäuerungsschritt entscheidend für eine effiziente Infektion der Zelle ist, da eine Inhibierung der Ansäuerung durch Bafilomycin A1 oder Ammoniumchlorid die perinukleare Akkumulation von AAV bzw. die Expression des Transgens unterbindet (Bartlett et al., 2000; Douar et al., 2001; Stahnke et al., in Vorbereitung). Diese Beobachtungen legen nahe, dass der ausbleibende niedrige pH-Wert eine Induzierung der Konformationsänderung des Kapsides verhindert. Die Behandlung mit Bafilomycin A1 konnte tatsächlich zum Teil die Exponierung der VP1/VP2-N-Termini und somit der Phospholipase verhindern (Sonntag et al., 2006). Es wurde diskutiert, ob die virale Phospholipase A₂ (PLA₂) für den Austritt aus den Endosomen verantwortlich ist (Girod et al., 2002). Die PLA₂ spielt hierbei tatsächlich eine entscheidende Rolle (Stahnke et al., in preparation). Auch für MVM konnte eine Beteiligung der PLA₂ am endosomalen Austritt gezeigt werden, für CPV wurde diese diskutiert (Farr et al., 2005; Suikkanen et al., 2003). Parvoviren scheinen nicht durch Lyse der endosomalen Membran, sondern nur durch geringe Porenformierung aus diesen freigesetzt zu werden. Für CPV wurde gezeigt, dass bei einer Infektion nur kleine Moleküle zusammen mit den Viren in das Cytoplasma übertreten können, größere hingegen nicht (Suikkanen et al., 2003; Parker und Parrish, 2000).

Nach dem Austritt des Virus aus den Endosomen in das Cytoplasma ist das virale Kapsid Ziel von Ubiquitylierung (Duan et al., 2000; Yan et al., 2002). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass intakte Kapside nicht ubiquityliert werden (Yan et al., 2002). Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass AAV während des endosomalen Transportes seine Kapsidkonformation ändert und aufgrunddessen nach dem Austritt ubiquityliert wird. Ubiquitylierungen sind in der Zelle ein Signal für proteasomale Degradierung des markierten Proteins. Es ist jedoch anzumerken, dass Ubiquitin auch Proteasomen-unabhängige Funktionen ausüben kann (Mukhopadhyay und Riezman, 2007). Der Einsatz von Proteasomen-Inhibitoren wie MG132 und MG101 (LLnL) führen bei Infektionen von AAV1-5 und AAV7-8 zu einer deutlichen Steigerung der Transduktionseffizienz (Denby et al., 2005; Douar et al., 2001; Duan et al., 2000; Hacker et al., 2005; Jennings et al., 2005; Yan et al., 2002; Yan et al., 2004). Die Ursache für die Steigerung der Transduktionseffizienz ist nicht bekannt. Sie kann durch die Inhibitor der Degradierung hervorgerufen sein, allerdings ist auch ein verbessertes Auseinanderfalten des Virus, eine gesteigerte perinukleäre Akkumulation oder Translokation in den Kern als Grund möglich (Duan et al., 2000; Yan et al., 2002).

1.1.3.5 Perinukleare Akkumulation und Kerneintritt von AAV

Die perinukleare Akkumulation von AAV beginnt zwischen 30 min nach Infektion, einzelne Viren erreichen den Kern sogar schon nach 15 min (Bartlett et al., 2000; Seisenberger et al., 2001). Diese Ansammlung von Viren bleibt auch noch Stunden nach Beginn der Genexpression bestehen (Xiao et al., 2002). Der überwiegende Teil der Viren ist noch intakt und enthält das virale Genom. Eine spezifische Akkumulation von viralen Partikeln lässt sich im Verlauf der Infektion in Einstülpungen des Zellkerns nachweisen (Lux et al., 2005; Seisenberger et al., 2001). Diese Einstülpungen der Kernmembran sind tiefe, tubuläre Strukturen, deren Funktion nicht bekannt ist. Es wird vermutet, dass sie eine Rolle im Transportprozess zwischen Kern und Zytoplasma spielen, da der umschlossene Bereich zum Zytoplasma gehört und die Membran Kernporen aufweist (Fricker et al., 1997). Für das Virus könnte eine Akkumulation in diesen tubulären Strukturen also einen engen Kontakt zu einer großen Fläche an Kernmembran und Kernporen bedeuten.

Die Mikroinjektion von AAV-Partikeln in das Zytoplasma führt nicht zur Expression des kodierenden Gens (Ding et al., 2005; Sonntag et al., 2006). Diese Beobachtung kann u.a. dadurch erklärt werden, dass weitere Motive, wie die PLA₂ am N-Terminus von VP1 (1.1.3.4), erst durch die Konformationsänderung des Viruskapsides während des endosomalen Transportes exponiert werden und diese für eine effiziente Infektion der Zelle benötigt werden. Bei diesen Motiven handelt es sich um vier basische Regionen (BR1-4), denen eine potentielle Funktion als Kernlokalisierungssignal (NLS) zugeschrieben wird (Abb. 1-2) (Grieger et al., 2006). Über die Funktion von BR1 und BR2 ist wenig bekannt. Grieger und Kollegen haben nachweisen können, dass BR1 sich nicht durch BR2-4 substituieren lässt (Grieger et al., 2007). Allgemein scheint sich eine Mutation in diesen Regionen je nach Art der Mutation unterschiedlich stark auf die Infektiosität der Viren auszuüben (Grieger et al., 2006; Wu et al., 2000). BR3 und BR4 scheinen essentiell für eine effiziente AAV-Infektion zu sein. Für BR3 konnte gezeigt werden, dass eine Mutation in dieser Region die Infektiosität der Viren drastisch senkt und dass das Ersetzen dieser Region durch eine NLS aus CPV die Infektiosität wiederherstellt (Grieger et al., 2006; Vihinen-Ranta et al., 1997). Allerdings konnten Sonntag und Kollegen nur für BR1, BR2 und BR2/3 eine Translokation im Zellkern nachweisen, nicht aber für BR3 allein (Sonntag et al., 2006). BR3 soll außerdem in VP2 eine Funktion während des Transports von Proteinen in den Zellkern für den Zusammenbau neuer Viren ausüben (Hoque et al., 1999). BR4 findet sich in allen drei Kapsidproteinen und ist für den Zusammenbau neuer Viruspartikel unerlässlich (Grieger et al., 2006). Auch wenn teilweise die Funktionen für die verschiedenen Regionen noch nicht bekannt sind, so scheinen sie doch alle, wenn auch in unterschiedlichen Maße, wichtig für die Infektiosität und

eventuell an der Translokation des viralen Genoms in den Zellkern beteiligt zu sein, da diese vier basischen Regionen für die Serotypen AAV1-11 stark konserviert sind (Grieger et al., 2006; Sonntag et al., 2006).

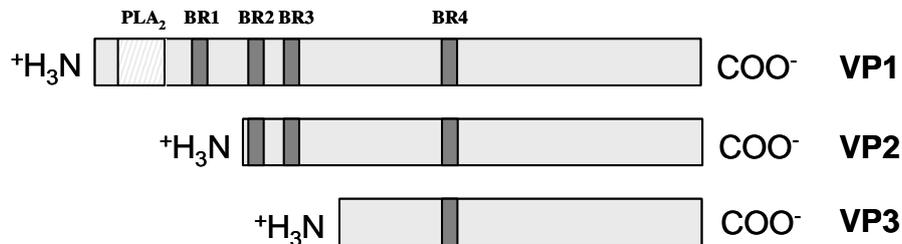


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der Lokalisierung des Phospholipase A₂ (PLA₂)-Motivs und der basischen Regionen (BR) in den Kapsidproteinen von AAV (abgewandelt aus Sonntag et al., 2006).

Die Kapsidproteine von AAV weisen vier konservierte basische Regionen (BR1-4) auf. BR1 befindet sich nur im N-terminalen Bereich von VP1, BR2 und BR3 in VP1 und im N-terminalen Bereich von VP2. BR4 befindet sich in allen drei Kapsidproteinen. Der N-Terminus von VP1 weist zudem ein konserviertes PLA₂-Motiv auf.

Die Translokation des viralen Genoms in den Zellkern ist im Vergleich mit dem Eintritt, dem endosomalen Transport und der perinuklearen Akkumulation ein verhältnismäßig langsamer und ineffizienter Prozess (Lux et al., 2005). Es ist wenig bekannt über den Mechanismus des Kerntransportes von AAV. Prinzipiell wäre ein Transport des Kapsids (25 nm) durch die Kernporen möglich, es konnte jedoch bisher noch nicht klar demonstriert werden, ob diese tatsächlich in den Kerntransport von AAV involviert sind (Panté und Kann, 2002). Es ist jedoch bekannt, dass AAV an das Kerntransportprotein Nucleolin bindet und mehrere potentielle NLS besitzt (Qiu und Brown, 1999; Grieger et al., 2006). Andere postulieren einen Kernporen-unabhängigen Transport (Hansen et al., 2001b). Auch die Frage, wo das Auseinanderfallen des Viruskapsides erfolgt, wird kontrovers diskutiert. Einige Gruppen konnten virale Kapside im Kern detektieren bzw. die Transduktion durch Mikroinjektion von kapsidspezifischen Antikörpern in den Kern unterbinden (Bartlett et al., 2000; Sanlioglu et al., 2000; Sonntag et al., 2006). Xiao und Kollegen beobachteten einen deutlichen Unterschied in der Effizienz des Kerntransportes von Kapsiden in der Anwesenheit oder Abwesenheit von einem Helfervirus. In der Abwesenheit von Adenovirus erfolgte scheinbar nur die Translokation der viralen Genome in den Kern, während mit Adenovirus auch Kapside nachweisbar waren (Xiao et al., 2002). Unsere eigenen Untersuchungen zeigen hingegen,

dass die Translokation von intakten Kapsiden ein sehr seltenes Ereignis ist (Lux et al., 2005). Bei Anwesenheit von Adenoviren sehen wir wie andere einen erhöhten Kerntransport von intakten Kapsiden allerdings bei weitem nicht in dem von Xiao und Kollegen beschriebenen Ausmaß (Lux et al., 2005; Xiao et al., 2002). Wir postulieren, dass die Freisetzung des viralen Genoms vor oder während des Kerntransportes unabhängig von der Anwesenheit eines Helfervirus stattfindet, da wir mittels konfokaler Mikroskopie perinuklear intakte Kapside mit viralen Genomen kolokalisieren, im Zellkern selbst jedoch nur virale Genome nachweisen konnten. Diese Aufnahmen wurden mit einer neuen konfokalen Mikroskopsoftware gemacht, welche eine präzisere Lokalisierung der Signale in der Z-Achse ermöglicht (Lux et al., 2005).

1.1.3.6 Produktive Virusvermehrung und latente Infektion

Nach dem Kerneintritt entscheidet sich durch die An- oder Abwesenheit eines Helferviruses, ob es zur produktiven Virusvermehrung oder zur latenten Infektion von AAV kommt. Bei Abwesenheit eines Helfervirus tritt AAV in einen latenten Lebenszyklus ein, indem es sein Genom spezifisch in das humane Chromosom 19q13.3-qter integriert. Diese Stelle wird AAVS1 genannt (Kotin et al., 1992). Dafür kommt es zunächst zur Synthese des zweiten Stranges des einzelsträngigen Virusgenoms und zu einer basalen Expression von Rep Proteinen (Brister und Muzyczka, 2000; Redemann et al., 1989). Es wurde gezeigt, dass Rep78 und Rep68 an die Rep-Bindestelle (RBS) und die *terminal resolution site* (TRS) in den ITR`s und an eine homologe Sequenz am AAVS1-Locus binden, wodurch die Integration gesteuert wird (Linden et al., 1996a/b; Weitzman et al., 1994). Das integrierte Genom kann nach einer Superinfektion mit einem Helfervirus aktiviert werden, so dass es nach Expression viraler Gene, Reaktivierung und Replikation des viralen AAV-Genoms zur produktiven Virusvermehrung kommt (Berns und Giraud, 1996).

Bei Anwesenheit eines Helferviruses während einer AAV-Infektion wird die Expression der viralen Gene und die Replikation sofort induziert.

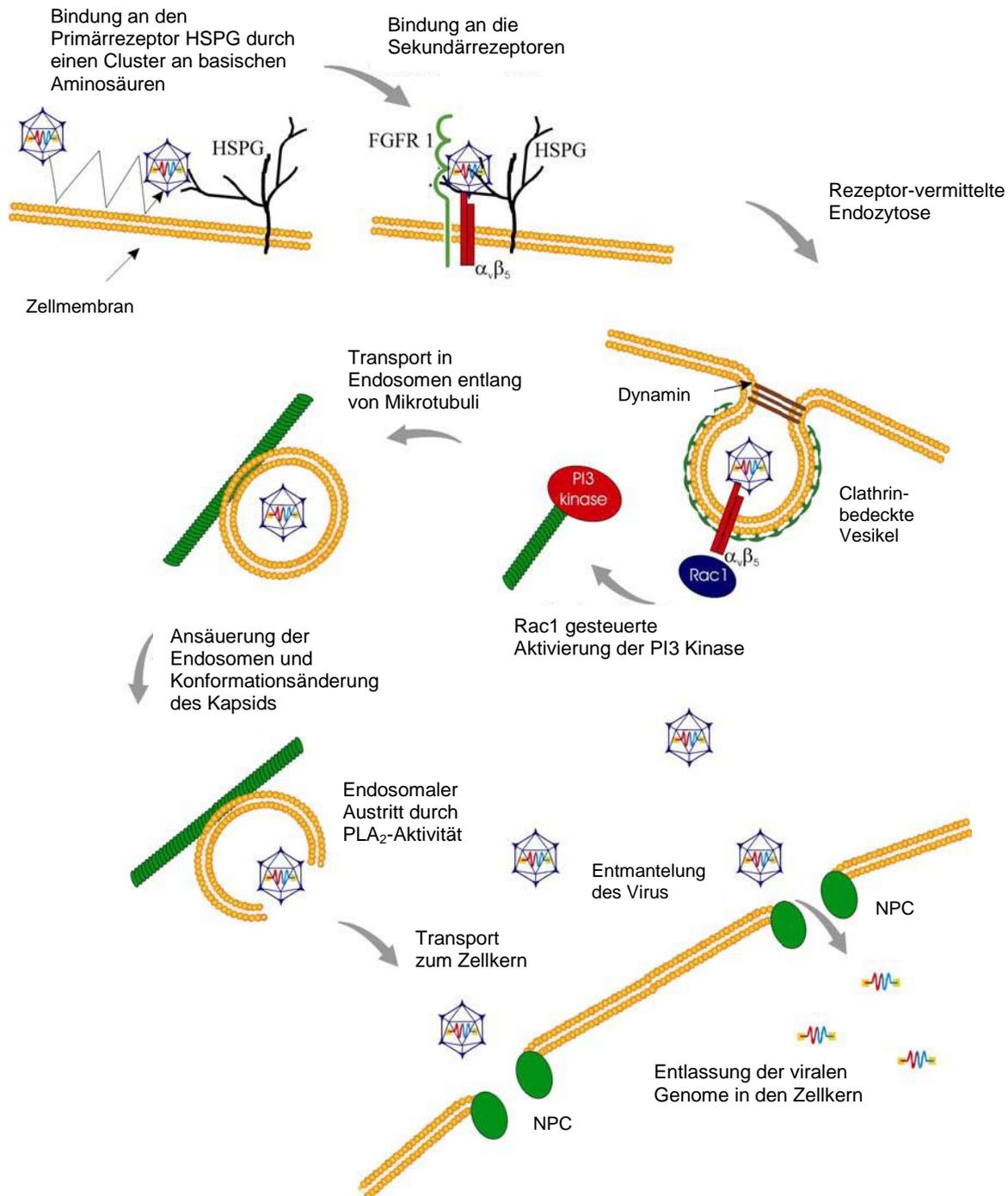


Abb. 1-3: Infektionsweg von AAV2 in HeLa-Zellen.

AAV2 berührt die Wirtszelle mehrmals und bindet dabei an seinen Primärrezeptor Heparan Proteoglykan (HSPG) und an die Co-Rezeptoren z.B. Fibroblast Wachstumsfaktor Rezeptor 1 (FGFR-1) und Integrin $\alpha_v\beta_5$. Das Virus wird mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in Dynamin-abhängiger Weise in Clathrin-bedeckten Vesikeln in die Zelle internalisiert. Durch die Bindung des Virus an Integrin wird das GTP-bindende Protein Rac1 aktiviert, welches zum einen die Endozytose unterstützt und zum anderen selbst die PI3 Kinase (PI3K) aktiviert. Die PI3K induziert die Umordnung des Zytoskeletts und ermöglicht so den Transport in Endosomen entlang von Mikrotubuli. Die Ansäuerung der Endosomen führt zur Konformationsänderung des viralen Kapsids und zum endosomalen Austritt mittels viraler PLA₂. Die Entmantelung des Viruskapsids erfolgt vor oder während des Kerneintritts. Der Mechanismus für den Kerntransport des Genoms ist noch nicht bekannt. (Abbildung modifiziert nach Büning et al., 2003)

1.2 Visualisierung von AAV

Die Untersuchung der Biologie viraler Infektionen erfolgt neben der Benutzung zahlreicher biochemischer Methoden auch immer mehr durch den Einsatz von mikroskopischen Techniken. Eine klassische Möglichkeit zur Visualisierung von viralen Kapsiden ist die Verwendung von spezifischen Antikörpern. Allerdings stösst diese Methode z.B. bei Koinfektionen verschiedener AAV-Serotypen, die derselbe Antikörper erkennt, bei Infektionen von Viren, für die kein Antikörper zu erwerben ist oder bei Untersuchungen in lebenden Zellen auf ihre Grenzen. Eine praktische technische Entwicklung war daher die Entwicklung der Markierung viraler Kapsiden durch Cyan-Farbstoffe mittels einer stabilen N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Esterbindung (Bartlett et al., 2000). Diese Markierungseffizienz (1 Farbstoff/Kapsid) ist jedoch, zumindestens für AAV, sehr gering (Seisenberger et al., 2001). Für den Einsatz dieser Viren in fluoreszenzmikroskopischen Studien würde daher eine große Partikelzahl benötigt. Bei Untersuchungen mit der Methode des *Single Virus Tracing* war diese Limitierung keine Hürde (Seisenberger et al., 2001). Diese Methode basiert auf der Detektion einzelner Moleküle und erlaubt die Beobachtung einzelner markierter Viruspartikel in Echtzeit. Allerdings hat auch diese Art der Untersuchung ihre Grenzen, da eine Kolo-kalisierung von Viruspartikeln und Zellorganellen nur zum Teil möglich ist.

Eine Alternative ist die Produktion von Viren, bei denen ein Fusionsprotein aus einem Fluoreszenzprotein und einem Kapsidprotein in das Viruskapsid eingebaut wird. Ein Fluoreszenzprotein, das sich gut für diese Art von Markierung eignet, ist das grün fluoreszierende Protein (GFP), da es nach Anregung durch kurzwelliges Licht eine grüne Fluoreszenz emittiert und keine weiteren Substrate dafür benötigt. Zudem wurde GFP bereits sehr häufig für die Untersuchung von intrazellulären Transportwegen und der Lokalisierung von Proteinen verwendet. GFP-Fusionsproteine sind daher ein beliebtes Werkzeug für diese Art von Studien, auch für Studien der viralen Infektionsbiologie (Benmerah et al., 1999; Desai und Person, 1998; McDonald et al., 2002; Pelkmans et al., 2001; Sampaio et al., 2005; Warrington et al., 2004). In unseren eigenen Studien haben wir mit Hilfe dieses Proteins das Kapsid von AAV2 markiert und das Virus so auf seinem Weg durch die Zelle beobachten können (Lux et al., 2005).

1.3 Phospholipasen A₂

1.3.1 Klassifizierung von Phospholipasen A₂

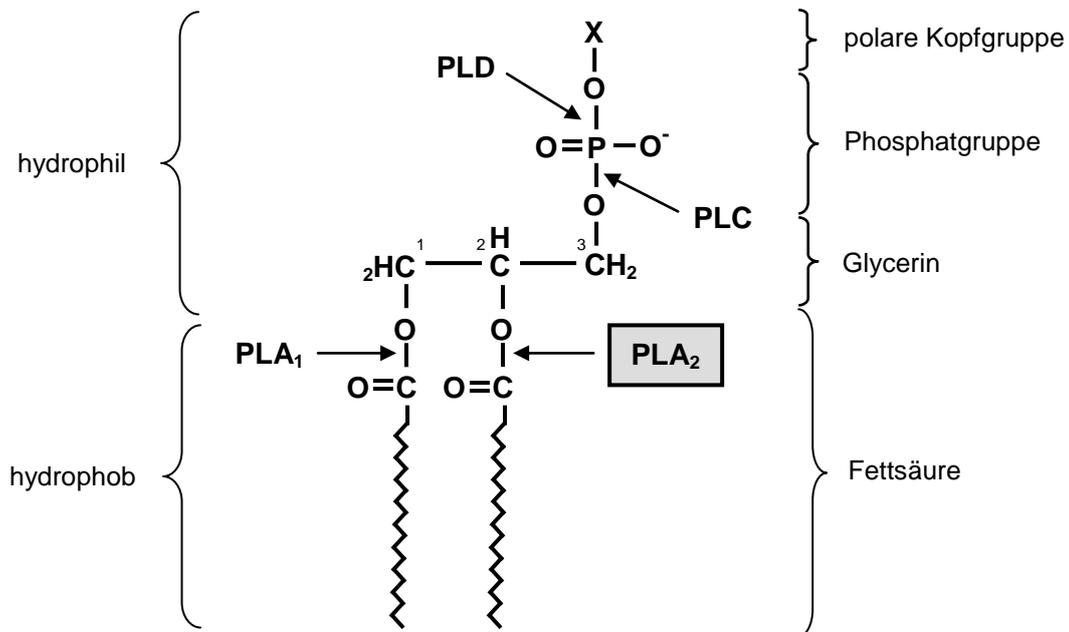


Abb. 1-4: Struktur von Glycerophospholipiden und die Positionen hydrolytischer Spaltung durch Phospholipasen (PL).

Membranphospholipide sind amphiphile Moleküle, welche aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil bestehen. Der hydrophobe Teil besteht aus zwei Fettsäuren, die jeweils mit einer der drei Hydroxylgruppen des Glycerins verestert sind. Der hydrophile Teil besteht aus einem Phosphatrest, der mit der dritten Hydroxylgruppe des Glycerins verestert und an den selbst ein weiteres hydrophiles Molekül gebunden ist (hier mit X gekennzeichnet). Die hydrolytische Spaltung durch PLA₁ und PLA₂ erfolgt an den jeweiligen Esterbindungen der Positionen *sn*-1 und *sn*-2. PLB spaltet sowohl die Position *sn*-1 als auch *sn*-2 (nicht gezeigt). PLC katalysiert die Spaltung der Bindung zwischen Glycerin und Phosphatrest und PLD entfernt die polare Kopfgruppe. Die Angriffsstellen der jeweiligen Enzyme sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Phospholipasen (PL) stellen eine sehr große und vielfältige Enzymgruppe dar. Die biologischen Funktionen von Phospholipasen reichen von der Synthese und Erneuerung von Membranen bis hin zur Bildung von Signalmolekülen, die alle auf der hydrolytischen Spaltung von Glycerophospholipiden basieren. Phospholipasen werden in vier Klassen eingeteilt: PLA (PLA₁ und PLA₂), PLB, PLC und PLD. Die Einordnung erfolgt hinsichtlich der hydrolysierten Position im Substrat (Abb. 1-4) (Kaiser et al., 1990).

Tab. 1-1: Klassifizierung der PLA₂ Enzyme aus Säugern (nach Dennis) (abgewandelt aus Schaloske und Dennis, 2006)

Die PLA₂ Enzyme der Säuger werden in vier Gruppen eingeteilt (sPLA₂, sekretorische PLA₂; cPLA₂, cytosolische PLA₂; iPLA₂, Ca²⁺-unabhängige PLA₂; PAF-AH, PAF-Acetylhydrolasen). Die Einteilung in die Subtypen erfolgt hinsichtlich ihrer Größe und der Ca²⁺-Abhängigkeit.

| Gruppe | Subtyp | Bezeichnung | Größe (in kDa) | Ca ²⁺ -Abhängigkeit |
|-------------------------|--------|--|----------------|--------------------------------|
| sPLA₂ | IB | pankreatische PLA ₂ synoviale PLA ₂ | 13-15 | μM-mM |
| | IIA | | 13-15 | μM-mM |
| | IIC | | 15 | μM-mM |
| | IID | | 14-15 | μM-mM |
| | IIE | | 14-15 | μM-mM |
| | IIF | | 16-17 | μM-mM |
| | III | | 55 | μM-mM |
| | V | | 14 | μM-mM |
| | X | | 14 | μM-mM |
| | XII | | 19 | μM-mM |
| cPLA₂ | IVA | cPLA ₂ α | 85 | nM-μM |
| | IVB | cPLA ₂ β | 114 | nM-μM |
| | IVC | cPLA ₂ γ | 61 | keine |
| | IVD | cPLA ₂ δ | 92-93 | nM-μM |
| | IVE | cPLA ₂ ε | 100 | nM-μM |
| | IVF | cPLA ₂ ζ | 96 | nM-μM |
| iPLA₂ | VIA1 | iPLA ₂ | 84-85 | keine |
| | VIA2 | iPLA ₂ β | 88-90 | keine |
| | VIB | iPLA ₂ γ | 88-91 | keine |
| | VIC | iPLA ₂ δ | 146 | keine |
| | VID | iPLA ₂ ε | 53 | keine |
| | VIE | iPLA ₂ ζ | 57 | keine |
| | VIF | iPLA ₂ η | 28 | keine |
| PAF-AH | VIIA | LP-PLA ₂ | 45 | keine |
| | VIIIB | PAF-AH II | 40 | keine |
| | VIII A | PAF-AH Ib (α1 <i>subunit</i>) | 26 | keine |
| | VIII B | PAF-AH Ib (α2 <i>subunit</i>) | 26 | keine |

Phospholipasen A₂ (PLA₂) bilden eine Superfamilie mit einer hohen Diversität. Sie katalysieren die Hydrolyse der *sn*-2 Esterbindung in Glycerophospholipiden. Diese Spaltung führt zur Freisetzung von Fettsäuren und Lysophospholipiden. Die Fettsäure Arachidonsäure (AA) ist häufiger Bestandteil von Phospholipiden. Sie dient in pathophysiologischen Prozessen als Signalmolekül und auch selbst als Substrat für die Produktion von

Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen, welche in Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen. Auch Lysophospholipide wie z.B. Lysophosphatidylcholin (LPC) oder Lysophosphatidsäure (LPA) fungieren als Signalmoleküle und Vorläufer für einige *second messenger* in verschiedenen Signalwegen. PLA₂ sind allgemein auch an der Regulation des zellulären Lipidmetabolismus beteiligt (Chakraborti, 2003; Dennis, 1997; Kudo, 2004; Six und Dennis, 2000).

Phospholipasen A₂ sind bedeutender Bestandteil von Schlangen- und Insektengiften, die u.a. eine neuro- und kardiotoxische Wirkung haben. Die Entdeckung der ersten PLA₂ in Säugerzellen erfolgte in den 1960er Jahren im Verdauungssaft der Pankreas von Ratten und blieb bis 1989 auch die Einzige (Arnesjö et al., 1967; Murakami und Kudo, 2002; Vogel und Zieve, 1960). Heute kennt man 27 verschiedene PLA₂-Enzyme aus Säugerzellen. Die Einteilung dieser Vertreter der PLA₂ Superfamilie erfolgt anhand ihrer Größe, ihrer Ca²⁺-Abhängigkeit und ihrer biochemischen Eigenschaften und Funktionen in vier Gruppen: die sekretorischen PLA₂ (sPLA₂), die cytosolischen PLA₂ (cPLA₂), die Ca²⁺-unabhängigen PLA₂ (iPLA₂) und die *platelet-activating factor* Acetylhydrolasen (PAF-AH). Sekretorische PLA₂ werden nach Stimulation von Zellen exprimiert und sezerniert, bei der cPLA₂ und der iPLA₂ handelt es sich um rein intrazelluläre Enzyme. PAF-AH sind spezielle PLA₂, da sie sehr substratspezifisch sind und nur PAF und oxidierte Phospholipide hydrolysieren (Chakraborti, 2003; Dennis, 1997; Murakami und Kudo, 2002). Eine Übersicht der bislang bekannten Säuger PLA₂ ist in Tabelle 1-1 dargestellt (Schaloske und Dennis, 2006; Seilhamer et al., 1989). Im Folgenden möchte ich nun konkret auf die sPLA₂ eingehen, da das stark konservierte PLA₂-Motiv im VP1-Kapsidprotein von Parvoviren im allgemeinen, speziell auch das von AAV, eine deutliche Homologie mit dem katalytischen Zentrum und der Ca²⁺-Bindestelle von sekretorischen Phospholipasen A₂ zeigt (Zádori et al., 2001).

1.3.2 Sekretorische Phospholipasen A₂ (sPLA₂)

Die Gruppe der sPLA₂ in Säugerzellen umfasst nach heutigem Wissensstand 10 Enzyme (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA). Die Vertreter dieser Gruppe haben, mit Ausnahme von sPLA₂-III (55 kDa), ein Molekulargewicht von 14-19 kDa. Die Subtypen I, II, V und X sind sehr nah verwandt und weisen mehrere stark konservierte Bereiche auf, eine Ca²⁺-Bindedomäne, das katalytische Zentrum und acht Disulfidbrücken, von denen allerdings nur sechs stark konserviert sind. Die Disulfidbrücken tragen zu der hohen Stabilität dieser Enzyme bei. Histidin- und Aspartatreste im katalytischen Zentrum sorgen im Zusammenspiel mit der Ca²⁺-Bindedomäne für die exakte Ca²⁺- und Substratbindung. sPLA₂-III und sPLA₂-XII

weisen nur eine Homologie hinsichtlich der Ca^{2+} -Bindedomäne und dem katalytischen Zentrum mit den anderen Vertretern dieser Gruppe auf. Die Hydrolyse von *sn*-2 Esterbindungen in Glycerophospholipiden durch sekretorische Phospholipasen A_2 ist Ca^{2+} -abhängig. Die benötigte Konzentration variiert im mikro- bis millimolaren Bereich (Murakami und Kudo, 2004b). Eine Ca^{2+} -Konzentration im millimolaren Bereich findet man vor allem in extrazellulären Flüssigkeiten, in denen sPLA₂ ihre Funktion ausüben, die von dieser Konzentration abhängig ist (z.B. sPLA₂-IIA). Konzentrationen im mikromolaren Bereich finden sich z.B. in intrazellulären Kompartimenten, wo man auch sPLA₂-Subtypen detektieren konnte (Gerasimenko et al., 1998; Menteyne et al., 2006; Murakami und Kudo, 2004b; Ramasamy, 2006). Sekretorische PLA₂ spalten Phospholipide ohne strenge Selektivität hinsichtlich der Art der Fettsäure, allerdings bevorzugen z.B. die sPLA₂-Subtypen IIA, IIC, IID, IIE und IIF anionische Phospholipide wohingegen die Subtypen V und X anionische Phospholipide und neutrales Phosphatidylcholin mit gleicher Effizienz hydrolysieren können (Murakami und Kudo, 2004b). Die Präferenz der sPLA₂-Subtypen IIA, IID und V für anionische Phospholipide ist bedingt durch ihre eigene kationische Ladung, welche z.B. auch deren Bindung an Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) erklärt. Beides, die Spezifität für bestimmte Kopfgruppen und die Bindung an HSPG, kann wesentlichen Einfluss auf die biologische Funktion der einzelnen PLA₂-Subtypen haben (Murakami und Kudo, 2002).

Die wesentliche Funktion der sPLA₂ Enzyme ist die Produktion von Lipidmediatoren. Sie sind jedoch auch in einer ganzen Reihe von physiologischen und pathologischen Vorgängen involviert. Als Beispiele sind hier die Regulation der angeborenen Immunität gegen bakterielle Infektionen, die Beteiligung an der Entwicklung von Atherosklerose, die Eicosanoidbiosynthese und die Beteiligung der Acrosomreaktion von Spermien mit der Zellmembran von Oocyten zu nennen (Buckland und Wilton, 2000; Haas et al., 2005; Murakami und Kudo, 2003; Patrat et al., 2000).

Die ausgeübte sPLA₂-Aktivität hängt von verschiedenen Komponenten wie sPLA₂-Subtyp, Zelltyp, Art des Stimulus und möglichen Interaktionen mit extrazellulären und membranassoziierten Faktoren ab (Murakami und Kudo, 2004b). Hier werden nun drei generelle Wege vorgestellt, über die sekretorische Phospholipasen A_2 ihre Funktion ausüben sollen. Nach Stimulierung der Zelle sezerniert diese sPLA₂. Nur die stark basischen sPLA₂-Subtypen IIA, IID, und V sind in der Lage an HSPG zu binden und deshalb bleibt ihnen die Nutzung des HSPG-*shuttling pathway* vorbehalten. Sie werden nach der Bindung mittels Caveolin-abhängiger Endozytose internalisiert und in spezifische Bereiche (z.B. perinukleare Bereiche) transportiert, wo man ebenfalls Enzyme wie 5-Lipoxygenasen (LOX) und Cyclooxygenasen (COX) findet, welche Arachidonsäure metabolisieren (Kim et al., 2002;

Murakami et al., 1999; Murakami et al., 2000; Murakami et al., 2001; Murakami und Kudo, 2002). Es scheint jedoch nicht ausgeschlossen, dass die Internalisierung teilweise auch zur lysosomalen Degradierung der sPLA₂ führen kann (Kim et al., 2001). Eine zweite Funktionsweise ist die direkte Hydrolyse von Phospholipiden an der Aussenseite der Zellmembran. Phosphatidylcholin (PC) macht einen großen Anteil der Phospholipide an dieser Stelle aus. PC kann allerdings nur von wenigen PLA₂-Subtypen wie z.B. sPLA₂-X als Substrat genutzt werden (Bezzine et al., 2000; Murakami und Kudo, 2004a). Die sPLA₂-Subtypen V und III sind wiederum in der Lage, beide Wege zu nutzen (Kim et al., 2001; Murakami und Kudo, 2004b). Der dritte Funktionsweg unterscheidet sich grundsätzlich von den zuvor beschriebenen Funktionsweisen. Bei diesem Weg fungieren sekretorische Phospholipasen A₂ unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität als Liganden für bestimmte Rezeptoren und beeinflussen so verschiedenste Signalwege. Der am besten charakterisierte sPLA₂-Rezeptor ist der M-Typ Rezeptor (Lambeau et al., 1990). Dieser kommt sowohl membranständig als auch extrazellulär und zytoplasmatisch in löslicher Form vor, jedoch bewirkt die Bindung an die letztere Form eine Inhibierung der sPLA₂-Aktivität. Die Interaktion mit dem Rezeptor hängt sowohl von der Spezies als auch vom sPLA₂-Subtyp ab (Lambeau und Lazdunski, 1999). Eine Bindung extrazellulärer sPLA₂ an den membranständigen Rezeptor kann neben der Induzierung verschiedener Signalwege auch die endozytotische Internalisierung zur Folge haben (Ancian et al., 1995; Hanasaki und Arita, 1992; Zvaritch et al., 1996). Diese Internalisierung kann dann zur intrazellulären Freisetzung oder zur Degradierung der Enzyme führen (Fayard et al., 1998; Hanasaki und Arita, 1992). Allen drei Funktionsweisen ist gemein, dass die sPLA₂ zuvor sezerniert werden. Dass dieser Vorgang möglicherweise nicht immer als Bedingung für eine Hydrolyse durch sekretorische Phospholipasen A₂ gegeben sein muss, zeigen Untersuchungen von Mounier und Kollegen, in denen die Spaltung von Phospholipiden durch sPLA₂-IIA und sPLA₂-X vor der Sekretion im Zusammenspiel mit der cytosolischen PLA₂α erfolgte (Mounier et al., 2004).

1.3.3 Vergleich der viralen PLA₂ und der sPLA₂ aus Säugerzellen

Aus den verschiedenen Funktionsweisen der sekretorischen Phospholipasen A₂ lassen sich auch Rückschlüsse auf den Funktionsort der parvoviralen PLA₂ ziehen. Diese benötigt wie alle sekretorischen PLA₂ Ca²⁺ (µM-mM) für ihre Aktivität (Canaan et al., 2004; Zádori et al., 2001). Der Funktionsort der viralen Phospholipase ist allerdings auf den intrazellulären Bereich begrenzt, da diese erst durch eine Konformationsänderung des Kapsids im Endosom exponiert wird (1.1.3.4). Bereits durch diese beiden Voraussetzungen wird der

Funktionsort auf intrazelluläre Kompartimente (z.B. Endosomen) beschränkt, da nur in diesen, nicht aber im Zytoplasma, die benötigte Ca^{2+} -Konzentration vorliegt (Koch, 1990; Gerasimenko et al., 1998; Menteyne et al., 2006; Murakami und Kudo, 2004b). Diese Eingrenzung des Funktionsortes deckt sich mit dem einiger sPLA₂-Subtypen, die mittels HSPG *shuttling pathway* (1.2.2) in die Zelle internalisiert werden und in zellulären Kompartimenten (z.B. Caveoli) ihre enzymatische Aktivität ausüben (Murakami et al., 1999; Murakami et al., 2000; Murakami und Kudo, 2002). Tatsächlich lassen Untersuchungen hinsichtlich des Funktionsortes der parvoviralen PLA₂ darauf schliessen, dass diese in den Endosomen für den endosomalen Austritt eingesetzt wird. Unsere eigenen Ergebnisse lassen auch für AAV diesen Rückschluss zu (Farr et al., 2005; Stahnke et al., in Vorbereitung).

1.4 Infektionsbiologie des Adenovirus

Das Adenovirus (Ad) ist ein nicht umhülltes Virus mit einem ikosaedrischen Kapsid, das einen Durchmesser von etwa 90 nm hat. Das Kapsid besteht aus Kapsomeren, die aus Hexonen und Pentonen bestehen. Die Ecken werden von Pentonen gebildet, die sich aus der Pentonbasis und einem Fiberproteinanteil zusammensetzen. Das Fiberprotein ragt an den Ecken 9 – 30 nm aus dem Kapsid heraus und stellt den Kontakt mit der Wirtszelle her. Das Kapsid umschließt ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom von 36 kb. Dieser Abschnitt umfasst die Infektionsbiologie von Ad2 und Ad5, welche dem Genus Mastadenovirus und dem Subgenus C zugeordnet werden, und die beide als Helferviren für AAV fungieren.

1.4.1 Virus-Zellmembran-Interaktion

Der Coxsackievirus-Adenovirus Rezeptor (CAR) ist der Primärrezeptor für Ad2 und Ad5 (Roelvink et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass allein die extrazelluläre Domäne von CAR ausreicht, um als Primärrezeptor für Ad2 und Ad5 zu fungieren (Wang und Bergelson, 1999). Auch Heparansulfat Proteoglykan (HSPG) wurde als Primärrezeptor beschrieben (Dechecchi et al., 2001). Integrine ($\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$) sind als Ko-Rezeptoren beschrieben. Die Bindung an diese vermittelt u.a. die Endozytose der Adenoviren (Davison et al., 1997; Li et al., 2001; Wickham et al., 1993). Bereits beim Kontakt des Virus mit seinen Rezeptoren beginnt das Auseinanderfallen des Kapsides, unabhängig von der endozytotischen Aufnahme in die Zelle (Greber et al., 1993; Nakano et al., 2000). Die

Bindung führt zudem zu einer intrazellulären Signalweiterleitung. Es werden verschiedene Signalwege und intrazelluläre Faktoren aktiviert, zum einen die Proteinkinase A (PKA) und unabhängig davon der p38/MAPK-Signalweg. Beides führt letztendlich zu einem effizienteren Transport der viralen DNA in den Zellkern (Suomalainen et al., 2001). Die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges über Ras und Raf induziert über Interleukin-8 das angeborene Immunsystem und steuert zudem zelluläre Bewegungen (Bruder und Kovetsdi, 1997). ERK1/2 führt zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von E1A, welches nach Expression die Expression früher adenoviraler Gene (E4) reguliert (Whalen et al., 1997). Ad2 und Ad5 induzieren auch die Aktivierung von PI3K, welche an der Internalisierung des Virus in die Zelle beteiligt ist (Li et al., 1998a). Alle Aktivierungen, mit Ausnahme der Aktivierung des p38/MAPK-Signalweges, erfolgen über die Bindung des Virus an Integrine (Greber, 2002). Das Adenovirus aktiviert auch die Proteinkinase C (PKC), welche in den endosomalen Transport und den endosomalen Austritt des Virus involviert ist (Nakano et al., 2000).

1.4.2 Rezeptor-vermittelte Endozytose

Die Internalisierung des Virus erfolgt wie bei AAV durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in Clathrin-bedeckten Vesikel in Dynamin-abhängiger Weise (Varga et al., 1991; Wang et al., 1998). Die α_V -Integrin-abhängig aktivierte PI3K interagiert mit p130^{CAS} und aktiviert Rac1 und CDC42, wodurch das Aktin-Zytoskelett beeinflusst und die Endozytose ermöglicht wird (Li et al., 1998b; Li et al., 2000). Aktivierte PI3K induziert auch Rab5, das u.a. durch die Formierung Clathrin-bedeckter Vesikel für die Endozytose benötigt wird und auch für die Regulierung des Transportes früher Endosomen mittels Mikrotubuli verantwortlich ist (Bucci et al., 1992; Nielsen et al., 1999; Rauma et al., 1999). In dieser Phase der Infektion scheint zudem die PKC eine wichtige Rolle zu spielen, zum einen beim endosomalen Transport des Virus als auch beim Austritt aus den Endosomen, der durch Inhibierung der PKC verhindert wird (Nakano et al., 2000).

1.4.3 Endosomaler Austritt

Der endosomale Austritt des Virus erfolgt durch Zerstörung der endosomalen Membran und wird bedingt durch die Ansäuerung des Endosoms (Blumenthal et al., 1986; Prchla et al., 1995). Allein die Ansäuerung des Endosoms ist jedoch nicht ausreichend für die Ad-bedingte Lyse (Rodríguez und Everitt, 1996). Die Bindung von Adenovirus an α_V -Integrine auf der

Zellmembran bewirkt eine verstärkte Makropinozytose. Dieser Vorgang ist abhängig von der PKC, F-Aktin und Amilorid-sensitiver Na^+ / H^+ - Austausch, Faktoren die auch für den endosomalen Austritt von Ad aus den Endosomen benötigt werden. Die Effizienz der Freisetzung von makropinozytotisch aufgenommenen Partikeln in das Cytoplasma erfolgt abhängig von der Menge an Adenovirus. Es ist unklar, ob die makropinosomale pH-Wert - abhängige Lyse direkt oder die Makropinozytose indirekt zur Lyse der Endosomen beiträgt (Imelli et al., 2004; Meier et al., 2002). Das adenovirale Kapsid scheint eine wichtige Rolle zu spielen. Ad ts-1 ist eine Mutante, die nicht mehr in der Lage ist, die endosomale Membran zu lysieren und aufgrunddessen letztendlich in die Lysosomen transportiert und dort abgebaut wird. Dieser Mutante fehlt die virale Protease L3/p23, die u.a. für die Prozessierung von Kapsidproteinen in den neugebildeten Adenoviruspartikeln verantwortlich ist (1.4.5) (Greber, 1998; Greber et al., 1996; Weber, 1976). Ad ts-1 ist aufgrund der mangelnden Prozessierung einiger Kapsidproteine nicht in der Lage, im Verlauf der Internalisierung seine Fiberproteine abzuspalten (Greber et al., 1996). Die Endozytose des Virus verläuft jedoch unabhängig von der Abspaltung der Fiberproteine, wie Versuche mit Inhibitoren der Protease zeigten (Greber et al., 1996). Ad ts-1 ist auch in der Lage die PI3k, welche für den Transport der Viren in den Endosomen verantwortlich ist, allerdings wird weder die PKA noch p38 zu aktivieren (Li et al., 1998a; Suomalainen et al., 2001). Auch eine verstärkte Makropinozytose wird nicht ausgelöst (Meier et al., 2002). Zudem erfolgt bei Ad ts-1 im Endosom aufgrund der mangelnden Abspaltung der Fiberproteine kein pH-abhängiger partieller Abbau des viralen Kapsids. Dieser pH-abhängige Abbau ist jedoch sehr wichtig, da er zur Freisetzung des Proteins VI führt, das die endosomale Lyse unterstützt (Wiethoff et al., 2005). Obwohl der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt werden konnte, scheint dieser Abbau und die Freisetzung des Proteins VI neben den anderen genannten Faktoren ein ganz wesentlicher Teil der Adenovirus-bedingten Lyse der endosomalen Membran zu sein.

