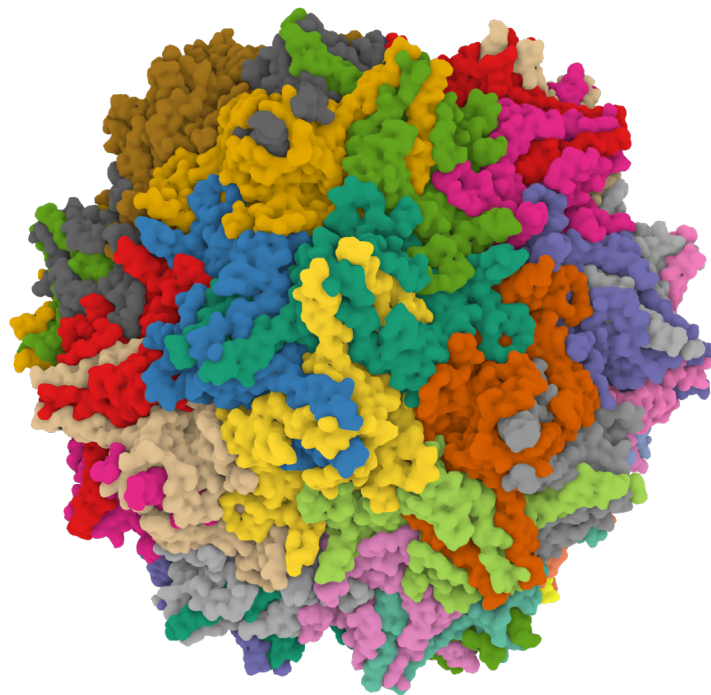


Aufarbeitung virusähnlicher Partikel (VLPs)



Abschlussbericht der Kooperationsphase 2024/2025

Durchgeführt am KIT Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik -
Molekulare Aufarbeitung von Bioprodukten (BLT-MAB)

Betreut durch
Dipl.-Ing. Kristina Schleining und Dipl.-Biol. Birgit Roser

Helena Ehlert und David Geisler, Kurs KA19

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	1
2	Einleitung	2
3	Grundlagen	3
3.1	Virusähnliche Partikel (VLP)	3
3.2	Adeno-assoziierte Viren (AAV)	3
4	Methoden	5
4.1	Affinitätschromatographie (AC)	5
4.2	ELISA	7
4.3	Photometrie	9
5	Durchführung	13
5.1	Anzüchten der genetisch veränderten <i>E. coli</i> Bakterienkultur	13
5.2	Affinitätschromatographie	14
5.3	ELISA	17
5.4	NanoDrop	18
6	Ergebnisse und Diskussion	19
6.1	Kultivierung	19
6.2	Affinitätschromatographie	21
7	Fehlerdiskussion	26
8	Fazit	27
9	Danksagung	28
10	Anhang	29
10.1	Chemikalienverzeichnis	29
10.2	ELISA-Messdaten	31
10.3	Literatur- und Quellenverzeichnis	32
10.4	Selbstständigkeitserklärung	34

1 Abstract

Virus-like particles (VLPs) are non-infectious capsid-shells of certain viruses that lack virus DNA. Therefore they can function as a vector to transmit specific DNA or mRNA into cells as a form of gene therapy. VLPs can be produced easily and inexpensively in bacteria such as *E. coli*. Due to this fact, they could be considered as a huge step toward making gene therapies a more accessible and less expensive option for treating rare, serious diseases. Currently, comparable therapies would cost health insurances and patients millions of Dollars - costs that neither insurances nor private persons can afford.

In our project we cultivated genetically modified *E. coli* BL21(DE3) cultures in order to produce VLPs. We separated the particles from the cell lysate with affinity chromatography comparing different buffers for binding and eluting the particles. Finally, we analyzed our results with an ELISA antibody test. We found a double buffer elution process leading to a strong shift in pH to be the most effective choice for eluting the bound capsids. With these elution conditions we managed to increase the particle yield of the elution step to over 3 %.

2 Einleitung

Virusähnliche Partikel (englisch *virus-like particles*, kurz VLPs) haben das Potenzial, die Kosten von Gentherapien stark zu senken. VLPs können als gentherapeutischer Vektor DNA oder mRNA tragen, die so in das Genom von Körperzellen eingeschleust werden kann. Hierfür werden üblicherweise genetisch modifizierte Viren verwendet, welche allerdings noch sehr hohe Produktionskosten haben. VLPs wiederum können mit Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) effizient und kostengünstig in großen Mengen produziert werden. Dies ist möglich, da virusähnliche Partikel aus der nicht-infektiösen Capsidhülle bestimmter Viren bestehen, welche als Proteinkomplex bakteriell hergestellt werden kann. VLPs enthalten keine virale DNA und können somit als Träger für beliebiges Erbgut verwendet werden. Die Kapazität ist hierbei von der jeweiligen Virusart abhängig.

Durch Einschleusen von Nukleinsäuren können in Zellen defekte Gene ersetzt oder über Gen-Silencing stillgelegt werden, Fremdgene eingeschleust werden oder bereits vorhandene Gene permanent editiert werden (Bulcha u. a. 2021). Dies ermöglicht das effektive Bekämpfen von Erbkrankheiten, was ohne Gentherapie oft sehr schwer zu bewältigen ist.

Aus diesen Gründen könnten mit VLPs z. B. momentan nahezu unbezahlbare Therapieansätze für schwere, seltene Krankheiten günstiger und zugänglicher werden, weshalb die Forschung an VLPs und ihren Eigenschaften sehr vielversprechend ist.

Die folgende Arbeit befasst sich mit der Optimierung der Aufarbeitung der virusähnlichen Partikeln von Adeno-assoziierten Viren (AAVs), speziell der AAV5-Capside zusammengesetzt aus dem AAV5-VP3-Protein. Diese bieten sich als Forschungsobjekt an, da AAVs bereits in der Gentherapie eingesetzt werden, die Produktion von deren virusähnlichen Partikeln allerdings noch nicht ausführlich erforscht wurde. Die VLPs wurden in einer *E. coli* BL21(DE3)-Kultur produziert und über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Um die Ausbeute der aufgereinigten VLPs zu optimieren, wurden verschiedene Bindepuffer und Elutionspuffer mit unterschiedlichen pH-Werten getestet. Die Konzentrationen der in den verschiedenen Ansätzen vorhandenen VLPs wurde anschließend anhand von ELISA-Antikörpertests ermittelt.

3 Grundlagen

3.1 Virusähnliche Partikel (VLP)

Bei virusähnlichen oder auch virusartigen Partikeln handelt es sich um die Proteinkapside der zugehörigen Viren. Diese sind Proteinkomplexe, welche sich selbst zusammensetzen und üblicherweise aus mehreren Proteintypen bestehen.

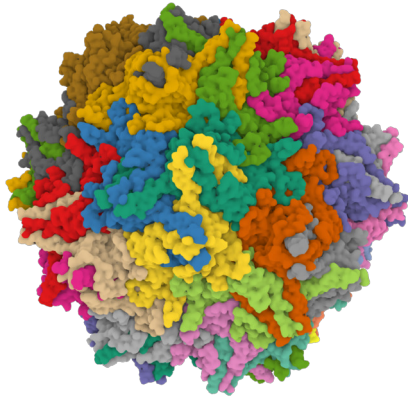
Da virusähnliche Partikel keine virale Erbinformation enthalten, sind sie nicht in der Lage sich in Wirtszellen zu vermehren und von dort aus weitere Zellen zu infizieren. Es können allerdings Nukleinsäuren in VLPs eingekapselt und in Zielzellen transportiert werden. Somit können VLPs möglicherweise in Zukunft in der Gentherapie eingesetzt werden, um hier die Rolle von Viren als gentherapeutische Vektoren zu übernehmen.

VLPs werden auch in manchen Impfstoffen eingesetzt, da sie die gleichen Oberflächenproteine wie die korrespondierenden normalen Viren besitzen und somit zur Immunisierung ohne Infektionsrisiko verwendet werden können.

3.2 Adeno-assoziierte Viren (AAV)

Adeno-assoziierte Viren (AAVs) sind Viren mit einer Größe von ca. 25 nm und einem ca. 4,8 Kilobasen umfassenden Genom, welche sich nur in Zellen, die bereits von Adenoviren infiziert wurden, vermehren können (Naso u. a. 2017). Sie haben die Besonderheit, dass sie in der Lage sind, ihr Erbgut spezifisch an einer bestimmten Stelle auf Chromosom 19 (AAVS1) in das Genom der infizierten Zelle einzuschleusen können (Kotin u. a. 1990). Somit kann, im Gegensatz zu Retroviren, einer anderen in der Gentherapie verwendeten Virengruppe, Erbgut möglicherweise gezielt in das Genom eingebaut werden, wodurch ein niedrigeres Risiko für Komplikationen besteht.

Das Erbgut der AAVs besteht aus dem *rep*- und dem *cap*-Gen. Das *rep*-Gen ist hierbei für die Replikation relevant, während das *cap*-Gen die Proteine VP1, VP2 und VP3 sowie MAAP und AAP bildet. VP1, VP2 und VP3 bilden zusammen die Capsidhülle des AAVs, welche aus 60 ikosaedrisch angeordneten Proteinen, üblicherweise im Verhältnis 1:1:10, besteht. Diese ist in Abb. 1 dargestellt.



(a) Oberfläche des Viruscapsids.



(b) Ikosaedrische Symmetrie des Capsids.

