Nanobodies als Werkzeuge zur Optimierung Adeno-assoziierter Viren für die Gen- und Tumortherapie

Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
am Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften

Universität Hamburg

vorgelegt von
Anna Marei Eichhoff
aus Viersen

Hamburg, März 2018

Erstgutachter:	Prof. Dr. Friedrich Nolte Institut für Immunologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Wolfgang Maison Institut für Pharmazie Universität Hamburg

Tag der Disputation:	4. Mai 2018
Datum der Druckfreigabe:	4. Mai 2018

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Friedrich Nolte für das interessante Thema, die hervorragende Betreuung und lehrreichen Diskussionen der Ergebnisse und die Möglichkeit anregende internationale Kongresse zu besuchen. Herrn Prof. Dr. Wolfgang Maison danke ich sehr für die Übernahme des Koreferats.

Für die schöne Zeit im Labor danke ich ganz herzlich meinen Kollegen am Institut für Immunologie. Besonders bedanken möchte ich mich bei Carolina Pinto *por todo lo loco espalda con espalda*, bei Thomas Eden für stets ein offenes Ohr, bei Fabienne Seyfried und Marion Nissen für grenzenlose Hilfsbereitschaft und viel Spaß, bei Gudrun Dubberke nicht nur für Zellkulturtipps, bei Joanna Schmid für Aufreinigungswunder, bei unserem Gast Dr. Sahil Adriouch für zahlreiche Hinweise und das Teilen seines Wissens - bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für ihre stete Hilfsbereitschaft!

Auch bedanken möchte ich mich bei den BTA-Schülerinnen Birte Albrecht (mein rettender Engel), Franziska Axt, Jasmina Gebert und Fiona Franke der School of Life Sciences, die mir eine große Hilfe im Labor waren und des Pipettierens nicht müde wurden. Ein großes Danke auch an die beiden Studentinnen Nikolina Pantelic und Enja Schneider, die mich in Teilen dieser Arbeit unterstützt haben.

Vielen Dank an alle Kooperationspartner, die zu den Ergebnissen beigetragen oder wichtige Materialien zur Verfügung gestellt haben: Priv.-Doz. Dr. Friedrich Buck (UKE) für die massenspektrometrische Analyse von AE1, Dr. Ingke Braren (UKE Vector Facility) für die Herstellung von AAVs, Dr. Jakob Körbelin (AG Trepel) für Hilfe bei der Herstellung und Aufreinigung von AAVs, Dr. Sahil Adriouch (Inserm, Rouen) für AAV1 und Immunisierungen, Prof. Dr. Dirk Grimm (Uni Heidelberg) für AAV1-P5. Prof. Dr. Martin Trepel (UKE), Dr. Junghae Suh (Rice University Houston), Prof. Dr. Christian Buchholz (Paul-Ehrlich-Institut, Langen), Prof. Dr. Hildegard Büning (MH Hannover) und Dr. Thomas Schirrmann (IHK Braunschweig) für die Bereitstellung von Plasmiden zur AAV und Nanobody Produktion.

Bei der Claussen-Simon-Stiftung und der DFG bedanke ich mich sehr für die finanzielle Unterstützung, die mir die Durchführung dieses Forschungsprojektes ermöglichten.

Mein privater Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Chell für die große Unterstützung in allen Lebenslagen, den besten Schreibplatz und viele motivierende Worte.

Zusammenfassung ..... **VII**

Abstract ..... **VIII**

Abkürzungsverzeichnis ..... **IX**

1 Einleitung **1**

1.1 Adeno-assoziierte Viren (AAVs) 1
1.1.1 AAVs als Vektoren in der Gen- und Tumortherapie 1
1.1.2 Das Genom und die dreidimensionale Struktur 4
1.1.3 Die Herstellung rekombinanter AAVs 6
1.1.4 Der Eintritt in die Zelle 7
1.1.5 In dieser Arbeit verwendete AAV Serotypen und AAV-spezifische Antikörper 9
1.1.6 Strategien zur Optimierung der Zellspezifität ('Targeting') 10
1.1.6.1 Die genetische Insertion von Proteinen in das virale AAV2 Capsid 11
1.1.6.2 Die Verwendung von Adaptern zwischen AAV und Rezeptor 13

1.2 Nanobodies 14

1.3 Die Membranoberflächenproteine P2X7, ARTC2.2 und CD38 17

2 Zielsetzung **18**

3 Ergebnisse **19**

3.1 Werkzeuge für die Optimierung der Zellspezifität Adeno-assoziierter Viren 19
3.1.1 Produktion von rekombinanten AAV-spezifischen Antikörpern 19
3.1.2 Membranprotein-spezifische Nanobodies 22

3.2 Die Insertion von Nanobodies in das Capsidprotein VP1 26
3.2.1 Generierung von Rezeptor-spezifischen AAVs durch die Insertion von Nanobodies in eine Oberflächenschlaufe von VP1 26
3.2.2 VP1-Nanobody Fusionsproteine werden in AAV2^{RA} Capside eingebaut 27
3.2.3 AAVs mit in VP1 insertierten Nanobodies binden an Zellen, die das Nanobody-spezifische Membranprotein exprimieren 29
3.2.4 P2X7-spezifische AAV2^{RA}s transduzieren bevorzugt P2X7-exprimierende Zielzellen 31
3.2.5 CD38- und ARTC2.2-spezifische AAV^{RA}s transduzieren bevorzugt CD38- bzw. ARTC2.2-exprimierende Zielzellen 32

3.3 Bispezifische Nanobody Adapterproteine 35
3.3.1 Herstellung von bispezifischen Nanobody-basierten Adapterproteinen 35
3.3.2 Bispezifische Nanobody-basierte Adapter vermitteln die spezifische Bindung von AAV2^{RA} an Target-exprimierende HEK Zellen 35
3.3.3 Bispezifische Nanobody-basierte Adapterproteine erhöhen die Transduktion Target-exprimierender HEK Zellen mit AAV2^{RA} 38
3.3.4 P2X7-spezifische Adapter erhöhen die Transduktion von P2X7-exprimierenden HEK Zellen mit AAV1 43
3.3.5 P2X7-spezifische Adapter erhöhen die Transduktion von P2X7-exprimierenden Makrophagen mit AAV1-P5 44
3.3.6 Herstellung und Charakterisierung neuer bispezifischer Nanobody-Adapter 46
3.3.7 Nb 152-enthaltende Adapter verstärken die Transduktion Target-exprimierender HEK Zellen mit AAV1 und AAV2^{RA} 48

4 Diskussion **52**

4.1 Die Insertion von Nbs in eine Oberflächenschlaufe von VP1 führt zur Verbesserung der Transduktion Target-exprimierender Zielzellen mit AAV2^{RA} 52
4.2 Bispezifische Adapterproteine können die Transduktion Target-exprimierender Zielzellen mit AAV2^{RA} und AAV1 erhöhen 54
4.3 Strukturell unterschiedliche Membranoberflächenproteine können als Nanobody-assistierte Rezeptoren für Adeno-assoziierte Viren dienen 59
4.4 Vor- und Nachteile von Nanobody-Capsid Fusionen und Nanobody-basierten bispezifischen Adapterproteinen 62
4.5 Ausblick und Schlussfolgerung 64

5 Materialien 66

5.1 Laborgeräte 66
5.2 Chemikalien 67
5.3 Puffer und Lösungen 68
5.4 Medien 69
5.5 Antikörper 70
5.6 Rekombinante AAVs 71
5.7 Plasmide 71
5.8 Größenstandards für Proteine und DNA 72
5.9 Enzyme 72
5.10 Oligonukleotide 72
5.11 Zelllinien 73

6 Methoden 74

6.1 Molekularbiologische Methoden 74
6.1.1 Quantifizierung von Desoxyribonukleinsäure 74
6.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 74
6.1.3 Restriktionsverdau mit Endonukleasen 75
6.1.4 Dephosphorylierung von Plasmid DNA 76
6.1.5 Agarose-Gelelektrophorese und Gelaufreinigung von DNA 76
6.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten 76
6.1.7 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterienzellen 77
6.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA 77
6.1.9 DNA-Sequenzierungen 78
6.1.10 Künstliche Gensynthese 78
6.1.11 Fusion von Nb 1c81 an den N-Terminus des VP2 Capsidproteins 79
6.1.12 Insertion eines Nbs in das VP1 Capsidprotein 79
6.1.13 Gezielte Mutagenese mittels PCR 80
6.1.14 Klonierung AAV-spezifischer Antikörper 82
6.1.14.1 Das scFv des monoklonalen Antikörpers A20 82
6.1.14.2 Die VHH der Affinitätsmatrix AVB Sepharose 82
6.1.15 Klonierung bispezifischer Adapterproteine 84
6.1.15.1 Dimere aus Nanobody und scFv 84
6.1.15.2 AE1-enthaltende Nanobody-Dimere 84

6.1.15.3 Nanobody-Dimere mit eigenen AAV-spezifischen Nanobodies ... 85
6.1.16 Quantitative Echtzeit-PCR ... 85
6.2 Zellbiologische Methoden ... 86
6.2.1 Kultivierung und Passagierung eukaryotischer Zellen ... 87
6.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen ... 87
6.2.3 Transiente Proteinexpression in HEK293-6E Suspensionszellen ... 87
6.2.4 Ausdifferenzierung muriner Makrophagen aus dem Knochenmark ... 88
6.3 Herstellung und Verwendung Adeno-assoziierter Viren (AAVs) ... 89
6.3.1 Produktion von AAVs mittels Transfektion von HEK293 Zellen ... 89
6.3.2 Gewinnung von AAVs aus Zellkulturüberstand und Zelllysat ... 90
6.3.3 Bindungsassay von AAVs an Membranprotein-exprimierende Zellen ... 90
6.3.4 Transduktion eukaryotischer Zellen mit AAVs ... 91
6.3.4.1 Transduktion von HEK293 Zellen ... 91
6.3.4.2 Transduktion ausdifferenzierter Makrophagen aus dem Knochenmark ... 92
6.4 Immunologische Methoden ... 92
6.4.1 Durchflusszytometrie ... 92
6.4.2 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ... 93
6.4.3 Immunpräzipitation ... 93
6.4.4 Proteintransfer (Western Blot) und Immundetektion ... 94
6.5 Proteinbiochemische Methoden ... 95
6.5.1 Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) ... 95
6.5.2 Affinitätschromatographie von Antikörpern ... 96
6.5.3 Quantifizierung von Proteinen ... 96
6.5.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung ... 96
6.5.5 Fluorochromkonjugation von Antikörpern ... 97
7 Literaturverzeichnis ... 98
8 Anhang ... 107
8.1 Abbildungsverzeichnis ... 107
8.2 Tabellenverzeichnis ... 109
8.3 Die Fusion von Nanobodies an den N-Terminus des Capsidproteins VP2 ... 110
8.3.1 Generierung von AAVs, in denen ein Nanobody an den N-Terminus des Capsidproteins VP2 fusioniert ist ... 110
8.3.2 Nanobody-VP2 Fusionsproteine werden in AAV2^{RA} Capside eingebaut ... 111
8.3.3 AAVs mit N-terminal an VP2-fusioniertem Nb 1c81 zeigen keine Bindung oder Transduktion P2X7-exprimierender Zielzellen ... 113
8.4 Liste der verwendeten Oligonukleotide ... 114
8.5 Sicherheit und Entsorgung ... 116
8.5.1 H-Sätze ... 118
8.5.2 P-Sätze ... 119
8.6 Publikationen und Kongressbeiträge ... 121
8.7 Eidesstattliche Erklärung ... 122

Zusammenfassung

Adeno-assoziierte Viren (AAVs) werden erfolgreich als Vektoren in der Gen- und Tumortherapie angewendet. Sie sind nicht pathogen, wenig immunogen und führen zur langfristigen Expression des übertragenen Transgens. Eine Herausforderung in der Verwendung von AAVs als Vektoren in der Gentherapie ist ihr breiter Tropismus, d.h. die parallele Infektion mehrerer Gewebe und Zelltypen. Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Zellspezifität von AAVs mit Hilfe von Membranprotein-spezifischen Nanobodies - einzelne Antigen-bindende Domänen der einzigartigen Schwere-Ketten-Antikörper der Kameliden - zu verbessern. Die von diesen Nanobodies erkannten Membranproteine P2X7, ARTC2.2 oder CD38, wurden als neue Rezeptoren für die AAV Serotypen AAV1 und AAV2^{RA} evaluiert (AAV2^{RA} ist eine Variante, bei der zwei für die Bindung an HSPG essentielle Arginine zu Alaninen mutiert sind). Dabei wurden zwei Nanobody-basierte Strategien entwickelt.

Die erste Strategie umfasst die genetische Insertion eines Nanobodies in eine exponierte Oberflächenschlaufe des viralen Capsidproteins VP1 von AAV2^{RA}. Nanobody-tragende AAVs zeigten in allen Fällen eine spezifische Bindung an Zielzellen, die das vom Nanobody erkannte Membranprotein auf der Oberfläche exprimierten, sowie eine wesentlich effizientere Transduktion der Zielzellen mit dem AAV-kodierten GFP-Reportergen.

Als zweite Strategie wurden bispezifische Adapterproteine entwickelt, die jeweils einen Membranprotein-spezifischen Nanobody über einen flexiblen Peptidlinker mit einem AAV-spezifischen Nanobody verbinden. Adapter, die den AAV1/AAV2 dual-spezifischen Nanobody 152 tragen, vermittelten für alle drei evaluierten Membranproteine eine stark erhöhte spezifische Transduktion der Zielzellen mit AAV1 ebenso wie mit AAV2^{RA}.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die drei evaluierten Membranproteine (P2X7, CD38, ARTC2.2) trotz struktureller Unterschiede in der Membranverankerung (Multi-*span* Homotrimer, Typ-II *single span*, GPI-Anker) als Zielrezeptoren für die Nanobody-assistierte Bindung und Transduktion von AAVs dienen können. Die beiden hier vorgestellten Nanobody-basierten Strategien zur Verbesserung der Zellspezifität von AAVs stellen interessante neue Ansätze dar, Adeno-assoziierte virale Vektoren für die Gentherapie zu optimieren.

Abstract

Adeno-associated viruses (AAVs) are used as vectors in gene and tumor therapy, since they are non-pathogenic, show low immunogenicity, and confer long-term expression of the transferred gene. A challenge in the use of AAVs as vectors in gene therapy is their broad tropism, i.e. the parallel infection of several tissues and cell types. The goal of this thesis was to improve the cell specificity of AAVs with the aid of membrane-protein specific nanobodies - the single antigen binding domain of the unique heavy-chain antibodies of camelids. The membrane proteins recognized by these nanobodies, P2X7, ARTC2.2, or CD38, were evaluated as new potential receptors for two AAV serotypes, AAV1 and AAV2^{RA}. Two nanobody-based strategies were developed.

The first strategy involves the genetic insertion of a nanobody into an exposed surface loop of the viral capsid protein VP1 of AAV2^{RA} (a variant in which two arginine residues essential for binding to HSPG are substituted by alanine). For each of the evaluated membrane proteins, incorporation of the nanobody into the viral capsid resulted in both specific binding to cells expressing the respective membrane protein, and specific transduction of these cells by the AAV-encoded GFP-reporter gene.

As a second strategy, a membrane protein-specific nanobody was genetically fused via a flexible peptide linker to an AAV-specific nanobody, thereby generating bispecific nanobody-based adapter proteins. Adapters carrying the AAV1/AAV2 dual-reactive nanobody 152 strongly and specifically enhanced the transduction of cells expressing the respective membrane protein by both AAV1 and AAV2^{RA}.

The results show that all three evaluated membrane proteins (P2X7, CD38, ARTC2.2) can serve as target receptors for nanobody-assisted transduction of AAVs, despite striking structural differences in their membrane anchorage (multi-span homo trimer, type-II single span, GPI-anchor). The two engineering strategies for the nanobody-based improvement of the cell specificity of AAVs provide the basis for new approaches to optimize Adeno-associated viral vectors for gene therapy.

Abkürzungsverzeichnis

AAP	*assembly-activating protein*
AAV	Adeno-assoziierter Virus
AAVs	Adeno-assoziierte Viren
Abb.	Abbildung
AL647	Alexa Fluor 647
ARTC2.2	ADP-Ribosyltransferase der C2-Familie
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*)
bNAbs	effektive neutralisierende Antikörper (*broadly neutralizing antibodies*)
bp	Basenpaare
Cap	Capsidproteine
CD	*cluster of differentiation*
CDR	*complementarity derermining region*
C_H	konstante Domäne der schweren Kette eines Antikörpers (*constant heavy domain*)
CLIC	Clathrin-unabhängige Trägerproteine (*clathrin-independent carriers*)
DMEM	Zellkulturmedium (*Dulbecco' s modified Eagle medium*)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*)
dNTPs	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	*Enhanced Chemoluminescence*
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
Fab	Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers (*fragment antigen binding*)
FACS	*fluorescent activated cell sorting*
Fc	konstante C_H2 und C_H3 Domäne eines Antikörpers (*fragment crystallizable*)
FCS	fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)
FDA	Food and Drug Administration

FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor (*fibroblast growth factor receptor*)
FR2	*framework region 2*
GEEC	GPI-reiche endozytische Kompartimente (*GPI-enriched endocytic compartments*)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GS-Linker	Glycin-Serin-Linker
h	Stunde
hcAb	Schwere-Ketten-Antikörper (*heavy chain antibody*)
HEK	Humane embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney)*
HER2/neu	*human epithelial growth factor receptor* 2
HGFR	Hepatozyten-Wachstumsfaktor Rezeptor (*hepatocyte growth factor receptor*)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*)
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
Ig	Immunglobuline
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
ITR	invertierte terminale repetitive Sequenzen (*inverted terminal repeats*)
kD	Kilodalton
LamR	Laminin-Rezeptor
LB	*Lysogeny broth*
LPLD	Lipoprotein-Lipase-Defizienz
mAk	monoklonaler Antikörper
M-CSF	*macrophage colony-stimulating factor*
MWCO	molekulare Ausschlussgrenze (*molecular weight cut off*)
NAD^+	β-Nikotinamidadenindinukleotid
Nb	Nanobody
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMMHC-IIA	*nonmuscle myosin heavy chain IIA*
NPC	Kernpore (*nuclear pore complex*)
ORF	offenes Leseraster (*open reading frame*)
P2X7	Purinorezeptor 7 der P2X Familie

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*)
PBS-MK	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Magnesium und Kalium
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
pdb	Proteindatenbank für 3D Strukturen (*protein data bank*)
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PLA_2	Phospholipase A_2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rAAVs	rekombinante Adeno-assoziierte Viren
Rep	Replikationsproteine
RPE65	*retinal pigment epithelium-specific* 65
rbFc	Fc-Teil eines Kaninchen-Antikörpers (*rabbit* Fc)
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*)
RPMI	Zellkulturmedium (aus dem Roswell Park Memorial Institut)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
scFv	variables Einzelketten-Fragment (*single-chain variable fragment*)
SDS	Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*)
SOC	*super optimal broth*
ssDNA	einzelsträngige (*single-stranded*) DNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TMB	3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidin
U	Enzymeinheit
UV	ultraviolett
vg	virale Genome
V_H	Variable Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
VHH	variable Domäne Schwerer-Ketten-Antikörper (*variable domain of the heavy chain of heavy chain antibodies*)
V_L	Variable Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
VP	virales Protein
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

1 Einleitung

In dieser Arbeit wurden Nanobodies als Werkzeuge zur Optimierung Adeno-assoziierter Viren für die Gen- und Tumortherapie eingesetzt. Die verwendeten Nanobodies binden spezifisch an die drei Membranoberflächenproteine P2X7, ARTC2.2 oder CD38, die als neue potenzielle Rezeptoren für Adeno-assoziierte Viren (AAVs) evaluiert wurden. In der Einleitung wird zunächst die Verwendung von AAVs als Vektoren in der Gen- und Tumortherapie, ihr Aufbau und die Mechanismen des Eintritts in die Zelle beschrieben. Dann folgt eine Darstellung bisheriger Strategien zur Optimierung der Zellspezifität von AAVs. Anschließend werden die Herkunft und Charakteristika von Nanobodies beschrieben. Das Kapitel endet mit einer Erläuterung der unterschiedlichen Strukturen der als Modell-Rezeptoren evaluierten Membranproteine.

1.1 Adeno-assoziierte Viren (AAVs)

1.1.1 AAVs als Vektoren in der Gen- und Tumortherapie

Adeno-assoziierte Viren (AAVs) sind eines der vielversprechendsten Vektorsysteme für die Übertragung von DNA in der Gen- und Tumortherapie. Die simple Genom- und Capsidstruktur der einzelsträngigen (*single-stranded,* ss) DNA-Viren hat es ermöglicht, replikationsdefekte rekombinante AAVs (rAAVs) zu generieren, die nicht mehr die eigene virale DNA, sondern ein gewünschtes Gen übertragen, das Transgen. rAAVs zeichnen sich durch die langfristige Expression des Transgens von episomal vorliegender DNA und einer geringen Immunogenität im Vergleich zu anderen Gentherapie-Vektoren wie Adenoviren oder Lentiviren aus (Weitzman und Linden 2011). Das Vorkommen latenter AAV Infektionen in Geweben humaner und nicht-humaner Primaten sowie der serologische Nachweis AAV-spezifischer Antikörper in der weltweiten Bevölkerung ohne Assoziation zu einer Krankheit, hat dazu geführt, AAVs als nicht-pathogene Viren einzustufen (Gao *et al.* 2004; Calcedo *et al.* 2009). In den letzten Jahren wurde eine mögliche Rolle von AAV2 Insertionen für die Entwicklung hepatozellulärer Karzinome diskutiert (Nault *et al.* 2015) - allerdings wird deren Bedeutung für die Gentherapie mit rekombinanten AAV Vektoren als untergeordnet angesehen (Nault *et al.* 2016; Schmidt *et al.* 2016).

In über 100 klinischen Studien wurde bestätigt, dass rAAVs sichere Vektoren darstellen, die vom Menschen gut toleriert werden und zu einer effizienten Übertragung des therapeutischen Gens führen. Das Spektrum der in diesen Studien behandelten Krankheiten reicht von monogenetischen, neurologischen, okularen, kardiovaskulären und Infektionskrankheiten bis zu Tumor- und Arthritistherapien (Vance *et al.* 2015; Naso *et al.* 2017). Es sind über 100 AAV Varianten und 12 Serotypen bekannt, die Sequenzidentitäten von 53 bis 99 % zeigen (Vance *et al.* 2015). Je nach Serotyp und Administrationsweg unterscheiden sich Infektionsraten und Tropismus/Gewebespezifität der AAVs. In der vorliegenden Arbeit werden die Serotypen AAV1 und AAV2 verwendet, deren Testung in klinischen Studien bereits zur Zulassung als Gentherapie-Vektoren in den USA bzw. in Europa geführt hat.

AAV2 wird z.B. für die lokale Behandlung vererbbarer Augenkrankheiten eingesetzt. Im Dezember 2017 wurde von der FDA (*Food and Drug Administration*, USA) das Medikament 'Voretigene neparvovec-rzyl' (Luxturna™) für die Behandlung von *Leber's congenital amaurosis* zugelassen, einer autosomal rezessiven Augenkrankheit, die meist zu Erblindung führt. Der subretinal injizierte AAV2 Vektor überträgt die gesunde Kopie des mutierten Gens RPE65 (*retinal pigment epithelium-specific* 65) (Russell *et al.* 2017). Andere klinische Studien evaluieren Sicherheit und Effektivität der lokalen Applikation des AAV2-basierten Vektors 'CERE-120', der für den neurotrophen Wachstumsfaktor Neurturin kodiert und zur Behandlung der neurologischen Krankheit Parkinson im Rahmen einer Operation am Gehirn injiziert wird (Bartus *et al.* 2013; Marks *et al.* 2016).

Die erste 2012 in Europa zugelassene Gentherapie 'alipogene tiparvovec' (Glybera®) basiert auf einem AAV1-Vektor, der für das Enzym Lipoprotein-Lipase kodiert und zur Behandlung der seltenen monogenetischen Krankheit Lipoprotein-Lipase-Defizienz (LPLD) eingesetzt wird (Yla-Herttuala 2012). In diesem Fall werden Muskelzellen, die eine niedrige Teilungsrate aufweisen und sich demnach gut für die langfristige Expression eines übertragenen Gens eignen, als Produktionsstelle des benötigten Enzyms eingesetzt (Abb. 1.1 A). Ein ähnlicher Ansatz wird auch bei der sogenannten *'Vectored immunoprophylaxis*' (VIP) verfolgt, bei der AAV-kodierte, neutralisierende Antikörper (*broadly neutralizing antibodies*, bNAbs) gegen das humane Immundefizienz-Virus (HIV) im AAV-injizierten Muskel produziert werden (Brady *et al.* 2017). In einem humanisierten Mausmodell konnte dieser Ansatz vor einer

Infektion mit verschiedenen HIV Stämmen schützen (Balazs *et al.* 2011; Balazs *et al.* 2014).

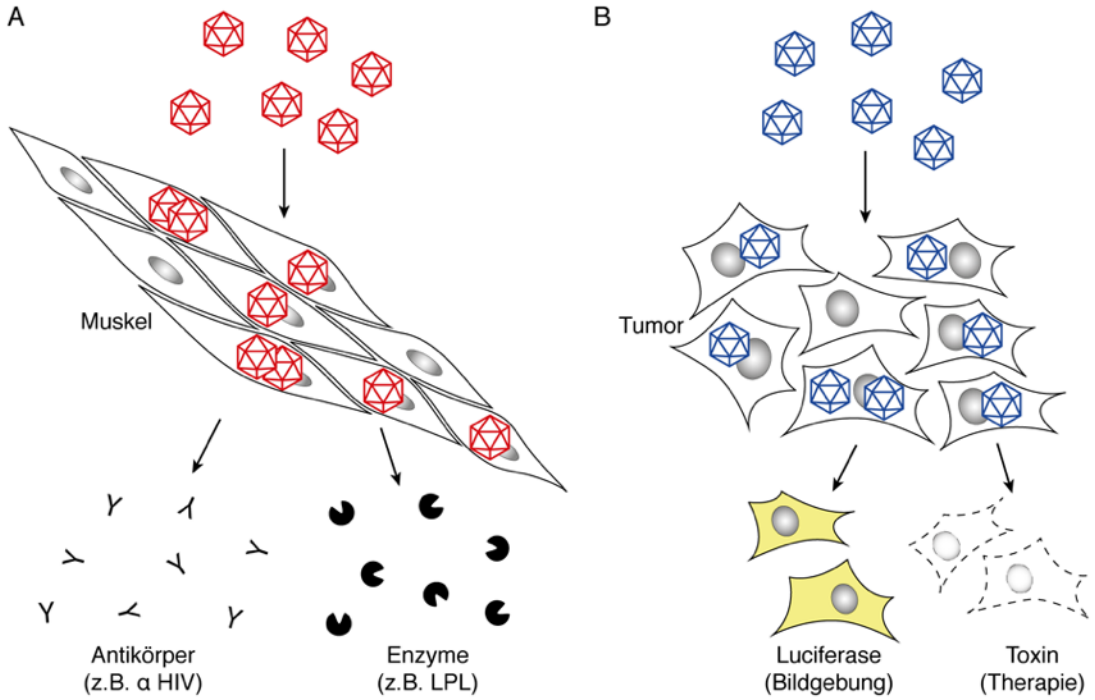

Abb. 1.1: Die Anwendung Adeno-assoziierter Viren als Vektoren in der Gen- und Tumortherapie. (A) Lokal in den Muskel injizierte AAVs können der Produktion von Enzymen dienen, wie z.B. der Lipoprotein-Lipase (LPL) im Fall der in Europa zugelassenen Gentherapie 'alipogene tiparvovec' für die Behandlung von Lipoprotein-Lipase-Defizienz. Die '*Vectored immunoprophylaxis*' nutzt ebenfalls die Muskelzellen als Produktionsstelle für die Herstellung HIV-neutralisierender Antikörper, die von AAVs kodiert werden. (B) In der experimentellen Tumortherapie werden Luciferase-kodierende AAVs eingesetzt, um Tumorwachstum in der Biolumineszenz-basierten Bildgebung zu verfolgen. Als therapeutischer Ansatz werden AAVs eingesetzt, die für ein zytotoxisches Gen kodieren, das die Tumorzelle intrinsisch zerstört.

Auch für die Tumortherapie wurden rAAVs in präklinischen Tiermodellen evaluiert (Abb. 1.1 B). Dabei werden AAV-kodierte Transgene in Tumorzellen selbst oder Tumor-supprimierenden Immunzellen exprimiert, z.B. Gene, die der Angiogenese und damit Blut- und Nährstoffversorgung des Tumors entgegenwirken oder zytotoxische Gene, die zur Zerstörung der Tumorzellen führen (Santiago-Ortiz und Schaffer 2016). Die AAV-vermittelte Expression der Herpes Simplex Virus Thymidinkinase phosphoryliert die antivirale Substanz Ganciclovir und hemmt damit das Tumorwachstum (Z. B. Li *et al.* 2006; Kim *et al.* 2011). Ein in experimentellen Tumormodellen der Maus als Reporter verwendetes Transgen kodiert für das Enzym Luciferase. Mäuse mit subkutanen xenotransplantierten Tumoren (*xenografts*) werden mit Luciferase-kodierenden rAAVs injiziert, um das Tumorwachstum in der Biolumineszenz-basierten Bildgebung, dem *bioluminescence imaging* zu verfolgen (Konkalmatt *et al.* 2013; Rajendran *et al.* 2011).

1.1.2 Das Genom und die dreidimensionale Struktur

AAVs assemblieren eine Capsidhülle aus drei strukturell verwandten Proteinen (~5 Kopien VP1, ~5 VP2 und ~50 VP3 (Abb. 1.2). Das ~5 kb große ssDNA virale Genom ist endständig von sich wiederholenden invertierten Sequenzen (*inverted terminal repeats*, ITRs) flankiert, die die Replikation und Verpackung der DNA in das virale Capsid steuern (Snyder *et al.* 1990). Das offene Leseraster 1 (*open reading frame* 1, ORF1) kodiert für multifunktionale Replikationsproteine (Rep) und die Capsidproteine (Cap) gefolgt von einer Polyadenylierungsstelle (pA) (Abb. 1.2 A). Der p5 Promotor initiiert die Transkription des Replikationsproteins Rep78 und seiner Splice-Variante Rep68, die als spezifische Endonukleasen fungieren (Im und Muzyczka 1990; McCarty *et al.* 1994). Diese Rep Proteine sind essentiell für die Transkription und Replikation, sowie für die Insertion des AAV Genoms in Chromosom 19 (Weitzman *et al.* 1994). Der p19 Promotor initiiert die Transkription des kleineren Replikationsproteins Rep52 und der Splice-Variante Rep40, die als Helikasen die Verpackung des viralen Genoms in assemblierte Capside vermitteln (King *et al.* 2001). Die drei Capsidproteine werden von zwei mRNAs transkribiert, die beide vom p40 Promotor reguliert werden und durch alternatives Splicing entstehen. Die VP2/VP3-kodierende Splice-Variante entsteht durch die häufiger verwendete Splice-Akzeptorstelle (*major splice acceptor site*) an Position 2228 (VP1 Nummerierung), während die VP1-kodierende mRNA durch eine alternative '*minor*' Splice-Akzeptorstelle an Position 2201 entsteht (Trempe und Carter 1988). Die Translation von VP2 und VP3 von der gleichen mRNA wird über ein alternatives Startcodon (ACG) reguliert, wodurch das VP3 Capsidprotein am stärksten produziert wird - das virale Capsid assembliert sich in einem 1:1:10 Verhältnis (VP1:VP2:VP3) aus insgesamt 60 Capsidproteinen. An der Assemblierung der Capside in den Nucleoli ist das *assembly-activating protein* (AAP), das vom p40 Promotor reguliert und einem alternativen eingebetteten Leseraster (ORF2) kodiert wird (Sonntag *et al.* 2010).

Die 3D-Strukturen einiger AAV Serotypen wurden bereits mittels Kryo-Elektronenmikroskopie und Röntgenkristallographie ermittelt (Xie *et al.* 2002; Nam *et al.* 2007; Walters *et al.* 2004) (Abb. 1.2 B). Das ikosaedrische Capsid zeichnet sich durch Vertiefungen an der zweifachen Symmetrieachse, Erhöhungen (Protrusionen) an der dreifachen Symmetrieachse und einem zylindrischen Poren-bildenden Kanal an der fünffachen Symmetrieachse aus. Zwischen den Vertiefungen an der zweifachen

Symmetrieachse und einer Vertiefung rund um den Zylinder, genannt Canyon, befindet sich ein Plateau, die 2/5fache Wand. In allen dreidimensionalen Strukturen ist jeweils nur die gemeinsame VP3 Region der Capsidproteine aufgelöst. Der ca. 60 Aminosäuren längere N-Terminus von VP2 liegt innerhalb des viralen Capsids und wird durch eine Konformationsänderung über die Poren an der fünffachen Symmetrieachse nach außen geklappt (Kronenberg *et al.* 2005). Der um nochmals ca. 100 Aminosäuren längere N-Terminus von VP1 enthält eine Phospholipase A_2 (PLA_2) Domäne, dessen katalytische Aktivität für eine erfolgreiche Infektion durch die Befreiung der Virionen aus Endosomen benötigt wird (Stahnke *et al.* 2011, Zadori *et al.* 2001). Zusätzlich beinhalten die längeren N-Termini von VP1 und VP2 basische Regionen und spezifische Sequenzmotive, die als Signale für Lokalisation und Transport zum Nukleus dienen (Hoque *et al.* 1999; Popa-Wagner *et al.* 2012, Sonntag *et al.* 2006).

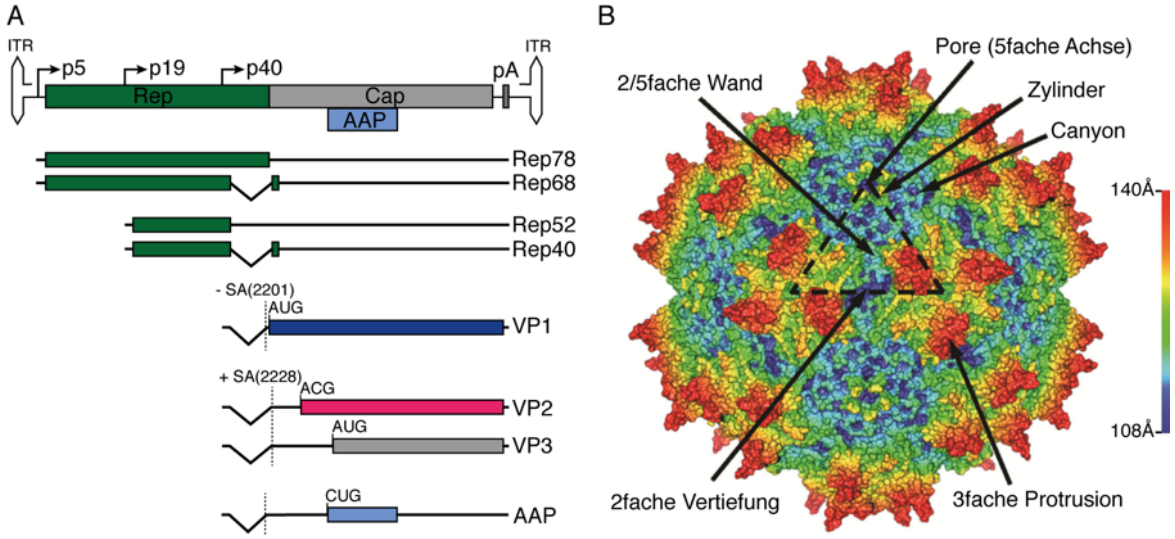

Abb. 1.2: Die Genomorganisation und die dreidimensionale Capsidstruktur von AAV2.
(A) Die ssDNA (~5 kb), flankiert von ITRs als Verpackungssignale, kodiert im ORF1 für Replikationsproteine (Rep) und Capsidproteine (Cap), sowie im eingebetteten ORF2 für das an der Assemblierung der Capside beteiligte *assembly-activating protein* (AAP). Das Replikationsprotein Rep78 und die Splice-Variante Rep68 werden durch den p5 Promotor reguliert und sind für Transkription und Replikation des AAV Genoms verantwortlich. Rep52 und die Splice-Variante Rep40, reguliert durch Promotor p19, vermitteln die Verpackung der ssDNA in assemblierte Capside. Der p40 Promotor reguliert die Transkription der Capsidproteine und des AAP. VP2 und VP3 werden von einer mRNA transkribiert, welche durch die häufiger verwendete Splice-Akzeptorstelle (+SA) an Position 2228 entsteht, wobei die Translation von VP2 durch ein selteneres Startcodon (ACG) initiiert wird. VP1 und AAP werden von einer mRNA transkribiert, die durch eine seltener genutzte Splice-Akzeptorstelle (-SA) an Position 2201 entsteht, so dass das Startcodon von VP1 enthalten ist, während ein unkonventionelles Startcodon (CUG) in ORF2 die Translation des AAP initiiert. (B) Die 3D Darstellung (modifiziert nach Halder *et al.* 2015) zeigt die Oberflächenstruktur des AAV2 Capsids in radialem Farbschema vom Zentrum des Capsids zur höchsten Erhebung, wobei blau dem Zentrum am nächsten und rot am weitesten entfernt ist. Allen AAV Serotypen gemein ist ein Poren-bildender Zylinder an der fünffachen Symmetrieachse, der umgebende Canyon, die Protrusionen an der dreifachen Achse und die Vertiefungen an der zweifachen Achse.

1.1.3 Die Herstellung rekombinanter AAVs

AAVs gehören zur Familie der *Parvoviridae* und hier zum Genus der *Dependoviren*, da sie für eine erfolgreiche Infektion auf eine Koinfektion mit Helferviren wie Adenoviren oder Herpesviren angewiesen sind (Buller *et al.* 1981, Atchison *et al.* 1965). Die Herstellung rekombinanter AAVs erfolgte in dieser Arbeit mittels der Tripel-Transfektion adhärenter HEK293 Zellen, die eine Koinfektion mit Adenoviren als Helferviren umgeht (Abb. 1.3) (Grimm *et al.* 1998). Das virale Wildtyp-Genom wird durch das gewünschte Transgen ersetzt, hier GFP als Reportergen. Dazu wird das Transgen mit den ITRs als Verpackungsvermittler flankiert, während die Replikations- und Capsidproteine sowie das AAP auf einem zusätzlichen Plasmid (pRepCap) ohne ITRs kodiert werden. Das dritte Plasmid, das Helferplasmid pXX6, stellt die adenoviralen Gene E2A, E4 und VA RNAs zur Verfügung, die essentiell für die Produktion von AAVs sind (X. Xiao *et al.* 1998). In HEK293 Zellen erfolgt die Expression der Replikations- und Capsidproteine und die Replikation und Verpackung des Transgens in das virale Capsid. Nach drei Tagen können AAVs aus dem Zellkulturüberstand oder aus Zelllysaten geerntet werden.

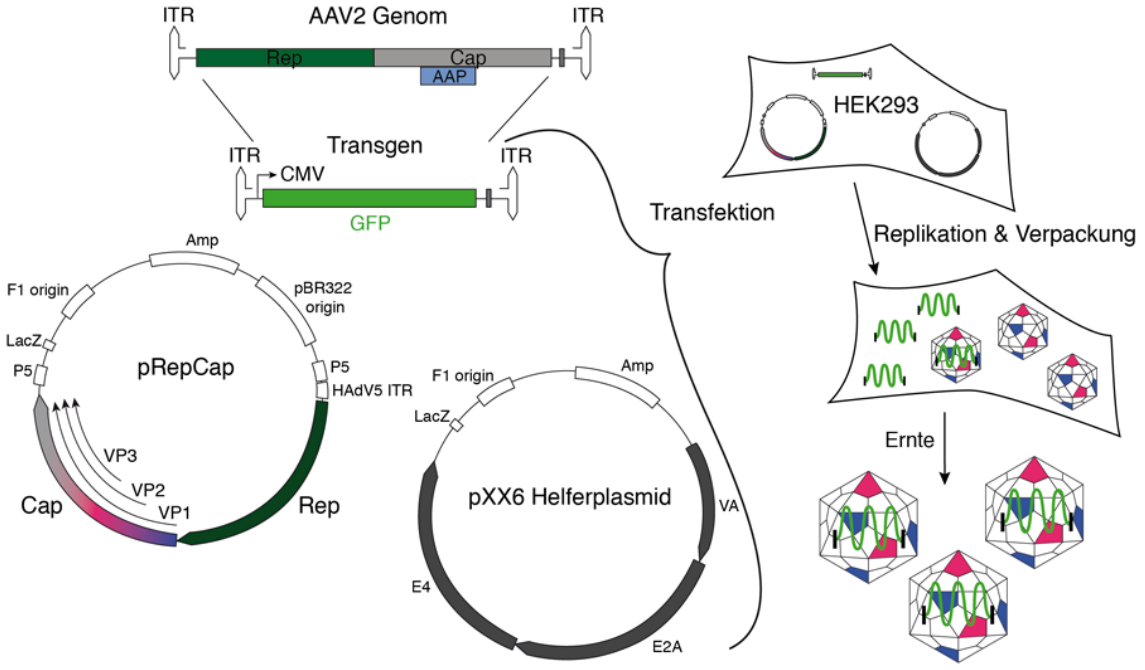

Abb. 1.3: Die Herstellung rekombinanter AAVs mittels Tripel-Transfektion von HEK293 Zellen. Das gewünschte Transgen, z.B. GFP als Reportergen mit CMV Promotor, ersetzt das Wildtyp AAV2 Genom durch die Flankierung mit ITRs. Die Replikations- und Capsidproteine werden auf einem zusätzlichen Plasmid (pRepCap) kodiert. Ein weiteres Plasmid, das Helferplasmid pXX6, kodiert für adenovirale Gene, die für die Produktion der rAAVs essentiell sind. Nach der Tripel-Transfektion adhärenter HEK293 Zellen erfolgen Expression, Replikation und Verpackung des Transgens in die Capside, so dass nach drei Tagen rAAVs aus Kulturüberstand und Lysaten geerntet werden können.

1.1.4 Der Eintritt in die Zelle

AAVs nutzen je nach Serotyp als primären Rezeptor zellgebundene Proteoglykane oder N- oder O-glykosylierte Zucker und häufig sekundäre proteinogene Korezeptoren (Nonnenmacher und Weber 2012). In Abb. 1.4 ist ein Modell des Zelleintritts und intrazellulären Transports des am besten studierten und in dieser Arbeit vorwiegend verwendeten Serotypen AAV2 dargestellt. AAV2 bindet an zellgebundenes Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) (Summerford und Samulski 1998). Die Bindestelle auf dem AAV2 Capsid an den dreifachen Protrusionen wurde durch Mutagenese-Studien und Kryo-Elektronenmikroskopie ermittelt (O'Donnell *et al.* 2009; Kern *et al.* 2003). Zwei Arginine an Position 585 und 588 wurden als Bindungspartner bestimmt, deren Mutation die Bindung an HSPG inhibiert (Opie *et al.* 2003). Es wurden verschiedene Korezeptoren für AAV2 postuliert, wie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 1 (*fibroblast growth factor receptor 1*, FGFR1) (Qing *et al.* 1999), die Integrine $\alpha V\beta_5$ (Summerford *et al.* 1999) und $\alpha 5\beta_1$ (Asokan *et al.* 2006), der Laminin-Rezeptor (LamR) (Akache *et al.* 2006) und der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (*hepatocyte growth factor receptor,* HGFR) (Kashiwakura *et al.* 2005). Die Bindung von AAV2 an HSPG induziert eine Konformationsänderung im Capsid, die eventuell die Interaktion mit Korezeptoren und/oder die Freisetzung der N-Termini von VP1 und VP2 erleichtert (Levy *et al.* 2009). Kürzlich wurde mittels genetischem Screening ein Typ-I Membranprotein (KIAA0319L) entdeckt, nun AAVR (AAV Rezeptor) genannt, das essentiell für die Infektion diverser AAV Serotypen - inklusive AAV2 - ist (Pillay *et al.* 2016; Pillay *et al.* 2017).

Für die Endozytose von AAVs in die Zelle wurden mehrere Internalisierungswege postuliert, wie die Clathrin-vermittelte Endozytose (Duan *et al.* 1999), die Rac1-abhängige Makropinozytose (Sanlioglu *et al.* 2000) und die Endozytose über Clathrin-unabhängige Trägerproteine (*clathrin-independent carriers*) und GPI-reiche endozytische Kompartimente (*GPI-enriched endocytic compartments*), der sogenannte CLIC/GEEC-Weg (Nonnenmacher und Weber 2011). Vermutlich unterscheidet sich der Aufnahmemechanismus je nach Zelltyp und AAV Serotyp (Weinberg *et al.* 2014).

Nach der Internalisierung der AAVs ist die weitere Prozessierung in Endosomen entscheidend (Sonntag *et al.* 2006; Ding *et al.* 2006). Mittels konfokaler und Elektronen-Mikroskopie wurde der schnelle und unidirektionale Transport von AAV2 Partikeln innerhalb von endosomatischen Vesikeln an Mikrotubuli entlang zur

perinukleären Region hin verfolgt (P. J. Xiao und Samulski 2012). Andere Studien zeigten die Lokalisation von AAV2 im Golgi-Apparat (Pajusola *et al.* 2002; Johnson *et al.* 2010). Die Transportwege von AAVs innerhalb der Zelle können je nach Zelltyp, Dosis und Serotyp voneinander abweichen. Allgemeiner Konsens ist, dass eine Reifung der Capside in endosomatischen Kompartimenten erfolgen muss, die zur Exposition der N-Termini von VP1 und VP2 führt (Kronenberg *et al.* 2005) und folglich über die Aktivität der entfalteten PLA_2 Domäne die Virionen ins Cytoplasma in der perinukleären Region entlassen werden. Über anschließend zugängliche Signalsequenzen in den freien N-Termini erfolgt der weitere Transport zum Nukleus. Intakte Viruspartikel gelangen über die Kernporen (*nuclear pore complexes*, NPCs) in den Zellkern, wo die Entpackung und Transkription des Genoms erfolgt (Bartlett *et al.* 2000; Johnson und Samulski 2009; Johnson *et al.* 2010).

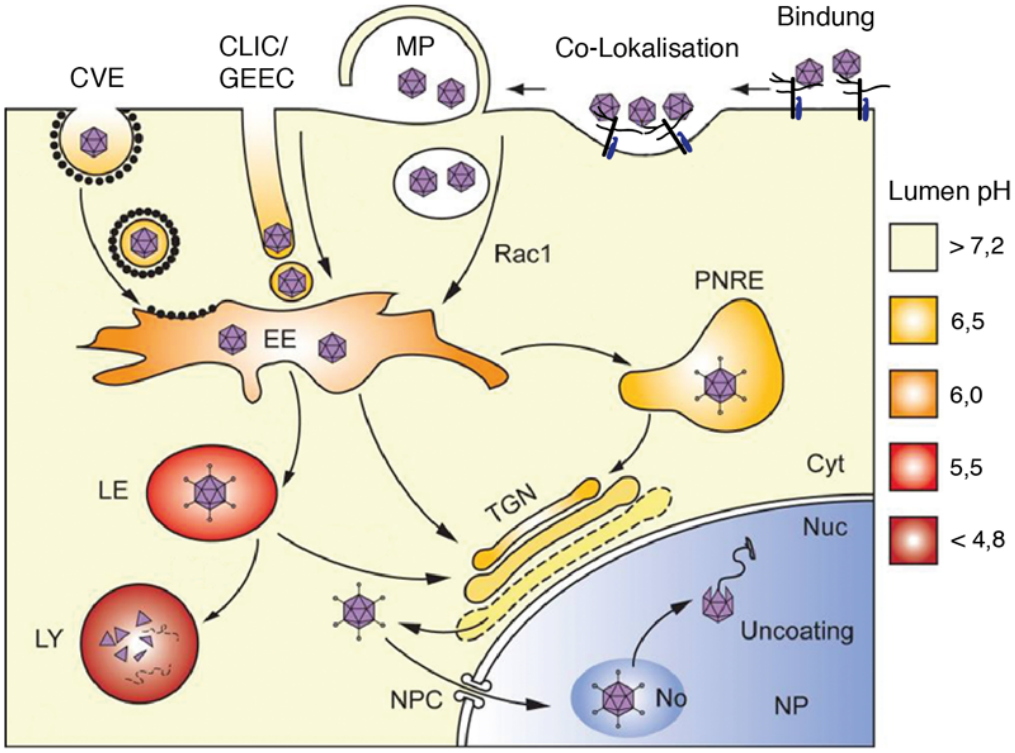

Abb. 1.4: Modell des Zelleintritts und intrazellulären Transports von AAV2.
Als primären Rezeptor bindet AAV2 an HSPG und je nach Zelltyp an unterschiedliche Korezeptoren. Anschließend werden die Partikel über verschiedene Internalisierungsmechanismen endozytiert, wie die Rac1-abhängige Makropinozytose (MP), den CLIC/GEEC-Weg und/oder die Clathrin-vermittelte Endozytose (CVE). Dann durchwandern die AAVs endosomatische Kompartimente wie frühe und späte Endosomen (*early/late endosomes*, EE/LE), perinukleäre recycelnde Endosomen (PNRE) und den Golgi-Apparat. Während dieser endosomatischen Prozessierung werden die N-Termini der Capsidproteine VP1 und VP2 exponiert. Sie enthalten eine PLA_2 Domäne, welche die Freilassung der Partikel ins Cytosol vermittelt, und basische Regionen, die als Signale für den weiteren Transport zum Nukleus dienen. Intakte AAV Partikel gelangen über die Kernporen (*nuclear pore complexes*, NPCs) in den Zellkern, wo das virale Genom entpackt und transkribiert wird. Abbildung modifiziert nach Nonnenmacher und Weber 2012.

