

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

**Entwicklung eines Gentherapievektors für humane
pulmonal-vaskuläre Endothelzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Joelle Camilla Korte
aus Hamburg

Hamburg 2023

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 06.02.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Maike Frye

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Hans F. E. Klose

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
1 Arbeitshypothese	5
2 Einleitung	6
2.1 Pulmonalerterielle Hypertonie	6
2.2 Genterapie	6
2.3 Vasculäres Endothelium als therapeutische Zielstruktur	7
2.4 Biologie des Adeno-assoziierten Virus	8
2.4.1 Genom und Proteine.....	9
2.4.2 Kapsid.....	11
2.4.3 Replikation.....	11
2.4.4 Bedeutung des Helfervirus.....	12
2.4.5 Rezeptoren und Tropismus.....	12
2.4.6 Intrazellulärer Transport.....	14
2.5 Das AAV als genterapeutischer Vektor	15
2.5.1 Entwicklung und Charakterisierung.....	15
2.5.2 Limitationen des AAV-Vektorsystems.....	17
2.6 Randomisierte AAV-Peptidbanken	17
2.6.1 Selektionen von AAV-Peptidbanken in Vorarbeiten.....	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Laborgeräte.....	20
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	22
3.1.3 Chemikalien.....	22
3.1.4 Zellen.....	22
3.1.4.1 Eukaryotische Zellen.....	22
3.1.4.2 Prokaryotische Zellen.....	22
3.1.5 Medien und Zusätze für die Kultivierung von Zellen.....	22
3.1.5.1 Eukaryotischer Zellen.....	22
3.1.5.2 Prokaryotischer Zellen.....	23
3.1.6 Molekularbiologische Kits und Gebrauchsfertige Reagenzien.....	24
3.1.7 Enzyme.....	25
3.1.8 Puffer.....	25
3.1.9 Marker und Indikatoren.....	25
3.1.10 Primer.....	26
3.1.11 Plasmide.....	26
3.1.12 Rekombinante AAV-Vektoren.....	27
3.1.13 Software.....	27
3.1.14 Extern bezogene Leistungen.....	28
3.2 Methoden	28
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	28
3.2.1.1 Kultivierung (adhärenter) Zellen.....	28
3.2.1.1.1 Kultivierung von HEK293T.....	28
3.2.1.1.2 Kultivierung von hPMVEC.....	28
3.2.1.1.3 Zellzählung.....	29

3.2.1.1.4	Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen.....	29
3.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	30
3.2.2.1	Isolation von Plasmid-DNA aus E. Coli.....	30
3.2.2.2	Quantifizierung von DNA-Konzentrationen.....	30
3.2.2.3	Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme.....	30
3.2.2.4	Auftrennung verdauter DNA.....	31
3.2.2.5	Agarosegelelektrophorese.....	31
3.2.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten.....	32
3.2.2.6.1	DNA T4 Ligase.....	32
3.2.2.6.2	Instant Sticky-end Ligase Master Mix.....	32
3.2.2.7	Sequenzierung von DNA.....	33
3.2.2.8	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	33
3.2.2.8.1	Standard PCR.....	33
3.2.2.8.2	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	34
3.2.2.9	Ethanol-fällung von DNA.....	35
3.2.3	Mikrobiologische Methoden.....	35
3.2.3.1	Kultivierung von E. coli.....	35
3.2.3.1.1	Kultivierung von E.coli auf Agarplatten.....	35
3.2.3.1.2	Kultivierung von E. coli in der Suspensionskultur.....	35
3.2.3.2	Herstellung kompetenter Bakterien.....	36
3.2.3.2.1	Elektrokompetente E. coli.....	36
3.2.3.2.2	Chemokompetente E. coli.....	37
3.2.3.3	Plasmidtransformation von E. coli.....	37
3.2.3.3.1	Plasmidtransformation durch Elektroporation.....	37
3.2.3.3.2	Plasmidtransformation durch Hitzeschock.....	38
3.2.4	Virologische Methoden.....	38
3.2.4.1	Herstellung von rekombinanten AAV-Vektorpartikeln in HEK293T.....	38
3.2.4.1.1	Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen.....	38
3.2.4.1.1.1	AAV2-rep/cap mit Peptid-kodierendem Insertion.....	39
3.2.4.1.1.2	Adenovirales Helferplasmid pXX6.....	39
3.2.4.1.2	Ernte der rAAV-Vektorpartikel.....	40
3.2.4.1.3	Fällung von AAV-Partikeln mit PEG8000.....	40
3.2.4.1.4	Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation.....	40
3.2.4.2	In vitro-Selektion einer randomisierten AAV2-Peptidbank auf hPMVEC.....	42
3.2.4.2.1	Inkubation der Peptidbank auf den Zielzellen.....	42
3.2.4.2.2	Vorgeschaltete Negativselektion der rAAV-Peptidbank auf HEK293T.....	43
3.2.4.2.2.1	Analyse der in HEK293T internalisierten AAV-DNA.....	43
3.2.4.2.3	Isolation von AAV-DNA aus eukaryotischen Zellen.....	43
3.2.4.2.4	PCR-basierte Amplifikation der AAV-Peptidbank Insertionen.....	44
3.2.4.2.5	Herstellung von sekundären/tertiären AAV-Peptidbanken.....	44
3.2.4.2.5.1	Verdau der Inserts.....	44
3.2.4.2.5.2	Ligation der Peptid-kodierenden Inserts in pMT-202-6.....	44
3.2.4.2.5.3	Transformation elektrokompetenter E. coli mit Peptidbankplasmiden.....	45
3.2.4.2.5.3.1	Testtransformation elektrokompetenter E. coli.....	45
3.2.4.2.5.3.2	Elektroporation im großen Ansatz.....	46
3.2.4.2.5.4	Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen.....	46
3.2.4.2.6	Produktion von Einzelklon-rAAV.....	47
3.2.5	Evaluation rekombinanter AAV-Vektoren.....	48
3.2.5.1	Transduktion von hPMVEC und HEK293T mit rAAV-Vektoren.....	48
3.2.5.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	48
3.2.5.3	Durchflusszytometrie.....	48
3.2.5.4	Statistik.....	48

4 Ergebnisse49

4.1	Analyse der Transduktionseffizienz von im Mausmodell vorselektierten AAV2-Kapsidmutanten auf hPMVEC und HEK293T mittels GFP Reporter-Assay.....	49
4.1.1	Herstellung der rekombinanten Vektoren rAAV2-ML(1-5)-CAG-eGFP.....	49
4.1.2	Genexpression in hPMVEC und HEK293T vermittelt durch rAAV2-ML(1-5)-CAG-eGFP	51

4.2	<i>In vitro</i>-Selektion einer 7mer-AAV2-Peptidbank auf hPMVEC.....	52
4.2.1	Isolation von AAV-DNA aus humanen Zellen nach Transduktion mit der AAV2-Peptidbank...	55
4.2.2	Herstellung der nachfolgenden AAV2-7mer-Peptidbanken.....	56
4.2.3	Anreicherung von AAV2-Kapsidvarianten	58
4.2.3.1	Anreicherung in hPMVEC	59
4.2.3.2	Anreicherung in HEK293T	60
4.3	Analyse der Transduktionseffizienz <i>in vitro</i> selektierter AAV2 Kapsidmutanten auf hPMVEC und HEK293T mittels GFP Reporter-Assay	62
4.3.1	Herstellung der rekombinanten Vektoren rAAV2-hEC(1–5)-CAG-eGFP.....	62
4.3.2	Genexpression in hPMVEC und HEK293T durch rAAV2-hEC(1–5)-CAG-eGFP	65
5	<i>Diskussion</i>.....	67
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	67
5.2	Analyse der Transduktionseffizienz	68
5.2.1	Selektion auf Internalisierungsebene.....	69
5.2.2	Rückschlüsse aus Sequenzierungen auf den Selektionsprozess	70
5.2.3	Auswahl von AAV2-Mutanten für Genexpressionsanalysen.....	70
5.3	Analyse der Transduktionsspezifität.....	72
5.3.1	Selektionsdruck auf Kapsidmutanten durch den Versuchsaufbau.....	72
5.3.2	Selektionsdruck auf Kapsidmutanten in der <i>in vitro</i> -Selektion	73
5.3.3	Einfluss der Negativselektion auf die Spezifität.....	73
5.4	Transgenexpressionsraten selektierter AAV2-Mutanten im Vergleich zum AAV2-Wildtyp.....	75
5.5	Vergleich mit anderen <i>in vitro</i>-Selektionen	75
5.6	Ausblick.....	77
6	<i>Zusammenfassung</i>.....	79
7	<i>Summary</i>	80
	<i>Literaturverzeichnis</i>.....	81
	<i>Danksagung</i>	88
	<i>Lebenslauf</i>.....	<i>Fehler! Textmarke nicht definiert.</i>
	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>.....	90

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Alanin
AAP	assembly activating protein
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AAV2	Adeno-assoziiertes Virus Serotyp 2
AAVR	AAV-Rezeptor
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
c-Met	Hepatocyte Growth Factor Receptor
CREATE	cyclization recombination-based AAV targeted evolution
D	Aspargin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dubecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Glutaminsäure
ECGS	endothelial cell growth supplement
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
F	Phenylalanin
FCS	Fetal Calf Serum
FGFR1	Human Fibroblast Growth Factor Receptor 1
G	Glycin
G	Guanin
gp	genomic particle
GPR108	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 108
H	Histidin
HCAEC	humane coronar-arterielle Endothelzellen
hEC1	NEVRPHA
hEC2	NRVNDHQ
hEC3	DGDWLKA
hEC4	NDRGQAS
hEC5	LATHQTF
HEK	Human Embryonic Kidney
HEK293T	HEK-Zellvariante, die die adenoviralen Gene E1A und E1B und das Simian-Virus 40 T-Antigen exprimiert
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hPMVEC	humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
HUVEC	humane umbilikal-venöse Endothelzellen
I	Isoleucin
ITR	Inverted Terminal Repeat
K	Lysin
KCl	Kaliumchlorid
L	Leucin
LB	Lysogeny Broth
M	Methionin

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ML	murine Lunge
ML1	GIYFSDD
ML2	PRDTHQRQTEAF
ML3	RVPRSEDQVGEG
ML4	QGRGPREDVFQI
ML5	PRDTSQINGQLQ
MOI	Multiplicity of Infection
N	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
O	Pyrrolysin
p	Promotor
P	Prolin
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PBS	phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Prä-mRNA	precursor messenger ribonucleic acids
Q	Glutamin
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
R	Arginin
rAAV	rekombinantes AAV
RBE	Rep-Binding Element
S	Serin
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite Repression
T	Threonin
T	Thymin
TAE	Tris Acetat EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
trs	terminal resolution site
U	Selenocystein
U	Uracil
V	Valin
vg	Virusgenome
VP	Viral Protein
W	Tryptophan
wt	Wildtyp
X	unbekannt
Y	Tyrosin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des AAV-Genoms	10
Abbildung 2: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Peptid/Kapsid-kodierenden Bereiche ML(1–5) der in vivo-selektierten AAV2-Klone	50
Abbildung 3: Transgenexpressionsraten humaner Zellen nach Transduktion mit im in vivo-Mausmodell selektierten rAAV-Vektoren	51
Abbildung 4: Schematische Übersicht der Selektionsansätze A, B und C	54
Abbildung 5: Schematische Darstellung der in vitro-Selektion einer randomisierten AAV2-Peptidbank auf hPMVEC	55
Abbildung 6: Aus humanen Zellen isolierte AAV-DNA nach Inkubation mit der AAV2-Peptidbank	56
Abbildung 7: AAV-rep/cap-Peptidbankplasmide (pMT-202-6) mit intakten ITR	58
Abbildung 8: Aminosäuresequenzen der Kapsid-kodierenden Inserts zufällig gewählter Einzelklone in jeder Selektionsrunde der Selektionsansätze A, B und C	60
Abbildung 9: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Peptid/Kapsid-kodierenden Bereiche der aus HEK293T-isolierten AAV2-Klone	62
Abbildung 10: Analyse des AAV-rep/cap-Backbone-Plasmids von pXX2-187-hEC(1–5)	63
Abbildung 11: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Peptid/Kapsid-kodierenden Bereiche hEC1–5 der in vitro-selektierten AAV2-Klone	64
Abbildung 12: Transgenexpression von eGFP unter der Kontrolle des Promotors CAG in hPMVEC nach Transduktion mit rAAV-Vektoren	65
Abbildung 13: Transgenexpression von eGFP unter der Kontrolle des Promotors CAG in HEK293T nach Transduktion mit rAAV-Vektoren	66
Abbildung 14: Transgenexpressionsraten humaner Zellen nach Transduktion mit rAAV-Vektoren mit Kapsid-kodierenden Peptidinserts	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte	20
Tabelle 2: Eukaryotische Zellen.....	22
Tabelle 3: Prokaryotische Zellen.....	22
Tabelle 4: Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryotischer Zellen	22
Tabelle 5: Zusätze für die Kultivierung prokaryotischer Zellen	23
Tabelle 6: Molekularbiologische Kits und Gebrauchsfertige Reagenzien	24
Tabelle 7: Enzyme	25
Tabelle 8: Puffer	25
Tabelle 9: Marker und Indikatoren.....	25
Tabelle 10: Primer	26
Tabelle 11: Plasmide.....	26
Tabelle 12: Rekombinante AAV-Vektoren	27
Tabelle 13: Software.....	27
Tabelle 14: Externe Leistungen.....	28
Tabelle 15: Herstellung der Vektoren rAAV2-ML(1–5)-CAG-eGFP	50
Tabelle 16: Übersicht über die Selektionsansätze A, B und C.....	57
Tabelle 17: Übersicht über die Negativselektion C auf HEK293T	61
Tabelle 18: Herstellung der Vektoren rAAV2-hEC(1–5)-CAG-eGFP und rAAV2-wt-CAG-eGFP	64

1 Arbeitshypothese

Für viele genetisch bedingte Erkrankungen, wie der familiären pulmonalarteriellen Hypertonie, fehlt es bis heute an kausalen Therapieoptionen. Mittels zielgerichteter Gentherapievektoren lässt sich Nukleinsäure in Zellen transportieren, um fehlerhafte Gene zu reparieren oder zu ersetzen. So lassen sich genetische Krankheiten durch Gentherapie ursächlich heilen. Die pulmonalarterielle Hypertonie entsteht infolge pathologischer Veränderungen der pulmonalen Vaskulatur und geht mit einer endothelialen Dysfunktion einher. Das Adeno-assoziierte Virus (AAV) ist eins der sichersten verfügbaren Vektorsysteme: Es integriert nicht ins Genom seiner Wirtszelle, ist mit keiner Krankheit assoziiert und ist ohne eine zusätzliche Infektion mit einem Helfervirus nicht replikationsfähig. Das AAV zeigt als Wildtyp einen breiten Tropismus, transduziert allerdings nur ineffizient das humane pulmonal-vaskuläre Endothelium. Der unspezifische Tropismus des AAV wird durch die Bindung des viralen Kapsids an ubiquitär exprimierte Zelloberflächenstrukturen bedingt. Indem im Kapsid-kodierenden Bereich des AAV-Genoms zusätzliche Nukleotide eingefügt werden, lassen sich dieser unspezifische Tropismus aufheben und die Viruskapside auf andere zelluläre Zielstrukturen umlenken. In randomisierten AAV-Peptidbanken werden an definierter Position im AAV-Genom für Peptide kodierende zufällige Nukleotidsequenzen eingefügt. An jeder Position des Peptids ist theoretisch jede proteinogene Aminosäure mit gleicher Wahrscheinlichkeit vertreten. So ergibt sich bei einem Peptid der Länge von sieben Aminosäuren eine theoretische Diversität von 20^7 verschiedenen AAV-Kapsiden. Mittels geeigneter Selektionsverfahren in Zielgeweben, lassen sich über mehrere Selektionsrunden unspezifische Mutanten abreichern und zielgerichtete Mutanten anreichern und schließlich isolieren. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte mittels der *in vivo*-Selektion einer randomisierten AAV-Peptidbank eine AAV-Mutante, die das murine pulmonal-vaskuläre Endothelium hoch spezifisch transduziert, isoliert werden (Körbelin et al., 2016c). Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Übertragbarkeit des Tropismus von in der Maus selektierten AAV-Mutanten auf die humane Zellkultur und ferner die *in vitro*-Selektion einer randomisierten AAV2-Peptidbank auf humanen pulmonal-vaskulären Endothelzellen, um einen entsprechend zielgerichteten AAV-Vektor zu isolieren, der zukünftig unter anderem für die weitere Erforschung der pulmonalarteriellen Hypertonie oder für die Entwicklung gentherapeutischer Therapieoptionen genutzt werden kann.

2 Einleitung

2.1 Pulmonalarterielle Hypertonie

Die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) ist eine chronische, progredient verlaufende, derzeit nicht heilbare Erkrankung, bei der sich der Lungengefäßwiderstand, und damit der pulmonal-arterielle Mitteldruck auf über 20 mmHg in Ruhe, erhöht (Simonneau et al., 2019). Zu Beginn der Erkrankung kann der erhöhte Blutdruck im Lungenkreislauf noch durch eine Hypertrophie und Dilatation des rechten Herzens kompensiert werden, bei Dekompensation aber in einer Rechtsherzinsuffizienz oder respiratorischen Insuffizienz resultieren und damit letztlich zum Tod führen (Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Kardiologie und angeborene Herzfehler e.V., 2020). Die Diagnose bedeutet für Betroffene, durch Symptome wie Dyspnoe und geminderte Leistungsfähigkeit, nicht nur eine Beeinträchtigung der Lebensqualität, sondern setzt mit einer 3-Jahres-Überlebensrate von 70–80 % auch die Lebenserwartung herab (Mathai et al., 2016; Gall et al., 2017; Strange et al., 2018). Ist die PAH Folge einer Lungen- oder Herzerkrankung, wie beispielsweise eines angeborenen Herzfehlers, steht die Grunderkrankung im Zentrum der Therapie (Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Kardiologie und angeborene Herzfehler e.V., 2020). Aktuell stehen keine kausalen Therapieoptionen für die hereditären und idiopathischen Formen der PAH, von denen etwa die Hälfte der PAH-Patienten betroffen sind, zur Verfügung (Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Kardiologie und angeborene Herzfehler e.V., 2020; Hoepfer et al., 2016). Bei schweren Verläufen kann eine Herz-Lungen-Transplantation erwogen werden, diese bringt wiederum Komplikationen, resultierend in einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 50 %, mit sich (Zafar et al., 2011). In 70 % der Familien mit hereditärer PAH, und 20 % der Patienten mit idiopathischer PAH, bedingt eine Mutation im Gen des *Bone Morphogenetic Protein Receptor 2* die endotheliale Dysfunktion, die zur PAH führt (Diebold et al., 2015).

2.2 Gentherapie

Gentherapie bezeichnet „die medizinische Methode der Einbringung von Nukleinsäuren (...) in Körperzellen (Gentransfer), um deren Erbgut zu verändern und somit in erster Linie genetisch verursachte Krankheiten zu behandeln“ (Deutsches Referenzzentrum für Ethik in den Biowissenschaften, 2020). „Ein Gentherapeutikum ist ein biologisches Arzneimittel, dessen Wirkstoff eine Nukleinsäure (Träger der Erbinformationen) enthält oder daraus besteht. Es wird eingesetzt, um eine Nukleinsäuresequenz zu regulieren, zu reparieren, zu ersetzen, hinzuzufügen oder zu entfernen. Die therapeutische, prophylaktische oder

diagnostische Wirkung steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der rekombinanten Nukleinsäuresequenz, die es enthält oder mit dem Produkt, das auf Basis dieser genetischen Information gebildet wird“ (Paul-Ehrlich-Institut, 2023).

Für viele genetisch bedingte Erkrankungen, wie der hereditären PAH, fehlt es aktuell an kausalen und damit kurativen Therapieoptionen. Meist erfolgt die Therapie symptomatisch, ohne signifikante Auswirkungen auf die krankheitsbedingte Lebenszeitverkürzung (Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Kardiologie und angeborene Herzfehler e.V., 2020; Gall et al., 2017; Strange et al., 2018). Die Identifikation krankheitsauslösender Mutationen, insbesondere monogener Genese, stellt zukünftige Therapieoptionen in Aussicht: Mittels gentherapeutischer Ansätze lasse sich Nukleinsäure in erkrankte Zellen schleusen und sich so die Expression pathologischer Gene herunterregulieren, prognostisch günstige Gene hochregulieren oder gar die krankheitsauslösende Mutation auf Erbgutebene korrigieren. Gentherapie bietet somit das Potential Krankheiten ursächlich zu heilen (Naso et al., 2017). Viren sind von Natur aus darauf ausgelegt, ihre Erbinformation zur eigenen Replikation in Wirtszellen des lebenden Organismus zu schleusen und werden aus diesem Grund als gentherapeutische Vektorsysteme genutzt. Die Herausforderungen stellen unter anderem die Pathogenität der meisten Viren und deren nicht-zielgerichtete Infektion von Geweben und Organen dar (Buchholz et al., 2015). Der potentielle Nutzen geht über die Heilung angeborener monogener Erkrankungen hinaus: Als Bauplan sämtlicher Proteine könnten mittels gentherapeutischem Transfer von Nukleinsäure auch erworbene Erkrankungen geheilt werden. Grundvoraussetzung an Vektorsysteme ist eine zielgerichtete Wirkung lediglich in erkrankten Zellen, ohne neue Pathologien zu induzieren (Naso et al., 2017). Zurzeit gibt es keinen viralen Vektor für das humane pulmonal-vaskuläre Endothelium, der diese Voraussetzungen erfüllt.

2.3 Vaskuläres Endothelium als therapeutische Zielstruktur

Das vaskuläre Endothelium kleidet das gesamte Gefäßsystem aus und bildet mit einer Gesamtfläche von bis zu 1000 m² die größte Oberfläche des menschlichen Körpers (Hennigs et al., 2021). Es wurde lange unterschätzt und als rein passive Barriere zwischen Blut und Gewebe abgetan (Krüger-Genge et al., 2019). Heute gilt es als, je nach Lokalisation, stark variierendes Organ mit diversen Funktionen. Es ist aktiv an der Sekretion und Absorption metabolisch und endokrin wirksamer Stoffe, der Vasodilatation und -konstriktion, der Regulation von Immunantworten, der Hämostase, der Induktion der

Angiogenese und an Metastasierungsprozessen beteiligt. Je nach Lokalisation im Körper, werden verschiedene funktionale Anforderungen an die lokalen Endothelzellen gestellt, resultierend in jeweils unterschiedlich ausgeprägtem Phänotyp. So unterscheiden sich die extrazelluläre Matrix, die Genexpression, Zelloberflächenstrukturen und zahlreiche weitere biologische Aspekte je nach Organ und Organkompartiment (Hennigs et al., 2021; Krüger-Genge et al., 2019). Eine endotheliale Dysfunktion, sprich eine Störung der physiologischen Zellfunktionen, wird als Pathogenese unter anderem kardiovaskulärer Erkrankungen, wie auch der PAH, angesehen (Krüger-Genge et al., 2019). Endothelzellen unterscheiden sich physiologisch zwischen verschiedenen Organen und sind selbst an Krankheitsprozessen beteiligt. Damit stellen sie eine ideale therapeutische Zielstruktur für Gentherapievektoren dar: Nach intravenöser Applikation würden die Vektorpartikel über die Blutbahn zum entsprechenden Endothelzellverband und darüber zum Zielorgan gelangen können, um lokal ihre Wirkung zu entfalten (Merchan et al., 2008). Zurzeit steht kein Vektor zur Verfügung, der das humane pulmonal vaskuläre Endothelium effizient und spezifisch transduziert. Ein spezifischer Vektor für humane pulmonal mikrovaskuläre Endothelzellen (hPMVEC) könnte zukünftig unter anderem für die weitere Erforschung der PAH oder für die Entwicklung gentherapeutischer Therapieoptionen genutzt werden.

2.4 Biologie des Adeno-assoziierten Virus

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV) gehört zur Gattung der Dependoviren innerhalb der Virusfamilie Parvoviridae. Das AAV ist somit für seine Replikation auf eine zusätzliche Infektion der Wirtszelle mit einem Helfervirus angewiesen (Atchison et al., 1965; Balakrishnan und Jayandharan, 2014). AAV sind sehr kleine unbehüllte Viren, mit einem Durchmesser von 20–22 nm und haben ein einzelsträngiges Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Genom (Balakrishnan und Jayandharan, 2014). Atchison et al. publizierten im Jahr 1965 die erstmalige Entdeckung des AAV unter dem Elektronenmikroskop als Kontamination von Adenoviren und zeigten dessen Unvermögen zur eigenständigen Replikation. Diese zufällige Entdeckung führte zur Namensgebung des AAV (Atchison et al., 1965). AAV sind sehr thermo-, säure- und proteasestabil (Korte et al., 2021).

Der Mensch ist natürlicher Wirt des Wildtyp-AAV. Bei bis zu 80 % der Bevölkerung können Antikörper gegen AAV im Blut – und damit eine vorangegangene Infektion mit AAV – nachgewiesen werden. Trotz der weiten Verbreitung der AAV-Infektion, ist keine Krankheit bekannt, die durch diese ausgelöst wird (Ayuso et al., 2010; Linden und Berns, 2000; Salganik et al., 2015; Xie et al., 2002). Bis heute wurden zahlreiche verschiedene

natürliche AAV-Serotypen identifiziert, aus denen bereits vielzählige synthetische Varianten und gentechnische Vektoren entwickelt wurden (Büning et al., 2015; Salganik et al., 2015). Als erster aller AAV-Serotypen wurde AAV Serotyp 2 (AAV2) entdeckt. Dieses kann gängige Zelllinien – wie HeLa- und *human embryonic kidney* (HEK)-Zellen – in der Zellkultur transduzieren. Dadurch ist das AAV2 der am besten untersuchte AAV-Serotyp (Ayuso et al., 2010; Büning et al., 2015; Nonnenmacher und Weber, 2012; Salganik et al., 2015).

2.4.1 Genom und Proteine

Das Genom des AAV2 besteht aus einer einzelsträngigen DNA mit einer Länge von 4675 Nukleotiden und wird randständig jeweils von *inverted terminal repeats* (ITR), deren Sequenzen ein Palindrom bilden, umrahmt. Die ITR sind jeweils 145 Nukleotide lang und bilden durch intramolekulare Basenpaarungen eine T-förmige Haarnadelstruktur (Sonntag et al., 2010; Srivastava et al., 1983). Initiiert durch die Promotoren (p) p5, p19 und p40 können von der DNA drei verschiedene *precursor messenger ribonucleic acids* (prä-mRNA) transkribiert werden, die wiederum durch alternatives Spleißen und unter Gebrauch verschiedener Startcodons insgesamt in acht verschiedene Proteine translatiert werden.

Die Promotoren p5 und p19 initiieren die Transkription der Nicht-Strukturproteine: Der Promotor p5 die der Proteine Rep78 und Rep68, der Promotor p19 die von Rep52 und Rep40. Rep68 ist von Rep78, und Rep40 von Rep52, je ein alternatives Spleißprodukt (Linden und Berns, 2000). Der N-terminale Aminosäureabschnitt, der nur in den größeren Rep-Proteinen enthalten ist, enthält DNA-Bindedomänen und eine Endonukleaseaktivität, durch die Rep68 und Rep78 in Anwesenheit eines Helfervirus an der DNA-Replikation, in dessen Abwesenheit an der Integration ins Wirtsgenom, beteiligt sind. Den kleineren Rep-Proteinen, Rep52 und Rep40, bleibt eine Helikase-Aktivität, durch die sie das AAV-Genom in Kapside verpacken (Agbandje-McKenna und Kleinschmidt, 2011; King et al., 2001; Linden und Berns, 2000; Salganik et al., 2015; Smith und Kotin, 1998).

Die Synthese der Kapsidproteine *Viral Protein* (VP) 1, VP2 und VP3 und des *assembly activating protein* (AAP) werden durch den Promotor p40 kontrolliert, dessen Transkript nach Prozessierung zwei alternative Spleißprodukte ergibt. VP1 entsteht durch Translation der längeren mRNA. VP2 und VP3 durch Translation der kürzeren mRNA – ausgehend von verschiedenen Startcodons (Salganik et al., 2015; Samulski und Muzyczka, 2014). VP1–3

haben das gleiche Stopcodon und somit die gleiche C-terminale Sequenz (Wu et al., 2000). Die N-terminalen Bereiche von VP1 und VP2, die nicht in VP3 enthalten sind, enthalten Kernlokalisierungssignale und der N-Terminus, der einzig in VP1 vorkommt, enthält zusätzlich eine Phospholipase A2-Aktivität. VP1 und VP2 tragen somit Funktionen, die für den Transport der Partikel zum Zellkern, und damit für die Genexpression, von Bedeutung sind (Agbandje-McKenna und Kleinschmidt, 2011; Linden und Berns, 2000; Salganik et al., 2015; Samulski und Muzyczka, 2014). Die Translation von AAP erfolgt von der gleichen mRNA wie VP2 und VP3, allerdings ausgehend von einem alternativen Startcodon und somit in einem versetzten Leseraster (Sonntag et al., 2010). AAP ist über Interaktion mit dem gemeinsamen C-Terminus von VP1–3 an deren Zusammenbau zum intakten Kapsid beteiligt, indem es über Kernlokalisierungssignale VP1–3 zum Zellkern leitet und hier die Assemblierung der VP-Proteine zum Kapsid unterstützt (Salganik et al., 2015; Sonntag et al., 2010).