Abbildung 1: AAV-Capsid (Serotyp 5).¹

AAV-VLPs

AAV-VLPs bestehen aus den Proteinen VP1, VP2 und VP3, welche sich selbstständig sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu dem Viruscapsid assemblieren. Aufgrund der ähnlichen Struktur von VP1, VP2 und VP3 müssen nicht alle drei Proteine für die Capsidbildung vorhanden sein, allerdings müssen alle drei vorhanden sein, dass die VLPs als gentherapeutischer Vektor eingesetzt werden können, da jedes der Proteine bei der Infektion einer Zelle eine Rolle spielt.

Die untersuchten VLPs bestehen ausschließlich aus dem VP3-Protein des AAV5-Virus. Sie wurden in *E. coli* produziert und anschließend mittels Affinitätschromatographie isoliert.

1. Erstellt über mol* (Sehnal u. a. 2021) nach Daten der RCSB Proteindatenbank ([RCSB.org](https://www.rcsb.org), Berman u. a. 2000) ID pdb_00007kp3, veröffentlicht in M. Silveria 2020

4 Methoden

4.1 Affinitätschromatographie (AC)

Chromatographie ist eine umfangreich einsetz- und variierbare Methode zur Trennung und Aufreinigung von Stoffen. Die Separation findet auf Grund von den unterschiedlichen Wechselwirkungen oder Eigenschaften der Stoffe eines Stoffgemisches statt.

Im Falle einer Affinitätschromatographie werden die Stoffe anhand dessen getrennt, ob sie an die Liganden (Teilchen, an das ein Zielprotein reversibel bindet) eines Materials binden oder nicht. Man unterscheidet bei der Affinitätschromatographie zwischen dem sogenannten Säulen- oder Batchverfahren. Bei der Säulenchromatographie werden Proben und Puffer durch Säulen geleitet, deren Oberflächen mit einem Material beschichtet sind, auf dem sich die Liganden befinden. Die Zielproteine haften am Säulenmaterial, während der Rest abgewaschen wird. Im Batchverfahren wird das gleiche Säulenmaterial verwendet, allerdings wird dieses entfernt und in Eppendorfgefäße abgefüllt. Die Proben und Puffer werden in Teilabschnitten zusammengeführt. Das bedeutet, dass das Verfahren diskontinuierlich, in einzelnen Abschnitten (*engl. batches*) abläuft.

Struktur des Säulenmaterials

Die Säulen sind mit einem spezifischen Resin befüllt, welches die Bindung der Zielproteine (hier: VLPs) ermöglicht.

Das Resin besteht aus einer Matrix, auf der sich sogenannte *spacer arms* befinden, die aus ihr herausragen. Auf den *spacer arms* sitzen die proteinspezifischen Liganden, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften reversibel an das Protein binden (Abb. 2). Im Projekt wurde eine Säule von Cytiva mit Capto AVB Resin verwendet.



<https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11485-pdf#page=13>

Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer Säule.

Ablauf der Affinitätschromatographie

1. **Equilibrieren** - Das Resin wird durch einen Bindepuffer auf die Probe vorbereitet, indem sich ein stabiles chemisches Milieu einstellt (Abb. 3).

<https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11485-pdf#page=11>

Abbildung 3: Resin liegt zur Bindung bereit.

2. **Probenauftrag und Waschgänge** - Die Probe wird aufgetragen und die Zielproteine binden über die Liganden. In mehreren Waschschritten mit Puffer werden die Substanzen, die nicht gebunden haben abgespült (Abb. 4).

<https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11485-pdf#page=11>

Abbildung 4: Resin beim Wash.

3. **Elution** - Mit einem Elutionspuffer werden die gebunden Proteine von den Liganden abgelöst, sodass sie zur weiteren Verwendung vorliegen. Dafür muss der Elutionspuffer einen deutlich anderen pH-Wert haben als der zuvor verwendete Bindepuffer. Dieser pH-Shift von bspw. neutral auf sauer oder alkalisch stört die Bindung und eluiert die Proteine (Abb. 5).

<https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11485-pdf#page=11>

Abbildung 5: Resin bei Elution.

Ziel der Affinitätschromatographie ist es, die Zielproteine (VLPs) selektiv zu isolieren und so aufzureinigen.

4.2 ELISA

Bei ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) handelt es sich um ein quantitatives Analyseverfahren zur hochsensitiven Bestimmung der Konzentration eines bestimmten Antigens über den spezifischen Antikörper.

Im Versuch wurden beispielsweise AAV-Antikörper verwendet, um die Capsid-Konzentration einer Probe zu messen. Die Capside binden an die Antikörper, die so modifiziert wurden, dass nach vollständiger Durchführung des ELISAs eine Farb-reaktion abläuft (Abb. 6). Die Konzentration der gebundenen Capside lässt sich anhand der Farbreaktion fotometrisch bestimmen.

Eine Variante eines ELISA ist der Sandwich-ELISA. Dieser verwendet zusätzlich Antikörper, um die gewünschten Zielproteine spezifisch an die Mikrotiterplatte zu binden. Ein direkter ELISA verwendet dagegen nur einen Antikörper und verlässt sich auf die unspezifische Bindung zwischen Antikörper und Antigen. Durch den unterschiedlichen Aufbau zeigt der Sandwich-ELISA eine deutlich höhere Sensitivität des Assays.

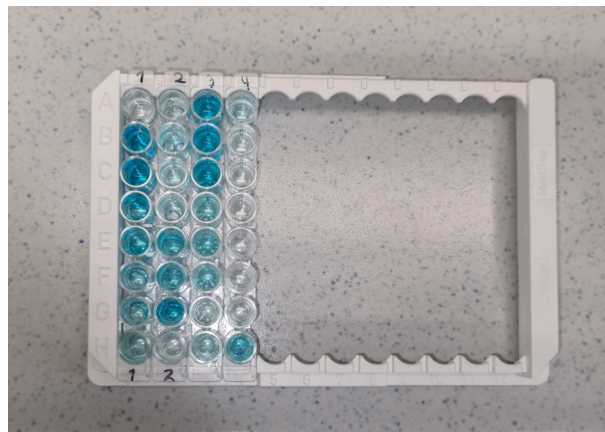


Abbildung 6: Farbreaktion bei einem ELISA.

Durchführungsschritte

1. **Beschichten einer Mikrotiterplatte** - Spezifische Antikörper zu dem zu analysierenden Antigen (hier: Teile des Capsids) werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte, die sogenannten Wells, aufgetragen.
2. Waschgang - Die Wells werden ausgewaschen und nicht gebundene Antikörper entfernt. So vermeidet man, dass diese in den folgenden Schritten auch an das Antigen binden. In der Regel wurden diese Schritte (Auftragen und Waschen des ersten Antikörpers) bereits vom Hersteller übernommen.

https://www.progen.com/media/6e/df/34/1686574647/20-360%20PRAAV5%20ELISA%20en_V12.2-web.pdf#page=11

Abbildung 7: Auftragen der Probe.

https://www.progen.com/media/6e/df/34/1686574647/20-360%20PRAAV5%20ELISA%20en_V12.2-web.pdf#page=11

Abbildung 8: Auftrag zweiter Antikörper mit Enzymkomplex.

https://www.progen.com/media/6e/df/34/1686574647/20-360%20PRAAV5%20ELISA%20en_V12.2-web.pdf#page=12

Abbildung 9: Hinzugabe des Enzymsubstrats.

https://www.progen.com/media/6e/df/34/1686574647/20-360%20PRAAV5%20ELISA%20en_V12.2-web.pdf#page=12

Abbildung 10: Farb-reaktion und Abbruch.

3. **Hinzufügen der Probe** - Die Antigene in der Probe binden spezifisch an die Antikörper auf der Platte.
4. Waschgang - Die Mikrotiterplatte wird erneut ausgewaschen, um nicht gebundene Bestandteile der Probe zu entfernen.
5. **Binden des zweiten Antikörpers** - Der zweite Antikörper wird auf die Platte gegeben. Dieser ist mit einem Enzymkomplex, welcher eine Farbreaktion katalysiert, verbunden.
6. Waschgang - Durchführung eines weiteren Waschganges zum Entfernen ungebundener Antikörper.
7. **Hinzugabe des Enzymsubstrats** - Durch die Zugabe des Substrates wird die Farbreaktion der Enzyme gestartet. In Wells, in denen mehr Enzyme gebunden wurden, da die Konzentration des Antigens in der Probe höher ist, wird mehr Substrat umgesetzt. Dies zeigt sich durch eine intensivere Färbung. (vgl. Abb. 6).
8. **Abbruch der Reaktion** - Die Enzyme werden mit einer Stopplösung inhibitiert, wodurch die Reaktion abbricht.

Bei dem benutzten Progen® ELISA AAV3 Kit² liegen Anti-AAV-Antikörper bereits in den Wells der Mikrotiterplatte gebunden vor. An diese binden die virusähnlichen Partikel. Anschließend wird ein zweiter Antikörper, an den ein Biotin-Konjugat gekoppelt ist, aufgetragen (Abb. 11). An das Biotin bindet das Streptavidin Strep-HRP, das als Enzymkomplex fungiert. Als Enzymsubstrat wird TMB zugegeben und durch den gebundenen Enzymkomplex zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Zuletzt wird Schwefelsäure als Stopplösung verwendet. Die Reaktion bricht ab und die Farbe verändert sich aufgrund des veränderten pH-Wertes von blau zu gelb.



Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines ELISAs.