1.1.5 In dieser Arbeit verwendete AAV Serotypen und AAV-spezifische Antikörper

AAV Serotypen unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz der Capsidproteine. Die größte Variabilität in der Sequenz liegt in den Schlaufen, die an der Oberfläche des viralen Capsids exponiert sind (Gao *et al.* 2003). Diese variablen Bereiche sind für die Bindung der AAVs an Zellrezeptoren entscheidend und bestimmen welche Zelltypen, Gewebe und Organe transduziert werden. In der vorliegenden Arbeit werden AAVs der Serotypen 1 und 2 verwendet, deren Capsidproteine 83 % Sequenzidentität aufweisen (Abb. 1.5) (Vance *et al.* 2015). Während AAV2 als primären Rezeptor HSPG zum Zelleintritt nutzt, bindet AAV1 an N-glykosylierte Sialinsäuren (Wu *et al.* 2006b). Ursprünglich wurden Serotypen über Kreuzreaktivitäten von Antikörpern in der Bevölkerung eingeordnet, bis die DNA-Sequenzierung zur Entdeckung zahlreicher Varianten führte.

Einige als experimentelle Werkzeuge etablierte AAV-spezifische Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. 1997 wurden von der AG Kleinschmidt am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg zwei AAV-spezifische murine monoklonale Antikörper (mAk), B1 und A20, publiziert (Wistuba *et al.* 1997). B1 bindet spezifisch an ein lineares konserviertes Epitop in der Nähe des C-Terminus der drei Capsidproteine VP1, VP2 und VP3 (Wobus *et al.* 2000) und eignet sich für die Detektion der Capsidproteine in Western Blot Analysen. A20 bindet spezifisch an assemblierte AAV Capside des Serotyp 2 und eignet sich damit für die Detektion intakter Virionen im ELISA oder der Fluoreszenzmikroskpie. Das diskontinuierliche Bindungsepitop wurde später ermittelt (Abb. 1.5) (Wobus *et al.* 2000; McCraw *et al.* 2012).

Die AAV Serotypen 1, 2, 3 und 5 können mit der kommerziell erhältlichen Affinitätsmatrix AVB Sepharose der Firma GE Healthcare Life Sciences chromatographisch aufgereinigt werden. Ligand der Matrix ist ein Einzeldomänen-Antikörper, der aus einer naiven Lama Phagen-Display Bibliothek selektioniert wurde (Oranje *et al.* 2004). Auch das Bindungsepitop dieses Einzeldomänen-Antikörpers wurde mittels Mutagenese-Studien und Sequenzalignments verschiedener AAV Serotypen ermittelt (Wang *et al.* 2015).

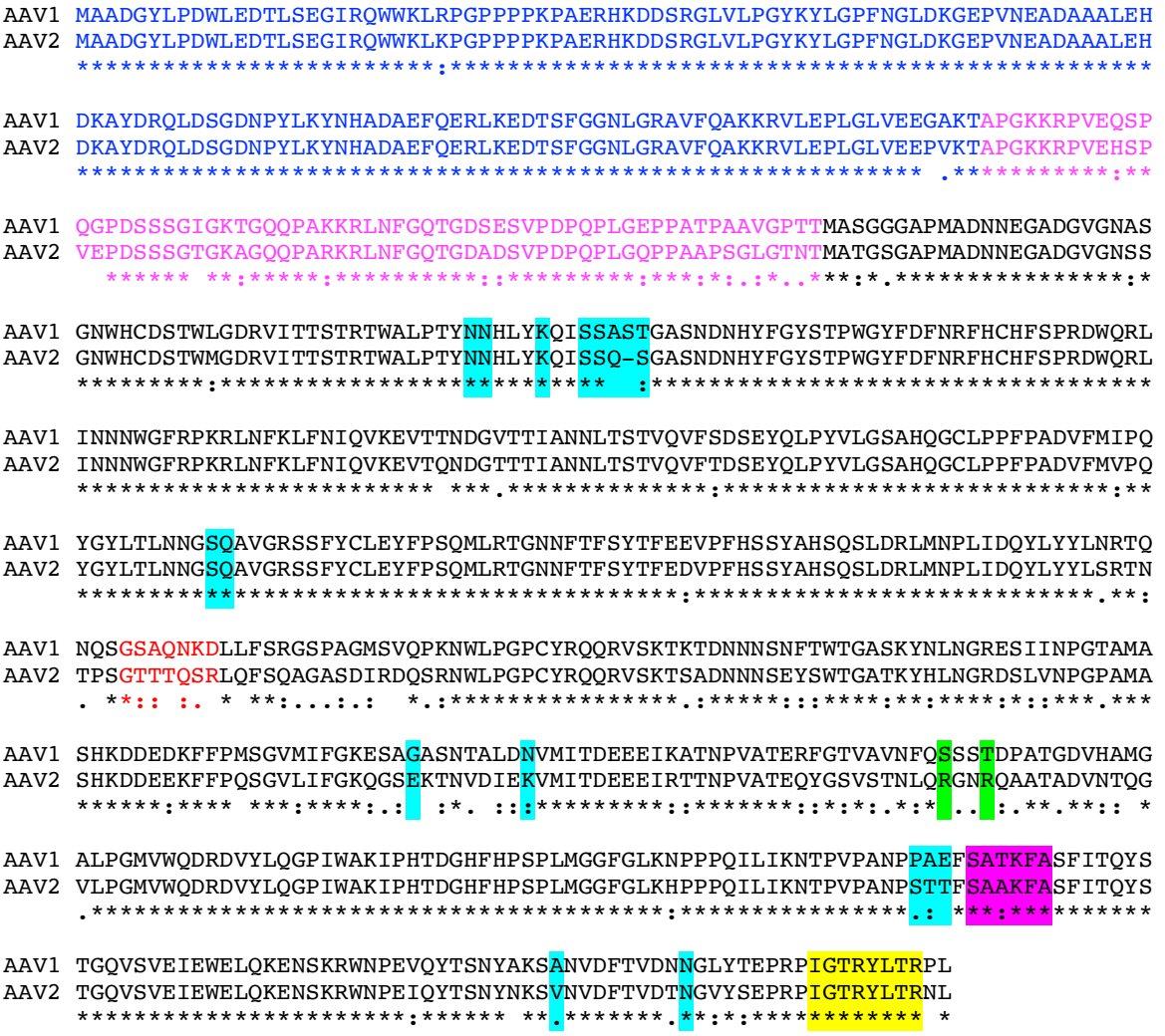

Abb. 1.5: Sequenzalignment der Capsidproteine von AAV1 und AAV2.
Der verlängerte N-Terminus von VP1 (AS in blau) und VP2 (AS in pink) ist zwischen den Serotypen stärker konserviert. VP3 (AS in schwarz) enthält mehrere variable Abschnitte, die an der Capsidoberfläche lokalisiert sind. Einer dieser variablen Bereiche bildet die höchste Protrusion des Capids (AS in rot), die in dieser Arbeit für die Insertion eines Nbs verwendet wurde. Die variablen Schlaufen bestimmen den Tropismus der AAVs, z.B. über die Bindung von AAV2 an HSPG (grün hinterlegt). Die exponierten Schlaufen bilden ferner die Bindungsstellen von Antikörpern. Die Epitope einiger monoklonaler Antikörper, die in der Forschung als Werkzeuge etabliert sind, wurden mittels Mutagenesestudien und Strukturanalysen ermittelt: Der AAV2-spezifische mAk A20 bindet ein diskontinuierliches Epitop (cyan hinterlegt); der zur Aufreinigung der AAV Serotypen 1, 2, 3 und 5 verwendete Einzeldomänen-Antikörper bindet ein lineares Epitop an der Oberfläche des Capsids (violett hinterlegt); mAk B1 bindet ein lineares konserviertes Epitop nahe des C-Terminus der Capsidproteine und eignet sich zur Detektion denaturierter Capsidproteine unterschiedlicher Serotypen im Western Blot.

1.1.6 Strategien zur Optimierung der Zellspezifität ('Targeting')

Die einfache Herstellung von rAAVs und das wachsende Verständnis der Funktion der Capsidproteine für die Virusbindung, Internalisierung, Transport, nukleärer Entpackung und Transgenexpression hat zu der Entwicklung von Strategien zur Optimierung der Zellspezifität durch Modifikation der AAV Capsidproteine geführt

(Grimm und Zolotukhin 2015). Eine große Herausforderung in der Gentherapie mit rAAVs ist die Infektion mehrerer Gewebe und Zelltypen. Obwohl dieser breite Tropismus die Nutzung von AAVs als Gentherapie-Vektoren für verschiedenste Krankheiten eröffnet hat, wird der breite Tropismus zum Nachteil, wenn ein gezieltes Organ und/oder spezifische Zelltypen genetisch verändert und Nebenwirkungen minimiert werden sollen. Eine weitere Schwierigkeit in der Nutzung von AAVs sind neutralisierende Antikörper, die in ~80 % der Bevölkerung vorkommen (Calcedo *et al.* 2009; Erles *et al.* 1999). Aus diesen Gründen wurden verschiedene Capsid 'Engineering' Strategien entwickelt, um die Zellspezifität von AAVs zu verbessern, genannt 'Targeting', oder um antigene Epitope des Capsids zu mutieren. Zunächst wurden rAAVs aus einer Mischung von Capsidproteinen verschiedener Serotypen hergestellt ('Mosaik-AAVs'), um die Eigenschaften der Serotypen miteinander zu kombinieren. Dann wurden AAV Varianten und Chimäre durch gezielte Mutationen einzelner Aminosäuren (AS) bzw. durch den Austausch von größeren Capsidprotein-Elementen generiert (Wu *et al.* 2006a).

Die Strategien zur Optimierung von AAVs lassen sich grob in zwei Kategorien einordnen: gerichtete Evolution und rationales Capsiddesign (Büning *et al.* 2015). Bei der gerichteten Evolution werden randomisierte Bibliotheken aus Capsidproteinen mittels DNA *shuffling* (Grimm *et al.* 2008), *error-prone* PCR (Perabo *et al.* 2006) oder der Insertion kurzer Oligonukleotide ('*peptide display*') hergestellt (Müller *et al.* 2003). rAAVs mit den gewünschten Eigenschaften werden dann *in vitro* oder *in vivo* aus den Bibliotheken selektioniert und angereicherte Klone anschließend sequenziert (Ying *et al.* 2010). Das rationale Capsiddesign befasst sich mit der gerichteten Modifizierung des viralen Capsids, z.B. durch Inkorporation eines Liganden für einen Rezeptor, der auf den Zielzellen exprimiert wird. Diese Strategie wurde auch in der vorliegenden Arbeit für die Inkorporation eines Nanobodies angewendet.

1.1.6.1 Die genetische Insertion von Proteinen in das virale AAV2 Capsid

Münch *et al.* fusionierten ein HER2-spezifisches DARPin (*designed ankyrin repeat protein*), ein kleines (14-17 kDa), synthetisches Protein an den N-Terminus des Capsidproteins VP2 von AAV2 (Abb. 1.6) (Münch *et al.* 2013). HER2/neu (*human epithelial growth factor receptor* 2) ist eine Rezeptor Tyrosinkinase, die in 15-30 % humaner Mammakarzinome hochexprimiert ist (Steiner *et al.* 2008; Burstein 2005). Zusätzlich wurde die Bindung von AAV2 an HSPG durch Mutation der Arginine an

Position 585 und 588 zu Alanin inhibiert. Das an den N-Terminus von VP2 fusionierte HER2-spezifische DARPin wurde dabei offensichtlich auf der viralen Capsidhülle präsentiert, denn die modifizierten AAVs transduzierten spezifisch HER2-exprimierende Zellen und keine HER2-negativen Zellen. In einem *in vivo* Mausmodell mit subkutanen HER2-exprimierenden *xenografts* konnte gezeigt werden, dass systemisch injizierte DARPin-tragende AAVs spezifisch den Tumor transduzierten, während unmodifizierte AAV2 Partikel den Tumor nicht erreichten und in der Leber akkumulierten (Münch *et al.* 2013).

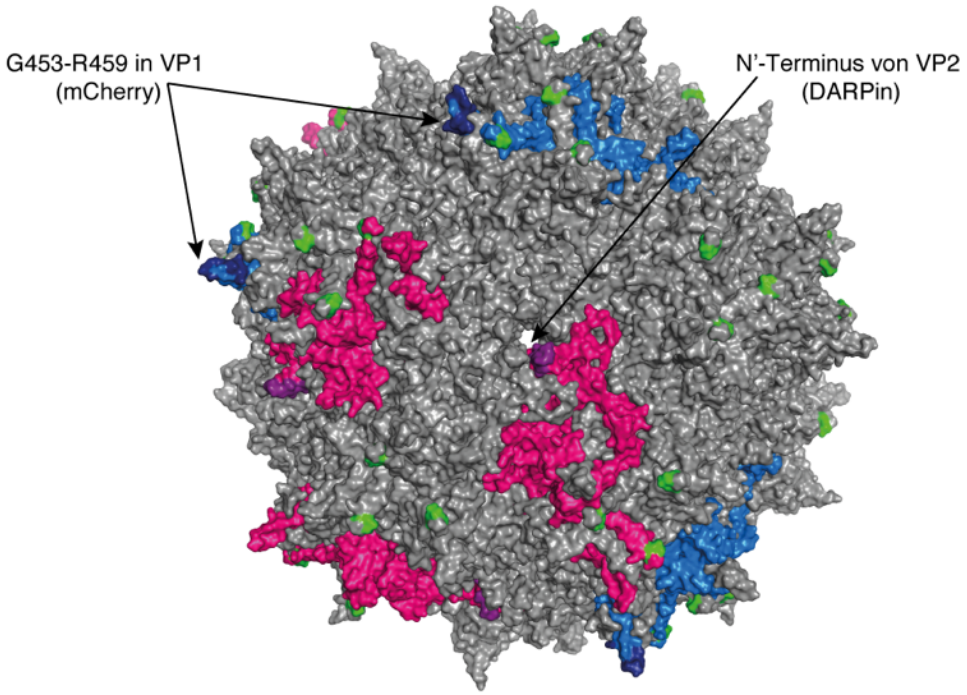

Abb. 1.6: Schema der beiden Insertionsstellen für Proteine in das Capsid von AAV2.
Gezeigt ist die 3D Struktur des AAV2 Capsids (pdb 1lp3) mit Blick auf den Poren-bildenden Zylinder an der fünffachen Symmetrieachse. VP1 (blau), VP2 (pink) und VP3 (grau) assemblieren das Capsid im Verhältnis 1:1:10. Die Fusionsstelle des DARPins liegt am N-Terminus von VP2, der in der 3D Struktur nicht aufgelöst ist und vermutlich innerhalb des Capsids liegt. Die letzten in der Struktur sichtbaren N-terminalen AS sind violett hervorgehoben. Die Insertionsstelle von mCherry befindet sich an Position 453-459 in VP1 anstelle der deletierten AS 'GTTTQSR' (hervorgehoben in dunkelblau), welche die höchste Protrusion des Capsids bilden. Die zwei Arginine an Position 585 und 588, die für die Bindung an HSPG essentiell sind, sind grün hervorgehoben.

Judd *et al.* beschrieben die erfolgreiche Insertion des fluoreszierenden Proteins mCherry (~30 kDa) in eine Oberflächenschlaufe an Position 453-459 des Capsidproteins VP1. Diese Insertionsstelle wurde nach randomisierter Insertion von mCherry an unterschiedlichen Positionen durch Selektion von Capsiden mit robuster mCherry Fluoreszenz bei erhaltener Infektivität identifiziert. Der selektionierte Klon enthielt mCherry anstelle von sieben deletierten Aminosäuren (453GTTTQSR459) an

der höchsten exponierten Stelle des Capsids an der dreifachen Symmetrieachse (Abb. 1.6). Obwohl die Bindungsstelle für HSPG nahe der mCherry-Insertionsstelle liegt, war die Bindung an HSPG nicht beeinträchtigt, so dass die Infektivität erhalten blieb (Judd *et al.* 2012).

1.1.6.2 Die Verwendung von Adaptern zwischen AAV und Rezeptor

Bartlett *et al.* entwickelten einen bispezifischen F(ab'γ)$_2$ Antikörper (Abb. 1.7) für die gezielte Transduktion nicht-permissiver Zellen mit AAV2 (Bartlett *et al.* 1999). Ein Fab'γ Arm stammte von dem AAV2-spezifischen mAk A20 (s.o. Abschnitt 1.1.5) (Wistuba *et al.* 1997). Der andere Fab'γ Arm stammte von dem Integrin $\alpha_{IIb}ß_3$-spezifischen mAk AP2. Integrin $\alpha_{IIb}ß_3$ ist das häufigste Membranprotein auf der Oberfläche von Thrombozyten, das nach Bindung des Liganden Fibrinogen die gemeinsame Endozytose vermittelt. Zusätzlich ist Integrin $\alpha_{IIb}ß_3$ auf der Oberfläche von Megakaryozyten exprimiert, den Vorläuferzellen der Thrombozyten im Knochenmark (Handagama *et al.* 1993). Die Fab'γ Fragmente der beiden Antikörper wurden chemisch über einen Bismaleimidohexan *crosslinker* miteinander verbunden. In der Tat verbesserte die Vorinkubation von AAV2 mit den bispezifischen F(ab'γ)$_2$ Antikörpern die Transduktion von zwei Megakaryozyten Leukämie Zelllinien.

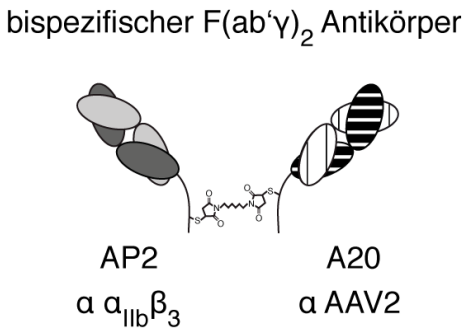

Abb. 1.7: Schematische Darstellung des bispezifischen F(ab'γ)$_2$ Antikörpers.
Der Fab'γ Arm des Integrin $\alpha_{IIb}ß_3$-spezifischen mAk AP2 wurde über einen Bismaleimidohexan *crosslinker* mit dem Fab'γ Arm des AAV2-spezifischen mAk A20 verbunden. Der erhaltene bispezifische F(ab'γ)$_2$ Antikörper verbesserte die Transduktion zunächst nicht-permissiver Megakaryozyten Zelllinien mit AAV2, die das Integrin $\alpha_{IIb}ß_3$ auf ihrer Oberfläche exprimierten (Bartlett *et al.* 1999).

Eine ähnliche Strategie wurde auch in der vorliegenden Arbeit für die Herstellung von bispezifischen Adaptern eingesetzt: durch die genetische Fusion eines AAV-spezifischen Nanobodies mit einem Membranprotein-spezifischen Nanobody über einen flexiblen Peptid-Linker.

1.2 Nanobodies

Antikörper (Immunglobuline, Ig) werden in der Forschung als wichtige Werkzeuge und in der Klinik zunehmend als Therapeutika eingesetzt. Der häufigste IgG Isotyp besteht aus zwei glykosylierten schweren Ketten (*heavy chains,* H) mit einem Molekulargewicht von je ca. 50 kDa und zwei leichten Ketten (*light chains,* L) von je ca. 25 kDa (Abb. 1.8 A). Die beiden N-terminalen variablen Domänen (V) der schweren und leichten Kette, V_H und V_L, bilden gemeinsam die Antigen-bindende Region, das Paratop. Die C-terminalen Sequenzen der beiden Ketten bilden die konstanten Domänen (*constant domains*, C). Die letzten beiden konstanten Domänen der schweren Kette, C_H2 und C_H3, vermitteln Effektorfunktionen über die Rekrutierung von Immunzellen und die Aktivierung des Komplementsystems. Die variablen Domänen können isoliert als variables Einzelketten-Fragment (*single-chain variable fragment*) durch Verbindung der V_H und V_L Domäne über ein synthetisches Linker-Peptid hergestellt werden (Huston *et al.* 1991).

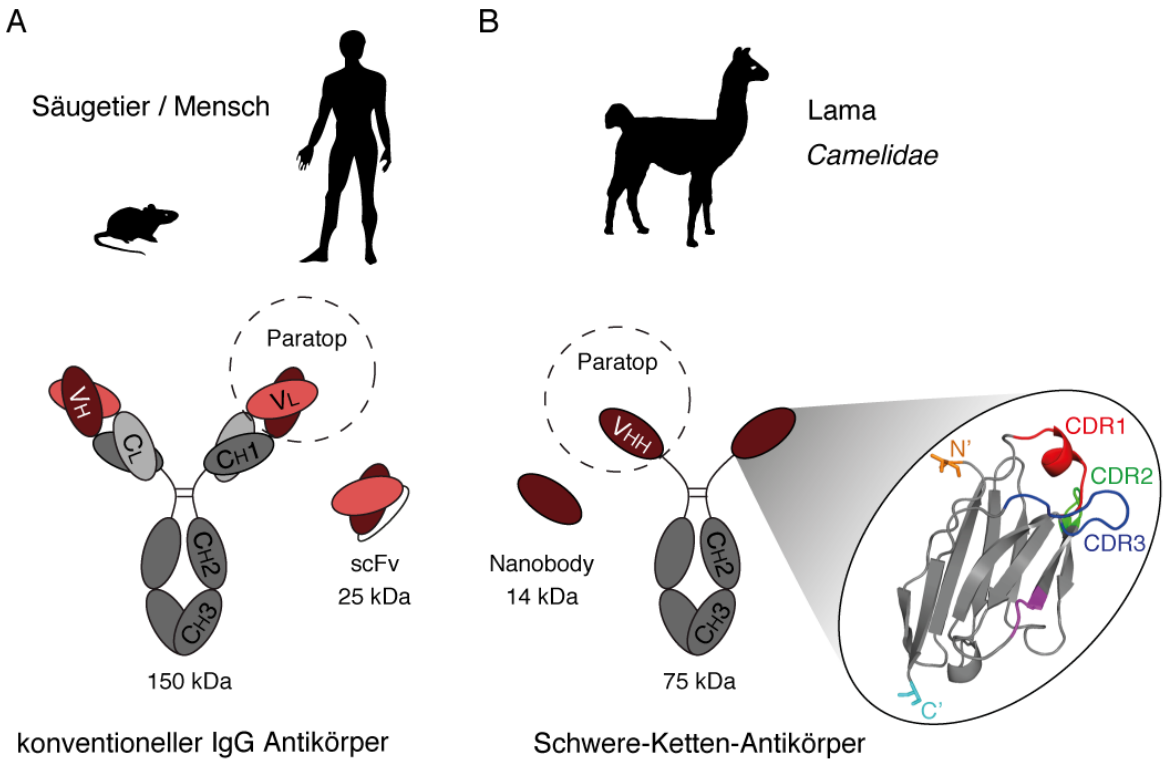

Abb. 1.8: Nanobodies aus Schwere-Ketten-Antikörpern der Familie *Camelidae*.
(A) Menschen und andere Säugetiere produzieren IgG Antikörper, die aus zwei schweren und zwei leichten Ketten bestehen. Die schweren Ketten sind über zwei Disulfidbrücken in der hinge Region miteinander verbunden und bestehen aus je drei konstanten Domänen (C_H1-3) und einer variablen Domäne (V_H). Leichte Ketten einhalten eine konstante (C_L) und eine variable Domäne (V_L) und sind i.d.R. über eine Disulfidbrücke mit der schweren Kette verbunden. V_H und V_L bilden gemeinsam die Antigen-bindende Einheit, genannt Paratop und können über ein synthetisches Linkerpeptid rekombinant als

scFv hergestellt werden. (B) *Camelidae* produzieren neben konventionellen Antikörpern auch sogenannte Schwere-Ketten-Antikörper, die nur aus schweren Ketten ohne C_H1 Domäne bestehen. Das Paratop wird von einer einzigen variablen Domäne gebildet, der VHH (*variable domain of the heavy chain of heavy chain antibodies*). Rekombinant hergestellt wird diese variable Domäne als kleinste Antigen-bindende Einheit mit einer Größe von 2-3 nm und einem MW von ca. 14 kDa auch Einzeldomänen-Antikörper oder Nanobody genannt. Vergrößert ist die 3D Struktur des in dieser Arbeit verwendeten Nb 370 gezeigt. Der N-Terminus (orange) befindet sich auf dem gleichen Pol wie die variablen Antigen-bindenden Schleifen CDR1 (rot), CDR2 (grün) und CDR3 (blau). Gegenüber liegt der C-Terminus, der die VHH mit der konstanten Region verbindet. In der konservierteren FR2 liegen die hydrophilen Aminosäuren (magenta), die die Löslichkeit von Nanobodies im Vergleich zu den V_H Domänen konventioneller Antikörper erhöhen.

Neben diesen 'konventionellen' Antikörpern hat sich in der Familie der *Camelidae*, zu denen Lamas, Alpakas und Kamele gehören, eine besondere Form von Antikörpern entwickelt, die Schwere-Ketten-Antikörper (Abb. 1.8 B) (Hamers-Casterman *et al.* 1993). Schwere-Ketten-Antikörper besitzen keine leichten Ketten, so dass das Paratop von einer einzelnen variablen Domäne gebildet wird, der VHH (*variable domain of the heavy chain of heavy chain antibodies*). Isoliert rekombinant hergestellt wird diese variable Domäne auch als Einzeldomänen-Antikörper oder aufgrund der geringen Größe von 2-3 nm als Nanobody bezeichnet. In der ovalen Struktur liegen die Antigen-bindenden CDR (*complementarity determining region*) Schlaufen an einem Pol, an dem auch der N-terminus liegt. Die CDR3 ist in VHHs oft länger und kann in Kavitäten von Antigenen hereinreichen, so dass die Funktion des Proteins inhibiert wird, wie z.B. die enzymatische Aktivität eines Enzyms oder die Öffnung eines Ionenkanals (Koch-Nolte *et al.* 2007; Danquah *et al.* 2016). Da in Schwere-Ketten-Antikörpern auch die C_H1 Domäne aufgrund einer mutierten Splice-Stelle fehlt (Nguyen *et al.* 1999), ist das C-terminale Ende der VHH direkt über eine *hinge*-Region mit den C_H2 und C_H3 Domänen verbunden. Als evolutive Anpassung an die fehlenden leichten Ketten weisen VHHs in der Framework Region 2 (FR2) an Position 37, 44, 45 und 47 (Nummerierung nach Kabat und Wu 1991) hydrophile Aminosäuren auf, die eine Erklärung für die hohe Löslichkeit von VHHs bieten (Muyldermans *et al.* 1994; Wesolowski *et al.* 2009).

Ein Vorteil der hohen Löslichkeit und Einzeldomänenstruktur von Nanobodies ist die einfache Generierung bi- und multivalenter Formate. Durch genetische Fusion von VHHs über synthetische Peptid Linker können einfach bi- und multispezifische Antikörper (die verschiedene Antigene erkennen) oder multivalente Antikörper (die das gleiche Epitop eines Antigens erkennen) generiert werden. Auf diese Weise

hergestellte Nb-Dimere und -Trimere zeichnen sich durch hohe Expressionslevel und eine gute Löslichkeit und Stabilität aus (Els Conrath *et al.* 2001; Bannas *et al.* 2017). Eine weitere Möglichkeit der Formatierung bietet die Fusion an den Fc-Teil eines Antikörpers, die eine Erhöhung der Avidität und der Halbwertszeit *in vivo* bewirkt und zytotoxische Effektorfunktionen ermöglicht (Bell *et al.* 2010). In Forschung und Diagnostik ist die Fusion an den Fc-Teil unterschiedlicher Spezien für den Einsatz in ELISA und Durchflusszytometrie hilfreich.

Auch in der Therapie finden Nanobodies zunehmend Anwendung (Cortez-Retamozo *et al.* 2004). Für dieses Jahr wird die Zulassung für das erste Nb-basierte Therapeutikum namens 'Caplacizumab' erwartet - ein Von-Willebrand-Faktor-spezifischer Nanobody Dimer (Peyvandi *et al.* 2016).

1.3 Die Membranoberflächenproteine P2X7, ARTC2.2 und CD38

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Membranproteine, P2X7, ARTC2.2 und CD38, als mögliche Rezeptoren für AAVs evaluiert, für die bereits spezifische Nanobodies in der AG Nolte entwickelt worden waren (Danquah *et al.* 2016, Fumey *et al.* 2017; Koch-Nolte *et al.* 2007). Diese drei Membranproteine unterscheiden sich wesentlich in ihrer Struktur und Funktion (Abb. 1.9). Das Ektoenzym CD38 gehört mit einer *a*-helicalen Transmembrandomäne und cytosolischem N-Terminus zu den Typ-II Membranproteinen. Die ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 besitzt keine Transmembrandomäne; die enzymatisch aktive extrazelluläre Domäne ist über einen 'GPI-Anker' - eine kovalente Verknüpfung des C-Terminus mit einem Membranglykolipid - in der extrazellulären Monolipidschicht der Doppelmembran befestigt. Jede Untereinheit des homotrimeren durch ATP und NAD^+ gesteuerten P2X7 Ionenkanals hat zwei Transmembrandomänen (Eden *et al.* 2017).

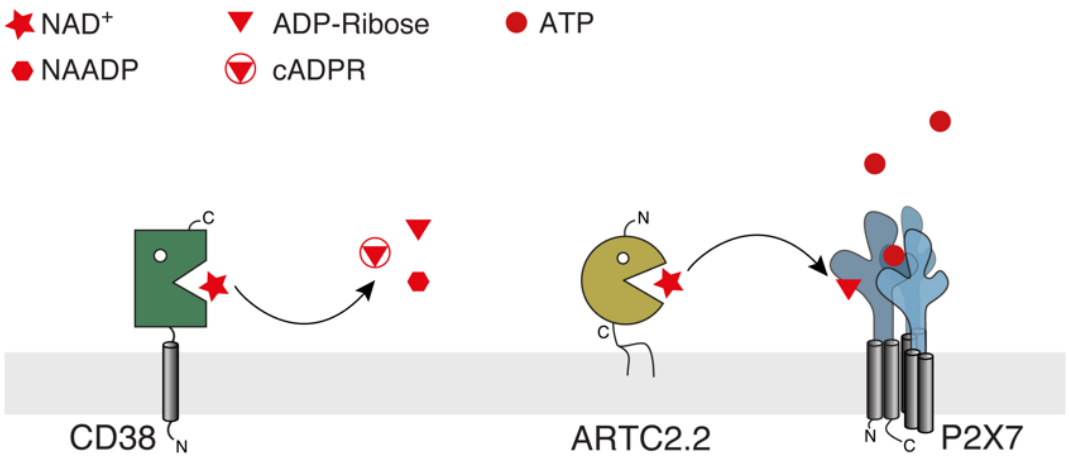

Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Membranproteine CD38, ARTC2.2 und P2X7.
Das Typ-II Membranprotein CD38 ist ein multifunktionelles Ektoenzym, das die Hydrolyse von extrazellulärem NAD^+ zu ADP-Ribose katalysiert, sowie die *second messenger* NAAPD und cADPR synthetisiert. Durch die Hydrolyse von NAD^+ ist CD38 an der Regulierung der Verfügbarkeit von NAD^+ als Substrat der ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 beteiligt. Das GPI-verankerte Ektoenzym überträgt die ADP-Ribosegruppe von NAD^+ auf Arginin 125 des purinergen Rezeptors P2X7. Der Ionenkanal besteht aus drei homologen Einheiten mit je zwei Transmembrandomänen. P2X7 kann durch ADP-Ribosylierung (über die ARTC2.2) oder durch extrazelluläres ATP aktiviert werden. ATP und NAD^+ werden als Gefahrensignale in Entzündungsreaktionen freigesetzt.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Evaluation Nanobody-basierter Strategien zur verbesserten Transduktion spezifischer Zellen mit Adeno-assoziierten Viren. Dabei sollten die drei strukturell unterschiedlichen Membranproteine P2X7, ARTC2.2 und CD38, für die spezifische Nanobodies zur Verfügung stehen, als mögliche Ziele für die Nanobody-assistierte Transduktion durch AAVs evaluiert werden.

Eine Strategie verfolgt den genetischen Einbau eines Nanobodies in das virale Capsid, entweder durch Fusion an den N-Terminus des VP2 Capsidproteins oder durch die Insertion in eine Oberflächenschlaufe des VP1 Capsidproteins. Die modifizierten AAVs sollen auf verstärkte Bindung und Transduktion Target-exprimierender Zielzellen getestet werden. Als zweite Strategie sollen bispezifische Adapterproteine entwickelt werden, in denen jeweils ein AAV-spezifischer Nanobody mit einem Membranprotein-spezifischen Nanobody über einen flexiblen Peptidlinker verbunden ist. Es soll überprüft werden, ob diese Adapterproteine die Transduktion Target-exprimierender Zielzellen mit AAV1 und AAV2 verstärken. Zudem soll festgestellt werden, welche Art von Membranproteinen als Rezeptoren für AAVs geeignet sind und ob unterschiedliche Membranverankerungen dabei eine Rolle spielen.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in drei Abschnitte gegliedert. Zunächst werden die in der Arbeit verwendeten Adeno-assoziierten Viren sowie die zur Optimierung und Detektion generierten Antikörperfragmente und Nanobodies vorgestellt. Danach werden die Ergebnisse der beiden entwickelten Strategien zur Optimierung der Zellspezifität Adeno-assoziierter Viren präsentiert. Abschnitt 2 behandelt die Strategie, einen Nanobody in eine exponierte Oberflächenschlaufe des Capsidproteins VP1 von AAV2^{RA} zu insertieren. In Abschnitt 3 wird die Herstellung bispezifischer (AAV/Rezeptor) Nanobody Adapterproteine vorgestellt und die Nutzung dieser Adapterproteine für die spezifische Transduktion von Rezeptor-exprimierenden Zielzellen mit GFP-kodierenden AAV2^{RA} und AAV1.

3.1 Werkzeuge für die Optimierung der Zellspezifität Adeno-assoziierter Viren

3.1.1 Produktion von rekombinanten AAV-spezifischen Antikörpern

In der vorliegenden Arbeit wurden Adeno-assoziierte Viren der Serotypen 1 (AAV1) und 2 (AAV2) eingesetzt, die bereits in klinischen Studien und für AAV Targeting Strategien eingesetzt werden (Abb. 3.1 A) (Büning *et al.* 2015; Russell *et al.* 2017; Yla-Herttuala 2012). Variante AAV2^{RA} wurde durch die Mutation von zwei Argininen zu Alaninen an Position 585 und 588 hergestellt. Diese Mutationen hemmen die Bindung an den natürlichen AAV2-Rezeptor HSPG (Boucas *et al.* 2009; Münch *et al.* 2013).
Zudem wurden verfügbare AAV-spezifische Antikörper sowie selbst hergestellte bzw. reformatierte Antikörper und Nanobodies eingesetzt, um AAV Capside aus Zellkulturüberständen zu präzipitieren, Capsidproteine im Western Blot zu detektieren und die Bindung von Viruspartikeln an der Zelloberfläche nachzuweisen. Der von der Arbeitsgruppe Kleinschmidt hergestellte mAk B1 erkennt ein lineares konserviertes Epitop in der Nähe des in allen drei Capsidproteinen enthaltenen C-Terminus und eignet sich damit besonders für die Detektion denaturierter Capsidproteine im Western Blot (Wistuba *et al.* 1997). Der ebenfalls von der AG Kleinschmidt entwickelte mAk A20 bindet spezifisch an assemblierte AAV Capside des

Serotyps 2 und ist somit für die Detektion und Präzipitation intakter AAV2 Capside geeignet (vgl. Abb. 1.5). In dieser Arbeit wurde die Antigen-bindende Domäne von A20 auch als *single chain variable fragment* (scFvA20) hergestellt, in dem die VH und VL Domänen mit einem 15 GS-Linker fusioniert wurden. Hierfür wurde die scFvA20-kodierende Nukleotidsequenz für die Expression in humanen Zellen Codon-optimiert und das entsprechende synthetische DNA-Fragment in zwei bereits verfügbare *pCSE2.5* Vektoren kloniert (Jäger *et al.* 2013), so dass dabei das scFv N-terminal an die Igκ Signalsequenz und C-terminal entweder an eine chimäre Hexahistidin/c-Myc-Sequenz oder an die hinge, C_H3 und C_H3 Domänen von Kaninchen IgG fusioniert wurde. Die Signalsequenz dient der Sekretion des rekombinanten Proteins, die Hexahistidin/c-Myc-Sequenz der Generierung eines 'getagten' monomeren Formats, die hinge/CH2/CH3-Sequenz der Generierung eines bivalenten Schwere-Ketten-Antikörpers (rbFc) (Abb. 3.1 B).

Die AAV Serotypen 1, 2, 3 und 5 können mit der kommerziell erhältlichen Affinitätsmatrix AVB Sepharose der Firma GE Healthcare Life Sciences chromatographisch aufgereinigt werden. Ligand der Matrix ist ein Einzeldomänen-Antikörper, der aus einer naiven Lama Phagen-Display Bibliothek selektioniert wurde (Oranje *et al.* 2004). Da die Sequenz dieses Nanobodies nicht veröffentlicht war, wurde dessen Aminosäuresequenz massenspektrometrisch analysiert. Die Codon-optimierte Nukleotidsequenz wurde analog zum scFvA20 in die o.a. *pCSE2.5* Vektoren kloniert, um diesen AE1 genannten Nanobody in monomerem und bivalentem Schwere-Ketten-Antikörper Format zu generieren (Abb. 3.1 B). Dafür wurden HEK293-6E Zellen transient mit den *pCSE2.5* Vektoren transfiziert und sechs Tage in Serum-freiem Medium kultiviert. In das Kulturmedium sezernierte Monomere wurden über den Hexahistidin-Tag mittels immobilisierter Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) und Schwere-Ketten-Antikörper über Bindung an eine Protein G Sepharose Matrix aufgereinigt. Gereinigte Monomere und Schwere-Ketten-Antikörper wurden für durchflusszytometrische Analysen chemisch an das Fluorochrom Alexa Fluor 647 (AF647) konjugiert.

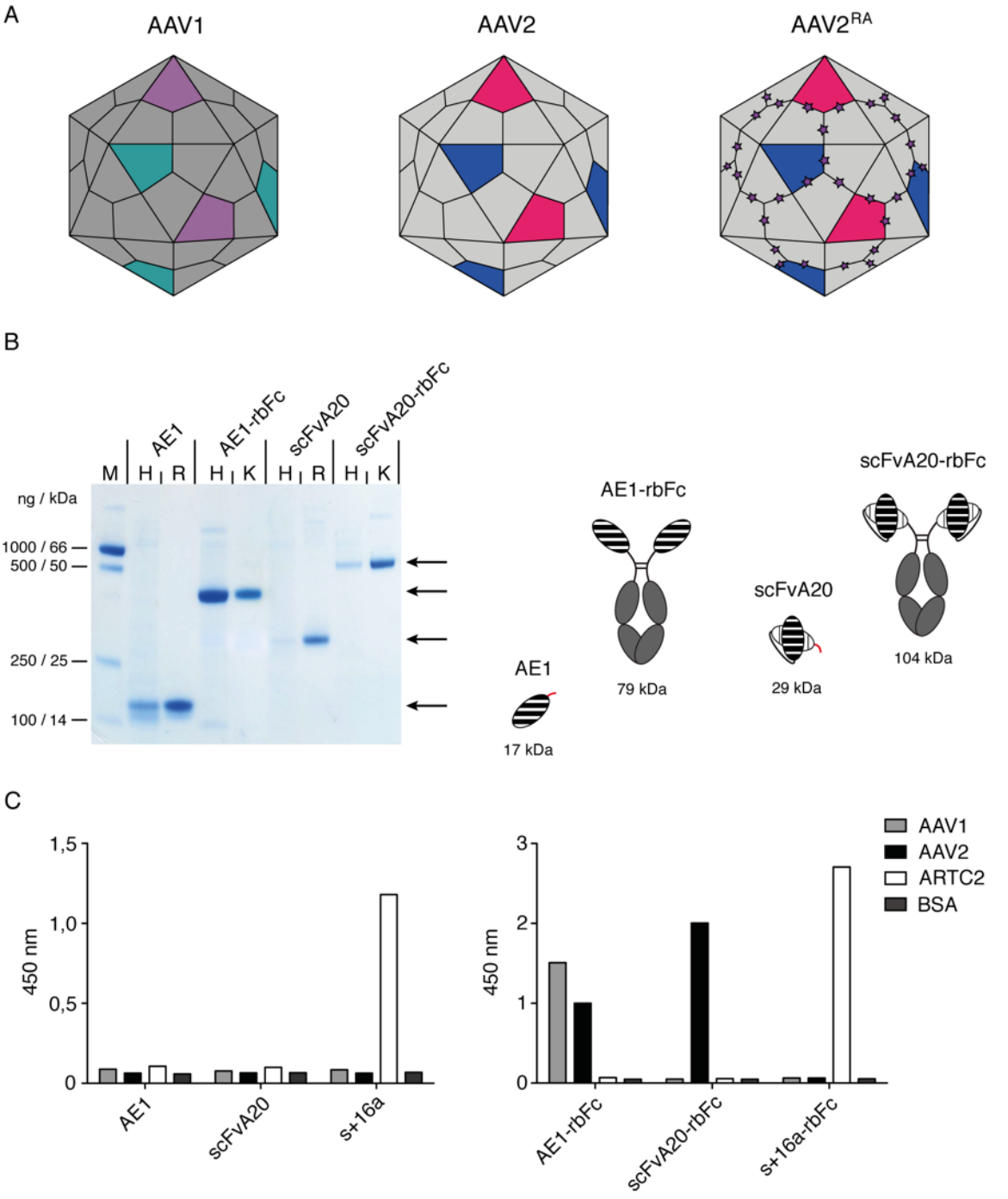

Abb. 3.1: In dieser Arbeit eingesetzte AAVs und AAV-spezifische Antikörper.
(A) AAV Capside assemblieren sich aus 60 Capsidproteinen: ~5 VP1 (violett, pink), ~ 5 VP2 (cyan, blau) und ~ 50 VP3 (grau). In AAV2^{RA} wurden zwei für die Bindung von HSPG wichtige Arginine an Position R585 und R588 zu Alaninen mutiert (violette Sterne). (B) Nb AE1 und scFv A20 wurden jeweils als Monomere mit C-terminalem Hexahistidin/c-Myc-Tag (rot) sowie als Schwere-Ketten-Antikörper (nach Fusion an die *hinge* und Fc-Domänen von Kaninchen IgG) in HEK Zellen produziert. Monomere wurden affinitätschromatographisch über Nickel-NTA, Fc-Fusionsproteine über Protein G Sepharose aufgereinigt und teilweise an Alexa Fluor 647 konjugiert. Mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung wurden jeweils 10 µl des HEK Zellkulturüberstandes (H) und ca. 1 µg der gereinigten (R) oder konjugierten (K) Antikörpers analysiert. Die Coomassie Färbung ermöglicht eine Mengenabschätzung im Vergleich zu dem Molekulargewichtsmarker (M). (C) Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit gereinigten AAV1 oder AAV2 (je $1*10^9$ vg/Napf) oder mit ARTC2.2 oder BSA (100 ng/Napf) beschichtet und freie Bindestellen mit BSA blockiert. Nach der Inkubation mit Antikörper-haltigen

Zellkulturüberständen (1:20 in PBS) wurden die Näpfe viermal gewaschen. Gebundene Monomere und Schwere-Ketten-Antikörper wurden mit HRP-gekoppelten c-Myc- bzw. Kaninchen IgG-spezifischen Sekundärantikörpern detektiert.

Um das Expressionsniveau und die Integrität der gereinigten Antikörper zu prüfen, wurden jeweils 10 µl Zellkulturüberstand sowie 1 µg des gereinigten Proteins mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung analysiert (Abb. 3.1 B). Der Vergleich zu den mitanalysierten Markerproteinen erlaubt eine Abschätzung der Proteinkonzentrationen in den HEK-Zellkulturüberständen: 75 bzw. 10 µg/ml für die Nb AE1 und scFv A20 Monomere, 150 bzw. 30 µg/ml für die AE1 und scFvA20 Schwere-Ketten-Antikörper. Die AE1-enthaltenden Konstrukte ließen sich somit fünffach effizienter produzieren als scFvA20-enthaltende Konstrukte.
Die Bindung der rekombinanten Antikörper an AAV1 und AAV2 wurde mittels ELISA überprüft (Abb. 3.1 C). Die Ergebnisse bestätigen die spezifische Bindung von AE1-rbFc an AAV1 und AAV2 sowie die Bindung von scFvA20-rbFc an AAV2 aber nicht an AAV1. Die entsprechenden Monomere zeigten im ELISA hingegen - vermutlich aufgrund ihrer niedrigen Affinität - nur sehr schwache Signale.

3.1.2 Membranprotein-spezifische Nanobodies

In dieser Arbeit werden in der AG Nolte bereits verfügbare Membranprotein-spezifische Nanobodies als Werkzeuge verwendet, um AAVs zielgerichtet in Zellen einzubringen, die eines der drei Target Membranproteine auf der Zelloberfläche exprimieren (Abb. 3.2 A). Der P2X7 Ionenkanal ist ein Homotrimer, dessen Untereinheiten jeweils zwei Transmembrandomänen enthalten. Das Ektoenzym CD38 ist mit seinem cytosolischen N-terminus und einer Transmembrandomäne ein Typ-II Membranprotein. Das Ektoenzym ARTC2.2 ist über die kovalente Verknüpfung seiner C-terminalen Aminosäure mit einem GPI-Anker in der extrazellulären Schicht der Zellmembran befestigt. Für CD38 wurden fünf Nanobodies verwendet, die an drei nicht überlappende Epitope der extrazellulären Domäne binden: Nbs 274, 370 und 1053 an Epitop 1, Nb 1067 an Epitop 2 und Nb JK19 an Epitop 3 (T. Li *et al.* 2016, Fumey *et al.* 2017). Für ARTC2.2 wurden zwei Nbs (s-14 und s+16) verwendet, die ebenfalls nicht-überlappende Eptiope binden (Koch-Nolte *et al.* 2007). Die Evaluierung von P2X7 erfolgte mit Nb 1c81 (Danquah 2012).

