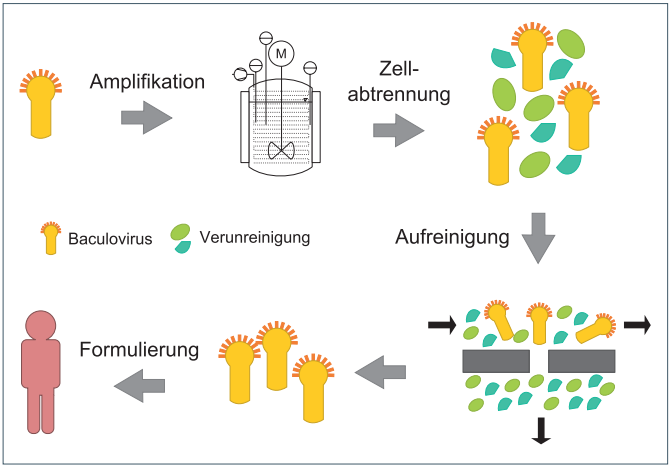
THM
TECHNISCHE HOCHSCHULE MITTELHESSEN

IBPT
Institut für Bioverfahrenstechnik
und Pharmazeutische Technologie

Gundula Sprick

# Transduktion humaner mesenchymaler Stromazellen mit rekombinanten Baculoviren




Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie | Band 11

Herausgeber: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

# Transduktion humaner mesenchymaler Stromazellen mit rekombinanten Baculoviren

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von

**Gundula Sprick**

Gießen, November 2018

1. **Gutachter:** **Professor Dr.-Ing. Peter Czermak**
Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie - IBPT
Fachbereich Life Science Engineering
Technische Hochschule Mittelhessen

Honorarprofessor
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. **Gutachter:** **Professor Dr. Thomas Wilke**
Arbeitsgruppe Spezielle Zoologie und Biodiversitätsforschung
Institut für Tierökologie und Spezielle Zoologie
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie

Band 11

**Gundula Sprick**

# Transduktion humaner mesenchymaler Stromazellen mit rekombinanten Baculoviren

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag
Düren 2019

**Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.

Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2019

Copyright Shaker Verlag 2019
Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-6627-2
ISSN 2198-5731

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren
Telefon: 02421 / 99 0 11 - 0 • Telefax: 02421 / 99 0 11 - 9
Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

*„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:*

*Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,*

*etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,*

*wieder wegzuwerfen.“*

Albert Einstein

# 1. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein System zu etablieren, mit Hilfe dessen die baculovirale Transduktion im Hinblick auf eine gentherapeutische Anwendung ermöglicht werden kann.

Hierfür wurden zunächst rekombinante Baculoviren kloniert und in Insektenzellen produziert. Verschiedenen Promotoren wurden hinsichtlich der Expressionsstärke eines Reporterproteins in humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSC) mittels Durchflusszytometrie untersucht und klassifiziert.

Durch statistische Versuchsplanung sollten die Transduktionsbedingungen mit Hilfe eines faktoriellen Designs optimiert werden. Hierbei wurde festgestellt, dass der Transduktionserfolg nicht ausschließlich von der Virenkonzentration, der Inkubationszeit, der Inkubationstemperatur und dem umhüllenden Fluid abhängig ist.

Die Expression des humanen knochenmorphogenen Proteins 2 (engl. *bone morphogenic protein* 2, BMP2) und der *Sex determining region* des Y-Chromosoms (SRY) Box 9 (SOX9) konnten erfolgreich für die Differenzierung von hMSC und der immortalisierten hMSC Zelllinie hMSC-TERT in Osteoblasten und Chondrozyten eingesetzt werden.

Um die für die klinische Zulassung nötige Reinheit der pseudotypisierten Baculoviren zu erzielen, wurde der Produktionsprozess zunächst vom Schüttelkolben in den Bioreaktor übertragen. Mittels serieller Tiefenfiltration erfolgte die Zellabtrennung im Vergleich zur klassischen Abtrennung mittels Zentrifugation. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung mittels Querstromfiltration (engl. *Tangential Flow Filtration*, TFF) und sterischer Exklusionschromatographie (engl. *Steric eXclusion Chromatography*, SXC). Hierdurch war es möglich, das Virus von Verunreinigungen abzutrennen. Des Weiteren wurde abschließende Transduktionsexperimente mit den aufgereinigten Viren durchgeführt und festgestellt, dass die Viren nach Aufreinigung noch aktiv sind.