Zur Ermittlung der genauen Antigen-Konzentrationen, in diesem Fall der Konzentration der VLPs, wird die Probe photometrisch untersucht und die Extinktion gemessen. Je höher die Konzentration an VLPs in der Probe, desto mehr Farbstoff wurde gebildet. Daher lässt sich durch die Intensivität des Farbstoffs die Höhe der Konzentration vor der genauen Bestimmung grob ableiten.

4.3 Photometrie

Photometrie ist ein häufig in der Biologie und Chemie verwendetes, analytisches Verfahren, mit dem Stoffkonzentrationen in Flüssigkeiten bestimmt werden können. Dabei nutzt man, dass die Extinktion eines Stoffes, die von einem Photometer gemessen werden kann, unter anderem von dessen Konzentration abhängt. Aus den Extinktionswerten kann mit dem Lambert-Beerschen Gesetz die Stoffkonzentration bestimmter Stoffe über eine Eichgerade bestimmt werden.

2. Hersteller: <https://www.progen.com/AAV3-ELISA-Control/PRAAV3-C>

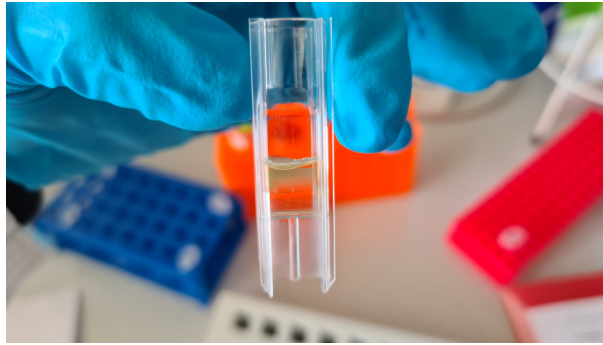


Abbildung 12: Küvette zur Bestimmung der Lichtabsorption einer Probe.

Prinzip der Photometrie

Bei der Photometrie wird in einem Photometer Licht einer bestimmten Wellenlänge durch die zu untersuchende Probe geleitet, die sich in einer Küvette befindet. Die durchstrahlte Schichtdicke beträgt dadurch stets $d = 1 \text{ cm}$. Damit nur Licht einer bestimmten Wellenlänge die Probe bestrahlt, befindet sich im Photometer ein Monochromator, der dafür sorgt, dass eine bestimmte Wellenlänge aus dem Lichtstrahl herausgefiltert wird. Die Probe absorbiert einen Teil des Lichts. Das Photometer misst die Intensität des einfallenden Lichts I_0 und des austretenden Lichts I (vgl. Abb. 13).



Abbildung 13: Schematischer Aufbau eines Photometers.

Das Prinzip der Messung beruht auf dem Lambert-Beerschen Gesetz. Dieses beschreibt den Zusammenhang zwischen der Extinktion bei einer Wellenlänge λ ($E(\lambda)$), des molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda)$, der Konzentration der absorbierenden Substanz (c), der Schichtdicke der Probe (d), sowie I_0 und I .

$$E(\lambda) = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d$$

Für ein exaktes Ergebnis wird in einer Vergleichsprobe die Extinktion des verwendeten Lösungsmittels gemessen und als sogenannten Nullwert festgelegt. Dieser wird von der gemessenen Extinktion der Probe abgezogen, so wird die Eigenabsorption des Lösungsmittels herausgerechnet.

Da verschiedene Substanzen unterschiedliche charakteristische Extinktionsspektren aufweisen, werden je nach Anwendungsbereich verschiedene Wellenlängen verwendet.

Bedeutung von Eichgeraden

Um ausgehend von einer gemessenen Extinktion eine unbekannte Konzentration zu bestimmen, erstellt man eine Eichgerade. Diese stellt den linearen Zusammenhang zwischen der Extinktion und der Konzentration graphisch dar. Dazu werden Lösungen bekannter Konzentrationen hergestellt und deren Extinktion gemessen. Die Extinktion wird gegen die Konzentration aufgetragen und eine Regressionsgerade ermittelt. Aus der Regression ergibt sich die Eichgerade.

Im Projekt wurde Photometrie an verschiedenen Stellen eingesetzt: Zum einen, um die Wachstumsdichte von den Bakterienkolonien zu ermitteln und so das Wachstum der Kultur zu untersuchen. Außerdem wurde mit dem NanoDrop die Gesamtprotein-Konzentration in den Proben gemessen und die im ELISA ermittelten Capsid-Konzentrationen quantitativ bestimmt.

NanoDrop

Der NanoDrop ist ein Photometer, mit dem die Protein- oder Nukleinsäurekonzentration sehr kleiner Flüssigkeitsmengen ermittelt wird. Hierbei werden 3 µl der Probe auf ein Spektralphotometer pipettiert, sodass sich dort ein einzelner Tropfen bildet. Bei Proteinen wird die Extinktion bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ gemessen. Diese ist proportional zur gesuchten Konzentration. Im Gegensatz zum ELISA misst der NanoDrop die Konzentration aller Proteine in der Probe, während beim ELISA ausschließlich die Konzentration der Capside bestimmt wird.



Abbildung 14: Arbeit am NanoDrop.

5 Durchführung

5.1 Anzüchten der genetisch veränderten *E. coli* Bakterienkultur

Für die Gewinnung von AAV-VLPs wurden genetisch veränderte *E. coli* Kulturen des Stamms BL21(DE3) pET_246_AAV5_VP3 in Nährmedien vermehrt.

Nährmedien

Im Versuch wurden zwei Nährmedien unter der Fragestellung verglichen, welches sich besser zur Produktion der virusähnlichen Partikel eignet. Untersucht wurden das LB- sowie das TB-Medium (Abb. 15). LB-Medium ist ein Standardmedium und wird sehr häufig verwendet (genaue Zusammensetzung im Anhang in Kap. 10.1). Als Vergleichsmedium wurde das TB-Medium (Abb. 15; genaue Zusammensetzung im Anhang in Kap. 10.1) untersucht, für das Hersteller³ eine höhere Zelldichte und ein schnelleres Wachstum versprechen.

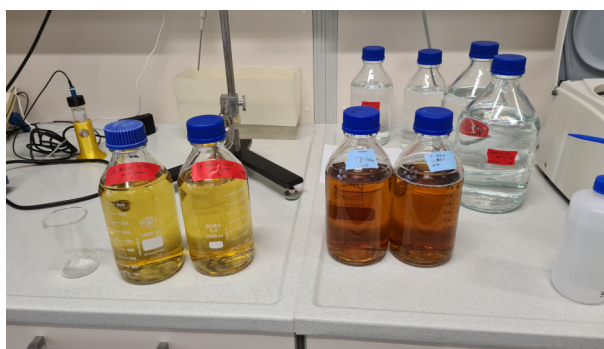


Abbildung 15: Links: LB-Medium; Rechts: TB-Medium.

Kultivierung

Für die *E. coli*-Kultur werden jeweils 2 ml Kulturflüssigkeit des genetisch veränderten *E. coli*-Stamms, BL21(DE3) pET_246_AAV5_VP3, in jeweils 100 ml der beiden Nährmedien überführt. Die eingesetzten *E. coli*-Bakterien enthalten einen Plasmidring mit einer Antibiotikaresistenz für Kanamycin und dem Fremdgen zur Herstellung des VP3-Proteins. Zu den beiden Vorkulturen wird anschließend 167 µl Kanamycin-Stocklösung⁴ zur Selektion hinzugegeben. Die Bakterien, die das Plasmid nicht aufgenommen haben, sterben ab. Die Vorkulturen werden über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator mit 200 rpm inkubiert, um das Bakterienwachstum anzuregen.

3. Carl Roth®, vgl. <https://www.carlroth.com/de/de/molekularbiologische-naehrmedien/terrific-broth-medium/p/x972.1>; Thermo Fisher Scientific®, vgl. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-culture/microbiological-culture/bacterial-growth-media/terrific-broth-.html>

4. Stocklösung: hochkonzentrierte Ausgangslösung eines Stoffes; siehe auch Anhang Kap. 10.1

Am nächsten Tag wird jeweils 1 L der Medien in Schüttelkolben abgefüllt und mit 1,67 ml Kanamycin-Stocklösung versetzt. Die Optische Dichte der Vorkulturen wird bestimmt. Hierfür wird eine 1:10 Verdünnung der Kultur hergestellt. Es wird nun jeweils so viel Volumen der Vorkulturen in die Schüttelkolben überführt, dass die entstehenden Hauptkulturen eine optische Dichte von 0,1 besitzen (Abb. 16). Mit dem Photometer wird alle 20 Minuten, also nach jedem Teilungszyklus, die Optische Dichte der Bakterien gemessen, um das Wachstum der Kulturen zu überprüfen. Bei einer OD von 0,6, also nach etwa 2,5 Teilungszyklen, werden 400 μ l IPTG (Isopropyl-D-thiogalactopyranosid) hinzugegeben. Dieses induziert die Herstellung von β -Galactosidase und führt so zu einem verstärkten Ablesen des Fremdgens. Die Kulturen werden schließlich bei 170 rpm und 20 °C über Nacht inkubiert.

Nachdem die Kulturen ausreichend gewachsen sind, können die Zellen durch Ultraschall-Lyse im Ultraschallbad für 20 min aufgeschlossen werden. Daraufhin werden sie bei 4000 $\times$ g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Die zellulären Bestandteile setzen sich ab, während die Nährmedien im Überstand entsorgt werden. Die entstandenen Zellpellets werden mit jeweils 30 ml PBS-Puffer (Zusammensetzung im Anhang in Kap. 10.1) gewaschen, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Am Ende der Zellernte erhält man jeweils ein Zellpellet aus der in LB-Medium und TB-Medium gewachsenen Bakterienkultur (Abb. 17). In den Zellpellets befinden sich die produzierten VLPs. Die Proben werden bei -20 °C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert. Im weiteren Verlauf wurde nur mit den LB-Proben gearbeitet.



