

4. ERGEBNISSE

4.1. Kinetik und Frequenz der ortsspezifischen Integration von AAV-2 in Chromosom 19

Bei Abwesenheit von Helferfunktionen etabliert AAV-2 Latenz durch Integration in das humane Genom. Die Integration erfolgt mit hoher Spezifität auf Chromosom 19 (19q13.3-qter) in einen als AAVS1 bezeichneten Ort. Die Ortspezifität wird durch die großen AAV-Rep-Proteine vermittelt. Die Kinetik der Integration war im Wesentlichen unbekannt. Bisherige Daten zu Frequenzen beruhten auf der Analyse expandierter und meist selektierter Zellklone.

Ortspezifische Integration kann durch Amplifikation von Chr. 19/ITR-Fusionssequenzen nachgewiesen werden. Um die Integration zu quantifizieren, wurde ein sensitiver quantitativer real time PCR-LightCycler-Assay etabliert.

4.1.1. Detektion von Fusionssequenzen von Chromosom 19 mit der *cap*-nahen (rechten) AAV-ITR

Die AAV an beiden Seiten flankierenden ITR sind identisch. Eine Differenzierung zwischen den beiden möglichen Orientierungen, mit denen AAV in Bezug auf AAVS1 integrieren kann, ist durch geeignete Wahl der ITR-spezifischen Primer möglich. Hier wurde der Primer so gelegt, daß er mit Sequenzen überlappt, die für die *cap*-nahe (rechte) AAV-Seite einzigartig sind.

4.1.1.1. Etablierung eines sensitiven, quantitativen real time PCR-Assays

Aus einer Reihe von Primern wurde mit Hilfe einer „nested PCR“ diejenige Kombination ausgewählt, die die höchste Sensitivität und die geringsten Hintergrundsignale ergab.

Der AAVS1-Primer wurde so gewählt, daß er hinter der Region mit den am meisten publizierten Integrationsstellen lag und somit möglichst viele Integrationsereignisse erfassen konnte.

Die Variabilität der exakten Chr. 19-Integrationsstellen führt zu PCR-Amplifikaten unterschiedlicher Länge. Aus diesem Grund mußte ein Detektionsformat eingesetzt werden,

das längenunabhängig ist. Die LightCycler-Technologie stellt ein solches Format zur Verfügung, nämlich das der Hybridisierungssonden. Dieses Format bietet außerdem den Vorteil einer zusätzlichen Sequenzspezifität während der Detektion. Beide Detektionssonden wurden nahe dem AAVS1-Amplifikationsprimer, jedoch auf dem Gegenstrang positioniert (Abb. 4.1.). Die optimalen PCR-Parameter wurden mit Hilfe eines Standardplasmides (siehe 4.1.1.1.1.) ausgetestet. Um auch lange Fragmente gleichmäßig kuzuamplifizieren, wurde die Elongationszeit wesentlich länger gewählt, als für die Amplifikation des Plasmidfragmentes nötig gewesen wäre.

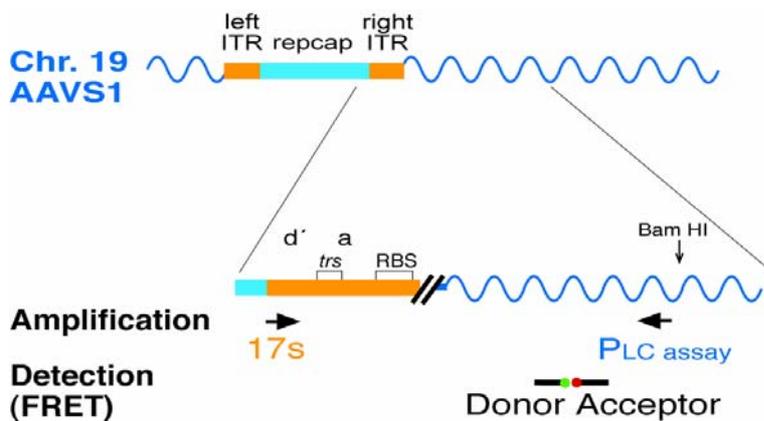


Abb. 4.1. Real time PCR-Assay zur Quantifizierung ortspezifischer Integration. AAV-Elemente sind als Kästchen in orange und hellblau dargestellt. Amplifikation, Detektion und Quantifizierung der ortspezifischen Integrationsereignisse erfolgte mit dem LightCycler Analysesystem. *trs*: terminal resolution site (=Ort der terminalen Auflösung der T-Struktur des ITR), RBS: Rep-Bindungsstelle. Die Primer, die zur Amplifikation der ITR/AAVS1-Fusionssequenzen benutzt wurden, sind durch Pfeile symbolisiert. Zusätzliche Sequenzspezifität liefern die zur Detektion verwendeten Hybridisierungssonden. Die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sonden kommen durch Hybridisierung an die amplifizierten PCR-Produkte in räumliche Nähe, wodurch ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) stattfinden kann. Die dann vom Akzeptor-Farbstoff emittierte Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge an Amplifikaten.

4.1.1.1.1. Klonierung des Standardplasmides zur Quantifizierung

Das Plasmid pAAVS1-TR wurde aus drei Plasmiden kloniert (siehe 2.6.). Es trägt eine künstliche Fusionssequenz aus der AAV-ITR und Chr. 19-AAVS1 und sollte in linearisierter Form als Standard zur Quantifizierung der Integrationsereignisse dienen. Die Konzentration der Plasmidlösung wurde über die Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt. Auf die Kopiezahl pro Volumeneinheit wurde, wie unter 3.2.9.1.1. beschrieben, umgerechnet.

4.1.1.1.2. Optimierung der PCR und Erstellung der Standardgeraden

Um die optimale Annealingtemperatur zu finden, wurde zuerst mit dem SYBR-Green-Detektionsformat gearbeitet. Da dieses Format sequenzunspezifisch detektiert, ist es möglich, mittels Schmelzpunktanalyse die tatsächliche Schmelztemperatur der Primer zu bestimmen

und im Verlauf der Amplifikation auftretende Primerdimere sowie unspezifische Reaktionsprodukte zu erkennen. Im nächsten Schritt wurden die Hybridisierungs sondens zur Detektion eingesetzt. Es wurde durch Amplifikation von 10^4 Kopien des Standardplasmides die optimale $MgCl_2$ -Konzentration des PCR-Gemisches bestimmt. Anschließend wurde durch Verwendung sehr niedriger Plasmid-Kopienzahlen und Zugabe genomischer DNA nichtinfizierter Zellen als Hintergrund die Annealingtemperatur ermittelt, bei der bei ausreichender Spezifität die Sensitivität noch zufriedenstellend war (Feineinstellung der Annealingtemperatur). Mit diesen optimierten PCR-Parametern wurde eine Standardgerade erstellt. Dazu wurde genomische DNA nichtinfizierter Zellen mit verschiedenen Verdünnungen des Standardplasmides versetzt (10 bis 10^5 Kopien pro Reaktion), mittels herkömmlicher PCR präamplifiziert und mit der real time LightCycler PCR analysiert. Die Standardgerade war im Bereich von 10^2 bis 10^5 Kopien linear.

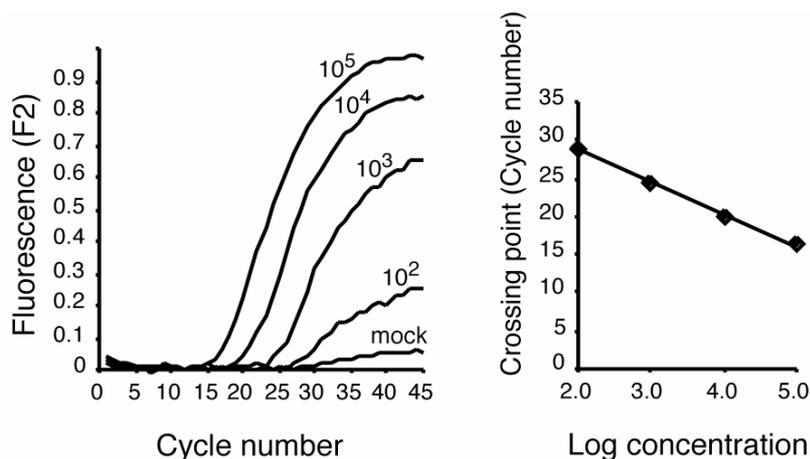


Abb. 4.2. Erstellung einer Standardgeraden. (A) Rohdaten der LightCycler-Analyse von $1 \mu g$ HeLa-DNA, die mit bekannten Kopiezahl des Standardplasmides pAAVS1-TR versetzt wurde. (B) Die Standardgerade wurde durch Korrelation der gemessenen „crossing points“ mit den Logarithmen der bekannten Konzentrationen (Kopien von pAAVS1-TR pro Reaktion) erstellt.

4.1.1.1.3. Überprüfung der Spezifität des PCR-Assays

Die Durchführung einer Reihe von Negativkontrollen sollte die Spezifität des Assays für ITR/Chr. 19-Fusionssequenzen dokumentieren. So wurde genomische DNA nichtinfizierter Zellen und Adenovirus-infizierter Zellen analysiert. Es wurden keine Signale detektiert. Ein Gemisch von Plasmiden, die jeweils eine Primerbindungsstelle tragen, wurde als Template eingesetzt, um ein mögliches Wechseln des Templatestranges durch die Polymerase und somit eine Generierung von PCR-Produkten in Abwesenheit echter Fusionssequenzen auszuschließen. Um die Spezifität des Assays für neu entstandene ITR/Chr. 19-Fusionssequenzen zu belegen, wurde DNA AAV-infizierter Zellen (72 h p.i.) mit nur einem

der beiden Primer amplifiziert. Auch hier wurden keine PCR-Produkte detektiert, wohingegen die Kombination beider Primer die erwartete Zahl Kopien an Fusionssequenzen reproduzierte. Damit wurde eine falschpositive Detektion von aberranten Fragmenten mit identischen Primerbindungsstellen an beiden Enden, die potentiell durch Rearrangierungen chromosomaler Sequenzen nach AAV-Infektion entstehen könnten, ausgeschlossen.

Probe	Verwendete Primer	DNA-Menge in der PCR	Kopien Fusionssequenzen
Mock-infizierte Zellen	P LCassay + 17s	1 µg	0
AAV-infizierte Zellen			
72 Stunden p.i. ^a	P LCassay	1 µg	0
72 Stunden p.i. ^a	17s	1 µg	0
72 Stunden p.i.	P LCassay + 17s	1 µg	5865 ±649
Ad-2-infizierte Zellen	P LCassay + 17s	1 µg	0
Plasmide pRVK + pTAV2-0 ^b	PAAVS1 + PITR	Je 10 ⁵ Kopien	0

^a Die 72 Stunden p.i. Probe (siehe Abb. 4.3.) wurde mit nur einem Primer wie angegeben analysiert.

^b Das AAVS1-tragende Plasmid pRVK und das AAV-2 Wildtyp tragende Plasmid pTAV2-0 wurden gemeinsam in je 10⁵ Kopien zur PCR-Reaktion gegeben. Diese Kopiezahl entspricht der Anzahl der Genomäquivalente pro µg HeLa-DNA.