1.4.4 Cytoplasmatischer Transport und Kerneintritt

Nach Übertritt des Virus ins Cytoplasma bewegen sich die Partikel mittels des Dynein-Motor-Komplexes entlang von Mikrotubuli zu deren Minus-Ende in Richtung Kernmembran (Leopold et al., 2000; Suomalainen et al., 1999). Die Bewegungen können abhängig vom Zelltyp eine durchschnittliche Geschwindigkeit von 1 – 10 $\mu\text{m} / \text{min}$ betragen (Suomalainen et al., 1999). Der cytoplasmatische Transport scheint jedoch auch unabhängig von Mikrotubuli zu funktionieren (Glotzer et al., 2001; Yea et al., 2007).

Während des Infektionsverlaufes wird das Kapsid sukzessiv abgebaut, so dass das virale Genom beim Kontakt mit dem Kernporenkomplex (NPC) nur noch von den Hexonen umhüllt ist (Greber et al., 1993). An dieser Stelle des Infektionszyklus wird die virale Protease L3/p23 benötigt, um das virale Genom aus dem Kapsid freizusetzen (Greber, 1998). Das virale Genom liegt assoziiert mit dem *Core Protein* pVII vor und wird zusammen mit diesem durch den NPC in den Nukleus transportiert. Das Core Protein pVII trägt drei NLS und bindet spezifisch an Importin α , Importin β und Transportin, welche in der Zelle hauptverantwortlich für den Kerntransport sind (Greber et al., 1993; Greber et al., 1997; Hindley et al., 2007; Wodrich et al., 2006). Der Transport des Genom-Protein-Komplexes erfolgt wahrscheinlich hauptsächlich über Transportin, während neusynthetisiertes Core Protein pVII für die Bildung neuer Viren vor allem mittels Importin α und Importin β transportiert wird (Hindley et al., 2007).

1.4.5 Produktion neuer Viruspartikel

Im Zellkern erfolgt die Transkription der viralen Gene, die Neusynthese der DNA und die Produktion neuer Viruspartikel. Dieser Prozess kann in vier Schritte eingeteilt werden, wobei der Ablauf eines jeden Schrittes für den nachfolgenden unerlässlich ist. Zunächst werden die frühen Gene exprimiert (1). Sie kodieren u.a. für Proteine, die für die Replikation der viralen DNA (2) benötigt werden. Nach Beginn der Replikation startet die Expression der späten Gene (3), die neben Strukturproteinen noch für Chaperone kodieren, die bei der Morphogenese (4) eine Rolle spielen. Ein Teil der Kapsidproteine lagert sich bereits im Zytoplasma zusammen und wird dann als vorgeformter Komplex in den Zellkern transportiert, wo die Fertigstellung der neuen Viren erfolgt (Berk, 2007). An dieser Stelle wird die virale Protease L3/p23 ein zweites Mal im Infektionszyklus von Adenoviren benötigt. Sie sorgt für eine proteolytische Prozessierung einiger Kapsidproteine in den neugebildeten *young virions* zu gereiften Viruspartikeln (Anderson, 1990; Greber, 1998; Weber, 1976). Die Freisetzung der gereiften Viruspartikel erfolgt durch Lyse der Zelle, welche durch Expression von großen Mengen des *Adenovirus Death Protein* in einer sehr späten Phase der Infektion induziert wird (Tollefson et al., 1996).

1.5 Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Infektionsbiologie des AAV2 und des AAV8. Ein wichtiges Hilfsmittel für die Untersuchung der Infektionsbiologie ist Möglichkeit, diese zu visualisieren (Lux et al., 2005; Warrington et al., 2004). Für AAV2 konnte im Vorfeld dieser

Doktorarbeit bereits gezeigt werden, dass sich das Kapsid durch den Einbau eines Fusionsproteins aus GFP und dem viralen Kapsidprotein VP2 markieren und zur Visualisierung der AAV2-Infektion einsetzen lässt. Diese Markierung ermöglichte bereits eine Reihe von experimentellen Ansätzen, die mit Antikörper nicht durchführbar sind z.B. die Visualisierung der Infektion in lebenden Zellen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll das Markierungsspektrum um weitere Fluoreszenzproteine erweitert und zusätzlich erstmals auf einen anderen Serotyp, AAV8, ausgeweitet werden. Es soll geprüft werden, ob sich andere Fluoreszenzproteine als GFP für die Markierung eignen und ob die Markierung des AAV8 prinzipiell überhaupt möglich ist. Die Erweiterung des Markierungsspektrums soll dann genutzt werden, um z.B. Koinfektionen von zwei Viren, die von demselben Antikörper erkannt werden, durchzuführen. Auch eine Visualisierung der Transduktion des AAV8 soll erstmals gezeigt werden, da für diesen kein Kapsidantikörper erhältlich ist.

In murinen *in vivo* Experimenten zeigt AAV8 in der Leber eine deutlich bessere Expression des Transgens als AAV2. Eine schlechtere Internalisierung des AAV2 in Hepatozyten konnte als Grund ausgeschlossen werden. Nun soll getestet werden, ob diese Diskrepanz zwischen den Serotypen hinsichtlich der Expression auch *in vitro* zu beobachten ist. Dafür soll neben einer murinen und einer humanen Hepatozyten-Zelllinie auch eine Cervixkarzinom-Zelllinie als Kontrolle verwendet werden, für die AAV2 besonders permissiv ist. Hierzu sollen neben Expressionsanalysen auch mikroskopische Techniken angewendet werden, die aufgrund der genetischen Markierung des AAV8 im Rahmen dieser Doktorarbeit möglich gemacht werden sollen.

Für AAV2 soll noch ein entscheidender Schritt der Infektionsbiologie näher untersucht werden. Es ist bekannt, dass ein Phospholipase A₂-Motiv am N-Terminus des Kapsidproteins VP1 eine wichtige Rolle im Verlauf der viralen Infektion spielt. Eine Mutation dieses Motivs reduziert die Infektiosität drastisch (Girod et al., 2002). Nun soll überprüft werden, an welcher Stelle der Infektion die Funktion dieser viralen PLA₂ benötigt wird. Eine vergleichende Analyse einzelner Abschnitte des Transduktionsweges des AAV2 und einer PLA₂-Mutante soll zeigen, an welchem essentiellen Schritt die Funktion der PLA₂ eingesetzt wird. Aufgrund der Tatsache, dass der N-Terminus von VP1 erst während der Infektion exponiert wird (Sonntag et al., 2006), soll vor allem eine mögliche Funktion beim Kerneintritt und beim Endosomenaustritt näher untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

| Zell-Linie | Beschreibung | Quelle |
|------------|--|--|
| 293 | Humane embryonale Nierenzellen, immortalisiert durch die adenoviralen Gene E1A und E1B | ATCC CRL-1573; American Type Culture Collection, Rockville, Maryland |
| HeLa | Humane epheliale Gebärmutterhalskrebszellen | ATCC CCL-2; American Type Culture Collection, Rockville, Maryland |
| H 2.35 | Murine Leberephitelzellen | ATCC CRL-1995; American Type Culture Collection, Rockville, Maryland |
| HepG2 | Humane Leberkarzinomzellen | ATCC HB-8065; American Type Culture Collection, Rockville, Maryland |

2.1.2 Viren (außer AAV)

Für die beschriebenen Experimente wurde neben AAV auch Adenovirus verwendet. Wildtyp Adenovirus 5 wurde aus eigenen Beständen der AG Büning bezogen. Außerdem wurde rekombinantes Adenovirus 5, das nicht mehr für adenovirale Gene kodiert, und die Adenovirus 2 ts-1 Mutante verwendet. Diese beiden Viren wurden freundlicherweise von Florian Kreppel (Abteilung für Gentherapie, Universität Ulm) zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Kompetente Bakterien

E.coli/DH5 α :

F⁻, *lac1*-, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*, *_(lacZYA-argF)*, U169, F80d*lacZ_M15*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*; (Hanahan, 1983)

2.1.4 Plasmide

pXX6-80

pXX6-80 ist ein adenovirales Helferplasmid, das für die adenoviralen Gene VA, E2A und E4 kodiert. Es kodiert für eine Ampicillin-Resistenz. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von J. Samulski (University of North Carolina, Chapel Hill, USA) zur Verfügung gestellt.

pUC-AV2 (pwt)

Das Plasmid kodiert für die Rep-Proteine (Rep) und die Kapsidproteine (VP1, VP2, VP3) von AAV2. Die offenen Leserahmen Rep und Cap werden von ITR`s flankiert. Das Plasmid weist ein Ampicillin-Resistenzgen auf. Dieses Plasmid wurde aus der Plasmidbank der AG Büning bezogen.

pUC-AV2 HD/AN

Dieses Plasmid kodiert für die Rep-Proteine (Rep) und die Kapsidproteine (VP1, VP2, VP3) von AAV2. Die offenen Leserahmen Rep und Cap werden von ITR`s flankiert. Die Aminosäuren Histidin (H) und Asparaginsäure (D) an den Aminosäurepositionen 76 und 77 wurden durch Alanin (A) bzw. Asparagin (N) substituiert. Diese Aminosäuren bilden das katalytische Zentrum eines Phospholipase A₂ Motivs. Dieses Plasmid wurde aus der Plasmidbank der AG Büning bezogen.

pUC-AV2-VP2k.o.

Dieses Plasmid basiert auf dem Plasmid pUC-AV2 (pwt). Durch ortsspezifische Mutagenese wurde das VP2 Startcodon deletiert (ACG zu ACC), ohne die Aminosäuresequenz des VP1 zu verändern. Dieses Plasmid wurde von Dr. Kerstin Lux (ehemals AG Büning) kloniert.

pUC-AV2 HD/AN-VP2k.o.

Dieses Plasmid basiert auf dem Plasmid pUC-AV2 HD/AN. Durch ortsspezifische Mutagenese wurde das VP2 Startcodon deletiert (ACG zu ACC), ohne die Aminosäuresequenz des VP1 zu verändern. Dieses Plasmid wurde von Dr. Kerstin Lux (ehemals AG Büning) kloniert.

pRC

Das Plasmid kodiert für die Rep-Proteine (Rep) und die Kapsidproteine (VP1, VP2, VP3) von AAV2. Das Plasmid trägt keine ITR`s. Die Klonierungsstrategie zur Konstruktion dieses Plasmids ist bereits zuvor beschrieben worden (Girod et al., 1999). Es kodiert für eine Ampicillin-Resistenz.

pRC HD/AN

Dieses Plasmid kodiert für die Rep-Proteine (Rep) und die Kapsidproteine (VP1, VP2, VP3) von AAV2. Das Plasmid weist keine ITR's auf. Die Aminosäuren Histidin (H) und Asparaginsäure (D) an den Aminosäurepositionen 76 und 77 wurden durch Alanin (A) bzw. Asparagin (N) substituiert. Diese Aminosäuren bilden das katalytische Zentrum eines Phospholipase A₂ Motivs. Dieses Plasmid wurde aus der Plasmidbank der AG Bünig bezogen.

pRC VP2 k.o.

Das Plasmid kodiert für die Rep-Proteine (Rep) und die Kapsidproteine (VP1, VP3). Es kodiert nicht für das Kapsidprotein VP2, da das Startcodon für dieses Protein deletiert ist (ACG → ACC). Die Herstellung des Plasmides erfolgte durch PCR-Amplifikation kombiniert mit ortsspezifischer Mutagenese von pRC, wobei das Startcodon ACG in ACC geändert wurde. Dafür wurden überlappende Fragmente mittels PCR amplifiziert (Primer: Oje 018 F und VP2 KO AAV2 R; VP2 KO AAV2 F und 440 back R) und diese überlappenden Fragmente in einem zweiten PCR-Schritt (Primer: Oje 018 F und 440 back R) miteinander ligiert. Das entstandene Fragment und das Plasmid pRC wurden mit BsiW I und EcoN I verdaut. Anschließend wurde das PCR-Fragment (667 bp) in den *backbone* von pRC (6900 bp) durch *sticky end* Ligation kloniert. Das Plasmid trägt ein Kanamycin-Resistenzgen. Dieses Plasmid wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit kloniert.

peGFP-VP2 2

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus eGFP und VP2 (AAV2). Es wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Kerstin Lux (Lux, 2006) hergestellt. Das Plasmid trägt ein Kanamycin-Resistenzgen.

peCFP-VP2 2

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus eCFP und VP2 (AAV2). Die für eCFP kodierende Sequenz wurde aus dem Plasmid pECFP-C1 (Clontech) mit Age I und BsrG I ausgeschnitten. Auch das Plasmid pEGFP-VP2 2 wurde mit Age I und BsrG I geschnitten. Die eCFP-kodierende Sequenz wurde anschließend mit dem 5802 bp-Fragment der Spaltung von pEGFP-VP2 2 ligiert. Das Plasmid kodiert für eine Kanamycin-Resistenz. Dieses Plasmid wurde im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Andreas Neerincx (Neerincx, 2007) kloniert.

pDsRed-VP2 2

Das Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus DsRed und VP2 (AAV2). Die für VP2 kodierende Sequenz wurde aus dem Plasmid pRC amplifiziert (Primer: AAV2 VP2 wo Start F Pho, VP2 2 R Pho), wobei das Startkodon deletiert wurde. Das Fragment wurde in das Plasmid pDsRed-Monomer-C1 (Clontech) kloniert, nachdem dieses durch Restriktionsverdau mit Sma I linearisiert worden war. Das Plasmid trägt ein Kanamycin-Resistenzgen. Es wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit kloniert.

pmCherry-VP2 2

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus mCherry und VP2 (AAV2). Die für mCherry kodierende Sequenz wurde zunächst aus dem Plasmid pRSET-B mCherry amplifiziert (Primer: mCherry F VP2 2 und mCherry R VP2 2). Der *forward*-Primer weist eine Age I - Restriktionsschnittstelle auf, der *reverse*-Primer eine BsrG I - Schnittstelle). Anschließend wurde sowohl die für mCherry kodierende Sequenz als auch das Plasmid pGFP-VP2 2 mit Age I und BsrG I geschnitten. Die mCherry-kodierende Sequenz wurde anschließend mit dem 5802 bp-Fragment der Spaltung von pEGFP-VP2 2 ligiert. Das Plasmid trägt ein Kanamycin-Resistenzgen. Dieses Plasmid wurde im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Andreas Neerinx (Neerinx, 2007) kloniert.

pXR-8

Dieses Plasmid kodiert für die Kapsidproteine (VP1, VP2, VP3) von AAV8 und für die Rep-Proteine von AAV2. Das Plasmid kodiert für eine Ampicillin-Resistenz. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von James Wilson (School of Medicine, University of Pennsylvania) zur Verfügung gestellt.

pXR-8 VP2 k.o.

Das Plasmid kodiert für die Rep-Proteine (Rep) von AAV2 und die Kapsidproteine (VP1, VP3) von AAV8. Es kodiert nicht für das Kapsidprotein VP2, da das Startcodon für dieses Protein deletiert ist (ACG → ACC). Die Herstellung des Plasmides erfolgte durch PCR-Amplifikation kombiniert mit ortsspezifischer Mutagenese von pRC, wobei das Startcodon ACG in ACC geändert wurde. Dafür wurden überlappende Fragmente mittels PCR amplifiziert (Primer: pXR-8 VP2 KO F und pXR-8 686 R ; pXR-8 6501 F und pXR-8 VP2 KO R) und diese überlappenden Fragmente in einem zweiten PCR-Schritt (Primer: pXR-8 6501 F und pXR-8 686 R) miteinander ligiert. Das entstandene Fragment und das Plasmid pXR-8 wurden mit BsiW I und Hind III verdaut. Anschließend wurde das PCR-Fragment (1381 bp) in den *backbone* von pXR-8 (5954 bp) durch *sticky end* Ligation kloniert. Das Plasmid trägt ein Ampicillin-Resistenzgen. Dieses Plasmid wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit kloniert.

peGFP-VP2 8

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus GFP und VP2 (AAV8). Die für VP2 kodierende Sequenz wurde aus dem Plasmid pXR-8 amplifiziert (Primer: pXR-8 VP2 Sma I wo Start F, pXR-8 CAP Sma I R), wobei das Startkodon deletiert wurde. Zusätzlich wurden durch Amplifikation mit den oben genannten Primern an den Enden des Fragmentes Schnittstellen für Sma I eingebaut. Das Fragment wurde mit Sma I geschnitten und anschließend in das Plasmid pEGFP-C3 (Clontech) kloniert, nachdem dieses durch Restriktionsverdau mit Sma I linearisiert worden war. Das Plasmid trägt ein Kanamycin-Resistenzgen. Dieses Plasmid wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit kloniert.

peCFP-VP2 8

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus eCFP und VP2 (AAV8). Die für eCFP kodierende Sequenz wurde aus dem Plasmid pECFP-C1 (Clontech) mit Pcl I und BsrG I ausgeschnitten. Auch das Plasmid pEGFP-VP2 8 wurde mit Pcl I und BsrG I geschnitten. Die eCFP-kodierende Sequenz wurde anschließend mit dem 5155 bp-Fragment der Spaltung von pEGFP-VP2 8 ligiert. Das Plasmid kodiert für eine Kanamycin-Resistenz. Dieses Plasmid wurde im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Andreas Neerincx (Neerincx, 2007) kloniert.

pDsRed-VP2 8

Das Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus DsRed und VP2 (AAV8). Die für VP2 kodierende Sequenz wurde aus dem Plasmid pXR-8 amplifiziert (Primer: pXR-8 VP2 wo Start F Pho, pXR-8 CAP R Pho), wobei das Startkodon deletiert wurde. Das Fragment wurde in das Plasmid pDsRed-Monomer-C1 (Clontech) kloniert, nachdem dieses durch Restriktionsverdau mit Sma I linearisiert worden war. Das Plasmid trägt ein Kanamycin-Resistenzgen. Dieses Plasmid wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit kloniert.

pmCherry-VP2 8

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus mCherry und VP2 (AAV8). Zunächst wurde die für mCherry kodierende Sequenz aus dem Plasmid pRSET-B mCherry amplifiziert (Primer: mCherry F VP2 8, mCherry R VP2 8). Der *forward*-Primer weist eine Nhe I-Restriktionsschnittstelle auf, der *reverse*-Primer eine Xho I-Schnittstelle. Anschließend wurde sowohl die für mCherry kodierende Sequenz als auch das Plasmid pGFP-VP2 2 mit Nhe I und Xho I geschnitten. Die mCherry-kodierende Sequenz wurde anschließend mit dem 5787 bp-Fragment der Spaltung von pEGFP-VP2 8 ligiert. Das Plasmid trägt ein Kanamycin-

Resistenzgen. Dieses Plasmid wurde im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Andreas Neerincx (Neerincx, 2007) kloniert.

pEGFP-C3

Dieses Plasmid trägt das eGFP-Gen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Das Plasmid kodiert für eine Kanamycin-Resistenz. Es wurde von der Firma Clontech bezogen.

pECFP-C1

Dieses Plasmid trägt das eCFP-Gen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Das Plasmid kodiert für eine Kanamycin-Resistenz. Es wurde von der Firma Clontech bezogen.

pDsRed-Monomer-C1

Dieses Plasmid trägt das DsRed-Gen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Das DsRed-Gen ist so mutiert, dass das exprimierte Protein nicht mehr zur Tetramerbildung fähig ist und so nur als Monomer vorliegen kann. Das Plasmid kodiert für eine Kanamycin-Resistenz. Es wurde von der Firma Clontech bezogen.

pRSET B mCherry

Dieses Plasmid trägt das mCherry-Gen unter Kontrolle des bakteriellen Promotors PT7. Zusätzlich trägt es einen 6xHis-Tag. Das Plasmid kodiert für eine Ampicillin-Resistenz. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Roger Tsien (University of California, USA) zur Verfügung gestellt.

pssGFP

Dieses Plasmid trägt das GFP-Gen aus *Aequorea victoria*. Das Gen steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Das Plasmid weist zudem ein Hygromycin-Resistenzgen auf, das durch den Promotor der Thymidinkinase kontrolliert wird. Beide kodierenden Sequenzen werden von den Verpackungssignalen (ITR`s) von AAV2 flankiert. Das Plasmid kodiert für eine Ampicillin-Resistenz.

pscGFP

Dieses Plasmid trägt das GFP-Gen aus *Aequorea victoria*. Das Gen steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Die Expressionskassette wird von den Verpackungssignalen (ITR`s) von AAV2 flankiert. Nur eines der beiden ITR`s ist intakt; das andere trägt eine Mutation in der *terminal resolution site*, welche bei Verpackung des Gens in Vektoren zu einem Pseudo-Doppelstrang-Genom führt. Das Plasmid kodiert für eine Ampicillin-Resistenz.

pZNL

Dieses Plasmid weist einen CMV-Promotor und einen EM-7 Promotor gefolgt von einem Zeocin-Resistenzgen auf. Nach einer Fusionssequenz folgt die Sequenz des LacZ-Gens, welche ein Kernlokalisierungssignal und das Polyadenylierungssignal aus SV40 umschließt. Die Expressionskassette wird von den ITR's flankiert. Das Plasmid kodiert für eine Ampicillin-Resistenz.

pLuci

Dieses Plasmid trägt das Luciferase-Gen aus *Renilla*. Das Gen steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Die Expressionskassette wird von den Verpackungssignalen (ITR`s) von AAV2 flankiert. Nur eines der beiden ITR`s ist intakt; das andere trägt wie auch pscGFP eine Mutation in der *terminal resolution site*, welche bei Verpackung des Gens in Vektoren zu einem Pseudo-Doppelstrang-Genom führt. Das Plasmid kodiert für eine Ampicillin-Resistenz. Es wurde freundlicherweise von Frau Dr. Quadt-Humme (früher AG Büning) zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Primer

Alle nachfolgend aufgelisteten Primer wurden von Metabion International AG (Martinsried, Germany) bezogen.

| Primer | Sequenz (5' - 3') |
|-----------------------|---|
| wt; 3201 (for) | GGTACGACGACGATTGCC |
| wt; 4066 (rev) | ATGTCCGTCGGTGTGTGG |
| eGFP (for) | GCTACCCCGACCACATGAAG |
| eGFP (rev) | GTCCATGCCGAGAGTGATCC |
| Human GAPDH (for) | GAGTCCACTGGCGTCTTCA |
| Human GAPDH (rev) | TTCAGCTCAGGGATGACCTT |
| Murine GAPDH (for) | ATCCCAGAGCTGAACG |
| Murine GAPDH (rev) | GAAGTCGCAGGAGACA |
| LacZ F (for) | ATCCTCTGCATGGTCAGGTC |
| LacZ R (rev) | CTGGGCCTGATTCATTCC |
| Luci (for) | CGTGCTGGACTCCTTCATCA |
| Luci (rev) | TTGCGGACAATCTGGACGAC |
| mCherry F VP2 2 (for) | TGAGTACTTGTACAACCTTGTACAGCTCGTCCATGC |
| mCherry R VP2 2 (rev) | GCGCTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG |
| mCherry F VP2 8 (for) | AAGCTTGAGCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATGC |
| mCherry R VP2 8 (rev) | AAAAAAAAAGCTAGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG |

| | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| AAV2 VP2 wo Start F Pho (for) | Pho-TCCGGGAAAAAAGAGGCCGG |
| AAV2 VP2 R Pho (rev) | Pho-TTACAGATTACGAGTCAGGTAT |
| Oje 018 F (for) | AAATCAGGTATGGCTGCCGA |
| 440 back R (rev) | GTTGCCTCTCTGGAGGTT |
| VP2 KO AAV2 F (for) | GTTAAGACCGCTCCGGG |
| VP2 KO AAV2 R (rev) | CCCGGAGCGGTCTTAAC |
| pXR-8 VP2 Sma I wo Start F (for) | AAAACCCGGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGT |
| pXR-8 VP2 Cap Sma I R (rev) | AAAACCCGGGTCCTGGAAAGAAGAGACCGGT |
| pXR-8 VP2 wo Start F Pho (for) | Pho-TCCTGGAAAGAAGAGACCGGT |
| pXR-8 VP2 Cap R Pho (rev) | Pho-TTACAGATTACGGGTGAGGTAA |
| pXR-8 6501 F (for) | AGACCCGCCCCAGTGACGCA |
| pXR-8 686 R (rev) | AACACGTCCGCCGGGAACG |
| pXR-8 VP2 KO F (for) | GCGCTAAGACCGCTCCTGG |
| pXR-8 VP2 KO R (rev) | CCAGGAGCGGTCTTAGCGC |

2.1.6 Kulturmedien und Zusätze

2.1.6.1 Zellkulturmedien und Zusätze

| | |
|---|-----------------------|
| Dexamethasone | Sigma, Deisenhofen |
| DMEM (<i>Dulbeccos` s Modified Eagle`s Medium</i>) Glutamax | Gibco BRL, Invitrogen |
| Fetales Kälber Serum (FCS) | Gibco BRL, Invitrogen |
| L-Glutamin (200 mM) | Gibco BRL, Invitrogen |
| Low Glucose DMEM Glutamax | Gibco BRL, Invitrogen |
| Natrium-Pyruvat (100 mM) | Gibco BRL, Invitrogen |
| Nichtessentielle Aminosäuren (100x) | Sigma, Deisenhofen |
| Penicillin-Streptomycin (100 U / ml bzw. 100 mg / ml) | Gibco BRL, Invitrogen |
| Trypsin-EDTA (1x) | Gibco BRL, Invitrogen |

2.1.6.2 Bakterienmedien und Zusätze

| | |
|-------------|-----------------------|
| Agar | Invitrogen, Karlsruhe |
| Hefeextrakt | Roth, Karlsruhe |
| Trypton | Roth, Karlsruhe |
| Ampicillin | Sigma, Deisenhofen |
| Kanamycin | Sigma, Deisenhofen |

2.1.7 Enzyme

| | |
|--------------------|--------------------------------------|
| Benzonase | Merck, Darmstadt |
| DNase I | Roche, Mannheim |
| Restriktionsenzyme | MBI Fermentas New England Biolabs |
| RNase | Roche, Mannheim |

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Antikörper gegen zelluläre Antigene

- Polyklonaler Ziege gegen Lamin B Antikörper, IgG (Santa Cruz Biotechnology); Verdünnung 1:50
- Monoklonaler Maus gegen β -Tubulin I Antikörper, IgG1 (Sigma); Verdünnung 1:4000
- Polyklonaler Kaninchen gegen GFP Antikörper, IgG (Invitrogen); Verdünnung 1:300
- Polyklonaler Kaninchen gegen RFP Antikörper (Rockland); Verdünnung 1:300

2.1.8.2 Antikörper gegen AAV Proteine

- A20 (AAV2-Kapsidantikörper), monoklonaler Maushybridomzellenüberstand (DKFZ Heidelberg, PD Dr. J. Kleinschmidt); unverdünnte Applikation
- B1 (erkennt den C-Terminus von VP1, VP2 und VP3), monoklonaler Maushybridomzellenüberstand (DKFZ Heidelberg, PD Dr. J. Kleinschmidt); Verdünnung 1:20

2.1.8.3 Sekundäre Antikörper

- Cy5 konjugierter Esel gegen Ziege Antikörper (Dianova); Verdünnung 1:100
- Cy5 konjugierter Esel gegen Kaninchen Antikörper (Dianova); Verdünnung 1:100
- FITC konjugierter Esel gegen Ziege Antikörper (Dianova); Verdünnung 1:100
- RRX konjugierter Esel gegen Maus Antikörper (Dianova); Verdünnung 1:100
- Biotin konjugierter Kaninchen gegen Maus Antikörper (Dianova); Verdünnung 1:10.000
- POD konjugierter Esel gegen Maus Antikörper (Dianova); Verdünnung 1:10.000

2.1.9 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|-------------------------------|-------------------------|
| Aceton | Roth, Karlsruhe |
| Acrylamid-Mix (30%) | Roth, Karlsruhe |
| Agar-Agar | Invitrogen, Karlsruhe |
| Agarose | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Ammoniumpersulfat | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Ampicillin | Sigma, Deisenhofen |
| Aphidicolin | Sigma, Deisenhofen |
| Aqua bidest. (Ampuwa) | Fresenius Kabi, Homburg |
| Bafilomycin A1 | Sigma, Deisenhofen |
| Benzonase | Merck, Darmstadt |
| POD konjugiertes Streptavidin | Dianova, Hamburg |
| Borsäure | Merck, Darmstadt |
| Brefeldin A | Sigma, Deisenhofen |
| Bromphenolblau | Sigma, Deisenhofen |
| BSA | AppliChem, Darmstadt |
| Calciumchlorid | Sigma, Deisenhofen |
| Chloroform | Merck, Darmstadt |
| Dapi | Merck, Darmstadt |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Riedel-de-Haën, Seelze |
| dNTP`s | Fermentas |
| DOC | Sigma, Deisenhofen |
| DTT | Sigma, Deisenhofen |
| EDTA | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Roth, Karlsruhe |
| Gelatine | Sigma, Deisenhofen |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| Hefeextrakt | Roth, Karlsruhe |
| HEPES | Roth, Karlsruhe |
| Isopropanol | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumacetat | Merck, Darmstadt |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |

| | |
|--|---------------------------|
| Lipofectamine™ 2000 | Invitrogen, Karlsruhe |
| Magnesiumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Manganchlorid | Merck, Darmstadt |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| MG132 | Sigma, Deisenhofen |
| Milchpulver | Roth, Karlsruhe |
| MOPS | Sigma, Deisenhofen |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid | Roth, Karlsruhe |
| Natriumphosphat | Roth, Karlsruhe |
| NP-40 | Fluka, Deisenhofen |
| OptiMEM | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Optiprep (Iodixanol) | Sigma, Deisenhofen |
| Paraformaldehyd | Sigma, Deisenhofen |
| PBS 1x | Gibco BRL, Karlsruhe |
| PBS 10x | Biochrom, Berlin |
| Phenolrot | Sigma, Deisenhofen |
| Propidiumjodid | Sigma, Deisenhofen |
| Quick Start Bradford Dye Reagent | BioRad, München |
| Restriktionsenzyme | Fermentas |
| | New England Biolabs |
| Saccharose | Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure | Roth, Karlsruhe |
| Schwefelsäure | Roth, Karlsruhe |
| SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) | Merck, Darmstadt |
| Super Signal Pico Chemiluminescent Substrate | Pierce |
| TEMED | Sigma, Deisenhofen |
| TMB | Sigma, Deisenhofen |
| Tris | Merck, Darmstadt |
| Triton®X-100 | Sigma, Deisenhofen |
| Trizol Reagenz | Invitrogen, Karlsruhe |
| Tween®20 | Merck, Darmstadt |
| Vectashield VC-H-1400 | Vector Laboratories, Inc. |
| Wasserstoffperoxid (30%) | Roth, Karlsruhe |

2.1.10 Standard Kits

| | |
|--|--------------------|
| Big Dye Terminator v3.1 Sequencing Kit | Applied Biosystems |
| DNeasy® Tissue Kit | Qiagen, Hilden |
| EndoFree® Plasmid Kits | Qiagen, Hilden |
| PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden |
| Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| Light-Cycler-FastStart DNA Master SYBR Green I | Roche, Mannheim |
| Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit | Roche, Mannheim |
| Quantitect SYBR Green PCR Kit | Qiagen, Hilden |

2.1.11 Größen- und Mengenstandards

Gel-Elektrophorese

| | |
|--------------------------|--------------------|
| MassRuler DNA Ladder Mix | MBI Fermentas GmbH |
|--------------------------|--------------------|

SDS-Gelelektrophorese

| | |
|--|-----------------|
| Precision Plus Protein Standard Dual Color | BioRad, München |
|--|-----------------|

Proteinkonzentrationsbestimmung

| | |
|--|-----------------|
| Quick Start Bovine Serum Albumine (BSA) Standard Set | BioRad, München |
|--|-----------------|

2.1.12 Verbrauchsmaterial

| | |
|----------------------------|------------------------------|
| Biomax Light Film | Kodak |
| Deckgläschen (Ø 10 mm) | Menzel Gläser |
| Facsröhrchen | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Filter (0.45 µm) | Schleicher & Schuell, Dassel |
| LightCycler Kapillaren | Roche, Mannheim |
| Nitrocellulosemembran | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Parafilm | Pechinery Plastic Packaging |
| Pipetten und Filterspitzen | Sarstedt |

| | |
|--------------------------------|------------------------------|
| Spritzen und Nadeln | B.Braun Melsungen, Melsungen |
| Reaktionsgefäße (1.5 ml; 2 ml) | Eppendorf, Hamburg |
| | Sarstedt |
| Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml) | Sarstedt |
| Skalpelle | Feather |
| Ultrazentrifugenröhrchen | Kendro |
| Whatman-Papier | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Zellkulturplastikware | TPP |
| Zellschaber | Corning Incorporated |

2.1.13 Geräte

| | |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| Axiovert 25 CFL | Carl Zeiss, Göttingen |
| Brutschrank Hera Cell 150 | Heraeus |
| Brutschrank Shaker Innova 4430 | New Brunswick Scientific, NJ |
| FACScalibur | Becton Dickinson, Heidelberg |
| FluoView FV1000 | Olympus, Hamburg |
| Gefrierschrank –80°C Hera | Heraeus |
| Gelelektrophoreseeinheit Mini Sub GT | BioRad, München |
| Heizer/Magnetrührer Heidolph MR 3001 | Heidolph Instruments, Schwabach |
| LightCycler 1 | Roche, Mannheim |
| LightCycler Karussell Zentrifuge | Roche, Mannheim |
| pH Meter Seven Easy | Mettler-Toledo, Schwerzenbach |
| Power Supply | Renner, Darmstadt |
| Pumpe P-1 | Amersham Pharm. Biotech |
| Sorvall Ultrazentrifuge OTD Combi | Thermo Scientific |
| Sorvall T-865 Rotor | Thermo Scientific |
| Spectrometer BioRad SmartSpec 3000 | BioRad, München |
| Sterilwerkbank Heraeus Lamina | Heraeus |
| Thermomixer Comfort | Eppendorf, Hamburg |
| Vakuumpumpe | VWR, Langenfeld |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries, NY, USA |
| Waage Adventure Pro | Ohaus, NJ, USA |
| Wasserbad Medingen W6 | Medingen, Freital |
| µQuant Microplate Spectrophotometer | BioTek Instruments |

| | |
|------------------|--------------------|
| Zentrifuge 5415D | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge 5415R | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge 5810R | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge 5-6B | Beckmann, München |

2.1.14 Daten verarbeitende Software

Adobe Photoshop CS2
Clone Manager 3
Cylchred
IrfanView
Microsoft Office Exel 2003
RelQuant (Roche)
Spezifische Software für das jeweilige Gerät

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen

Alle Zelllinien wurden als Monolayer-Kulturen in Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen bei 37°C und 5% CO₂ in den jeweils unten aufgeführten Zellkulturmedien gehalten. Dem Medium wurde in allen Fällen 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin beigemischt. Die Passagierung der Zellen erfolgte bei Konfluenz ungefähr zweimal pro Woche. Dafür wurden die Zellen mit PBS gespült und mit einer Trypsinlösung (0.25% Trypsin, 1mM EDTA) abgelöst. Nach Ablösen der Zellen wurde durch Zugabe von FCS-haltigem, frischem Medium die enzymatische Reaktion der Trypsinlösung inhibiert. Anschließend wurden die Zellen in gewünschter Verdünnung ausgesät.

| Zelllinie | Medium | Zusätze |
|-----------|-----------------------|--|
| 293 | DMEM | 10% FCS* |
| H 2.35 | DMEM (Low Glucose) | 4% FCS*, 200nM Dexamethasone |
| HeLa | DMEM | 10% FCS* |
| HepG2 | DMEM | 10% FCS*, 2 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 1x NEAA |

* Hitzeinaktivierung (30 min bei 56°C) von FCS vor Gebrauch

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen langfristig aufzubewahren, werden diese eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Die gewünschten Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und durch Zentrifugieren (5 min bei 4°C und 300 x g) pelletiert. 2.5×10^6 Zellen / ml wurden in 1 ml Einfriermedium (10% DMSO in FCS) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einem mit Isopropanol isoliertem Behälter innerhalb von 24h auf -80°C abgekühlt, da langsames Einfrieren die Zellen schont, bevor sie in dauerhaft in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Das Auftauen von Zellen erfolgte langsam auf Eis, bevor die Zellen in 15 ml Kulturmedium überführt wurden. Die Zellen wurden pelletiert (5 min; 4°C; 300 x g) und in 37°C warmem Kulturmedium in Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl einer Zellsuspension in eine *Neubauer*-Zählkammer überführt und die Anzahl der Zellen pro Großquadrat auf dem Objektträger unter dem Mikroskop bestimmt. Die Zellzahl wurde wie folgt ermittelt:

Zellzahl / ml = durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat x 10^4 x Verdünnungsfaktor

2.2.1.4 Kultivierung von Säugetierzellen auf Deckgläschen

Zum Nachweis von viralen und zellulären Proteinen durch spezifische Antikörper mittels Immunfluoreszenz wurden Deckgläschen (Ø 10 mm) in die Löcher einer 24-Lochplatte platziert und je 4×10^4 Zellen / Loch in 500 µl Kulturmedium auf diese ausgesät. Die Zellen wurden 24 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und anschließend für die verschiedenen experimentellen Ansätze verwendet.

2.2.1.5 Transfektion von Säugetierzellen

2.2.1.5.1 Transfektion von Plasmid-DNA in Säugetierzellen mittels Calcium- Phosphat-Methode

Die Produktion von AAV erfolgte durch Transfektion von Plasmid-DNA in 293-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Methode. Die zu transfizierende DNA wurde mit 450 µl einer 250 mM CaCl₂-Lösung gemischt. Anschließend wurde tropfend 450 µl HBS-Puffer hinzugefügt und die Lösung gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei RT wurde das DNA-Präzipitat gleichmäßig auf die gesamte Fläche der Kulturschale getropft und diese anschließend leicht geschwenkt. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C und 5% CO₂ gehalten.

HBS-Puffer: 50 mM Hepes
 280 mM NaCl
 1.5 mM NaP (pH 7.29)

- Ansatz für 375 ml HBS-Puffer: 5.955 g Hepes
 8.18 g NaCl
 1.5 ml 0.5 M NaP (pH 7.29)

Auf 400 ml mit Endotoxin-freiem H₂O auffüllen

- 5 x 20 ml entnehmen und verschiedene pH-Werte (6.5 – 7.2) einstellen

- den besten pH-Wert durch Testtransfektionen ermitteln
- pH-Wert in der Originallösung einstellen und auf 375 ml mit Endotoxin-freiem H₂O auffüllen
- sterilfiltrieren

2.2.1.5.2 Transfektion von Plasmid-DNA in Säugetierzellen mittels Lipofectamine™ 2000

Plasmide wurden in HeLa-Zellen mit Lipofectamine™ 2000 transfiziert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für ein Loch einer 24-Lochplatte wurden 200 ng Plasmid eingesetzt.

2.2.1.6 Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Das Antibiotikum Aphidicolin (Sigma) hemmt in eukaryontischen Zellen die Replikation der DNA reversibel, indem es die DNA-Polymerasen α und δ inhibiert. Es wurde verwendet, um den Zellzyklus in HeLa-Zellen in der G1/S-Phase zu arretieren. 4×10^4 HeLa-Zellen wurden pro Loch in 12 – Lochplatten ausgesät und 24 h später mit normalem Kulturmedium oder mit 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Aphidicolin in Kulturmedium behandelt. 24 h nach Start der Behandlung wurden die unbehandelten und behandelten Zellen mit Trypsin abgelöst und bei $300 \times g$ pelletiert (4°C ; 5 min). Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 500 μl PBS resuspendiert. Um die Zellen zu fixieren wurde nun tröpfchenweise 1.5 ml 100 % Ethanol dazugegeben und sofort gevortext. Die Fixierung erfolgte bei 4°C für 45 min. Anschließend wurde erneut zentrifugiert ($300 \times g$; 4°C ; 5 min), das Pellet einmal in PBS gewaschen und dann in 500 μl PBS aufgenommen. An dieser Stelle war eine Lagerung der fixierten Zellen bei 4°C für bis zu 48 h möglich. Da die Detektion der DNA durch Interkalation von Propidiumjodid (PI) erfolgt und dieses auch in RNA interkalieren kann, wird nun RNase (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben und die Zellen für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde PI (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugeben, die Zellen wurden 5 min auf Eis gelagert und dann sofort im FACScalibur analysiert.

2.2.1.7 Aufreinigung von Gesamt-, Zytoplasma- und Kernfraktion

HeLa-Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät und abhängig von dem jeweiligen Experiment behandelt. Zum Zeitpunkt der Ernte wurden die Zellen abgekratzt, pelletiert ($300 \times g$; 5 min; RT) und das Pellet anschließend einmal mit PBS gewaschen. Bei der Aufreinigung des Gesamtlysats wurde das Pellet anschließend in N₂ schockgefroren und bei -20°C bis zur

weiteren Verwendung gelagert. Zur Aufreinigung der Zytoplasma- oder Kernfraktion wurde das Pellet vorsichtig in 200 µl RLN-Puffer (4°C) aufgenommen, 5 min auf Eis inkubiert und dann zentrifugiert (300 x g; 2 min; 4°C). Der Überstand enthält die zytoplasmatische Fraktion. Er wurde abgenommen, schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Kernpellet wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend ebenfalls schockgefroren und bei -80°C gelagert. Je nach Bedarf wurde dann aus den Fraktionen DNA (2.2.4.7) oder Protein (2.2.5.1) extrahiert. Die Extraktion von Protein aus den zytoplasmatischen Überständen erfolgte durch TCA-Fällung (2.2.5.2).

RLN-Puffer: 50 mM Tris-HCL pH 8.0
 140 mM NaCl
 1.5 mM MgCl₂
 0.5 % (v/v) Nonidet P-40 (1.06 g/ml)

2.2.2 Virologische Methoden

2.2.2.1 Adenovirusfreie Produktion von Adeno-assoziierten Viren

Die Produktion von Adeno-assoziierten Viren erfolgte adenovirusfrei in HEK293 Zellen durch Benutzung von pXX6, welches für die adenoviralen Gene E2A, E4 und VA kodiert (Xiao et al., 1998). Die Expression dieser Gene reicht aus, um die Helferfunktion eines Adenovirus zu ersetzen.

7.5 x 10⁶ HEK293 Zellen wurden in 15 cm Schalen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. 24 h später und bei einer Konfluenz der Zellen von etwa 80 % wurde das Medium gewechselt und weitere 2 h später eine Kotransfektion der Zellen mittels Calciumphosphat-Methode mit zwei, drei oder vier verschiedenen Verpackungsplasmiden vorgenommen.

Für die Produktion von rekombinanten AAV Vektoren wurden folgende Plasmide benötigt:

7.5 µg pRC oder pXR-8 (bei fluoreszenzmarkierten Vektoren pRC-VP2k.o. bzw. pXR-8-VP2k.o.)

- kodiert für virale Proteine, die für die virale Replikation und den Kapsidzusammenbau nötig sind

7.5 µg pTransgen

- kodiert für das Transgen, flankiert durch die ITR`s, die eine Verpackung der Transgensequenz in das Kapsid signalisieren

22.5 µg pXX6-80

- kodiert für E2A, E4 und VA des Adenovirus 5, welche ausreichend sind, um die Helferfunktion eines Adenovirus für die Replikation von AAV ersetzen

Bei AAV2 Viren, in die das wt-Genom verpackt wird, wird neben pXX6-80 nur 15 µg pUC-AV2 (oder eine mutierte Form z.B. HD/AN oder VP2k.o.) transfiziert.

Für die Herstellung fluoreszenzmarkierter Viren und Vektoren werden zusätzlich 7.5 µg des Plasmids transfiziert, das für das jeweilige Fusionsprotein aus Fluoreszenzprotein und VP2 kodiert.