Abbildung 16: Links: Vorkultur;
Rechts: Hauptkultur.



Abbildung 17: Links: Zellpellet LB,
Rechts: Zellpellet TB.

5.2 Affinitätschromatographie

Vorbereitung der Proben

Zunächst werden die eingefrorenen Pellets (Abb. 17) aufgetaut und in jeweils 30 ml Tris-HCl-Puffer resuspendiert. Die Proben werden erneut durch Ultraschall aufgeschlossen. Danach werden sie bei 12000 $\times$ g und 4 °C für 40 min zentrifugiert. Die virusähnlichen

Partikel befinden sich nun im Überstand. Dieser wird in 3×3 ml Portionen aufgeteilt und unterschiedlich weiterverarbeitet. Zu den drei Proben (A, B und C) werden in verschiedene Bindepuffer gegeben.

Probe A: 3 ml Probe + 400 µl Tris-HCl-Puffer

Probe B: 3 ml Probe + 400 µl PBS-Puffer

Probe C: 3 ml Probe + 400 µl Ammoniumsulfat-Puffer, um die Proteine in der Probe zu fällen. Der Ammoniumsulfat-Puffer wird mit dem PBS-Puffer ausgetauscht.

Auswahl der Elutionspuffer

Um die gebundenen VLPs möglichst erfolgreich zu eluieren, wurden verschiedene Elutionspuffer (EB - *elution buffer*) mit unterschiedlichen pH-Werten und Elutionseigenschaften getestet (Tab. 1).

Tabelle 1: Elutionspuffer

Pufferzusammensetzung	pH-Wert
EB1: 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl	2,5
EB2: 0,1 M Glycin, 0,5 M NaCl	3,0
EB3: 20 mM CAPS, 0,5 M NaCl, 0,5 M Arginin	10,8

Vorbereiten der Säule

Zunächst wird das Resin aus der Säule entfernt (Abb. 18), gewogen und eine 1:1 Mischung mit Wasser hergestellt. Damit werden neun Proben mit der Resin-Mischung angesetzt, da jede Kombination zwischen Binde- und Elutionspuffer untersucht wird (Tab. 2) Die Chromatographie wird im Batchverfahren durchgeführt.



Abbildung 18: Entnahme des Säulenmaterials.

Tabelle 2: Kombination der Binde- und Elutionspuffer

	A	B	C	Kombination
EB	1	1	1	A1, B1, C1
	2	2	2	A2, B2, C2
	3	3	3	A3, B3, C3

Beladen der Säule

Das Resin wird mit jeweils 400 µl Bindepuffer, also bei Probe A Tris-HCl Puffer und bei B und C PBS-Puffer, equilibriert. Je 200 µl der Proben A, B und C werden aufgetragen, für 15 min bei 300 rpm inkubiert und anschließend für 1 min bei 14000 xg zentrifugiert. Vor der weiteren Verarbeitung werden Proben entnommen (Flow-Through⁵) und beiseite gestellt.

Waschen der Säule

Das Säulenmaterial wird mit 400 µl von den jeweiligen Bindepuffern (Tris-HCl oder PBS) gewaschen, für 2 min bei 300 rpm inkubiert (Abb. 19) und 1 min lang bei 14000 xg zentrifugiert. Es werden Proben entnommen (Wash 1). Der komplette Waschgang wird genauso wie beschrieben wiederholt. Es werden erneut Proben entnommen (Wash 2).

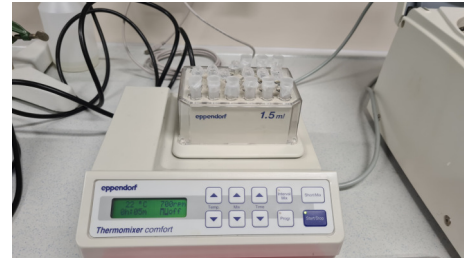


Abbildung 19: Inkubation der Proben auf dem Schüttelinkubator.

Elution

Nun folgt die Elution des Säulenmaterials.

Zunächst werden je 200 µl der Elutionspuffer EB1, EB2 und EB3 (Tab. 1) zu den Ansätzen A, B und C gegeben. EB1 wird in A1, B1 und C1 eingefüllt, EB2 in A2, B2 und C2, EB3 in A3, B3 und C3 (Tab. 2). Dann werden die Proben bei gleichen Bedingungen wie oben beschrieben erneut inkubiert und zentrifugiert. Es werden die Proben entnommen (Elution 1) und die Elution wird wie beschrieben wiederholt (Elution 2).

Damit die Capside nicht von einem Milieu mit niedrigem pH-Wert Schaden nimmt, werden die sauren Elutionsproben EB1 und EB2 mit 1 M Tris + 0,5 M NaCl-Lösung auf pH 7 neutralisiert. Alle Proben werden bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.



Abbildung 20: Alle entnommen Proben: FT, Wash und Elution.

Im Verlauf des Projekts wurde dieser Versuch ein weiteres Mal durchgeführt. Dabei wurde beim Beladen des Säulenmaterials statt des Schüttelinkubators ein Überkopfschüttler benutzt, damit die Proben sich gleichmäßiger mischen und besser an das Resin binden. Auf Basis der Ergebnisse (Kap. 6.2) wurde die Probenanzahl reduziert und nur der Tris-HCl Puffer als Bindepuffer untersucht. Zudem wurden andere

5. Durchfluss: alles, das nicht an dem Säulenmaterial gehaftet hat

Elutionspuffer (Tab. 3) getestet .

Tabelle 3: Elutionspuffer 2

Pufferzusammensetzung	pH-Wert
EB4: 100 mM Citronensäure	2,0
EB5: 100 mM Citronensäure	2,5
EB6: 200 mM Glycin + 500mM Arginin	2,0

Nach der doppelten Elution mit den jeweiligen Puffern wurden die Proben, die mit EB6 eluiert wurden, zusätzlich alkalisch eluiert. Dies geschah durch das zusätzliche Auftragen von 300 µl des alkalischen EB3 Puffers. So erfolgte bei diesen Proben ein sehr hoher pH-Shift - von einem sauren in ein alkalisches Milieu.

5.3 ELISA

Die für den ELISA verwendete Mikrotiterplatte umfasst 12×8 Wells für Proben. In die ersten beiden Stripes werden 12 Wells mit je 100 µl des für den ELISA verwendeten ASSB-Puffers und Verdünnungen des Puffers befüllt. Diese Proben dienen als Kontrolle. Zudem wurden je 100 µl der Ausgangsproben A, B und C in 1:100, 1:200 und 1:50 Verdünnung aufgetragen. Auf den restlichen Stripes werden 100 µl aller Proben der Affinitätschromatographie (Flowthrough, Wash 1, Wash 2, Elution 1, Elution 2) aufgetragen. Jede Probe wird doppelt bestimmt.



Abbildung 21: Praktische Durchführung eines ELISA-Test.

Die ELISA-Platte wird für 1 h bei 37 °C inkubiert und danach dreimal mit 200 µl des ASSB-Puffers pro Probe ausgewaschen. Jede Probe auf der Platte wird mit 100 µl Biotin-Lösung behandelt und erneut für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Waschschrift wird wie oben beschrieben wiederholt. 100 µl der Strep-HRP-Lösung werden aufgetragen und die Inkubation und Waschschrift werden, wie bereits beschrieben, wiederholt.

Auf die gewaschenen Proben werden je 100 µl TMB-Lösung aufgetragen und die Platte für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Während dieser Zeit färben sich die Proben in Abhängigkeit ihres Capsidgehalts. Ist die Zeit abgelaufen trägt man jeweils 100 µl der Stopplösung auf, welche die Reaktion beendet. Die Proben werden auf eine UV-Platte übertragen und mit einem Photometer die Extinktion bei 450 nm Wellenlänge gemessen.

5.4 NanoDrop

Alle Proben, die sich aus der Chromatographie (Kap. 5.2) ergaben, wurden im NanoDrop untersucht und die Gesamt-Proteinkonzentration bestimmt. Dazu wurden jeweils 3 μ l einer Probe analysiert und deren Extinktion gemessen. So kann die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden. Zur Nullwert-Bestimmung wurden 3 μ l des Bindepuffers der Probe eingesetzt, die Extinktion gemessen und von den jeweiligen Probenwerten subtrahiert. Die Ergebnisse des NanoDrops sind nicht gleichzusetzen mit den Ergebnissen des ELISAs, die sich nur auf die Konzentration der Capside in den Proben beziehen.

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Kultivierung

Die optische Dichte (OD) wurde mit einem Photometer in 40 min-Intervallen bei allen vier Hauptkulturen bestimmt, bis deren OD 0,6 überschritt (Tab. 4). Sobald dieser Schwellenwert erreicht war, wurde über Zugabe von IPTG die Genexpression des VP3-Fremdgens induziert und somit die VLP-Produktion begonnen.