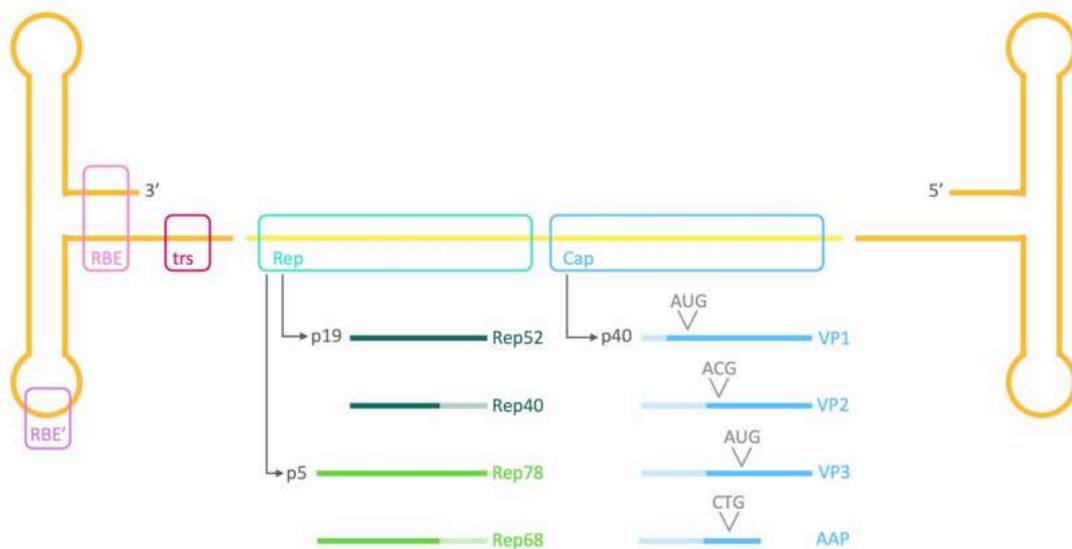


Abbildung 1: Schematische Darstellung des AAV-Genoms

(adaptiert nach: Linden und Berns, 2000; Salganik et al., 2015; Samulski und Muzyczka, 2014): Die einzelsträngige DNA ist jeweils randständig von ITR (orange) flankiert. Diese bilden durch intramolekulare Basenpaarung eine Haarnadelstruktur, wobei die inneren 20 Nukleotide als Einzelstrang verbleiben. Innerhalb der ITR liegen das RBE (rosa), das RBE' (lila) und die trs (rot). Der mittelständige Einzelstrang (gelb) kodiert unter der Kontrolle dreier Promotoren für die mRNA der Rep- und Cap-Proteine. Dabei initiiert der Promotor p5 die Transkription einer prä-mRNA, die nach alternativem Spleißen in Rep78 und Rep68 (hellgrün) translatiert werden kann und der Promotor p19 die Transkription einer prä-mRNA, die ebenfalls nach alternativem Spleißen in zwei Proteine – Rep52 und Rep40 (dunkelgrün) – translatiert werden kann (blasse Abschnitte entsprechen Introns). p40 veranlasst die Transkription einer prä-mRNA (blau), die durch alternatives Spleißen in zwei mRNA prozessiert wird (blasse Abschnitte entsprechen Introns). Durch Verwendung

verschiedener Startcodons, können diese zwei mRNA in VP1, VP2, VP3 und AAP translatiert werden. Abkürzungen: Assembly activating protein (AAP), Adeno-assoziiertes Virus (AAV), Desoxyribonukleinsäure (DNA), inverted terminal repeats (ITR), precursor messenger ribonucleic acids (prä-mRNA), Promotor (p), Rep-binding element (RBE), Startcodons AUG/ACG/CTG (Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Uracil (U), Thymin (T)), terminal resolution site (trs), viral protein (VP).

2.4.2 Kapsid

Das AAV2-Kapsid hat einen Durchmesser von 20–22 nm und die Form eines Ikosaeders mit der Triangulationszahl $T=1$. Das Kapsid setzt sich insgesamt aus 60 Molekülen zusammen und wird von VP1, VP2 und VP3 im Verhältnis 1:1:10 gebildet (Salganik et al., 2015; Samulski und Muzyczka, 2014; Xie et al., 2002). Die Struktur des Kapsids wird durch den gemeinsamen C-Terminus der Kapsidproteine gebildet. Die N-terminalen Bereiche von VP1 und VP2, die nicht in VP3 enthalten sind, sind ins Zentrum des Partikels gerichtet (Agbandje-McKenna und Kleinschmidt, 2011; Salganik et al., 2015; Xie et al., 2002).

Das Kapsid hat durch die Form eines Ikosaeders verschiedene Symmetrieachsen, in deren Bereichen tertiärstrukturelle Besonderheiten lokalisiert sind (Xie et al., 2002). An der dreizähligen Symmetrieachse bildet das Kapsid drei Peplomer-ähnliche Protrusionen, an denen sich die viralen Rezeptorbindungsdomänen befinden. Diese unterscheiden sich je nach AAV-Serotyp, was sich in der Ausbildung jeweils unterschiedlicher Gewebetropismen niederschlägt (Agbandje-McKenna und Kleinschmidt, 2011; Salganik et al., 2015; Xie et al., 2002; Zincarelli et al., 2008). Im Bereich der fünfzähligen Symmetrieachse befindet sich eine Pore, durch die im Rahmen der Replikation das assemblierte Kapsid mit der viralen DNA beladen wird. Zudem ist diese Pore für die Externalisierung der N-Termini von VP1 und VP2 während des intrazellulären Transports der Partikel zum Zellkern von Bedeutung (Agbandje-McKenna und Kleinschmidt, 2011; Salganik et al., 2015).

2.4.3 Replikation

Die ITR enthalten mit dem *Rep-binding element* (RBE), der RBE', der *terminal resolution site* (trs) und dem freien 3'-Ende die einzigen cis-aktiven Komponenten, die zur Replikation benötigt werden (Agbandje-McKenna und Kleinschmidt, 2011; McLaughlin et al., 1988). Das freie 3'-Ende am Ende eines der ITR dient als Primer der Folgestrangsynthese (Hauswirth und Berns, 1977). Durch den Polymerase- δ -Komplex der Wirtszelle wird der Folgestrang, resultierend in einer selbstkomplementären doppelsträngigen DNA, synthetisiert und ausgehend vom 3'-Ende des soeben synthetisierten Stranges erneut die

Folgestrangsynthese initiiert (Samulski und Muzyczka, 2014). Rep68 und Rep78 schneiden mit ihrer Endonukleaseaktivität, vermittelt durch die gleichzeitige Bindung an RBE und RBE', in der trs innerhalb der ITR des ursprünglichen Leitstranges, um ein 3'-Ende freizulegen, von dem aus dieser Strang durch Bildung der ITR vervollständigt wird. Nach der Spaltung an der trs markieren die gebundenen Rep68- und Rep78-Proteine das zur Verpackung bereitstehende DNA-Molekül, das Rep40 und Rep52 mit ihrer Helikaseaktivität ins Innere eines assemblierten Kapsids leiten (Linden und Berns, 2000; Salganik et al., 2015; Samulski et al., 1987).

2.4.4 Bedeutung des Helfervirus

Das Adenovirus, aber zum Beispiel auch das Herpes-Simpex-Virus, kann die für das AAV2 nötigen Helferfunktionen bereitstellen. Die adenoviralen Helferproteine replizieren selbst nicht das AAV, sondern induzieren als Transkriptionsfaktoren die AAV-eigenen Proteine und schaffen für die Replikation günstige Bedingungen in der Wirtszelle, wie die Induktion der Synthese-Phase, wodurch Enzyme für die Replikation bereitgestellt werden, oder die Inhibition der p53-induzierten Apoptose (Samulski und Muzyczka, 2014).

Ohne zusätzliche Infektion mit einem Helfervirus verbleibt die AAV-Infektion latent. In dieser Latenz integriert das AAV sein Genom spezifisch ins Chromosomen 19 der Wirtszelle, was gegenüber anderen Viren, die ihr Genom unspezifisch integrieren, eine Besonderheit darstellt (Salganik et al., 2015). Wie auch die Infektion selbst führt auch die Integration zu keiner morphologischen oder pathologischen Veränderung der Wirtszelle (Balakrishnan und Jayandharan, 2014; Linden und Berns, 2000; Salganik et al., 2015; Smith, 2008).

Eine spätere Infektion mit einem Helfervirus kann das AAV aus dem Status der latenten Infektion befreien (Berns et al., 1975; Linden und Berns, 2000). Durch die Superinfektion mit einem Helfervirus werden die AAV2-Promotoren aktiviert und so das zuvor integrierte Provirus wieder aus dem Wirtsgenom entfernt, repliziert und in Viruspartikel verpackt (Balakrishnan und Jayandharan, 2014).

2.4.5 Rezeptoren und Tropismus

Der Tropismus des AAV2 wird durch das virale Kapsid bestimmt, indem es an Strukturen auf Wirtszelloberflächen bindet und mit intrazellulären Rezeptoren interagiert. Die

Rezeptorbindungsdomänen der verschiedenen AAV-Serotypen unterscheiden sich, resultierend in entsprechend unterschiedlichen Affinitäten zu Rezeptoren und damit unterschiedlicher Ausprägung des jeweiligen Tropismus (Salganik et al., 2015). Seit der Entdeckung des AAV2 wurden unterschiedliche Rezeptoren verschiedener Funktionen – von Adhäsionsrezeptoren, über Co- und Internalisierungsrezeptoren bis zu endosomalen Rezeptoren – identifiziert. Der unspezifische, breite Tropismus aller AAV-Serotypen, über verschiedene Spezies hinweg, lässt sich sowohl durch die Affinität zu verschiedenen Rezeptoren, als auch deren teilweise ubiquitäre Expression, erklären (Balakrishnan und Jayandharan, 2014; Zincarelli et al., 2008). Das AAV ist fähig Wirtszellen unabhängig vom Zellzyklus, also sowohl teilungsaktive als auch ruhende Zellen, zu infizieren (Salganik et al., 2015). Der Wildtyp des AAV2 zeigt *in vivo* überwiegend einen Tropismus für die Leber, Skelettmuskelzellen, glatte Muskelzellen der Vaskulatur und das zentrale Nervensystem (Balakrishnan und Jayandharan, 2014; Michelfelder et al., 2009; Nonnenmacher und Weber, 2012; Zincarelli et al., 2008). *In vitro* sind gängige Zelllinien, wie HEK- und HeLa-Zellen, für AAV2 permissiv (Samulski und Muzyczka, 2014).

Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) ist ein auf Zelloberflächen exprimiertes saures Polysaccharid und stellt für AAV2 den primären Adhäsionsrezeptor dar (Agbandje-McKenna und Kleinschmidt, 2011; Summerford und Samulski, 1998). Durch die Bindung wird eine Konformationsänderung des viralen Kapsids induziert, die wiederum die Bindung an Corezeptoren, ermöglicht (Levy et al., 2009). HSPG bindet Liganden über elektrostatische Kräfte: Die negativ geladenen Anteile des HSPG können basische Aminosäuren binden, Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen eingehen (Kern et al., 2003). Die Effizienz, mit der der AAV2-Wildtyp Wirtszellen transduzieren kann, ist proportional zur HSPG-Expression auf deren Zelloberfläche. Der unspezifische Tropismus von AAV2 lässt sich durch die ubiquitäre Expression von HSPG auf Zelloberflächen verschiedenster Gewebe erklären (Summerford und Samulski, 1998). Die HSPG-bindende Domäne von AAV2 liegt im gemeinsamen C-terminalen Bereich der Kapsidproteine VP1–3 (Rabinowitz et al., 1999). Genauer vermitteln die basischen Aminosäuren Arginin an den Positionen 484, 487, 585 und 588 und Lysin an Position 532 die HSPG-Bindung – ist an den Positionen 585 oder 588 kein Arginin, kann AAV2 nicht an HSPG binden (Kern et al., 2003; Opie et al., 2003). Dabei stellt die HSPG-Bindung lediglich den ersten Schritt der Kaskade dar, ist aber nicht isoliert notwendig zur Induktion der Genexpression (Kern et al., 2003).

Die Rezeptoren *AAV-Rezeptor* (AAVR) und G-Protein-gekoppelter Rezeptor 108 (*GPR108*) binden hoch konservierte Strukturen des AAV2-Kapsids und sind damit ebenfalls entscheidend für die Transduktion von Wirtszellen (Dudek et al., 2020; Pillay et al., 2016). Sie vermitteln der Adhäsion nachgeordnete Schritte, wie die Partikelinternalisierung, den Austritt aus dem Endosomen und womöglich auch den Kerntransport. Der *GPR108* ist im trans-Golgi-Netzwerk, der AAVR stromaufwärts – wahrscheinlich auf der Zelloberfläche – lokalisiert (Dudek et al., 2020). Der *Human Fibroblast Growth Factor Receptor 1* (FGFR1), der *Hepatocyte Growth Factor Receptor* (c-Met) und die Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha V\beta 5$ werden als Corezeptoren des AAV2 diskutiert (Asokan et al., 2006; Kashiwakura et al., 2005; Qing et al., 1999; Summerford et al., 1999). Die Expression dieser Corezeptoren unterscheidet sich zwischen verschiedenen AAV2-permissiven Geweben, was darauf hinweist, dass AAV2 verschiedene Wege zur Transduktion seiner Wirtszellen nutzen kann und nicht zwangsläufig auf die Expression einzelner Rezeptoren angewiesen ist (Asokan et al., 2006; Pillay et al., 2016).

2.4.6 Intrazellulärer Transport

Insgesamt ist die Kaskade – von der Internalisierung bis zum Kerntransport und das Zusammenspiel der beteiligten Rezeptoren – durch die das AAV2 seine Wirtszelle infiziert, noch nicht vollständig verstanden (Dudek et al., 2020; Salganik et al., 2015). Bestimmte Zellorganellen, wie das Endosomen – insbesondere die darin vermittelte Ansäuerung – werden als essentiell beschrieben. Jedoch scheint das AAV2 nicht auf einen isolierten intrazellulären Weg zum Zellkern angewiesen zu sein (Salganik et al., 2015). Einige Untersuchungen legen nahe, dass das internalisierte AAV2 vom Endosomen über das trans-Golgi-Netzwerk zum Zellkern gelangt und so, von der Zellmembran geschützt, einer Immunantwort des angeborenen Immunsystems entkommen kann (Dudek et al., 2020). Die Bindung des AAV2 an Rezeptoren der Zelloberfläche vermittelt die Endozytose. Mit AAV2-Partikeln beladene Endosomen wandern entlang der Mikrotubuli von der Zellmembran Richtung Zellkern. Durch das saure Milieu innerhalb der Endosomen wird die Kapsidkonformation verändert, sodass die N-terminalen Bereiche von VP1 und VP2, die zuvor zum Zentrum des Viruspartikels gerichtet waren, durch die Pore an der fünfzähligen Symmetrieachse an die Kapsidoberfläche externalisiert werden und somit mittels ihrer Phospholipase A2-Aktivität die Partikel aus dem Endosomen in das Cytoplasma freigesetzt werden (Salganik et al., 2015). AAV2-Partikel werden, wahrscheinlich vermittelt durch Kernlokalisierungssignale, intakt durch Kernporen in den Nukleus aufgenommen, die

einzelsträngige DNA freigesetzt und diese zum Doppelstrang komplementiert (Agbandje-McKenna und Kleinschmidt, 2011; Büning et al., 2015; Nonnenmacher und Weber, 2012; Salganik et al., 2015; Samulski und Muzyczka, 2014).

2.5 Das AAV als gentherapeutischer Vektor

Seit seiner Entdeckung im Jahr 1965 wurde die Biologie des AAV zunehmend untersucht: Es ist mit keiner Krankheit assoziiert, integriert als Wildtyp nur spezifisch ins Wirtszellgenom und ist für seine Replikation von einer Coinfektion mit einem Helfervirus abhängig (Balakrishnan und Jayandharan, 2014). Diese Faktoren kennzeichnen das ausgeprägte Sicherheitsprofil des AAV als gentherapeutisches Vektorsystem. Das AAV kam als erstes virales Vektorsystem zur klinischen Anwendung (Samulski und Muzyczka, 2014). Im Jahr 2012 wurde Glybera (AAV1, alipogen tiparvovec) als erstes Gentherapeutikum in Europa zugelassen. Es wurde zur Behandlung des genetisch bedingten Lipoproteinlipasemangels eingesetzt, allerdings 2017 aus ökonomischen Aspekten wieder vom Markt genommen (European Medicines Agency, 2015; Keeler und Flotte, 2019). Luxturna (AAV2, Voretigene Neparvovec) wird bei RPE65-Gendefekten, die zur Erblindung führen können, eingesetzt (Keeler und Flotte, 2019). Zolgensma (AAV9, Onasemnogene abeparvovec) wird zur Behandlung des SMN1-Gendefektes, der die spinale Muskelatrophie bedingt, eingesetzt und ist in den Vereinigten Staaten von Amerika und in Europa zugelassen (Keeler und Flotte, 2019).

2.5.1 Entwicklung und Charakterisierung

In den 1980er Jahren gelang es erstmals das AAV als gentherapeutischen Vektor zu gestalten. Die hinsichtlich der Sicherheit vorteilhafte Eigenschaft des AAV, auf eine Coinfektion mit einem Helfervirus angewiesen zu sein, stellte bis dahin eine Limitation der AAV-Produktion dar. Samulski et al. klonierten die virale AAV2-DNA in ein bakterielles Plasmid, nach dessen Transfektion in adenoviral-coinfizierte HEK-Zellen es gelang, AAV2 herzustellen, die die gleiche Infektiosität wie der AAV2-Wildtyp erreichten (Samulski et al., 1982). 1984 konnten erstmals mit Transgen ausgestattete rekombinante AAV2-Vektoren in transduzierten Zellen (*in vitro*) eine Transgenexpression induzieren (Hermonat und Muzyczka, 1984). 1988 identifizierten McLaughlin et al. die ITR als einziges cis-aktives Element des AAV2-Genoms (McLaughlin et al., 1988). Im darauf folgenden Jahr publizierten Samulski et al. die Produktion rekombinanter AAV2-Vektoren durch Transfektion von Produktionszellen mit zwei Plasmiden: Die AAV2-Gene Rep, Cap und

AAV in einem separaten Plasmid als das von ITR flankierte Transgen (Samulski et al., 1989). Seitdem Xiao et al. 1998 die für die Replikation und Verpackung des AAV nötigen Bestandteile des adenoviralen Genoms in das Helferplasmid pXX6 klonierten, ist für die Produktion von AAV-Vektoren keine Infektion der Produktionszellen mit kontaminierenden Adenoviren mehr nötig, was das Sicherheitsprofil von AAV-Vektoren, sowohl in der Produktion als auch in der klinischen Anwendung, weiter verbesserte. Denn pXX6 enthält nicht jene Gene, die für die Replikation der Adenoviren selbst nötig wären (Xiao et al., 1998). Durch weitere Modifikationen der AAV-DNA, der verwendeten Plasmide und Weiterentwicklungen der Produktionsmethoden, wurde die AAV-Vektorproduktion und die vermittelte Transgenexpression zunehmend optimiert, bis 1993 das AAV erstmals als gentherapeutischer Vektor *in vivo* angewendet wurde und schließlich 2012 Glybera, basierend auf AAV1, als erstes Gentherapeutikum in Europa zugelassen wurde (Balakrishnan und Jayandharan, 2014; Domenger und Grimm, 2019; Flotte et al., 1993; Xiao et al., 1998).

Eine heute verbreitete Methode zur Produktion rekombinanter AAV-Vektoren ist die Transfektion von Produktionszellen, wie HEK293T-Zellen (diese exprimieren die adenoviralen Helferproteine E1a und E1b und das T-Antigen des Simian Virus 40), mit drei Plasmiden: Ein von ITR flankiertes Transgen mit Enhancer, Promotor, Polyadenylierungssignal und Spleißsignalen, einem rep/cap-Plasmid und einem Helferplasmid (Domenger und Grimm, 2019; Samulski und Muzyczka, 2014). Die transfizierten HEK293T-Zellen produzieren anschließend AAV-Vektorpartikel, die nur das von ITR umrahmte Transgen enthalten und deren Kapsidstruktur durch die Gene des Rep/Cap-Plasmids bestimmt wird. Das rep/cap-Plasmid selbst wird nicht in die Partikel verpackt. Zwar ist die Integration des Wildtyp-AAV ins Wirtszellgenom, im Unterschied zu der von anderen Viren, spezifisch, dennoch wirft sie im Hinblick auf die klinische Anwendung im Menschen Sicherheitsbedenken, insbesondere einer Karzinogenese, auf. Die Integration wird durch die Rep-Proteine vermittelt (Samulski und Muzyczka, 2014). Dadurch dass diese in den Vektorpartikeln nicht mehr enthalten sind, integrieren AAV-Vektoren auch nicht ins Wirtsgenom – ihre DNA verbleibt als Episom (Grimm et al., 2006; Salganik et al., 2015). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vermitteln AAV eine langfristige Transgenexpression. So konnte in Mäusen nach einmaliger Applikation noch nach 665 Tagen, und im Menschen auch nach vier Jahren, die Expression des Transgens nachgewiesen werden (Körbelin et al., 2016a; Salganik et al., 2015).

2.5.2 Limitationen des AAV-Vektorsystems

Neben den genannten Vorteilen bestehen gewisse Limitationen in der gentherapeutischen Anwendung von AAV-Vektoren. So ist durch die Größe des AAV die Kapazität für die Verpackung von Promotoren und Transgenen in den Vektorpartikeln mit einer Größe von maximal 5 kb begrenzt. Größere Transgene können die Vektorpartikel destabilisieren. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass größere Transgene auf mehrere Vektorpartikel aufgeteilt werden könnten (Wu et al., 2010). Virale Vektoren geraten in Konfrontation mit dem Immunsystem des Wirtsorganismus. So können im Rahmen einer vorherigen Konfrontation des Immunsystems gebildete Antikörper gegen das AAV-Kapsid applizierte AAV-Vektorpartikeln binden und neutralisieren. Oder applizierte rekombinante AAV können selbst eine Immunantwort im Wirtsorganismus auslösen, die entweder gegen das virale Kapsid oder gegen das Transgen gerichtet sein kann. Zudem kann durch transduzierte Zellen eine T-Lymphozyten-Antwort provoziert werden. Die Immunantwort korreliert dabei mit der applizierten Dosis (Balakrishnan und Jayandharan, 2014; Keeler und Flotte, 2019; Salganik et al., 2015). Im murinen Tiermodell konnte eine geringe Rate (1 %) willkürlicher Integration der DNA von AAV-Vektoren in teilungsaktiven Zellen gezeigt werden, die mit der Induktion hepatozellulärer Karzinome im Zusammenhang steht (Salganik et al., 2015; Samulski und Muzyczka, 2014). Sofern nicht mit anderen Methoden kombiniert, stellen allerdings nur ruhende Zellen ein sinnvolles Zielgewebe für AAV-Vektoren dar, da sich in teilungsaktiven Zellen der gentherapeutische Effekt mit jeder Zellteilung ausdünnen würde (Balakrishnan und Jayandharan, 2014).

2.6 Randomisierte AAV-Peptidbanken

Endothelzellen, wie hPMVEC, sind nicht effizient durch das AAV2-Wildtyp transduzierbar (Nicklin et al., 2001; Varadi et al., 2012; Zhang et al., 2019). Um den Tropismus von Vektoren zu erweitern, lässt sich theoretisch der Ligand eines Rezeptors, der spezifisch auf bestimmten Zielzellen exprimiert wird (sofern dieser bekannt ist), in das virale Kapsid einfügen (Büning et al., 2015). Jedoch ist nicht vorhersagbar, inwiefern Rezeptoren diese Liganden ebenso im Kontext der viralen Kapsidkonformation binden, eingefügte Rezeptorliganden das Kapsid destabilisieren oder inwieweit eine erfolgte Bindung auch zur Internalisierung in die jeweiligen Zellen führt. Die Selektion randomisierter AAV-Peptidbanken auf Zielzellen löst diese Probleme: Die Bindung potentieller Liganden im Kontext des stabilen viralen Kapsids und das Vermögen zur Internalisierung dieser

Vektorpartikel sind Teil des Selektionsprozesses (Körbelin et al., 2017, 2016a, 2016c; Müller et al., 2003; Naumer et al., 2012b).

Die Selektion randomisierter AAV2-Peptidbanken auf Zellen oder in Geweben basiert auf der Methode des Phagendisplays. George P. Smith publizierte 1985 die Etablierung des Phagendisplays, das die Identifikation unbekannter Liganden mittels auf Bakteriophagen präsentierter Peptide ermöglichte (Smith, 1985). Wie bei den später entwickelten randomisierten AAV2-Peptidbanken, beruht auch das Phagendisplay auf der Kongruenz zwischen auf der Virusoberfläche präsentierter Peptide und der jeweils kodierenden DNA. So kann die DNA von an Zielstrukturen gebundene Bakteriophagen isoliert und sequenziert, und so das bindungsvermittelnde Peptid identifiziert werden. Nach der Entdeckung, dass das AAV2 Insertionsmutationen im Kapsid-Gen toleriert und diese auch auf Kapsidebene repräsentiert werden, wurden bekannte Liganden für Zellrezeptoren in das Kapsid-Gen, und damit das Kapsid, integriert (Girod et al., 1999; Rabinowitz et al., 1999). Um auch für Gewebe, die initial nicht permissiv für AAV sind und/oder deren Rezeptor-Liganden-Interaktionen unbekannt sind, AAV-Vektoren zur Verfügung zu stellen, wurden mittels Phagendisplay selektierte Liganden anschließend in das AAV2-Kapsid integriert (Nicklin et al., 2001; White et al., 2004; Work et al., 2006). Schließlich wurden der Selektionsprozess und die Integration selektierter Peptide in das AAV2-Kapsid in einem Ansatz – den randomisierten AAV2-Peptidbanken – vereint.

Müller et al. etablierten erstmals die Herstellung hochdiverser randomisierter AAV2-Peptidbanken und die Methode ihrer Selektion auf Zielzellen (Müller et al., 2003). Die Autoren entwickelten das zur Herstellung von AAV2-Vektorpartikeln nötige Rep/cap-Plasmid mit Schnittstellen für die Ligation mit dem randomisierten Peptid-kodierenden Nukleotidinsert. Das Insert besteht aus 21 Nukleotiden – kodierend für sieben Aminosäuren. An jeder Aminosäureposition des Inserts ist theoretisch jede proteinogene Aminosäure mit gleicher Wahrscheinlichkeit vertreten. Somit erreichen randomisierte AAV-Peptidbanken eine theoretische Diversität, sprich die Anzahl unterschiedlicher Peptide, von $20^7 = 1,28 \times 10^9$. Müller et al. konnten eine Diversität von $1,1 \times 10^8$ nachweisen. Das Insert ist auf Kapsidebene an Position Arginin 588 (R588), im Bereich der dreizähligen Symmetrieachse, eingefügt. In diesem Bereich liegt die HSPG-Bindedomäne, die durch das Insert unterbrochen wird und somit die Affinität zu HSPG und den damit einhergehenden unspezifischen Tropismus aufhebt. Als *proof of concept* selektierten die Autoren die

randomisierte AAV2-Peptidbank *in vitro* auf primären humanen coronar-arteriellen Endothelzellen (HCAEC) und konnten die Umlenkung des Tropismus zeigen (Müller et al., 2003). Im gleichen Jahr publizierten Perabo et al. ebenfalls eine Methode zur Selektion von im AAV2-Kapsid integrierter Peptide – das eingefügte Peptid auf Kapsidebene lediglich um eine Aminosäure versetzt (R587) (Perabo et al., 2003).

Seither wurden die randomisierten AAV-Peptidbanken weiter optimiert: Für Cystein kodierende Nukleotidsequenzen werden exkludiert, die anfangs für die Kapsid-Genom-Korrelation nötig gehaltenen *Transfer Shuttles* nicht mehr verwendet oder die Länge der Peptidinserts variiert (Körbelin et al., 2017; Naumer et al., 2012b; Nonnenmacher et al., 2015). Randomisierte AAV-Peptidbanken stellen ein dynamisches Werkzeug zum Design viraler Vektoren dar, mit deren Selektion sich hochspezifische Klone für theoretisch jedes beliebige Zielgewebe isolieren lassen (Müller et al., 2003). Mittels der Selektion randomisierter AAV2-Peptidbanken auf verschiedenen Zellen und Geweben – sowohl *in vitro* als auch *in vivo* – wurden bereits zahlreiche AAV-Vektoren mit modifiziertem Tropismus generiert (Körbelin et al., 2016a, 2016c; Müller et al., 2003; Perabo et al., 2003; Trepel et al., 2015; Zhang et al., 2019).

2.6.1 Selektionen von AAV-Peptidbanken in Vorarbeiten

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte durch die *in vivo* Selektion einer randomisierten AAV2-Peptidbank, mit randomisierten Peptid einer Länge von sieben Aminosäuren (7 mer), im Mausmodell eine rekombinante AAV2-Mutante isoliert werden, die das murine pulmonal-vaskuläre Endothelium effektiv, spezifisch und langfristig transduziert. Nach intravenöser Applikation der randomisierten AAV2-Peptidbank wurde die internalisierte AAV2-DNA aus der murinen Lunge isoliert und nach fünf *in vivo* Selektionsrunden sich anreichernde Peptidsequenzen mittels *Next Generation Sequencing* identifiziert. Anhand eines Scoring-Systems konnte die hochspezifische AAV2-Mutante mit dem Peptidinsert ESGHGYF (Glutaminsäure (E), Serin (S), Glycin (G), Histidin (H), Tyrosin (Y), Phenylalanin (F)) identifiziert werden. Diese erreichte in anschließenden Analysen im Zielgewebe eine 200-fach stärkere Transgenexpression als der AAV2-Wildtyp, die auch nach 244 Tagen noch auf einem stabilen Niveau nachweisbar war (Körbelin et al., 2016c). Um der Anwendung im menschlichen Organismus näher zu kommen, war es das Ziel dieser Arbeit, die Transgenexpression von zuvor im Mausmodell selektierten AAV2-Mutanten in der humanen Zellkultur zu analysieren, sowie eine randomisierte AAV2-Peptidbank direkt

auf hPMVEC zu selektierten, um zielgerichtete rekombinante AAV2-Vektoren zu isolieren. Solche Vektoren könnten zukünftig unter anderem für die weitere Erforschung der PAH oder für die Entwicklung gentherapeutischer Therapieoptionen genutzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Laborgeräte

Laborgeräte	Bezeichnung	Hersteller
Absaugsystem	VacuSafe comfort	Integra Biosciences TM
Biologische Sicherheitswerkbank	MaxiSafe 2030i	Thermo Scientific TM
Brutschrank (Bakterienkultur)	T6120	Haraeus [®]
Brutschrank (Zellkultur)	HeraCell 240	Thermo Scientific TM
Durchflusszytometer	BD FACSCanto TM	BD Biosciences
Eismaschine	Ice Maker	Hoshizaki
Elektroporator	GenePulsarXCell	Bio-Rad
Gefrierbehälter	Mr Frosty TM	Thermo Scientific TM
Geldokumentationssystem	E-BOX-VX2/20M	Vilber
Gelelektrophoresekammer	SubCell GT	Bio-Rad
Heizblock	91D1100	Peqlab
Kühlschrank 4 °C	Comfort	Liebherr
Laborautoklav	Evo [®]	MediTech
Lichtmikroskop	Diavert	Leitz
Mechanische Pipetten	Research [®] Plus	Eppendorf
Motopipette	Pipetboy	Integra
Mikrowelle	R-334	Sharp
Minizentrifuge	MC-6400	A. Hartenstein
Phasenkontrastmikroskop	Axiovert 25	Zeiss
ph-Meter	Micropocessor pH Meter pH537	WTW
Plattformschüttler	Promax 2020	Heidolph

Präzisionswaage	LabStyle 3002	Mettler Toled
Quecksilberdampfampe	HBO 50	OSRAM
Schüttelinkubator	Innova™ 2000	New Brunswick Scientific
Spannungsgerät	PowerPac 300	Bio-Rad
Spektralphotometer	Nanodrop 2000c	Thermo Scientific™
Standcomputer	Elite Desk Z220 WorkStation Mac pro os x hd	hp hp Apple inc.
Stand-Kühlzentrifuge	Avanti® J-E Centrifuge (Rotor: JA-14 (339247))	Beckman Coulter
Stickstofftank	C47/11-6	MVE Biological Solutions
Thermocycler	Mastercycler® personal/ gradient	Eppendorf
Thermocycler (qPCR)	LightCycler® 96	Roche
Tiefkühler (4 °C/ -20 °C)	Premium NoFrost	Liebherr
Tiefkühler -20 °C	Biomedical Freezer MDF- U537	SANYO
Tiefkühler -80 °C	UltraLow MDF-U73V	SANYO
Tube Topper	Quick-Seal™ Cordless Tube Topper	Beckman Coulter
Ultrazentrifuge	Optima™ LE-80K Ultracentrifuge Rotor: 70.1 Ti (342184)	Beckman Coulter
Vibrationsmischer	VortexGenie™ 2 ROTILABO®	Scientific Industries SI™ Carl Roth
Wasserbad	Thermomix ME 1083	Braun GFL
Zählkammer	Neubauer	A. Hartenstein
Zentrifugen	5417R, 5424, 5810	Eppendorf

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Herstellern bezogen: Beckman Coulter, Becton Dickinson, Braun, Eppendorf, Greiner bio-one, Nunc, Roche, Sarstedt, TH Geyer.