Pro Platte wurde 1 ml 250 mM CaCl₂ mit der Plasmid-DNA gemischt und anschließend 1 ml HBS-Puffer hinzugegeben und erneut gemischt. Nach einer 2 minütigen Inkubation wurde die Lösung vorsichtig auf die Zellen aufgetropft und die Platte leicht geschwenkt. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium durch solches mit nur 2 % FCS ersetzt, um die Teilungsrate der Zellen zu verringern. Weitere 24 h später wurden die Zellen geerntet und bei 300 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml Lysepuffer aufgenommen. Die Zell- und Kernmembranen wurden durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen zerstört, so dass die Viren freigesetzt wurden. Um Kontaminationen mit genomischer oder Plasmid-DNA bzw. RNA zu vermeiden, wurde die Suspension anschließend 30 min mit 50 U / ml Benzonase (DNase / RNase) bei 37 °C inkubiert. Durch Zentrifugation (30 min; 4 °C; 3220 x g) wurden die Zelltrümmer pelletiert; der die Viren enthaltende Überstand wurde vorsichtig abgenommen und erneut zentrifugiert.

Lysepuffer: 150 mM NaCl
 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)

2.2.2.2 Aufreinigung und Konzentration von Adeno-assoziierten Viren im Iodixanolgradienten

Die produzierten Viren wurden mit Hilfe eines diskontinuierlichen Iodixanol-Gradienten aufgereinigt und konzentriert. Der diskontinuierliche Gradient besteht aus vier verschiedenen Iodixanol-Phasen (15 %; 25 %; 40 %; 60 %). Diese setzen sich wie folgt zusammen.

| | 15 % Iodixanol | 25 % Iodixanol | 40 % Iodixanol | 60 % Iodixanol |
|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 10x PBS | 5 ml | 5 ml | 5 ml | - |
| 1 M MgCl₂ | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |
| 2.5 M KCl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |
| 5 M NaCl | 10 ml | - | - | - |
| Optiprep | 12.5 ml | 20 ml | 33,3 ml | 50 ml |
| 0.5 % Phenolrot | 75 µl | 75 µl | - | 75 µl |
| H₂O | ad 50 ml | ad 50 ml | ad 50 ml | ad 50 ml |

Der virushaltige Überstand (2.2.2.1) wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen (Kendro) überführt und mit den vier verschiedenen Iodixanol-Phasen unterschichtet, beginnend mit der 15 % - Lösung. Die Unterschichtung wurde mittels einer langen Kanüle durchgeführt, welche an eine Pumpe (P-1; Amersham Bioscience) angeschlossen war. Das Volumen der verschiedenen Phasen betrug 8 ml (15 %), 6 ml (25 %), 5 ml (40 %) und 6 ml (60 %). Das Röhrchen wurde anschließend mit PBS M/K aufgefüllt, verschlossen und bei 4°C für 2 h mit 63000 rpm (Sorvall Ultracentrifuge OTD Combi) zentrifugiert. Die DNA-haltigen Viruskapside befanden sich in der 40 % - Phase. Diese wurde mit einer Spritze abgenommen. Die Viren wurden aliquotiert und bei – 80°C gelagert.

PBS-M/K 1x PBS
 1 mM MgCl₂
 2.5 mM KCl

2.2.2.3 Bestimmung des Titers der viralen Präparationen

2.2.2.3.1 Bestimmung des genomischen Titers viraler Präparationen

Der genomische Titer einer viralen Präparation beschreibt die Anzahl der Partikel / µl, die die verpackte DNA, d.h. das Transgen oder das wt-Genom enthalten.

Die Isolation von DNA aus viralen Präparationen erfolgte mit dem *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen). 10 µl einer viralen Präparation wurden mit 190 µl PBS versetzt. Anschließend wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer zugesetzt, gevortext und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Dieser Schritt führt zu Lyse der Viruskapside und zur Freisetzung der enthaltenen DNA. Dann wurden 200 µl 100 % Ethanol zugesetzt und erneut gevortext. Die Lösung wurde auf eine *DNeasy Mini Spin* Säule geladen und diese 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit AW1 (1 min; 6000 x g) und AW2 (3 min;

16000 x g). Anschließend wurde die DNA mit 200 µl 10 mM Tris (pH 8.5) eluiert (1 min; 6000 x g).

Die Menge der isolierten DNA wurde durch quantitative PCR (2.2.4.5.2) bestimmt. Der genomische Titer wurde durch Abgleich mit einer Verdünnungsreihe (1×10^8 bis 1×10^5 Kopien) des Plasmids, das für das Transgen bzw. das wt-Genom kodiert, unter Berücksichtigung der Verdünnung bei der DNA-Aufreinigung mittels *DNeasy Tissue Kit* ermittelt.

2.2.2.3.2 Bestimmung des Kapsidtiters viraler Präparationen

Der Kapsidtiters einer viralen Präparation wurde durch einen Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) ermittelt, in dem die intakten Kapside durch einen monoklonalen anti-AAV Antikörper (A20) erkannt werden.

Da der Kapsidtiters einer AAV-Präparation zumeist 10x höher ist als der genomische Titer (2.2.2.3.1), wurde anhand dieser Annahme eine Verdünnungsreihe der Präparation in 1x PBS durchgeführt, um Konzentrationen zu erreichen, die sich im linearen Bereich des ELISA befinden (1×10^7 bis 1×10^9 Kapside / ml). Als Standard wurde eine AAV-Präparation eingesetzt, deren Kapsidtiters zuvor mit einem *AAV2 Titration ELISA* (Progen) bestimmt worden war.

In die Löcher von Nunc-Immunoplaten (96-Lochplatten) wurden 100 µl der einzelnen Virusverdünnung gegeben und über Nacht bei 4°C gelagert. PBS diente als Kontrolle. Am nächsten Morgen wurden die Löcher dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend die unspezifischen Bindungen mit 200 µl Blockierungspuffer pro Loch abgeblockt (2 h; RT). Dann wurde der Blockierungspuffer verworfen und die Platte 1 h bei RT mit dem A20-Antikörper inkubiert (Verdünnung 1:4 in Blockierungspuffer; 100 µl / Loch). Es folgten drei Waschschriffe mit Waschpuffer und eine Inkubation von 1 h bei RT mit einem Biotin-konjugierten anti-Maus Antikörper (Verdünnung 1:50000 in Blockierungspuffer; 100 µl / Loch). Es wurde erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 1 h bei RT mit einem mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Streptavidin inkubiert (Verdünnung 1:1000 in Blockierungspuffer; 100 µl / Loch). Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer und zweimaligem Waschen mit H₂O (200 µl / Loch) wurde die Startlösung (100 µl / Loch) in die Löcher gegeben und im Dunkeln inkubiert. Bei ausreichender Farbentwicklung (5 – 15 min) wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung pro Loch unterbrochen und die Intensität der Farbreaktion bei 450 nm im Photometer gemessen.

Waschpuffer 0.05 % Tween20
 in 1x PBS

| | |
|--------------------|--|
| Blockierungspuffer | 3 % BSA 5 % Saccharose 0.05 % Tween20 in 1x PBS |
| Startlösung | 1 mg TMB in 100 µl DMSO lösen dann Zugabe von 10 ml 0.1 M NaOAc pH 6.2 1 µl 30 % H ₂ O ₂ (Zugabe unmittelbar vor Gebrauch) |
| | ➤ vor Gebrauch immer frisch ansetzen |
| Stopplösung | 1 M H ₂ SO ₄ |

2.2.2.4 Virusinfektionen von Säugierzellen

Die zu infizierenden Zellen wurden 24 h vor der Infektion subkonfluent ausgesät. Je nach Versuchsansatz wurden diese in 6 -, 12 - oder 24 – Lochplatten ausgesät. Zellen, die mittels Immunfluoreszenz untersucht werden sollten, wurden in 24 – Lochplatten auf Deckgläschen ausgesät. Am Tag der Infektion wurden die Zellen gezählt, um eine definierte Zahl an Viren / Zelle einsetzen zu können. Je nach Fragestellung und Nachweismethode wurde dafür der genomische oder der Kapsid-Titer verwendet. Im Fall von vergleichenden Infektionen mit AAV2 und AAV8 wurde immer der genomische Titer verwendet, da AAV8 nicht durch den A20-Antikörper erkannt wird und der Kapsid-ELISA (2.2.2.3.2) auf diesem basiert. Zudem ist kein Kapsidantikörper für AAV8 käuflich zu erwerben. Das Endvolumen / Loch während der Infektion richtete sich nach der Lochgröße (1 ml für 6 - Loch; 500 µl für 12 – Loch; 200 µl für 24 – Loch). Die Zellen wurden bis zum Abbruch der Infektion bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei Infektionen von Zellen für Zeitexperimente oder Immunfluoreszenz wurden diese auf Eis infiziert und zunächst für 30 min auf Eis gelagert, bevor sie in den 37°C-Brutschrank gestellt wurden. So ist eine relativ zeitgleiche Infektion der Zellen möglich, da die Viren während der Inkubation auf Eis auf die Zellen absinken können. Für längere Infektionen (24 – 48 h) war dieser Schritt nicht notwendig.

2.2.3 Mikrobiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterienstämmen

E.coli Bakterien wurden entweder in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 200 rpm geschüttelt. Als Selektionszusatz wurde Ampicillin (50 µg / ml) oder Kanamycin (50 µg / ml) verwendet.

Zur Kryokonservierung wurde 500 µl der entsprechenden Bakteriensuspension mit 500 µl sterilem Glycerol gemischt, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

LB-Medium 5 g Natriumchlorid
 5 g Hefeextrakt
 10 g Trypton

- ⇒ mit destilliertem Wasser auf 1 L auffüllen und autoklavieren
- ⇒ Antibiotikazugabe bei Bedarf kurz vor Gebrauch

LB-Agar 1 L LB-Medium
 15 g Agar

- ⇒ autoklavieren
- ⇒ auf etwa 40°C abkühlen lassen und das entsprechende Antibiotikum zugeben
- ⇒ in Petrischalen gießen

2.2.3.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

5 ml LB-Medium wurden mit dem gewünschten Bakterienstamm angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag wurde diese Vorkultur 1:100 in 250 ml frischem LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7 - 0.8 bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde auf 50 ml Reaktionsgefäße verteilt, 10 min auf Eis gekühlt und anschließend für 10 min bei 4°C zentrifugiert (3000 rpm). Alle folgenden Schritte wurden in einem Kühlraum (4°C) durchgeführt. Das Bakterienpellet wurde in TFB I Puffer resuspendiert (30 ml pro 100 ml abzentrifugiertem LB-Medium) und danach 10 min bei 4°C inkubiert. Die Bakterien wurden erneut für 10 min bei 4°C zentrifugiert (2000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in TFB II Puffer (4 ml pro 30 ml TFB I) resuspendiert, in 1.5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Mittels photometrischer Messung wurde die Konzentration und die Reinheit von DNA bestimmt. Dafür wurde die zu bestimmende DNA je nach Konzentration so verdünnt, dass die Absorption der Probe bei 260 nm im Photometer zwischen 0,1 und 1 lag. Eine OD_{260} von 1 entspricht 50 µg DNA / ml. Proteine weisen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm auf. Der Quotient von 260 nm / 280 nm gibt daher Aufschluss über die Reinheit der DNA. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, um eine ausreichende Reinheit der DNA zu gewährleisten.

2.2.4.3 DNA-Restriktionsspaltung

Plasmid-DNA wurde zur Analyse oder zur Isolation bestimmter DNA-Fragmente mit Restriktionsendonukleasen (Fermentas, New England Biolabs) gespalten. Zur Isolation bestimmter DNA - Fragmente wurden 3 – 10 µg DNA in 50 – 100 µl Gesamtvolumen geschnitten. Für analytische Spaltungen wurden 800 ng DNA in 30 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Ansätze wurden, wenn nicht anders angegeben, 2 h bei 37°C inkubiert. Je nach Endvolumen wurden die Ansätze mit dem zugehörigen 10 x Puffer sowie 2 – 10 U Enzym versetzt und mit Aqua dest. aufgefüllt. Das Auftrennen der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese nach Zusatz von 6 x DNA-Ladepuffer (Fermentas) zu den Reaktionsansätzen.

2.2.4.4 Agarosegelelektrophorese

DNA Fragmente lassen sich durch das Anlegen von konstanter Spannung aufgrund ihrer negativen Ladung je nach Größe auftrennen. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer (Fermentas) gemischt (mindestens 1:6) und in 0,8 % igen Agarosegelen (w/v 1x TBE), versetzt mit 1 µg/ml Ethidiumbromid, bei einer Spannung von 10 V/cm aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte 1 – 2 h. Das Gel wurde mit einem Gelddokumentationsgerät begutachtet und fotografiert. DNA-Fragmente wurden unter einer UV-Handlampe mit langwelligem Licht ausgeschnitten. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Gel erfolgte mittels *Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden).

| | |
|---------|-----------------------------------|
| 10x TBE | 540 g Tris |
| | 275 g Borsäure |
| | 200 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) |
| | mit Aqua bidest. auf 5L auffüllen |

2.2.4.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

2.2.4.5.1 Nicht-quantitative PCR

Die PCR ist eine Methode, bei der durch ein temperaturreguliertes Verfahren gewünschte DNA Fragmente amplifiziert werden. Zunächst wurde die doppelsträngige *template*-DNA 5 min bei 95°C in ihre Einzelstränge aufgeschmolzen. Die folgenden drei Schritte wurden nun beliebig oft zyklisch wiederholt. Der Zyklus begann jeweils mit einem Denaturierungsschritt (95°C für 45 sec), um die DNA-Primer-Hybride aufzuschmelzen. Dann folgte der *Annealing*-Schritt (40 sec), in dem die Primer an die DNA binden. Die Temperatur dieses Schrittes hing von der spezifischen Schmelztemperatur T_M der verwendeten Primer ab. Die Bindung erfolgte bei 5°C unter der T_M . Im dritten Schritt wurde das gewünschte DNA-Fragment polymerisiert (72°C). Die Dauer der Polymerisierung hing von der Länge des zu polymerisierenden Stückes ab. Anschließend an die Zyklen konnte ein einmaliger *Extension*-Schritt (10 min bei 72°C) erfolgen, bei dem noch nicht vollständig verlängerte Fragmente vollständig polymerisiert wurden. Die Proben wurden auf 4°C bis zur Entnahme aus der PCR-Maschine gekühlt. Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 100 ng template-DNA, 0.2 mM dNTP`s, je 30 pmol Primer, 5µl 10x Pfu-PCR-Puffer und 1.25 U Pfu-DNA-Polymerase (Fermentas) in einem Endvolumen von 50µl.

2.2.4.5.2 Quantitative PCR

Die quantitative PCR wurde eingesetzt, um den genomischen Titer einer AAV-Präparation zu bestimmen bzw. um die Ausgangsmenge eines spezifischen DNA-Fragmentes in einer Probe quantitativ zu ermitteln.

Die quantitative PCR wurde in einem *LightCycler 1* System (Roche) mit dem *LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I* (Roche) durchgeführt. Die Zusammensetzung der PCR erfolgte laut den Angaben des Herstellers.

| | |
|----------------|--------------------------------|
| 2 µl | DNA oder cDNA |
| 2 µl | <i>Fast Start Mix 1</i> |
| 2 µl | MgCl ₂ (25 mM) |
| 0.1 µl | Primer <i>forward</i> (0.1 mM) |
| 0.1 µl | Primer <i>reverse</i> (0.1 mM) |
| <u>13.8 µl</u> | H ₂ O |
| 20 µl | |

Zur Amplifizierung des LacZ-Gens wurde das *Quantitect SYBR Green PCR Kit* (Qiagen) benutzt.

| | |
|---------------|---|
| 2 µl | DNA oder cDNA |
| 10 µl | <i>Quantitect SYBR Green PCR Master Mix</i> |
| 0.1 µl | Primer <i>forward</i> (0.1 mM) |
| 0.1 µl | Primer <i>reverse</i> (0.1 mM) |
| <u>7.8 µl</u> | H ₂ O |
| 20 µl | |

Protokoll für humane und murine GAPDH-PCR:

| Programm | Zyklen | Auswertungmodus | Temp (°C) | Zeit (s) | Änderung (°C/s) | Aufnahmemodus |
|---------------|--------|-----------------|-----------|----------|-----------------|----------------|
| Denaturierung | 1 | Keine | 95 | 900 | 20 | Keine |
| Amplifikation | 35-45 | Quantifizierung | 94 | 15 | „ | „ |
| | | | 66 | 20 | „ | „ |
| | | | 72 | 15 | „ | Einfach |
| Schmelzkurve | 1 | Schmelzkurven | 95 | 0 | „ | „ |
| | | | 65 | 10 | „ | „ |
| | | | 95 | 0 | 0.1 | Kontinuierlich |
| Abkühlung | 1 | Keine | 40 | 30 | 20 | Keine |

Protokoll für GFP-PCR:

| Programm | Zyklen | Auswertungmodus | Temp (°C) | Zeit (s) | Änderung (°C/s) | Aufnahmemodus |
|---------------|--------|-----------------|-----------|----------|-----------------|----------------|
| Denaturierung | 1 | Keine | 95 | 900 | 20 | Keine |
| Amplifikation | 35-45 | Quantifizierung | 95 | 10 | „ | „ |
| | | | 63 | 3 | „ | „ |
| | | | 72 | 20 | „ | Einfach |
| Schmelzkurve | 1 | Schmelzkurven | 95 | 0 | „ | „ |
| | | | 67 | 10 | „ | „ |
| | | | 95 | 0 | 0.1 | Kontinuierlich |
| Abkühlung | 1 | Keine | 40 | 30 | 20 | Keine |

Protokoll für wtAAV2-PCR:

| Programm | Zyklen | Auswertungmodus | Temp (°C) | Zeit (s) | Änderung (°C/s) | Aufnahmemodus |
|---------------|--------|-----------------|-----------|----------|-----------------|----------------|
| Denaturierung | 1 | Keine | 95 | 900 | 20 | Keine |
| Amplifikation | 35-45 | Quantifizierung | 95 | 10 | „ | „ |
| | | | 60 | 3 | „ | „ |
| | | | 72 | 35 | „ | Einfach |
| Schmelzkurve | 1 | Schmelzkurven | 95 | 0 | „ | „ |
| | | | 66 | 10 | „ | „ |
| | | | 95 | 0 | 0.05 | Kontinuierlich |
| Abkühlung | 1 | Keine | 40 | 30 | 20 | Keine |

Protokoll für Luciferase-PCR:

| Programm | Zyklen | Auswertungmodus | Temp (°C) | Zeit (s) | Änderung (°C/s) | Aufnahmemodus |
|---------------|--------|-----------------|-----------|----------|-----------------|----------------|
| Denaturierung | 1 | Keine | 95 | 900 | 20 | Keine |
| Amplifikation | 35-45 | Quantifizierung | 95 | 10 | „ | „ |
| | | | 69 | 5 | „ | „ |
| | | | 72 | 12 | „ | Einfach |
| Schmelzkurve | 1 | Schmelzkurven | 95 | 0 | „ | „ |
| | | | 67 | 10 | „ | „ |
| | | | 95 | 0 | 0.1 | Kontinuierlich |
| Abkühlung | 1 | Keine | 40 | 30 | 20 | Keine |

Protokoll für LacZ-PCR:

| Programm | Zyklen | Auswertungmodus | Temp (°C) | Zeit (s) | Änderung (°C/s) | Aufnahmemodus |
|---------------|--------|-----------------|-----------|----------|-----------------|----------------|
| Denaturierung | 1 | Keine | 95 | 900 | 20 | Keine |
| Amplifikation | 35-45 | Quantifizierung | 94 | 15 | „ | „ |
| | | | 53 | 20 | „ | „ |
| | | | 72 | 20 | „ | Einfach |
| Schmelzkurve | 1 | Schmelzkurven | 95 | 0 | „ | „ |
| | | | 66 | 10 | „ | „ |
| | | | 95 | 0 | 0.1 | Kontinuierlich |
| Abkühlung | 1 | Keine | 40 | 30 | 20 | Keine |

2.2.4.6 Sequenzierung

Zur Überprüfung von DNA-Sequenzen wurde mittels des *BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit* der zu sequenzierende Bereich in einer PCR amplifiziert. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 200 ng *template*-DNA, 3.2 pmol Primer, 4 µl 5x BigDye Puffer und 0.5 µl BigDye Mix 3.1 in einem Gesamtvolumen von 20 µl.

Protokoll der Sequenzierungs-PCR:

| Programm | Zyklen | Temp (°C) | Zeit (s) |
|---------------|--------|-----------|----------|
| Denaturierung | 1 | 96 | 60 |
| Amplifikation | 90 | 96 | 30 |
| | | 50 | 15 |
| | | 60 | 240 |
| Amplifikation | 1 | 60 | 600 |
| Abkühlung | 1 | 4 | ∞ |

Das amplifizierte Produkt wurde dem Sequenzierservice CCG des Institutes für Genetik (Köln) zur Analyse übergeben.

2.2.4.7 Extraktion von DNA aus Säugerzellen

Die Isolation von DNA aus Säugerzellen erfolgte unabhängig von der Zell-Linie mit dem *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen). Die Durchführung erfolgte laut den Angaben des Herstellers im Protokoll *Purification of total DNA from animal blood or cells (spin-column protocol)*. Die Elution erfolgte anstatt mit dem mitgelieferten Puffer mit 80 – 200 µl 10 mM Tris (pH 8.5).

2.2.4.8 Extraktion von DNA aus Gewebe

Die Isolation von DNA aus murinem Organgewebe wurde mit dem *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen). Die Durchführung erfolgte mit kleinen Änderungen nach den Angaben des Herstellers. 25 mg Organgewebe (bei Milz nur maximal 10 mg) wurden mit 360 µl Puffer ATL und 40 µl Proteinase K (doppelte Menge wie angegeben) versetzt und über Nacht schüttelnd bei 56°C lysiert. Die Ansätze wurden 15 sec gevortext und anschließend 400 µl AL-Puffer zugegeben. Nach wiederholtem Vortexen wurden 400 µl 100 % Ethanol hinzugefügt. Die flüssige Phase wurde auf eine *DNeasy Mini Spin* Säule geladen und zentrifugiert (6000 x g;

1 min; RT). Es folgten zwei Waschschriffe mit AW1 (16.000 x g; 1 min; RT) und AW2 (16.000 x g; 3 min; RT). Die DNA wurde in 100 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) eluiert und anschließend die DNA-Konzentration bestimmt (2.2.4.2). 100 ng DNA wurden dann mittels quantitativer PCR analysiert (2.2.4.5.2).

2.2.4.9 Extraktion von zellulärer RNA

Zur Extraktion von zellulärer RNA wurden Zellen einer 12-Lochplatte zunächst mit PBS gewaschen und mit einer Trypsinlösung (0.25% Trypsin, 1mM EDTA) abgelöst. Nach Ablösen der Zellen wurde durch Zugabe von FCS-haltigem, frischem Medium die enzymatische Reaktion der Trypsinlösung inhibiert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (200 x g; RT; 5 min) pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und erneut pelletiert. Das Pellet wurde dann in 200 µl Trizol resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert, damit die Nucleo-Protein-Komplexe dissoziieren können. An dieser Stelle ist eine Lagerung bei -80°C bis zur Weiterführung der RNA-Extraktion möglich. Dem Trizol-Lysat wurde 40 µl Chloroform zugegeben (1/5 Vol) und 15 sec gevortext. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei RT und eine anschließende Zentrifugation (12000 x g; 15 min; 4°C). Die obere, farblose, wässrige Phase, welche die RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde Isopropanol (1 Vol) zugegeben und gevortext. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei RT wurde erneut zentrifugiert (12000 x g; 12 min; 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal mit 500 µl 75%igem Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen. Die RNA wurde erneut pelletiert (12000 x g; 8 min; 4°C), der Überstand verworfen, das Pellet kurz luftgetrocknet (3 - 5 min) und in 20 µl DEPC-H₂O durch auf- und abpipettieren (30 sec) resuspendiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

2.2.4.10 cDNA-Synthese

Zur Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA wurde das Verfahren der reversen Transkription genutzt. Zunächst wurden 10 µg RNA mit 1 U / µl DNase I, 2.5 mM MgCl₂, und 0.1 mg/ml BSA in einem Gesamtvolumen von 23,25 µl für 30 min inkubiert, um eventuelle DNA-Kontaminationen zu entfernen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1.25 µl einer 50 mM EDTA-Lösung (pH 8.0) und einer 10 minütigen Inkubation bei 65°C gestoppt. Anschließend wurden 3 µg RNA unter der Benutzung des *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte laut den Angaben des Herstellers. Die cDNA wurde bis zur Analyse mittels quantitativer PCR bei -20°C gelagert.

2.2.5 Proteinanalytik

2.2.5.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

HeLa-Zellen wurden mit PBS gewaschen, durch trypsinieren abgelöst und bei 200 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet wurde in 500 µl kaltem Ripa-Puffer resuspendiert und die Proben für 30 min auf Eis inkubiert. Das resultierende Zelllysate wurde anschließend 30 min bei 4°C zentrifugiert (16.000 x g). Der Überstand, welcher die Proteine enthält, wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt (2.2.5.3). Die Proteinextrakte wurden bei -80°C gelagert.

Ripa-Puffer: 0.5 % DOC
 0.1 % SDS
 150 mM NaCl
 50 mM Tris pH 8.0
 1 % NP-40

2.2.5.2 Proteinfällung mittels Trichloressigsäure (TCA)

Der Lösung, aus der die Proteine gefällt werden sollen, wurde TCA zugesetzt, so dass die TCA-Endkonzentration in der zu fällenden Lösung 15 % beträgt. Die Ansätze wurden für 1h bei -20°C gelagert und anschließend zentrifugiert (16.000 x g; 20 min; 4°C). Das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem Aceton (-20°C) gewaschen und dann bei 56°C getrocknet (10 min), um letzte Reste des Acetons abzdampfen. Dann wurde das Pellet in 200 µl Ripa-Puffer resuspendiert, um bei gemeinsamer Proteinbestimmung mit Gesamtproteinextrakten (2.2.5.1) gleiche Bedingungen zu garantieren.

2.2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bradford-Reagenz enthält Coomassie-Blau, das an Protein bindet und dessen Absorptionsmaximum sich dadurch auf 595 nm verschiebt. Je höher die Proteinkonzentration ist, desto stärker ist die Absorption.

5 µl der Proteinlösung wurde in ein Loch einer 96-Lochplatte vorgelegt und 250 µl 1x Bradford-Reagens dazugegeben. Als *blank* diente 5 µl Ripa-Puffer. Als Standard dienten je 5 µl verschiedener BSA-Konzentrationen aus dem *Quick Start™ Bovine Serum Albumin*

(BSA) Standard Set (BioRad). Nach 10 min wurde eine photometrische Messung bei 595 nm durchgeführt. Anhand des Standards wurde eine Eichgerade erstellt, durch welche die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt werden konnten.

2.2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Proteine wurden mittels SDS-Page nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Trennung der Proteine wurde durch das SDS ermöglicht, welches auch im Probenpuffer enthalten war und durch das die Proteine eine stark negative Ladung erhielten. So war die Eigenladung des Proteins im Bezug auf das Laufverhalten im Gel vernachlässigbar. Für die SDS-Page wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Aufgrund der zu analysierenden Proteingrößen wurde ein 8 % Trenngel gewählt. Das Sammelgel war fünfprozentig. Die Proben wurden mit 5x Probenpuffer (1:5) versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert, um die Proteine vollständig zu denaturieren und sofort auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Kammer (Owl) wurde mit Laufpuffer befüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 – 120 Volt. Als Proteinmolekulargewichtsmarker diente *Dual Color* (BioRad).

| | |
|-------------------------|---|
| Sammelgel | 5 % Acrylamide Mix 125 mM Tris (pH 6.8) 10 % SDS 10 % Ammoniumpersulfat 1 % TEMED |
| Trenngel | 8 % Acrylamide Mix 375 mM Tris (pH 8.8) 10 % SDS 10 % Ammoniumpersulfat 0.6 % TEMED |
| 5x Probenpuffer (-20°C) | 250 mM Tris (pH 6.8) 500 mM DTT 10 % SDS 20 % Glycerol 2 % Bromphenolblau |
| Laufpuffer | 25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 0.1 % SDS |

2.2.5.5 Protein-Transfer (Western Blot)

Der Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page (2.2.5.4) folgte der Transfer der Protein auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA85, Schleicher & Schüll). Die Übertragung wurde mit dem *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* – System (BioRad) durchgeführt. Dafür wurde folgender Stapel gebildet: 3 Lagen *Whatman*-Papier, SDS-Gel, Nitrozellulosemembran, 3 Lagen *Whatman*-Papier. Das *Whatman*-Papier und die Membran waren zuvor mit *Blotting*-Puffer befeuchtet wurden. Die Schichtung musste luftblasenfrei sein. Der Stapel wurde in die dafür vorgesehen Halterung gespannt und in die Transfer-Kammer gegeben, die anschließend mit *Blotting*-Puffer gefüllt wurde. Der Transfer der Proteine erfolgte über Nacht bei 1.5 mA / cm² Membran.

| | |
|-----------------|---|
| Blotting Puffer | 1x Western Salts 15% v/v Methanol |
| Western Salts | 250 mM Tris Base 1,92 M Glycin ➤ pH 8.3 einstellen ➤ Zugabe von 0,02 % SDS |

2.2.5.6 Immunologischer Proteinnachweis

2.2.5.6.1 Western Blot Analyse

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurde die Nitrozellulosemembran, auf welche Proteine mittels Western Blot (2.2.5.5) übertragen worden sind, 1 h bei RT mit 5 % Milch in PBS-T (0.1 % Tween in 1x PBS) abgeblockt. Es folgte die Inkubation (1h; RT) mit dem Primärantikörper (B1 oder β Tubulin I Antikörper). Dieser wurde wie oben angegeben in 5% Milch /PBS-T verdünnt eingesetzt (2.1.8). Nach drei 5 - 10 minütigen Waschschrinen mit PBS-T folgte die Inkubation mit einem Peroxidase (POD)-konjugierten Sekundärantikörper gegen Maus (Verdünnung 1:10 000 in 5% Milch /PBS-T). Nach drei weiteren Waschschrinen wurde die Membran kurz in Aqua bidest. geschwenkt und anschließend 5 min mit *Super Signal Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce) inkubiert, um dann das Signal durch Exponieren der Membran auf einem *Biomax Light Film* (Kodak) sichtbar zu machen.

2.2.5.6.2 Detektion von GFP mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Die gewünschte Zell-Linie wurde in 12-Lochplatten ausgesät und 24 h später infiziert. Zum Zeitpunkt der Analyse der GFP-Expression wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und bei 300 x g (4°C; 5 min) pelletiert. Die Zellen wurden in 300 µl 1x PBS resuspendiert. Mindestens 10.000 Zellen wurden sofort mit einem *FACScalibur* (Becton Dickinson) analysiert. Als GFP-positive Zellen wurden jene definiert, deren Fluoreszenz stärker war als die von 99 % der Kontrollzellen. Die Daten wurden mit *WinMDI 2.8* ausgewertet.

2.2.5.6.3 Immunfluoreszenz

Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und 24 h später infiziert. Die Zellen wurden zum gewünschten Zeitpunkt fixiert, indem sie zunächst zweimal mit 1x PBS gewaschen wurden und anschließend 15 min bei RT mit 3 % Paraformaldehyd (PFA) in 1x PBS fixiert wurden. Dann wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen und 30 min mit 50 mM Ammoniumchlorid in 1x PBS inkubiert. Dieses neutralisiert die Wirkung des PFA. Es folgten erneut zwei Waschrritte mit 1x PBS. An dieser Stelle war eine Lagerung von maximal 48 h bei 4-8°C möglich. Um die Zellen mit Antikörpern zu färben war es nötig, sie durchlässig zu machen. Dafür wurden sie 5 min bei RT mit 0.2 % Triton in 1x PBS behandelt und anschließend viermal mit 1x PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen abzublocken wurden die Zellen dann 10 min bei RT mit 0.2 % Gelatine in 1x PBS inkubiert. Nach dem Blockieren wurden die Zellen 1 - 2 h mit dem Primärantikörper inkubiert. Dieser wurde in 0.2 % Gelatine in 1x PBS wie oben angegeben verdünnt (2.1.8). Die Zellen wurden anschließend 3x mit 1x PBS gewaschen und dann 1 - 2 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Auch dieser wurde in 0.2 % Gelatine in 1x PBS wie oben angeben (2.1.8.3) verdünnt. Nach drei weiteren Waschrritten mit 1x PBS wurden die Zellen in *Vectashield Mounting Medium* eingebettet und am kofokalen Mikroskop FluoView FV1000 ausgewertet. Die Objektträger wurden bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Bei einer Kernfärbung mit Dapi wurden die Zellen vor dem Einbetten für 5 min mit Dapi (1 µg/ml) versetzt und anschließend dreimal gewaschen, bevor die Einbettung erfolgte.

3 Ergebnisse

3.1 AAV vermittelte Transduktion von Hepatozyten

Hepatozyten als Bestandteil der Leber sind das Ziel vieler Gentherapiestudien. Dieses Organ zeichnet sich durch seine gute Erreichbarkeit aus. Zudem werden sekretierbare gentherapeutische Produkte nach Herstellung in Hepatozyten effizient in das Blutsystem abgegeben. AAV2 und AAV8 akkumulieren beide nach systemischer Applikation in der Leber. In *in vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, dass AAV8 in murinen Hepatozyten eine weitaus höhere Transgenexpression zeigt als AAV2 (Gao et al., 2002; Nakai et al., 2005). Eine schlechtere Internalisierung des AAV2 in Leberzellen konnte als Ursache ausgeschlossen werden (Miao et al., 2000; Nakai et al., 2002; Thomas et al., 2004).

In dieser Doktorarbeit soll nun getestet werden, ob diese Diskrepanz in der Genexpression des AAV2 und des AAV8 auch in *in vitro* Experimenten beobachtet werden kann und ob sich somit ein *in vitro* System zur Untersuchung der Gründe dieses Effekts eignet. Hierzu wurden zwei Zelllinien verwendet und zwar die murine Hepatozyten-Zelllinie H2.35 und die humane Hepatom-Zelllinie HepG2. Als Referenzzelllinie verwendete ich die humane Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa, für AAV2 besonders permissiv ist.

Die Interaktion des AAV mit der Zelle erfolgt hauptsächlich über das Kapsid (Stilwell und Samulski, 2004). Adeno-assoziierte Viren und AAV basierte Vektoren unterscheiden sich nur in ihrem Genom. Daher ist es möglich, für vergleichende Untersuchungen zur Infektionsbiologie verschiedener Serotypen Vektoren zu verwenden. In die Kapside verschiedener Serotypen werden AAV2-basierte Genome verpackt, die für dasselbe Transgen kodieren (Rabinowitz et al., 2002) und so den direkten Vergleich ermöglichen. AAV2 und AAV8 wurden als solche pseudotypisierte Vektoren produziert und in den folgenden Versuchen eingesetzt.

3.1.1 AAV8 zeigt trotz deutlich schlechterer Internalisierung eine äquivalent hohe Anzahl Transgen-exprimierender Zellen wie AAV2 in H2.35-Zellen

In *in vivo* Experimenten wurde beschrieben, dass AAV8 im murinen System eine deutliche höhere Transgenexpression in der Leber aufweist als AAV2, obwohl AAV2 anscheinend sehr effizient in Hepatozyten internalisiert wird (Gao et al., 2002; Nakai et al., 2002; Thomas et al., 2004). Diese Beobachtung sollte in *in vitro* Versuchen überprüft werden.

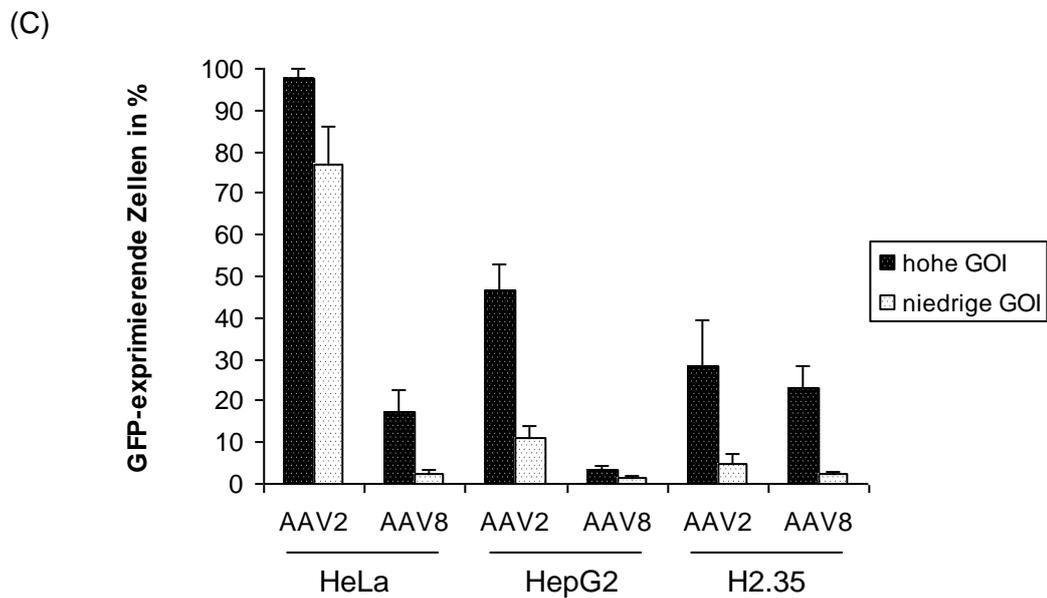
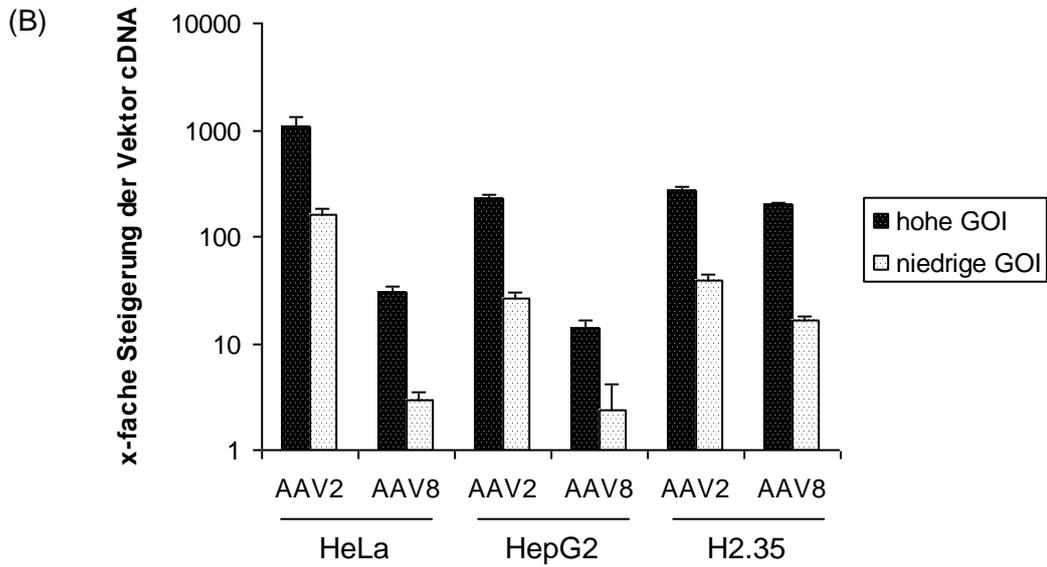
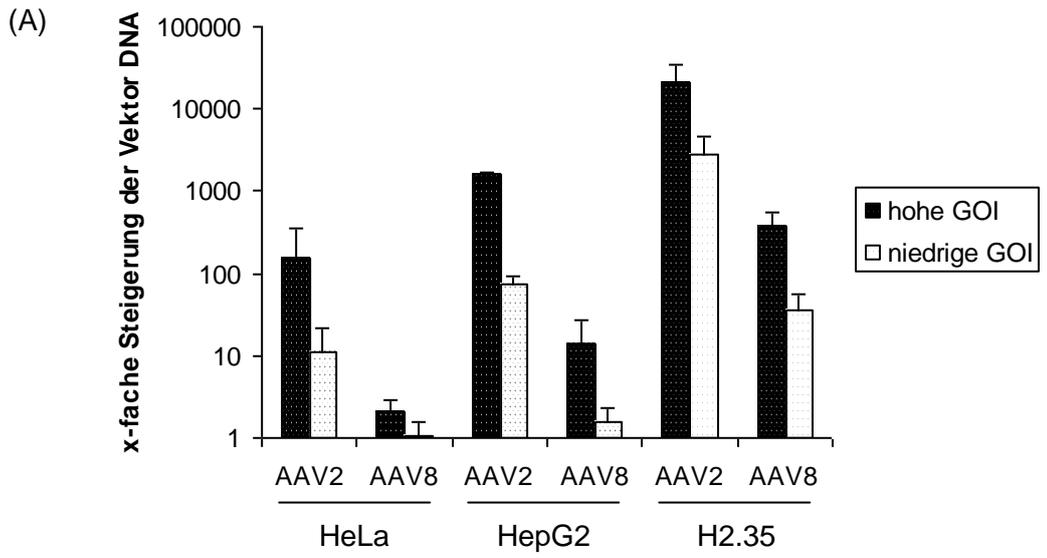


Abb. 3-1 Untersuchung der Internalisierung, Transkription und Expression des Vektor Genoms von AAV2 und AAV8 Vektoren in transduzierten HeLa-, HepG2- und H2.35-Zellen.

HeLa-, HepG2- und H2.35-Zellen wurden ausgesät und 24h später mit AAV2 oder AAV8 transduziert. Für die Transduktion von HeLa-Zellen und HepG2-Zellen wurde sowohl für AAV2 als auch für AAV8 eine GOI von 10^4 und 10^3 , für die Transduktion von H2.35-Zellen eine GOI von 10^5 und 10^4 eingesetzt. Die Transduktion erfolgte für 48h bei 37°C. Bei einem Teil der Ansätze wurden im Anschluss die Zellen gewaschen, abgelöst und anschließend die DNA oder die RNA extrahiert, letztere wurde dann in cDNA umgeschrieben. Sowohl die DNA als auch die cDNA wurden auf Vektor DNA bzw. Vektor cDNA mittels quantitativer PCR untersucht. Der Abgleich der Gesamt-DNA-Menge erfolgte über die Detektion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). (A) zeigt die Ergebnisse des Nachweises der Vektor DNA. (B) zeigt die Ergebnisse des Nachweises der Vektor cDNA. (C) Ein anderer Teil wurde mittels FACS hinsichtlich der Anzahl GFP-exprimierender Zellen analysiert. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3).

Für diese Untersuchung wurden HeLa-, HepG2- und H2.35-Zellen ausgesät und 24h später mit AAV2 oder AAV8 transduziert. Für die Transduktion von HeLa-Zellen und HepG2-Zellen wurde sowohl für AAV2 als auch für AAV8 eine GOI von 10^4 und 10^3 , für die Transduktion von H2.35-Zellen eine GOI von 10^5 und 10^4 eingesetzt. Die Transduktion erfolgte für 48h bei 37°C. Bei einem Teil der Ansätze wurden im Anschluss die Zellen pelletiert und anschließend die DNA oder die RNA extrahiert, letztere wurde dann in cDNA umgeschrieben. Sowohl die DNA als auch die cDNA wurden auf Vektor DNA bzw. Vektor cDNA mittels quantitativer PCR untersucht. Der Abgleich der Gesamt-DNA-Menge erfolgte über die Detektion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Ein anderer Teil wurde mittels FACS hinsichtlich GFP-exprimierender Zellen analysiert.