Tabelle 4.1. Spezifität des real-time PCR-Assays für die Detektion von ITR/Chr. 19-Fusionssequenzen

4.1.1.2. Kinetik der Integration von AAV in Chr. 19-AAVS1

Um den Verlauf der ortsspezifischen Integration von AAV-2 in AAVS1 zu untersuchen, wurden HeLa Zellen mit AAV-2 mit einer MOI von 500 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde von drei Zellkulturschalen unabhängig genomische DNA extrahiert. Mit Hilfe des real-time PCR-Assays wurden die Proben auf ortsspezifische Integration analysiert. Die Quantifizierung der Proben erfolgte durch Vergleich mit einer Standardkurve, die im gleichen PCR-Lauf generiert wurde. Zwischen 8 h und 16 h nach der Infektion wurde ortsspezifische Integration detektierbar. Ein Maximum an Integration wurde nach 96 h p.i. erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden 6353 ± 524 Kopien Fusionssequenzen/ μg genomischer DNA detektiert. Zwei Wochen nach der Infektion ging der Prozentsatz an Zellen, die Integration trugen, leicht zurück.

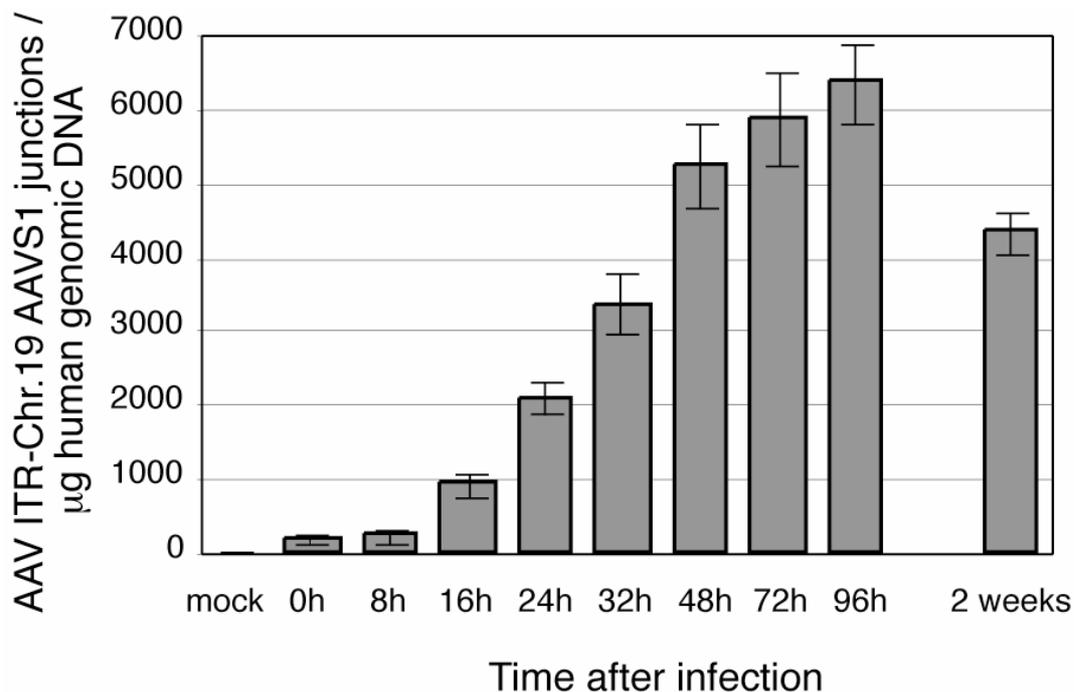


Abb. 4.3. Kinetik der ortsspezifischen Integration von AAV-2. Die Kopiezahlen der ITR/AAVS1-Fusionssequenzen pro Mikrogramm DNA AAV-infizierter HeLa-Zellen wurden durch Vergleich mit mitgeführten Standards ermittelt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Kulturen.

4.1.1.3. Analyse der PCR Produkte

4.1.1.3.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden Agarose-gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Variabilität der Integrationsorte auf Chr. 19 führt zu unterschiedlichen Fragmentlängen. Das beobachtete schmierartige Fragmentgemisch war deshalb erwartet worden. Die Abwesenheit dominierender Banden unterstreicht die Fähigkeit des PCR-Assays, Fusionssequenzen unterschiedlichster Chr. 19-Integrationsorte ohne Selektion zu koamplifizieren. Das Vorhandensein von größeren Fragmenten zeigt außerdem, daß auch weiter vom Chr. 19-Primer entfernt, also näher an der Rep-Bindestelle liegende Integrationsereignisse gut erfaßt wurden.

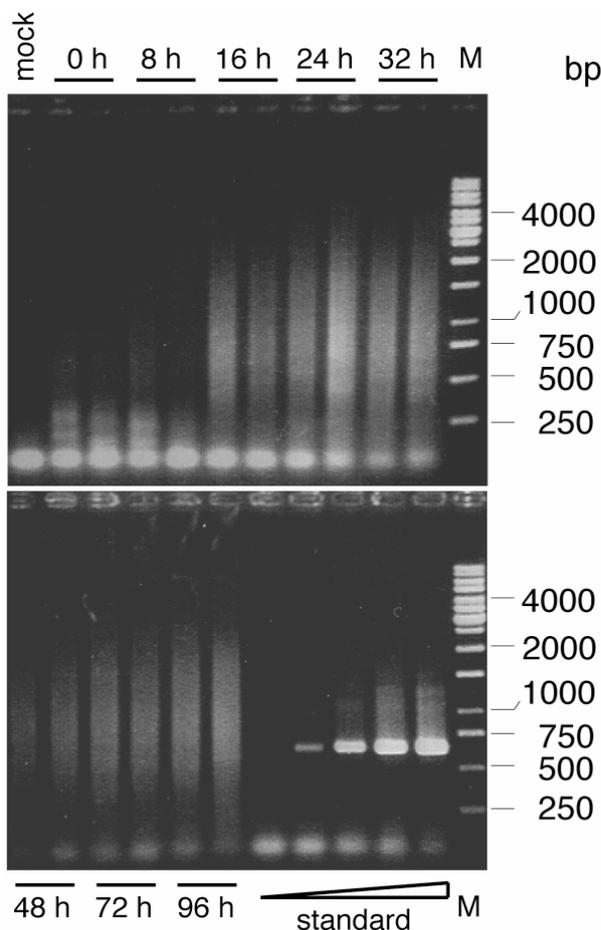


Abb. 4.4. Die LightCycler PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% igen Agarosegel analysiert. Als Standard wurden 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 bzw. 10^5 Kopien des Plasmides pAAVS1-TR mit je $1\mu\text{g}$ HeLa-DNA eingesetzt. M: DNA-Fragmentgrößenmarker

4.1.1.3.2. *Klonierung und Sequenzanalyse*

Um die Struktur der amplifizierten Fusionssequenzen und die genauen Integrationsorte zu ermitteln, sollten die PCR-Produkte sequenziert werden. Zusätzlich konnte so die eigentliche Amplifikationsreaktion unabhängig von der sequenzspezifischen Detektion charakterisiert werden. Dazu wurden die PCR-Produkte der 96 h-Probe, wie in Material und Methoden beschrieben, in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Von 13 zufällig ausgewählten Kolonien wurde Plasmid-DNA isoliert und durch einen *EcoRI*-Verdau das PCR-Insert freigesetzt. Die gelelektrophoretische Analyse bestätigte wiederum die Variabilität der Fragmentlängen.

Von 10 Klonen wurde die Nukleotidsequenz bestimmt. Jeder Klon wies eine individuelle Sequenz mit spezifischen Bruchpunkten in der AAV- und AAVS1-Sequenz auf. Der Bruchpunkt der AAV-Sequenz lag bei der Mehrheit der Klone im a-Element der ITR. Bei den Klonen 1, 2 und 13 war zusätzlich noch das b-Element vorhanden, was auf eine „flop“-Orientierung der ITR hinweist. Die Bruchpunkte in der Chr. 19-Sequenz variierten, wie von publizierten Daten her erwartet, in einem Bereich von mehreren hundert Basenpaaren. Die sequenzierten Fusionssequenzen gaben keinen Hinweis auf Umordnungen der Chr. 19- oder der AAV-Sequenz. Keines der 10 analysierten PCR-Inserts zeigte fremde Sequenzen, die weder AAV noch dem Chr.19-Integrationsort zuzuordnen waren.

