

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung und Optimierung des rAAV-vermittelten Gentergetings

Ziel des rAAV-vermittelten Gentergetings ist die Korrektur einer Mutation über Homologe Rekombination gezielt am Genort, wobei das korrigierte Gen unter der Kontrolle des endogenen Promotors verbleibt. In dieser Arbeit wurde das rAAV-vermittelte Gentergeting als Modellsystem für die Analyse verschiedener Parameter, wie der Vektor-Dosis, der rAAV-Vektorarchitektur und der Zelllinie verwendet. Aufgrund früherer Beobachtungen, denen zufolge die Position der korrekten Nukleotide innerhalb der rAAV-Donor-DNA und die Länge der Homologiearme entscheidend für die Frequenz des HR-gestützten Gentergetings sind (63), wurden zwei rAAV-vermittelte Gentergeting-Systeme unabhängig voneinander etabliert.

4.1.1 Herstellung von Zelllinien mit einem integrierten Ziellokus

In beiden Systemen lag ein mutiertes *egfp*-Gen (Deletion bzw. Insertion) vor, das korrigiert werden sollte. Für die Korrektur der jeweiligen Mutation wurden sowohl der Donorvektor als auch die Endonukleasen (I-*SceI*, ZFNs), für das Einführen eines DSBs, als rAAV2-Vektoren in die Zelle geschleust. Hintergrundgedanke der Entwicklung von zwei rAAV-vermittelten Gentergeting-Systemen war, den Einfluss der rAAV-Vektorarchitektur auf das Gentergeting zu analysieren. Dafür wurde die korrekte Nukleotidsequenz innerhalb der rAAV-Donor-DNA unterschiedlich positioniert. Im Gentergeting-System "L δ G" lag die korrekte Nukleotidsequenz in der Mitte des rAAV-Donorvektors (zentrisch) (Abb. 9 A), während im Gentergeting-System "mG" die korrekte Nukleotidsequenz am 5'-Ende des rAAV-Donors (azentrisch) lokalisiert war (Abb. 9 B).

Der Ziellokus LacZs31 δ GFPINwpre des rAAV-vermittelten Gentergeting-Systems "L δ G" wurde mittels eines retroviralen Vektors in die Zellen eingebracht (29). Der Ziellokus bestand aus einem mutierten *egfp*-Gen und einem funktionellen *lacZ*-Gen (Abb. 9) unter der Kontrolle des LTR (*long terminal repeat*) des Maus-Leukämie Virus (MLV). Die Mutation beruhte auf einer Deletion der ersten 33 bp des *egfp*-Gens, die zu einer Leserasterverschiebung führte. Der Nachweis des integrierten Ziellokus "L δ G" erfolgte mit Hilfe des *lacZ*-Gens über eine LacZ-Färbung (Kapitel 3.1.3). Zwischen den beiden Genen befanden sich die Erkennungssequenz für die I-*SceI*-Endonuklease sowie die DNA-Bindungsstellen für die Zinkfinger nukleasen GZF1-N und GZF3-N (171).

Der Ziellokus *cmvGFP_31iNwpre* des Gentergeting-Systems „mG“ wurde mittels eines lentiviralen Vektors in die Zellen geschleust. Die Mutation des *egfp*-Gens beruhte auf einer Insertion von 34 bp, die die Erkennungssequenz der I-*SceI*-Endonuklease und die DNA-Bindungsstellen für die Zinkfingernukleasen GZF1-N und GZF3-N umfasste. Diese Insertion führte zudem zu einer Leserasterverschiebung innerhalb des *egfp*-Gens. Die U3-Regionen innerhalb der LTRs des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) lagen deletiert vor. Das mutierte *egfp*-Gen befand sich unter der Kontrolle eines internen CMV-Promotors.

Zusätzlich zur Leserasterverschiebung lagen in beiden Systemen drei Stop-Codons im Ziellokus vor. Ein Neomycin-Phosphotransferase-Gen (*neo*) ermöglichte die Selektion der Zellen, die einen integrierten Ziellokus trugen. Das *neo*-Gen wurde über eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) transkriptionell mit der *egfp*-Kassette verbunden.

Zudem sollte der Einfluss der Zelllinie auf das rAAV-vermittelte Gentergeting untersucht werden. Für diese Analyse wurden zu Beginn der Arbeit unterschiedliche Zelllinien (HEK293, U-2 OS, HeLa und HT-1080) mit dem jeweiligen integrierten Ziellokus hergestellt (Zielzellen). Die Zielzellen des zentrischen Systems wurden mit „L δ G“ (LacZ δ GFP) abgekürzt und die Zielzellen des azentrischen Systems mit „mG“ (mutiertes GFP), (Bsp.: U2OS-L δ G, U2OSmG) (Abb. 9 A und B). Für die Experimente wurden polyklonale Zielzellen verwendet, um Positionseffekte zu verhindern. Das bedeutet, dass der integrierte Ziellokus an verschiedenen Orten im Wirtsgenom integriert vorlag.

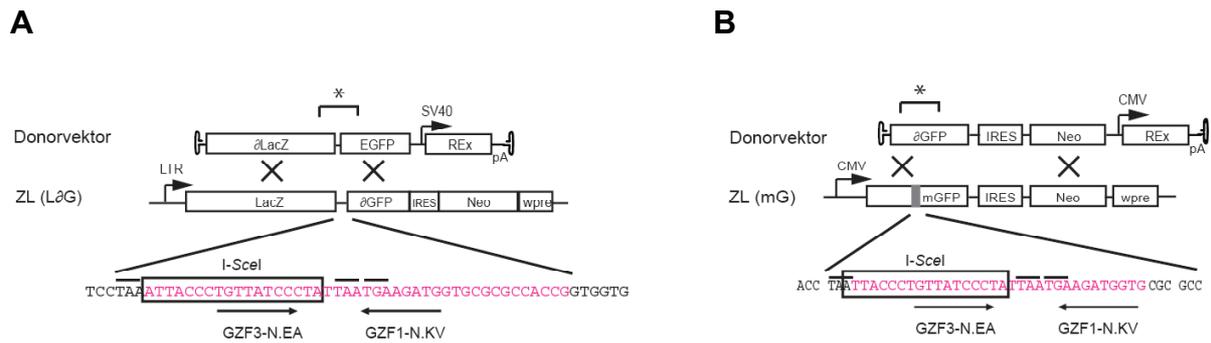


Abb. 9: Schema der rAAV-vermittelten Gentargeting-Systeme I+II

A) Gentargeting-System "LδG" (zentrisch): Der integrierte Ziellokus (ZL) besteht aus einem funktionellen *lacZ*-Gen und einem deletierten *egfp*-Gen. Zwischen den beiden Genen (rote Sequenz) befindet sich eine *I-SceI*-Schnittstelle (schwarzes Kästchen) und zwei Bindungsstellen für die Zinkfinger-nukleasen GZF1-N und GZF3-N (Pfeile). Drei Stop-Codons (Striche) und eine Leserasterverschiebung verhindern zusätzlich die Translation des LacZ-EGFP-Fusionsproteins. Nach der HR (Kreuze) mit dem rAAV-Donorvektor erfolgt die Expression des LacZ-EGFP-Fusionsproteins vom MLV-LTR Promotor aus. Die korrekte Nukleotidsequenz liegt zentrisch (*) im Donorvektor vor.

B) Gentargeting-System "mG" (azentrisch): Der integrierte Ziellokus besteht aus einem mutierten *egfp*-Gen. Die Mutation basiert auf einer Insertion, die eine *I-SceI* Schnittstelle und die Bindungsstelle für GZF1-N und GZF3-N (Pfeile) umfasst. Drei Stop-Codons (Striche) und eine Leserasterverschiebung verhindern zusätzlich die Translation des EGFP-Proteins. Nach HR (Kreuze) mit dem rAAV-Donorvektor erfolgt die Expression des korrigierten *egfp*-Gens vom CMV-Promotor aus. Die korrekte Nukleotidsequenz liegt azentrisch (*) im Donorvektor vor. Die homologen Sequenzen des Donors und die der *I-SceI* Endonuklease (hier nicht gezeigt) liegen in einem rAAV-Vektor verpackt vor.

LTR, *long terminal repeat* des Maus-Leukämie-Virus; CMV, Promotor des Zytomegalievirus; SV40, Promotor des Simianen Virus 40. IRES, interne ribosomale Eintrittsstelle; Neo, Neomycin-Phosphotransferase-Gen; pA, Poly-A-Sequenz; wpre, posttranskriptionelles Regulatorelement des *Woodchuck* Hepatitis-Virus. *: Position der korrekten Nukleotidsequenzen.

Für das rAAV-vermittelte Gentargeting-System "LδG" wurden ausschließlich Zelllinien verwendet, die zu 100% eine Blaufärbung aufwiesen (Abb. 10). Da im Gentargeting-System "mG" auf ein zusätzliches *lacZ*-Markergen verzichtet wurde und somit ein Nachweis des integrierten Ziellokus über eine LacZ-Färbung nicht möglich war, wurden die Zellen nach der Transduktion mit dem lentiviralen Vektor solange selektioniert (in der Regel 2-3 Wochen nach der Transduktion) bis keine toten Zellen unter dem Mikroskop zu beobachten waren.

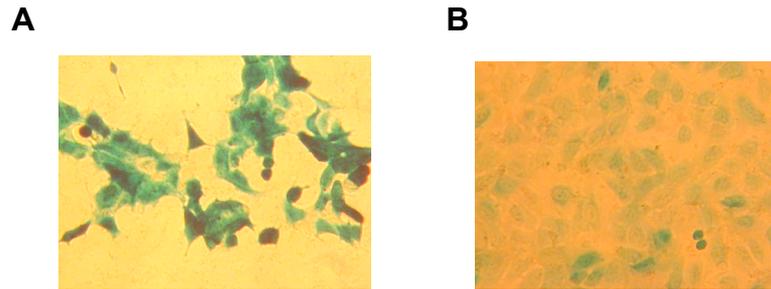


Abb. 10: Nachweis des integrierten Ziellokus

Der Nachweis des integrierten Ziellokus „LacZ Δ GFP“ wurde mit Hilfe einer X-Gal-Färbung nachgewiesen. Dafür wurden die HEK293-L Δ G-Zellen (A) und die U2OS-L Δ G-Zellen (B) an der Wachstumsunterlage fixiert und anschließend mit einer X-Gal-Lösung behandelt. Die Bildung des Indigofarbstoffes in den Zellen kommt durch die Spaltung des zugegebenen Substrats (X-Gal) durch die β -Galaktosidase (*lacZ*-Genprodukt) zustande.

Die Zellen des Systems „L Δ G“ wiesen unter dem Mikroskop eine unterschiedliche Intensität der Blaufärbung auf (Abb. 10), die durch die unterschiedliche Morphologie der Zellen erklärt werden kann. Die HEK293-L Δ G-Zellen sind im Gegensatz zu den großen flachen U2OS-L Δ G-Zellen kleiner und kugelig, weshalb sie im Mikroskop dunkler waren als die U2OS-L Δ G-Zellen.

4.1.2 Untersuchung der Vektordosis, der Zelllinie und des rAAV-SceI-Vektortyps auf die Gentargetingfrequenz

Im folgenden Abschnitt sollte untersucht werden, ob die Vektordosis und der Zelltyp einen Einfluss auf das rAAV-vermittelte Gentargeting haben. Aufgrund früherer Studien, die eine Erhöhung der Transgenexpression durch die Verwendung von dsAAV-Vektoren belegen (111), entwickelte sich zudem die Frage, ob die Gentargetingfrequenz durch den Einsatz eines dsAAV-SceI Vektors gesteigert werden könnte, da unmittelbar nach der Infektion die Expression der I-SceI-Endonuklease erfolgen kann. Somit würde relativ schnell die Endonuklease für das rAAV-vermittelte Gentargeting zur Verfügung stehen. Deshalb wurde die I-SceI-Endonuklease als ssAAV-Vektor und als dsAAV-Vektor verpackt in die Zelle eingeführt. Der rAAV-Donor.REx wurde als ssAAV-Vektor appliziert.

Für die Titrationsanalysen wurden die Zielzellen des Gentargeting-Systems „L Δ G“ mit steigenden Mengen an rAAV-Donor und rAAV-SceI infiziert. Während des Experimentes wurden die rAAV-transduzierten Zellen nicht unter Selektion gestellt. Am 7. Tag nach der Transduktion erfolgte die phänotypische Analyse der Zellen im Durchflusszytometer. Dabei wurde die Korrektur des deletierten *egfp*-Gens anhand der EGFP-positiven Zellen ermittelt. Die Anzahl der rAAV-transduzierten Zellen wurde mit Hilfe des Markergens REx des rAAV-Donorvektors über die Anzahl der REx-positiven Zellen bestimmt.

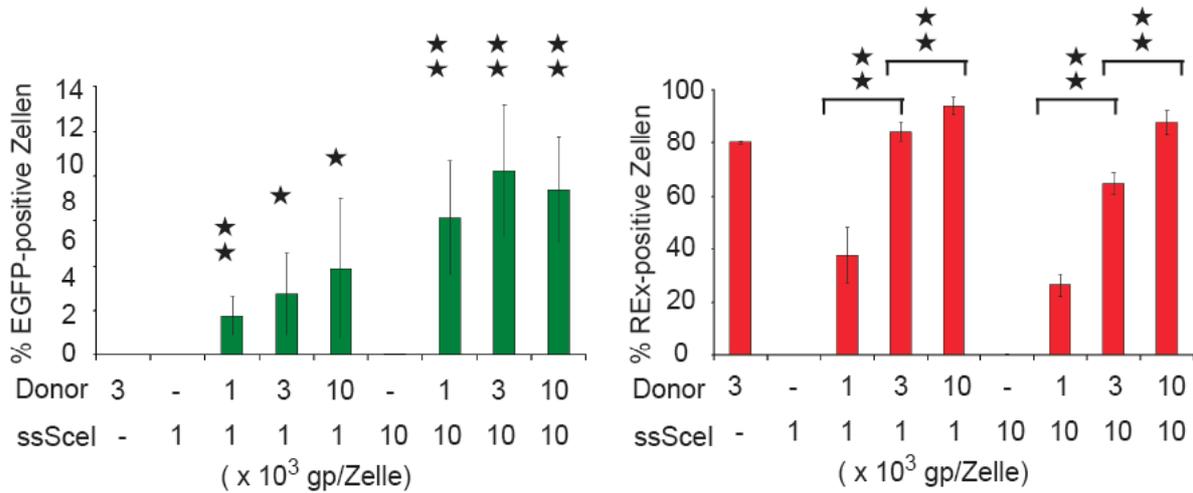


Abb. 11: Titration von ssAAV-SceI und rAAV-Donor.REX in U2OS-L Δ G-Zellen

Die Balken repräsentieren die Anzahl der EGFP-positiven Zellen und der REX-positiven Zellen in Abhängigkeit verschiedener Vektormengen an ssAAV-SceI und rAAV-Donor. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an gp rAAV/Zelle infiziert und am 7. Tag nach der Infektion im Durchflusszytometer analysiert (n=3). Die Standardabweichungen sind in Form von Fehlerbalken angegeben. Die Sterne (*,**) weisen zum einen auf einen signifikanten Unterschied in der Gentergetingfrequenz zum nicht stimulierten Gentergeting (Donor allein, 1. Säule) und zum anderen auf eine signifikante Zunahme der Transduktionsfrequenz in Abhängigkeit der rAAV-Donormenge hin. (*: P < 0,05, **: P < 0,005). gp: genomische Partikel.

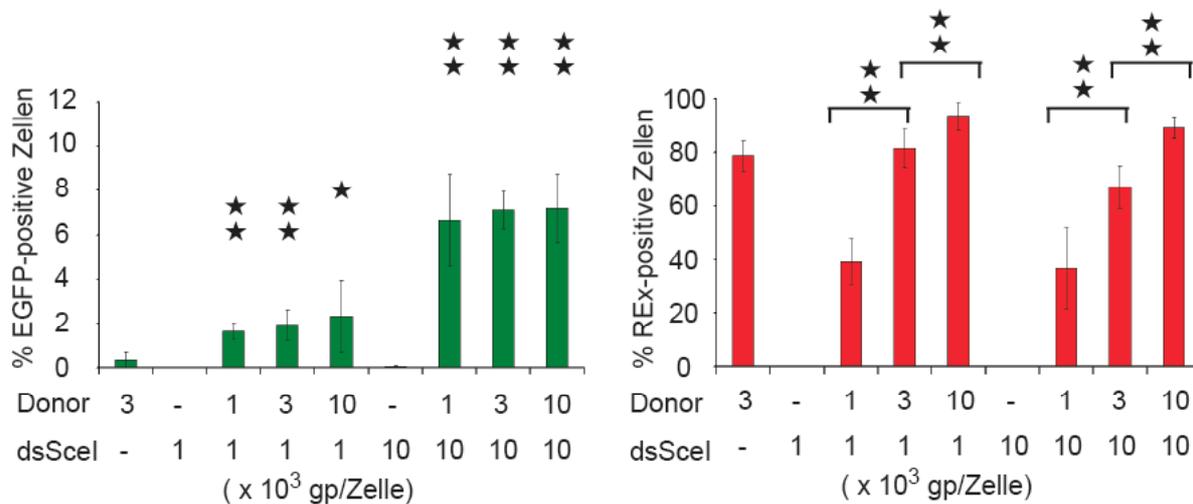


Abb. 12: Titration von dsAAV-SceI und rAAV-Donor.REX in U2OS-L Δ G-Zellen

Die Balken repräsentieren die Anzahl der EGFP-positiven Zellen und der REX-positiven Zellen in Abhängigkeit verschiedener Vektormengen an dsAAV-SceI und rAAV-Donor. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an gp rAAV/Zelle infiziert und am 7. Tag nach der Infektion im Durchflusszytometer analysiert (n=3). Die Standardabweichungen sind in Form von Fehlerbalken angegeben. Die Sterne (*,**) weisen zum einen auf einen signifikanten Unterschied in der Gentergetingfrequenz zum nicht stimulierten Gentergeting (Donor allein, 1. Säule) und zum anderen auf eine signifikante Zunahme der Transduktionsfrequenz in Abhängigkeit der rAAV-Donormenge hin. (*: P < 0,05, **: P < 0,005). gp: genomische Partikel.

In Abwesenheit eines I-SceI-induzierten DSB konnte keine Korrektur des deletierten *egfp*-Gens in den U2OS-L δ G-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 11 und 12). In Gegenwart eines DSB stieg die Anzahl der EGFP-positiven Zellen bei beiden rAAV-SceI Vektoren signifikant um ein 600-800faches an ($P < 0,005$). Bei 1×10^4 gp von ssAAV-SceI und 1×10^3 gp von rAAV-Donor pro Zelle wurde ein Maximum von 8% EGFP-positiven Zellen erreicht (Abb. 11). Bei der Verwendung von 1×10^4 gp von dsAAV-SceI und 1×10^3 gp von rAAV-Donor pro Zelle wurden 7% der Zellen korrigiert (Abb. 12). Eine Erhöhung der rAAV-Donor Vektordosis von 3×10^3 gp auf 1×10^4 gp pro Zelle führte zu keiner weiteren Steigerung der Gentargetingfrequenz (Abb. 11 und 12). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die I-SceI-Endonuklease, nicht aber der Donorvektor, der limitierende Faktor in dieser Zelllinie ist.

Die Anzahl der REx-positiven Zellen nahm mit steigenden Mengen des rAAV-Donors signifikant zu ($P < 0,005$), wobei mit der höchsten Dosis von 1×10^4 gp an rAAV-Donor pro Zelle 90% der Zellen transduziert wurden (Abb. 11 und 12).

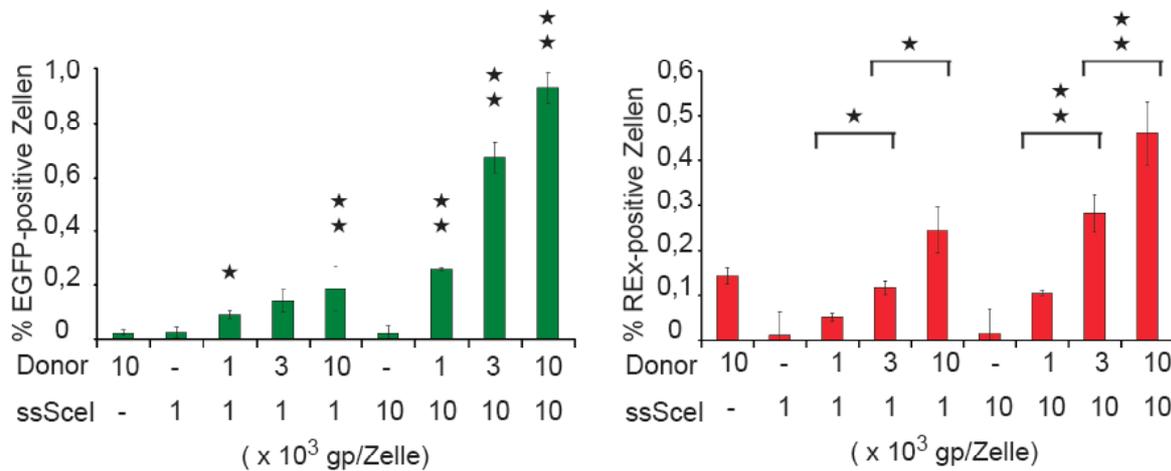


Abb. 13: Titration von ssAAV-SceI und rAAV-Donor.REX in HEK293-L Δ G-Zellen

Die Balken repräsentieren die Anzahl der EGFP-positiven Zellen und der REX-positiven Zellen in Abhängigkeit verschiedener Vektormengen an ssAAV-SceI und rAAV-Donor. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an gp rAAV/Zelle infiziert und am 7. Tag nach der Infektion im Durchflusszytometer analysiert (n=3). Die Standardabweichungen sind in Form von Fehlerbalken angegeben. Die Sterne (*,**) weisen zum einen auf einen signifikanten Unterschied in der Gentrargetingfrequenz zum nicht stimulierten Gentrargeting (Donor allein, 1. Säule) und zum anderen auf eine signifikante Zunahme der Transduktionsfrequenz in Abhängigkeit der rAAV-Donormenge hin. (*: P < 0,05, **: P < 0,005). gp: genomische Partikel.

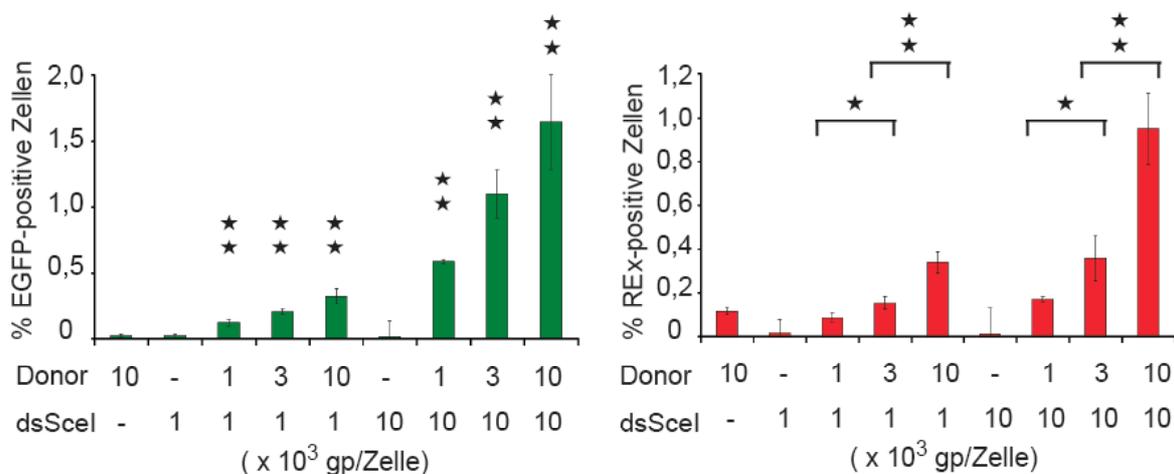


Abb. 14: Titration von dsAAV-SceI und rAAV-Donor.REX in HEK293-L Δ G-Zellen

Die Balken repräsentieren die Anzahl der EGFP-positiven Zellen und der REX-positiven Zellen in Abhängigkeit verschiedener Vektormengen an dsAAV-SceI und rAAV-Donor. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an gp von rAAV/Zelle infiziert und am 7. Tag nach der Infektion im Durchflusszytometer analysiert (n=3). Die Standardabweichungen sind in Form von Fehlerbalken angegeben. Die Sterne (*,**) weisen zum einen auf einen signifikanten Unterschied in der Gentrargetingfrequenz zum nicht stimulierten Gentrargeting (Donor allein, 1. Säule) und zum anderen auf eine signifikante Zunahme der Transduktionsfrequenz in Abhängigkeit der rAAV-Donormenge hin. (*: P < 0,05, **: P < 0,005). gp: genomische Partikel.

In den HEK293-L δ G-Zellen wurde in Gegenwart des rAAV-Donors eine Gentargetingfrequenz von 0,02% erreicht. In Gegenwart des ssAAV-SceI Vektors stieg die Gentargetingfrequenz signifikant auf 0,8% bzw. beim dsAAV-SceI Vektor auf 1,2% an ($P < 0,005$) (Abb. 13 und 14). Dabei wurde eine Steigerung der Gentargetingfrequenz in Abhängigkeit der Vektordosis beider rAAV-Vektoren beobachtet. Die höchsten Gentargetingfrequenzen wurden in Gegenwart der höchsten Vektordosen von 1×10^4 gp/Zelle für den rAAV-Donor und ssAAV-SceI erreicht.

Die Anzahl REx-positiver Zellen nahm signifikant mit steigenden Mengen an rAAV-Donor zu, wobei die höchste Transduktionsfrequenz bei 0,95% lag ($P < 0,05$). Zudem konnte ein Anstieg der REx-positiven Zellen bei einer Erhöhung der rAAV-SceI Dosis beobachtet werden. Eine Erklärung dafür gibt es derzeit nicht.

Zusammenfassend ließ sich beobachten, dass für das rAAV-vermittelte Gentargeting in beiden Zelllinien Vektordosen bis zu 1×10^4 gp rAAV pro Zelle benötigt wurden, um die höchsten Gentargetingfrequenzen zu erzielen. Dabei war in den U2OS-L δ G-Zellen die Menge an rAAV-SceI ausschlaggebend für die Erhöhung der Gentargetingfrequenz, während in den HEK293-L δ G-Zellen die Gentargetingfrequenz sowohl von der Menge des rAAV-SceI Vektors als auch des rAAV-Donorvektors abhängig war. In beiden Zelllinien konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen ssAAV-SceI und dsAAV-SceI hinsichtlich der Gentargetingfrequenzen festgestellt werden. Es wurden jedoch Unterschiede in der Gentargetingfrequenz und der Transduktionsfrequenz zwischen beiden verwendeten Zelllinien festgestellt. In den U2OS-L δ G-Zellen wurden mit der höchsten Dosis an rAAV-Donor bis zu 90% der Zellen transduziert im Vergleich zu 0,9% bei den HEK293-L δ G-Zellen. Dies bedeutet, dass die Transduktionsfrequenz in U2OS-L δ G-Zellen um ein 100faches höher war als in den HEK293-L δ G-Zellen. Zudem konnte in den U2OS-L δ G-Zellen eine 8fach höhere Gentargetingfrequenz in den HEK293-L δ G-Zellen nachgewiesen werden.

4.1.3 Kinetik des rAAV-vermittelten Gentargetings in verschiedenen Zielzellen

Im Hinblick auf zukünftige therapeutische Anwendungen eines solchen rAAV-vermittelten Gentargeting-Systems ist die Stabilität eines Gentargetingereignisses und somit die Langzeitexpression des korrigierten Gens von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurde die Gentargetingfrequenz über einen längeren Zeitraum nach der Transduktion beobachtet. Für die Kinetikstudie wurden U2OS-L δ G- und HEK293-L δ G-Zellen mit den höchsten Mengen an rAAV-SceI und rAAV-Donor (je 1×10^4 gp/Zelle) infiziert und im Abstand von 7 Tagen über einen Zeitraum von 30 bzw. 36 Tagen nach der Infektion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Während des Experimentes wurden die Zellen nicht unter Selektion gestellt.

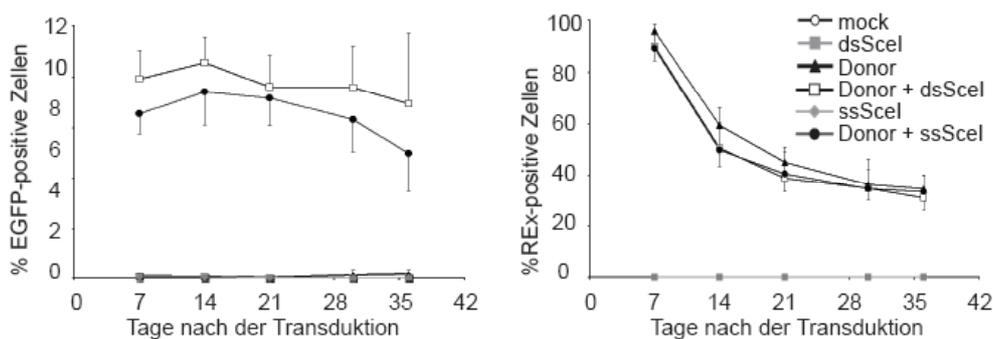


Abb. 15: Kinetik des rAAV-vermittelten Gentargetings in U2OS-L Δ G-Zellen

Die Graphen repräsentieren die Anzahl der EGFP- und REx-positiven Zellen über einen Zeitraum von 36 Tagen. Für die Infektion wurden die Zellen mit 1×10^4 gp von ssAAV-SceI bzw. dsAAV-SceI Vektor/Zelle infiziert und im Abstand von 7 Tagen im Durchflusszytometer untersucht ($n=3$). Während des Versuches wurden die Zellen nicht unter Selektion gestellt. Der Ansatz „mock“ gibt die nicht infizierten Zellen an. Die Standardabweichungen sind in Form von Fehlerbalken angegeben.