Abbildung 3-1 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse. Angegeben ist der Nachweis der Vektor DNA bzw. cDNA, der über das Maß des Nachweises in den Negativkontrollen hinaus detektiert werden konnte. Die Anzahl GFP-exprimierender Zellen ist in Prozent angegeben. In Ansätzen, die mit AAV8 (höhere GOI) transduziert worden sind, konnte sowohl in HeLa-Zellen (78fach weniger) als auch in HepG2-Zellen (116fach weniger) und H2.35-Zellen (56fach weniger) erheblich weniger Vektor DNA nachgewiesen werden wie in Zellen, die mit AAV2 (höhere GOI) transduziert worden sind. Ein Vergleich bei der niedrigeren GOI war im Fall von HeLa- und HepG2-Zellen schwierig, da die Detektion von Vektor DNA von AAV8 unterhalb der Nachweisgrenze lag (Abb. 3-1A). Betrachtet man nun den Nachweis der Transkription des Transgens, so ändert sich das Bild (Abb. 3-1B). In Ansätzen, die mit AAV8 (höhere GOI) transduziert worden sind, konnte in HeLa-Zellen (35.9fach weniger) deutlich weniger Vektor cDNA nachgewiesen werden, wenn auch der Unterschied zwischen AAV2 und AAV8 um die Hälfte kleiner wurde. In HepG2-Zellen hingegen konnte nun nur noch ein Unterschied von 16.3fach weniger Vektor cDNA für AAV8 nachgewiesen werden als für

AAV2. Ein ganz klares Bild zeigt die Analyse der Vektor cDNA in H2.35-Zellen. In diesen ist AAV2 auf Transkriptionsebene nur noch 1.4fach besser als AAV8. Ein Vergleich bei der niedrigeren GOI war aufgrund der Nachweisgrenze auch in diesem Fall schwieriger. Die Analyse der Anzahl Transgen-exprimierender Zellen spiegelt die Ergebnisse wieder, die bei der Untersuchung der Unterschiede zwischen beiden Vektoren auf Transkriptionsebene ermittelt wurden (Abb. 3-1C). In HeLa-Zellen können nur die Ergebnisse ausgewertet werden, die bei der niedrigeren GOI erzielt worden sind, da bei der Transduktion der Zellen mit AAV2 (GOI 10^4) bereits die Sättigung erreicht war. Bei der niedrigeren GOI zeigt AAV2 eine 32fach höhere Anzahl GFP-exprimierender Zellen als AAV8. Die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in AAV2 transduzierten HepG2-Zellen übersteigt die Anzahl in AAV8 transduzierten Ansätzen um etwa das 10fache, während sich in H2.35-Zellen die Menge der GFP-exprimierenden Zellen fast gleichen.

Zusammenfassend kann man daher sagen, dass AAV2 zwar deutlich besser in alle getesteten Zell-Linien internalisiert wird, jedoch der Unterschied zwischen beiden Vektoren auf Transkriptions- und Translationsebene in humanen Hepatozyten um das 10fache sinkt (HepG2) bzw. in murinen Hepatozyten ganz neviert wird (H2.35).

3.1.2 Fusionsproteine zur genetischen Markierung Adeno-assoziiierter Viruskapside

Fluoreszenzproteine (FP) werden häufig mit Proteinen fusioniert, um deren Lokalisation z.B. in der Zelle sichtbar zu machen (Chalfie et al., 1994; Helber und Requena, 2007; Nikles et al., 2008). Es wurde bereits gezeigt, dass das Kapsidprotein VP2 des AAV Serotyps 2 große Insertionen als Fusion an seinem N-Terminus toleriert (Yang et al., 1998). Das AAV-Kapsid besteht aus den drei Kapsidproteinen VP1, VP2 und VP3 (1.1.2). Von diesen drei Kapsidproteinen eignet sich nur der N-Terminus von VP2 zur Insertion größerer Peptide (Yang et al., 1998). Daher verwendeten wir diese Position zur genetischen Insertion des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Dieses Fusionsprotein GFP-VP2 ließ sich erfolgreich in das AAV Serotyp 2 Kapsid einbauen und wurde für mikroskopische Untersuchungen zur Infektionsbiologie verwendet (Lux et al., 2005). Um die Möglichkeiten der Visualisierung der AAV-Zellinteraktion zu erweitern, wurden in dieser Arbeit weitere Fluoreszenzproteine auf ihre Eignung als genetische Markierung von AAV-Kapsiden untersucht.

Zu diesem Zweck wurde der offene Leserahmen (ORF) von VP2 mittels PCR amplifiziert und an den C-Terminus des ORF des jeweiligen Fluoreszenzproteins angehängt. Das natürliche Startkodon von VP2 wurde während der Amplifizierung deletiert, um den Start der

Translation von diesem Startkodon aus zu vermeiden. Die Transkription des Fusionsproteins wurde durch den Promotor des humanen Cytomegalievirus (CMV) kontrolliert. Bei den verwendeten Fluoreszenzproteinen handelt es sich um das Cyan fluoreszierende Protein (CFP) und die rot fluoreszierenden Proteine DsRed und mCherry. CFP ist eine Variante von GFP und unterscheidet sich nur durch sechs Aminosäuremutationen, welche zur Verschiebung der Anregungs- und Emissionswellenlänge in den kurzwelligeren Bereich führt (pECFP-C1 Vector Information). DsRed stammt aus der Koralle *Discosoma sp.* (Baird et al., 2000). In dieser Arbeit wurde das DsRed-Monomer (Clontech) verwendet, welches keine Tetramere bildet wie DsRed und daher besser für die Markierung von Viruskapsiden geeignet ist. Das Fluoreszenzprotein mCherry ist ein Derivat von DsRed und wurde aus diesem durch eine Reihe von Mutationen und Modifikationen generiert (Shu et al., 2006).

Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurde unter anderem die Infektionsbiologie von AAV Serotyp 2 (AAV2) und AAV Serotyp 8 (AAV8) in Hepatozyten verglichen. Um diese Untersuchungen auch mit mikroskopischen Methoden durchführen zu können, wurden diese Fusionsproteine für beide Serotypen kloniert. Zusätzlich wurde auch ein Fusionsprotein aus GFP und VP2 des AAV8 hergestellt.

Um die biologischen Eigenschaften der Fusionsproteine GFP-VP2, CFP-VP2, DsRed-VP2 und mCherry-VP2 des jeweiligen Serotyps zu testen, wurden transiente Transfektionen mit den Plasmiden, die für die Fusionsproteine kodieren, in HeLa-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle wurden HeLa-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die nur das jeweilige Fluoreszenzprotein exprimieren. Die Zellen wurden 24h nach der Transfektion fixiert und die Kernlamina wurde mit einem anti-LaminB Antikörper angefärbt. In pCFP-transfizierten Ansätzen wurde der Zellkern mit Dapi visualisiert. Abbildung 3-2 zeigt, dass die Signale der Fluoreszenzproteine in der gesamten Zelle detektierbar sind, wohingegen man die der Fusionsproteine, unabhängig vom Serotyp und von der Art des Fluoreszenzproteins, nur im Zellkern findet. Dieses Ergebnis war erwartet, denn für die verwendeten Fluoreszenzproteine sind keine Sequenzen bekannt, die eine Lokalisierung des Proteins in einem bestimmten zellulären Kompartiment zur Folge haben.

Für VP2 des AAV2 hingegen wurde bereits gezeigt, dass dieses ein Kernlokalisierungssignal (NLS) besitzt und daher als exprimiertes Protein im Zellkern zu finden ist (Hoque et al., 1999). Da die NLS im VP2 von AAV in den Serotypen AAV1-11 stark konserviert sind, findet man auch das exprimierte VP2 des AAV8 im Zellkern (Sonntag et al., 2006). Das Experiment lässt daher den Schluss zu, dass die Fusion mit jedem der vier Fluoreszenzproteine keinen negativen Einfluss auf die Kernlokalisierung des exprimierten VP2 von AAV2 bzw. AAV8 hat.

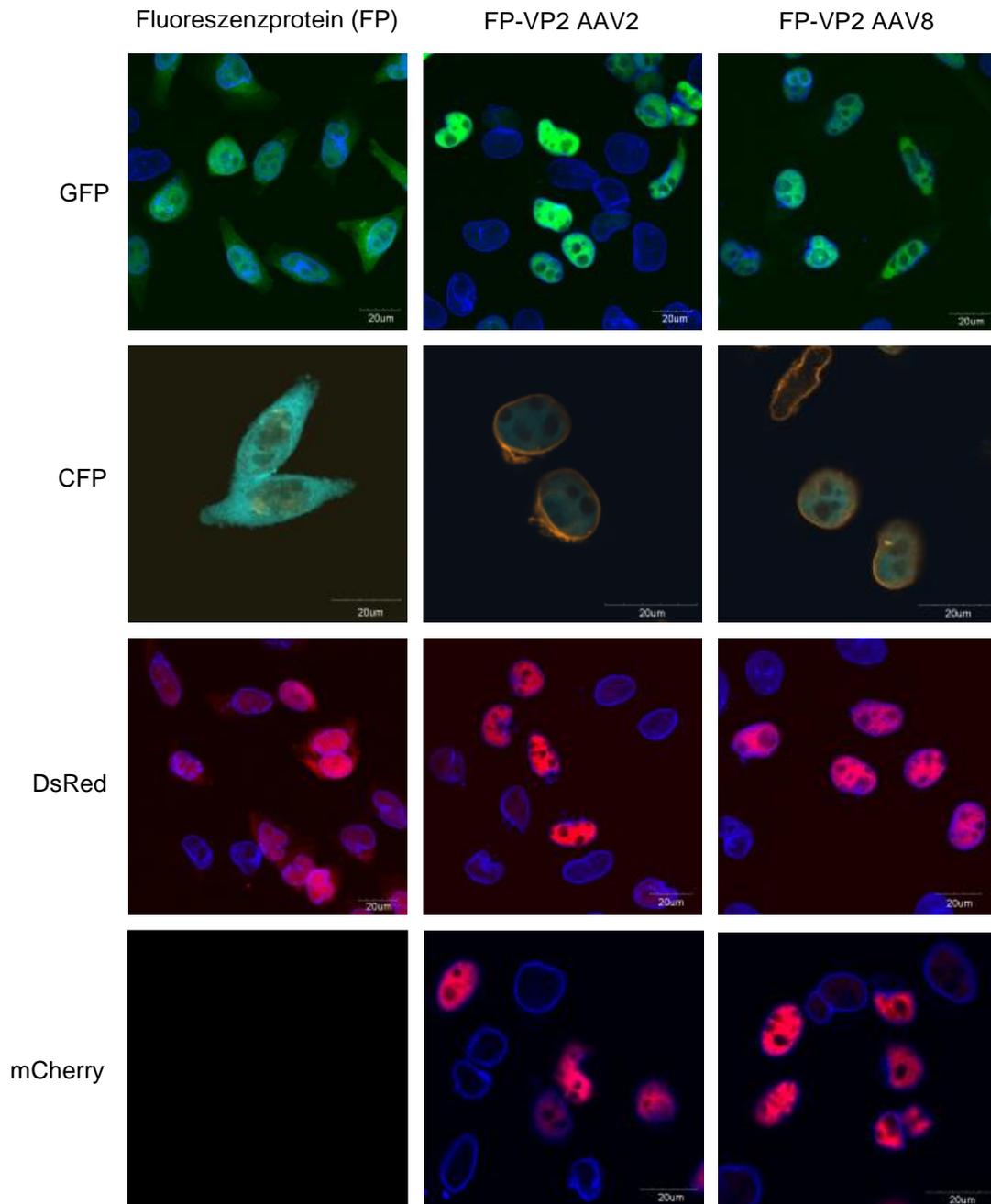


Abb. 3-2: Transiente Transfektion von HeLa-Zellen mit Fluoreszenzprotein (FP) und FP-VP2 exprimierenden Plasmiden.

HeLa-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% mit Plasmiden transfiziert, die für eines der Fluoreszenzproteine (GFP, CFP, DsRed, mCherry) kodieren oder solchen, die eines der Fusionsproteine FP-VP2 (GFP-VP2, CFP-VP2, DsRed-VP2, mCherry-VP2) des AAV2 bzw. AAV8 exprimieren. 24h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert. Die Kernlamina wurde in pGFP, pDsRed und pmCherry transfizierten Ansätzen mit einem anti-LaminB Antikörper (Cy5-konjugierten Sekundärantikörper; blau) gefärbt. In den pCFP transfizierten Ansätzen wurde der Zellkern mit Dapi (orange) visualisiert.

3.1.3 Die Substituierung von VP2 durch Fluoreszenzprotein-VP2 ermöglicht die Produktion von fluoreszenzmarkierten, rekombinanten AAV2 und AAV8 Vektoren

Entgegen früherer Studien mit scFv-VP2 Fusionsproteinen, in der eine Produktion von viralen AAV2-Vektoren nur in Anwesenheit aller drei Kapsidproteine des AAV2 erfolgte, konnte u.a. in unseren eigenen Studien gezeigt werden, dass im Fall einer Markierung des AAV2-Kapsids durch GFP-VP2 auch eine komplette Substituierung des natürlichen VP2 möglich ist und diese Viren weiterhin infektiös sind (Lux et al., 2005; Warrington et al., 2004; Yang et al., 1998).

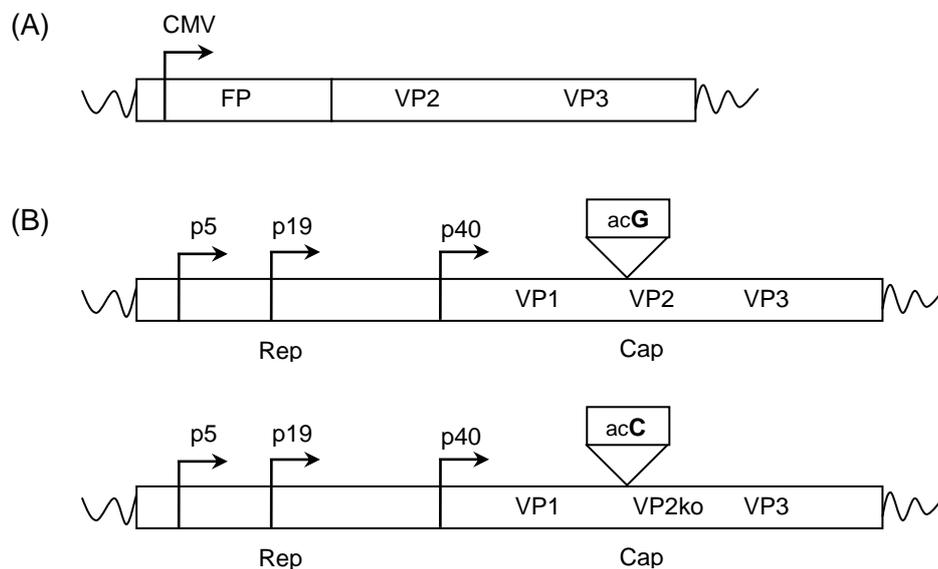


Abb. 3-3: Schematische Darstellung von Plasmiden, die für Kapsidproteine des AAV2 bzw. AAV8 kodieren.

(A) Allgemeine schematische Darstellung der Plasmide, die für das Fusionsprotein aus Fluoreszenzprotein (FP) (GFP, CFP, DsRed, mCherry) und VP2 des AAV2 bzw. AAV8 kodieren (GFP-VP2, CFP-VP2, DsRed-VP2, mCherry-VP2). Das VP2 Startcodon ist deletiert. (B) Um rekombinante fluoreszenzmarkierte AAV2 und AAV8 Vektoren zu produzieren wurde im Plasmid pRC (AAV2) bzw. pXR-8 (AAV8) (obere Zeichnung) eine Basensubstitution (G zu C) in der Wobble-Position des VP2 Startcodons (ACG) durchgeführt und so die Plasmide pRC-VP2k.o. (AAV2) und pXR-8-VP2k.o. (AAV8) (untere Zeichnung) generiert. So wird die Expression von VP2 unterbunden ohne die Aminosäuresequenz von VP1 zu verändern.

Tab. 3-1: Vergleich von AAV-Präparationen nichtmarkierter und Fluoreszenzprotein-markierter Vektoren.

In dieser Tabelle sind verschiedene AAV2 und AAV8-Vektorpräparationen nach der Art des Kapsids (unmarkiert oder Fluoreszenzprotein-markiert) und der Art des Transgens (ssGFP, scGFP, Luciferase, LacZ=beta Galaktosidase) aufgelistet. Zudem ist die Partikelmenge angegeben. Die Partikelmenge bezeichnet die DNA-enthaltenden Vektorpartikel / μl , die durch Transfektion von 1.5×10^7 293-Zellen einer 15 cm-Zellkulturplatte generiert worden sind.

| Art des Kapsids | Transgen | Partikelmenge |
|--------------------------------|------------|--------------------|
| AAV2 ^a | scGFP | $3,37 \times 10^7$ |
| AAV2 ^b | scGFP | $6,15 \times 10^7$ |
| AAV2 | LacZ | $4,4 \times 10^7$ |
| AAV8 | LacZ | $7,0 \times 10^7$ |
| GFP-VP2 /AAV2 ^a | LacZ | $5,46 \times 10^6$ |
| GFP-VP2 /AAV2 ^b | LacZ | $1,51 \times 10^7$ |
| GFP-VP2 /AAV2 ^a | Luciferase | $2,54 \times 10^7$ |
| GFP-VP2 /AAV2 ^b | Luciferase | $3,40 \times 10^7$ |
| GFP-VP2 /AAV8 | Luciferase | $7,02 \times 10^7$ |
| CFP-VP2 /AAV2 | Luciferase | $3,0 \times 10^7$ |
| CFP-VP2 /AAV8 | Luciferase | $3,53 \times 10^7$ |
| DsRed-VP2 /AAV2 ^a | ssGFP | $3,87 \times 10^7$ |
| DsRed-VP2 /AAV2 ^b | ssGFP | $6,0 \times 10^6$ |
| DsRed-VP2 /AAV8 | ssGFP | $2,04 \times 10^8$ |
| DsRed-VP2 /AAV2 | Luciferase | $1,14 \times 10^8$ |
| DsRed-VP2 /AAV8 | Luciferase | $1,08 \times 10^8$ |
| mCherry-VP2 /AAV2 ^a | Luciferase | $5,13 \times 10^7$ |
| mCherry-VP2 /AAV2 ^b | Luciferase | $7,08 \times 10^7$ |
| mCherry-VP2 /AAV8 ^a | Luciferase | $1,52 \times 10^8$ |
| mCherry-VP2 /AAV8 ^b | Luciferase | $1,08 \times 10^8$ |

a und b markieren virale Präparationen, die unabhängig voneinander produziert worden sind

Die Produktion von rekombinanten AAV Vektoren erfolgte durch Transfektion von 293-Zellen mit drei verschiedenen Plasmiden (2.2.2.1). Eines der Plasmide kodierte für die Rep- und Kapsidproteine von AAV, ein weiteres für das zu verpackende Transgen und ein drittes für adenovirale Proteine, die für die Replikation des AAV benötigt werden. Um

fluoreszenzmarkierte AAV-Vektoren zu produzieren, deren natürliches VP2 durch Fluoreszenzprotein (FP)-VP2 ersetzt wird, wurden neben dem adenoviralen Helferplasmid und dem Plasmid, das für das Transgen kodiert, zwei Plasmide benötigt, eines das FP-VP2 exprimiert und eines das zwar weiterhin für die anderen beiden Kapsidproteine, VP1 und VP3, kodiert, aber nicht mehr für VP2. Daher wurde das Startcodon von VP2 (ACG) in pRC (AAV2) bzw. pXR-8 (AAV8) durch eine Basensubstitution (G zu C) in der Wobble-Position dieses Startcodons verändert und so pRC-VP2k.o. und pXR-VP2k.o. generiert. Diese Mutation unterbindet zwar die Expression von VP2, verändert allerdings nicht die Aminosäuresequenz von VP1. Eine schematische Darstellung dieser Plasmide ist in Abbildung 3-3 gezeigt. 48h nach Transfektion wurden die 293-Zellen geerntet und die Zellen lysiert. Die Aufreinigung der produzierten Vektoren erfolgte mittels eines diskontinuierlichen Gradienten (2.2.2.2). Anschließend wurde der genomische Titer der Viruspartikel durch quantitative PCR bestimmt.

Die markierten AAV-Vektorverpackungen wiesen im Vergleich zu Verpackungen von unmarkierten AAV-Vektoren vergleichbare Mengen an Transgen-enthaltenden Partikel auf. Auch die Wahl des Transgens (Luciferase, ssGFP, scGFP, LacZ), das in die Vektorkapside verpackt wurde, scheint diese nicht zu beeinflussen (Tab. 3-1).

Der Einbau des Fusionsproteins in das Kapsid wurde durch Western Blot überprüft. Dafür wurden die Vektoren denaturiert, in einem SDS- Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektierung der Kapsidproteine erfolgte durch den B1-Antikörper, der an den C-Terminus aller drei Kapsidproteine bindet. Abbildung 3-4 zeigt die Kapsidproteinzusammensetzung verschiedener Fluoreszenzprotein (FP)-markierter und nicht markierter AAV2 (A) und AAV8 (B) Vektoren. Unmarkierte AAV2 und AAV8-Vektoren zeigen drei Banden, die den Kapsidproteinen VP1, VP2 und VP3 entsprechen und die wie erwartet in einem Verhältnis von etwa 1:1:10 vorliegen (Abb. 3-4 (A) bzw. (B) Reihe 1). In FP-markierten AAV2 und AAV8 Vektoren ist das natürliche VP2 durch FP-VP2 ersetzt. Daher konnte man bei diesen Vektoren neben VP1 und VP3 noch eine Bande des FP-VP2 detektieren, nicht aber eine des natürlichen VP2 (Abb. 3-4 (A) Reihe 2-6, 8 bzw. (B) Reihe 2-4, 6, 8). Es ist jedoch zu beobachten, dass einige virale Präparationen der FP-markierten Vektoren ein überdurchschnittlich hohes Maß an FP-VP2 in der Zusammensetzung des Kapsids aufweisen. Gleichzeitig kann man bei diesen Präparationen auch ein Signal für natürliches VP2 zu erkennen ist, obwohl dessen Startcodon deletiert ist (Abb. 3-4 (A) Reihe 7 und 3-4 (B) Reihe 5 und 7). Allgemein kann man beobachten, dass der Anteil von VP1 und FP-VP2 an der Zusammensetzung des Kapsids bei FP-markierten Vektoren bei Betrachtung unterschiedlicher Präparationen variiert und diese Varianz unabhängig von FP und Serotyp ist (Abb. 3-4, gekennzeichnet mit ^a und ^b).

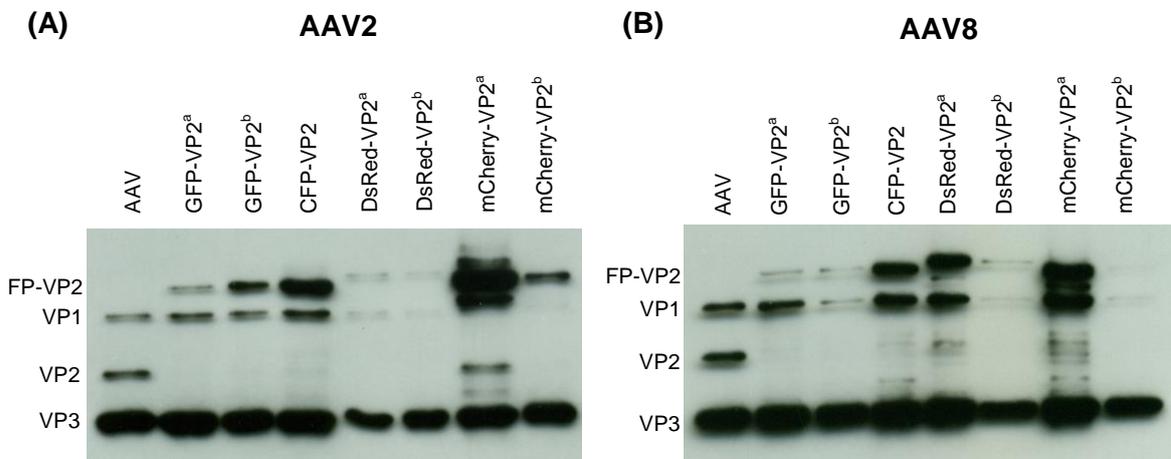


Abb. 3-4: Western Blot Analyse von AAV2 (A) und AAV8 (B) Kapsiden.

AAV2 (A) und AAV8 (B) Vektoren wurden über einen diskontinuierlichen Gradienten aufgereinigt. 1×10^9 Transgen-enthaltende Partikel wurden denaturiert, ihre Kapsidproteine wurden in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot unter der Benutzung des B1-Antikörpers analysiert (POD konjugierter anti-Maus Sekundäntikörper). Der B1-Antikörper erkennt den C-Terminus aller Kapsidproteine (Fluoreszenzprotein (FP)-VP2, VP1, VP2 und VP3). (A) zeigt die Analyse von AAV2-Vektoren, (B) zeigt die von AAV8-Vektoren. In den Reihen sind jeweils unmarkiertes AAV (1), GFP-markiertes AAV (2 und 3), CFP-markiertes AAV (4), DsRed-markiertes AAV (5 und 6) und mCherry-markiertes AAV (7 und 8) aufgetragen. ^a und ^b markieren virale Präparationen, die unabhängig voneinander produziert worden sind.

3.1.4 Neue Anwendungsmöglichkeiten markierter AAV-Vektoren zur Untersuchung der Infektionsbiologie von AAV

Die Markierung von AAV-Vektoren mit verschiedenen Fluoreszenzproteinen ermöglicht die Durchführung von Experimenten zur Untersuchung der Infektionsbiologie von AAV, die vorher aus technischen Gründen nicht möglich gewesen sind. Diese Experimente umschließen z.B. Koinfektionen von zwei Vektoren, die von demselben Antikörper erkannt werden. Ein Beispiel für einen solchen Fall ist die Koinfektion des AAV2 und der PLA₂-Mutante, die auch, neben AAV2 und AAV8, im Rahmen meiner Doktorarbeit mit einem Fluoreszenzfusionsprotein markiert werden konnte (Abb. 3-5). Diese Mutante unterscheidet sich vom Wildtyp-AAV2 nur durch die Veränderung von zwei Aminosäuren im N-terminalen Bereich des VP1 (⁷⁶HD/AN). Diese Mutation liegt im katalytischen Zentrum einer viralen Phospholipase A₂, die eine entscheidende Rolle für die Infektiosität von AAV spielt (3.2). Um direkte Unterschiede zwischen dem Wildtyp (wt) und der Mutante hinsichtlich ihres

Infektionsweges durch die Zelle zu ergründen, war es nötig Koinfektionen durchzuführen. Da beide Viren nicht durch die zur Verfügung stehenden Antikörper unterschieden werden können, wurde der Wildtyp mit DsRed-VP2 markiert, wohingegen in das Kapsid der HD/AN-Mutante GFP-VP2 eingebaut wurde, um so eine Unterscheidung zu ermöglichen. HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später mit DsRed-markiertem wt und GFP-markierter HD/AN-Mutante (jeweils 5×10^6 Kapside /Zelle) für 2h koinfiziert und anschließend fixiert. Um das Signal zu verstärken wurde DsRed mit einem anti RFP-Antikörper und einem sekundären Cy5-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper gefärbt. Der Zellkern wurde mit Dapi sichtbar gemacht. Abbildung 3-5 (A) zeigt die Signale des anti RFP-Antikörpers, der das DsRed der DsRed-markierten Wildtyp-Viren erkennt. Die Signale der GFP-markierten HD/AN-Mutante sind in Abbildung 3-5 (B) zu sehen. In (C) sind die Signale aus (A) und (B) mit dem Dapi-Signal überlagert dargestellt. Kolokalisationen des anti-RFP Antikörpersignals und des GFP-Signals sind in den überwiegenden Teilen der Aufnahme zu beobachten.

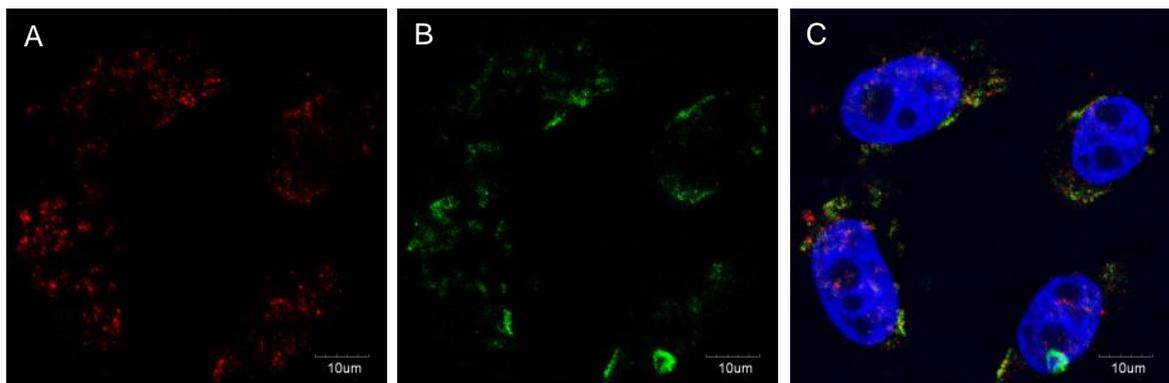


Abb. 3-5: Koinfektion von DsRed-VP2 AAV2 wt und GFP-VP2 AAV2 HD/AN-Mutante.

HeLa-Zellen wurden ausgesät, 24h später mit DsRed-markiertem AAV2 wt und GFP-markierter AAV2 HD/AN-Mutante (jeweils 5×10^6 Kapside /Zelle) für 2h koinfiziert und anschließend fixiert. Die Zellen wurden mit einem anti-RFP Antikörper (erkennt DsRed) und einem sekundären Cy5-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper gefärbt. Der Zellkern wurde mit Dapi visualisiert. (A) zeigt die Signale des anti-RFP Antikörper (rot). (B) zeigt die GFP-Signale der GFP-markierten HD/AN-Mutante (grün). (C) zeigt die Überlagerung von (A) und (B) und der Dapi-Färbung (blau).

Die Visualisierung von AAV8 ist prinzipiell nur mit fluoreszenzmarkierten Vektoren möglich, da kein anti-AAV8-Kapsid Antikörper käuflich zu erwerben ist. Auch Koinfektionen von AAV2- und AAV8-Vektoren sind nur mit fluoreszenzmarkierten Kapsiden möglich, da eine wirkliche Vergleichbarkeit des jeweiligen Vektors mit dem anderen hinsichtlich der Wege durch die Zelle nur dann gegeben ist, wenn beide Vektoren markiert sind. Zur Visualisierung einer Kotransduktion von fluoreszenzmarkiertem AAV2 Vektor mit fluoreszenzmarkiertem AAV8

Vektor wurden humane Hepatomazellen, HepG2, ausgesät und 24h später mit GFP-markiertem oder CFP-markiertem AAV2 Vektor und mCherry-markiertem AAV8 Vektor (GOI 10^5) für 2h kotransduziert und anschließend fixiert. Die Koinfektionen mit CFP-markiertem AAV2 Vektor wurden mit einem anti-GFP Antikörper (erkennt auch CFP) gefärbt. Die Kernfärbung erfolgte mit einem anti-LaminB Antikörper.

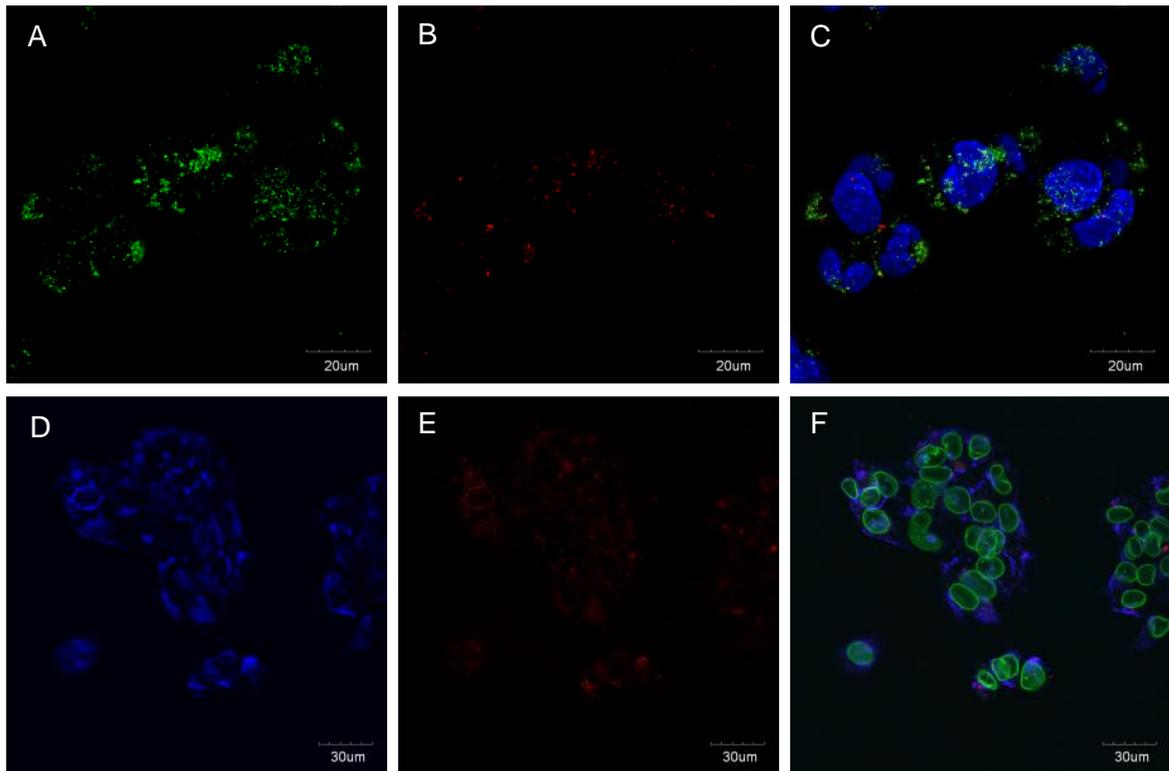


Abb. 3-6: Kotransduktion von GFP-VP2 AAV2 oder CFP-VP2 AAV2 und mCherry-VP2 AAV8 in HepG2-Zellen.

HepG2-Zellen wurden ausgesät, 24h später mit GFP-markiertem AAV2 und mCherry-markiertem AAV8 (A - C) oder CFP-markiertem AAV2 und mCherry-markiertem AAV8 (D - F) (GOI 10^5) für 2h kotransduziert und anschließend fixiert. Die mit CFP-markiertem AAV2 Vektor transduzierten Zellen wurden mit einem anti-GFP Antikörper (erkennt CFP) und einem sekundären Cy5-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper gefärbt. In allen Ansätzen wurde die Kernlamina mit einem anti-LaminB Antikörper gefärbt ((A) – (C) FITC-konjugierter anti-Ziege Sekundärantikörper; (D) – (F) Cy5-konjugierter anti-Ziege Sekundärantikörper). (A) zeigt die GFP-Signale (grün) des markierten AAV2 Vektors. (D) zeigt das Signal des anti-GFP Antikörpers (blau), der die CFP-markierten AAV2 Vektoren erkennt. (B) und (E) zeigen die mCherry-Signale des markierten AAV8 Vektors (rot). (C) und (F) zeigen die Überlagerungen von (A) und (B) bzw. (D) und (E) und die Färbung der Kernlamina (blau bzw. grün).

In Abbildung 3-6 sind die mikroskopischen Aufnahmen der Kotransduktionen dargestellt. (A) – (C) zeigt Bilder der Kotransduktion von GFP-markiertem AAV2 (A) und mCherry-markiertem AAV8 Vektor (B). (D) – (F) zeigt die Aufnahmen der Kotransduktion von CFP-markiertem AAV2 (D) und mCherry-markiertem AAV8 Vektor (E). Es ist zu erkennen, dass das mCherry-Signal des markierten AAV8 Vektors (B und E) schwächer ist, als das des GFP- oder CFP-markierten AAV2 Vektors (A und D). Dieser Unterschied ist bedingt durch eine schlechtere Internalisierungseffizienz von AAV8 in HepG2-Zellen im Vergleich mit der von AAV2. Dennoch zeigen sich bei internalisierten AAV2 und AAV8 Vektoren deutliche Kolokalisationen in der Zelle (C und F).

3.1.5 MG132 führt zu einer deutlichen Steigerung der Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in AAV2 und AAV8 transduzierten H2.35-Zellen

In Kapitel 3.1.1 konnte demonstriert werden, dass in AAV2 und AAV8 transduzierten Zell-Linien deutliche Unterschiede im relativen Verhältnis von internalisierter DNA zu transkribierter DNA und zu exprimiertem Transgen bestehen. Daher sollte nun getestet werden, ob ein stärkerer oder weniger starker Abbau eines der beiden Serotypen in einer der Zell-Linien durch Proteasomen für diesen Effekt verantwortlich sind. Die Behandlung der Zellen mit dem Proteasomeninhibitor MG132 während der Transduktion sollte darüber Aufschluss geben.

Für dieses Experiment wurden HeLa-, HepG2- und H2.35-Zellen ausgesät und 24h später mit AAV2 oder AAV8 transduziert. Die Transduktion von HeLa-Zellen und HepG2-Zellen erfolgte mit einer GOI von 10^4 , die Transduktion von H2.35-Zellen mit einer GOI von 10^5 . Die Zellen wurden 15 min vor und während der Transduktion mit $10 \mu\text{M}$ MG132 inkubiert. 4h p.t. wurden die Zellen gewaschen und 20h später mittels FACS analysiert (Abb. 3-7). Die Ergebnisse der detektierten Anzahl Transgen-exprimierender Zellen sind in Abbildung 3-7A dargestellt. In AAV2 transduzierten HeLa- und HepG2-Zellen konnte durch MG132 keine (von 95.8% auf 98.7%) bzw. eine geringe (von 64.4% auf 73.2%) Steigerung der Anzahl GFP-exprimierender Zellen beobachtet werden, wobei in HeLa-Zellen bereits ohne MG132 eine Sättigung erreicht war. In AAV2 transduzierten H2.35-Zellen konnte hingegen mit MG132 ein deutlicher Anstieg der Anzahl Transgen-exprimierender Zellen beobachtet werden (von 5.9% auf 64.4%). MG132 steigert auch die Menge GFP-exprimierender Zellen in AAV8 transduzierten HeLa-Zellen (von 5.3% auf 17.1%) und HepG2-Zellen (von 2.1% auf 8%). Jedoch ist auch bei diesem Serotyp der deutlich stärkste Anstieg in H2.35-Zellen zu detektieren (von 1.4% auf 48%).

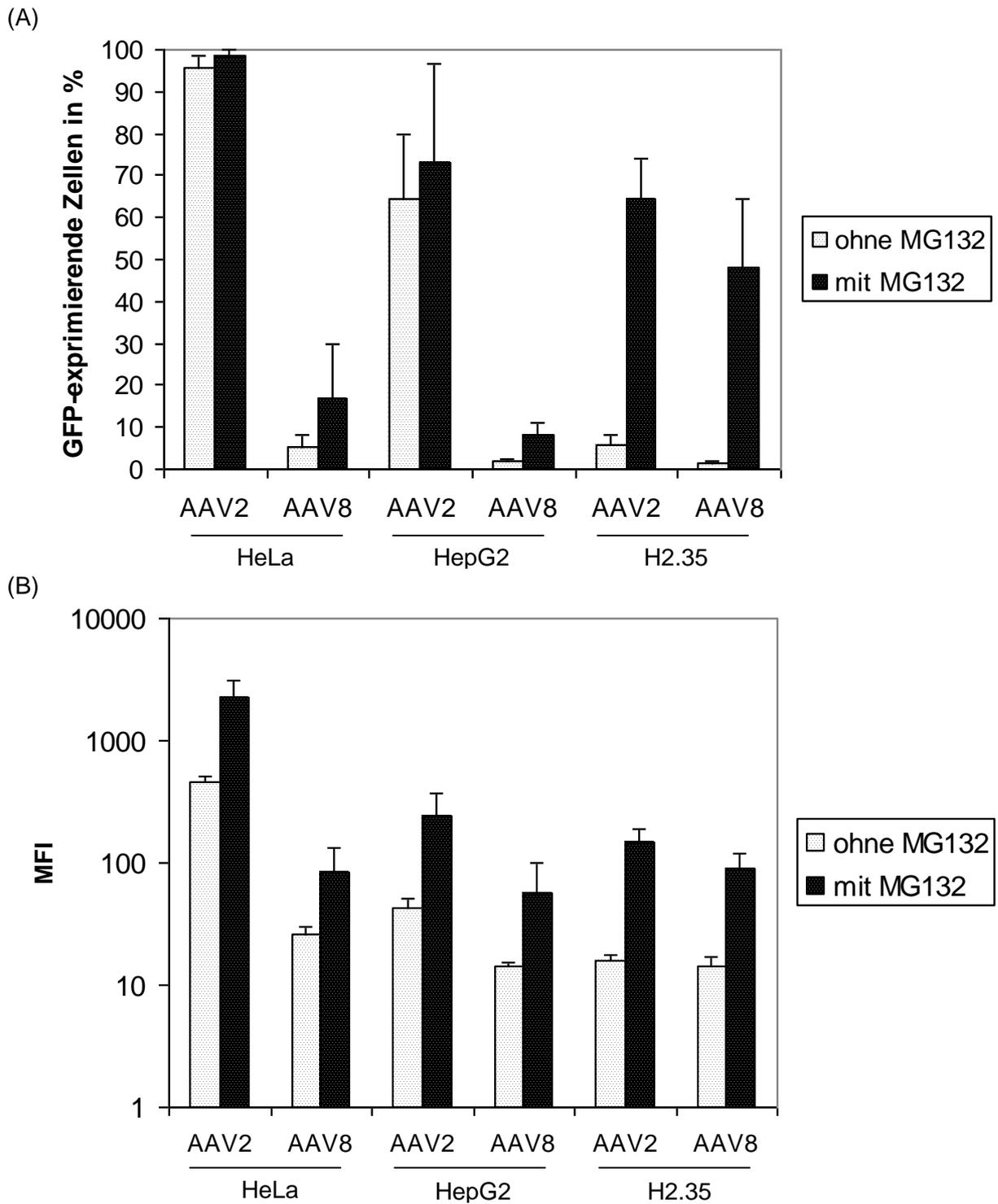


Abb. 3-7: Einfluss von MG132 auf die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in mit AAV2 oder AAV8 transduzierten HeLa-, HepG2- und H2.35-Zellen.

HeLa-, HepG2- und H2.35-Zellen wurden ausgesät und 24h später mit AAV2 oder AAV8 transduziert. Die Transduktion von HeLa-Zellen und HepG2-Zellen erfolgte mit einer GOI von 10^4 , die Transduktion von H2.35-Zellen mit einer GOI von 10^5 . Die Zellen wurden 15 min vor und während der Transduktion mit MG132 ($10\mu\text{M}$) inkubiert. 4h p.t. wurden die Zellen gewaschen und 20h später mittels FACS analysiert. (A) zeigt die Anzahl GFP-exprimierender Zellen in Prozent. (B) zeigt die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI). Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$).

Interessant ist die vergleichende Betrachtung der jeweiligen durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI), die in Abbildung 3-7B dargestellt ist. Für AAV2 transduzierte HeLa- und HepG2-Zellen konnte bei Behandlung mit MG132, anders als bei der Betrachtung der Anzahl GFP-exprimierender Zellen, ein deutlicher Anstieg der MFI verzeichnet werden, von 461 auf 2249 bzw. von 42 auf 239. In AAV2 transduzierten H2.35-Zellen korreliert die Steigerung der MFI (von 16 auf 145) etwa mit dem Anstieg der Transgen-Expression (von 5.9% auf 64.4%). Auch in AAV8 transduzierten HeLa- und HepG2-Zellen korreliert die Steigerung der MFI von 26 auf 83 bzw. von 14 auf 57 mit dem Anstieg der GFP-Expression. Im Vergleich mit der enormen Expressionsteigerung durch MG132 in AAV8 transduzierten H2.35-Zellen steigt die MFI wesentlich schwächer (von 14 auf 91).

Zusammenfassend kann man daher sagen, dass MG132 in AAV2 transduzierten H2.35-Zellen und in AAV8 transduzierten HeLa- und HepG2-Zellen einen Anstieg der Transgen-exprimierenden Zellen bedingt, der mit der Zunahme der MFI korreliert. Hingegen steigt die MFI in AAV2 transduzierten HeLa- und HepG2-Zellen durch MG132 deutlich an. Dieser Anstieg ist jedoch nicht mit einem Anstieg der Anzahl GFP-exprimierender Zellen korrelierbar. Ein noch anderes Bild zeichnet sich für AAV8 transduzierte H2.35-Zellen, die zwar eine immense Steigerung der GFP-exprimierenden Zellen zeigen, aber in Verhältnis kaum einen Anstieg in der MFI. MG132 scheint daher je nach Zell- und Serotyp einen unterschiedlichen Effekt hervorzurufen.