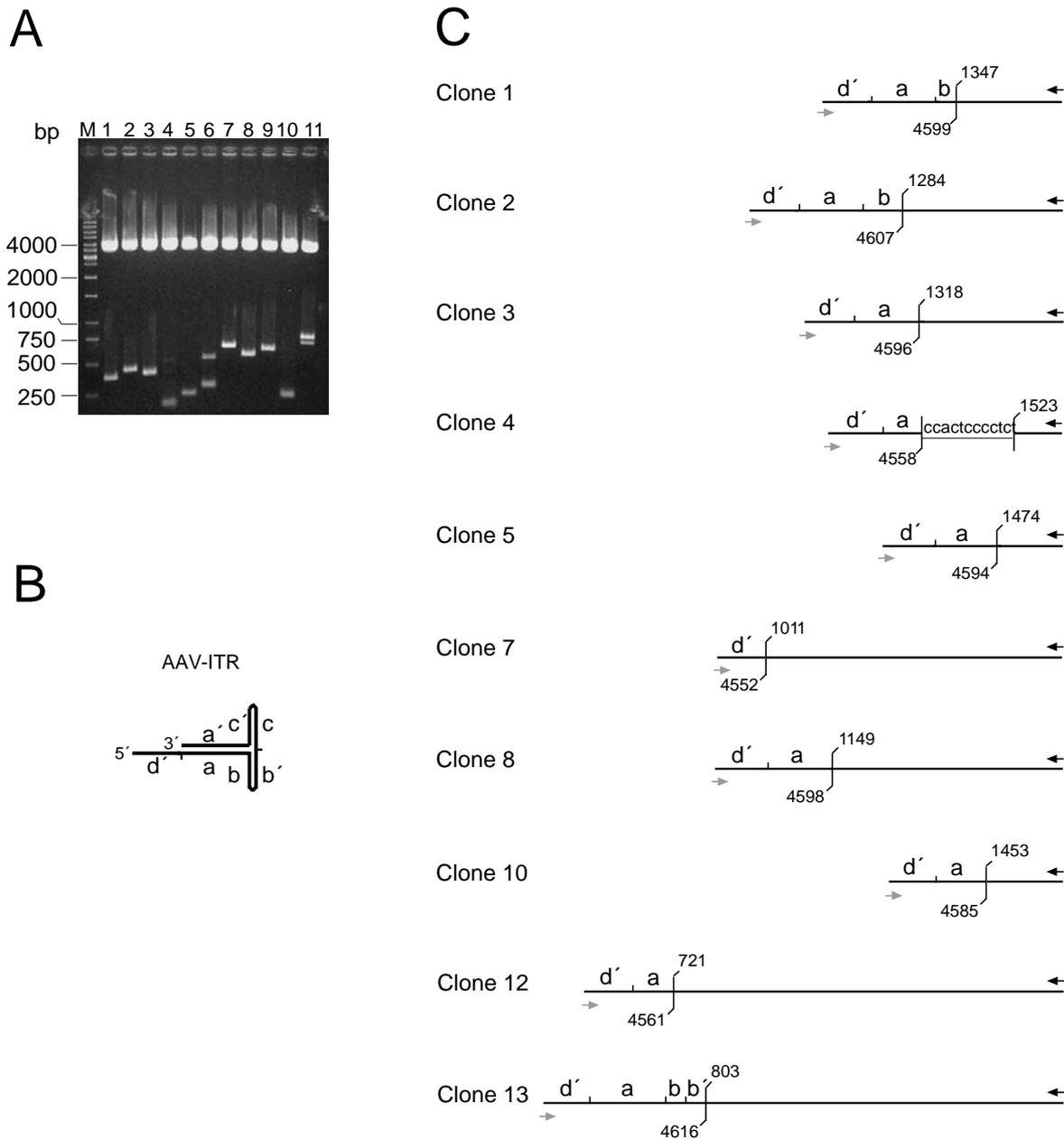


Abb. 4.5. Analyse der PCR-amplifizierten AAV-ITR/Chr. 19-Fusionssequenzen. Die PCR-Fragmente der 96 h-Probe (Abb. 4.3. und 4.4.) wurden kloniert. Von zufällig ausgewählten Klonen wurde DNA isoliert. (A) Der EcoRI-Verdau setzt das PCR-Fragment frei. Die Agarosegelelektrophorese visualisiert die Variabilität der Fragmentlängen. (B) Haarnadelstruktur der AAV-ITR in „flop“-Orientierung. Die Buchstaben (a, b, c...) repräsentieren palindromische Sequenzelemente der AAV-ITR. (C) Von der DNA-Sequenz abgeleitete Strukturen der klonierten Fusionssequenzen. Die Nummerierung der Klone entspricht der Nummer der Spur in (A). Rechts ist die Chr. 19-Sequenz mit der Bindestelle des Primers PLCassay (schwarzer Pfeil), links die AAV-ITR-Sequenz mit der Bindestelle des Primers 17s (grauer Pfeil) dargestellt. Die Positionen der letzten eindeutig zuzuordnenden viralen oder zellulären Nukleotide sind nach der publizierten Nomenklatur (Kotin, Linden, and Berns, 1992; Srivastava, Lusby, and Berns, 1983) angegeben. Sequenzen, die mit AAV und Chr. 19 überlappen, sind unterstrichen.

4.1.1.4. Vergleich der Amplifikationseffizienzen von Standard und Proben unterschiedlicher Fragmentlänge

Eine Quantifizierung durch Vergleich mit einem Standard führt nur dann zu einem richtigen Ergebnis, wenn Standard und Probe mit annähernd gleicher Effizienz amplifiziert werden.

Anhand der Standardgeraden läßt sich die Effizienz der PCR-Amplifikation ermitteln. Eine PCR-Reaktion läßt sich anhand der Formel $N=N_0 \times E^n$ beschreiben, wobei N die Zahl der amplifizierten Moleküle, N_0 die Ausgangsmolekülzahl, E die Amplifikationseffizienz und n die Zykluszahl angibt. Die optimale Amplifikationseffizienz $E=2$ gibt den theoretischen Fall an, daß jedes PCR-Produkt einmal pro Zyklus amplifiziert wird. In der Praxis ist $E < 2$. E ist besonders bei Erreichen der Plateauphase eine variable Größe. Während der logarithmischen Phase ist E jedoch konstant, so daß sich die Gleichung $N=N_0 \times (E_{\text{konst}})^n$ ergibt. Für zwei verschiedene Ausgangsmolekülzahlen lassen sich demnach zwei Gleichungen aufstellen: $N_2=N_{0,2} \times E^{n_2}$ und $N_3=N_{0,3} \times E^{n_3}$. Man kann annehmen, daß die Fluoreszenzsignale bei einer gemeinsamen Zahl an amplifizierten Molekülen $N=N_2=N_3$ aus dem Hintergrund heraustreten. Der Zyklus, bei dem dies geschieht, wird als crossing point bezeichnet. Je kleiner die Ausgangsmolekülzahl, desto größer ist der crossing point. Setzt man $N_2=N_3$ erhält man $N_{0,2}/N_{0,3} = E^{(n_3-n_2)} = E^{\Delta n}$. Δn entspricht dann der Differenz der crossing points. Bei einer 10-fach Verdünnung ist $N_{0,2}=10 \times N_{0,3}$. Damit ist $10=E^{\Delta n}$ bzw. $\log 10 = \log E \times \Delta n$. Durch Umformung der Gleichung läßt sich die Effizienz der PCR-Reaktion berechnen nach $E=10^{1/\Delta n}$.

Für die Standardgerade werden die gemessenen crossing points gegen die bekannten Logarithmen der Ausgangsmolekülzahlen aufgetragen. Die Standardgerade kann somit nach der Gleichung $n = \text{Anstieg} \times \log N_0 + (\text{Abschnitt auf der y-Achse})$ beschrieben werden. Der Anstieg ist negativ und folglich $= -\Delta n / \Delta \log N_0$. Bei einer 10-fach Verdünnung ist $\log N_{0,2} - \log N_{0,3} = 1$, womit der Anstieg der Standardgeraden $= -\Delta n$ ist. Eingesetzt in obige Gleichung läßt sich also die Effizienz der PCR-Reaktion anhand des Anstiegs der Standardgeraden nach der Gleichung $E=10^{-1/\text{Anstieg}}$ berechnen. Ein Anstieg von $-3,32$ beschreibt eine Reaktion mit der theoretisch maximalen Effizienz von 2.

Die Effizienz der PCR könnte besonders bei längeren Amplifikaten niedriger sein. Da aufgrund der Variabilität der Integrationsstellen die Proben sehr heterogen sind, wurden die Amplifikationseffizienzen von unterschiedlichen Fragmentlängen getestet. Dazu wurden Verdünnungsreihen (10^3 bis 10^6 Kopien/Reaktion) klonierter Fusionssequenzen von 265 bp bzw. 622 bp Länge angesetzt und zusammen mit Verdünnungen des Standards gemessen. Durch Definition ausgewählter Proben als Standard wurden mit Hilfe der LightCycler-

Software drei Standardgeraden erstellt. Über den Anstieg der Standardgeraden wurden die Effizienzen der Amplifikationen berechnet. Die Effizienzen waren 1,78 bzw. 1,74 und damit mit der Effizienz des Standardplasmides (667 bp) $E=1,77$ identisch. Zusätzlich wurde die 96 h-Probe in 1:3-er Schritten verdünnt. Die Effizienz lag hier bei 1,74.

4.1.2. Detektion von Fusionssequenzen von Chromosom 19 mit der *rep*-nahen (linken) AAV-terminalen Repetition

In den bisherigen Experimenten zur ortsspezifischen Integration wurde ein Primer verwendet, der mit Sequenzen hybridisiert, die nur am rechten Ende von AAV zu finden sind. Deshalb wurden nur Fusionssequenzen erfaßt, die die rechte ITR enthalten. Um nun die Kinetik und Frequenz der Integration von AAV in der anderen Orientierung bezüglich AAVS1 zu untersuchen und mit den bisher erhaltenen Daten zu vergleichen, wurde ein Assay etabliert, der die linke ITR enthaltende Fusionssequenzen erfaßt.

4.1.2.1. Etablierung eines sensitiven, quantitativen real time PCR-Assays

Für die Amplifikation der ITR/Chr. 19-Fusionssequenzen wurden neue Primer entworfen. Der ITR-spezifische Primer (AAV-2LTR) hybridisiert mit Sequenzen, die für das linke Ende von AAV charakteristisch sind. Der AAVS1-spezifische Primer (IntegrAAVS1) hybridisiert an gleicher Position wie der AAVS1-spezifische Primer des rechten Assays, ist nur etwas länger. Die Hybridisierungssonden zur Detektion wurden beibehalten.

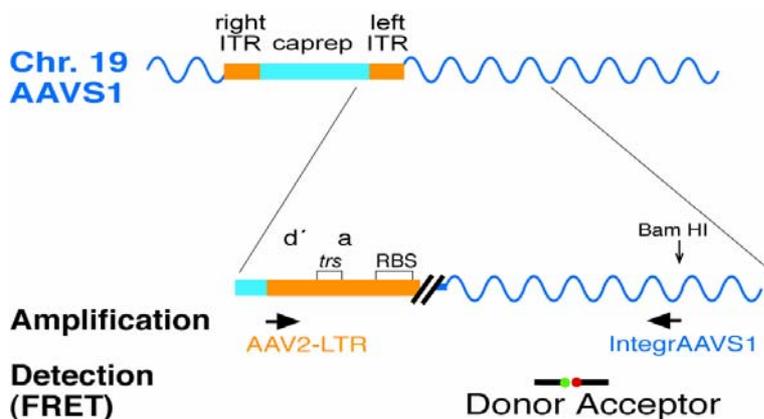


Abb 4.6. Real-time PCR-Assay zur Detektion von Fusionssequenzen des linken AAV-ITR mit Chr. 19-AAVS1. Chr. 19 ist als Wellenlinie dargestellt. Die AAV-Elemente sind als Kästchen in orange und hellblau abgebildet. Nukleotidposition 1 befindet sich auf der rechten Seite, Nukleotidposition 4647 auf der linken Seite. *trs*: terminal resolution site (=Ort der terminalen Auflösung der T-Struktur des ITR), RBS: Rep-Bindungsstelle. Die Amplifikationsprimere sind durch Pfeile dargestellt. Durch Hybridisierung der Detektionssonden an die Amplifikationsprodukte werden die an die Sonden gekoppelten Farbstoffe in räumliche Nähe gebracht und es kommt zu einem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).

4.1.2.1.1. Klonierung des Standardplasmides zur Quantifizierung

Das Standardplasmid pAAVS1-LTR wurde aus dem AAV-2-tragenden Plasmid pTAV2-0, dem AAVS1-tragenden Plasmid pRVK und einem als Vektor dienenden Plasmid, wie in Material und Methoden beschrieben, kloniert. Es enthält eine künstliche Fusionssequenz aus dem linken ITR von AAV und Chr. 19-AAVS1. Ein Teil einer Plasmid-Midipräparation wurde linearisiert und mittels Adsorptionschromatographie (Spin Kit, Qiagen) gereinigt. Über die Messung der optischen Dichte bei 260 nm wurde auf die Kopiezahl pro Volumeneinheit der DNA-Lösung geschlossen (Rechnung siehe unter 4.1.1.1.1.).

4.1.2.1.2. Optimierung der PCR und Erstellung der Standardgeraden

Das existierende PCR-Protokoll für den Assay, der für die rechte ITR spezifisch ist, wurde an die neuen Bedingungen adaptiert. Mit Hilfe des Standardplasmides wurde zuerst die $MgCl_2$ -Konzentration des PCR-Reaktionsgemisches austitriert und anschließend die optimale Annealingtemperatur ermittelt. Die sonstigen Parameter blieben unverändert.

Von dem Standardplasmid wurde eine Verdünnungsreihe mit 10^2 bis 10^6 Kopien pro Reaktion hergestellt und eine Standardgerade erstellt.

