

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1.	Viren	1
1.2.	Parvoviren.....	2
1.2.1.	Morphologie und Eigenschaften	2
1.2.2.	Systematik	2
1.3.	Adeno-assoziierte Viren	3
1.3.1.	Vorkommen und Risikobewertung	3
1.3.2.	Lebenszyklus	4
1.3.3.	Genomstruktur.....	6
1.3.4.	Transkription	8
1.3.5.1.	Regulatorische Elemente.....	8
1.3.5.2.	Transkription während latenter Infektion.....	9
1.3.5.3.	Transkription während produktiver Infektion.....	9
1.3.6.	Helferfunktionen	10
1.3.7.	DNA Replikation	12
1.3.7.1.	Elemente des AAV-Replikationsursprungs und deren Funktion.....	14
1.3.8.	Latenz und ortsspezifische Integration	16
1.3.8.1.	Elemente im Chromosom 19.....	16
1.3.8.2.	Elemente von AAV	17
1.3.8.3.	Rolle von Rep.....	17
1.3.8.4.	Ortsspezifische Integration von rAAV	18
1.3.8.5.	Integrationsmodell.....	19
1.3.9.	Veränderungen der biologischen Eigenschaften der Wirtszellen	23
1.3.10.	Effekte einer AAV-Infektion auf heterologe Virusreplikation und heterologe Promotoren.....	23
1.3.11.	Tumorprotektive Wirkung von AAV	24
1.3.12.	AAV als Gentherapievektor	25
1.4.	Quantitative PCR	28
1.4.1.	Grundlagen der Quantifizierung.....	28
1.4.1.1.	Methoden der Quantifizierung	28
1.4.1.2.	Endpunktanalyse	28
1.4.1.3.	Prinzipien der kinetischen Quantifizierung.....	29
1.4.2.	Das LightCycler PCR Analysesystem	30
1.4.2.1.	Das LightCycler Instrument	30
1.4.2.2.	Detektionsformate	30
1.4.2.3.	Standardkurve und Quantifizierung mit der LightCycler Software.....	32
1.5.	Zielsetzung.....	33

2.	MATERIAL	34
2.1.	Geräte.....	34
2.2.	Chemikalien, Lösungen und Puffer	34
2.3.	Enzyme	35
2.4.	Fertige Reaktionssysteme (Kits).....	35
2.5.	Oligonukleotide	36
2.6.	Plasmide.....	37
2.8.	Bakterienstämme	38
2.9.	Zelllinien.....	38
2.10.	Viren	38
2.11.	Computerprogramme	39
3.	METHODEN.....	40
3.1.	Zellbiologische Methoden	40
3.1.1.	Zellkultivierung.....	40
3.1.2.	Herstellung von Adenovirus Stocks.....	40
3.1.3.	Bestimmung des Titers infektiöser Adenoviren.....	40
3.1.4.	Präparation von AAV-2 Stocks und rAAV Vektorstocks.....	41
3.1.5.	Aufreinigung der Virusstocks	42
3.1.5.1.	Benzonasebehandlung.....	42
3.1.5.2.	Iodixanol-Dichtegradient	42
3.1.5.3.	Heparin-Affinitätschromatographie	43
3.1.5.4.	Dialyse.....	44
3.1.6.	Titration von AAV- und rAAV-Stocks.....	44
3.1.7.	Infektion von Zellen mit AAV-2.....	45
3.2.	Molekularbiologische Methoden.....	46
3.2.1.	Modifikation und Rekombination von DNA	46
3.2.2.	Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen.....	46
3.2.3.	Isolierung von DNA aus Virusstocks.....	47
3.2.4.	Vorbereitung der DNA für die PCR.....	47
3.2.4.1.	Restriktionsverdau.....	47
3.2.4.2.	RNase Verdau	47
3.2.4.5.	Reinigung	48
3.2.5.	Nested PCR-Assay	48
3.2.6.	Southern Blot	49
3.2.7.	Nicht-radioaktive Markierung von DNA	49
3.2.8.	Hybridisierung von DNA auf Nylonmembranen.....	49
3.2.9.	Real time PCR-Assay zum Nachweis ortsspezifischer Integration.....	50
3.2.9.1.	Nachweis der Fusionssequenzen von Chromosom 19 mit der cap-nahen (rechten) ITR.....	51
3.2.9.2.	Nachweis der Fusionssequenzen von Chromosom 19 mit der rep-nahen (linken) ITR.....	53
3.2.10.	Klonierung der PCR Produkte.....	53
3.2.11.	Analyse der PCR Produkte.....	54