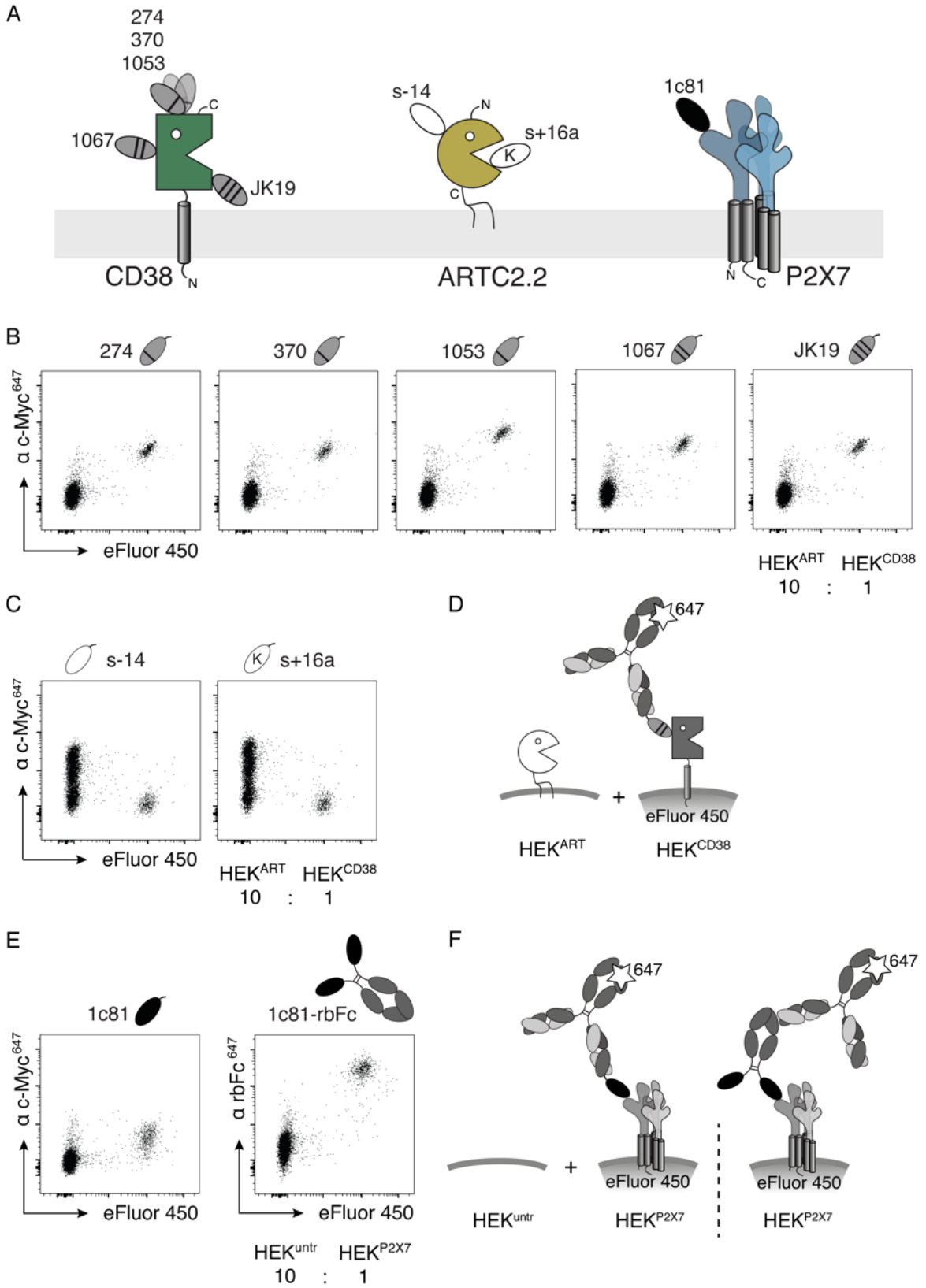

Abb. 3.2: Schematische Darstellung und durchflusszytometrische Analyse der in dieser Arbeit verwendeten Membranprotein-spezifischen Nanobodies.
(A) CD38 (grün) ist ein Typ-II Membranprotein. Die fünf verwendeten Nanobodies binden drei nicht-überlappende Epitope: Nbs 274, 370 und 1053 an Epitop 1, Nb 1067 an Epitop 2 und Nb JK19 an Epitop 3 (die Zahl der Querstreifen in den grauen Nb-Symbolen entspricht den Epitopen). Für ARTC2.2 (gelb), das über einen GPI-Anker in der Membran befestigt ist, wurden Nb s-14 (weiß) und der die Aktivität inhibierende Nb s+16a (weiß mit Buchstabe 'K') eingesetzt. Für den P2X7 Ionenkanal (blau) wurde Nb

1c81 (schwarz) verwendet. (B-F) Durchflusszytometrische Analysen der Bindung dieser Nanobodies an Target-exprimierende HEK Zellen. Der Versuchsaufbau ist in (D) und (F) schematisch dargestellt. (B-D) ARTC2.2-transfizierte HEK Zellen (HEK^{ART}) wurden im Verhältnis 10:1 mit CD38-transfizierten, eFluor450 markierten HEK Zellen (HEK^{CD38}) gemischt und mit c-Myc-Tag tragenden CD38-spezifischen Nanobodies (B) bzw. ARTC2.2-spezifischen Nanobodies (C) inkubiert. Gebundene Nanobodies wurden mit AF647-konjugiertem c-Myc-spezifischen mAk 9E10 detektiert. Die Messdaten wurden mit der Software FlowJo ausgewertet und als Dotplots dargestellt. (E) Untransfizierte HEK Zellen (HEK^{untr}) wurden 10:1 mit Fluor450-beladenen P2X7-transfizierten HEK Zellen (HEK^{P2X7}) gemischt. Die Zellen wurden entweder mit monomerem c-Myc-Tag tragendem Nb 1c81 oder mit bivalentem 1c81-rbFc Schwere-Ketten-Antikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Detektion gebundener Antikörper mit AF647-konjugiertem c-Myc-spezifischem mAk 9E10 bzw. mit Kaninchen-IgG-spezifischen polyklonalen Sekundär-Antikörpern.

Die Bindung der o.g. Nanobodies an ihr jeweiliges Membranprotein wurde durchflusszytometrisch mit stabil transfizierten HEK293 Zellen (HEK^{P2X7}, HEK^{CD38}, HEK^{ART}) überprüft (Abb. 3.2 B-E). HEK^{ART} und HEK^{CD38} wurden in einem Verhältnis von 1:10 gemischt, nachdem HEK^{CD38} Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff eFluor450 markiert worden waren. Anschließend wurden die Zellen mit c-Myc-Tag tragenden Nanobodies inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden gebundene Nanobodies mit dem c-Myc-spezifischen AF647-konjugierten mAk 9E10 detektiert (Abb. 3.2 D). Die Ergebnisse zeigen wie zu erwarten die spezifische Färbung der eFluor450-beladenen HEK^{CD38} Zellen durch die CD38-spezifischen Nanobodies, und der HEK^{ART} Zellen durch die beiden ART-spezifischen Nanobodies (Abb. 3.2 B, C). Für die Evaluierung des P2X7-spezifischen Nb 1c81 wurden eFluor450 beladene HEK^{P2X7} mit untransfizierten HEK293 Zellen (HEK^{untr}) gemischt (Abb. 3.2 F). Die Zellen wurden anschließend mit 1c81 in monomerem oder bivalentem Format inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen erfolgte die Detektion von gebundenem 1c81 mit AF647-konjugiertem mAk 9E10 bzw. Kaninchen-IgG spezifischen Sekundärantikörpern. Die Ergebnisse zeigen wieder eine spezifische Anfärbung der HEK^{P2X7} Zellen (Abb. 3.2 E). Die stärkeren Signale mit 1c81 in bivalentem Format deuten auf eine höhere Avidität dieses Konstrukts.

Abb. 3.3 zeigt ein *Alignment* der Aminosäuresequenzen der verwendeten Nanobodies und der schweren variablen Domäne (VH) des mAks A20. Alle Sequenzen beinhalten das kanonische Cysteinpaar (gelb hervorgehoben). Alle Nanobodies außer 370 weisen eine für VHHs typische lange CDR3 Region mit 14 und 19 Aminosäuren auf (blau). In der FR2 an Position 37, 44, 45 und 47 (Nummerierung nach Kabat und Wu 1991) liegen die für VHHs charakteristischen hydrophilen Aminosäuresubstitutionen (magenta) (Muyldermans *et al.* 1994; Harmsen *et al.* 2000).

```
                                  FR1                 CDR1        FR2          CDR2
Kabat Nummerierung           10         20         30          40         50
A20(VH) -10 AAV2     DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYT-WHWIRQFPGNKQEWMGYIHFSGY-
AE1     -17 AAV1/2   QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTDGMYA--MGWFREAPGKEREFVAVQDLTASN-
1c81    -19 P2X7     EVQLVESGGKLVQAGGSLRLSCSASGRTFSFSTSTMGWFRQAPGKELEFVAAIDWSDFN-
s-14    -14 ARTC2.2  QVQLQQSGGGLVQAGGSLTLSCRVSGTHFPIRP--LAWYRQAPGKERELVASISAGHV--
274     -15 CD38     DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVSFSRYT--MGWYREVPGKERREFVAAVRPSGDS
370     -9  CD38     DVQLQASGGGSVQAGGSLTLSCRYSGGFVFRVSS-MGWYRQAPGNQRELIATITVGGK--
1067    -19 CD38     DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCVGSGRRFDNYA--MAWFRQAPGKERTFVAAISWSSGT-
1053    -15 CD38     DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTGSGRTFRNYP--MAWFRQAPG-KEREFVAGITWVGAS
JK19    -15 CD38     QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFVSFG--MGWFRQAPGKEREFVAAINWRGST-

                            FR3                          CDR3                FR4
            60         70         80            90
A20(VH)  TNYNPSLKSRVSITRDTSKNQFFLHLNSVTTEDTATYYCARGDYGYEWFTY---------WGQGTLVTVLE
AE1      TYYSSAVKGRFTISRDNAKNTAYLQMNRLKSEDTAVYYCAAGPTLMSSYGNSARDYDY--WGQGTRVTVSS
1c81     TYYADSVKGRFTISRHNPRNSVYLQLNSLKPEDTAVYYCAAHSETRGGTRYFDRPSLYNYWGQGTQVTVSS
s-14     TNYNVAVEGRFIISRDNYKDTVYLKMNNVKPEDTAVYLCNLGPATMSTDFRPTDF-----WGQGTQVTVSS
274      TYYGNSVKGRFSISRDDDKNIVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGFPVLVALSIADPDY----WGQGTQVTVST
370      TNYKDSVQGRFIISRND--TTVTLQMNRLQPEDTAVYYCNLASTAVGADT----------WGQGTRVTVSS
1067     TRYLDTVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARYQPRYYDSGDMDGYEYEFWGQGTQVTVSS
1053     TLYADFAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYSCAAGRGIVAGRIPAEYAD----WGQGTQVTVSS
JK19     TAYADSVKGRFTISRDVTKNTIYLQMNSLKPEDTAIYYCAEGRTASASTMIREYDS----WGQGTQVTVSS
```

Abb. 3.3: Vergleich der Aminosäuresequenzen der verwendeten Nanobodies.
Das Alignment der Aminosäuresequenzen der VH A20 mit den in dieser Arbeit verwendeten VHHs zeigt die Namen, die Länge der CDR3 und die Targetspezifität der Antikörper. In der Sequenz der VH A20 sind Aminosäuren der vier *framework* Regionen grau hinterlegt, die sich von VHHs unterscheiden. Die für VHHs typischen hydrophilen AS in der FR2 sind in magenta hervorgehoben. Die variablen Antigen-bindenden CDRs sind in rot (CDR1), grün (CDR2) und blau (CDR3) dargestellt.

3.2 Die Insertion von Nanobodies in das Capsidprotein VP1

3.2.1 Generierung von Rezeptor-spezifischen AAVs durch die Insertion von Nanobodies in eine Oberflächenschlaufe von VP1

Die AG Suh (Rice University, Houston) publizierte die erfolgreiche genetische Insertion des fluoreszierenden Proteins mCherry in das AAV2 Capsids in der prominenten Oberflächenschlaufe an der Position 453-459 (GTTTQSR) (Judd *et al.* 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden an dieser Stelle Nanobodies insertiert (Abb. 3.4). Die Insertionsstelle liegt an der dreifachen Symmetrieachse des Capsids nahe der zwei Arginine, die das Bindungsmotiv an den natürlichen AAV2 Rezeptor HSPG bilden. Mittels PCR-Amplifikation wurde der Nanobody jeweils N-terminal mit einem 25 AS langen GS-Linker, $(GGGGS)_5$, und C-terminal mit einem kurzen fünf GA-Linker, $(GGGGA)_1$, versehen, so dass die N-terminal liegende Antigen-bindende Seite des Nanobodies aus dem Capsid herausragen kann (Abb. 3.4 A, B). Während der PCR-Amplifikation wurde das VHH-kodierende Insert außerdem mit den Erkennungssequenzen für die Endonukleasen *NgoMIV* und *KasI* flankiert.

Für die Herstellung von AAV2, in denen der Nanobody in VP1, nicht aber in VP2 oder VP3 insertiert ist, werden zwei Plasmide benötigt. Das Plasmid *pRC_RR_VP1-Nb* kodiert für das VP1-Nb Fusionsprotein und enthält eine Mutation der *major splice site*, wodurch die Herstellung der für VP2 und VP3 kodierenden mRNAs verhindert wird. Das Plasmid *pRC_RR_VP2-3* enthält eine Mutation des Startcodons von VP1 und kodiert somit nur für VP2 und VP3. Diese Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. Junghae Suh für die Insertion von Nanobodies zur Verfügung gestellt. In beiden Plasmiden wurden mittels PCR-Mutagenese die zwei Arginine an Position 585 und 588 durch Alanine ersetzt, um die Bindung an HSPG zu inhibieren (Boucas *et al.* 2009; Münch *et al.* 2013). Der Austausch des mCherry-kodierenden Inserts durch VHH-kodierende Inserts erfolgte mittels Restriktionsverdau von Vektor und PCR-Amplikon mit den Endonukleasen *NgoMIV* und *KasI* und anschließender Ligation der Fragmente. Mittels DNA-Sequenzierung wurde die erfolgreiche Klonierung von einem P2X7-spezifischen Nb (1c81), einem ARTC2.2-spezifischen Nb (s-14) und vier CD38-spezifischen Nanobodies (370, 1053, 1067, JK19) bestätigt.

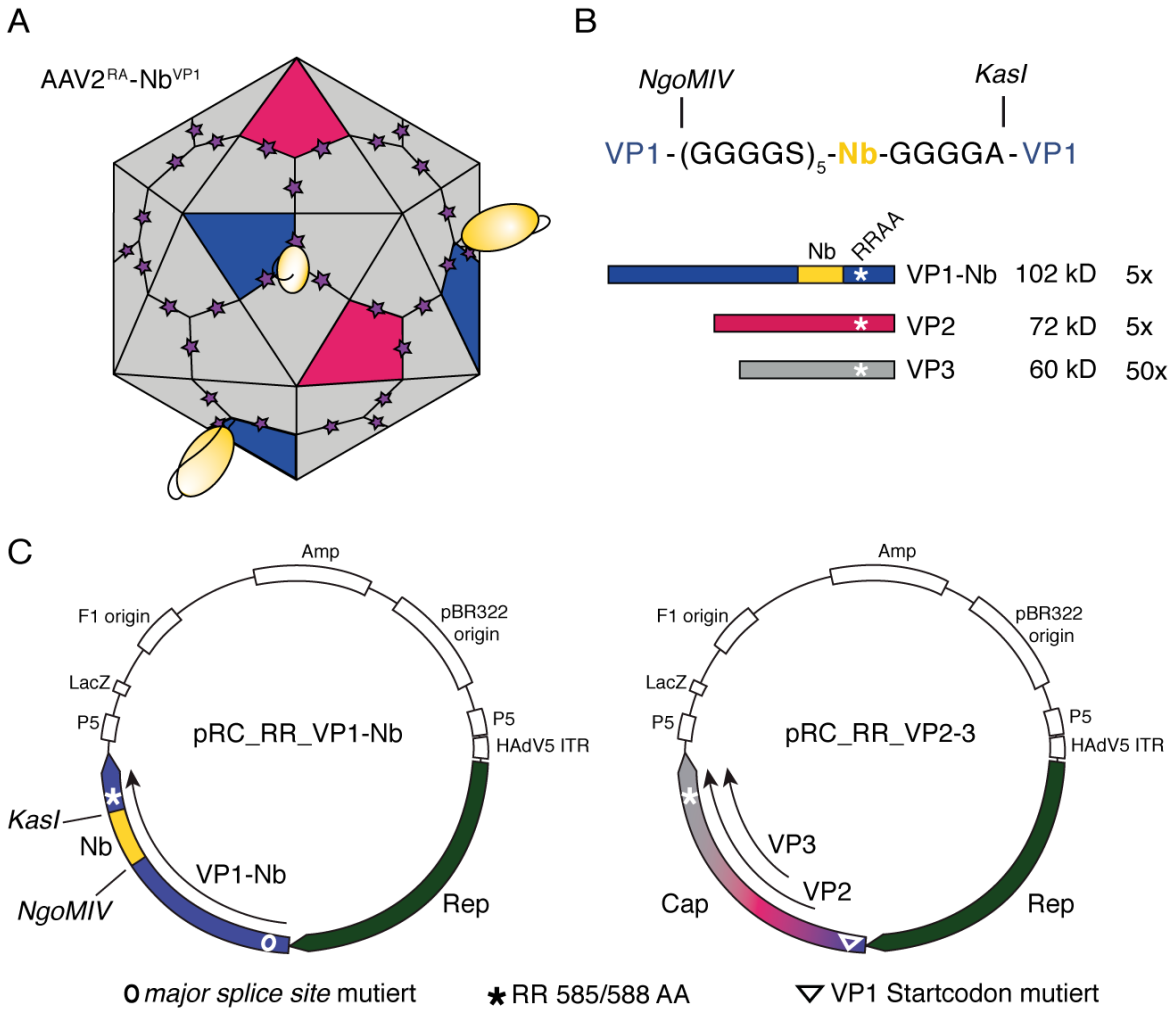

Abb. 3.4: Schematische Darstellung der genetischen Insertion von Nanobodies in eine prominente Oberflächenschlaufe des VP1 Capsidproteins von AAV2RA.
(A) Der genetisch in das virale Capsidprotein VP1 (blau) insertierte Nanobody (gelb) liegt an der dreifachen Symmetrieachse nahe der mutierten Bindestellen für HSPG (Sterne). (B) Der Nanobody wird von zwei Linker-Peptiden flankiert: Am N-Terminus von einem langen 25-GS-Linker und am C-Terminus von einem kurzen 5-GA-Linker, so dass der Nb mit der N-terminal liegenden Antigenbindestelle vorweg aus dem Capsid herausragen kann. (C) Für die Herstellung der Nb-tragenden Viren (AAV2RA-NbVP1) werden zwei Plasmide benötigt: *pRC_RR_VP1-Nb* kodiert für das VP1-Nb Fusionsprotein und enthält eine Mutation der *major splice site* (O), welche die Generierung der VP2 und VP3 kodierenden mRNA verhindert. *pRC_RR_VP2-3* enthält eine Mutation des VP1 Startcodons (∇), so dass die Translation von VP1 verhindert wird und über dieses Plasmid nur die Capsidproteine VP2 und VP3 zur Verfügung gestellt werden können. Diese Plasmide wurden von Junghae Suh, Rice University Houston, für die Insertion von Nanobodies zur Verfügung gestellt. In beiden Plasmiden wurden mittels Mutagenese-PCR die zwei AS Arginin an Position 585 und 588 zu Alanin mutiert (*).

3.2.2 VP1-Nanobody Fusionsproteine werden in AAV2RA Capside eingebaut

Die Herstellung von AAVs mit in VP1 insertierten Nbs erfolgte in HEK293 Zellen. Dazu wurden die Zellen mit den beiden Capsid-kodierenden Plasmiden, dem Helferplasmid *pXX6* sowie dem GFP-Reporter kodierenden Plasmid ko-transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden Kulturüberstände und Zelllysate geerntet. Die viralen Titer

in Lysaten und Kulturüberständen wurden im Vergleich zu einer Standardreihe bestimmt. Für AAVs mit in VP1 insertierten Nanobodies wurden Titer von 0,1-1*10^{10} vg pro Lysat und Überstand einer 15 cm Zellkulturschale erreicht. Die Titer für AAVs mit unmodifiziertem VP1 (AAV2) lagen mit 1-4*10^{10} vg pro Zellkulturschale etwas höher.

Expression und Inkorporation der VP1-Nb Fusionsproteine in virale Capside wurde nach Immunpräzipitation der viralen Partikel mittels Western Blot Analysen untersucht. Dazu wurden Immunkomplexe aus AAV Partikeln und AAV-spezifischem AE1-rbFc oder scFvA20-rbFc mit Protein G Sepharose Kügelchen aus Zelllysaten und Kulturüberständen präzipitiert. Gebundene Proteine wurden durch SDS eluiert, mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Freie Bindestellen der Membran wurden mit 5 % Milchproteinen in TBST über Nacht blockiert. Die Detektion der Capsidproteine erfolgte mit dem B1 mAk und Maus-IgG-spezifischen HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Zugabe des Substrates der Meerrettich-Peroxidase initiierte die Chemolumineszenzreaktion, welche auf Röntgenfilm detektiert wurde (Abb. 3.5).

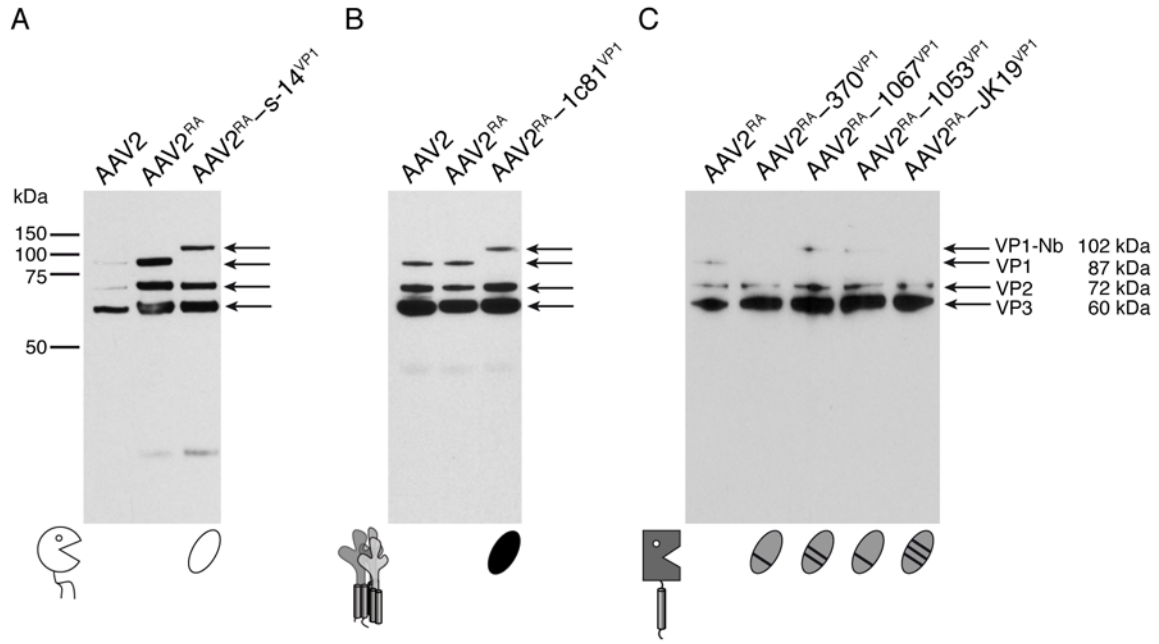

Abb. 3.5: VP1-Nb Fusionsproteine werden exprimiert und in virale Capside eingebaut.
Adeno-assoziierte Viren wurden mittels Transfektion in HEK293 Zellen hergestellt. Nach drei Tagen wurden AAVs im Kulturüberstand mit PEG-8000 präzipitiert und das Pellet in 1 ml PBS-MK resuspendiert. Die Zellen wurden zentrifugiert, ebenfalls in 1 ml PBS-MK aufgenommen und in drei Zyklen Einfrieren/Auftauen lysiert. AAVs (1*10^{9} vg/Ansatz) in Zelllysat (A) oder Überstand (B, C) wurden mit AAV-spezifischem scFvA20-rbFc (A) oder AE1-rbFc (B, C) gebunden an Protein G Sepharose immunpräzipitiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen (Western Blot). Die Capsidproteine wurden mit dem

monoklonalen murinen Antikörper B1 und sekundärem Maus-IgG spezifischem HRP-konjugiertem Antikörper detektiert. Die Chemolumineszenzreaktion wurde auf Röntgenfilm sichtbar.

Zum Vergleich wurden Immunpräzipitate von AAV2 und AAV2^{RA} aufgetragen. Die Ergebnisse zeigen bei allen AAV-Präzipitaten eine prominente Bande bei ~60 kDa, die dem Hauptcapsidprotein VP3 (~50 Kopien/Capsid) entspricht, sowie eine weitere dem Capsidprotein VP2 entsprechende Bande bei ~70 kDa (~5 Kopien/Capsid). AAV2 und AAV2^{RA} Immunpräzipitate enthalten eine weitere dem Capsidprotein VP1 entsprechende Bande bei ~85 kD. Diese Bande fehlt bei Viren mit in VP1-insertierten Nanobodies. Stattdessen ist hier jeweils eine höher gelegene Bande bei ~100 kD zu erkennen, die dem berechneten Molekulargewicht des Fusionsproteins entspricht. Diese Bande ist in den Viren, die ARTC2.2- und P2X7-spezifische Nanobodies enthalten (AAV2^{RA}-s-14^{VP1} und AAV2^{RA}-1c81^{VP1}) jeweils deutlicher zu erkennen (Abb. 3.5 A, B) als in Viren mit CD38-spezifischen Nanobodies (Abb. 3.5 C).

3.2.3 AAVs mit in VP1 insertierten Nanobodies binden an Zellen, die das Nanobody-spezifische Membranprotein exprimieren

Im nächsten Schritt wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, ob die generierten AAV2^{RA} mit in VP1 integrierten Nanobodies spezifisch an Zellen binden, die das Target-Membranprotein auf der Oberfläche exprimieren. Dazu wurden untransfizierte HEK Zellen im Überschuss mit Fluor450-beladenen HEK^{mP2X7} bzw. HEK^{CD38} Zellen gemischt und für 30 Minuten bei 4 °C mit AAVs inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen erfolgte die Detektion zellgebundener Virionen mit AF647-konjugiertem scFvA20-rbFc (Abb. 3.6). Die Ergebnisse zeigen eine spezifische Färbung von HEK^{mP2X7} Zellen nach Inkubation mit AAV2^{RA}-1c81^{VP1} (Abb. 3.6 A) und von HEK^{CD38} Zellen nach Inkubation mit vier verschiedenen AAV2^{RA}-αCD38^{VP1} (Abb. 3.6 B). Kontroll-Inkubationen der Zellen mit unmodifizierten AAV2^{RA} und AAV2 führten zu keiner bzw. zu einer schwachen Färbung untransfizierter und transfizierter HEK Zellen (Abb. 3.6 A, B). Die stärkere Fluoreszenzintensität von HEK^{CD38} Zellen nach Inkubation mit AAV2^{RA}-1053^{VP1} oder AAV2^{RA}-1067^{VP1} als mit AAV2^{RA}-370^{VP1} oder AAV2^{RA}-JK19^{VP1} (Abb. 3.6 B) könnte auf eine effizientere Inkorporation von Nb 1053 und Nb 1067 in die Viruscapside deuten (vergleiche auch die Intensitäten der entsprechenden VP1-Nb Banden im Western Blot in Abb. 3.5 C).

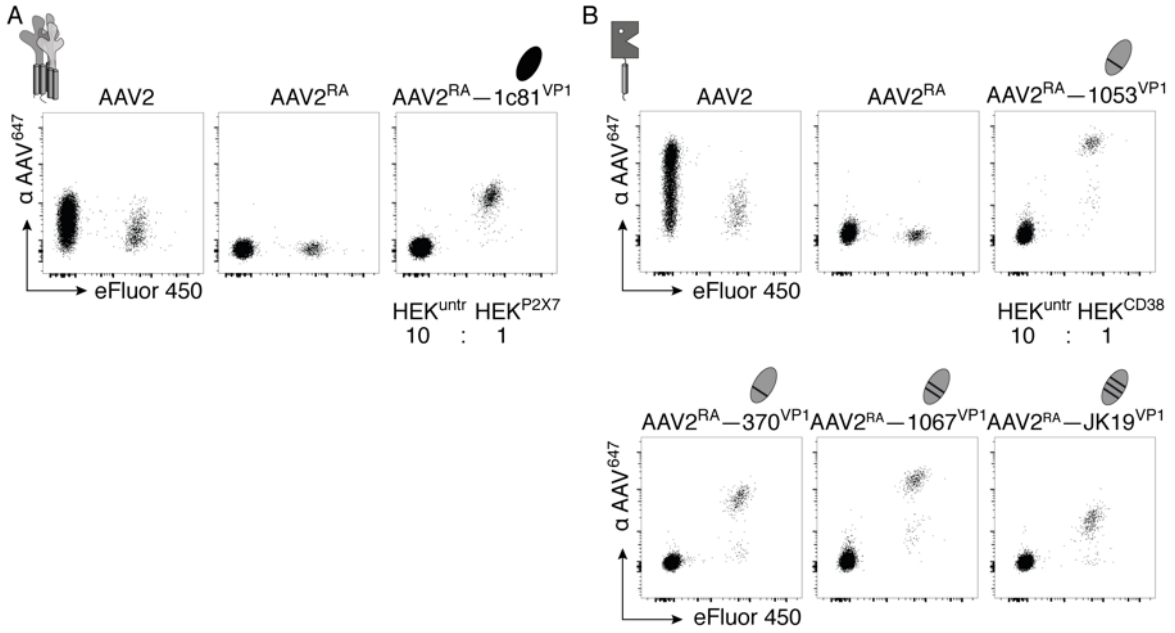

Abb. 3.6: AAVs mit in VP1 insertierten P2X7- oder CD38-spezifischen Nbs binden ausschließlich an Zellen, die das jeweilige Membranprotein auf der Oberfläche exprimieren.
(A) Eine 10:1 Mischung untransfizierter HEK Zellen und Fluor450-beladener HEK^{P2X7} Zellen wurde für 30 Minuten bei 4 °C mit AAV2, $AAV2^{RA}$ oder $AAV2^{RA}$-$1c81^{VP1}$ inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurden zellgebundene Virionen mit AF647-konjugierten scFvA20-rbFc mittels Durchflusszytometrie detektiert. (B) Die Bindung von AAVs mit insertierten CD38-spezifischen Nanobodies (1053, 370, 1067, JK19) an HEK^{CD38} Zellen wurde wie in (A) mittels Durchflusszytometrie an einer Mischung untransfizierter HEK Zellen und eFluor450-markierten HEK^{CD38} Zellen analysiert.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die in VP1 insertierten Nanobodies eine spezifische Bindung der $AAV2^{RA}$s an Zellen vermitteln, die das entsprechende Target Membranprotein auf der Oberfläche exprimieren. Zur Vereinfachung werden im Folgenden $AAV2^{RA}$-$1c81^{VP1}$ auch als P2X7-spezifische $AAV2^{RA}$s, $AAV2^{RA}$-s-14^{VP1} als ARTC2.2-spezifische $AAV2^{RA}$s, und $AAV2^{RA}$s, in denen einer der CD38-spezifischen Nanobodies (274, 370, 1053 oder JK19) in VP1 insertiert ist, als CD38-spezifische $AAV2^{RA}$s bezeichnet.

3.2.4 P2X7-spezifische AAV2^{RA}s transduzieren bevorzugt P2X7-exprimierende Zielzellen

Als nächstes wurde untersucht, ob P2X7-spezifische AAV2^{RA}s die Transduktion P2X7-transfizierter Zielzellen mit einem AAV-kodierten Reportergen verstärken. Als Maß für diesen Prozess wurde die Fluoreszenzintensität des Reporter GFPs zwei Tage nach Inkubation von HEK Zellen mit AAV2^{RA}s durchflusszytometrisch quantifiziert.

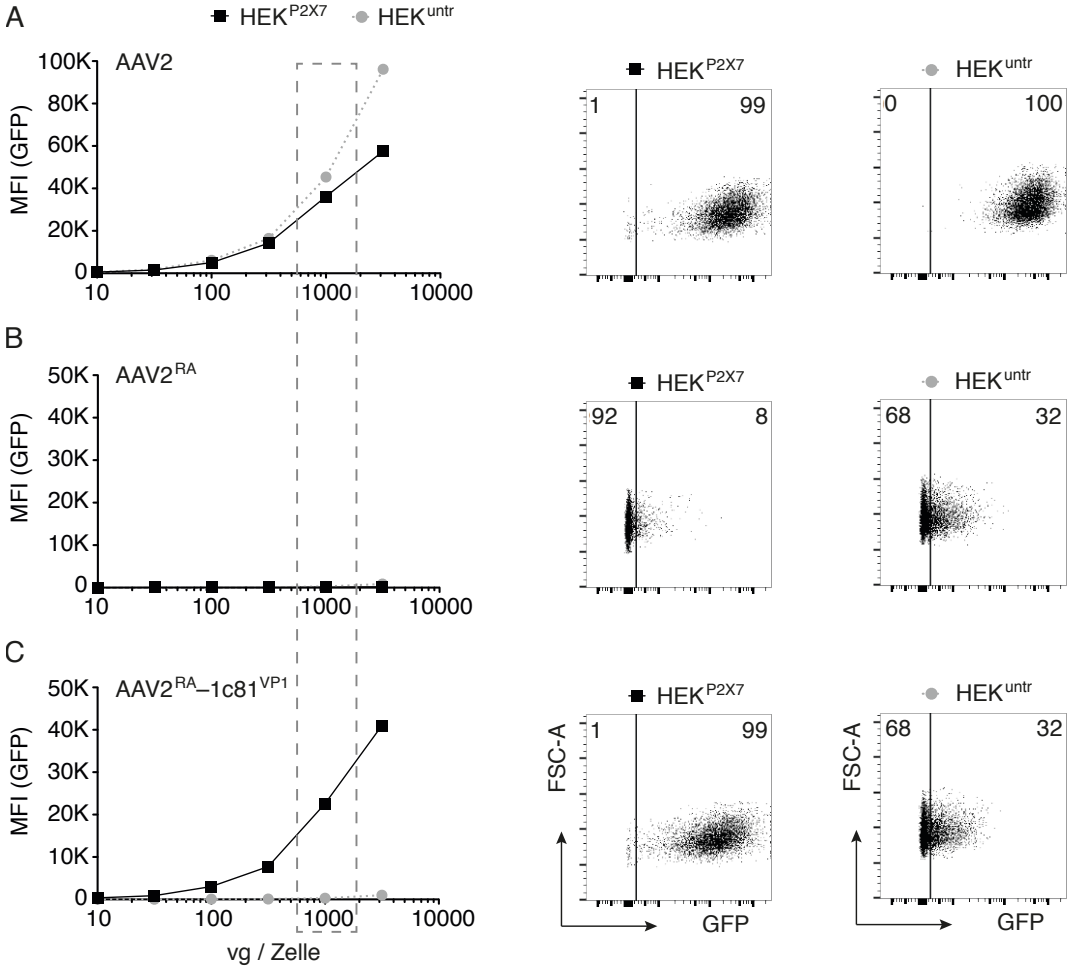

Abb. 3.7: AAV2^{RA}s mit in VP1 insertiertem P2X7-spezifischem Nanobody verstärken spezifisch die Transduktion P2X7-exprimierender HEK Zellen.
HEK^{P2X7} oder untransfizierte HEK Zellen (HEK^{untr}) wurden in 24-well Zellkulturplatten ausgesät (1*10^5 Zellen/Napf). Am nächsten Tag wurden GFP-kodierende titrierte AAV2 (A), AAV2^{RA} (B) oder AAV2^{RA}-1c81^{VP1} (C) zu den Zellen pipettiert (10-3160 vg/Zelle). Nach 48 Stunden wurde die GFP Expression als Maß für die Transduktionseffizienz der Viren durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von GFP gegenüber der Anzahl viraler Genome pro Zelle und daneben ein repräsentativer Dotplot beider Zelllinien (bei 1000 vg/ Zelle). Die Zahlen geben GFP-negative und -positive Zellen in Prozent an. Die grau gestrichelten Kästen heben die als Dotplots dargestellte Datenpunkte hervor. vg = virale Genome. FSC-A = *forward scatter – area*.

Dazu wurden 1*10^5 HEK^{P2X7} oder untransfizierte HEK Zellen (HEK^{unt}) in den Vertiefungen einer 24-Well Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden den

Kulturen seriell verdünnte AAV-enthaltene Zellkulturüberstände zugefügt und die Zellen weiter inkubiert. Nach zwei Tagen erfolgte die Quantifizierung der Expression des Reportergens GFP im Durchflusszytometer. Mit Hilfe der Flow Jo Software wurde die mittlere GFP-Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen bestimmt und gegen die Anzahl viraler Genome pro Zelle aufgetragen (Abb. 3.7). Die Ergebnisse zeigen für AAV2 eine deutliche von der Konzentration der zugegebenen Viren abhängige GFP Expression durch untransfizierte sowie - etwas schwächer - auch durch P2X7-transfizierten Zellen (Abb. 3.7 A). Nach Inkubation mit $AAV2^{RA}$ hingegen ist selbst nach Inkubation mit sehr hohen Virus Titern keine oder allenfalls nur eine sehr schwache GFP Expression zu detektieren (Abb. 3.7 B). Dies weist darauf hin, dass die Mutation der beiden Arginine erwartungsgemäß die Nutzung von HSPG als AAV Rezeptor in HEK293 Zellen verhindert. Nach Inkubation der Zellen mit $AAV2^{RA}$-$1c81^{VP1}$ zeigt sich eine deutliche, von der Konzentration der zugegebenen Viren abhängige GFP Expression bei P2X7-exprimierenden Zellen aber nicht bei HEK^{untr} Zellen (Abb. 3.7 C). Daraus lässt sich schließen, dass die Nanobody-vermittelte Bindung von $AAV2^{RA}$-$1c81^{VP1}$ an P2X7 den Eintritt der Virionen in die Zelle ermöglicht und dass $AAV2^{RA}$-$1c81^{VP1}$ in der Tat die Transduktion P2X7-exprimierender Zellen verstärken kann.

3.2.5 CD38- und ARTC2.2-spezifische AAV^{RA}s transduzieren bevorzugt CD38- bzw. ARTC2.2-exprimierende Zielzellen

Im Folgenden wurde untersucht, ob auch CD38- und ARTC2.2-spezifische AAV^{RA}s die Transduktion Target-exprimierender Zellen mit dem GFP-Reporter verstärken. Dabei wurde ferner ermittelt, ob Rezeptor-spezifische AAVs auch in gemischten Kulturen bevorzugt Zellen transduzieren, die den passenden Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren. Dazu wurden je $5*10^4$ HEK^{CD38} und HEK^{ARTC2} Zellen zusammen in den Vertiefungen einer 96-Well Zellkulturplatte ausgesät. Nach zwei Stunden wurden den Zellen AAV-enthaltene Kulturüberstände (500 vg/Zelle) zugefügt und die Zellen weiter inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die Transduktionseffizienz wieder anhand der GFP Expression durchflusszytometrisch ermittelt (Abb. 3.8). Um HEK^{CD38} von HEK^{ART} Zellen in den gemischten Zellpopulationen unterscheiden zu können, wurden

die Zellen vor der Messung für 20 Minuten bei 4 °C mit einem AF647-konjugierten CD38-spezifischen Antikörper inkubiert und anschließend zweimal gewaschen.

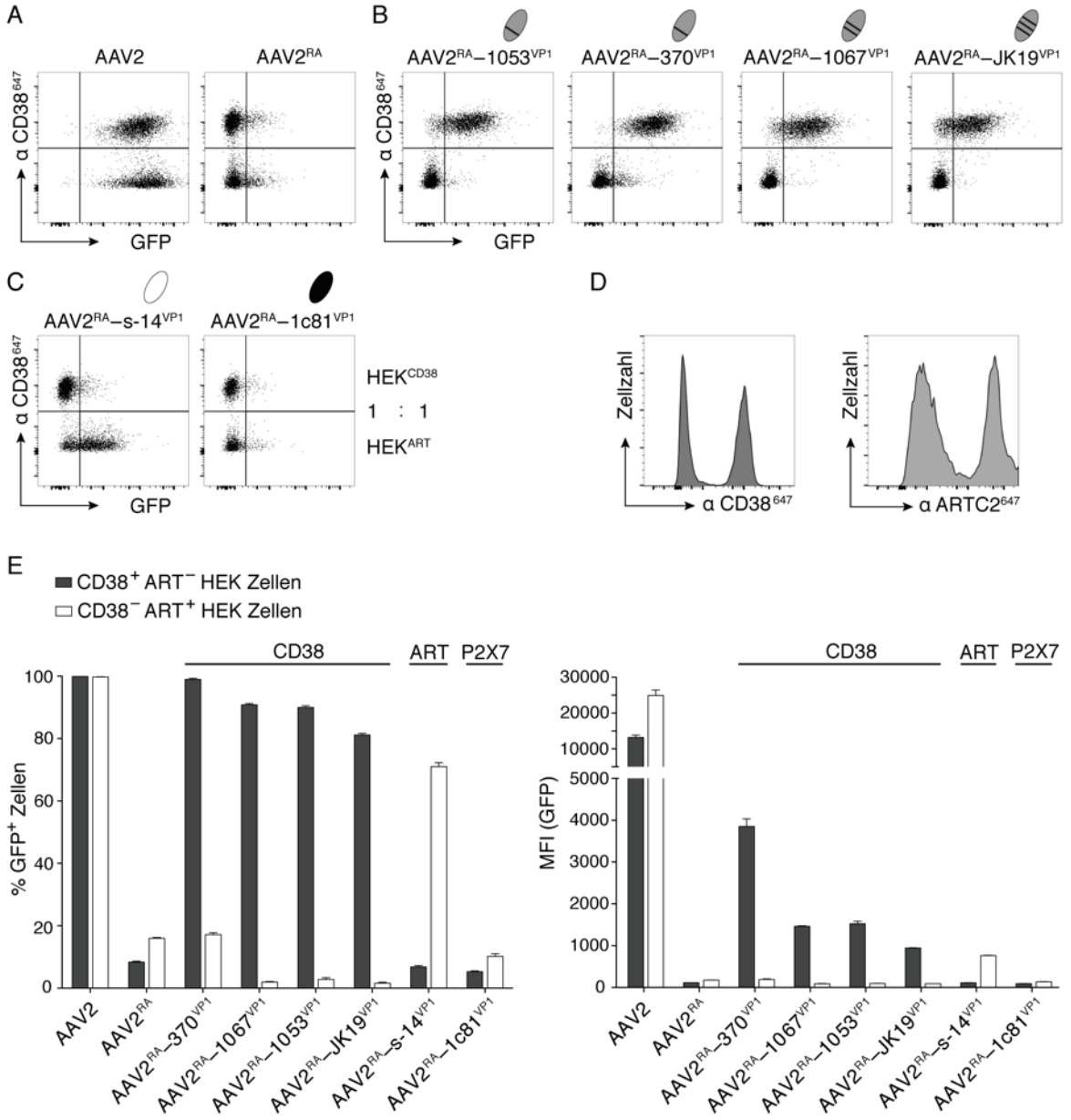

Abb. 3.8: In gemischten Kulturen transduzieren CD38- und ARTC2.2-spezifische AAV2^{RA}s jeweils die Target-exprimierenden HEK Zellen mit höherer Effizienz.
Je 5*10^4 CD38-transfizierte und 5*10^4 ARTC2.2-transfizierte HEK Zellen wurden gemischt und in den Vertiefungen einer 24-Well Zellkulturplatte ausgesät. Nach 2 Stunden wurden den Kulturen jeweils GFP-kodierende AAV2, AAV2^{RA} (A) oder CD38- bzw. ARTC2.2 oder P2X7-spezifische AAV2^{RA} (B, C) zugefügt (je 500 vg/Zelle). Nach 48 Stunden wurde die GFP Expression durchflusszytometrisch gemessen. Um die beiden Zelltypen zu unterscheiden, wurden die Zellen direkt vor der Analyse für 20 Minuten bei 4 °C mit einem AF647-konjugierten CD38-spezifischen Antikörper inkubiert. (D) Die Zelloberflächenexpression von CD38 und ARTC2.2 wurde durch Inkubation der gemischten Zellen mit einem AF647-konjugierten CD38-spezifischen, bzw. ARTC2.2-spezifischen Antikörper bestätigt. (E) Auswertung des Prozentsatz GFP-positiver Zellen sowie der mittleren GFP Fluoreszenzintensität (MFI) von je drei Replikaten.

Die Ergebnisse zeigen wieder eine starke bzw. minimale GFP Expression nach Inkubation der Zellen mit AAV2 bzw. AAV2^{RA} (Abb. 3.8 A). Bei allen vier CD38-spezifischen AAV2^{RA}s hingegen ist eine starke GFP Fluoreszenzintensität der CD38-transfizierten Zellen zu erkennen, während ARTC2.2-transfizierte Zellen nur eine sehr schwache GFP Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 3.8 B). Umgekehrt führte die Inkubation der Kulturen mit ARTC2.2-spezifischen AAV2^{RA}-14^{VP1} zu einer höheren GFP-Expression von ARTC2.2-transfizierten Zellen als von CD38-transfizierten Zellen (Abb. 3.8 C). Der als Negativkontrolle eingesetzte P2X7-spezifische AAV2^{RA}-1c81^{VP1} hingegen führte, ähnlich wie AAV2^{RA}, nur zu einer minimalen GFP-Expression bei beiden Zellpopulationen.
Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Insertion eines Membranprotein-spezifischen Nanobodies in die exponierte Oberflächenschlaufe von VP1 die Transduktion Target-exprimierender HEK Zellen mit AAV2^{RA} verstärken kann, und zwar für alle drei hier untersuchten strukturell recht unterschiedlichen Membranproteine und für alle sechs hier untersuchten P2X7-, ARTC2.2- und CD38-spezifischen Nanobodies.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der P2X7-spezifische Nb 1c81 auch an den N-Terminus von VP2 fusioniert (s. Anhang 8.3). Die AGs Buchholz und Büning hatten zuvor gezeigt, dass die Insertion eines ca. 13 kDa großen Herceptin-spezifischen Liganden (DARPins) an dieser Position die Transduktion von Herceptin-exprimierenden Tumorzellen mit AAV2^{RA}s verstärken konnte (Münch *et al.* 2013). Obwohl Western-Blot Analysen die erfolgreiche Expression und Inkorporation des 1c81-VP2 Fusionsproteins in AAV2^{RA} Capside bestätigten, zeigten AAV2^{RA}-1c81^{VP2} Virionen weder eine spezifische Bindung noch eine erhöhte Transduktion P2X7-exprimierender HEK Zellen. Deshalb wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

3.3 Bispezifische Nanobody Adapterproteine

3.3.1 Herstellung von bispezifischen Nanobody-basierten Adapterproteinen

Als zweite Strategie für die Optimierung der Zellspezifität von AAVs wurden bispezifische Adapterproteine entwickelt. Diese bestehen N-terminal aus einem Rezeptor-spezifischen Nb, der über einen 25 AS langen GS-Linker mit einem AAV-spezifischen Nb oder scFv verbunden ist. Diese Adapterproteine wurden mittels PCR-Amplifikation und Drei-Wege-Ligation in den *pCSE2.5* Vektor kloniert, so dass der Adapter N-terminal an das Igκ Signalpeptid und C-terminal an den Hexahistidin/c-Myc-Tag fusioniert wurde. Die Produktion der sezernierten Adapterproteine erfolgte in HEK Zellen, die Aufreinigung aus dem Kulturmedium über Ni-NTA Chromatographie. Integrität und Reinheit der Adapter wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung überprüft (Abb. 3.9).

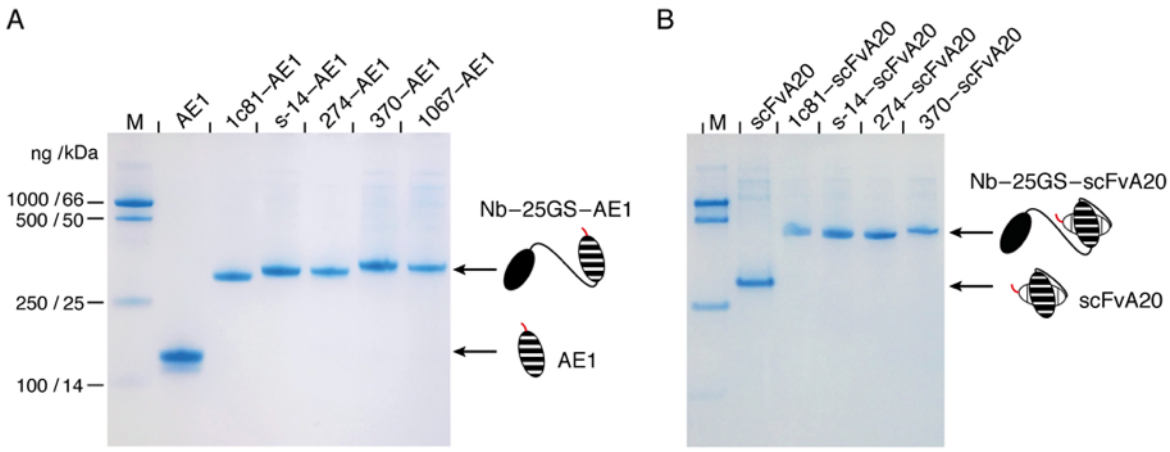

Abb. 3.9: SDS-PAGE Analyse von gereinigten bispezifischen Adapterproteinen.
Die Adapter bestehen jeweils aus einem Membranprotein-spezifischen Nb: αP2X7 (1c81), αARTC2.2 (s-14) oder αCD38 (274, 370, 1067) und dem AAV-spezifischen Nb AE1 oder scFv A20. Die beiden Komponenten sind über einen 25 AS langen GS-Linker verbunden und tragen am C-Terminus einen Hexahistidin/c-Myc-Tag (rot). In HEK293-6E Zellen produzierte Adapter wurden über Ni-NTA Sepharose chromatographisch aufgereinigt und mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung analysiert. Pro Spur wurden ca. 1 µg Protein aufgetragen: (A) Nb AE1-enthaltende Adapter, (B) scFv A20-enthaltende Adapter. M=Molekulargewichtsmarker.