## 2. Summary

The aim of this work was to establish a system applying baculoviral transduction for gene therapeutically applications.

For this purpose, recombinant baculoviruses were first cloned and produced in insect cells. Various promoters were tested and classified regarding the expression level of a reporter protein in human mesenchymal stromal cells (hMSC) by flow cytometry.

By statistical design of experiments, the transduction conditions should be optimized by means of a factorial design. It was found that the transduction success does not depend exclusively on the virus concentration, the incubation time, the incubation temperature and the enveloping fluid.

The expression of the human bone morphogenic protein 2 (BMP2) and the sex determining region of the Y chromosome (SRY) box 9 (SOX9) were successful used to differentiate hMSC and the immortalized hMSC cell line hMSC-TERT into osteoblasts and chondrocytes.

In order to achieve the purity of pseudotyped baculoviruses required for clinical approval, the production process was first transferred from shake flask to bioreactor. Cell separation was carried out by using serial depth filtration in comparison to centrifugation. This was followed by purification applying tangential flow filtration (TFF) and steric exclusion chromatography (SXC). This made it possible to separate the virus from impurities. Furthermore, final transduction experiments were performed using the purified viruses and it was found that the viruses are still active after purification.

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung ..... I

2. Summary ..... II

3. Motivation & Ziele der Arbeit ..... 1

4. Einleitung ..... 3

4.1. Gentherapie ..... 4

4.1.1. Adenovirus als viraler Vektor ..... 5

4.1.2. Adeno-assoziiertes Virus als viraler Vektor ..... 5

4.1.3. Retrovirus als viraler Vektor ..... 6

4.1.4. Lentivirus als viraler Vektor ..... 6

4.1.5. Baculovirus als viraler Vektor ..... 7

4.2. Zelltherapie ..... 10

4.3. Produktion und Aufreinigung von Baculoviren für die therapeutische Applikation ..... 11

4.3.1. Virusamplifikation ..... 12

4.3.2. Virusaufreinigung ..... 13

5. Material & Methoden ..... 19

5.1. Stämme & Zelllinien ..... 19

5.2. Oligonukleotide ..... 20

5.3. Plasmide ..... 20

5.4. Allgemeine Methoden ..... 20

5.4.1. Sterilisation ..... 20

5.4.1. Bestimmung der Osmolarität von Medien ..... 20

5.4.2. Größenbestimmung von Baculoviren ..... 21

5.4.1. Rasterelektronenmikroskopie ..... 21

5.4.2. Kultivierung von *E. coli* auf Agar-Platten ..... 21

5.4.3. Kultivierung von *E. coli* in Suspension ..... 22
5.5. Molekularbiologische Methoden ..... 22
5.5.1. Isolierung von Plasmiden ..... 22
5.5.2. Restriktionsverdau von Plasmiden ..... 22
5.5.3. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen ..... 22
5.5.4. Ligation von DNA-Elementen ..... 23
5.5.5. Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli* ..... 23
5.5.6. Transformation chemisch kompetenter *E. coli* ..... 23
5.5.7. *Golden Gate* Bibliothek ..... 24
5.5.8. Klonieren von *Golden Gate* Produkten ..... 24
5.5.9. Klonieren von rekombinanten Baculoviren ..... 25
5.5.10. Aufreinigung baculoviraler DNA ..... 26
5.5.11. Quantifizierung der Baculoviren-DNA mittels quantitativer PCR 27
5.6. Biochemische Methoden ..... 27
5.6.1. SDS-PAGE ..... 27
5.6.2. Nachweis der Pseudotypisierung über Western-Blot ..... 28
5.6.3. BCA-Assay ..... 28
5.6.4. Bestimmung der DNA-Konzentration mittels PicoGreen ..... 29
5.6.5. Quantifizierung von Oberflächenmarkern ..... 29
5.7. Zellbiologische Methoden ..... 29
5.7.1. Revitalisierung von Insektenzelllinien ..... 29
5.7.2. Kryokonservierung von Insektenzelllinien ..... 30
5.7.3. Kultivierung von Insektenzelllinien ..... 30
5.7.4. Bestimmung der Zellzahl & Viabilität ..... 30
5.7.5. Revitalisierung von Stromazellen ..... 31
5.7.6. Kryokonservierung von Stromazellen ..... 31