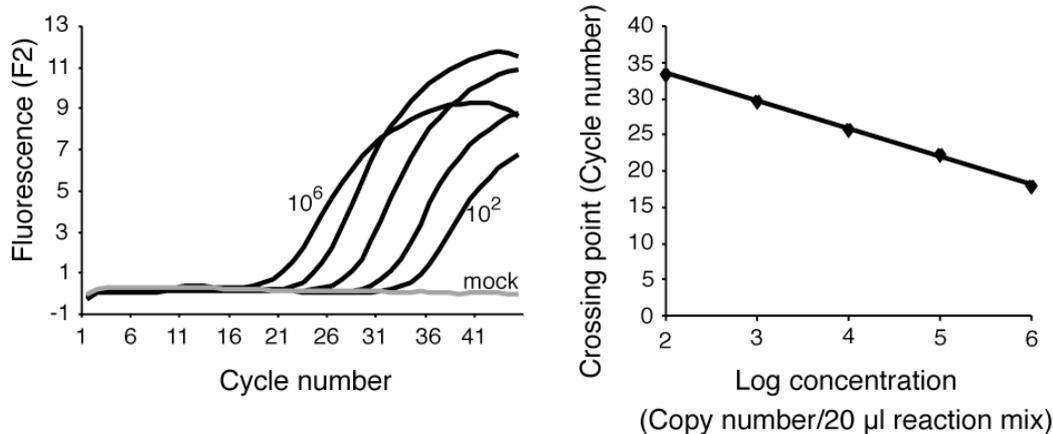


Abb. 4.7. LightCycler-Analyse von 1 µg HeLa-DNA, die mit verschiedenen Kopiezahlen des Standardplasmides pAAVS1-LTR versetzt wurde. Links sind die Rohdaten, rechts ist die entsprechende Standardgerade dargestellt.

4.1.2.1.3. Überprüfung der Spezifität des PCR-Assays

Die Spezifität des Assays für die Detektion von linken ITR/AAVS1-Fusionssequenzen wurde durch die Analyse einer Reihe von Negativkontrollen überprüft. DNA nichtinfizierter HeLa-Zellen war im Test negativ. Ebenso verhielt es sich mit der 96 h p.i.-Probe, wenn sie mit nur einem der beiden Primer amplifiziert wurde. Damit wurde die vermeintliche Detektion von Fusionssequenzen durch Amplifikation von Fragmenten mit identischen Primerbindungsstellen an beiden Enden ausgeschlossen. Ein mögliches Wechseln des

Templatestranges der Polymerase wurde durch die gemeinsame Verwendung der Plasmide pRVK (AAVS1) und pTAV2-0 (AAV-2) untersucht. Beim Einsatz von 5×10^5 Kopien je Plasmid, was in etwa der Anzahl an humanen Genomen von 1 μg DNA entspricht, wurden nur 5 Fusionssequenzen detektiert. Diese Zahl liegt im Bereich des Hintergrundsignals und hat auf die Quantifizierung keinen Einfluß.

Wegen einer partiellen Sequenzübereinstimmung der ITR-spezifischen Primer des rechten und des linken ITR-spezifischen Assays sollte gezeigt werden, daß der jeweilige Primer tatsächlich nur Fusionssequenzen seiner spezifischen Orientierung erkennt. Dafür wurde das Standardplasmid des rechten ITR-spezifischen Assays mit dem linken ITR-spezifischen Primer amplifiziert und umgekehrt. Wie aus Tabelle 4.2. entnommen werden kann, wurde die entgegengesetzte Orientierung der Integration sehr ineffizient detektiert. Obwohl die Quantifizierung unter 200 Kopien/Reaktion relativ ungenau ist, kann man abschätzen, daß der Assay für die entgegengesetzte Orientierung nicht mehr als 1% der tatsächlich vorhandenen Fusionssequenzen detektiert.

Probe	Verwendete Primer	DNA-Menge in der PCR	Kopien Fusionssequenzen ^a
Mock-infizierte HeLa-Zellen	IntegrAAVS1+ AAV2-LTR	1 μg = 3×10^5 Genomäquivalente	0
AAV-infizierte Zellen			
96 Stunden p.i. ^b	IntegrAAVS1	1 μg	0
96 Stunden p.i. ^b	AAV2-LTR	1 μg	0
96 Stunden p.i.	IntegrAAVS1+ AAV2-LTR	1 μg	5379
Plasmide pRVK + pTAV2-0 ^c	IntegrAAVS1+ AAV2-LTR	Je 5×10^5 Kopien	5
Plasmid pAAVS1-TR ^d	IntegrAAVS1+ AAV2-LTR	10^3 Kopien	10
Plasmid pAAVS1-TR ^d	IntegrAAVS1+ AAV2-LTR	10^4 Kopien	11
Plasmid pAAVS1-LTR ^e	P LCassay + 17s	10^3 Kopien	0
Plasmid pAAVS1-LTR ^e	P LCassay + 17s	10^4 Kopien	76

^a Die Kopiezahl der vorhandenen Fusionssequenzen pro Reaktion wurde durch Vergleich mit parallel amplifizierten Standards ermittelt. Die LightCycler Analyse wurde durchgeführt, wie in Abb. 4.7. gezeigt. Zur Beachtung: Eine verlässliche Quantifizierung ist nur über 200 Kopien/Reaktion möglich.

^b Die Probe 96 Stunden p.i. (auch dargestellt in Abb. 4.8.) wurde mit nur einem Primer, wie angegeben, analysiert.

^c Das AAVS1-tragende Plasmid pRVK und das AAV-2 Genom-tragende Plasmid pTAV2-0 dienen als Negativkontrollen. Beide wurden zusammen mit je 5×10^5 Kopien eingesetzt, was der Anzahl der HeLa-Genomäquivalente pro μg DNA entspricht (1 Genomäquivalent=3,2 pg, siehe 4.1.3.).

^d Das Standardplasmid, das eine Fusionssequenz der rechten ITR mit AAVS1 trägt, wurde mit dem linken ITR-spezifischen Primer amplifiziert.

^e Das Standardplasmid, das eine Fusionssequenz der linken ITR mit AAVS1 trägt, wurde mit dem rechten ITR-spezifischen Primer amplifiziert.

Tabelle 4.2. Spezifität des real-time PCR-Assays für die Detektion von linken ITR/AAVS1-Fusionssequenzen

4.1.2.2. Kinetik der Integration von AAV mit der anderen Orientierung bezüglich AAVS1

Es sollte untersucht werden, mit welcher Frequenz und Kinetik AAV-2 mit der anderen möglichen Orientierung bezüglich AAVS1 in das humane Genom integriert. Dazu wurden die DNAs infizierter HeLa-Zellen, die, wie unter 4.1.1.2 beschrieben, bereits mit dem rechten ITR-spezifischen Assay untersucht worden waren, mit dem linken ITR-spezifischen Assay analysiert.

Ortspezifische Integration wurde ab 16 Stunden nach der Infektion detektierbar. Das Maximum wurde 96 Stunden nach der Infektion erreicht. Insgesamt reflektieren die Kinetik der Integration und die Anzahl der detektierten Fusionssequenzen die Daten, die mit dem rechten ITR-spezifischen Assay erhalten wurden. Um eine zufriedenstellende Spezifität zu erreichen, mußte das Primerannealing bei einer Temperatur durchgeführt werden, bei der die Sensitivität etwas niedriger als bei dem rechten ITR-spezifischen Assay war. Die Abweichungen von Probe zu Probe waren hier höher als bei dem rechten ITR-spezifischen Assay.

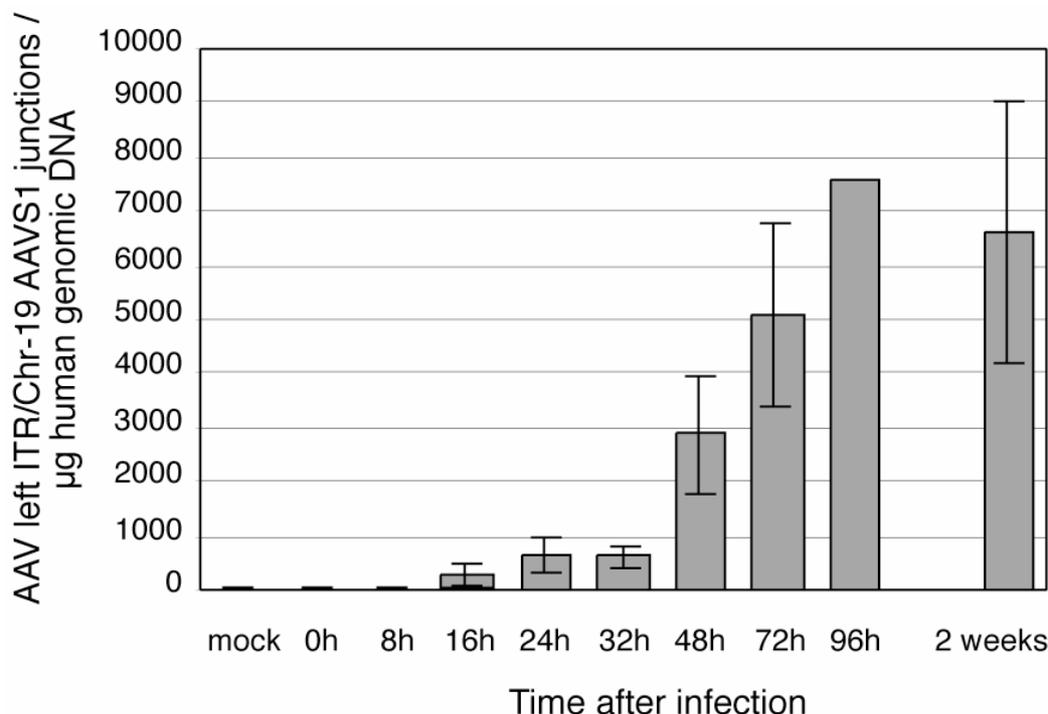


Abb. 4.8. Kinetik der linken ITR-spezifischen Integration in AAVS1. HeLa-Zellen wurden mit einer MOI von 500 infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurde gesamtgenomische DNA isoliert. 1 μg DNA wurde mittels real-time PCR-Assay amplifiziert. Die Anzahl der linken ITR/Chr. 19-Fusionssequenzen wurde im LightCycler durch Vergleich mit dem Standardplasmid pAAVS1-LTR quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Kulturen. Der Wert 96 Stunden p.i. repräsentiert den Mittelwert aus zwei Proben.

4.1.2.3. Sequenzanalyse der PCR-Produkte

Die Struktur der amplifizierten Fragmente sollte untersucht werden. Dazu wurden die PCR-Produkte der 96 Stunden-Probe in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Um zu testen, ob die klonierten Fragmente die AAVS1-Sequenz enthalten, wurde von den Bakterienkolonien eine LightCycler-PCR durchgeführt. Ca. 2/3 der getesteten Kolonien gaben nach Amplifikation ein positives Signal. Obwohl die LightCycler-PCR aufgrund des ungereinigten Templates unter suboptimalen Bedingungen durchgeführt wurde, mußte man davon ausgehen, daß nicht alle PCR-Produkte spezifisch waren. Für die Quantifizierung dürfte das jedoch keine Auswirkungen haben, da unspezifische Produkte von den Detektionssonden nicht erfaßt werden.

LightCycler-positive Kolonien wurden einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen. Auf der ITR-Seite war bei zwei Klonen das d-Element und bei drei Klonen das a-Element an AAVS1 fusioniert. Bei Klon 18 war im Zuge der Integration nur ein kleiner Teil der ITR verloren gegangen. Die fusionierte ITR lag in flop-Orientierung vor. Bei Klon 19 umfaßte die ITR-Sequenz noch das c'-Element, woraus sich auf die flip-Orientierung schließen läßt. Die Bruchpunkte auf der AAVS1-Seite variierten in einem Bereich von mehreren hundert Basenpaaren. Diese Ergebnisse stimmen mit denen für die rechte ITR-spezifische Integration überein.