3.1.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: Carl Roth, Merck, PanReac/Applichem, Promega, TH Geyer.

3.1.4 Zellen

3.1.4.1 Eukaryotische Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zellen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Eukaryotische Zellen

Zelltyp	Beschreibung	Referenz/Bezug
HEK293T	Human Embryonic Kidney, Immortalisierte Zelllinie	DSMZ ACC 635
hPMVEC	Humane, pulmonale, mikrovaskuläre Endothelzellen, Primärzellen	(1) Promocell #C-12281 Lot4070302 (2) Sciencell #sc-3000 Lot-17008

3.1.4.2 Prokaryotische Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten prokaryotischen Zellen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Prokaryotische Zellen

Prokaryotische Zellen	Beschreibung	Referenz
Escherichia coli (E. coli)	DH5 α (Mutationen in recA1, EndA1 und lacZ Δ M15)	Hanahan, 1983

3.1.5 Medien und Zusätze für die Kultivierung von Zellen

3.1.5.1 Eukaryotischer Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryotischer Zellen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryotischer Zellen

Produkt	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose	Gibco™

Endothelial Cell Medium-Kit (ECM-Kit, #SC-1001)	Sciencell
Hitzeinaktiviertes Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i> , FCS)	Gibco™
Penicillin/Streptomycin (PS) 10000 U/ml	Life Technologies

3.1.5.2 Prokaryotischer Zellen

Die zur Herstellung, der in dieser Arbeit verwendeten Medien, benötigten Zusätze für die Kultivierung prokaryotischer Zellen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Zusätze für die Kultivierung prokaryotischer Zellen

Produkt	Hersteller
Ampicillin Natriumsalz	Sigma
Bacto™ Agar	Becton Dickinson
Bacto™ Tryptone	Becton Dickinson
Bacto™ Yeastextract	Becton Dickinson

Die Herstellungsanleitungen der Medien, die zur Kultivierung von E.coli genutzt wurden, sind im Folgenden beschrieben.

LB-Medium (Lysogeny Broth)

10 g Bacto Tryptone
5 g Bacto Yeastextract
10 g Natriumchlorid (NaCl)
Ad 1000 ml doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O)

Anschließend wurde das Medium bei 121 °C unter 2 bar für 20 min steril autoklaviert.

Zur Herstellung von 1 l **LB-Ampicillin-Medium** (LB-Amp-Medium) wurde nach dem Autoklavieren auf 1 l abgekühltes (ungefähr 50 °C) LB-Medium 150 mg Ampicillin gegeben.

Zur Herstellung von **LB-Agarplatten** ohne Antibiotika wurden vor dem Autoklavieren 1 l LB-Medium mit 15 g *Bacto™ Agar* gemischt, anschließend steril autoklaviert und auf Agarplatten verteilt.

Zur Herstellung von **LB-Amp-Agarplatten** wurden nach dem Autoklavieren 150 mg Ampicillin auf 1 l abgekühltes (ungefähr 50 °C) LB-Agar gegeben und anschließend auf Agarplatten verteilt.

SOB-Medium (Super Optimal Broth)

20 g *BactoTM Tryptone*
 5 g *BactoTM Yeast Extract*
 8,6 ml NaCl (1 M)
 2,5 ml Kaliumchlorid (KCl) (1 M)
 Ad 1000 ml ddH₂O

Anschließend wurde das Medium bei 121 °C unter 2 bar für 20 min steril autoklaviert.

SOC-Medium (Super Optimal Broth with Catabolite Repression)

48,5 ml SOB-Medium
 1 ml Glukose (1 M)
 500 µl Magnesiumchlorid (MgCl₂) (1 M)

Anschließend wurde das Medium bei 121 °C unter 2 bar für 20 min steril autoklaviert.

3.1.6 Molekularbiologische Kits und Gebrauchsfertige Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Kits und gebrauchsfertigen Reagenzien sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Molekularbiologische Kits und Gebrauchsfertige Reagenzien

Kit	Produktnummer	Hersteller
DNAeasy [®] Blood and Tissue Kit	69506	Qiagen
FastStart Essential DNA Green Master	06402712001	Roche
Instant Sticky-end Ligase Master Mix	M0370S	New England Biolabs
NucleoBond [®] Xtra Maxi Kit	740414	Machery Nagel
NucleoBond [®] Xtra Midi Kit	740410	Machery Nagel
mi-Plasmid Miniprep Kit	mi-PMN250	Metabion
OptiPrep TM Density Gradient Medium (60 % w/v Iodixanol)	1114542	Axis-Shield/Nycomed (Progen)
Polyfect Transfection reagent	301107	Qiagen
QiaQuick [®] PCR Purification Kit	28106	Qiagen

3.1.7 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Enzyme

Enzym	Hersteller
Benzonase® (250 Units/µl)	Sigma
GoTaq® Polymerase	Promega
Restriktionsendonukleasen: BglI, PstI, SfiI, XhoI MscI, SmaI	New England Biolabs Thermo Fisher Scientific™
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
TrypLE™ Express Enzyme	Gibco™

3.1.8 Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Puffer

Puffer	Hersteller
CutSmart®	New England Biolabs
Dulbecco's Phosphate-buffered saline (PBS) (1x)	Gibco™
Dulbecco's PBS (10x)	Gibco™
FastDigest Buffer	Thermo Fisher Scientific™
GoTaq® Reaction Buffer (5x)	Promega
NEBuffer™ 3	New England Biolabs
NEBuffer™ 3.1	New England Biolabs
T4 DNA Ligase Reaction Buffer	New England Biolabs

3.1.9 Marker und Indikatoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Marker und Indikatoren sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Marker und Indikatoren

Produkt	Hersteller
GeneRuler 1 kb DNA ladder	Thermo Fisher Scientific™
Gel Loading dye (6x)	New England Biolabs
Phenolrot	Sigma
ROTI®GelStain	Carl Roth

3.1.10 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Metabion synthetisiert und sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Primer

Primer	Sequenz (5'–3')
AAV2 1 fw	GCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACC
AAV2 1 rev	GCCTGGAAGAACGCCTTGTGTG
AAV2 4 fw	ATGGCAAGCCACAAGGACGATG
AAV2 4 rev	CTTCATCACACAGTACTCCACG
CAG fw	GGACTCTGCACCATAACACAC
CAG rev	GTAGGAAAGTCCCATAAGGTCA

3.1.11 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung/Verwendung	Referenz
pAAV-CAG-eGFP	AAV-Expressionskassette mit CAG-Promotor, der die Expression des Reportergens <i>enhanced green fluorescent protein</i> (eGFP) kontrolliert, Poly-(A)-Signal, flankiert von ITR; zur Produktion von rekombinanten AAV (rAAV) mit Reportergen	Körbelin et al., 2016a
pAAV-CAG-LUC	AAV-Expressionskassette mit CAG-Promotor, der die Expression des Reportergens Luciferase kontrolliert, Poly-(A)-Signal, flankiert von ITR; Standardplasmid zur Titration von rAAV mit gleichem Promotor	Körbelin et al., 2016a
pMT-202-6	AAV2-rep/cap, mit SfiI-Schnittstellen, um Insertionen nach Position R588 einzufügen, flankiert von ITR; AAV-Peptidbank-Plasmid zur Herstellung von randomisierten AAV2-Peptidbanken	Müller et al., 2003
pMT-202-6-NNK Insert	Standardplasmid zur Titration von rAAV der randomisierten Peptidbank	Müller et al., 2003
pXX2-187	AAV2-rep/cap, mit SfiI-Schnittstellen, um Insertionen nach Position R588 einzufügen;	Michelfelder et al., 2007

	unter transienter Transfektion mit Transgenplasmid zur Herstellung von Einzelklon-rAAV	
pXX2-wt	AAV2-Wildtyp (wt); zur Herstellung von AAV2-Wildtyp-Vektoren	Xiao et al., 1998
pXX6	Adenovirales Helferplasmid, enthält E1A, E1B, E2A, E4 und VA; zur Produktion von rAAV in HEK293T	Xiao et al., 1998

3.1.12 Rekombinante AAV-Vektoren

Die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten rekombinanten AAV-Vektoren sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Rekombinante AAV-Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung
rAAV2-R588(x) ₇ -Peptidbank	Randomisierte AAV2-Peptidbank; AAV2-Kapsid mit randomisierter (x) ₇ -Insertion an Position R588
rAAV2-wt-CAG-eGFP	AAV2-Wildtypkapsid, trägt das Reportergen eGFP unter der Kontrolle des CAG-Promoters
rAAV2-(x) ₇ -CAG-eGFP	AAV2-Kapsid mit ausgewählter R588(x) ₇ -Insertion, trägt das Reportergen eGFP unter der Kontrolle des CAG-Promoters
rAAV2-(x) ₁₂ -CAG-eGFP	AAV2-Kapsid mit ausgewählter R588(x) ₁₂ -Insertion, trägt das Reportergen eGFP unter der Kontrolle des CAG-Promoters

3.1.13 Software

Die in dieser Arbeit verwendete Software ist in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Software

Software	Bezugsquelle
ApE	https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/ (M. Wayne Davis)
BD FACSDiva	BD Biosciences
AxioVision LE64	Zeiss
Keynote	Apple Inc.
LightCycler® Nano	Roche
NanoDrop 2000	Thermo Scientific™
Microsoft Excel	Microsoft

Microsoft PowerPoint	Microsoft
Microsoft Word	Microsoft
Prism 7	GraphPad
PubMed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov
SnapGene Viewer	https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/
Zotero	https://www.zotero.org

3.1.14 Extern bezogene Leistungen

Externe Anbieter, die für diese Arbeit Leistungen erbracht haben, sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Externe Leistungen

Software	Art der Dienstleistung
Metabion	Synthese von Primern
SeqLab	Sequenzierung von DNA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung (adhärenter) Zellen

3.2.1.1.1 Kultivierung von HEK293T

HEK-293T-Zellen wurden in *DMEM high glucose* mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (*DMEM-Vollmedium*) in 75 cm²-Kulturflaschen (Sarstedt) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml *TrypLE™ Express Enzyme* (Gibco™) gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von *DMEM-Vollmedium* gestoppt, die Zellen bei 300 × g für 5 min pelletiert in *DMEM-Vollmedium* resuspendiert. Die Zellen wurden zwei Mal die Woche, beziehungsweise bei einer Konfluenz von 80–100 %, passagiert.

3.2.1.1.2 Kultivierung von hPMVEC

hPMVEC wurden in Endothelzell-Medium (*ECM-Kit*; 5 % FCS, 1 % *endothelial cell growth supplement* (ECGS), 1 % Penicillin/Streptomycin) in 25 cm²- oder 75 cm²-Kulturflaschen (Sarstedt) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die Kulturflaschen wurden 1 h bei Raumtemperatur mit 0,2 % Gelatine (0,1 ml Gelatine pro cm²) beschichtet. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen

mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml *TrypLETM Express Enzyme* (GibcoTM) gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von *DMEM*-Vollmedium gestoppt, die Zellen bei 300 × g für 5 min pelletiert und in EC-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden zwei Mal die Woche, beziehungsweise bei einer Konfluenz von 80–100 %, passagiert.

3.2.1.1.3 Zellzählung

Um die Zellzahl eukaryotischer Zellen zu bestimmen, wurden 10 µl der jeweiligen Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer transferiert. HEK293T-Zellen wurden zuvor in einer 1:10-Verdünnung mit Trypanblau (0,4 %) gefärbt. Die Zellen innerhalb der vier großen Quadrate, mit einem Volumen von je 0,1 µl, wurden unter dem Lichtmikroskop gezählt und die Zellzahl pro ml ermittelt, indem folgende Rechnung durchgeführt wurde:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Gezählte Zellen}}{4} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10000$$

3.2.1.1.4 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Einfriermedium für hPMVEC:

40 % hitzeinaktiviertes FCS
50 % EC-Medium ohne Antibiotika
10 % Dimethylsulfoxid

Einfriermedium für HEK293T:

90 % FCS
10 % Dimethylsulfoxid

Zur Kryokonservierung eukaryotischer Zellen wurden diese geerntet (3.2.1.1.1) und pro 75 cm²-Zellkulturflasche in 2 ml (hPMVEC) beziehungsweise in 5 ml (HEK293T) Einfriermedium resuspendiert, in ein Kryoröhrchen (1 ml pro Kryoröhrchen) überführt und im Gefrierbehälter *Mr. FrostyTM* (Thermo ScientificTM) mit einer Kühlrate von –1 °C pro min auf –80 °C gekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in einem Stickstofftank. Zur Rekultivierung eukaryotischer Zellen wurden diese im Kryoröhrchen im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und anschließend in eine entsprechend dem Zelltyp vorbereitete Zellkulturflasche mit warmen Vollmedium überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Isolation von Plasmid-DNA aus E. Coli

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten E. coli wurde je nach Volumen der Bakterienkultur verschiedene kommerzielle Kits genutzt. Die Plasmid-DNA aus 5 ml Bakterienkultur wurde durch das *mi-Plasmid Miniprep Kit* (Metabion), aus 500 ml durch das *NucleoBond® Xtra Midi Kit* (Machery Nagel) und von 1 l durch das *NucleoBond® Xtra Maxi Kit* (Machery Nagel) nach Herstellerangaben extrahiert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 50 µl, 500 µl beziehungsweise 1000 µl *Elution Buffer* (aus jeweiligem Kit) gelöst. Anschließend wurde die Konzentration mittels Spektralphotometrie gemessen (3.2.2.2) und ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt (3.2.2.3). Plasmid-DNA wurde bei –20 °C gelagert.

3.2.2.2 Quantifizierung von DNA-Konzentrationen

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA wurde 1 µl Probe mittels Spektralphotometrie im *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific™) gemessen. Die DNA wurde als rein angesehen, wenn der Quotient der Extinktion bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge (Verhältnis DNA zu Protein) größer als 1,8 war.

3.2.2.3 Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme

Zur Analyse von Plasmid-DNA wurde diese in folgendem Ansatz verdaut:

1 µg	Plasmid-DNA
1 µl	Restriktionsenzym (<i>PstI/XhoI</i> ; New England Biolabs)
2 µl	<i>NEBuffer™</i> 3.1 (10x; New England Biolabs)
Ad 20 µl	ddH ₂ O

Der Ansatz wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde eine analytische Agarosegelelektrophorese (3.2.2.5) durchgeführt.

Zur Kontrolle der intakten Beschaffenheit der ITR im AAV-Pepitdbank-Plasmid pMT-202-6 wurden die Restriktionsenzyme *SmaI* oder *MscI* (Thermo Fisher Scientific™) und der *FastDigest-Puffer* (Thermo Fisher Scientific™) verwendet. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurde eine analytische Agarosegelelektrophorese (3.2.2.5) durchgeführt.

Die AAV-Peptidbank-Plasmide (pMT-202-6, pXX2-187) wurden vor anschließender Ligation mit den Peptid-kodierenden Oligonukleotiden in folgendem Ansatz verdaut:

20 µg	Plasmid-DNA
20 µl	<i>SfiI</i> (New England Biolabs)
20 µl	<i>Cutsmart[®] Puffer</i> (10x; New England Biolabs)
Ad 200 µl	ddH ₂ O

Der Ansatz wurde bei 50 °C für 2 h inkubiert und anschließend mit dem *QIAQuick[®] PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Im weiteren wurden die verdauten Plasmide mit Peptid-kodierenden DNA-Fragmenten (3.2.2.6) ligiert.

3.2.2.4 Auftrennung verdauter DNA

Zur Aufreinigung verdauter Plasmid-DNA von Enzymen und Puffern sowie von sehr kurzen DNA-Fragmenten des Restriktionsverdau wurde das *QiaQuick[®] PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Membran der Säulen sind für Proteine und Puffer sowie DNA-Fragmente < 100 Basenpaare (bp) durchlässig. Zur gezielten Isolierung kurzer DNA-Abschnitte (< 100 bp) wie der Peptid-kodierenden DNA-Fragmente wurde der erste Säulendurchfluss verwendet (dritter Schritt im Herstellerprotokoll) und die Peptid-kodierenden Oligonukleotide wurden von den ebenfalls im Durchfluss enthaltenen Enzymen und Puffern mittels ethanolischer Fällung (3.2.2.9) befreit.

3.2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarosegelelektrophorese bei 90 Volt für 30–60 min durchgeführt. Für DNA-Fragmente mit einer Größe > 1000 bp wurden 1 %-ige Agarosegele, und für DNA-Fragmente mit einer Größe < 1000 bp 2 %-ige Agarosegele, genutzt. Das Gel wurde in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer (1x) bedeckt. Die DNA-Proben wurden mit adäquater Menge Ladepuffer gemischt. Als Größenmaßstab wurde der *1 kb Gene ruler DNA Ladder* (Thermo Fisher ScientificTM) genutzt. Zum Herstellen des Agarosegels wurde die entsprechende Menge Agarose in kochendem TAE-Buffer (1x) gelöst und auf 100 ml 15 µl *ROTI[®] GelStain* (Carl Roth) hinzugegeben. Nach der Agarosegelelektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht in einem Geldokumentationssystem analysiert.

Rezept zur Herstellung von 500 ml **50x TAE** (Tris Acetat EDTA)-**Puffer**:

121 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

Ad 250 ml ddH₂O
50 ml Na₂ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,5 M) (pH 8)
28,55 ml Eisessig
Ad 500 ml ddH₂O

Für **1x TAE-Puffer** wurde 50x TAE-Puffer 1: 50 in ddH₂O verdünnt.

3.2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

3.2.2.6.1 DNA T4 Ligase

Zur Ligation von Peptid-kodierenden DNA-Fragmenten in das AAV-Peptidbank-Plasmid pMT-202-6 wurde die *DNA T4 Ligase* (New England Biolabs) genutzt. Die Ligation wurde nach folgendem Schema angesetzt:

500 ng pMT-202-6 (*SfiI*-verdaut, 3.2.2.3)
x ng Insert-DNA (*BglI*-verdaut 3.2.4.2.5.1)/ddH₂O für die Leerligation
Ad 20 µl ddH₂O

Der Ligationsansatz wurde bei 65 °C für 2 min und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 2,5 µl *T4 DNA Ligase Reaction Buffer* (New England Biolabs) und 2,5 µl *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs) hinzugegeben und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde die Ligation gefällt (3.2.2.9) und damit elektrokompetente *E. coli* transformiert (3.2.3.3.2).

3.2.2.6.2 Instant Sticky-end Ligase Master Mix

Zur Ligation von Peptid-kodierenden DNA-Fragmenten in das AAV-Plasmid pXX2-187 wurde der *Instant Sticky-end Ligase Master Mix* (New England Biolabs) genutzt. Dazu wurde folgender Ansatz vorgelegt:

1 µl pXX2-187 (*SfiI*-verdaut, 3.2.2.3)
2 µl Insert-DNA (*BglI*-verdaut 3.2.4.2.5.1)/ddH₂O für die Leerligation
2 µl ddH₂O

Zu dem vorgelegten Ansatz wurden 5 µl *Instant Sticky-end Master Mix* (New England Biolabs) hinzupipettiert, 5 Mal auf- und abpipettiert und auf Eis überführt. Anschließend wurden mit der Ligation chemokompetente *E. coli* transformiert (3.2.3.3.1).

3.2.2.7 Sequenzierung von DNA

Zum Sequenzieren von DNA-Fragmenten wurden 13 µl einer DNA-Probe (mit einer Konzentration zwischen 40–100 ng/µl) mit 3 µl AAV4 fw-Primer (10 µM) an *SeqLab* geschickt. Die Nukleotidsequenzen wurden mittels der Software ApE (v3.0.8) in die entsprechenden Aminosäuresequenzen translatiert und diese im Folgenden durch den Ein-Buchstaben-Code abgekürzt: Alanin (A), Aspartat (D), Glutaminsäure (E), Phenylalanin (F), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Lysin (K), Leucin (L), Methionin (M), Asparagin (N), Pyrrolysin (O), Prolin (P), Glutamin (Q), Arginin (R), Serin (S), Threonin (T), Selenocystein (U), Valin (V), Tryptophan (W), unbekannt (X), Tyrosin (Y).

3.2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR)

3.2.2.8.1 Standard PCR

Um DNA zu amplifizieren, wurde eine PCR mit dem *GoTaq®*-Kit (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. Um den Bereich von AAV-DNA, der das Peptidkodierende Insert enthält, zu amplifizieren, wurden die Primer AAV4 fw und AAV4 rev verwendet. Es wurde ein Mastermix nach folgendem Schema auf Eis vorbereitet:

50 µl Ansatz (pro Reaktion)

10 µl	<i>GoTaq® Reaction Buffer</i> 5x (Promega)
1 µl	<i>GoTaq® PCR Nucleotide Mix</i> , je 10 mM (Promega)
1 µl	Primer AAV4 fw (20 µM)
1 µl	Primer AAV4 rev (20 µM)
0,25 µl	<i>GoTaq® DNA Polymerase</i> (Promega)
≤ 500 ng	DNA-Probe/nukleasefreies ddH ₂ O als Negativkontrolle
ad 50 µl	nukleasefreies ddH ₂ O

Die PCR erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm:

Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Primerhybridisierung	61 °C	1 min	35 Zyklen
Elongation	72 °C	30 sec	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
	4 °C	bis zur Entnahme der Proben	

PCR-Produkte wurden anschließend per Agarosegelelektrophorese analysiert (3.2.2.5).

3.2.2.8.2 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Zur Titration von rekombinanten AAV-Vektorpartikeln wurde eine qPCR im *LightCycler*[®] 96 (Roche) mit dem *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche) durchgeführt. Ein 20 µl-Mastermix wurde auf Eis vorbereitet und Lichtexposition weitestgehend vermieden. Für die Konzentrationsberechnung wurde parallel eine dezimale Verdünnungsreihe eines Standardplasmids mit definierter Konzentration und eine Negativkontrolle titriert.

Ansatz pro Reaktion:

2 µl	Probe*/Standard**/nukleasefreies ddH ₂ O als Negativkontrolle
10 µl	<i>FastStart Essential DNA Green Master</i> (Roche)
1 µl	Primer fw (5 µM)
1 µl	Primer rev (5 µM)
6 µl	Nukleasefreies ddH ₂ O

* je in 1: 1.000- und 1: 10.000-Verdünnung

** dezimale Verdünnungsreihe

Für die Titration wurden jeweils Primer, die das verpackte (ITR-enthaltende) Plasmid binden und Standards mit gleichem Promotor, verwendet. Für Vektoren aus der randomisierten AAV-Peptidbank (verpacktes Plasmid: pMT-202-6-7mer) wurden die Primer AAV1 fw und AAV1 rev und der Standard pMT-202-6-NNK7 Insert, für die Titration von rekombinanten AAV-Vektorpartikeln mit Transgen (verpacktes Plasmid: pAAV-CAG-eGFP) CAG fw und CAG rev und der Standard pAAV-CAG-eGFP benutzt.

Die qPCR erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm im *LightCycler*[®] 96 (Roche):

Präinkubation	95 °C	600 sec
3-Schritt-Amplifikation	95 °C	30 sec
(45 Zyklen)	67 °C (AAV1) / 64 °C (CAG)	30 sec
	72 °C	30 sec
Schmelzen	95 °C	10 sec
	65 °C	60 sec
	97 °C	1 sec

Die Plasmide für die Standardreihe wurden durch Berechnung des Gewichtes eines Moleküls und einer Hochrechnung wieviel 10¹⁰ Kopien des Plasmids wiegen, anschließend auf 5 · 10⁷ Kopien/µl verdünnt.

Die Daten wurden mit der *LightCycler*[®] Nano Software (Roche) ausgewertet.

Zur Berechnung der Konzentration in Virusgenomen (vg)/ μl wurde der Durchschnitt aus den Duplikaten durch folgende Rechnung ermittelt:

$$\frac{vg}{\mu l} = \frac{c(1) \cdot d(1) + c(2) \cdot d(2)}{2}$$

c = Gemessene Konzentration

d = Verdünnungsfaktor

3.2.2.9 Ethanol-fällung von DNA

Zur Ethanol-fällung von DNA wurde folgende Fällung angesetzt:

$x \mu\text{l}$	DNA-Probe
$x/10 \mu\text{l}$	Natriumacetat (3 M)
$2x \mu\text{l}$	Ethanol (absolut)
$1 \mu\text{l}$	Glycogen

Der Ansatz wurde gründlich gemischt und anschließend für 2 h bei -20°C gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei $20817 \times g$ für 30 min bei 4°C pelletiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und zum Waschen $500 \mu\text{l}$ eiskaltes Ethanol (70 %) hinzugegeben. Der Ansatz wurde bei $20817 \times g$ für 8 min bei 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in ddH₂O resuspendiert.

3.2.3 Mikrobiologische Methoden

3.2.3.1 Kultivierung von *E. coli*

3.2.3.1.1 Kultivierung von *E. coli* auf Agarplatten

Zur Kultivierung von *E. coli* auf Agarplatten wurden die Bakterien auf LB-Amp-Agarplatten oder LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Einzelklone in Suspensionskultur genommen.

3.2.3.1.2 Kultivierung von *E. coli* in der Suspensionskultur

Zur Kultivierung von *E. coli* in der Suspensionskultur wurde mit einem Einzelklon einer LB-Amp-Agarplatte eine 5 ml-Suspensionskultur LB-Amp-Medium angeimpft. Die

Suspensionskultur wurde über Nacht, beziehungsweise bis die erforderliche Dichte erreicht war, bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Wenn größere Volumina der Suspensionskultur erforderlich waren, wurde anschließend mit der Präkultur ein größeres Volumen Medium angeimpft und erneut bis zur erforderlichen Dichte bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Mit ITR-haltigen AAV-Plasmiden transformierte E. coli wurden bei 30 °C und 175 rpm inkubiert, um die korrekte Amplifizierung der ITR zu gewährleisten.

3.2.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien

3.2.3.2.1 Elektrokompente E. coli

Benötigte Reagenzien:

1000 ml	SOB-Medium (3.1.5.2)
1500 ml	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) (1 mM, pH 7)
100 ml	10 % v/v Glycerol

Zur Herstellung elektrokompenter E. coli wurden diese auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotika (3.1.5.2) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde mit einem Einzelklon der LB-Agarplatte 50 ml SOB-Medium in einem 200 ml-Erlenmeyerkolben beimpft und dies über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am Tag darauf wurden vier Erlenmeyerkolben mit je 250 ml SOB-Medium mit 0,8 ml der Präkultur beimpft und bei Raumtemperatur und 200 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,75-0,8$ inkubiert. Anschließend wurden die Kolben für 15 min in Eiswasser gekühlt und zwischendurch geschwenkt. Danach wurden die Zellsuspensionen gleichmäßig auf sechs vorgekühlte sterile 250 ml-Zentrifugenbecher verteilt und bei $614 \times g$ für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die folgenden Schritte wurden soweit wie möglich auf Eis durchgeführt. Es wurde vorsichtig der Überstand entfernt und verworfen und das Pellet in je 150 ml eiskaltem HEPES (1 mM) resuspendiert. Die sechs Suspensionen wurden erneut bei $614 \times g$ für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand zügig entfernt und verworfen. Die Pellets wurden vorsichtig in je 60 ml eiskaltem HEPES (1 mM) resuspendiert und insgesamt in zwei Zentrifugenbecher vereint. Diese wurden bei $614 \times g$ für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und erneut zügig der Überstand entfernt und verworfen. Die zwei Pellets wurden in je 10 ml eiskaltem 10 % v/v Glycerol resuspendiert und in einem Zentrifugenbecher vereint. Dieser wurde bei $1381 \times g$ für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde schnell und vorsichtig der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 2,5 ml eiskaltem 10 % v/v Glycerol resuspendiert und anschließend in auf

Trockeneis vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Reaktionsgefäße wurden direkt nach Befüllung in Flüssigstickstoff überführt und danach bis zur Nutzung bei -80 °C gelagert.

3.2.3.2.2 Chemokompetente *E. coli*

Benötigte Reagenzien:

225 ml	LB-Medium ohne Antibiotika (3.1.5.2)
100 ml	Calciumchlorid (CaCl_2) (100 mM)
7,5 ml	CaCl_2 (50 mM)/20 % Glycerin

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli* wurden diese auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotika (3.1.5.2) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde mit einem Einzelklon der LB-Agarplatte 25 ml LB-Medium ohne Antibiotika angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und bei 200 rpm inkubiert. Am Tag darauf wurden 200 ml LB-Medium mit 7 ml der Präkultur beimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,5-0,6$ inkubiert. Die folgenden Schritte wurden, sofern möglich, auf Eis durchgeführt. Die Kultur wurde auf zwei vorgekühlte und sterile 250 ml-Zentrifugenbecher verteilt. Diese wurden bei $3107 \times g$ für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und verworfen. Die Pellets wurden jeweils in 50 ml eiskaltem CaCl_2 (100 mM) resuspendiert und anschließend in einen Zentrifugenbecher zusammengefügt. Die Zellsuspension wurde dann 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei $3107 \times g$ für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 7,5 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 /20 % Glycerin resuspendiert und zügig in auf Trockeneis vorgekühlte Reaktionsgefäße verteilt und direkt nach dem Befüllen in Flüssigstickstoff überführt und danach bis zur Nutzung bei -80 °C gelagert.

3.2.3.3 Plasmidtransformation von *E. coli*

3.2.3.3.1 Plasmidtransformation durch Elektroporation

Zur Plasmidtransformation von elektrokompenten *E. coli* mittels Elektroporation wurde $1\ \mu\text{l}$ ($c = 100\ \text{ng}$) Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und auf Eis gekühlt. Die elektrokompenten *E. coli* (3.2.3.2.1) wurden auf Eis aufgetaut, $20\ \mu\text{l}$ auf die Plasmid-DNA gegeben und vorsichtig auf- und abpipettiert. Danach wurde der Ansatz zügig in eine vorgekühlte Küvette pipettiert. Dabei wurden Luftblasen in der Küvette vermieden und die Küvette anschließend sorgfältig aber schnell abgetrocknet, um im folgenden Schritt keinen

Kurzschluss zu provozieren. Die Küvette mit Transformationsansatz wurde im Elektroporator platziert und die Elektroporation mit 25 µF, 200 Ohm und 1,8 kV durchgeführt. Die Elektroporation wurde als gelungen bewertet, wenn die Zeitkonstante > 4,8 ms war. Der Ansatz wurde zügig in ein Kulturröhrchen mit 2 ml vorgewärmtem SOC-Medium (3.1.5.2) überführt und 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Danach wurde die Suspension auf einer vorgewärmten LB-Amp-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit Einzelklonen Suspensionskulturen angeimpft.