3.3.2 Bispezifische Nanobody-basierte Adapter vermitteln die spezifische Bindung von AAV2^{RA} an Target-exprimierende HEK Zellen

Zunächst wurde untersucht, ob P2X7/AAV- und ARTC2.2/AAV-bispezifische Adapter eine spezifische Bindung von AAV2^{RA} an P2X7- bzw. ARTC2.2-exprimierende Zellen vermitteln können. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abb. 3.10 A und C

dargestellt. HEK^{ART} Zellen wurden in zehnfachem Überschuss mit eFluor450-markierten HEK^{P2X7} Zellen gemischt und mit Adaptern inkubiert (Abb. 3.10 A, B). In einem zweiten Ansatz wurden HEK^{P2X7} Zellen in zehnfachem Überschuss mit eFluor450-markierten HEK^{ART} Zellen gemischt und mit Adaptern inkubiert (Abb. 3.10 C, D). Nicht gebundene Adapter wurden durch Waschen der Zellen entfernt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4 °C mit AAV2^{RA} inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurden gebundene Viruspartikel mit AF647-konjugiertem scFvA20-rbFc im Durchflusszytometer detektiert (Abb. 3.10 B, D).

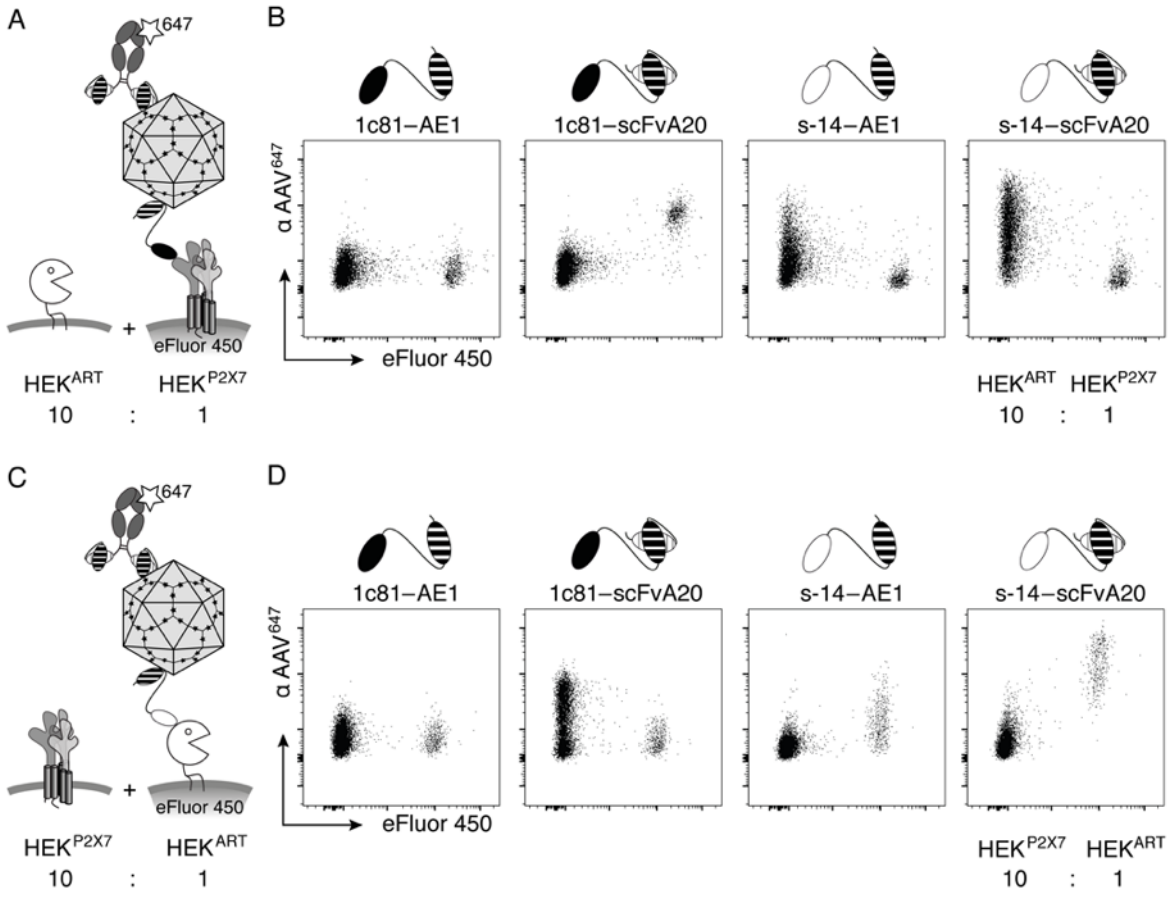

Abb. 3.10: Bispezifische Adapter vermitteln die Bindung von AAV2^{RA} an Target-exprimierende Zielzellen.
(A, C) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: HEK^{ART} Zellen wurden im Verhältnis 10:1 mit Fluor450-beladenen HEK^{P2X7} Zellen gemischt (A, B). In einem zweiten Ansatz wurden HEK^{P2X7} Zellen im Verhältnis 10:1 mit Fluor450-beladenen HEK^{ART} Zellen gemischt (C, D). Die Zellen wurden jeweils mit den oben aufgeführten bispezifischen Adaptern für 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen erfolgte die Zugabe von AAV2^{RA} enthaltendem Zellkulturüberstand für 30 Minuten bei 4 °C. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden gebundene Virionen mit AF647-konjugiertem scFvA20-rbFc mittels Durchflusszytometrie detektiert.

Die Ergebnisse zeigen bei Zellen, die mit scFvA20-enthaltenden Adaptern inkubiert worden waren, jeweils eine deutliche Anfärbung der Target-spezifischen Zellen - bei 1c81-enthaltenden Adaptern der HEK^{P2X7} Zellen und bei s-14-enthaltenden Adaptern der HEK^{ART} Zellen (Abb. 3.10 B, D). Zellen, die mit Nb AE1-enthaltenden Adapterproteinen vorbehandelt worden waren, zeigten keine bzw. nur sehr schwache Signale. Die Ergebnisse zeigen, dass bispezifische Adapter die Bindung von AAV2^{RA} an Target-exprimierende Zielzellen vermitteln, wobei sowohl für P2X7 als auch ARTC2.2, scFvA20-enthaltende Adapter die Bindung offensichtlich stärker erhöhen als AE1-enthaltende Adapter.

In einem weiteren Bindungsassay wurde untersucht, ob die fünf hergestellten CD38/AAV-bispezifischen Adapter die Bindung von AAV2^{RA} an CD38-exprimierende Zellen vermitteln. Die Versuchsdurchführung entspricht der des vorherigen Experiments, nur dass hier HEK^{ART} Zellen in zwanzigfachem Überschuss mit eFluor450-markierten HEK^{CD38} Zellen gemischt wurden (Abb. 3.11 B).

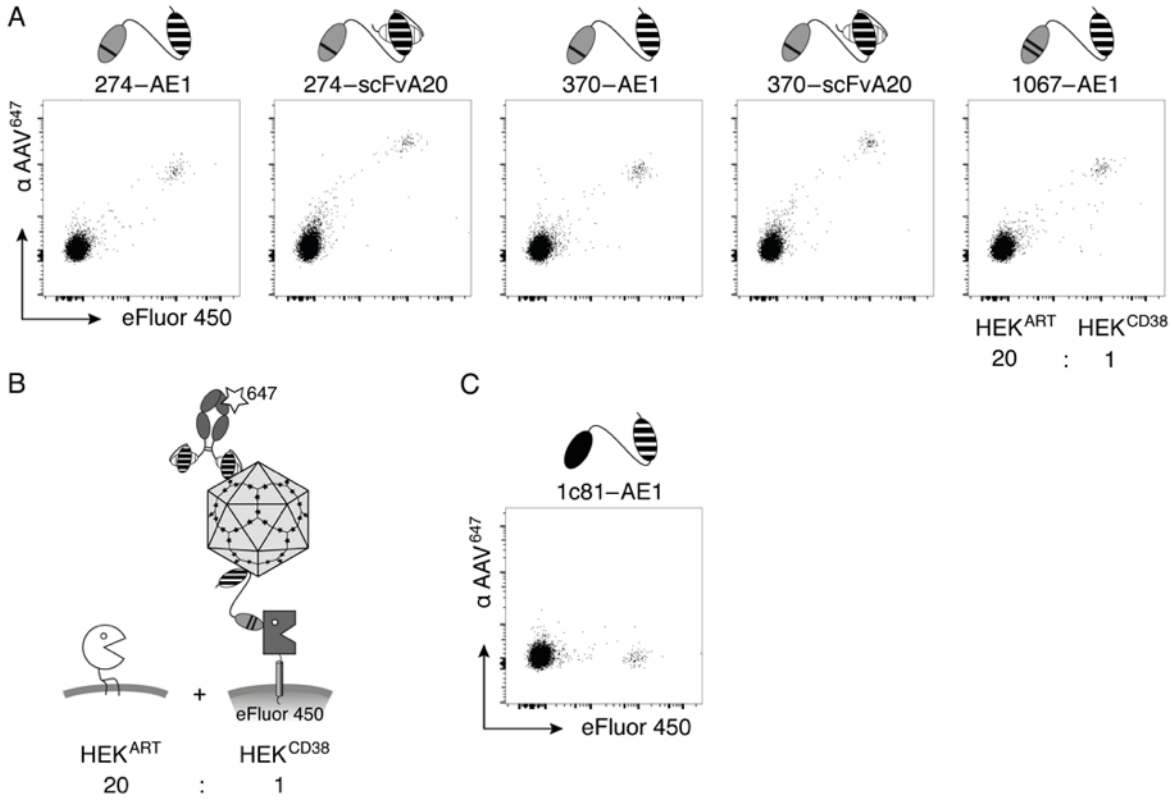

Abb. 3.11: AAV2^{RA} bindet mit Hilfe CD38/AAV-bispezifischer Adapterproteine spezifisch an CD38-exprimierende Zielzellen.
Der Versuchsaufbau ist in (B) dargestellt und erfolgte ähnlich wie in Abb. 3.10: HEK^{ART} Zellen wurden im Verhältnis 20:1 mit eFluor450-markierten HEK^{CD38} Zellen gemischt und mit 1 µg gereinigten CD38/AAV-bispezifischen Adaptern (A) oder P2X7/AAV-bispezifischen Adaptern als Negativkontrolle

(C) inkubiert. Die Detektion gebundener Viruspartikel erfolgte wieder mit AF647-konjugiertem scFvA20-rbFc.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Nb AE1- als auch scFv A20-enthaltende Adapter eine deutliche Bindung von AAV2^{RA} an HEK^{CD38} Zellen, nicht aber an HEK^{ART} Zellen vermitteln (Abb. 3.11 A), wobei scFvA20-enthaltende Adapter jeweils zu einer etwas stärkeren Fluoreszenzintensität führen als AE1-enthaltende Adapter. Als Negativkontrolle eingesetzte P2X7/AAV-bispezifische Adapter (1c81-AE1) (Abb. 3.11 C) führten erwartungsgemäß zu keiner detektierbaren Bindung. Die Ergebnisse zeigen, dass auch CD38/AAV-bispezifischen Adapter eine spezifische Bindung von AAV2^{RA} an Target-exprimierende Zellen vermitteln können.

3.3.3 Bispezifische Nanobody-basierte Adapterproteine erhöhen die Transduktion Target-exprimierender HEK Zellen mit AAV2^{RA}

Mit den im folgenden gezeigten Versuchen wurde ermittelt, ob bispezifische Nanobody-basierte Adapter die Transduktion Target-exprimierender HEK Zellen mit AAV2^{RA} verstärken können. Dies wurde zunächst mit P2X7-spezifischen Adaptern an untransfizierten und P2X7-transfizierten HEK Zellen untersucht (Abb. 3.12), dann mit CD38- bzw. ARTC2.2-spezifischen Adaptern an HEK^{CD38} und HEK^{ART} Zellen (Abb. 3.13-Abb. 3.14).

Im ersten Versuch wurden HEK^{P2X7} oder untransfizierte HEK Zellen in den Vertiefungen einer Zellkulturplatte ausgesät. Am Folgetag wurden GFP-kodierende AAV2^{RA} mit titrierten Adaptern vorinkubiert und dann den Kulturen hinzugefügt. Nach zwei Tagen wurde die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch über die GFP-Fluoreszenzintensität bestimmt (Abb. 3.12). Ohne Adapter oder mit ARTC2.2-spezifischen Kontrolladaptern zeigen beide Zelllinien nur eine sehr niedrige GFP-Expression. Bei Zugabe von P2X7-spezifischen Adaptern zeigen HEK^{P2X7}, nicht aber HEK^{untr} Zellen, konzentrationsabhängig einen deutlichen Anstieg der GFP-Fluoreszenz. Dabei erhöhen AE1-enthaltende Adapter die GFP-Expression deutlich stärker als scFvA20-enthaltende Adapter.

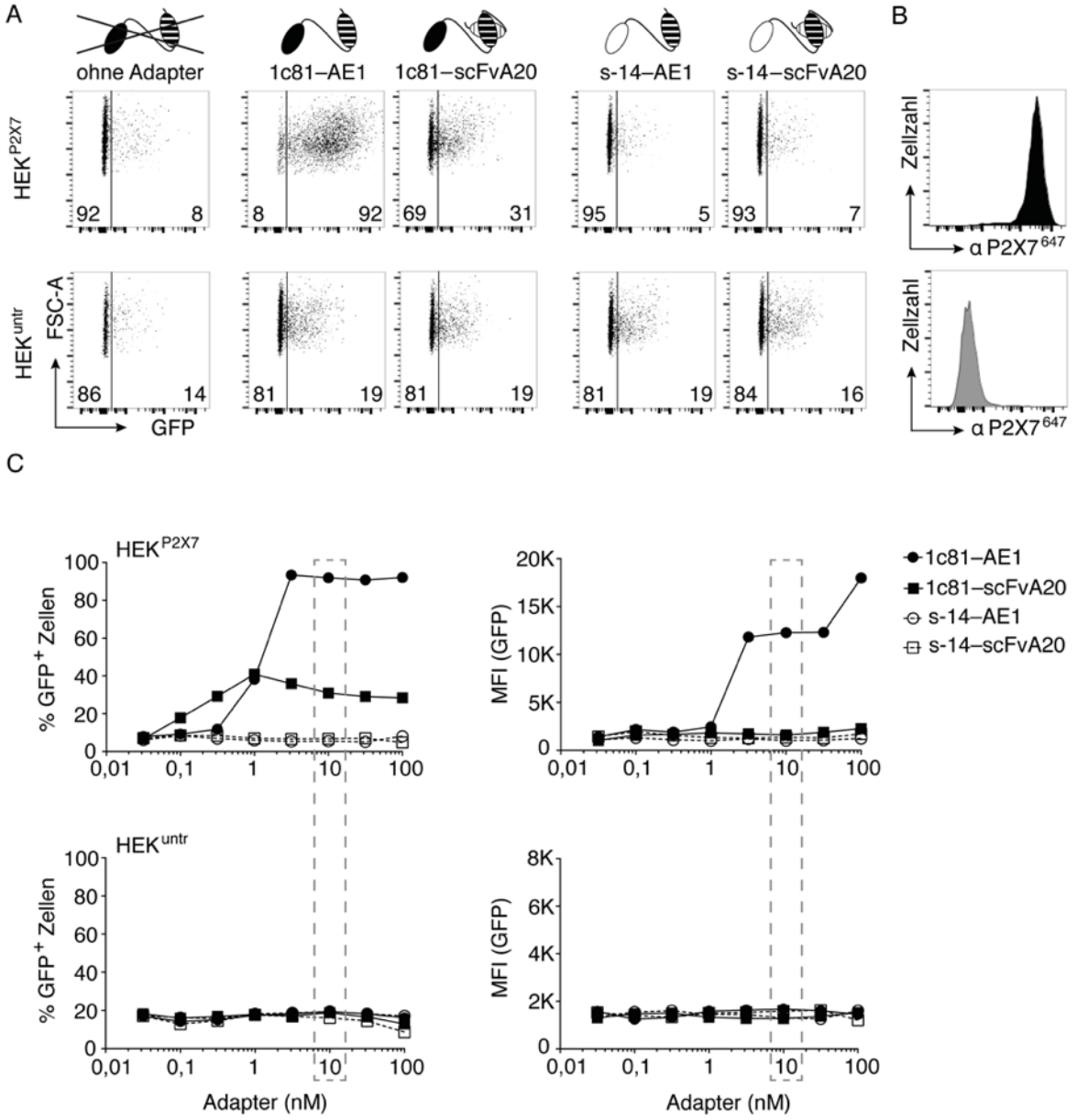

Abb. 3.12: P2X7/AAV-spezifische Adapter erhöhen die Transduktion von P2X7-exprimierenden HEK Zellen mit GFP-kodierenden AAV2^{RA}.
HEK^{P2X7} und HEK^{untr} Zellen wurden in 24-well Zellkulturplatten ausgesät (1*10^5/Napf). Am nächsten Tag wurden GFP-kodierende AAV2^{RA} für 1 h bei 4°C mit titrierten Adaptern (0,03-100 nM) vorinkubiert und dann den Kulturen zugefügt (6*10^7 vg/Napf ~ 300 vg/Zelle). 48 h später wurde die GFP Expression durchflusszytometrisch ermittelt. (A) Dotplots der beiden Zelllinien bei 10 nM Adapterproteinen. Über den Plots sind die eingesetzten Adapter dargestellt. Die Zahlen zeigen den Prozentsatz GFP-negativer, bzw. -positiver Zellen. (B) Die Expression von P2X7 auf der Zelloberfläche wurde mit AF647-konjugiertem mAk Hano44 verifiziert. (C) Grafische Darstellung des Prozentsatzes GFP-positiver Zellen und der mittleren GFP Fluoreszenzintensität (MFI) gegenüber der Konzentration der Adapter. Gestrichelte Kästen verweisen auf die in (A) dargestellten Datenpunkte.

Im nächsten Versuch wurde ermittelt, ob bispezifische Nanobody-basierte Adapter auch in gemischten Kulturen bevorzugt die Transduktion von Zellen mit AAV2^{RA} verstärken, die den entsprechenden Rezeptor (CD38 bzw. ARTC2.2) exprimieren. Dazu wurden HEK^{CD38} und HEK^{ART} Zellen im Verhältnis 1:1 in 24-Well

Zellkulturplatten ausgesät. Nach zwei Stunden erfolgte die Zugabe GFP-kodierender AAV2^{RA} mit je 10 nM Adapterproteinen, nach 48 Stunden wurde die GFP-Expression im Durchflusszytometer bestimmt. Zur Unterscheidung der beiden Zellpopulationen wurden die Zellen vor der Messung mit einem AF647-konjugierten CD38-spezifischen Antikörper gefärbt (Abb. 3.13).

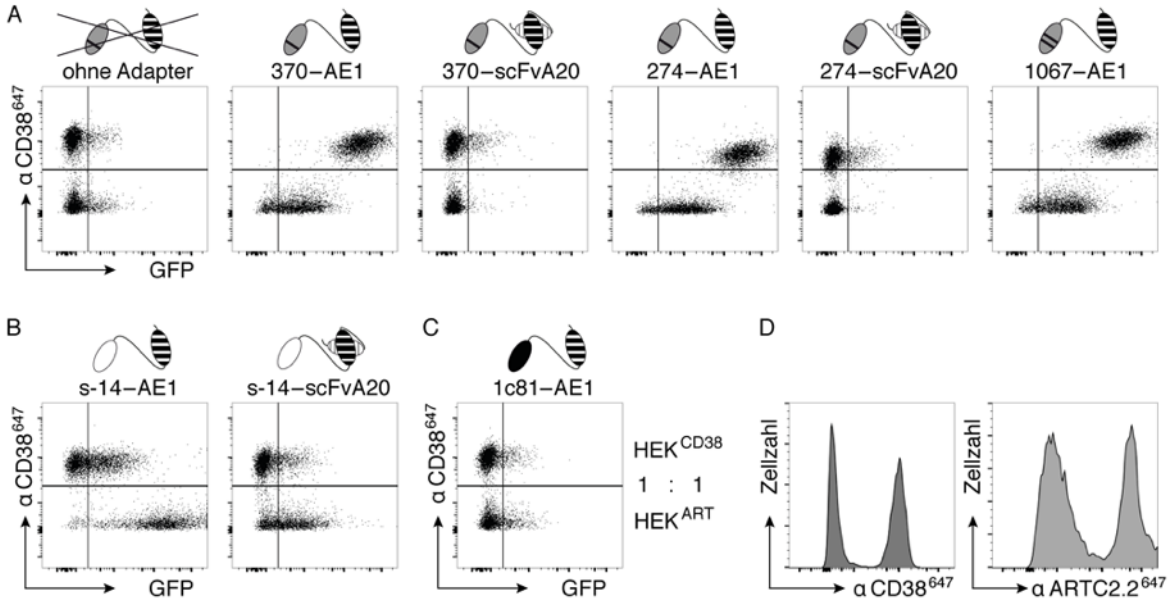

Abb. 3.13: CD38- und ARTC2.2 spezifische Adapter erhöhen in Mischkulturen jeweils verstärkt die Transduktion der Target-exprimierenden HEK Zellen mit AAV2^{RA}.
HEK^{CD38} Zellen wurden 1:1 mit HEK^{ART} Zellen gemischt und in 24-well Zellkulturplatten ausgesät (je 5*10^4 Zellen/Napf). GFP-kodierende AAV2^{RA} wurden mit 10 nM gereinigten bispezifischen Adaptern für 1 h bei 4°C vorinkubiert und dann zu den Zellen pipettiert (5*10^7 vg/Napf ~ 500 vg/Zelle). 48 h nach AAV Zugabe wurde die GFP Expression durchflusszytometrisch ermittelt. Zur Unterscheidung der beiden Zelltypen wurden die Zellen mit CD38-spezifischem AF647-konjugiertem JK36-rbFc inkubiert. Über den Dotplots sind die jeweils eingesetzten Adapter dargestellt: (A) CD38/AAV, (B) ART/AAV, (C) P2X7/AAV. (D) Die Expression von CD38 bzw. ARTC2.2 auf der Zelloberfläche der HEK Zellen wurde mit AF647-konjugiertem JK36-rbFc bzw. s+16-hFc ermittelt.

Ohne Adapter (Abb. 3.13 A) oder mit Kontrolladaptern (in diesem Fall P2X7 spezifische 1c81-AE1 Adapter) (Abb. 3.13 C) zeigten beide Zellpopulationen wieder nur eine basale GFP-Expression. Bei Vorinkubation mit AE1-enthaltenden Adaptern hingegen zeigten die Zielzellen jeweils eine starke GFP Expression: HEK^{CD38} Zellen bei Zugabe der CD38-spezifischen Adapter 370-AE1, 274-AE1 oder 1067-AE1 (Abb. 3.13 A) und HEK^{ART} Zellen nach Zugabe des ARTC2.2-spezifischen Adapters s-14-AE1 (Abb. 3.13 B). ScFv A20-enthaltende Adapter konnten - wie zuvor bei P2X7 exprimierenden Zellen - die GFP-Expression nicht oder nur sehr schwach erhöhen.

Bei den mit AE1-enthaltenden Adaptern behandelten Zellen fällt ferner auf, dass die jeweils Target-negativen Zellen in den Mischkulturen eine leicht erhöhte GFP-Fluoreszenz zeigen (CD38-negative HEK^{ART} Zellen in Abb. 3.13 A, ARTC2.2-negative HEK^{CD38} Zellen in Abb. Abb. 3.13 B). In diesen sehr dichten Mischkulturen könnte dieses Phänomen auf eine Übertragung von GFP, z.B. über exozyototische Vesikel, von HEK^{CD38} auf HEK^{ART} Zellen hinweisen oder aber auf eine Adapter-vermittelte unspezifische Transduktion Target-negativer Zellen. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen wurden im folgenden Versuch HEK^{CD38} und HEK^{ART} Zellen in getrennten Ansätzen mit den effizientesten AE1-enthaltenden CD38- bzw. ARTC2.2-spezifischen Adaptern (270-AE1, s-14-AE1) behandelt (Abb. 3.14).

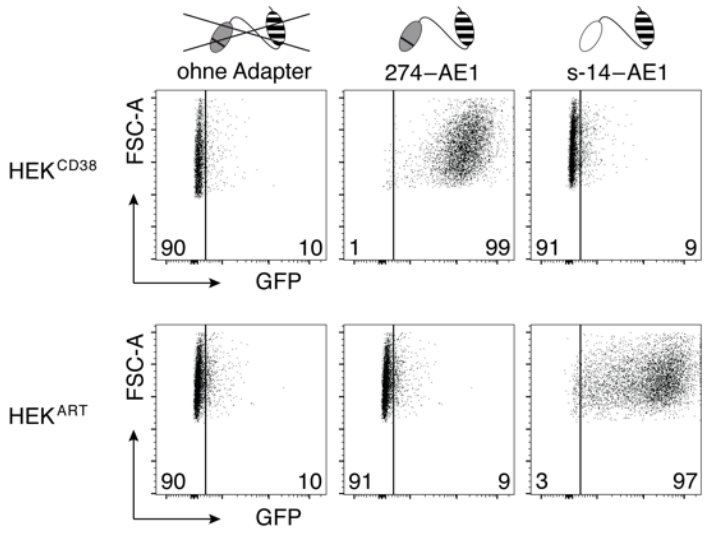

Abb. 3.14: In Einzelkulturen verstärken AE1-enthaltende Adapter ausschließlich die Transduktion Target-exprimierender HEK Zellen.
Es wurden jeweils 1*10^5 HEK^{CD38} oder HEK^{ART} Zellen in einer 24-well Zellkulturplatte ausgesät. AAV2^{RA} wurden für 20 Minuten bei 4°C ohne oder mit 10 nM Adapterproteinen vorinkubiert und dann den Zellen zugegeben. Nach 48 h wurde die Expression des Transgens GFP durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen für beide Adapter wieder eine sehr starke GFP-Fluoreszenzintensität in den Target-exprimierenden Zellen (HEK^{CD38} für 274-AE1, HEK^{ART} für s-14-AE1), aber keine GFP-Signale in den Target-negativen Zellen. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, dass die Inkubation einer Mischung aus ARTC2.2-transfizierten und CD38-transfizierten HEK Zellen mit AAV2^{RA} und bispezifischen Adaptern in einem gemeinsamen Napf zu einer leichten Erhöhung der Transduktion der jeweils Zielrezeptor-negativen Zellen führte (Abb. 3.13). Eine

vergleichbare Erhöhung der Transduktion Zielrezeptor-negativer Zellen wurde nicht beobachtet, wenn die beiden Zellpopulationen in getrennten Näpfen mit AAV2^{RA} und Adaptern inkubiert wurden (Abb. 3.14).

Zusammengefasst zeigen die in diesem Abschnitt präsentierten Ergebnisse, dass AE1-enthaltende bispezifische Adapter für alle drei Membranproteine (P2X7, ARTC2.2 und CD38) die Transduktionseffizienz Target-exprimierender Zielzellen mit AAV2^{RA} deutlich verbessern. Im folgenden Abschnitt wird in zwei Pilotexperimenten untersucht, ob P2X7-spezifische Adapter auch die Transduktion von P2X7-exprimierenden Zellen mit AAV1 und AAV1-P5 verstärken können.

3.3.4 P2X7-spezifische Adapter erhöhen die Transduktion von P2X7-exprimierenden HEK Zellen mit AAV1

Nb AE1 zeigt neben einer Reaktivität mit AAVs des Serotyp 2 auch eine Bindung an AAVs des Serotyp 1 (vgl. Abb. 3.1 C). Daher wurde im folgenden Experiment untersucht, ob AE1-enthaltende P2X7-spezifische Adapter auch die Transduktion von HEK^{P2X7} Zellen mit AAV1 verstärken können (Abb. 3.15). Dazu wurden P2X7-exprimierende und untransfizierte HEK Zellen in separaten 24-well Zellkulturplatten ausgesät und am folgenden Tag mit P2X7-spezifischen (1c81-AE1) oder - als Negativkontrolle - mit CD38-spezifischen Adaptern (370-AE1) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von titrierten GFP-kodierenden AAV1. Nach zwei Tagen wurde die GFP Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert.

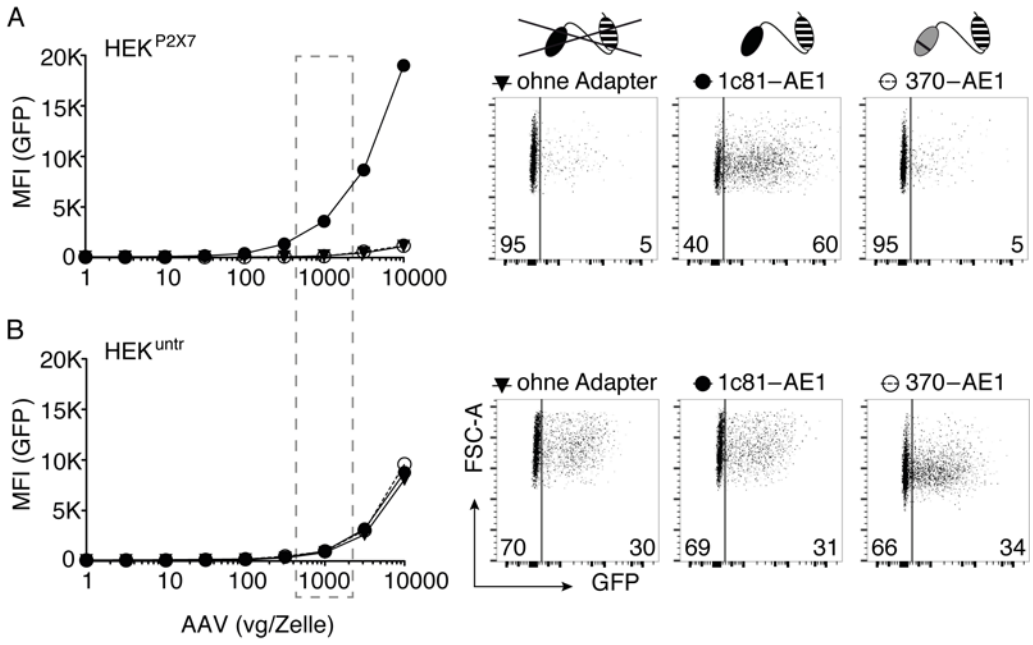

Abb. 3.15: P2X7-spezifische Adapter (1c81-AE1) erhöhen auch die Transduktion P2X7-exprimierender HEK Zellen mit AAV1.
HEK^{P2X7} (A) oder untransfizierte HEK Zellen (B) wurden in 24-well Zellkulturplatten ausgesät (1*10^5 Zellen/Napf). Am folgenden Tag wurden die Zellen vor Zugabe von titrierten AAV1 (1*10^5-1*10^9 vg/Napf ~ 1-10.000 vg/Zelle) mit 50 nM Adaptern vorinkubiert (1 h bei 37 °C). 48 h nach AAV Zugabe wurde die GFP Expression durchflusszytometrisch ermittelt. Die grafische Darstellung stellt die mittlere GFP Fluoreszenzintensität (MFI) in Relation zu der Anzahl zugegebener AAV1. Gefüllte Dreiecke: ohne Zugabe von Adaptern, gefüllte Kreise: mit P2X7-spezifischen Adaptern, offene Kreise: CD38-spezifische Adapter. Die gestrichelten Kästen zeigen die als Dotplots dargestellten Datenpunkte (bei 1000 vg/Zelle). Über den Dotplots sind die eingesetzten bispezifischen Nanobody Adapter schematisch dargestellt. Die Zahlen zeigen den Prozentsatz GFP-negativer bzw. -positiver Zellen.

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Verstärkung der GFP-Fluoreszenzintensität von HEK^{P2X7} Zellen nach Behandlung mit dem P2X7-spezifischen Adapter, aber nicht mit dem CD38-spezifischen Adapter (Abb. 3.15 A). Bei Target-negativen HEK^{untr} Zellen

zeigen weder mit P2X7-spezifischen noch CD38-spezifischen Adaptern eine Verstärkung der GFP-Fluoreszenzintensität (Abb. 3.15 B). Bei sehr hohen Virustitern (>1.000 vg/Zelle) können AAV1 Virionen offensichtlich auch Adapter-unabhängig eine schwache Transduktion von HEK Zellen vermitteln (etwas effizienter bei HEK^{untr} als bei HEK^{P2X7} Zellen).

3.3.5 P2X7-spezifische Adapter erhöhen die Transduktion von P2X7-exprimierenden Makrophagen mit AAV1-P5

Die bisherigen Versuche wurden mit HEK Zellen durchgeführt, die mit Zielrezeptoren transfiziert waren und diese in hoher Kopienzahl auf der Zelloberfläche tragen. Im nächsten Pilotexperiment wurde untersucht, ob P2X7-spezifische Adapter auch die Transduktion von Makrophagen verstärken können, die P2X7 natürlich exprimieren. Dazu wurden ausdifferenzierte Knochenmark-Makrophagen (*bone marrow-derived macrophages*, BMDMs) aus Wildtyp (WT) und P2X7-defizienten (P2X7-/-) Mäusen vergleichend mit einer von der AG Grimm für Lymphozyten optimierten AAV1-P5 Variante transduziert. Hierzu wurden die Makrophagen in separaten 96-well Zellkulturplatten ausgesät und mit P2X7-spezifischen Adaptern (1c81-AE1) oder als Negativkontrolle mit ARTC2.2-spezifischen Adaptern (s-14-AE1) vorinkubiert. Anschließend wurden YFP-kodierende AAV1-P5 zu den Kulturen hinzugefügt und nach 48 h die YFP Expression mittels Durchflusszytometrie ermittelt (Abb. 3.16).

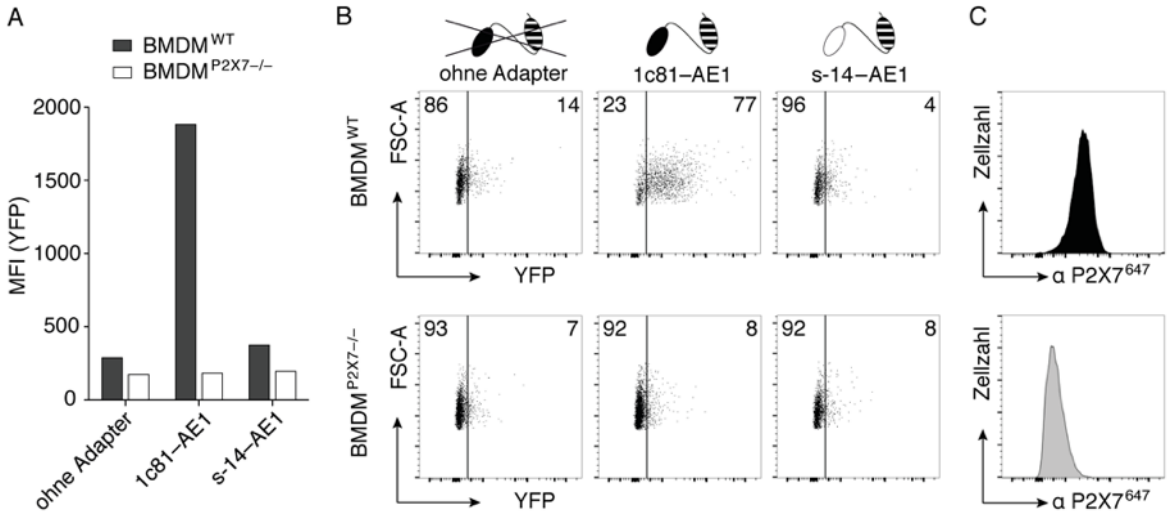

Abb. 3.16: Der P2X7-spezifische Adapter 1c81-AE1 erhöht die Transduktion P2X7-exprimierender ausdifferenzierter Knochenmarks-Makrophagen.
Knochenmarkszellen wurden aus Tibia und Femur von WT und $P2X7^{-/-}$ Mäusen extrahiert und über 6 Tage in M-CSF-haltigem Medium zu Makrophagen ausdifferenziert. Die Zellen wurden in 96-well Zellkulturplatten ausgesät (je $2*10^4$/Napf). YFP-kodierende AAV1-P5 wurden mit 10 nM P2X7-

spezifischen Adaptern (1c81-AE1) oder ARTC2.2-spezifischen Adaptern (s-14-AE1) vorinkubiert und anschließend zu den Zellen pipettiert ($2*10^8$ vg/Napf ~ 10.000 vg/Zelle). Nach 48 Stunden wurde die Expression des Transgens YFP durchflusszytometrisch ermittelt. (A) Grafische Darstellung der mittleren YFP Fluoreszenzintensität (MFI) nach Behandlung der Zellen mit AAV1-P5 in Ab- oder Anwesenheit von P2X7- bzw. ARTC2.2-spezifischen Adaptern. (B) Dotplot Analysen der YFP-Fluoreszenzintensität der untersuchten Makrophagen. Die Zahlen geben den Prozentsatz YFP-negativer bzw. -positiver Zellen an. (C) Die Expression von P2X7 auf der Oberfläche der Makrophagen wurde mit dem AF647-konjugierten P2X7-spezifischen mAk Hano44 analysiert.

Die Ergebnisse zeigen bei mit P2X7-spezifischen Adaptern behandelten Wildtyp Makrophagen eine deutlich höhere YFP Expression als bei mit ARTC2.2-spezifischen Adaptern behandelten Zellen. Bei Makrophagen aus P2X7-/- Mäusen führt die Behandlung mit P2X7-spezifischen Adaptern hingegen zu keiner verstärkten YFP Expression.

Zusammengefasst zeigen die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse, dass bispezifische Nanobody Adapter die Transduktion Target-exprimierender Zellen mit $AAV2^{RA}$ und mit AAV1 spezifisch verstärken können. Es ist bemerkenswert, dass Nanobody-basierte Adapter in allen durchgeführten Vergleichsuntersuchungen die Transduktion der Zielzellen mit AAVs deutlich stärker erhöhten als scFv A20-basierte Adapter, obwohl letztere in Bindungsassays scheinbar deutlich mehr Viruspartikel an die Zielzellen banden. Um festzustellen, ob auch andere AAV-spezifische Nanobodies in bispezifischen Adaptern wirksam sind, werden im letzten Ergebnisteil entsprechende Versuche mit jüngst in der AG Nolte hergestellten neuen AAV-spezifischen Nanobodies vorgestellt.

3.3.6 Herstellung und Charakterisierung neuer bispezifischer Nanobody-Adapter

In den vorausgehenden Versuchen hatte sich gezeigt, dass Nb AE1-enthaltende Adapter eine deutliche Verbesserung der Transduktion von Target-exprimierenden Zielzellen mit AAV2^{RA} und AAV1 vermitteln, während scFvA20-enthaltende Adapter die Transduktion mit AAV2^{RA} nur gering verbessern. Um die Funktionalität von Adaptern mit verschiedenen AAV-spezifischen Nbs miteinander vergleichen zu können, wurden weitere Versuche mit zwei neuen jüngst in der AG Nolte selektionierten AAV-spezifischen Nanobodies durchgeführt. Diese Nanobodies waren unter meiner Ko-Betreuung von Nikolina Pantelic im Rahmen einer Masterarbeit aus AAV-immunisierten Lama IgH-transgenen Mäusen (Eden 2018) isoliert und charakterisiert worden (Pantelic 2018). Über die Klonierung in den pCSE2.5 Vektor wurden diese VHHs zunächst in einem bivalenten Format als VHH-Kaninchen IgG Schwere-Ketten-Antikörper in HEK293-6E Zellen produziert.

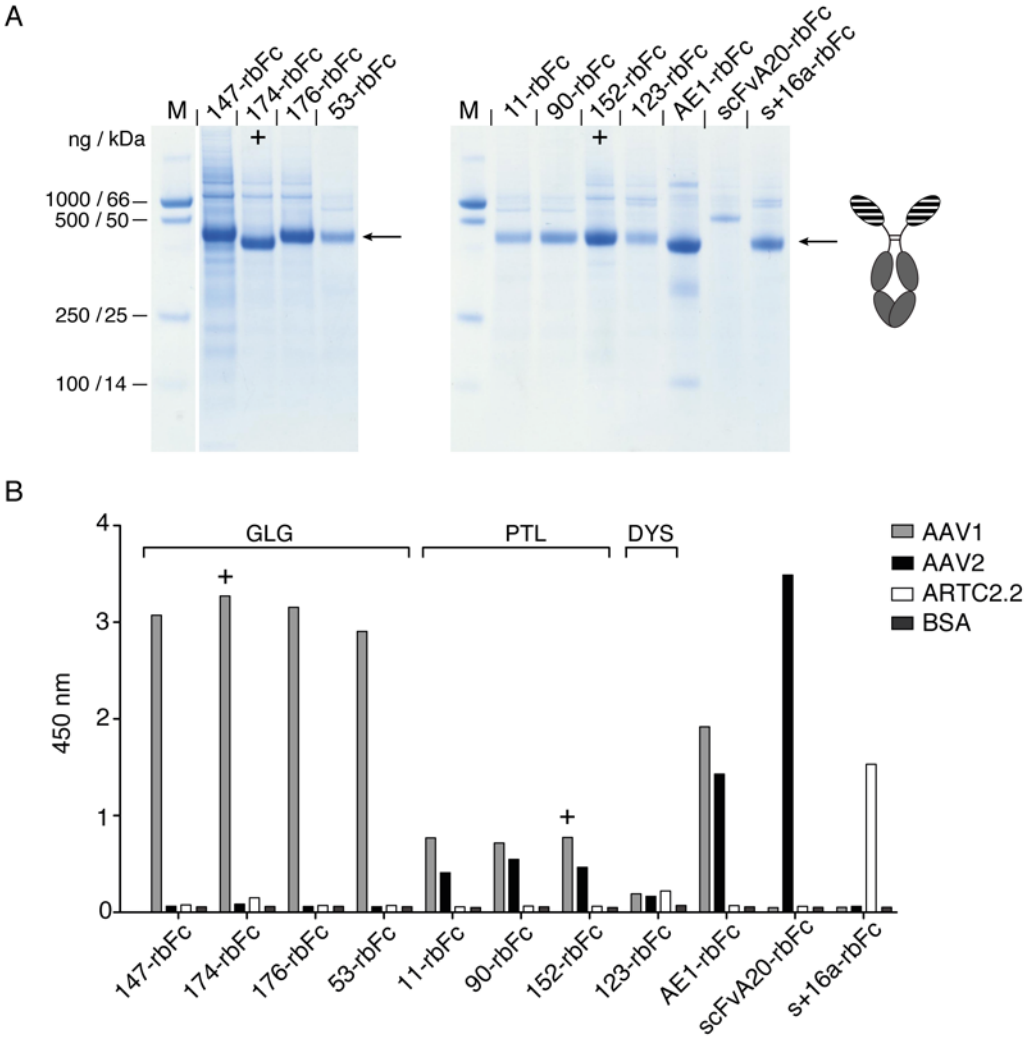

Abb. 3.17: Nb 152 reagiert spezifisch mit AAV1 und AAV2, Nb 174 nur mit AAV1.
Aus immunisierten Lama IgH-transgenen Mäusen gewonnene Nanobodies wurden als VHH-rbFc Schwere-Ketten-Antikörper in HEK293-6E Zellen produziert. Nbs mit ähnlicher AS Sequenz wurden

einer Familie zugeordnet, die Benennung erfolgte nach prägnanten Aminosäuren in der CDR3 (GLG, PTL, DYS). Die mit + markierten Nbs 152 und 174 wurden nachfolgend als Adapterproteine kloniert und getestet. (A) SDS-PAGE Analyse von je 10 µl Zellkulturüberstand von HEK293-6E Zellen. Die mit einem Pfeil markierten Banden entsprechen jeweils dem Nb-rbFc Fusionsprotein, rechts schematisch dargestellt. (B) Die Bindung der selektionierten Nbs an AAV1 und/oder AAV2 wurde mittels ELISA evaluiert. Dazu wurden die Vertiefungen einer ELISA-Platte mit AAV1 oder AAV2 ($1*10^9$ vg/Napf) oder als Kontrollantigene mit rekombinanter ARTC2.2 oder BSA (100 ng/Napf) beschichtet und freie Bindestellen mit BSA blockiert. Nach Inkubation mit HEK Kulturüberständen (1:20 in PBS) wurden gebundene Nb-rbFc mit Peroxidase-konjugierten anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörpern detektiert.

Abb. 3.17 A zeigt eine SDS-PAGE Analyse von entsprechenden Zellkulturüberständen. Zum Vergleich wurden Kulturüberstände mit AE1-rbFc, scFvA20-rbFc und s+16a-rbFc aufgetragen. Die prägnanten Banden bei ca. 40-45 kDa entsprechen jeweils einer Kette der durch DTT dissoziierten Nb-rbFc Fusionsproteine. Die Ergebnisse zeigen, dass alle Nanobody-Kaninchen IgG Schwere-Ketten-Antikörper in hoher Ausbeute (0,5-4 µg/10 µl Überstand) produziert wurden. In Abb. 3.17 B wurde die spezifische Bindung der produzierten Fusionspoteine an AAV1 und/oder AAV2 mittels ELISA untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die vier Nb-rbFc der GLG Familie spezifisch mit AAV1 reagieren und die drei Nbs der PTL Familie spezifisch an AAV1 und AAV2 binden.

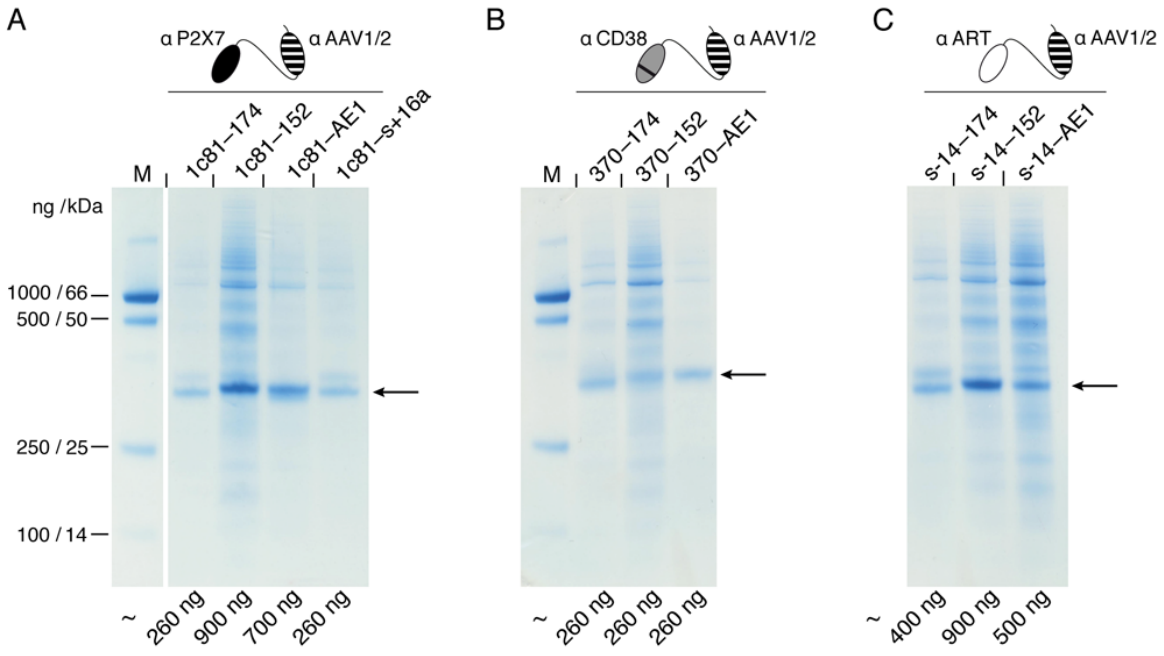

Abb. 3.18: Die neuen bispezifischen Adapter werden mit hoher Ausbeute in den Kulturüberstand transient transfizierter HEK293-6E Zellen sezerniert.
Nb 152 und Nb 174 wurden jeweils durch Austausch von AE1 in pCSE2.5 kloniert und als sezernierte P2X7- (A), CD38- (B) und ARTC2.2- (C) spezifische Adapter in HEK293-6E Zellen produziert. Proteine in Zellkulturüberständen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (10 µl/Spur). Die mit einem Pfeil markierte prominente Bande auf Höhe von ca. 30-35 kDa entspricht dem relativen Molekulargewicht von Nanobody-Dimeren. Unterhalb der Gele ist die durch Vergleich mit den Markerproteinen (M) abgeschätzte Menge des jeweiligen Adapterproteins in ng/Spur angegeben.

Aus diesen Familien wurden Nb 152 und Nb 174 als P2X7-, CD38- oder ARTC2.2-spezifische Adapter kloniert und evaluiert. Die Klonierung der neuen Adapter auf Basis der bereits hergestellten Adapter erfolgte durch Austausch der AE1-kodierenden Sequenz mit Nb 152- bzw. Nb 174-kodierenden Sequenzen (Pantelic 2018). Diese Adapter wurden wie zuvor in HEK293-6E Zellen produziert und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.18). Zum Vergleich wurden Überstände mit AE1-enthaltenden Adaptern sowie ein P2X7/ARTC2.2-bispezifischer Kontrolladaptern (1c81-s+16a) analysiert. Die prominente mit dem Pfeil markierte Bande bei ca. 30-35 kDa entspricht dem Molekulargewicht der Nb-Dimere. Die Ergebnisse zeigen, dass auch alle neuen bispezifischen Adapter in hoher Ausbeute produziert wurden (~0,25-1 µg/10 µl Überstand).