3.2 Die virale Phospholipase A₂ und ihre Funktion während einer AAV-Infektion

Parvoviren weisen eine virale sekretorische Phospholipase A₂ (sPLA₂) auf, die sich am N-Terminus des VP1 befindet, und deren Vorkommen in Viren vorher nicht bekannt war (Zádori et al., 2001). Diese sPLA₂ ist essentiell für die Infektiosität von AAV, da diese drastisch sinkt, wenn man dieses sPLA₂-Motiv mutiert (Girod et al., 2002). Da der N-Terminus von VP1 erst im Verlauf der Infektion auf dem viralen Kapsid exponiert wird und somit die sPLA₂ erst zu diesem Zeitpunkt aktiv werden kann, lässt sich daraus schließen, dass diese für einen Schritt nach der Exponierung aber vor der Expression der viralen Gene benötigt wird, etwa dem Austritt aus den Endosomen oder dem Kerneintritt (Sonntag et al., 2006).

In den folgenden Kapiteln wurde die von Girod und Kollegen hergestellte PLA₂-Mutante detailliert untersucht, um die Funktion der PLA₂ während einer AAV-Infektion zu bestimmen. Bei dieser Mutante wurden die beiden Aminosäuren des katalytischen Zentrums verändert (HD zu AN). Daher steht die Abkürzung HD/AN auf den folgenden Seiten für diese Mutante. Wenn nicht explizit anders angegeben, wurden in den folgenden Versuchen rekombinante Vektoren verwendet, die anstatt des wt-Genoms das Transgen scGFP aufweisen.

3.2.1 AAV2 und PLA₂-Mutante zeigen dieselbe Effizienz beim Eintritt in HeLa-Zellen

Um zu ergründen, an welcher Stelle während der AAV2-Infektion die Phospholipase A₂ (PLA₂) benötigt wird, wurde zunächst untersucht, ob sich wt und HD/AN in der Effizienz ihres Zelleintritts unterscheiden. Dafür wurden Zellen mit AAV2 oder HD/AN mit einer GOI von 10⁴ transduziert und 30 min auf Eis inkubiert, um ein Absinken der Vektoren auf die Zellmembran und eine zeitgleiche Internalisierung zu ermöglichen. Nach einer anschließenden einstündigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen gründlich gewaschen und trypsiniert, um nichtinternalisierte Vektoren von der Zellmembran zu entfernen. Anschließend wurde die DNA aus den Zellen extrahiert. Die Menge an Vektor DNA wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. Der Abgleich der Gesamt-DNA-Menge erfolgte über die Detektion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH).

Für AAV2 konnte das 715-fache und für die PLA₂-Mutante das 1017-fache an Vektor Genomen detektiert werden (Abb. 3-8). Da die Anzahl der nachgewiesenen internalisierten Vektor Genome in den mit PLA₂-Mutante transduzierten Zellen die Anzahl der nachgewiesenen

Genome in den mit AAV2 transduzierten Zellen sogar noch etwas übersteigt, kann man schließen, dass die PLA₂-Funktion nicht für den Eintritt in die Zelle benötigt wird.

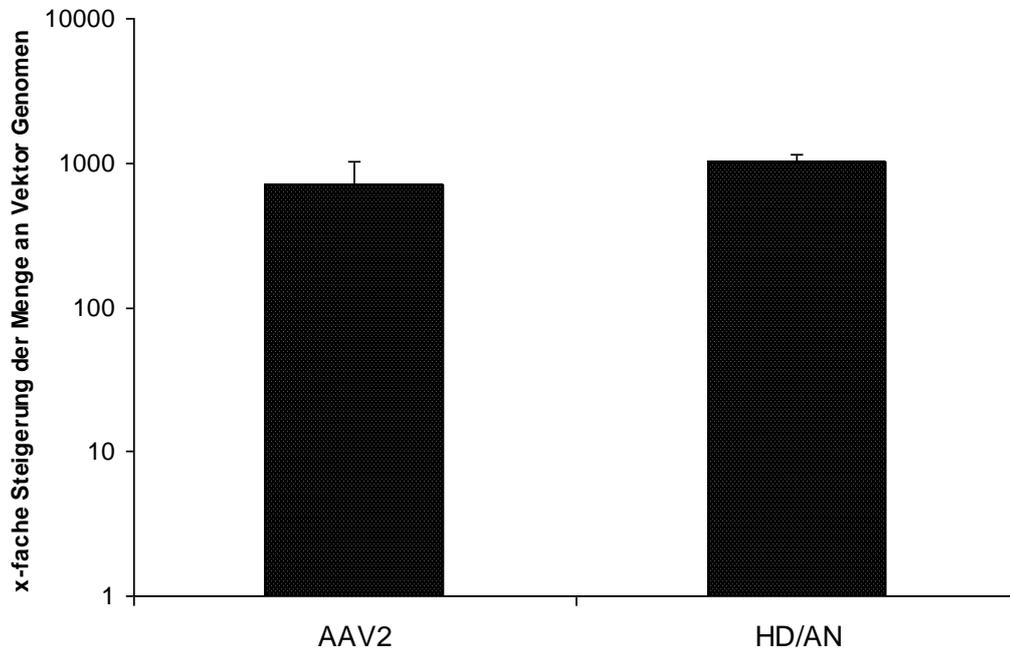


Abb. 3-8: Quantifizierung der Effizienz des Eintritts von AAV2 und PLA₂-Mutante (HD/AN) in HeLa-Zellen.

Zur Quantifizierung der Internalisierungseffizienz von AAV2 und PLA₂-Mutante (HD/AN) wurden 4×10^4 HeLa-Zellen in eine 12-Lochplatte ausgesät und 24h später mit einer GOI von 10^4 transduziert. Die Transduktion erfolgte zunächst für 30 min auf Eis und anschließend 1h bei 37°C. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurde aus diesen die DNA extrahiert. Die Vektor DNA wurde mittels quantitativer PCR analysiert. Der Abgleich der Gesamt-DNA-Menge erfolgte über die Detektion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3).

3.2.2 AAV2 und PLA₂-Mutante kolokalisieren 30 min und 1h nach Infektion

Da gezeigt werden konnte, dass AAV2 und PLA₂-Mutante dieselbe Effizienz beim Eintritt in HeLa-Zellen zeigen (3.2.1), sollte nun mikroskopisch überprüft werden, ob beide Viren in frühen Phasen der Infektion auch in denselben Bereichen zu detektieren sind. Daher wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später mit DsRed-markiertem AAV2 und GFP-markierter PLA₂-Mutante koinfiziert (5×10^6 Kapside / Zelle). Bei den verwendeten Viren handelt es sich nicht um Vektoren, da sie nicht für ein Transgen sondern für das Wildtyp-Genom kodieren. Um eine zeitgleiche Internalisierung zu gewährleisten, wurde die Infektion vor der Inkubation

bei 37°C zunächst für 30 min auf Eis durchgeführt. Die Infektion wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (30 min und 1h bei 37°C) abgebrochen und die Zellen wurden fixiert. Die Zellen wurden mit einem anti RFP-Antikörper (erkennt DsRed) und einem sekundären Cy5-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper gefärbt. Der Visualisierung des Zellkerns erfolgte durch Dapi-Färbung (Abb. 3-9).

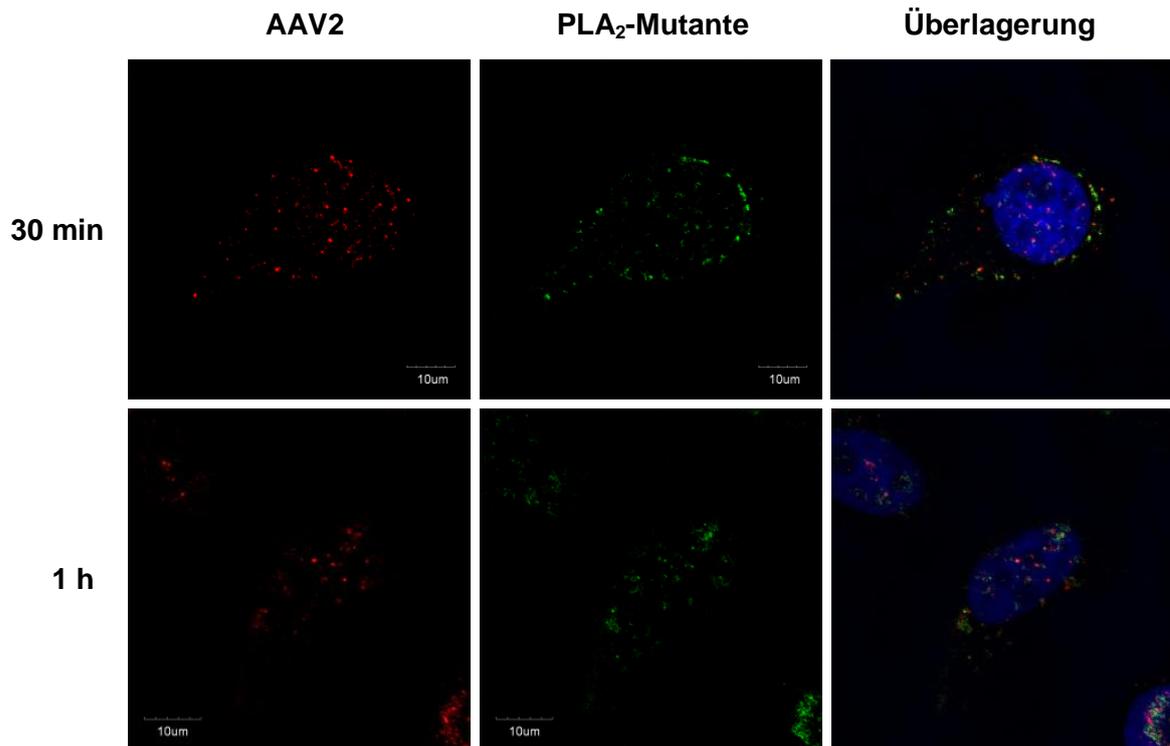


Abb. 3-9: Koinfektion von DsRed-markiertem AAV2 und GFP-markierter PLA₂-Mutante in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später mit DsRed-markiertem AAV2 und GFP-markierter PLA₂-Mutante koinfiziert (5×10^6 Kapside / Zelle), die für das Wildtyp-Genom kodieren. Vor der Inkubation bei 37°C wurde die Infektion zunächst für 30 min auf Eis durchgeführt. Die Infektion wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (30 min und 1h bei 37°C) abgebrochen und die Zellen wurden fixiert. Die Zellen wurden mit einem anti RFP-Antikörper (erkennt DsRed) und einem sekundären Cy5-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper gefärbt. Die Visualisierung des Zellkerns erfolgte durch Dapi-Färbung. Die obere Reihe zeigt eine Aufnahme von Zellen die 30 min und die untere Reihe eine Aufnahme von Zellen die 1h nach Infektion fixiert wurden. In der ersten Spalte sind nur die Signale des anti RFP Antikörpers (rot) und in der zweiten Spalte nur die GFP-Signale (grün) dargestellt. Die dritte Spalte zeigt eine Überlagerung der anti RFP-Signale, der GFP-Signale und der Dapi-Färbung (blau).

Abbildung 3-9 zeigt Aufnahmen, die mit einem konfokalen Mikroskop 30 min (obere Reihe) bzw. 1h (untere Reihe) nach Infektionsbeginn gemacht wurden. In Spalte 1 sind nur die Signale des anti RFP Antikörpers, der den DsRed-markierten AAV2 Wildtyp erkennt, und in Spalte 2 nur die GFP-Signale der PLA₂-Mutante dargestellt. In Spalte 3 sind die Signale der

Spalte 1 und 2 mit dem Dapi-Signal des Zellkerns übereinander gelegt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Signale des anti RFP Antikörpers (Spalte 1) und die GFP-Signale (Spalte 2) in gleichen Regionen zu finden sind und teilweise sogar Kollokalisierungen (Spalte 3) beobachtet werden können. Während die Signale 30 min nach Start der Infektion noch über die Zelle verteilt sind (obere Reihe), findet man bereits 1h nach Infektionsbeginn lokale Ansammlungen des anti RFP Antikörper Signals und des GFP Signals. Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass sich AAV2 und die PLA₂-Mutante zu frühen Zeitpunkten der Infektion in denselben Bereichen befinden.

3.2.3 PLA₂-Mutante zeigt trotz perinukleärer Akkumulation nur eine schwache, verspätete Transgenexpression in HeLa-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation des katalytischen Zentrums der viralen PLA₂ zu einem drastischen Abfall der Infektiosität führt (Girod et al., 2002). In den oberen Kapiteln konnte bereits demonstriert werden, dass AAV2 und die PLA₂-Mutante keine Unterschiede hinsichtlich der Internalisierungseffizienz (3.2.1) und der Lokalisierung in der Zelle zu frühen Zeitpunkten der Infektion (3.2.2) aufweisen. Ein wichtiger Schritt für ein DNA-Virus wie z.B. AAV ist es, nach dem erfolgreichen Eintritt in die Zelle das Genom in den Zellkern zu transportieren, damit dieses dort exprimiert wird. Daher sollte nun mittels einer Zeitkinetik überprüft werden, ab welchem Zeitpunkt man Transgen-exprimierende Zellen in den mit AAV2 oder der PLA₂-Mutante transduzierten Ansätzen detektieren kann.

Dafür wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später mit AAV2 (GOI 10⁴ und 10³) oder der PLA₂-Mutante (GOI 10⁵ und 10⁴) transduziert. Die Transduktion erfolgte zunächst für 30 min auf Eis bevor die Zellen bei 37°C inkubiert wurden. Zu festgelegten Zeitpunkten (0h, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 11h, 24h, 48h) nach dem Temperaturwechsel wurde die Transduktion unterbrochen. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen bestimmt (Abb. 3-10A). Für AAV2 konnten bereits 2h (GOI 10⁴) bzw. 3h (GOI 10³) nach Transduktion (p.t.) die ersten Transgen-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (1.7 % bzw. 1.7 %). Nach 11h p.t. (GOI 10⁴) bzw. 11-24h p.t. (GOI 10³) wurde das Plateau erreicht. Für die PLA₂-Mutante zeichnet sich ein anderes Bild. Erste Transgen-exprimierende Zellen wurden 11h und 24h p.t. (GOI 10⁵ und GOI 10⁴) detektiert. Zudem konnte in dem Messzeitraum kein Plateau erreicht werden. Im Gegensatz zu Transduktionen mit wt-AAV2 führte eine Erhöhung der Partikelzahl nicht zu einer signifikanten Steigerung an Transgen-exprimierenden Zellen.

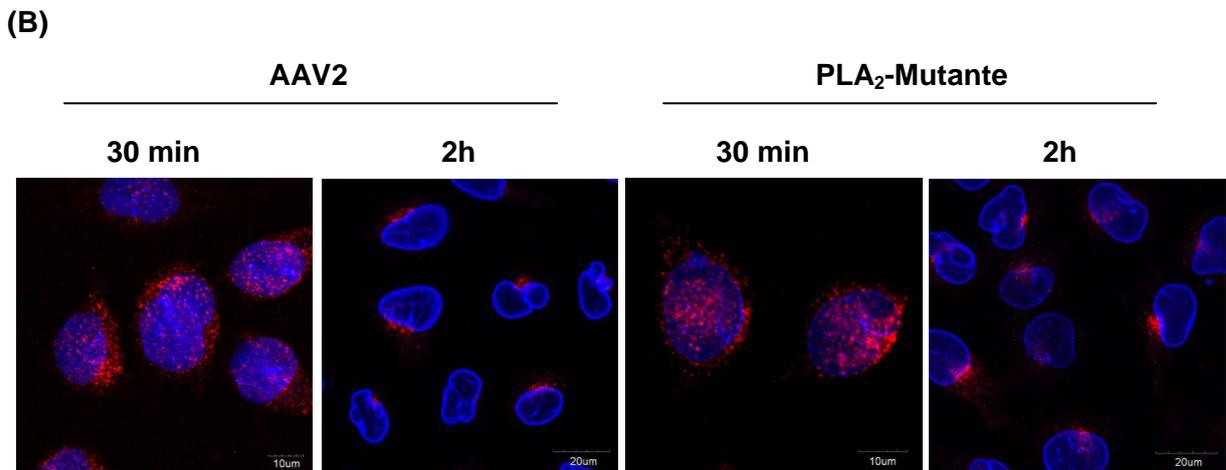
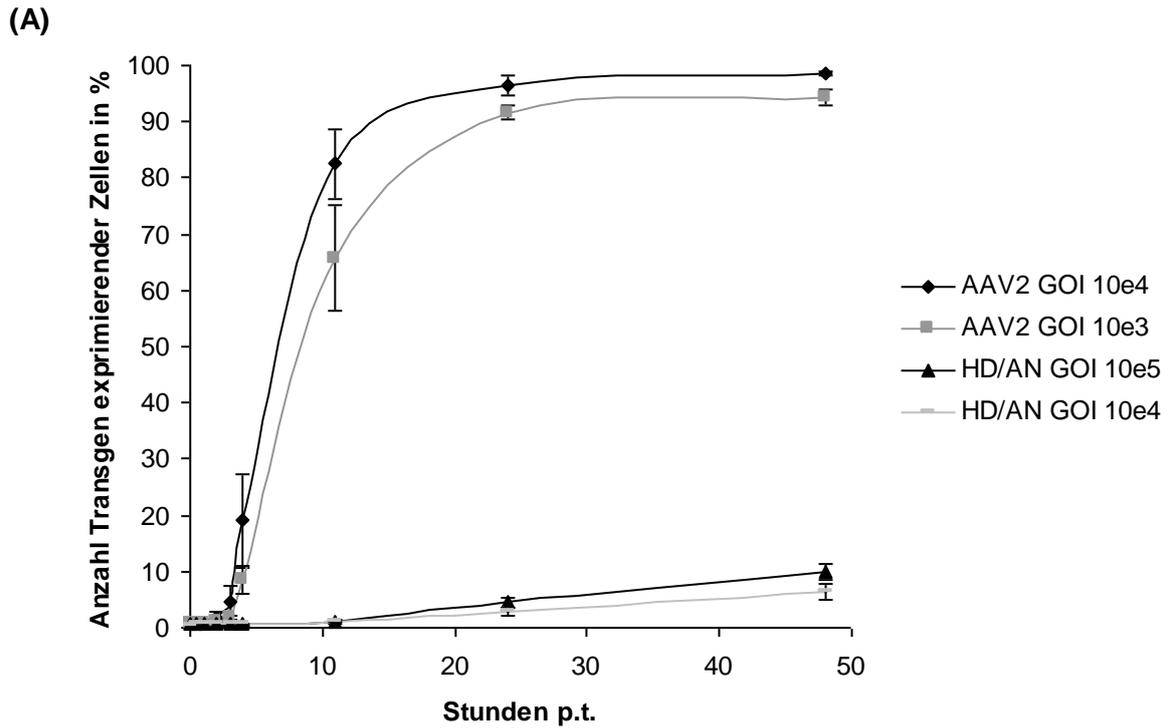


Abb. 3-10: Zeitkinetik der Transgen-exprimierenden Zellen (A) und der intrazellulären Lokalisierung der Vektoren (B) in AAV2 bzw. mit der PLA₂-Mutante (HD/AN) transduzierten HeLa-Zellen.

(A) HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später mit AAV2 (GOI 10⁴ und 10³) oder PLA₂-Mutante (GOI 10⁵ und 10⁴) transduziert. Der Abbruch der Transduktion erfolgte nach 0h, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 11h, 24h bzw. 48h. Die Zellen wurden abgelöst und mittels FACS analysiert. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3).

(B) HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später mit AAV2 bzw. PLA₂-Mutante (GOI 10⁴) transduziert. Der Abbruch der Transduktion wurde 30 min und 2h nach Transduktion durchgeführt. Die Zellen wurden fixiert und das Kapsid wurde mit A20, einem anti-AAV2-Kapsid Antikörper, angefärbt (RRX-konjugierter anti-Maus Sekundärantikörper; oben rot). Die Kernlamina wurde mit einem anti-LaminB Antikörper (Cy5-konjugierter anti-Ziege Sekundärantikörper; oben blau) visualisiert.

Parallel sollten Immunfluoreszenzaufnahmen derselben Zeitpunkte zeigen, wo sich das Virus jeweils in der Zelle befindet. Dafür wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später mit AAV2 oder der PLA₂-Mutante mit einer GOI von 10⁴ transduziert. Die Transduktion erfolgte zunächst für 30 min auf Eis bevor die Zellen bei 37°C inkubiert wurden. Der Abbruch der Transduktion wurde zu denselben Zeitpunkten durchgeführt wie für die Zeitkinetik. Die Zellen wurden fixiert und das Kapsid wurde mit A20, einem anti-AAV2-Kapsid Antikörper, angefärbt. Die Kernlamina wurde mit einem anti-LaminB Antikörper sichtbar gemacht. In Abbildung 3-10B sind Aufnahmen von AAV2 transduzierten (links) und mit der PLA₂-Mutante transduzierten (rechts) HeLa-Zellen 30 min p.t. und 2h p.t. gezeigt. Nach 30 min zeigte sich sowohl für AAV2 als auch für die PLA₂-Mutante eine diffuse Verteilung der Vektoren im Zytoplasma, wohingegen bereits 2h p.t. eine deutliche perinukleäre Akkumulation zu detektieren ist.

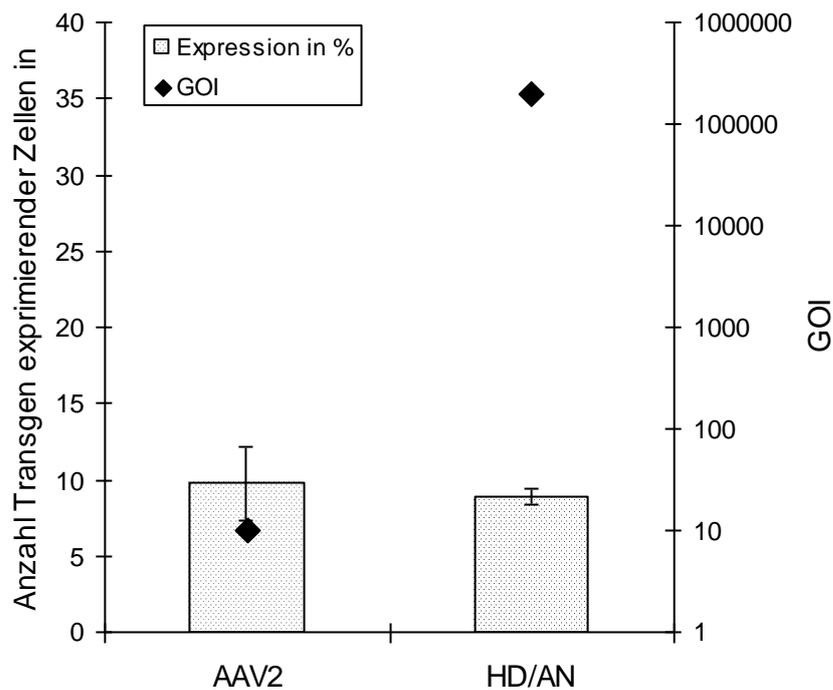


Abb. 3-11: Darstellung des Verhältnisses von GOI und Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in AAV2 transduzierten oder mit der PLA₂-Mutante (HD/AN) transduzierten HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später mit AAV2 (GOI 10¹) oder PLA₂-Mutante (GOI 2x10⁵) für 24h bei 37°C transduziert. Die Zellen wurden abgelöst und mittels FACS analysiert (Balken; linke Y-Achse). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3). Die Graphik zeigt zudem die jeweils eingesetzte GOI (Raute; rechte Y-Achse).

Zusammenfassend kann man daher aus diesen Beobachtungen schließen, dass bereits 2h p.t. sowohl für AAV2 als auch für die PLA₂-Mutante eine perinukleäre Akkumulation detektiert werden konnte und für AAV2 auch 2-3h p.t. bereits Transgen-exprimierende Zellen nachzuweisen waren. Für die Mutante konnten hingegen Transgen-exprimierende Zellen nur mit einer erheblichen Zeitverzögerung nachgewiesen werden.

In den folgenden Experimenten sollte herausgefunden werden, an welcher Stelle des Infektionsweges die PLA₂ benötigt wird. Die Analyse dieser Experimente basierte auf der Detektion von GFP, dem exprimierten Transgen. Um die Versuchsauswertung zu ermöglichen, sollten AAV2 und die PLA₂-Mutante eine vergleichbare Transduktionseffizienz erreichen. Dies war bei Verwendung von 10¹ bzw. 2 x 10⁵ Vektorpartikeln von AAV2 bzw. PLA₂-Mutante gegeben. Um diese ermittelten GOI zu verifizieren wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später mit AAV2 (GOI 10¹) oder PLA₂-Mutante (GOI 2x10⁵) für 24h bei 37°C transduziert. Die Zellen wurden abgelöst und per FACS analysiert (Abb. 3-11). Wie gewünscht zeigen beide Vektoren eine Menge Transgen-exprimierender Zellen von etwa 10%.

3.2.4 Aphidicolin-arretierte HeLa-Zellen zeigen eine verstärkte Genexpression von AAV2 und PLA₂-Mutante

AAV2 und PLA₂-Mutante zeigen keine Unterschiede hinsichtlich der Internalisierungseffizienz in die Zelle, der intrazellulären Lokalisierung zu frühen Zeitpunkten der Infektion und der perinukleären Akkumulation bereits 2h p.t.. Allerdings ist für die Mutante ein deutlich verspäteter und wesentlich schwächerer Anteil Transgen-exprimierender Zellen zu beobachten. Die Tatsache, dass zwar eine perinukleäre Akkumulation besteht, diese aber nicht mit einer Genexpression einhergeht, lässt die Vermutung zu, dass die Funktion der PLA₂ beim Eintritt in den Zellkern benötigt wird. Um diese Frage zu beantworten wurde der Zellzyklus von HeLa-Zellen mit Aphidicolin arretiert und die Transduktion arretierter Zellen mit der von nicht arretierten Zellen verglichen. Aphidicolin ist ein Antibiotikum, das die DNA-Polymerasen α und δ der Zelle inhibiert und so eine Arretierung des Zellzyklus in der G1/S-Phase bedingt. Sollte also die PLA₂-Funktion den Eintritt in den Zellkern durch eine lokale Öffnung der Membran induzieren, so muss man annehmen, dass das geringe Maß an GFP-exprimierenden Zellen in mit der PLA₂-Mutante transduzierten Ansätzen auf einige Vektoren zurückzuführen ist, die es in Zellzyklusphasen mit offener Kernmembran schaffen, ihr Transgen zu transkribieren oder in den darauffolgend neugebildeten Zellkern zu gelangen. Diese wenigen Vektoren sollten dazu in Zellen mit stabilisierter Kernmembran nicht mehr in

der Lage sein. Dafür wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später für weitere 24h in Kulturmedium oder in Kulturmedium, das mit 5 µg/ml Aphidicolin versetzt war, kultiviert. Dann wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Parallel wurden die Zellen mit AAV2 (GOI 10^1) oder PLA₂-Mutante (GOI 2×10^5) transduziert und weitere 24h in Kulturmedium mit oder ohne Aphidicolin bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen mittels FACS analysiert (Abb. 3-12). Wie erwartet zeigen AAV2 und PLA₂-Mutante in nicht arretierten HeLa-Zellen gleiche Mengen an GFP-exprimierenden Zellen (15,5% bzw. 13,9%). In durch Aphidicolin arretierten HeLa-Zellen sieht man sowohl für AAV2 als auch für die Mutante eine deutliche Steigerung der Menge Transgen-exprimierender Zellen (34,4% bzw. 50,1%), wobei der Effekt für die Mutante noch stärker ist.

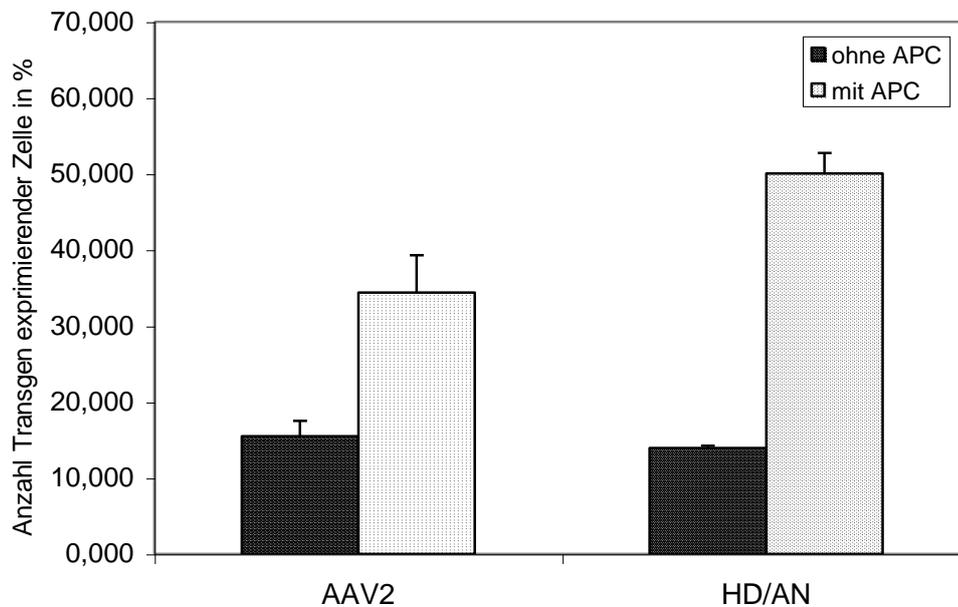


Abb. 3-12: Effekt von Aphidicolin auf die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in mit AAV2 oder mit der PLA₂-Mutante (HD/AN) transduzierten HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später für weitere 24h in Kulturmedium oder in Kulturmedium, das mit 5 µg/ml Aphidicolin versetzt war, gehalten. Dann wurden die Zellen mit AAV2 (GOI 10^1) oder der PLA₂-Mutante (GOI 2×10^5) transduziert und weitere 24h in Kulturmedium mit oder ohne Aphidicolin bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die GFP-exprimierenden Zellen mittels FACS analysiert. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3).

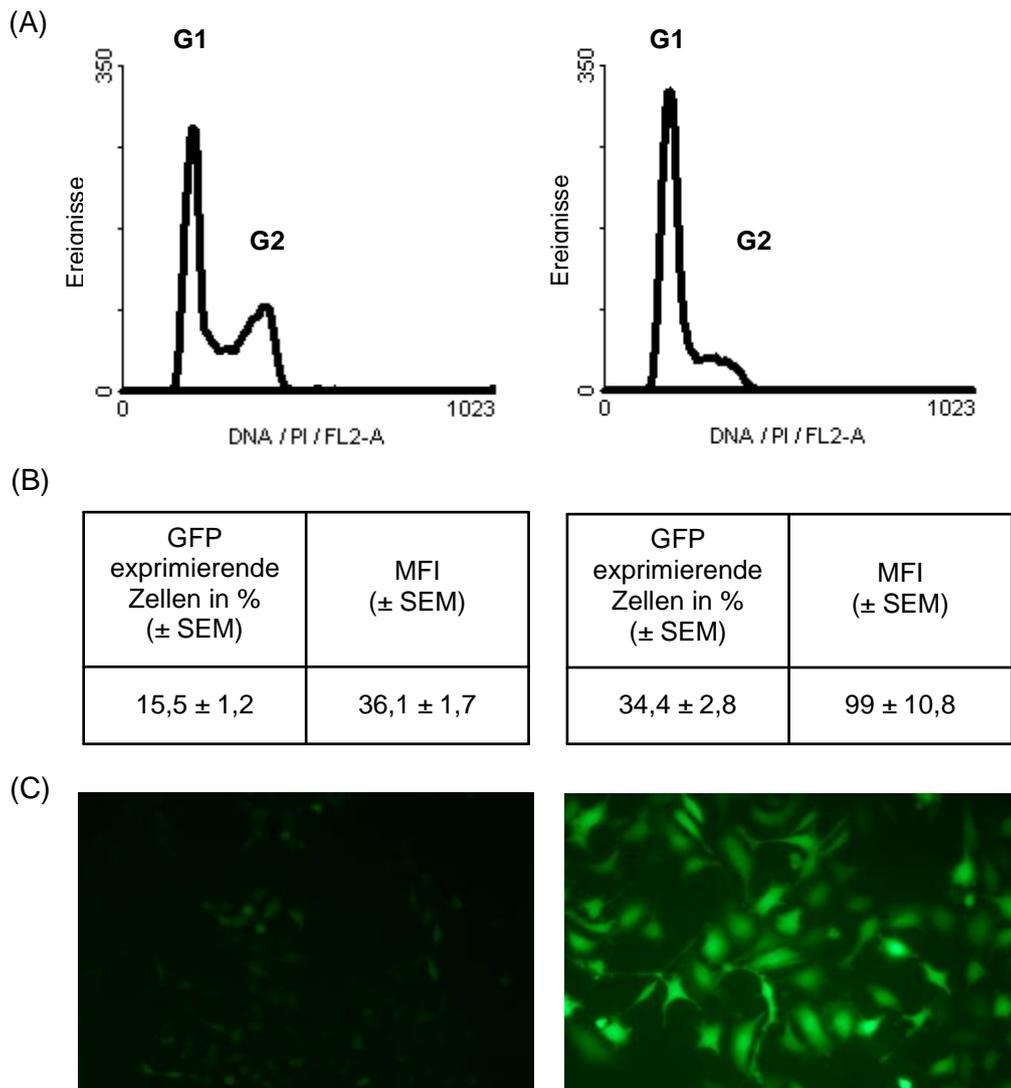


Abb. 3-13: Einfluss von Aphidicolin auf den Zellzyklus (A) und die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in AAV2 transduzierten HeLa-Zellen (B und C).

HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später für weitere 24h in Kulturmedium oder in Kulturmedium mit 5 μ l / ml Aphidicolin gehalten. (A) Dann wurde ein Teil der Zellen abgelöst, fixiert und 30 min mit RNase (100 μ g/ml) behandelt. Nach Zugabe von Propidiumjodid (100 μ g/ml) wurde mittels FACS eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Die linke Graphik zeigt Zellen, die nicht mit Aphidicolin und die rechte Graphik solche, die mit Aphidicolin behandelt worden sind. (B) Der andere Teil der Zellen wurde in Kulturmedium ohne (links) oder mit Aphidicolin (rechts) mit AAV2 transduziert ($GOI\ 10^1$). 24h p.t. wurde die GFP-exprimierenden Zellen mittels FACS analysiert. Angegeben sind Mittelwerte der ermittelten Anzahl GFP-exprimierender Zellen und der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) \pm Standardabweichung ($n=3$). (C) Aphidicolin-arretierte (rechts) und nicht arretierte (links) HeLa-Zellen wurden für 24h mit AAV2 ($GOI\ 10^3$) transduziert und anschließend unter einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop photographiert. Die Aufnahmen erfolgten mit derselben Vergrößerung und zeigen einen repräsentativen Bildausschnitt.

In Abbildung 3-13A ist der Zellzyklus von HeLa-Zellen dargestellt, die 24h mit oder ohne 5 µg/ml Aphidicolin behandelt worden sind. Die Zellen wurden anschließend fixiert, mit RNase (100 µg/ml) behandelt und Propidiumjodid (100 µg/ml) hinzu gegeben, welches in die DNA interkaliert und nach Anregung fluoresziert. Die Fluoreszenz erlaubt durch die Ermittlung des DNA-Gehalts die Bestimmung der Zellzyklusphase (G1-, S- oder G2-Phase). Eine Darstellung der Verteilung der Zellzyklusphasen für HeLa-Zellen, die in Kulturmedium gehalten worden sind, ist in Abbildung 3-13A (linkes Bild) gezeigt. Diese Verteilung ändert sich in Aphidicolin-arretierten HeLa-Zellen, da diese in der G1/S-Phase arretiert werden und sich keine Zellen mehr in der G2-Phase befinden (Abb. 3-13A rechtes Bild). Wenn diese Zellen nun für 24h mit AAV2 (GOI 10^1) transduziert werden, kann man deutlich mehr GFP-exprimierende Zellen in dem arretierten Ansatz detektieren (34,4%; Abb. 3-13B rechte Tabelle) als in nicht arretierten Zellen (15,5%; Abb. 3-13B linke Tabelle). Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass sich nicht nur die Anzahl GFP-exprimierender Zellen erhöht, sondern auch die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) gleichermaßen steigt. Nicht arretierte HeLa-Zellen weisen eine MFI von 36 (linke Tabelle) auf, wohingegen in Aphidicolin-arretierten Zellen eine MFI von 99 (rechte Tabelle) zu detektieren ist (Abb. 3-13B). Diese Unterschiede in der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität lassen sich auch visuell beobachten. Aphidicolin-arretierte und nicht arretierte HeLa-Zellen wurden für 24h mit AAV2 (GOI 10^3) transduziert und anschließend unter einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop photographiert (Abb. 3-13C). Das linke Bild zeigt nicht-arretierte, mit AAV2 transduzierte und das rechte Bild Aphidicolin-arretierte, mit AAV2 transduzierte HeLa-Zellen. Beide Aufnahmen wurden mit derselben Vergrößerung aufgenommen und zeigen einen äquivalenten, repräsentativen Bildausschnitt. Man erkennt deutlich, dass nicht-arretierte HeLa-Zellen wesentlich kleiner sind als Aphidicolin-arretierte. Auch der Unterschied in der MFI ist sehr gut zu erkennen. Aphidicolin-arretierte HeLa-Zellen weisen eine wesentlich stärkere grüne Fluoreszenz auf als nicht-arretierte Zellen. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurde eine höhere GOI (10^3) eingesetzt, da die Sensitivität des Facs deutlich stärker ist als die des Fluoreszenzmikroskopes und bei einer GOI von 10^1 keine Aufnahmen möglich gewesen wären.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Aphidicolin gut geeignet ist, um HeLa-Zellen in der G1/S-Phase zu arretieren. Aphidicolin-arretierte und mit AAV2 oder der PLA₂-Mutante transduzierte HeLa-Zellen zeigen eine höhere Anzahl transduzierter Zellen als nicht arretierte. Auch die MFI ist wesentlich höher. Die Stabilisierung der Kernmembran durch Aphidicolin inhibiert also nicht die Transgenexpression des AAV2 und der PLA₂-Mutante.

3.2.5 Die Stabilisierung der Kernmembran von HeLa-Zellen verhindert weder für AAV2 noch für die PLA₂-Mutante den Transport von Vektor DNA in den Zellkern

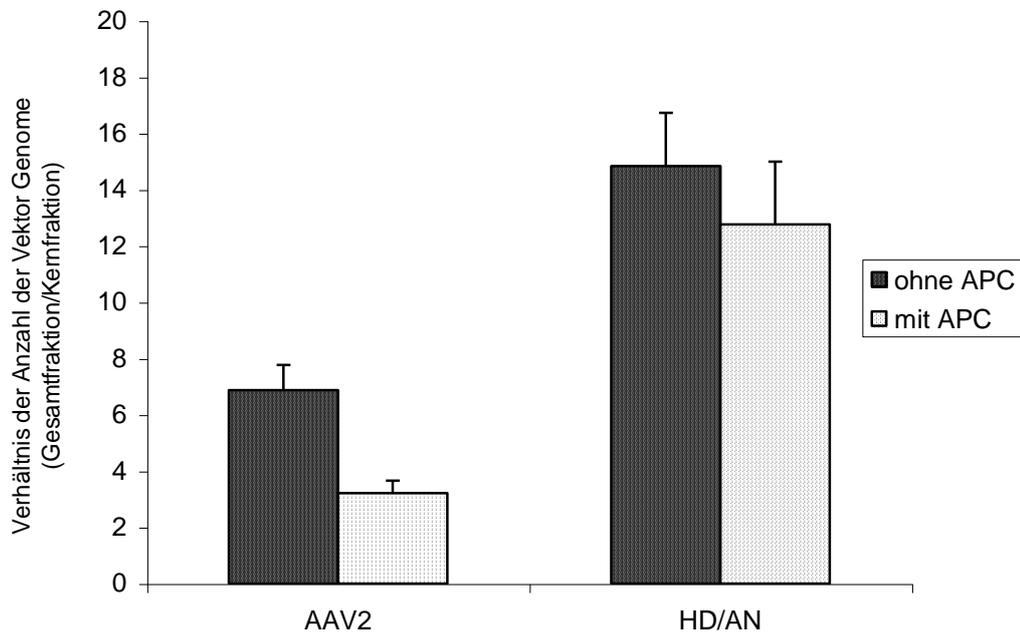
Im vorherigen Kapitel (3.2.4) wurde mittels Nachweis der Anzahl GFP-exprimierender Zellen bereits gezeigt, dass die Funktion der PLA₂ wahrscheinlich nicht für den Kerneintritt benötigt wird. Ein Nachweis der Vektor DNA im Zellkern von arretierten und nicht-arretierten Zellen soll diese Vermutung unterstützen.

Für dieses Experiment wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später für weitere 24h in Kulturmedium oder in Kulturmedium, das mit 5 µg/ml Aphidicolin versetzt war, gehalten. Dann wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Parallel wurden die Zellen mit AAV2 oder PLA₂-Mutante mit einer GOI 10² für 24h bei 37°C transduziert. Anschließend wurden die Zellen durch Abkratzen geerntet und von zwei gleichen Ansätzen einmal die Gesamt-DNA und einmal die Kern-DNA extrahiert. Die Vektor DNA wurde mittels quantitativer PCR analysiert. Der Abgleich der Gesamt-DNA-Menge erfolgte über die Detektion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Für diesen Versuch wurde die gleiche geringe GOI für beide Vektoren eingesetzt, um eine Vergleichbarkeit auf DNA-Ebene zu gewährleisten. Abbildung 3-14A zeigt die Auswertung dieses Versuches. In dieser Graphik ist die Vektor DNA in der gesamten Zelle ins Verhältnis zur Vektor DNA im Zellkern gesetzt worden, d.h. je höher der dargestellte Balken ist desto geringer ist der Anteil der Vektor DNA im Zellkern an der detektierten Vektor DNA Gesamt-Menge.

Vergleicht man den Anteil der viralen DNA im Zellkern in arretierten und AAV2 transduzierten mit nicht-arretierten und AAV2 transduzierten Zellen so nimmt der Anteil in arretierten Zellen zu (jedes 3,2te Genom zu jedem 6,9te Genom im Zellkern). Auch für Zellen die mit der PLA₂-Mutante transduziert worden sind konnte dieser Effekt beobachtet werden, wenngleich auch nicht so deutlich (jedes 14,9te Genom in nicht arretierten Zellen zu jedes 12,8te Genom in arretierten Zellen im Zellkern). Zudem kann man sagen, dass der Anteil der viralen DNA im Zellkern wie erwartet in mit AAV2 transduzierte Zellen deutlich höher ist als in Zellen, die mit der PLA₂-Mutante transduziert worden sind.

Diesem Ergebnis nach wird die PLA₂-Funktion nicht für den Kerneintritt benötigt, da der Anteil der viralen DNA im Zellkern sowohl für AAV2 als auch für die PLA₂-Mutante in Aphidicolin-arretierten HeLa-Zellen im Vergleich mit nicht arretierten Zellen nicht abnimmt, d.h. der Kerntransport nicht inhibiert ist.

(A)



(B)



Abb. 3-14: Detektierung von Vektor DNA im Zellkern von arretierten und nicht arretierten HeLa-Zellen.

(A) HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später für weitere 24h in Kulturmedium oder in Kulturmedium, das mit 5 μ g/ml Aphidicolin (APC) versetzt war, gehalten. Dann wurden die Zellen mit AAV2 oder der PLA₂-Mutante (HD/AN) mit einer GOI 10² für 24h bei 37°C transduziert. Anschließend wurden die Zellen durch Abkratzen geerntet und von zwei gleichen Ansätzen einmal die Gesamt-DNA und einmal die Kern-DNA extrahiert. Die Vektor DNA wurde mittels quantitativer PCR analysiert. Der Abgleich der Gesamt-DNA-Menge erfolgte über die Detektion von GAPDH. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM (n=3). Dargestellt ist in dieser Graphik das Verhältnis der Vektor DNA in der gesamten Zelle zur Vektor DNA im Zellkern. (B) Für den Reinheitsnachweis der Fraktionen wurden nicht arretierte und arretierte HeLa-Zellen verwendet. Die DNA bzw. die Proteine aus der Gesamt-Fraktion (T), der Kern-Fraktion (N) und der zytoplasmatischen Fraktion (C) wurden isoliert. Die DNA-Fraktionen wurden mittels PCR auf das Vorkommen von GAPDH untersucht. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen ((B) obere Reihe). Die Proteinfractionen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Westernblot das Vorhandensein von β -Tubulin detektiert ((B) untere Reihe).