3.2.3.3.2 Plasmidtransformation durch Hitzeschock

Zur Plasmidtransformation von chemokompetenten *E. coli* mittels Hitzeschock wurde 1 µl Plasmid-DNA ($c = 100$ ng) im Reaktionsgefäß auf Eis vorgekühlt. 50 µl chemisch kompetente *E. coli* (3.2.3.2.2) wurden auf Eis aufgetaut, anschließend auf die vorgekühlte Plasmid-DNA gegeben, vorsichtig auf- und abpipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß unmittelbar in ein 42 °C warmes Wasserbad überführt, 30 sec inkubiert und danach 2 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde folgend in 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium (3.1.5.2) überführt, 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, danach auf eine vorgewärmte LB-Amp-Agar-Platte (3.1.5.2) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit Einzelklonen Übernachtskulturen angeimpft (weitere Schritte unterscheiden sich je nach Versuchsaufbau).

3.2.4 Virologische Methoden

3.2.4.1 Herstellung von rekombinanten AAV-Vektorpartikeln in HEK293T

Adaptiert nach Xiao et al. (Xiao et al., 1998).

3.2.4.1.1 Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen

Zur Herstellung rekombinanten AAV (rAAV) wurden pro Ansatz fünf 145 mm-Zellkulturschalen (Greiner) mit HEK293T-Zellen mit einer Dichte von je 10^7 Zellen pro Platte in absolut 17 ml *DMEM*-Vollmedium (3.2.1.1.1) ausgesät und am Folgetag bei einer Dichte von 50–70 % transfiziert. Es wurde folgender Mastermix zur Transfektion von fünf Kulturschalen angesetzt:

3 µg	pXX2-187	AAV2-rep/cap mit Peptid-kodierender Insertion (3.2.4.1.1.1)
6 µg	pXX6	Adenovirales Helferplasmid (3.2.4.1.1.2)

3 µg pAAV-CAG-eGFP Reportergen
Ad 2250 µl *DMEM high glucose*

Zu dem vorgelegten Ansatz wurden 600 µl *Polyfect Transfection Reagent* (Qiagen) hinzupipettiert, gründlich gemischt und anschließend zur Komplexbildung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 5 ml *DMEM*-Vollmedium hinzugegeben, gemischt und zuletzt tröpfchenweise je 1570 µl auf die Zellkulturschalen verteilt. Nach 24 h wurden die Zellkulturschalen mit 6,5 ml *DMEM*-Vollmedium aufgefüllt und für weitere 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.4.1.1.1 AAV2-rep/cap mit Peptid-kodierendem Insertion

Zur Bereitstellung des AAV2-rep/cap-Plasmids pXX2-187 für die transiente Transfektion von HEK293T-Zellen wurden chemokompetente *E. coli* mit dem Plasmid-DNA transformiert (3.2.3.3.2). Anschließend wurden von der LB-Amp-Agarplatte Einzelklone in Suspensionskultur genommen und zur Analyse aus einem Teil der Suspensionskultur die Plasmid-DNA mit dem *mi-Plasmid Miniprep Kit* isoliert (3.2.2.1) und ein analytischer Restriktionsverdau mit dem Enzym *PstI* (New England Biolabs) und dem Puffer *NEBufferTM 3.1* (New England Biolabs) durchgeführt (3.2.2.3). Zur Anreicherung eines positiv analysierten Klons wurde das Volumen einer Suspensionskultur vergrößert und anschließend die Plasmid-DNA mit dem *NucleoBond[®] Xtra Maxi Kit* (Machery Nagel) zu isoliert (3.2.2.1). Die isolierte DNA wurde erneut zur Analyse mit *PstI* (New England Biolabs) verdaut. Zuletzt wurde das Plasmid mit *SfiI* (New England Biolabs) verdaut (3.2.2.3), um folgend die Peptid-kodierende Insertion in das Plasmid ligieren zu können (3.2.4.2.6).

3.2.4.1.1.2 Adenovirales Helferplasmid pXX6

Zur Bereitstellung des adenoviralen Helferplasmids pXX6 zur transienten Transfektion von HEK293T-Zellen wurden chemokompetente *E. coli* mit dem Plasmid transformiert (3.2.3.3.2). Anschließend wurden von der LB-Amp-Agarplatte Einzelklone in Suspensionskultur genommen und zur Analyse aus einem Teil der Suspensionskultur die Plasmid-DNA mit dem *mi-Plasmid Miniprep Kit* (Metabion) isoliert (3.2.2.1) und ein analytischer Restriktionsverdau mit dem Enzym *XhoI* (New England Biolabs) und dem Puffer *NEBufferTM 3.1* (New England Biolabs) durchgeführt (3.2.2.3). Das Volumen einer positiv analysierten Suspensionskultur wurde vergrößert, um anschließend die Plasmid-

DNA mit dem *NucleoBond® Xtra Maxi Kit* (Machery Nagel) zu isolieren (3.2.2.1). Die isolierte DNA wurde erneut zur Analyse mit *XhoI* verdaut und anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.4.1.2 Ernte der rAAV-Vektorpartikel

Zur Ernte der rAAV-Vektorpartikel wurden die transfizierten HEK293T-Zellen nach 48 h mit einem Zellschaber (Sarstedt) gelöst und die Suspension der fünf Zellkulturschalen in einem sterilen 250 ml-Zentrifugenbecher vereinigt. Die Platten wurden anschließend mit 8 ml PBS (1x) pro fünf Platten nachgespült und diese Suspension ebenfalls in den Zentrifugenbecher gegeben. Die Suspension wurde bei $212 \times g$ für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Anschließend wurden das Zellpellet und der Überstand getrennt. Zum Aufbrechen der Zellen wurde das HEK293T-Zellpellet drei Frier-/Tauzyklen (Wasserbad $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, Trockeneis in Ethanol absolut) unterzogen. Die zelluläre DNA der HEK293T-Zellen wurde durch Hinzugabe von *Benzonase®* (Sigma) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min verdaut. Anschließend wurde der Verdau bei $3000 \times g$ für 15 min zentrifugiert, um die zellulären Anteile zu pelletieren. Mit dem klaren Überstand wurde das Pellet aus der PEG8000-Fällung (3.2.4.1.3) resuspendiert.

3.2.4.1.3 Fällung von AAV-Partikeln mit PEG8000

Adaptiert nach Guo et al. (Guo et al., 2012).

Die im Überstand enthaltenen AAV-Partikel wurden gefällt, indem 10 g PEG8000 und 5,8 g NaCl pro 100 ml Volumen hinzugegeben und gelöst wurden. Anschließend wurde die Lösung über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Viruspartikel wurden bei $5000 \times g$ für 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet erneut bei $5000 \times g$ für 2 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit abzupipettieren. Das Pellet wurde im klaren Überstand des letzten Schrittes der Pellet-Aufreinigung resuspendiert (3.2.4.1.2). Zum Verdau der zellulären DNA der HEK293T-Zellen wurde $1\text{ }\mu\text{l}$ *Benzonase®* (Sigma) hinzupipettiert und der Ansatz für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wurde der Verdau bei $3000 \times g$ für 15 min pelletiert und der klare Überstand für die Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (3.2.4.1.4) verwendet.

3.2.4.1.4 Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Adaptiert nach Hermens et al. (Hermens et al., 1999).

Benötigte Reagenzien und deren Herstellung:

10x PBS-MK (500 ml):

500 ml 10x PBS
10 mM MgCl₂
25 mM KCl

Durch 0,22 µm-Filter (Sarstedt) steril filtriert.

1x PBS-MK:

Zur Herstellung von 1x PBS-MK wurde 10x PBS-MK 1:10 in sterilem ddH₂O verdünnt.

NaCl (5 M):

durch einen 0,22 µm -Filter (Sarstedt) steril filtriert.

Phenolrotlösung:

50 mg Phenolrot
Ad 10 ml ddH₂O

Der Ansatz wurde bei 200 × g für 30 min zentrifugiert und der Überstand anschließend durch einen 0,22 µm -Filter steril filtriert.

Vorratslösung für 15 %-Iodixanollösung:

60 ml NaCl (5 M)
30 ml 10x PBS-MK
135 ml ddH₂O

Die Lösung wurde im Voraus angesetzt und bei 4 °C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden zu 2,5 ml der Vorratslösung 0,83 ml *OptiPrep*TM (Axis-Shield/Nycomed) hinzupipettiert.

Vorratslösung für 25 %-Iodixanollösung:

30 ml 10x PBS-MK
2,25 ml Phenolrot
150 ml ddH₂O

Die Lösung wurde im Voraus angesetzt und bei 4 °C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden zu 1,481 ml der Vorratslösung 0,97 ml *OptiPrep*TM (Axis-Shield/Nycomed) hinzupipettiert.

Vorratslösung für 40 %-Iodixanollösung:

30 ml 10x PBS-MK
69,99 ml ddH₂O

Die Lösung wurde im Voraus angesetzt und bei 4 °C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden zu 0,665 ml der Vorratslösung 1,33 ml *OptiPrep*TM (Axis-Shield/Nycomed) hinzupipettiert.

Vorratslösung für **54 %-Iodixanollösung**:

30 ml 10xPBS-MK
2,25 ml Phenolrot gemischt

Die Lösung wurde im Voraus angesetzt und bei 4 °C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden zu 0,215 ml der Vorratslösung 1,8 ml *OptiPrepTM* (Axis-Shield/Nycomed) hinzupipettiert.

Zur Aufreinigung der AAV-Partikel mittels Iodixanol-Ultrazentrifugation wurde die vektorhaltige Suspension (3.2.4.1.3) mittels einer Kanüle in ein 13,5 ml-*Quick-SealTM*-Zentrifugenröhrchen (Beckman Coulter) überführt. Zuerst wurde die Vektorsuspension mit 3 ml der 15 %-Iodixanollösung (inkl. *OptiPrepTM*) unterschichtet, welche wiederum mit 2 ml der 25 %-Iodixanollösung (inkl. *OptiPrepTM*) unterschichtet wurde, worauf dann 1,66 ml der 40 %-Iodixanollösung (inkl. *OptiPrepTM*) und zuletzt 1,66 ml der 54 %-Iodixanollösung (inkl. *OptiPrepTM*) folgten. Diese Schritte wurden vorsichtig durchgeführt, sodass keine Luftblasen entstanden und die verschiedenen Schichten stets getrennt blieben. Falls nötig wurden die Röhrchen mit 1x PBS-MK aufgefüllt, sodass keine Luft im Röhrchen verblieb. Die Ultrazentrifugenröhrchen wurden mit dem *QuickSealTM*-Tube Topper (Beckman Coulter) zugeschweißt und bei 58000 × g für 70 min bei 18 °C im Vakuum im 70.1 Ti Rotor in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Danach wurde die vektorhaltige Schicht (40 %-Lösung) mit einer Nadel (23 G, Braun) punktiert. Zur Titration der rAAV-Partikel wurde eine qPCR durchgeführt (3.2.2.8.2). AAV-Vektorpartikel wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.4.2 *In vitro*-Selektion einer randomisierten AAV2-Peptidbank auf hPMVEC

Adaptiert nach Müller et al., Waterkamp et al. und Körbelin et al. (Körbelin et al., 2017; Müller et al., 2003; Waterkamp et al., 2006).

3.2.4.2.1 Inkubation der Peptidbank auf den Zielzellen

Zur Selektion der randomisierten rAAV2-R588(X)₇-Peptidbank auf hPMVEC wurden die Zellen in definierter Menge ($2,6 \cdot 10^5$) in einer mit Gelatine beschichteten (3.2.1.1.2) 6 cm-Zellkulturschale (Sarstedt) ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium von den Zellen entfernt, diese mit PBS gewaschen und mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 10000 Genkopien (*genomic particle*, gp) pro Zelle mit der randomisierten Peptidbank transduziert. Dabei wurde die MOI pro Selektionsrunde verringert: In der ersten Runde MOI 10000 gp, in der zweiten MOI 1000 gp, in der dritten MOI 100 gp. Die entsprechende Menge Vektorlösung der randomisierten AAV-Peptidbank wurde, in 2 ml EC-Medium ohne FCS

und ECGS (3.2.1.1.2) verdünnt, auf die Zellen gegeben und diese 4 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen, um die Vektoren ohne Tropismus für die Zielzellen zu entfernen. Es wurden 3 ml EC-Medium (3.2.1.1.2) auf die Zellen pipettiert und diese für 72 h inkubiert.

3.2.4.2.2 Vorgeschaltete Negativselektion der rAAV-Peptidbank auf HEK293T

Zusätzlich zur direkten Inkubation der randomisierten rAAV2-R588(X)₇-Peptidbank auf den Zielzellen wurde eine vorgeschaltete Negativselektion auf HEK293T-Zellen durchgeführt. Dazu wurden $1,8 \cdot 10^6$ HEK293T-Zellen in einer 6 cm-Zellkulturschale (Sarstedt) ausgesät und am Folgetag mit einer MOI von 11.111, damit die Diversität 10-fach abgedeckt ist, in 2 ml EC-Medium ohne FCS und ECGS (3.2.1.1.2) auf die Zellen gegeben. Nach 2 h Inkubation wurde das Medium abpipettiert, bei $300 \times g$ für 5 min zentrifugiert und der Überstand auf am Vortag ausgesäte hPMVEC gegeben (weitere Schritte wie 3.2.4.2.1).

3.2.4.2.2.1 Analyse der in HEK293T internalisierten AAV-DNA

Zur Analyse der in HEK293T-Zellen internalisierten AAV-DNA wurde diese isoliert (3.2.4.2.3), der Peptid-kodierende Bereich per PCR amplifiziert (3.2.2.8.1), dieser mit *BglII* (New England Biolabs) verdaut (3.2.4.2.5.1) und in ein neues mit *SfiI* verdautes Backbone-Plasmid (pMT-202-6) ligiert (3.2.2.6.1). Mit den ligierten AAV-Peptidbankplasmiden wurden elektrokompetente *E. coli* transformiert (3.2.3.3.1) und der Peptid-kodierende Bereich der AAV-DNA sequenziert (3.2.2.7).

3.2.4.2.3 Isolation von AAV-DNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolation von AAV-DNA aus eukaryotischen Zellen (hPMVEC oder HEK293T) wurden diese nach 72 h Inkubation mit der Peptidbank geerntet. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml frischem PBS mit einem Zellschaber (Sarstedt) gelöst. Die Zellsuspension wurde bei $250 \times g$ für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die im Zellpellet enthaltene DNA mit dem *DNAeasy[®] Blood and Tissue Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde mittels Spektralphotometrie (3.2.2.2) quantifiziert und anschließend gefällt (3.2.2.9).

3.2.4.2.4 PCR-basierte Amplifikation der AAV-Peptidbank Insertionen

Um den Bereich der AAV-DNA, der das Peptid-kodierende Insert enthält, zu amplifizieren, wurde eine PCR durchgeführt (3.2.2.8.1). Die PCR erfolgte in zwei Schritten. Es wurde ein Mastermix, der für die gesamte einzusetzende DNA reichte, angesetzt. Zuerst wurde eine Test-PCR mit einer kleinen Menge der DNA (ein Reaktionsansatz) durchgeführt. Zeigte die Test-PCR in der Agarosegelelektrophorese (3.2.2.5) die richtigen und die Negativkontrolle keine Banden, wurde der Mastermix als rein bewertet und die gesamte restliche DNA für die PCR eingesetzt. Nach der PCR wurden die PCR-Produkte gefällt (3.2.2.9).

3.2.4.2.5 Herstellung von sekundären/tertiären AAV-Peptidbanken

3.2.4.2.5.1 Verdau der Inserts

Das gefällte PCR-Produkt (3.2.4.2.4) wurde wie folgt verdaut:

40 µg	Insert-DNA
10 µl	<i>BglI</i> (New England Biolab)
10 µl	<i>NEBuffer</i> TM 3 (New England Biolab)
Ad 100 µl	ddH ₂ O

Der Ansatz wurde bei 37 °C für 4 h inkubiert. Anschließend wurde der Verdau mit dem *QIAquick*[®] *PCR Purification Kit* (Qiagen) bis zum dritten Schritt der Herstellerangaben aufgereinigt (3.2.2.4), wobei der Säulendurchfluss die DNA-Inserts enthält. Der Durchfluss der vier Säulen (je 10 µg DNA) wurde vereint, anschließend gefällt (3.2.2.9) und die Konzentration per Spektralphotometrie gemessen (3.2.2.2).

3.2.4.2.5.2 Ligation der Peptid-kodierenden Inserts in pMT-202-6

Die *BglI*-verdauten Inserts (3.2.4.2.5.1) wurden mit der *DNA T4 Ligase/Reaction Buffer* (New England Biolabs) in das Backbone-Plasmid pMT-202-6 (*SfiI*-verdaut, 3.2.2.3) ligiert (3.2.2.6.1). Um das Verhältnis zu ermitteln, unter dem die Ligation am suffizientesten abläuft, wurden Testligationen mit verschiedenen Verhältnissen zwischen AAV Peptidbank-Plasmid (pMT-202-6) zu Insert (1: 10, 1: 30, 1: 100). Eine Leerligation mit ddH₂O anstatt Insert diente als Negativkontrolle.

500 ng	pMT-202-6 (<i>SfiI</i> -verdaut)
18,63/55,9/186,3 ng (1: 10/1: 30/1: 100)	Insert (<i>BglI</i> -verdaut, 3.2.4.2.5.1)/ddH ₂ O für die Leerligation
Ad 20 µl	ddH ₂ O

Nach der Ligation wurden die Ansätze gefällt (3.2.2.9) und damit elektrokompetente *E. coli* transformiert (3.2.4.2.5.3).

3.2.4.2.5.3 Transformation elektrokompetenter *E. coli* mit Peptidbankplasmiden

3.2.4.2.5.3.1 Testtransformation elektrokompetenter *E. coli*

Zuerst wurde eine Testelektroporation der verschiedenen Backbone-Insert-Verhältnisse und der Leerligation (3.2.4.2.5.2) durchgeführt, um das Ligationsverhältnis zu ermitteln, das die meisten Kolonien auf LB-Amp-Agarplatten generiert. Direkt nach der Elektroporation (3.2.3.3.1) wurde der Ansatz in vorgewärmtes SOC-Medium (3.1.5.2) überführt und bei 37 °C für 1 h bei 200 rpm inkubiert. Daraufhin wurden die Kulturen verdünnt (1: 10, 1: 100, 1: 1000, 1: 10000) und je 100 µl auf vorgewärmte LB-Amp-Platten (3.1.5.2) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach 18 h wurden die Einzelklone auf den LB-Amp-Agar-Platten gezählt und aus den vier Verdünnungen eines Ligationsansatzes je der Durchschnitt ermittelt. Basierend auf der Anzahl der Einzelklone wurde die Transformationseffizienz (Transformationen/µg DNA) unter Abzug des Hintergrundes (dieser durfte maximal 1 % betragen) und unter der Annahme, dass durch die Fällung nach der Ligation sich die Konzentration nicht verändert hat, mit folgender Formel hochgerechnet:

$$\frac{\text{Transformationen}}{\mu\text{g DNA}} = n(x) \cdot d \cdot m \cdot a - n(0)$$

$n(x)$ = Anzahl der Kolonien auf einer Agarplatte mit Ligation (x); Leerligation (0)

d = Verdünnungsfaktor

m = Anteil der für den Ausstrich verwendeten Mediums vom Gesamtmedium
(2000/100)

a = Anzahl möglicher Elektroporationen mit gesamter DNA aus Ligationsansatz

Ergab die Rechnung, dass bei Elektroporation des gesamten Ligationsansatzes, $> 10^5$ Einzelklone wachsen würden und war der Hintergrund $< 1\%$, wurde der Ligationsansatz, der die meisten Klone generierte, für die Elektroporation im großen Ansatz eingesetzt.

3.2.4.2.5.3.2 Elektroporation im großen Ansatz

Mit dem Ligationsansatz des Plasmid-Insert-Verhältnisses, welches die meisten Einzelklone generiert hat, wurde der restliche Ligationsansatz zur Transformation elektrokompeter *E. coli* genutzt. Der Versuchsaufbau entsprach dem der Testligation (3.2.4.2.5.3.1). Jedoch wurden nach der Elektroporation die Kulturen aller Elektroporationen zusammengeführt, bei 37 °C für eine Stunde bei 200 rpm inkubiert und anschließend je 100 µl verschiedener Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) auf vorgewärmte LB-Amp-Platten (3.1.5.2) ausplattiert, um die Transformationseffizienz berechnen (3.2.4.2.5.3.1) und Einzelklone sequenzieren zu können. Mit dem restlichen SOC-Medium wurden 500 ml LB-Amp-Medium (3.1.5.2) angeimpft und diese Kultur bei 30 °C und 175 rpm für 12–20 h inkubiert, bis eine $OD_{600} = 0,2$ in einer 1:10-Verdünnung erreicht wurde. Am Folgetag wurde die Plasmid-DNA mit dem *NucleoBond® Xtra Midi Kit* soliert (Machery Nagel) (3.2.2.1). Zur Kontrolle wurde anschließend ein Restriktionsverdau mit *SmaI* (New England Biolabs) und *PstI* (New England Biolabs) durchgeführt (3.2.2.3). Um einen Überblick über die Diversität der selektierte Peptidbanken zu erhalten, wurde die Plasmid-DNA von zehn zufällig gewählten Einzelklonen isoliert (3.2.2.1) und sequenziert (3.2.2.7).

3.2.4.2.5.4 Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen

Zur Herstellung der nachfolgenden Peptidbanken innerhalb der Selektion wurde eine 145 mm-Zellkulturschale (Greiner) mit HEK293T-Zellen mit einer Dichte von je 10^7 Zellen in absolut 17 ml *DMEM*-Vollmedium (3.2.1.1.1) ausgesät und am Folgetag bei einer Dichte von 50–70 % transfiziert. Es wurde folgender Ansatz zur Transfektion einer Kulturschale angesetzt:

200 ng	pMT-202-6	Peptidbank-Plasmid mit randomisierter Peptidkodierender Insertion
11,8 µg	pXX6	Adenovirales Helferplasmid
Ad 450 µl	<i>DMEM high glucose</i>	

Zu dem vorgelegten Ansatz wurden 120 µl *Polyfect Transfection Reagent* (Qiagen) hinzupipettiert, gründlich gemischt und anschließend zur Komplexbildung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 ml *DMEM*-Vollmedium hinzupipettiert, gemischt und zuletzt tröpfchenweise auf die Zellkulturschale pipettiert. Nach 24 h wurde die Zellkulturschale mit 6,5 ml *DMEM*-Vollmedium aufgefüllt und für weitere 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Danach erfolgte die Ernte, Aufreinigung

(3.2.4.1.2 bis 3.2.4.1.4) und Titration via qPCR (Primer: AAV 1 fw/rev, 5 μ M; Standard: pMT-202-6-NNK7 Insert; 3.2.2.8.2) der AAV-Vektorpartikel.

3.2.4.2.6 Produktion von Einzelklon-rAAV

Um die Transduktionseffizienz von Einzelklonen auf Zellen testen zu können, wurden unter Cotransfektion mit einem Reportergenplasmid rAAV hergestellt, welche in transduzierten Zellen zu der Genexpression dieses Reportergens führten. Dazu wurden die Peptidkodierenden Fragmente aus dem ursprünglichen ITR-enthaltenden AAV-Peptidbank-Plasmid (pMT-202-6) in ein neues AAV-Plasmid (pXX2-187) ohne ITR übertragen. Hierfür wurde der Peptid-kodierende Bereich der entsprechenden Plasmide, ausgegangen von der Plasmid-DNA, die zum Sequenzieren isoliert wurde (3.2.4.2.5.3.2), per PCR amplifiziert (3.2.2.8.1), das PCR-Produkt gefällt (3.2.2.9), mit *BglI* (New England Biolabs) verdaut (3.2.4.2.5.1), bis zum dritten Schritt nach Herstellerangaben mit dem *QIAquick[®] PCR Purification Kit* aufgereinigt (Qiagen) (3.2.2.4), in ein neues AAV-Plasmid (pXX2-187, *SfiI*-verdaut, 3.2.2.3) ligiert und damit per Hitzeschock in chemokompetente *E. coli* transformiert (3.2.3.3.2, Modifikation: Es wurden 5 μ l Ligationsansatz und 90 μ l chemokompetente *E. coli* genutzt). Von den LB-Amp-Agarplatten wurden Einzelklone in Suspensionskultur genommen und die Plasmid-DNA mit dem *mi-Plasmid Miniprep Kit* (Metabion) isoliert (3.2.2.1). Diese wurde mittels zweier Restriktionsverdau (*SmaI*, *PstI*, 3.2.2.3) auf das richtige Backbone-Plasmid und mittels Sequenzierung (3.2.2.7) auf das richtige Insert analysiert. Der Verdau mit *SmaI* (New England Biolabs) diente der Überprüfung ob ITR in den Plasmiden enthalten waren. Dies wäre ein Zeichen dafür gewesen, dass das ehemalige Backbone-Plasmid pMT-202-6 enthalten ist. Der Verdau mit *PstI* sollte hingegen bei richtigem Backbone-Plasmid Schnittstellen zeigen. Korrekt ligierte Plasmide wurden anschließend in einer 500 ml-Suspensionskultur amplifiziert und die Plasmid-DNA isoliert (3.2.2.1). Die klonierten Plasmide wurden mittels transienter Transfektion von HEK293T-Zellen zur Herstellung rekombinanter AAV-Vektorpartikel genutzt (3.2.4.1.1). Danach erfolgte die Ernte, Aufreinigung (3.2.4.1.2 bis 3.2.4.1.4) und Titration via qPCR (Primer: AAV CAG fw/rev, 5 μ M; Standard: pAAV-CAG-LUC; 3.2.2.8.2) der Vektoren.

3.2.5 Evaluation rekombinanter AAV-Vektoren

3.2.5.1 Transduktion von hPMVEC und HEK293T mit rAAV-Vektoren

Um die Transduktionseffizienz von isolierten rAAV-Vektoren zu ermitteln wurden hPMVEC und HEK293T mit rAAV2-(X)_{7/12}-CAG-eGFP (2.4.2.6) transduziert. Dazu wurden 150.000/Well HEK293T-Zellen beziehungsweise 25.000/Well hPMVEC in je 500 µl Vollmedium auf einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Wells der hPMVEC wurde zuvor mit Gelatine beschichtet (3.2.1.1.2). Am Folgetag wurde das Vollmedium abgesaugt und der Vektorstock (3.2.4.2.6) verdünnt in Medium ohne FCS mit einer MOI von 25.000 gp auf die Zellen gegeben, sodass diese knapp bedeckt waren. Nach 4 h wurde auf jedes Well 500 µl Vollmedium gegeben. Die Zellen wurden für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert und anschließend analysiert.

3.2.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zur visuellen Evaluation der Genexpression des Reportergens eGFP unter der Kontrolle des Promotors CAG in hPMVEC und HEK293T-Zellen nach Transduktion mit rAAV-Vektorpartikeln wurden die transduzierten Zellen (3.2.5.1) unter dem Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25 (Zeiss) mit Quecksilberdampflampe und mit der Software AxioVision LE64 (Zeiss) analysiert.

3.2.5.3 Durchflusszytometrie

Die Anzahl eGFP-exprimierender hPMVEC und HEK293T-Zellen nach Transduktion mit rAAV-Vektorpartikeln wurde mittels Durchflusszytometrie im BD FACSCanto™ (BD Biosciences) gezählt und mit der Software *BD FACSDiva* (BD Biosciences) ausgewertet. Dazu wurden die Zellen geerntet (3.2.1.1.1 und 3.2.1.1.2), mit PBS gewaschen, das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Es wurden jeweils 10.000 Zellen mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm angeregt und auf Größe, Granularität und emittiertes Fluoreszenzsignal analysiert. Die eGFP-Signale transduzierter Zellen wurden basierend auf den Signalen nicht behandelter Zellen eingegrenzt und deren Anteil in Prozent von allen gezählten Zellen erhoben (Transduktionsrate).

3.2.5.4 Statistik

Die statistische Auswertung der mittels Durchflusszytometrie erhobenen Transduktionsraten erfolgte mittels PRISM 7 (GraphPad). Die Daten wurden anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse und dem Bonferroni-Test auf Signifikanz geprüft. Die Normalverteilung

wurde nach Kolmogorow-Smirnow getestet. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ festgelegt. Die Streuung wurde in Standardabweichungen (σ) gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Transduktionseffizienz von im Mausmodell vorselektierten AAV2-Kapsidmutanten auf hPMVEC und HEK293T mittels GFP Reporter-Assay

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe waren mittels *in vivo*-Selektionen randomisierter AAV2-Peptidbanken (mit Peptid-kodierenden Insertionen verschiedener Länge – 7mer und 12mer) im murinen Tiermodell AAV-Mutanten isoliert worden, die zielgerichtet die murine Lunge transduzieren. In dieser Arbeit wurde die Genexpression von fünf dieser Klone (rAAV2-ML(1–5)-CAG-eGFP; murine Lunge (ML)) *in vitro* in der humanen Primärzellkultur analysiert, um zu überprüfen, inwieweit der Tropismus von in der Maus selektierten AAV2-Vektoren auf hPMVEC übertragbar ist. Zudem wurden die Genexpression dieser Klone auf der Zelllinie HEK293T getestet, um einen Eindruck der Spezifität zu erhalten.

4.1.1 Herstellung der rekombinanten Vektoren rAAV2-ML(1–5)-CAG-eGFP

Zur Herstellung der AAV-Vektoren rAAV2-ML(1–5)-CAG-eGFP wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits die entsprechenden Peptid-kodierenden Nukleotid-Insertionen ML(1–5) in das rep/cap-Backbone-Plasmid pXX2-187 ligiert, mit den Ligationsansätzen pXX2-187-ML(1–5) *E. coli* transformiert und amplifiziert. Innerhalb dieser Arbeit wurde anschließend die Plasmid-DNA der transformierten *E. coli* für die spätere Sequenzierung isoliert (Tabelle 15, Spalte 2). Nach der Plasmid-Isolation wurden die Peptid-kodierenden Inserts der AAV-DNA durch SeqLab sequenziert. Das Peptid-kodierende Insert von pXX2-187-ML1 hat eine Länge von 21 Nukleotiden (entspricht 7 Aminosäuren) und die Peptidinserts von pXX2-187-ML(2–5) jeweils eine Länge von 36 Nukleotiden (entspricht 12 Aminosäuren). Alle fünf AAV2-Klone zeigten die gewünschten Peptidinsertionen; ML1: GIYFSDD, ML2: PRDTHQRQTEAF, ML3: RVPRSEDQVGEG, ML4: QGRGPREDVFQI und ML5: PRDTSQINGQLQ (Abbildung 2)

ML1 5' CAG AGA GGC **GGT ATC TAC TTC TCT GAT GAT** GCC CAG GCG 3'
 Q R G **G I Y F S D D** A Q A

ML2 5' CAG AGA GGC **CCA CGT GAT ACC CAT CAG CGT CAG ACC GAA GCA TTC** GCC CAG GCG 3'
 Q R G **P R D T H Q R Q T E A F** A Q A

ML3 5' CAG AGA GGC **CGT GTT CCA CGT TCT GAA GAT CAG GTT GGT GAA GGT** GCC CAG GCG 3'
 Q R G **R V P R S E D Q V G E G** A Q A

ML4 5' CAG AGA GGC **CAG GGT CGT GGT CCA CGT GAA GAT GTT TTC CAG ATC** GCC CAG GCG 3'
 Q R G **Q G R G P R E D V F Q I** A Q A

ML5 5' CAG AGA GGC **CCA CGT GAT ACC TCT CAG ATC AAC GGT CAG CTG CAG** GCC CAG GCG 3'
 Q R G **P R D T S Q I N G Q L Q** A Q A

Abbildung 2: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Peptid/Kapsid-kodierenden Bereiche ML(1–5) der in vivo-selektierten AAV2-Klone

Die obere Zeile zeigt die Nukleotid-, die untere Zeile die Aminosäuresequenz (orange) der im Mausmodell selektierten AAV2-Vektoren. Die Peptid-kodierenden Inserts (fett gedruckt) wurden im rep/cap-Backbone-Plasmid pXX2-187 an Position R588 (Aminosäurenummerierung VP1) eingefügt. Die Insertion von ML1 ist sieben Aminosäuren, die von ML(2–5) 12 Aminosäuren lang. Abkürzungen der Basen: Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T); Abkürzungen der Aminosäuren: Alanin (A), Aspartat (D), Glutaminsäure (E), Phenylalanin (F), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Leucin (L), Asparagin (N), Prolin (P), Glutamin (Q), Arginin (R), Serin (S), Threonin (T), Valin (V), Tyrosin (Y).