3.3.7 Nb 152-enthaltende Adapter verstärken die Transduktion Target-exprimierender HEK Zellen mit AAV1 und AAV2^{RA}

Als erstes wurde getestet, ob die neuen P2X7-spezifischen Adapter die Transduktion von P2X7-exprimierenden Zielzellen mit AAV1 und AAV2^{RA} verstärken. Dazu wurden P2X7-transfizierte oder untransfizierte HEK Zellen in 96-well Zellkulturplatten ausgesät und GFP-kodierende AAV1 oder AAV2^{RA} mit titrierten Adaptern zugefügt. Nach zwei Tagen wurde die Transduktionseffizienz wieder durchflusszytometrisch über die GFP Fluoreszenzintensität ermittelt (Abb. 3.19). Die Ergebnisse zeigen, dass der Nb 152-enthaltende Adapter (1c81-152) ähnlich effizient wie der Nb AE1-enthaltende Adapter (1c81-AE1) die Transduktion P2X7-exprimierender HEK Zellen mit AAV1 (Abb. 3.19 B) sowie auch mit AAV2^{RA} (Abb. 3.19 C) verstärkt. Die Transduktion P2X7-negativer untransfizierter HEK Zellen hingegen wird durch diese Adapter nicht beeinflusst. Ebenso wenig beeinflussen CD38-spezifische Kontrolladapter oder P2X7/ARTC2.2-spezifische Nanobody-Dimere die Transduktion von HEK Zellen mit AAV1 oder AAV2^{RA}. Nb 174-enthaltende P2X7-spezifische Adapter erhöhen ebenfalls, wenngleich auch nur äußerst schwach, die Transduktion P2X7-exprimierender Zellen mit AAV1, nicht aber mit AAV2^{RA}.

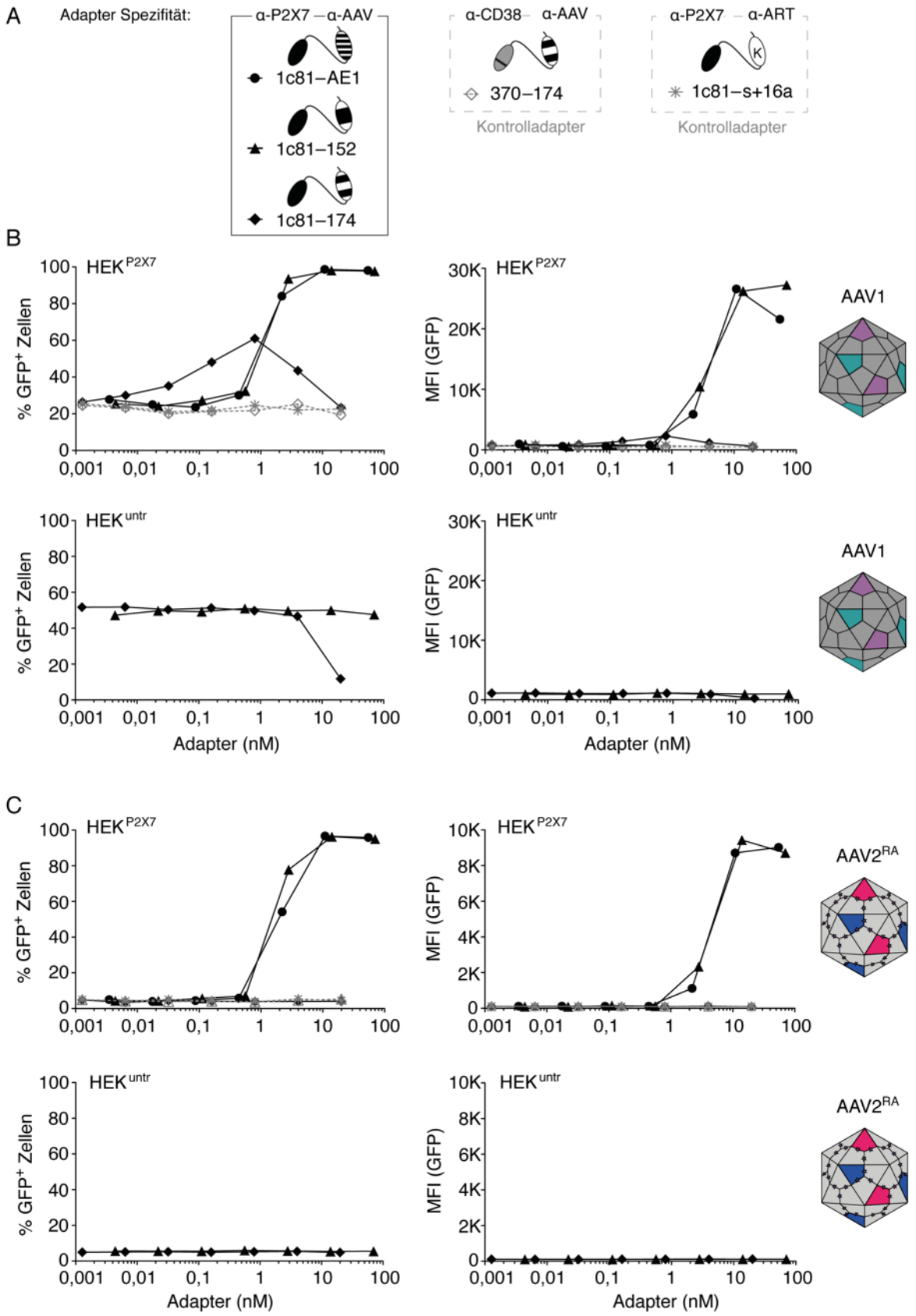

Abb. 3.19: Nb 152-enthaltende P2X7-spezifische Adapter erhöhen die Transduktion P2X7-exprimierender HEK Zellen sowohl mit AAV1 als auch mit AAV2^{RA}.
HEK^{P2X7} und HEK^{untr} Zellen wurden separat in 96-well Zellkulturplatten ausgesät (2*10^4 Zellen/Napf). GFP-kodierende AAV1 (B) oder AAV2^{RA} (C) wurden mit titrierten Adaptern für 30 Minuten bei 4 °C vorinkubiert und dann den Zellen zugegeben (10.000 vg AAV1/Zelle bzw. 300 vg AAV2^{RA}/Zelle). 48 h später wurde die GFP Expression durchflusszytometrisch ermittelt. (A) Schematische Darstellung der

in diesem Versuch eingesetzten Adapter. (B, C) Grafische Darstellung des Prozentsatzes GFP-positiver Zellen bzw. der mittleren GFP Fluoreszenzintensität (MFI) gegenüber der Konzentration zugegebener Adapter (berechnet anhand der geschätzten Proteinkonzentration in den verwendeten HEK Zellkulturüberständen, s. Abb. 3.18). Neben den Graphen ist jeweils der eingesetzte AAV Serotyp AAV1 oder AAV2^{RA} symbolisch dargestellt.

Mit dem nächsten Experiment wurde evaluiert, ob auch die neuen ARTC2.2- und CD38-spezifischen Adapter die Transduktion der jeweiligen Target-exprimierenden HEK-Zellen in gemischten Kulturen verstärken können. Dazu wurden ARTC2.2-transfizierte HEK Zellen im Verhältnis 1:1 mit eFluor450-markierten CD38-transfizierten HEK Zellen in 96-well Zellkulturplatten ausgesät. GFP-kodierende AAV1 oder AAV2^{RA} wurden wie zuvor mit titrierten Adaptern in HEK Zellkulturüberständen (Abb. 3.18) vorinkubiert und anschließend zu den Zellen pipettiert. Nach zwei Tagen wurde die GFP Expression durchflusszytometrisch ermittelt (Abb. 3.20).

Die Ergebnisse zeigen, dass Nb 152-enthaltende Adapter ähnlich effizient wie Nb AE1-enthaltende Adapter die Transduktion Target-exprimierender HEK Zellen mit AAV1 (Abb. 3.20 B) und mit AAV2^{RA} (Abb. 3.20 C) verstärken (s-14-152 für ARTC2.2 und 274-152 für CD38). Die Zugabe von Nb 174-enthaltenden Adaptern hingegen verstärkte nur die Transduktion der spezifischen Zielzellen mit AAV1 (Abb. 3.20 B), nicht aber mit AAV2^{RA} (Abb. 3.20 C), und das wieder deutlich schwächer als mit Nb 152-enthaltenden Adaptern. Auch in diesem Experiment ist eine schwache Steigerung der GFP-Fluoreszenzintensität bei Target-negativen Zellen zu erkennen, wenn Target-positive Zellen im gleichen Napf eine sehr starke GFP-Expression aufweisen (Abb. 3.20 B). Auch hier ist eine Übertragung von GFP durch exozytotische Vesikel denkbar.

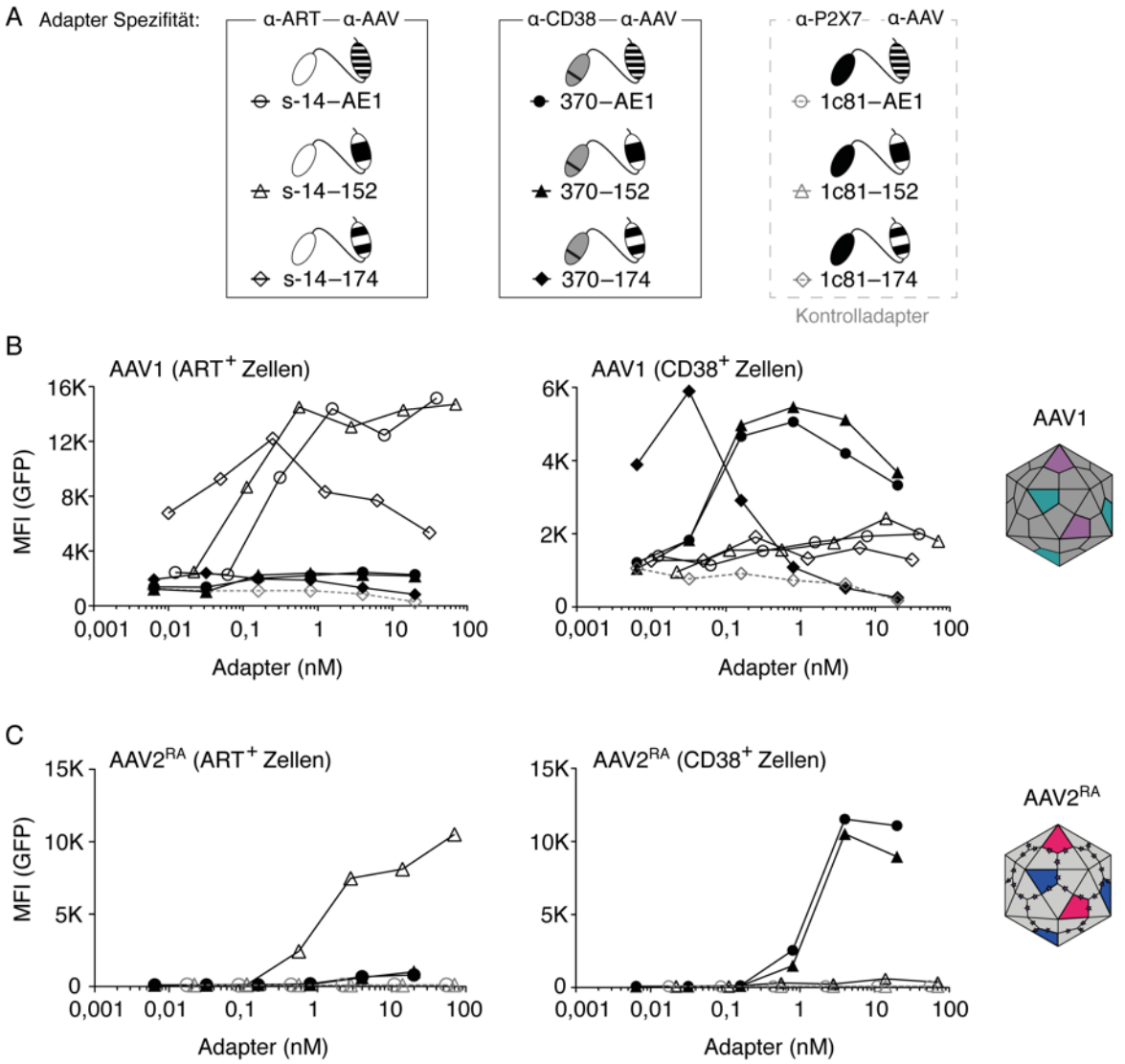

Abb. 3.20: Nb 152 enthaltende ARTC2.2- bzw. CD38-spezifische Adapter erhöhen jeweils die Transduktion Target-exprimierender HEK Zellen mit AAV1 und AAV2^{RA}.
HEK^{ART} Zellen wurden 1:1 gemischt mit eFluor450-markierten HEK^{CD38} Zellen in 96-well Zellkulturplatten ausgesät (je 1*10^4 Zellen/Napf). Die Zugabe von AAV1 und AAV2^{RA} mit titrierten Adaptern erfolgten wie in Abb. 3.19. Mit Hilfe der FlowJo Software wurde jeweils die GFP Fluoreszenzintensität von eFluor450-negativen (ART$^+$) Zellen und von eFluor450-positiven (CD38$^+$) Zellen ermittelt. (A) Schematische Darstellung der in diesem Expriment eingesetzten Adapter. (B, C) Grafische Darstellung der mittleren GFP Fluoreszenzintensität (MFI) gegenüber der Konzentration der Adapter (berechnet anhand der geschätzten Proteinkonzentration in den HEK Zellkulturüberständen in Abb. 3.18). Neben den Graphen ist jeweils der eingesetzte AAV Serotyp AAV1 oder AAV2^{RA} symbolisch dargestellt.

Zusammengefasst zeigen die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse, dass Nb 152-enthaltende Adapter die Transduktion von Target-exprimierenden Zellen mit AAV1 und AAV2^{RA} deutlich verstärken können und zwar für alle drei hier getesteten Membranproteine (P2X7, ARTC2.2 und CD38).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Strategien entwickelt und evaluiert, um die Zellspezifität Adeno-assoziierter Viren mit Hilfe von Nanobodies zu verändern. Die erste Strategie umfasst den Einbau eines Nbs in das virale Capsid durch die genetische Fusion an ein Capsidprotein, während die zweite Strategie Nanobody-Dimere als Adapter verwendet, um AAV und Zielrezeptor miteinander zu verbinden, ohne dabei das virale Capsid zu verändern. Während die genetische Fusion eines Nbs an den N-Terminus des Capsidproteins VP2 nicht in einer verstärkten Bindung oder Transduktion von Zielzellen resultierte, führte die Insertion eines Nbs in eine exponierte Oberflächenschlaufe des Capsidproteins VP1 in der Tat zu Bindung und verbesserter Transduktion Target-exprimierender Zielzellen mit AAV2^{RA}. Auch die Nutzung bispezifischer Nanobody-Adapterproteine resultierte in einer verbesserten Transduktion von Zielzellen sowohl mit AAV2^{RA} als auch mit AAV1. Interessanterweise konnten alle drei evaluierten Membranoberflächenproteine (P2X7, CD38, ARTC2.2) als Zielrezeptoren für AAVs dienen, obwohl sie sehr unterschiedliche Membranverankerungen aufweisen (Multi-*span* Homotrimer, Typ-II *single span*, GPI-Anker). Am Ende der Diskussion werden die beiden in dieser Arbeit entwickelten Strategien zur Optimierung der Targetspezifität von AAVs mit Hilfe von Nanobodies vergleichend bewertet. Schließlich folgt ein Ausblick für die weiterführende Nutzung dieser erfolgreichen AAV Targeting Strategien.

4.1 Die Insertion von Nbs in eine Oberflächenschlaufe von VP1 führt zur Verbesserung der Transduktion Target-exprimierender Zielzellen mit AAV2^{RA}

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Stellen im AAV2^{RA} Capsid für den Einbau von Nbs evaluiert: die Fusion eines Nbs an den N-Terminus des Capsidproteins VP2 sowie die Insertion eines Nbs in die Oberflächenschlaufe von VP1, die die höchste Protrusion des Capsids bildet. Abb. 4.1 zeigt die beiden Insertionsstellen in der Oberflächenstruktur des AAV2 Capsids.

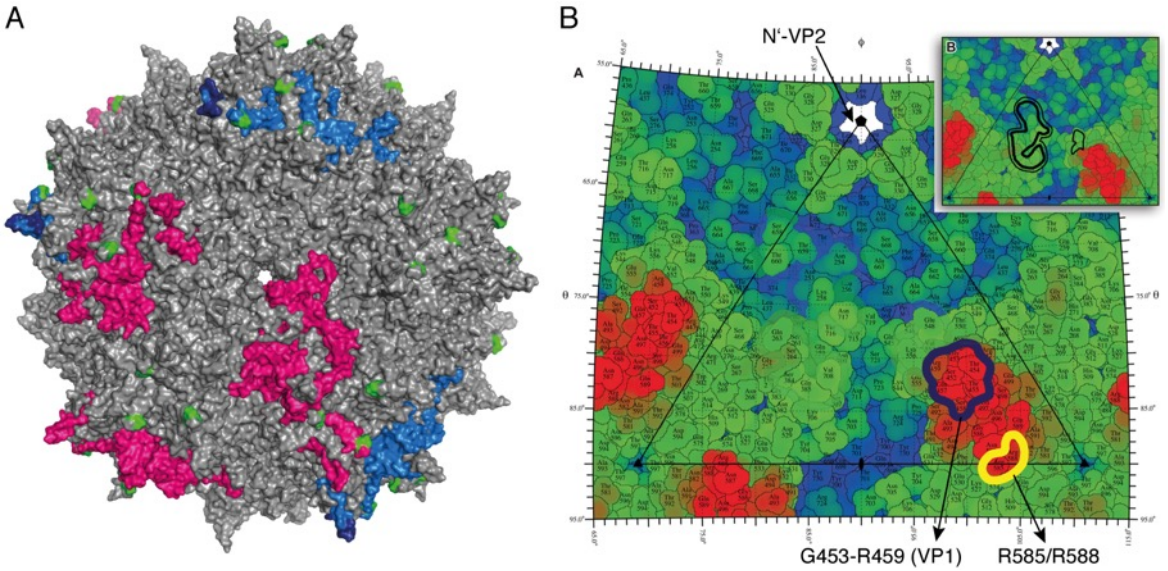

Abb. 4.1: Darstellung der zwei für die Insertion von Nbs evaluierten Stellen im AAV2^{RA} Capsid. (A) Die 3D Struktur des AAV2 Capsids (pdb 1lp3) zeigt drei VP1 Capsidproteine in blau, vier VP2 Capsidproteine in pink und die restlichen VP3 Capsidproteine in grau. Die zwei Arginine an Position 585 und 588, die das Bindungsmotiv an HSPG bilden, sind grün hervorgehoben. (B) Planare Darstellung eines Ausschnitts der Oberflächenstruktur des AAV2 Capsids modifiziert nach McCraw *et al.* 2012. Das Dreieck hebt die dreifache Symmetrieachse des Capsids hervor. Die Farben indizieren die Distanz zum Mittelpunkt des Capsids, wobei blau mit 105 Å am nächsten und rot mit 140 Å am weitesten entfernt ist. Die evaluierte Insertionsstelle des Nbs mittels Fusion an den N-Terminus von VP2 nach Münch *et al.* 2013 liegt innerhalb der Pore (weiß) an der fünffachen Symmetrieachse des Capsids. Die Insertion des Nbs in eine Oberflächenschlaufe von VP1 nach Judd *et al.* 2012 erfolgt an der höchsten Protrusion des Capsids unter Deletion der AS 453-459 (GTTTQSR) (dunkelviolett umrandet). Die beiden Arginine an Position 585 und 588 (gelb umrandet) liegen in der zweithöchsten Protrusion des Capsids.

Während die genetische Fusion des 1c81 Nbs an den N-Terminus von VP2 nicht zu einer verstärkten Bindung oder Transduktion von Zielzellen führte (s. Anhang 8.3), führte die Insertion von sechs verschiedenen Nbs in die VP1 Oberflächenschlaufe in jedem Fall zur spezifischen Bindung und verbesserten Transduktion Target-exprimierender Zielzellen mit AAV2^{RA} (Abb. 3.6 bis Abb. 3.8). Andere Arbeitsgruppen hatten an dieser Position zuvor bereits erfolgreich Peptide (Boucas *et al.* 2009; Naumer *et al.* 2012) und kleine Proteine (mCherry) insertiert (Judd *et al.* 2012).

Dass AAV2^{RA}s mit in VP1 insertierten Nbs Target-exprimierende Zielzellen verstärkt transduzieren wurde für AAVs mit insertiertem P2X7-spezifischem Nb 1c81 in Einzelkulturen P2X7-transfizierter Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen gezeigt (Abb. 3.7) und für AAVs mit insertierten CD38- oder ARTC2.2-spezifischen Nbs in gemischten Kulturen CD38- und ARTC2.2-exprimierender Zellen (Abb. 3.8Abb. 3.8). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass alle sechs hier verwendeten Nbs nach Insertion in die Protrusion des VP1 Capsidproteins eine korrekte Tertiärstruktur

ausbilden und die Fähigkeit der spezifischen Bindung an ihr Targetprotein beibehalten. Dass die Insertion eines Nbs in die Tertiärstruktur eines anderen Proteins ohne Verlust der Bindungseigenschaft des Nbs im Prinzip möglich ist, wurde auch von anderen gezeigt, z.B. durch die genetische Insertion eines Hühnereiweiß-spezifischen Nbs in eine exponierte Schlaufe des Enzyms ß-Lactamase (Crasson *et al.* 2015), oder die Insertion eines GFP-spezifischen Nbs in eine Oberflächenschlaufe des Hüllproteins des Hepatitis B Virus (Peyret *et al.* 2015). Neben der richtigen Tertiärstruktur des Nbs innerhalb des VP1 Capsidproteins bleibt offensichtlich auch die sterische Bindung an das Antigen erhalten. Vermutlich wurde dies in der vorliegenden Arbeit durch die Wahl des langen GS-Linkers am N-Terminus und des kurzen GS-Linkers am C-Terminus des Nbs begünstigt, denn die N- und C-Termini eines Nbs liegen an entgegengesetzten Polen des Proteins - der N-Terminus nah der Antigen-bindenden CDR Schlaufen, der C-terminus am anderen Pol (vgl. Abb. 1.8, 3D Struktur des Nbs).
Die prominente Capsidprotrusion an Position 453-459 von AAV2^{RA} ist auch für die Insertion kurzer Peptide (12 und 7 AS) und folgender Selektion von AAV2^{RA} Varianten mit erhöhter Transduktion normalerweise nicht-permissiver primärer humaner Endothelzellen der Koronararterie genutzt worden (Boucas *et al.* 2009; Naumer *et al.* 2012). Diese Capsidposition - innerhalb einer Schlaufe, die die anti-parallelen ß-Blätter GH2 und GH3 verbindet - bildet die höchste Protrusion des Capsids (Xie *et al.* 2002) (vgl. auch Abb. 4.1). Sie entspricht einer von zwölf hypervariablen Regionen (HVR-V), in denen sich AAV Serotypen unterscheiden und die den Tropismus mitbestimmen (Gao *et al.* 2003). Die Aminosäuren innerhalb dieser Schlaufe sind für die Bindung an verschiedene Zellrezeptoren wichtig, aber weder für die Assemblierung der Capsidproteine noch für die grundlegende Struktur des Capsids wesentlich. Damit ist diese Position für die Insertion Rezeptor-spezifischer Liganden, und - wie in dieser Arbeit gezeigt - insbesondere für die Insertion von Membranprotein-spezifischen Nanobodies geeignet.

4.2 Bispezifische Adapterproteine können die Transduktion Target-exprimierender Zielzellen mit AAV2^{RA} und AAV1 erhöhen

Für die zweite Strategie zur verbesserten Transduktion Target-exprimierender Zielzellen wurden in dieser Arbeit bispezifische Adapterproteine entwickelt, mit

denen AAVs und Zelloberflächenproteine miteinander verbunden werden sollten. Dafür wurden Membranprotein-spezifische Nbs über ein Linker-Peptid genetisch an AAV-spezifische Nanobodies bzw. das scFv des AAV2-spezifischen A20 Antikörpers fusioniert (Abb. 4.2 B).

Das Fab-Fragment dieses A20 Antikörpers war zuvor von den Arbeitsgruppen Kleinschmidt und Samulski bereits in Form eines bispezifischen F(ab'γ)$_2$ Fragments erfolgreich zur Transduktion nicht-permissiver Zellen eingesetzt worden (Bartlett *et al.* 1999). Dazu war der Fab'γ Arm des mAk A20 mit dem Fab'γ Arm des Integrin $\alpha_{IIb}ß_3$-spezifischen mAk AP2 über Disulfidbrücken in der hinge Region kovalent verbunden worden. Das Integrin $\alpha_{IIb}ß_3$ wird nach Bindung des Liganden Fibrinogen endozytiert (Handagama *et al.* 1993). Die Herstellung des bispezifischen F(ab'γ)$_2$ Fragments erforderte mehrere Schritte. Zunächst wurden beide Antikörper mit der Protease Pepsin verdaut, so dass F(ab'γ)$_2$ Fragmente entstanden. Diese wurden mit 2-mercapthoethylamine reduziert und der erhaltene Fab'γ Arm eines der Antikörper mit dem bifunktionalen *crosslinker* Bismaleimidohexane inkubiert, dessen Maleimid-gruppen mit reduzierten Thiolgruppen reagieren. Die maleimidierten Fab'y Fragmente wurden schließlich mit den reduzierten Fab'y Fragmenten des anderen Antikörpers inkubiert, so dass bispezifische F(ab'γ)$_2$ Fragmente entstehen konnten. Zwischen den verschiedenen Schritten erfolgten Umpufferungen, Aufreinigungen und Konzentrierungen mittels Ultrafiltration.

Die genetische Fusion zweier Nanobodies ähnelt im Prinzip der chemischen Verknüpfung von zwei Fab-Fragmenten, ist jedoch technisch wesentlich einfacher zu bewerkstelligen. AAV-spezifische Nbs bestehen aus einer einzigen gut löslichen Domäne - im Gegensatz zu den zwei Ketten des A20 Fab Fragments bzw. zu den zwei Domänen des A20 scFv. Nanobodies können deshalb leichter als Fusionsproteine kloniert und exprimiert werden und sind zudem auch als bispezifische Dimere durch eine hohe Löslichkeit ausgezeichnet (Muyldermans 2013). In dieser Arbeit wurde zunächst Nb AE1 verwendet, der als Ligand der Affinitätsmatrix AVB Sepharose (GE Healthcare) zur chromatographischen Aufreinigung der AAV Serotypen 1, 2, 3 und 5 verwendet wird. Später wurden die in der eigenen AG hergestellten AAV-spezifischen Nbs 152 und 174 evaluiert. Abb. 4.2 zeigt schematische Darstellungen des bispezifischen F(ab'γ)$_2$ Fragments nach Bartlett *et al.* 1999 und der in dieser Arbeit entwickelten Nanobody-basierten bispezifischen Adapterproteine. Die Nanobody-

basierten Adapterproteine konnten mit hoher Ausbeute in transient transfizierten HEK-Zellen produziert werden (Abb. 3.9 und Abb. 3.18).

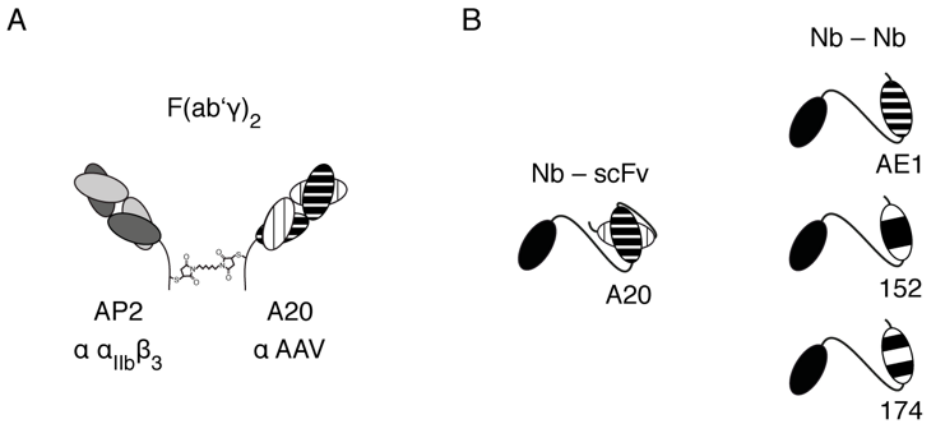

Abb. 4.2: Vergleichende Darstellung eines bispezifischen F(ab'γ)$_2$ Fragments und der entwickelten bispezifischen Nanobody-basierten Adapterproteine.
(A) Das Fab'γ Fragment des AAV-spezifischen A20 Antikörpers wurde in einem schrittweisen Verfahren über einen Bismaleimidohexan *crosslinker* chemisch mit dem Fab'γ Fragment eines Integrin-spezifischen Antikörpers (AP2) verbunden, so dass ein bispezifisches F(ab'γ)$_2$ Fragment (α AAV/α Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) entstehen konnte (Bartlett *et al.* 1999). (B) Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten bispezifischen Adapterproteine aus Rezeptor-spezifischem Nb und scFv von A20 (Nb-scFv) bzw. den AAV-spezifischen Nbs AE1, 152 und 174 (Nb-Nb) wurden mittels genetischer Fusion über einen GS-Linker bereits auf DNA-Ebene in einem Schritt verbunden und anschließend als rekombinantes Protein hergestellt.

Die Nb AE1- oder 152-enthaltenden Adapterproteine vermittelten eine deutlich erhöhte Transduktion der Zellen, die das entsprechende Target-Membranprotein auf der Oberfläche exprimierten, sowohl mit AAV2^{RA} als auch mit AAV1 (Abb. 3.12, Abb. 3.13, Abb. 3.19 und Abb. 3.20). Die scFvA20- und Nb 174-enthaltenden Adapterproteine hingegen führten zu einer - wenngleich auch deutlich schwächeren - Steigerung der Transduktion Target-exprimierender Zellen mit AAV2^{RA} aber nicht mit AAV1 (Abb. 3.12, Abb. 3.13), bzw. mit AAV1 aber nicht mit AAV2^{RA} (Abb. 3.19, Abb. 3.20).

So vermittelten AE1- und 152-enthaltende P2X7/AAV-bispezifische Adapterproteine (1c81-AE1, 1c81-152) eine starke Verbesserung der Transduktion P2X7-exprimierender HEK Zellen, während scFvA20-enthaltende P2X7/AAV-bispezifische Adapterproteine (1c81-scFvA20) nur zu einer schwachen Verbesserung führten (Abb. 3.12, Abb. 3.19). Im Falle der ARTC2.2/AAV-bispezifischen Adapterproteine zeigte sich ebenfalls mit AE1- und 152-enthaltenden Adapterproteinen (s-14–AE1, s-14-152) eine deutliche Erhöhung der Transduktion ARTC2.2-exprimierender HEK

Zellen; ebenso wie im Fall der AE1- und 152-enthaltenden CD38/AAV-bispezifischen Adapterproteine (370-AE1, 274-AE1, 1067-AE1) (Abb. 3.13, Abb. 3.20).

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass das scFv von A20 und der Nb 174 die Transduktion jeweils nur schwach, bzw. nur in einem engen Konzentrationsbereich verbessern, obwohl sie in Bindungsassays stärkere Signale zeigten als die Nbs AE1 und 152 (Abb. 3.17). Diese Kombination aus stärkerer Bindung an AAVs bei geringerer Verbesserung der Transduktion mit $AAV2^{RA}$ bzw. AAV1 im Vergleich zu AE1- und 152-enthaltenden Adapterproteinen, könnte für eine Bindung an unterschiedliche Epitope und/oder eine Beeinflussung der Entpackung bzw. des intrazellulären Transports des Virusgenoms sprechen. Der bei hohen Konzentrationen von scFvA20- oder Nb 174-enthaltenden Adapterproteinen beobachtete Rückgang der Transduktionseffizienz der Zielzellen könnte bei diesem Versuchsaufbau durch eine hohe Affinität des scFv's zu $AAV2^{RA}$, bzw. des Nbs 174 zu AAV1, zu erklären sein. Die Vorinkubation von AAVs und Adapterproteinen würde zu einer nahezu vollständigen Abdeckung der Capside mit Adapterproteinen führen. Im Überschuss vorhandene Adapterproteine könnten nachfolgend an die Membranproteine auf der Zelloberfläche binden, so dass diese mit freien Adapterproteinen belegt und für die AAV-Adapterprotein-Komplexe nicht mehr zugänglich wären.

Untersuchungen der AG Kleinschmidt mit konventionellen AAV-spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAks) deuten an, dass das Erkennungsepitop die Neutralisation der Infektion beeinflusst. So verhindern die mAks C24-B und C37-B die Bindung von AAV2 an den Zellrezeptor, während A20 einen späteren Zeitpunkt der Infektion hemmt und D3 die Infektion trotz Bindung nicht verhindert (Wobus *et al.* 2000). Eine Strukturanalyse von AAV2 im Komplex mit dem Fab' Fragment von A20 zeigte, dass der *footprint* von A20 nicht mit der Heparin Bindungsstelle überlappt. A20 bindet ein diskontinuierliches Epitop (vgl. auch Abb. 1.5), in dem die Schlaufen der hypervariablen Regionen I und II einer VP Untereinheit mit der hypervariablen Region IX der benachbarten Untereinheit verbunden sind (McCraw *et al.* 2012). Später wurden die weiteren Schritte des viralen Lebenszyklus mit Mutationen innerhalb oder nahe der A20 *footprints* untersucht. Dabei zeigte sich, dass weder der Eintritt in die Zelle noch die Akkumulation im Zellkern oder das Freisetzen des Genoms, aber dennoch die Transkription des Genoms verhindert waren (Aydemir *et al.* 2016).

Auch das Bindungsepitop des Nbs AE1 ist mittels einer Kombination aus Sequenzalignment, Strukturanalyse und der Affinität verschiedener AAV Serotypen an die AVB Sepharose Matrix ermittelt worden. Hauptverantwortlich für die Bindung ist das lineare Epitop SPAKFA in AAV3 (entsprechend AS 662-667 SAAKFA in AAV2), dessen Aminosäurereste an der Oberfläche des Capsids exponiert sind und nahe der Pore an der fünffachen Symmetrieachse liegen. Ein weiterer, geringer Beitrag zur Bindung des Nbs wird vermutlich durch das Epitop QNDGTT (325-330 in AAV2), besonders durch Threonin an Position 330, vermittelt (Wang *et al.* 2015). Die Bindungsepitope von A20 und AE1 sind in Abb. 4.3 schematisch hervorgehoben. Nb AE1 erzeugt als Einzeldomänen-Antikörper einen kleineren *footprint* auf dem AAV2 Capsid als die zwei variablen Domänen des konventionellen A20 Antikörpers. Aufgrund der ähnlichen Konzentrationsabhängigkeit in der Transduktion mit Nb 152- und AE1-enthaltenden Adapterproteinen sowie der Erkennung sowohl von AAV1 als auch AAV2 durch beide Nbs könnte spekuliert werden, dass diese das gleiche Epitop erkennen und/oder eine ähnliche Affinität aufweisen.

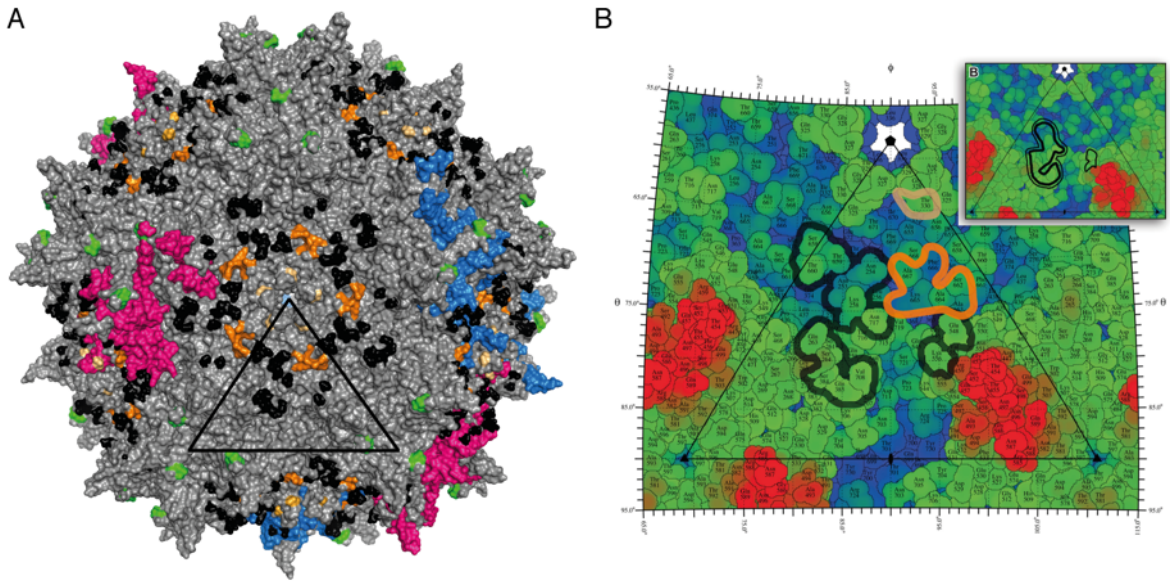

Abb. 4.3: Die Epitope des mAk A20 und Nb AE1 in der 3D Struktur von AAV2.
(A) Gezeigt ist die 3D Struktur von AAV2 wie in Abb. 4.1. Zusätzlich hervorgehoben ist das Epitop des monoklonalen Antikörpers A20 (AS in schwarz) nach McCraw *et al.* 2012 und das Epitop des Nanobodies AE1 (AS in orange) nach Wang *et al.* 2015. Das Dreieck deutet die dreifache Symmetrieachse des Capsids an und zeigt denselben Ausschnitt wie in (B). (B) Planare Darstellung der Oberflächenstruktur des AAV2 Capsids modifiziert nach McCraw *et al.* 2012. Die Farben indizieren die Distanz zum Mittelpunkt des Capsids, wobei blau mit 105 Å am nächsten und rot mit 140 Å am weitesten entfernt ist. Aminosäuren, die das diskontinuierliche Epitop des mAk A20 bilden sind

schwarz umrandet. Der *footprint* wurde mittels eines Homologiemodels des Fab' A20 angepasst an die *cryo*-EM Rekonstruktion des AAV2 Capsids erstellt. Aminosäuren, die das lineare Epitop des Nbs AE1 bilden, sind orange umrandet. Die weitere potenziell am Epitop beteiligte AS T-330 ist beige umrandet und befindet sich an der Außenwand der Pore.

Die Beobachtung, dass Nb 174-enthaltende Adapter bei den drei untersuchten Zielzellen die Transduktion mit AAV1 jeweils nur in einem vergleichsweise engen Konzentrationsbereich erhöhten (Abb. 3.19, Abb. 3.20), verdeutlicht, dass nicht alle AAV-spezifischen Nbs in bispezifischen Adapterproteinen die Transduktion von Zielzellen verbessern. Nb 174 könnte ähnlich wie mAk A20 ein Epitop binden, das in einem der späteren Schritte des AAV Lebenszyklus eine Rolle spielt.

Um zu evaluieren, welche Epitope auf den viralen Capsiden verschiedener Serotypen besonders dazu geeignet sind über Adapterproteine die Transduktion von Zielzellen zu verbessern, wäre eine Kartierung der von den jeweiligen Nbs erkannten Epitope hilfreich. Dies könnte mit Hilfe von Kreuzblockade-, Mutagenese- oder Ko-Kristallisations-Studien bewerkstelligt werden. Um den Einfluss der Affinität eines Nanobodies zu untersuchen, könnten natürlich vorkommende Varianten bzw. zielgerichtete Mutanten eines Nbs in entsprechende Adapterproteine kloniert und hinsichtlich ihres Einflusses auf die Transduktion verglichen werden.

4.3 Strukturell unterschiedliche Membranoberflächenproteine können als Nanobody-assistierte Rezeptoren für Adeno-assoziierte Viren dienen

Bemerkenswerterweise zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass drei strukturell unterschiedliche Membranproteine als Nanobody-assistierte Rezeptoren für AAVs dienen können, wenn der Membranprotein-spezifische Nanobody entweder durch genetische Fusion in das virale Capsid eingefügt wird oder über einen Peptidlinker mit einem AAV-spezifischen Nanobody zu einem bispezifischen Adapterprotein verknüpft wird. Dies führt zu der Fragestellung, wie die AAVs über die fremden Rezeptoren in die Zelle gelangen. Es ist z.B. denkbar, dass die Nb-assistierte Bindung der AAVs an die Membranproteine die gemeinsame Endozytose der AAV-Rezeptor-Komplexe induziert. Die Membranproteine könnten aber auch nur einen Kontakt der AAVs mit

der Zelle herstellen und die Endozytose der AAVs könnte dann über andere Co-Rezeptoren vermittelt werden.

Die hier evaluierten Membranproteine sind Ektoenzyme (CD38, ARTC2.2) bzw. ein ATP-gesteuerter Ionenkanal (P2X7) und somit keine klassischen Endozytose-Rezeptoren. Publizierte Untersuchungen deuten jedoch an, dass zumindest P2X7 und CD38 endozytiert werden können. Die AG Wiley hat gezeigt, dass P2X7 als Scavenger-Rezeptor auf Monozyten und Makrophagen die Phagozytose apoptotischer Zellen und Bakterien vermitteln kann (Wiley und Gu 2012). Sie zeigten, dass inaktivierter P2X7 auf der Zelloberfläche humaner Monozyten Komplexe mit einer Untereinheit von Myosin II bildet, NMMHC-IIA (*nonmuscle myosin heavy chain IIA*), und dass diese Komplexe essentiell für die Phagozytose nicht-opsonierter Beads sind. Eine gesteigerte Phagozytose dieser Beads, Hitze-inaktivierter Bakterien und apoptotischer Lymphozyten konnte auch in nicht-phagozytischen HEK293 Zellen beobachtet werden, die P2X7 überexprimieren (Gu *et al.* 2010; Gu *et al.* 2011). Da eine P2X7-vermittelte phagozytische Aktivität nur in Abwesenheit von ATP und Serum beobachtet werden konnte und durch extrazelluläres ATP sogar inhibiert wurde, schlugen die Forscher vor, dass inaktivierter P2X7 als Scavenger-Rezeptor die Aufnahme von Zelltrümmern und Bakterien reguliere (Ou *et al.* 2018).

Neben seiner enzymatischen Aktivität fungiert CD38 zusätzlich als Rezeptor für den Liganden CD31 (Deaglio *et al.* 1998). Die Interaktion zwischen CD38 und CD31 vermittelt die Aktivierung und Adhäsion von Lymphozyten und aktiviert Gene der Proliferation, Migration und des 'Homing' in chronisch lymphatischen Leukämie Zellen (Deaglio *et al.* 2000; Deaglio *et al.* 2010). Es wurde ferner gezeigt, dass die Bindung von agonistischen als auch antagonistischen mAks an CD38 die Gruppierung von sogenannten *clustern* an der Zelloberfläche induziert und diese Komplexe anschließend internalisiert werden (Funaro *et al.* 1998). Auf ähnliche Weise könnte auch die Nb-assistierte Bindung von AAVs an CD38 eine gemeinsame Endozytose initiieren.

Auch für die GPI-verankerte ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 gibt es nur indirekte Hinweise auf eine - wenngleich auch nur geringe - Antikörper-induzierte Endozytose. So wurde beobachtet, dass sowohl der Fluoreszenz-markierte ARTC2.2-spezifische Nanobody s+16a als auch der konventionelle ARTC2.2-spezifische mAk Nika102 nach 24 h bei 37 °C noch größtenteils an der Zelloberfläche muriner Lymphomzellen zu

finden sind, während ungleichmäßig verteilte cytosolische Färbungen auf eine partielle Internalisierung hinweisen (Bannas *et al.* 2015). Um zu klären, ob die Nb-assistierte Bindung der AAVs an die hier untersuchten Rezeptoren jeweils zur gemeinsamen Endozytose der AAV-Rezeptor-Komplexe führt, könnte die Internalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden, z.B. mit Fluoreszenz-markierten Adapterproteinen und/oder AAVs (Bartlett *et al.* 2000).

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Nb-vermittelte Bindung von AAVs an P2X7, ARTC2.2 und CD38 die sekundäre Endozytose der AAVs über andere Co-Rezeptoren erleichtert. Auch der natürliche Zelleintritt von AAV2 scheint über verschiedene Internalisierungswege abzulaufen (vgl. Abschnitt 1.1.4). Dabei bleibt unklar, ob der primäre Rezeptor HSPG gemeinsam mit AAV2 (und Co-Rezeptoren) endozytiert oder ob AAV2 nach HSPG-Bindung an der Zelloberfläche an Co-Rezeptoren transferiert wird und dann endozytiert (Asokan *et al.* 2006). Für solch eine "sekundäre" Endozytose würde sprechen, dass alle drei in dieser Arbeit evaluierten Membranproteine, trotz struktureller und funktioneller Unterschiede, als alternative AAV-Rezeptoren dienen konnten, eventuell um den ersten Kontakt mit der Zelloberfläche herzustellen.

In diesem Zusammenhang ist möglicherweise auch die Beobachtung interessant, dass die Inkubation einer Mischung aus ARTC2.2-transfizierten und CD38-transfizierten HEK Zellen mit AAV2^{RA} und bispezifischen Adapterproteinen in einem gemeinsamen Napf zu einer leichten Erhöhung der Transduktion der jeweils Zielrezeptor-negativen Zellen führte (Abb. 3.13), während dieses Phänomen nicht auftrat, wenn die beiden Zellpopulationen in getrennten Näpfen mit AAV2^{RA} und Adapterproteinen inkubiert wurden (Abb. 3.14). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Transduktion Target-negativer Zellen in der Mischkultur könnte eine erleichterte Aufnahme der AAVs von Target-negativen Zellen durch die räumliche Nähe zu Target-exprimierenden Zellen sein, die über Adapterproteine AAVs an ihrer Zelloberfläche konzentrieren. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre die Übertragung des GFP Reporter-Proteins von transduzierten Target-positiven Zellen auf Target-negative Zellen, z.B. über exozytotische Mikrovesikel (Ratajczak und Ratajczak 2016).

4.4 Vor- und Nachteile von Nanobody-Capsid Fusionen und Nanobody-basierten bispezifischen Adapterproteinen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Strategien, der direkte Einbau von Nbs in das virale Capsid sowie die Nutzung Nanobody-basierter bispezifischer Adapterproteine, die Transduktion von Zielzellen mit AAV2^{RA} (und AAV1) steigern können. Die jeweiligen Vor- und Nachteile dieser Strategien sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Vor- und Nachteile der beiden Nb-basierten Strategien zur Optimierung von AAVs

	Nb-Capsid Fusionen	**Bispezifische Adapterproteine**
Klonierung	aufwendig	einfach
AAV Produktion: - Anzahl Plasmide - virale Titer	 4 niedrig	 3 hoch
Nb Produktion	bereits in AAV enthalten	einfach, hohe Ausbeute
Übertragbarkeit auf andere AAV Serotypen	möglich	möglich
Anzahl Therapeutika	1	2
Abdeckung immunogener Epitope des Capsids ('Schutzschild')	nicht möglich	potenziell möglich

Die Produktion von Nanobody-enthaltenden AAVs ist aufwendiger als die Produktion von unmodifizierten AAVs. Anstelle von drei Plasmiden werden für die Herstellung in HEK293 Zellen vier Plasmide benötigt, wobei das zusätzliche Plasmid für das Nb-Capsid Fusionsprotein kodiert (Abb. 3.4). Für die sechs in dieser Arbeit hergestellten Nb-enthaltenden AAV2^{RA}s wurden zudem niedrigere Titer erhalten als für unmodifizierte AAV2^{RA}s. Der Einbau des modifizierten Capsidproteins könnte eine weniger effiziente Assemblierung der Capside bedingen (vgl. Abschnitt 3.2.1). Bei der Klonierung der VP1-Nb Fusionsproteine wurden die Nb-flankierenden GS-Linker während der PCR-Amplifikation eingefügt (Abb. 3.4 und Abschnitt 6.1.12). Dieser Klonierungsschritt könnte zukünftig durch das Einfügen geeigneter Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, die direkt den Nb flankieren, vereinfacht werden. Für die

Übertragung dieser Strategie auf andere AAV Serotypen könnte die Generierung chimärer Capside evaluiert werden (Hauck *et al.* 2003). Hierfür könnte das zusätzliche AAV2-basierte VP1-Nb-kodierende Plasmid mit dem Capsidprotein-kodierenden Plasmid eines anderen Serotypen, z.B. AAV1, bei der Transfektion kombiniert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Insertion des Nbs in das VP1 Capsidprotein eines anderen Serotypen über die Klonierung eines entsprechenden neuen VP1-Nb Fusionsprotein-kodierenden Plasmids. Die geeignete Position in VP1 könnte durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der Capsidproteine der verschiedenen Serotypen sowie einer Analyse der Kristallstrukturen assemblierter AAV Capside erfolgen. Ein Vorteil des festen Einbaus von Nbs in das AAV Capsid für klinische Studien ist, dass nur die Sicherheit eines Reagenzes als Therapeutikum in der Gen- und Tumortherapie evaluiert werden müsste. Bei der Nutzung bispezifischer Adapterproteine hingegen würde ein Therapeutikum aus zwei kombinierten Reagenzien bestehen, deren Sicherheit jeweils klinisch ermittelt werden müsste. Für die *in vivo* Anwendung bispezifischer Adapterproteine müsste zudem ermittelt werden, ob eine gleichzeitige oder sequentielle Gabe von Adapterproteinen und AAVs bessere Wirkungen erzielt. Bei gleichzeitige Gabe könnten die Adapterproteine die Bindung von vorformierten neutralisierenden Antikörpern hemmen. Bei einer vorzeitigen Injektion der Adapterproteine könnten die Zielzellen markiert und überschüssige Nanobodies durch renale Filtration eliminiert werden, so dass bei anschließender Gabe der AAVs die Adapterprotein-beschichteten Zellen bevorzugt transduziert werden könnten.