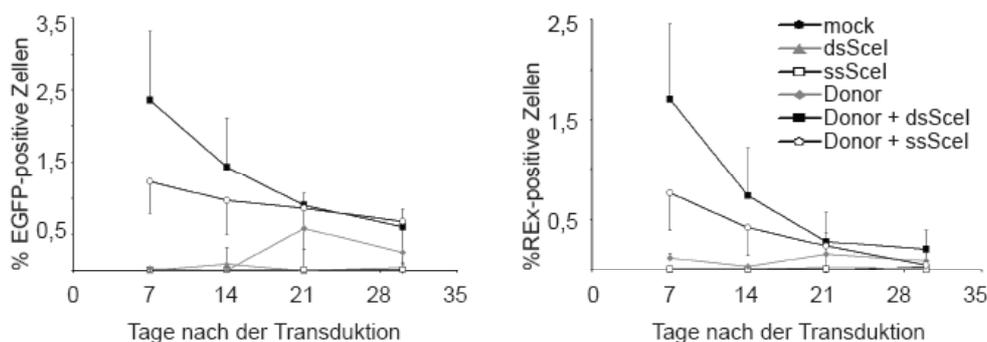


Abb. 16: Kinetik des rAAV-vermittelten Gentargetings in HEK293-L Δ G-Zellen

Die Graphen repräsentieren die Anzahl der EGFP-positiven Zellen und der REx-positiven Zellen über einen Zeitraum von 30 Tagen. Für die Infektion wurden die Zellen mit 1×10^4 gp von ssAAV-SceI bzw. dsAAV-SceI Vektoren infiziert und im Abstand von 7 Tagen im Durchflusszytometer untersucht ($n=3$). Während des Versuches wurden die Zellen nicht unter Selektion gestellt. Der Ansatz „mock“ gibt die nicht infizierten Zellen an. Die Standardabweichungen sind in Form von Fehlerbalken angegeben.

In beiden Zelllinien konnte eine signifikante Abnahme der REx-positiven Zellen über den Beobachtungszeitraum festgestellt werden ($P < 0,005$), wobei ab dem 21. Tag ein konstantes Level erreicht wurde (Abb.15 und 16). Dabei sank in den U2OS-L Δ G-Zellen die Anzahl der REx-positiven Zellen signifikant von 90% bis auf 30% ab ($P < 0,005$) (Abb. 15). In den HEK293-L Δ G-Zellen konnte ebenfalls eine signifikante Abnahme der REx-positiven Zellen von 1,7% bis auf 0,2% ($P < 0,005$) vom Tag 7 zum Tag 30 festgestellt werden (Abb. 16). Die Anzahl der EGFP-positiven Zellen blieb in den U2OS-L Δ G-Zellen über den Beobachtungszeitraum stabil, wohingegen in den HEK293-L Δ G-Zellen eine signifikante Abnahme der EGFP-positiven

Zellen vom 7. Tag bis zum 30. Tag nach der rAAV-Transduktion festgestellt werden konnte ($P < 0,005$).

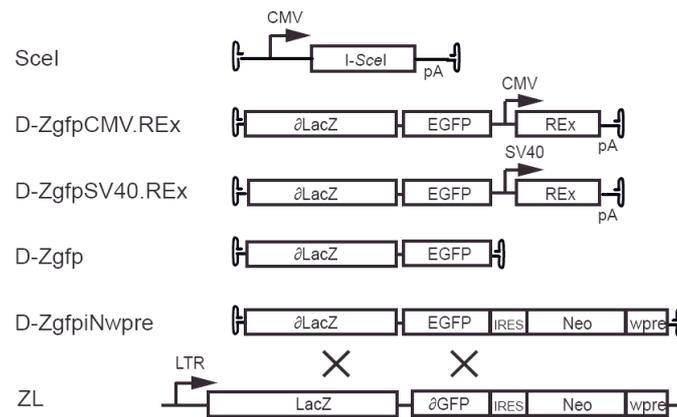
Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die Anzahl der EGFP-positiven Zellen in den U2OS-L Δ G-Zellen über einen Zeitraum von mindestens 36 Tagen unter nicht selektiven Bedingungen stabil blieb, wohingegen in den HEK293-L Δ G-Zellen eine Abnahme der EGFP-positiven Zellen beobachtet werden konnte, was vermutlich auf einen stillgelegten endogenen LTR-Promotor zurückgeführt werden kann.

Aufgrund dieser gewonnenen Daten wurden die folgenden Experimente in den U2OS-L Δ G-Zellen durchgeführt, wobei die höchste Dosis von 1×10^4 gp/Zelle pro rAAV-Vektor verwendet wurde.

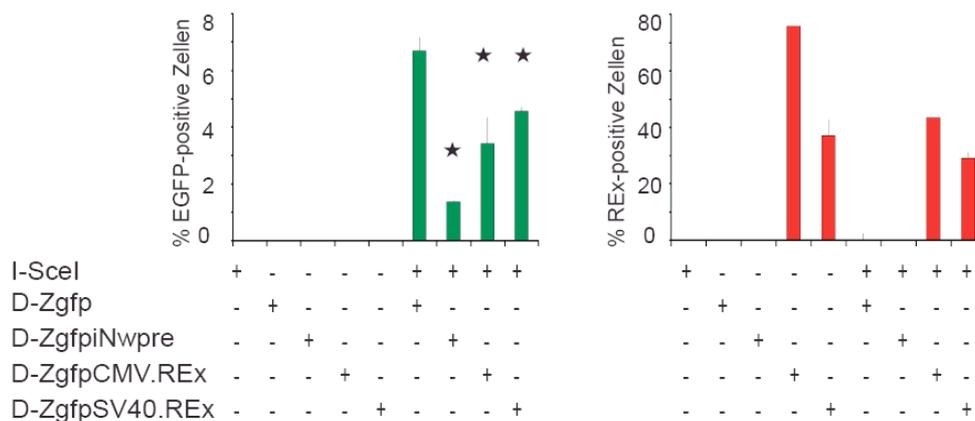
4.1.4 Einfluss der Homologielänge zwischen dem mutierten Ziellokus und dem rAAV-Donorvektor

Neben der Vektordosis und des Zelltyps scheint die Homologielänge zwischen dem mutierten Ziellokus und dem rAAV-Donorvektor ein weiterer wichtiger Parameter hinsichtlich der Gentargetingeffizienz zu sein. Eine Studie von Hirata und Russell belegt, dass die Gentargetingfrequenz verbessert werden kann, wenn die gesamte Homologielänge zwischen dem mutierten Ziellokus und dem rAAV-Donor bei 3-4 kb liegt (63). Um dieser Frage nachzugehen, wurden im folgenden Experiment rAAV-Donorvektoren hergestellt, deren Homologielängen zum Ziellokus variierten. Diese wurden hinsichtlich ihrer Gentargetingfrequenzen miteinander verglichen (Abb. 17). Bis auf den Donor D-Zgfp π Nwpre, mit der längsten Homologiesequenz (4,2 kb), verfügten alle Donorvektoren über eine Gesamthomologielänge von 2,1 kb. Dabei befanden sich der kurze Homologiearm (654 bp) am 5'-Ende und der lange Homologiearm (1,5 kb) am 3'-Ende der Vektoren. Zudem besaßen zwei dieser Vektoren, D-ZgfpSV40.REx und D-ZgfpCMV.REx, ein zusätzliches Markergen (REx) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors respektive eines SV40-Promotors. Es wurden U2OS-L ∂ G-Zellen mit 1×10^4 gp rAAV-Donor und rAAV-SceI pro Zelle infiziert und am 10. Tag nach der Transduktion mittels Durchflusszytometrie analysiert.

A



B

**Abb. 17: Einfluss der Vektorarchitektur auf die Gentargetingfrequenz**

A) Schema des Ziellokus (ZL) und der rAAV-Donorvektoren (D). Die Homologe Rekombination zwischen dem mutierten Ziellokus (ZL) und dem rAAV-Donor ist in Form von Kreuzen dargestellt. B) Titration in U2OS-L Δ G-Zellen. Die Balken repräsentieren die Anzahl der EGFP- und REx-positiven Zellen. Für die Titration wurden die Zellen mit rAAV-Donorvektoren unterschiedlicher Homologielänge (1×10^4 gp/Zelle) in Gegenwart von ssAAV-ScelI (1×10^4 gp/Zelle) infiziert und am 10. Tag nach der Transduktion im Durchflusszytometer analysiert. Der Stern weist auf einen signifikanten Unterschied der Gentargetingfrequenzen der Donorvektoren D-ZgfpINwpre, D-ZgfpCMV.REx und D-ZgfpSV40.REx zur Gentargetingfrequenz des Donorvektors D-Zgfp hin (*: $P < 0,05$). CMV, Promotor des Zytomegalievirus; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; LTR, *long terminal repeat* des Maus-Leukämie-Virus; Neo, Neomycin-Phosphotransferase-Gen; pA, Poly-A-Sequenz, SV40, Promotor des Simianen Virus 40; wpre, posttranskriptionelles Element aus dem *Woodchuck* Hepatitis-Virus.

In Abwesenheit eines I-SceI-stimulierten DSB konnte keine Korrektur des mutierten *egfp*-Gens nachgewiesen werden. In Gegenwart eines DSB wurde unter Verwendung des kurzen Donors D-Zgfp die höchste Gentargetingfrequenz mit 7% erzielt. Die Donorvektoren, die ein zusätzliches Markergen trugen, erzielten mit 3,5% und 4% signifikant geringere Gentargetingfrequenzen als der Donor D-Zgfp ($P < 0,05$). Der rAAV-Donor D-ZgfpINwpre mit der längsten Homologielänge zeigte die niedrigste Gentargetingfrequenz mit 1%. Im

Gegensatz zum CMV-getriebenen REx wurde in Gegenwart des SV40-Promotors eine höhere Transduktionsfrequenz erreicht, wobei in Gegenwart von rAAV-SceI die Anzahl der REx-positiven Zellen bei beiden Vektoren abnahm. Eine Erklärung dafür gibt es derzeit nicht. Dabei konnte für den Donor D-ZgfpCMV.REx eine Abnahme der REx-positiven Zellen um die Hälfte beobachtet werden, wohingegen die Anzahl der REx-positiven Zellen beim Donor D-ZgfpSV40.REx um 10% niedriger war (Abb. 17).

Es wurde gezeigt, dass ein Donorvektor mit einer Homologielänge von 2,1 kb eine höhere Gentargetingfrequenz erzielte als ein Donorvektor mit einer Homologielänge von 4,2 kb. Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass diese Beobachtung ausschließlich auf die Homologielänge zurückgeführt werden kann. Es wäre denkbar, dass andere Faktoren in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. Überdies wurde gezeigt, dass die Gentargetingeffizienz in Gegenwart eines zusätzlichen Markergens im Vektor niedriger war. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Experimente des Gentargeting-Systems “L δ G” der Donor D-Zgfp mit der kürzeren Homologie und keinem zusätzlichen Markergen verwendet.

4.1.5 Vergleich von rAAV-Kombivektoren und rAAV-Einfachvektoren

Um den Einfluss der Vektorarchitektur genauer zu analysieren, wurde das Gentargeting-System “mG” verwendet. Im Gegensatz zum vorigen Gentargeting-System “L δ G” lag die korrekte Nukleotidsequenz innerhalb des rAAV-Donors nicht mittig sondern azentrisch vor (Abb. 9).

Die Aufnahme von AAV erfolgt über eine rezeptorvermittelte Endozytose (8). Dies hat zur Folge, dass bei der Verwendung von zwei oder mehreren rAAV-Vektoren mehr Rezeptoren auf der Zelloberfläche besetzt werden als bei einer Infektion mit einem Vektor. Dadurch könnte die Transduktionsfrequenz negativ beeinflusst werden. Um möglichst viele Viruspartikel in die Zelle schleusen zu können und gleichsam eine möglichst hohe Gentargetingfrequenz zu erzielen, wurden rAAV-Kombivektoren konstruiert, die sowohl für die homologe Donorsequenz als auch für die Sequenz der I-SceI-Endonuklease kodierten (Abb.18 A). Als Kontrolle wurde ein rAAV-Vektor konstruiert, bei dem die I-SceI-Kassette gegen die REx-Kassette ausgetauscht wurde (Abb.18 A). Zudem wurde ein Donorvektor ohne Markergen und ohne I-SceI-Kassette hergestellt (D- δ GFPiN).

Die U2OSmG-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an rAAV (1×10^3 bzw. 1×10^4 gp/Zelle) infiziert. Für einen Vergleich von rAAV-Kombi- und Einfachvektoren wurden in einem Parallelansatz eine Koinfektion mit den zwei rAAV-Vektoren, rAAV-SceI und rAAV-Donor, durchgeführt.

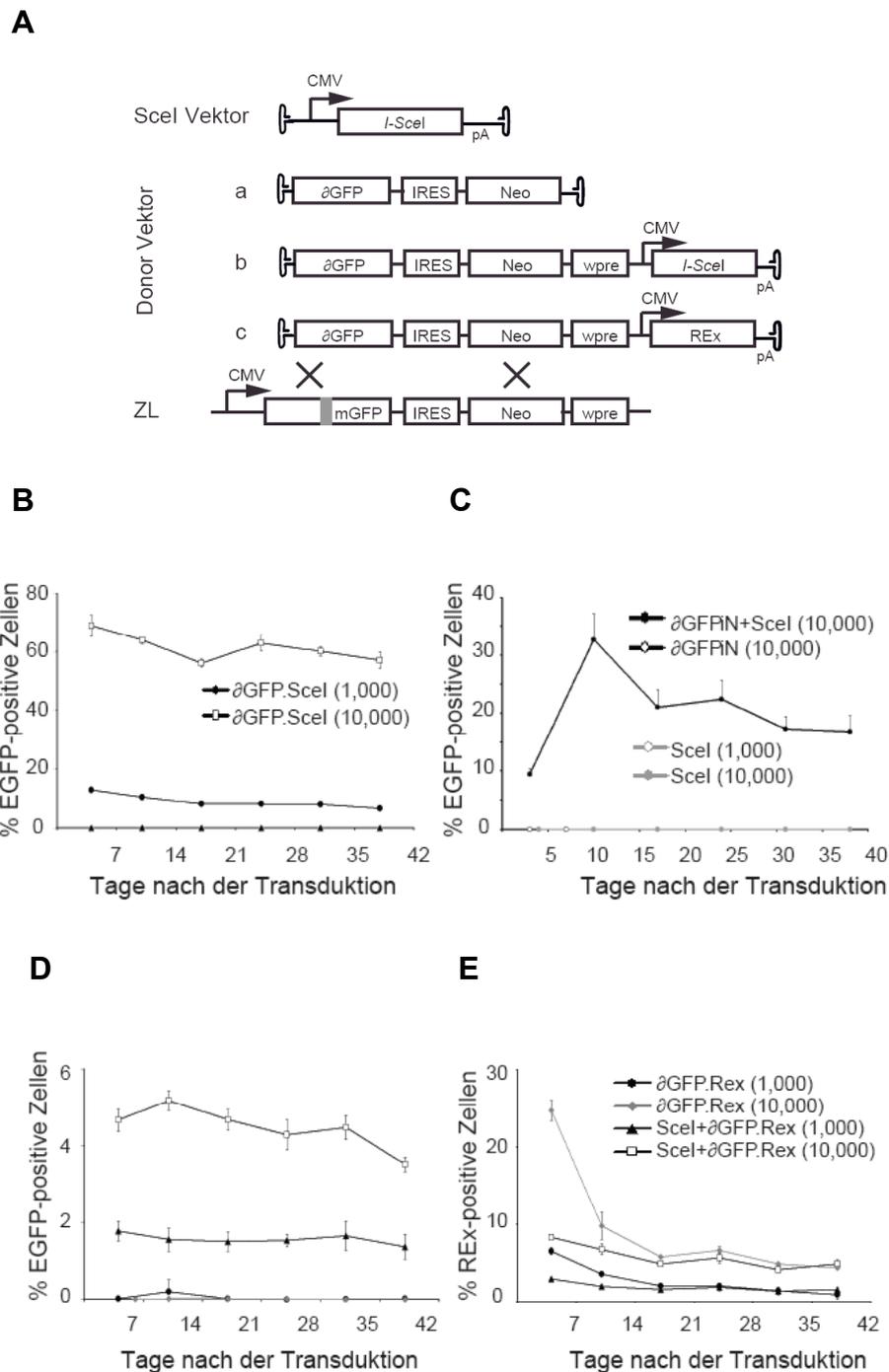


Abb. 18: Vergleich von rAAV-Kombi- und Einfachvektoren

A) Schema des Ziellokus (ZL) und der rAAV-Kombi- und rAAV-Einfachvektoren des Gentargeting-Systems "mG". Die Homologe Rekombination zwischen dem mutierten Ziellokus (ZL) und dem rAAV-Donor ist in Form von Kreuzen dargestellt. B, C, D, E) Kinetik in U2OSmG-Zellen. Die Graphen repräsentieren die Anzahl der EGFP- und REX-positiven Zellen über einen Zeitraum von 38 Tagen. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen (1×10^3 bzw. 1×10^4 gp/Zelle) an rAAV-Kombi- und rAAV-Einfachvektoren infiziert ($n=3$) und wöchentlich mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben. B) Infektion mit dem Kombivektor rAAV- δ GFP.SceI. C) Koinfektion mit rAAV-SceI und dem Donorvektor rAAV- δ GFPIN ohne Marker gen. D, E) Koinfektion mit rAAV-SceI und dem Donorvektor rAAV- δ GFP.REX mit Marker gen. CMV, Promotor des Zytomegalievirus; pA, Poly-A-Sequenz, SV40, Promotor des Simianen Virus 40; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; Neo, Neomycin-Phosphotransferase-Gen; wpre, posttranskriptionelles Element aus dem *Woodchuck* Hepatitis-Virus.

Mit der höchsten Vektordosis (1×10^4 gp/Zelle) des Kombivektors rAAV- Δ GFP.SceI wurden 65% der Zellen korrigiert (Abb. 18 B), während bei der Koinfektion mit rAAV- Δ GFPiN und rAAV-SceI 25% der Zellen korrigiert wurden (Abb. 18 C). Die Verwendung des REx-kodierenden Donorvektors rAAV- Δ GFP.REx in Kombination mit rAAV-SceI führte mit den höchsten Vektordosen zu einer Gentargetingfrequenz von 5% (Abb. 18 D). Die Korrektur des mutierten *egfp*-Gens blieb über den zeitlichen Beobachtungszeitraum von 38 Tagen bei allen Infektionsansätzen stabil. Im Vergleich dazu sank die Anzahl der REx-positiven Zellen ab dem 14. Tag bis auf ein konstantes Level ab (Abb. 18 E), was bereits zuvor beobachtet werden konnte (Abb. 15).

Um den Einfluss der Zelllinie auf das rAAV-vermittelte Gentargeting mittels Kombivektoren genauer zu analysieren wurden im folgenden Versuch verschiedene Zelllinien (HT1080mG und HeLamG) mit der höchsten Vektordosis (1×10^4 gp/Zelle) an rAAV- Δ GFP.SceI infiziert. Die Analyse der EGFP- und REx-positiven Zellen erfolgte im Abstand von 7 Tagen über einen Beobachtungszeitraum von 38 Tagen.

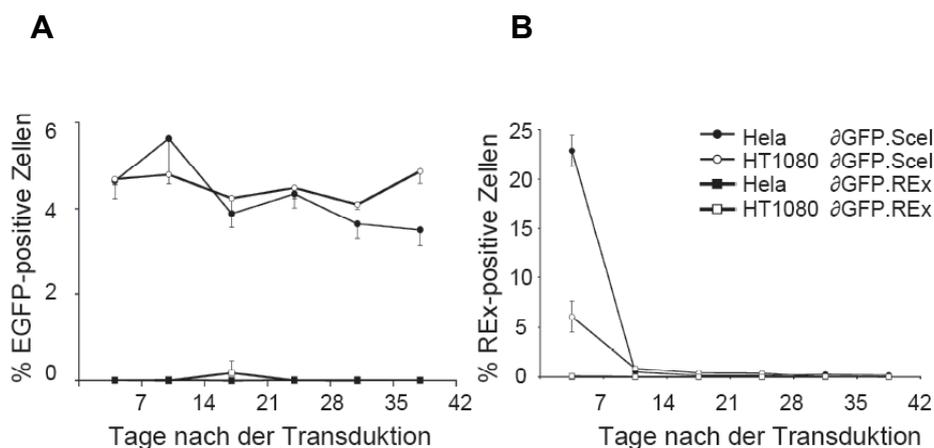


Abb. 19: Einsatz von rAAV-Kombivektoren in verschiedenen Zielzellen

Die Graphen repräsentieren die Anzahl der EGFP-positiven Zellen (A) und der REx-positiven Zellen (B) über einen Zeitraum von 38 Tagen. Die Zellen (HeLamG- und HT1080mG-Zellen) wurden mit jeweils 1×10^4 gp rAAV infiziert ($n=3$) und wöchentlich mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die Korrektur des mutierten *egfp*-Gens wurden der Kombivektor rAAV- Δ GFP.SceI und als Kontrolle der Vektor rAAV- Δ GFP.REx verwendet. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Die höchste Menge an rAAV- Δ GFP.SceI führte in den HeLamG- und den HT1080mG-Zellen zu Gentargetingfrequenzen von 5% (Abb. 19 A). Für den Nachweis der rAAV-Transduktion wurde der Kontrollvektor rAAV- Δ GFP.REx verwendet. In beiden Zelllinien sank die Anzahl der REx-positiven Zellen innerhalb von 10 Tagen unter 1% ab (Abb. 19 B), was bereits im rAAV-vermittelten Gentargeting-System "L Δ G" beobachtet werden konnte.

Anhand der vorliegenden Daten konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der EGFP-positiven Zellen in U2OSmG-Zellen mit 65% um ein 13faches höher war, als in HeLamG- und HT1080mG-Zellen. Beim Vergleich der Gentargetingeffizienz von rAAV-Kombi- und Einfachvektoren konnte beobachtet werden, dass mit zwei Einfachvektoren (rAAV-SceI und rAAV-Donor D- δ GFPiN) eine signifikant geringere Gentargetingfrequenz von 25% erreicht wurde, als mit einem rAAV-Kombivektor (Abb. 19 C) ($P < 0,005$), was auf eine Absättigung der AAV-Rezeptoren zurückgeführt werden könnte. Für die Berechnung des P-Wertes wurden die 10-Tage-Werte der EGFP-positiven Zellen beider Ansätze miteinander verglichen.

4.2 rAAV-vermitteltes Gentargeting mit Zinkfingernukleasen

4.2.1 Titration und Kinetik des ZFN-stimulierten Gentargetings

Im Hinblick auf zukünftige klinische Anwendungen eines rAAV-vermittelten Gentargeting-Systems ist der Einsatz der I-SceI-Endonuklease für die Stimulation der HR limitiert, da eine Erkennungssequenz für I-SceI im menschlichen Genom sehr selten vorkommt. Zinkfingernukleasen, die speziell für jede Zielsequenz konstruiert werden können, stellen demnach eine gute Alternative dar.

In Transfektionsexperimenten wurde gezeigt, dass spezifisch schneidende ZFNs zu einer Erhöhung der Gentargetingfrequenz führten. Jedoch ist nicht jede Zelllinie bzw. jedes Gewebe für eine Transfektion geeignet. AAV2-Vektoren können sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen infizieren und sind daher gut geeignet, um ZFNs in die Zelle zu schleusen. Die verwendeten ZFNs GZF1-N.KV und GZF3-N.EA wurden zuvor durch Mutationen in der FokI-Domäne (171) und weiteren Veränderungen (4) optimiert (Kapitel 1.1.1).

Für die Kinetikstudien wurden U2OS-L δ G-Zellen und U2OSmG-Zellen mit verschiedenen Mengen der zwei rAAV-ZFNs und des rAAV-Donors infiziert (Abb. 17) und im Abstand von 7 Tagen über einen Beobachtungszeitraum von 24 Tagen ausgewertet.

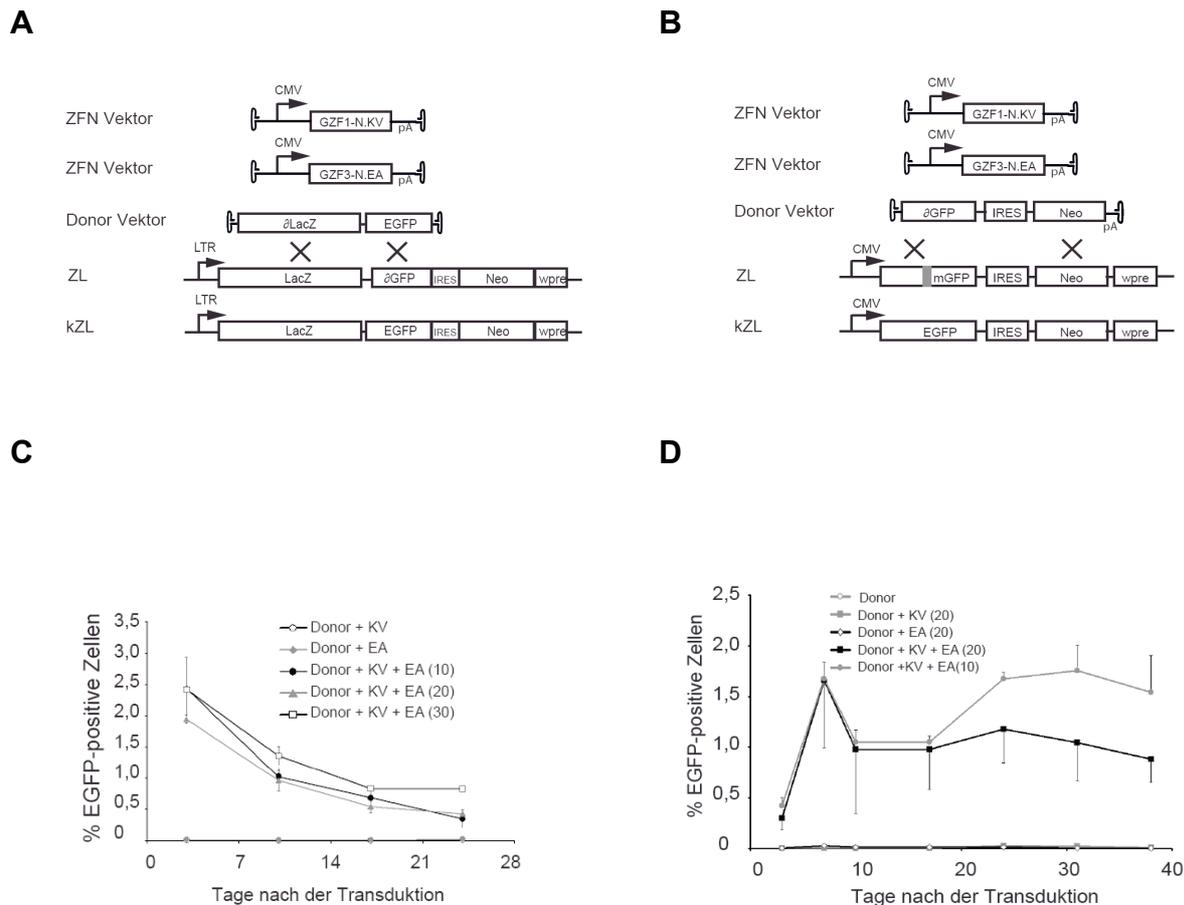


Abb. 20: Kinetik des ZFN-stimulierten Gentargetings

(A, B) Schema der Zielloki des Gentargeting-Systems „L Δ G“ (A) und „mG“ (B) sowie der rAAV-Vektoren für das ZFN-stimulierte Gentargeting. Die Homologe Rekombination zwischen dem mutierten Ziellokus (ZL) und dem rAAV-Donor ist in Form von Kreuzen dargestellt. (C, D) Kinetik in U2OS-L Δ G-Zellen (C) und U2OSmG-Zellen (D). Die Graphen repräsentieren die Anzahl der EGFP-positiven Zellen über einen Zeitraum von 24 Tagen (C) bzw. 38 Tagen (D). Die Zellen wurden mit steigenden Mengen an rAAV-GZF1-N.KV und rAAV-GZF3-N.EA infiziert und wöchentlich mittels Durchflusszytometrie analysiert (n=3). Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. CMV, Promotor des Zytomegalievirus; D, Donorvektor; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; kZL, korrigierter Ziellokus Neo, Neomycin-Phosphotransferase-Gen; pA, Poly-A-Sequenz; SV40, Promotor des Simianen Virus 40; wpre, posttranskriptionelles Element aus dem *Woodchuck* Hepatitis-Virus.

Mit den rAAV-ZFNs wurde eine maximale Gentargetingfrequenz von 2,5% am 3. Tag nach der Transduktion erreicht, wobei steigende Mengen an rAAV-ZFNs zu keiner weiteren Erhöhung der Gentargetingfrequenz führten (Abb. 20 C und D). Innerhalb der ersten 14 Tage konnte eine Abnahme der EGFP-positiven Zellen beobachtet werden. Anschließend stellte sich ein konstantes Niveau bei 1% ein (Abb. 20 C).