Um zu überprüfen, ob die LightCycler-Detektionssonden einige PCR-Produkte aufgrund unspezifischer Bindung der Amplifikationsprimer oder aufgrund von Rearrangierungen der AAVS1-Sequenz nicht erfassen konnten, wurden einige der LightCycler-negativen Klone ebenfalls sequenziert. Es wurden ausschließlich Amplifikationsprimersequenzen in Verbindung mit anderen humanen Sequenzen gefunden, was auf eine unspezifische Bindung der Primer schließen läßt.

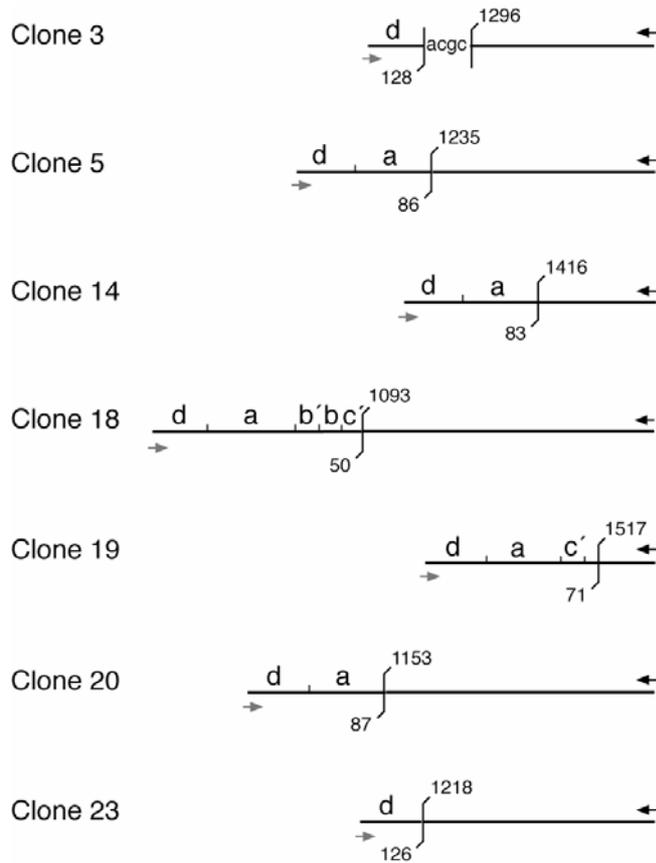


Abb. 4.9. Analyse der linken ITR/AAVS1-Fusionssequenzen. Die PCR-Produkte der Probe 96 Stunden wurden kloniert und sequenziert. Dargestellt sind die von den Sequenzdaten abgeleiteten Strukturen der Fusionssequenzen mit Chr. 19-Sequenzen auf der rechten und ITR-Sequenzen auf der linken Seite. Der schwarze Pfeil symbolisiert die Bindungsstelle des Primers IntegrAAVS1, der graue die des Primers AAV2-LTR. Die Nukleotidpositionen der jeweiligen Bruchpunkte sind angegeben. In Klon 3 wurden Nukleotide gefunden, die weder AAVS1 noch der ITR zugeordnet werden konnten (kleine Buchstaben).

4.1.3. Integrationsfrequenz pro Zelle

Aus den Integrationsfrequenzen des rechten und des linken ITR-spezifischen Assays läßt sich der Prozentsatz der Zellen ermitteln, in denen AAV zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Infektion integriert vorliegt. Dazu werden im ersten Schritt die Anzahl der Fusionssequenzen pro μg genomischer DNA beider Assays addiert. Um die Zahl der Fusionssequenzen pro Zellzahl anzugeben, muß man den DNA-Gehalt pro Zelle ermitteln. Die Masse einer humanen genomischen Kopie kann wie folgt berechnet werden. Das humane Genom hat 3×10^9 Basenpaare. Das Molekulargewicht des humanen Genoms ist demnach $3 \times 10^9 \text{ bp} \times 660 \text{ g} / (\text{mol} \times \text{bp}) = 1,98 \times 10^{12} \text{ g} / \text{mol}$. Da $1 \text{ mol} = 6,23 \times 10^{23}$ Kopien, entsprechen $1,98 \times 10^{12} \text{ g} = 6,23 \times 10^{23}$ Kopien. Somit folgt: $1 \text{ genomische Kopie} = 0,32 \times 10^{-11} \text{ g} = 3,2 \text{ pg}$. Da Hela-Zellen einen hypertriploiden Karyotyp aufweisen (Macville et al., 1999), kann man einen DNA-Gehalt von 10 pg/Zelle annehmen. Daraus folgt, daß $1 \mu\text{g}$ dem DNA-Gehalt von 10^5 Zellen entspricht.

Die Daten beider Assays addieren sich am Integrationsmaximum vier Tage (96 h) nach der Infektion zu 14.000 Kopien Fusionssequenzen/ μg DNA. Das entspricht einer Integrationsfrequenz von 14% der Zellen in Abwesenheit eines Selektionsdruckes. Diese Angabe kann als untere Schätzung angesehen werden, da der PCR-Assay aus einer Reihe von Gründen in einem Pool nicht alle Integrationsereignisse detektiert. Als Gründe können genannt werden: 1. Einige Fusionssequenzen könnten Strukturen bilden, die schwierig zu amplifizieren sind, z.B. wenn die ITR komplett erhalten bleibt und eine Haarnadelstruktur bildet. 2. Integrationsereignisse jenseits des AAVS1-Primers können nicht gefunden werden. 3. Erfolgt die Integration stromaufwärts der Rep-Bindungsstelle, entstehen sehr lange Fragmente, die möglicherweise nicht amplifiziert werden sowie 4. Wenn die ITR bei der Integration verloren geht, d.h. der AAV-Bruchpunkt an einer internen Sequenz liegt, kann der ITR-spezifische Primer nicht binden.

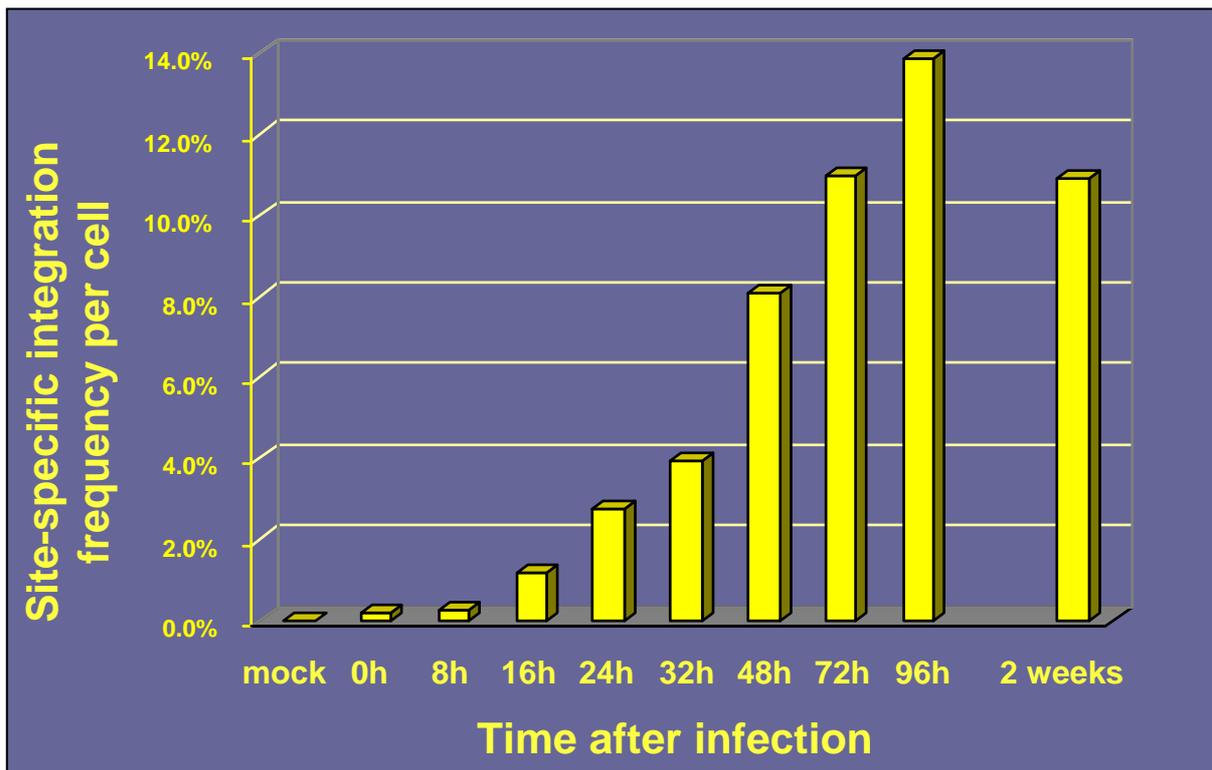


Abb. 4.10. Integrationsfrequenzen pro Zelle. Die Mittelwerte aus dem rechten und linken ITR-spezifischen Assay (Abb. 4.3. und 4.8.) wurden addiert. Unter Berücksichtigung des hypertriploiden Karyotyps von HeLa wurden die Integrationsfrequenzen pro Zelle berechnet. Zum Zeitpunkt der maximalen Integration nach vier Tagen lag AAV-2 ohne Selektion in mindestens 14% der Zellen integriert vor.

4.1.4. Integrationsfrequenz in Abhängigkeit der Multiplizität der Infektion (MOI)

Nachdem berechnet wurde, welcher Anteil der Zellen AAV enthielt, sollte nun der Anteil der Viruspartikel (infektiöse Einheiten) ermittelt werden, der nach Infektion in AAVS1 integriert war. Da vermutet wurde, daß dieser Anteil von der Multiplizität der Infektion abhängt, mit welcher die Zellen infiziert werden, wurde die Integrationsfrequenz in Abhängigkeit von der MOI analysiert. HeLa-Zellen wurden mit einer MOI von 10, 30, bzw. 100 infiziert. Nach 24 Stunden wurde von drei Schalen je MOI unabhängig genomische DNA isoliert. 1 µg DNA wurde dann mit der rechten ITR-spezifischen PCR amplifiziert und quantifiziert. Daten für eine MOI von 500 wurden aus dem Experiment in Abb. 4.3. übernommen. Wie erwartet zeigte sich, daß die Integrationsfrequenz nicht proportional zur MOI ansteigt. Eine 50-fache Erhöhung der MOI von 10 auf 500 resultierte nur in einer 13-fachen Erhöhung der ortsspezifischen Integration. Von der Kopiezahl der Fusionssequenzen/µg DNA wurde auf die

Integrationsfrequenz pro Zelle umgerechnet. Zur Vereinfachung, um auf die Durchführung des linken Assays zu verzichten, wurden dabei die Werte für den rechten Assay verdoppelt (0,3 bis 4,2% für beide Orientierungen). Nun wurde durch die jeweilige MOI geteilt und die Integrationsfrequenzen pro infektiöser Einheit berechnet. Bei einer MOI von 500 liegen somit 24 Stunden nach der Infektion 0,008% der infektiösen AAV integriert vor, hingegen bei einer MOI von 10 dieser Wert auf 0,034% ansteigt. Legt man die Daten der Kinetik zugrunde, kann man von einer Verdreifachung dieser Zahlen nach 96 Stunden ausgehen, woraus sich dann für eine MOI von 10 eine Integrationsfrequenz pro infektiöser Einheit von 0,103% ergibt. Dieser Wert gibt wiederum eine untere Schätzung an. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß ohne Selektion bei einer MOI=10 mindestens 1 von 1000 infektiösen AAV-2-Partikeln innerhalb von vier Tagen ortsspezifisch integriert.