Ein entscheidender Vorteil der bispezifischen Adapterproteine liegt in der Möglichkeit des einfachen modularen Austausches sowohl des Rezeptor-spezifischen Nbs als auch des AAV-spezifischen Nbs (Els Conrath *et al.* 2001). Da auch mehr als zwei Nbs einfach über Linker-Peptide verbunden werden können, könnten sowohl auf Seite des Membranproteins als auch auf Seite des AAVs zwei gleiche oder verschiedene Nanobodies verknüpft werden, um die Avidität der Adapter für die AAVs oder für die Zielzellen zu verbessern (Abb. 4.4). Dabei besteht zumindest theoretisch auch die Möglichkeit, Adapterproteine als eine Art Schutzschild gegen neutralisierende Antikörper zu nutzen. Durch die Beschichtung des viralen Capsids mit Adapterproteinen könnten immunogene Epitope des Capsids verdeckt oder die Bindung neutralisierender Antikörper sterisch gehindert werden. Somit könnte neben

der Verbesserung der Transduktion spezifischer Zellpopulationen auch der Erkennung viraler Capside durch das Immunsystem entgangen werden.

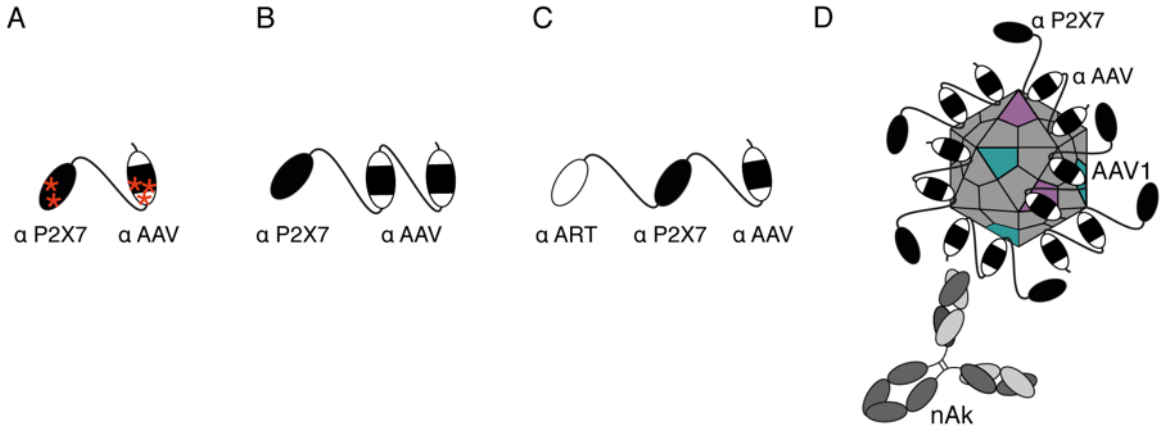

Abb. 4.4: Schematische Darstellung von Möglichkeiten für die Weiterentwicklung bispezifischer Nanobody-Adapterproteine.
(A) Modifikation der Affinitäten der Nbs für das Membranprotein und/oder AAV durch Mutagenese. (B) Erhöhung der Avidität durch Dimerisierung des AAV-spezifischen Nbs. (C) Modifikation der Zellspezifität durch Dimerisierung des Membranprotein-spezifischen Nbs (bevorzugte Transduktion ART/P2X7-exprimierender Zellen). (D) Adapterproteine als Schutzschild vor neutralisierenden Antikörpern (nAk).

4.5 Ausblick und Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit entwickelten Strategien für die Optimierung Adeno-assoziierter Viren ebnen als *'proof of principle'* den Weg für interessante weiterführende Untersuchungen. Da sowohl durch den Einbau von Nbs in das virale Capsid als auch durch die Nutzung bispezifischer Adapterproteine Target-exprimierende Zielzellen spezifisch verstärkt transduziert werden können, bieten sich viele Möglichkeiten für Weiterentwicklungen.

Die erfolgreiche Nutzung von drei strukturell unterschiedlichen Membranproteinen als Nb-assistierte Rezeptoren für AAVs deutet an, dass auch zahlreiche andere Membranproteine diese Rolle übernehmen können. Aufgrund der exzellenten physikochemischen Eigenschaften von Nanobodies und der einfachen Formatierungsmöglichkeiten (Krah *et al.* 2016), könnten beide Strategien durch den Austausch der Membranprotein-spezifischen Nbs auf andere Zellpopulationen übertragen werden, die z.B. in Tumor- oder Gentherapie von Interesse sind.

Für die Weiterentwicklung der bispezifischen Adapterproteine könnten weitere AAV-spezifische Nbs hergestellt und evaluiert werden und auch Kombinationen AAV-spezifischer Nbs bzw. Kombinationen verschiedener Adapterproteine getestet werden. Eine bessere Kenntnis der Bindeepitope könnte dabei zusätzlich Auskünfte über mögliche Funktionen des Capsids liefern. Von großem Interesse wäre die Klärung der Frage, ob Adapterproteine auch als Schutzschild vor neutralisierenden Antiköpern dienen könnten. Dies könnte z.B. in Transduktionsversuchen mit der Zugabe von Seren AAV-immunisierter Mäuse oder humanen intravenösen Immunglobulinen (IVIG) ermittelt werden.
Als Voraussetzung für klinische Anwendungen wird es essentiell sein, die beiden Strategien *in vivo* in Mausmodellen zu testen. Um zu evaluieren, ob der Tropismus der AAVs durch den Einbau von Nbs oder den Einsatz bispezifischer Adapterproteine verändert wird und die Zielzellen auch *in vivo* transduziert werden, könnten GFP- oder Luciferase-kodierende AAVs in WT-Mäuse und in Zielrezeptor-*knock out* (KO)-Mäuse injiziert werden. Anschließend könnten nach Organentnahme mittels Luminometer (bei Luciferase-kodierenden AAVs), Durchflusszytometrie (bei GFP-kodierenden AAVs) sowie mittels quantitativer PCR Unterschiede in der viralen Transduktion ermittelt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Testung der beiden Strategien *in vivo* könnte ein Xenograft-Tumormodell sein. Dazu würde immunsupprimierten Mäusen jeweils in eine Flanke Rezeptor-exprimierende HEK293 Zellen und in die andere Flanke Rezeptor-negative HEK293 Zellen injiziert werden. Nachdem die Zellen zu Tumoren angewachsen sind, könnten Luciferase-kodierende AAVs (und bispezifische Adapterproteine) injiziert werden und die Transduktion der Tumorzellen in einem Biolumineszenz Imaging System analysiert werden. So könnte vergleichend evaluiert werden, ob die Rezeptor-exprimierenden Tumorzellen bevorzugt transduziert werden.

Zusammengefasst stellen die beiden in dieser Arbeit etablierten, Nanobody-basierten Strategien zur Optimierung der Zellspezifität von AAVs gute Ansätze für die Weiterentwicklung Adeno-assoziierter viraler Vektoren für die Gen- und Tumortherapie dar. Es konnte gezeigt werden, dass Nanobodies in der Tat nützliche Werkzeuge für die Verbesserung der Zellspezifität Adeno-assoziierter Viren sein können.

5 Materialien

5.1 Laborgeräte

Tabelle 5.1: Verwendete Laborgeräte und deren Hersteller

Laborgerät	**Modell**	**Hersteller**
Analysenwaage	Analytical Plus	Ohaus
Autoklav	Modell 2540 EL	Tuttnauer Europe
Autoklav	Evo 130 Typ II	MediTech Service GmbH
Brutschrank Bakterien	Biotherm 37	Julabo
Bakterieninkubator	Multitron Pro	Infors HT
Bakterieninkubator	Ecotron	Infors HT
Brutschrank CO_2 Inkubator	MCO-20AIC	Sanyo Electric Co.
ELISA Platten-Reader	Victor^3 1420	Perkin-Elmer
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences
Heizblock	Thermomixer kompakt	Eppendorf
Laufkammern Agarose-Gelelektrophorese	Modell 40-0708	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Laufkammern für SDS-PAGE	XCell SureLock MiniCell	Thermo Fisher Scientific
Mikropipetten	Modell Research	Eppendorf
pH-Meter	Toledo MP220	Mettler
Photometer	Nanodrop 2000c	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Photometer	Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Real-Time PCR-System	StepOne Plus	Applied Biosystems
Roller	Mixer SRT6	Stuart
Spannungsgerät Agarose-Gelelektrophorese		Biometra GmbH
Spannungsgerät SDS-PAGE	PowerPac 200	BioRad
Sterile Werkbank	Gelaire Typ BSB4	Gelman
Thermocycler	T3/T Gradient	Biometra
Tischzentrifuge	5424	Eppendorf
Tischwaage	Scout Pro	Ohaus
UV-Transilluminator	Typ TI1	Biometra
Wasserbad	Modell 1007	Gesellschaft für Labortechnik
Zentrifuge	Rotana 460 R	Hettich

5.2 Chemikalien

Die verwendeten Standardchemikalien zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurden von den Firmen BD Biosciences, Carl Roth GmbH + Co. KG, GE Healthcare, Merck oder Thermo Fisher Scientific bezogen. Chemikalien anderer Hersteller oder für spezielle Anwendungen sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 5.2: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller

Chemikalie	**Hersteller**
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Pierce™/Thermo Fisher Scientific
Amersham ECL Western Blotting Detection R.	GE Healthcare
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG
BSA	Sigma-Aldrich/Merck
Blasticidin	InvivoGen
Carbenicillin	Sigma-Aldrich/Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich/Merck
DMEM (*dulbecco's modified eagle medium*)	Gibco™/Thermo Fisher Scientific
DNA Gel Loading Dye (6x)	New England Biolabs
eFluor450	eBioscience™/Thermo Fisher Scientific
FastStart Essential DNA Green Master Mix	Roche
FCS (*fetal calf serum*)	Gibco™/Thermo Fisher Scientific
G418	Gibco™/Thermo Fisher Scientific
Geneticin	Gibco™/Thermo Fisher Scientific
HIS-Select Nickel Affinity Gel	Sigma-Aldrich/Merck
IgG Elution buffer pH2,8	Thermo Fisher Scientific
Kanamycin	Sigma-Aldrich/Merck
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
Phosphate buffered saline (PBS)	Gibco™/Thermo Fisher Scientific
Pluronic F-68	Gibco™/Thermo Fisher Scientific
Polyethylenglycol (PEG) MW 8000	Carl Roth GmbH + Co.
Polyethylenimin (PEI), MW25000	Polysciences, Inc.
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare
TAE-Puffer (50x) UltraPure DNA Typing Grade	Thermo Fisher Scientific
Triton X-100	Sigma-Aldrich/Merck
Tryptone N1	Organo Technie
Tween-20	Sigma-Aldrich/Merck

5.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 5.3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer	**Zusammensetzung**
Puffer für ELISA:	
Blockierungspuffer	1 % BSA in PBS
Waschpuffer	0,05 % Tween-20 in PBS
Antikörperlösung	1 % BSA in PBS
Stopplösung	0,5 M Schwefelsäure
Puffer für SDS-PAGE:	
NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10x)	500 mM Dithiothreitol (DTT)
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4x)	Lithiumdodecylsulfat (pH 8,4)
MES-Laufpuffer	50 mM MES, 50 mM TrisBase, 1 % SDS, 1 mM EDTA (pH 7,3)
Puffer für Western Blot:	
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 20 % Methanol (pH 8,3)
Blotpuffer	5 % Transferpuffer, 10 % Methanol, 0,1 % Antioxidans
TBS	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH7,4)
Waschpuffer (TBST)	0,1 % Tween-20 in TBS
Blockierungspuffer	5% Milchpulver (w/v) in TBST
Puffer für Transfektion/AAV Produktion:	
PEI (Polyethylenimin)	7,5 mM 25 kDa lineares Polyethylenimin (Polysciences Inc.), 0,333 mg/ml gelöst in H_2O bei 60 °C, steril filtriert
NaCl 300 mM	300 mM NaCl in H_2O, steril filtriert
PBS-MK (10x)	PBS (10x), 10 mM $MgCl_2$, 25 mM KCl, steril filtriert
Puffer für die chromatographische Aufreinigung rekombinanter Proteine:	
Elutionspuffer Ni-NTA	50 mM Natriumphosphat, 0,3 M NaCl, 250 mM Imidazol (pH 8,8)

IgG Elution Buffer (Protein G)	Thermo Fisher Scientific (pH 2,8)
Neutralisationspuffer Protein G	1 M Tris (pH 9)
Puffer für Agarose-Gelelektrophorese:	
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50x)	2 M Tris-Acetat, 50 mM EDTA
Ladepuffer (6x)	2,5 % Ficoll-400, 11 mM EDTA, 3.3 mM Tris-HCl, 0,017 % SDS, 0,015 % Bromphenolblau (pH 8)
Waschpuffer für Immunpräzipitation	0,5% Triton X-100 in PBS
FACS-Puffer	0,02 % BSA in PBS

5.4 Medien

Tabelle 5.4: Zusammensetzung der verwendeten Medien

Medium	**Zusammensetzung**
Medien für eukaryotische Zellkultur:	
DMEM Komplettmedium	DMEM (Gibco™), 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 x nicht-essentielle Aminosäuren, 10 % FCS
L-Cell Medium	Überstand von L929 Zellen kultiviert in RPMI 10 % FCS; enthält M-CSF; dankend erhalten von Juan J. Martínez García, Pablo Pelegrin Lab, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spanien
F17 Komplettmedium	FreeStyle™ F17 Expression Medium (Gibco™), 4 mM L-Glutamin, 1 % FCS, 0,5 % G418
F17 Transfektionsmedium	FreeStyle™ F17 Expression Medium (Gibco™), 4 mM L-Glutamin, 0,1 % Pluronic
F293 Medium	FreeStyle™ 293 Expression Medium (Gibco™)
F17/F293 *feeding* Medium	F17 Transfektionsmedium/F293 Medium, 20 % (w/v) Tryptone N1

Medien für Bakterienkulturen:	
LB-Medium	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl (pH7)
LB-Agar	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar Agar (pH7)
SOC-Medium	8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM $MgSO_4$, 20 mM Glucose, 2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt

5.5 Antikörper

Nachfolgend sind die in der Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt. Antikörper, die im Rahmen der Arbeit selbst kloniert und produziert wurden, sind nicht aufgelistet.

Tabelle 5.5: Eigenschaften der verwendeten Antikörper und ihre Hersteller

Antigen	**Klon**	**Wirt**	**Konjugat**	**Hersteller**
ARTC2.2	s-14	Lama	-	AG Nolte
ARTC2.2	s+16a-hFc	Lama	AF647	AG Nolte
c-Myc	polyklonal	Kaninchen	HRP	Sigma-Aldrich/Merck
c-Myc	9E10	Maus	AF647	AG Nolte
CD38, human	274	Lama	-	AG Nolte
CD38, human	370	Lama	-	AG Nolte
CD38, human	1053	Lama	-	AG Nolte
CD38, human	1067	Lama	-	AG Nolte
CD38, human	JK19	Lama	-	AG Nolte
CD38, human	JK36-hFc	Lama	AF647	AG Nolte
Kaninchen IgG	polyklonal	Esel	HRP	GE Healthcare
Kaninchen IgG	polyklonal	Ziege	AF647	Molecular Probes
P2X7, murin/human	1c81	Lama	-	AG Nolte
P2X7, murin	RH23A44#16 (Hano44)	Ratte	AF647	AG Nolte
VP1, VP2, VP3	B1	Maus	-	AG Trepel, UKE

5.6 Rekombinante AAVs

Tabelle 5.6: Die verwendeten rAAVs und ihre Herkunft

Name	**Herkunft**
gereinigte AAV1 (ELISA Abb. 3.1, Abb. 3.17): AAV1-CMVieCBA8G11_Fc_rBMpA ($2{,}13*10^{13}$ vg/ml)	Sahil Adriouch, Inserm U905, Universität Rouen, Frankreich
gereinigte AAV2 (ELISA Abb. 3.1, Abb. 3.17): ssAAV2-p10/CMV-GFP ($1{,}43*10^{13}$ vg/ml)	Ingke Braren, Vector Facility UKE
gereinigte $AAV2^{RA}$ (Abb. 3.12, Abb. 3.19, Abb. 3.20): $dsAAV2^{RA}$-CMVeGFP ($3{,}5*10^{11}$ vg/ml)	eigene Herstellung (6.3.1 und 6.3.2); aufgereinigt über Iodixanolgradienten mit Hilfe von Jakob Körbelin, AG Trepel, UKE, nach in der AG etabliertem Protokoll (Körbelin 2013)
gereinigte AAV1 (Abb. 3.15, Abb. 3.19, Abb. 3.20): ssAAV1-CMV-GFP ($1{,}2*10^{12}$ vg/ml)	Ingke Braren, Vector Facility UKE
gereinigte AAV1-P5 (Abb. 3.16): AAV1-P5-CMV-YFP ($2{,}5*10^{11}$ vg/ml)	Dirk Grimm, Universität Heidelberg

5.7 Plasmide

Tabelle 5.7: Die verwendeten Plasmide, ihre Herkunft und ggf. Referenz

Name	**Herkunft**	**Referenz**
pCSE2.5_rbIgGFc	Thomas Schirrmann, IHK Braunschweig, pCSE2.5 mit *rabbit* IgG-Fc Sequenz zwischen den *NotI* und *XbaI* Schnittstellen	Jäger *et al.* 2013
pCSE2.5_HISmyc	in der AG Nolte hergestellte Variante von pCSE2.5 mit Hexahistidin- und c-Myc-Tag zwischen den *NotI* und *XbaI* Schnittstellen	
pKB-scFvA20-2xCBD	Martin Trepel, Onko-/Haematologie, UKE	
pXX2 (AAV2)	Martin Trepel, Onko-/Haematologie, UKE	X. Xiao *et al.* 1998

pXX6	Martin Trepel, Onko-/Haematologie, UKE	X. Xiao *et al.* 1998
scAAV-CMVeGFP	Martin Trepel, Onko-/Haematologie, UKE	McCarty *et al.* 2001
pRC_RR_VP1_r1c3	Junghae Suh, Rice University, Houston, Texas, USA	Judd *et al.* 2012
pRC_RR_VP2-3	Junghae Suh, Rice University, Houston, Texas, USA	Judd *et al.* 2012
pHMX-VP2	Christian Buchholz, Paul-Ehrlich-Institut, Langen	Münch *et al.* 2013
pRCVP2koA	Hildegard Büning, Medizinische Hochschule Hannover	Münch *et al.* 2013

5.8 Größenstandards für Proteine und DNA

Tabelle 5.8: Verwendete Größenstandards für Proteine und doppelsträngige DNA

Name	**Hersteller**
Größenstandards für DNA:	
GeneRuler 1 Kb DNA ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 100 bp DNA ladder	Thermo Fisher Scientific
Größenstandards für Proteine:	
Supermark	AG Nolte (75 µg/ml IgG, 100 µg/ml BSA, 10 µg/ml Lysozym)
MagicMark™ XP Western Standard	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
Precision Plus Protein Kaleidoscope	Bio-Rad

5.9 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs, Thermo Fisher Scientific, Promega und Roche bezogen.

5.10 Oligonukleotide

Alle eingesetzten Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich und Eurofins synthetisiert. Die Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

5.11 Zelllinien

Tabelle 5.9: Die verwendeten pro- und eukaryotischen Zellen.

Name	**Hersteller**
prokaryotische Zellen:	
XL-2 Blue *E. coli*	Stratagene
XL-10 Gold *E. coli*	Agilent Technologies
SURE2 *E. coli*	Agilent Technologies
eukaryotische Zellen:	
HEK293T, untransfiziert	erhalten von Dr. Carol Stocking (HPI)
HEK293^{P2X7}	stabil transfiziert in AG Nolte mit murinem P2X7
HEK293^{ART}	stabil transfiziert in AG Nolte mit ARTC2.2
HEK293^{CD38}	stabil transfiziert in AG Nolte mit humanem CD38
HEK293AAV	Cell Biolabs/ erhalten von Ingke Braren (UKE)
HEK293-6E	erhalten von Dr. Yves Durocher (lizensiert von NRC Canada)

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

6.1.1 Quantifizierung von Desoxyribonukleinsäure

Die Quantifizierung von doppelsträngiger DNA erfolgte mittels eines UV-Vis-Spektralphotometers (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific). Die Absorption der Probe wurde bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge gemessen, um Konzentration und Reinheit zu bestimmen. Die Konzentration wurde mit der Formel A_{260} *x 50 ng/µl x Verdünnung* errechnet. Ein Maß für die Reinheit der Probe ist die Ratio zwischen A_{260}/A_{280}. Werte zwischen 1,8-2,0 wurden als rein bewertet. Niedrigere Werte können auf Verunreinigungen mit Phenolen, Proteinen oder anderen Substanzen deuten.

6.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der gezielten Vervielfältigung von DNA-Fragmenten und erfolgt in drei Schritten. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang bei 95 °C denaturiert. Anschließend lagern sich Oligonukleotide (Primer) bei ca. 50-68 °C - abhängig von ihrer Schmelztemperatur - an die komplementären DNA-Fragmente an, welche die zu vervielfältigende Sequenz flankieren. Im letzten Elongationsschritt synthetisiert die DNA-Polymerase bei 70 °C den komplementären DNA-Strang aus freien dNTPs. Die zyklische Wiederholung von Denaturierung, Anlagerung und Elongation führt zur exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten DNA-Fragments. Eine Standard-PCR wurde mit der KOD-Polymerase und mitgelieferten Reagenzien durchgeführt.

Tabelle 6.1: Reaktionsansatz einer PCR mit KOD-Polymerase.

Reagenz	**Volumen**	**Konzentration (final)**
10x Puffer für KOD-Polymerase	5 µl	1x
dNTPs (je 2 mM)	5 µl	je 0,2 mM
$MgSO_4$ (25 mM)	2 µl	1 mM
Sense-Primer (10 µM)	2 µl	400 nM
Antisense-Primer (10 µM)	2 µl	400 nM
KOD-DNA-Polymerase (1 U/µl)	1 µl	0,02 U/µl
DNA (ca. 1 ng)	x µl	
ddH_2O	ad 50 µl	

Für die Amplifikation GC-reicher DNA-Sequenzen wurden auch die Q5-Polymerase und mitgelieferte Reagenzien verwendet.

Tabelle 6.2: Reaktionsansatz einer PCR mit Q5-Polymerase.

Reagenz	**Volumen**	**Konzentration (final)**
5x Puffer für Q5-Polymerase	4 µl	1x
dNTPs (je 2 mM)	2 µl	je 0,2 mM
5x Q5 High GC Enhancer	4 µl	1x
Sense-Primer (10 µM)	1 µl	500 nM
Antisense-Primer (10 µM)	1 µl	500 nM
Q5-DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,2 µl	0,02 U/µl
DNA (ca. 1 ng)	x µl	
ddH_2O	ad 20 µl	

Die PCR wurde im Thermocycler mit folgendem Standard-Programm durchgeführt und dieses gegebenenfalls nach Angaben der Polymerase-Hersteller angepasst.

Tabelle 6.3: Programm einer Standard-PCR.

Reaktionsschritt	**Temperatur (in °C)**	**Zeit (in s)**	**Zyklen**
1. Primäre Denaturierung	95	120	1
2. Denaturierung	95	20	
3. Primer-Anlagerung	50 - 68	15	30
4. Elongation	70	20-30/kb	
5. Finale Elongation	70	300	1
6. Pause	4	∞	

6.1.3 Restriktionsverdau mit Endonukleasen

DNA-Fragmente und Plasmid-DNA wurden für Klonierungen und Größenanalysen mit den Enzymen (Endonukleasen) und zugehörigen Puffern der Firma New England Biolabs (NEB) gespalten. Endonukleasen schneiden doppelsträngige DNA in spezifischen kurzen palindromischen Sequenzen. Temperatur und Puffer wurden je nach Enzym nach Angabe des Herstellers gewählt. Für Restriktionen mit jeweils zwei Enzymen wurde das Online-Tool "Double Digest Finder" von NEB herangezogen. Die Ansätze erfolgten in einem Volumen von 30 µl in einem Thermocycler, wobei jeweils 1U Endonuklease eingesetzt wurde, um 0,5-1 µg DNA in 2-5 Stunden zu spalten. Im Anschluss an den Restriktionsverdau erfolgte je nach verwendeten Enzymen eine Hitzeinaktivierung bei 65 °C oder 80 °C für 20 Minuten.

6.1.4 Dephosphorylierung von Plasmid DNA

Enzymatisch gespaltene Plasmid-DNA, die in Klonierungen als Vektor-Rückgrat diente, wurde enzymatisch endständig dephosphoryliert, um eine Rezyklierung zu vermeiden. Dazu wurde im Anschluss an den Restriktionsverdau 1 µl Antarktische Phosphatase (New England Biolabs) und 3 µl des zehnfach konzentrierten zugehörigen Puffers zum Reaktionsansatz hinzugefügt und dieser für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

6.1.5 Agarose-Gelelektrophorese und Gelaufreinigung von DNA

Agarose-Gelelektrophorese wurde angewendet, um DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen und zu isolieren. 0,8% Agarose wurde in TRIS-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer unter Erhitzen gelöst und anschließend in eine Gelkammer gegossen. Zu 50 ml oder 100 ml Agarose-Lösung wurden jeweils 2,5 µl oder 5 µl Roti®-GelStain (Carl Roth GmbH + Co. KG) hinzugefügt und ein Probenkamm gesetzt. Nach Aushärtung wurde das Gel in eine Laufkammer überführt und mit TAE-Puffer bedeckt. Proben wurden mit sechsfach konzentriertem Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen übertragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-120 V für 30-50 Minuten. Die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol FF zeigen den Fortschritt der Elektrophorese anhand sichtbarer farbiger Banden, so dass eine optische Kontrolle möglich war. Die anschließende Dokumentation des Agarose-Gels erfolgte unter UV-Licht in einem Transilluminator mit Video-Image-System (BioVision 3000 WL). Die Verwendung eines mitgelaufenen DNA-Standards erlaubte eine vergleichende Analyse der Größe der DNA-Banden. DNA-Fragmente, die für Klonierungen weiterverwendet werden sollten, wurden auf einem UV-Transilluminator ohne Dokumentationssystem (Type TI1, Biometra) unter UV-Licht kenntlich. Das entsprechende Gelstück wurde ausgeschnitten und die DNA mit dem Kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben isoliert.

6.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation werden DNA-Fragmente miteinander verknüpft, deren Nukleotidüberhänge zueinander komplementär sind. 100-200 ng enzymatisch gespaltene und gereinigte Plasmid-DNA, die als Vektor-Rückgrat diente, wurde im molaren Verhältnis 1:3 zu gereinigten enzymatisch gespaltenen DNA-Fragmenten

(Inserts) eingesetzt. Das Enzym Ligase katalysiert die Bildung der Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxygruppe der DNA unter Verwendung von ATP. Die Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 20 µl unter Verwendung der T4-Ligase (New England Biolabs) und zugehörigem zehnfach konzentriertem Puffer angesetzt und für 16 h bei 14 °C inkubiert. Es folgte eine Hitzeinaktivierung der Ligase für 10 Minuten bei 65 °C.

6.1.7 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterienzellen

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* XL-2 Blue (Stratagene) Bakterienzellen mit Plasmid-DNA erfolgte mittels Hitzeschock. Dazu wurde ein 100 µl Aliquot der Zellen aus Lagerung bei -80 °C auf Eis aufgetaut und auf zwei Ansätze verteilt. Zu je 50 µl Zellen wurden 1-10 ng Plasmid-DNA oder 2 µl eines Ligationsansatzes pipettiert und diese für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad, wonach die Proben nochmals für 2 Minuten auf Eis inkubiert wurden. 450 µl vorgewärmtes SOC-Medium wurde zu den Ansätzen hinzugefügt und die Bakterien bei 37 °C für eine Stunde schüttelnd (250 rpm) kultiviert. Anschließend wurden 20 µl der Plasmid-DNA-Kulturen oder 50 µl der Ligations-Kulturen unter sterilen Bedingungen auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C invertiert inkubiert.

Das Plasmid *scAAV-CMVeGFP* enthält invertierte repetitive Sequenzen (ITRs) für die Verpackung der DNA in das virale Capsid. ITRs sind instabil in regulären *E. coli* Zellen und werden häufig während der Replikation deletiert, während Plasmide ohne diese Sequenzen einen Replikationsvorteil aufweisen. Daher wurde das Plasmid *scAAV-CMVeGFP* mittels Hitzeschock nach gleichem Protokoll in 100 µl SURE2 Zellen (Agilent Technologies) transformiert, die für irreguläre Sequenzen optimiert sind (Gray *et al.* 2011).

6.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde in *E. coli* Bakterienzellen vervielfältigt und mit kommerziell erhältlichen Kits isoliert. Plasmid-Isolierungen geringer Mengen (ca. 20 µg DNA) wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Dazu wurden 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer einzelnen Bakterienkolonie einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 240 rpm

kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Isolierung größerer Mengen Endotoxin-freier Plasmid-DNA (ca. 500 µg) wurde das EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet. Hierfür wurden 100 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in sterilen Glaskolben mit einer Bakterienkolonie oder einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 240 rpm kultiviert. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben.

Das Plasmid *scAAV-CMVeGFP* wurde aufgrund verminderter Replikationsfähigkeit mit dem Kit NucleoBond Maxi EF (Macherey-Nagel) isoliert, das ein größeres Volumen Bakterienkultur erlaubt. Die Isolierung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Für die Isolierung wurden nur Klone verwendet, die zuvor auf die Integrität des Plasmids mittels Restriktionsverdau mit dem Enzym *SmaI* (New England Biolabs) überprüft wurden. *SmaI* spaltet die DNA innerhalb der ITRs. Als intakt wurden Plasmide gewertet, bei denen in der Agarose-Gelelektrophorese eine einzelne prominente Bande bei ca. 3.700 bp und eine Bande bei ca. 1000 bp sichtbar waren. Eine zusätzliche Bande bei ca. 4.700 bp deutet auf linearisierten Vektor mit partiell verlorenen ITRs hin. Isolierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

6.1.9 DNA-Sequenzierungen

Sequenzierungen der DNA erfolgten mit der Didesoxymethode nach Sanger und wurden von den Firmen SeqLab (Göttingen) und Eurofins (Ebersberg) durchgeführt. Für Sequenzierungen bei SeqLab wurden 500-700 ng DNA mit 20 pmol des Sequenzierprimers und deionisiertem Wasser in 7 µl Volumen angesetzt. Für Sequenzierungen bei Eurofins wurden zu 50-100 ng/µl DNA in deionisiertem Wasser in 15 µl Volumen 2 µl Sequenzierprimer (10 µM) hinzugefügt. Die Auswertung der Sequenzierdaten erfolgte mit dem Programm 4Peaks (Nucleobytes).

6.1.10 Künstliche Gensynthese

Die künstliche Gensynthese dient der Neusynthese von DNA-Fragmenten ohne die Verwendung bereits bestehender DNA-Matrizen als Ausgangsmaterial. Sie basiert auf der Methode zur Synthese von Oligonukleotiden, der Phosphoramidit-Synthese. Gensynthesen wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Dazu wurde die gewünschte Aminosäure- oder Nukleotidsequenz, unter Nutzung der firmeneigenen online verfügbaren GeneOptimizer™ Software, für die anschließende Proteinexpression in humanen Zellen optimiert. Die Software verwendet einen

Algorithmus, der je nach Organismus präferierte Codons aussucht und dabei Transkription, Splicing, Translation und mRNA Stabilität berücksichtigt. Die zur Synthese beauftragte Sequenz wurde mit passenden Restriktionsstellen für spätere Klonierungen flankiert. Das synthetisierte DNA-Fragment wurde von Thermo Fisher Scientific im Vektor *pMA-T* lyophilisiert geliefert und in 25 µl destilliertem Wasser gelöst.

6.1.11 Fusion von Nb 1c81 an den N-Terminus des VP2 Capsidproteins

Die Fusion des Nbs 1c81 an den N-Terminus des VP2 Capsidproteins von AAV2^{RA} erfolgte mittels Restriktionsverdau und anschließender Ligation. Der 1c81-kodierende Phagemidvektor pAX50 sowie der Zielvektor *pHMX-VP2* wurden mit den Endonukleasen *NotI* und *SfiI* sequentiell für 1 Stunde bei 37 °C und 1 Stunde bei 50 °C gespalten (siehe auch 6.1.6). Die weiteren Klonierungsschritte erfolgten wie in 6.1.7 bis 6.1.9 beschrieben.

6.1.12 Insertion eines Nbs in das VP1 Capsidprotein

Um eine VHH in das VP1 Capsidprotein von AAV2^{RA} zu insertieren, wurde zunächst die VHH-kodierende Region aus dem eukaryotischen Vektor pCSE2.5 mittels PCR vervielfältigt (6.1.2). Die dafür entworfenen synthetischen Oligonukleotide (Primer) (Anhang 8.4) fügen gewünschte flankierende Sequenzen an die VHH-kodierenden Inserts an. Im Sense-Primer ist die Restriktionsstelle GCCGGC eingefügt, die von der Endonuklease *NgoMIV* erkannt wird. Im Antisense-Primer befindet sich die Erkennungssequenz GGCGCC der Endonuklease *KasI*. Desweiteren kodieren die Primer für die Abfolge von vier Aminosäuren Glycin und einem Serin (GGGGS) in variabler Wiederholung für die Generierung eines flexiblen Peptidlinkers. N-terminal der VHH wurde ein fünffacher GS-Linker, $(GGGGS)_5$, und C-terminal ein einfacher GA-Linker, $(GGGGA)_1$, angehängt. Um bei PCR-Amplifikationen die Entstehung von Primer-Dimeren anstelle des Zielamplikons aufgrund komplementärer Sequenzen im Sense- und Antisense-Primer zu verhindern, wurde die Amplifikation in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde jeweils nur der Sense- oder Antisense-Primer mit einem kurzen Standard-Sequenzierprimer, *CMV_fn* bzw. *BGH_rev*, in der PCR kombiniert. Anschließend wurde das Amplikon als Matrize für eine *nested* PCR mit Sense- und Antisense-Primer gemeinsam verwendet (Abb. 6.1). Das resultierende Amplikon wurde mit dem Kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) nach

Herstellerangaben isoliert. Analog zum Restriktionsverdau von 2 µg des Zielvektors *pRC_RR_VP1_r1c3* erfolgte die enzymatische Spaltung mit *NgoMIV* und *KasI* bei 37 °C für 5 Stunden (vgl. 6.1.3). Die weiteren Klonierungsschritte wurden wie in 6.1.4 bis 6.1.9 durchgeführt.

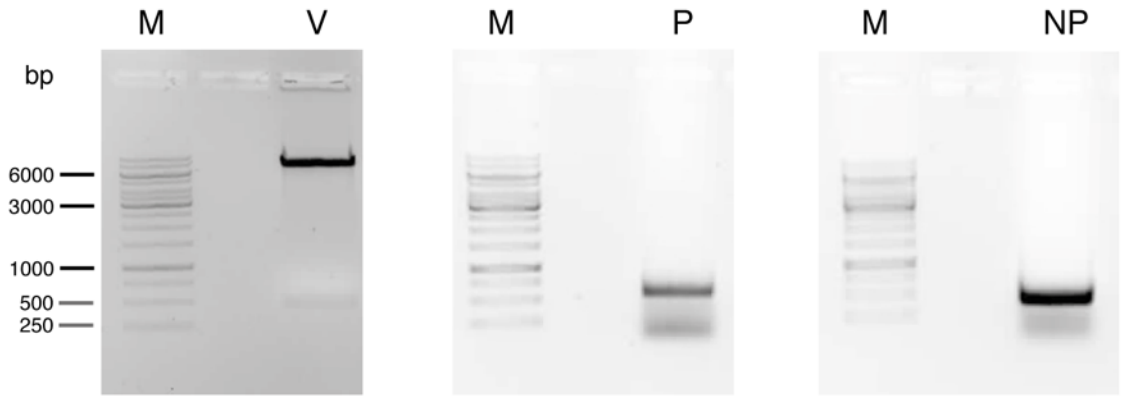

Abb. 6.1: Insertion einer VHH in das VP1 Capsidprotein mittels Klonierung.
Gezeigt sind Agarosegele nach elektrophoretischer Auftrennung eines beispielhaften Restriktionsverdaus des Zielvektors *pRC_RR_VP1-r1c3* (V) mit den Endonukleasen *NgoMIV* und *KasI* sowie beispielhaft die Amplifikation des Nbs 370 unter Anfügung der Restriktionsstellen und GS-Linker Sequenzen. Um die Entstehung von Primerdimeren in der PCR aufgrund komplementärer Sequenzen in Sense- und Antisense-Primer zu verhindern, wurde das VHH-kodierende Fragment zunächst nur mit dem Antisense-Primer und einem Standard-Sequenzierprimer amplifiziert (P). Im zweiten Schritt wurde das PCR-Amplikon als Matrize für eine *nested* PCR (NP) mit Sense- und Antisense-Primer gemeinsam verwendet. Das resultierende Amplikon wurde mit den Endonukleasen *NgoMIV* und *KasI* geschnitten und mit dem Vektor-Rückgrat ligiert. M = Molekulargewichtsmarker.

6.1.13 Gezielte Mutagenese mittels PCR

In den AAV Capsid-kodierenden Plasmiden *pXX2*, *pRC_RR_VP2-3* und *pRC_RR_VP1-Nb* wurden jeweils die zwei Basentripletts, die für die Aminosäure Arginin an Position 585 und 588 kodieren, zu Alanin-kodierenden Tripletts mutiert. Die Mutationen wurden mittels PCR-Amplifikation eingefügt. Dabei wird ein Primerpaar verwendet, das die gewünschte Änderung der Nukleotidsequenz beinhaltet. Die gezielten Mutagenesen wurden mit Hilfe des Kits QuikChange II Site-Directed Mutagenesis von Agilent Technologies durchgeführt. Sense- und Antisense-Primer (Anhang 8.4) wurden nach in der Anleitung vorgeschlagenen Richtlinien entworfen. Es wurden die im Kit enthaltenen Reagenzien verwendet.

Tabelle 6.4: Reaktionsansatz einer PCR mit PfuUltra Polymerase

Reagenz	**Volumen**	**Konzentration (final)**
10x Puffer für *PfuUltra* Polymerase	5 µl	1x
dNTPs (je 2 mM)	5 µl	je 0,2 mM
Sense-Primer 'MutR585-8A_for' (100 ng/µl)	1,25 µl	125 ng
Antisense-Primer 'MutR585-8A_rev' (100 ng/µl)	1,25 µl	125 ng
PfuUltra HF DNA Polymerase (2.5 U/µl)	1 µl	0,05 U/µl
Plasmid-DNA (10 ng/µl)	1 µl	
ddH_2O	35,5 µl	

Die Reaktionen wurden im Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt.

Tabelle 6.5: Programm einer Mutagenese-PCR.

Reaktionsschritt	**Temperatur (in °C)**	**Zeit**	**Zyklen**
1. Primäre Denaturierung	95	60 s	1
2. Denaturierung	95	50 s	
3. Primer-Anlagerung	60	50 s	18
4. Elongation	68	9 min	
5. Finale Elongation	68	7 min	1
6. Pause	4	∞	

Das eingesetzte DNA-Plasmid wird während der PCR unter der Verwendung des Primerpaares, das die gewünschten Mutationen enthält, vollständig amplifiziert. Anschließend wird die eingesetzte parentale DNA mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut, das ausschließlich methylierte DNA spaltet. Nach erfolgter PCR-Amplifikation wurde 1 µl *DpnI* (10 U/µl) zum Reaktionsansatz hinzugefügt, eine Stunde bei 37 °C inkubiert und das Enzym für 20 Minuten bei 80 °C hitzeinaktiviert. Im Anschluss wurden ultrakompetente XL-10 Gold Bakterienzellen mit den neu synthetisierten DNA-Plasmiden mittels Hitzeschock transformiert. Dazu wurde 1 Aliquot der Zellen aus der Lagerung bei -80 °C entnommen und je 45 µl auf zwei Ansätze verteilt. Je 2 µl ß-Mercaptoethanol wurden hinzugefügt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden 2 µl des PCR-Ansatzes hinzu pipettiert und weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation mittels Hitzeschock und weitere Schritte erfolgten wie in 6.1.7 bis 6.1.9.

6.1.14 Klonierung AAV-spezifischer Antikörper

6.1.14.1 Das scFv des monoklonalen Antikörpers A20

Die Nukleotidsequenz des scFv des monoklonalen murinen Antikörpers A20 wurde dem Plasmid *pKB-scFvA20-2xCBD* entnommen. Für die Expression in eukaryotischen HEK293-6E Zellen wurde die Nukleotidsequenz mit der GeneOptimizer™ Software optimiert und von der Firma Thermo Fisher Scientific chemisch synthetisiert (vgl. 6.1.10). Die Umklonierung aus dem Vektor *pMA-T* erfolgte wie in 6.1.3 bis 6.1.9 beschrieben über die Restriktionsstellen *NcoI* und *NotI* in den eukaryotischen Vektor pCSE2.5, jeweils mit C-terminalem Hexahistidin- und c-Myc-T*ag* (*pCSE2.5_HISmyc*) sowie fusioniert an die konstante C_H2 und C_H3 Domäne eines Kaninchen IgG Antikörpers (*pCSE2.5_rbIgGFc*).

6.1.14.2 Die VHH der Affinitätsmatrix AVB Sepharose

Zur chromatografischen Aufreinigung der AAV Serotypen 1, 2, 3 und 5 ist die Affinitätsmatrix AVB Sepharose der Firma GE Healthcare Life Sciences erhältlich. Ligand der Matrix ist ein Einzeldomänen-Antikörper, der aus einer naiven Lama Phagen-Display Bibliothek selektioniert wurde (Oranje *et al.* 2004). Da die Aminosäuresequenz der VHH nicht veröffentlicht ist, wurde sie zu Forschungszwecken massenspektrometrisch analysiert. Das kommerziell erhältliche ELISA Kit CaptureSelect™ AVB Sepharose HP Leakage (Thermo Fisher Scientific) wurde für die Detektion des Affinitätsliganden in Lösungen entwickelt, die mit der AVB Sepharose Matrix aufgereinigt werden. Zur Bestimmung der Quantität des Liganden ist ein Standardreagenz im Kit enthalten. Hiervon wurden viermal je 2 µl mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die enthaltenen Proteine mit Coomassie gefärbt. Es war jeweils eine Bande entsprechend der Größe eines Nanobodies von ca. 15 kDa sichtbar.

Die nachfolgend erläuterte enzymatische Behandlung der Proteine und die anschließende massenspektrometrische Analyse der Aminosäuresequenz des Nanobodies wurden von Dr. Friedrich Buck des Instituts für Klinische Chemie, UKE durchgeführt. Dazu wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und enthaltene Proteine mit Dithiothreitol (10 mM, 56 °C, 30 min) reduziert. Die Cystein-Seitenketten wurden mit Jodacetamid (55 mM, Raumtemperatur, 20 min im Dunkeln) modifiziert und die Proteine im Gel mit Trypsin, Chymotrypsin, LysC, AspN und GluC in 50 mM NH_4HCO_3 bei 37 °C für 16 h verdaut (5 ng/µl *sequencing grade* Protease; *modified*

trypsin und Chymotrypsin: Promega; LysC, AspN und GluC: Roche). Anschließend wurden die Gelstücke dreimal extrahiert (50 % Acetonitril/5 % Ameisensäure), die vereinigten Extrakte in einem Vakuumkonzentrator eingedampft und in 20 µl 0,1 % Ameisensäure aufgenommen. Für die Bestimmung der Gesamtmasse des Proteins wurde die in Lösung vorliegende Probe mit 0,1 % Ameisensäure auf eine Konzentration von 50 ng/µl gebracht. Die nach Verdau mit den verschiedenen Proteasen erhaltenen Peptide wurden mit der Methode des „static nanospray" auf einem QTOF-Massenspektrometer (QTOF Premier, Waters) vermessen. Dazu wurden die Proben an einen C18 µZipTip (Millipore®, Merck) gebunden, mit 1 µl 60 % Methanol/5 % Ameisensäure eluiert und in eine ausgezogene, mit Gold bedampfte Glaskapillare überführt, die in die Ionenquelle des Geräts eingespannt wurde. Der Electrospray wurde bei 650-750 V durchgeführt. Die Selektion der precursor-Ionen erfolgte manuell.

Zusätzlich wurden die verdauten Peptide auf einem Orbitrap-Tribrid-Massenspektrometer (Orbitrap Fusion, Thermo Scientific) gekoppelt mit einer Kapillar-HPLC (Dionex Ultimate 3000, Thema Scientific) aufgenommen (Fluß: 250 µl/min, Laufmittel A: H_2O/0,1 % Ameisensäure, B: Acetonitril/0,1 % Ameisensäure, Gradient: 2 % - 30 % B in 30 min). Die Precursor-Masse der Peptide wurde im Orbitrap-Detektor mit einem maximalen Fehler von 10 ppm gemessen, die Fragmentmassen nach Stoßfragmentierung im Ionenfallen-Detektor (max. Fehler: 0,2 Da).

Die Bestimmung der Gesamtmase des Nanobodies erfolgte ebenfalls durch „static nanospray" auf dem QTOF-Massenspektrometer. Die dabei erhaltenen multiplen m/z-Werte wurden mit Hilfe des Programms MaxEnt1 (Waters) deconvolutiert. Die Auswertung der MS/MS-Daten erfolgte jeweils manuell, wobei die Sequenzen bekannter Nanobodies als Vorlage verwendet wurden.

Die ermittelte Aminosäuresequenz wurde mit der GeneOptimizer™ Software von Thermo Fisher Scientific in eine Nukleotidsequenz übersetzt und chemisch synthetisiert (6.1.10). Das VHH-kodierende Insert wurde wie in 6.1.3 bis 6.1.9 beschrieben über die Erkennungssequenzen der Enzyme *NcoI* und *NotI* aus dem Vektor *pMA-T* in die Vektoren *pCSE2.5_HISmyc* und *pCSE2.5_rbIgGFc* kloniert.

6.1.15 Klonierung bispezifischer Adapterproteine

6.1.15.1 Dimere aus Nanobody und scFv

Die Klonierung bispezifischer Adapterproteine bestehend aus einer VHH und dem scFv des mAk A20 erfolgte mittels Drei-Wege-Ligation in den eukaryotischen Vektor *pCSE2.5_HISmyc*. Dafür wurden die Immunglobulin-kodierenden Sequenzen mittels PCR amplifiziert (6.1.2). Während der Amplifikation wurden gewünschte flankierende Sequenzen durch die Verwendung spezifisch entworfener synthetischer Oligonukleotide (Anhang 8.4) an die DNA-Fragmente angehängt.