4.2.2 Nachweis des korrigierten *egfp*-Gens auf Genomebene

Für den Nachweis des korrigierten *egfp*-Gens auf Genomebene wurden PCR-Analysen durchgeführt. Dafür wurden 300 ng genomische DNA aus U2OSmG-Zellen (38. Tag nach der rAAV-Transduktion) eingesetzt, die zuvor mit 1×10^4 gp rAAV-Vektor infiziert wurden.

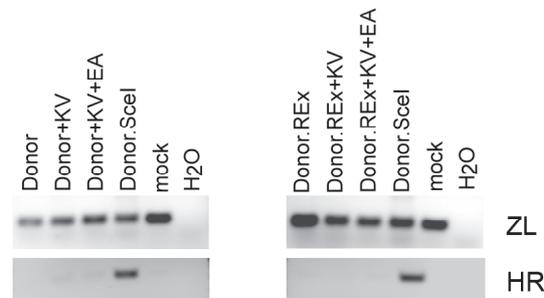


Abb. 21: Nachweis des korrigierten *egfp*-Gens mittels PCR auf genomischer Ebene

Für die PCR wurde genomische DNA aus U2OSmG-Zellen verwendet, die mit 1×10^4 gp rAAV.GZF1-N.KV, rAAV.GZF3-N.EA und rAAV-Donor pro Zelle infiziert wurden. Als Positivkontrolle wurde rAAV-Donor.SceI verwendet. Die DNA wurde am 38. Tag nach der Transduktion isoliert. Für die PCRs wurden 300 ng genomische DNA eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde genomische DNA aus nicht infizierten U2OSmG-Zellen (mock) verwendet. Für den Nachweis der HR wurden die schwarzen Primerpaare (#136/#559, #361/#559, Abb. 28) eingesetzt. Als Kontrolle wurde die Anzahl der gesamten Zielloki (ZL) über das rote Primerpaar #361/#237 (Abb. 28) nachgewiesen. Zusätzlich wurde DNA aus nicht-infizierten Zellen („mock“) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt.

Mit Hilfe der PCR-Analyse ließ sich ausschließlich die Korrektur des mutierten Gens in Gegenwart der I-SceI-Endonuklease nachweisen (Abb. 21). Für den Nachweis des Gentargetings mit Hilfe von rAAV-ZFNs konnte kein spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen werden, da die Gentargetingfrequenz in diesen Ansätzen mit 1% unter der PCR-Nachweisgrenze lag.

4.2.3 Expressionsanalyse der ZFNs nach rAAV-Transduktion

Aufgrund der niedrigen Gentargetingfrequenzen des ZFN-stimulierten Gentargetings wurde eine Expressionsanalyse der rAAV-ZFNs durchgeführt. Dahinter stand die Vermutung, die Konzentration der ZFNs könnte für das Gentargeting zu niedrig sein.

Für die Expressionsanalyse der rAAV-ZFNs wurden U2OSmG-Zelle mit 1×10^4 gp rAAV pro Zelle infiziert und am 3. Tag nach der Infektion geerntet. Als Kontrolle wurden gleiche Mengen an rAAV-SceI appliziert.

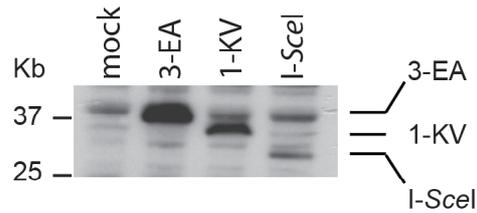


Abb. 22: Expressionsanalyse der ZFNs nach rAAV-Transduktion

Für die Expressionsanalyse der ZFNs wurden U2OSmG-Zellen mit 1×10^4 gp an ssAAV-SceI, rAAV-GZF1-N.KV und rAAV-GZF3-N.EA pro Zelle infiziert und am 3. Tag nach der Transduktion geerntet. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte U2OSmG-Zellen („mock“) geerntet. Pro Spur wurden 100 μ g Proteinlysate eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines HA-spezifischen Primärantikörpers.

Mit Hilfe der Westernblot-Analysen konnte die Expression der ZFNs in rAAV-transduzierten U2OSmG-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 22). Dabei unterschieden sich die Expressionsstärken der ZFNs voneinander. Für GZF3-N.EA konnte eine stärkere Expression nachgewiesen werden als für GZF1-N.KV. Zudem wurde ein Größenunterschied zwischen den beiden ZFNs beobachtet, der bereits in früheren Studien beobachtet wurde (171). Als Kontrolle wurde die rAAV-SceI Endonuklease nachgewiesen. Das Proteinlysate aus nicht infizierten Zellen diente als Kontrolle.

4.2.4 Feineinstellung der rAAV-ZFN Dosis für das ZFN-stimulierte Gtargeting

Aufgrund der Beobachtung, dass die ZFNs nach der Infektion in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen in der Zelle vorlagen, wurde eine Feineinstellung der ZFNs-Mengen in Form einer Titrationsanalyse vorgenommen.

Dafür wurden die U2OSmG-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an rAAV-GZF1-N.KV und rAAV-GZF3-N.EA sowie rAAV. Δ GFPiN infiziert und am 10. Tag nach der Transduktion mittels Durchflusszytometrie analysiert.

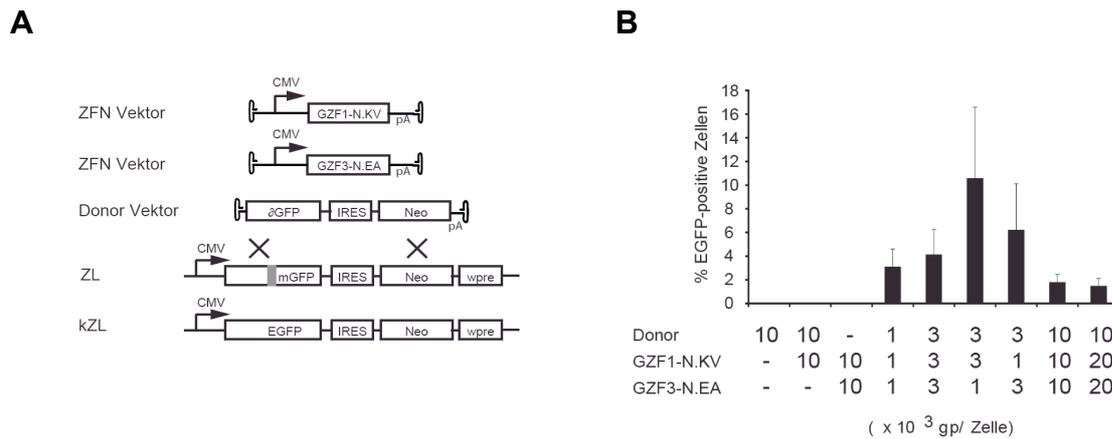


Abb. 23: Titration der rAAV-ZFNs für das ZFN-stimulierte Gentergeting

(A) Schema des Ziellokus und der rAAV-Vektoren für das ZFN-stimulierte Gentergeting. Die Homologe Rekombination zwischen dem mutierten Ziellokus (ZL) und dem rAAV-Donor ist in Form von Kreuzen dargestellt. (B) Titration der rAAV-ZFNs in U2OSmG-Zellen. Die Balken repräsentieren die Anzahl der EGFP-positiven Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Mengen an rAAV.GZF1-N.KV und rAAV.GZF3-N.EA und rAAV- Δ GFPiN infiziert und am 10. Tag nach der Infektion mittels Durchflusszytometrie analysiert ($n=3$). Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben. CMV, Promotor des Zytomegalievirus; kZL, korrigierter Ziellokus; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; Neo, Neomycin-Phosphotransferase-Gen; pA, Poly-A-Sequenz; SV40, Promotor des Simianen Virus 40; wpre, posttranskriptionelles Element aus dem *Woodchuck* Hepatitis-Virus.

Bei einem Verhältnis der rAAV-ZFNs Mengen von 3:1 zwischen rAAV.GZF1-N.KV und rAAV.GZF3-N.EA wurde die höchste Gentergetingfrequenz von 10% erreicht (Abb. 23 B). Bei einem umgekehrten Verhältnis von 1:3 zwischen rAAV-GZF1-N.KV und rAAV-GZF3-N.EA wurden 6% der Zellen korrigiert. Gleiche rAAV-ZFN Mengen von 1×10^3 gp pro Zelle erzielten Gentergetingfrequenzen von 3%, während gleiche rAAV-ZFN Mengen von 3×10^3 gp pro Zelle zu 4% EGFP-positiven Zellen führten. Bei einer Erhöhung der rAAV-ZFN Vektordosis auf 2×10^4 gp pro Zelle wurden niedrigere Gentergetingfrequenzen von 1,5% erreicht (Abb. 23 B), was auf ein zytotoxisches Problem der ZFNs hinweist.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass sowohl die Menge als auch das Mengenverhältnis der rAAV-ZFNs entscheidend für das ZFNs-stimulierte Gentergeting waren. Dabei führten hohe rAAV-ZFNs Vektordosen von $\geq 1 \times 10^4$ gp pro Zelle zu einer Abnahme der Gentergetingfrequenz.

4.3 Chancen/Risiko-Analyse des rAAV-vermittelten Gentargetings

4.3.1 Bestimmung der *Targeting Ratio* mittels Durchflusszytometrie

Um eine Aussage über das Verhältnis zwischen der Korrektur des Gens und der rAAV-Zufallsintegration treffen zu können, wurde die *Targeting Ratio* als ein Chancen/Risiko-Faktor berechnet. Dieser Faktor lässt sich als Quotient aus der Anzahl der EGFP-positiven Zellen (Gentargeting) und der Anzahl der REx-positiven Zellen (zufällige Integration) am 36. Tag nach der rAAV-Transduktion der U2OS-L δ G-Zellen darstellen. Die verschiedenen Zielzellen wurden mit jeweils 1×10^4 gp von rAAV-Scel und rAAV-Donor pro Zelle infiziert und mittels der Durchflusszytometrie analysiert.

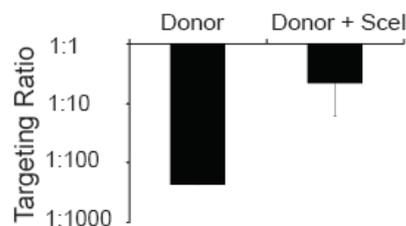


Abb. 24: Durchflusszytometrische Bestimmung der *Targeting Ratio* für die U2OS-L δ G-Zellen

Für die Berechnung der *Targeting Ratio* (EGFP-positive Zellen/REx-positive Zellen) wurden die Daten der Durchflusszytometrie am 36. Tag verwendet. Die Zellen wurden mit 10,000 gp rAAV/Zelle infiziert ($n=3$). Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Für den Ansatz mit dem Donorvektor wurde eine *Targeting Ratio* von 1:230 ermittelt (Abb. 24 A). Das bedeutet, dass ein Korrekturereignis pro 230 Zufallsintegrationsereignissen auftrat. In Gegenwart eines I-Scel-induzierten DSB wurde das Verhältnis zu Gunsten des Gentargetings auf 1:5 verbessert (Abb. 24).

4.3.2 Bestimmung der *Targeting Ratio* mittels Allel-spezifischer *real-time* PCRs

Mittels der phänotypischen Analyse der rAAV-transduzierten Zellen wurde eine Aussage über das Verhältnis eines Gentargetingereignisses gegenüber einer zufälligen rAAV-Integration getroffen. Um die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Daten auf Genomebene zu bestätigen, wurden Allel-spezifische *real-time* PCRs entwickelt, mit der das Verhältnis zwischen einer zufälligen Integration und einem Gentargetingereignis quantitativ bestimmt werden konnte (Abb. 25).

Für den Nachweis der Gesamtanzahl der Zielloki (ZL) wurde das Primerpaar #384/#385 (blau) verwendet. Für die Detektion des korrigierten Ziellokus (kZL) wurde eine *nested* PCR etabliert. In der ersten äußeren PCR wurde das Primerpaar #386/#377 (grün) benutzt, wobei der Primer #377 spezifisch für den korrigierten Bereich des *egfp*-Gens war. Der Primer #386 detektierte ausschließlich das 5'-Ende des *lacZ*-Gens, das im Donorvektor nicht vorhanden war. Durch die Wahl dieses Primerpaares wurde eine unspezifische Amplifikation des Donorvektors und des nicht korrigierten ZL ausgeschlossen. Aufgrund der Größe des PCR-Produkts von 2 kb, konnte diese äußere PCR nicht für die anschließende Quantifizierung im LightCycler verwendet werden. Aus diesem Grund wurde für die *real-time* PCR das blaue Primerpaar verwendet, dessen Produkt bei circa 120 bp lag. Zufällige Integrationen des Donorvektors wurden mit dem Primerpaar #369/#370 (rot), welches das Reporter-gen REx detektierte, nachgewiesen.

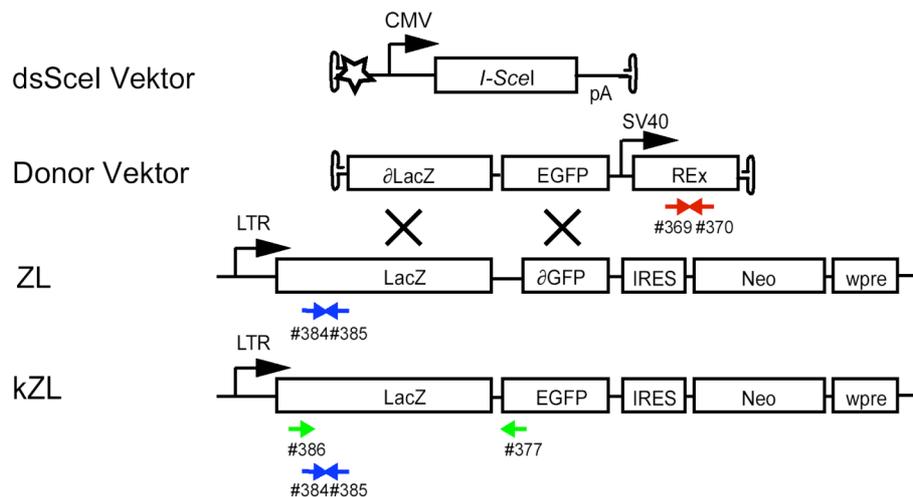


Abb. 25: Position und Orientierung der Primer des rAAV-vermittelten Genterging-Systems "L δ G"

Die in den PCRs eingesetzten Primer sind als Pfeile dargestellt. Die PCRs sind durch verschiedene Farben der Pfeile gekennzeichnet. Für den Nachweis zufälliger Integrationen von rAAV wurde das rote Primerpaar verwendet. Der kZL wurde über eine *nested* PCR nachgewiesen (1. PCR: grün, 2. PCR: blau). Für den Nachweis des ZL wurde das blaue Primerpaar verwendet. Die Homologe Rekombination zwischen dem mutierten Ziellokus (ZL) und dem rAAV-Donor ist in Form von Kreuzen dargestellt. Der Stern markiert die Deletion innerhalb der ITR des rAAV-SceI Vektors. CMV, Promotor des Zytomegalievirus; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; kZL, korrigierter Ziellokus; LTR, *long terminal repeat* des Maus-Leukämie Virus; Neo, Neomycin-Phosphotransferase-Gen; pA, Poly-A-Sequenz, SV40, Promotor des Simianen Virus 40; wpre, posttranskriptionelles Element aus dem *Woodchuck* Hepatitis-Virus.

Anhand der *real-time* PCR Daten wurde die *Targeting Ratio* für den Genotyp der rAAV-transduzierten U2OS-L δ G-Zellen bestimmt. Dafür wurde die ermittelte Kopienzahl der Korrekturereignisse (kZL) bzw. Integrationsereignisse (REx) auf die Gesamtkopienzahl der Zielloki (ZL) in 100 ng bezogen. Anschließend wurde der Quotient aus kZL/ZL (Gentargeting) und REx/ZL (Integration) gebildet.

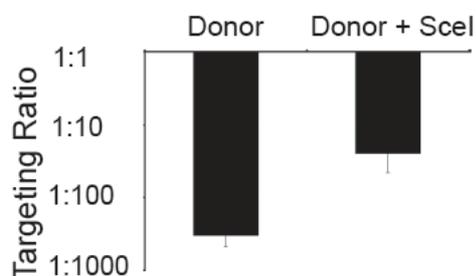


Abb. 26: Targeting Ratio des Genotyps in U2OS-L δ G-Zellen

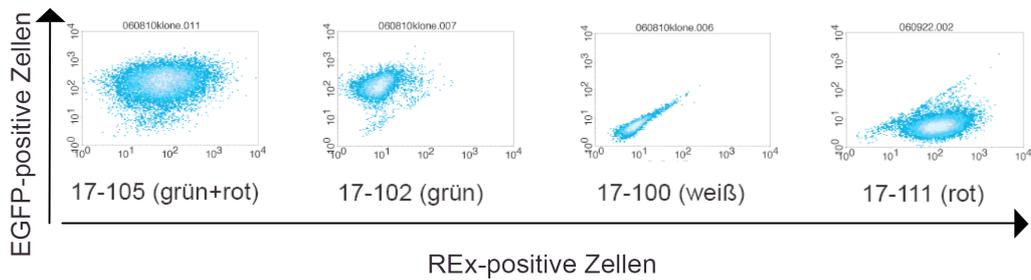
Die Balken repräsentieren die *Targeting Ratio* (Quotient aus kZL/ZL und REx/ZL) für den Genotyp der rAAV-transduzierten U2OS-L δ G-Zellen, die logarithmisch dargestellt sind. Für die *real-time* PCRs wurde 100 ng genomische DNA vom 38. Tag nach der Infektion eingesetzt (n=3). Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Für diese PCR-Analysen wurde ausschließlich genomische DNA aus U2OS-L δ G-Zellen verwendet, da in den HEK293-L δ G-Zellen die Anzahl der REx-Gene als Indikator für die zufällige Integration des rAAV-Vektors aus Sensitivitätsgründen nicht bestimmt werden konnte. Dies kann auf die geringe Anzahl der REx-positiven Zellen zurückgeführt werden, die zum Zeitpunkt der DNA-Isolierung unter 0,5% lag. Aufgrund dieser Beobachtung konnte somit eine untere Detektionsgrenze für den Nachweis von rAAV-Integrationen festgelegt werden. In den U2OS-L δ G-Zellen dagegen lag die Anzahl der REx-positiven Zellen am Tag der DNA-Isolierung bei 40%, die mittels *real-time* PCR verifiziert wurde. Die *Targeting Ratio*, die für den Genotyp ermittelt wurde, lag für den Ansatz mit dem rAAV-Donor bei 1:330, d.h. ein Korrekturereignis pro 330 Zufallsintegrationen. Durch einen I-*Scel*-induzierten DSB wurde das Verhältnis auf 1:25 verbessert (Abb. 26). Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass mittels der etablierten *real-time* PCRs die Daten des Phänotyps der U2OS-L δ G-Zellen auf Genomebene bestätigt wurden.

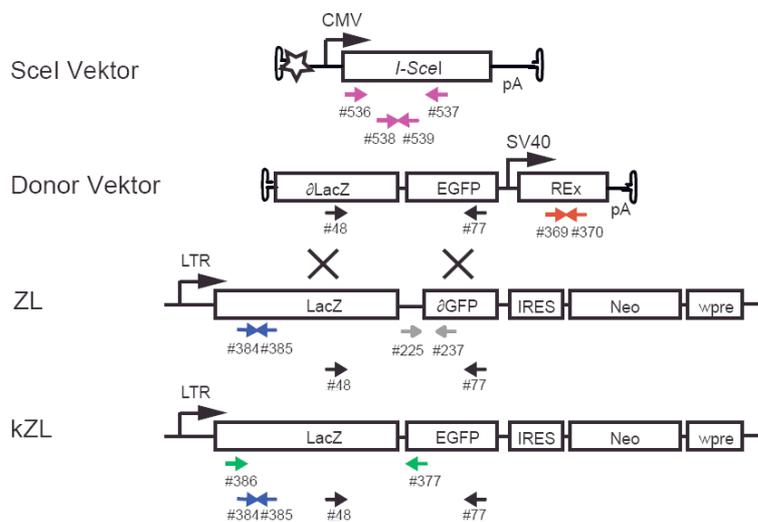
4.3.3 Genotypisierung von U2OS-L δ G-Klonen

Zusätzlich zu der *real-time* PCR Analyse wurden die rAAV-transduzierten Zellen auf klonaler Ebene mittels herkömmlicher *blockcycler* PCRs genotypisiert. Dadurch sollten die in den *real-time* PCRs ermittelten Daten auf Einzelklonebene bestätigt werden. Zudem stellte sich die Frage, ob und wie häufig ein Integrations- und Gtargetingereignis in ein und derselben Zelle stattfand. Für diese Untersuchungen wurden die transduzierten U2OS-L δ G-Zellen im Anschluss an die Kinetikstudien (36 Tage nach der Transduktion) klonal kultiviert (Kapitel 3.1.4) und vor der Isolierung der genomischen DNA im Durchflusszytometer untersucht. Für die PCR-Analysen wurden nur phänotypisch eindeutige Klone verwendet (Abb. 27 A). Jeder Klon wurde mittels verschiedener Detektions-PCRs untersucht. Zufällige Integrationsereignisse wurden über die Detektion der REx-Kassette (#369/#370, rot) und des I-*SceI*-Gens (1. PCR: #536/#537, 2. PCR #538/#539, violett) nachgewiesen. Der Nachweis von HR-Ereignissen erfolgte über das Primerpaar #386/#377 (grün), wobei der Primer #377 ausschließlich das 5'-Ende des *egfp*-Gens detektierte. Der nicht korrigierte Ziellokus (ZL) wurde über die Primer #225/#237 (grau) nachgewiesen, wobei der Primer #225 die I-*SceI*-Schnittstelle zwischen dem *lacZ*-Gen und dem *egfp*-Gen detektierte. Eine Detektion des Donorvektors konnte somit ausgeschlossen werden. Mit der Kontroll-PCR (#48/#77, schwarz) wurde die Gesamtheit der LacZ-GFP-Kassetten detektiert. Die Lage und Orientierung der beschriebenen Primerpaare sind in der Abbildung 27 B nochmals schematisch dargestellt.

A



B



C

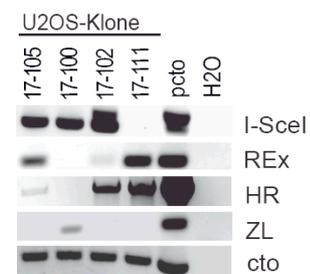


Abb. 27: Geno- und Phänotypisierung der U2OS-L Δ G-Klone

(A) Phänotypische Analyse der U2OS-L Δ G-Klone im Durchflusszytometer. Die X-Achse repräsentiert die Anzahl der REX-positiven Zellen und die Y-Achse die Anzahl der EGFP-positiven Zellen. Der Phänotyp des jeweiligen Klons ist in Klammern angegeben. (B) Schematische Darstellung der Position und Orientierung der Primerpaare (Pfeile). Die Homologe Rekombination ist in Form von Kreuzen dargestellt. Der Stern markiert die Deletion innerhalb der ITR des dsAAV-SceI Vektors. Die verschiedenen Farben der Pfeile kennzeichnen die jeweiligen PCRs. Für den Nachweis von Zufallsintegrationen von rAAV wurden die „rote PCR“ (REX) und die „violette PCR“ (I-SceI) eingesetzt. Der korrigierte Ziellokus (kZL) wurde über die „grüne PCR“ und der Ziellokus (ZL) über die „graue PCR“ nachgewiesen. Als Kontrolle wurde die „schwarze PCR“ eingesetzt. (C) Genotypisierung. Für die PCRs wurden 100 ng genomische DNA aus U2OS-L Δ G-Klonen eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Die nachzuweisende Zielsequenz der jeweiligen PCR ist rechts neben den Gelbildern angegeben, wobei die Kontroll-PCR (cto) die Gesamtanzahl der Zielloki, d.h. korrigierte Zielloki (HR) und nicht korrigierte Zielloki (ZL) angibt. Als Positivkontrolle (pcto) wurde Plasmid-DNA und als Negativkontrolle RNase freies Wasser verwendet. CMV, Promotor des Zytomegalievirus; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; LTR, *long terminal repeat* des Maus-Leukämie Virus; Neo, Neomycin-Phosphotransferase-Gen; pA, Poly-A-Sequenz, SV40, Promotor des Simianen Virus 40; wpre, posttranskriptionelles Element aus dem *Woodchuck* Hepatitis-Virus.

In Tabelle 14 sind Phäno- und Genotyp aller analysierten Klone zusammenfassend aufgeführt. Dabei gibt der Phänotyp die Anzahl der Zellen an, die im Durchflusszytometer identifiziert wurden. Für die genotypische Analyse wurde die zufällige rAAV-Integration des rAAV-Donorvektors über die REx-PCR und die Integration des rAAV-SceI Vektors über die I-SceI-PCR detektiert (Abb. 27 B). Die Korrektur des *egfp*-Gens (HR) wurde anhand der „grünen PCR“ nachgewiesen (Abb. 27 B).

Tab. 14: Zusammenfassung der PCR-Analysen der U2OS-L δ G-Klonen

Phänotyp	Genotyp		
	HR	Rex	I-SceI
grün 	6	1	6
grün-rot 	2	2	2
weiß 	0	3	10
rot 	2	9	7

In allen EGFP-exprimierenden Klonen konnte auf Genomebene das korrigierte *egfp*-Gen nachgewiesen werden (Tab. 14, Abb. 27 C). Zudem konnte in 2 von insgesamt 9 REx-exprimierenden Klonen, deren Phänotyp nicht auf ein erfolgreiches rAAV-vermitteltes Gentargeting schließen ließ, ein korrigierter Ziellokus detektiert werden (Abb. 27 C, Klon 17-111). Diese Beobachtung könnte möglicherweise auf einen stillgelegten LTR-Promotor zurückgeführt werden. Die Mehrheit der analysierten Klone wies eine Zufallsintegration eines rAAV-Vektors auf (Tab. 14), wobei in Klonen, deren Phänotyp nicht auf eine rAAV-Integration hinwies (weiße Klone), auch ein REx-Gen nachgewiesen werden konnte (Tab. 14).

Zusammenfassend ließ sich beobachten, dass mit Hilfe der Einzellklonanalyse die Daten des Phänotyps bezüglich der Gentargetingfrequenz bestätigt wurden. Zusätzlich wurden jedoch auch Zufallsintegrationen in Zellen detektiert, die anhand der phänotypischen Analyse nicht nachgewiesen wurden (Tab. 14, Nachweis der I-SceI-Kassette). Das bedeutet, dass die Anzahl der rAAV-Integrationen unterschätzt wurde.

4.4 Analyse der rAAV-Vektorgenome im Wirtsgenom

4.4.1 Vergleich der rAAV-Integrationsereignisse eines Zwei-Vektor-Systems und eines Ein-Vektor-Systems

Im folgenden Experiment sollten die Gentergeting- und Integrationsereignisse von rAAV-Einfachvektoren mit denen des rAAV-Kombivektors verglichen werden. Der Hintergrundgedanke war, dass durch die Verwendung nur eines rAAV-Vektors (Ein-Vektor-System) die Gentergetingfrequenz verbessert und gleichsam die Integrationsfrequenz von rAAV im Vergleich zu einer Koinfektion (Zwei-Vektor-System) gesenkt werden kann.

Für diese Untersuchungen wurden U2OSmG-Zellen mit 1×10^4 gp von rAAV-Kombivektor bzw. rAAV-Einfachvektoren pro Zelle infiziert und am 38. Tag nach der Transduktion geerntet. Anschließend wurde die isolierte genomische DNA mit Hilfe von Allel-spezifischen *real-time* PCRs quantitativ analysiert.

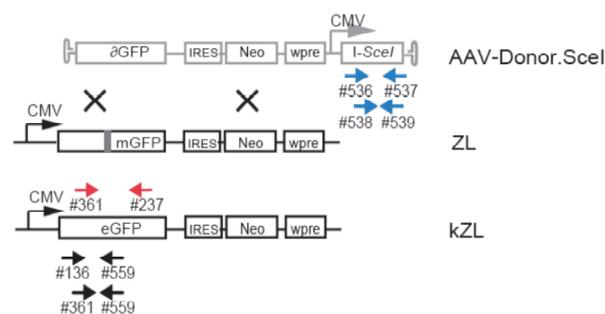


Abb. 28: Genotypische Analyse der rAAV-Integrationen und Gentergetingereignisse des rAAV-Kombivektors

Das Schema stellt die Lage und Orientierung der verwendeten Primerpaare (Pfeile) dar. Die Homologe Rekombination zwischen dem mutierten Ziellokus (ZL) und dem rAAV-Donor ist in Form von Kreuzen dargestellt. Die verschiedenfarbigen Primerpaare repräsentieren die Detektions-PCRs. Für die Detektion der Zufallsintegrationen von rAAV wurden die blauen Primerpaare eingesetzt. Die Gesamtanzahl der HR-Ereignisse wurde mittels der schwarzen Primerpaare bestimmt. Für die Normierung wurde das rote Primerpaar verwendet. Es wurden jeweils 100 ng genomische DNA aus U2OSmG-Zellen (vom 38. Tag nach der Transduktion) in den PCRs eingesetzt. CMV, Promotor des Zytomegalievirus; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; kZL, korrigierter Ziellokus; mGFP, mutiertes *egfp*-Gen; Neo, Neomycin-Phosphotransferase-Gen; wpre, posttranskriptionelles Element aus dem *Woodchuck* Hepatitis-Virus.