MOI	Rechte ITR-AAVS1 Fusionssequenzen per µg HeLa DNA (24 Stunden p.i.) ^a	Integrationsfrequenz pro Zelle (24 Stunden p.i.) ^c	Integrationsfrequenz pro infektiöser Einheit (24 Stunden p.i.) ^e	Integrationsfrequenz pro infektiöser Einheit (96 Stunden p.i.) ^e
10	171±96	0,34%	0,034%	0,103%
30	456±191	0,91%	0,030%	0,091%
100	786±650	1,57%	0,016%	0,048%
500	2097±224 ^b	4,19%	0,008%	0,024%

^a HeLa-Zellen wurden mit AAV-2 bei verschiedenen MOI infiziert. Gesamtgenomische DNA wurde 24 Stunden p.i. isoliert und mittels real time PCR analysiert. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei Experimenten.

^b Die Werte für MOI=500 wurden der Abb. 4.3. entnommen.

^c Die Integrationsfrequenz pro Zelle wurde unter der Annahme eines DNA-Gehaltes von 10 pg pro HeLa-Zelle und einer identischen rechten und linken ITR-spezifischen Integrationsfrequenz kalkuliert.

^d Die Integrationsfrequenz pro infektiöser Einheit wurde durch Division der Frequenz in Spalte drei durch die MOI in Spalte eins berechnet.

^e Die Prozente in Spalte vier wurden mit 3,03 multipliziert, um die höhere maximale Integrationsfrequenz bei 96 Stunden p.i. zu berücksichtigen (vergleiche Abb. 4.3.).

Tabelle 4.3. Frequenz der ortsspezifischen Integration bei verschiedenen MOI

4.1.5. Ortspezifische Integration von Vektorplasmiden und rAAV-Vektoren

Das ein rekombinantes AAV-Genom tragende Plasmid **psubgfpneo** wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, aus den vorhandenen Plasmiden psub201(+) und pTR-UF5 kloniert. Die ortsspezifische Integration der ITR-flankierten *gfpneo*-Kassette nach Transfektion sollte bei Anwesenheit verschiedener *rep*-Konstrukte analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden *rep*-Expressionskassetten unter der Kontrolle des authentischen Promotors in gegenläufiger Orientierung vor die ITR-flankierte *gfpneo*-Kassette von **psubgfpneo** gesetzt. Folgende Plasmide wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, hergestellt: **psubgfpneorepcap**, welches das komplette AAV-*repcap* enthält, **psubgfpneorepcap-**, bei dem *cap* nicht exprimiert wird, **psubgfpneorep68tr**, welches für eine verkürzte Variante der großen Rep-Proteine kodiert und **psubgfpneorep52**, bei dem nur die kleinen Rep-Proteine synthetisiert werden.

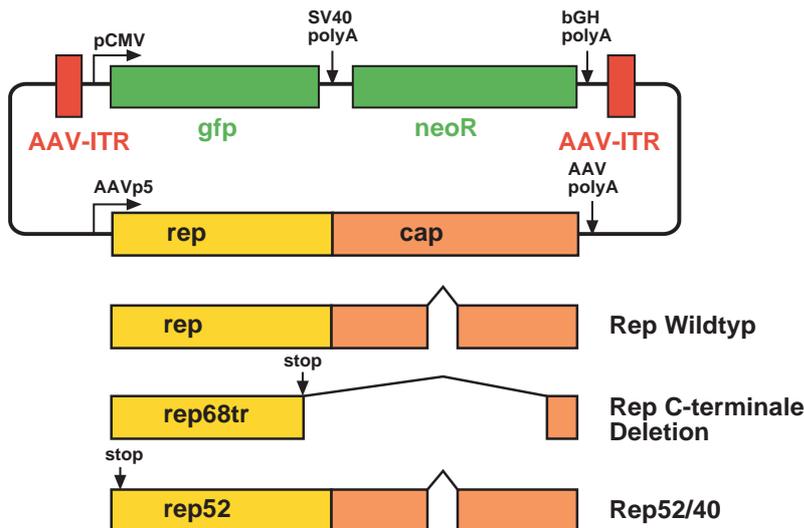


Abb. 4.11. Konstruktion von Vektoren mit *rep*-Expressionskassetten. Die *rep*-Expressionskassetten wurden in gegenläufiger Orientierung hinter die ITR-flankierte *gfpneo*-Kassette gesetzt.

In einem Vorversuch wurden die Plasmide **psubgfpneorepcap-** bzw. **psub201(+)** in 293-Zellen transfiziert und nach 2 Tagen genomische Gesamt-DNA isoliert. Der PCR-Assay zum Nachweis von Fusionssequenzen der rechten ITR mit AAVS1 detektierte 101 Kopien Fusionssequenzen/ μ g DNA für **psub201(+)** und 571 bzw. 445 Kopien für **psubgfpneorepcap-**. Verglichen mit den Anzahlen Fusionssequenzen, die man nach AAV-Wildtypinfektion von 293-Zellen erhielt, lagen diese Werte deutlich unter den Erwartungen. Es wurde daraufhin das Plasmid **pTAV2-0**, dessen Sequenz 100% der AAV-2 Wildtypsequenz entspricht, für die

Transfektion eingesetzt. Es wurde sowohl mit CaCl₂ als auch mit Lipofectamin transfiziert und die Inkubationszeit auf 5 Tage verlängert. Die Zahl der detektierten Fusionssequenzen blieb weiter sehr niedrig. Auch der Einsatz von linearisiertem pTAV2-0 brachte kein anderes Ergebnis. Da somit schon die Positivkontrollen im untersten Bereich lagen, wo überhaupt noch Quantifizierung möglich war, mußten die Integrationsereignisse angereichert werden. Dies geschah durch Selektion von Zellen mit stabiler *neo*-Genexpression mit Geneticin. HeLa-Zellen wurden mit folgenden Plasmiden transfiziert: *psubgfpneorepcap*, *psubgfpneorepcap-*, *psubgfpneorep68tr*, *psubgfpneorep52*, *psubgfpneo*, *psubgfpneo+ΔTR18* (trägt *repcap* ohne ITR) bzw. *psubgfpneo+pRep78* (kodiert nur für Rep78). Nach 3 Wochen Selektion waren einzelne Zellhaufen sichtbar und es wurde genomische DNA extrahiert. Mit Hilfe des real time PCR-Assays wurde Integration der ITR-flankierten *gfpneo*-Kassette in die humane AAVS1-Sequenz nachgewiesen. Wenn die *rep*-Kassette auf dem gleichen Plasmid lokalisiert war (*psubgfpneorepcap*, *psubgfpneorepcap-*), wurden die meisten ortsspezifischen Integrationsereignisse beobachtet (1565, 1555-2300 Kopien). Wurde dagegen *rep* auf einem zweiten Plasmid bereitgestellt (*psubgfpneo+ΔTR18*, *psubgfpneo+pRep78*), sank die Integrationsrate in AAVS1 auf 178 bzw. 131 Kopien/μg. Die verkürzten großen Rep-Proteine (*psubgfpneorep68tr*) konnten noch ortsspezifische Integration vermitteln, jedoch weniger effizient als die Volllänge-Versionen. Wie erwartet vermittelten die kleinen Rep-Proteine (*psubgfpneorep52*) keine ortsspezifische Integration. Hier lag die Anzahl der detektierten Fusionssequenzen im Bereich der Negativkontrollen (*psubgfpneo* bzw. untransfizierte Zellen).

Probe	Fusionssequenzen/ μg genomischer DNA
293 3 d p.i.	2898
psub201(+) 2 d p.Tr.	101
psubgfpneorepcap- 2 d p.Tr.	571 (445) ^b
pTAV2-0 2 d p.Tr. CaCl ₂	148
pTAV2-0 5 d p.Tr. Lipofectamin	192
pTAV2-0, linear 5 d p.Tr. Lipofectamin	158
psubgfpneorepcap (Geneticin) ^a	1565
psubgfpneorepcap- (Geneticin) ^a	2300 (1555) ^b
psubgfpneo+ Δ TR18 (Geneticin) ^a	178
psubgfpneo+pRep78 (Geneticin) ^a	131
psubgfpneorep68tr (Geneticin) ^a	944
psubgfpneorep52 (Geneticin) ^a	64
psubgfpneo (Geneticin) ^a	88
HeLa untransfiziert	28

^a HeLa-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und 3 Wochen unter Selektionsdruck (G418) gehalten. Aus dem *neo*-Resistenz tragenden Zellpool wurde genomische DNA isoliert und mit dem real time PCR-Assay zum Nachweis von rechte ITR/AAVS1-Fusionssequenzen analysiert.

^b Die in Klammern angegebenen Werte stammen aus einem zweiten, völlig unabhängigen Experiment.

Tabelle 4.4. Nachweis ortsspezifischer Integration nach Transfektion von AAV-Vektorplasmiden

Weiterhin sollte untersucht werden, wie effizient rekombinante Viren bei *rep*-Bereitstellung durch ein Plasmid ortsspezifisch integrieren. Dazu wurde durch Transfektion des AAV-Plasmides *psubgfpneo* und des Helferplasmides pDG ein rekombinanter AAV-Stock hergestellt. Trotz mehrfacher Wiederholung gelang es nicht, eine Präparation mit genügend hohem Titer herzustellen, die eine Infektion von Zellen mit ausreichend hoher MOI erlaubte (erreichte Titer 10^6 - 10^7 transduzierende Einheiten/ml). Mit den üblicherweise für die Produktion rekombinanter AAV-Präparationen verwendeten Plasmiden pTR-UF5 oder pTR-lacZ erreicht man zwar einen um 2 Log-Stufen höheren Titer, jedoch liegen die AAV-ITR in diesen Konstrukten nicht in der Wildtypsequenz vor, so daß ein neuer Assay mit einem neuen ITR-spezifischen Primer hätte etabliert werden müssen.

Mit *psubgfpneo* erhaltene rekombinante Viren integrieren ohne externe Bereitstellung von Rep nicht ortsspezifisch, obwohl sie möglicherweise mit ihrem Kapsid einige Rep-Moleküle in die Zelle bringen. So wurde auch nach Selektion der Zellen auf stabile Integration des rekombinanten AAV-Genoms keine ortsspezifische Integration nachgewiesen.

4.2. Verpackung von Chromosom 19-Integrationsstellen in AAV-Virionen während der Virusproduktion

4.2.1. Nachweis von ITR/AAVS1-Fusionssequenzen in verschiedenen Proben durch PCR-Analyse

Bei den Untersuchungen zur Integrationskinetik fiel auf, daß Proben, die sofort nach der Virusadsorption geerntet worden waren, in dem Assay zum Nachweis der ortsspezifischen Integration ein geringes, aber spezifisches positives Signal gaben. DNA mock-infizierter Zellen hingegen war konstant negativ (Abb. 4.3.). Auch in den anfänglichen Experimenten zur Untersuchung der ortsspezifischen Integration war vermeintliche Integration schon eine Stunde nach der Infektion beobachtet worden. Damals waren ITR/Chr. 19-Fusionssequenzen mittels einer nested PCR (zwei hintereinanderfolgende PCR mit unterschiedlichen Primerpaaren) amplifiziert, geblottet und mit einer AAVS1-Sonde detektiert worden. Es handelte sich also offensichtlich um spezifische ITR/Chr. 19-Signale, deren Herkunft geklärt werden sollte.