Tabelle 4: OD-Messdaten der vier Hauptkulturen (SK1-4) vor der Zugabe von IPTG

Zeit [min]	LB-Medium		TB-Medium	
	SK1	SK2	SK3	SK4
0	0,11	0,11	0,15	0,15
40	0,14	0,13	0,18	0,18
80	0,33	0,3	0,44	0,45
120	0,49	0,44	0,66	0,66
160	0,66	0,67	-	-

In Abb. 22 wurde der Durchschnitt der OD der beiden Kulturen in gleichen Medien anhand der Daten aus 4 gegen die jeweiligen Zeitpunkte der Messungen aufgetragen.

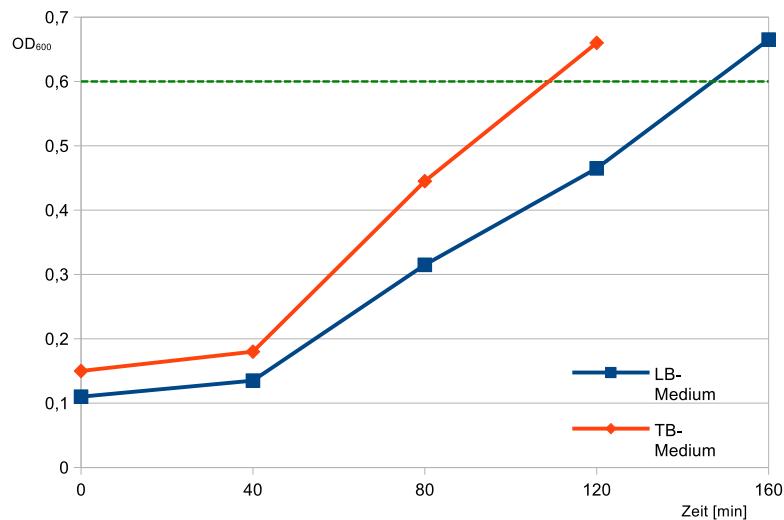


Abbildung 22: Durchschnittliche OD der Kulturen in LB- und TB-Medien während der Wachstumsphase nach Tab. 4. Grenze für Induktion der Genexpression mittels IPTG bei OD 0,6 in Grün.

Mit einer kleinen Probe der LB-Kulturen und der TB-Kulturen wurde ein AAV-Schnelltest⁶ durchgeführt.

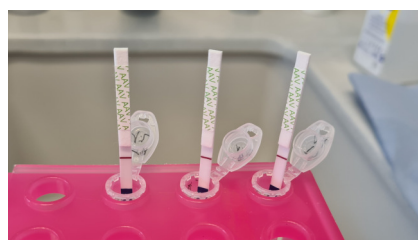
Dieser zeigt bei AAV-Konzentrationen zwischen 10^9 und 10^{11} Capside pro mL neben der Kontrollbande einen zweite Bande. Der Test ist semi-quantitativ, da sich über die Intensität der Testbande Rückschlüsse auf die genauere Konzentration schließen lassen.

Da dieser Test für adeno-assoziierte Viren ausgelegt ist, sollte er auch für deren VLPs aussagekräftig sein, da sie sich wie die Capsidhülle der AAVs verhalten und somit bei Antikörpertests die gleichen Bindeeigenschaften wie die jeweiligen AAVs aufweisen. Da der Schnelltest konformationsspezifisch funktioniert, spielt auch das Fehlen der VP1- und VP2-Proteine in den produzierten Kapsiden keine Rolle.

Um den Test durchzuführen, wurden Teile der Zellpellets beider zusammengeführten Kulturen resuspendiert, über einen Ultraschalldisruptor lysiert und anschließend nach Bedienungsanleitung des Tests⁷ in den Verdünnungen 1:1, 1:2 und 1:10 getestet. Diese sind in Abb. 23 dargestellt.



(a) LB-Medium



(b) TB-Medium

Abbildung 23: Durchführung des Progen Dip'N'Check AAV-Schnelltest. Obere Bande: Kontrolle, Untere Bande: semi-quantitativer Indikator für Vorhandensein von AAVs

Diskussion

Die optische Dichte der Bakterienkulturen verhält sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (siehe Kap. 4.3) proportional zu ihren Zelldichten, da die Bakterienzellen hier makroskopisch ähnlich genug sind, um als einander gleich betrachtet zu werden, und somit die Konzentration die einzige sich beim Kolonienwachstum ändernde Größe darstellt.

In beiden Medien war über das erste Messintervall eine deutlich geringere Wachstumsrate zu beobachten, als während den darauf folgenden Intervallen. Dies lässt sich mög-

6. Progen Dip'N'Check AAV5

7. https://www.progen.com/media/a9/cc/1d/1711095672/2024_0322_progen_manual_dip_n_check_AAV5_109x152mm_final_rz_V02.pdf [09.08.2025]

lichweise darauf zurückführen, dass sich die Kulturen in diesem Zeitraum erst an die Inkubationsbedingungen anpassen mussten.

Die *E. coli*-Kulturen im TB-Medium wiesen, wie zu erwarten war, eine deutlich höhere Wachstumsrate als jene im LB-Medium auf. Bei Vergleich der Regressionsgeraden der OD-Messungen ohne den ersten Datenpunkt nahm die optische Dichte im TB-Medium durchschnittlich um circa 37,9 % schneller als die des LB-Mediums zu. Dementsprechend erreichten die Kulturen im TB-Medium die Zielspanne des OD-Wertes für die Induktion der Produktion der Capside bereits 40 min früher.

Der nach der Induktion der Genexpression durchgeführte AAV-Antikörper-Schnelltest in Abb. 23 zeigte allerdings bei den zusammengeführten TB-Kulturen ein nur minimal positives Ergebnis, während sich bei den LB-Kulturen ein deutlich stärker positives Ergebnis feststellen ließ. Dadurch, dass das einzige positive Ergebnis der TB-Kultur bei der 1:1-Verdünnung und nicht bei der 1:10-Verdünnung liegt, lässt sich hier auch ausschließen, dass die Konzentration über der Maximalkonzentration des Schnelltests bei 10^{11} Capside pro mL liegen. Deswegen ist davon auszugehen, dass die Konzentration bei den 1:10- und 1:2-Verdünnungen unterhalb der unteren Empfindlichkeitsgrenze bei 10^9 Capside pro mL liegt.

Dies deutet darauf hin, dass TB-Medien sich zwar wie auch von Herstellern beworben gut für schnelles und dichtes Bakterienwachstum eignen, allerdings für VLP-Produktion eher ungeeignet sind.

Da die Hauptunterschiede der beiden Medien das Vorhandensein der Salze KH_2PO_4 und K_2HPO_4 und die deutlich höhere Hefekonzentration im TB-Medium ($24 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ statt $5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$) sind, könnten hier Folgeexperimente darüber Aufschluss geben, welche dieser Zusammensetzungsunterschiede für die schlechtere Expression verantwortlich sind.

Aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration der Kulturen in TB-Medium wurden bei der Affinitätschromatographie und demzufolge auch bei der Analyse über ELISA nur Proben der beiden LB-Kulturen weiterverwendet (Siehe Kap. 5.2 und 5.3).

6.2 Affinitätschromatographie

Mit allen Proben der Affinitätschromatographie eine NanoDrop-Messung zur Bestimmung der allgemeinen Proteinkonzentration durchgeführt. Dies diente als Vorschau für die Ergebnisse des ELISA, bei dem hohe NanoDrop-Proteinkonzentrationen bei den Elutionspuffern auf eine hohe VLP-Konzentration in diesen hinweisen, da andere Proteine sich fast ausschließlich im Flowthrough-Puffer oder in den Wash-Puffern befinden. Tab. 5 und 6 zeigen die Ergebnisse dieser Messungen.

Tabelle 5: Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben des ersten Chromatographiedurchganges über NanoDrop-Messungen. Ergebnisse in $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$.

	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
Flowthrough	55,54	55,28	53,75	101,16	66,31	108,93	19,65	19,88	19,99
Wash 1	5,14	4,41	3,47	7,30	3,31	11,59	2,51	2,56	2,65
Wash 2	0,18	0,15	0,15	0,73	0,37	0,67	0,17	0,73	0,17
Elution 1	0,05	0,09	0,07	0,05	0,06	0,08	0,23	0,21	0,31
Elution 2	0,10	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,04

Tabelle 6: Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben des 2. Chromatographiedurchganges über NanoDrop-Messungen in $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$. Der negative Messwert bei A5E2 ist auf Messungenauigkeit des NanoDrops bei geringen Konzentrationen zurückzuführen.

	A4	A5	A6
A0	65,69		
Flowthrough	50,77	54,18	54,03
Wash 1	6,74	8,79	7,65
Wash 2	0,45	0,53	0,59
Elution 1	0,03	0,02	0,06
Elution 2	0,02	-0,01	0,01
Elution 3	0,06	0,08	0,05

Die Capsidkonzentration in den Puffern aller Schritte der Chromatographie wurde zusätzlich über ELISA bestimmt. Hierfür wurde nach dem üblichen Verfahren eines Sandwich-ELISA vorgegangen (siehe Kap. 5.3). Auch wurde bei beiden ELISA-Durchgängen eine Negativkontrolle und eine Verdünnungsreihe einer Positivkontrolle mitgetestet, über diese eine Eichgerade für die Ermittlung der Konzentration aufgestellt wurde (Abb. 24).