Ein Reinheitsnachweis der Kernfraktion wurde durchgeführt, um zytoplasmatische Kontaminationen in dieser auszuschließen. Dieser Nachweis ist in Abbildung 3-14B dargestellt. Für diesen Nachweis wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später für 48h in normalem Kulturmedium oder in Kulturmedium mit 5 µg/ml Aphidicolin gehalten. Diese Zellen wurden dann durch Abkratzen gelöst und aus ihnen wurde anschließend entweder DNA oder Protein extrahiert, wobei Gesamtextrakte (T), Kernextrakte (N) und zytoplasmatische Extrakte (C) gewonnen wurden.

Die DNA-Fractionen wurden mittels PCR auf das Vorkommen von GAPDH untersucht. Abbildung 3-14B oben zeigt die PCR-Produkte aufgetrennt in einem Agarose-Gel. Da sich das GAPDH-Gen nur in der DNA des Zellkerns findet, sollte dieses auch nur in den Gesamt-DNA-Fractionen und den Kernfraktionen nachweisbar sein, wie dieser Reinheitsnachweis zeigt. Tatsächlich zeigen sich deutliche Banden bei den Gesamtfractionen (T) und Kernfraktionen (N), wobei die Banden der Fractionen aus Aphidicolin-arretierten Zellen etwas schwächer sind. Die zytoplasmatische Fraction (C) der arretierten Zellen zeigt keine Bande, allerdings ist in der zytoplasmatischen Fraction der nicht arretierten HeLa-Zellen eine sehr schwache Bande zu erkennen, die wahrscheinlich auf wenige geplatzte Kerne während der Fractionierung zurückzuführen ist.

Die Proteinfractionen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Westernblot auf das Vorhandensein von β -Tubulin untersucht (Abb. 3-14B unten). β -Tubulin ist ein zytoplasmatisches Protein und sollte daher nur in den Gesamtfractionen und in den zytoplasmatischen Fractionen nachweisbar sein. Tatsächlich konnte nur in den Gesamt-Protein-Fractionen (T) und in den zytoplasmatischen Fractionen (C) nicht arretierter und Aphidicolin-arretierter HeLa-Zellen β -Tubulin nachgewiesen werden, nicht aber in den Kernfraktionen (N). Insgesamt kann man aus diesen Ergebnissen schließen, dass die Kernfraktion frei von zytoplasmatischen Kontaminationen ist.

3.2.6 Brefeldin A induziert einen dramatischen Abfall in der Anzahl GFP-exprimierender Zellen in AAV2 und mit der PLA₂-Mutante transduzierten HeLa-Zellen

Es ist bekannt, dass AAV2 mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in Clathrin-bedeckten Vesikeln in die Zelle internalisiert und in Endosomen transportiert wird (Bartlett et al., 2000; Douar et al., 2001; Duan et al., 2000). Brefeldin A (BFA) unterbindet die Transition von frühen zu späten Endosomen. Da bekannt ist, dass dieses die Genexpression des AAV2 inhibiert, ist dieser Effekt bei einem Transport der PLA₂-Mutante durch frühe und späte

Endosomen auch für diese zu erwarten. Ein solcher Effekt kann jedoch nur deutlich gezeigt werden, wenn die Menge an GFP-exprimierenden Zellen der Mutante ohne BFA bereits eine Höhe aufweist, von der eine Reduktion überhaupt nachgewiesen werden kann. Für diesen Zweck wurde Aphidicolin eingesetzt, von dem gezeigt worden ist, dass es durch Arretierung des Zellzyklus in der G1/S-Phase eine Steigerung der Expressionshöhe hervorruft (3.2.4).

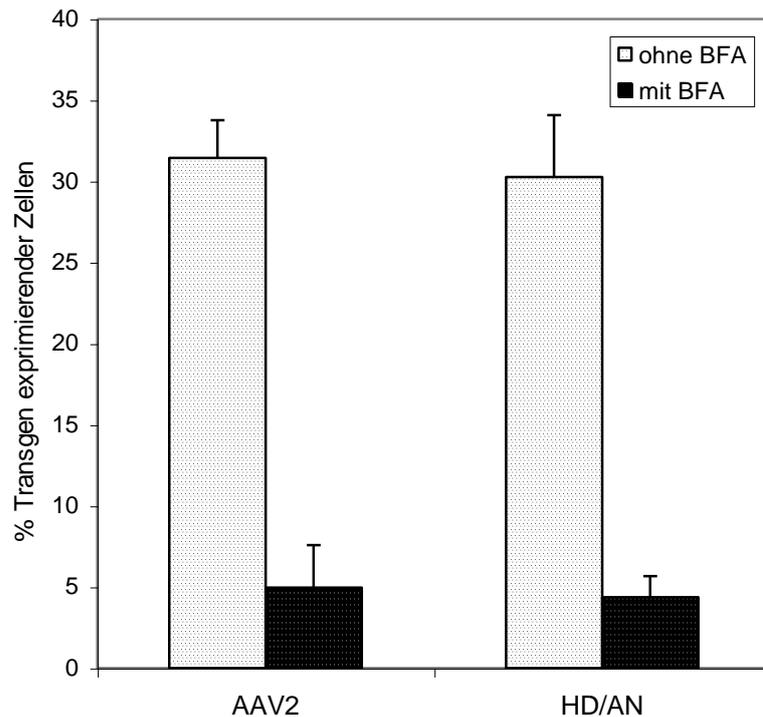


Abb. 3-15: Einfluss von Brefeldin A (BFA) auf die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in mit AAV2 oder der PLA₂-Mutante (HD/AN) transduzierten HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später für 24h in Kulturmedium mit Aphidicolin (5 µg/ml) inkubiert. Dann wurden die Zellen 15 min mit oder ohne BFA (5 µg/ml) in Aphidicolin-haltigem Kulturmedium präinkubiert und anschließend mit AAV2 (GOI 10¹) oder PLA₂-Mutante (GOI 2x10⁵) transduziert. 4h p.t. wurden die Zellen mit PBS gewaschen und weitere 20h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen mittels FACS analysiert. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM (n=3).

Für diesen Versuch wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später für weitere 24h in Kulturmedium mit Aphidicolin (5 µg/ml) inkubiert. Dann wurden die Zellen 15 min mit oder ohne BFA (5 µg/ml) in Aphidicolin-haltigem Kulturmedium präinkubiert und anschließend mit AAV2 (GOI 10¹) oder PLA₂-Mutante (GOI 2x10⁵) transduziert, um etwa dieselbe Menge an Transgen-exprimierenden Zellen zu erreichen (3.2.3). 4h p.t. wurden die Zellen mit PBS gewaschen und weitere 20h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet

und mittels FACS analysiert (Abb. 3-15). AAV2 und die PLA₂-Mutante zeigen ohne BFA einen Anteil von GFP-exprimierenden Zellen von 31,4% bzw. 30,3% (Abb. 3-15 helle Balken). Dieser Anteil sinkt bei Behandlung der Zellen mit BFA drastisch ab, sowohl in AAV2 transduzierten Zellen (4,9%) als auch in solchen, die mit der PLA₂-Mutante transduziert worden sind (4,4%) (Abb. 3-15 dunkle Balken). Die Transition von frühen zu späten Endosomen scheint also sowohl für AAV2 als auch für die PLA₂-Mutante eine wichtige Rolle im Infektionsverlauf zu spielen. Man kann also daraus schließen, dass beide durch frühe und späte Endosomen transportiert werden.

3.2.7 Bafilomycin A1 verursacht für AAV2 und die PLA₂-Mutante eine dramatische Reduktion der Anzahl Transgen-exprimierender Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl AAV2 als auch die PLA₂-Mutante in späte Endosomen transportiert werden. In diesen sinkt der pH-Wert ab. Diese Ansäuerung wird durch die Protonenpumpe V-ATPase induziert. Diese Protonenpumpe kann durch Bafilomycin A1 (BAF) inhibiert werden. Wie Brefeldin A verhindert auch BAF eine effiziente Transgenexpression in AAV2 transduzierten HeLa-Zellen. Da BAF also auch einen inhibierenden Einfluss auf die Transgenexpression der PLA₂-Mutante haben könnte, wurde wie im Experiment mit Brefeldin A (3.2.6) zunächst die Höhe Transgen-exprimierender Zellen durch die Arretierung der Zellen mit Aphidicolin angehoben.

Für den Versuch wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später für weitere 24h in Kulturmedium mit Aphidicolin (5 µg/ml) inkubiert. Dann wurden die Zellen 30 min mit oder ohne BAF (100 nM) in Aphidicolin-haltigem Kulturmedium präinkubiert und anschließend mit AAV2 (GOI 10²) oder PLA₂-Mutante (GOI 2x10⁵) transduziert und für weitere 24h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen mittels FACS analysiert (Abb. 3-16). AAV2 weist ohne Bafilomycin einen Anteil Transgen-exprimierender Zellen von 87,9% auf, der Anteil der PLA₂-Mutante beträgt 54,3% (Abb. 3-16 helle Balken). Werden die Zellen mit Bafilomycin A1 behandelt, sinkt die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen drastisch ab, sowohl in AAV2 transduzierten Zellen (15,7%) als auch in solchen, die mit der PLA₂-Mutante transduziert worden sind (11,4%) (Abb. 3-16 dunkle Balken). Da bei Verhinderung der Ansäuerung später Endosomen durch Bafilomycin A1 sowohl für AAV2 als auch für die PLA₂-Mutante eine deutliche Reduktion in der Anzahl Transgen-exprimierender Zellen beobachtet werden konnte, kann man schließen, dass dieser Schritt für beide Vektoren ein wichtiger Faktor bei der Transduktion von HeLa-Zellen ist.

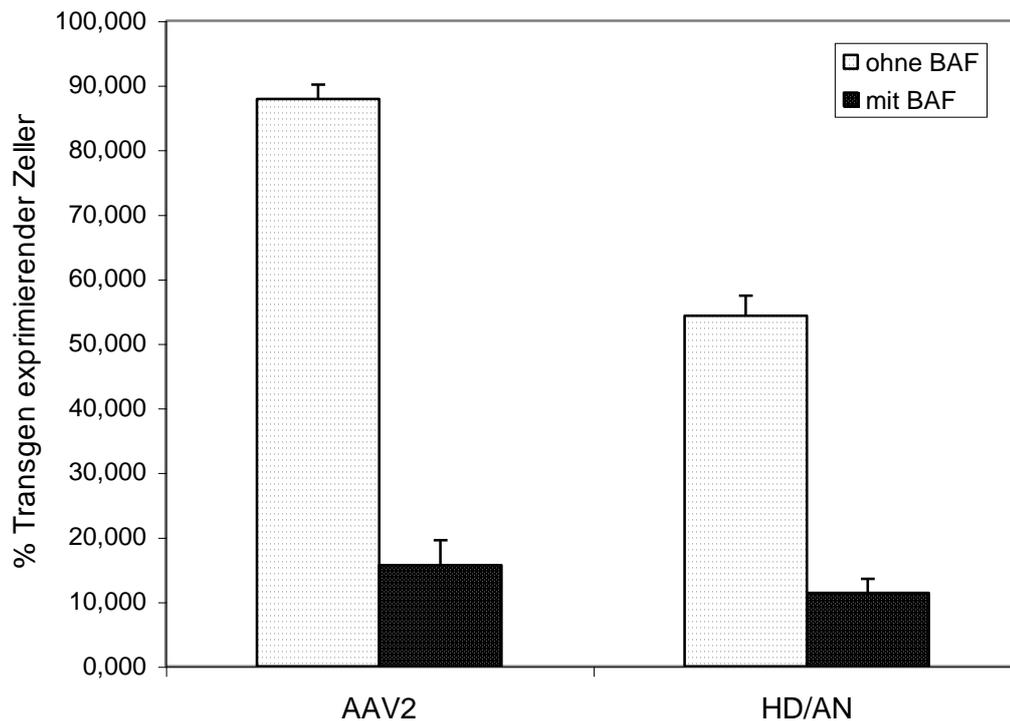


Abb. 3-16: Einfluss von Bafilomycin A1 (BAF) auf die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in mit AAV2 oder der PLA₂-Mutante (HD/AN) transduzierten HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später für 24h in Kulturmedium mit Aphidicolin (5 µg/ml) inkubiert. Dann wurden die Zellen 30 min mit oder ohne BAF (100 nM) in Aphidicolin-haltigem Kulturmedium präinkubiert und anschließend mit AAV2 (GOI 10¹) oder PLA₂-Mutante (GOI 2x10⁵) transduziert und für 24h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Anzahl GFP-exprimierender Zellen mittels FACS analysiert. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3).

3.2.8 Koinfektionen mit Adenoviren beeinflussen die Anzahl GFP-exprimierender Zellen in mit AAV2 bzw. der PLA₂-Mutante transduzierten HeLa-Zellen

Das Adenovirus (Ad) fungiert als Helfervirus von AAV, das allein nicht in der Lage ist, sich selbst zu replizieren. Für diesen Schritt werden die adenoviralen Genprodukte E2A, E4 und VA benötigt (Xiao et al., 1998). Ob noch weitere Komponenten des Adenovirus einen Helfereffekt ausüben, ist noch nicht geklärt. In den folgenden Experimenten habe ich den endosomolytischen Effekt von Adenoviren ausgenutzt, um den aufgrund der fehlenden PLA₂-Aktivität möglicherweise in den Endosomen akkumulierten PLA₂-Mutanten den Übertritt in das Zytoplasma zu ermöglichen.

3.2.8.1 Koinfektion mit Adenovirus 5 Wildtyp steigert die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in mit AAV2 oder der PLA₂-Mutante transduzierten HeLa-Zellen

Es soll überprüft werden, ob eine Koinfektion von AAV2 und PLA₂-Mutante mit Adenovirus 5 Wildtyp (Ad5 wt) einen Effekt auf die Anzahl Transgen-exprimierender HeLa-Zellen hat.

Dafür wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später mit steigenden Mengen an Ad5 wt und AAV2 (GOI 10¹) oder PLA₂-Mutante (GOI 2 x 10⁵) koinfiziert. Die Koinfektion erfolgte für 24h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels FACS hinsichtlich der GFP-exprimierenden Zellen analysiert (Abb. 3-17).

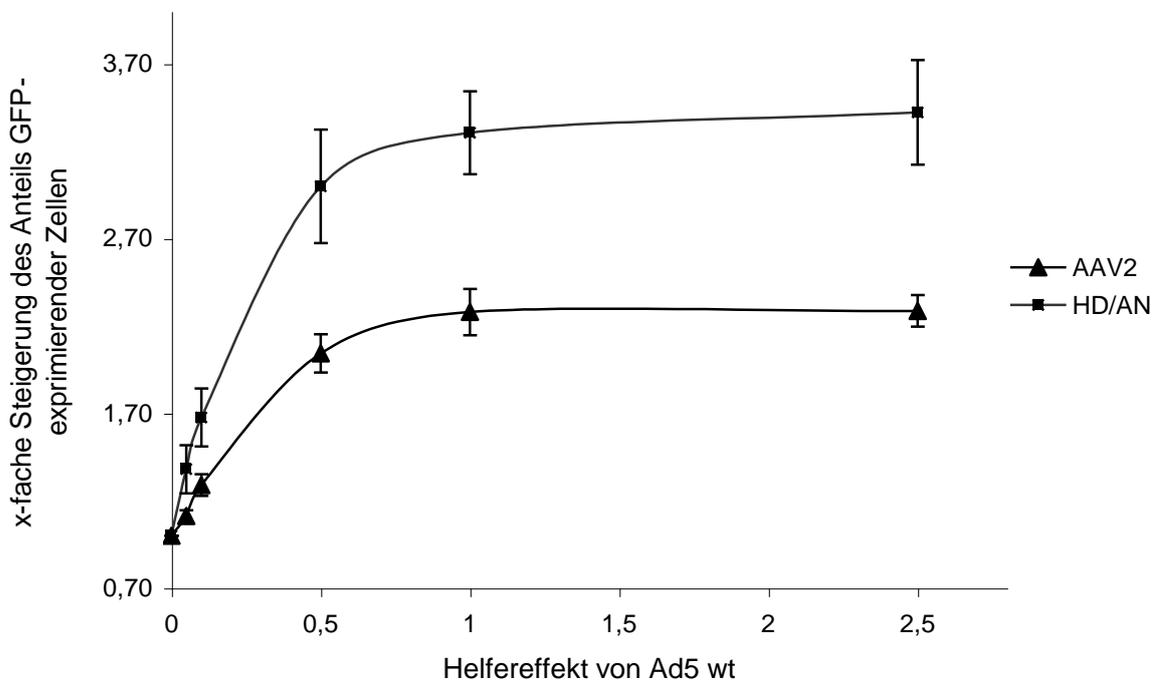


Abb. 3-17: Steigerung der Anzahl GFP-exprimierender Zellen nach Koinfektion des AAV2 oder der PLA₂-Mutante (HD/AN) mit Adenovirus 5 Wildtyp (Ad5 wt) in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später mit steigenden Mengen Ad5 wt und AAV2 (GOI 10¹) oder PLA₂-Mutante (GOI 2 x 10⁵) koinfiziert. Die Koinfektion erfolgte für 24h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels FACS analysiert. Die Steigerung der GFP-exprimierenden Zellen ist in einer dosisabhängigen Kurve dargestellt, wobei die Werte der AAV2-transduzierten Zellen mit Dreiecken und die der PLA₂-Mutante mit Quadraten gekennzeichnet sind. In der Graphik ist auf der Y-Achse die Steigerung der Anzahl GFP-exprimierender Zellen angegeben, wobei die Transduktion von AAV2 oder PLA₂-Mutante ohne Ad5 wt als 1 festgelegt wurde. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM (n=3).

In Abbildung 3-17 ist der Anteil Transgen-exprimierender Zellen in einer dosisabhängigen Kurve dargestellt, wobei die Werte der AAV2-transduzierten Zellen mit Dreiecken und die der PLA₂-Mutante mit Quadraten gekennzeichnet sind. In der Graphik ist auf der Y-Achse die Steigerung der Anzahl GFP-exprimierender Zellen angegeben, wobei die Transduktion von AAV2 oder PLA₂-Mutante ohne Ad5 wt als 1 festgelegt wurde. Man sieht deutlich, dass die Koinfektion von AAV2 bzw. PLA₂-Mutante mit Ad5 wt zu einer Steigerung der Anzahl GFP-exprimierender Zellen führte. Diese Steigerung ist dosisabhängig und auffallend stärker in Zellen, die mit der PLA₂-Mutante transduziert worden sind. Es konnte für AAV2 eine Steigerung der Anzahl GFP-exprimierender Zellen von maximal 2.3fach (2.5 µl) beobachtet werden, während die Steigerung für der PLA₂-Mutante bei 3.4fach (2.5 µl) lag. Steigerungen der Anzahl GFP-exprimierender Zellen konnten schon bei Koinfektion mit der geringsten Dosis Ad5 wt (0.05 µl) detektiert werden, und zwar eine 1.1fache Steigerung bei AAV2 und eine 1.4fache Steigerung bei der PLA₂-Mutante. Bei weiterer Erhöhung der Ad5 wt Dosis konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Steigerung gezeigt werden, sowohl für AAV2 (1.3fach durch 0.1 µl; 2.0fach durch 0.5 µl) als auch für die PLA₂-Mutante (1.7fach durch 0.1 µl; 3.0fach durch 0.5 µl). Ab einer Dosis von 1µl konnte bei beiden Vektoren ein Sättigungseffekt beobachtet werden (2.3fach für AAV2; 3.3fach für die PLA₂-Mutante). Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Koinfektion mit Ad5 wt sowohl für AAV2 als auch für die PLA₂-Mutante eine Erhöhung der Anzahl Transgen-exprimierender Zellen bewirkt, dass dieser Effekt jedoch für die Mutante noch deutlicher ist.

3.2.8.2 Kotransduktion mit rekombinantem Adenovirus 5 steigert die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in mit der PLA₂-Mutante, aber nicht in AAV2 transduzierten HeLa-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass die Koinfektion mit Ad5 wt zu einer deutlichen Steigerung der Anzahl GFP-exprimierender Zellen in mit AAV2 oder der PLA₂-Mutante transduzierten Ansätzen führt (3.2.8.1). Ad5 wt weist zwei mögliche Faktoren auf, die für diesen Effekt verantwortlich sein können, zum einen die adenoviralen Gene, von denen gezeigt werden konnte, dass diese die Expression von AAV2 Vektoren steigern können (Ferrari et al., 1996; Fisher et al., 1996; Trahair et al., 2000). Zum anderen weist das adenovirale Kapsid eine endosmolytische Funktion auf (Blumenthal et al., 1986; Prchla et al., 1995). Da bei einer Koinfektion mit Ad5 wt nicht zwischen diesen beiden Faktoren unterschieden werden kann, wurde eine Kotransduktion mit einem rekombinanten Adenovirus 5 (Ad5 rec) durchgeführt werden. Dieser Vektor weist keine adenoviralen Gene mehr auf, so dass ein möglicher Effekt auf die Funktion des Kapsides eingegrenzt werden kann.

Für dieses Experiment wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später mit Ad5 rec und AAV2 (GOI 10^1) oder PLA₂-Mutante (GOI 2×10^5) kotransduziert. Für die Kotransduktion mit Ad5 rec wurden verschiedene Mengen an infektiösen Partikeln (IP) pro Zelle eingesetzt (20, 50, 100, 150, 200 IP / Zelle). Die Kotransduktion erfolgte für 24h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels FACS analysiert (Abb. 3-18). In Abbildung 3-18 ist die Steigerung der Anzahl GFP-exprimierender Zellen in einer dosisabhängigen Kurve dargestellt, wobei die Werte der AAV2-transduzierten Zellen mit Dreiecken und die der PLA₂-Mutante mit Quadraten gekennzeichnet sind. In der Graphik ist auf der Y-Achse die Steigerung der Anzahl GFP-exprimierender Zellen angegeben, wobei die Transduktion von AAV2 oder PLA₂-Mutante ohne Ad5 rec als 1 festgelegt wurde.

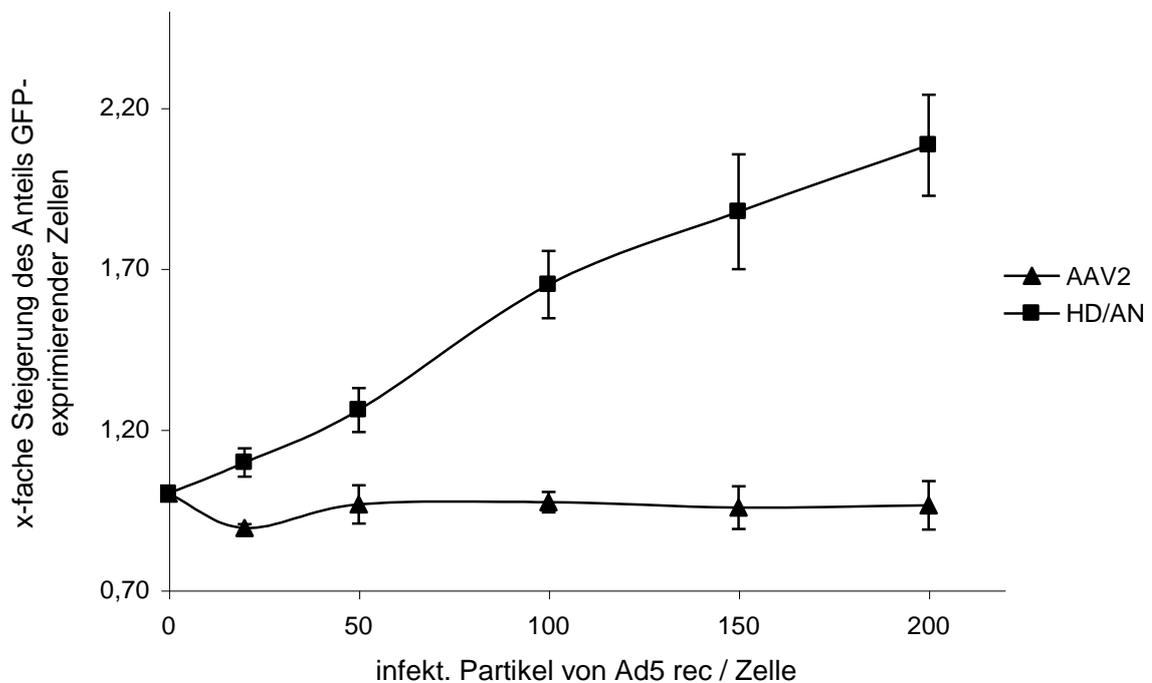


Abb. 3-18: Transgenexpression von AAV2 und PLA₂-Mutante (HD/AN) nach Kotransduktion mit rekombinantem Adenovirus 5 (Ad5 rec) in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später mit Ad5 rec und AAV2 (GOI 10^1) oder PLA₂-Mutante (GOI 2×10^5) kotransduziert. Die Kotransduktion mit Ad5 rec erfolgte mit verschiedenen infektiösen Partikeln (IP) / Zelle (20, 50, 100, 150, 200 IP / Zelle). Die Kotransduktion erfolgte für 24h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels FACS analysiert. Die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen ist in einer dosisabhängigen Kurve dargestellt, wobei die Werte der AAV2-transduzierten Zellen mit Dreiecken und die der PLA₂-Mutante mit Quadraten gekennzeichnet sind. In der Graphik ist auf der Y-Achse die Steigerung des Anteils GFP-exprimierender Zellen angegeben, wobei die Transduktion von AAV2 oder PLA₂-Mutante ohne Ad5 rec als 1 festgelegt wurde. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM (n=3).

Die Kotransduktion der PLA₂-Mutante mit Ad5 rec führt zu einer deutlichen Steigerung der Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen. Dieser Anstieg ist wie bei der Kotransduktion mit Ad5 wt dosisabhängig, wobei mit der höchsten eingesetzten Menge (200 IP / Zelle) eine Steigerung um das 2.1fache erreicht wurde. Eine Sättigung wurde bei den eingesetzten Partikeln nicht erzielt. Der Anstieg des Anteils GFP-exprimierender Zellen beginnt bereits bei der niedrigsten eingesetzten Dosis (20 IP / Zelle; 1.1fache Steigerung) und steigert sich mit zunehmender Menge (1.3facher Anstieg durch 50 IP / Zelle; 1.7fach durch 100 IP / Zelle; 1.9fach durch 150 IP / Zelle). Im Gegensatz dazu konnte bei der Kotransduktion des AAV2 mit Ad5 rec keine Erhöhung des Anteils Transgen-exprimierender Zellen festgestellt werden. Die ermittelten Werte lagen sogar noch etwas unter denen, die ohne Ad5 rec Kotransduktion erzielt wurden (0.89fach durch 20 IP / Zelle; 0.97facher Anstieg durch 50 IP / Zelle; 0.97fach durch 100 IP / Zelle; 0.96fach durch 150 IP / Zelle; 0.96fach durch 200 IP / Zelle). Daher kann man zusammenfassend sagen, dass die Kotransduktion mit Ad5 rec nur eine Steigerung des Anteils der GFP-exprimierenden Zellen in mit der PLA₂-Mutante transduzierten Ansätzen hervorruft, jedoch keine Erhöhung in AAV2 transduzierten Zellen induziert. Die Funktion des adenoviralen Kapsids scheint daher nur für die Transduktion der PLA₂-Mutante von entscheidender Bedeutung zu sein.

3.2.8.3 Die Koinfektion mit Adenovirus 2 ts-1 hat keinen Einfluss auf die Menge Transgen-exprimierender Zellen in AAV2 und mit der PLA₂-Mutante transduzierten HeLa-Zellen

Die Kotransduktionen von AAV2 und PLA₂-Mutante (3.2.8.2) lassen den Schluss zu, dass der endosmyolitische Effekt des adenoviralen Kapsids ausreicht, um die fehlende PLA₂-Funktion der Mutante zu ersetzen. Um diese Theorie zu untermauern, sollte nun eine Kotransduktion mit einem Adenovirus durchgeführt werden, das nicht mehr in der Lage ist, die Endosomen zu lysieren. Bei diesem Virus handelt es sich um die Adenovirus 2 Temperatur-sensitive Mutante (Ad2 ts-1) (Greber et al., 1996; Weber, 1976). Ad2 und Ad5 gehören beide dem Genus Mastadenovirus und dem Subgenus C an und sind hinsichtlich der Infektionsbiologie vergleichbar. Beide sind als gleichwertige AAV-Helferviren beschrieben.

Für dieses Experiment wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später mit Ad5 rec bzw. Ad2 ts-1 und AAV2 (GOI 10¹) oder PLA₂-Mutante (GOI 2 x 10⁵) koinfiziert. Für die Kotransduktion mit Ad5 rec wurden 200 infektiöse Partikel (IP) pro Zelle eingesetzt. Die Kotransduktion mit Ad2 ts-1 erfolgte mit 200 Partikeln / Zelle. Die Transduktion erfolgte für 24h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels FACS analysiert (Abb. 3-19).

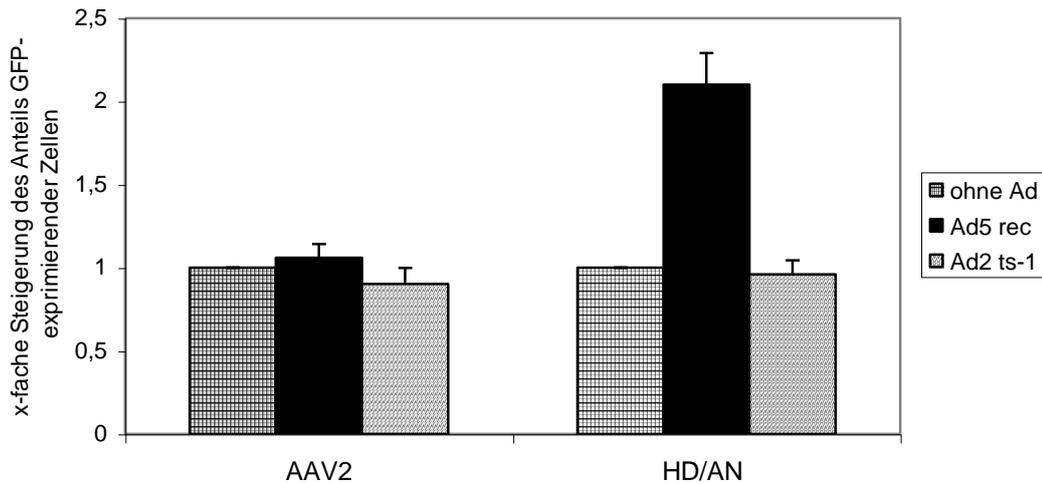


Abb. 3-19: Steigerung des Anteils GFP-exprimierender Zellen in mit AAV2 oder der PLA₂-Mutante (HD/AN) transduzierten HeLa-Zellen nach Kotransduktion mit rekombinantem Adenovirus 5 (Ad5 rec) bzw. der Adenovirus 2 Temperatur-sensitiven Mutante (Ad2 ts-1).

HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später mit Ad5 rec bzw. Ad2 ts-1 und AAV2 (GOI 10¹) oder PLA₂-Mutante (GOI 2 x 10⁵) kotransduziert. Für die Kotransduktion mit Ad5 rec wurden 200 infektiöse Partikel pro Zelle eingesetzt. Die Kotransduktion mit Ad2 ts-1 erfolgte mit 200 Partikeln / Zelle. Die Transduktion erfolgte für 24h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels FACS analysiert. In der Graphik ist auf der Y-Achse die Steigerung des Anteils GFP-exprimierender Zellen angegeben, wobei die Transduktion von AAV2 oder PLA₂-Mutante ohne Ad-Kotransduktion als 1 festgelegt wurde. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3).

In der Graphik ist auf der Y-Achse die Steigerung des Anteils GFP-exprimierender Zellen angegeben, wobei die Transduktion von AAV2 und PLA₂-Mutante ohne Adenovirus-Kotransduktion jeweils auf 1 gesetzt wurde. Für AAV2 kann im Fall einer Kotransduktion mit Ad5 rec nur eine Steigerung des Anteils GFP-exprimierender Zellen von 1.06fach detektiert werden, während im Fall einer Cotransduktion mit Ad2 ts-1 dieser sogar noch abnimmt (0.9fach). Die Kotransduktion der PLA₂-Mutante mit Ad5 rec führt zu einer deutlichen Steigerung des Anteils Transgen-exprimierender Zellen (2.1fach), wie sie bereits im vorangegangenen Versuch beobachtet werden konnte (3.2.8.2). Die Kotransduktion der PLA₂-Mutante mit Ad2 ts-1 hingegen führte zu keinem Effekt (0.96fach). Zusammenfassend kann man daher sagen, dass keines der in diesem Experiment eingesetzten Adenoviren einen Effekt auf die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in AAV2 transduzierten Ansätzen hat, wohingegen Ad5 rec eine deutliche Steigerung in mit der PLA₂-Mutante transduzierten Zellen hervorruft, nicht aber Ad2 ts-1.

3.2.8.4 Visualisierung der Koinfektion von AAV2 und PLA₂-Mutante mit Adenovirus 5 in HeLa-Zellen

Es soll untersucht werden, wie das Adenovirus 5 und AAV2 bzw. die PLA₂-Mutante während einer Koinfektion intrazellulär lokalisiert sind. Für dieses Experiment wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später mit AAV2 oder PLA₂-Mutante (10^5 Kapsiden / Zelle) mit 10^4 Partikeln / Zelle des Alexa488-markiertem Adenovirus 5 (Ad5-Alexa488) für 30 min bei 37°C koinfiziert. Sowohl AAV2 als auch die PLA₂-Mutante weisen ein wt-Genom auf. Um eine zeitgleiche Internalisierung zu gewährleisten, wurde die Infektion vor der Inkubation bei 37°C zunächst für 30 min auf Eis durchgeführt. Im Anschluss an die Infektion wurden die Zellen fixiert und das AAV-Kapsid mit dem kapsidspezifischen Antikörper A20 gefärbt. Die Kernlamina wurde mit einem anti-LaminB Antikörper visualisiert.

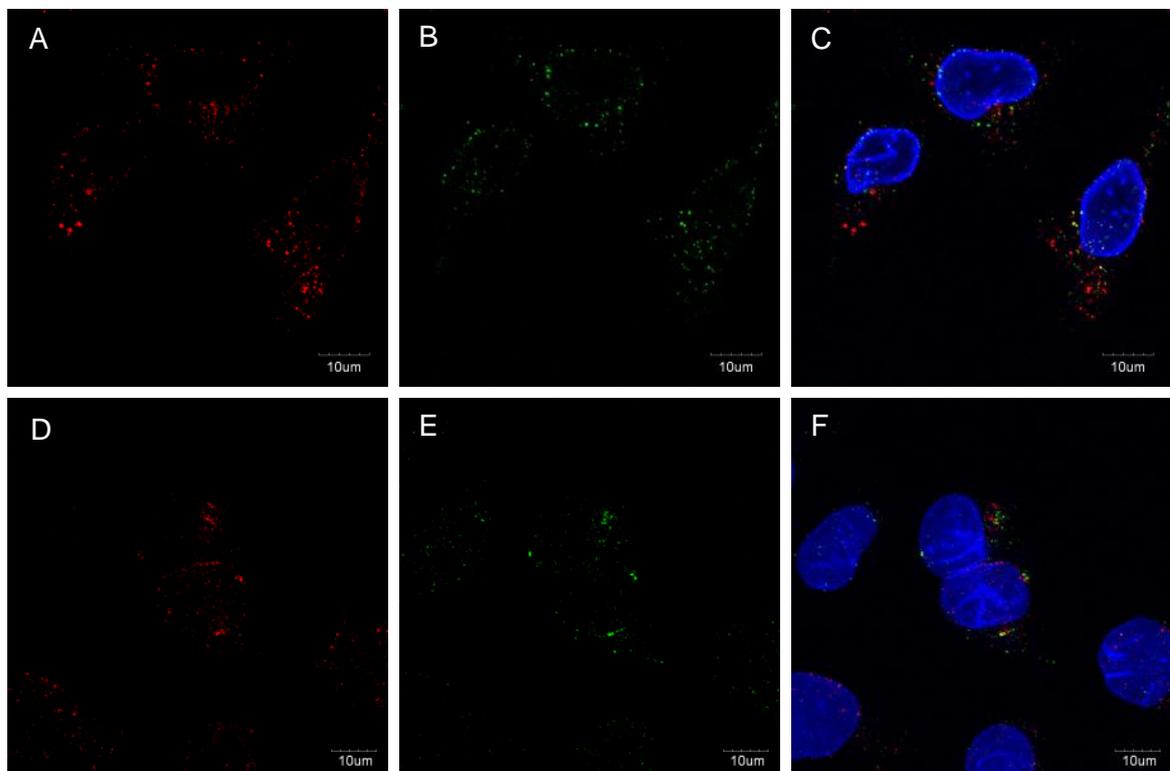


Abb. 3-20: Koinfektion von AAV2 oder PLA₂-Mutante mit Alexa488-markiertem Adenovirus 5.

HeLa-Zellen wurden ausgesät, 24h später mit AAV2 und Alexa488-markiertem Adenovirus 5 (Ad5-Alexa488) (A - C) oder PLA₂-Mutante und Ad5-Alexa488 (D - F) für 30 min koinfiziert, wobei für AAV 10^5 Kapside / Zelle und für Ad5-Alex488 10^4 Partikel / Zelle eingesetzt wurden. Anschließend wurden die Zellen fixiert. Die Färbung des AAV Kapsids erfolgte mit A20, einem kapsidspezifischen Antikörper (RRX-konjugierter anti-Maus Sekundäntikörper; rot). In allen Ansätzen wurde die Kernlamina mit einem anti-LaminB Antikörper gefärbt (Cy5-konjugierter anti-Ziege Sekundäntikörper; blau). (A) zeigt die Signale des A20-detektierten AAV2 Kapsids. (D) zeigt die Signale des A20-detektierten Kapsids der PLA₂-Mutante. (B) und (E) zeigen die Alexa488-Signale des markierten Ad5-Kapsids (grün). (C) und (F) zeigen die Überlagerungen von (A) und (B) bzw. (D) und (E) und die Färbung der Kernlamina.

In Abbildung 3-20 ist die Koinfektion von AAV2 und Ad5-Alexa488 (obere Reihe) und von PLA₂-Mutante und Ad5-Alexa488 (untere Reihe) dargestellt. Bei einer Koinfektion von AAV2 (rot) und Ad5-Alexa488 (grün) kann nur teilweise eine Kolokalisation (gelb) der jeweiligen Signale detektiert werden. Die Mehrheit der Signale liegen zwar in denselben Regionen, zeigen jedoch keine genaue Übereinstimmung in ihrer Lokalität (Abb. 3-20C). Ein sehr ähnliches Bild zeichnet sich für die Koinfektion von PLA₂-Mutante (rot) und Ad5-Alexa488 (grün) (Abb. 3-20D-F). Auch hier kann man nur einige Bereiche entdecken, in denen eine Kolokalisation beider Viren zu erkennen ist (F; gelb).

Zusammenfassend kann man daher sagen, dass die intrazelluläre Lokalisierung des AAV2 bzw. der PLA₂-Mutante zwar teilweise jedoch nicht immer der Lokalisierung des Ad5 entspricht.

3.2.9 Proteasomeninhibitor MG132 und rekombinantes Adenovirus 5 steigern die Anzahl GFP-exprimierender Zellen in mit der PLA₂-Mutante transduzierten HeLa-Zellen in additiver Weise

Um zu überprüfen, ob AAV2 und PLA₂-Mutante Ziel proteasomalen Abbaus sind, sollte der Effekt des Proteasomeninhibitors MG132 auf die Transgenexpression untersucht werden. Es sollte zudem ermittelt werden, ob MG132 und Ad additiv wirken können.

Für dieses Experiment wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später mit AAV2 (GOI 10¹) oder PLA₂-Mutante (GOI 2 x 10⁵) transduziert. Weitere Ansätze wurden zusätzlich zur Transduktion mit MG132 (10µM) inkubiert und/oder mit Ad5 rec (200 infektiöse Partikel / Zelle) kotransduziert. Bei MG132 behandelten Ansätzen wurden die Zellen vor der Transduktion 15 min mit diesem präinkubiert. Alle Ansätze wurden 4h p.t. gewaschen und in Kulturmedium für weitere 20h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels FACS analysiert (Abb. 3-21). In der Abbildung ist auf der Y-Achse die Steigerung des Anteils GFP-exprimierender Zellen angegeben, wobei die Transduktion von AAV2 und PLA₂-Mutante ohne weitere Faktoren jeweils auf 1 gesetzt wurde.

Die Kotransduktion von AAV2 und Ad5 rec führt zu einer 1.1fachen Erhöhung des Anteils Transgen-exprimierender Zellen, während die Behandlung der Zellen mit MG132 eine 1.7fache Steigerung bewirkt. Beide Faktoren zusammen verursachen keine weitere Erhöhung als die, die bei der Behandlung der Zellen mit MG132 beobachtet werden konnte (1.6fach). Die Kotransduktion von PLA₂-Mutante und Ad5 rec hingegen steigert den Anteil GFP-exprimierender Zellen um das 1.7fache. Die MG132-Behandlung von mit der PLA₂-Mutante transduzierten Zellen steigert diesen Anteil noch wesentlich deutlicher (4.1fach). Der

Anteil GFP-exprimierender Zellen erhöht sich noch weiter, wenn zusätzlich zur Behandlung mit MG132 eine Kotransduktion mit Ad5 rec durchgeführt wird (5fach).

Zusammenfassend kann man daher sagen, dass nur für die Kotransduktion der PLA₂-Mutante mit Ad5 rec eine deutliche Steigerung der GFP-exprimierenden Zellen detektiert werden kann, nicht aber für Kotransduktion von AAV2 und Ad5 rec. Die Behandlung von Zellen mit MG132 führt sowohl bei Transduktionen von Zellen mit PLA₂-Mutante als auch mit AAV2 zu einer Erhöhung der Anzahl Transgen-exprimierender Zellen, wenn auch ein deutlicherer Effekt in Zellen zu beobachten ist, die mit der Mutante transduziert worden sind. Der Einsatz beider Faktoren kann den Anteil GFP-exprimierender Zellen in AAV2 transduzierten Ansätzen keine nicht über den durch MG132 beobachteten Effekt hinaus erhöhen. Beide Faktoren zusammen führen hingegen bei Zellen, die mit der PLA₂-Mutante transduziert worden sind, in additiver Weise zu einer Steigerung Transgen-exprimierender Zellen.

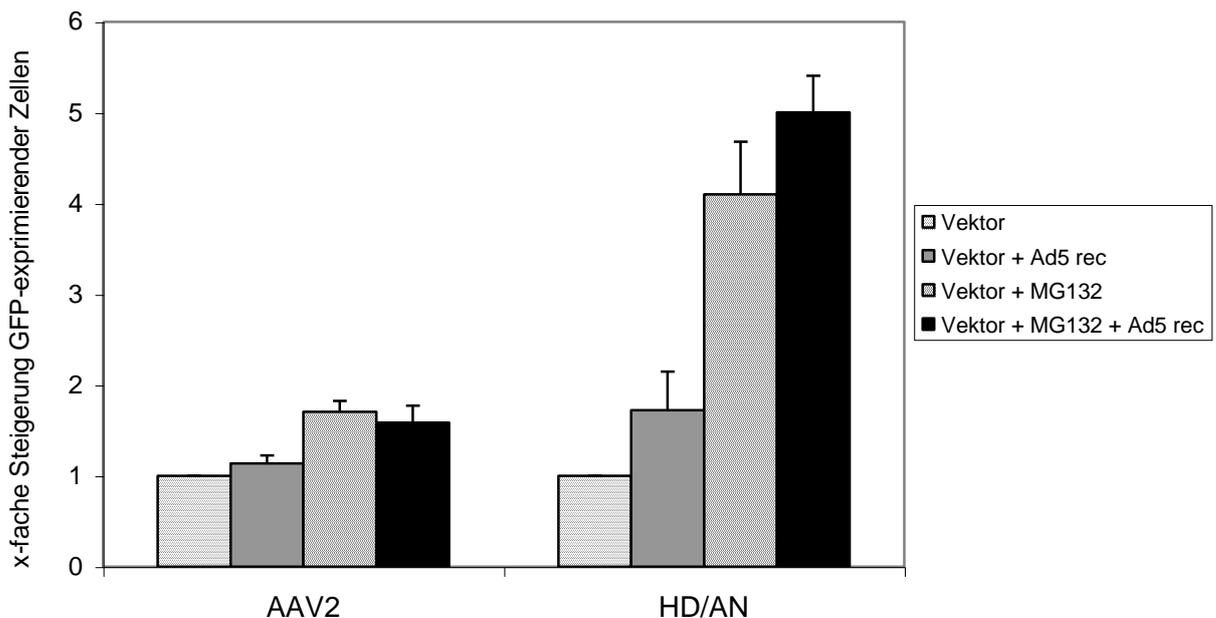


Abb. 3-21: Effekt von MG132 und Kotransduktion mit rekombinantem Adenovirus 5 auf die Transgenexpression von AAV2 und mit der PLA₂-Mutante transduzierten HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später mit AAV2 (GOI 10¹) oder PLA₂-Mutante (GOI 2 x 10⁵) transduziert. Weitere Ansätze wurden zusätzlich zur Transduktion mit MG132 (10µM) inkubiert oder mit Ad5 rec (200 infektiöse Partikel / Zelle) kotransduziert oder mit beidem. Bei MG132 behandelten Ansätzen wurden die Zellen vor der Transduktion 15 min mit diesem präinkubiert. Alle Ansätze wurden 4h p.t. gewaschen und in Kulturmedium für weitere 20h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels FACS analysiert. In der Abbildung ist auf der Y-Achse die Steigerung Transgen-exprimierender Zellen angegeben, wobei die Transduktion von AAV2 und PLA₂-Mutante ohne weitere Faktoren jeweils auf 1 gesetzt wurde. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3).