Um die Amplifikation von eventuell im Virusstock enthaltenen Verunreinigungen auszuschließen, wurden die AAV-Stocks nach einem ursprünglich für die AAV-Vektorproduktion entwickelten Protokoll hochgereinigt. HeLa-Zellen wurden mit diesem hochgereinigten Stock mit einer MOI von 500 infiziert. Sofort nach der 45 minütigen Adsorptionsperiode (0 h) oder nach 72 h wurde DNA extrahiert und mit dem rechten ITR/Chr. 19-spezifischen real-time PCR-Assay analysiert. Es wurden 173 Kopien Fusionssequenzen (0 h) detektiert, wohingegen nicht-infizierte Zellen (mock) keine Fusionssequenzen enthielten und die Positivkontrolle (72 h) 2150 Kopien zeigte.

Um eine tatsächliche Integration von AAV absolut auszuschließen, wurden nun HeLa-Zellen mit AAV gemischt und sofort DNA extrahiert. Wiederum wurden Fusionssequenzen (69 Kopien) gefunden. Schließlich wurde DNA aus AAV-2 (2×10^7 infektiöse Einheiten) isoliert und 124 Kopien detektiert. Die Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte zeigte ein diffuses Bandengemisch wie nach einer Wildtypinfektion, so daß die Kontamination der PCR mit dem Standardplasmid, das in jedem Lauf für die Quantifizierung eingesetzt wurde, ausgeschlossen werden konnte. Ein Southern Blot des Gels bestätigte zusätzlich das Vorhandensein von AAVS1-Sequenzen. Damit war gezeigt, daß in einem hochgereinigten AAV-2 Wildtypstock Chr. 19-AAVS1-Sequenzen in Fusion mit AAV-ITR-Sequenzen enthalten sein mußten. Zur Kontrolle wurden auch noch das AAV-Genom enthaltende

Plasmid pTAV2-0 und Adenovirus-infizierte HeLa-Zellen getestet. Das Plasmid pTAV2-0 und adenovirale Helferfunktionen werden zur AAV-Produktion benötigt. Sowohl 5×10^8 Kopien des Plasmides als auch 1 μg DNA Adenovirus-infizierter Zellen waren negativ, was bedeutete, daß die Ausgangsmaterialien für die AAV-Produktion frei von Fusionssequenzen waren.

Probe	DNA-Menge in der PCR	Kopien Fusionssequenzen
Mock infizierte HeLa-Zellen	1 μg = 3×10^5 Genomäquivalente	0
AAV-2 infizierte Zellen 0 Stunden p.i. ^a	1 μg	173
AAV-2 infizierte Zellen 72 Stunden p.i. ^a	1 μg	2150
AAV-2 gemischt mit HeLa-Zellen ^b	1 μg extrahiert aus 105 HeLa-Zellen und 6×10^7 infektiösen Einheiten	69
AAV-2 einzeln ^c	extrahiert aus 2×10^7 infektiösen Einheiten	124
Plasmid pTAV2-0 ^d	5×10^8 Kopien	0
Ad-2 infizierte Zellen 72 Stunden p.i.	1 μg	0

^a HeLa-Zellen wurden mit einem hochgereinigten AAV-2 Stock mit einer MOI von 500 infiziert. Sofort nach der 45 minütigen Adsorptionsperiode (0 Stunden p.i.) oder 72 Stunden p.i. wurde genomische DNA extrahiert.

^b HeLa-Zellen wurden mit hochgereinigtem AAV-2 gemischt und sofort extrahiert.

^c Aus einer hochgereinigten AAV-Präparation wurde Gesamt-DNA isoliert.

^d Das Plasmid pTAV2-0 enthält das AAV-Wildtypgenom und wurde in 25-fachen Überschuß zu der geschätzten Zahl infektiöser Partikel in der AAV-2-Probe zur PCR gegeben.

Tabelle 4.5. Real-time PCR Analyse von ITR/AAVS1-Fusionssequenzen

4.2.2. Sequenzanalyse der ITR/AAVS1-Fusionssequenzen

Zur näheren Analyse der im Stock enthaltenen Fusionssequenzen sollten diese sequenziert werden. Dazu wurde die aus einem AAV-Stock extrahierte DNA zweimal hintereinander mit der konventionellen PCR amplifiziert. Weil die Struktur der Produkte absolut unbekannt war, wurde auf die LightCycler PCR wegen der kurzen Zykluszeiten und der höheren Empfindlichkeit verzichtet. Die PCR-Produkte wurden kloniert. Die DNA zufällig ausgewählter Klone wurde sequenziert.

Es wurden AAV-ITR-Sequenzen gefunden, die mit variablen AAVS1-Integrationsstellen fusioniert waren. In einem Klon wurden p5-Promotersequenzen, in zwei anderen Klonen Teile des *cap*-Genes und das AAV-Polyadenylierungssignal gefunden. Da diese Sequenzen eigentlich nicht innerhalb des von den Primern zu amplifizierenden Bereiches liegen, muß von beträchtlichen Umordnungen des AAV-Genoms ausgegangen werden. Weiterhin sind die Strukturen wesentlich komplizierter als sie bei latent infizierten Zellen beobachtet wurden. Es

wurden keine Sequenzen gefunden, die weder AAV noch AAVS1 zugeordnet werden konnten.

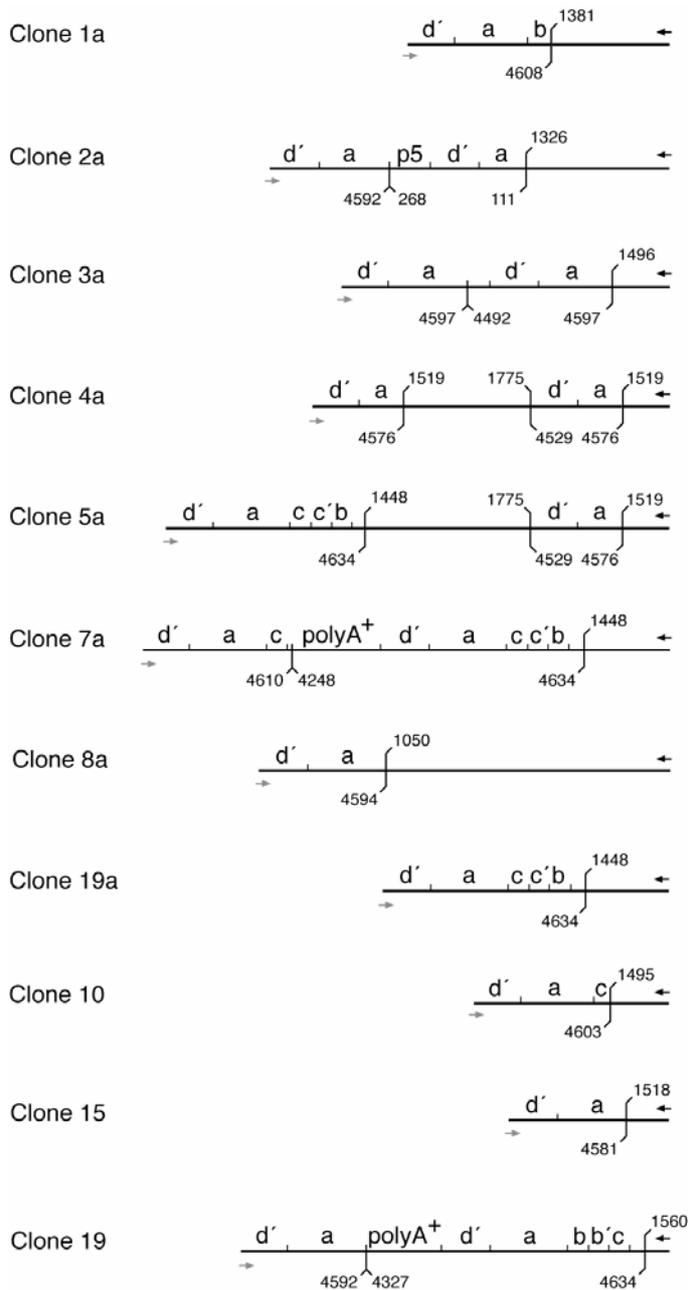


Abb. 4.11. Strukturkarten der in einem AAV-2 Virusstock gefundenen ITR/AAVS1-Fusionssequenzen. Aus der DNA eines hochgereinigten AAV-2 Virusstocks wurden ITR/AAVS1-Fusionssequenzen amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die Strukturkarten wurden aus den DNA-Sequenzdaten abgeleitet. Die Bindungsstelle des AAVS1-spezifischen Primers ist durch einen schwarzen Pfeil symbolisiert, die des rechten ITR-spezifischen Primers durch einen grauen Pfeil. Bei einigen Sequenzen existiert eine zweite interne Primerbindungsstelle (nicht markiert). Die Positionen der letzten eindeutig dem AAV-ITR oder AAVS1 zuzuordnenden Nukleotide sind nach der publizierten Nomenklatur angegeben (Kotin, Linden, and Berns, 1992; Srivastava, Lusby, and Berns, 1983). Die kleinen Buchstaben (a, b, c...) repräsentieren palindromische Sequenzelemente der AAV-ITR. p5: AAV p5-Promotersequenz, polyA⁺: 90-150 bp von AAV-cap und dem gemeinsamen AAV-Polyadenylierungssignal.

4.2.3. Demonstration der Effizienz des Benzonaseschrittes während der Virusreinigung

In den vorangegangenen Experimenten wurde nachgewiesen, daß hochgereinigte AAV-2 Wildtyppräparationen geringe Mengen an AAV-ITR/AAVS1-Fusionssequenzen enthalten, welche durch die Reinigungsprozedur nicht entfernt werden. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür scheint ein äußerst effizienter Schutz der DNA durch Kapside zu sein.

Um diese Annahme zu belegen, sollte die Effizienz des Benzonaseverdauschnittes während der Reinigungsprozedur der Stocks evaluiert werden. Das konnte idealerweise durch eine effiziente enzymatische Degradation von im Überschuß zugegebener Fusionssequenz-DNA geschehen.