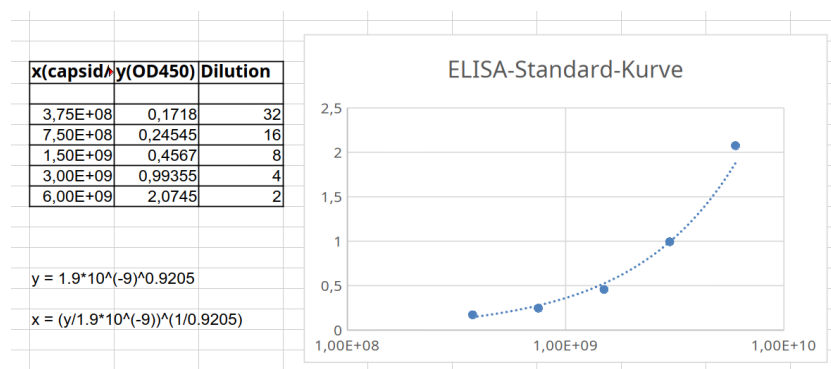


Abbildung 24: Aufstellen der Regressionsfunktion des 2. ELISA.

Folgende Funktionen wurden so zur Konzentrationsbestimmung aufgestellt:

1. ELISA: $c(x) = (x - 0,6971)/(1,9752 \times 10^{-10})$; $R^2 \approx 0,9715$
2. ELISA: $c(x) = (x + 0,0115)/(3,4390 \times 10^{-10})$; $R^2 \approx 0,9974$

Anhand dieser Funktionen wurden nun die Konzentrationen aller Proben unter Berücksichtigung der Verdünnung der Proben ermittelt. Diese sind in Tab. 7 und 8 dargestellt.

Tabelle 7: Berechnete Konzentrationen der Proben des 1. ELISA (EB1-3) in $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$.

Probe	Flowthrough	Wash 1	Elution 1	Elution 2
A1	6,86E+10	1,39E+08	2,49E+05	2,36E+04
A2	3,24E+10	1,75E+07	5,77E+05	2,91E+05
A3	2,36E+10	6,50E+06	3,74E+05	3,57E+04
B1	6,07E+10	4,37E+08	9,52E+04	1,14E+06
B2	1,01E+11	2,83E+07	5,75E+05	3,94E+04
B3	7,59E+10	8,02E+08	3,99E+05	4,07E+04
C1	8,18E+09	2,39E+08	2,59E+06	3,51E+06
C2	5,03E+09	3,96E+06	3,07E+05	3,04E+05
C3	8,23E+09	1,22E+07	4,62E+05	1,07E+05
A0	1,07E+11			
B0	2,38E+11			
C0	6,26E+09			

Tabelle 8: Berechnete Konzentrationen der Proben des 2. ELISA (EB4-6) in $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$.

Probe	Flowthrough	Wash 1	Wash 2	Elution 1	Elution 2	Elution 3
A4	6,18E+09	2,02E+09	1,02E+09	6,01E+08	4,77E+08	3,55E+09
A5	7,41E+09	2,84E+09	1,43E+09	4,60E+08	5,94E+08	6,27E+09
A6	7,10E+09	2,33E+09	1,17E+09	5,49E+08	7,43E+08	6,45E+08
A0	2,02E+11					

Da auch die Ausgangsproben vor der Chromatographie getestet wurden (benannt A0-C0), ist es möglich, zu analysieren, wie viele VLPs aus den 200 μl Zelllysats sich bei jedem Schritt der Affinitätschromatographie im Puffer befinden und somit verloren gehen oder im Fall der Elutionen erfolgreich gelöst werden. Hierfür wurde die Capsidanzahl in jeder Probe über Konzentration und Volumen und anschließend der Anteil an der gleichermaßen ermittelten Capsidmenge in der Ausgangsprobe berechnet. Eine Beispielrechnung für A5E3 ist in 25 dargestellt.

$$\text{Anteil } p_{A5E3} = \frac{c_{A5E3} \times V_{A5E3}}{c_{A0} \times V_{A0}} \times 100\% = \frac{6,27 \times 10^9 \frac{\text{vP}}{\text{mL}} \times 200 \mu\text{L}}{2,02 \times 10^{11} \frac{\text{vP}}{\text{mL}} \times 200 \mu\text{L}} \times 100\% \approx 3,104\%$$

Abbildung 25: Anteilberechnung für A5E3

Berechnet man dies für alle Messdaten, kann man die in Abb. 26, 27 sowie Tab. 9 dargestellten Verteilungen ermitteln.

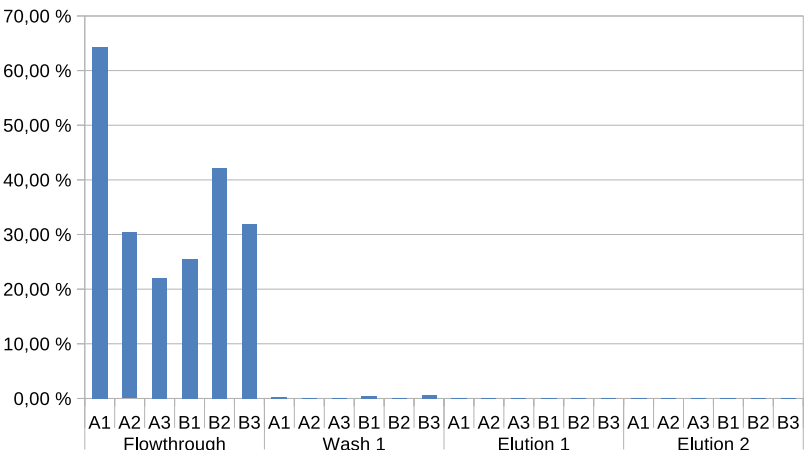


Abbildung 26: VLP-Verlust der einzelnen Schritte der Affinitätschromatographie (1. Durchgang - EB1-3, Schüttelinkubator).

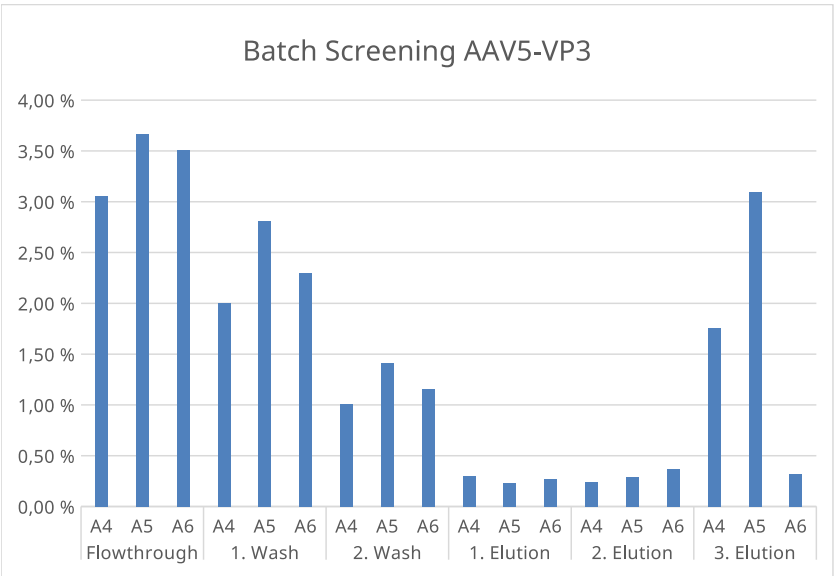


Abbildung 27: VLP-Verlust der einzelnen Schritte der Affinitätschromatographie (2. Durchgang - EB4-6, Überkopfschüttler im Brutschrank).

Tabelle 9: Aufsummierung der Ergebnisse aus Abb. 27.

	EB4	EB5	EB6
Flowthrough- & Wash-Puffer	5,69 %	7,76 %	6,85 %
Elutionen	2,25 %	3,56 %	0,94 %
Noch gebunden	91,79 %	88,68 %	92,20 %

Diskussion

Die Messdaten des ELISA zum zweiten Durchgang der Affinitätschromatographie deutlich, dass das Säulenmaterial die AAV5-VP3-Capside sehr gut bindet, sie sich allerdings nicht mehr gut eluieren lassen. So zeigt Tab. 9, dass auch nach dreifacher Elution mit doppeltem pH-Shift immer noch circa 90 % der ursprünglich in der Probe vorhandenen Viruscapside am Säulenmaterial gebunden sind.

Der erste Durchlauf mit EB1-3 und Inkubation im Schüttelinkubator zeigt in Abb. 26 verglichen mit den Ergebnissen des zweiten Durchlaufes in Abb. 27 deutlich höhere Konzentrationen im Flowthrough, was darauf zurückzuführen ist, dass dort die Equilibrierung auf dem Schüttelinkubator für eine deutlich schlechtere Bindung an das Resin als mit dem Überkopfschüttler im zweiten Durchgang sorgt.

Von den ungebundenen Capsiden befindet sich der Großteil in den Flowthrough- und Wash-Lösungen, welche bei der Affinitätschromatographie vor der Elution verwendet werden. Die dort enthaltenen Capside haben sich nicht an das Chromatographie-Resin gebunden und sind somit nicht erfolgreich aufgereinigt, sondern wurden mit den anderen Proteinen ausgespült.

Auch bei den NanoDrop-Messungen ist in Tab. 5 und 6 zu beobachten, dass sich nur sehr geringe Proteinkonzentrationen im Eluat befinden. Allerdings bedeutet dies auch, dass die VLPs, wenn auch in geringer Menge, erfolgreich aufgereinigt wurden, da im Eluat nur kleinste Mengen anderer Proteine enthalten sind.