Für den Nachweis des Gentergetings erfolgte eine Präamplifikation mittels *blockcycler* PCR (#136/#559). Die anschließende Quantifizierung mittels *real-time* PCR erfolgte mit dem Primerpaar #361/#559 (schwarze PCR). Zufallsintegrationen wurden über die Detektion des SceI-Gens des rAAV-SceI Vektors ebenfalls in einer *nested* PCR nachgewiesen. Die erste PCR erfolgte mit dem Primerpaar #536/#537, die *real-time* PCR wurde mit dem Primerpaar

#538/#539 (blaue PCR) durchgeführt. Für den Nachweis der rAAV-Integrationen am DSB wurde in der ersten PCR der, in *antisense* Orientierung vorliegende, rAAV-Kombivektor über das Primerpaar #136/#538 präamplifiziert. Durch die Verwendung des Primers #136 wurde sichergestellt, dass ausschließlich der 5'-Bereich des *egfp*-Gens im Ziellokus detektiert werden konnte. Dieser Bereich des *egfp*-Gens ist auf dem rAAV-Kombivektor deletiert, so dass eine Amplifikation des rAAV-Vektors nicht erfolgen konnte. Für die quantitative *nested* PCR wurde ein I-*SceI*-spezifisches Primerpaar (#538/#539) verwendet. Die Normierung der PCRs erfolgte mit Hilfe einer PCR, mit der die Gesamtzahl der Zielloki über der Primerpaar #361/#237 bestimmt werden konnte. Für die PCRs wurde jeweils 100 ng genomische DNA aus den U2OSmG-Zellen vom 38. Tag nach der Transduktion eingesetzt. Die Position und Orientierung der Primerpaare sind in der Abbildung 28 schematisch dargestellt.

Tab. 15: Genotypisierung des rAAV-vermittelten Gentergetings in U2OSmG-Zellen

Ansatz	Genkorrektur kZL/ZL (Kopien/100ng)	zufällige Integration SceI /ZL (Kopien/100ng)	<i>Targeting Ratio</i> (kZL/zufällige Integration)
PCR	schwarz/rot	blau/rot	schwarz/blau
rAAV- Donor.SceI	0,41 ± 0,07	0,21 ± 0,13	2,50 ± 1,24
rAAV-SceI + rAAV-Donor	0,09 ± 0,02	0,04 ± 0,01	2,69 ± 1,09
rAAV-SceI	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,08 ± 0,04
rAAV- Donor.REx	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	/

Anhand der in der Tabelle 15 aufgeführten Werte für den korrigierten Ziellokus und die zufälligen Integrationsereignisse, wurde die *Targeting Ratio* für den rAAV-Kombivektor (rAAV-Donor.SceI) sowie für die rAAV-Einzelvektoren (rAAV-SceI und rAAV-Donor) des rAAV-vermittelten Gentergeting-Systems “mG” berechnet. Die Werte stellen Mittelwerte von 3fach gemessenen Mehrfachansätzen (n=3) dar.

Hinsichtlich der *Targeting Ratio* für das Ein-Vektor-System und das Zwei-Vektor-System wurden ähnliche Verhältnisse zwischen der Genkorrektur und der Zufallsintegration von 2,5:1 bzw. 2,7:1 (3:1) bestimmt. Eine Erklärung dafür findet sich bei der Betrachtung der einzelnen Werte für die Genkorrektur und die Zufallsintegration (Tab.15). Dabei war in Gegenwart des rAAV-Kombivektors die Anzahl der korrigierten Zielloki mit 0,4 Kopien des rAAV-Kombivektors pro Ziellokus höher als beim Koinfektionsansatz (0,09 rAAV-Kopien pro Ziellokus). Zudem konnten bei der Analyse der Integrationen des rAAV-Kombivektors mit 0,2 rAAV-Kopien pro Ziellokus mehr rAAV-Integrationen detektiert werden als für das Zwei-Vektor-System mit bis zu 0,04 Kopien des rAAV-SceI Vektors pro Ziellokus. Anhand dieser Werte wird ersichtlich, dass

unter Verwendung eines rAAV-Kombivektors zwar eine höhere Gentergetingfrequenz erzielt wurde als beim Koinfektionsansatz, wobei gleichsam aber auch eine höhere Integrationsfrequenz des rAAV-Kombivektors nachgewiesen werden konnte. Dadurch blieb das Verhältnis zwischen dem Gentergeting und der Zufallsintegration bei beiden Ansätzen (Ein-Vektor-System und Zwei-Vektor-System) unverändert. Da der Nachweis von Zufallsintegrationen ausschließlich über die I-*SceI*-Kassette erfolgte, diente der Donor.REx-Vektor als Kontrolle. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass beide Vektoren, rAAV-*SceI* und rAAV-Donor, mit der gleichen Wahrscheinlichkeit in das Wirtsgenom integrierten. Dies sollte bei der anschließenden Diskussion der Integrationsfrequenzen eines Ein-Vektor-Systems und eines Zwei-Vektor-Systems mit berücksichtigt werden.

Zudem konnte beobachtet werden, dass die Werte der quantitativen *real-time* PCRs im Vergleich zu den Daten der Durchflusszytometrie mit 65% für den rAAV-Kombivektor und 40% für die Koinfektion niedriger waren. Das kann durch eine geringe Sensitivität der *real-time* PCRs erklärt werden. Dennoch konnte unter Berücksichtigung der Fehlerraten (Tab.15) eine gute Übereinstimmung der Daten auf genotypischer- und phänotypischer Ebene festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte bei der Genotypisierung der rAAV-transduzierten U2OSmG-Zellen festgestellt werden, dass die Daten der Durchflusszytometrie durch die quantitativen *real-time* PCRs bestätigt werden konnten. Zudem wurde gezeigt, dass die Gentergeting- und Integrationsfrequenzen beider Ansätze miteinander korrelierten, so dass die *Targeting Ratio* für beide Systeme mit circa 3 Gentergetingereignissen zu einem Zufallsintegrationsereignis nahezu gleich war.

4.4.2 Analyse der rAAV-Integrationsereignisse am I-*SceI*-induzierten DSB

Die Beobachtung einer 5-10fach höheren Integrationsfrequenz des rAAV-Kombivektors im Vergleich zum Zwei-Vektor-System, führte zu der Vermutung, dass die Donorsequenz des rAAV-Kombivektors während der HR eine Integration des rAAV-Vektors in den I-*SceI*-induzierten DSB vermitteln könnte. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe von Sequenzierungsanalysen die I-*SceI*-Schnittstelle im Ziellokus genauer untersucht. Dafür wurde genomische DNA aus U2OSmG-Zellen eingesetzt, die mit dem rAAV-Kombivektor infiziert wurden. Für die Sequenzierung wurde eine Präamplifikation mit Hilfe des Primerpaares #536/#185 durchgeführt, mit dem ausschließlich rAAV-Integrationen am I-*SceI*-induzierten DSB detektiert werden konnten. Die analysierten Klone sind in den folgenden Abbildungen 29 und 30 schematisch dargestellt.

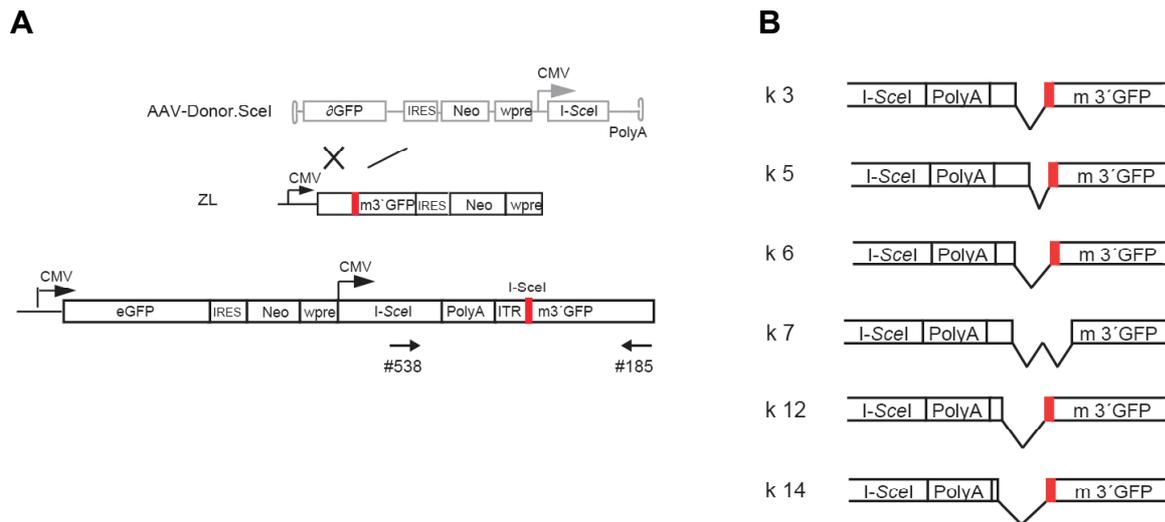


Abb. 29: HR-gekoppelte Integration eines rAAV-Vektors am I-SceI-induzierten DSB

A) Schematische Darstellung der HR-gekoppelten Integration am I-SceI-induzierten DSB. Das Kreuz gibt die Homologe Rekombination zwischen dem Donorvektor und dem Ziellokus an. Der Querstrich repräsentiert die Integration des Donorvektors am DSB. Mittels des Primerpaares #538/#185 (Pfeile) wurden die rAAV-Integrationsstellen am DSB amplifiziert und anschließend sequenziert. Für die PCR wurde genomische DNA aus rAAV-transduzierten U2OSmG-Zellen vom 38. Tag nach der rAAV-Transduktion verwendet (1×10^4 gp rAAV-Kombivektor/Zelle). Für die Sequenzierungsanalyse wurden die PCR-Fragmente anschließend in das Plasmid pJET.blunt2 kloniert. Die Sequenzierung erfolgte ebenfalls mit den Primern #538 und #185. B) Schematische Darstellung der Sequenzierungsklonen (k). Das rote Kästchen gibt die I-SceI-Schnittstelle an. Die Triangel geben die Deletionen innerhalb der ITRs an. CMV, Promotor des Zytomegalievirus; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; mGFP, mutiertes *gfp*-Gen; Neo, Neomycin-Phosphotransferase-Gen; wpre, posttranskriptionelles Element aus dem *Woodchuck* Hepatitis-Virus; ZL, Ziellokus

Mit Hilfe der Sequenzanalysen konnte die Integration von rAAV am I-SceI-induzierten DSB verifiziert werden. Zudem wurden zwei verschiedene Versionen von HR-gekoppelten Integrationen identifiziert, die nach der Infektion mit dem rAAV-Kombivektor am I-SceI-induzierten DSB stattfanden (Abb. 29 und Abb. 30). Beide dieser Ereignisse führten zu einer Korrektur des mutierten *egfp*-Gens. Das in Abbildung 29 dargestellte HR-Ereignis ist mit einer Integration eines rAAV-Kombivektors am I-SceI-induzierten DSB assoziiert. Anhand der schematischen Darstellung der rAAV-Integrationsereignisse (Abb. 29 B) ist zu erkennen, dass die Integrationen des rAAV-Vektors mit Deletionen der ITRs verbunden waren. Weder auf Seiten des Wirtsgenoms noch auf Seiten des rAAV-Vektors konnten dabei Umordnungen der Sequenzen beobachtet werden. Ein Teil der I-SceI-Schnittstelle blieb nach der Integration ebenfalls erhalten (rotes Kästchen).

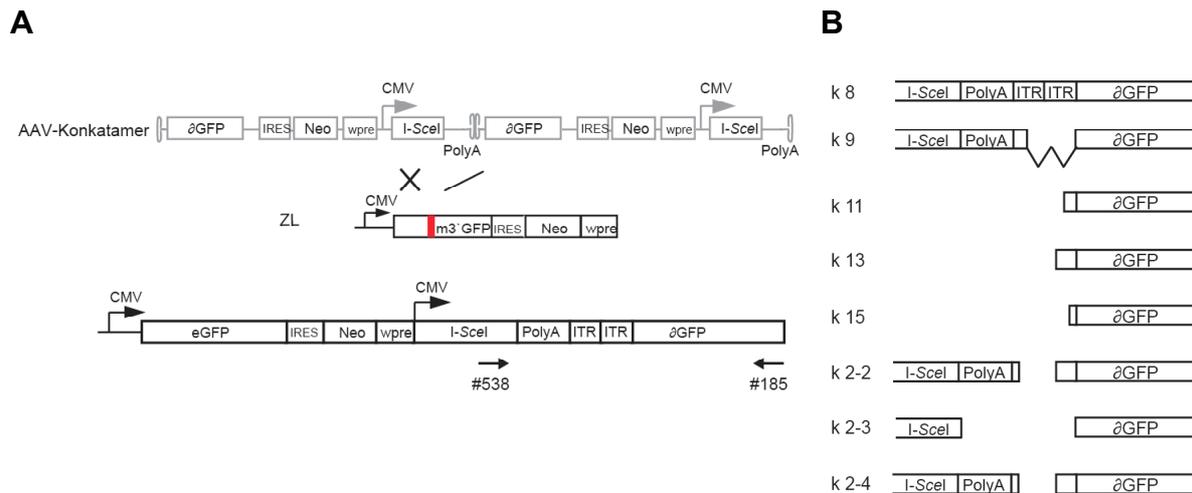


Abb. 30: HR-gekoppelte Integration eines rAAV-Konkatamers am I-SceI-induzierten DSB

A) Schematische Darstellung der HR-gekoppelten Integration am I-SceI-induzierten DSB. Das Kreuz gibt die HR zwischen dem Donorvektor und dem Ziellokus an. Der Querstrich repräsentiert die Integration des rAAV-Konkatamers am DSB. Für die PCRs wurde genomische DNA aus rAAV-transduzierten U2OSmG-Zellen vom 38. Tag nach der rAAV-Transduktion verwendet (1×10^4 gp rAAV-Kombivektor/Zelle). Mittels des Primerpaares #538/#185 wurden die rAAV-Integrationsstellen am DSB amplifiziert, in das Plasmid pJET.blunt2 kloniert und anschließend sequenziert. B) Schema der Sequenzierungskлоне (K). Die Triangel geben die Deletionen innerhalb der ITRs an. CMV, Promotor des Zytomegalievirus; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; LTR, *long terminal repeat* des Maus-Leukämie Virus; mGFP, mutiertes *gfp*-Gen; Neo, Neomycin-Phosphotransferase-Gen; wpre, posttranskriptionelles Element aus dem *Woodchuck* Hepatitis-Virus; ZL, Ziellokus

In der Abbildung 30 ist der zweite Typ der HR-gekoppelten Integration am I-SceI-induzierten DSB schematisch dargestellt. Dieses Ereignis setzt eine Rekombination zwischen den ITRs von zwei oder mehreren rAAV-Kombivektoren und die daraus bedingte Bildung eines rAAV-Konkatamers voraus. Aufgrund der Positionen der Sequenzierungsprimer konnte keine Aussage über das 3'-Ende des DSB gemacht werden.

Anhand der schematischen Darstellung wird deutlich, dass in den meisten Klonen die Sequenzierung, sowohl von der Seite des I-SceI-Gens als auch vom 3'-Ende des *egfp*-Gens, innerhalb der rekombinierten ITRs abbrach.

Anhand der Anzahl der analysierten Klone lässt sich schlussfolgern, dass diese beiden Versionen der HR-gekoppelten Integration am I-SceI-induzierten DSB in gleichen Verhältnissen in den rAAV-transduzierten Zellen auftraten. Eine Quantifizierung dieser Ereignisse war nicht möglich, da kein ausreichend spezifisches Primerpaar konstruiert werden konnte.

4.4.3 *real-time* PCR gestützte Quantifizierung von rAAV-Integrationen am I-SceI-induzierten DSB

Aufgrund des vorherigen Nachweises von rAAV-Integrationen am I-SceI-induzierten DSB, ergab sich die Frage, wie häufig solche Integrationsereignisse während des rAAV-vermittelten Gtargetings in einem Zwei-Vektor-System (rAAV-SceI und rAAV-Donor) und in einem Ein-Vektor-System (rAAV-Kombivektor) auftraten.

Für die Untersuchung des Zwei-Vektor-Systems wurden spezifische PCRs etabliert, die zuerst auf Ebene der *blockcycler* PCR durchgeführt wurden. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung der Integrationsereignisse am I-SceI-induzierten DSB mit Hilfe einer spezifischen *real-time* PCR. Für die PCRs wurde genomische DNA aus U2OS-L Δ G-Zellen eingesetzt, die mit 1×10^4 gp von rAAV-SceI und rAAV-Donor.REx pro Zelle infiziert und am 36. Tag nach der Transduktion geerntet wurden. Die Position und Orientierung der Primerpaare sind in der Abbildung 31 dargestellt.

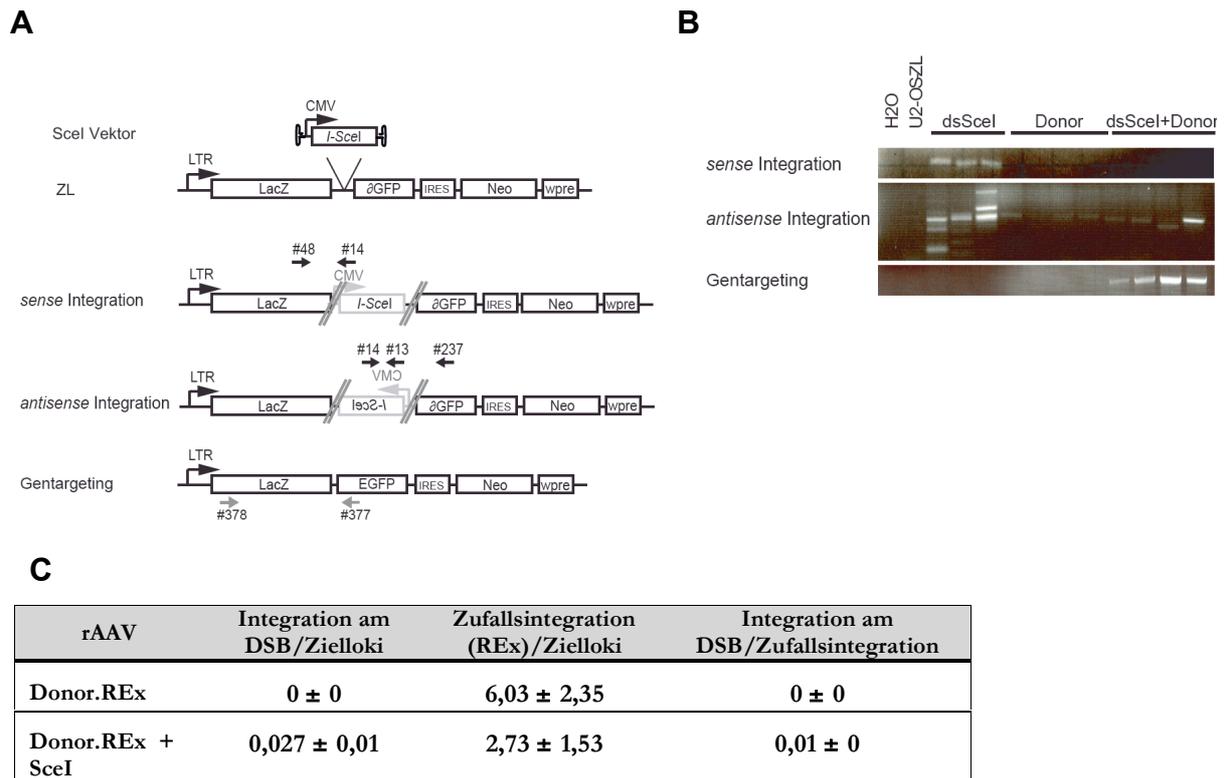


Abb. 31: Nachweis von rAAV-Integrationen am I-ScelI-induzierten DSB des Zwei-Vektor-Systems

A) Schematische Darstellung der Lage und Orientierungen der verwendeten Primerpaare (Pfeile) für die Detektion der *sense* und *antisense* Integrationen sowie der Gentargeting-Ereignisse. Die Querstriche geben die Integration des rAAV-Vektors am I-ScelI-induzierten DSB an. B) *blockcycler* PCRs. Die *sense*-Integration wurde über das Primerpaar #48/#14 und *antisense* Integrationen über das Primerpaar #14/#237 nachgewiesen. Der Nachweis des Gentargetings erfolgte mit dem Primerpaar #378/377. Für die PCRs wurde 300 ng genomische DNA aus U2OS-L δ G-Zellen eingesetzt, die mit 10,000 gp von rAAV-ScelI und rAAV-Donor.REx infiziert wurden. Die Ernte der DNA erfolgte am 36. Tag nach der rAAV-Transduktion. Als Negativkontrolle wurde genomische DNA aus nicht infizierten U2OS-L δ G-Zellen und RNase freies Wasser verwendet. C) Quantitative Analyse der Integration des rAAV-ScelI Vektors am DSB. Für die *real-time* PCR (#13/#14) wurde 100 ng genomische DNA eingesetzt, die in einer vorgeschalteten *blockcycler* PCR präamplifiziert wurde (#14/#237) (n=4). Die Anzahl der Zufallsintegrationen bzw. Integrationen am DSB wurde mit der Anzahl der Zielloki (blaue PCR, Abb. 27) verrechnet. CMV, Promotor des Zytomegalievirus; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; LTR, *long terminal repeat* des Maus-Leukämie Virus; Neo, Neomycin-Phosphotransferase-Gen; wpre, posttranskriptionelles Element aus dem *Woodchuck* Hepatitis-Virus; ZL, Ziellokus.

Mit Hilfe der spezifischen Primerpaare konnten sowohl rAAV-Integrationen am DSB in *sense* Orientierung (#48/#14) als auch in *antisense* Orientierung (#14/#237) nachgewiesen werden (Abb. 31 B). Dabei wurde ausschließlich die Integration des rAAV-ScelI Vektors nachgewiesen. Für den Nachweis des integrierten rAAV-Donors konnte keine ausreichend spezifisches Primerpaar konstruiert werden. Bei der Analyse wurden in einigen Ansätzen PCR-Fragmente unterschiedlicher Größe nachgewiesen. Dies könnte durch eine Integration mehrerer rAAV-Genome am DSB erklärt werden. Zusätzlich wurde in den Ansätzen mit rAAV-ScelI und rAAV-Donor die Korrektur des deletierten *egfp*-Gens nachgewiesen (Abb. 31 B, Gentargeting).

Die quantitative Analyse erfolgte ausschließlich für die *antisense* Orientierung, wobei eine zusätzliche *nested* PCR im LightCycler durchgeführt wurde. Für die Analyse wurde 100 ng genomische DNA aus U2OS-L δ G-Zellen eingesetzt. Diese wurden mit 1×10^4 gp von rAAV-SceI und rAAV-Donor.REx pro Zelle infiziert und am 36. Tag nach der Transduktion geerntet (n=4). In der ersten PCR wurde der, in *antisense* Orientierung integrierte rAAV-SceI Vektor über das Primerpaar #14/#237 präamplifiziert. Die quantitative *nested* PCR erfolgte anschließend über das Primerpaar #13/#14, das den CMV-Promotor des rAAV-Vektors detektierte. Die Kopienzahlen der *antisense* Integrationen am I-SceI-induzierten DSB wurden normiert auf die Anzahl der gesamten Zielloki (Abb. 27, blaue PCR). Dabei konnten 0,027 rAAV-Kopien pro Ziellokus berechnet werden (Abb. 31 C). Infektionsansätze, in denen ausschließlich der rAAV-Donor verwendet wurde, waren, wie erwartet, in der PCR negativ. Für die Berechnung der Integrationen am I-SceI-induzierten DSB wurde die Kopienzahl der Integration am DSB durch die Kopienzahl der Zufallsintegrationen dividiert. Pro 1000 Zufallsintegrationen traten 10 Integrationen am I-SceI-induzierten DSB auf (0,01 Kopien/Zufallsintegration). Das bedeutet, dass die Mehrheit der rAAV-Integrationen nicht am I-SceI-induzierten DSB erfolgte.

Im weiteren Verlauf der Genotypisierung wurden die Integrationen des rAAV-Kombivektors am I-SceI-induzierten DSB quantitativ bestimmt. Für die *real-time* PCR wurden 100 ng genomische DNA aus U2OSmG-Zellen eingesetzt, die mit 1×10^4 gp von rAAV-Donor.SceI bzw. rAAV-Donor.REx pro Zelle infiziert und am 38. Tag nach der Transduktion geerntet wurden. Die Position und Orientierung der Primerpaare sind in der Abbildung 32 dargestellt.

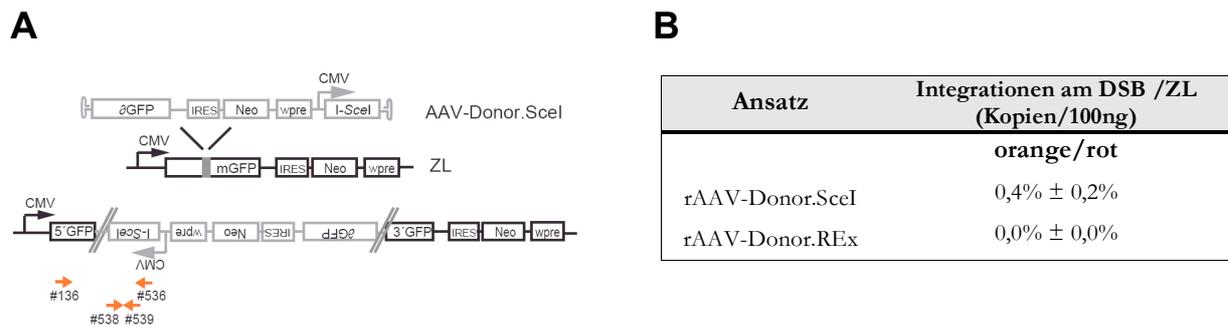


Abb. 32: Nachweis von rAAV-Integrationen am I-SceI-induzierten DSB des Ein-Vektor-Systems

A) Schematische Darstellung der Lage und Orientierungen der verwendeten Primerpaare (Pfeile) für die Detektion der Integrationen am DSB. Die Querstriche geben die Integrationsstellen des rAAV-Vektors am I-SceI-induzierten DSB an. Die Primerpaare der PCRs sind als Pfeile dargestellt. B) Quantitative Analyse der Integration von rAAV-Donor.SceI am I-SceI-induzierten DSB. Für die *real-time* PCR (#538/#539) wurde 100 ng genomische DNA eingesetzt, die in einer vorgeschalteten *blockcycler* PCR präamplifiziert wurde (#136/#536) (n=3). Die Anzahl der Integrationen wurde mit der Anzahl der Zielloki (rote PCR, Abb. 28) verrechnet. CMV, Promotor des Zytomegalievirus; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; mGFP, mutiertes *egfp*-Gen; Neo, Neomycin-Phosphotransferase-Gen; wpre, posttranskriptionelles Element aus dem *Woodchuck* Hepatitis-Virus; ZL, Ziellokus.

Mit Hilfe der Primerpaare #136/#536 und #538/#539 (orangefarbene Primerpaare) wurden *antisense* Integrationsereignisse des rAAV-Kombivektors am I-SceI-induzierten DSB nachgewiesen. Der Primer #136 wurde so gewählt, dass ausschließlich das 5'-Ende des *egfp*-Gens im Ziellokus nachgewiesen werden konnte, da dieser Sequenzbereich im rAAV-Kombivektor deletiert wurde. Der Nachweis von *sense* Integrationen des rAAV-Kombivektors erwies sich als nicht ausführbar, da in diesem Fall eine Detektion von integrierten rAAV-Konkatameren (mehrere miteinander verbundene AAV-Genome) nicht ausgeschlossen werden konnte. Anhand der *real-time* PCR Daten (Abb. 32 B) ist zu erkennen, dass 0,4% der rAAV-Kombivektoren am I-SceI-induzierten DSB in *antisense* Orientierung integrierten. Für den Donorvektor rAAV-Donor.Rex, der als Negativkontrolle verwendet wurde, war die I-SceI-spezifische PCR negativ. Aufgrund nicht ausreichend spezifischer Primer konnte jedoch keine Quantifizierung der Integration des rAAV-Kombivektors in *sense* Orientierung gemacht werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Integrationsfrequenz des rAAV-Kombivektors am I-SceI-induzierten DSB höher war als die des rAAV-SceI-Vektors im Zwei-Vektor-System. In beiden Systemen war die Integrationsfrequenz am I-SceI-induzierten DSB niedriger als die Frequenz der Zufallsintegrationen, was darauf hindeutet, dass die Mehrheit der rAAV-Integrationen nicht am I-SceI-induzierten DSB erfolgte.

5 Diskussion

Das rAAV-vermittelte Gentergeting ermöglicht die Korrektur eines mutierten Gens direkt an seinem Genlokus im Genom. Dabei wird ein in der Zelle natürlich auftretender Mechanismus, die Homologe Rekombination, ausgenutzt. In dieser Arbeit wurden die korrekten homologen Sequenzen mit Hilfe von rAAV2-Vektoren in die Zelle geschleust. Parameter, wie die Architektur des rAAV-Vektors, die rAAV-Dosis sowie die verwendete Zelllinie können dabei einen Einfluss auf die Gentergetingfrequenz haben.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher ein rAAV-vermitteltes Gentergeting-System als Modellsystem für die Korrektur eines mutierten *egfp*-Gens etabliert, um den Einfluss dieser Parameter auf die Gentergetingfrequenz einfach und quantitativ zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Gentergetingfrequenz abhängig von der verwendeten Zelllinie, der rAAV-Vektordosis sowie der Architektur des rAAV-Vektors war. Um die Gentergetingfrequenz zu erhöhen, wurde ein DSB mit Hilfe der *homing* Endonuklease I-*SceI* am Ort der Mutation eingeführt. Dabei konnten mit einem rAAV-Kombivektor 65% der Zellen korrigiert werden im Vergleich zu einer Koinfektion mit zwei Vektoren, bei der bis zu 25% der Zellen korrigiert wurden. Im Hinblick auf zukünftige klinische Anwendungen des rAAV-vermittelten Gentergetings, wurden künstliche ZFN eingesetzt, die im Gegensatz zu der Endonuklease I-*SceI*, spezifisch für jede mutierte Sequenz konstruiert werden können. Durch den Einsatz von rAAV-ZFNs konnte das mutierte *egfp*-Gen in bis zu 10% der Zellen korrigiert werden.