Anschließend wurden mittels transienter Transfektion von HEK293T-Zellen die rekombinanten Vektoren rAAV2-ML(1–5)-CAG-eGFP hergestellt. Nach Ernte und Aufreinigung wurden die Konzentrationen der Vektorstocks mittels qPCR ermittelt. Die Vektorausbeute betrug insgesamt $1,69 \times 10^{11}$ *genomic particles* (gp) im Fall von rAAV2-**ML1**-CAG-eGFP, $8,35 \times 10^{11}$ gp im Fall von rAAV2-**ML2**-CAG-eGFP, $1,58 \times 10^{11}$ gp im Fall von rAAV2-**ML3**-CAG-eGFP, $6,51 \times 10^{11}$ gp im Fall von rAAV2-**ML4**-CAG-eGFP und $4,81 \times 10^{11}$ gp im Fall von rAAV2-**ML5**-CAG-eGFP (Tabelle 15, Spalten 4–5).

Tabelle 15: Herstellung der Vektoren rAAV2-ML(1–5)-CAG-eGFP

Isolierte Plasmid-DNA der rep/cap-Plasmide pXX2-187 ML(1–5), Konzentrationen und Vektorpartikelmengen der anschließend generierten Vektoren rAAV2-ML(1–5)-CAG-eGFP

Rep/cap-Plasmid	Plasmid-DNA (µg)	rAAV2-Klon	gp/µl	gp (insgesamt)
pXX2-187-ML1	452,5	rAAV2-ML1-CAG-eGFP	$1,13 \times 10^8$	$1,69 \times 10^{11}$
pXX2-187-ML2	268,7	rAAV2-ML2-CAG-eGFP	$5,57 \times 10^8$	$8,35 \times 10^{11}$
pXX2-187-ML3	479,7	rAAV2-ML3-CAG-eGFP	$1,05 \times 10^8$	$1,58 \times 10^{11}$
pXX2-187-ML4	393,1	rAAV2-ML4-CAG-eGFP	$6,51 \times 10^8$	$6,51 \times 10^{11}$

pXX2-187-ML5	551,6	rAAV2-ML5-CAG-eGFP	$4,38 \times 10^8$	$4,81 \times 10^{11}$
--------------	-------	--------------------	--------------------	-----------------------

4.1.2 Genexpression in hPMVEC und HEK293T vermittelt durch rAAV2-ML(1–5)-CAG-eGFP

Zur Ermittlung der *in vitro* Transduktionseffizienz der zuvor im *in vivo* Mausmodell selektierten AAV-Kapsidmutanten rAAV2-ML(1–5)-CAG-eGFP in humanen Zellen, wurde die Transgenexpression des Reportergens eGFP unter der Kontrolle des CAG-Hybrid-Promotors in transduzierten Zellen gemessen. Dazu wurden hPMVEC (Zielzellen) und HEK293T (Kontrollzellen) auf 24-Well-Platten ausgesät und am Folgetag mit einer MOI von je 25.000 gp/Zelle mit rAAV2-ML(1–5)-CAG-eGFP transduziert. Als Kontrollen dienten Wildtyp-AAV2 (rAAV2-wt-CAG-eGFP) und der zuvor ebenfalls in der murinen Lunge selektierte AAV2-Klon rAAV2-ESGHGYF-CAG-eGFP (Körbelin et al., 2016c). Die Vektorpartikellösungen enthalten durch die Aufreinigung Iodixanol, welches sich potentiell negativ auf die Vitalität der Zellen hätte auswirken können. Daher wurden die Vektorpartikellösungen in dem Zelltyp entsprechenden Medium ohne Zusätze mindestens 1:2 verdünnt und die Zellen entsprechend der MOI möglichst knapp mit der Lösung bedeckt. Nach 48 h wurden die eGFP-exprimierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (Abbildung 3).

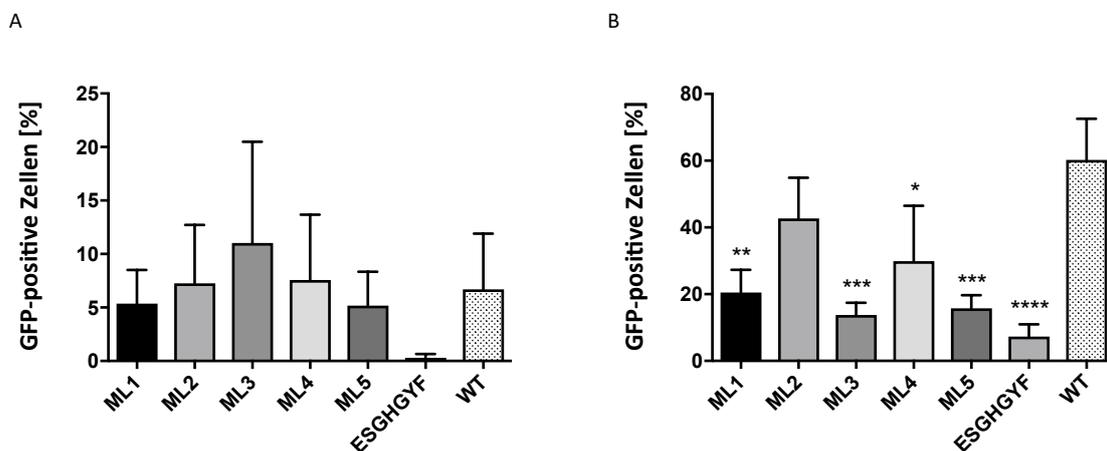


Abbildung 3: Transgenexpressionsraten humaner Zellen nach Transduktion mit im *in vivo*-Mausmodell selektierten rAAV-Vektoren

Transgenexpressionsraten des Reportergens eGFP unter der Kontrolle des Promotors CAG von hPMVEC (A) und HEK293T (B) 48 h nach Transduktion mit den AAV-Vektoren rAAV2-ML(1–5)-CAG-eGFP und rAAV2-wt-CAG-eGFP mit einer MOI von 25.000 gp/Zelle (auf X-Achse nach Peptid-kodierendem Inserts abgekürzt) (n=3). eGFP-exprimierende Zellen wurden im Durchflusszytometer gezählt, basierend auf den Signalen nicht behandelter Zellen eingegrenzt und deren Anteil in Prozent von allen gezählten Zellen erhoben (Transgenexpressionsraten). Die Transgenexpressionsraten wurden anhand einfaktorieller Varianzanalyse und dem Bonferroni-Test auf Signifikanz geprüft.

Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die Signifikanz von Unterschieden der Transgenexpressionsraten von rAAV2-ML(1–5)-CAG-eGFP zu rAAV2-wt-CAG-eGFP sind mit Sternen markiert (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Abkürzungen: enhanced green fluorescent protein (eGFP), genomic particles (gp), human embryonic kidney-Zellen (HEK293T), humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (hPMVEC), multiplicity of infection (MOI), Peptidinserts: GIYFSDD (ML1), PRDTHQRQTEAF (ML2), RVPRSEDQVGEG (ML3), QGRGPREDVFQI (ML4), PRDTSQINGQLQ (ML5), Rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus (rAAV), Wildtyp (wt).

Keiner der AAV-Vektoren mit zuvor im *in vivo*-Mausmodell selektierten Kapsidkodierenden Peptidinsertionen konnte auf hPMVEC eine Transgenexpression mit signifikantem Unterschied zum AAV2-Wildtyp induzieren (Abbildung 3, A). rAAV2-wt-CAG-eGFP zeigte im Mittel eine Transgenexpressionsrate von 6,7 % ($\sigma = 5,2$ %). Die im Mittel höchste Transgenexpressionsrate auf hPMVEC erreichte rAAV2-**ML3**-CAG-eGFP mit 11,3 % ($\sigma = 9,5$ %). rAAV2-**ML1**-CAG-eGFP erreichte im Mittel eine Transgenexpressionsrate von 5,4 % ($\sigma = 3,1$ %), rAAV2-**ML2**-CAG-eGFP von 7,3 % ($\sigma = 5,4$ %), rAAV2-**ML4**-CAG-eGFP von 7,6 % ($\sigma = 6,1$ %), rAAV2-**ML5**-CAG-eGFP von 5,2 % ($\sigma = 3,2$ %) und rAAV2-**ESGHGYF**-CAG-eGFP von 0,3 % ($\sigma = 0,4$ %).

Alle getesteten AAV-Vektoren, außer rAAV2-**ML2**-CAG-eGFP, zeigten jedoch auf HEK293T-Zellen eine signifikant geringere Transgenexpressionsrate als der AAV2-Wildtyp (rAAV2-wt-CAG-eGFP) (Abbildung 3, B), welcher im Mittel zu 60,2 % ($\sigma = 12,4$ %) eGFP-positiven HEK293T führte. rAAV2-**ML1**-CAG-eGFP erreichte im Mittel eine Transgenexpressionsrate von 20,5 % ($\sigma = 6,9$ %, $P = 0,0012$). rAAV2-**ML3**-CAG-eGFP erreichte im Mittel eine Transgenexpressionsrate von 13,8 % ($\sigma = 3,7$ %, $P = 0,0003$). rAAV2-**ML4**-CAG-eGFP erreichte im Mittel eine Transgenexpressionsrate von 29,9 % ($\sigma = 16,6$ %, $P = 0,0004$). rAAV2-**ML5**-CAG-eGFP erreichte im Mittel eine Transgenexpressionsrate von 15,8 % ($\sigma = 3,9$ %, $P = 0,0005$). rAAV2-**ESGHGYF**-CAG-eGFP erreichte im Mittel eine Transgenexpressionsrate von 7,3 % ($\sigma = 3,7$ %, $P < 0,0001$). Nur die Transgenexpressionsrate von rAAV2-**ML2**-CAG-eGFP unterschied sich mit im Mittel 42,7 % ($\sigma = 12,3$ %) nicht signifikant vom AAV2-Wildtyp.

4.2 *In vitro*-Selektion einer 7mer-AAV2-Peptidbank auf hPMVEC

Da die im *in vivo*-Mausmodell selektierten AAV-Kapsidmutanten ML1–5 keinen verbesserten Tropismus für hPMVEC aufwiesen (4.1), wurde im Weiteren versucht, mittels *in vitro*-Selektion einer AAV2-7mer-Peptidbank auf hPMVEC AAV2-Klone mit optimierten Tropismus für diese Zellen zu isolieren. Dazu wurde eine randomisierte AAV2-

7mer-Peptidbank, parallel in drei Ansätzen selektiert. In Ansatz A wurden alle drei Selektionsrunden auf hPMVEC des gleichen Spenders durchgeführt. In Ansatz B wurden die drei Selektionsrunden auf hPMVEC zweier verschiedener Spender durchgeführt, um potentielle individuelle Unterschiede zwischen den Spendern auszugleichen. Ansatz C beinhaltete eine vorgeschaltete Negativselektion zur Abreicherung von Kapsidmutanten mit intakter HSPG-Bindedomäne. Dazu wurde die Peptidbank jeweils erst auf HEK293T – also auf Nicht-Zielzellen – inkubiert und anschließend der Überstand, der mutmaßlich Vektorpartikel enthielt, die nicht in HEK293T internalisieren, auf hPMVEC inkubiert. So wurde versucht, Kapsidmutanten mit AAV2-Wildtyp-artigem Tropismus zu entfernen, da AAV2-Wildtyp bekannt dafür ist, die HSPG-reichen HEK293T-Zellen sehr effizient zu binden. Die zweite Selektionsrunde des Ansatzes C wurde einmal ohne (C.1) und einmal mit (C.2) erneuter Negativselektion auf HEK293T durchgeführt. In jeder Selektionsrunde wurde die MOI um den Faktor 10 reduziert: Von 10.000, auf 1.000 und in der dritten Runde auf 100 gp/Zelle (Abbildung 4). Die MOI der Transduktion der HEK293T-Zellen wurde so kalkuliert, dass die Diversität der AAV-Peptidbank um den Faktor 10 abgedeckt war, unter der Annahme, dass damit im Überstand ausreichend AAV-Vektorpartikel für die anschließende Transduktion der hPMVEC enthalten waren.

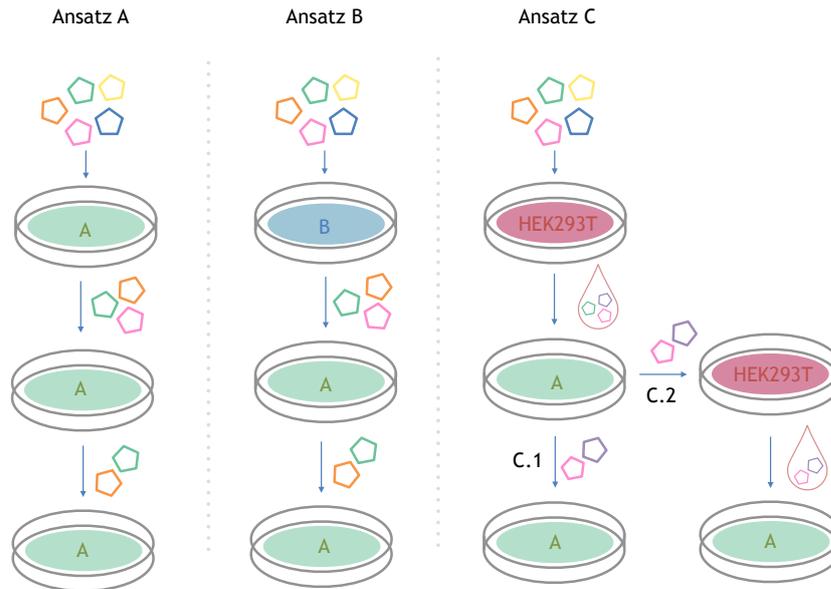


Abbildung 4: Schematische Übersicht der Selektionsansätze A, B und C

In Ansatz A waren die hPMVEC in den drei Selektionsrunden von dem selben Spender A (grün). In Ansatz B wurde die erste Selektionsrunde auf hPMVEC von Spender B (blau) und die zwei weiteren Selektionsrunden auf hPMVEC von Spender A durchgeführt. In Ansatz C wurde die Peptidbank (Pentagone) bevor sie auf hPMVEC von Spender A gegeben wurde, auf HEK293T-Zellen (rot) inkubiert – mit dem Ziel unspezifische Klone aus der Selektion herauszufiltern – und anschließend der Überstand (Tropfen) auf hPMVEC gegeben. Die zweite Selektionsrunde von Ansatz C wurde zwei Mal durchgeführt – Ansatz C.1 und C.2. In Ansatz C.1 wurde die sekundäre Peptidbank nicht erneut auf HEK293T-Zellen negativ selektiert. Auf Ansatz C.2 erfolgte eine erneute Negativselektion auf HEK293T vor der zweiten Selektionsrunde auf hPMVEC. Abkürzungen: human embryonic kidney-Zellen (HEK293T), humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (hPMVEC).

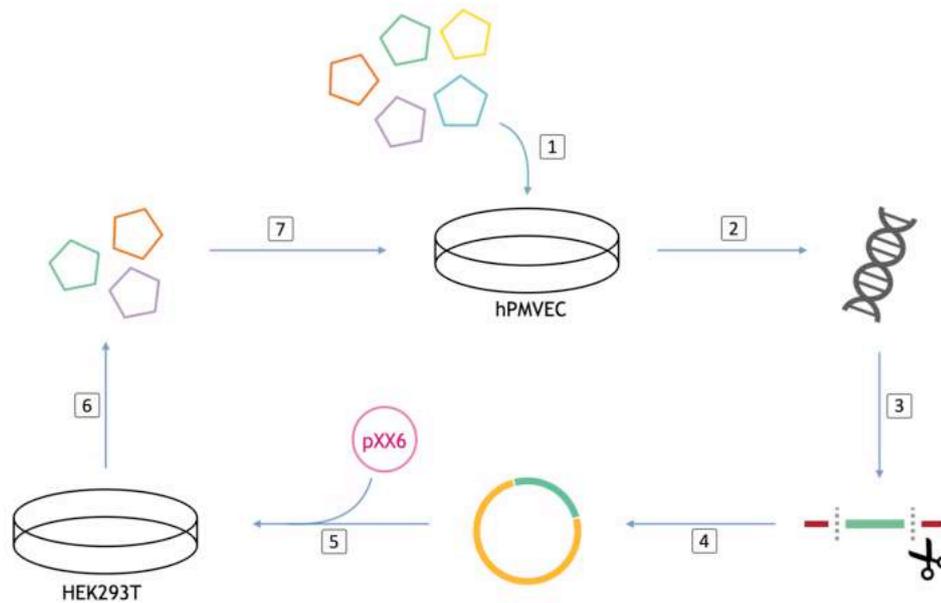


Abbildung 5: Schematische Darstellung der *in vitro*-Selektion einer randomisierten AAV2-Peptidbank auf hPMVEC

Zuerst wurde die randomisierte AAV2-Peptidbank (Pentagone) auf hPMVEC inkubiert (1). Nach 72 h wurde die intrazelluläre AAV-DNA, also die DNA von in die Zielzellen internalisierten rAAV, isoliert und mittels PCR und AAV-spezifischen Primern (AAV4 fw, AAV4 rev) amplifiziert (2). Die Peptid-kodierenden Inserts wurden aus dem AAV-Peptidbank-Plasmid verdaut (3) und in ein neues AAV-Peptidbank-Plasmid ligiert (4). Zur Herstellung der sekundären beziehungsweise tertiären AAV2-Peptidbanken wurden HEK293T-Zellen mit Peptidbank-Plasmiden und dem Helferplasmid pXX6 cotransfiziert (5). Nach Inkubation wurden die Zellen geerntet, die rekombinanten AAV-Vektorpartikel isoliert und aufgereinigt (6). Die so generierten AAV2-Peptidbanken wurden für die nachfolgenden Selektionsrunden auf hPMVEC genutzt (7). Abkürzungen: Adeno-assoziiertes Virus (AAV), Desoxyribonukleinsäure (DNA), human embryonic kidney-Zellen (HEK293T), humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (hPMVEC), Polymerase Kettenreaktion (PCR), Rekombinantes AAV (rAAV).

4.2.1 Isolation von AAV-DNA aus humanen Zellen nach Transduktion mit der AAV2-Peptidbank

Nach einer 72-stündigen Inkubation der randomisierten AAV2-Peptidbank auf den Zellen, wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-DNA isoliert (Abbildung 5, Schritt 2). In Selektionsansatz A konnten nach der ersten, zweiten und dritten Selektionsrunde 4,7 µg, 3,7 µg und 5,5 µg Gesamt-DNA isoliert werden. In Selektionsansatz B konnten nach der ersten, zweiten und dritten Selektionsrunde 1,1 µg, 5,4 µg und 3,4 µg Gesamt-DNA isoliert werden. Im Selektionsansatz C konnten nach der ersten und in den jeweils zweiten Selektionsrunden (C.1 und C.2) 4,5 µg, 6,1 µg und 8,2 µg Gesamt-DNA isoliert werden (Tabelle 16). Anschließend wurde mittels PCR unter der Verwendung von AAV-spezifischen Primern die AAV-DNA amplifiziert. Die verwendeten Primer binden im AAV-

Peptidbank-Genom und ermöglichen die Amplifikation eines etwa 400 bp langen Abschnittes des *Cap* Gens, der das Peptid-kodierende Oligonukleotid-Insert enthält. Anschließend wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert, ob die DNA-Proben die erwarteten Größen aufwiesen. In allen Selektionsrunden konnten mit der Agarosegelelektrophorese nach der PCR Banden der erwarteten Größe nachgewiesen werden (Abbildung 6). Durch die PCR konnte somit die isolierte AAV-DNA aller Selektionsansätze vervielfältigt werden (Tabelle 16, Spalte 4).

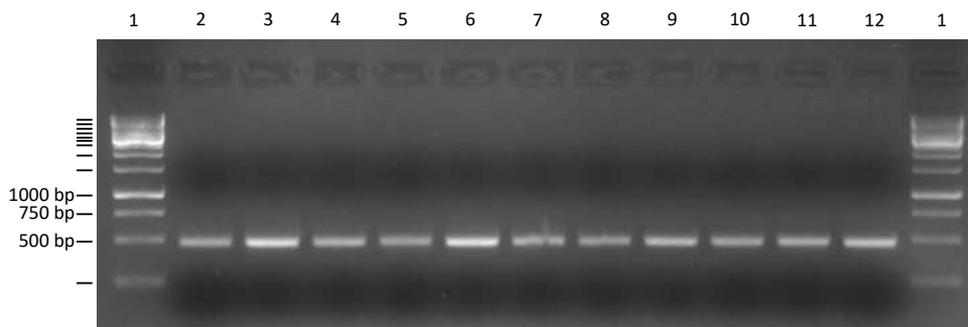


Abbildung 6: Aus humanen Zellen isolierte AAV-DNA nach Inkubation mit der AAV2-Peptidbank

Agarosegel (2 % Agarose, 15 µl/100 ml ROTI®GelStain) nach Agarosegelelektrophorese bei 90 Volt für 40 min in 1x TAE-Puffer. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer gefärbt. Die eingesetzten DNA-Proben zeigten nach Amplifikation via PCR mit AAV-spezifischen Primern Banden im 400 bp Bereich. GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific™) (1). Selektionsansatz A (2–4): Aus hPMVEC A isolierte, via PCR amplifizierte und gefällte DNA, nach erster (2), zweiter (3) und dritter (4) Selektionsrunde. Selektionsansatz B: Aus hPMVEC B isolierte, via PCR amplifizierte und gefällte DNA, nach erster (5) und aus hPMVEC A nach zweiter (6) und dritter (7) Selektionsrunde. Selektionsansatz C: Aus hPMVEC isolierte, via PCR amplifizierte und gefällte DNA, nach erster (8) und zweimal nach zweiter (9–10) Selektionsrunde und isolierte, via PCR amplifizierte und gefällte DNA aus den zwei HEK293T-Zellpellets der Negativselektion (11–12). Abkürzungen: Adeno-assoziiertes Virus (AAV), Basenpaare (bp), Desoxyribonukleinsäure (DNA), human embryonic kidney-Zellen (HEK293T), humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (hPMVEC), Polymerase Kettenreaktion (PCR).

4.2.2 Herstellung der nachfolgenden AAV2-7mer-Peptidbanken

Die isolierte und amplifizierte AAV-DNA wurde im Folgenden genutzt, um die vorselektierten AAV2-Peptidbanken für nachfolgende Selektionsrunden zu generieren. Nach Restriktionsverdau wurden die Peptid-kodierenden Insertionsbereiche aus den PCR-amplifizierten AAV-DNA-Fragmenten (Abbildung 5, Schritt 3) in ein kompatibel verdautes AAV-Peptidbank-Plasmid (pMT-202-6) ligiert (Abbildung 5, Schritt 4). Es wurden jeweils Testligationen mit verschiedenen Verhältnissen von Peptidbank-Plasmid zu Insert (1: 100,

1: 30 und 1: 10) angesetzt, um eine möglichst hohe Ligationseffizienz und damit eine hohe Diversität der Peptidbank zu erhalten. In der ersten Runde aller drei Selektionsansätze führte das Verhältnis aus AAV-Peptidbank-Plasmid zu Insert von 1: 100, in der zweiten Runde aller Selektionsansätze das Verhältnis 1: 30 und in der dritten Selektionsrunde in Ansatz A und B 1: 100 jeweils zur suffizientesten Ligation (Tabelle 16, Spalte 5). Mit den jeweils effizientesten Ligationsansätzen wurden elektrokompetente *E. coli* transformiert und folgend die theoretische Diversität, sprich die Anzahl unterschiedlicher transformierter Klone auf Agarplatten, berechnet (Formel siehe 3.2.4.2.5.3.1) (Tabelle 16, Spalte 7). In Ansatz A konnten in der ersten, zweiten und dritten Runde 500 ng eingesetzte Plasmid-DNA jeweils $2,08 \times 10^6$, $7,46 \times 10^6$ beziehungsweise $4,4 \times 10^6$ transformierte Klone generieren, in Ansatz B jeweils $1,01 \times 10^7$, $1,49 \times 10^6$ beziehungsweise $7,0 \times 10^6$ transformierte Klone generieren und in Ansatz C in der ersten Runde $1,55 \times 10^6$ und in den zweiten Runden $5,75 \times 10^6$ (C.1) beziehungsweise $1,8 \times 10^6$ (C.2) transformierte Klone generieren. Dabei betrug bei allen Ansätzen der Hintergrund der Leerligation $< 0,2 \%$. Die in *E. coli* amplifizierte Plasmid-DNA (Tabelle 2, Spalte 8) wurde isoliert und mittels Restriktionsverdau auf die Integrität der ITR analysiert. Die in AAV-Peptidbank-Plasmiden enthaltenen ITR sorgen für die notwendige Verpackung der AAV-Peptidbank-Genome in die korrespondierenden AAV-Kapside. In der Plasmid-DNA zur Herstellung der nachfolgenden AAV-Peptidbanken konnten in allen Selektionsansätzen mittels *MscI*-Verdau intakte ITR nachgewiesen werden (Abbildung 7). Anschließend wurden die sekundären beziehungsweise tertiären Peptidbanken mittels Transfektion von HEK293T hergestellt (Abbildung 5, Schritt 5). Nach Ernte und Aufreinigung wurden die Konzentrationen der Vektorstocks mittels qPCR ermittelt (Tabelle 16, Spalte 9). Die Ernte ergab insgesamt $1,23 \times 10^{12}$ gp ($1,12 \times 10^9$ gp/ μ l) der sekundären und $5,6 \times 10^{11}$ gp ($5,09 \times 10^8$ gp/ μ l) der tertiären AAV-Peptidbank in Ansatz A, $5,03 \times 10^{12}$ gp ($4,19 \times 10^9$ gp/ μ l) der sekundären und $5,35 \times 10^{11}$ gp ($5,35 \times 10^8$ gp/ μ l) der tertiären AAV-Peptidbank in Ansatz B und $6,48 \times 10^{11}$ gp ($7,2 \times 10^8$ gp/ μ l) der sekundären AAV-Peptidbank in Ansatz C. Die generierten AAV-Peptidbanken wurden für erneute Selektionsrunden eingesetzt (Abbildung 5, Schritt 7).

Tabelle 16: Übersicht über die Selektionsansätze A, B und C

Übersicht über die abnehmende MOI in jeder Selektionsrunde (die MOI der ersten Runde der Negativselektion C und der zweiten Runde C.2 wurden kalkuliert), die Menge an aus hPMVEC isolierter DNA, der DNA-Menge nach Amplifikation des Peptid-kodierenden Bereichs mittels PCR, dem jeweils gewählten Verhältnis aus Backbone-Plasmid zu Insert, den Hintergrund der Transformation, die berechnete Diversität, also die Anzahl

transformierter Klone pro eingesetzte DNA, die Menge isolierter Plasmid-DNA und die generierten AAV-Peptidbankpartikel

Ansatz	MOI	DNA Isolation (µg)	DNA PCR (µg)	Ligation	Hintergrund	Transformierte Klone pro 500 ng DNA	Isolierte Plasmid-DNA (µg)	AAV-Peptidbankpartikel (gp)
A - Runde 1	10.000	4,7	57,0	1:100	0 %	$2,08 \times 10^6$	101,97	$1,23 \times 10^{12}$
A - Runde 2	1.000	3,7	53,6	1:30	0 %	$7,46 \times 10^6$	88,7	$5,6 \times 10^{11}$
A - Runde 3	100	5,5	64,4	1:100	0,2 %	$4,4 \times 10^6$	/	/
B - Runde 1	10.000	1,1	55,5	1:100	0 %	$1,01 \times 10^7$	497,7	$5,03 \times 10^{12}$
B - Runde 2	1.000	5,4	58,7	1:30	0 %	$1,49 \times 10^6$	133,8	$5,35 \times 10^{11}$
B - Runde 3	100	3,4	57,0	1:100	0,2 %	$7,0 \times 10^6$	/	/
C - Runde 1		4,5	52,0	1:100	0 %	$1,55 \times 10^6$	74,34	$6,48 \times 10^{11}$
C - Runde 2 .1	1.000	6,1	66,4	1:30	0 %	$5,75 \times 10^6$	/	/
.2		8,2	97,3	1:30	0,2 %	$1,8 \times 10^6$	/	/

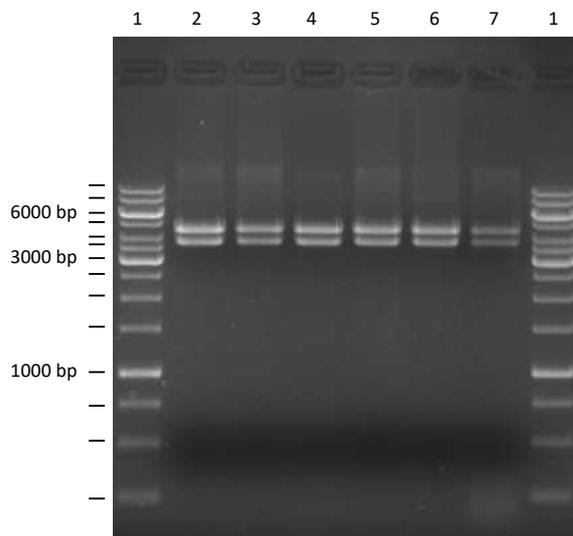


Abbildung 7: AAV-rep/cap-Peptidbankplasmide (pMT-202-6) mit intakten ITR

Agarosegel (1 % Agarose, 15 µl/100 ml *ROTI®GelStain*) nach Agarosegelelektrophorese bei 90 Volt für 1 h in 1x TAE-Puffer. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer gefärbt. Vor transienter Transfektion der HEK293T-Zellen zur Herstellung der nachfolgenden Peptidbanken wurde die Plasmid-DNA des AAV-rep/cap-Peptidbankplasmids pMT-202-6 mit *MscI* (Thermo Fisher Scientific™) verdaut, um die Integrität der ITR zu überprüfen. Die zwei Schnittstellen des Restriktionsenzym *MscI* liegen innerhalb der ITR. Sind diese intakt, sind Banden in der Größe von 4469 bp und 3852 bp zu erwarten. *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific™) (1). AAV-Peptidbank-Plasmide mit Peptidbank-Insertion (*Maxis/Midis*), *MscI*-verdaut(2). Abkürzungen: Adeno-assoziiertes Virus (AAV), Basenpaare (bp), Desoxyribonukleinsäure (DNA), *inverted terminal repeats* (ITR), *human embryonic kidney*-Zellen (HEK293T).