5.7.7. Kultivierung von Stromazellen ..... 32
5.7.8. Transfektion von Insektenzellen ..... 32
5.7.9. Baculovirus Amplifikation ..... 33
5.7.10. Virenproduktion im Bioreaktor ..... 33
5.7.11. Titerbestimmung Baculoviren nach O´Reilly ..... 34
5.7.12. Transduktion von Stromazellen ..... 34
5.7.13. Differenzierung von Stromazellen ..... 35
5.8. Methoden zur Virusaufreinigung ..... 37
5.8.1. Reaktorernte mittels Zentrifugation ..... 37
5.8.2. Reaktorernte mittels Tiefenfiltration ..... 37
5.8.3. Querstromfiltration ..... 37
5.8.4. Sterische Exklusionschromatographie ..... 38
5.9. Statistische Versuchsplanung ..... 39
5.10. Fehlerbetrachtung ..... 40
6. Ergebnisse & Diskussion ..... 41
6.1. Voraussetzungen für das Baculovirus als Genshuttle ..... 41
6.1.1. Aufbau der *Golden Gate*-Bibliothek ..... 41
6.1.2. Klonierung von rekombinanten Baculoviren ..... 50
6.2. Produktion von rekombinanten Baculoviren ..... 52
6.2.1. Transfektion von Sf9-Zellen mit Bacmid-DNA ..... 53
6.2.2. Amplifikation der Viren ..... 55
6.2.3. Validierung der Pseudotypisierung ..... 57
6.2.4. Lagerung der Viren ..... 58
6.3. Promoterevaluierung für den Einsatz pseudotypisierter Baculoviren als virale Vektoren ..... 61
6.3.1. Klassifizierung der Promoterstärke ..... 63

6.3.2. Identifikation von Einflussfaktoren der Transduktion ..... 68
6.3.3. Promoterevaluierung unter optimierten Transduktionsbedingungen ..... 72
6.3.4. Zusammenfassende Diskussion zur Optimierung der Transduktionsbedingungen und der Promoterevaluierung ..... 79
6.4. Differenzierung mesenchymaler Stromazellen mittels rekombinanter Baculoviren ..... 83
6.4.1. Transduktion zur Osteoblasten-Differenzierung ..... 83
6.4.2. Transduktion zur Chondrozyten-Differenzierung ..... 85
6.5. Virusaufreinigung mittels membranbasierter Prozesse ..... 87
6.5.1. Virusproduktion im Bioreaktor ..... 87
6.5.2. Reaktorernte mittels Tiefenfiltration und Zentrifugation ..... 90
6.5.3. Virusaufreinigung und -aufkonzentrierung mittels Querstromfiltration ..... 93
6.5.4. Virusaufreinigung mittels sterischer Exklusionschromatographie ..... 102
6.5.5. Bewertung der Querstromfiltration und sterischen Exklusionschromatographie zur Virusaufreinigung ..... 104
6.5.6. Bestimmung der Partikelgröße aufgereinigter Baculoviren ..... 104
6.5.7. Transduktion mit aufgereinigten Baculoviren ..... 106
7. Ausblick ..... 111
8. Literaturverzeichnis ..... 113
9. Abkürzungsverzeichnis ..... 129
10. Formelzeichen ..... 131
11. Anhang ..... 133
11.1. Ergänzungen zum Klonierungsteil ..... 133
11.2. Standardkurve zur qPCR ..... 137

11.3. Ergänzungen zur Optimierung der Transduktionsbedingungen ..... 138
11.4. Ergänzungen zur Reaktorernte ..... 139
11.5. Ergänzungen zur Querstromfiltration ..... 139
11.6. Ergänzung zur sterischen Exklusionschromatographie ..... 140
Auszeichnungen ..... 141
Veröffentlichungen ..... 141
Genehmigungen von Verlagen ..... 143
Danksagung ..... 145