3.2.12.	Kontrolle der Effizienz des Benzonaseverdauschnittes bei der Reinigung von Virusstocks	55
4.	ERGEBNISSE	56
4.1.	Kinetik und Frequenz der ortsspezifischen Integration von AAV-2 in Chromosom 19	56
4.1.1.	Detektion von Fusionssequenzen von Chromosom 19 mit der <i>cap</i> -nahen (rechten) AAV-ITR	56
4.1.1.1.	Etablierung eines sensitiven, quantitativen real time PCR-Assays	56
4.1.1.2.	Kinetik der Integration von AAV in Chr. 19-AAVS1	60
4.1.1.3.	Analyse der PCR Produkte	61
4.1.1.4.	Vergleich der Amplifikationseffizienzen von Standard und Proben unterschiedlicher Fragmentlänge	64
4.1.2.	Detektion von Fusionssequenzen von Chromosom 19 mit der <i>rep</i> -nahen (linken) AAV-terminalen Repetition	66
4.1.2.1.	Etablierung eines sensitiven, quantitativen real time PCR-Assays	66
4.1.2.2.	Kinetik der Integration von AAV mit der anderen Orientierung bezüglich AAVS1	69
4.1.2.3.	Sequenzanalyse der PCR-Produkte	70
4.1.3.	Integrationsfrequenz pro Zelle	72
4.1.4.	Integrationsfrequenz in Abhängigkeit der Multiplizität der Infektion (MOI)	73
4.1.5.	Ortspezifische Integration von Vektorplasmiden und rAAV-Vektoren	75
4.2.	Verpackung von Chromosom 19-Integrationsstellen in AAV-Virionen während der Virusproduktion	78
4.2.1.	Nachweis von ITR/AAVS1-Fusionssequenzen in verschiedenen Proben durch PCR-Analyse	78
4.2.2.	Sequenzanalyse der ITR/AAVS1-Fusionssequenzen	79
4.2.3.	Demonstration der Effizienz des Benzonaseschrittes während der Virusreinigung	81
4.2.4.	Detektion von ITR/AAVS1-Fusionssequenzen in verschiedenen AAV-Wildtyp- und rAAV-Vektorpräparationen	83
5.	DISKUSSION	85
5.1.	Charakterisierung der ortsspezifischen Integration von AAV-2 in das humane Chromosom 19	85
5.1.1.	Kinetik der ortsspezifischen Integration von AAV-2	85
5.1.2.	Chromosom 19-Integrationsorte nichtselektierter Zellen, Zelllinien und episomal EBV-Plasmid tragender Zellen	87
5.1.3.	Vergleich der Ergebnisse des linke ITR-spezifischen und rechte ITR-spezifischen Assays	89
5.1.4.	Integrationsfrequenz pro Zelle und pro infektiöser Einheit	90
5.1.5.	Integration von AAV-Vektoren	92
5.1.6.	Anwendungsmöglichkeiten der real time PCR-Assays und Ausblick	95

5.2.	Verpackung von humanen Chr.19-Sequenzen in AAV-Virionen während der Virusproduktion.....	97
5.2.1.	Vergleich der unter permissiven Bedingungen generierten Fusionssequenzen mit in Abwesenheit von Helfervirus generierten Fusionssequenzen.....	97
5.2.2.	Modell der ortsspezifischen Integration	97
5.2.3.	Möglicher Mechanismus der Generierung von Fusionssequenzen während einer produktiven Infektion.....	99
5.2.4.	Konsequenzen für die Gentherapie und für die rAAV-Vektorproduktion.....	101
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	102
7.	ANHANG.....	115
7.1.	Zusammenfassung	115
7.2.	Summary	117
7.3.	Lebenslauf.....	119
7.4.	Publikationen, Poster, Vorträge.....	120
7.4.1.	Publikationen.....	120
7.4.2.	Poster und Abstracts.....	120
7.4.3.	Vorträge.....	121
7.5.	Danksagung	122