3.2.10 Die Koinfektion der PLA₂-Mutante mit AAV2wt führt zu keiner signifikanten Erhöhung des Anteils Transgen-exprimierender Zellen

AAV2wt weist im Gegensatz zur PLA₂-Mutante eine funktionale Phospholipase A₂ am N-Terminus des VP1 auf. Es soll überprüft werden, ob die Bereitstellung der PLA₂ in *trans* durch eine Koinfektion mit AAV2wt ausreicht, um eine Erhöhung der Transgen-exprimierenden Zellen der PLA₂-Mutante zu induzieren.

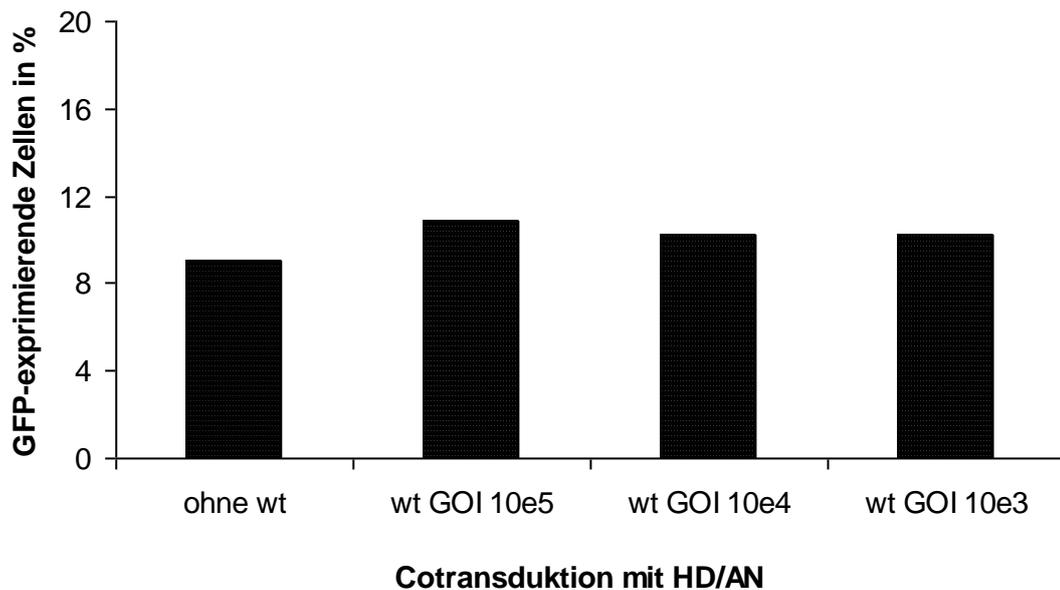


Abb. 3-22: GFP-exprimierende Zellen nach Koinfektion der PLA₂-Mutante mit AAV2wt in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden ausgesät und 24h später mit PLA₂-Mutante (GOI 2x10⁵) und AAV2 wt (GOI 10³, 10⁴, 10⁵) koinfiziert, wobei AAV2 nicht das Transgen GFP, sondern das AAV2-Genom aufweist. Nach einer Koinfektion von 24h bei 37°C wurden die Zellen geerntet und mittels FACS analysiert. Angegeben sind Einzelwerte (n=1).

Daher wurden HeLa-Zellen ausgesät und 24h später mit PLA₂-Mutante (GOI 2x10⁵) und AAV2 wt (GOI 10³, 10⁴, 10⁵) koinfiziert, wobei AAV2 nicht das Transgen GFP, sondern das AAV2-Genom aufweist. Nach einer Koinfektion von 24h bei 37°C wurden die Zellen geerntet und mittels FACS hinsichtlich der Transgen-exprimierender Zellen analysiert (Abb. 3-22). Für HeLa-Zellen, die mit der PLA₂-Mutante transduziert worden sind, konnte ein Anteil der GFP-exprimierenden Zellen von 9% detektiert werden. Die Koinfektion mit AAV2 wt führte in keinem der gewählten Ansätze zu einer signifikanten Steigerung (10.9% bei GOI 10⁵; 10.2% bei GOI 10⁴; 10.2% bei GOI 10³). Bei diesem Experiment handelt es sich um ein

Einzelexperiment. Ich habe weitere Experimente durchgeführt, bei denen die eingesetzten GOI leicht variierten. Bei keinem der ausgetesteten Versuchsansätze konnte eine signifikante Erhöhung festgestellt werden. Teilweise wurde sogar eine Reduktion des Anteils GFP-exprimierender Zellen beobachtet. Die in Abbildung 3-22 dargestellten Ergebnisse zeigen repräsentativ alle analysierten Ansätze, um eine spätere Diskussion im Kontext mit den anderen Experimenten des Kapitel 3.2 zu ermöglichen.

4 Diskussion

4.1 Die AAV:Hepatozyten Interaktion

Die Infektionsbiologie der Adeno-assoziierten Viren ist bisher nur zum Teil verstanden (1.1.3). In den meisten Untersuchungen verwendete man die humane Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa und beschränkte sich auf den Serotyp 2, der als viraler Vektor bereits in über 40 klinischen Studien Anwendung gefunden hat (Büning et al., 2008). In der Zwischenzeit werden jedoch eine Reihe weiterer Serotypen als virale Vektoren entwickelt und zwei von ihnen (AAV1 und AAV8) werden derzeit in der klinischen Anwendung erprobt (Büning et al., 2008). In dieser Arbeit wurde damit begonnen, die Interaktion der Serotypen 2 und 8 in Hepatozyten zu charakterisieren. Hierzu verwendete ich keine Viren sondern virale Vektoren. Adeno-assoziierte Viren und AAV basierte Vektoren unterscheiden sich nur in ihrem Genom. Da die Interaktion zwischen AAV und der Zelle aber hauptsächlich über das Kapsid erfolgt (Stilwell und Samulski, 2004), können für vergleichende Untersuchungen der verschiedenen Serotypen Vektoren verwendet werden. In die Kapside der verschiedenen Serotypen können dieselben, AAV2-basierten Vektorgenome verpackt werden (Pseudotypisierung; *cross-packaging*) (Hildinger et al., 2001; Rabinowitz et al., 2002), was den direkten Vergleich erleichtert und die Identifizierung der durch die verschiedenen Kapside verursachten Reaktionen der Zelle auf die Infektion erlaubt. Diese Methode der Pseudotypisierung wendete ich ebenfalls in meinen Studien an. Die rAAV2- und rAAV8-Vektoren, die eine 83%ige Homologie (Gao et al., 2002) in der Aminosäuresequenz ihrer Kapsidproteine aufweisen, kodierten für GFP in der so genannten *self-complementary* Genom-Konformation. Dabei handelt es sich um DNA-Abschnitte, die auf sich selber zurückfalten können und so in der Zelle als doppelsträngige DNA-Genome erkannt werden, so dass sie ohne weitere Modifikationen transkribiert werden können. Hierin unterscheiden sich die von mir verwendeten Vektoren von den natürlich vorkommenden AAV, die ein einzelstängiges DNA-Genom aufweisen, das im Zellkern zunächst in einen transkriptionell-aktiven Doppelstrang umgewandelt werden muss. Diese Umwandlung erfolgt in Hepatozyten jedoch nur sehr ineffizient (Jayandharan et al., 2008). Damit dieser limitierende Schritt die geplanten Expressionsstudien nicht beeinträchtigt, entschieden wir uns für die Verwendung selbstkomplementärer Genome. Hepatozyten als Bestandteil der Leber sind als Zielzellen für gentherapeutische Interventionen interessant. Zum einen akkumulieren virale Vektoren nach systemischer Gabe in der Leber, was zur Auslösung inflammatorischer Reaktionen führen kann (Raper et al., 2003) und zum anderen können sekretierbare gentherapeutische Produkte nach Herstellung in Hepatozyten effizient in das Blutsystem abgegeben werden.

Werden zwischen 5×10^{10} und 3×10^{11} AAV2-Partikel pro Maus injiziert, detektiert man jedoch nur zwischen 0,3 und 3,9% Transgen-exprimierende Hepatozyten (Miao et al., 2000; Nakai et al., 2002; Nakai et al., 2005). Werden andere Serotypen, die dasselbe Vektorgenom tragen, injiziert, finden sich deutlich höhere Werte. So berichten Nakai und Mitarbeiter, dass die Gabe von 3×10^{11} Partikeln von AAV1 zu 7,7% und von AAV8 zu 14,9% stabil exprimierenden Hepatozyten führte (Nakai et al., 2005). Mit $1,8 \times 10^{12}$ AAV8-Partikeln erreichte Nakai 65,8% und mit $7,2 \times 10^{12}$ sogar 97,4% stabil transduzierte Hepatozyten (Nakai et al., 2005), während er mit $3,9 \times 10^{12}$ AAV2-Partikeln in einer früheren Studie (Nakai et al., 2002) nur 8,9% erreichte (dieser Wert war in (Nakai et al., 2005) nicht getestet worden). Die „Unfähigkeit“ Hepatozyten zu transduzieren liegt nicht an der Aufnahme des AAV2 in die Zelle. In fast 100% der Hepatozyten detektiert man nach Gabe von $1,2 \times 10^{11}$ AAV2-Partikeln Vektorgenome (Miao et al., 2000; Nakai et al., 2002). Die Zellaufnahme von AAV2 *in vivo* ist sogar effizienter als für andere Serotypen. Davidoff und Mitarbeiter berichten von 1,5fach höheren Genommengen für AAV2 als für AAV8 in der Leber 24 Stunden nach Injektion über die Schwanzvene (Davidoff et al., 2005). Ähnliche Ergebnisse berichten Thomas und Kollegen (Thomas et al., 2004). 3 Tage nach Injektion in die Portalvene waren vergleichbare Mengen von AAV2- und AAV8-Genomen in den Hepatozyten und deutlich weniger AAV6- als AAV2-Genome detektierbar, obgleich AAV2 die niedrigste Genexpression zeigte (54fach schwächer als AAV8 und 5fach schwächer als AAV6) (Thomas et al., 2004). Auch in dieser Studie trugen alle Serotypen dasselbe Vektorgenom.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten nun erste Untersuchungen zur *in vitro* AAV2/AAV8-Hepatozyteninteraktion durchgeführt werden. Hierzu wurden zwei Zelllinien verwendet und zwar die murine Hepatozyten-Zelllinie H2.35 und die humane Hepatom-Zelllinie HepG2. Als Referenzzelllinie verwendete ich die humane Cervixkarzinomzelllinie HeLa. Im Gegensatz zu Thomas und Kollegen (Thomas et al., 2004), die *in vivo* für AAV2 und AAV8 vergleichbare Mengen an Vektorgenomen in den Hepatozyten der Mausleber detektieren, zeigten die hier durchgeführten quantitativen Analysen, dass AAV2 deutlich effizienter in alle drei Zell-Linien aufgenommen wird als AAV8 (Abb. 3-1A), da signifikant mehr intrazelluläre Vektorgenome nach einer AAV2 als nach einer AAV8 Applikation per quantitativer PCR nachgewiesen werden konnten. Setzt man jedoch die Menge an Transgen-Produkten (quantitative PCR von cDNA und Anzahl Transgen-exprimierender Zellen im FACS) in Relation zur Menge an intrazellulären Partikeln, so zeigt sich, dass AAV2 zwar sehr effizient die Zellmembran passieren kann, dass AAV8 in Hepatozyten aber deutlich effizienter intrazellulär prozessiert wird. In HeLa-Zellen dagegen scheint diese intrazelluläre Limitierung für AAV2 nicht vorhanden zu sein (Abb. 3-1B und C). Die effizientere intrazelluläre Prozessierung, die ich in

meiner Arbeit für AAV8 zeigen konnte, war besonders ausgeprägt in den murinen Hepatozyten, aber auch deutlich messbar in der humanen Hepatomazelllinie HepG2.

Um zu untersuchen, ob sowohl AAV2 als auch AAV8 in die perinukleäre Region transportiert wird, eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Genexpression, markierte ich das AAV8-Kapsid genetisch mit einem Fluoreszenzprotein. Diese Technik, die eine Visualisierung der AAV-Infektion im Mikroskop erleichtert, war zuvor von unserer Arbeitsgruppe für den Serotyp 2 entwickelt worden. Ich konnte nun zeigen, dass auch AAV8-Kapside den Einbau von Fluoreszenzproteinen als Fusion an den N-Terminus von VP2 tolerieren. Neben Varianten des Grün-Fluoreszierenden Proteins testete ich alternative Fluoreszenzproteine wie DsRed und sein Derivat mCherry. Auch der Einbau dieser Varianten in die Kapside der Serotypen 2 und 8 konnte mit hoher Effizienz durchgeführt werden. Diese genetisch-markierten AAV-Vektoren erlaubten zum ersten Mal die Kolo-kalisierung verschiedener Serotypen in Zellen. Dies ist bisher nicht möglich gewesen, da für viele Serotypen keine Antikörper zur Analyse zur Verfügung stehen und die zur Verfügung stehenden Antikörper nicht zwischen Serotypen unterscheiden können. Neben der erstmaligen Markierung des Serotyp 8 konnte ich auch zeigen, dass sich das GFP-VP2 Fusionsprotein auch in das Kapsid einer Mutante des AAV2 einbauen lässt. Diese fluoreszenzmarkierte PLA₂-Mutante wurde in Koinfektionen mit AAV2wt eingesetzt, um Hinweise auf die intrazelluläre Lokalisierung beider Viren zum selben Zeitpunkt zu gewinnen. Dieses Experiment wurde im Zusammenhang mit der Ergründung der Funktion der viralen PLA₂ durchgeführt.

Die Fluoreszenzmarkierung von AAV2 und ihr Einsatz in intrazellulären Untersuchungen war zuvor bereits mit chemisch-markierten AAV2 Kapsiden durchgeführt worden (Bartlett et al., 2000; Seisenberger et al., 2001). Allerdings ist die Markierungseffizienz (1 Farbstoff/Kapsid) sehr niedrig, so dass für fluoreszenz-mikroskopische Studien eine große Partikelzahl benötigt wird (Seisenberger et al., 2001). Zudem werden hochreine AAV-Präparationen benötigt, welche man nur durch eine Affinitätschromatographie oder Gelfiltration zusätzlich zur Aufreinigung mittels diskontinuierlichem Gradienten erreicht. Die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie ist jedoch nicht für alle AAVs möglich, da entsprechende Protokolle bzw. Chromatographiematerial noch nicht beschrieben sind.

Die Verwendung der genetisch-markierten AAV-Vektoren zeigte, dass die für AAV2 und AAV8 detektierten Signale in denselben Bereichen kolo-kalisieren (3.1.4). Das deutet darauf hin, dass beide Serotypen in dieselben intrazellulären Bereiche transportiert werden. Für AAV8 können in den verwendeten Hepatozyten deutlich weniger Signale detektiert werden als für AAV2. Diese Diskrepanz ist auf die unterschiedliche Internalisierungseffizienz beider

Serotypen in den verwendeten Zell-Linien (HeLa, HepG2 und H2.35) zurückzuführen, wie sie schon zuvor durch den Nachweis intrazellulärer Partikel gezeigt werden konnte (3.1.1).

Ein möglicher limitierender Schritt in der AAV-Infektion von AAV2 in Hepatozyten könnte ein effizienter proteasomaler Abbau sein. Dies untersuchte ich mit demselben Proteasomeninhibitor, den auch Duan und Kollegen in der Maus einsetzten (Duan et al., 2000). In Einklang mit ihren Ergebnissen beobachtete ich eine deutliche Steigerung der Menge an Transgen-exprimierenden Zellen für AAV2 in der murinen Hepatozyten-Zelllinie H2.35, allerdings weniger deutlich in der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 (Abb. 3-7). Obwohl die intrazelluläre Prozessierung des AAV8 in Hepatozyten effizienter zu sein scheint, kann auch bei diesem Serotyp in den verwendeten murinen und humanen Hepatozyten eine Steigerung der Anzahl Transgen-exprimierender Zellen durch MG132 erreicht werden, im besonderen Maß in der murinen Hepatozyten Zelle-Linie H2.35. Während der Anstieg der Anzahl Transgen-exprimierender Zellen durch AAV2 in H2.35 Zellen mit der Erhöhung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) korreliert, bedingt der Anstieg Transgen-exprimierender Zellen durch AAV8 in diesen Zellen im Verhältnis eine wesentliche schwächere Steigerung der MFI. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der durch MG132 in H2.35-Zellen hervorgerufene Effekt abhängig vom Serotyp ist.

Bisher ist unklar, wie die AAV-Infektion in Hepatozyten (*in vivo* oder *in vitro*) erfolgt und worauf die unterschiedliche Permissivität (= Fähigkeit zur Genexpression) der Hepatozyten für die verschiedenen Serotypen beruht. Zudem gibt es bisher keine Untersuchungen darüber, wie die Hepatozyten auf das Eindringen der verschiedenen Serotypen reagieren und welche Abwehrmechanismen induziert werden. Ich konnte mit den hier gezeigten Experimenten darstellen, dass sich HepG2- und H2.35-Zellen für die *in vitro* Analyse der hepatozytenspezifischen, intrazellulären Blockierung des AAV2, die *in vivo* im murinen System beobachtet werden konnten, eignen. Aufgrund der Etablierung der genetischen Markierung des AAV8 bietet dieses System neben biochemischen auch die Möglichkeit für mikroskopische Untersuchungen. Zusätzlich kann mit diesem System auch ein speziesspezifischer Unterschied in Hepatozyten zwischen Maus und Mensch getestet werden.

4.2 Die intrinsische Phospholipase-Aktivität ermöglicht die endosomale Freisetzung von Parvoviren

Parvoviren weisen im N-Terminus des größten Kapsidproteins eine Aminosäureabfolge auf, wie sie sonst nur in sekretorischen Phospholipasen des Typs A₂ (sPLA₂) zu finden sind. Zádori und Kollegen konnten für das porcine Parvovirus zeigen, dass dieses Motiv in Abhängigkeit von Ca²⁺ (100 µM – 10 mM) PLA₂-Aktivität zeigt. Die Mutierung des katalytischen Zentrums (^{41/42} HD/AN) führt zu einer Reduktion der PLA₂-Aktivität und der Infektiösität um das 10⁵-fache. Es konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante hinsichtlich des Eintritts festgestellt werden. Sowohl für Wildtyp als auch für die Mutante konnte eine perinukleäre Akkumulation in späten Endosomen beobachtet werden, aber nur der Wildtyp zeigt 12h nach Infektion replizierende virale DNA (Zádori et al., 2001). Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen Farr und Kollegen für das *minute virus of mice* (Farr et al., 2005). Bei diesen Parvoviren handelt es sich um Vertreter der autonomen Parvoviren. Adeno-assoziierte Viren sind Dependoviren, d.h. sie benötigen für ihre Replikation und für eventuell weitere noch nicht näher charakterisierte Schritte in ihrem Infektionszyklus die Unterstützung anderer nicht-verwandter Viren wie z.B. Adenovirus oder Herpes Simplex Virus.

Auch AAV besitzt in der *unique region* des VP1-Proteins, das mit einer Anzahl von 5 Proteinen an der Ausbildung des AAV-Kapsids beteiligt ist, die PLA₂-Homologie-Domäne. Girod und Kollegen konnten zeigen, dass eine Mutation (^{41/42} HD/AN) in dem Bereich, der dem katalytischen Zentrum entsprechen würde, zu einer drastischen Verringerung der Infektiösität von Wildtyp-AAV2 führt. In mikroskopischen Untersuchungen ließen sich intrazelluläre Partikel der Mutante nachweisen, woraus die Autoren schlossen, dass die Mutation nicht mit der Zellaufnahme interferiert (Girod et al., 2002). Diese Interpretation der mikroskopischen Untersuchungen konnte in dieser Arbeit durch quantitative Analysen bestätigt werden. Hierzu bestimmte ich die Menge an intrazellulären Vektorenomen für rekombinante AAV2-Vektoren mit einem unmutierten Kapsid im Vergleich zu Vektoren mit einem Kapsid, das die HD/AN-Mutation trug. In beiden Fällen konnten vergleichbare Mengen an intrazellulären Partikeln nach eine Stunde p.t. detektiert werden (Abb. 3-8).

Girod und Kollegen vermuteten, dass die PLA₂ entweder für die Freisetzung aus den Endosomen oder für den Kerneintritt benötigt wird. Beide Kompartimente sind von Membranen umgeben und somit potentielle Substrate für Phospholipasen, die die Hydrolyse von Esterbindungen in Glycerophospholipiden katalysieren. Ein ineffizienter Kerntransport könnte die deutlich geringere Infektiösität (Girod et al., 2002) und die signifikant niedrigere und durch Erhöhung der applizierten Vektormenge nur geringfügig zu steigenden

Transduktionseffizienz (bestimmt anhand der Anzahl Transgen-exprimierender Zellen) (Abb. 3-10A) erklären. Dies würde allerdings implizieren, dass AAV für die Einbringung seiner Genome in den Zellkern nicht wie bisher angenommen die NPC verwendet (Grieger et al., 2006; Sonntag et al., 2006; Qiu und Brown, 1999), sondern die Kernmembran mit Hilfe der intrinsischen PLA₂-Aktivität – wahrscheinlich nur transient – öffnet. Mutanten könnten in diesem Fall nur dann in den Zellkern gelangen und eine erfolgreiche Genexpression ausführen, wenn die Kernmembran im Laufe des Zellzyklus aufgelöst wird. Um diesen Punkt zu klären, arretierte ich Zellen durch Zugabe von Aphidicolin in G1/S-Phase und inhibierte so den Zellzyklus-bedingten Abbau der Kernmembran. Weder auf die Transduktionseffizienz (3.2.4) noch auf die nukleäre Akkumulation der Vektorgenome (3.2.5) wirkte sich die Aphidicolinbehandlung negativ aus. Dies spricht gegen eine Beteiligung der PLA₂ am Kerntransport von AAV.

Ein weiteres wichtiges Argument, das gegen eine Funktion der PLA₂ beim Kerneintritt spricht, ist die Ca²⁺-Konzentration [nM] im Cytoplasma. Diese ist im Gegensatz zum extrazellulären Raum [mM] sehr niedrig. Die virale PLA₂ benötigt jedoch µM-mM Ca²⁺-Konzentrationen für ihre enzymatische Aktivität (Schaloske und Dennis, 2006).

Auch die zweite Möglichkeit, eine ineffiziente Freisetzung aus den Endosomen, ist mit dem beobachteten Phänotyp der Mutante kongruent. In mikroskopischen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass AAV2 und die PLA₂-Mutante nach 2h perinukleär zu detektieren sind (3.2.3). Dies stimmt mit den Beobachtungen von Girod und Kollegen überein (Girod et al., 2002). Durch Verwendung unterschiedlicher Kapsidmarkierungen konnte ich Koinfektionen durchführen, die es mir erlaubten zu zeigen, dass AAV2wt und HD/AN nicht nur in derselben Region der Zelle akkumulieren, sondern dass sie kolokalisieren. Da AAV über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose in Clathrin-bedeckten Vesikeln in die Zelle aufgenommen und innerhalb von Endosomen von der Zellperipherie in Richtung Zellkern transportiert wird (Bartlett et al., 2000; Douar et al., 2001; Duan et al., 1999; Sanlioglu et al., 2000), könnten die perinukleär akkumulierten AAV-Partikel sich noch in Endosomen befinden. Endosomen in perinukleären Regionen sind häufig späte Endosomen (Gisou van der Goot und Gruenberg, 2006; Piper und Luzio, 2001). Der Übergang von frühen zu späten Endosomen kann durch die Zugabe von Brefeldin A blockiert werden (Lippincott-Schwartz et al., 1991; Pelham, 1991). Dies führt zur Inhibierung der AAV-Infektion. Wie ich in dieser Arbeit zeigen konnte, inhibiert Brefeldin A rekombinante AAV (rAAV)-Vektoren mit der HD/AN-Mutation und rAAV-Vektoren mit einem unmodifizierten Kapsid mit gleicher Effizienz (3.2.6), was daraufhin deutet, dass für beide eine ordnungsgemäße Reifung der Endosomen essentiell ist und dass sich beide in diesen Kompartimenten befinden.

Der N-Terminus von VP1, der das PLA₂-Motiv aufweist, liegt auf der Innenseite des AAV-Kapsides verdeckt (Kronenberg et al., 2005). Sonntag und Kollegen konnten zeigen, dass der N-Terminus von VP1 erst nach der Internalisierung im Verlauf der Infektion auf dem viralen Kapsid exponiert wird. Somit kann die virale PLA₂ auch erst zu diesem Zeitpunkt aktiv werden. Aufgrund des Zeitpunktes der Exponierung (0.5 – 3h nach Infektion) schlossen sie, dass die Exponierung in Endosomen stattfinden muss, wie es auch schon für MVM diskutiert worden ist (Mani et al., 2006; Sonntag et al., 2006).

Für AAV und andere Parvoviren konnte gezeigt werden, dass diese Exponierung des VP1 N-Terminus *in vitro* durch Hitze hervorgerufen werden kann (Cotmore et al., 1999; Kronenberg et al., 2005; Ros et al., 2006; Vihinen-Ranta et al., 2002). Die Exponierung des N-Terminus kann jedoch in anderen Parvoviren als AAV auch durch Lösungen mit niedrigem pH-Wert ausgelöst werden, wie man ihn in späten Endosomen findet (Cotmore et al., 1999; Ros et al., 2006; Suikkanen et al., 2003; Vihinen-Ranta et al., 2002). Für AAV konnte bislang keine Exponierung durch niedrigen pH-Wert erreicht werden. Sonntag und Kollegen konnten unter physiologischen Bedingungen zwar ab pH 4 und niedriger eine Exponierung beobachten, jedoch wurde gleichzeitig auch der C-Terminus der Kapsidproteine detektiert, was auf eine Denaturierung der Kapside aufgrund der Behandlung hinweist. Eine Verhinderung der Ansäuerung der Endosomen mit Bafilomycin A1 verursachte nur einen Rückgang der Exponierung um knapp die Hälfte. Daher diskutieren die Autoren, dass *in vivo* die Ansäuerung der Endosomen allein nicht ausreicht, um die Exponierung zu induzieren (Sonntag et al., 2006). Obwohl Bafilomycin A1 nur teilweise die Exponierung des VP1 N-Terminus inhibieren kann, induziert es trotzdem einen dramatischen Abfall der Genexpression sowohl des AAV2 wt als auch der PLA₂-Mutante (3.2.7; Bartlett et al., 2000; Douar et al., 2001). Dieser beobachtete Effekt ist daher wahrscheinlich durch eine Vielzahl von weiteren Faktoren verursacht. Bafilomycin A1 beeinflusst neben der Verhinderung der Ansäuerung von Endosomen z.B. auch die Regulation des Ca²⁺-Einstrom und verhindert die Formierung von endosomalen *carrier vesicles*, eine Stufe endosomaler Vesikel zwischen frühen und späten Endosomen, die auch als *multi vesicular bodies* (MVB) bekannt ist (Christensen et al., 2001; Clague et al., 1994; Gisou van der Goot und Gruenberg, 2006; Menteyne et al., 2006).

Die Exponierung von 50% der N-Termini von VP1 wird jedoch durch Bafilomycin A1 verhindert. Die Reduktion der Restaktivität der PLA₂-Mutanten kann auch durch mögliche zusätzliche „Funktionen“ der *unique region* der VP1-Proteine erklärt werden, und impliziert, dass diese Funktionen für die Erhaltung der Restaktivität der PLA₂-Mutante essentiell sind. Bei diesen Funktionen könnte es sich um NLS-Sequenzen handeln (Grieger et al., 2006; Sonntag et al., 2006), die für den Kerntransport benötigt werden könnten. Wenn diese

Sequenzen tatsächlich diese Funktionen während der Infektion von AAV2 erfüllen, dann ist dies ein weiteres Argument, das gegen eine PLA₂-vermittelte Kernmembranzerstörung als Kerneintrittsmechanismus spricht.

All diese Ergebnisse sprachen dafür, dass die PLA₂-Domäne in Dependoviren dieselbe Funktion erfüllt wie in autonomen Parvoviren, nämlich die Freisetzung aus den Endosomen (Farr et al., 2005). Sowohl für AAV2 als auch für die PLA₂-Mutante konnte 2h p.t. eine deutliche perinukleäre Akkumulation beobachtet werden. Tatsächlich zeigen späte Endosomen eine pleiomorphe sphärische Struktur, die teilweise tubulär und zisternenartig ist und sich häufig in perinukleären Bereichen befindet (Gisou van der Goot und Gruenberg, 2006; Piper und Luzio, 2001). Um zu zeigen, dass die PLA₂ des AAV2 für die Freisetzung aus Endosomen eingesetzt wird, verwendete ich die endosmolytische Aktivität von Adenoviren unter der Annahme, dass in Endosomen in denen sich AAV und Adenoviren gleichzeitig befinden, die endosmolytische Aktivität der Adenoviren der Freisetzung der PLA₂-Mutante assistieren könnte. Bei Verwendung von wtAd beobachtete ich, dass Adenoviren sowohl die Transduktionseffizienz von AAV2 mit unmodifizierten Kapsid als auch von AAV mit der HD/AN-Mutation erhöhen, wobei der Effekt für die Mutante signifikant höher war. Die Verwendung von rekombinanten Adenoviren, die keine adenoviralen Gene mehr aufweisen, beeinflusste jedoch ausschließlich die Transduktionseffizienz der HD/AN-Mutante. Hieraus lassen sich folgende zwei Punkte schließen: I) adenovirale Gene unterstützen die Transduktion rekombinanter AAV-Vektoren und haben nicht nur einen positiven Effekt auf die Transduktionseffizienz von Wildtyp-AAV und II) die endosmolytische Aktivität des adenoviralen Kapsids kann die PLA₂-Mutation in *trans* aufheben. Dass die endosmolytische Aktivität für den Steigerung der Transduktionseffizienz der PLA₂-Mutante verantwortlich ist, konnte ich durch Verwendung eine adenoviralen Mutante zeigen, die die Endosomen nicht mehr lysieren kann und die zu keiner Steigerung der Transduktionseffizienz der HD/AN-Mutante führte.

Auch für das Parvovirus *minute virus of mice* (MVM) wurde die Funktion der PLA₂ für den Austritt aus den Endosomen beschrieben (Farr et al., 2005). Farr und Kollegen konnten bei Koinfektion der MVM-PLA₂-Mutante mit Ad5 allerdings eine deutlich stärkere Steigerung der Genexpression detektieren. Für diesen Unterschied lässt sich vor allem ein wichtiger Grund aufführen. Der Primärrezeptor von AAV2 ist HSPG (Summerford und Samulski, 1998). Auch Ad2/5 bindet an diesen Rezeptor, so dass eine Konkurrenz um Bindestellen entsteht, und Ad2/5 wird wie AAV2 über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen (Dechecchi et al., 2001; Varga et al., 1991; Wang et al., 1998). Bei einer Koinfektion von A2/5 und MVM tritt keine Konkurrenz um Rezeptoren auf, da für MVM Sialinsäuren als Rezeptor beschrieben sind (Nam et al., 2006). Die Visualisierung einer Koinfektion von Ad5

und AAV2 bzw. PLA₂-Mutante bestätigt diese Annahme (3.2.8.4). Zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion können nur einige Koloalationen von AAV2 bzw. PLA₂-Mutante und Ad5 beobachtet werden, was dafür spricht, dass sich aufgrund der Konkurrenzsituation um den Rezeptor nur zum Teil beide Viren in demselben Endosom befinden, was in den anderen Fällen einen Effekt durch die adenovirale Lyse der Endosomen verhindert.

Ein weiterer Hinweis auf die Endosomen als Ort der PLA₂-Aktivität konnte durch das Proteasomen-Blockade-Experiment gewonnen werden. Die Zugabe von MG132 führte zu einem signifikanten Anstieg in der Transduktionseffizienz für die Mutante jedoch nicht für AAV mit einem Wildtyp-Kapsid. MG132 ist als Verbindung bekannt, die den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg im Zytoplasma inhibiert (Lee und Goldberg, 1998). Dass die Funktion dieser Verbindung bei weitem nicht so streng eingegrenzt werden kann, zeigen mehrere Publikationen der letzten Jahre. Das Ubiquitin-Proteasom-System fungiert nicht nur im Zytoplasma, sondern nimmt auch Einfluss auf die Internalisierung von membranständigen Liganden-gebundenen Rezeptoren mittels Endozytose und induziert deren Degradierung in Lysosomen (Alves dos Santos et al., 2001; van Kerkhof et al., 2001; Longva et al., 2002; Mukhopadhyay und Riezman, 2007). Daher kann MG132 durch die Inhibierung des Ubiquitin-Proteasom-Signalwegs wahrscheinlich auch die Degradierung der PLA₂-Mutante in Lysosomen verhindern. Diese Interpretation erklärt auch, warum beim Einsatz von rekombinantem Ad5 und MG132 ein additiver Effekt für die PLA₂-Mutante nachzuweisen ist, da das rekombinante Ad5 einem Teil der internalisierten PLA₂-Mutanten den Übertritt aus den Endosomen in das Cytoplasma ermöglicht und das MG132 die Degradierung der Vektoren verhindert, die sich noch in den Endosomen befinden.

Dass autonome Parvoviren und das Dependovirus AAV sich nicht immer gleich verhalten müssen, zeigt die Behandlung mit MG132. Während MG132 für AAV2 zu einer Steigerung der Transgen-exprimierenden Zellen führt, verhindert MG132 bei autonomen Parvoviren wie MVM und dem caninen Parvovirus die Translokation in den Zellkern und somit die Genexpression (Ros und Kempf, 2004).

Unterstützt wird die Schlussfolgerung, dass die virale PLA₂ für den Austritt des Virus aus den Endosomen benötigt wird, durch die Ca²⁺-Konzentration [μ M], die in Endosomen vorherrscht und die für die enzymatische Funktion der viralen PLA₂ essentiell ist (Gerasimenko et al., 1998; Gerasimenko und Tepikin, 2005; Menteyne et al., 2006; Pillay et al., 2002; Schaloske und Dennis, 2006).

Die PLA₂-Funktion von AAV2 scheint die endosomale Membran nur sehr lokal begrenzt zu öffnen, da eine Koinfektion von AAV2 wt mit der PLA₂-Mutante keine signifikante Steigerung der Genexpression der Mutante induzieren konnte (3.2.10). Auch beim caninen Parvovirus (CPV) konnte kein bzw. nur das Entlassen kleiner Moleküle aus den Endosomen durch die

Infektion beobachtet werden, was ebenfalls ein größeres Aufbrechen der Membran durch die PLA₂ ausschließt (Parker und Parrish, 2000; Suikkanen et al., 2003).

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass alle Ergebnisse meiner Arbeit darauf hindeuten, dass die Aufgabe der PLA₂-Domäne in AAV-Kapsiden die Freisetzung der viralen Partikel aus den Endosomen ist. Eine ähnliche Funktion wurde für das Protein VI der Adenoviren beschrieben. Hier führt die Ansäuerung zu einem partiellen Abbau des Kapsids und zur Freisetzung des Adenovirusproteins VI, das dann die Lyse der Membran induziert (Wiethoff et al., 2005).

Da die Ansäuerung der Endosomen mit zur Exponierung des VP1 N-Terminus beiträgt, ist die PLA₂-Aktivierung mit dem pH-Wert der Endosomen gekoppelt und ermöglicht so eine zeitlich sehr gute Steuerung der Freisetzung des AAV, nämlich in der Nähe des Zellkerns. Durch die Vermeidung eines langen Transport als freies Viruspartikel im Zytoplasma kann auch eine mögliche Degradierung effizienter verhindert werden. Der Transport durch frühe und späte Endosomen schützt somit das Virus vor der Erkennung durch die Zelle.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass sich HepG2- und H2.35-Zellen für die *in vitro* Analyse der hepatozytenspezifischen, intrazellulären Blockierung des AAV2, die *in vivo* im murinen System beobachtet werden konnte, eignen. Aufgrund der Etablierung der genetischen Markierung des AAV8 bietet dieses System neben biochemischen auch die Möglichkeit für mikroskopische Untersuchungen. Zusätzlich kann mit diesem System auch ein speziesspezifischer Unterschied in Hepatozyten zwischen Maus und Mensch getestet werden.

In weiteren Experimenten soll nun mit diesem System detailliert geklärt werden, an welcher Stelle die intrazelluläre Blockierung von AAV2 in Hepatozyten erfolgt. Dafür sollen Verbindungen eingesetzt werden, die verschiedene Schritte des Infektionsweges blockieren (z.B. Brefeldin A und Bafilomycin A1). Auch mikroskopische Untersuchungen mit Markern verschiedener Kompartimente sollen weiteren Aufschluss geben. Zudem soll überprüft werden, ob möglicherweise eine mangelnde Konformationsänderung des AAV2 Kapsids im Vergleich mit dem AAV8 Kapsid in den Endosomen zu einem verminderten Austritt des Serotyp 2 aus diesem Kompartiment führt. Auch eine mögliche Reaktion des angeborenen Immunsystems auf eine AAV2 und AAV8 Infektion soll untersucht werden. Für diese Versuche sollte das System auch auf primäre murine und primäre humane Hepatozyten ausgeweitet werden.

Ein großer Bestandteil dieser Doktorarbeit war die Untersuchung der Funktion der viralen PLA₂ am N-Terminus des VP1. Diese ist essentiell für die Infektion von AAV2 und ist in allen untersuchten AAV-Serotypen hochkonserviert. In meinen Experimenten konnte ich zeigen, dass diese weder für den Eintritt in die Zelle noch für den Eintritt in den Zellkern, sondern für den Austritt aus den Endosomen benötigt wird. In folgenden Versuchen sollen die genauen Begleitumstände der PLA₂-Funktion untersucht werden. Zu welchem Zeitpunkt erfolgt der Austritt aus den Endosomen genau? Welche Ca²⁺-Konzentrationen und welcher pH-Wert muss zu diesem Zeitpunkt herrschen? Gibt es Faktoren, die eine konkrete Induzierung der PLA₂-Funktion veranlassen. Zudem ist für AAV immer noch nicht geklärt, wie die Konformationsänderung in Endosomen erfolgt.