Von dem gebundenen Anteil wurde bei der zweiten Durchführung der Affinitätschromatographie bei den Citronensäurepuffern ein deutlich größerer Anteil wieder eluiert, als mit dem Glycinpuffer. Hier löste sich am meisten bei der dritten Elution, welche mit dem alkalischen Elutionspuffer (EB3) durchgeführt wurde. Bei der dritten Probe, welche zuvor mit dem Glycinpuffer behandelt wurde, fiel die Ausbeute dieser Elution nicht höher aus als die erste und zweite Elution, während bei Probe A4 und A5 hier mehrere Prozent der gebundenen Capside gelöst wurden (Abb. 27).

Grund für die vergleichsweise erfolgreiche Elution bei Probe A4 und A5 ist der extreme pH-Shift von pH 2,0 bzw. 2,5 auf pH 10,8. Dieser ist möglicherweise bei Probe A6 zu schwach ausgefallen, da der Elutionspuffer 3 eine deutlich höhere Pufferkapazität als Elutionspuffer 1 und 2 aufweist, wodurch der pH-Wert möglicherweise nicht hoch genug steigen konnte.

7 Fehlerdiskussion

Gerade die erste Durchführung der Chromatographie und des ELISA brachten unbrauchbare Ergebnisse. Die photometrisch ermittelten Absorptionswerte 0,8 der Kontrollproben, bei denen nur der ASSB-Puffer als Negativ-Probe aufgetragen wurde, da schließlich jede Probe mit dem Puffer gewaschen wurde, waren zu hoch. Diese Werte würden bedeuten, dass sich Capside im Puffer befanden, was aber nicht der Fall war. Verglichen mit den Werten, die bei gleichen oder ähnlichen Versuchsaufbau am Institut ermittelt wurde, liegt ein realistischer Absorptionswert des Puffers zwischen 0,1 und 0,3. Auch hatte die Regressionsfunktion der Positivkontrollen mit einem Bestimmtheitsmaß $R^2 \approx 0,9715$ eine vergleichsweise geringe Genauigkeit. Diese schlechten Kontrollwerte verminderten die Aussagekraft des gesamten Tests. Daher musste der Versuch erneut durchgeführt werden.

Folgende Fehler können bei den Pipettiervorgängen geschehen sein:

- Falsches Auftragen der Proben durch Verrutschen auf der ELISA-Platte:
Dieser Fehler resultiert in den nächsten beiden Fehlern. Pipettiert man eine Probe in das Well einer anderen Probe, vermischen sie sich. Pipettiert man eine Probe in das Well, in dem sich bereits die gleiche Probe befindet, ergibt sich eine erhöhte, falsche Konzentration der Probe.
- Kontamination oder Vermischung von Proben:
Die Verunreinigung der Proben sorgt dafür, dass der ELISA nicht mehr aussagekräftig ist. Denn mit der Verunreinigung der Proben geht auch eine Veränderung der Proteinkonzentration einher. Der hohe Absorptionswert des Puffers rührt am wahrscheinlichsten daher, dass eine Form der Kontamination durch eine andere Probe stattgefunden hat.
- Auftragen falscher Dosis von Probe oder Puffer:
Beim ELISA wechselt sich bei den verschiedenen Schritten immer eine 100 µl Dosis für die Chemikalien und einer 200 µl Dosis für den Puffer ab. Eine falsche Pufferdosis beim Waschen der Proben hat wahrscheinlich kaum Auswirkungen auf das Ergebnis, da die Waschschritte mehrfach wiederholt werden und somit der Großteil an ungebundenen Stoffen trotzdem abgewaschen wird. Da die Schritte des ELISAs aufeinander aufbauen, sollte auch eine falsche Chemikaliendosis nicht zu großen Problemen führen. Trägt man beispielsweise doppelte Menge Strep-HRP auf, so wirkt dieses nur mit dem vorher aufgetragenen Biotin zusammen. Die überschüssigen Strep-HRP Moleküle werden dann einfach im nächsten Waschgang abgespült.

- Vergessen von Pipettierschritten: Wäscht man die Proben anstatt 3 mal nur 2 mal wird dies keinen großen Unterschied machen. Vergisst man allerdings einen entscheidenden Pipettierschritt gibt es durchaus negative Konsequenzen. Falls beispielsweise kein Biotin aufgetragen wurde, gäbe es keinen zweiten Antikörper, der an die Probe bindet. Somit wären alle weiteren ELISA-Schritte nutzlos. Bei der Durchführung des ELISA fiel nach der zweiten Inkubation, die nach dem Auftragen des Biotins erfolgte, auf, dass ein Stripe versehentlich nicht mit Biotin behandelt wurde. Dieser Schritt wurde nachgeholt und der Stripe unabhängig vom Rest der Platte inkubiert. Durch die Inkubationszeit war dieser 1 h später fertig als die restliche Platte. In der photometrischen Auswertung ließ sich kein Unterschied feststellen.

Zudem waren auch die Bedingungen der Chromatographie nicht ideal. Die verwendeten Filtereppendorfgefäße ließen sich nicht mehr schließen, weshalb sie beim Beladen des Säulenmaterials nur auf einen Schüttelinkubator und nicht in den Überkopfschüttler gestellt werden konnten. Durch diese schlechtere Vermischung lässt sich erklären, dass wenige virusähnliche Partikel an das Säulenmaterial gebunden haben. Bei der zweiten Durchführung des Versuchs wurde extra darauf geachtet, dass die Vermischung im Überkopfschüttler erfolgen konnte. Dafür wurden neue, sicher verschließbare Gefäße eingesetzt, so dass die Proben in den Überkopfschüttler gestellt werden konnten und die Vermischung besser ablief. Durch diese Änderungen verbesserten sich die Ergebnisse stark.

8 Fazit

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Verfahren, mit dem eine Elutionsbedingung für die Aufreinigung von virusähnlichen Partikeln durch Affinitätschromatographie gefunden wurde, die 3 % der VLPs vom Resin ablöst. Diese 3 % stellen den höchsten, bisher am Institut gemessenen Elutionswert dar. Somit war das Projekt zu Teilen erfolgreich. Allerdings fallen sowohl die hohen materiellen, als auch zeitlichen Kosten, die mit der Chromatographie einhergehen, auf. Somit würde sich beim Arbeiten mit virusähnlichen Partikeln ein Fokus auf die Affinitätschromatographie langfristig nicht rentieren. Denn alle bisherigen Ergebnisse, nachdem nun umfangreich verschiedenste Bedingungen getestet wurden, zeigen schlechte bis mäßige Werte. Der Großteil der VLPs bleibt immer noch am Resin gebunden und wird nicht eluiert. Daher erscheint es sinnvoller nach alternativen Aufreinigungsmethoden zu suchen, die bessere Ergebnisse erzielen. So könnten VLPs in Zukunft umfangreicher eingesetzt werden.

9 Danksagung

Wir möchten uns aufrichtig bei allen, die unser Projekt ermöglicht haben bedanken. Ein großer Dank gilt dem Institut für Bio-und Lebensmitteltechnik Teilinstitut IV: Molekulare Aufarbeitung von Bioprodukten, Karlsruher Institut für Technologie. Wir wurden im Institut herzlich willkommen geheißen und sehr gut betreut. Zudem bedanken wir uns beim Institutsleiter Prof. Dr. Jürgen Hubbuch, für das Anbieten dieses Projekts. Unser besonderer Dank gilt unseren beiden Betreuerinnen Dipl.-Ing. Kristina Schleining und Dipl.-Biol. Birgit Roser. Beide standen uns stets mit Rat und Tat zur Seite und halfen uns entscheidend.

Ebenfalls wollen wir uns bei unseren Hector-Kursleitern, Dietmar Gruber und Anke Richert bedanken, die uns die letzten Jahre tatkräftig unterstützt und gefördert haben. Hervorheben möchten wir Anke Richerts Arbeit, Einsatz und Unterstützung als Ansprechpartnerin während unseres Projekts.

Zuletzt möchten wir uns bei Dr. Hans-Werner und Josephine Hector bedanken, dafür, dass sie das Hector-Seminar gestiftet und ins Leben gerufen haben. Sie ermöglichten uns so vielfältige Erfahrungen und Einblicke in wissenschaftliches Arbeiten und Forschen, sowie eine umfassende Förderung in den verschiedenen MINT-Bereichen.