Während des rAAV-vermittelten Gentergetings kann ein rAAV-Vektor zufällig in das Wirtsgenom der Zelle integrieren. Um eine Aussage über das Verhältnis des Gentergetings versus der Zufallsintegrationen von rAAV treffen zu können, wurde im zweiten Teil der Arbeit die *Targeting Ratio* als ein Chancen/Risiko-Faktor auf phänotypischer und genotypischer Ebene bestimmt. Dabei wurde die *Targeting Ratio* durch einen I-*SceI*-induzierten DSB zu Gunsten des Gentergetings verbessert. Die genotypische Analyse mittels Allel-spezifischer *real-time* PCRs bestätigte die phänotypische Analyse. Zudem konnten neben Zufallsintegrationen der rAAV-Vektoren auch Integrationen am I-*SceI*-induzierten DSB nachgewiesen werden.

5.1 Optimierung des rAAV-vermittelten Gentergetings

Das rAAV-vermittelte Gentergeting wurde erstmals in zwei Systemen unabhängig voneinander gezeigt. In dem einen System wurde ein in humanen Zellen integriert vorliegendes *neo*-Gen als mutierte Zielsequenz benutzt, dessen Korrektur über G418-resistente Klone nach erfolgreicher HR mit dem rAAV-Donorvektor gemessen werden konnte (75). Im zweiten Ansatz wurde keine Korrektur sondern eine Inaktivierung des auf dem X-Chromosom kodierten endogenen *HPRT*-Gens (Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase) durch Deletion von Nukleotiden durchgeführt. Die Selektion der rAAV-transduzierten männlichen XY-Zellen erfolgte mittels des 6-Thioguanins (6-TG) (153). In beiden Systemen wurden Gentergetingfrequenzen zwischen 0,02% und 0,042% erzielt.

In weiteren Studien wurden nicht-selektive Systeme für die Untersuchung des rAAV-vermittelten Gentergetings verwendet. Der Vorteil eines solchen Systems, in dem beispielsweise eine mutiertes *egfp*-Markergen verwendet wird, besteht darin, dass ein Gentergetingereignis unter nicht-selektiven Bedingungen direkt über die EGFP-Expression in der lebenden Zelle mittels Durchflusszytometrie gemessen werden kann. In primären embryonalen Mauszellen (PMEFs) wurden mit 0,006% EGFP-positiven Zellen im Vergleich zu HEK293-Zellen mit 0,1% nur niedrige Gentergetingfrequenzen erreicht (100), was auf die schlechtere Transduktionsfrequenz in den PMEFs-Zellen zurückgeführt werden konnte. Die unterschiedlichen Gentergetingfrequenzen von 0,006% bis 0,042% wiesen darauf hin, dass das rAAV-vermittelte Gentergeting von der rAAV-Vektordosis und den verwendeten Zelllinien abhängig war.

Für die Untersuchung eines rAAV-vermittelten Gentergeting-Systems *in vivo* wurde ein Mausmodell entwickelt. Mit Hilfe eines rAAV2-Vektors, der in die Mäuse injiziert wurde, konnte ein mutiertes *lacZ*-Gen innerhalb des ubiquitär exprimierten *ROSA26*-Genlokus korrigiert werden. Dabei wurden Gentergetingfrequenzen von 2×10^{-5} bis 8×10^{-6} β -Galaktosidase-positiven Hepatozyten/ Leberzelle nachgewiesen (120).

Ähnlich wie in den oben aufgeführten Beispielen, wurde in dieser Arbeit in Gegenwart eines rAAV-Donorvektors allein eine geringe bis gar keine Gentergetingfrequenz nachgewiesen. Das kann dadurch erklärt werden, dass ein HR-Ereignis in humanen Zellen sehr selten ist (1 HR in 10^6 Zellen). Im Hinblick auf zukünftige gentherapeutische Anwendungen eines rAAV-vermittelten Gentergeting-Systems kann jedoch die Höhe der Gentergetingfrequenz entscheidend für den Erfolg der Therapie sein. Eine Selektion der Zellen, die korrigiert wurden, ist jedoch in den meisten Fällen nicht möglich. Das zeigt die Notwendigkeit auf, die Gentergetingfrequenz zu erhöhen ohne dabei auf eine Selektion der Zellen angewiesen zu sein. Um die bisher erzielten

Gentargetingfrequenzen unter Verwendung von rAAV-Vektoren weiter zu verbessern wurde daher in dieser Arbeit eine Optimierung des rAAV-vermittelten Gentargetings vorgenommen.

Durch das Einführen eines I-*SceI*-induzierten DSB am Ort der Mutation konnte bereits mehrfach eine Erhöhung der rAAV-vermittelten Gentargetingfrequenz um ein 60-100faches beobachtet werden (117, 139). In dieser Arbeit konnten in der Gegenwart eines I-*SceI*-induzierten DSB mit den höchsten Vektordosen bis zu 65% der Zielzellen korrigiert werden. Das bedeutet eine 6500fache Erhöhung des rAAV-vermittelten Gentargetings im Vergleich zum nicht stimulierten Gentargeting.

Anhand der Titrationsexperimente konnte zudem eine Abhängigkeit des rAAV-vermittelten Gentargetings von der rAAV-Vektordosis festgestellt werden, wobei steigende Dosen an rAAV-*SceI* zu einer Zunahme der Gentargetingfrequenz führten. In HEK293-Zellen hatte eine Erhöhung der Donorvektordosis einen zusätzlichen stimulierenden Einfluss auf die Gentargetingfrequenz, wohingegen in U2OS-Zellen keine weitere Steigerung der Gentargetingfrequenz beobachtet werden konnte. Diese Beobachtung führte zu folgenden Schlussfolgerungen: Zum einen hat die Vektordosis einen entscheidenden Einfluss auf die Gentargetingfrequenz und zum anderen ist die Expression der Endonuklease ein limitierende Faktor in U2OS-Zellen nicht aber in HEK293-Zellen. Das kann dadurch erklärt werden, dass in den HEK293-Zellen im Vergleich zu den U2OS-Zellen keine Sättigung der rAAV-Transduktion vorlag. Beim Einsatz höherer Mengen an rAAV-*SceI* in HEK293-Zellen würde möglicherweise die Menge an rAAV-*SceI* ebenso limitierend bezüglich der Gentargetingfrequenz sein, wie in den U2OS-Zellen.

Aufgrund der Beobachtung, dass die I-*SceI*-Endonuklease ein wichtiger Faktor in diesem System „L δ G“ ist, sollte die Expression der I-*SceI*-Endonuklease in der Zelle weiter erhöht werden, indem dsAAV-*SceI* Vektoren eingesetzt wurden. Diese Vermutung basiert auf der Beobachtung, dass in HeLa-Zellen eine 5-140fache Steigerung der Transduktionsfrequenz bei der Verwendung von dsAAV-Vektoren nachgewiesen werden konnte (111). Das kann dadurch erklärt werden, dass bei diesen Vektoren die Zweitstrangsynthese umgangen wird (Kapitel 1.1.1), so dass im Gegensatz zu den ssAAV-Vektoren unmittelbar nach dem *uncoating* doppelsträngige Genome für die Transkription der I-*SceI*-Endonuklease zur Verfügung stehen. Folglich würde man erwarten, dass nach der Infektion mit dsAAV-*SceI* im Gegensatz zu ssAAV-*SceI* höhere Mengen der I-*SceI*-Endonuklease für das Einführen eines DSB zur Verfügung stehen und somit das Gentargeting stimuliert würde. In einer noch nicht veröffentlichten Studie von Hirsch und Samulski, wurde gezeigt, dass das rAAV-vermittelte Gentargeting unter Verwendung eines dsAAV-*SceI* Vektors geringfügig erhöht werden konnte (64). In dieser Arbeit wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen ssAAV-*SceI* und dsAAV-*SceI* hinsichtlich der

Gentargetingfrequenz beobachtet. Eine mögliche Erklärung könnte die Genomgröße von ssAAV-SceI sein. Diese entspricht mit 2,5 kb der Hälfte eines herkömmlichen einzelsträngigen Vektorgenoms von 4,7 kb. Solche Genome können aufgrund ihrer Größe ebenfalls als Dimere verpackt werden (36, 63, 124), weshalb nach der Infektion der Zelle, ebenso wie bei dsAAV-Vektoren, doppelsträngige Genome für die Transkription zur Verfügung stehen.

In früheren Zellkultur-Studien von Hirata und Russell wurde gezeigt, dass in Abwesenheit eines DSB (i) die Art der Mutation, (ii) die Position der korrekten Nukleotide im rAAV-Donorvektor und (iii) die Homologielänge zwischen dem rAAV-Donor und dem mutierten Ziellokus einen Einfluss auf das rAAV-vermittelte Gentargeting haben (63). In dieser Arbeit wurde der Einfluss dieser Parameter auf das rAAV-vermittelte Gentargeting erstmals in Gegenwart eines induzierten DSB analysiert.

(i) In einer Reihe von rAAV-vermittelten Gentargeting-Systemen mit unterschiedlich mutierten Zielgenen konnten sowohl kleine Insertionen (< 25 bp) sowie kurze Deletionen (< 25 bp) und Substitutionen (1-2 bp) eingefügt bzw. korrigiert werden, wobei sich Insertionen schlechter korrigieren ließen als Deletionen (62, 63, 74, 75). Die in dieser Arbeit verwendeten rAAV-vermittelten Gentargeting-Systeme unterschieden sich hinsichtlich der Mutation im Ziellokus voneinander. Im System „L δ G“ wurde das *egfp*-Gen in den ersten 33 bp deletiert, wohingegen im System „mG“ eine 34 bp Insertion in der 3'-Region des *egfp*-Gens eingeführt wurde. (ii) Der Hauptunterschied beider Gentargeting-Systeme lag jedoch in der Position der korrekten Nukleotide im rAAV-Donorgenom. Unter Verwendung eines mutierten *AP*-Gens (Alkalische Phosphatase) wurde gezeigt, dass die besten Gentargetingfrequenzen erzielt werden konnten, wenn die korrekten Nukleotide in der Mitte der Donorsequenz und nicht an den Enden des rAAV-Vektors lokalisiert waren (63, 75). In dieser Arbeit lagen im System „L δ G“ die korrekten Sequenzen mittig der rAAV-Donorsequenz, wohingegen im System „mG“ die korrekten Nukleotide am 3'Ende des rAAV-Donors lokalisiert waren. Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass die Art der Mutation als auch die Position der Nukleotide keinen Einfluss auf die Gentargetingfrequenz hatten, da bei einer Koinfektion der U2OS-Zellen mit rAAV-SceI und rAAV-Donor.REx im System „L δ G“ mit 8% eine ähnliche Gentargetingfrequenz erzielt wurde wie in U2OS-Zellen des Systems „mG“ mit 6%. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass sowohl die Mutationsart als auch die Position der korrekten Nukleotide keinen entscheidenden Einfluss auf das rAAV-vermittelte Gentargeting haben, wenn die HR durch einen DSB stimuliert wird. Um jedoch den Einfluss der Mutationsart auf die Gentargetingfrequenz genauer analysieren zu können, sollten sich die Insertion bzw. die Deletion an ein und derselben Stelle im Ziellokus befinden. Zudem sollten für beide Systeme gleiche rAAV-Donorvektoren mit gleichen Gesamthomologielängen verwendet werden. (iii) Es konnte

gezeigt werden, dass in Abwesenheit eines DSB ein kurzer Homologiearm von 150 bp am 5'-Ende und ein längerer Homologiearm von 500 bp am 3'-Ende des rAAV-Vektors ausreichend für das Gtargeting waren. Die Gtargetingfrequenz konnte um ein 2-5faches gesteigert werden, wenn die Gesamthomologielänge zwischen dem Vektor und dem Ziellokus von 1,7 kb auf 3,0 kb erhöht wurde (63). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Donorvektor (D-Zgfp) mit einer kurzen Gesamthomologielänge von 2,1 kb zum Ziellokus eine 7fach höhere Gtargetingfrequenz erzielte als der Donorvektor D-ZgfpiNwpre mit einer Gesamthomologielänge von 4,2 kb. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Gtargetingfrequenzen könnte die IRES-Sequenz sein, die im längeren Donorvektor vorhanden war. Diese Sequenz könnte aufgrund ihrer komplexen Sekundär-/Tertiärstruktur von ssDNA einen störenden Einfluss auf die Rekombination zwischen dem Donorvektor und dem Ziellokus haben. Gegen diese Hypothese spricht jedoch die Beobachtung, dass im Gtargeting-System "mG" mit dem Donorvektor D- δ GFPiN, der ebenfalls eine IRES-Sequenz enthielt, bessere Gtargetingfrequenzen erzielt wurden als mit einem REx-kodierenden Donorvektor D- δ GFPiN.REx. Diese Beobachtung führt zu einer weiteren Vermutung, der zufolge das REx-Protein einen toxischen Einfluss auf das HR-vermittelte Gtargeting haben könnte.

Bei therapeutischen Anwendungen von rAAV-Vektoren, wie beispielsweise bei der Behandlung der Cystischen Fibrose oder der Hämophilie B, die auf der Komplementation eines fehlenden Proteins beruhen, ist oftmals eine mehrmalige Applikation des rAAV-Vektors notwendig, um die Konzentration des Proteins in der Zelle aufrechtzuerhalten (108).

Ziel eines gentherapeutischen Ansatzes ist daher auch immer eine Langzeitexpression des korrigierten Gens, um die Anzahl der Applikationen von rAAV-Vektoren zu minimieren, da aufgrund eventuell bestehender Antikörper der gentherapeutische Effekt reduziert werden kann. Anhand der Kinetikstudien konnte gezeigt werden, dass die Korrektur des mutierten *egfp*-Gens in allen Zelllinien, ausgenommen den HEK293-Zellen, über einen Zeitraum von 4-5 Wochen stabil blieb, wobei die rAAV-transduzierten Zellen nicht unter Selektion gestellt wurden. Die Abnahme der EGFP-positiven Zellen in den HEK293-Zellen könnte möglicherweise auf einen stillgelegten LTR-Promotor (*gene silencing*) zurückgeführt werden.

Für die Untersuchung des rAAV-vermittelten Gtargetings in verschiedenen Zelllinien wurden polyklonale Zelllinien verwendet. Der Hintergrundgedanke war, dass die Position des integrierten Ziellokus im Wirtsgenom einen Einfluss auf das rAAV-vermittelte Gtargeting haben könnte. Beim Vergleich verschiedener klonaler Zelllinien müsste der Ziellokus in allen Ziellinien am selben Genlokus integriert vorliegen, damit sich solche Positionseffekte nicht bemerkbar machen. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei der Herstellung der Zielzellen der Ziellokus jeweils an derselben

Stelle im Wirtsgenom integriert wurde, ist jedoch sehr gering. Durch die Verwendung polyklonaler Zielzellen wurden solche Positionseffekte vermindert.

Bei einem Vergleich der verschiedenen Zielzellen (U2OS und HEK293) konnten beachtliche Unterschiede zwischen den Gentergetingfrequenzen festgestellt werden. Eine Erklärung dafür könnte das unterschiedliche Vorkommen und Zusammenspiel der an der HR und am NHEJ beteiligten zellulären Proteine in den verschiedenen Zelllinien sein. Die beiden DNA-Reparaturwege, HR und NHEJ, können in einer Art Gleichgewichtszustand vorliegen. Die genauen Mechanismen, die diesen Zustand regulieren sind derzeit noch unklar. Es ist jedoch bekannt, dass das Gleichgewicht je nach Zellzyklusstadium (S-/G2-Phase: HR, G1-Phase: NHEJ) in Richtung eines der beiden Wege verschoben ist. Mit Hilfe von *knockout*-Zellen und/oder Zellen, in denen einige der relevanten DSBs-Reparaturproteine runterreguliert wurden, konnten wichtige Hinweise bezüglich der Regulation beider DNA-Reparaturwege gewonnen werden. Ein wichtiger regulatorischer Faktor für die Wahl des DSB-Reparaturweges scheint unter anderem der Phosphorylierungszustand der DNA-abhängigen Protein-Kinase (DNA-PKcs) zu sein. Für das NHEJ ist eine Phosphorylierung der DNA-PKcs wichtig (94). Durch eine Abnahme der Phosphorylierung der Protein-Kinase wird das NHEJ in der S-Phase runterreguliert (24). Das bedeutet, dass durch Suppression oder *knockout* wichtiger Proteine des NHEJ, wie die DNA-PKcs, KU70 oder XRCC4 die HR begünstigt werden kann (3, 133).

Obwohl der genaue Mechanismus des rAAV-vermittelten Gentergetings derzeit noch unklar ist, konnten bereits wichtige Erkenntnisse bezüglich der am rAAV-vermittelten Gentergeting beteiligten zellulären Proteine gewonnen werden. Demnach scheinen die über RAD51/RAD54 regulierten Schritte der HR essenziell für das rAAV-vermittelte Gentergeting zu sein (179). RAD51 nimmt dabei eine Schlüsselrolle ein, indem es das Replikationsprotein A (RPA) am ssAAV-Genom ersetzt und eine Nukleoprotein-Filament bildet (170). Die Funktion des RPA-Proteins besteht vermutlich darin, das ssAAV-Genom vor der Nuklease-vermittelten Degradation zu schützen und somit die HR zu garantieren. Zudem konnte durch eine Inaktivierung der an der HR beteiligten zellulären Proteine, wie RAD52 und RAD54, eine Abnahme der stimulierten HR und der Gentergetingfrequenz beobachtet werden (40, 147, 179). Das RAD51-Paralog XRCC3 scheint ebenso ein wichtiges Element beim HR-vermittelten Gentergeting zu sein, da eine Runterregulation der XRCC3-Expression in Zellkultur-Studien das rAAV-vermittelte Gentergeting negativ beeinflusste (179). Es ist vorstellbar, dass das XRCC3-Protein die RAD51-vermittelte Nukleoprotein-Filamentbildung unterstützt (45, 178). Dieses Nukleoprotein-Filament paart sich anschließend aufgrund der homologen Sequenzen mit der mutierten Ziellokussequenz, wobei das RAD54-Protein die doppelsträngige genomische DNA entwindet (178, 179).

Anhand dieser Beobachtungen wäre es denkbar, dass in den U2OS-Zellen, die eine höhere Gentargetingfrequenz aufwiesen als die übrigen Zelllinien, ein höheres Proteinlevel an den HR beteiligten Proteine vorlag. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Anstieg der Genexpression von RAD51 und RAD52 während der S-Phase zu einer Erhöhung der HR führte (25). Zudem könnten aber auch Proteine des NHEJ-Reparaturweges in den U2OS-Zellen in geringeren Konzentrationen vorgelegen haben, wodurch die HR eventuell gefördert wurde. Diese Hypothesen können jedoch nur durch die Herstellung und Analyse weiterer *knockout*-Zelllinien geklärt werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der bei der Analyse der unterschiedlichen Gentargetingfrequenzen nicht außer Acht gelassen werden sollte, ist die rAAV-Transduktionsfrequenz, d.h. die Anzahl der funktionellen rAAV-Partikel, die in die Zelle gelangen. Die Transduktionsfrequenz wurde mittels des REx-Proteins bestimmt. Im Vergleich zu allen anderen verwendeten Zelllinien wurden in den U2OS-Zellen die höchsten Transduktionsfrequenzen und Gentargetingfrequenzen erreicht. In den HEK293-Zellen war die Gentargetingfrequenz am niedrigsten, wobei die Anzahl der REx-positiven Zellen ebenfalls niedriger war als in den anderen Zellen. Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Effizienz des rAAV-vermittelten Gentargetings von der Transduktionsfrequenz und der Transduktionseffizienz abhängig ist.

Die Transduktionseffizienz ist unter anderem durch den unterschiedlichen Anteil der AAV-Rezeptoren auf der Zelloberfläche bedingt. Das Problem geringer Transduktionsfrequenzen kann jedoch zum einen durch den Einsatz verschiedener AAV-Serotypen gelöst werden, die einen unterschiedlichen Zelltropismus aufweisen. Für die Transduktion von Hepatozyten sind vor allem rAAV8-Vektoren (47) geeignet, für die Transduktion von Muskelzellen dagegen rAAV1 (26), um nur einige rAAV-Vektoren zu nennen. Durch Produktion von rAAV-Chimären mittels Rekombination verschiedener rAAV-Serotypen kann für jeden Zell- bzw. Gewebetyp der passende rAAV-Pseudotyp identifiziert werden (16).

Eine Möglichkeit die Gentargetingfrequenz zu steigern und eine effiziente Transduktion zu garantieren, ist die Verwendung von rAAV-Kombivektoren. Solche Vektoren liefern sowohl die Sequenz der Endonuklease als auch die homologen Sequenzen des Donors. Im Gentargeting-System "mG" wurden mit einer Koinfektion von rAAV-SceI und rAAV-Donor δ GFP Δ N 25% der U2OSmG-Zellen korrigiert. Im Gegensatz dazu wurde in Gegenwart eines einzelnen rAAV-Kombivektors eine signifikant höhere Gentargetingfrequenz mit 65% erzielt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Gesamtmenge an rAAV-Partikeln durch den Einsatz eines rAAV-Kombivektors reduziert wird. Die Gefahr einer Rezeptorabsättigung und der damit verbundenen Reduzierung der Transduktionsfrequenz kann dadurch verringert werden. Ein positiver Nebenaspekt ist die Senkung der Produktionskosten für nur einen rAAV-Vektor. Im Hinblick

auf den Einsatz von rAAV-verpackten ZFNs könnten die Produktionskosten ebenfalls gesenkt werden, indem beispielsweise beide ZFNs auf einem Vektorgenom vereinigt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein direkter Vergleich beider verwendeten Gentergeting-Systeme schwierig ist, da die unterschiedlichen Gentergetingfrequenzen ein Zusammenspiel der zuvor erwähnten Parameter sein können. Dies zeigt die Notwendigkeit auf, dass jedes rAAV-vermittelte Gentergeting eines zu korrigierenden Ziellokus vor einem *in vivo* Einsatz ausreichend optimiert werden muss.

5.2 Risikoabschätzung des rAAV-vermittelten Gentergetings

Für das rAAV-vermittelte Gentergeting mussten hohe Viruspartikelzahlen pro Zelle eingesetzt werden, damit möglichst hohe Gentergetingfrequenzen erzielt werden konnten. Dies bestätigt frühere Gentergeting-Studien, in denen in Gegenwart eines I-SceI-induzierten DSB ebenfalls hohe Vektordosen mit bis zu $1,5 \times 10^5$ genomische Partikel pro Zelle eingesetzt wurden (117). In diesem Zusammenhang sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Aufnahme der rAAV-Partikel in die Zelle durch den Anteil der Rezeptoren auf der Zelloberfläche limitiert wird. Zudem ist bisher noch nicht bekannt, wie viele rAAV-Partikel nach der Endozytose tatsächlich zum Kern transportiert werden und anschließend in den Zellkern gelangen. In der Annahme, dass nur ein Allel eines Gens genetisch modifiziert werden soll, bedeutet dies, dass nach der Infektion vermutlich weitaus mehr Viruspartikel in der Zelle vorlagen als theoretisch für das Gentergeting benötigt wurden. Daher stellte sich die Frage, welches Schicksal die übrigen rAAV-Genome ereilt, die nicht für das rAAV-vermittelte Gentergeting verwendet wurden. Obwohl bereits nachgewiesen werden konnte, dass die Mehrheit der rAAV-Genome als extrachromosomale Episome in der Zelle vorliegt (51, 129, 160), ist es durchaus möglich, dass einige der rAAV-Vektoren während des rAAV-vermittelten Gentergetings in das Wirtsgenom der Zelle integrierten. Im folgenden Verlauf dieses Diskussionsabschnittes soll daher untersucht werden, wie häufig ein solches rAAV-Integrationsereignis während des rAAV-vermittelten Gentergetings stattfand.

Mittels Hepatektomiestudien in rAAV-transduzierten Mäuse-Lebern konnte bereits gezeigt werden, dass in den zur Teilung angeregten Hepatozyten die extrachromosomal vorliegenden rAAV-Episome ausgedünnt wurden (129). Diese Beobachtung erklärt die Abnahme der REx-positiven Zellen in allen verwendeten Zielzelllinien über einen Zeitraum von cirka 21 Tagen nach der Transduktion um mehr als die Hälfte. Während des Beobachtungszeitraumes von bis zu 36 Tagen wurden die rAAV-transduzierten Zellen mindestens zweimal pro Woche während der Zellpassagierung jeweils 1:10 ausgedünnt, was insgesamt einem Verdünnungsfaktor von 10^{12} entspricht. Einundzwanzig Tage nach der rAAV-Transduktion erreichte die REx-Expression ein konstantes Niveau, was auf integrierte rAAV-Genome zurückgeführt werden kann. Dabei lag die Anzahl der REx-positiven U2OS-Zellen höher als für die übrigen Zelllinien (HeLa, HT-1080 und HEK293), was höchstwahrscheinlich durch die höhere initiale Transduktionsfrequenz in U2OS-Zellen bedingt war.

Wie anhand der klinischen X-SCID-Studien beobachtet werden konnte, können Integrationen von viralen Vektoren Veränderungen des Erbguts hervorrufen, was zu einer Entartung der betroffenen Zelle bis hin zur Bildung von Karzinomen führen kann (20, 32, 54, 161). Mehrere Studien belegen das Vorkommen zufälliger Integrationen von rAAV-Vektoren, wobei die durchschnittlichen Integrationsfrequenzen mit einem Integrationsereignis pro 10^3 - 10^4 Vektorpartikeln gering sind (116, 155). Anders als bei der Verwendung der in den X-SCID-Studien eingesetzten retroviralen Vektoren konnte in den klinischen Gentherapiestudien mit rAAV-Vektoren, wie der Cystischen Fibrose (Phase II) oder der Hämophilie B (Phase I) bisher keine insertionsbedingten Erkrankungen nachgewiesen werden (56, 109). Bisher gibt es nur eine einzige, in Fachkreisen sehr umstrittene, da bislang nicht reproduzierbare, Studie mit rAAV-Vektoren in Mäuse-Hepatozyten, in denen eine insertionsbedingte Karzinogenese beobachtet wurde. Dennoch kann jedes Integrationsereignis die Gefahr einer insertionsbedingten Entartung der Zelle erhöhen. Die konstante REx-Expression, die sich im Laufe der Zeit nach der rAAV-Transduktion einstellte, weist darauf hin, dass rAAV-Integrationen während des rAAV-vermittelten Gentergetings auftraten. Für zukünftige gentherapeutische Anwendungen des rAAV-vermittelten Gentergetings ist daher die Abschätzung des Risikopotenzials von rAAV-Vektoren hinsichtlich insertionsbedingter Mutagenesen enorm wichtig. Eine Quantifizierung und Charakterisierung der rAAV-Integrationen und der Rekombinationsereignisse während des rAAV-vermittelten Gentergetings war deshalb auch Gegenstand dieser Arbeit. Dabei ging es nicht allein darum, die Veränderung des Phänotyps einer rAAV-transduzierten Zelle, die eine Korrektur des mutierten *egfp*-Gens mit sich bringt, zu analysieren, sondern auch um eine Untersuchung auf genomischer Ebene.

Während des gentherapeutischen rAAV-vermittelten Gentergetings sollten die Integration eines Gentherapievektors und die damit verbundene Gefahr einer Insertionsmutagenese möglichst gering sein. Daher stellte sich die Frage, wie häufig eine rAAV-Integration im Vergleich zum rAAV-vermittelten Gentergeting auftrat. Aus diesem Grund wurde die *Targeting Ratio* (Gentergeting/zufällige Integration) als ein Chancen/Risiko-Faktor berechnet. Anhand der phänotypischen Daten des 36. Tages nach der Transduktion wurde für die U2OS-L Δ G-Zelllinie ein Verhältnis von 1 Gentergetingereignis pro 230 rAAV-Zufallsintegrationen in Abwesenheit eines DSB berechnet. Durch einen I-SceI-induzierten DSB wurde das Verhältnis auf 1:5 verbessert, was einem Faktor von 46 entspricht. Das bedeutet, dass das Risiko einer Insertionsmutagenese durch die Stimulation des HR-vermittelten Gentergetings verringert werden kann. Um diese Beobachtung auch auf genomischer Ebene verifizieren zu können, wurden Allel-spezifische *real-time* PCRs etabliert, die eine spezifische Detektion sowie eine Quantifizierung der Integrations- und Gentergetingereignisse ermöglichten. Diese Art der

Genomanalyse bietet gegenüber anderen Systemen vor allem den Vorteil, dass sowohl Integrationsereignisse als auch HR-Ereignisse parallel in ein und derselben Probe (genomischer DNA) detektiert werden können. Zudem ist die Quantifizierung durch die Verwendung von spezifischen Primerpaaren genauer, als beispielsweise ein Bakterien-basiertes *rescue*-System, in dem die Anzahl positiver Gentergeting-Ereignisse über die Selektion von Bakterienklonen bestimmt wird (116). Eine solche Analyse durchläuft viele Schritte, wie die Isolierung und den Restriktionsverdau der genomischen DNA sowie die Klonierung und Selektion der isolierten rAAV-Sequenz, die allesamt fehlerbehaftet sein können.