Es wurden eine AAV-2-Präparation durch pTAV2-0-Transfektion und Adenovirus Typ 2-Infektion sowie eine AAV-negative Kontrollpräparation (kein pTAV2-0) generiert. Beide Präparationen wurden parallel gereinigt, wie in Material und Methoden beschrieben. Dabei wurden nichtverpackte Nukleinsäuren durch Behandlung mit Benzonase degradiert. Anschließend wurden die Präparationen mittels diskontinuierlichem Iodixanoldichtegradienten sowie durch Heparinaffinitätschromatographie und Dialyse zu einem hohen Grad gereinigt. Zu den Präparationen wurde Träger-DNA gegeben und genomische DNA extrahiert. Der real-time PCR-Assay detektierte in der Kontrollpräparation keine Fusionssequenzen, während die AAV-Präparation (5×10^8 infektiöse Einheiten/ml) positiv war. Dieser Befund schließt eine DNA- oder Viruskontamination während der Reinigungsprozedur aus. Um nun die Effizienz des Benzonaseschrittes zu belegen, wurden die AAV-negativen Kontrollpräparationen mit einem Überschuß an ungeschützter Fusionssequenz-DNA in Form des Plasmides pAAVS1-TR versetzt. Nach einem 30-minütigem Benzonaseverdau detektierte der PCR-Assay 10^3 Kopien/ml, wohingegen in der unverdauten Probe 6×10^6 Kopien gefunden wurden. Dieses beweist eine effiziente Reduktion (5000-fach) der ungeschützten Fusionssequenzen. Im Gegensatz dazu wurde die Anzahl an Fusionssequenzen im AAV-Stock nur um das zweifache von 2×10^5 auf 1×10^5 Kopien reduziert. Diese geringe Reduktion könnte dadurch zustande gekommen sein, daß einige Kapside durchlässig oder defekt waren. Möglicherweise stellt die Abweichung aber auch einen variablen Fehler der Quantifizierung dar.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die in AAV-Stocks gefundenen Fusionssequenzen Benzonase-resistent sind und die Resistenz offensichtlich auf einer Verpackung in Kapsiden beruht.

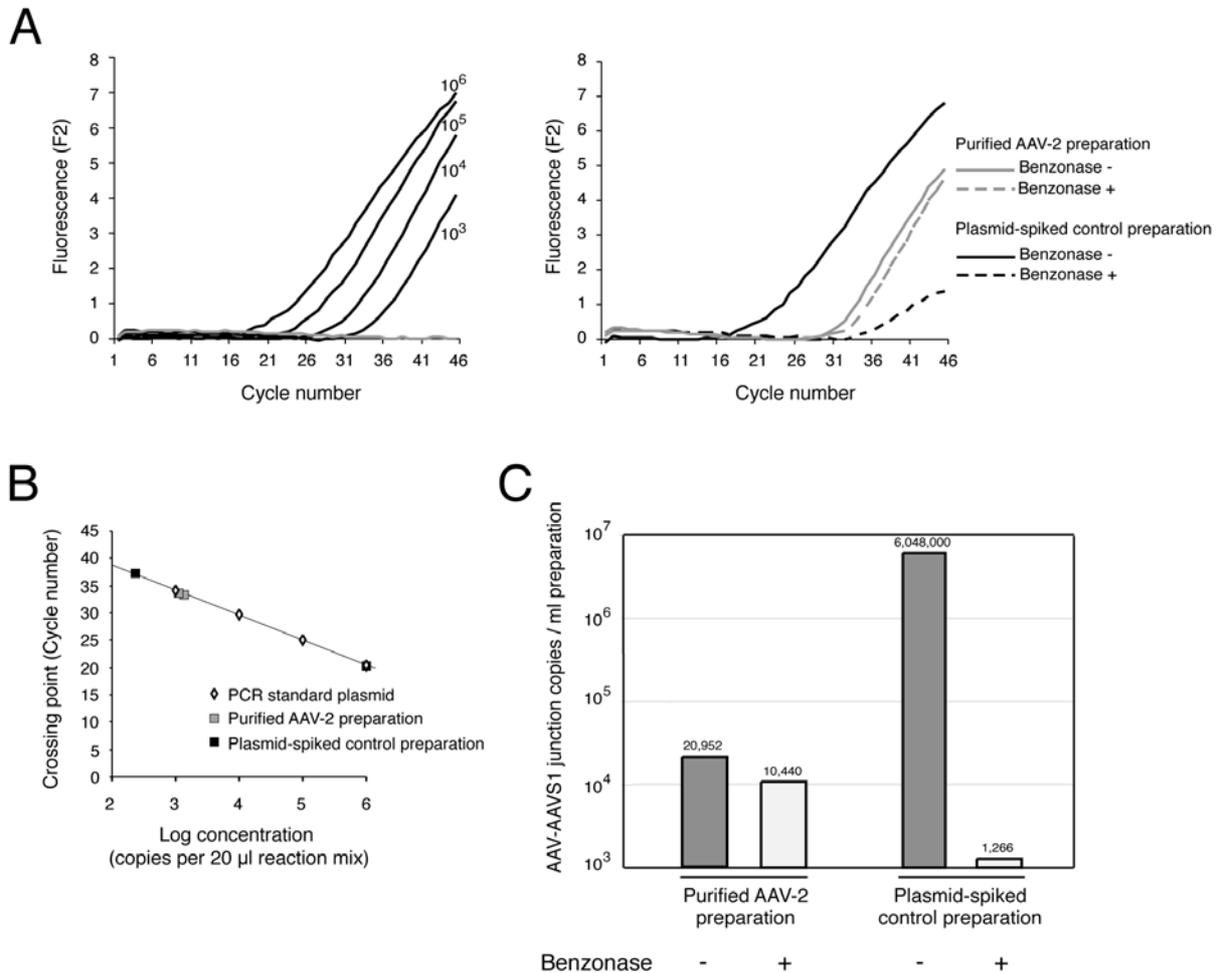


Abb. 4.12. Demonstration der Benzonaseresistenz der in AAV-Präparationen enthaltenen Fusionssequenzen. Eine gereinigte AAV-Wildtyppräparation und eine mit 4×10^7 Kopien pAAVS1-TR versetzte AAV-negative Kontrollpräparation wurden mit 250 U Benzonase für 30 min inkubiert. Entsprechende Kontrollen ohne Benzonase wurden durchgeführt. A: Rohdaten der real-time PCR-Analyse der Fusionssequenzen in AAV- und Kontrollpräparationen. Zur Quantifizierung wurde das Standardplasmid in bekannten Konzentrationen (10^3 bis 10^6 Kopien/Reaktion) parallel amplifiziert. B: Standardgerade. Die Konzentrationen der Proben wurden anhand der aus den Rohdaten des Standards erstellten Standardgeraden von der Software berechnet. C: Die Kopiezahlen der in den AAV- und Kontrollpräparationen enthaltenen Fusionssequenzen/ml sind von den Werten in B abgeleitet. Da nur 1/6-tel von 1 ml Gesamtvolumen der Proben analysiert wurde, wurden die Kopiezahlen aus B entsprechend umgerechnet. Die Werte sind über den Säulen angegeben.

4.2.4. Detektion von ITR/AAVS1-Fusionssequenzen in verschiedenen AAV-Wildtyp- und rAAV-Vektorpräparationen

Um zu klären, ob das Auftreten von verpackten Fusionssequenzen in Virusstocks in irgendeinem Zusammenhang mit der Präparationsmethode steht, wurden AAV-Wildtypstocks nach verschiedenen Methoden und auf verschiedenen Zellen präpariert. So wurden Stocks auf HeLa-Zellen durch Koinfektion von AAV-2 und Ad-2 oder durch Transfektion von pTAV2-0 und nachfolgender Ad-2-Infektion oder durch Kotransfektion von 293-Zellen mit pTAV2-0 und pDG generiert. Die meisten Stocks wurden hochgereinigt, einige wurden aber auch als Zellysate untersucht. Von neun getesteten Präparationen waren in sieben Präparationen Fusionssequenzen nachweisbar. Die Anzahl an Fusionssequenzen pro infektiöser Einheit unterlag starken Schwankungen, was möglicherweise mit der Ungenauigkeit der Quantifizierung in dem Bereich kleiner Kopiezahlen zu begründen ist. Pro 10^6 infektiösen Einheiten wurden zwischen 0 und 645 Fusionssequenzen gefunden. Das Vorhandensein von Fusionssequenzen in AAV-Stocks ist offensichtlich unabhängig von der Präparationsmethode und der Art der verwendeten Zellen.

Produktionsdatum	Methode	Zellart	gereinigt	DNA-Menge in PCR	Kopien Fusionssequenzen	
					pro Reaktion	pro 10^9 Viriongenome
17.5.02	AAV-2(10/00)+Ad-2	HeLa	nein	nicht bestimmt	183	
17.5.02	AAV-2(7/93)+Ad-2	HeLa	nein	nicht bestimmt	774	
4.10.00	pTAV2-0+Ad-2	HeLa	ja	2×10^8 Viriongenome ^a	124	729
20.4.01	pTAV2-0+Ad-2	HeLa	ja	$1,4 \times 10^7$ i.u. ^b	9000	
4.10.00	pTAV2-0+pDG	293 T	ja	2×10^7 i.u. ^b	0	
19.12.01	pTAV2-0+pDG	293 T	ja	2×10^9 Viriongenome ^a	24	13
19.12.01	pTAV2-0+pDG	293 T	ja	1×10^9 Viriongenome ^a	37	34
6/01	pTAV2-0+pDG	293 T	nein	$1,4 \times 10^8$ i.u. ^b	153	

^a Die Menge der in der PCR analysierten DNA wurde aus einem Volumen des Stocks präpariert, das die angegebene Anzahl viraler Genome enthält. Der genomische-Partikel-Titer wurde mittels real time PCR bestimmt.

^b Die Menge der in der PCR analysierten DNA wurde aus einem Volumen des Stocks präpariert, das die angegebene Anzahl infektiöser Einheiten enthält. Die genomische Partikelzahl kann je nach Präparation bis zu 100-fach höher sein als die Anzahl infektiöser Partikel. Der genomische-Partikel-Titer wurde hier nicht bestimmt.

Tabelle 4.6. Nachweis von ITR/AAVS1-Fusionssequenzen in verschiedenen AAV-Wildtyppräparationen mittels real time PCR.

Desweiteren wurden rekombinante AAV-Vektorstocks auf die Anwesenheit von ITR/AAVS1-Fusionssequenzen untersucht. Drei von drei unabhängig generierten Vektorstocks enthielten Fusionssequenzen. Pro 10^6 transduzierenden Einheiten wurden 154 bis 1275 Kopien gefunden. Zur Kontrolle wurden die zur Präparation verwendeten Plasmide getestet. 6×10^{10} Kopien *psubgfpneo* und 1×10^{11} Kopien pDG waren im real-time PCR-Assay negativ.

Produktions- datum	Methode	Zellart	gereinigt	DNA-Menge in PCR ^a	Kopien Fusionssequenzen	
					pro Reaktion	pro 10^9 Viriongenome
8.3.02	psubgfpneo#4+pDG	293T	ja	2×10^{11} Virion- genome	3826	32
8.3.02	psubgfpneo#6+pDG	293T	ja	2×10^{11} Virion- genome	570	6
25.1.02	psubgfpneo+pDG	293T	nein	1×10^9 Virion- genome	154	154

^a Die Menge der in der PCR analysierten DNA wurde aus einem Volumen des Stocks präpariert, das die angegebene Anzahl Viriongenome enthielt. Der Titer genomischer Partikel wurde mittels real time PCR bestimmt.

Tabelle 4.7. Nachweis von ITR/AAVS1-Fusionssequenzen in Vektorstocks.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sowohl Wildtyp- als auch Vektorstocks regelmäßig verpackte AAV-ITR/Chr. 19-AAVS1-Fusionssequenzen enthalten. Da viele Stocks mittels Transfektion getesteter Plasmide generiert wurden, kann man davon ausgehen, daß die Fusionssequenzen während einer einzigen AAV-Produktionsrunde entstanden sind.