4.2.3 Anreicherung von AAV2-Kapsidvarianten

Innerhalb jeder Selektionsrunde wurde nach der Transformation elektrokompenter *E. coli* die Plasmid-DNA zehn zufällig gewählter Einzelklone isoliert und sequenziert, um einen Überblick über sich an- und abreichernde Aminosäuresequenzen der Kapsid-kodierenden

Nukleotid-Inserts zu erhalten. Die Nukleotidsequenzen wurden in die Aminosäuresequenzen translatiert.

4.2.3.1 Anreicherung in hPMVEC

Es wurden insgesamt 90 Peptid-kodierende Inserts der Plasmid-DNA von zufällig gewählten Einzelklonen nach Selektion der randomisierten AAV-Peptidbank auf hPMVEC sequenziert (Abbildung 8). Sechs Sequenzierungen waren fehlerhaft, sodass nur 84 Sequenzen ausgewertet werden konnten. Unter den 84 Sequenzen haben sich acht Aminosäuresequenzen mindestens zwei Mal wiederholt: NRVNDHQ kam 30 x, NEVRPHA 17 x, NSVQWTT 4 x, DGDWLKA 4 x, NDRGQAS 3 x, LATHXTF 2 x, NQARYDQ 2 x und NSTGWNA 2 x unter allen Sequenzierungen vor. NRVNDHQ zeigte sich in der zweiten und dritten Selektionsrunde aller drei Selektionsansätze und wurde dabei in Selektionsansatz A in jeweils bei sechs von zehn Klonen, in Selektionsansatz B in der zweiten Runde bei drei und in der dritten Runde bei sieben von zehn und in Selektionsansatz C je bei vier von zehn Klonen detektiert. NEVRPHA zeigte sich in allen Runden aller drei Selektionsansätze – ausgenommen der ersten Selektionsrunde der Negativselektion: In Selektionsansatz A wurde die Aminosäuresequenz NEVRPHA in der ersten Runde bei einem von neun, in der zweiten Runde bei drei von zehn und in der dritten Runde bei zwei von zehn Klonen detektiert. In Selektionsansatz B wurde NEVRPHA in der ersten und zweiten Runde bei je einem von sechs beziehungsweise zehn und in der dritten Runde bei zwei von zehn Klonen detektiert. In Selektionsansatz C wurde NEVRPHA in der zweiten und dritten Selektionsrunde bei je drei von zehn Klonen detektiert. NSVQWTT zeigte sich bei einem der zehn sequenzierten Klone in der dritten Selektionsrunde von Ansatz A und bei drei von zehn Klonen in der zweiten Selektionsrunde von Ansatz B. DGDWLKA und NDRGQAS zeigten sich je in den ersten Selektionsrunden von Ansatz B und C – je bei einem von sechs Klonen in Ansatz B und bei drei beziehungsweise zwei von zehn Klonen in Ansatz C. LATHXTF zeigte sich je bei einem Klon in den ersten Runden von Ansatz A und C. NQARYDQ zeigte sich je bei einem Klon in der zweiten Runde von Ansatz A und in der dritten Runde von Ansatz B. NSTGWNA zeigte sich je bei einem Klon in der ersten Runde von Ansatz B und in der dritten Runde von Ansatz C. Insgesamt konnten 27 verschiedene Aminosäuresequenzen differenziert werden, die teilweise an der gleichen Position gleiche Aminosäuren bis zu gleichen Aminosäuremotiven zeigten. 14 der 27 verschiedenen Aminosäuresequenzen, beziehungsweise 64 aller sequenzierten Klone, zeigten an der ersten Insertposition Asparagin (N). Vier der 27 verschiedenen

Aminosäuresequenzen, beziehungsweise 56 aller sequenzierten Klone, zeigten an der dritten Insertposition Valin (V) und fünf der 27 verschiedenen Aminosäuresequenzen, beziehungsweise 23 aller sequenzierten Klone, zeigten an der vierten Insertposition Arginin (R). Vier der 27 verschiedenen Aminosäuresequenzen, beziehungsweise 49 aller sequenzierten Klone, zeigten an der sechsten Insertposition Histidin (H). Drei der 27 verschiedenen Aminosäuresequenzen zeigten an der siebten Insertposition Alanin (A) oder Glutamin (Q). Insgesamt zeigten 5 der 27 differenzierbaren Aminosäuresequenzen das Motiv NXVXXXX. Die zwei häufigsten Sequenzen, NEVRPHA und NRVNDHQ, zeigten beide das Motiv NXVXXHX. 5 der 27 differenzierbaren Aminosäuresequenzen zeigten das Motiv NXXRXXX. Die Aminosäuresequenz NEVRPHA vereint diese gehäuften Motive (NXVRXHX).

A			B			C		
Runde 1	Runde 2	Runde 3	Runde 1	Runde 2	Runde 3	Runde 1	Runde 2.1	Runde 2.2
NEVRPHA	NRVNDHQ	NRVNDHQ	NDRGQAS	NATQLHQ	NRVNDHQ	DGDWLKA	NEVRPHA	NEVRPHA
WGGGTPX	NRVNDHQ	NRVNDHQ	DGDWLKA	NRVNDHQ	NRVNDHQ	GSTQMAQ	NRVNDHQ	NEVRPHA
SQHAGGP	NRVNDHQ	NRVNDHQ	AVGPNQT	NRVNDHQ	NEVRPHA	DGDWLKA	NRVNDHQ	NAVRETS
XPNQPSS	NEVRPHA	NRVNDHQ	NSTGWNA	NRVNDHQ	NRVNDHQ	AWGEKVV	NEVRHID	NRVNDHQ
VEAKAGW	NQARYDQ	NRVNDHQ	NEVRPHA	NSVQWTT	NRVNDHQ	NDRGQAS	NQARWAE	NTTQTTY
QVIPQHG	NRVNDHQ	NMARQID	HGPAHAG	NEVRPHA	NRVNDHQ	LATHQTF	NEVRPHA	NRVNDHQ
NQAQLPP	NRVNDHQ	NEVRPHA		NSVQWTT	NRVNDHQ	NDRGQAS	DVVYRRE	NSTGWNA
LATHXTF	NEVRPHA	NEVRPHA		NSVQWTT	NEVRPHA	DGDWLKA	NRVNDHQ	NRVNDHQ
NXTHYEK	NEVRPHA	NSVQWTT		NSVYDKP	NRVNDHQ	YINTTSY	NEVRPHA	NEVRPHA
	NRVNDHQ	NRVNDHQ		NHVHQAT	NQARYDQ		NRVNDHQ	NRVNDHQ

●	NRVNDHQ (30x)
●	NEVRPHA (17x)
●	NSVQWTT (4x)
●	DGDWLKA (4x)
●	NDRGQAS (3x)
●	LATHXTF (2x)
●	NQARYDQ (2x)
●	NSTGWNA (2x)

Abbildung 8: Aminosäuresequenzen der Kapsid-kodierenden Inserts zufällig gewählter Einzelklone in jeder Selektionsrunde der Selektionsansätze A, B und C

Rechts sind sämtliche sich wiederholenden Aminosäuresequenzen der Inserts nach Häufigkeit sortiert aufgeführt und deren Vorkommen farblich in der Tabelle markiert. Abkürzungen der Aminosäuren: Alanin (A), Aspartat (D), Glutaminsäure (E), Phenylalanin (F), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Lysin (K), Leucin (L), Methionin (M), Asparagin (N), Pyrrolysin (O), Prolin (P), Glutamin (Q), Arginin (R), Serin (S), Threonin (T), Selenocystein (U), Valin (V), Tryptophan (W), unbekannt (X), Tyrosin (Y).

4.2.3.2 Anreicherung in HEK293T

Nach den Negativselektionsrunden wurden 10,96 µg und 8,91 µg Gesamt-DNA aus den HEK293T-Zellen isoliert (Tabelle 17, Spalte 3) und wie zuvor via PCR mit AAV-spezifischen Primern der Peptid-kodierende Bereich der AAV-DNA amplifiziert (Tabelle 17, Spalte 4). Mittels Agarosegelelektrophorese konnten Banden im erwarteten 400 bp-Bereich nachgewiesen werden (Abbildung 6, Spalte 11–12). Nach Ligation der Peptid-kodierenden Insertionen in das AAV-Peptidbank-Plasmid (pMT-202-6) wurden elektrokompente E. coli transformiert und nach Amplifikation die Plasmid-DNA je fünf zufällig gewählter Einzelklone pro Negativselektionsrunde isoliert und sequenziert. Eine Sequenzierung war fehlerhaft, sodass nur neun Sequenzen ausgewertet werden konnten. Die

Aminosäuresequenzen der sequenzierten Klone der ersten Selektionsrunde waren SEGHRMF, NGIQWRE, NATQLHQ und NFIDDSQ und die der zweiten Selektionsrunde 3 x NRVNDHQ und 2 x NEVRPHA (Abbildung 9) – durch die Wiederholungen der zuletzt genannten konnten also sechs verschiedene Aminosäuresequenzen differenziert werden. Auch in diesen Sequenzen Peptid-kodierender Inserts, wiederholten sich an der gleichen Insertposition Aminosäuren, die sich auch in den Peptid-Sequenzen der aus hPMVEC isolierten Klone zeigten. Acht der neun sequenzierten Aminosäureinserts zeigten auch an der ersten Insertposition ein Asparagin (**N**), vier an der zweiten Insertposition eine Glutaminsäure (**E**), fünf an der dritten Insertposition ein Valin (**V**), drei beziehungsweise zwei an der vierten Insertposition ein Arginin (**R**) oder Glutamin (**Q**), sechs an der sechsten Insertposition Histidin (**H**), drei an der siebten Insertposition Alanin (**A**) und vier an der siebten Insertposition Glutamin (**Q**). Unter den neun Sequenzen zeigte sich bei zweien an der dritten Insertposition Isoleucin (**I**), was keiner der 84 aus hPMVEC isolierten Klonen zeigte. Insgesamt wiederholten sich die Peptidmotive **NXIXXXX** (2x), **NXXQXXX** (2x), **NXXXXXQ** (2x) und **NXVXXXX** (5x).

Tabelle 17: Übersicht über die Negativselektion C auf HEK293T

	MOI	DNA-Menge nach Isolation	DNA-Menge nach PCR
Runde 1	11.111 (entspricht 100-fach abgedeckter Diversität)	10,96 µg	77,31 µg
Runde C.2	10.000 (damit die eigentliche MOI von 1000 in der zweiten Runde auf den HEKs 10-fach abgedeckt ist)	8,91 µg	78,86 µg

HEK1	5'	CAG	AGA	GGC	TCT	GAA	GGT	CAT	CGT	ATG	TTC	GCC	CAG	GCG	3'
		Q	R	G	S	E	G	H	R	M	F	A	Q	A	
HEK2	5'	CAG	AGA	GGC	AAC	GGT	ATC	CAG	TGG	CGT	GAA	GCC	CAG	GCG	3'
		Q	R	G	N	G	I	Q	W	R	E	A	Q	A	
HEK3	5'	CAG	AGA	GGC	AAC	GCA	ACC	CAG	CTG	CAT	CAG	GCC	CAG	GCG	3'
		Q	R	G	N	A	T	Q	L	H	Q	A	Q	A	
HEK4	5'	CAG	AGA	GGC	AAC	TTC	ATC	GAT	GAT	TCT	CAG	GCC	CAG	GCG	3'
		Q	R	G	N	F	I	D	D	S	Q	A	Q	A	
<hr/>															
HEK1	5'	CAG	AGA	GGC	AAC	GAA	GTT	CGT	CCA	CAT	GCA	GCC	CAG	GCG	3'
		Q	R	G	N	E	V	R	P	H	A	A	Q	A	
HEK2	5'	CAG	AGA	GGC	AAC	GAA	GTT	CGT	CCA	CAT	GCA	GCC	CAG	GCG	3'
		Q	R	G	N	E	V	R	P	H	A	A	Q	A	
HEK3	5'	CAG	AGA	GGC	AAC	CGT	GTT	AAC	GAT	CAT	CAG	GCC	CAG	GCG	3'
		Q	R	G	N	R	V	N	D	H	Q	A	Q	A	
HEK4	5'	CAG	AGA	GGC	AAC	CGT	GTT	AAC	GAT	CAT	CAG	GCC	CAG	GCG	3'
		Q	R	G	N	R	V	N	D	H	Q	A	Q	A	
HEK5	5'	CAG	AGA	GGC	AAC	GAA	GTT	CGT	CCA	CAT	GCA	GCC	CAG	GCG	3'
		Q	R	G	N	E	V	R	P	H	A	A	Q	A	

Abbildung 9: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Peptid/Kapsid-kodierenden Bereiche der aus HEK293T-isolierten AAV2-Klone

Die obere Zeile zeigt die Nukleotid-, die untere Zeile die Aminosäuresequenz (rot) der im Rahmen der Negativselektion aus HEK293T (erste Selektionsrunde Zeilen 1–4, zweite Selektionsrunde (C.2) Zeilen 5–9) isolierten AAV2-DNA. Die Peptid-kodierenden Inserts (fett gedruckt) wurden ins AAV-Plasmid pMT-202-6 eingefügt. Abkürzungen der Basen: Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T); Abkürzungen der Aminosäuren: Alanin (A), Aspartat (D), Glutaminsäure (E), Phenylalanin (F), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Leucin (L), Asparagin (N), Prolin (P), Glutamin (Q), Arginin (R), Serin (S), Threonin (T), Valin (V), Tryptophan (W).

4.3 Analyse der Transduktionseffizienz *in vitro* selektierter AAV2 Kapsidmutanten auf hPMVEC und HEK293T mittels GFP Reporter-Assay

4.3.1 Herstellung der rekombinanten Vektoren rAAV2-hEC(1–5)-CAG-eGFP

Zuerst wurden aus den Sequenzierungen (Abbildung 8) fünf Mutanten für die Herstellung von transgtragenden rekombinanten AAV-Vektorpartikeln ausgewählt. NRVNDHQ (hEC2) und NEVRPHA (hEC1) waren mit Abstand die häufigsten Sequenzen. DGDWLKA (hEC3), NDRGQAS (hEC4) und LATHQTF (hEC5) kamen sowohl in der Negativselektion als auch je in anderen Selektionsansätzen vor – zusätzlich zeigen die ersteren alternative Aminosäuremotive. Alle Klone mit gleicher Kapsid-kodierender Aminosäureinsertion zeigten auf Nukleotidebene ebenfalls die gleiche Sequenz, wodurch eine Auswahl auf Nukleotidebene zwischen verschiedenen Klonen nicht nötig war. Um die Transduktionseffizienz dieser AAV-Kapsidmutanten in Zielzellen beurteilen zu können, wurden rAAV mit GFP-Reportergen, unter der Kontrolle des hybriden CAG-Promotors, hergestellt. Dafür wurde zunächst das jeweilige Peptid-kodierende Insert aus dem ITR-enthaltenden AAV-Peptidbank-Plasmid (pMT-202-6) isoliert und in ein AAV-Plasmid

ohne ITR (pXX2-187) ligiert, welches für die Herstellung von rAAV benötigt wird. Die Abwesenheit von ITR in der Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsverau mit MscI überprüft (Abbildung 10). Die Integrität des Plasmids pXX2-187 wurde ferner mittels Restriktionsverdau mit PstI analysiert und die Plasmide wurden zur Überprüfung des richtigen Inserts sequenziert (Abbildung 11).

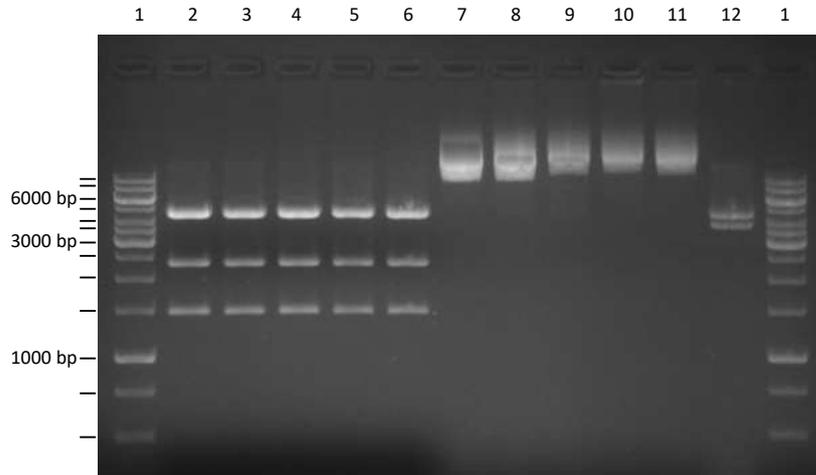


Abbildung 10: Analyse des AAV-rep/cap-Backbone-Plasmids von pXX2-187-hEC(1–5)

Agarosegel (1 % Agarose, 15 µl/100 ml ROTI®GelStain)) nach Agarosegelelektrophorese bei 90 Volt für 1 h in 1x TAE-Puffer. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer gefärbt. GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific™) (1) pXX2-187-hEC1 PstI-verdaut (2), pXX2-187-hEC2 PstI-verdaut (3), pXX2-187-hEC3 PstI-verdaut (4), pXX2-187-hEC4 PstI-verdaut (5), pXX2-187-hEC5 PstI-verdaut (6), pXX2-187-hEC1 MscI-verdaut (7), pXX2-187-hEC2 MscI-verdaut (8), pXX2-187-hEC3 MscI-verdaut (9), pXX2-187-hEC4 MscI-verdaut (10), pXX2-187-hEC5 MscI-verdaut (11). Das Restriktionsenzym PstI verdaut pXX2-187 zu DNA-Fragmenten einer Größe von 4151, 2327, 1463 und 418 bp. pXX2-187 hat keine MscI-Schnittstellen. Zur Kontrolle diente das MscI-verdaute AAV Peptidbank-Plasmid pMT-202-6. Abkürzungen: Adeno-assoziiertes Virus (AAV), Basenpaare (bp), Desoxyribonukleinsäure (DNA), Peptidinserts: NEVRPHA (hEC1), NRVNDHQ (hEC2), DGDWLKA (hEC3), LATHQTF (hEC5), NDRGQAS (hEC4).

hEC1 5' CAG AGA GGC **AAC GAA GTT CGT CCA CAT GCA** GCC CAG GCG 3'
 Q R G **N E V R P H A** A Q A

hEC2 5' CAG AGA GGC **AAC CGT GTT AAC GAT CAT CAG** GCC CAG GCG 3'
 Q R G **N R V N D H Q** A Q A

hEC3 5' CAG AGA GGC **GAT GGT GAT TGG CTG AAA GCA** GCC CAG GCG 3'
 Q R G **D G D W L K A** A Q A

hEC4 5' CAG AGA GGC **CTG GCA ACC CAT CAG ACC TTC** GCC CAG GCG 3'
 Q R G **L A T H Q T F** A Q A

hEC5 5' CAG AGA GGC **AAC GAT CGT GGT CAG GCA TCT** GCC CAG GCG 3'
 Q R G **N D R G Q A S** A Q A

Abbildung 11: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Peptid/Kapsid-kodierenden Bereiche hEC1–5 der in vitro-selektierten AAV2-Klone

Die obere Zeile zeigt die Nukleotid-, die untere Zeile die Aminosäuresequenz (grün) der in vitro in hPMVEC selektierten AAV2-Klone. Die Peptid-kodierenden Inserts (fett gedruckt) wurden im rep/cap-Backbone-Plasmid pXX2-187 an Position R588 (Aminosäurenummerierung VP1) eingefügt. Abkürzungen der Basen: Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T); Abkürzungen der Aminosäuren: Alanin (A), Aspartat (D), Glutaminsäure (E), Phenylalanin (F), Glycin (G), Histidin (H), Lysin (K), Leucin (L), Asparagin (N), Prolin (P), Glutamin (Q), Arginin (R), Serin (S), Threonin (T), Valin (V), Tryptophan (W).

Anschließend wurden durch transiente Transfektion von HEK293T-Zellen die rekombinanten Vektoren rAAV2-hEC(1–5)-CAG-eGFP sowie rAAV2-wt-CAG-eGFP hergestellt und via qPCR die Konzentrationen der AAV-Vektorpartikel ermittelt (Tabelle 18). Die Ernte ergab insgesamt $4,91 \times 10^{10}$ gp von rAAV2-hEC1-CAG-eGFP (in zwei Produktionen), $1,53 \times 10^{11}$ gp von rAAV2-hEC2-CAG-eGFP, $1,38 \times 10^{11}$ gp von rAAV2-hEC3-CAG-eGFP, $1,64 \times 10^{11}$ gp von rAAV2-hEC4-CAG-eGFP, $2,1 \times 10^{11}$ gp von rAAV2-hEC5-CAG-eGFP und $1,1 \times 10^{11}$ gp von rAAV2-wt-CAG-eGFP.

Tabelle 18: Herstellung der Vektoren rAAV2-hEC(1–5)-CAG-eGFP und rAAV2-wt-CAG-eGFP

Isolierte Plasmid-DNA der rep/cap-Plasmide pXX2 187 hEC(1–5), Konzentrationen und Vektorpartikelmengen der anschließend generierten Vektoren rAAV2-hEC(1–5)-CAG-eGFP und rAAV2-wt-CAG-eGFP

Rep/cap-Plasmid	Plasmid-DNA (µg)	rAAV2-Klon	gp/µl	gp (insgesamt)
pXX2-187-hEC1	451,15	rAAV2-hEC1-CAG-eGFP	$2,05 \times 10^7$	$3,9 \times 10^{10}$
		rAAV2-hEC1-CAG-eGFP	$8,92 \times 10^6$	$1,01 \times 10^{10}$
pXX2-187-hEC2	421,8	rAAV2-hEC2-CAG-eGFP	$1,09 \times 10^8$	$1,53 \times 10^{11}$
pXX2-187-hEC3	517,5	rAAV2-hEC3-CAG-eGFP	$1,06 \times 10^8$	$1,38 \times 10^{11}$

pXX2-187-hEC4	391,35	rAAV2-hEC4-CAG-eGFP	$1,37 \times 10^8$	$1,64 \times 10^{11}$
pXX2-187-hEC5	512,5	rAAV2-hEC5-CAG-eGFP	$2,28 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{11}$
		rAAV2-wt-CAG-eGFP	$9,58 \times 10^7$	$1,1 \times 10^{11}$

4.3.2 Genexpression in hPMVEC und HEK293T durch rAAV2-hEC(1–5)-CAG-eGFP

Zur Transduktion von hPMVEC (von Spender A) und HEK293T-Zellen wurden die Zellen auf einer 24-Well-Platte ausgesät und am Folgetag mit einer MOI von 25.000 gp/Zelle mit rAAV2-hEC(1–5)-CAG-eGFP in technischen Duplikaten transduziert. Als Kontrolle diente Wildtyp-AAV2 (rAAV2-wt-CAG-eGFP). Die Vektorpartikellösungen wurden in dem Zelltyp entsprechendem Medium ohne Zusätze mindestens 1:2 verdünnt und die Zellen entsprechend der MOI möglichst knapp mit der Lösung bedeckt. Nach 48 h Inkubation wurde die Genexpression des Reportergens eGFP in hPMVEC und HEK293T-Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25 (Zeiss) mit Quecksilberdampfampe analysiert (Abbildungen 12 und 13) und anschließend die eGFP-exprimierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (Abbildung 14).

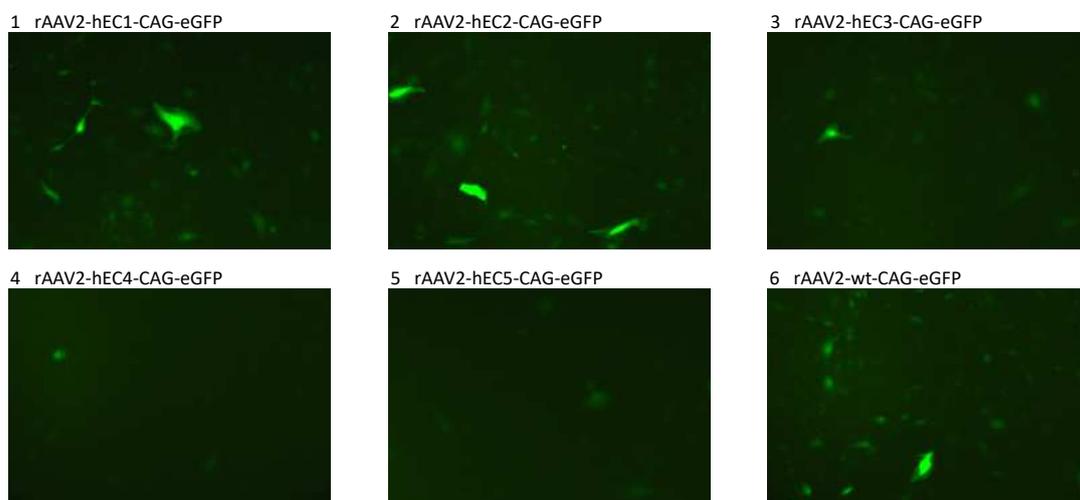


Abbildung 12: Transgenexpression von eGFP unter der Kontrolle des Promotors CAG in hPMVEC nach Transduktion mit rAAV-Vektoren

eGFP-vermittelte Fluoreszenz 48 h nach Transduktion mit den auf hPMVEC selektierten AAV-Vektoren rAAV2-hEC(1–5)-CAG-eGFP und rAAV2-wt-CAG-eGFP mit einer MOI von 25.000 gp/Zelle. Abkürzungen: enhanced green fluorescent protein (eGFP), genomic particles (gp), humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (hPMVEC), multiplicity of infection (MOI), Peptidinserts: NEVRPHA (hEC1), NRVNDHQ (hEC2), DGDWLKA (hEC3), NDRGQAS (hEC4), LATHQTF (hEC5), Rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus (rAAV), Wildtyp (wt).

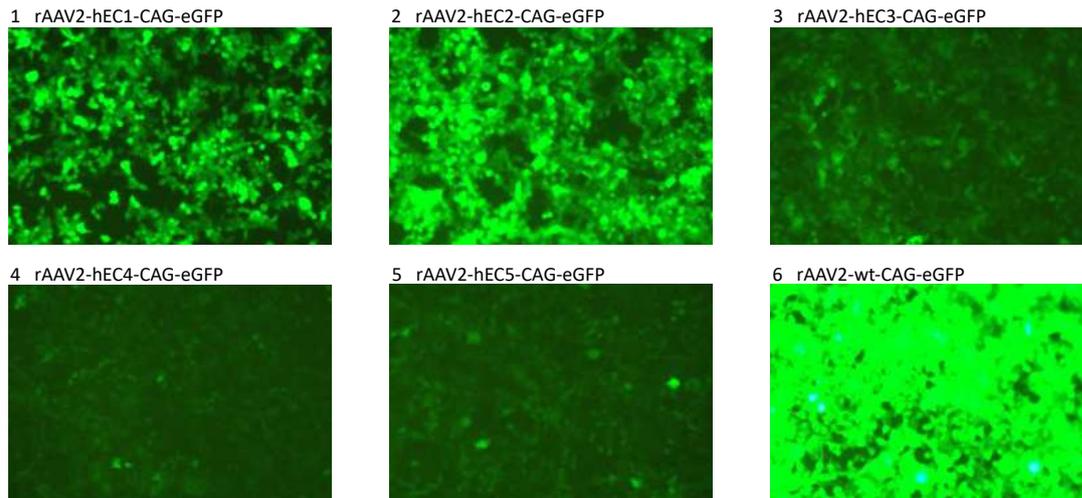


Abbildung 13: Transgenexpression von eGFP unter der Kontrolle des Promotors CAG in HEK293T nach Transduktion mit rAAV-Vektoren

GFP-vermittelte Fluoreszenz 48 h nach Transduktion mit den auf hPMVEC selektierten AAV-Vektoren rAAV2-hEC(1–5)-CAG-eGFP und rAAV2-wt-CAG-eGFP mit einer MOI von 25.000 gp/Zelle. Abkürzungen: Enhanced green fluorescent protein (eGFP), genomic particles (gp), human embryonic kidney-Zellen (HEK293T), multiplicity of infection (MOI), Peptidinserts: NEVRPHA (hEC1), NRVNDHQ (hEC2), DGDWLKA (hEC3), NDRGQAS (hEC4), LATHQTF (hEC5), Rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus (rAAV), Wildtyp (wt).

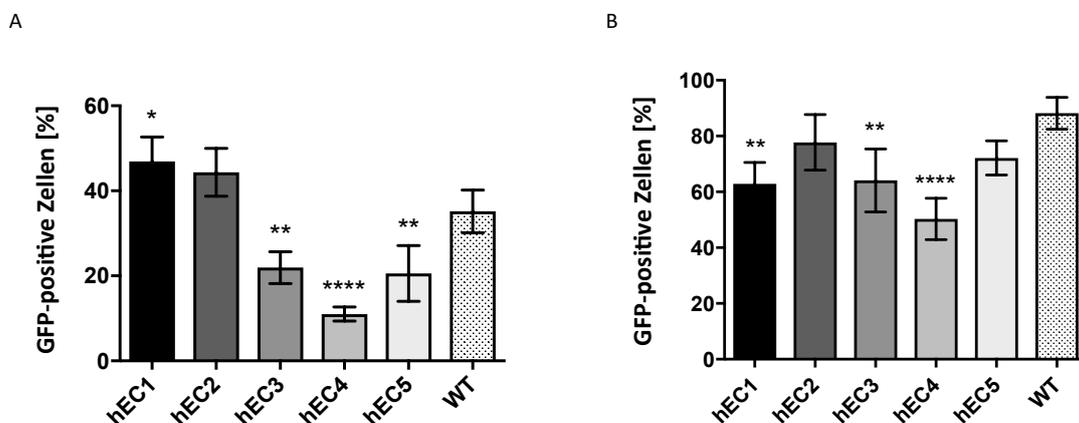


Abbildung 14: Transgenexpressionsraten humaner Zellen nach Transduktion mit rAAV-Vektoren mit Kapsid-kodierenden Peptidinserts

Transgenexpressionsraten des Reportergens eGFP unter der Kontrolle des Promotors CAG von hPMVEC (A) und HEK293T (B) 48 h nach Transduktion mit den auf hPMVEC selektierten AAV-Vektoren rAAV2-hEC(1–5)-CAG-eGFP und rAAV2-wt-CAG-eGFP mit einer MOI von 25.000 gp/Zelle (auf X-Achse nach Peptid-kodierendem Inserts abgekürzt) (n=4). eGFP-exprimierende Zellen wurden im Durchflusszytometer gezählt, basierend auf den Signalen nicht behandelter Zellen eingegrenzt und deren Anteil in Prozent von allen gezählten Zellen erhoben (Transgenexpressionsraten). Die Transgenexpressionsraten wurden anhand einfaktorieller Varianzanalyse und dem Bonferroni-Test auf Signifikanz geprüft. Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die Signifikanz von Unterschieden der Transgenexpressionsraten von rAAV2-hEC(1–5)-CAG-eGFP zu rAAV2-wt-CAG-eGFP sind mit Sternen markiert (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$,

**** $p < 0,0001$). Abkürzungen: enhanced green fluorescent protein (eGFP), genomic particles (gp), human embryonic kidney-Zellen (HEK293T), humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (hPMVEC), multiplicity of infection (MOI), Peptidinserts: NEVRPHA (hEC1), NRVNDHQ (hEC2), DGDWLKA (hEC3), NDRGQAS (hEC4), LATHQTF (hEC5), Rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus (rAAV), Wildtyp (wt).

rAAV2-**wt**-CAG-eGFP induzierte in hPMVEC im Mittel eine Transgenexpressionsrate von 35,2 % ($\sigma = 5,0$ %). rAAV2-**hEC1**-CAG-eGFP zeigte eine signifikant höhere mittlere Transgenexpressionsrate von 46,9 % ($\sigma = 5,7$ %, $P = 0,0187$). rAAV2-**hEC2**-CAG-eGFP zeigte im Mittel eine Transgenexpressionsrate von 44,4 % ($\sigma = 5,6$ %), die sich nicht signifikant von der des Wildtyps unterschied. rAAV2-**hEC3**-CAG-eGFP, rAAV2-**hEC4**-CAG-eGFP und rAAV2-**hEC5**-CAG-eGFP zeigten jeweils signifikant geringere Transgenexpressionsraten in hPMVEC als der Wildtyp. rAAV2-**hEC3**-CAG-eGFP zeigte im Mittel eine Transgenexpressionsrate von 22,0 % ($\sigma = 3,7$ %, $P = 0,0073$), rAAV2-**hEC4**-CAG-eGFP von 11,0 % ($\sigma = 1,7$ %, $P < 0,0001$) und rAAV2-**hEC5**-CAG-eGFP von 20,6 % ($\sigma = 6,6$ %, $P = 0,0031$) (Abbildung 14, A).