Für die quantitative PCR-Analyse wurde die genomische DNA am letzten Tag der Kinetikstudien isoliert, um eine Detektion von episomal vorliegenden rAAV-Genomen auszuschließen. Mit Hilfe der *real-time* PCRs wurden, unter Berücksichtigung der Standardabweichungen, nahezu gleiche Verhältnisse zwischen der rAAV-Integration und dem Gentergeting von 1:330 (in Abwesenheit eines DSB) und 1:25 (in Gegenwart eines DSB) wie in der phänotypischen Analyse detektiert. Durch die PCR-gestützte Analyse der U2OS-L δ G-Einzellklone konnte das zuvor festgestellte Verhältnis zwischen der Korrektur des *egfp*-Gens und einer Zufallsintegration bestätigt werden. Das lässt darauf schließen, dass der Phänotyp die molekularbiologischen Verhältnisse in der Zelle widerspiegelt. Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass die Integrationsfrequenz von rAAV ausschließlich über die Detektion der REx-Kassette erfolgte. Da es sich aber um eine Koinfektion (Zwei-Vektor-System) handelte, bei der parallel zum rAAV-Donor.REx Vektor auch der rAAV-SceI Vektor appliziert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die Integrationsfrequenz höher war. Dabei konnte davon ausgegangen werden, dass beide Vektoren ähnliche Integrationsfrequenzen aufwiesen. Diese Annahme konnte durch die Analyse der U2OS-L δ G-Einzellklone bestätigt werden (Kapitel 3.4.4), da in nahezu allen Klonen Integrationen des rAAV-Donorvektors und des rAAV-SceI Vektors nachgewiesen werden konnten. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Integrationsfrequenz tatsächlich höher war, als zuvor angenommen.

Bezug nehmend zu der eingangs gestellten Frage hinsichtlich des Schicksals der rAAV-Genome während des rAAV-vermittelten Gentergetings kann folgendes festgehalten werden: (i) Die Mehrheit der funktionellen rAAV-Genome (Abnahme der REx-positiven Zellen von 90% auf 30%) wurde über die Zellpassagierung ausgedünnt. (ii) Die anschließend beobachtete konstante REx-Expression konnte mittels PCR-Analysen auf integrierte rAAV-Genome zurückgeführt werden, wobei eine rAAV-Integrationen und ein Gentergetingereignis parallel in einer Zelle auftraten.

Wenngleich die Gefahr einer insertionsbedingten Mutagenese durch den Verlust der mehrheitlich episomal vorliegenden rAAV-Genome verringert wird und die *Targeting Ratio* durch einen

spezifisch eingeführten DSB verbessert werden konnte, sollte im Hinblick zukünftiger klinischer Anwendungen der Frage nachgegangen werden, wie die Integrationsfrequenz weiter reduziert werden könnte. Eine Möglichkeit war, die Menge an rAAV-Partikeln pro Zelle zu reduzieren. Wie anhand der rAAV-Titrationsexperimente nachgewiesen werden konnte, hätte das jedoch eine Abnahme der Gentargetingfrequenz zur Folge gehabt (Kapitel 4.1.2). Um eine Senkung der Integrationsfrequenz zu ermöglichen und gleichsam eine Abnahme der Gentargetingfrequenz zu verhindern, wurde ein rAAV-Kombivektor konstruiert, der sowohl für die homologen Sequenzen des Donorvektors als auch für die CMV-gesteuerte I-*SceI*-Endonuklease kodierte. Durch Verwendung nur eines rAAV-Vektors (Ein-Vektor-System), der beide essenziellen Faktoren vereinigte, konnte die Virusmenge pro Zelle im Vergleich zu einem Zwei-Vektor-System verringert werden. Mittels quantitativer *real-time* PCRs wurde untersucht, ob durch die Verringerung der rAAV-Vektorpartikelzahl bei der Verwendung nur eines rAAV-Vektors auch die Anzahl der rAAV-Zufallsintegrationen reduziert wurde.

Im Gentargeting-System „mG“ wurde für den rAAV-Kombivektor als auch für die Koinfektion eine ähnliche *Targeting Ratio* von 3:1 (GK:ZI) erzielt. Das bedeutet, dass 3 Gentargetingereignisse pro einer Zufallsintegration auftraten. Im Vergleich zum Gentargeting-System „L Δ G“ steht demnach das Verhältnis zwischen Gentargeting und Zufallsintegration auf Seiten des Gentargetings. Wie sind jedoch diese unterschiedlichen *Targeting Ratios* der beiden Gentargeting-Systeme „L Δ G“ und „mG“ zu erklären? Anhand des Vergleichs verschiedener Donorvektoren im rAAV-vermittelten Gentargeting wurde deutlich, dass ein rAAV-Donorvektor ohne ein zusätzliches Markergen (D- Δ GFPiN) mit 25% eine weitaus höhere Gentargetingfrequenz erzielte als ein Donorvektor mit einem REx-Markergen (5-8% EGFP-positive Zellen). Das könnte bedeuten, dass die rAAV-Vektorarchitektur möglicherweise einen Einfluss auf die *Targeting Ratio* hat, indem sie die HR zwischen dem rAAV-Vektor und dem Ziellokus begünstigt und somit das Verhältnis zu Gunsten des Gentargetings verschiebt.

Wie ist jedoch zu erklären, dass kein Unterschied hinsichtlich der *Targeting Ratio* zwischen dem rAAV-Kombivektor und der Koinfektion ermittelt werden konnte? Eine Erklärung findet sich bei einer genaueren Betrachtung der Kopienzahlen für den korrigierten Ziellokus (kZL/ZL) und für die rAAV-Integrationen (I-*SceI*-Integrationen/ZL) (Tab. 15). Dabei wird anhand der Anzahl korrigierter Zielloki deutlich, dass beim Einsatz eines rAAV-Kombivektors die Gentargetingfrequenz im Vergleich zu einer Koinfektion um das 4,5fache erhöht werden konnte (0,41 kZL/ZL versus 0,09 kZL/ZL). Ebenso war aber auch die Integrationsfrequenz des rAAV-Kombivektors, gemessen an der Anzahl integrierter I-*SceI*-Sequenzen, um ein 5-10faches im Vergleich zur Infektion mit zwei rAAV-Vektoren erhöht (0,21 ZI/ZL versus 0,02-0,04 ZI/ZL). Das bedeutet, dass das Verhältnis zwischen dem rAAV-vermittelten Gentargeting und der

Zufallsintegration in beiden Ansätzen (Ein-Vektor-System bzw. Zwei-Vektor-System) gleich blieb.

Zudem muss vermerkt werden, dass die genotypische Analyse niedrigere Werte erzielte als die phänotypische Analyse, was mit einer geringeren Sensitivität der quantitativen PCR erklärt werden kann. Obwohl in dem Gtargeting-System "mG" für die Quantifizierungsanalysen eine *blockcycler* PCR vorgeschaltet werden musste, konnten die PCR-Signale nicht weiter verbessert werden. Überdies sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Integrationsfrequenz des rAAV-Donors D- δ GFPiN nicht ermittelt wurde, da kein spezifisches Primerpaar gefunden werden konnte, um den rAAV-Donorvektor von dem korrigierten Ziellokus unterscheiden zu können. Bei einer ähnlichen Kopienzahl für die Integration des Donorvektors würde theoretisch eine Gesamtkopienzahl von circa 0,08 ermittelt werden, die immer noch um ein 2faches niedriger wäre als die des rAAV-Kombivektors.

Die ursprünglich aufgestellte Hypothese, ein rAAV-Kombivektor würde im Vergleich zu einem Zwei-Vektor-System zu niedrigeren Integrationsfrequenzen führen, konnte somit widerlegt werden. Es stellte sich folglich die Frage, welche Faktoren die erhöhte Integrationsfrequenz des rAAV-Kombivektors bedingten. Da der einzige Unterschied zwischen beiden Ansätzen die Architektur des rAAV-Kombivektors war, führte das zu der Vermutung, die Donorsequenz des rAAV-Kombivektors könnte während der HR einen Einfluss auf die Integration der rAAV-Kombivektors haben, indem sie möglicherweise dessen Sequenzen wie die I-*SceI*-Sequenz in die DNA-Bruchstelle „zieht“. In einem solchen Fall könnte die I-*SceI*-Sequenz im Ziellokus nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Sequenzierungsanalysen trat zu Tage, dass die I-*SceI*-Sequenz des rAAV-Kombivektors am I-*SceI*-induzierten DSB nachgewiesen werden konnte. Anhand der hohen Gtargetingfrequenzen von 65% ist es sehr wahrscheinlich, dass diese rAAV-Integrationen am DSB mit einer Korrektur des *egfp*-Gens verbunden waren, wodurch die zuvor aufgestellte Hypothese, die Donorsequenz des rAAV-Kombivektors könnte während der HR die Integration des rAAV-Vektors vermitteln, untermauert werden konnte.

Bei der Analyse konnten zwei verschiedene Typen der HR-gekoppelten Integration identifiziert werden, wobei beim ersten Typ die HR mit einer Integration eines einzelnen rAAV-Genoms am DSB verbunden war. Der zweite Typ basierte auf einer vorangegangenen Konkatamerbildung zwischen zwei oder mehreren rAAV-Vektorgenomen. Die Sequenzierung dieser HR-gekoppelten Integration erwies sich als schwierig. Eine Erklärung dafür findet sich in den rekombinierten ITR-Sequenzen, die sich zu Sekundärstrukturen ausbilden und die Amplifikation beeinträchtigen können. Die Anzahl der sequenzierten Klone war für beide Typen gleich hoch, so dass vermutet werden könnte, dass beide Versionen der HR-gekoppelten Integration in gleichen Verhältnissen auftraten. Dabei sollte erwähnt werden, dass sich beide Typen nicht notwendiger Weise

gegenseitig ausschließen, da der erste Typ auch bei der HR-gekoppelten Integration der rAAV-Konkatamere zusätzlich am 3'-Ende des DSB erfolgen könnte. Anhand der Position des Sequenzierungsprimers kann jedoch keine differenzierte Aussage über die Sequenz am 3'-Ende des DSB getroffen werden.

Die Bildung und Integration von Konkatameren ist bereits mehrmals beschrieben worden (41, 190) und erfolgt über eine intramolekulare Rekombination zwischen den ITRs von zwei oder mehreren rAAV-Genomen (41, 190). In Hepatozyten rAAV8-infizierter neonataler Mäuse lag die Integrationsfrequenz bei durchschnittlich 0,2 Kopien pro Zelle, was ebenfalls auf eine Konkatamerbildung hindeutete (73). Solche rAAV-Vektoren können theoretisch in beiden Orientierungen am DSB vorliegen. Mit Hilfe zwei verschiedener *blockcycler* PCRs, die den Nachweis von rAAV-Integrationen am I-*SceI*-induzierten DSB zuließen, wurden rAAV-Integrationen in beiden Richtungen, *sense* und *antisense*, nachgewiesen (Abb. 29). Die PCR-Fragmente zeigten im Agarosegel unterschiedliche Größen, die durch unterschiedliche Längen der rAAV-Konkatamere erklärt werden können.

Aufgrund dieser und frühere Beobachtungen von Miller und Russell, wonach rAAV-Vektoren am I-*SceI*-induzierten DSB integrieren (116), wurde eine *real-time* gestützte PCR etabliert, die eine Quantifizierung der Integrationen des rAAV-Kombivektors am I-*SceI*-induzierten DSB zuließ. Dabei konnte in 0,4% der Zielloki eine Integration des rAAV-Vektors in *antisense* Orientierung nachgewiesen werden. Für die HR-gekoppelte Integration des rAAV-Kombivektors in *sense* Orientierung am I-*SceI*-induzierten DSB konnte jedoch kein ausreichend spezifisches Primerpaar konstruiert werden, um zwischen den Integrationsereignissen am I-*SceI*-induzierten DSB und den Zufallsintegrationen von rAAV-Konkatameren unterscheiden zu können. Eine solche PCR wäre jedoch von enormer Wichtigkeit, um die Ergebnisse der Sequenzanalyse quantitativ belegen zu können. Für die quantitative Analyse der Integrationen am I-*SceI*-induzierten DSB für das Gentergeting-System "L δ G" wurde in 2,7% der Zielloki eine *antisense* Integration des rAAV-*SceI* Vektors am DSB nachgewiesen (Abb. 29). Das bedeutet, dass 1% der rAAV-Integrationen in *antisense* Orientierung an einem DSB vorlagen.

Diese Beobachtungen führen zu folgender Schlussfolgerung, wonach die Mehrheit der rAAV-Integrationen während des rAAV-vermittelten Gentergetings nicht an einem I-*SceI*-induzierten DSB erfolgte. Das bestätigt eine frühere Studie von Miller und seinen Mitarbeitern, wonach 7,4-7,7% der rAAV-Integrationen an einem I-*SceI*-induzierten DSB erfolgten (116). Für zukünftige Anwendungen des rAAV-vermittelten Gentergetings hinsichtlich der Korrektur endogener Gene ist dieses Ergebnis bedeutsam, da in diesem System spezifische DSBs am Ziellokus eingeführt werden müssen, um eine möglichst hohe Gentergetingfrequenz zu garantieren. Wenngleich die Integration am I-*SceI*-induzierten DSB in *antisense* Orientierung niedrig war, könnte die

Integration des rAAV-Kombivektors in *sense* Orientierung jedoch höher liegen, was auf der eingangs gestellten Hypothese beruht, die Donorsequenz könnte einen Einfluss auf die Integration des rAAV-Kombivektors haben. Demzufolge scheint ein Ein-Vektor-System hinsichtlich des rAAV-vermittelten Gtargetings von Nachteil gegenüber einem Zwei-Vektor-System sein.

Um dieses Ergebnis jedoch zu bestätigen, müsste zudem die in *sense* Orientierung integrierten rAAV-Vektoren und die Integrationen des rAAV-Donorvektors quantitativ bestimmt werden. Ein exakter Vergleich hinsichtlich der Integration am I-*Scel*-induzierten DSB zwischen dem Ein-Vektor-System und dem Zwei-Vektor-System ist zudem nur dann möglich, wenn für beide Ansätze dasselbe Primerpaar verwendet wird.

5.3 Zukunftsperspektiven des rAAV-vermittelten Gentargetings

Obwohl derzeit rund 1400 klinische Gentherapiestudien laufen, fanden gentherapeutische Anwendungen bisher noch keinen Eingang in die Praxis. Das ist vor allem darauf zurückzuführen, dass in der Vorzeit in einigen Studien erhebliche Sicherheitsprobleme mit Todesfolge auftraten, die die Forschungswelt schwer erschütterten. Das hatte zur Folge, dass die Öffentlichkeit und die regulatorischen Behörden eine distanzierte Haltung gegenüber dem klinischen Einsatz der Gentherapie einnehmen. Nichts desto trotz können solche Rückschläge eine weitere Verwendung als *proof of principle* Systeme für zukünftige Gentherapiestudien finden. Infolge dieser Erfahrungen wurde geradezu eine stärkere Auseinandersetzung mit den Risiken und Gefahren von Gentherapiestudien von den Behörden gefordert. Daher steht heutzutage vor allem die Sicherheit und Effizienz der, in vielen Gentherapieansätzen eingesetzten, viralen Vektoren im Mittelpunkt der Gentherapieforschung.

Im Hinblick auf zukünftige gentherapeutische Anwendungen des rAAV-basierenden Gentargetings wurde auch in dieser Arbeit der Sicherheitsaspekt dieses Systems im Zusammenhang mit dessen Vor- und Nachteilen genauer beleuchtet. Die Vorteile des rAAV-basierenden Gentargetings gegenüber anderen viralen Gentargeting-Systemen sind vor allem die Verwendung eines einzelsträngigen AAV-Donorgenoms, die niedrige Integrationsfrequenz des rAAV-Vektors und die Durchführbarkeit dieses rAAV-basierenden Systems in verschiedenen humanen Zelllinien.

In dieser Arbeit wurden die homologen Sequenzen für das HR-vermittelte Gentargeting über einen ssAAV-Vektor in die Zelle gebracht, da einzelsträngige DNA-Moleküle sehr wahrscheinlich für den Prozess der Homologen Rekombination leichter zugänglich sind als eine doppelsträngige DNA (59, 63). Ein solcher rAAV-Vektor kann deshalb gegenüber anderen RNA- und DNA-Vektoren, wie beispielsweise retroviralen- oder adenoviralen Vektoren von Vorteil sein, da er einzelsträngig ist.

Unter Verwendung eines Retrovirus-basierenden Vektors wurden beim Gentargeting eines mutierten *neo*-Gens in humanen Zellen ein Gentargetingfrequenz von 1 selektierten Zelle pro 3×10^6 infizierten Zellen erzielt (39). Dabei musste nach der Infektion das RNA-Genom des retroviralen Maus-Leukämie-Vektors zunächst in eine cDNA umgeschrieben werden. Ein Grund für die schlechte Gentargetingfrequenz könnte möglicherweise ein erschwerter Zugang dieser überwiegend integriert vorliegenden cDNA zum chromosomal vorliegenden *neo*-Gen, im Gegensatz zu einer einzelsträngigen DNA, gewesen sein. Diese Hypothese würde auch die

niedrigen Gentergetingfrequenzen von $0,3-1 \times 10^{-5}$ Aprt⁺ Kolonien pro infizierter Zelle erklären, die mittels doppelsträngigen adenoviralen Vektoren erzielt wurden (183).

Frühere Studien belegen die Stimulation der HR und somit eine Erhöhung der Gentergetingfrequenz durch Einführen eines DSBs am Ort der Mutation. In dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass ein solcher DSB nicht nur das Verhältnis zwischen dem Gentergeting und der Zufallsintegration des Vektors verbessert, sondern auch eine Gefährdung für die Zelle darstellen kann, indem es ein potenzielles Ziel für rAAV-Integrationen darstellt. Diese Gefahr kann jedoch vermutlich durch die Konstruktion des rAAV-Vektors beeinflusst werden. Das bedeutet, dass durch die Verwendung eines Zwei-Vektor-Systems die Gefahr einer Integration am I-ScdI-induzierten DSB wahrscheinlich gesenkt werden könnte.

Wie gefährlich zufällige Integrationen viraler Vektoren im Hinblick auf eine Entstehung karzinogener Zellen sein können, wurde im Fall der an X-SCID erkrankten Kinder deutlich, die mit einem retroviralen Vektor behandelt wurden. X-SCID ist eine Immunschwächeerkrankung, bei der mehrere Interleukinrezeptoren mutiert vorliegen können. Dies führt dazu, dass sich aus den hämatopoetischen Stammzellen keine Vorläufer-T-Lymphozyten und keine NK-Zellen entwickeln können. In den Jahren 1999-2000 wurden in Großbritannien und Frankreich insgesamt 20 Kindern hämatopoetische CD34-positive Stammzellen entnommen. Diese wurden *ex vivo* mit Hilfe eines Maus-Leukämie-Vektors transformiert und den Kindern wieder reimplantiert. Drei Jahre nach der Behandlung, die zunächst vielversprechend verlief, entwickelten 5 der 20 Kinder eine Leukämie (4 Kinder in Paris, 1 Kind in London) (20, 32, 54, 161), an der 1 Kind starb. Als mögliche Ursache der Leukämie wurde die Integration des viralen Vektors nahe des Promotors des *LMO2*-Proto-Onkogens aufgeführt. Studien im Mausmodell deuten darauf hin, dass das *LMO2*-Gen als Onkogen wirken könnte, da in 33% der transformierten Mäuse nach 1,5 Jahren eine Leukämie auftraten (135), was darauf hindeutet, dass die Insertionsmutagenese nicht der einzige Grund für die Mutation des *LMO2*-Gens gewesen ist. Anhand dieser Beobachtung könnte vermutet werden, dass rAAV-Vektoren ähnliche Risiken hinsichtlich gentherapeutischer Ansätze in sich bergen wie retrovirale Vektoren.

Die Integration solcher retroviraler Vektoren ist jedoch eine Voraussetzung für die Expression des Transgens und daher im Vergleich zu den rAAV-Vektoren viel höher. Dies kann vor allem dadurch erklärt werden, dass die retroviralen Vektoren im Gegensatz zu den rAAV-Vektoren ein Enzym (Integrase) mit sich bringen, das DNA-DSBs im Wirtsgenom einführt und dadurch die Integration vermittelt. Aufgrund der schnellen Integrationskinetik von γ -retroviralen Vektoren wurden im Laufe der Zeit Integrations-defiziente lentivirale Vektoren (IDLVs) entwickelt, in denen das Gen für die Integrase mutiert wurde. Aufgrund intramolekularer Rekombination der mutierten LTRs sind diese IDLVs in der Lage extrachromosomale Episome zu bilden (17, 102,

177, 188). Diese lentiviralen Episome weisen eine geringe Integrationsfrequenz auf und werden über Zellteilungen ausgedünnt. In einem Gentargeting-System konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung solcher IDLVs, in Gegenwart eines I-*SceI*-induzierten DSB, ein mutiertes *efgp*-Gen in 12% der verwendeten humanen Zellen korrigiert werden konnte. Zudem konnte eine niedrige Integrationsfrequenz der IDLVs auf Genomebene nachgewiesen werden (29, 103).

Im Gegensatz zu retroviralen Vektoren besitzen rAAV-Vektoren keine DSB-induzierenden Proteine und nutzen möglicherweise bereits existierende DSBs im Wirtsgenom. Diese Annahme basiert auf der Beobachtung, dass durch chemische und physikalische DNA-schädigende Agenzien eine Erhöhung der rAAV-Transduktionsfrequenz und der rAAV-Integration beobachtet werden konnte (2, 152). Im Gegensatz zum rAAV-vermittelten Gentargeting, an dem die zellulären Proteine der HR beteiligt sind, wird die Integration von rAAV-Vektoren sehr wahrscheinlich über die Proteine des NHEJ vermittelt. Derzeit existieren jedoch nur Modelle für den genauen Mechanismus der rAAV-Integration. Dabei könnten die zu *hairpin-loops* gefalteten ITRs des rAAV-Vektors von der Reparaturmaschinerie als DNA-Doppelstrang-Bruchstellen vom Ku-Protein erkannt und anschließend mit den freien Enden des DNA-DSBs mittels des Ligase IV/XRCC4-Komplex verknüpft werden (151, 155) (Kapitel 1.1.1). Im Anschluss daran liegt das virale Vektorgenom integriert im Wirtsgenom vor. Um ein genaueres Bild über den Vorgang der rAAV-Integration zu erlangen, sind weitere Analysen notwendig, um die am NHEJ beteiligten zellulären Proteine identifizieren zu können.

Nichts desto trotz könnte der Einsatz eines solchen rAAV-basierenden Gentargeting-Systems für die Korrektur eines endogenen Gens, das beispielsweise in der Nähe eines Proto-Onkogens lokalisiert ist oder selbst ein Proto-Onkogen ist, risikobehaftet sein. Bei der Verwendung retroviraler Vektoren können solche Gene aufgrund der viralen regulatorischen Elemente aktiviert werden, wie im Fall von X-SCID gezeigt wurde. Ein vorteilhafter Aspekt des rAAV-basierenden Gentargetings ist jedoch, dass rAAV-Vektoren solche regulatorischen Elemente in der Regel nicht mit sich bringen, wie anhand der rAAV-Donorvektoren gezeigt wurde. Eine Ausnahme stellen exogene Promotoren, wie beispielsweise der CMV-Promotor der rAAV-*SceI* und rAAV-ZFNs Vektoren dar. Eine Integration des rAAV-*SceI* Vektor konnte in dieser Arbeit mittels der Integrationsanalysen am I-*SceI*-induzierten DSB durch CMV-spezifische Primer bestätigt werden. Ein solches Integrationsereignis könnte je nach Integrationsort des rAAV-Vektors eine Gefahr für die Stimulation benachbarter Gene sein. Für rAAV wurde gezeigt, dass bevorzugt aktiv transkribierte Gene Ziele für rAAV-Integrationen sind (126). Wenn nur ein Allel eines aktiv transkribierten Gens durch die Integration betroffen ist, würde die Expression immer noch vom zweiten Allel des Gens erfolgen können. Würde jedoch ein Proto-Onkogen durch die rAAV-Integration aktiviert werden, hätte dies dagegen einen weitaus schlimmeren Effekt. Für

rAAV-Vektoren konnten jedoch, wie bereits erwähnt wurde, keine Stimulationen von Proto-Onkogenen nachgewiesen werden.

(iv) Aufgrund der großen Mannigfaltigkeit der AAV-Serotypen ist das rAAV-basierende System „L δ G“ in einer Reihe von Gewebetypen anwendbar. Dies ermöglicht die Korrektur eines therapeutisch relevanten Gens in einer Vielzahl von Zelltypen, wie unter anderem den embryonalen Stammzellen (ES) von Mäusen oder mesenchymalen Zellen (MSCs). Letztere können sich in eine Reihe von Zelltypen differenzieren wie beispielsweise in knochenbildende Osteoblasten. Solche MSCs wurden aus Patienten mit *Osteogenesis imperfecta* Typ III (OI) für ein *ex vivo* durchgeführtes rAAV-vermitteltes Gentargeting isoliert. Diese genetisch bedingte Knochenerkrankung (ugs. Glasknochenkrankheit) beruht auf einer dominanten Mutation in den Kollagen-Genen *COL1A1* und *COL1A2*, die zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit führen. Mit Hilfe von rAAV-Vektoren wurden die mutiert vorliegenden *COL1A1*-Gene in den MSCs inaktiviert. Durch Einführen eines *neo*-Gens mit Hilfe eines rAAV-Vektors konnte nach Selektion der transduzierten Zellen eine Gentargetingfrequenz von 90% beobachtet werden. In Mäusen wurde zudem nach einer Xenotransplantation der rAAV-transduzierten humanen MSCs eine normale Kollagenproduktion und Knochenbildung beobachtet (22). Das rAAV-vermittelte Gentargeting ist jedoch nur beschränkt einsetzbar, da es auf den natürlichen Prozess der HR angewiesen ist, der ausschließlich in teilungsfähigen Zellen abläuft. Für postmitotische Zellen, wie beispielsweise Zellen des ZNS, ist ein solches System daher ungeeignet. Zudem zeigte die Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) mit rAAV-Vektoren nur begrenzten Erfolg (165).

Derzeit beschäftigen sich eine Reihe von Forschungsgruppen mit der Frage, wie die rAAV-vermittelte Gentargetingfrequenz weiter verbessert werden kann, beispielsweise durch (i) Runterregulation essenzieller Proteine des NHEJ, (ii) Synchronisation der zu transduzierenden Zellen in der S-Phase und (iii) der Applikation von Chemikalien.

(i) Wie bereits erwähnt wurde, führte das *knockout* bestimmter NHEJ-Proteine zu einer Erhöhung der HR (3, 33, 133). Es ist daher vorstellbar, das Proteinlevel von regulatorisch bedeutsamen Proteinen des NHEJ, mittels siRNA-Technik zu senken, wodurch die HR gefördert und somit das rAAV-vermittelte Gentargeting erhöht werden kann. Für DNA-PK_{cs} konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass durch Stilllegung der Genexpression auf Transkriptionsebene das rAAV-vermittelte Gentargeting nicht beeinflusst wurde (179). (ii) Es konnte bereits gezeigt, dass die Reparatur von DSBs über HR in Zellen, die sich durch Synchronisation (Arretierung der Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus) in der S-Phase befanden, um das 39fache höher war als in Zellen, die in der M-Phase vorlagen (156). Hinsichtlich des rAAV-vermittelten Gentargetings wäre es daher denkbar, die Zielzellen vor der rAAV-Infektion, beispielsweise

durch Entzug des fötalen Kälberserums im Zellkulturmedium, zu synchronisieren, um die Gentargetingfrequenz zu erhöhen. (iii) Derzeit laufen einige Untersuchungen auf Zellkulturebene, die sich mit der Stimulation der Gentargetingfrequenz durch den Einfluss verschiedener Chemikalien, wie beispielsweise Indirubin, Hydroxyurea oder Vinblastin, beschäftigen (Rahman et al, in Vorbereitung). In diesem Zusammenhang ist eine zusätzliche Genomanalyse unabdingbar, um etwaige negative Einflüsse der Chemikalien auf die *Targeting Ratio* ausreichend abschätzen zu können.

Neben der gezielten Korrektur von Genen kann das rAAV-vermittelte Gentargeting aber auch für die Herstellung von *knockout*-Zelllinien und *knockout*-Mäusen verwendet werden. Dabei wird ein Gen gezielt ausgeschaltet, wodurch es zu einem Funktionsverlust des jeweiligen Gens kommt (*knockout*). Auf Zellkulturebene dienen *knockout*-Zelllinien als Modellsysteme für die Analyse von zellspezifischen Einflüssen (144). Die Verwendung von *knockout*-Mäusen, die als Krankheitsmodelle für bestimmte Krankheiten wichtige Hinweise über bestimmte krankheitsbezogene Prozesse innerhalb des Organismus dienen, scheint zudem zukunftsweisend zu sein. Dabei wird das Gen, das von Interesse für die jeweilige Krankheit ist, gezielt ausgeschaltet, um anschließend dessen Wirkung im Organismus zu überprüfen. Die Methoden zur Herstellung von *knockout*-Zelllinien und *knockout*-Mäusen mit Hilfe von rAAV-Vektoren sind ähnlich. Mittels eines zum Ziellokus homologen rAAV-Vektors wird ein Selektionsgen, das von *loxP*-Schnittstellen flankiert sein kann, in das Wirtsgenom eingebracht. Über homologe Rekombination mit dem rAAV-Vektor wird das Gen (oder Teile des Gens), welches ausgeschaltet werden soll, durch das Selektionsgen des rAAV-Vektors ersetzt. Anschließend erfolgt eine positiv-negativ Selektion der Zellen, die das Selektionsgen im Genom integriert haben. Mit Hilfe einer zusätzlichen *Cre*-Rekombinase, die an den *loxP*-Schnittstellen schneidet, kann das Selektionsgen nach der Selektion wieder aus dem Genom entfernt werden.