Die nachfolgend N-terminal stehende VHH-kodierende Region wurde mit einem Sense-Primer amplifiziert, der die Erkennungssequenz des Enzyms *PciI* einfügt, sowie einem Antisense-Primer, der einen zweifachen GS-Linker und die Erkennungssequenz der Endonuklease *BamHI* einfügt. Die Amplifikation des scFv des mAk A20 erfolgte mit einem Sense-Primer, der ebenfalls die Erkennungssequenz des Enzyms *BamHI* und einen dreifachen GS-Linker hinzufügt, sowie einem Standard-Sequenzierprimer des Vektors *pCSE2.5* als Antisense-Primer. Die Amplikons wurden jeweils mit dem Kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben isoliert. Das VHH-kodierende Amplikon wurde mit den Enzymen *PciI* und *BamHI* gespalten, während das scFv-kodierende Amplikon mit *BamHI* und *NotI* gespalten wurde (6.1.3). Der Zielvektor *pCSE2.5_HISmyc* wurde mit den Endonukleasen *NcoI* und *NotI* enzymatisch gespalten und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und isoliert (6.1.5). Die Endonukleasen *NcoI* und *PciI* erzeugen zueinander komplementäre Nukleotidüberhänge der DNA. Es folgte eine Drei-Wege-Ligation, in der beide Amplikons in einem molaren Verhältnis von 1:1:3 zum Zielvektor eingesetzt wurden. Die Ligationsreaktion und folgende Schritte wurden wie in 6.1.6 bis 6.1.9 durchgeführt.

6.1.15.2 AE1-enthaltende Nanobody-Dimere

Für die Klonierung bispezifischer Adapterproteine bestehend aus zwei VHHs wurden die bereits hergestellten Plasmide mit Adapterproteinen aus VHH und scFv als Ausgangsmaterial verwendet (6.1.15.1). Die scFv-kodierende Sequenz wurde mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen *BamHI* und *NotI* entfernt und der Vektor als Rückgrat verwendet (vgl. 6.1.3-6.1.5). An ihre Stelle wurde die AE1-kodierende Sequenz gesetzt. Dazu wurde die VHH-kodierende Sequenz mittels PCR (6.1.2) amplifiziert und dabei die Erkennungssequenz für das Enzym *BamHI* sowie ein

dreifacher GS-Linker über einen entsprechenden Sense-Primer (Anhang 8.4) eingefügt. Die nächsten Klonierungsschritte erfolgten wie in Abschnitt 6.1.3 bis 6.1.9 beschrieben.

6.1.15.3 Nanobody-Dimere mit eigenen AAV-spezifischen Nanobodies

Die Klonierung der bispezifischen Adapterproteine mit eigenen AAV-spezifischen Nbs, die in der AG Nolte selektioniert wurden, wurde von Nikolina Pantelic im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt (Pantelic 2018). Die Plasmide mit AE1-enthaltenden Adapterproteinen wurden dafür als Ausgangsmaterial verwendet. Der Austausch der AE1-kodierenden Sequenz erfolgte wie in 6.1.15.2 für den Austausch des scFv's beschrieben.

6.1.16 Quantitative Echtzeit-PCR

Intakte AAVs übertragen ihre DNA als sogenanntes Transgen, z.B. ein Reportergen, in die Wirtszelle. Während der Produktion der AAVs in HEK293 Zellen erfolgt die Verpackung des Transgens (*scAAV-CMVeGFP*) in das virale Capsid. Bei diesem Prozess entstehen auch leere Capside, die kein Transgen enthalten. Mit der quantitativen Echtzeit-PCR kann die Zahl der Transgene, die in Capside verpackt wurden, in Zelllysaten oder Zellkulturüberständen einer AAV-Produktion ermittelt und damit der virale Titer bestimmt werden. Nicht-verpackte freie Plasmide werden zuvor durch Behandlung von Lysat und Überstand mit der Endonuklease Benzonase verdaut, welche freie DNA und RNA spaltet (6.3.2).

Zur Ermittlung der Anzahl verpackter Transgene mittels quantitativer PCR wurden die Ct-Werte der Proben mit denen einer Standardreihe bekannter Kopienzahlen des Plasmids *scAAV-CMVeGFP* verglichen. Die Standardreihe setzte sich aus sieben Werten von $1*10^7$ bis $1*10^1$ DNA Kopien zusammen. Die Kopienzahl wurde eingestellt, indem sie aus der Konzentration der eingesetzten DNA nach folgender Formel berechnet wurde:

$$\frac{\text{(DNA Konzentration [g/µl]} * 6.022 \times 10^{23}\ [\text{mol}^{-1}])}{\text{(5.848 [bp]} * 650\ [\text{g/bp}])}$$

6.022×10^{23} [mol^{-1}]: Avogadro-Konstante

650 [g/bp]: Masse pro bp doppelsträngiger DNA

5.848 [bp]: Länge des Plasmids *pdsAAV-CMVeGFP*

Zelllysate und Zellkulturüberstände wurden beide in drei und vier Verdünnungsschritten 1:10.000 und 1:100.000 verdünnt eingesetzt. Die Reaktionen wurden in 20 µl mit dem FastStart Essential DNA Green Master Mix der Firma Roche angesetzt.

Tabelle 6.6: Reaktionsansatz einer quantitativen PCR.

Reagenz	**Volumen**	**Konzentration (final)**
2x FastStart Essential DNA Green Master	10 µl	1x
Sense-Primer *CMVfw_qPCR* (5 µM)	1 µl	250 nM
Antisense-Primer *CMVrev_qPCR* (5 µM)	1 µl	250 nM
Probe oder Standardprobe	2 µl	
ddH_2O	ad 20 µl	

Die Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR erfolgte im Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-time PCR System der Firma Thermo Fisher Scientific. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 6.7 gezeigt.

Tabelle 6.7: Programm einer quantitativen PCR.

Reaktionsschritt	**Temperatur (in °C)**	**Zeit (in s)**	**Zyklen**
1. Primäre Denaturierung	95	600	1x
2. Denaturierung	95	30	
3. Primer-Anlagerung	67	30	40x
4. Elongation *	72	30	

* Während der Elongationszeit wurde die Fluoreszenzintensität gemessen (*data collection*).

Die Ergebnisse wurden mit der zugehörigen StepOne™ Software und Microsoft Excel ausgewertet.

6.2 Zellbiologische Methoden

Die Zellkulturarbeiten wurden alle unter sterilen Bedingungen in einer Laminarströmungsbank (Gelaire Typ BSB4) durchgeführt. Alle Medien und Lösungen wurden entweder steril erworben, bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert oder über Stericup® oder Steriflip® Vakuumfilter (Merck) steril filtriert. Die Bestimmung von Zellzahlen erfolgte nach 1:10 Verdünnung eines Aliquots der Zellsuspension mit Trypanblau (0,4 % in PBS) in einer Neubauer-Zählkammer (LaborOptik).

6.2.1 Kultivierung und Passagierung eukaryotischer Zellen

Adhärente HEK293 Zellen wurden in DMEM Komplettmedium mit 5-10% FCS in Zellkulturflaschen (Nunc™ EasYFlasks™, Thermo Fisher Scientific) bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2 kultiviert. Zur Teilung oder für die weitere Verwendung der Zellen in Versuchen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1-3 ml 1x Trypsin (Invitrogen) gelöst. Das Trypsin wurde mit dem dreifachen Volumen FCS-haltigen Mediums inaktiviert, die Zellen bei 1.200 rpm für 8 Minuten zentrifugiert und in einem geeigneten Volumen aufgenommen. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage je nach Dichte im Verhältnis 1:5 bis 1:20 geteilt. Zur Erhaltung stabil transfizierter HEK293 Zelllinien wurde einmal wöchentlich 10 µg/ml Blasticidin (InvivoGen) (HEK^{P2X7} und HEK^{CD38} Zellen) oder 500 µg/ml Geneticin (Gibco) (HEK^{ART} Zellen) zur Kultur hinzugefügt.

6.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Für die Kryokonservierung wurden ca. $1*10^6$ Zellen in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium (DMEM Komplettmedium mit 70 % FCS und 10 % DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen für mindestens 24 h bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

6.2.3 Transiente Proteinexpression in HEK293-6E Suspensionszellen

Die Herstellung rekombinanter Proteine erfolgte mittes transienter Transfektion von HEK293-6E Suspensionszellen mit pCSE2.5-Vektoren. Für die Produktion monomerer oder dimerer Antikörperfragmente mit Hexahistidin-Tag (Nbs, scFv, Adapterproteine) wurden HEK293-6E Zellen in Serum-freiem Gibco™ FreeStyle 293 Medium (Thermo Fisher Scientific) in Petrischalen in Suspension kultiviert. Für die Produktion von Fc-Fusionsproteinen (Nb-rbFc, scFv-rbFc) wurden HEK293-6E Zellen in Gibco™ FreeStyle F17 Komplettmedium (Thermo Fisher Scientific) mit 1 % FCS halb-adhärent in Zellkulturflaschen (Nunc™ EasYFlasks™, Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Als Transfektionsreagenz wurde 7,5 mM (0,333 mg/ml) PEI (Polysciences Inc.) verwendet. Zur Transfektion in einem Kulturvolumen von 10 ml (10 cm Petrischalen bzw. T75 Zellkulturflaschen) wurden 10 µg DNA und 40 µg PEI (124 µl) eingesetzt, die jeweils in separaten Ansätzen in 250 µl ddH_2O vorbereitet wurden. Die

Ansätze wurden jeweils 1:1 mit 300 mM NaCl gemischt (150 mM NaCl final) und mittels Vortex für 10 s gemischt. Dann wurde der PEI-Ansatz zum DNA-Ansatz hinzugefügt und nach erneutem Mischen mittels Vortex für 10 s bei RT für 15-30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz tröpfchenweise zu HEK293-6E Zellen in FreeStyle 293 Medium hinzupipettiert.
HEK293-6E Zellen in F17 Komplettmedium wurden vor der Zugabe einmal mit F17 Transfektionsmedium (ohne FCS) gewaschen und es wurden 10 ml frisches F17 Transfektionsmedium hinzugefügt. Um größere Proteinausbeuten für chromatographische Aufreinigungen zu erhalten, wurden pro Antikörperkonstrukt HEK293-6E Zellen in zwei bis drei 15 cm Petrischalen bzw. T225 Zellkulturflaschen á je 30 ml mit jeweils 20 µg DNA und 80 µg PEI (248 µl in 750 µl ddH_2O) transfiziert.
Die Zellen wurden sechs Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Kulturen mit 250 µl (10 ml Produktion) bzw. 500 µl (30 ml Produktion) F17 bzw. F293 *feeding* Medium (20 % w/v Tryptone N1) supplementiert. Am sechsten Tag nach Transfektion wurde der Zellkulturüberstand mit sezernierten Proteinen abgenommen, mittels Zentrifugation bei 1.200 rpm für 8 Minuten von den Zellen getrennt und in ein frisches Falcon überführt. Die Lagerung der Zellkulturüberstände erfolgte bei 4 °C.

6.2.4 Ausdifferenzierung muriner Makrophagen aus dem Knochenmark

Für die Gewinnung primärer muriner Makrophagen aus dem Knochenmark wurden jeweils Femur und Tibia einer Maus (C57black6) in PBS und anschließend in 70 % Ethanol gesäubert. Die Ausdifferenzierung der Knochenmarkszellen zu Makrophagen erfolgte durch Zugabe des Wachstumsfaktors M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*). Die Enden von Tibia und Femur wurden abgeschnitten und das Knochenmark mit einer 22G Nadel an einer Spritze mit 10 ml PBS herausgespült. Die Zellsuspension wurde in ein 15 cm Falcon übertragen und bei 1.200 rpm für 8 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 2 ml Medium (DMEM Komplettmedium mit 25 % M-CSF-haltigem L-Cell Medium und 15 % FCS) resuspendiert und dann in 10 ml Medium aufgenommen. Zu drei 15 cm Zellkulturschalen (Cellstar®, Greiner Bio-One) wurden jeweils 4 ml der Zellsuspension hinzugefügt, diese anschließend mit Medium auf 25 ml aufgefüllt und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 inkubiert. Am vierten Tag wurden die Kulturen jeweils mit 15 ml Medium supplementiert. Am sechsten Tag

konnten ausdifferenzierte Makrophagen für weitere Versuche geerntet werden (6.3.4.2).

6.3 Herstellung und Verwendung Adeno-assoziierter Viren (AAVs)

6.3.1 Produktion von AAVs mittels Transfektion von HEK293 Zellen

Die Produktion von AAVs erfolgte mittels der parallelen Transfektion von HEK293AAV Zellen (Cell Biolabs) mit drei (AAV2, $AAV2^{RA}$) oder vier ($AAV2^{RA}$-$Nb^{VP1/VP2}$) Plasmiden. Dazu wurden $6*10^6$ Zellen/Schale in 25 ml DMEM Komplettmedium mit 10 % FCS in 15 cm Zellkulturschalen (Cellstar®, Greiner Bio-One) ausplattiert und bei 37 °C, 5 % CO_2 kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium ca. 1 h vor der Transfektion durch 17 ml frisches Medium ersetzt. Als Transfektionsreagenz diente 25 kDa lineares Polyethylenimin (PEI, Polysciences Inc.) in einer Konzentration von 0,333 mg/ml. Für die Produktion von AAV2 und $AAV2^{RA}$ wurden folgende Plasmide verwendet: 4,5 µg pXX2 (AAV2) bzw. 4,5 µg pXX2_R585/8A ($AAV2^{RA}$), 20 µg des Helferplasmids pXX6 und 4 µg des Transgens scAAV-CMVeGFP pro Kulturschale (s.a. Abb. 1.3). Für die Produktion von $AAV2^{RA}$ mit in VP1 insertierten Nbs wurden anstelle von pXX2 jeweils 4,5 µg pRC_RR_VP1-Nb und 4 µg pRC_RR_VP2-3 (s. Abb. 3.4) verwendet. Für die Produktion von $AAV2^{RA}$ mit an den N-Terminus von VP2 fusioniertem Nb 1c81 wurden anstelle von pXX2 jeweils 4 µg pHMX-Nb-VP2 und 4 µg pXX2-VP2ko (s. Abb. 8.1) eingesetzt. Die Plasmide wurden jeweils gemeinsam in 750 µl ddH_2O angesetzt, welches anschließend mit 750 µl 300 mM NaCl (final 150 mM) versetzt und mittels Vortex für 10 s gemischt wurde. Das PEI wurde jeweils in vierfacher Menge im Verhältnis zur DNA in 750 µl ddH_2O angesetzt, ebenfalls mit 750 µl 300 mM NaCl versetzt und für 10 s mittels Vortex gemischt. Der PEI-Ansatz wurde langsam tropfend zum DNA-Ansatz hinzugefügt, dann für 10 s mittels Vortex gemischt und für 15-20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die tröpfchenweise gleichmäßige Zugabe des Ansatzes (3 ml) zu den Zellen einer Kulturschale. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium durch 25 ml frisches Medium ersetzt. Nach drei Tagen wurden AAVs aus dem Überstand und Zelllysaten geerntet.

6.3.2 Gewinnung von AAVs aus Zellkulturüberstand und Zelllysat

Die adhärenten transfizierten HEK293AAV Zellen wurden drei Tage nach Mediumwechsel vorsichtig mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst, gemeinsam mit dem Kulturüberstand in ein 50 ml-Falcon übertragen und für 5 Minuten bei 1.200 rpm, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 50 ml-Falcon überführt und das Zellpellet bis zur Lyse der Zellen auf Eis gelagert.
Für die Fällung von AAVs aus dem Überstand wurde dieser mit 10 g PEG-8000 und 5,8 g NaCl pro 100 ml (ca. 10 % w/v PEG-8000 und 1 M NaCl) versetzt und über Nacht bei 4 °C rollernd inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Überstände bei 4.600 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der PEG-enthaltende Überstand wurde verworfen und die Falcons erneut für 3 Minuten bei 4.600 rpm zentrifugiert, um verbleibenden Überstand restlos entfernen zu können. Das AAV-enthaltende Pellet wurde in 1 ml PBS-MK resuspendiert.
Für die Gewinnung von AAVs aus Zelllysaten wurde das Zellpellet (s.o.) in 1 ml PBS-MK resuspendiert und in ein 15 ml-Falcon übertragen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch drei Zyklen Einfrieren/Auftauen (5-10 Minuten Einfrieren in Trockeneis umspült mit 99 % Ethanol, 5-10 Minuten Auftauen im Wasserbad bei 37 °C).
Anschließend erfolgte der Verdau von freier DNA und RNA in Überständen und Lysaten mit der Endonuklease Benzonase (Sigma, E1014, 250 U/µl) für 30 Minuten bei 37 °C (50 U/ml Überstand bzw. Lysat). Verbleibende unlösliche Bestandteile wurden für 15 Minuten bei 4.600 rpm abzentrifugiert. Die viralen Titer wurden mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt (s. Abschnitt 6.1.16). Die Lagerung der Lysate und Überstände erfolgte bei -80 °C.

6.3.3 Bindungsassay von AAVs an Membranprotein-exprimierende Zellen

Die Untersuchung der Bindung von AAVs über insertierte Nanobodies oder bispezifische Adapterproteine an Membranprotein-exprimierende Zielzellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dazu wurden zwei Zellpopulationen in FACS-Röhrchen im Verhältnis 1:10 oder 1:20 in FACS-Puffer gemischt. Zuvor wurde jeweils die kleinere Zellpopulation mit dem Fluoreszenzfarbstoff eFluor450 (1 µl/1*10^6 Zellen) für 20 Minuten auf Eis beladen. Überschüssiger Farbstoff wurde durch zweimaliges Waschen der Zellen mit 1 ml FACS-Puffer (1.200 rpm, 8 Minuten, 4 °C) entfernt. Die gemischten Zellen wurden je nach Versuchsaufbau entweder zunächst mit 1 µg

Adapterproteinen inkubiert (20 Min auf Eis) und zweimal gewaschen oder direkt mit AAV-enthaltenden Kulturüberständen oder Lysaten ($1*10^9$ vg) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Ungebundene AAVs wurden durch zweimaliges Waschen entfernt. Gebundene Virionen wurden mit AF647-konjugiertem scFvA20-rbFc (20 Minuten auf Eis) im Durchflusszytometer (FACS Canto II, BD Biosciences) detektiert, nachdem die Zellen erneut zweimal gewaschen und zur Messung in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen worden waren.

6.3.4 Transduktion eukaryotischer Zellen mit AAVs

6.3.4.1 Transduktion von HEK293 Zellen

HEK293 Zellen wurden entweder am Tag vor der Inkubation mit AAVs in 24-well oder 96-well Zellkulturplatten in DMEM Komplettmedium mit 10 % FCS ausgesät und über Nacht im Brutschank bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % inkubiert, oder die Ausplattierung erfolgte ca. 1-2 h vor der AAV-Zugabe, so dass die Zellen halb-adhärent waren. Für die Untersuchung der Transduktionseffizienz von AAVs mit insertierten Nbs wurden die hergestellten AAV-enthaltenden Zellkulturüberstände in 100 µl Medium verdünnt und zu den Kulturen hinzugefügt (final 500 µl/24-well Napf). Für die Untersuchung der Transduktionseffizienz der Zielzellen mit $AAV2^{RA}$ oder AAV1 und bispezifischen Adapterproteinen, wurden gereinigte Adapterproteine oder Adapter-enthaltende Zellkulturüberstände in Medium verdünnt und mit gereinigten AAVs oder AAVs in Kulturüberständen in 50-100 µl Medium für 30 Minuten auf Eis vorinkubiert. Anschließend wurden die AAV/Adapter-Ansätze zu den Kulturen hinzugefügt (final 500 µl/24-well Napf oder 200 µl/96-well Napf). Die Anzahl Zellen pro Napf, der Zeitpunkt der Ausplattierung, die Konzentration verwendeter Adapterproteine und die Anzahl viraler Genome variierten je nach Versuchsaufbau und sind im Ergebnisteil beschrieben.

Nach der Zugabe der AAVs wurden die Zellen zwei Tage im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 inkubiert. Zur Analyse der GFP-Expression wurden Zellen in 24-well Zellkulturplatten mit PBS gewaschen, für 5-10 Minuten mit Trypsin abgelöst und dieses anschließend mit 500 µl DMEM 10 % FCS inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen übertragen und das Medium durch Zentrifugation bei 1.200 rpm für 8 Minuten entfernt. Bei gemischten CD38- und ARTC2.2-transfizierten Zellen wurden die Zellen mit CD38-spezifischem AF647-konjugiertem JK36-rbFc (100 ng/Ansatz) für

20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zweimal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (1.200 rpm, 8 Minuten). Zellen in 96-well Platten wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit kaltem PBS für mind. 10 Minuten inkubiert, bis die Zellen durch Resuspendieren gelöst werden konnten. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie in FACS-Puffer (6.4.1).

6.3.4.2 Transduktion ausdifferenzierter Makrophagen aus dem Knochenmark

Ausdifferenzierte Makrophagen aus dem Knochenmark von Wildtyp oder P2X7-defizienten Mäusen kultiviert in 15 cm Zellkulturschalen wurden mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von kaltem PBS und Inkubation für 10 Minuten auf Eis abgelöst. In 96-well Zellkulturplatten wurden je $2*10^4$ Zellen pro Napf in 150 µl DMEM Komplettmedium mit 15 % FCS ausgesät und die Platten für 2 h im Brutschrank inkubiert. Gereinigte Adapterproteine wurden in 50 µl Medium (final im Napf 10 nM) mit YFP-kodierenden AAV1-P5 (dankend erhalten von Dirk Grimm, Universität Heidelberg) für 30 Minuten auf Eis vorinkubiert und anschließend zu den Zellen hinzugefügt ($2*10^8$ vg/Napf ~ 10.000 vg/Zelle). Die Zellen wurden für zwei Tage im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO_2 inkubiert. Die Analyse der YFP-Expression erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

6.4 Immunologische Methoden

6.4.1 Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse der Eigenschaften von Zellen, die durch Anregung mit Laserstrahlen verschiedener Wellenlänge ermittelt werden können. In dieser Arbeit diente die Durchfluss-zytometrie der quantitativen Bestimmung der Expression von cytosolischen fluoreszierenden Proteinen wie GFP oder YFP (s.a. 6.3.4). Zusätzlich wurde die Bindung von Antikörpern oder AAVs (s.a. 6.3.3) an Zellen und die Expression von Membranproteinen über spezifische Fluorochrom-konjugierte Antikörper detektiert. Dazu wurden $1*10^6$ Zellen in FACS-Röhrchen mit 1 µg Fluorochrom-markierten Antikörpern in FACS-Puffer (0,2 % BSA in PBS) für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen der Zellen mit 1 ml FACS-Puffer entfernt (1.200 rpm, 8 Minuten). Die Zellen wurden in 300 µl FACS-Puffer

aufgenommen und am FACS Canto II (BD Biosciences) analysiert. Die Auswertungen der Messdaten erfolgten mit der Software FlowJo.

6.4.2 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA ist eine antikörperbasierte Methode, mit der die Bindung eines Antigens an einen Antikörper anhand einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen werden kann. Hier wurde der ELISA verwendet, um die spezifische Bindung hergestellter Antikörper-Konstrukte an Adeno-assoziierte Viren des Serotyps 1 und 2 nachzuweisen. Dazu wurden die Vertiefungen einer 96-Well Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C in 100 µl PBS mit den Antigenen immobilisiert. Die Blockierung freier Bindestellen erfolgte mit 150 µl 1 % BSA in PBS für 1 h bei 4 °C. Schwere-Ketten-Antikörper oder VHH/scFv-Monomere in HEK293-6E Zellkulturüberständen (5 µl) wurden für 1 h bei 4 °C in 100 µl 1% BSA in PBS mit den Antigenen inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen viermal mit 0,05 % Tween-20 in PBS gewaschen. Die Inkubation des Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte für 1 h bei RT. Für die Detektion der Schwere-Ketten-Antikörper mit Kaninchen IgG Fc-Teil wurde ein HRP-gekoppelter (*horseradish peroxidase* = Meerrettichperoxidase) Kaninchen-spezifischer Antikörper 1:5000 in 1 % BSA/PBS eingesetzt. Die Detektion der monomeren c-Myc-Tag tragenden Antikörperfragmente erfolgte über Inkubation mit einem c-Myc-spezifischen HRP-gekoppelten Antikörper 1:3000 in 1 % BSA in PBS. Die Vertiefungen wurden viermal mit 0,05 % Tween-20 in PBS gewaschen. Die Farbreaktion wurde durch Inkubation mit 100 µl des Substrats TMB eingeleitet und nach 10-20 Minuten mit 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Die optische Dichte bei 450 nm wurde am Platten-Reader Victor 3 1420 (Perkin-Elmer) gemessen.

6.4.3 Immunpräzipitation

Um AAV Capsidproteine in Zelllysaten oder Zellkulturüberständen nachzuweisen, wurden diese zunächst immunpräzipitiert. Dazu wurden 10 µl Protein G Sepharose Affinitätsmatrix pro Ansatz mit je 1 µg des AAV-spezifischen Antikörpers AE1-rbFc oder scFvA20-rbFc in 500 µl PBS für 1 Stunde oder über Nacht bei 4 °C rollernd inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit 800 µl PBS und Zentrifugation bei 2.000 rpm für 1 Minute entfernt. Die Matrix wurde in einem geeigneten Volumen PBS resuspendiert und auf die benötigten Ansätze verteilt (10 µl Matrix/Ansatz). Dann folgte die Inkubation mit $1*10^9$ vg AAV in Zelllysat oder

Zellkulturüberstand (3-200 µl, aufgefüllt auf 500 µl mit PBS) für 1 Stunde rollernd bei 4 °C. Anschließend wurde die Matrix zweimal kurz und einmal für 10 Minuten jeweils mit 800 µl 0,5 % Triton X-100 in PBS gewaschen und bei 2.000 rpm 1 Minute zentrifugiert. Im letzten Waschschritt erfolgte die Inkubation für 10 Minuten mit PBS ohne Triton. Nach Zentrifugation (2.000 rpm, 1 Minute) erfolgten Elution und Denaturierung gebundener Proteine durch die Zugabe von 20 µl SDS-Probenpuffer und Inkubation für 10 Minuten bei 70 °C. Die SDS-PAGE und anschließende Detektion der Capsidproteine wurden wie in 6.5.4 und 6.4.4 beschrieben durchgeführt.

6.4.4 Proteintransfer (Western Blot) und Immundetektion

Die Übertragung von Proteinen auf eine Membran (Western Blot) dient dazu bestimmte Proteine durch die spezifische Bindung von Antikörpern nachzuweisen (Immundetektion). Der elektrophoretische Proteintransfer wurde im Tank-Blot-System XCell SureLock™ Mini-Cell (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Dazu wurden Gel, Filterpapier, Schwämme und PVDF-Membran mit Transferpuffer benetzt. Die PVDF-Membran wurde zuvor für 15 Sekunden in Methanol geschwenkt, um die Hydrophobie herabzusetzen und den Kontakt zum Transferpuffer zu erleichtern. Das Gel wurde auf ein Filterpapier gelegt und auf Seite der Kathode mit der PVDF-Membran bedeckt, die wieder mit einem Filterpapier geschützt wurde. Gel und Membran wurden mit Schwämmen in der Blotkammer fixiert und diese in einer Elektrophorese-Kammer befestigt. Die Elektrophorese erfolgte in Transferpuffer bei 300 mA für 1,5 Stunden. Anschließend wurden freie Bindestellen auf der Membran mit 5 % Milchpulver in TBST über Nacht blockiert. Als Primärantikörper wurde der monoklonale murine Antikörper B1 eingesetzt, der ein Epitop nahe des C-Terminus der drei AAV Capsidproteine VP1, VP2 und VP3 bindet (vgl. Abb. 1.5). Dazu wurde B1 Hybridomüberstand in TBST mit 5 % Milchpulver 1:2 verdünnt und 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit TBST gewaschen und dann mit einem Peroxidase-konjugierten Maus-spezifischen Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit TBST erfolgte die Substratzugabe (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare) nach Herstellerangaben. Die Detektion der Chemolumineszenzreaktion erfolgte auf Röntgenfilm.

6.5 Proteinbiochemische Methoden

6.5.1 Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Antikörperfragmente mit C-terminalem Hexahistidin-Tag (dimere Adapterproteine, monomere Nbs und das scFv des mAk A20) wurden mittels Immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) aus Kulturüberständen aufgereinigt. Das Trennverfahren beruht auf der kovalenten Bindung von Histidin an Ni^{2+}-Ionen, die über einen Chelatkomplex mit Nitrilotriessigsäure (NTA) an eine Agarose Matrix gebunden sind. Für die Isolierung von Antikörperfragmenten aus 60 ml Zellkulturüberstand transient transfizierter HEK293-6E Zellen (6.2.3) wurden Säulen mit 4 ml HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich/Merck) beladen und mit 10 ml PBS äquilibriert. Abb. 6.2 zeigt SDS-PAGE Analysen von zwei repräsentativen Affinitätsreinigungen bispezifischer Adapterproteine.

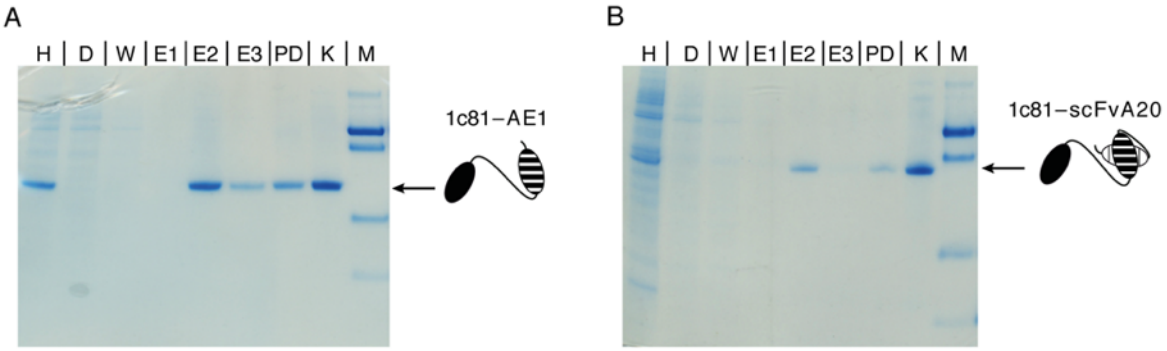

Abb. 6.2: SDS-PAGE Analysen von zwei repräsentativen Affinitätsreinigungen der Adapterproteine 1c81-AE1 (A) und 1c81-scFvA20 (B) mittels IMAC.
Es wurden je 10 µl von 60 ml HEK Zellkulturüberstand (H) und 10 µl des Durchflusses (D) nach Säulenbeladung auf das Gel aufgetragen. Unspezifisch an die 4 ml Ni-NTA Säule gebundene Proteine wurden mit 20 ml Waschpuffer entfernt, wovon 10 µl aufgetragen wurden (W). Die Elution Hexahistidin-getagter Proteine erfolgte mit 250 mM Imidazol in PBS, wobei 2 ml als erste Fraktion und nachfolgend zwei 5 ml Fraktionen aufgefangen wurden. Es wurden 10 µl der ersten Fraktion (E1), 2 µl der zweiten Fraktion (E2) und 10 µl der dritten Fraktion (E3) aufgetragen. Die zweite Elutionsfraktion wurde nach Herstellerangaben über PD-10 Säulen in PBS umgepuffert und 1,4 µl aufgetragen (PD). Die Proteinlösung wurde über Zentrifugationsröhrchen mit MWCO 10.000 eingeengt, die Proteinkonzentration mittels BCA bestimmt und 1 µg gereinigtes Protein (K) im Vergleich zu einem Molekulargewichtsmarker (M) aufgetragen.

Der Zellkulturüberstand wurde auf die Matrix gegeben und der Durchfluss verworfen (je 10 µl wurden für SDS-PAGE Analysen verwahrt). Unspezifisch bindende Proteine wurden durch Waschen der Matrix mit 20 ml PBS entfernt. Die Elution rekombinanter Hexahistidin-getagter Proteine erfolgte mit 250 mM Imidazol in PBS in drei Fraktionen (Eluat 1: 2 ml, Eluat 2 und 3: je 5 ml). Die zweite Fraktion enthielt jeweils die größte Menge des rekombinanten Proteins und wurde über zwei PD-10 Säulen (GE

Healthcare) nach Herstellerangaben in PBS umgepuffert. Die Proteinlösung wurde über Zentrifugationsfilter mit MWCO (*molecular weight cut off*) 10.000 (Amicon Ultra, Merck) auf ca. 500 µl je nach Proteinkonzentration eingeengt. Die Qualität der Affinitätsreinigungen wurde jeweils mittels SDS-PAGE Analysen überprüft. Die langfristige Lagerung gereinigter Proteine erfolgte bei -80 °C. Bis zu 6 Wochen wurden gereinigte Proteine bei 4 °C unter Zugabe von 0,02 % Natriumazid gelagert.

6.5.2 Affinitätschromatographie von Antikörpern

Schwere-Ketten-Antikörper wurden aus Kulturüberständen mittels Affinitäts-chromatographie über die Bindung der konstanten Domänen an Protein G als Ligand einer Sepharose-Matrix gereinigt. Dazu wurde eine Säule mit 2 ml Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) beladen und mit 10 ml PBS äquilibriert. 60 ml Kulturüberstand transient transfizierter HEK293-6E Zellen (6.2.3) wurde auf die Matrix gegeben und diese anschließend mit 20 ml PBS gewaschen. Die Elution gebundener Schwere-Ketten-Antikörper erfolgte durch Herabsetzen des pH-Werts mit IgG Elutionspuffer pH 2,8 (Thermo Fisher Scientific) in drei Fraktionen (Eluat 1: 1,2 ml, Eluat 2 und 3: je 2,5 ml). Der saure pH-Wert wurde mit einem Zehntel Volumen 1 M Tris pH 9 neutralisiert. Die Umpufferung der zweiten Fraktion über PD-10 Säulen und die Konzentrierung der Proteinlösung über Amicon Zentrifugationsfilter erfolgte wie in 6.5.1. Gereinigte Schwere-Ketten-Antikörper wurden unter Zugabe von 0,02 % Natriumazid bei 4 °C gelagert.

6.5.3 Quantifizierung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce™, Thermo Fisher Scientific) nach Protokoll des Herstellers bestimmt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde kolorimetrisch im Vergleich zu einer parallel angesetzten Standardreihe bekannter Konzentrationen boviner Gamma Globuline (BGG) (Pierce™) quantifiziert. Die Messung der Absorption bei 562 nm erfolgte am Platten-Reader Victor 3 1420 (Perkin-Elmer).

6.5.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung

Proteine wurden mittels SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) und Färbung mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau analysiert. Dazu wurden die Proben mit LDS Ladepuffer (4x) und *Reducing Agent* (10x)

(NuPAGE™) versetzt und für 10 Minuten bei 70 °C denaturiert. Die Taschen vorgefertigter 10-12 % Bis-Tris Gele (NuPAGE™, Thermo Fisher Scientific) wurden mit den Proben beladen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in MES-Laufpuffer im Tank-Blot-System XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) bei 200 V für 40-60 Minuten. Sollten die Proteinbanden zur Analyse gefärbt werden, wurden die Gele anschließend in der Coomassie-Blau Färbelösung des Collidial Blue Staining Kits (Invitrogen™) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung entsorgt und die Gele in vollentsalztem Wasser mit Hilfe eines Aktivkohlepads bis zur gewünschten Bandenintensität entfärbt. Die Konservierung von Gelen erfolgte durch kurzes Schwenken der Gele in Gel-Dry™ Drying Solution (Invitrogen™) vor der Einspannung in einen Rahmen zwischen zwei Cellophanfolien.

6.5.5 Fluorochromkonjugation von Antikörpern

Die Konjugation des Fluorochroms Alexa Fluor 647 (AF647) an Schwere-Ketten-Antikörper wurde mit dem Molecular Probes® Alexa Fluor 647 Kit von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt. Die erfolgreiche Konjugation wurde mittels photometrischer Messung (Ultraspec 2000) der Absorption der Probe bei 650 nm im Vergleich zur Absorption bei 280 nm ermittelt. Das Verhältnis von Fluorochromen zum Protein wurde mit folgender Formel berechnet:

(A650 x Verdünnungsfaktor) / (ε AF647 x Proteinkonzentration [M])

ε = Extinktionskoeffizient

7 Literaturverzeichnis

Akache, B., Grimm, D., Pandey, K., Yant, S.R., Xu, H. & Kay, M.A. (2006). The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol,* **80:** 9831-6.

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:** 8961-9.

Atchison, R.W., Casto, B.C. & Hammon, W.M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science,* **149:** 754-6.

Aydemir, F., Salganik, M., Resztak, J., Singh, J., Bennett, A., Agbandje-Mckenna, M. & Muzyczka, N. (2016). Mutants at the 2-Fold Interface of Adeno-associated Virus Type 2 (AAV2) Structural Proteins Suggest a Role in Viral Transcription for AAV Capsids. *J Virol,* **90:** 7196-204.

Balazs, A.B., Chen, J., Hong, C.M., Rao, D.S., Yang, L. & Baltimore, D. (2011). Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature,* **481:** 81-4.

Balazs, A.B., Ouyang, Y., Hong, C.M., Chen, J., Nguyen, S.M., Rao, D.S., An, D.S. & Baltimore, D. (2014). Vectored immunoprophylaxis protects humanized mice from mucosal HIV transmission. *Nat Med,* **20:** 296-300.

Bannas, P., Hambach, J. & Koch-Nolte, F. (2017). Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front Immunol,* **8:** 1603.

Bannas, P., Lenz, A., Kunick, V., Well, L., Fumey, W., Rissiek, B., Haag, F., Schmid, J., Schutze, K., Eichhoff, A., Trepel, M., Adam, G., Ittrich, H. & Koch-Nolte, F. (2015). Molecular imaging of tumors with nanobodies and antibodies: Timing and dosage are crucial factors for improved in vivo detection. *Contrast Media Mol Imaging,* **10:** 367-78.

Bartlett, J.S., Kleinschmidt, J., Boucher, R.C. & Samulski, R.J. (1999). Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab'gamma)2 antibody. *Nat Biotechnol,* **17:** 181-6.

Bartlett, J.S., Wilcher, R. & Samulski, R.J. (2000). Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol,* **74:** 2777-85.

Bartus, R.T., Baumann, T.L., Brown, L., Kruegel, B.R., Ostrove, J.M. & Herzog, C.D. (2013). Advancing neurotrophic factors as treatments for age-related neurodegenerative diseases: developing and demonstrating "clinical proof-of-concept" for AAV-neurturin (CERE-120) in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging,* **34:** 35-61.

Bell, A., Wang, Z.J., Arbabi-Ghahroudi, M., Chang, T.A., Durocher, Y., Trojahn, U., Baardsnes, J., Jaramillo, M.L., Li, S., Baral, T.N., O'connor-Mccourt, M., Mackenzie, R. & Zhang, J. (2010). Differential tumor-targeting abilities of three single-domain antibody formats. *Cancer Lett,* **289:** 81-90.

Boucas, J., Lux, K., Huber, A., Schievenbusch, S., Von Freyend, M.J., Perabo, L., Quadt-Humme, S., Odenthal, M., Hallek, M. & Buning, H. (2009). Engineering adeno-associated virus serotype 2-based targeting vectors using a new insertion site-position 453-and single point mutations. *J Gene Med,* **11:** 1103-13.

Brady, J.M., Baltimore, D. & Balazs, A.B. (2017). Antibody gene transfer with adeno-associated viral vectors as a method for HIV prevention. *Immunol Rev,* **275:** 324-333.

Buller, R.M., Janik, J.E., Sebring, E.D. & Rose, J.A. (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol,* **40:** 241-7.

Büning, H., Huber, A., Zhang, L., Meumann, N. & Hacker, U. (2015). Engineering the AAV capsid to optimize vector-host-interactions. *Curr Opin Pharmacol,* **24:** 94-104.

Burstein, H.J. (2005). The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med,* **353:** 1652-4.

Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Gao, G., Lin, J. & Wilson, J.M. (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis,* **199:** 381-90.

Cortez-Retamozo, V., Backmann, N., Senter, P.D., Wernery, U., De Baetselier, P., Muyldermans, S. & Revets, H. (2004). Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res,* **64:** 2853-7.

Crasson, O., Rhazi, N., Jacquin, O., Freichels, A., Jerome, C., Ruth, N., Galleni, M., Filee, P. & Vandevenne, M. (2015). Enzymatic functionalization of a nanobody using protein insertion technology. *Protein Eng Des Sel,* **28:** 451-60.

Danquah, W. (2012). Selection and characterization of llama-derived anti-P2X7 single domain antibodies. *Dissertation, Universität Hamburg, MIN-Fakultät*.

Danquah, W., Meyer-Schwesinger, C., Rissiek, B., Pinto, C., Serracant-Prat, A., Amadi, M., Iacenda, D., Knop, J.H., Hammel, A., Bergmann, P., Schwarz, N., Assuncao, J., Rotthier, W., Haag, F., Tolosa, E., Bannas, P., Boue-Grabot, E., Magnus, T., Laeremans, T., Stortelers, C. & Koch-Nolte, F. (2016). Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med,* **8:** 366ra162.

Deaglio, S., Aydin, S., Grand, M.M., Vaisitti, T., Bergui, L., D'arena, G., Chiorino, G. & Malavasi, F. (2010). CD38/CD31 interactions activate genetic pathways leading to proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells. *Mol Med,* **16:** 87-91.

Deaglio, S., Mallone, R., Baj, G., Arnulfo, A., Surico, N., Dianzani, U., Mehta, K. & Malavasi, F. (2000). CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. *Chem Immunol,* **75:** 99-120.

Deaglio, S., Morra, M., Mallone, R., Ausiello, C.M., Prager, E., Garbarino, G., Dianzani, U., Stockinger, H. & Malavasi, F. (1998). Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J Immunol,* **160:** 395-402.

Ding, W., Zhang, L.N., Yeaman, C. & Engelhardt, J.F. (2006). rAAV2 traffics through both the late and the recycling endosomes in a dose-dependent fashion. *Mol Ther,* **13:** 671-82.

Duan, D., Li, Q., Kao, A.W., Yue, Y., Pessin, J.E. & Engelhardt, J.F. (1999). Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol,* **73:** 10371-6.

Eden, T. (2018). Herstellung und Charakterisierung von Lama Schwere-Ketten-Antikörper produzierenden transgenen Mäusen. *Dissertation, Universität Hamburg, MIN-Fakultät*.

Eden, T., Menzel, S., Wesolowski, J., Bergmann, P., Nissen, M., Dubberke, G., Seyfried, F., Albrecht, B., Haag, F. & Koch-Nolte, F. (2017). A cDNA Immunization Strategy to Generate Nanobodies against Membrane Proteins in Native Conformation. *Front Immunol,* **8:** 1989.

Els Conrath, K., Lauwereys, M., Wyns, L. & Muyldermans, S. (2001). Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J Biol Chem,* **276:** 7346-50.

Erles, K., Sebokova, P. & Schlehofer, J.R. (1999). Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol,* **59:** 406-11.

Fumey, W., Koenigsdorf, J., Kunick, V., Menzel, S., Schutze, K., Unger, M., Schriewer, L., Haag, F., Adam, G., Oberle, A., Binder, M., Fliegert, R., Guse, A., Zhao, Y.J., Cheung Lee, H., Malavasi, F., Goldbaum, F., Van Hegelsom, R., Stortelers, C., Bannas, P. & Koch-Nolte, F. (2017). Nanobodies effectively modulate the enzymatic activity of CD38 and allow specific imaging of CD38+ tumors in mouse models in vivo. *Sci Rep,* **7:** 14289.

Funaro, A., Reinis, M., Trubiani, O., Santi, S., Di Primio, R. & Malavasi, F. (1998). CD38 functions are regulated through an internalization step. *J Immunol,* **160:** 2238-47.

Gao, G., Alvira, M.R., Somanathan, S., Lu, Y., Vandenberghe, L.H., Rux, J.J., Calcedo, R., Sanmiguel, J., Abbas, Z. & Wilson, J.M. (2003). Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **100:** 6081-6.

Gao, G., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X. & Wilson, J.M. (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol,* **78:** 6381-8.

Gray, S.J., Choi, V.W., Asokan, A., Haberman, R.A., Mccown, T.J. & Samulski, R.J. (2011). Production of recombinant adeno-associated viral vectors and use in in vitro and in vivo administration. *Curr Protoc Neurosci,* **Chapter 4:** Unit 4 17.

Grimm, D., Kern, A., Rittner, K. & Kleinschmidt, J.A. (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther,* **9:** 2745-60.

Grimm, D., Lee, J.S., Wang, L., Desai, T., Akache, B., Storm, T.A. & Kay, M.A. (2008). In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *J Virol,* **82:** 5887-911.

Grimm, D. & Zolotukhin, S. (2015). E Pluribus Unum: 50 Years of Research, Millions of Viruses, and One Goal--Tailored Acceleration of AAV Evolution. *Mol Ther,* **23:** 1819-31.

Gu, B.J., Saunders, B.M., Jursik, C. & Wiley, J.S. (2010). The P2X7-nonmuscle myosin membrane complex regulates phagocytosis of nonopsonized particles and bacteria by a pathway attenuated by extracellular ATP. *Blood,* **115:** 1621-31.

Gu, B.J., Saunders, B.M., Petrou, S. & Wiley, J.S. (2011). P2X(7) is a scavenger receptor for apoptotic cells in the absence of its ligand, extracellular ATP. *J Immunol,* **187:** 2365-75.

Halder, S., Van Vliet, K., Smith, J.K., Duong, T.T., Mckenna, R., Wilson, J.M. & Agbandje-Mckenna, M. (2015). Structure of neurotropic adeno-associated virus AAVrh.8. *J Struct Biol,* **192:** 21-36.

Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N. & Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature,* **363:** 446-8.

Handagama, P., Scarborough, R.M., Shuman, M.A. & Bainton, D.F. (1993). Endocytosis of fibrinogen into megakaryocyte and platelet alpha-granules is mediated by alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa). *Blood,* **82:** 135-8.

Harmsen, M.M., Ruuls, R.C., Nijman, I.J., Niewold, T.A., Frenken, L.G. & De Geus, B. (2000). Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol,* **37:** 579-90.

Hauck, B., Chen, L. & Xiao, W. (2003). Generation and characterization of chimeric recombinant AAV vectors. *Mol Ther,* **7:** 419-25.

Hoque, M., Ishizu, K., Matsumoto, A., Han, S.I., Arisaka, F., Takayama, M., Suzuki, K., Kato, K., Kanda, T., Watanabe, H. & Handa, H. (1999). Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation. *J Virol,* **73:** 7912-5.

Huston, J.S., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Mccartney, J., Warren, F., Haber, E. & Oppermann, H. (1991). Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods Enzymol,* **203:** 46-88.

Im, D.S. & Muzyczka, N. (1990). The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell,* **61:** 447-57.

Jäger, V., Bussow, K., Wagner, A., Weber, S., Hust, M., Frenzel, A. & Schirrmann, T. (2013). High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol,* **13:** 52.

Johnson, J.S., Li, C., Diprimio, N., Weinberg, M.S., Mccown, T.J. & Samulski, R.J. (2010). Mutagenesis of adeno-associated virus type 2 capsid protein VP1 uncovers new roles for basic amino acids in trafficking and cell-specific transduction. *J Virol,* **84:** 8888-902.

Johnson, J.S. & Samulski, R.J. (2009). Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus. *J Virol,* **83:** 2632-44.

Judd, J., Wei, F., Nguyen, P.Q., Tartaglia, L.J., Agbandje-Mckenna, M., Silberg, J.J. & Suh, J. (2012). Random Insertion of mCherry Into VP3 Domain of Adeno-associated Virus Yields Fluorescent Capsids With no Loss of Infectivity. *Mol Ther Nucleic Acids,* **1:** e54.

Kabat, E.A. & Wu, T.T. (1991). Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol,* **147:** 1709-19.

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. *J Virol,* **79:** 609-14.

Kern, A., Schmidt, K., Leder, C., Muller, 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:** 11072-81.

Kim, J.Y., Kim, J.H., Khim, M., Lee, H.S., Jung, J.H., Moon, D.H., Jeong, S. & Lee, H. (2011). Persistent anti-tumor effects via recombinant adeno-associated virus encoding herpes thymidine kinase gene monitored by PET-imaging. *Oncol Rep,* **25:** 1263-9.

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:** 3282-91.

Koch-Nolte, F., Reyelt, J., Schossow, B., Schwarz, N., Scheuplein, F., Rothenburg, S., Haag, F., Alzogaray, V., Cauerhff, A. & Goldbaum, F.A. (2007). Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. *FASEB J,* **21:** 3490-8.

Konkalmatt, P.R., Deng, D., Thomas, S., Wu, M.T., Logsdon, C.D., French, B.A. & Kelly, K.A. (2013). Plectin-1 Targeted AAV Vector for the Molecular Imaging of Pancreatic Cancer. *Front Oncol,* **3:** 84.

Körbelin, J. (2013). Generation of tissue-specific vectors by in vivo selection of random peptide libraries displayed on the surface of adeno-associated virus type 2. *Dissertation, Universität Hamburg, MIN-Fakultät*.

Krah, S., Schroter, C., Zielonka, S., Empting, M., Valldorf, B. & Kolmar, H. (2016). Single-domain antibodies for biomedical applications. *Immunopharmacol Immunotoxicol,* **38:** 21-8.

Kronenberg, S., Bottcher, B., Von Der Lieth, C.W., Bleker, S. & Kleinschmidt, J.A. (2005). A conformational change in the adeno-associated virus type 2 capsid leads to the exposure of hidden VP1 N termini. *J Virol,* **79:** 5296-303.