10 Anhang

10.1 Chemikalienverzeichnis

In chronologischer Reihenfolge nach Erwähnung in der Durchführung

LB-Medium bestehend aus:

- 10 g Trypton
- 5 g NaCl
- 5 g Hefeextrakt
- 1 L destilliertes Wasser

TB-Medium bestehend aus:

- 12 g Trypton
- 5 g Glycerol
- 24 g Hefeextrakt
- 900 ml destilliertes Wasser
- 0.17 M KH_2PO_4 - 23.1 g/L
- 0.72 M K_2HPO_4 - 125.4 g/L

Kanamycin-Stocklösung: 30 mg/mL Kanamycin

IPTG: Isopropyl-D-thiogalactopyranosid

PBS Puffer (Phosphate buffered Saline, pH 7,4) bestehend aus:

- 137 mM NaCl
- 2.6 mM KCl
- 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 1.8 mM KH_2PO_4

Tris-HCl Puffer (pH 8,5) bestehend aus:

- 20 mM Tris-HCl
- 0.15 M NaCl

AMS Puffer (Ammoniumsulfat Puffer, pH 5,5) bestehend aus:

- 3,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Elutionspuffer:

EB1 (pH 2,5) bestehend aus:

- 0.1 M Natriumacetat (CH_3COONa)
- 0.5 M NaCl

EB2 (pH 3,0) bestehend aus:

- 0.1 M Glycin
- 0.5 M NaCl

EB3 (pH 10,8) bestehend aus:

- 20 mM CAPS (N-Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure)
- 0.5 M NaCl
- 0.5 M Arginin

EB4 (pH 2,0): 100 mM Zitronensäure

EB5 (pH 2,5): 100 mM Zitronensäure

EB6 (pH 2,0) bestehend aus:

- 200 mM Glycin
- 500 mM Arginin

Tris-Neutralisationslösung:

- 1 M Tris
- 0,5 M NaCl

ELISA: AAV3 Kit, Hersteller Progen®

10.2 ELISA-Messdaten

Tabelle 10: Planung und Extinktionswerte des 1. ELISA (EB1-3, Schüttelinkubator). Die Negativkontrolle durch ASSB 1x in den Feldern A1 und A2 musste wegen zu hoher Werte (vermutlich durch Kontamination) gegen einen Referenzwert ersetzt werden. KC2-6 ist die Positivkontrolle in den Verdünnungen 1:2 (KC2) - 1:32 (KC6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ASSB 1x	ASSB 1x	B 1:100	A1FT1 1:2	B2FT1 1:2	C3FT1 1:2	A2W1 1:2	B3W1 1:2	C1E1 1:2	A3E1 1:2	B1E2 1:2	C2E2 1:2
B	KC2	KC5	B 1:100	A1FT1 1:2	B2FT1 1:2	C3FT1 1:2	A2W1 1:2	B3W1 1:2	C1E1 1:2	A3E1 1:2	B1E2 1:2	C2E2 1:2
C	KC2	KC6	B 1:200	B1FT1 1:2	C2FT1 1:2	A1W1 1:2	B2W1 1:2	C3W1 1:2	A2E1 1:2	B3E1 1:2	C1E2 1:2	A3E2 1:2
D	KC3	KC6	B 1:200	B1FT1 1:2	C2FT1 1:2	A1W1 1:2	B2W1 1:2	C3W1 1:2	A2E1 1:2	B3E1 1:2	C1E2 1:2	A3E2 1:2
E	KC3	A 1:100	C 1:100	C1FT1 1:2	A3FT1 1:2	B1W1 1:2	C2W1 1:2	A1E1 1:2	B2E1 1:2	C3E1 1:2	A2E2 1:2	B3E2 1:2
F	KC4	A 1:100	C 1:100	C1FT1 1:2	A3FT1 1:2	B1W1 1:2	C2W1 1:2	A1E1 1:2	B2E1 1:2	C3E1 1:2	A2E2 1:2	B3E2 1:2
G	KC4	A 1:200	C 1:50	A2FT1 1:2	B3FT1 1:2	C1W1 1:2	A3W1 1:2	B1E1 1:2	C2E1 1:2	A1E2 1:2	B2E2 1:2	C3E2 1:2
H	KC5	A 1:200	C 1:50	A2FT1 1:2	B3FT1 1:2	C1W1 1:2	A3W1 1:2	B1E1 1:2	C2E1 1:2	A1E2 1:2	B2E2 1:2	C3E2 1:2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,107	0,1071	1,5018	3,4591	3,8171	1,7728	0,3213	0,9383	0,2049	0,1399	0,147	0,1656
B	2,0508	1,0907	1,5091	3,0795	3,608	1,5297	0,28	0,6273	0,2143	0,1719	0,2032	0,1436
C	1,9376	0,8909	0,725	3,1982	1,4036	0,5335	0,3553	0,2894	0,1835	0,1723	0,2498	0,128
D	1,2894	0,7353	1,2088	3,1048	1,4423	0,4603	0,3152	0,2701	0,1388	0,1442	0,1463	0,1339
E	1,3823	1,1514	0,3081	1,701	2,4573	0,7531	0,1967	0,1472	0,1571	0,1563	0,1601	0,1303
F	1,1575	0,9542	0,5455	1,6124	2,171	0,5962	0,245	0,1589	0,1775	0,171	0,1518	0,1342
G	1,2744	0,7165	0,5111	2,3976	3,5083	0,6282	0,234	0,1349	0,1628	0,1314	0,1233	0,1401
H	0,8247	1,0416	0,6818	2,7263	3,2635	0,5163	0,2583	0,1452	0,1499	0,1234	0,1372	0,1441

Tabelle 11: Planung und Extinktionswerte des 2. ELISA (EB4-6, 3. Elution mit EB3, Überkopfschüttler).

	1	2	3	4
A	ASSB 1x	ASSB 1x	A1FT1 1:1	A3W2 1:1
B	KC2	KC5	A2FT1 1:1	A1E1 1:1
C	KC2	KC6	A3FT1 1:1	A2E1 1:1
D	KC3	KC6	A1W1 1:1	A3E1 1:1
E	KC3	A 1:100	A2W1 1:1	A1E2 1:1
F	KC4	A 1:100	A3W1 1:1	A2E2 1:1
G	KC4	A2E3 1:1	A1W2 1:1	A3E2 1:1
H	KC5	A3E3 1:1	A2W2 1:1	A1E3 1:1

	1	2	3	4
A	0,1123	0,1842	1,6659	0,2691
B	2,1854	0,4482	2,0015	0,1516
C	2,2601	0,3136	1,6926	0,1134
D	1,1269	0,3265	0,5382	0,1202
E	1,1567	1,1133	0,7589	0,1181
F	0,5098	0,9284	0,5465	0,1499
G	0,7001	1,6905	0,2644	0,1668
H	0,3392	0,1635	0,3775	0,9522

10.3 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Berman, Helen M., John Westbrook, Zukang Feng, Gary Gilliland, T. N. Bhat, Helge Weissig, Ilya N. Shindyalov und Philip E. Bourne. 2000. „The Protein Data Bank“. *Nucleic Acids Research* 28, Nr. 1 (Januar): 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- Bulcha, Jote T., Yi Wang, Hong Ma, Phillip W. L. Tai und Guangping Gao. 2021. „Viral vector platforms within the gene therapy landscape“. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6, Nr. 1 (Februar): 53. ISSN: 2059-3635. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>.
- Carl Roth. *Terrific-Broth-Medium, 500g*. Online, aufgerufen am 04.08.2025. <https://www.carlroth.com/de/de/molekularbiologische-naehrmedien/terrific-broth-medium/p/x972.1>.
- Cytiva. 2020. *AVB Sepharose High Performance Manual*. Online, aufgerufen am 20.07.2025. <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-15123-pdf>.
- . 2021. *Affinity Chromatography - Vol 3: Specific Groups of Biomolecules*. Online, aufgerufen am 20.07.2025. <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11485-pdf>.
- . 2024. *Gene therapy AAV vector purification process*. Online, aufgerufen am 20.07.2025. <https://www.cytivalifesciences.com/en/de/knowledge-center/gene-therapy-aav-vector-purification-process>.
- Kotin, R M, M Siniscalco, R J Samulski, X D Zhu, L Hunter, C A Laughlin, S McLaughlin, N Muzyczka, M Rocchi und K I Berns. 1990. „Site-specific integration by adeno-associated virus.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, Nr. 6 (März): 2211–2215. ISSN: 1091-6490. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.6.2211>. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.6.2211>.
- M. Silveria, M.S. Chapman. 2020. *Adeno-associated virus serotype 5 at 2.1 Angstroms resolution, AAV5*. <https://doi.org/10.2210/pdb7KP3/pdb>.
- Naso, Michael F., Brian Tomkowicz, William L. Perry und William R. Strohl. 2017. „Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy“. *BioDrugs* 31, Nr. 4 (Juli): 317–334. ISSN: 1179-190X. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>. <http://dx.doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>.
- Progen. 2018. *AAV5 Titration ELISA Manual*. Online, aufgerufen am 20.07.2025. https://www.progen.com/media/6e/df/34/1686574647/20-360%20PRAAV5%20ELISA%20en_V12.2-web.pdf.

Sehnal, David, Sebastian Bittrich, Mandar Deshpande, Radka Svobodová, Karel Berka, Václav Bazgier, Sameer Velankar, Stephen K Burley, Jaroslav Koča und Alexander S Rose. 2021. „Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures“. *Nucleic Acids Research* 49, Nr. W1 (Mai): W431–W437. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab314>.

Thermo Fisher Scientific. *Terrific Broth*. Online, aufgerufen am 04.08.2025. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-culture/microbiological-culture/bacterial-growth-media/terrific-broth-.html>.

Bildquellen

Abb. 1 und Titelbild erstellt über mol* (Sehnal u. a. 2021) nach Daten der RCSB Protein-datenbank ([RCSB.org](https://www.rcsb.org), Berman u. a. 2000) ID pdb_00007kp3, veröffentlicht in M. Silveria 2020.

Abb. 2, 3, 4 und 5: <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11485-pdf>

Abb. 7, 8, 9, 10 und 11: https://www.progen.com/media/6e/df/34/1686574647/20-360%20PRAAV5%20ELISA%20en_V12.2-web.pdf

Abb. 13: <https://www.h-pmp.com/images/PrinzipPhotometrie.jpg>

Manche Abbildungen mussten in der online veröffentlichten Version aus rechtlichen Gründen gegen URLs ersetzt werden.

Soweit nicht anderweitig gekennzeichnet handelt es sich um eigene Bilder.

10.4 Selbstständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von uns, Helena Ehlert und David Geisler, unter Beratung von Anke Richert eigenständig verfasst. Es wurden keine weiteren Hilfsmittel und Quellen verwendet, als die, die wir angegeben haben.

Karlsruhe, den _____

Helena Ehlert

David Geisler