Zukunftsweisend für den Einsatz des rAAV-vermittelten Gentargetings für die Korrektur eines therapeutisch relevanten Gens ist vor allem der Einsatz von rAAV-verpackten ZFNs. Die Bedeutung solcher ZFNs im rAAV-vermittelten Gentargeting wird daher im folgenden Abschnitt ausführlich diskutiert.

5.4 rAAV-vermitteltes Gentergeting mit ZFNs

Die Verwendung der I-SceI-Endonuklease für das Einführen eines DSB ist nur im Modellsystem möglich, da es theoretisch keine Erkennungssequenzen für diese Endonuklease im menschlichen Genom gibt. Ein gezielt eingeführter DSB am Ort der Mutation ist, wie bereits mehrfach gezeigt wurde, essenziell für hohe Gentergetingfrequenzen. Für ein therapeutisch einsetzbares rAAV-vermitteltes Gentergeting-System könnten solche spezifischen DSBs mit Hilfe künstlich hergestellter ZFNs eingeführt werden. Diese speziell für den zu korrigierenden Zielort konstruierten ZFNs ermöglichen eine Reihe von Genmodifikationen wie (i) die Korrektur mutierter Gene, (ii) die Insertion von zusätzlichen Gensequenzen (Genaddition) und (iii) die Herstellung von *knockout*-Zellen.

(i) Bei der ZFNs-vermittelten Korrektur des endogenen *IL2R γ* -Gens (Interleukin-2 Rezeptor), das beim schweren Immundefekt X-SCID eine wichtige Rolle spielt, wurden mittels Transfektion Gentergetingfrequenzen bis zu 18% erreicht (175). (ii) In einer anderen Studie wurden ZFNs verwendet, um ein *egfp*-Gen gezielt über HR in den menschlichen *CCR5*-Genlokus einzubringen. Dabei wurde in bis zu 39% der Zellen eine Genaddition nachgewiesen, wobei die HR-Frequenz von der verwendeten Zelllinie abhängig war (103). (iii) Ein weiteres Beispiel für die Verwendung von ZFNs ist das Ausschalten (*knockout*) von Genen. In einem Modellsystem konnte in 1% der transfizierten chinesischen Hamsterovarienzellen (CHO) eine Unterbrechung der Gensequenz in beiden Allelen des endogenen *DHFR*-Gens (Dihydrofolat Reduktase) festgestellt werden (159).

Die Applikation der ZFNs mittels konventioneller Transfektionsmethoden kann jedoch je nach Zielorgan erschwert sein. Daher müsste beim Einsatz solcher ZFNs *in vivo* auf andere Methoden zurückgegriffen werden. Eine Möglichkeit für das Einschleusen von ZFNs in die Zellen liefern virale Vektoren. Unter Verwendung von Integrase-defizienten Lentiviren konnte im Fall des *IL2R γ* -Gens die Gentergetingfrequenz auf bis zu 29% erhöht werden (103). In einem *in vivo*-Tiermodell wurde das ZFNs-vermittelte Gentergeting mit Hilfe eines adenoviralen Vektors für das *knockout* des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) in Glioblastoma-spezifischen zytolytischen T-Lymphozyten (CTLs) eingesetzt. Dadurch sollte eine CTLs-vermittelte Zerstörung maligner Glioblastoma-Zellen in Gegenwart von Glucocorticoiden garantiert werden. Dabei wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine zytolytische Aktivität als auch eine Tumorzell-Spezifität der GR-resistenten CTLs beobachtet (146).

Eine Alternative zu den lentiviralen Vektoren stellen rAAV-Vektoren dar, da AAV zum einen über ein breites Wirtszellspektrum verfügt und zum anderen sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen infizieren kann. Eine Verpackung der ZFNs in rAAV-Vektoren konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden. In einer unveröffentlichten Studie von Hirsch und Samulski wurde

in einer humanen embryonalen Hämophilie B Zelllinie versucht mit Hilfe von rAAV-verpackten ZFNs eine 2 bp Mutation in der Faktor IX-Sequenz zu korrigieren (64). Es konnte jedoch nur eine Korrektur des Gens nachgewiesen werden, wenn die ZFNs in Form von Plasmid-DNA zusammen mit dem dsAAV-Donorvektor in die Zelle geschleust wurden. Ein möglicher Grund könnten die zuvor mehrfach beobachteten zytotoxischen Effekte der ZFNs sein, die zur Abnahme des Gentargetings und der korrigierten Zellen führen (4, 119, 138, 139, 171). Die Toxizität kann zum einen durch eine hohe DNA-Spaltungsaktivität der *FokI*-Domänen begründet werden und/oder durch eine nicht-optimale *Linker*-Sequenz (55) sowie einer schlechten DNA-Bindungsaktivität der Zinkfingermodule (30) (Kapitel 1.1.4). Letzteres begünstigt unspezifische Bindungen der ZFNs an die DNA, die zu unspezifischen DSBs im Wirtsgenom (*off-target sites*) führen. Diese unspezifischen DSBs können in der Zelle akkumuliert werden. Wenn keine Reparatur der DNA-Schäden erfolgt, wird die Apoptose eingeleitet, woraufhin die Zelle stirbt und die Gentargetingfrequenz reduziert wird. Für zukünftige klinische Anwendungen ist es daher notwendig diese toxischen Nebeneffekte der ZFNs zu reduzieren, um die Stabilität des ZFNs-stimulierten Gentargetings zu gewährleisten. Im Zuge der Entwicklung und Optimierung neuer ZFNs wurden in früheren Studien spezifischere ZFNs mit verbesserten DNA-Bindungsspezifitäten und geringerem Toxizitätspotenzial entwickelt. Eine Möglichkeit ZFN zu konstruieren ist das *Modular Assembly*, bei dem einzelne Zinkfinger-Module (ZF-Module), mit bereits charakterisierter Spezifität, miteinander verbunden werden (7, 10, 107, 162). Die Effizienz der Herstellung funktioneller ZFN-Paare liegt jedoch bei weniger als 6% (145). Zudem können ZFN entstehen, die eine geringe Aktivität und/oder eine hohe Toxizität aufweisen (30, 140). Eine weitere Möglichkeit für die Entwicklung spezifischer ZFNs ist eine Kombination aus Selektions-Methoden, wie beispielsweise das *Bacterial-Two-Hybrid* (B2H) System, mit dem ZF-Module mit hohen DNA-Bindungsspezifitäten selektioniert werden (68, 78). Die ZFNs weisen zusätzlich eine hohe DNA-Affinität und Aktivität sowie eine geringe Toxizität auf (30, 140). Der Nachteil für viele Labore ist jedoch der Umgang mit großen ZF-Bibliotheken, die für diese Selektionsmethoden benötigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden ZFNs in rAAV-Vektoren verpackt, die hinsichtlich des *Linkers* und der *FokI*-Domäne optimiert wurden (171). Um die zytotoxischen Effekte der ZFNs zu reduzieren, wurden Veränderungen innerhalb der *FokI*-Domänen durchgeführt. Durch die Symmetrie an der *FokI*-Dimerisierungsdomäne kann die Bildung von ZFNs-Homodimeren nicht ausgeschlossen werden, die unspezifische DSBs im Genom hervorrufen können. Durch den Austausch von Aminosäuren in der *FokI*-Dimerisierungsdomäne, wurden asymmetrische *FokI*-Dimerisierungsdomänen hergestellt, wodurch die Bildung von Homodimeren unterbunden und die Toxizität signifikant vermindert wurde (171).

Obwohl am 3. Tag nach der rAAV-Transduktion die ZFNs im Westernblot detektierbar waren, erwies sich der Nachweis der rAAV-ZFNs als schwierig, da trotz einer rAAV-Vektordosis von 1×10^4 gp pro Zelle nur schwache Signale detektiert werden konnten. Diese Beobachtung liegt möglicherweise einer niedrigen Expression der ZFNs in den U2OS-Zellen im AAV-Kontext zugrunde. Mittels der Westernblot-Analysen konnte festgestellt werden, dass die beiden ZFNs 1-KV und 3-EA in unterschiedlichen Konzentrationen (*steady-state level*) vorlagen, wobei 1-KV schwächer exprimiert wurde als 3-EA. Daher wurde eine Feineinstellung der ZFNs in Form einer rAAV-Titration durchgeführt. Dabei wurde bei einem Mengenverhältnis von 1:3 zwischen rAAV-GZF1-N.KV und rAAV-GZF3-N.EA ein Maximum der Gentargetingfrequenz von 10% erreicht. Steigende Mengen der rAAV-ZFNs ($> 1 \times 10^4$ gp/Zelle) führten zu einer Abnahme der Gentargetingfrequenz, was auf verbleibende zytotoxische Effekte der ZFNs hinweist.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass zum ersten Mal ZFNs mit Hilfe von rAAV-Vektoren in einem rAAV-vermittelten Gentargeting-System zum Einsatz gebracht wurden, die über *Modular Assembly* konstruiert wurden (4). Im Vergleich zu herkömmlichen Transfektionsmethoden wurden dabei ähnlich hohe Gentargetingfrequenzen erreicht. Im Hinblick auf den Einsatz von rAAV-ZFNs in zukünftigen Gentherapiestudien sind jedoch weitere Optimierungen der ZFNs notwendig, um die noch bestehenden zytotoxischen Effekte zu eliminieren. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass die ZFNs aufgrund integrierter rAAV-ZFNs konstitutiv exprimiert werden, wodurch die zytotoxischen Effekte verstärkt werden können. Mit Hilfe eines autoregulatorischen Systems könnte die Toxizität der ZFNs reduziert werden, indem die integrierten rAAV-Vektoren durch die ZFNs wieder aus dem Genom herausgeschnitten werden. Als Voraussetzung müssten die ZFN-Bindestellen zuvor in das rAAV-Vektorgenom, beispielsweise in der Nähe der ITR-Sequenzen, eingeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit, neben der Optimierung eines bereits existierenden ZFNs-Paares, wäre die Entwicklung eines neuen ZFNs-Paares, das gegenüber dem verwendeten ZFNs-Paar eine höhere DNA-Bindungsspezifität aufweist. Dafür könnte das neu entwickelte System OPEN (*Oligomerized Pool ENgineering*) verwendet werden, das eine Verbesserung der bereits beschriebenen Methoden zur Konstruktion neuer ZF darstellt. Gegenüber dem *Modular Assembly* werden mit der OPEN-Strategie aktivere ZFNs-Paare konstruiert (106). Bisher wurden 37 ZFNs-Paare generiert, die eine effiziente Modifikation des *egfp*-Gens, sowie der endogenen Gene *VEGF-A*, *CFTRG* und *HoxB13* in menschlichen Zellen ermöglichten.

Diese kontrovers diskutierten Aspekte sollten nochmals veranschaulichen, wie bedeutend eine solche molekular- und zellbiologische Charakterisierung des rAAV-vermittelten Gentergetings im Hinblick auf zukünftige therapeutische Anwendungen ist. Zudem sollte gezeigt werden, welche Vorteile und Anwendungsmöglichkeiten ein solches rAAV-vermitteltes Gentergeting-System gegenüber anderen viralen Gentergeting-Systemen hinsichtlich der Behandlung therapeutisch relevanter Gene mit sich bringt.

6 Zusammenfassung

Vektoren des Adeno-Assoziierten Virus (AAV) zeichnen sich durch eine Reihe von vorteilhaften Eigenschaften aus, wie beispielsweise einer geringen Immunantwort, ein breites Wirtszellspektrum sowie die Fähigkeit sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen infizieren zu können. Aufgrund dieser Eigenschaften sind rekombinante AAV-Vektoren (rAAV) geradezu als Gentherapievektoren prädestiniert.

Ziel meiner Arbeit war die Etablierung eines rAAV-vermittelten Gentergeting-Systems, das als *proof of principle* System verwendet wurde, um ein defektes *egfp*-Gen über Homologe Rekombination (HR) direkt am mutierten Ziellokus korrigieren zu können. Dafür wurden verschiedene menschliche Zelllinien mit einem integriert vorliegenden mutierten *egfp*-Gen mit rAAV-Vektoren kotransduziert. Für das Gentergeting wurde die zum mutierten Ziellokus homologe Donor-DNA sowie die I-*SceI*-Endonuklease als auch die spezifisch für den Ziellokus konstruierten Zinkfingernukleasen (ZFNs), für das Einführen eines DNA-Doppelstrangbruches (DSB) am mutierten Ziellokus, in rAAV-Vektoren verpackt. Die Genkorrekturfrequenz wurde durch die Messung der EGFP-positiven Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Dabei konnte durch das Einführen eines I-*SceI*-induzierten DSB in den mutierten Ziellokus das Gentergeting um ein 6500faches stimuliert werden. Durch die Verwendung eines einzelnen rAAV-Vektors, der sowohl für die Donorsequenz als auch für die I-*SceI*-Endonuklease kodierte, konnten Gentergetingfrequenzen bis zu 65% erreicht werden. Im Gegensatz dazu führten Infektion mit zwei rAAV-Vektoren, rAAV-*SceI* und rAAV-Donor, zu 25% EGFP-positiven Zellen. Unter Verwendung von rAAV-ZFNs wurden Gentergetingfrequenzen bis 10% erreicht. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Gentergetingfrequenz vom Zelltyp, der rAAV-Vektordosis und der Donorvektor-Architektur abhängig war.

Obwohl jedes Integrationsereignis auch immer mit der Gefahr einer Mutagenese der transduzierten Zelle verbunden sein kann, konnten rAAV-Vektoren bisher nicht mit einer onkogenen Transformation in Verbindung gebracht werden. Nichts desto trotz wurde, im Hinblick auf zukünftige klinische Versuche, das Risikopotenzial des rAAV-vermittelten Gentergetings durch Bestimmung der *Targeting Ratio* als ein Chancen/Risiko-Faktor untersucht. Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Daten konnte ein Verhältnis von 1 Genkorrekturereignis zu 230 rAAV-Zufallsintegrationen bestimmt werden, dass durch Einführen eines spezifischen DSB im mutierten Ziellokus auf 1:5 verbessert werden konnte. Diese Ergebnisse konnten mit Hilfe von Allel-spezifischen *real-time* PCRs auf genomischer Ebene bestätigt werden.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass mit Hilfe von speziell konstruierten rAAV-Vektoren therapeutisch relevante Gantargetingfrequenzen erzielt werden konnten. Das rAAV-vermittelte Gantargeting ist daher ein vielversprechender therapeutischer Ansatz, um bestimmte Erbkrankheiten in naher Zukunft behandeln zu können.

7 Summary

Vectors based on adeno-associated virus (AAV) have a number of advantageous properties, such as low immunogenicity, a broad host range and the ability to transduce dividing and non-dividing cells. Due to these abilities recombinant AAV vectors hold great promise as gene therapy vectors. In my thesis I aimed at establishing an AAV-mediated gene targeting system. In a proof-of-principle approach a mutated *egfp* gene was corrected by homologous recombination (HR) directly at the mutated target locus. To this end, different human target cell lines with an integrated mutated *egfp* target locus were co-transduced with AAV vectors, which either served as a donor vector for gene targeting or that contained expression cassettes encoding the I-SceI homing endonuclease or specifically designed zinc-finger nucleases (ZFNs) for introducing a DNA double strand break (DSB) at the target locus. The frequency of gene correction was detected by assessing the number of EGFP-positive cells using flow cytometry. As shown, gene targeting at the mutated *egfp* target locus could be stimulated up to 6500-fold by an I-SceI-induced DSB. Using a single AAV-vector, encoding the I-SceI endonuclease and the donor sequence, gene targeting frequencies up to 65% were reached. In contrast, infections with two vectors, AAV-SceI and AAV-donor, rendered up to 25% of EGFP-positive cells. Moreover, when using AAV-ZFNs gene conversion was observed in up to 10% of the target cells. My data further revealed that the gene targeting frequency was dependent on the cell type, the vector dose and the donor vector architecture.

Even though integration events can potentially lead to mutagenesis of transduced cells, AAV-based vectors have never been associated with oncogenic transformation. Nonetheless, with regard to future clinical trials, I assessed the potential risk of AAV-mediated gene targeting by determining the targeting ratio as a risk/benefit indicator. A targeting ratio of 1 gene correction event per 230 random AAV integration events were calculated based on the flow cytometry data. This ratio could be improved to 1:13 upon insertion of a specific DSB in the *egfp* target locus. The phenotypic targeting ratio could be confirmed on the genomic level using allele-specific real-time PCR.

In summary, transduction of target cells with appropriately designed AAV vectors can induce therapeutically relevant gene targeting frequencies. AAV-mediated gene targeting could hence be a promising therapeutic approach to treat certain inherited disorders in the near future.

8 Literaturverzeichnis

1. **Afione, S. A., C. K. Conrad, W. G. Kearns, S. Chunduru, R. Adams, T. C. Reynolds, W. B. Guggino, G. R. Cutting, B. J. Carter, and T. R. Flotte.** 1996. In vivo model of adeno-associated virus vector persistence and rescue. *J Virol* **70**:3235-41.
2. **Alexander, I. E., D. W. Russell, and A. D. Miller.** 1994. DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors. *J Virol* **68**:8282-7.
3. **Allen, C., A. Kurimasa, M. A. Brenneman, D. J. Chen, and J. A. Nickoloff.** 2002. DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3758-63.
4. **Alwin, S., M. B. Gere, E. Guhl, K. Effertz, C. F. Barbas, 3rd, D. J. Segal, M. D. Weitzman, and T. Cathomen.** 2005. Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. *Mol Ther* **12**:610-7.
5. **Aminoff, M. J.** 2001. Parkinson's disease. *Neurol Clin* **19**:119-28, vi.
6. **Archetti, I., and D. S. Bocciarelli.** 1965. [Structure and biological characteristics of a small, still unclassified virus]. *Ann Ist Super Sanita* **1**:103-6.
7. **Bae, K. H., Y. D. Kwon, H. C. Shin, M. S. Hwang, E. H. Ryu, K. S. Park, H. Y. Yang, D. K. Lee, Y. Lee, J. Park, H. S. Kwon, H. W. Kim, B. I. Yeh, H. W. Lee, S. H. Sohn, J. Yoon, W. Seol, and J. S. Kim.** 2003. Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription factors. *Nat Biotechnol* **21**:275-80.
8. **Bartlett, J. S., R. Wilcher, and R. J. Samulski.** 2000. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* **74**:2777-85.
9. **Beaton, A., P. Palumbo, and K. I. Berns.** 1989. Expression from the adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in trans by the rep protein. *J Virol* **63**:4450-4.
10. **Beerli, R. R., and C. F. Barbas, 3rd.** 2002. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nat Biotechnol* **20**:135-41.
11. **Berns, K. I., and R. A. Bohenzky.** 1987. Adeno-associated viruses: an update. *Adv Virus Res* **32**:243-306.
12. **Berns, K. I., and C. Giraud.** 1996. Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **218**:1-23.
13. **Beumer, K., G. Bhattacharyya, M. Bibikova, J. K. Trautman, and D. Carroll.** 2006. Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases. *Genetics* **172**:2391-403.
14. **Bibikova, M., D. Carroll, D. J. Segal, J. K. Trautman, J. Smith, Y. G. Kim, and S. Chandrasegaran.** 2001. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol* **21**:289-97.
15. **Blacklow, N. R., M. D. Hoggan, and W. P. Rowe.** 1968. Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *J Natl Cancer Inst* **40**:319-27.
16. **Bowles, D. E., J. E. Rabinowitz, and R. J. Samulski.** 2003. Marker rescue of adeno-associated virus (AAV) capsid mutants: a novel approach for chimeric AAV production. *J Virol* **77**:423-32.
17. **Brussel, A., and P. Sonigo.** 2004. Evidence for gene expression by unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA species. *J Virol* **78**:11263-71.
18. **Buller, R. M., J. E. Janik, E. D. Sebring, and J. A. Rose.** 1981. Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* **40**:241-7.
19. **Cathomen, T., and J. K. Joung.** 2008. Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Mol Ther* **16**:1200-7.
20. **Cavazzana-Calvo, M., L. Dal-Cortivo, I. Andre-Schmutz, S. Hacein-Bey Abina, and A. Fischer.** 2007. [Cell therapy for inherited diseases of the hematopoietic system.]. *C R Biol* **330**:538-42.
21. **Chamberlain, J. R., D. R. Deyle, U. Schwarze, P. Wang, R. K. Hirata, Y. Li, P. H. Byers, and D. W. Russell.** 2008. Gene targeting of mutant COL1A2 alleles in mesenchymal stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Mol Ther* **16**:187-93.

22. **Chamberlain, J. R., U. Schwarze, P. R. Wang, R. K. Hirata, K. D. Hankenson, J. M. Pace, R. A. Underwood, K. M. Song, M. Sussman, P. H. Byers, and D. W. Russell.** 2004. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science* **303**:1198-201.
23. **Chan, P. P., M. Lin, A. F. Faruqi, J. Powell, M. M. Seidman, and P. M. Glazer.** 1999. Targeted correction of an episomal gene in mammalian cells by a short DNA fragment tethered to a triplex-forming oligonucleotide. *J Biol Chem* **274**:11541-8.
24. **Chen, B. P., D. W. Chan, J. Kobayashi, S. Burma, A. Asaithamby, K. Morotomi-Yano, E. Botvinick, J. Qin, and D. J. Chen.** 2005. Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* **280**:14709-15.
25. **Chen, F., A. Nastasi, Z. Shen, M. Brennenman, H. Crissman, and D. J. Chen.** 1997. Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutat Res* **384**:205-11.
26. **Chen, Z. J., B. T. Kren, P. Y. Wong, W. C. Low, and C. J. Steer.** 2005. Sleeping Beauty-mediated down-regulation of huntingtin expression by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun* **329**:646-52.
27. **Chiorini, J. A., M. D. Weitzman, R. A. Owens, E. Urcelay, B. Safer, and R. M. Kotin.** 1994. Biologically active Rep proteins of adeno-associated virus type 2 produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *J Virol* **68**:797-804.
28. **Choi, V. W., R. J. Samulski, and D. M. McCarty.** 2005. Effects of adeno-associated virus DNA hairpin structure on recombination. *J Virol* **79**:6801-7.
29. **Cornu, T. I., and T. Cathomen.** 2007. Targeted Genome Modifications Using Integrase-deficient Lentiviral Vectors. *Mol Ther* **15**:2107-13.
30. **Cornu, T. I., S. Thibodeau-Beganny, E. Guhl, S. Alwin, M. Eichtinger, J. K. Joung, and T. Cathomen.** 2008. DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. *Mol Ther* **16**:352-8.
31. **Crystal, R. G., D. Sondhi, N. R. Hackett, S. M. Kaminsky, S. Worgall, P. Stieg, M. Souweidane, S. Hosain, L. Heier, D. Ballon, M. Dinner, K. Wisniewski, M. Kaplitt, B. M. Greenwald, J. D. Howell, K. Strybing, J. Dyke, and H. Voss.** 2004. Clinical protocol. Administration of a replication-deficient adeno-associated virus gene transfer vector expressing the human CLN2 cDNA to the brain of children with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Gene Ther* **15**:1131-54.
32. **Deichmann, A., S. Hacein-Bey-Abina, M. Schmidt, A. Garrigue, M. H. Brugman, J. Hu, H. Glimm, G. Gyapay, B. Prum, C. C. Fraser, N. Fischer, K. Schwarzwaelder, M. L. Siegler, D. de Ridder, K. Pike-Overzet, S. J. Howe, A. J. Thrasher, G. Wagemaker, U. Abel, F. J. Staal, E. Delabesse, J. L. Villeval, B. Aronow, C. Hue, C. Prinz, M. Wissler, C. Klanke, J. Weissenbach, I. Alexander, A. Fischer, C. von Kalle, and M. Cavazzana-Calvo.** 2007. Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J Clin Invest* **117**:2225-32.
33. **Delacote, F., M. Han, T. D. Stamato, M. Jasin, and B. S. Lopez.** 2002. An *xrcc4* defect or Wortmannin stimulates homologous recombination specifically induced by double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **30**:3454-63.
34. **Diakun, G. P., L. Fairall, and A. Klug.** 1986. EXAFS study of the zinc-binding sites in the protein transcription factor IIIA. *Nature* **324**:698-9.
35. **Donahue, B. A., J. G. McArthur, S. K. Spratt, D. Bohl, C. Lagarde, L. Sanchez, B. A. Kaspar, B. A. Sloan, Y. L. Lee, O. Danos, and R. O. Snyder.** 1999. Selective uptake and sustained expression of AAV vectors following subcutaneous delivery. *J Gene Med* **1**:31-42.
36. **Dong, J. Y., P. D. Fan, and R. A. Frizzell.** 1996. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* **7**:2101-12.
37. **Donsante, A., D. G. Miller, Y. Li, C. Vogler, E. M. Brunt, D. W. Russell, and M. S. Sands.** 2007. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* **317**:477.
38. **Duan, D., P. Sharma, J. Yang, Y. Yue, L. Dudus, Y. Zhang, K. J. Fisher, and J. F. Engelhardt.** 1998. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol* **72**:8568-77.
39. **Ellis, J., and A. Bernstein.** 1989. Gene targeting with retroviral vectors: recombination by gene conversion into regions of nonhomology. *Mol Cell Biol* **9**:1621-7.

40. **Essers, J., R. W. Hendriks, S. M. Swagemakers, C. Troelstra, J. de Wit, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers, and R. Kanaar.** 1997. Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell* **89**:195-204.
41. **Fisher, K. J., K. Jooss, J. Alston, Y. Yang, S. E. Haecker, K. High, R. Pathak, S. E. Raper, and J. M. Wilson.** 1997. Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med* **3**:306-12.
42. **Fisher-Adams, G., K. K. Wong, Jr., G. Podsakoff, S. J. Forman, and S. Chatterjee.** 1996. Integration of adeno-associated virus vectors in CD34+ human hematopoietic progenitor cells after transduction. *Blood* **88**:492-504.
43. **Flotte, T. R., S. A. Afione, and P. L. Zeitlin.** 1994. Adeno-associated virus vector gene expression occurs in nondividing cells in the absence of vector DNA integration. *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**:517-21.
44. **Flotte, T. R., P. L. Zeitlin, T. C. Reynolds, A. E. Heald, P. Pedersen, S. Beck, C. K. Conrad, L. Brass-Ernst, M. Humphries, K. Sullivan, R. Wetzel, G. Taylor, B. J. Carter, and W. B. Guggino.** 2003. Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther* **14**:1079-88.
45. **Forget, A. L., B. T. Bennett, and K. L. Knight.** 2004. Xrcc3 is recruited to DNA double strand breaks early and independent of Rad51. *J Cell Biochem* **93**:429-36.
46. **Friedman-Einat, M., Z. Grossman, F. Mileguir, Z. Smetana, M. Ashkenazi, G. Barkai, N. Varsano, E. Glick, and E. Mendelson.** 1997. Detection of adeno-associated virus type 2 sequences in the human genital tract. *J Clin Microbiol* **35**:71-8.
47. **Gao, G., L. H. Vandenberghe, M. R. Alvira, Y. Lu, R. Calcedo, X. Zhou, and J. M. Wilson.** 2004. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* **78**:6381-8.
48. **Gao, G. P., M. R. Alvira, L. Wang, R. Calcedo, J. Johnston, and J. M. Wilson.** 2002. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:11854-9.
49. **Gavin, D. K., S. M. Young, Jr., W. Xiao, B. Temple, C. R. Abernathy, D. J. Pereira, N. Muzyczka, and R. J. Samulski.** 1999. Charge-to-alanine mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 Rep78/68 proteins yields temperature-sensitive and magnesium-dependent variants. *J Virol* **73**:9433-45.
50. **Graham, I. R., and G. Dickson.** 2002. Gene repair and mutagenesis mediated by chimeric RNA-DNA oligonucleotides: chimeroplasty for gene therapy and conversion of single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Biochim Biophys Acta* **1587**:1-6.
51. **Grimm, D., K. Pandey, H. Nakai, T. A. Storm, and M. A. Kay.** 2006. Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. *J Virol* **80**:426-39.
52. **Grossman, Z., E. Mendelson, F. Brok-Simoni, F. Mileguir, Y. Leitner, G. Rechavi, and B. Ramot.** 1992. Detection of adeno-associated virus type 2 in human peripheral blood cells. *J Gen Virol* **73 (Pt 4)**:961-6.
53. **Haber, J. E.** 2000. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* **16**:259-64.
54. **Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo.** 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**:415-9.
55. **Handel, E. M., S. Alwin, and T. Cathomen.** 2008. Expanding or Restricting the Target Site Repertoire of Zinc-finger Nucleases: The Inter-domain Linker as a Major Determinant of Target Site Selectivity. *Mol Ther*.
56. **Hasbrouck, N. C., and K. A. High.** 2008. AAV-mediated gene transfer for the treatment of hemophilia B: problems and prospects. *Gene Ther* **15**:870-5.
57. **Hauswirth, W. W., and K. I. Berns.** 1977. Origin and termination of adeno-associated virus DNA replication. *Virology* **78**:488-99.