5 Literaturverzeichnis

- Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H, Kay MA (2006)** The 37/67-Kilodalton Laminin Receptor Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol* **80(19)**:9831-9836
- Alves dos Santos CM, van Kerkhof P, Strous GJ (2001)** The Signal Transduction of the Growth Hormone Receptor Is Regulated by the Ubiquitin/Proteasome System and Continues After Endocytosis. *J Biol Chem* **276(14)**:10839-10846
- Ancian P, Lambeau G, Lazdunski M (1995)** Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipase A₂. *Biochemistry* **34(40)**:13146-13151
- Anderson CW (1990)** The proteinase polypeptide of adenovirus serotype 2 virions. *Virology* **177(1)**:259-272
- Arnesjö B, Barrowman J, Borgström B (1967)** The Zymogen of Phospholipase A² in Rat Pancreatic Juice. *Acta Chem Scand* **21(10)**:2897-2900
- Asokan A, Hamra JB, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ (2006)** Adeno-Associated Virus Type 2 Contains an Integrin $\alpha 5\beta 1$ Binding Domain Essential for Viral Cell Entry. *J Virol* **80(18)**:8961-8969
- Atchison RW, Casto BC, Hammon WM (1965)** Adenovirus-Associated Defective Virus particles. *Science* **149**:754-756
- Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (2000)** Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA* **97(22)**:11984-11989
- Bantel-Schaal U, zur Hausen H (1984)** Characterization of the DNA of a Defective Human Parvovirus Isolated from a Genital Site. *Virology* **134**:52-63
- Bantel-Schaal U, Delius H, Schmidt R, zur Hausen H (1999)** Human Adeno-Associated Virus Type 5 Is Only Distantly Related to Other Known Primate Helper-Dependent Parvoviruses. *J Virol* **73(2)**:939-947
- Bantel-Schaal U, Hub B, Kartenbeck J (2002)** Endocytosis of Adeno-Associated Virus Type 5 Leads to Accumulation of Virus Particles in the Golgi Compartment. *J Virol* **76(5)**:2340-2349
- Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ (2000)** Infectious Entry Pathway of Adeno-Associated Virus and Adeno-Associated Virus Vectors. *J Virol* **74(6)**:2777-2785
- Becerra SP, Rose JA, Hardy M, Baroudy BM, Anderson CW (1985)** Direct mapping of the adeno-associated virus capsid proteins B and C: A possible ACG initiation codon. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:7919-7923
- Becerra SP, Koczot F, Fabisch P, Rose JA (1988)** Synthesis of Adeno-Associated Virus Structural Proteins Requires Both Alternative mRNA Splicing and Alternative Initiations from a Single Transcript. *J Virol* **62(8)**:2745-2754
- Benmerah A, Bayrou M, Cerf-Bensussan N, Dautry-Varsat A (1999)** Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J Cell Sci* **112**:1303-1311
- Berk AJ (2007)** Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology 5. Edition* **63**:2355-2394

- Berns KI (1990)** Parvoviral Replication. *Microbiological Reviews* **54(3)**:316-329
- Berns KL, Giraud C (1996)** Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **218**:1-23
- Berns KI, Linden RM (1995)** The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* **17(3)**:237-245
- Bezzine S, Koduri RS, Valentin E, Murakami M, Kudo I, Ghomashchi F, Sadilek M, Lambeau G, Gelb MH (2000)** Exogenously added human group X secreted phospholipase A₂ but not the group IB, IIA, and V enzymes efficiently release arachidonic acid from adherent mammalian cells. *J Biol Chem* **275(5)**:3179-3191
- Blackburn SD, Steadman RA, Johnson FB (2006)** Attachment of adeno-associated virus type 3H to fibroblast growth factor receptor 1. *Archives of Virology* **151**:617-623
- Blacklow NR, Hoggan MD, Rowe WP (1967)** Isolation of Adenovirus-Associated Viruses From Man. *Microbiology* **58**:1410-1415
- Blacklow NR, Hoggan MD, Kapikian AZ, Austin JB, Rowe WP (1968)** Epidemiology of Adenovirus-Associated Virus Infection in a Nursery Population. *American Journal of Epidemiology* **88(8)**:368-378
- Bleker S, Sonntag F, Kleinschmidt JA (2005)** Mutational Analysis of Narrow Pores at the Fivefold Symmetry Axes of Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids Reveals a Dual Role in Genome Packaging and Activation of Phospholipase A₂ Activity. *J Virol* **79(4)**:2528-2540
- Blumenthal R, Seth P, Willingham MC, Pastan I (1986)** pH-dependent lysis of liposomes by adenovirus. *Biochemistry* **25(8)**:2231-2237
- Bokoch GM, Vlahos CJ, Wang Y, Knaus UG, Traynor-Kaplan AE (1996)** Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J* **315**:775-779
- Brister JR, Muzyczka N (2000)** Mechanism of Rep-Mediated Adeno-Associated Virus Origin Nicking. *J Virol* **74(17)**:7762-7771
- Brown KE (2000)** Haematological consequences of parvovirus B19 infection. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* **13(2)**:245-259
- Bruder JT, Kovesdi I (1997)** Adenovirus Infection Stimulates the Raf/MAPK Signaling Pathway and Induces Interleukin-8 Expression. *J Virol* **71(1)**:398-404
- Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M (1992)** The Small GTPase rab5 Functions as a Regulatory Factor in the Early Endocytotic Pathway. *Cell* **70**:715-728
- Buckland AG, Wilton DC (2000)** The antibacterial properties of secreted phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta* **1488**:71-82
- Büning H, Nicklin SA, Perabo L, Hallek M, Baker AH (2003)** AAV-based gene transfer. *Curr Opin Mol Ther* **5(4)**:367-375
- Büning H, Perabo L, Coutelle O, Quadts-Humme S, Hallek H (2008)** Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Medicine* **10**:717-733
- Canaan S, Zádori Z, Ghomashchi F, Bollinger J, Sadilek M, Moreau ME, Tijssen P, Gelb MH (2004)** Interfacial Enzymology of Parvovirus Phospholipases A₂. *J Biol Chem* **279(15)**:14502-14508
- Cassell GD, Weitzman MD (2004)** Characterization of a nuclear localization signal in the C-terminus of the adeno-associated virus Rep68/78 proteins. *Virology* **327(2)**:206-214
- Chakraborti S (2003)** Phospholipase A₂ isoforms: a perspective. *Cellular Signalling* **15**:637-665

- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994)** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**(5148):802-805
- Chiorini JA, Yang L, Liu Y, Safer B, Kotin RM (1997)** Cloning of Adeno-Associated Virus Type 4 (AAV4) and Generation of Recombinant AAV4 Particles. *J Virol* **71**(9):6823-6833
- Chiorini JA, Kim F, Yang L, Kotin RM (1999)** Cloning and Characterization of Adeno-Associated Virus Type 5. *J Virol* **73**(2):1309-1319
- Christensen KA, Myers JT, Swanson JA (2001)** pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J Cell Sci* **115**:599-607
- Clague MJ, Urbé S, Aniento F, Gruenberg J (1994)** Vacuolar ATPase Activity Is Required for Endosomal Carrier Vesicle Formation. *J Biol Cell* **269**(1):21-24
- Cockley KD, Rapp F (1987)** Complementation for Replication by Unrelated Animal Viruses Containing DNA Genomes. *Microbiological Reviews* **51**(4):431-438
- Cotmore SF, D'Abramo Jr. AM, Ticknor CM, Tattersall P (1999)** Controlled Conformational Transitions in the MVM Virion Expose the VP1 N-Terminus and Viral Genome without Particle Disassembly. *Virology* **254**:169-181
- Daniel TO, Milfay DF, Escobedo J, Williams LT (1987)** Biosynthetic and glycosylation studies of cell surface platelet-derived growth factor receptor. *J Biol Chem* **262**(20):9778-9784
- Davidoff AM, Gray JT, Ng CY, Zhang Y, Zhou J, Spence Y, Bakar Y, Nathwani AC (2005)** Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. *Mol Ther* **11**(6):875-888
- Davidson BL, Stein CS, Heth JA, Martins I, Kotin RM, Derksen TA, Zabner J, Ghodsi A, Chiorini JA (2000)** Recombinant adeno-associated virus type 2, 4 and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:3428-3432
- Davison E, Diaz RM, Hart IR, Santis G, Marshall JF (1997)** Integrin $\alpha 5\beta 1$ -Mediated Adenovirus Infection Is Enhanced by the Integrin-Activating Antibody TS2/16. *J Virol* **71**(8):6204-6207
- Dehecchi MC, Melotti P, Bonizzato A, Santacatterina M, Chilosi M, Cabrini G (2001)** Heparan Sulfate Glycosaminoglycans Are Receptors Sufficient To Mediate the Initial Binding of Adenovirus Types 2 and 5. *J Virol* **75**(18):8772-8780
- De la Maza LM, Carter BJ (1981)** Inhibition of adenovirus oncogenicity in hamsters by adeno-associated virus DNA. *J Nat Cancer Inst* **67**(6):1323-1326
- Denby L, Nicklin SA, Baker AH (2005)** Adeno-associated virus (AAV)-7 and -8 poorly transduce vascular endothelial cells and are sensitive to proteasomal degradation. *Gene Ther* **12**:1534-1538
- Dennis EA (1997)** The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* **22**:1-2
- Desai P, Person S (1998)** Incorporation of the Green Fluorescent Protein into the Herpes Simplex Virus Type 1 Capsid. *J Virol* **72**(9):7563-7568
- Ding W, Zhang L, Yan Z, Engelhardt JF (2005)** Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* **12**:873-880
- Ding W, Zhang LN, Yeaman C, Engelhardt JF (2006)** rAAV2 Traffics through both the Late and the Recycling Endosomes in a Dose-Dependent Fashion. *Mol Ther* **13**(4):671-682

- Di Pasquale G, Davidson BL, Stein CS, Martins I, Scudiero D, Monks A, Chiorini JA (2003)** Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nature Medicine* **9(10)**:1306-1312
- Di Pasquale G, Chiorini JA (2006)** AAV Transcytosis through Barrier Epithelia and Endothelium. *Mol Ther* **13(3)**:506-516
- Duan D, Li Q, Kao AW, Yue Y, Pessin JE, Engelhardt JF (1999)** Dynamin Is Required for Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Infection. *J Virol* **73(12)**:10371-10376
- Duan D, Yue Y, Yan Z, Yang J, Engelhardt JF (2000)** Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *The Journal of Clinical Investigation* **105(11)**:1573-1587
- Douar AM, Poulard K, Stockholm D, Danos O (2001)** Intracellular Trafficking of Adeno-Associated Virus Vectors: Routing to the Late Endosomal Compartment and Proteasome Degradation. *J Virol* **75(4)**:1824-1833
- Dubielzig R, King JA, Weger S, Kern A, Kleinschmidt JA (1999)** Adeno-Associated Virus Type 2 Protein Interactions: Formation of Pre-Encapsidation Complexes. *J Virol* **73(11)**:8989-8998
- Farr GA, Zhang L, Tattersall P (2005)** Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. *PNAS* **102(47)**:17148-17153
- Farr GA, Cotmore SF, Tattersall P (2006)** VP2 Cleavage and the Leucine Ring at the Base of the Fivefold Cylinder Control pH-Dependent Externalization of both the VP1 N Terminus and the Genome of Minute Virus of Mice. *J Virol* **80(1)**:161-171
- Fayard JM, Tessier C, Pageaux JF, Lagarde M, Laugier C (1998)** Nuclear location of PLA₂-I in proliferative cells. *J Cell Sci* **111**:985-994
- Feng DM, Chen JZ C, Yue YB, Zhu HZ, Xue JL, Jia W WG (2006)** A 16 bp Rep Binding Element is Sufficient for Mediating Rep-dependent Integration into AAVS1. *J Mol Biol* **358**:38-45
- Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ (1996)** Second-Strand Synthesis Is a Rate-Limiting Step for Efficient Transduction by Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors. *J Virol* **70(5)**:3227-3234
- Fisher KJ, Gao GP, Weitzman MD, DeMatteo R, Burda JF, Wilson JM (1996)** Transduction with Recombinant Adeno-Associated Virus for Gene Therapy Is Limited by Leading-Strand Synthesis. *J Virol* **70(1)**:520-532
- Fricker M, Hollinshead M, White N, Vaux D (1997)** Interphase Nuclei of Many Mammalian Cell Types Contain Deep, Dynamic, Tubular Membrane-bound Invaginations of the Nuclear Envelope. *J Cell Biol* **136(3)**:531-544
- Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM (2002)** Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *PNAS* **99(18)**:11854-11859
- Gao GP, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM (2004)** Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues. *J Virol* **78(12)**:6381-6388
- Gastadelli M, Imelli N, Boucke K, Amstutz B, Meier O, Greber UF (2008)** Infectious Adenovirus Type 2 Transport Through Early but not Late Endosomes. *Traffic* **Epub ahead of print**
- Georg-Fries B, Biederlack S, Wolf J, zur Hausen H (1984)** Analysis of Proteins, Helper Dependence, and Seroepidemiology of a New Human Parvovirus. *Virology* **134**:64-71
- Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV (1998)** Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Curr Biol* **8**:1335-1338

- Gerasimenko O, Tepikin A (2005)** How to measure Ca^{2+} in cellular organelles?. *Cell Calcium* **38**:201-211
- Girod A, Ried M, Wobus C, Lahm H, Leike K, Kleinschmidt J, Deléage G, Hallek M (1999)** Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nature Medicine* **5(9)**:1052-1056
- Girod A, Wobus CE, Zádori Z, Ried M, Leike K, Tijssen P, Kleinschmidt JA, 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** :973-978
- Gisou van der Goot F, Gruenberg J (2006)** Intra-endosomal membrane traffic. *TRENDS in Cell Biology* **16(10)**:514-521
- Glotzer JB, Michou AI, Baker A, Saltik M, Cotten M (2001)** Microtubule-Independent Motility and Nuclear Targeting of Adenoviruses with Fluorescently Labeled Genomes. *J Virol* **75(5)**:2421-2434
- Greber UF, Willets M, Webster P, Helenius A (1993)** Stepwise Dismantling of Adenovirus 2 during Entry into Cells. *Cell* **75**:477-486
- Greber UF, Webster P, Weber J, Helenius A (1996)** The role of the adenovirus protease in virus entry into cells. *EMBO J* **15(8)**:1766-1777
- Greber UF, Suomalainen M, Stidwill RP, Boucke K, Ebersold MW, Helenius A (1997)** The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J* **16(19)**:5998-6007
- Greber UF (1998)** Virus Assembly and Disassembly:the Adenovirus Cysteine Protease as a Trigger Factor. *Rev Med Virol* **8**:213-222
- Greber UF (2002)** Signalling in viral entry. *Cell Mol Life Sci* **59**:608-626
- Grieger JC, Snowdy S, Samulski RJ (2006)** Separate Basic Region Motifs within the Adeno-Associated Virus Capsid Proteins Are Essential for Infectivity and Assembly. *J Virol* **80(11)**:5199-5210
- Grieger JC, Johnson JS, Gurda-Whitaker B, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ (2007)** Surface-Exposed Adeno-Associated Virus Vp1-NLS Capsid Fusion Protein Rescues Infectivity of Noninfectious Wild-Type Vp2/Vp3 and Vp3-Only Capsids but Not That of Fivefold Pore Mutant Virions. *J Virol* **81(15)**:7833-7843
- Grimm D, Kay MA (2003)** From Virus Evolution to Vector Revolution: Use of Naturally Occurring Serotypes of Adeno-associated Virus (AAV) as Novel Vectors for Human Gene Therapy. *Curr Gene Ther* **3**:281-304
- Haas U, Podda M, Behne M, Gurrieri S, Alonso A, Fürstenberger G, Pfeilschifter J, Lambeau G, Gelb MH, Kaszkin M (2004)** Characterization and Differentiation-dependent Regulation of Secreted Phospholipase A₂ in Human Keratinocytes and in Healthy and Psoriatic Human Skin. *J Invest Dermatol* **124**:204-211
- Hacker UT, Wingenfeld L, Kofler DM, Schuhmann NK, Lutz S, Herold T, King SB, Gerner FM, Perabo L, Rabinowitz J, McCarty DM, Samulski RJ, Hallek M, Büning H (2005)** Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency. *J Gene Med* **7(11)**:1429-1438
- Halbert CL, Allen JM, Miller AD (2001)** Adeno-Associated Virus Type 6 (AAV6) Vectors Mediate Efficient Transduction of Airway Epithelial Cells in Mouse Lungs Compared to That of AAV2 Vectors. *J Virol* **75(14)**:6615-6624

- Hanahan D (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166(4)**:557-580
- Hanasaki K, Arita H (1992)** Characterization of a High Affinity Binding Site for Pancreatic-type Phospholipase A₂ in the Rat. *J Biol Chem* **267(9)**:6414-6420
- Hansen J, Qing K, Srivastava A (2001a)** Adeno-Associated Virus Type 2-Mediated Gene Transfer: Altered Endocytic Processing Enhances Transduction Efficiency in Murine Fibroblasts. *J Virol* **75(9)**:4080-4090
- Hansen J, Qing K, Srivastava A (2001b)** Infection of Purified Nuclei by Adeno-associated Virus 2. *Mol Ther* **4(4)**:289-296
- Hauswirth WW, Berns KI (1977)** Origin and termination of adeno-associated virus DNA replication. *Virology* **78(2)**:488-499
- Helber N, Requena N (2007)** Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **177**:537-548
- Hermonat PL (1989)** The adeno-associated virus Rep78 gene inhibits cellular transformation induced by bovine papillomavirus. *Virology* **172(1)**:253-261
- Hildinger M, Auricchio A, Gao G, Wang L, Chirmule N, Wilson JM (2001)** Hybrid vectors based on adeno-associated virus serotypes 2 and 5 for muscle-directed gene transfer. *J Virol* **75(13)**:6199-6203
- Hindley CE, Lawrence FJ, Matthews DA (2007)** A Role for Transportin in the Nuclear Import of Adenovirus Core Proteins and DNA. *Traffic* **8**:1313-1322
- Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP (1966)** Studies of small DNA Viruses found in various Adenovirus Preparations: Physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* **55(6)**:1467-1474
- Hoque M, Ishizu KI, Matsumoto A, Han SI, Arisaka F, Takayama M, Suzuki K, Kato K, Kanda T, Watanabe H, Handa H (1999)** Nuclear Transport of the Major Capsid Protein Is Essential for Adeno-Associated Virus Capsid Formation. *J Virol* **73(9)**:7912-7915
- Hosang M (1988)** Characterization of a platelet-derived growth factor receptor on Swiss 3T3 cells by affinity crosslinking. *J Recept Res* **8(1-4)**:455-466
- Im D-S, Muzyczka N (1990)** The AAV Origin Binding Protein Rep68 Is an ATP-Dependent Site-Specific Endonuclease with DNA Helicase Activity. *Cell* **61**:447-457
- Im D-S, Muzyczka N (1992)** Partial Purification of Adeno-Associated Virus Rep78, Rep52, and Rep40 and Their Biochemical Characterization. *J Virol* **66(2)**:1119-1128
- Imelli N, Meier O, Boucke K, Hemmi S, Greber UF (2004)** Cholesterol Is Required for Endocytosis and Endosomal Escape of Adenovirus Type 2. *J Virol* **78(6)**:3089-3098
- Ingber DE (2003)** Mechanosensation through integrins: Cells act locally but think globally. *PNAS* **100(4)**:1472-1474
- Jayandharan GR, Zhong L, Li B, Kachniarz B, Srivastava A (2008)** Strategies for improving the transduction efficiency of single-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Therapy* **15**:1287-1293
- Jennings K, Miyamae T, Traister R, Marinov A, Katakura S, Sowders D, Trapnell B, Wilson JM, Gao G, Hirsch R (2005)** Proteasome Inhibition Enhances AAV-Mediated Transgene Expression in Human Synoviocytes *in Vitro* and *in Vivo*. *Mol Ther* **11(4)**:600-607

- Kaiser E, Chiba P, Zaky K (1990)** Phospholipases in Biology and Medicine. *Clin Biochem* **23**:349-370
- Kaludov N, Brown KE, Walters RW, Zabner J, Chiorini JA (2001)** Adeno-Associated Virus Serotype 4 (AAV4) and AAV5 Both Require Sialic Acid Binding for Hemagglutination and Efficient Transduction but Differ in Sialic Acid Linkage Specificity. *J Virol* **75(15)**:6884-6893
- Kapeller R, Cantley LC (1994)** Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays* **16(8)**:565-576
- Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K, Hirai Y, Shimada T, Matsumoto K, Nakumara T, Watanabe M, Oshimi K, Daida H (2005)** Hepatocyte Growth Factor Receptor Is a Coreceptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Infection. *J Virol* **79(1)**:609-614
- Katz RA, Greger JG, Darby K, Boimel P, Rall GF, Skalka AM (2002)** Transduction of Interphase Cells by Avian Sarcoma Virus. *J Virol* **76(11)**:5422-5434
- Kelkar S, De BP, Gao GP, Wilson JM, Crystal RG, Leopold PL (2006)** A Common Mechanism for Cytoplasmic Dynein-Dependent Microtubule Binding Shared among Adeno-Associated Virus and Adenovirus Serotypes. *J Virol* **80(15)**:7781-7785
- Kempka G, Kolb-Bachofen V (1988)** Binding, Uptake, and Transcytosis of Ligands for Mannose-Specific Receptors in Rat Liver: An Electron Microscopic Study. *Experimental Cell Research* **176**:38-48
- Kern A, Schmidt K, Leder C, Müller OJ, Wobus CE, Bettinger K, von der Lieth CW, King JA, Kleinschmidt JA (2003)** Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids. *J Virol* **77(20)**:11072-11081
- Kim KP, Rafter JD, Bittova L, Han SK, Snitko Y, Munoz NM, Leff AR, Cho W (2001)** Mechanism of Human Group V Phospholipase A₂ (PLA₂)-induced Leukotriene Biosynthesis in Human Neutrophils. *J Biol Chem* **276(14)**:11126-11134
- Kim YJ, Kim KP, Rhee HJ, Das S, Rafter JD, Oh YS, Cho W (2002)** Internalized Group V Secretory Phospholipase A₂ Acts on the Perinuclear Membranes. *J Biol Chem* **277(11)**:9358-9365
- King JA, Dubielzig R, Grimm D, Kleinschmidt JA (2001)** DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J* **20(12)**:3282-3291
- Khleif SN, Myers T, Carter BJ, Trempe JP (1991)** Inhibition of cellular transformation by the adeno-associated virus rep gene. *Virology* **181(2)**:738-741
- Koch GL (1990)** The endoplasmic reticulum and calcium storage. *Bioessays* **12**:527-531
- Kotin RM, Linden RM, Berns KI (1992)** Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J* **11(13)**:5071-5078
- Kyöstiö SRM, Owens RA, Weitzman MD, Antoni BA, Chejanovsky N, Carter BJ (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(5)**:2947-2957
- Kronenberg S, Kleinschmidt JA, Böttcher B (2001)** Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids. *EMBO reports* **2(11)**:997-1002
- Kronenberg S, Böttcher B, von der Lieth CW, Bleker S, Kleinschmidt JA (2005)** A Conformational Change in the Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Leads to the Exposure of Hidden VP1 N Termini. *J Virol* **79(9)**:5296-5303
- Kudo I (2004)** Diversity of Phospholipase A₂ Enzymes. *Biol Pharm Bull* **27(8)**:1157

- Lambeau G, Schmid-Alliana A, Lazdunski M, Barhanin J (1990)** Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A₂ in skeletal muscle. *J Biol Chem* **265(16)**:9526-9532
- Lambeau G, Lazdunski M (1999)** Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. *Trends Pharmacol Sci* **20**:162-170
- Lee DH, Goldberg AL (1998)** Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends in Cell Biology* **8**:397-403
- Leopold PL, Kreitzer G, Miyazawa N, Rempel S, Pfister KK, Rodriguez-Boulan E, Crystal RG (2000)** Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum Gene Ther* **11(1)**:151-165
- Li E, Stupack D, Klemke R, Cheresch DA, Nemerow GR (1998a)** Adenovirus Endocytosis via α V Integrins Requires Phosphoinositide 3-OH Kinase. *J Virol* **72(3)**:2055-2061
- Li E, Stupack D, Bokoch GM, Nemerow GR (1998b)** Adenovirus Endocytosis Requires Actin Cytoskeleton Reorganization Mediated by Rho Family GTPases. *J Virol* **72(11)**:8806-8812
- Li E, Stupack DG, Brown SL, Klemke R, Schlaepfer DD, Nemerow GR (2000)** Association of p130^{CAS} with Phosphatidylinositol-3-OH Kinase Mediates Adenovirus Cell Entry. *J Biol Chem* **275(19)**:14729-14735
- Li E, Brown SL, Stupack DG, Puente XS, Cheresch DA, Nemerow GR (2001)** Integrin α V β 1 Is an Adenovirus Coreceptor. *J Virol* **75(11)**:5405-5409
- Linden RM, Winocour E, Berns KI (1996a)** The recombinant signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:7966-7992
- Linden RM, Ward P, Giraud C, Winocour E, Berns KI (1996b)** Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:11288-11294
- Lippincott-Schwartz J, Yuan L, Tipper C, Amherdt M, Orci L, Klausner RD (1991)** Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* **67(3)**:601-616
- Longva KE, Blystad FD, Stang E, Larsen AM, Johannessen LE, Madhus IH (2002)** Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Chem Biol* **156(5)**:843-854
- Lusby EW, Berns KI (1982)** Mapping of the 5' Termini of Two Adeno-Associated Virus 2 RNAs in the Left Half of the Genome. *J Virol* **41(2)**:518-526
- Lux K, Goerlitz N, Schlemminger S, Perabo L, Goldnau D, Endell J, Leike K, Kofler DM, Finke S, Hallek M, Buening H (2005)** Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. *J Virol* **79(18)**:11776-11787
- Lux K (2006)** Visualization of the intracellular trafficking of incoming Adeno-associated virus type 2. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwigs-Maximilians-Universität München
- Mani B, Baltzer C, Valle N, Almendral JM, Kempf C, Ros C (2006)** Low pH-Dependent Endosomal Processing of the Incoming Parvovirus Minute Virus of Mice Virion Leads to Externalization of the VP1 N-Terminal Sequence (N-VP1), N-VP2 Cleavage, and Uncoating of the Full-Length Genome. *J Virol* **80(2)**:1015-1024
- Mayor HD, Jamison RM, Jordan LE, Melnick JL (1965)** Structure and Composition of a Small Particle Prepared from a Simian Adenovirus. *Journal of Bacteriology* **90(1)**:235-242

- McCarty DM, Pereira DJ, Zolotukhin I, Zhou X, Ryan JH, Muzyczka N (1994a)** Identification of Linear DNA Sequences That Specifically Bind the Adeno-Associated Virus Rep Protein. *J Virol* **68(8)**:4988-4997
- McCarty DM, Ryan JH, Zolotukhin S, Zhou X, Muzyczka N (1994b)** Interaction of the Adeno-Associated Virus Rep Protein with a Sequence within the A Palindrome of the Viral Terminal Repeat. *J Virol* **68(8)**:4998-5006
- McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M, Hope TJ (2002)** Visualization of the intracellular behaviour of HIV in living cells. *J Cell Biol* **159(3)**:441-452
- McPherson RA, Rosenthal LJ, Rose JA (1985)** Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated replication. *Virology* **147(1)**:217-222
- Meier O, Boucke K, Hammer SV, Keller S, Stidwill RP, Hemmi S, Greber UF (2002)** Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol* **158(6)**:1119-1131
- Melnick JL, Mayor HD, Smith KO, Rapp F (1965)** Association of 20-Millimicron Particles with Adenoviruses. *Journal of Bacteriology* **90(1)**:271-274
- Menteyne A, Burdakov A, Charpentier G, Petersen OH, Cancela JM (2006)** Generation of Specific Ca^{2+} Signals from Ca^{2+} Stores and Endocytosis by Differential Coupling to Messengers. *Curr Biol* **16**:1931-1937
- Miao CH, Nakai H, Thompson AR, Storm TA, Chiu W, Snyder RO, Kay MA (2000)** Nonrandom Transduction of Recombinant Adeno-Associated Vectors in Mouse Hepatocytes In Vivo: Cell Cycling Does Not Influence Hepatocyte Transduction. *J Virol* **74(8)**:3793-3803
- Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T (2004)** Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* **330(2)**:375-383
- Mounier CM, Ghomashchi F, Lindsay MR, James S, Singer AG, Parton RG, Gelb MH (2004)** Arachidonic Acid Release from Mammalian Cells Transfected with Human Groups IIA and X Secreted Phospholipase A_2 Occurs Predominantly during Secretory Process and with the Involvement of Cytosolic Phospholipase A_2 - α . *J Biol Chem* **279(24)**:25024-25038
- Mukhopadhyay D, Riezman H (2007)** Proteasome-Independent Functions of Ubiquitin in Endocytosis and Signaling. *Science* **315**:201-205
- Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Yamamoto S, Kuwata H, Kudo I (1999)** Functional Association of Type IIA Secretory Phospholipase A_2 with the Glycosylphosphatidylinositol-anchored Heparan Sulfate Proteoglycan in the Cyclooxygenase-2-mediated Delayed Prostanoid-biosynthetic Pathway. *J Biol Chem* **274(42)**:29927-29936
- Murakami M, Nakatani Y, Kuwata H, Kudo I (2000)** Cellular components that functionally interact with signaling phospholipase A_2 s. *Biochim Biophys Acta* **1488**:159-166
- Murakami M, Koduri RS, Enomoto A, Shimbara S, Seki M, Yoshihara K, Singer A, Valentin E, Ghomashchi F, Lambeau G, Gelb MH, Kudo I (2001)** Distinct Arachidonate-releasing Functions of Mammalian Secreted Phospholipase A_2 s in Human Embryonic Kidney 293 and Rat Mastocytoma RBL-2H3 Cells through Heparan Sulfate Shuttling and External Plasma Membrane Mechanisms. *J Biol Chem* **276(13)**:10083-10096
- Murakami M, Kudo I (2002)** Phospholipase A_2 . *J Biochem* **131**:285-292
- Murakami M, Kudo I (2003)** New phospholipase A_2 isozymes with a potential role in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **14**:431-436

- Murakami M, Kudo I (2004a)** Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res* **43(1)**:3-35
- Murakami M, Kudo I (2004b)** Diversity of Phospholipase A₂. *Biol Pharm Bull* **27(8)**:1158-1164
- Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu SI, Nara Y, Kay MA (2002)** Unrestricted Hepatocyte Transduction with Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vectors in Mice. *J Virol* **76(2)**:214-224
- Nakai H, Fuess S, Thomas CE, Storm TA, Fuess S, Powell S, Wright JF, Kay MA (2005)** A Limited Number of Transducible Hepatocytes Restricts a Wide-Range Linear Vector Dose Response in Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Liver Transduction. *J Virol* **79(1)**:11343-11349
- Nakano MY, Boucke K, Suomalainen M, Stidwill RP, Greber UF (2000)** The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. *J Virol* **74(15)**:7085-7095
- Nam HJ, Gurda-Whitaker B, Gan WY, Ilaria S, McKenna R, Mehta P, Alvarez RA, Agbandje-McKenna M (2006)** Identification of the Sialic Acid Structures Recognized by Minute Virus of Mice and the Role of Binding Affinity in Virulence Adaption. *J Biol Chem* **281(35)**:25670-25677
- Neerincx AH (2007)** Herstellung von rekombinanten, Kapsid-markierten AAV-Vektoren zur Visualisierung viraler Infektionen. Bachelor-Arbeit, Klinik für Neurologie und Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln
- Nielsen E, Severin F, Backer JM, Hyman AA, Zerial M (1999)** Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature Cell Biology* **1**:376-382
- Nikles D, Vana K, Gauczynski S, Knetsch H, Ludewigs H, Weiss S (2008)** Subcellular localization of prion proteins and the 37 kDa/67 kDa laminin receptor fused to fluorescent proteins. *Biochim Biophys Acta* **1782(5)**:335-340
- Opie SR, Warrington Jr. KH, Agbandje-McKenna M, Zolotukhin S, 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(12)**:6995-7006
- Pajusola K, Gruchala M, Joch H, Lüscher TF, Ylä-Herttuala S, Büeler H (2002)** Cell-Type-Specific Characteristics Modulate the Transduction Efficiency of Adeno-Associated Virus Type 2 and Restrain Infection of Endothelial Cells. *J Virol* **76(22)**:11530-11540
- Panté N, Kann M (2002)** Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of ~39 nm. *Molecular Biology of the Cell* **13**:425-434
- Parker JS, Perrish CR (2000)** Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol* **74(4)**:1919-1930
- Parks WP, Green M, Pina M, Melnick JL (1967)** Physicochemical Characterization of Adeno-associated Satellite Virus Type 4 and Its Nucleic Acid. *J Virol* **1(5)**:980-987
- Parsons JT (1996)** Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **8**:146-152
- Patrat C, Serres C, Jouannet P (2000)** The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell* **92(3-4)**:255-266
- Pedrali-Noy G, Spadai S, Miller-Faurès A, Miller AOA, Truppa J, Koch G (1980)** Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase α with aphidicolin. *Nucleic Acids Research* **8(2)**:377-387

- Pelham HRB (1991)** Multiple Targets for Brefeldin A. *Cell* **67**:449-451
- Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A (2001)** Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biol* **3**:473-483
- Pereira DJ, McCarty DM, Muzyczka N (1997)** The Adeno-Associated Virus (AAV) Rep Protein Acts as both a Repressor and an Activator To Regulate AAV Transcription during a Productive Infection. *J Virol* **71**(2):1079-1088
- Philpott NJ, Giraud-Wali C, Dupuis C, Gomos J, Hamilton, Berns KI, Falck-Pedersen E (2002a)** Efficient Integration of Recombinant Adeno-Associated Virus DNA Vectors Requires a p5-*rep* Sequence in *cis*. *J Virol* **76**(11):5411-5421
- Philpott NJ, Gomos J, Berns KI, Falck-Pedersen E (2002b)** A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19. *PNAS USA* **99**(19):12381-12385
- Pillay CS, Elliot E, Dennison C (2002)** Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* **363**:417-429
- Piper RC, Luzio JP (2001)** Late Endosomes; Sorting and Partitioning in Multivesicular Bodies. *Traffic* **2**:612-621
- Prchla E, Plank C, Wagner E, Blaas D, Fuchs R (1995)** Virus-mediated Release of Endosomal Content In Vitro: Different Behavior of Adenovirus and Rhinovirus Serotype 2. *J Cell Biol* **131**(1):111-123
- Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A (1999)** Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nature medicine* **5**(1):71-77
- Qiu J, Brown KE (1999)** A 110-kDa Nuclear Shuttle Protein, Nucleolin, Specifically Binds to Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV-2) Capsid. *Virology* **257**:373-382
- Qiu J, Pintel DJ (2002)** The Adeno-Associated Virus Type 2 Rep Protein Regulates RNA Processing via Interaction with the Transcription Template. *Mol Cell Biol* **22**(11):3639-3652
- Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ (2002)** Cross-Packaging of a Single Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Vector Genome into Multiple AAV Serotypes Enables Transduction with Broad Specificity. *J Virol* **76**(2):791-801
- Raj K, Ogston P, Beard P (2001)** Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. *Nature* **412**:914-917
- Ramasamy I (2006)** Recent advances in physiological calcium homeostasis. *Clin Chem Lab Med* **44**(3):237-273
- Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML (2003)** Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* **80**(1-2):148-158
- Rauma T, Tuukkanen J, Bergelson JM, Denning G, Hautala T (1999)** rab5 GTPase Regulates Adenovirus Endocytosis. *J Virol* **73**(11):9664-9668
- Redemann BE, Mendelson E, Carter BJ (1989)** Adeno-Associated Virus Rep Protein Synthesis during Productive Infection. *J Virol* **63**(2):873-882
- Ren M, Xu G, Zeng J, De Lemos-Chiarandini, Adesnik M, Sabatini DD (1998)** Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *PNAS USA* **95**:6187-6192

- Richardson WD, Westphal H (1981)** A cascade of adenovirus early functions is required for expression of adeno-associated virus. *Cell* **27(1 Pt 2)**:133-141
- Rodríguez E, Everitt E (1996)** Adenovirus Uncoating and Nuclear Establishment Are Not Affected by Weak Base Amines. *J Virol* **70(6)**:3470-3477
- Roelvink PW, Lizonova A, Lee JGM, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW, Brough DE, Kovessi I, Wickham TJ (1998)** The Coxsackie-Adenovirus Receptor Protein Can Function as Cellular Attachment Protein for Adenovirus Serotypes from Subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* **72(10)**:7909-7915
- Ros C, Kempf C (2004)** The ubiquitin-proteasome machinery is essential for nuclear translocation of incoming minute virus of mice. *Virology* **324(2)**:350-360
- Ros C, Gerber M, Kempf C (2006)** Conformational Changes in the VP1-Unique Region of Native Human Parvovirus B19 Lead to Exposure of Internal Sequences That Play a Role in Virus Neutralization and Infectivity. *J Virol* **80(24)**:12017-12024
- Rutledge EA, Halbert CL, Russell DW (1998)** Infectious Clones and Vectors Derived from Adeno-Associated Virus (AAV) Serotypes Other Than AAV Type 2. *J Virol* **72(1)**:309-319
- Sampaio KL, Cavignac Y, Stierhof YD, Sinzger C (2005)** Human Cytomegalievirus Labeled with Green Fluorescent Protein for Live Analysis of Intracellular Particle Movements. *J Virol* **79(5)**:2754-2767
- Samulski RJ, Chang LS, 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(10)**:3096-3101
- Sanlioglu S, Benson PK, Yang J, Atkinson EM, Reynolds T, Engelhardt JF (2000)** Endocytosis and Nuclear Trafficking of Adeno-Associated Virus Type 2 Are Controlled by Rac1 and Phosphatidylinositol-3-Kinase Activation. *J Virol* **74(19)**:9184-9416
- Schaloske RH, Dennis EA (2006)** The phospholipase A₂ superfamily and its group system. *Biochim Biophys Acta* **1761**:1246-1259
- Schlehofer JR, Ehrbar M, zur Hausen H (1986)** Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helper virus dependent parvovirus. *Virology* **152(1)**:110-117
- Schmidt M, Voutetakis A, Afione S, Zheng C, Mandikian D, Chiorini JA (2008)** Adeno-Associated Virus Type 12 (AAV12): a Novel AAV Serotype with Sialic Acid- and Heparan Sulfate Proteoglycan-Independent Transduction Activity. *J Virol* **82(3)**:1399-1406
- Seiler MP, Miller AD, Zabner J, Halbert CL (2006)** Adeno-Associated Virus Types 5 and 6 Use Distinct Receptors for Cell Entry. *Human Gene Therapy* **17**:10.19
- Seilhamer JJ, Plant S, Pruzanski W, Schilling J, Stefanski E, Vadas P, Johnson LK (1989)** Multiple forms of phospholipase A₂ in arthritic synovial fluid. *J Biochem* **106(1)**:38-42
- Seisenberger G, Ried MU, Endreß T, Büning H, Hallek M, Bräuchle C (2001)** Real-Time Single-Molecule Imaging of the Infection Pathway of an Adeno-Associated Virus. *Science* **294**:1929-1932
- Shu X, Shaner NC, Yarbrough CA, Tsien RY, Remington SJ (2006)** Novel Chromophores and Buried Charges Control Color in mFruits. *Biochemistry* **45(32)**:9639-9647
- Six DA, Dennis EA (2000)** The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* **1488**:1-19

- Sönnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M (2000)** Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* **149**:901-913
- Sonntag F, Bleker S, Leuchs B, Fischer R, Kleinschmidt JA (2006)** Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids with Externalized VP1/VP2 Trafficking Domains Are Generated prior to Passage through the Cytoplasm and Are Maintained until Uncoating Occurs in the Nucleus. *J Virol* **80(22)**:11040-11054
- Srivastava A, Lusby EW, Berns KI (1983)** Nucleotide Sequence and Organization of the Adeno-Associated Virus 2 Genome. *J Virol* **45(2)**:555-564
- Stilwell JL, Samulski RJ (2004)** Role of Viral Vectors and Virion Shells in Cellular Gene Expression. *Mol Ther* **9(3)**:337-346
- Suikkanen S, Antila M, Jaatinen A, Vihinen-Ranta M, Vuento M (2003)** Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology* **316(2)**:267-280
- Summerford C, Samulski RJ (1998)** Membrane-Associated Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Virions. *J Virol* **72(2)**:1438-1445
- Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ (1999)** α V β 5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nature Medicine* **5(1)**:78-82
- Suomalainen M, Nakano MY, Keller S, Boucke K, Stidwill RP, Greber UF (1999)** Microtubule-dependent Plus- and Minus End-directed Motilities Are Competing Processes for Nuclear Targeting of Adenovirus. *J Cell Biol* **144(4)**:657-672
- Suomalainen M, Nakano MY, Boucke K, Keller S, Greber UF (2001)** Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *EMBO J* **20(6)**:1310-1319
- Tapon N, Hall A (1997)** Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* **9**:86-92
- Thomas CE, Storm TA, Huang Z, Kay MA (2004)** Rapid Uncoating of Vector Genomes Is the Key to Efficient Liver Transduction with Pseudotyped Adeno-Associated Virus Vectors. *J Virol* **78(6)**:3110-3122
- Tollefson AE, Scaria A, Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ, Wold WSM (1996)** The Adenovirus Death Protein (E3-11.6K) Is Required at Very Late Stages of Infection for Efficient Cell Lysis and Release of Adenovirus from Infected Cells. *J Virol* **70(4)**:2296-2306
- Trahair TN, Alexander IE, Rowe PB, Smythe JA (2000)** The adenovirus E4 ORF6 and E1b 55 kDa proteins cooperate in a p53-independent manner to enhance transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Gen Virol* **81** :2983-2991
- Vafaie J, Schwartz RA (2004)** Parvovirus B19 infections. *Int J Dermatol* **43**:747-749
- Van Kerkhof P, Alves dos Santos CM, Sachse M, Klumperman J, Bu G, Strous GJ (2001)** Proteasome Inhibitors Block a Late Step in Lysosomal Transport of Selected Membrane but not Soluble Proteins. *Molecular Biology of the Cell* **12**:2556-2566
- Varga MJ, Weibull C, Everitt E (1991)** Infectious entry pathway of adenovirus type 2. *J Virol* **65(11)**:6061-6070
- Vihinen-Ranta M, Kakkola L, Kalela A, Vilja P, Vuento M (1997)** Characterization of a nuclear localization signal of canine parvovirus capsid proteins. *Eur J Biochem* **250**:389-394

- Vihinen-Ranta M, Wang D, Weichert WS, Parrish CR (2002)** The VP1 N-Terminal Sequence of Canine Parvovirus Affects Nuclear Transport of Capsids and Efficient Cell Infection. *J Virol* **76(4)**:1884-1891
- Vogel WC, Zieve L (1960)** A Lecithinase A In Duodenal Contents Of Man. *J Clin Invest* **39**:1295-1301
- Walters RW, Yi SMP, Keshavjee S, Brown KE, Welsh MJ, Chiorini JA, Zabner J (2001)** Binding of Adeno-associated Virus Type 5 to 2,3-Linked Sialic Acid Is Required for Gene Transfer. *The Journal of Biological Chemistry* **276(23)**:20610-20616
- Wang K, Huang S, Kapoor-Munshi A, Nemerow G (1998)** Adenovirus Internalization and Infection Require Dynamin. *J Virol* **72(4)**:3455-3458
- Wang X, Bergelson JM (1999)** Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Cytoplasmic and Transmembrane Domains Are Not Essential for Coxsackie and Adenovirus Infection. *J Virol* **73(3)**:2559-2562
- Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, Chen C, Li J, Xiao X (2005)** Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nature Biotech* **23(3)**:321-328
- Warrington KH, Gorbatyuk OS, Harrison JK, Opie SR, Zolotukhin S, Muzyczka N (2004)** Adeno-associated virus type 2 VP2 capsid protein is nonessential and can tolerate large peptide insertions at its N terminus. *J Virol* **78(12)**:6595-6609
- Weber J (1976)** Genetic Analysis of Adenovirus Type 2. *J Virol* **17(2)**:462-471
- Weitzman MD, Kyöstiö SRM, Kotin RM, Owens RA (1994)** Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:5808-5812
- Whalen SG, Marcellus RC, Whalen A, Ahn NG, Ricciardi RP, Branton PE (1997)** Phosphorylation within the transactivation domain of adenovirus E1A protein by mitogen-activated protein kinase regulates expression of early region 4. *J Virol* **71(5)**:3545-3553
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR (1993)** Integrins $\alpha_v\beta_3$ $\alpha_v\beta_5$ Promote Adenovirus Internalization but Not Virus Attachment. *Cell* **73**:309-319
- Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L, Nemerow GR (2005)** Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption following Capsid Disassembly. *J Virol* **79(4)**:1992-2000
- Wistuba A, Weger S, Kern A, Kleinschmidt JA (1995)** Intermediates of Adeno-Associated Virus Type 2 Assembly: Identification of Soluble Complexes Containing Rep and Cap Proteins. *J Virol* **69(9)**:5311-5319
- Wistuba A, Kern A, Weger S, Grimm D, Kleinschmidt JA (1997)** Subcellular Compartmentalization of Adeno-Associated Virus Type 2 Assembly. *J Virol* **71(2)**:1341-1352
- Wodrich H, Cassany A, D'Angelo MA, Guan T, Nemerow G, Gerace L (2006)** Adenovirus Core Protein pVII Is Translocated into the Nucleus by Multiple Import Receptor Pathways. *J Virol* **80(19)**:9608-9618
- Wu P, Xiao W, Conlon T, Hughes J, Agbandje-McKenna M, Ferkol T, Flotte T, 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(18)**:8635-8647
- Wu Z, Miller E, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ (2006)** $\alpha_{2,3}$ and $\alpha_{2,6}$ N-Linked Sialic Acids Facilitate Efficient Binding and Transduction by Adeno-Associated Virus Type 1 and 6. *J Virol* **80(18)**:9093-9103

- Xiao X, Li J, Samulski RJ (1998)** Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in the Absence of Helper Adenovirus. *J Virol* **72(3)**:2224-2232
- Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM (1999)** Gene Therapy Vectors Based on Adeno-Associated Virus Type 1. *J Virol* **73(5)**:3994-4003
- Xiao W, Warrington Jr. KH, Hearing P, Hughes J, Muzyczka N (2002)** Adenovirus-Facilitated Nuclear Translocation of Adeno-Associated Virus Type 2. *J Virol* **76(22)**:11505-11517
- Yakobson B, Koch T, Winocour E (1987)** Replication of Adeno-Associated Virus in Synchronized Cells without the Addition of a Helper Virus. *J Virol* **61(4)**:972-981
- Yakobson B, Hrynko TA, Peak MJ, Winocour E (1989)** Replication of Adeno-Associated Virus in Cells Irradiated with UV Light at 254 nm. *J Virol* **63(3)**:1023-1030
- Yalkinoglu AÖ, Heilbronn R, Bürkle A, Schlehofer JR, zur Hausen H (1988)** DNA Amplification of Adeno-associated Virus as a Response to Cellular Genotoxic Stress. *Cancer Research* **48**:3123-3129
- Yan Z, Zak R, Luxton GWG, Ritchie TC, Bantel-Schaal U, Engelhardt JF (2002)** Ubiquitination of both Adeno-Associated Virus Type 2 and 5 Capsid Proteins Affects the Transduction Efficiency of Recombinant Vectors. *J Virol* **76(5)**:2043-2053
- Yan Z, Zak R, Zhang Y, Ding W, Godwin S, Munson K, Peluso R, Engelhardt JF (2004)** Distinct Classes of Proteasome-Modulating Agents Cooperatively Augment Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 and Type 5-Mediated Transduction from the Apical Surfaces of Human Airway Epithelia. *J Virol* **78(6)**:2863-2874
- Yang Q, Mamounas M, Yu G, Kennedy S, Leaker B, Merson J, Wong-Staal F, Yu M, Barber JR (1998)** Development of novel cell surface CD34-targeted recombinant adenoassociated virus vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* **9(13)**:1929-1937
- Yea C, Dembowy J, Pacione L, Brown M (2007)** Microtubule-Mediated and Microtubule-Independent Transport of Adenovirus Type 5 in HEK293 Cells. *J Virol* **81(13)**:6889-6908
- Zabner J, Seiler M, Walters R, Kotin RM, Fulgeras W, Davidson BL, Chiorini JA (2000)** Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol* **74(8)**:3852-3858
- Zádori Z, Szelei J, Lacoste MC, Li Y, Gariépy S, Raymond P, Allaire M, Nabi IR, Tijssen P (2001)** A Viral Phospholipase A₂ Is Required for Parvovirus Infectivity. *Developmental Cell* **1**:291-302
- Zhou X, Zolotukhin I, Im D-S, Muzyczka N (1999)** Biochemical Characterization of Adeno-Associated Virus Rep68 DNA Helicase and ATPase Activities. *J Virol* **73(2)**:1580-1590
- Zvaritch E, Lambeau G, Lazdunski M (1996)** Endocytotic Properties of the M-type 180-kDa Receptor for Secretory Phospholipases A₂. *J Biol Chem* **271(1)**:250-257

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau PD Dr. Hildegard Büning betreut worden.

Köln, den

.....