Der AAV2-Wildtyp induzierte in HEK293T-Zellen im Mittel eine Transgenexpressionsrate von 88,2 % ($\sigma = 5,7$ %). rAAV2-**hEC1**-CAG-eGFP, rAAV2-**hEC3**-CAG-eGFP und rAAV2-**hEC4**-CAG-eGFP zeigten im Mittel jeweils signifikant geringere Transgenexpressionsraten als der Wildtyp: rAAV2-**hEC1**-CAG-eGFP von 62,9 % ($\sigma = 7,7$ %, $P = 0,002$), rAAV2-**hEC3**-CAG-eGFP von 64,1 % ($\sigma = 11,3$ %, $P = 0,0032$) und rAAV2-**hEC4**-CAG-eGFP von 50,3 % ($\sigma = 7,4$ %, $P < 0,0001$). Die mittleren Transgenexpressionsraten von rAAV2-**hEC2**-CAG-eGFP und rAAV2-**hEC5**-CAG-eGFP auf HEK293T-Zellen unterschieden sich nicht signifikant vom Wildtyp. rAAV2-**hEC2**-CAG-eGFP zeigte im Mittel eine Transgenexpressionsrate von 77,7 % ($\sigma = 9,9$ %) und rAAV2-**hEC5**-CAG-eGFP von 72,2 % ($\sigma = 6,1$ %) (Abbildung 14, B).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe im murinen pulmonal-vaskulären Endothelium (*in vivo*) selektierten AAV-Mutanten, rAAV2-**ML(1–5)**-CAG-eGFP und rAAV2-**ESGHGYF**-CAG-eGFP, konnten in humanen PMVEC jeweils keine signifikant höhere Transgenexpressionsrate als rAAV2-**wt**-CAG-eGFP vermitteln, was darauf schließen lässt, dass der Tropismus dieser im Tiermodell selektierten AAV-Mutanten nicht auf menschliche Zellen übertragbar ist. Aus der Literatur sind Beispiele von AAV-Kapsidmutanten bekannt,

welche in einer bestimmten Mauszuchtlinie selektiert worden waren, und deren Tropismus teilweise nicht einmal auf andere Mauslinien – also nicht einmal innerhalb derselben Spezies – übertragbar war (Batista et al., 2020; Hordeaux et al., 2018; Matsuzaki et al., 2019). Vor diesem Hintergrund verwundert es nicht, dass die im murinen pulmonal-vaskulären Endothelium (*in vivo*) selektierten AAV-Mutanten, keine erhöhte Transduktionseffizienz in humanen Zellen vermittelten. Vielmehr verdeutlicht diese Erkenntnis die Notwendigkeit, den Selektionsprozess zur Isolierung zielgerichteter AAV-Vektoren für den Einsatz im menschlichen Patienten auch in humanen Geweben oder Zellen, durchzuführen, was daher den nächsten Schritt des experimentellen Teils dieser Doktorarbeit darstellte.

Nach drei Selektionsrunden der randomisierten AAV2-Peptidbank auf hPMVEC zeigten die Sequenzierungen der Peptid-kodierenden Nukleotidinserts von einzelnen AAV-Mutanten in drei unabhängigen Selektionsansätzen (A, B, C) wie erwartet repetitive Peptidsequenzen und Peptidmotive. Es wurden fünf der Mutanten, die sich in mindestens zwei der drei Selektionsansätze identifizieren ließen, zur Herstellung von AAV2-Reportervektoren (rAAV2-**hEC(1–5)**-CAG-eGFP) ausgewählt und deren Transduktionseffizienz auf den Zielzellen (hPMVEC), sowie auf klassischer Weise stark für AAV2-Wildtyp empfänglichen HEK293T-Zellen, durch Messung des Reportergens eGFP analysiert. Eine dieser Mutanten, rAAV2-**hEC1**-CAG-eGFP (NEVRPHA), zeigte wie erhofft ein gegenüber dem AAV2-Wildtyp (rAAV2-**wt**-CAG-eGFP) verbessertes Genexpressionsprofil mit einer signifikant erhöhten Transgenexpressionsrate in den Zielzellen (hPMVEC) sowie einer signifikant herabgesetzten Transgenexpressionsrate in Nicht-Zielzellen (HEK293T).

5.2 Analyse der Transduktionseffizienz

Das verbesserte Transgenexpressionsprofil der selektierten Mutante rAAV2-**hEC1**-CAG-eGFP (NEVRPHA) im Vergleich zum AAV2-Wildtyp (rAAV2-**wt**-CAG-eGFP) deutet auf einen grundsätzlich erfolgreichen Selektionsprozess hin. Die allerdings immer noch höhere absolute Transgenexpressionsrate dieser Mutante in HEK293T-Zellen als in hPMVEC verdeutlicht jedoch gewisse Defizite beziehungsweise einen gewissen Optimierungsbedarf im Selektionsprozess (5.2.1 bis 5.2.3). Da aus der in dieser Arbeit verwendeten AAV-Peptidbank in der Vergangenheit in unterschiedlichen Selektionsverfahren (*in vitro* und *in vivo*) bereits mehrere hocheffiziente und hochspezifische Kapsidvarianten für verschiedene Zielzellen isoliert worden waren, kann davon ausgegangen werden, dass grundsätzlich geeignete Kapsidmutanten für die effiziente und spezifische Transduktion von hPMVEC in

der Peptidbank enthalten sind (Körbelin et al., 2016c, 2016a; Müller et al., 2003; Trepel et al., 2015). Für eine vollumfängliche Analyse der Transgenexpressionsraten der selektierten AAV-Mutanten wäre eine Kontroll-Mutante mit zufälligem, nicht selektierten, Peptidinsert als Negativkontrolle prinzipiell sinnvoll gewesen. Da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mehrfach gezeigt wurde, dass Kontrollmutanten keine erhöhte Transgenexpressionsrate gegenüber dem rAAV2-Wildtyp zeigen, wurde zur Ressourcenschonung auf die Herstellung dieses Kontrollvektors verzichtet.

5.2.1 Selektion auf Internalisierungsebene

Die Intensität der durch AAV-Vektoren induzierten Transgenexpression ist von diversen Prozessierungsschritten zwischen der Aufnahme des Vektors in die Wirtszelle bis zur Genexpression, sowie dem Promotor, dem Transgen und der Zeit zwischen Transduktion und Genexpressionsmessung abhängig (Naumer et al., 2012a). Die PCR-Amplifikation der AAV-Mutanten erfolgte nach der Aufnahme von Vektorpartikeln in die Zielzellen, und damit völlig unabhängig von deren Vermögen zur Induktion einer Transgenexpression. Im Rahmen der Auswertung wurde allerdings die Genexpression des Reportergens in Zellen nach deren Transduktion mit Vektorpartikeln bewertet. War eine Kapsidvariante also beim intrazellulären Transport zum Zellkern und/oder bei der Aufnahme in diesen – beides Voraussetzungen für die Genexpression, aber durchaus kritische Aspekte für AAV2-Vektorpartikel – benachteiligt, könnte sie sich gegebenenfalls im Rahmen der Selektion durchgesetzt haben, ohne zu einer entsprechend ausgeprägten Genexpression führen zu können (Agbandje-McKenna und Kleinschmidt, 2011; Nonnenmacher und Weber, 2012; Salganik et al., 2015).

Deverman et al. etablierten ein Selektionsverfahren, genannt *cyclization recombination-based AAV targeted evolution* (CREATE), das einen Selektionsdruck für Kapsidmutanten, die den intrazellulären Transport zum Zellkern und die Komplementierung zum Doppelstrang bewältigen, integriert (Deverman et al., 2016). In der CREATE-Peptidbank ist auf der Ebene der verpackten Transgenkassetten das Polyadenylierungssignal invertiert. Wird die CREATE-Peptidbank transgenen Mäusen mit zellspezifischer Cre-Expression intravenös appliziert, wird das eigentlich invertierte Polyadenylierungssignal von internalisierten Kapsidmutanten im Zellkern der Cre-exprimierenden Zielzellen wieder korrekt ausgerichtet und lässt sich anschließend mit entsprechenden Primern, die in diesem Bereich binden, amplifizieren. Nach nur zwei Selektionsrunden konnten die Autoren die

AAV-Kapsidmutante AAV-PHP.B, mit der Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und mit einer im Vergleich zum AAV9-Wildtyp 40-fach erhöhten Genexpression im Zentralnervensystem, isolieren. Der Selektionsprozess mittels CREATE bedarf einer spezialisierten Peptidbank und Cre-exprimierenden Mäusen oder Zielzellen und stellt somit ein weniger dynamisches beziehungsweise aufwendigeres Werkzeug als das in dieser Arbeit verwendete Selektionsverfahren dar. Da anhand des Selektionsverfahrens dieser Arbeit in der Vergangenheit allerdings mehrfach effiziente und spezifische AAV-Kapsidmutanten isoliert worden waren, bietet der erhebliche Mehraufwand der CREATE nicht zwangsläufig einen Vorteil für die *in vitro*-Selektion. Zudem isolierten Zhang et al. im Rahmen der Selektion einer randomisierten AAV2-Peptidbank auf humanen umbilikal-venösen Endothelzellen (HUVEC) die intranukleare AAV-DNA. Hier präsentierten sich intra- und extranuklear die gleichen dominanten AAV-Kapsidmutanten, was darauf hindeutet, dass etwaige Unterschiede beim intrazellulären Transport im Selektionsverfahren vernachlässigt werden können (Zhang et al., 2019).

5.2.2 Rückschlüsse aus Sequenzierungen auf den Selektionsprozess

Nach Inkubation der randomisierten AAV2-Peptidbank auf hPMVEC ließ sich in jeder Selektionsrunde in Ansatz A, B und C DNA aus den hPMVEC isolieren und mittels AAV-spezifischer Primer die AAV-DNA amplifizieren (Abbildung 6). Ein kritischer Aspekt des Selektionsverfahrens, und damit eine potentielle Fehlerquelle, ist die intakte Replikation der ITR während der Generierung nachfolgender Peptidbanken. Zur Gewährleistung der korrekten Amplifikation, wurden mit ITR-haltigen Plasmiden transformierte *E. coli* bei 30 °C und 175 rpm inkubiert, um ein Überwachsen oder zu schnelles Wachstum der Bakterienkulturen zu verhindern. Die ITR sind als einziges cis-aktives Element dafür nötig, dass das rep/cap-Plasmid nicht nur die Struktur des Kapsids bestimmt, sondern dieses Plasmid auch im jeweiligen AAV-Partikel verpackt wird. Nur durch diese Kongruenz sind Rückschlüsse aus der isolierten AAV-DNA auf jeweils dazugehörige Kapside möglich. In allen Selektionsrunden der Ansätze A, B und C konnten intakte ITR nachgewiesen und somit Rückschlüsse aus den Sequenzierungen gezogen werden (Abbildung 7).

5.2.3 Auswahl von AAV2-Mutanten für Genexpressionsanalysen

Durch die Einzelschritte des Selektionszyklus, wie der Plasmidamplifikation in kompetenten Bakterien oder der Generierung der AAV-Peptidbanken in HEK293T-Zellen, sind die verschiedenen AAV2-Mutanten einem – über den durch die eigentliche Selektion auf

hPMVEC hinausgehenden – Selektionsdruck ausgesetzt (Körbelin et al., 2017). Das kann dazu führen, dass bestimmte AAV2-Mutanten in den Peptidbanken über- oder unterrepräsentiert werden, sodass deren jeweiliges Vorkommen in den Peptidbanken nicht mit dem tatsächlichen Vermögen zur Induktion einer Transgenexpression in den Zielzellen korreliert. So könnten bestimmte Klone auf Plasmidebene beispielsweise in transformierten *E. coli* leichter zu amplifizieren sein oder bei der Produktion der nachfolgenden AAV-Peptidbanken in HEK293T-Zellen einen Vorteil bei der Replikation oder Kapsid-Assemblierung zeigen, resultierend in einer Überrepräsentation in den nachfolgenden Peptidbanken, die zu einer Ungleichverteilung („Bias“) zugunsten oder -ungunsten einzelner Mutanten führen kann.

In dieser Arbeit wurde die Selektion über das Sequenzieren von zehn Einzelklonen in jeder Selektionsrunde überwacht und anschließend, basierend auf den sich hier anreichernden Peptid-kodierenden Sequenzen, fünf der Peptidinserts für anschließende Genexpressionsanalysen ausgewählt. Die Peptid-kodierenden Sequenzen von jeweils zehn Einzelklonen bilden zwar nicht annähernd die tatsächliche Diversität der Peptidbanken ab, erwiesen sich aber in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe und ebenfalls in der Literatur als ausreichend repräsentativ, sodass in der Vergangenheit bereits mehrfach aus einem Pool von Einzelklonen hoch effiziente und spezifische AAV-Kapsidmutanten isoliert worden waren (Deverman et al., 2016; Körbelin et al., 2016a, 2016c).

Die Auswahl von Einzelklonen für Genexpressionsanalysen ist ein kritischer Aspekt, schließlich wird der Erfolg der Selektion letztlich über die erreichte Transgenexpression dieser Klone bewertet (Körbelin et al., 2016b). Die in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe *in vivo* selektierte AAV2-Mutante mit dem Kapsid-kodierenden Peptidinsert ESGHGYF mit Tropismus für das murine pulmonal-vaskuläre Endothelium konnte zwar über das Sequenzieren von nur zehn Einzelklonen identifiziert werden, machte aber nach fünf Selektionsrunden lediglich 6 % der durch *Next Generation Sequencing* sequenzierten Klone aus. Andere Mutanten waren häufiger vertreten, aber nicht so spezifisch für das Zielgewebe wie Mutanten mit dem Peptidinsert ESGHGYF, die letztlich über ein objektives Scoring-System identifiziert wurde (Körbelin et al., 2016c). Die rein subjektive Auswahl von potentiell geeigneten Kapsidmutanten kann sich als fehlerhaft erweisen. Retrospektiv hätten in dieser Arbeit die AAV2-Mutanten mit den Peptidinserts NSVQWTT und NQARYDQ ebenfalls oder alternativ auf ihre Genexpressioneffizienz geprüft werden können. Diese

zwei Klone wurden jeweils nur in der zweiten und dritten Selektionsrunde isoliert, was auf eine Anreicherung zurückzuführen sein könnte. Da diese Peptide in ihrer Peptidkonstellation den Peptidinserts NEVRPHA und NRVNDHQ ähnelten, wurden jedoch andere Peptidinserts zur weiteren Analyse ausgewählt, um eine größere Streubreite abzudecken. Die für Genexpressionsanalysen ausgewählten AAV2-Mutanten mit den Peptidinserts DGDWLKA und NDRGQAS wurden jeweils in den ersten Selektionsrunden der Ansätze B und C, die Mutante mit dem Peptidinsert LATHQTF nur in jeweils der ersten Selektionsrunde von Ansatz A und C, detektiert. Diese Mutanten wurden für die Transgenexpressionsanalysen ausgewählt, da sie sich in verschiedenen Ansätzen isolieren ließen und nicht das eh schon repräsentierte Peptidmotiv (NXVXXX) zeigten. Keine dieser drei Mutanten präsentierte sich in den Sequenzierungen der zweiten oder dritten Selektionsrunden, was mit den geringen Transgenexpressionsraten dieser drei Mutanten auf hPMVEC zusammenhängen könnte. Diese subjektive Auswahl von Mutanten birgt das Risiko, Klone, die eher ubiquitäre Strukturen und nicht spezifisch hPMVEC binden, auszuwählen. Dies könnte das eher unspezifische Genexpressionsprofil der selektierten AAV2-Mutanten dieser Arbeit erklären.

5.3 Analyse der Transduktionsspezifität

5.3.1 Selektionsdruck auf Kapsidmutanten durch den Versuchsaufbau

Die Spezifität der selektierten AAV2-Mutanten wurde mittels Transduktion von Nicht-Zielzellen (HEK293T) evaluiert. Dabei sind Rückschlüsse auf die tatsächliche Spezifität nur begrenzt möglich: Zum einen lässt sich die Spezifität offensichtlich nicht anhand der *in vitro*-Transgenexpressionsanalyse einer einzigen „Nicht-Ziel“-Zelllinie ermitteln, zum anderen wurden in dieser Arbeit HEK293T-Zellen sowohl zur Produktion der randomisierten AAV2-Banken verwendet, als auch als Nicht-Zielzellen (*off target*) eingesetzt. Aufgrund des bereits beschriebenen zusätzlichen Selektionsdrucks durch die Einzelschritte des Selektionsprozesses – wie der Produktion rekombinanter AAV-Vektorpartikel in HEK293T-Zellen – sind mutmaßlich AAV2-Mutanten, die einen Vorteil in der Vektorproduktion, durch beispielsweise bessere Replikation in HEK293T-Zellen, haben, in nachfolgenden AAV-Peptidbanken überrepräsentiert. Somit sind im Pool aller selektierten AAV2-Mutanten vermutlich Mutanten mit erhöhter Affinität zu HEK293T-Zellen überrepräsentiert, was die relativ hohen Transgenexpressionsraten der selektierten Klone auf eben diesen erklären könnte.

5.3.2 Selektionsdruck auf Kapsidmutanten in der *in vitro*-Selektion

Bei der *in vivo*-Selektion einer AAV-Peptidbank wird diese den Versuchstieren intravenös appliziert – somit passieren die AAV-Kapsidmutanten in jeder Selektionsrunde verschiedenste Endothelzellverbände. Durch diesen enormen Überschuss an „Nicht-Ziel“-Gewebe im Vergleich zum Zielgewebe, sind die Vektorpartikel einem starken negativen Selektionsdruck ausgesetzt, sodass sich im Zielgewebe tendenziell spezifischere Mutanten anreichern. In der *in vitro*-Selektion hingegen wird die Peptidbank auf allein einer Zellpopulation selektiert, sodass der beschriebene negative Selektionsdruck fehlt und auch Mutanten mit weniger spezifischen Tropismus in die Zielzellen internalisieren können, was das unspezifische Genexpressionsprofil der in der dieser Arbeit selektierten Kapsidmutanten erklären könnte. Die in dieser Arbeit integrierte Negativselektion der Peptidbank auf Nicht-Zielzellen (HEK293T) diente dazu, den negativen Selektionsdruck auf die Kapsidmutanten zu erhöhen.

5.3.3 Einfluss der Negativselektion auf die Spezifität

Die Peptidinsertion an Position R588 unterbricht zunächst die HSPG-Bindedomäne, jedoch können die inserierten Aminosäuren selbst erneut eine HSPG-Affinität, also weiterhin einen unspezifischen Tropismus, aufweisen (Perabo et al., 2006). HEK293T-Zellen exprimieren große Mengen des ubiquitären HSPG, dessen Bindung unspezifischen AAV-Mutanten zugeschrieben wird (Körbelin et al., 2017). Ziel der Negativselektion auf HEK293T-Zellen (Ansatz C) in dieser Arbeit war das Herausfiltern von diesen unspezifischen AAV-Klonen. In anderen Arbeiten wurden bereits ähnliche Ansätze, wie die Negativselektion durch eine Heparin-Affinitäts-Säule – allerdings auf Peptidebene – verfolgt (Perabo et al., 2006). Es ließ sich sowohl aus den HEK293T-Zellen selber, als auch aus anschließend mit deren Überstand transduzierten hPMVEC, AAV-DNA isolieren und amplifizieren (Abbildung 6). Dies zeigt, dass sich die AAV-Peptidbank durch die Inkubation auf HEK293T-Zellen in einen intra- und einen extrazellulären Anteil separieren ließ. Leider scheint sich daraus allerdings keine zwangsläufige Spezifität des extrazellulären Anteils ableiten zu lassen. Die Sequenzierungen der in HEK293T-Zellen internalisierten AAV-Klone zeigten in der ersten Selektionsrunde Sequenzen, die sich in keiner der Selektionsansätze auf hPMVEC zeigten, in der zweiten Selektionsrunde jedoch bereits nur Klone mit den Peptidinserts NEVRPHA und NRVNDHQ, welche sich parallel auch in den hPMVEC anreicherten, das heißt welche auch im ursprünglichen extrazellulären Anteil, dem HEK293T-Zellüberstand, vorhanden gewesen sein müssen. Das Auftreten dieser zwei AAV2-Mutanten, sowohl bei aus

HEK293T-Zellen als auch aus hPMVEC isolierten Klonen der gleichen Selektionsrunde, zeigt, dass die Inkubation der AAV2-Peptidbank auf HEK293T-Zellen unspezifische Vektorpartikel nicht ausreichend aus der Selektion gefiltert haben kann und impliziert bereits eine niedrige Spezifität dieser Klone. Die Peptidinserts DGDWLKA und LATHQTF zeigten sich hingegen nicht in den aus HEK293T-Zellen isolierten AAV-Mutanten, was mit den signifikant geringeren Transgenexpressionsraten dieser Mutanten in HEK293T-Zellen übereinstimmt. Das sich die sequenzierten Inserts in Runde C.1 und C.2, deren Unterschied nur die erneute Negativselektion in C.2 war, kaum unterschieden, verdeutlicht weiterhin, dass der Versuchsaufbau der Negativselektion das Ziel der Auftrennung der Klone nach ihrer Spezifität nicht vollständig erfüllt hat. Ein Defizit des Versuchsaufbaus war, dass die im Überstand der HEK293T-Zellen befindliche Vektorpartikelmenge nicht quantitativ ermittelt wurde, sodass die tatsächliche MOI, mit der anschließend die hPMVEC transduziert wurden, unbekannt war.

AAV-Mutanten, die Asparagin an der ersten und Arginin an der vierten Insertposition tragen (NXXRXXX), zeigen vergleichsweise eine 60–80 % erhöhte Heparinbindung und weisen dadurch eine erhöhte Affinität zu HEK293T-Zellen auf, welche reichlich HSPG exprimieren (Körbelin et al., 2017). Sechs der 27 differenzierbaren Aminosäuresequenzen dieser Arbeit zeigen dieses Motiv (NXXRXXX). Darunter auch die Sequenz hEC1 (NEVRPHA), was die hohe Transduktionsrate von HEK293T-Zellen durch rAAV2-hEC1-CAG-eGFP erklären könnte. Die Aminosäuresequenz hEC1 (NEVRPHA) zeigt sich ebenfalls in der aus den HEK293T-Zellen der Negativselektion isolierten AAV-DNA, was diese These weiter unterstützt.

Die Spezifität spielt insbesondere bei der Anwendung im lebenden Organismus eine Rolle, um potentiell hervorrufbare Nebenwirkungen zu begrenzen (Naso et al., 2017). Anders als die Umlenkung des Tropismus auf eigentlich nicht permissive Zellen, lässt sich die Genexpression, und damit die Spezifität, zusätzlich auf verschiedenen Ebenen (prä- oder posttranskriptionell) kontrollieren, zum Beispiel durch zellspezifische Promotoren oder microRNA (Domenger und Grimm, 2019; Kochergin-Nikitsky et al., 2021; Trepel et al., 2015; Wu et al., 2021). Für den Einsatz in der Zellkultur hingegen, kommt der Spezifität kaum eine Bedeutung zu, sodass solange die benötigte Transduktionseffizienz erreicht wird, eine niedrige Spezifität die Anwendung nicht limitiert.

5.4 Transgenexpressionsraten selektierter AAV2-Mutanten im Vergleich zum AAV2-Wildtyp

Diese Arbeit beruht auf der These, dass Endothelzellen nicht hinreichend permissiv für den AAV2-Wildtyp sind (Pajusola et al., 2002). Dieser erreicht laut Literatur *in vitro* auf Endothelzellen, abhängig von der MOI, Transgenexpressionsraten zwischen 10 % und 20 % (Nicklin et al., 2001; Varadi et al., 2012; Zhang et al., 2019). In den Transgenexpressionsanalysen dieser Arbeit zeigt der AAV2-Wildtyp auf hPMVEC allerdings recht heterogene Transgenexpressionsraten zwischen 6,7 % und 35,2 %, je nach eingesetztem Batch. Im Kontrast zur Transgenexpressionsrate von 35,2 % des Wildtypes scheint die Transgenexpressionsrate des selektierten Klons rAAV2-hEC1-CAG-eGFP (NEVRPHA), mit 46,9 % ($\sigma = 5,7 \%$, $P = 0,0187$) auf hPMVEC, nur geringfügig gesteigert. Durch den Selektionsprozess wäre die Transgenexpressionsrate „nur“ um 11,7 Prozentpunkte erhöht worden. Im Vergleich zu einer Transgenexpression von 6,7 % hingegen, wäre immerhin eine um 40,2 Prozentpunkte erhöhte Transgenexpressionsrate erzielt worden. Je nach Referenzwert konnte durch die Selektion also eine AAV2-Mutante isoliert werden, die im Vergleich zum AAV2-Wildtyp eine zwischen 1,33- und 7-fach erhöhte Transgenexpression in hPMVEC vermittelt. Wodurch die unterschiedlich hohe Transduktionseffizienz der verschiedenen Batches des Wildtyp AAV2-Kontrollvektors zu erklären ist, ließ sich im Rahmen dieser Doktorarbeit leider nicht abschließend ermitteln. Mögliche Gründe könnten Unterschiede in der Titration, und damit unbewusst unterschiedliche MOIs auf den Zellen, oder Unterschiede in der Vektorherstellung, insbesondere verschieden häufiges Einfrieren und Auftauen, resultierend in einer herabgesetzten Leistung eines Batches, sein.

5.5 Vergleich mit anderen *in vitro*-Selektionen

Während *in vivo* selektierte AAV2-Mutanten eine bis zu 200-fach verbesserte Transgenexpression im Vergleich zum AAV2-Wildtyp erreichen können, konnte eine Verbesserung um diesen Faktor durch *in vitro* selektierte AAV2-Mutanten bisher nicht gezeigt werden (Körbelin et al., 2016c, 2016a; Naumer et al., 2012a; Stiefelhagen et al., 2008; Zhang et al., 2019). Müller et al. etablierten die Methodik der Selektion randomisierter AAV2-Peptidbanken auf Zielzellen und selektierten diese *in vitro* auf HCAEC. Nach mehreren Selektionsrunden reicherten sich Mutanten mit den Kapsid-kodierenden Peptidinserts NSVRDL(G/S), PRSVTVP und NSVSSC(S/A) an. Nachfolgende Transduktionstests auf HCAEC zeigten eine im Vergleich zum AAV2-Wildtyp 4- bis 40-

fach gesteigerte Transgenexpression (Müller et al., 2003). Das Peptidmotiv **NXXRXXX**, das mit einer erhöhten HSPG-Bindung assoziiert ist, zeigte sich auch bei diesen Mutanten (Körbelin et al., 2017).

Zhang et al. selektierten eine randomisierte AAV2-Peptidbank (7mer) *in vitro* auf humanen umbilikal-venösen Endothelzellen (HUVEC) und isolierten zwei AAV2-Mutanten mit den Kapsid-kodierenden Peptidinserts VSSSTPR und NNPLPQR. Erstere erreichte bei einer MOI von 30.000 eine Transgenexpressionsrate von 68,2 % ($\sigma = 6,9\%$), was einer 2,7-fachen Erhöhungen gegenüber des AAV2-Wildtypes entspricht. Die zweite Mutante erreichte mit einer MOI von 30.000 lediglich eine Transgenexpressionsrate von ungefähr 40 % (Zhang et al., 2019).

Naumer et al. selektierten eine randomisierte AAV2-Peptidbank (7mer) *in vitro* auf humanen Melanom-Zelllinien (*P Mel A2* und *P Mel L*) und Glioblastom-Zelllinien (*NCH 37* und *NCH 199*). Nach vier Selektionsrunden konnten die Anreicherungen der Mutanten mit dem Kapsid-kodierenden Peptidinserts NDVRSAN (für die Melanomzelllinien) und GPQGKNS und EDRTERR (für die Glioblastomzelllinien) gezeigt werden. In den anschließenden Genexpressionsanalysen zeigte sich jedoch, dass diese selektierten Mutanten nur teilweise eine bessere Transgenexpressionsrate als der AAV2-Wildtyp generieren konnten. Zudem zeigten die Autoren, dass sich die intrazelluläre Verteilung von AAV-Vektoren zwischen den Mutanten mit verschiedenen Kapsid-kodierenden Peptidinserts unterscheidet. Manche Klone reicherten sich im Zellkern an, während andere zu gleichen Verhältnissen an der Zellmembran, im Cytosol und im Zellkern lokalisiert waren (Naumer et al., 2012a). Wie bereits bei Mutanten aus der Selektion von Müller et al. und bei Mutanten dieser Arbeit, zeigte sich auch bei der Mutante mit dem Peptidinsert NDRRSAN das Peptidmotiv **NXXRXXX**.

Stiefelhagen et al. selektierten eine randomisierte AAV2-Peptidbank (7mer) *in vitro* auf einer myeloischen Leukämie-Zelllinie (K562) und zeigten nach vier Selektionsrunden die Anreicherung der Kapsid-kodierenden Peptidinserts EARVRPP und NSVSLYT. Die AAV2-Mutante mit dem Kapsid-kodierenden Peptidinsert EARVRPP zeigte eine gegenüber dem AAV2-Wildtyp verdoppelte Transgenexpressionsrate von 60 %, während die AAV2-Mutante mit dem Kapsid-kodierenden Peptidinsert NSVSLYT in den Zielzellen gegenüber

dem AAV2-Wildtyp keine verbesserte Transgenexpression induzieren konnte (Stiefelhagen et al., 2008).