58. **Havre, P. A., E. J. Gunther, F. P. Gasparro, and P. M. Glazer.** 1993. Targeted mutagenesis of DNA using triple helix-forming oligonucleotides linked to psoralen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:7879-83.
59. **Hendrie, P. C., R. K. Hirata, and D. W. Russell.** 2003. Chromosomal integration and homologous gene targeting by replication-incompetent vectors based on the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **77**:13136-45.
60. **Hendrie, P. C., D. W. Russell, P. P. Chan, M. Lin, A. F. Faruqi, J. Powell, M. M. Seidman, P. M. Glazer, P. Rouet, F. Smih, M. Jasin, M. Jasin, Y. G. Kim, J. Cha, and S. Chandrasegaran.** 2005. Gene targeting with viral vectors
61. **Hermonat, P. L., M. A. Labow, R. Wright, K. I. Berns, and N. Muzyczka.** 1984. Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J Virol* **51**:329-39.
62. **Hirata, R., J. Chamberlain, R. Dong, and D. W. Russell.** 2002. Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors. *Nat Biotechnol* **20**:735-8.
63. **Hirata, R. K., and D. W. Russell.** 2000. Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J Virol* **74**:4612-20.
64. **Hirsch, M. L., Green, Laura , Samulski, Richard J. .** 2008, May 28-June 1. Self-Complementary AAV-Mediated Double-Strand Break Repair and Its Application to Correction of the Factor 9 R333Q Allele. Gene Therapy Center, University of North Carolina, Chapel Hill, NC.
65. **Hoggan, M. D.** 1970. Adenovirus associated viruses. *Prog Med Virol* **12**:211-39.
66. **Hoggan, M. D., N. R. Blacklow, and W. P. Rowe.** 1966. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**:1467-74.
67. **Hoggan, M. D., A. J. Shatkin, N. R. Blacklow, F. Koczot, and J. A. Rose.** 1968. Helper-dependent infectious deoxyribonucleic acid from adenovirus-associated virus. *J Virol* **2**:850-1.
68. **Hurt, J. A., S. A. Thibodeau, A. S. Hirsh, C. O. Pabo, and J. K. Joung.** 2003. Highly specific zinc finger proteins obtained by directed domain shuffling and cell-based selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:12271-6.
69. **Huser, D., S. Weger, and R. Heilbronn.** 2002. Kinetics and frequency of adeno-associated virus site-specific integration into human chromosome 19 monitored by quantitative real-time PCR. *J Virol* **76**:7554-9.
70. **Im, D. S., and N. Muzyczka.** 1992. Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *J Virol* **66**:1119-28.
71. **Im, D. S., and N. Muzyczka.** 1990. The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* **61**:447-57.
72. **Inagaki, K., C. Ma, T. A. Storm, M. A. Kay, and H. Nakai.** 2007. The role of DNA-PKcs and artemis in opening viral DNA hairpin termini in various tissues in mice. *J Virol* **81**:11304-21.
73. **Inagaki, K., C. Piao, N. M. Kotchey, X. Wu, and H. Nakai.** 2008. Frequency and spectrum of genomic integration of recombinant adeno-associated virus serotype 8 vector in neonatal mouse liver. *J Virol* **82**:9513-24.
74. **Inoue, N., R. Dong, R. K. Hirata, and D. W. Russell.** 2001. Introduction of single base substitutions at homologous chromosomal sequences by adeno-associated virus vectors. *Mol Ther* **3**:526-30.
75. **Inoue, N., R. K. Hirata, and D. W. Russell.** 1999. High-fidelity correction of mutations at multiple chromosomal positions by adeno-associated virus vectors. *J Virol* **73**:7376-80.
76. **Jasin, M.** 1996. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet* **12**:224-8.
77. **Jooss, K., Y. Yang, K. J. Fisher, and J. M. Wilson.** 1998. Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J Virol* **72**:4212-23.
78. **Joung, J. K., E. I. Ramm, and C. O. Pabo.** 2000. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:7382-7.
79. **Kaplitt, M. G., P. Leone, R. J. Samulski, X. Xiao, D. W. Pfaff, K. L. O'Malley, and M. J. During.** 1994. Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet* **8**:148-54.
80. **Kearns, W. G., S. A. Afione, S. B. Fulmer, M. C. Pang, D. Erikson, M. Egan, M. J. Landrum, T. R. Flotte, and G. R. Cutting.** 1996. Recombinant adeno-associated virus (AAV-

- CFTR) vectors do not integrate in a site-specific fashion in an immortalized epithelial cell line. *Gene Ther* **3**:748-55.
81. **Kessler, P. D., G. M. Podsakoff, X. Chen, S. A. McQuiston, P. C. Colosi, L. A. Matelis, G. J. Kurtzman, and B. J. Byrne.** 1996. Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:14082-7.
 82. **Kim, Y. G., J. Cha, and S. Chandrasegaran.** 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:1156-60.
 83. **King, J. A., R. Dubielzig, D. Grimm, and J. A. Kleinschmidt.** 2001. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *Embo J* **20**:3282-91.
 84. **Knauert, M. P., and P. M. Glazer.** 2001. Triplex forming oligonucleotides: sequence-specific tools for gene targeting. *Hum Mol Genet* **10**:2243-51.
 85. **Kohli, M., C. Rago, C. Lengauer, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein.** 2004. Facile methods for generating human somatic cell gene knockouts using recombinant adeno-associated viruses. *Nucleic Acids Res* **32**:e3.
 86. **Kotin, R. M., and K. I. Berns.** 1989. Organization of adeno-associated virus DNA in latently infected Detroit 6 cells. *Virology* **170**:460-7.
 87. **Kotin, R. M., R. M. Linden, and K. I. Berns.** 1992. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *Embo J* **11**:5071-8.
 88. **Kotin, R. M., J. C. Menninger, D. C. Ward, and K. I. Berns.** 1991. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* **10**:831-4.
 89. **Kotin, R. M., M. Siniscalco, R. J. Samulski, X. D. Zhu, L. Hunter, C. A. Laughlin, S. McLaughlin, N. Muzyczka, M. Rocchi, and K. I. Berns.** 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:2211-5.
 90. **Kren, B. T., P. Bandyopadhyay, N. R. Chowdhury, J. R. Chowdhury, and C. J. Steer.** 2002. Oligonucleotide-mediated site-directed gene repair. *Methods Enzymol* **346**:14-35.
 91. **Kren, B. T., P. Bandyopadhyay, and C. J. Steer.** 1998. In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Med* **4**:285-90.
 92. **Kren, B. T., A. Cole-Strauss, E. B. Kmiec, and C. J. Steer.** 1997. Targeted nucleotide exchange in the alkaline phosphatase gene of HuH-7 cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Hepatology* **25**:1462-8.
 93. **Kumar, S., G. Mahendra, T. R. Nagy, and S. Ponnazhagan.** 2004. Osteogenic differentiation of recombinant adeno-associated virus 2-transduced murine mesenchymal stem cells and development of an immunocompetent mouse model for ex vivo osteoporosis gene therapy. *Hum Gene Ther* **15**:1197-206.
 94. **Kurimasa, A., S. Kumano, N. V. Boubnov, M. D. Story, C. S. Tung, S. R. Peterson, and D. J. Chen.** 1999. Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. *Mol Cell Biol* **19**:3877-84.
 95. **Labow, M. A., P. L. Hermonat, and K. I. Berns.** 1986. Positive and negative autoregulation of the adeno-associated virus type 2 genome. *J Virol* **60**:251-8.
 96. **Lengauer, C., K. W. Kinzler, and B. Vogelstein.** 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**:643-9.
 97. **Linden, R. M., P. Ward, C. Giraud, E. Winocour, and K. I. Berns.** 1996. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11288-94.
 98. **Linden, R. M., E. Winocour, and K. I. Berns.** 1996. The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7966-72.
 99. **Liu, L., H. Parekh-Olmedo, and E. B. Kmiec.** 2003. The development and regulation of gene repair. *Nat Rev Genet* **4**:679-89.
 100. **Liu, X., Z. Yan, M. Luo, R. Zak, Z. Li, R. R. Driskell, Y. Huang, N. Tran, and J. F. Engelhardt.** 2004. Targeted correction of single-base-pair mutations with adeno-associated virus vectors under nonselective conditions. *J Virol* **78**:4165-75.
 101. **Lobrich, M., and P. A. Jeggo.** 2007. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* **7**:861-9.
 102. **Loewen, N., D. A. Leske, Y. Chen, W. L. Teo, D. T. Saenz, M. Peretz, J. M. Holmes, and E. M. Poeschla.** 2003. Comparison of wild-type and class I integrase mutant-FIV vectors in

- retina demonstrates sustained expression of integrated transgenes in retinal pigment epithelium. *J Gene Med* **5**:1009-17.
103. **Lombardo, A., P. Genovese, C. M. Beausejour, S. Colleoni, Y. L. Lee, K. A. Kim, D. Ando, F. D. Urnov, C. Galli, P. D. Gregory, M. C. Holmes, and L. Naldini.** 2007. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* **25**:1298-306.
104. **Lusby, E., K. H. Fife, and K. I. Berns.** 1980. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J Virol* **34**:402-9.
105. **Maass, G., C. Bogedain, U. Scheer, D. Michl, M. Horer, M. Braun-Falco, M. Volkenandt, D. Schadendorf, C. M. Wendtner, E. L. Winnacker, R. M. Kotin, and M. Hallek.** 1998. Recombinant adeno-associated virus for the generation of autologous, gene-modified tumor vaccines: evidence for a high transduction efficiency into primary epithelial cancer cells. *Hum Gene Ther* **9**:1049-59.
106. **Maeder, M. L., S. Thibodeau-Beganny, A. Osiaik, D. A. Wright, R. M. Anthony, M. Eichtinger, T. Jiang, J. E. Foley, R. J. Winfrey, J. A. Townsend, E. Unger-Wallace, J. D. Sander, F. Muller-Lerch, F. Fu, J. Pearlberg, C. Gobel, J. P. Dassie, S. M. Pruett-Miller, M. H. Porteus, D. C. Sgroi, A. J. Iafrate, D. Dobbs, P. B. McCray, Jr., T. Cathomen, D. F. Voytas, and J. K. Joung.** 2008. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell* **31**:294-301.
107. **Mandell, J. G., and C. F. Barbas, 3rd.** 2006. Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucleic Acids Res* **34**:W516-23.
108. **Manno, C. S.** 2003. The promise of third-generation recombinant therapy and gene therapy. *Semin Hematol* **40**:23-8.
109. **Manno, C. S., G. F. Pierce, V. R. Arruda, B. Glader, M. Ragni, J. J. Rasko, M. C. Ozelo, K. Hoots, P. Blatt, B. Konkle, M. Dake, R. Kaye, M. Razavi, A. Zajko, J. Zehnder, P. K. Rustagi, H. Nakai, A. Chew, D. Leonard, J. F. Wright, R. R. Lessard, J. M. Sommer, M. Tigges, D. Sabatino, A. Luk, H. Jiang, F. Mingozzi, L. Couto, H. C. Ertl, K. A. High, and M. A. Kay.** 2006. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12**:342-7.
110. **McCarty, D. M., H. Fu, P. E. Monahan, C. E. Toulson, P. Naik, and R. J. Samulski.** 2003. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* **10**:2112-8.
111. **McCarty, D. M., P. E. Monahan, and R. J. Samulski.** 2001. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* **8**:1248-54.
112. **McKeon, C., and R. J. Samulski.** 1996. NIDDK Workshop on AAV Vectors: Gene Transfer into Quiescent Cells. *Hum Gene Ther* **7**:1615-9.
113. **McLaughlin, S. K., P. Collis, P. L. Hermonat, and N. Muzyczka.** 1988. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* **62**:1963-73.
114. **McPherson, R. A., L. J. Rosenthal, and J. A. Rose.** 1985. Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* **147**:217-22.
115. **Miao, C. H., H. Nakai, A. R. Thompson, T. A. Storm, W. Chiu, R. O. Snyder, and M. A. Kay.** 2000. Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction. *J Virol* **74**:3793-803.
116. **Miller, D. G., L. M. Petek, and D. W. Russell.** 2004. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat Genet* **36**:767-73.
117. **Miller, D. G., L. M. Petek, and D. W. Russell.** 2003. Human gene targeting by adeno-associated virus vectors is enhanced by DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **23**:3550-7.
118. **Miller, D. G., E. A. Rutledge, and D. W. Russell.** 2002. Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat Genet* **30**:147-8.
119. **Miller, D. G., G. D. Trobridge, L. M. Petek, M. A. Jacobs, R. Kaul, and D. W. Russell.** 2005. Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells. *J Virol* **79**:11434-42.
120. **Miller, D. G., P. R. Wang, L. M. Petek, R. K. Hirata, M. S. Sands, and D. W. Russell.** 2006. Gene targeting in vivo by adeno-associated virus vectors. *Nat Biotechnol* **24**:1022-6.
121. **Miller, J. C., M. C. Holmes, J. Wang, D. Y. Guschin, Y. L. Lee, I. Rupniewski, C. M. Beausejour, A. J. Waite, N. S. Wang, K. A. Kim, P. D. Gregory, C. O. Pabo, and E. J.**

- Rebar.** 2007. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* **25**:778-85.
122. **Moss, R. B., D. Rodman, L. T. Spencer, M. L. Aitken, P. L. Zeitlin, D. Waltz, C. Milla, A. S. Brody, J. P. Clancy, B. Ramsey, N. Hamblett, and A. E. Heald.** 2004. Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* **125**:509-21.
123. **Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-50.
124. **Muzyczka, N.** 1992. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **158**:97-129.
125. **Nakai, H., Y. Iwaki, M. A. Kay, and L. B. Couto.** 1999. Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver. *J Virol* **73**:5438-47.
126. **Nakai, H., E. Montini, S. Fuess, T. A. Storm, M. Grompe, and M. A. Kay.** 2003. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* **34**:297-302.
127. **Nakai, H., E. Montini, S. Fuess, T. A. Storm, L. Meuse, M. Finegold, M. Grompe, and M. A. Kay.** 2003. Helper-independent and AAV-ITR-independent chromosomal integration of double-stranded linear DNA vectors in mice. *Mol Ther* **7**:101-11.
128. **Nakai, H., X. Wu, S. Fuess, T. A. Storm, D. Munroe, E. Montini, S. M. Burgess, M. Grompe, and M. A. Kay.** 2005. Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver. *J Virol* **79**:3606-14.
129. **Nakai, H., S. R. Yant, T. A. Storm, S. Fuess, L. Meuse, and M. A. Kay.** 2001. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol* **75**:6969-76.
130. **Ogston, P., K. Raj, and P. Beard.** 2000. Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV-16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV-16 E2 protein. *J Virol* **74**:3494-504.
131. **Paques, F., and J. E. Haber.** 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:349-404.
132. **Pavletich, N. P., and C. O. Pabo.** 1991. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252**:809-17.
133. **Pierce, A. J., P. Hu, M. Han, N. Ellis, and M. Jasin.** 2001. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev* **15**:3237-42.
134. **Pierce, E. A., Q. Liu, O. Igoucheva, R. Omarrudin, H. Ma, S. L. Diamond, and K. Yoon.** 2003. Oligonucleotide-directed single-base DNA alterations in mouse embryonic stem cells. *Gene Ther* **10**:24-33.
135. **Pike-Overzet, K., D. de Ridder, F. Weerkamp, M. R. Baert, M. M. Verstegen, M. H. Brugman, S. J. Howe, M. J. Reinders, A. J. Thrasher, G. Wagemaker, J. J. van Dongen, and F. J. Staal.** 2006. Gene therapy: is IL2RG oncogenic in T-cell development? *Nature* **443**:E5; discussion E6-7.
136. **Podsakoff, G., K. K. Wong, Jr., and S. Chatterjee.** 1994. Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J Virol* **68**:5656-66.
137. **Ponnazhagan, S., D. Erikson, W. G. Kearns, S. Z. Zhou, P. Nahreini, X. S. Wang, and A. Srivastava.** 1997. Lack of site-specific integration of the recombinant adeno-associated virus 2 genomes in human cells. *Hum Gene Ther* **8**:275-84.
138. **Porteus, M. H.** 2006. Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Mol Ther* **13**:438-46.
139. **Porteus, M. H., T. Cathomen, M. D. Weitzman, and D. Baltimore.** 2003. Efficient gene targeting mediated by adeno-associated virus and DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **23**:3558-65.
140. **Pruett-Miller, S. M., J. P. Connelly, M. L. Maeder, J. K. Joung, and M. H. Porteus.** 2008. Comparison of zinc finger nucleases for use in gene targeting in mammalian cells. *Mol Ther* **16**:707-17.
141. **Qing, K., C. Mah, J. Hansen, S. Zhou, V. Dwarki, and A. Srivastava.** 1999. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* **5**:71-7.

142. **Radecke, F., I. Peter, S. Radecke, K. Gellhaus, K. Schwarz, and T. Cathomen.** 2006. Targeted chromosomal gene modification in human cells by single-stranded oligodeoxynucleotides in the presence of a DNA double-strand break. *Mol Ther* **14**:798-808.
143. **Radecke, S., F. Radecke, I. Peter, and K. Schwarz.** 2006. Physical incorporation of a single-stranded oligodeoxynucleotide during targeted repair of a human chromosomal locus. *J Gene Med* **8**:217-28.
144. **Rago, C., B. Vogelstein, and F. Bunz.** 2007. Genetic knockouts and knockins in human somatic cells. *Nat Protoc* **2**:2734-46.
145. **Ramirez, C. L., J. E. Foley, D. A. Wright, F. Muller-Lerch, S. H. Rahman, T. I. Cornu, R. J. Winfrey, J. D. Sander, F. Fu, J. A. Townsend, T. Cathomen, D. F. Voytas, and J. K. Joung.** 2008. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat Methods* **5**:374-5.
146. **Reik, A., Zhou, Yuanyue, Hamlett, Araceli, Wagner, Jamie, Mendel, Matthew C., Flinders, Colin W., Liu, Ei-Qi, Lee, Gary, Paschon, David E., Rebar, Edward J., Ando, Dale, DiGiusto, David, Gregory, Philip D., Holmes, Michael C., Jensen, Michael, C., .** 2008, May 28-June 1. Zinc Finger Nucleases Targeting the Glucocorticoid Receptor Allow IL-13 Zetakine Transgenic CTLs To Kill Glioblastoma Cells In Vivo in the Presence of Immunosuppressing Glucocorticoids. Sangamo BioSciences, Richmond, CA; Division of Cancer Immunotherapeutics & Tumor Immunology, City of Hope National Medical Center, Duarte, CA, Richmond, CA.
147. **Rijkers, T., J. Van Den Ouweland, B. Morolli, A. G. Rolink, W. M. Baarends, P. P. Van Sloun, P. H. Lohman, and A. Pastink.** 1998. Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* **18**:6423-9.
148. **Roche, M. B.** 2000. Overview of LightCycler Quantification Methods, vol. Techn.Note No. LC 10.
149. **Rouet, P., F. Smih, and M. Jasin.** 1994. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:6064-8.
150. **Rouet, P., F. Smih, and M. Jasin.** 1994. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol* **14**:8096-106.
151. **Russell, D. W.** 2003. AAV loves an active genome. *Nat Genet* **34**:241-2.
152. **Russell, D. W., I. E. Alexander, and A. D. Miller.** 1995. DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:5719-23.
153. **Russell, D. W., and R. K. Hirata.** 1998. Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet* **18**:325-30.
154. **Russell, D. W., R. K. Hirata, and N. Inoue.** 2002. Validation of AAV-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol* **20**:658.
155. **Rutledge, E. A., and D. W. Russell.** 1997. Adeno-associated virus vector integration junctions. *J Virol* **71**:8429-36.
156. **Saleh-Gohari, N., and T. Helleday.** 2004. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res* **32**:3683-8.
157. **Samulski, R. J., A. Srivastava, K. I. Berns, and N. Muzyczka.** 1983. Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV. *Cell* **33**:135-43.
158. **Samulski, R. J., X. Zhu, X. Xiao, J. D. Brook, D. E. Housman, N. Epstein, and L. A. Hunter.** 1991. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *Embo J* **10**:3941-50.
159. **Santiago, Y., E. Chan, P. Q. Liu, S. Orlando, L. Zhang, F. D. Urnov, M. C. Holmes, D. Guschin, A. Waite, J. C. Miller, E. J. Rebar, P. D. Gregory, A. Klug, and T. N. Collingwood.** 2008. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:5809-14.
160. **Schnepp, B. C., R. L. Jensen, C. L. Chen, P. R. Johnson, and K. R. Clark.** 2005. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol* **79**:14793-803.
161. **Schwarzwaelder, K., S. J. Howe, M. Schmidt, M. H. Brugman, A. Deichmann, H. Glimm, S. Schmidt, C. Prinz, M. Wissler, D. J. King, F. Zhang, K. L. Parsley, K. C. Gilmour, J.**

- Sinclair, J. Bayford, R. Peraj, K. Pike-Overzet, F. J. Staal, D. de Ridder, C. Kinnon, U. Abel, G. Wagemaker, H. B. Gaspar, A. J. Thrasher, and C. von Kalle.** 2007. Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. *J Clin Invest* **117**:2241-9.
162. **Segal, D. J., J. T. Stege, and C. F. Barbas, 3rd.** 2003. Zinc fingers and a green thumb: manipulating gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol* **6**:163-8.
163. **Senapathy, P., J. D. Tratschin, and B. J. Carter.** 1984. Replication of adeno-associated virus DNA. Complementation of naturally occurring rep- mutants by a wild-type genome or an ori-mutant and correction of terminal palindrome deletions. *J Mol Biol* **179**:1-20.
164. **Smih, F., P. Rouet, P. J. Romanienko, and M. Jasin.** 1995. Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **23**:5012-9.
165. **Srivastava, A.** 2005. Hematopoietic stem cell transduction by recombinant adeno-associated virus vectors: problems and solutions. *Hum Gene Ther* **16**:792-8.
166. **Starke, G., and P. Hlinak.** 1974. Requirements for the control of a dog kidney cell-adapted live mumps virus vaccine. *J Biol Stand* **2**:143-50.
167. **Stender, S., M. Murphy, T. O'Brien, C. Stengaard, M. Ulrich-Vinther, K. Soballe, and F. Barry.** 2007. Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* **13**:93-9; discussion 99.
168. **Summerford, C., J. S. Bartlett, and R. J. Samulski.** 1999. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* **5**:78-82.
169. **Summerford, C., and R. J. Samulski.** 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* **72**:1438-45.
170. **Symington, L. S.** 2002. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:630-70, table of contents.
171. **Szcepek, M., V. Brondani, J. Buchel, L. Serrano, D. J. Segal, and T. Cathomen.** 2007. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* **25**:786-93.
172. **Tan, I., C. H. Ng, L. Lim, and T. Leung.** 2001. Phosphorylation of a novel myosin binding subunit of protein phosphatase 1 reveals a conserved mechanism in the regulation of actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **276**:21209-16.
173. **Thompson, L. H., and D. Schild.** 2001. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res* **477**:131-53.
174. **Thomson, B. J., F. W. Weindler, D. Gray, V. Schwaab, and R. Heilbronn.** 1994. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* **204**:304-11.
175. **Urnov, F. D., J. C. Miller, Y. L. Lee, C. M. Beausejour, J. M. Rock, S. Augustus, A. C. Jamieson, M. H. Porteus, P. D. Gregory, and M. C. Holmes.** 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435**:646-51.
176. **van Gent, D. C., J. H. Hoeijmakers, and R. Kanaar.** 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* **2**:196-206.
177. **Vargas, J., Jr., G. L. Gusella, V. Najfeld, M. E. Klotman, and A. Cara.** 2004. Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther* **15**:361-72.
178. **Vasileva, A., and R. Jessberger.** 2005. Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting. *Nat Rev Microbiol* **3**:837-47.
179. **Vasileva, A., R. M. Linden, and R. Jessberger.** 2006. Homologous recombination is required for AAV-mediated gene targeting. *Nucleic Acids Res* **34**:3345-60.
180. **Vasquez, K. M., L. Narayanan, and P. M. Glazer.** 2000. Specific mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mice. *Science* **290**:530-3.
181. **Walker, J. R., R. A. Corpina, and J. Goldberg.** 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**:607-14.
182. **Walz, C., A. Deprez, T. Dupressoir, M. Durst, M. Rabreau, and J. R. Schlehofer.** 1997. Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J Gen Virol* **78 (Pt 6)**:1441-52.
183. **Wang, Q., and M. W. Taylor.** 1993. Correction of a deletion mutant by gene targeting with an adenovirus vector. *Mol Cell Biol* **13**:918-27.

184. **Weitzman, M. D., S. M. Young, Jr., T. Cathomen, and R. J. Samulski.** 2003. Targeted integration by adeno-associated virus. *Methods Mol Med* **76**:201-19.
185. **Wendtner, C. M., A. Nolte, E. Mangold, R. Buhmann, G. Maass, J. A. Chiorini, E. L. Winnacker, B. Emmerich, R. M. Kotin, and M. Hallek.** 1997. Gene transfer of the costimulatory molecules B7-1 and B7-2 into human multiple myeloma cells by recombinant adeno-associated virus enhances the cytolytic T cell response. *Gene Ther* **4**:726-35.
186. **Xiao, W., N. Chirmule, S. C. Berta, B. McCullough, G. Gao, and J. M. Wilson.** 1999. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* **73**:3994-4003.
187. **Yan, Z., Y. Zhang, D. Duan, and J. F. Engelhardt.** 2000. Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6716-21.
188. **Yanez-Munoz, R. J., K. S. Balaggan, A. MacNeil, S. J. Howe, M. Schmidt, A. J. Smith, P. Buch, R. E. MacLaren, P. N. Anderson, S. E. Barker, Y. Duran, C. Bartholomae, C. von Kalle, J. R. Heckenlively, C. Kinnon, R. R. Ali, and A. J. Thrasher.** 2006. Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat Med* **12**:348-53.
189. **Yang, C. C., X. Xiao, X. Zhu, D. C. Ansardi, N. D. Epstein, M. R. Frey, A. G. Matera, and R. J. Samulski.** 1997. Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro. *J Virol* **71**:9231-47.
190. **Yang, J., W. Zhou, Y. Zhang, T. Zidon, T. Ritchie, and J. F. Engelhardt.** 1999. Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. *J Virol* **73**:9468-77.
191. **You, H., Y. Liu, C. K. Prasad, N. Agrawal, D. Zhang, S. Bandyopadhyay, H. Liu, H. H. Kay, J. L. Mehta, and P. L. Hermonat.** 2006. Multiple human papillomavirus genes affect the adeno-associated virus life cycle. *Virology* **344**:532-40.

9 Anhang

9.1 Publikationen

Radecke, F., Peter, I., Radecke, S., Gellhaus, K., Schwarz, K., and T. Cathomen. 2006. Targeted chromosomal gene modification in human cells by single-stranded oligodeoxynucleotides in the presence of a DNA double-strand break. *Mol Ther* **14**:798-808.

Gellhaus, K., Cornu, T., Heilbronn, R. and T. Cathomen. (in Vorbereitung)
The fate of AAV genomes during DNA double strand induced AAV mediated gene targeting.

Gellhaus, K., Bednarski, C., Heilbronn, R. and T. Cathomen. (in Vorbereitung)
Zinc-finger nuclease induced gene targeting using AAV vectors.

Rahman, S., Gellhaus, K. and T. Cathomen. (in Vorbereitung)
Cytostatic drugs enhance AAV-mediated gene targeting.

9.2 Poster

Gellhaus, K., Cornu, T. and Cathomen, T. (2006). Risk-assessment of AAV-mediated gene targeting. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie*, Düsseldorf

Gellhaus, K., Bednarski, C., Heilbronn, R. and Cathomen, T. (2008). Zinc-finger nuclease induced gene targeting using AAV vectors. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie*, Berlin

Gellhaus, K., Cornu, T., Bednarski, C., Heilbronn, R. and Cathomen, T. (2008). Zinc-finger nuclease induced gene targeting using AAV vectors. *Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Gentherapie*, Brügge, Belgien

9.3 Vorträge und Abstracts

Gellhaus, K., Cornu, T. and Cathomen, T. (2007). Risk-assessment of AAV-mediated gene targeting. *Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Gentherapie*, Rotterdam, Niederlande

Gellhaus, K., Cornu, T. and Cathomen, T. (2007). Risk-assessment of AAV-mediated gene targeting. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie*, Heidelberg

Gellhaus, K., Cornu, T. and Cathomen, T. (2008). The fate of AAV vector genomes during DNA double-strand break induced gene targeting. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie*, Berlin

9.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich während meiner Dissertationszeit begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Toni Cathomen für die Bereitstellung und die stetige Betreuung meines Dissertationsthemas.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Tatjana Cornu bedanken, die mich fortwährend, vor allem aber in schwierigeren Situationen, motiviert und unterstützt hat.

Bei Herrn Dr. Klaus Schwarz und Herrn Dr. Frank Radecke bedanke ich mich für die gute kooperative Zusammenarbeit.

Ein weiteres Dankeschön geht an Frau Prof. Dr. Regine Heilbronn und Herrn Dr. Stefan Weger, für ihre Bereitschaft sich mit meinen wissenschaftlichen Problemen auseinander zu setzen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei all denjenigen Freunden, Bekannten und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Cathomen und Heilbronn für ihre Hilfsbereitschaft und ihre moralische Unterstützung bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir während dieser Zeit immerwährend zur Seite standen.