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. *J Struct Biol,* **165:** 146-56.

Li, T., Qi, S., Unger, M., Hou, Y.N., Deng, Q.W., Liu, J., Lam, C.M., Wang, X.W., Xin, D., Zhang, P., Koch-Nolte, F., Hao, Q., Zhang, H., Lee, H.C. & Zhao, Y.J. (2016). Immuno-targeting the multifunctional CD38 using nanobody. *Sci Rep,* **6:** 27055.

Li, Z.B., Zeng, Z.J., Chen, Q., Luo, S.Q. & Hu, W.X. (2006). Recombinant AAV-mediated HSVtk gene transfer with direct intratumoral injections and Tet-On regulation for implanted human breast cancer. *BMC Cancer,* **6:** 66.

Marks, W.J., Jr., Baumann, T.L. & Bartus, R.T. (2016). Long-Term Safety of Patients with Parkinson's Disease Receiving rAAV2-Neurturin (CERE-120) Gene Transfer. *Hum Gene Ther,* **27:** 522-7.

Mccarty, D.M., Monahan, P.E. & Samulski, R.J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther,* **8:** 1248-54.

Mccarty, D.M., Pereira, D.J., Zolotukhin, I., Zhou, X., Ryan, J.H. & Muzyczka, N. (1994). Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adeno-associated virus Rep protein. *J Virol,* **68:** 4988-97.

Mccraw, D.M., O'donnell, J.K., Taylor, K.A., Stagg, S.M. & Chapman, M.S. (2012). Structure of adeno-associated virus-2 in complex with neutralizing monoclonal antibody A20. *Virology,* **431:** 40-9.

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:** 1040-6.

Münch, R.C., Janicki, H., Volker, I., Rasbach, A., Hallek, M., Buning, H. & Buchholz, C.J. (2013). Displaying high-affinity ligands on adeno-associated viral vectors enables tumor cell-specific and safe gene transfer. *Mol Ther,* **21:** 109-18.

Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem,* **82:** 775-97.

Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J.A. & Hamers, R. (1994). Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng,* **7:** 1129-35.

Nam, H.J., Lane, M.D., Padron, E., Gurda, B., Mckenna, R., Kohlbrenner, E., Aslanidi, G., Byrne, B., Muzyczka, N., Zolotukhin, S. & Agbandje-Mckenna, M. (2007). Structure of adeno-associated virus serotype 8, a gene therapy vector. *J Virol,* **81:** 12260-71.

Naso, M.F., Tomkowicz, B., Perry, W.L., 3rd & Strohl, W.R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs,* **31:** 317-334.

Nault, J.C., Datta, S., Imbeaud, S., Franconi, A., Mallet, M., Couchy, G., Letouze, E., Pilati, C., Verret, B., Blanc, J.F., Balabaud, C., Calderaro, J., Laurent, A., Letexier, M.,

Bioulac-Sage, P., Calvo, F. & Zucman-Rossi, J. (2015). Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet,* **47:** 1187-93.

Nault, J.C., Mami, I., La Bella, T., Datta, S., Imbeaud, S., Franconi, A., Mallet, M., Couchy, G., Letouze, E., Pilati, C., Verret, B., Blanc, J.F., Balabaud, C., Calderaro, J., Laurent, A., Letexier, M., Bioulac-Sage, P., Calvo, F. & Zucman-Rossi, J. (2016). Wild-type AAV Insertions in Hepatocellular Carcinoma Do Not Inform Debate Over Genotoxicity Risk of Vectorized AAV. *Mol Ther,* **24:** 660-1.

Naumer, M., Ying, Y., Michelfelder, S., Reuter, A., Trepel, M., Muller, O.J. & Kleinschmidt, J.A. (2012). Development and validation of novel AAV2 random libraries displaying peptides of diverse lengths and at diverse capsid positions. *Hum Gene Ther,* **23:** 492-507.

Nguyen, V.K., Hamers, R., Wyns, L. & Muyldermans, S. (1999). Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol Immunol,* **36:** 515-24.

Nonnenmacher, M. & Weber, T. (2011). Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell Host Microbe,* **10:** 563-76.

Nonnenmacher, M. & Weber, T. (2012). Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther,* **19:** 649-58.

O'donnell, J., Taylor, K.A. & Chapman, M.S. (2009). Adeno-associated virus-2 and its primary cellular receptor--Cryo-EM structure of a heparin complex. *Virology,* **385:** 434-43.

Opie, S.R., Warrington, K.H., Jr., 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.

Oranje, P., Verheesen, P., Verbart, D., Mijnsbergen, Y., Haard, H. & Hermans, P. (2004). 423. isolation of an adeno-associated virus (AAV)-specific camelid-derived single chain antibody fragment: a novel tool for purification of AAV vectors of different serotypes. *Mol Ther,* **9:** 162.

Ou, A., Gu, B.J. & Wiley, J.S. (2018). The scavenger activity of the human P2X7 receptor differs from P2X7 pore function by insensitivity to antagonists, genetic variation and sodium concentration: Relevance to inflammatory brain diseases. *Biochim Biophys Acta*.

Pajusola, K., Gruchala, M., Joch, H., Luscher, T.F., Yla-Herttuala, S. & Bueler, H. (2002). Cell-type-specific characteristics modulate the transduction efficiency of adeno-associated virus type 2 and restrain infection of endothelial cells. *J Virol,* **76:** 11530-40.

Pantelic, N. (2018). Selection and characterization of AAV-specific nanobodies. *Masterarbeit, Hochschule Bremen*.

Perabo, L., Endell, J., King, S., Lux, K., Goldnau, D., Hallek, M. & Buning, H. (2006). Combinatorial engineering of a gene therapy vector: directed evolution of adeno-associated virus. *J Gene Med,* **8:** 155-62.

Peyret, H., Gehin, A., Thuenemann, E.C., Blond, D., El Turabi, A., Beales, L., Clarke, D., Gilbert, R.J., Fry, E.E., Stuart, D.I., Holmes, K., Stonehouse, N.J., Whelan, M., Rosenberg, W., Lomonossoff, G.P. & Rowlands, D.J. (2015). Tandem fusion of hepatitis B core antigen allows assembly of virus-like particles in bacteria and plants with enhanced capacity to accommodate foreign proteins. *PLoS One,* **10:** e0120751.

Peyvandi, F., Scully, M., Kremer Hovinga, J.A., Cataland, S., Knobl, P., Wu, H., Artoni, A., Westwood, J.P., Mansouri Taleghani, M., Jilma, B., Callewaert, F., Ulrichts, H., Duby, C., Tersago, D. & Investigators, T. (2016). Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med,* **374:** 511-22.

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:** 108-12.

Pillay, S., Zou, W., Cheng, F., Puschnik, A.S., Meyer, N.L., Ganaie, S.S., Deng, X., Wosen, J.E., Davulcu, O., Yan, Z., Engelhardt, J.F., Brown, K.E., Chapman, M.S., Qiu, J. & Carette, J.E. (2017). AAV serotypes have distinctive interactions with domains of the cellular receptor AAVR. *J Virol*.

Popa-Wagner, R., Sonntag, F., Schmidt, K., King, J. & Kleinschmidt, J.A. (2012). Nuclear translocation of adeno-associated virus type 2 capsid proteins for virion assembly. *J Gen Virol,* **93:** 1887-98.

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:** 71-7.

Rajendran, S., Collins, S., Van Pijkeren, J.P., O'hanlon, D., O'sullivan, G.C. & Tangney, M. (2011). Targeting of breast metastases using a viral gene vector with tumour-selective transcription. *Anticancer Res,* **31:** 1627-35.

Ratajczak, M.Z. & Ratajczak, J. (2016). Horizontal transfer of RNA and proteins between cells by extracellular microvesicles: 14 years later. *Clin Transl Med,* **5:** 7.

Russell, S., Bennett, J., Wellman, J.A., Chung, D.C., Yu, Z.F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., Mccague, S., Cross, D., Marshall, K.A., Walshire, J., Kehoe, T.L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L.A., Hudson, F.P., Dingfield, L., Zhu, X., Haller, J.A., Sohn, E.H., Mahajan, V.B., Pfeifer, W., Weckmann, M., Johnson, C., Gewaily, D., Drack, A., Stone, E., et al. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet,* **390:** 849-860.

Sanlioglu, S., Benson, P.K., Yang, J., Atkinson, E.M., Reynolds, T. & Engelhardt, J.F. (2000). Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol,* **74:** 9184-96.

Santiago-Ortiz, J.L. & Schaffer, D.V. (2016). Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *J Control Release,* **240:** 287-301.

Schmidt, M., Gil-Farina, I. & Buning, H. (2016). Reply to "Wild-type AAV Insertions in Hepatocellular Carcinoma Do Not Inform Debate Over Genotoxicity Risk of Vectorized AAV". *Mol Ther,* **24:** 661-2.

Snyder, R.O., Samulski, R.J. & Muzyczka, N. (1990). In vitro resolution of covalently joined AAV chromosome ends. *Cell,* **60:** 105-13.

Sonntag, F., Bleker, S., Leuchs, B., Fischer, R. & Kleinschmidt, J.A. (2006). Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J Virol,* **80:** 11040-54.

Sonntag, F., Schmidt, K. & Kleinschmidt, J.A. (2010). A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **107:** 10220-5.

Stahnke, S., Lux, K., Uhrig, S., Kreppel, F., Hosel, M., Coutelle, O., Ogris, M., Hallek, M. & Buning, H. (2011). Intrinsic phospholipase A2 activity of adeno-associated virus is involved in endosomal escape of incoming particles. *Virology,* **409:** 77-83.

Steiner, D., Forrer, P. & Pluckthun, A. (2008). Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display. *J Mol Biol,* **382:** 1211-27.

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.

Summerford, C. & Samulski, R.J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol,* **72:** 1438-45.

Trempe, J.P. & Carter, B.J. (1988). Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein. *J Virol,* **62:** 3356-63.

Vance, M.A., Mitchell, A. & Samulski, R.J. 2015. *AAV Biology, Infectivity and Therapeutic Use from Bench to Clinic*, INTECH.

Walters, R.W., Agbandje-Mckenna, M., Bowman, V.D., Moninger, T.O., Olson, N.H., Seiler, M., Chiorini, J.A., Baker, T.S. & Zabner, J. (2004). Structure of adeno-associated virus serotype 5. *J Virol,* **78:** 3361-71.

Wang, Q., Lock, M., Prongay, A.J., Alvira, M.R., Petkov, B. & Wilson, J.M. (2015). Identification of an adeno-associated virus binding epitope for AVB sepharose affinity resin. *Mol Ther Methods Clin Dev,* **2:** 15040.

Weinberg, M.S., Nicolson, S., Bhatt, A.P., Mclendon, M., Li, C. & Samulski, R.J. (2014). Recombinant adeno-associated virus utilizes cell-specific infectious entry mechanisms. *J Virol,* **88:** 12472-84.

Weitzman, M.D., Kyostio, S.R., Kotin, R.M. & Owens, R.A. (1994). Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **91:** 5808-12.

Weitzman, M.D. & Linden, R.M. (2011). Adeno-associated virus biology. *Methods Mol Biol,* **807:** 1-23.

Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D.V., Goldbaum, F.A., Haag, F. & Koch-Nolte, F. (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol,* **198:** 157-74.

Wiley, J.S. & Gu, B.J. (2012). A new role for the P2X7 receptor: a scavenger receptor for bacteria and apoptotic cells in the absence of serum and extracellular ATP. *Purinergic Signal,* **8:** 579-86.

Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D. & Kleinschmidt, J.A. (1997). Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol,* **71:** 1341-52.

Wobus, C.E., Hugle-Dorr, B., Girod, A., Petersen, G., Hallek, M. & Kleinschmidt, J.A. (2000). Monoclonal antibodies against the adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-2-cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. *J Virol,* **74:** 9281-93.

Wu, Z., Asokan, A. & Samulski, R.J. (2006a). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther,* **14:** 316-27.

Wu, Z., Miller, E., Agbandje-Mckenna, M. & Samulski, R.J. (2006b). Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *J Virol,* **80:** 9093-103.

Xiao, P.J. & Samulski, R.J. (2012). Cytoplasmic trafficking, endosomal escape, and perinuclear accumulation of adeno-associated virus type 2 particles are facilitated by microtubule network. *J Virol,* **86:** 10462-73.

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:** 2224-32.

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:** 10405-10.

Ying, Y., Muller, O.J., Goehringer, C., Leuchs, B., Trepel, M., Katus, H.A. & Kleinschmidt, J.A. (2010). Heart-targeted adeno-associated viral vectors selected by in vivo biopanning of a random viral display peptide library. *Gene Ther,* **17:** 980-90.

Yla-Herttuala, S. (2012). Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol Ther,* **20:** 1831-2.

Zadori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.C., Li, Y., Gariepy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I.R. & Tijssen, P. (2001). A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell,* **1:** 291-302.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Die Anwendung Adeno-assoziierter Viren als Vektoren in der Gen- und Tumortherapie. 3
Abb. 1.2: Die Genomorganisation und die dreidimensionale Capsidstruktur von AAV2 5
Abb. 1.3: Die Herstellung rekombinanter AAVs mittels Tripel-Transfektion von HEK293 Zellen 6
Abb. 1.4: Modell des Zelleintritts und intrazellulären Transports von AAV2. 8
Abb. 1.5: Sequenzalignment der Capsidproteine von AAV1 und AAV2. 10
Abb. 1.6: Schema der beiden Insertionsstellen für Proteine in das Capsid von AAV2. 12
Abb. 1.7: Schematische Darstellung des bispezifischen $F(ab'\gamma)_2$ Antikörpers. 13
Abb. 1.8: Nanobodies aus Schwere-Ketten-Antikörpern der Familie *Camelidae*. 14
Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Membranproteine CD38, ARTC2.2 und P2X7 17
Abb. 3.1: In dieser Arbeit eingesetzte AAVs und AAV-spezifische Antikörper 21
Abb. 3.2: Schematische Darstellung und durchflusszytometrische Analyse der in dieser Arbeit verwendeten Membranprotein-spezifischen Nanobodies 23
Abb. 3.3: Vergleich der Aminosäuresequenzen der verwendeten Nanobodies. 25
Abb. 3.4: Schematische Darstellung der genetischen Insertion von Nanobodies in eine prominente Oberflächenschlaufe des VP1 Capsidproteins von $AAV2^{RA}$ 27
Abb. 3.5: VP1-Nb Fusionsproteine werden exprimiert und in virale Capside eingebaut. 28
Abb. 3.6: AAVs mit in VP1 insertierten P2X7- oder CD38-spezifischen Nbs binden ausschließlich an Zellen, die das jeweilige Membranprotein auf der Oberfläche exprimieren. 30
Abb. 3.7: $AAV2^{RA}$s mit in VP1 insertiertem P2X7-spezifischem Nanobody verstärken spezifisch die Transduktion P2X7-exprimierender HEK Zellen. 31
Abb. 3.8: In gemischten Kulturen transduzieren CD38- und ARTC2.2-spezifische $AAV2^{RA}$s jeweils die Target-exprimierenden HEK Zellen mit höherer Effizienz 33
Abb. 3.9: SDS-PAGE Analyse von gereinigten bispezifischen Adapterproteinen. 35
Abb. 3.10: Bispezifische Adapter vermitteln die Bindung von $AAV2^{RA}$ an Target-exprimierende Zielzellen. 36
Abb. 3.11: $AAV2^{RA}$ bindet mit Hilfe CD38/AAV-bispezifischer Adapterproteine spezifisch an CD38-exprimierende Zielzellen. 37
Abb. 3.12: P2X7/AAV-spezifische Adapter erhöhen die Transduktion von P2X7-exprimierenden HEK Zellen mit GFP-kodierenden $AAV2^{RA}$ 39

Abb. 3.13: CD38- und ARTC2.2 spezifische Adapter erhöhen in Mischkulturen jeweils verstärkt die Transduktion der Target-exprimierenden HEK Zellen mit AAV2^{RA}.....40
Abb. 3.14: In Einzelkulturen verstärken AE1-enthaltende Adapter ausschließlich die Transduktion Target-exprimierender HEK Zellen.....41
Abb. 3.15: P2X7-spezifische Adapter (1c81-AE1) erhöhen auch die Transduktion P2X7-exprimierender HEK Zellen mit AAV1.....43
Abb. 3.16: Der P2X7-spezifische Adapter 1c81-AE1 erhöht die Transduktion P2X7-exprimierender ausdifferenzierter Knochenmarks-Makrophagen.....44
Abb. 3.17: Nb 152 reagiert spezifisch mit AAV1 und AAV2, Nb 174 nur mit AAV1.....46
Abb. 3.18: Die neuen bispezifischen Adapter werden mit hoher Ausbeute in den Kulturüberstand transient transfizierter HEK293-6E Zellen sezerniert.....47
Abb. 3.19: Nb 152-enthaltende P2X7-spezifische Adapter erhöhen die Transduktion P2X7-exprimierender HEK Zellen sowohl mit AAV1 als auch mit AAV2^{RA}. 49
Abb. 3.20: Nb 152 enthaltende ARTC2.2- bzw. CD38-spezifische Adapter erhöhen jeweils die Transduktion Target-exprimierender HEK Zellen mit AAV1 und AAV2^{RA}. 51
Abb. 4.1: Darstellung der zwei für die Insertion von Nbs evaluierten Stellen im AAV2^{RA} Capsid. 53
Abb. 4.2: Vergleichende Darstellung eines bispezifischen F(ab'γ)$_2$ Fragments und der entwickelten bispezifischen Nanobody-basierten Adapterproteine.....56
Abb. 4.3: Die Epitope des mAk A20 und Nb AE1 in der 3D Struktur von AAV2.....58
Abb. 4.4: Schematische Darstellung von Möglichkeiten für die Weiterentwicklung bispezifischer Nanobody-Adapterproteine. 64
Abb. 6.1: Insertion einer VHH in das VP1 Capsidprotein mittels Klonierung. 80
Abb. 6.2: SDS-PAGE Analysen von zwei repräsentativen Affinitätsreinigungen der Adapterproteine 1c81-AE1 (A) und 1c81-scFvA20 (B) mittels IMAC. 95
Abb. 8.1: Herstellung von AAVs, die einen Nanobody am N-Terminus von VP2 tragen.....110
Abb. 8.2: VP2-Nb Fusionsproteine werden exprimiert und in virale Capside eingebaut. 112
Abb. 8.3: AAV2^{RA}-1c81^{VP2} binden und transduzieren P2X7-positive Zielzellen nicht. 113

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Vor- und Nachteile der beiden Nb-basierten Strategien zur Optimierung von AAVs 62
Tabelle 5.1: Verwendete Laborgeräte und deren Hersteller 66
Tabelle 5.2: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller 67
Tabelle 5.3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen 68
Tabelle 5.4: Zusammensetzung der verwendeten Medien 69
Tabelle 5.5: Eigenschaften der verwendeten Antikörper und ihre Hersteller 70
Tabelle 5.6: Die verwendeten rAAVs und ihre Herkunft 71
Tabelle 5.7: Die verwendeten Plasmide, ihre Herkunft und ggf. Referenz 71
Tabelle 5.8: Verwendete Größenstandards für Proteine und doppelsträngige DNA 72
Tabelle 5.9: Die verwendeten pro- und eukaryotischen Zellen 73
Tabelle 6.1: Reaktionsansatz einer PCR mit KOD-Polymerase. 74
Tabelle 6.2: Reaktionsansatz einer PCR mit Q5-Polymerase 75
Tabelle 6.3: Programm einer Standard-PCR 75
Tabelle 6.4: Reaktionsansatz einer PCR mit PfuUltra Polymerase 81
Tabelle 6.5: Programm einer Mutagenese-PCR. 81
Tabelle 6.6: Reaktionsansatz einer quantitativen PCR. 86
Tabelle 6.7: Programm einer quantitativen PCR. 86
Tabelle 8.1: Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide 114
Tabelle 8.2: Verwendete Chemikalien und ihre Gefährdungs- und Sicherheitshinweise 116

8.3 Die Fusion von Nanobodies an den N-Terminus des Capsidproteins VP2

8.3.1 Generierung von AAVs, in denen ein Nanobody an den N-Terminus des Capsidproteins VP2 fusioniert ist

Die AGs Buchholz (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) und Büning (MH Hannover) publizierten den Einbau eines DARPins in das AAV2^{RA} Capsid mittels Fusion des DARPins an den N-Terminus des VP2 Capsidproteins (Münch *et al.* 2013). Der gleiche Ansatz wurde verwendet, um anstelle des DARPins den P2X7-spezifischen Nb 1c81 an VP2 zu fusionieren (Abb. 8.1 A).

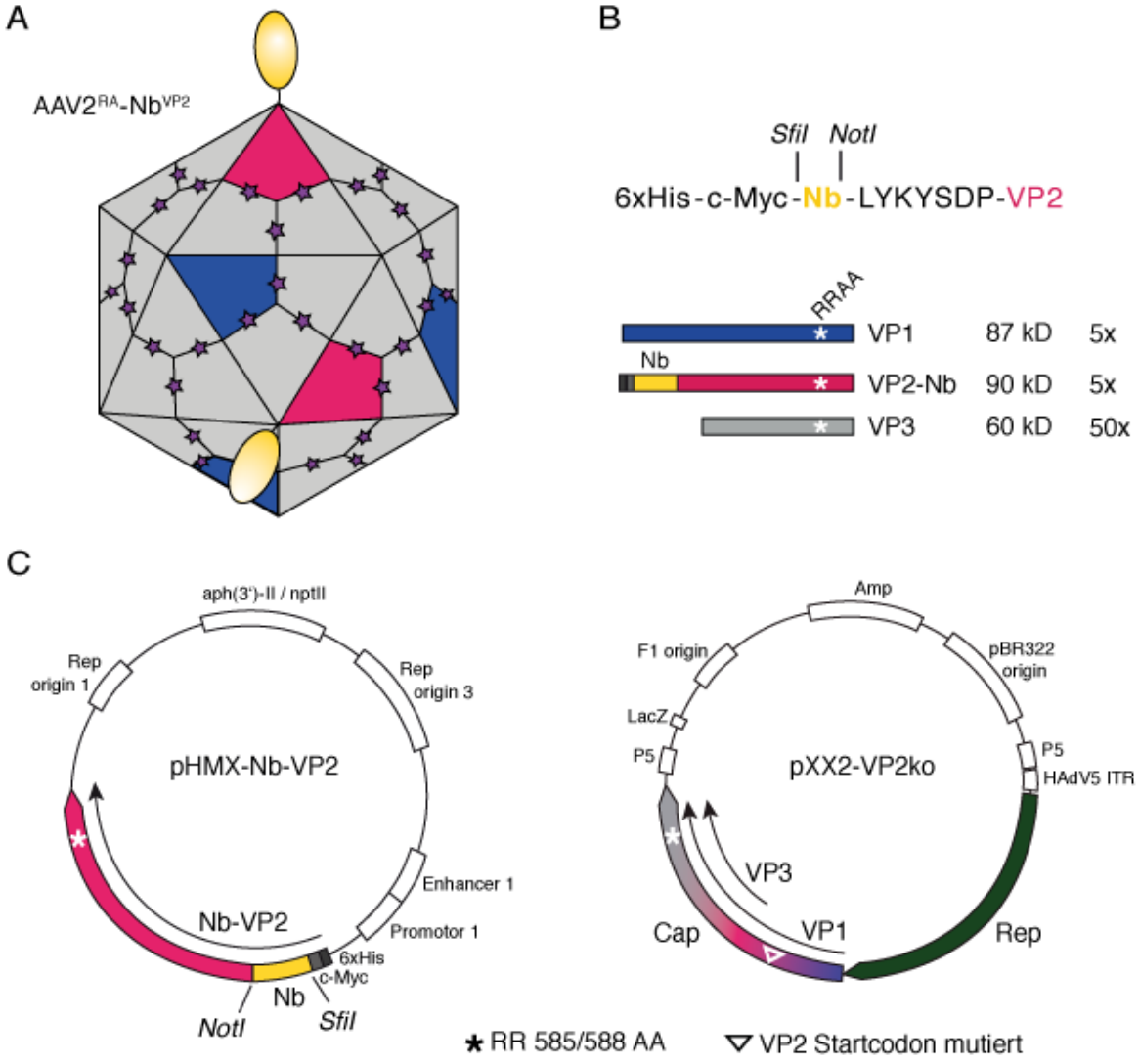

Abb. 8.1: Herstellung von AAVs, die einen Nanobody am N-Terminus von VP2 tragen.
(A) Schematische Darstellung des AAV2^{RA} Capsids mit Nbs, die an den N-Terminus von VP2 fusioniert sind (AAV2^{RA}-Nb^{VP2}). Die drei Capsidproteine VP1 (blau), VP2 (pink) und VP3 (grau) assemblieren das virale Capsid im Verhältnis 5:5:50. Der Nanobody (gelb) ist genetisch an den N-Terminus von VP2

fusioniert, der an der fünffachen Symmetrieachse des Capsids lokalisiert ist. Die Bindung an den natürlichen Rezeptor HSPG wird durch Mutationen verhindert (violette Sterne). (B) N-terminal des Nbs befindet sich ein Hexahistidin- und c-Myc-Tag und C-terminal ein kurzes Verbindungssegment aus 7 AS zu VP2. (C) Die Herstellung des AAV2^{RA}-Nb^{VP2} Capsids erfordert zwei Plasmide: *pHMX-Nb-VP2* kodiert für das Nb-VP2 Fusionsprotein, während *pXX2-VP2ko* für VP1 und VP3 kodiert. Die Expression von natürlichem VP2 ohne Nb wird durch eine Mutation des Startcodons verhindert. Das Plasmid *pHMX-Nb-VP2* wurde - linearisiert mit den Endonukleasen *NotI* und *SfiI* - von Prof. Dr. Christian Buchholz (Paul-Ehrlich-Institut, Langen), zur Verfügung gestellt. Das Plasmid *pXX2-VP2ko* wurde von Prof. Dr. Hildegard Büning (MH Hannover) zur Verfügung gestellt.

Für die Herstellung von AAVs mit an VP2 fusioniertem Nb 1c81 wurden anstelle des Replikations-/Capsidprotein-kodierenden Plasmids zwei Plasmide verwendet (Abb. 8.1 C), die freundlicherweise von Prof. Dr. Christian Buchholz und Prof. Dr. Hildegard Büning für die Insertion eines Nbs anstelle des DARPins zur Verfügung gestellt wurden. Das Plasmid *pHMX-VP2-Nb* kodiert für das VP2-Nb Fusionsprotein, das am N-Terminus einen Hexahistidin- und c-Myc-Tag trägt und den Nb über eine kurze Sequenz mit VP2 verbindet (Abb. 8.1 B und C). Durch die Insertion des Nbs entspricht das geschätzte Molekulargewicht ungefähr dem des Capsidproteins VP1. Das Plasmid *pXX2-VP2ko* stellt die Capsidproteine VP2 und VP3 zur Verfügung und enthält eine Mutation des Startcodons von VP2, um die Expression des natürlichen VP2 zu verhindern. Beide Plasmide enthalten die Mutationen der zwei Arginine an Position R585 und R588 zu Alaninen, um die Bindung an den natürlichen AAV2 Rezeptor HSPG zu inhibieren (Münch *et al.* 2013).

8.3.2 Nanobody-VP2 Fusionsproteine werden in AAV2^{RA} Capside eingebaut

Die Herstellung der AAVs mit an VP2 fusioniertem Nb 1c81 erfolgte mittels Transfektion von HEK293 Zellen mit den Capsid-kodierenden Plasmiden, dem pXX6 Helferplasmid und dem GFP-Reporter-kodierenden Plasmid. Nach drei Tagen wurden AAV-enthaltende Zelllysate geerntet. Expression und Inkorporation der VP2-Nb Fusionsproteine in virale AAV2^{RA} Capside wurden nach Immunpräzipitation viraler Partikel im Western Blot nachgewiesen. Dazu wurden Immunkomplexe aus AAV Partikeln und AAV-spezifischem AE1-rbFc mit Protein G Sepharose Kügelchen aus Zellysaten präzipitiert. Gebundene Proteine wurden mit SDS eluiert, mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Freie Bindestellen der Membran wurden mit 5 % Milchpulver in TBST über Nacht blockiert, bevor die Detektion der Capsidproteine mit mAk B1 und Maus-IgG-spezifischen HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte. In einer weiteren Western Blot Analyse

wurde das VP2-Nb Fusionsprotein mit einem c-Myc-spezifischen HRP-gekoppelten mAk (9E10) detektiert. Die Chemolumineszenzreaktionen wurden durch Zugabe des Substrats der Meerrettich-Peroxidase initiiert und auf Röntgenfilm detektiert (Abb. 8.2). Zum Vergleich wurden Immunpräzipitate von AAV2 und AAV2^{RA} aufgetragen.

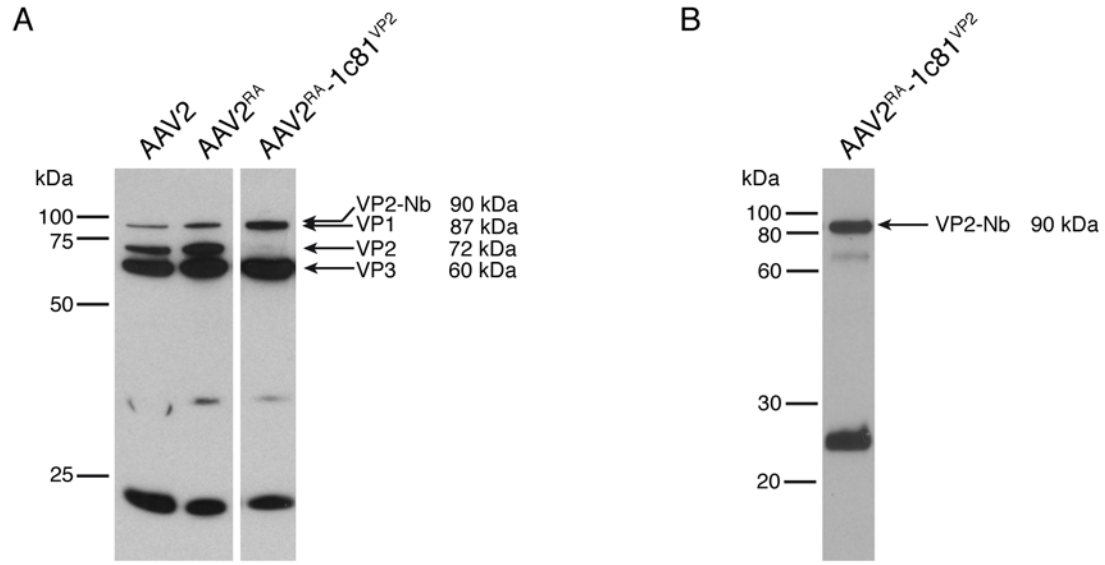

Abb. 8.2: VP2-Nb Fusionsproteine werden exprimiert und in virale Capside eingebaut.
AAVs wurden mittels Transfektion in HEK293 Zellen hergestellt. Nach drei Tagen wurden die Zellen zentrifugiert, in 1 ml PBS-MK aufgenommen und in drei Zyklen Einfrieren/Auftauen lysiert. 100 µl AAV-enthaltende Lysate wurden mit AAV-spezifischem AE1-rbFc gebunden an Protein G Sepharose immunpräzipitiert. Gebundene Proteine wurden in SDS-Probenpuffer eluiert, mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF-Membran übertragen (Western Blot). (A) Die Capsidproteine wurden mit mAk B1 und Maus-spezifischem HRP-konjugiertem Sekundärantikörper detektiert. (B) VP2-Nb Fusionsproteine wurden mit c-Myc-spezifischem HRP-konjugiertem mAk 9E10 nachgewiesen. Die Chemolumineszenzreaktionen wurden auf Röntgenfilm sichtbar.

Die Ergebnisse zeigen bei allen AAV-Präzipitaten und Detektion mit mAk B1 eine prominente Bande des häufigsten Capsidproteins VP3 bei ~60 kDa. AAV2 und AAV2^{RA} Immunpräzipitate zeigen auch zwei Banden auf Höhe von ~72 und 87 kDa, die VP2 und VP1 entsprechen (Abb. 8.2 A). In Präzipitaten von AAV2^{RA}s mit Nb 1c81 fusioniert an VP2 (AAV2^{RA}-1c81^{VP2}) fehlt wie zu erwarten die VP2-Bande, es ist jedoch eine prominente Bande von ~90 kDa sichtbar. Da das Molekulargewicht des VP2-Nb Fusionsproteins fast dem von VP1 entspricht (~90 kDa und ~87 kDa), kann nicht unterschieden werden, ob die Bande beiden Proteinen oder nur einem der Proteine entspricht. Die Detektion der AAV-Präzipitate von AAV2^{RA}-1c81^{VP2} mit c-Myc-spezifischem mAk 9E10 zeigt jedoch ebenfalls eine prominente Bande auf Höhe von ~90 kDa, die wahrscheinlich den c-Myc-getaggten Fusionsproteinen entspricht (Abb. 8.2 B).

8.3.3 AAVs mit N-terminal an VP2-fusioniertem Nb 1c81 zeigen keine Bindung oder Transduktion P2X7-exprimierender Zielzellen

Zunächst wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, ob AAV^{RA}s mit dem P2X7-spezifischen Nb 1c81 fusioniert an VP2 an HEK^{P2X7} Zielzellen binden. Dazu wurden untransfizierte HEK Zellen im Überschuss mit eFluor450-beladenen HEK^{P2X7} Zellen gemischt und für 30 Minuten auf Eis mit AAV-enthaltenden Zellkulturüberständen inkubiert. Zellgebundene Virionen wurden nach zweimaligem Waschen der Zellen mit AF647-konjugiertem scFvA20-rbFc detektiert (Abb. 8.3 A). Die Ergebnisse zeigen die unspezifische Bindung von AAV2 an beide Zellpopulationen, während mit AAV2^{RA} und AAV2^{RA}-1c81^{VP2} keine Färbung der Zellen detektierbar war (Abb. 8.3 A). Für die Untersuchung einer möglichen Transduktion P2X7-exprimierender Zielzellen wurden 1*10^5 HEK^{mP2X7} Zellen in den Vertiefungen einer 24-Well Zellkulturplatte ausgesät. Am Folgetag wurden AAV-enthaltende Zellkulturüberstände zu den Kulturen hinzugefügt. Nach 48 h wurde die Expression des Reportergens GFP durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 8.3 B). Das Ergebnis zeigt nach Inkubation mit AAV2 eine sehr starke GFP-Fluoreszenzintensität und damit effektive Transduktion, während die Zellen mit AAV2^{RA} wie zu erwarten nur gering transduziert wurden. Auch nach Inkubation mit AAV2^{RA}-1c81^{VP2} zeigt sich nur eine schwache GFP-Expression und damit geringe Transduktion der Zielzellen (Abb. 8.3 B).

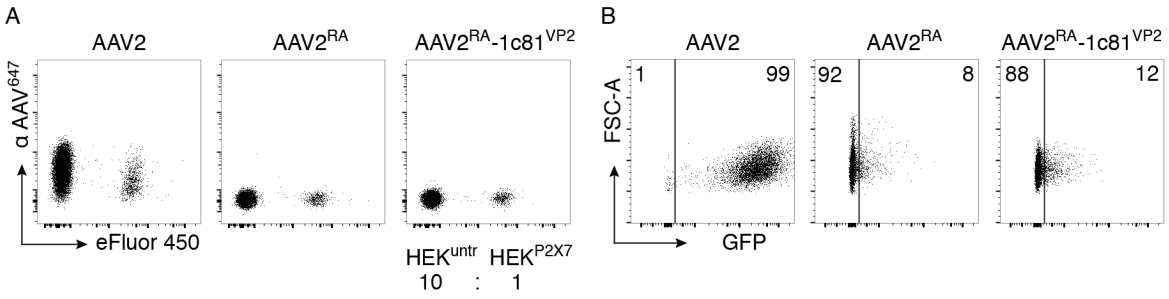

Abb. 8.3: AAV2^{RA}-1c81^{VP2} binden und transduzieren P2X7-positive Zielzellen nicht.
(A) HEK^{untr} Zellen wurden im Verhältnis 10:1 mit eFluor450-beladenen HEK^{P2X7} Zellen gemischt und für 30 Minuten bei 4 °C mit AAV-enthaltenden Zellkulturüberständen inkubiert (1*10^9 vg/Ansatz). Nach zweimaligem Waschen erfolgte die durchflusszytometrische Detektion gebundener Partikel mit AF647-konjugiertem scFvA20-rbFc. (B) HEK^{P2X7} Zellen wurden in 24-Well Zellkulturplatten ausgesät (1*10^5 Zellen/Napf). Nach 24 h erfolgte die Zugabe AAV-enthaltender Zellkulturüberstände (1000 vg/Zelle). Nach 48 h wurde die Expression des Reportergens GFP durchflusszytometrisch ermittelt.

8.4 Liste der verwendeten Oligonukleotide

Tabelle 8.1: Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Name	**Verwendung**	**Sequenz**
CMV_fn (forward)	Sequenzierung pCSE2.5	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
BGHrev (reverse)	Sequenzierung pCSE2.5	TAGAAGGCACAGTCGAGG
Seq-pXX2 (forward)	Sequenzierung pXX2	GCAAGGCTCAGAGAAAACAAATGTGGAC
Seq-pXX2 (reverse)	Sequenzierung pXX2	CGTCCGTGTGTGGAATCTTTGCC
VP1-mCherry (forward)	Sequenzierung pRC_RR_VP1-Nb	gctgcgtaccggaaacaac
VP1-mCherry (reverse)	Sequenzierung pRC_RR_VP1-Nb	cttggtagctccagtccacgag
P1 (forward)	Sequenzierung pHMX-Nb-VP2	cgtggatagcggtttgactca
VP2 (reverse)	Sequenzierung pHMX-Nb-VP2	tccggttcccgaggagga
MutR585_8A (forward)	Mutagenese R585A/R588A	ccaacctccaggcaggcaacgcacaagcagctacc
MutR585_8A (reverse)	Mutagenese R585A/R588A	ggtagctgcttgtgcgttgcctgcctggaggttgg
EVQLV-NgoMIV-25GS_fw (forward)	Klonierung von Nb 1c81 in mCherry-site von VP1	tcttGCCGGCGGCGGTGGATCTGGCGGAGGTGGCAGTGGAGGCGGAGGTAGCGGAGGGGGCGGATCTGGAGGCGGAGGCAGCGAGGTGCAATTGGTGGAGTC
QVQLQ-NgoMIV-25GS_fw (forward)	Klonierung von Nbs s-14 in mCherry-site von VP1	tcttgccggcggaggcggatctggcggaggcggaagtggcggcggaggaagcggagggggcggatctgggggggggaggctcacaggtgcagctgcag
370-Ngo-25GS_f (forward)	Klonierung von Nb 370 in mCHERRY-site von VP1	tcttgccggcggaggcggatctggcggaggcggaagtggcggcggaggaagcggagggggcggatctgggggggggaggctcagatgtgcagctgcaggcgtc
1067-53Ngo25GS_f (forward)	Klonierung der Nbs 1067 und 1053 in mCHERRY-site von VP1	tcttgccggcggaggcggatctggcggaggcggaagtggcggcggaggaagcggagggggcggatctgggggggggaggctcagatgtgcagctgcaggagtc
JKo19-Ngo-25GS_f (forward)	Klonierung von Nb JK19 in mCHERRY-site von VP1	tcttgccggcggaggcggatctggcggaggcggaagtggcggcggaggaagcggagggggcggatctgggggggggaggctcacaggtgcagctgcaggagtc
VTVSS-5GA-KasI_rev (reverse)	Klonierung von Nbs mit C-terminaler Sequenz VTVSS in mCHERRY-site von VP1	acgcggcgcctccgcctcctgaggagacggtgac

A20-20GS-BamHI_for (forward)	Klonierung des scFvs A20 mit N-terminalem GS-linker	tcttggatccggcgggggaggtagtgggg gtgggggctcaATGTCCGACGTGCAGCTG
Pci-VHH_for (forward)	Klonierung von Adaptern, Einfügung PciI Schnittstelle an N-terminale VHH	tcggACATGTccgatgtgcagctgca
VTVSS-10GS-BamHI_rev (reverse)	Klonierung von VHHs mit C-terminaler Sequenz VTVSS, Anfügung GS-linker für Adapter	acgcggatcccccgccaccgctgcctcca ccgccTGAGGAGACGGTGAC
VTVST-10GS-BamHI_rev (reverse)	Klonierung von VHHs mit C-terminaler Sequenz VTVST, Anfügung GS-linker für Adapter	acgcggatcccccgccaccgctgcctcca ccgccTGTGGAGACGGTGAC
AE1-BamHI-15GS-fw (forward)	AE1-Amplifikation mit 15GS-linker und BamHI Schnittstelle	tcttggatccggaggcggaggatctggcg gcggaggaagcggcggaggcggaagtcag gtgaagctgcag
BamHI-15GS-NbAAV_f (forward)	Klonierung von neuen AAV-spezifischen Nbs in Adapter	cagtggatccggcgggggaggtagtgggg gtgggggctcaggggggtgggggcaacatg tctcaggtgcagctg
VTVSS-Not_r (reverse)	Klonierung von neuen AAV-spezifischen Nbs in Adapter	gtcagcggccgcTGAGGAGACGGTGAC
CMVfw_qPCR (forward)	Sense-Primer zur Bestimmung des viralen Titers mittels quantitativer PCR	gggactttcctacttggca
CMVrev_qPCR (reverse)	Antisense-Primer zur Bestimmung des viralen Titers mittels quantitativer PCR	aagtcccgttgattttggtg

8.5 Sicherheit und Entsorgung

Alle Versuche wurden unter Berücksichtigung der Gefährdungs- und Sicherheitshinweise der verwendeten Chemikalien durchgeführt. Chemikalien, Lösungen und Puffer wurden in dafür vorgesehene Behälter entsorgt und kontaminierte Materialien zuvor autoklaviert.

Tabelle 8.2: Verwendete Chemikalien und ihre Gefährdungs- und Sicherheitshinweise

Chemikalie	**Gefahrensymbol**	**H-Sätze**	**P-Sätze**
2-Mercaptoethanol	GHS05, GHS06, GHS08, GHS09	301+331, 310, 315, 317, 318, 373, 410	270, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 310
3,3'5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Acetonitril (C_2H_3N)	GHS02, GHS07	225, 302+312+332, 319	210, 280, 305+351+338, 403+235
Ameisensäure	GHS02, GHS05, GHS06	226, 290, 302, 314, 331	210, 280, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310
Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3)	GHS07	302	270
Blasticidin S Hydrochlorid	GHS06	300	270, 301+310
Carbenicillin Dinatriumsalz	GHS08	317, 334	302+352, 333+313, 342+311
Dithiothreitol (DTT)	GHS07	302+312+332	261, 280, 301+312, 304+340, 363, 501
Ethanol	GHS02	225	210
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	GHS07	319	305, 351+338
Geneticindisulfat (G418)	GHS08	317, 334	302+352, 304+341, 333+313

Imidazol	GHS05, GHS07, GHS08	302, 314, 360D	260, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 308+313
Iodacetamid	GHS06, GHS08	315, 317, 319, 335	280, 302+352, 304+340,
Kanamycinsulfat	GHS08	360D	260, 308+313
Lithiumdodecylsulfat (LDS)	GHS02, GHS05, GHS07	228, 318, 315, 335	210, 280, 305+351+338
Methanol	GHS02, GHS06, GHS08	225, 301+311+331, 370	210, 270, 280, 303+361+353, 304+340, 308+311
Natriumazid (NaN_3)	GHS06, GHS08, GHS09	300, 310, 373, 410	273, 280, 301+310+330, 302+352, 310, 391, 501
Natriumdodecylsulfat (SDS)	GHS02, GHS05, GHS07	228, 302+332, 315, 318, 335, 412	210, 261, 280, 301+312+330, 305+351+338+310 370+378
Natriumphosphat	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Polyethylenimin (PEI)	GHS07	302	264, 270, 301+312, 330, 501
Salzsäure	GHS05, GHS07	290, 314, 335	280, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310
Schwefelsäure	GHS05	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
TRIS	GHS07	315, 319, 335	280, 302+352, 305+351+338, 312
Triton X-100	GHS05, GHS07	302, 318	280, 301+312, 305+351+338
Trypanblau	GHS08	350	201, 308+313

8.5.1 H-Sätze

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H300	Lebensgefahr bei Verschlucken.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H310	Lebensgefahr bei Hautkontakt.
H311	Giftig bei Hautkontakt.
H312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H330	Lebensgefahr bei Einatmen.
H331	Giftig bei Einatmen.
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H350	Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H370	Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
H373	Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
H411	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

8.5.2 P-Sätze

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.

P260 Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.

P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.

P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.

P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P284 [Bei unzureichender Belüftung] Atemschutz tragen. (Bis zum Inkrafttreten der 8. ATP am 1. Februar 2018: Atemschutz tragen.)

P301 Verschlucken:

P302 Bei Berührung mit der Haut:

P303 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):

P304 Bei Einatmen:

P305 Bei Kontakt mit den Augen:

P308 Bei Explosion oder falls betroffen:

P310 Sofort Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.

P311 Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.

P312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.

P313 Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P330 Mund ausspülen.

P331 Kein Erbrechen herbeiführen.

P333 Bei Hautreizung oder –ausschlag:

P235 Kühl halten.

P338 Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

P340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.

P341	Bei Atembeschwerden an die frische bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P342	Bei Symptomen der Atemwege:
P351	Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
P352	Mit viel Wasser/... waschen.
P353	Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
P361	Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
P363	Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
P370	Bei Brand:
P378	… zum Löschen … verwenden. (Die vom Gesetzgeber offen gelassenen Einfügungen sind vom Inverkehrbringer zu ergänzen)
P391	Verschüttete Mengen aufnehmen.
P403	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P501	Enstorgung des Inhalts/ Behälters gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften.

8.6 Publikationen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

Seifert L, Hoxha E, Eichhoff AM, Zahner G, Dehde S, Reinhard L, Koch-Nolte F, Stahl RAK, Tomas NM (2018) The most N-terminal region of THSD7A is the predominant target for autoimmunity in THSD7A-associated membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. in press

Cowardin CA, Buonomo EL, Saleh MM, Wilson MG, Burgess SL, Kuehne SA, Schwan C, Eichhoff AM, Koch-Nolte F, Lyras D, Aktories K, Minton NP, Petri WA Jr. (2016) The binary toxin CDT enhances Clostridium difficile virulence by suppressing protective colonic eosinophilia. *Nat Microbiol.* 11; 1(8):16108.

Bannas P, Lenz A, Kunick V, Well L, Fumey W, Rissiek B, Haag F, Schmid J, Schütze K, Eichhoff A, Trepel M, Adam G, Ittrich H, Koch-Nolte F. (2015) Molecular imaging of tumors with nanobodies and antibodies: Timing and dosage are crucial factors for improved in vivo detection. *Contrast Media Mol Imaging, Sept-Oct;* 10(5):367-78.

Unger M*, Eichhoff AM*, Schumacher L*, Strysio M, Menzel S, Schwan C, Alzogaray V, Zylberman V, Seman M, Brandner J, Rohde H, Zhu K, Haag F, Mittrücker HW, Goldbaum F, Aktories K, Koch-Nolte F. (2015) Selection of nanobodies that block the enzymatic and cytotoxic activities of the binary Clostridium difficile toxin CDT. *Sci Rep*. 19; 5:7850.

Kongressbeiträge:

'Engineering single domain antibodies (Nanobodies) as potent antagonists of lymphocyte ecto-enzymes, ion channels, and bacterial toxins', Poster, 4th European Congress of Immunology (ECI), 2015 (Wien, Österreich)

'Nanobodies that block the enzymatic and cytotoxic activities of the binary *C. difficile* toxin CDT.' Vortrag, 6. Protein & Antibody Engineering Summit (PEGS), 2014 (Lissabon, Portugal)

8.7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Ich danke Dr. Friedrich Buck (Klinische Chemie, UKE) für die massenspektrometrische Analyse der Aminosäuresequenz von AE1 (Abb. 3.1, Abschnitt 6.1.14.2), Enja Schneider (IfI) für Unterstützung bei der Klonierung von AE1-enthaltenden Antikörpern (Abb. 3.1, Abb. 3.9), Birte Albrecht (UKE School of Life Sciences) für Unterstützung bei der Klonierung von VP1/VP2-Nb Fusionsproteinen und AAV-Produktionen (Abb. 3.4, Abb. 3.5, Abb. 8.1, Abb. 8.2), sowie Dr. Sahil Adriouch (IfI und INSERM, Rouen) und Thomas Eden (IfI) für die Durchführung von AAV Immunisierungen und Nikolina Pantelic (IfI) für die anschließende Unterstützung bei der Selektion und Charakterisierung AAV-spezifischer Nbs sowie der Evaluierung als Adapter (Abb. 3.17, Abb. 3.18, Abb. 3.20).

Datum, Unterschrift