Der Vergleich mit anderen *in vitro* Selektionen ist durch den heterogenen Versuchsaufbau, wie einer unterschiedlichen Anzahl an Selektionsrunden, unterschiedlich langen Inkubationszeiten, unterschiedlichen Zielzellen und unterschiedlichen Messmethoden limitiert. Bisher gibt es keine publizierte *in vitro* Selektion einer randomisierten AAV2-Peptidbank auf hPMVEC. Allerdings reihen sich die Ergebnisse dieser Arbeit von der Größenordnung her in die beschriebenen Ergebnisse anderer *in vitro* Selektionen ein. In der Zellkultur zeigt der AAV2-Wildtyp bereits Transgenexpressionsraten zwischen 10 und 30 %, welche durch die selektierten AAV2-Mutanten zwar signifikant übertroffen werden können, von diesen aber trotzdem keine Transgenexpressionsraten von über 70 % erreicht werden konnten. Zudem zeigte sich in verschiedenen unabhängigen Selektionen das vermutlich unspezifische Peptidmotiv **NXXRXXX**, welches mit einer hohen Affinität für HSPG assoziiert wird, dem selben Glycan, welches die Zellbindung von AAV2-Wildtyp initiiert (Körbelin et al., 2017). Dies zeigt wie schwer es ist, AAV-Mutanten anzureichern, die, wie eigentlich gewünscht, lediglich zelluläre Targets binden, die vom AAV2-Wildtyp nicht gebunden werden.

5.6 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit auf hPMVEC selektierte AAV2-Mutante rAAV2-hEC1-CAG-eGFP (NEVRPHA) zeigt unter *in vitro*-Bedingungen ein im Vergleich zum Wildtyp AAV2 verbessertes Vermögen zur Transduktion von hPMVEC bei gleichzeitig verringerter Affinität für HEK293T-Zellen. Da sich Endothelzellen in der Zellkultur durch die unphysiologischen Umweltbedingungen rasch adaptieren und dazu neigen, zu dedifferenzieren, und sich somit von Endothelzellen im Endothelzellverband des lebenden Organismus zu unterscheiden, lässt sich die *in vitro* beobachtete erhöhte Effizienz von rAAV2-hEC1-CAG-eGFP im Vergleich zum AAV2-Wildtyp nicht zwangsläufig auf den lebenden Organismus übertragen (Staton et al., 2009). Allerdings ist eine grundsätzliche Anwendbarkeit im lebenden Organismus nicht auszuschließen, da für die Selektion bewusst primäre Zellen sehr früher Passage verwendet worden sind und diese Zellen daher wahrscheinlich noch einen sehr ursprünglichen Phänotyp aufwiesen.

Zur Gewinnung eines gentherapeutischen Vektors für den Einsatz im Patienten sollte der Selektionsprozess dem Organismus so nah wie möglich kommen, was offensichtlich durch ethische Aspekte limitiert ist. Um den Selektionsprozess weiter dem lebenden, menschlichen Organismus zu nähern, wird die Arbeitsgruppe zukünftig zusätzlich randomisierte AAV2-Peptidbanken *ex vivo* auf humanen Lungenpräparaten selektieren, um zielgerichtete Vektoren zu isolieren. In diesen Lungenpräparaten befinden sich die Zellen noch in ihrem ursprünglichen Zellverband und es kann mittels Perfusion eine gerichtete Virus-Zellinteraktion über die luminale Zellemembran stattfinden, ein Prozess der im hier angewendeten *in vitro* Ansatz nicht sichergestellt war.

Unabhängig von einer möglichen Anwendung im Patienten, kann der in dieser Arbeit entwickelte Vektor zukünftig zur weiteren Erforschung der Pathogenese der PAH im *in vitro*-Zellsystem genutzt werden. Mittels des selektierten AAV-Vektors können zukünftig verschiedenste Nukleinsäuren zur genetischen Modifikation von hPMVEC effizient in diese transferiert werden, zum Beispiel potentiell krankheitsauslösende Gene (wie BMPR2) oder *small hairpin* RNA zum Knockdown von Genen. Somit stellt AAV2-NEVRPHA eine Alternative für die chemische oder physikalische Transfektion von hPMVEC dar, deren Limitationen die Effizienz des Gentransfers in primäre vaskuläre Endothelzellen und eine mögliche Zelltoxizität sind (Rai et al., 2021).

6 Zusammenfassung

Gentherapeutische Vektoren bieten die Möglichkeit, Nukleinsäure in Zellen zu transferieren und so genetisch bedingte Erkrankungen, für die es bis heute an Heilungsoptionen fehlt, ursächlich zu heilen. Die familiäre PAH ist durch genetische Veränderungen der pulmonalen Vaskulatur, resultierend in einer endothelialen Dysfunktion, bedingt. Aktuell ist kein zielgerichteter gentherapeutischer Vektor für das humane pulmonal-vaskuläre Endothelium verfügbar. Das AAV ist eins der sichersten und besterprobten Vektorsysteme, kann aber hPMVEC nicht effizient transduzieren. Mittels der Selektion randomisierter AAV-Peptidbanken lässt sich der unspezifische Tropismus des AAV auf eigentlich nicht permissive Gewebe umlenken. Im Kapsidgen des AAV-Genoms werden dafür randomisierte Peptid-kodierende Nukleotide eingefügt, die auf Kapsidebene präsentiert werden. So werden die ursprünglichen Bindungsdomänen unterbrochen und potentiell die Bindung neuer Zelloberflächenstrukturen ermöglicht. Anhand des Selektionsverfahrens lassen sich AAV-Mutanten mit Tropismus für das Zielgewebe anreichern und isolieren. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden im Mausmodell AAV-Mutanten mit hoch sensitiven und spezifischen Tropismus für das murine pulmonal-vaskuläre Endothelgewebe isoliert. Im Zuge dieser Arbeit durchgeführte Genexpressionsanalysen dieser Mutanten in humaner Zellkultur (hPMVEC) zeigten gegenüber dem AAV-Wildtyp keine verbesserte Transgenexpression und deuten somit auf einen spezies- und gewebespezifischen, nicht übertragbaren, Tropismus von im Mausmodell selektierten AAV2-Mutanten hin. Im Zuge der daraufhin durchgeführten *in vitro*-Selektion einer randomisierten AAV-Peptidbank auf hPMVEC reicherten sich AAV-Mutanten mit folgenden Peptidinserts an: NEVRPHA, NRVNDHQ, DGDWLKA, LATHQTF und NDRGQAS. Die Mutante rAAV2-hEC1 (NEVRPHA) zeigte als einzige der selektierten Mutanten eine gegenüber rAAV2-wt signifikant verbesserte Transgenexpressionsrate auf hPMVEC (46,9 %, $\sigma = 5,7$ %, $P = 0,0187$) und eine zwar signifikant herabgesetzte, jedoch immer noch substantielle, Transgenexpressionsrate auf Kontrollzellen (HEK293T) (62,9 %, $\sigma = 7,7$ %, $P = 0,002$). Obwohl eine Anwendbarkeit der AAV-Mutante rAAV2-hEC1 (NEVRPHA) aufgrund mangelnder Zellspezifität für hPMVEC im Patienten eher unwahrscheinlich erscheint, kann sie aufgrund ihrer hohen Transduktionseffizienz für diese Zellen zukünftig zur weiteren *in vitro*-Erforschung der Pathogenese der PAH genutzt werden.

7 Summary

Gene therapy vectors offer the opportunity to transfer nucleic acid into cells, thereby providing promising treatment options for genetic diseases. The familial pulmonary arterial hypertension is caused by genetic changes in the pulmonary vascularity linked to an endothelial cell dysfunction. To date there is a lack of targeted gene therapy vector for the human pulmonary vasculature. AAV is one of the safest and most tested vector systems but is not capable to adequately transduce hMPVEC. The unspecific tropism of the AAV can be redirected to originally non-permissive tissues by screening randomized AAV peptide libraries. For this purpose, randomized peptide-coding nucleotides are inserted into the capsid gene of the AAV genome. Disruption of the original receptor binding domains enables the binding of new cell surface structures. Using a screening process based on multiple subsequent selection rounds, AAV mutants with tropism for the target tissue can be enriched and isolated. In preliminary work by the working group, AAV mutants with a highly sensitive and specific tropism for murine pulmonary vascular endothelial tissue had been isolated in a mouse model. The present study shows that gene expression of these mutants in human cell cultures (hPMVEC) is not improved compared to the AAV wild type. This illustrates a species- and tissue-specific, non-transmissible tropism of these selected AAV2 mutants. An alternative screening of a randomized AAV peptide library on hPMVEC in the course of this study led to the enrichment of mutants with the following peptide inserts: NEVRPHA, NRVNDHQ, DGDWLKA, LATHQTF und NDRGQAS. The mutant rAAV2-hEC1 (NEVRPHA) was the only one of the selected mutants to show a significantly improved transgene expression rate on hPMVEC (46,9 %, $\sigma = 5,7$ %, $P = 0,0187$) compared to rAAV2-wt and a significantly reduced although still substantial transgene expression rate (62,9 %, $\sigma = 7,7$ %, $P = 0,002$) on control cells (HEK293T). The clinical use of this vector might be limited by its non-specific gene expression profile but its efficient transduction capacity on hPMVEC suggests a future use in further *in vitro* research on the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.

Literaturverzeichnis

- Agbandje-McKenna, M., Kleinschmidt, J., 2011. AAV capsid structure and cell interactions. *Methods Mol. Biol.* 807, 47–92. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-370-7_3
- Asokan, A., Hamra, J.B., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., Samulski, R.J., 2006. Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry. *J. Virol.* 80, 8961–8969. <https://doi.org/10.1128/JVI.00843-06>
- Atchison, R.W., Casto, B.C., Hammon, W.McD., 1965. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149, 754–755. <https://doi.org/10.1126/science.149.3685.754>
- Ayuso, E., Mingozzi, F., Bosch, F., 2010. Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr Gene Ther* 10, 423–436.
- Balakrishnan, B., Jayandharan, G., 2014. Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. *CGT* 14, 86–100. <https://doi.org/10.2174/1566523214666140302193709>
- Batista, A.R., King, O.D., Reardon, C.P., Davis, C., Shankaracharya, Philip, V., Gray-Edwards, H., Aronin, N., Lutz, C., Landers, J., Sena-Esteves, M., 2020. Ly6a Differential Expression in Blood-Brain Barrier Is Responsible for Strain Specific Central Nervous System Transduction Profile of AAV-PHP.B. *Hum Gene Ther* 31, 90–102. <https://doi.org/10.1089/hum.2019.186>
- Berns, K.I., Pinkerton, T.C., Thomas, G.F., Hoggan, M.D., 1975. Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 68, 556–560. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90298-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90298-6)
- Buchholz, C.J., Friedel, T., Büning, H., 2015. Surface-Engineered Viral Vectors for Selective and Cell Type-Specific Gene Delivery. *Trends in Biotechnology* 33, 777–790. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.09.008>
- Büning, H., Huber, A., Zhang, L., Meumann, N., Hacker, U., 2015. Engineering the AAV capsid to optimize vector–host-interactions. *Current Opinion in Pharmacology* 24, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.08.002>
- Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Kardiologie und angeborene Herzfehler e.V., 2020. Pulmonale Hypertonie, Version 3.0, Stand 29.04.2020. AWMF online. URL https://register.awmf.org/assets/guidelines/023-0381_S2k_Pulmonale-Hypertonie_2021-02_01.pdf (Zugriff: 10.04.2023).
- Deutsches Referenzzentrum für Ethik in den Biowissenschaften, 2020. Im Blickpunkt: Somatische Gentherapie. URL <https://www.drze.de/de/forschung-publicationen/im-blickpunkt/somatische-gentherapie/somatische-gentherapie> (Zugriff: 13.04.2023).
- Deverman, B.E., Pravdo, P.L., Simpson, B.P., Kumar, S.R., Chan, K.Y., Banerjee, A., Wu, W.-L., Yang, B., Huber, N., Pasca, S.P., Gradinaru, V., 2016. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol* 34, 204–209. <https://doi.org/10.1038/nbt.3440>
- Diebold, I., Hennigs, J.K., Miyagawa, K., Li, C.G., Nickel, N.P., Kaschwich, M., Cao, A., Wang, L., Reddy, S., Chen, P.-I., Nakahira, K., Alcazar, M.A.A., Hopper, R.K., Ji, L., Feldman, B.J., Rabinovitch, M., 2015. BMPR2 Preserves Mitochondrial Function and DNA during Reoxygenation to Promote Endothelial Cell Survival and Reverse Pulmonary Hypertension. *Cell Metabolism* 21, 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.03.010>
- Domenger, C., Grimm, D., 2019. Next-generation AAV vectors-do not judge a virus (only)

- by its cover. *Hum. Mol. Genet.* 28, R3–R14. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz148>
- Dudek, A.M., Zabaleta, N., Zinn, E., Pillay, S., Zengel, J., Porter, C., Franceschini, J.S., Estelien, R., Carette, J.E., Zhou, G.L., Vandenberghe, L.H., 2020. GPR108 Is a Highly Conserved AAV Entry Factor. *Molecular Therapy* 28, 367–381. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.11.005>
- European Medicines Agency, 2015. Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit; Glybera (No. EMA/670094/2015). URL https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/glybera-epar-summary-public_de.pdf (Zugriff: 13.04.2023).
- Flotte, T.R., Afione, S.A., Conrad, C., McGrath, S.A., Solow, R., Oka, H., Zeitlin, P.L., Guggino, W.B., Carter, B.J., 1993. Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10613–10617. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10613>
- Gall, H., Felix, J.F., Schneck, F.K., Milger, K., Sommer, N., Voswinkel, R., Franco, O.H., Hofman, A., Schermuly, R.T., Weissmann, N., Grimminger, F., Seeger, W., Ghofrani, H.A., 2017. The Giessen Pulmonary Hypertension Registry: Survival in pulmonary hypertension subgroups. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 36, 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2017.02.016>
- 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. *Nat. Med.* 5, 1052–1056. <https://doi.org/10.1038/12491>
- Grimm, D., Pandey, K., Nakai, H., Storm, T.A., Kay, M.A., 2006. Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. *J. Virol.* 80, 426–439. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.1.426-439.2006>
- Guo, P., El-Gohary, Y., Prasad, K., Shiota, C., Xiao, X., Wiersch, J., Paredes, J., Tulachan, S., Gittes, G.K., 2012. Rapid and simplified purification of recombinant adeno-associated virus. *J Virol Methods* 183, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.04.004>
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)
- Hauswirth, W.W., Berns, K.I., 1977. Origin and termination of adeno-associated virus DNA replication. *Virology* 78, 488–499. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(77\)90125-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(77)90125-8)
- Hennigs, J.K., Matuszcak, C., Trepel, M., Körbelin, J., 2021. Vascular Endothelial Cells: Heterogeneity and Targeting Approaches. *Cells* 10, 2712. <https://doi.org/10.3390/cells10102712>
- Hermens, W.T., Ter Brake, O., Dijkhuizen, P.A., Sonnemans, M.A., Grimm, D., Kleinschmidt, J.A., Verhaagen, J., 1999. Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks for gene transfer in the nervous system. *Hum Gene Ther* 10, 1885–1891. <https://doi.org/10.1089/10430349950017563>
- Hermonat, P.L., Muzyczka, N., 1984. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6466–6470. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.20.6466>
- Hoeper, M.M., Humbert, M., Souza, R., Idrees, M., Kawut, S.M., Sliwa-Hahnle, K., Jing, Z.-C., Gibbs, J.S.R., 2016. A global view of pulmonary hypertension. *The Lancet Respiratory Medicine* 4, 306–322. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00543-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00543-3)

- Hordeaux, J., Wang, Q., Katz, N., Buza, E.L., Bell, P., Wilson, J.M., 2018. The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J Mice. *Molecular Therapy* 26, 664–668. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.01.018>
- Kashiwakura, Y., Tamayose, K., Iwabuchi, K., Hirai, Y., Shimada, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Watanabe, M., Oshimi, K., Daida, H., 2005. Hepatocyte Growth Factor Receptor Is a Coreceptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Infection. *JVI* 79, 609–614. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.609-614.2005>
- Keeler, A.M., Flotte, T.R., 2019. Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here? *Annu. Rev. Virol.* 6, 601–621. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015530>
- Kern, A., Schmidt, K., Leder, C., Müller, O.J., Wobus, C.E., Bettinger, K., Von der Lieth, C.W., King, J.A., Kleinschmidt, J.A., 2003. Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *J. Virol.* 77, 11072–11081. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.20.11072-11081.2003>
- King, J.A., Dubielzig, R., Grimm, D., Kleinschmidt, J.A., 2001. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J.* 20, 3282–3291. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.12.3282>
- Kochergin-Nikitsky, K., Belova, L., Lavrov, A., Smirnikhina, S., 2021. Tissue and cell-type-specific transduction using rAAV vectors in lung diseases. *J Mol Med* 99, 1057–1071. <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02086-y>
- Körbelin, J., Dogbevia, G., Michelfelder, S., Ridder, D.A., Hunger, A., Wenzel, J., Seismann, H., Lampe, M., Bannach, J., Pasparakis, M., Kleinschmidt, J.A., Schwaninger, M., Trepel, M., 2016a. A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases. *EMBO Mol Med* 8, 609–625. <https://doi.org/10.15252/emmm.201506078>
- Körbelin, J., Hunger, A., Alawi, M., Sieber, T., Binder, M., Trepel, M., 2017. Optimization of design and production strategies for novel adeno-associated viral display peptide libraries. *Gene Ther* 24, 470–481. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.51>
- Körbelin, J., Schwaninger, M., Trepel, M., 2016b. Vascular-targeted recombinant adeno-associated viral vectors for the treatment of rare diseases. *Rare Diseases* 4, e1220470. <https://doi.org/10.1080/21675511.2016.1220470>
- Körbelin, J., Sieber, T., Michelfelder, S., Lunding, L., Spies, E., Hunger, A., Alawi, M., Rapti, K., Indenbirken, D., Müller, O.J., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J.A., Trepel, M., 2016c. Pulmonary Targeting of Adeno-associated Viral Vectors by Next-generation Sequencing-guided Screening of Random Capsid Displayed Peptide Libraries. *Molecular Therapy* 24, 1050–1061. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.62>
- Korte, J., Mienert, J., Hennigs, J.K., Körbelin, J., 2021. Inactivation of Adeno-Associated Viral Vectors by Oxidant-Based Disinfectants. *Human Gene Therapy* 32, 771–781. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.120>
- Krüger-Genge, Blocki, Franke, Jung, 2019. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *IJMS* 20, 4411. <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>
- Levy, H.C., Bowman, V.D., Govindasamy, L., McKenna, R., Nash, K., Warrington, K., Chen, W., Muzyczka, N., Yan, X., Baker, T.S., Agbandje-McKenna, M., 2009. Heparin binding induces conformational changes in Adeno-associated virus serotype 2. *Journal of Structural Biology* 165, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.12.002>
- Linden, R.M., Berns, K.I., 2000. Molecular Biology of Adeno-Associated Viruses, in: Faisst, S., Rommelaere, J. (Eds.), *Contributions to Microbiology*. KARGER, Basel, pp. 68–84.

- Mathai, S.C., Suber, T., Khair, R.M., Kolb, T.M., Damico, R.L., Hassoun, P.M., 2016. Health-related Quality of Life and Survival in Pulmonary Arterial Hypertension. *Annals ATS* 13, 31–39. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201412-572OC>
- Matsuzaki, Y., Tanaka, M., Hakoda, S., Masuda, T., Miyata, R., Konno, A., Hirai, H., 2019. Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Shared among Diverse Inbred Strains of Mice. *Molecular Therapy* 27, 700–704. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.02.016>
- McLaughlin, S.K., Collis, P., Hermonat, P.L., Muzyczka, N., 1988. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J. Virol.* 62, 1963–1973.
- Merchan, J.A., Dean, J., Azpurua, F., Sen, S., Zhu, Y., Aikawa, R., 2008. Utility of vascular endothelial specific peptides for enhancement of adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Int J Biomed Sci* 4, 217–220.
- Michelfelder, S., Kohlschütter, J., Skorupa, A., Pfenning, S., Müller, O., Kleinschmidt, J.A., Trepel, M., 2009. Successful expansion but not complete restriction of tropism of adeno-associated virus by in vivo biopanning of random virus display peptide libraries. *PLoS ONE* 4, e5122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005122>
- Michelfelder, S., Lee, M.-K., deLima-Hahn, E., Wilmes, T., Kaul, F., Müller, O., Kleinschmidt, J.A., Trepel, M., 2007. Vectors selected from adeno-associated viral display peptide libraries for leukemia cell-targeted cytotoxic gene therapy. *Experimental Hematology* 35, 1766–1776. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.07.018>
- Müller, O.J., Kaul, F., Weitzman, M.D., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J.A., Trepel, M., 2003. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol* 21, 1040–1046. <https://doi.org/10.1038/nbt856>
- Naso, M.F., Tomkowicz, B., Perry, W.L., Strohl, W.R., 2017. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* 31, 317–334. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>
- Naumer, M., Popa-Wagner, R., Kleinschmidt, J.A., 2012a. Impact of capsid modifications by selected peptide ligands on recombinant adeno-associated virus serotype 2-mediated gene transduction. *J. Gen. Virol.* 93, 2131–2141. <https://doi.org/10.1099/vir.0.044735-0>
- Naumer, M., Ying, Y., Michelfelder, S., Reuter, A., Trepel, M., Müller, O.J., Kleinschmidt, J.A., 2012b. Development and Validation of Novel AAV2 Random Libraries Displaying Peptides of Diverse Lengths and at Diverse Capsid Positions. *Human Gene Therapy* 23, 492–507. <https://doi.org/10.1089/hum.2011.139>
- Nicklin, S.A., Buening, H., Dishart, K.L., de Alwis, M., Girod, A., Hacker, U., Thrasher, A.J., Ali, R.R., Hallek, M., Baker, A.H., 2001. Efficient and Selective AAV2-Mediated Gene Transfer Directed to Human Vascular Endothelial Cells. *Molecular Therapy* 4, 174–181. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0424>
- Nonnenmacher, M., van Bakel, H., Hajjar, R.J., Weber, T., 2015. High capsid-genome correlation facilitates creation of AAV libraries for directed evolution. *Mol Ther* 23, 675–682. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.3>
- Nonnenmacher, M., Weber, T., 2012. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* 19, 649–658. <https://doi.org/10.1038/gt.2012.6>
- Opie, S.R., Warrington, K.H., 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, 6995–7006. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.12.6995-7006.2003>

- Pajusola, K., Gruchala, M., Joch, H., Lüscher, T.F., Ylä-Herttuala, S., Büeler, H., 2002. Cell-Type-Specific Characteristics Modulate the Transduction Efficiency of Adeno-Associated Virus Type 2 and Restrains Infection of Endothelial Cells. *J Virol* 76, 11530–11540. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.22.11530-11540.2002>
- Paul-Ehrlich-Institut, 2022. Gentherapie (Nr. 502 im BAnz AT 16.02.2023 B11). URL <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/atmp/gentherapie/gentherapie-node.html> (Zugriff: 13.04.2023).
- Perabo, L., Büning, H., Kofler, D.M., Ried, M.U., Girod, A., Wendtner, C.M., Enssle, J., Hallek, M., 2003. In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display. *Molecular Therapy* 8, 151–157. [https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(03\)00123-0](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(03)00123-0)
- Perabo, L., Goldnau, D., White, K., Endell, J., Boucas, J., Humme, S., Work, L.M., Janicki, H., Hallek, M., Baker, A.H., Buning, H., 2006. Heparan Sulfate Proteoglycan Binding Properties of Adeno-Associated Virus Retargeting Mutants and Consequences for Their In Vivo Tropism. *Journal of Virology* 80, 7265–7269. <https://doi.org/10.1128/JVI.00076-06>
- Pillay, S., Meyer, N.L., Puschnik, A.S., Davulcu, O., Diep, J., Ishikawa, Y., Jae, L.T., Wosen, J.E., Nagamine, C.M., Chapman, M.S., Carette, J.E., 2016. An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature* 530, 108.
- Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V., Srivastava, A., 1999. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat. Med.* 5, 71–77. <https://doi.org/10.1038/4758>
- Rabinowitz, J.E., Xiao, W., Samulski, R.J., 1999. Insertional mutagenesis of AAV2 capsid and the production of recombinant virus. *Virology* 265, 274–285. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0045>
- Rai, N., Shihan, M., Seeger, W., Schermuly, R.T., Novoyatleva, T., 2021. Genetic Delivery and Gene Therapy in Pulmonary Hypertension. *IJMS* 22, 1179. <https://doi.org/10.3390/ijms22031179>
- Salganik, M., Hirsch, M.L., Samulski, R.J., 2015. Adeno-associated Virus as a Mammalian DNA Vector. *Microbiol Spectr* 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0052-2014>
- Samulski, R.J., Berns, K.I., Tan, M., Muzyczka, N., 1982. Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 2077–2081. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.6.2077>
- Samulski, R.J., Chang, L.S., Shenk, T., 1989. Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J. Virol.* 63, 3822–3828.
- Samulski, R.J., Chang, L.S., Shenk, T., 1987. A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J Virol* 61, 3096–3101. <https://doi.org/10.1128/JVI.61.10.3096-3101.1987>
- Samulski, R.J., Muzyczka, N., 2014. AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu. Rev. Virol.* 1, 427–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085355>
- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D.S., Denton, C.P., Gatzoulis, M.A., Krowka, M., Williams, P.G., Souza, R., 2019. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 53, 1801913. <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>
- Smith, G.P., 1985. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* 228, 1315–1317.

- <https://doi.org/10.1126/science.4001944>
- Smith, R.H., 2008. Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Therapy* 15, 817–822. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.55>
- Smith, R.H., Kotin, R.M., 1998. The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity. *J. Virol.* 72, 4874–4881.
- Sonntag, F., Schmidt, K., Kleinschmidt, J.A., 2010. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 10220–10225. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001673107>
- Srivastava, A., Lusby, E.W., Berns, K.I., 1983. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* 45, 555–564.
- Staton, C.A., Reed, M.W.R., Brown, N.J., 2009. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol* 90, 195–221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00633.x>
- Stiefelhagen, M., Sellner, L., Kleinschmidt, J.A., Jauch, A., Laufs, S., Wenz, F., Zeller, W.J., Fruehauf, S., Veldwijk, M.R., 2008. Application of a haematopoietic progenitor cell-targeted adeno-associated viral (AAV) vector established by selection of an AAV random peptide library on a leukaemia cell line. *Genet Vaccines Ther* 6, 12. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-6-12>
- Strange, G., Lau, E.M., Giannoulatou, E., Corrigan, C., Kotlyar, E., Kermeen, F., Williams, T., Celermajer, D.S., Dwyer, N., Whitford, H., Wrobel, J.P., Feenstra, J., Lavender, M., Whyte, K., Collins, N., Steele, P., Proudman, S., Thakkar, V., Keating, D., Keogh, A., 2018. Survival of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension Patients in the Modern Era in Australia and New Zealand. *Heart, Lung and Circulation* 27, 1368–1375. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2017.08.018>
- Summerford, C., Bartlett, J.S., Samulski, R.J., 1999. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat. Med.* 5, 78–82. <https://doi.org/10.1038/4768>
- Summerford, C., Samulski, R.J., 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J. Virol.* 72, 1438–1445.
- Trepel, M., Körbelin, J., Spies, E., Heckmann, M.B., Hunger, A., Fehse, B., Katus, H.A., Kleinschmidt, J.A., Müller, O.J., Michelfelder, S., 2015. Treatment of multifocal breast cancer by systemic delivery of dual-targeted adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 22, 840–847. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.52>
- Varadi, K., Michelfelder, S., Korff, T., Hecker, M., Trepel, M., Katus, H.A., Kleinschmidt, J.A., Müller, O.J., 2012. Novel random peptide libraries displayed on AAV serotype 9 for selection of endothelial cell-directed gene transfer vectors. *Gene Ther* 19, 800–809. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.143>
- Waterkamp, D.A., Müller, O.J., Ying, Y., Trepel, M., Kleinschmidt, J.A., 2006. Isolation of targeted AAV2 vectors from novel virus display libraries. *J. Gene Med.* 8, 1307–1319. <https://doi.org/10.1002/jgm.967>
- White, S.J., Nicklin, S.A., Büning, H., Brosnan, M.J., Leike, K., Papadakis, E.D., Hallek, M., Baker, A.H., 2004. Targeted Gene Delivery to Vascular Tissue In Vivo by Tropism-Modified Adeno-Associated Virus Vectors. *Circulation* 109, 513–519. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000109697.68832.5D>
- Work, L.M., Büning, H., Hunt, E., Nicklin, S.A., Denby, L., Britton, N., Leike, K., Odenthal, M., Drebber, U., Hallek, M., Baker, A.H., 2006. Vascular bed-targeted in vivo gene delivery using tropism-modified adeno-associated viruses. *Molecular Therapy* 13, 683–693. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.11.013>
- 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.*

- Viol. 74, 8635–8647. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8635-8647.2000>
- Wu, W., Yang, Y., Yao, F., Dong, L., Xia, X., Zhang, S., Lei, H., 2021. AAV-mediated in vivo genome editing in vascular endothelial cells. *Methods* 194, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.12.001>
- Wu, Z., Yang, H., Colosi, P., 2010. Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Molecular Therapy* 18, 80–86. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.255>
- Xiao, X., Li, J., Samulski, R.J., 1998. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.* 72, 2224–2232.
- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A., Chapman, M.S., 2002. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10405–10410. <https://doi.org/10.1073/pnas.162250899>
- Zafar, F., Heinle, J.S., Schechter, M.G., Rossano, J.W., Mallory, G.B., Elidemir, O., Morales, D.L.S., 2011. Two decades of pediatric lung transplant in the United States: Have we improved? *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 141, 828-832.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2010.06.067>
- Zhang, L., Rossi, A., Lange, L., Meumann, N., Koitzsch, U., Christie, K., Nesbit, A., Moore, T., Hacker, U., Morgan, M.A., Hoffmann, D., Zengel, J.R., Carette, J.E., Schambach, A., Salvetti, A., Odenthal, M., Büning, H., 2019. Capsid engineering overcomes barriers toward Adeno-associated viral (AAV) vector-mediated transduction of endothelial cells. *Human Gene Therapy hum.*2019.027. <https://doi.org/10.1089/hum.2019.027>
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., Rabinowitz, J.E., 2008. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* 16, 1073–1080. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.76>

Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde im Zeitraum von August 2019 bis September 2020 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe *ENDomics* unter der Betreuung von Dr. rer. nat. Jakob Körbelin durchgeführt.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die Unterstützung und die besonders schöne Zeit im Labor bedanken. Jakob, Julia und Jan, vielen Dank für dieses herzliche und humorvolle Jahr und danke dafür, dass Ihr diese Arbeit ermöglicht habt.

Ich bedanke mich bei der E.W. Kuhlmann Stiftung. Dank Ihres Promotionsstipendiums war mir eine Doktorarbeit dieses Umfangs möglich.

Priv.-Doz. Dr. med. Hans F. E. Klose danke ich vielmals für die Betreuung dieser Arbeit als Doktorvater.

Ich bin sehr dankbar für die Unterstützung von M. Sc. Julia Mienert. Danke für Deine Geduld, mit der Du mich eingearbeitet hast und danke für all Deine Hilfe im Labor – ohne Dich wäre ich aufgeschmissen gewesen.

Ich möchte mich bei Dr. med. Jan K. Hennigs bedanken. Vielen Dank für Deine Unterstützung und die kritische Auseinandersetzung mit dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Jakob Körbelin. Danke für Deine einzigartige wissenschaftliche Betreuung und all Deine Unterstützung. Ich danke Dir dafür, dass Du es mir ermöglicht hast, an diesem Thema zu arbeiten. Danke für die Rezension dieser Arbeit. Ohne Dich wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: