

5. DISKUSSION

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der ortsspezifischen Integration von adeno-assoziiertem Virus Typ 2 in das humane Chromosom 19. Dazu wurden zwei sensitive quantitative Assays, die eine Unterscheidung der Orientierung des integrierten AAV-Genoms ermöglichen, etabliert. Im Folgenden werden die mit Hilfe dieser Assays erhaltenen Ergebnisse zu Kinetik und Frequenz der ortsspezifischen Integration und den gefundenen chromosomalen Bruchpunkten diskutiert sowie die Möglichkeiten und Grenzen der Assays aufgezeigt.

Ausgehend von der Beobachtung, daß schon sehr früh nach Infektion von humanen Zellen mit AAV-2 vermeintliche Integration stattfand, wurden im zweiten Teil der Arbeit Experimente durchgeführt, die eine Verpackung von AAV-ITR/Chromosom 19-Fusionssequenzen in AAV-Kapside belegen. Es werden die existierenden Modelle der Integration erörtert, ein Mechanismus zur Entstehung der Fusionssequenzen vorgeschlagen sowie die möglichen Konsequenzen für eine AAV-basierte Gentherapie diskutiert.

5.1. Charakterisierung der ortsspezifischen Integration von AAV-2 in das humane Chromosom 19

5.1.1. Kinetik der ortsspezifischen Integration von AAV-2

Aus früheren Untersuchungen geht hervor, daß AAV-2 in eine als AAVS1 bezeichnete Region des humanen Chromosom 19 in einem Bereich von mehreren hundert Basenpaaren integriert (Samulski et al., 1991). Aufgrund der Variabilität der exakten Chr. 19-Integrationsstellen führt eine PCR-Amplifikation der AAV-zellulären Fusionssequenzen mit einem AAV-spezifischen und einem Chr. 19-spezifischen Primer zu Fragmenten verschiedener Längen. Eine quantitative Erfassung der ortsspezifischen Integration mittels herkömmlicher quantitativer PCR (Endpunktanalyse) ist deshalb ohne vorherige Selektion von Einzelzellklonen nicht möglich. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit mit dem Detektionsformat Hybridisierungssonden gearbeitet, welches längenunabhängig detektiert. Es wurde gezeigt, daß ortsspezifische Integration bereits zwischen 8 und 16 h nach der Infektion mit AAV-2 nachweisbar wird. Die Integrationsrate stieg bis zum Tag 4 nach Infektion an und fiel zwei Wochen nach Infektion wieder leicht ab. Aus Vorarbeiten war bekannt, daß

ortspezifische Integration in das humane Genom innerhalb von Tagen erfolgt bzw. bereits nach 24 h nachgewiesen werden kann (nichtquantitativer Nachweis). Eine quantitative Beschreibung der Integration wurde über ein Epstein-Barr Virus (EBV)-basiertes Modellsystem (Giraud, Winocour, and Berns, 1994), über stabile Transgenexpression (Surosky et al., 1997) oder über Untersuchung von Einzelklonen nach Selektion vorgenommen. Ein direkter Vergleich mit den hier vorgestellten Ergebnissen zur Integrationskinetik im natürlichen System ist deshalb schwierig. Frühe Zeitpunkte nach Infektion oder Transfektion können neben der hier vorgestellten Methode nur mit dem EBV-Modellsystem untersucht werden. Dieses System basiert auf einem Epstein-Barr-Virus Shuttle Vektor, in den Teile der AAVS1-Region subkloniert wurden und der in episomaler Form in 293 Zellen mit bis zu 100 Kopien pro Zelle propagiert wird. Der Shuttle-Vektor stellt für AAV ein Substrat für ortspezifische Integration dar und kann mittels des *E. coli*-Systems einfach untersucht werden. 10 h nach Infektion mit AAV-2 bei einer MOI von 50 wurden bei 0,08%, 23 h p.i. bei 1,9% und 46 h p.i. bei 2,2% der analysierten Shuttle Vektor-Klone AAV-Sequenzen nachgewiesen (Giraud, Winocour, and Berns, 1994). Das wird durch die Ergebnisse des real time PCR-Assays bestätigt, wo ebenfalls schon wenige Stunden nach Infektion ortspezifische Integration nachweisbar war und von Tag 1 zu Tag 2 nach Infektion ein Anstieg zu beobachten war (Hüser, Weger, and Heilbronn, 2002). Der Abfall nach zwei Wochen kann mit der Notwendigkeit erklärt werden, die Zellen in Abwesenheit eines Selektionsdruckes zu passagieren. Einige Arbeiten dokumentieren, daß Zellen mit latentem AAV langsamer wachsen (Walz and Schlehofer, 1992; Winocour, Callahan, and Huberman, 1988). Die gemessene Integrationsrate ist das Zusammenspiel aus wahrer Integrationsrate und Proliferationsrate der Zellen. Entsteht Zellen durch das Etablieren einer Latenz von AAV ein geringer Wachstumsnachteil, so sinkt die gemessene Integrationsrate pro μg genomischer DNA, obwohl die ursprüngliche Anzahl an Integrationsereignissen konstant bleibt. Bei Integration von Wildtypvirus wäre aber auch denkbar, daß es durch die Aktivität des Rep-Proteins am Integrationsort zu Rekombinationen und einem tatsächlichen Verlust des Integrationsereignisses kommt (Young et al., 2000).

Die ortspezifische Integration ist ein sehr komplexes Ereignis, das noch nicht vollständig verstanden ist und bei dem eine Reihe von Wirtsfaktoren involviert sind. Die Integrationskinetik könnte mit dem Expressionsniveau des AAV-Rep-Proteins, welches die Ortspezifität vermittelt, verknüpft sein. Surosky et al. (Surosky et al., 1997) fanden, daß die *rep*-Expression 2 Tage nach AAV-Infektion maximal ist und dann langsam abnimmt. Die gleiche Arbeit zeigt allerdings auch, daß die Verwendung verschiedener Promotoren zur

Regulation der Höhe der *rep*-Expression nicht den Anteil an stabilen β -Galaktosidase produzierenden, also Integration tragenden Klonen, beeinflusst. Hingegen führt die Abwesenheit von Rep zu deutlich niedrigeren Transgenexpressionsraten. Schon geringe Mengen des Rep-Proteins scheinen also ortsspezifische Integration vermitteln zu können. Eine Erhöhung der Rep-Menge führt nicht zwangsläufig zu einem Anstieg der Integrationsraten. Young et al. (Young et al., 2000) bestimmten die in der Zelle vorhandene Anzahl der Rep-Moleküle 24 h nach latenter Infektion und kalkultierten, daß diese Menge bereits ausreicht, um mit allen vorhandenen Rep-Bindungsstellen des humanen Genoms zu interagieren. Der Anstieg der Integrationsrate von Tag 1 bis Tag 4 nach Infektion läßt sich demnach nicht allein auf die *rep*-Expressionsraten zurückführen.

5.1.2. Chromosom 19-Integrationsorte nichtselektierter Zellen, Zelllinien und episomal EBV-Plasmid tragender Zellen

Die chromosomalen Bruchpunkte, die durch Integration von AAV in AAVS1 entstanden sind, wurden durch Sequenzanalyse der PCR-Produkte bestimmt. Die Bruchpunkte der hier amplifizierten Fusionssequenzen nichtselektierter Zellen wurden mit in anderen Arbeiten beschriebenen chromosomalen Integrationsorten verglichen. Es zeigte sich, daß der Bereich, in dem die chromosomalen Bruchpunkte gefunden wurden, bei nichtselektierten Zellen (Hüser, Weger, and Heilbronn, 2002) mit dem bei latent infizierten oder transfizierten Zellen nach klonaler Selektion (Palombo et al., 1998; Pieroni et al., 1998; Tsunoda et al., 2000; Yang et al., 1997) übereinstimmt (Abb. 5.1.). Die Integrationsstellen stimmen ebenfalls mit denen von transgenen Mäusen und Ratten, die 3.5 kb der humanen AAVS1-Region tragen, überein (Rizzuto et al., 1999). Abb. 5.1. veranschaulicht, daß vorrangig Integrationsstellen in Primernähe gefunden werden. Der Grund dafür könnte technischer Natur sein, da möglicherweise kürzere PCR-Fragmente einfacher amplifiziert werden. Beim EBV-System wird diese Selektion vermieden, da die Integration tragenden Episome mit AAV-Sonden hybridisiert werden. Mit dem EBV-Modellsystem werden vorrangig Integrationsstellen rund um die Rep-Bindungsstelle gefunden, einige aber auch weiter stromabwärts (Giraud, Winocour, and Berns, 1995). Der Grund hierfür ist nicht klar, könnte aber mit Unterschieden in der Chromatinstruktur der authentischen Chr. 19-Region und der Plasmidkonformation im EBV-System zu erklären sein. Lamartina et al. (Lamartina, Ciliberto, and Toniatti, 2000) beschrieben eine DNaseI-hypersensitive offene Chromatinregion in der Nähe der RBS auf

Chr. 19. Dieser Befund unterstützt die Interpretation, daß die Chromatinkonformation für den Abstand zwischen der RBS und der Integrationsstelle kritisch sein könnte. Es wäre interessant zu sehen, ob man mit einem weiter stromaufwärts gelegenen Primer Integrationsereignisse im Bereich der RBS finden könnte.

Aus den hier gezeigten Daten, die innerhalb von Stunden nach der Infektion und ohne Selektion erhalten wurden, kann man schließen, daß frühe Integrationsereignisse sich nicht von solchen unterscheiden, die nach klonaler Selektion und möglichen extensiven Genomumordnungen gefunden wurden.

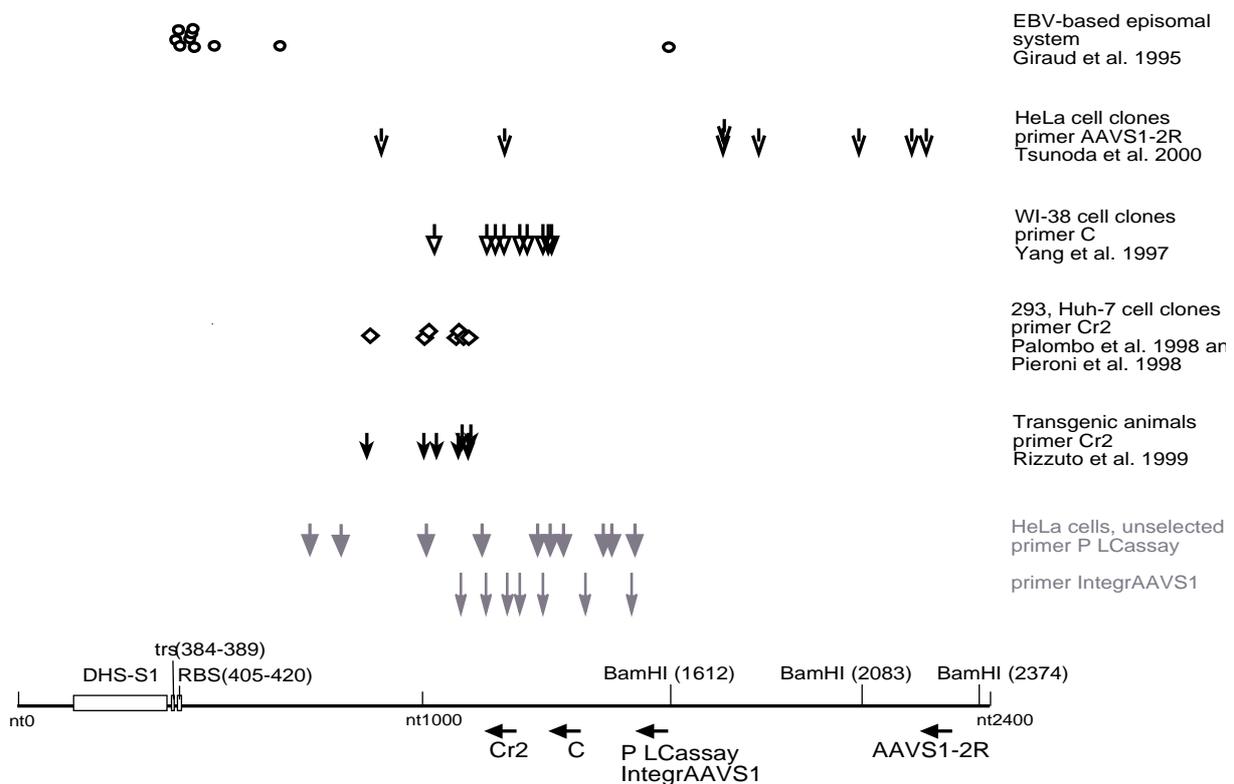


Abb. 5.1. Vergleich der publizierten Chromosom19-Bruchpunkte nach AAV-Integration. Schematische Darstellung der AAVS1-Integrationsorte, wie sie in verschiedenen Zellsystemen mit verschiedenen Primern detektiert wurden. Die Grundlinie zeigt die AAVS1-Sequenz mit der von Kotin et al. (Kotin, Linden, and Berns, 1992) eingeführten Numerierung. Die homologen Bereiche der trs und RBS, wie von Linden et al. (Linden et al., 1996) angegeben und die kürzlich beschriebene DNase-hypersensitive Stelle (DHS-S1) (Lamartina, Ciliberto, and Toniatti, 2000) sind als Kästchen dargestellt. Die verwendeten Primer sind mit der in der jeweiligen Publikation verwendeten Bezeichnung unterhalb der Linie an ihrer Nukleotidposition eingezeichnet. Die Primer haben folgende Nukleotidpositionen in 5'-3'-Richtung: Cr2 1222 bis 1201, C 1345 bis 1326, P LCassay 1609 bis 1593, IntegrAAVS1 1615 bis 1596 und AAVS1-2R 2299 bis 2280. Die in den jeweiligen Studien gefundenen chromosomalen Bruchpunkte sind als charakteristische Symbole dargestellt, jedes Symbol repräsentiert eine Integrationsstelle. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Bruchpunkte sind grau dargestellt. Das Zellsystem, die Primer zur Detektion der Integrationsorte und die jeweiligen Referenzen sind rechts von den Symbolen genannt.

5.1.3. Vergleich der Ergebnisse des linke ITR-spezifischen und rechte ITR-spezifischen Assays

Die ortsspezifische Integration des Wildtypvirus wurde mit zwei verschiedenen PCR-Assays untersucht, um die Orientierung des AAV-Genoms bezüglich AAVS1 nach Integration zu unterscheiden. Der Assay, der für die rechte ITR spezifisch war, arbeitete etwas sensitiver und produzierte kleinere Standardabweichungen als der linke ITR-spezifische Assay. Diese Tatsache spiegelt die aufwendige Feineinstellung der PCR-Bedingungen wider, die bei der Etablierung des rechten ITR-spezifischen Assays zur Anwendung kamen. Der rechte ITR-spezifische Assay diente dazu, die bis dahin weitgehend unbekannte Kinetik der ortsspezifischen Integration von AAV zu erfassen. Mit dem linke ITR-spezifischen Assay konnte diese Kinetik dann bestätigt werden. Der leichte Sensitivitätsverlust und die höhere Standardabweichung spielten für die Gesamtaussage eine untergeordnete Rolle und wurden daher akzeptiert, um bei vertretbarem Aufwand der Optimierung eine zufriedenstellende Spezifität zu garantieren.

Neben einem identischen Verlauf der Integrationskinetik wurden auch ähnliche Integrationsfrequenzen beider Assays gefunden (Hüser and Heilbronn, 2003; Hüser, Weger, and Heilbronn, 2002). Beide Assays arbeiten unabhängig voneinander; mit verschiedenen Primern, verschiedenen Reaktionsbedingungen sowie zwei völlig unabhängig klonierten und verdünnten Standardplasmiden. Beachtet man außerdem den Quantifizierungsbereich beider Assays über mehrere Log-Stufen hinweg, dokumentieren die ähnlichen Frequenzen die Genauigkeit beider Assays.

Die Sequenzanalyse der PCR-Produkte beider Assays ergab ähnliche Strukturen der ITR/AAVS1-Fusionssequenzen und zeigte, daß die chromosomalen Bruchstellen jeweils in demselben Bereich von AAVS1 zu finden sind (Abb. 5.1.).

Die Daten zur Kinetik, Frequenz und den chromosomalen Bruchstellen belegen die Orientierungsunabhängigkeit der Integration von AAV-2 in AAVS1. AAV bevorzugt also bei der Integration keine bestimmte Richtung.

5.1.4. Integrationsfrequenz pro Zelle und pro infektiöser Einheit

Die Integrationsereignisse in einem Pool von Zellen wurden in Kopien ITR/AAVS1-Fusionssequenzen/ μg genomischer DNA gemessen. Um die Integrationsfrequenzen pro Zelle zum jeweiligen Zeitpunkt zu berechnen, mußten einige Annahmen getroffen werden. Der genaue DNA-Gehalt der im Labor verwendeten HeLa-Zellen ist nicht bekannt. Macville et al. (Macville et al., 1999) beschrieben HeLa als hypertriploid ($3n+$). Es wurde daher ein DNA-Gehalt von 10 pg pro Zelle angenommen. Des weiteren wird von mehreren Gruppen beschrieben, daß HeLa über drei Chromosome 19 verfügt (Berns and Giraud, 1996). Es wurde jedoch nirgendwo eine Zelle gefunden, die mehrere, ein integriertes AAV-Genom tragende Chromosome 19 enthält. Aus diesem Grund wurde für die Berechnung der Integrationsfrequenz pro Zelle angenommen, daß nur ein Integrationsereignis pro Zelle stattfindet. Ferner ist die Quantifizierung eines Pools von Integrationsereignissen mittels PCR aufgrund technischer Gegebenheiten fehlerbehaftet: Einige Fragmente könnten wegen ihrer Länge oder Sekundärstruktur schlechter amplifiziert werden. Andere Integrationsereignisse werden aufgrund ihrer chromosomalen oder viralen Bruchstellen nicht von den verwendeten Primern erfaßt (Tsunoda et al., 2000). Die angegebenen Frequenzen können deshalb als untere Schätzung angesehen werden. Die kalkulierte ortsspezifische Integrationsrate vier Tage nach der Infektion liegt bei mindestens 14% der Zellen. Der Vergleich mit Integrationsfrequenzen, die von anderen Autoren mit anderen quantitativen Methoden gefunden worden, ist nur bedingt möglich. Integrationsfrequenzen von rekombinantem AAV in Gegenwart von Rep beziehen sich auf selektionierte Zellen, d.h. geben nur den ortsspezifischen Anteil an der Gesamtintegrationsfrequenz an und nicht die ortsspezifische Integrationsrate selbst.

Mit Wildtyp-Virus durchgeführte Arbeiten ermitteln dagegen meist die Gesamtintegrationsfrequenz über die Reaktivierung des Provirus mit Hilfe von Helfervirus und betrachten nicht die ortsspezifische Integrationsfrequenz. In einer der ersten Arbeiten zu AAV wurde von Berns et al. (Berns et al., 1975) beschrieben, daß aus ungefähr 30% (18 von 63 Klonen) der ursprünglich mit AAV infizierten Detroit-6-Zellklone nach Überinfektion mit Helfervirus AAV reaktiviert werden konnte. Eine weitere Studie zur Gesamtintegrationsfrequenz wurde von Laughlin et al. (Laughlin, Cardellicchio, and Coon, 1986) vorgenommen. In 7-14% der latent infizierten KB-Zellklone konnte nach Helferinfektion AAV-Kapsidantigen bzw. AAV-DNA nachgewiesen werden. Eine ungewöhnlich hohe Integrationsrate wurde von Kearns et al. (Kearns et al., 1996) beobachtet:

In 59% der latent infizierten bronchialen Epithelzellen ließ sich AAV-Integration nachweisen und 94% dieser Integrationsereignisse fanden auf Chr. 19 statt.

Kotin et al. (Kotin et al., 1990) beschreibt, daß bei 68% der latent infizierten Zellklone AAV an AAVS1 integriert vorliegt. Integration erfolgt also bei Wildtyp-Virus in 2/3 der Fälle in die AAVS1-Region. Berücksichtigt man diese Tatsache, kann man von den oben angegebenen Gesamtintegrationsfrequenzen auf ortsspezifische Integrationsfrequenzen pro Zelle je nach Zellart von 4 bis 40% nach klonaler Expansion schließen. Die hier ermittelte Frequenz von 14% liegt ebenfalls in diesem Bereich. Mit dem EBV-Shuttlesystem wurde die ortsspezifische Integrationsrate untersucht. Man fand in 2,4% der klonierten EBV-Plasmide AAV integriert vor (Giraud, Winocour, and Berns, 1995). Hier muß allerdings beachtet werden, daß die Kopiezahl der in diesen Zellen vorliegenden AAVS1-Region um Log-Stufen höher ist, als im natürlichen System.

Die provirale Struktur, in der AAV integriert vorliegt, besteht meist aus zwei bis vier tandemartig angeordneten Kopien, die an einer einzelnen Stelle im Chromosom integriert sind (Laughlin, Cardellichio, and Coon, 1986; McLaughlin et al., 1988). Der real time PCR-Assay erfasst allerdings nur eine AAV-Genom-Kopie dieser konkatemeren Strukturen. Es wurde noch nicht vollständig geklärt, ob die Konkatemere vor, während oder nach der Integration gebildet werden und ob sie durch Replikation aus einem einzigen infektiösen Genom hervorgehen. Es wurde jedoch nachgewiesen, daß Kopf-Schwanzende-Konkatemere des WT-AAV in der Lage sind, ortsspezifisch zu integrieren (Giraud, Winocour, and Berns, 1995). Für die Berechnung der Integrationsfrequenz pro infektiöser Einheit (d.h. des Anteils der infektiösen Partikel, die ins humane Genom integrieren) wurde angenommen, daß je eine Fusionssequenz aus zellulärer und AAV-DNA aus je einer infektiösen Einheit entstanden ist. Zu beachten ist hier, daß das Verhältnis von AAV-Genom-Partikeln zu infektiösen Partikeln in einem Virusstock je nach Präparation 10 bis 100 ist.

5.1.5. Integration von AAV-Vektoren

AAV-Vektoren sind in der Lage, Langzeitgenexpression zu vermitteln (Davidson et al., 2000; Halbert et al., 2000; Pruchnic et al., 2000). Das Provirus kann dabei in der Zelle in integrierter oder episomaler Form vorliegen. In Abwesenheit von Rep gleichen die proviralen Strukturen denen, die in Anwesenheit von Rep beobachtet werden, mit der Ausnahme, daß Integration nicht auf Chromosom 19 stattfindet (Duan et al., 1997; McLaughlin et al., 1988; Rutledge and Russell, 1997; Yang et al., 1997). Es werden in beiden Fällen Kopf-Schwanzende-Wiederholungen des AAV-Genoms, Umordnungen der zellulären DNA und Mikrohomologien zwischen zellulärer und viraler DNA an den Fusionsstellen beobachtet. Die Integrationsrate, die man ohne Rep beobachtet, ist variabel und je nach Zelllinie verschieden. Sie kann von 1% (Russell and Hirata, 1998) bis zu 80% (McLaughlin et al., 1988) betragen. Die Frequenz mit der AAV-Vektoren *in vivo* integrieren, bleibt weiterhin unbekannt (Senior, 2002). Die Persistenz der Transduktion scheint mit der Bildung von zirkulären rAAV-Intermediaten zusammenzuhängen (Duan et al., 1999; Muzyczka and Berns, 2001). Aus monomeren Strukturen bilden sich höhermolekulare Konkatemere. Dieser Vorgang kann von Integrationsereignissen begleitet sein (Afione et al., 1996; Flotte, Afione, and Zeitlin, 1994; Kearns et al., 1996; Malik et al., 2000; Vincent-Lacaze et al., 1999). Für eine gentherapeutische Anwendung von rAAV kann die effiziente ortsspezifische Integration des Zieltransgens wünschenswert sein. Eine Reihe von Arbeiten untersuchten daher die Integration von rekombinanten AAV in Form von Viren oder Plasmiden in Anwesenheit des Rep-Proteins. Surosky (Surosky et al., 1997) wies in Anwesenheit von Rep eine Integrationsfrequenz von 5-10% der Zellklone nach. Diese Rate war unabhängig vom verwendeten Rep-Promotor. Tratschin (Tratschin et al., 1985) und Lebkowski (Lebkowski et al., 1988) erreichten 0,5-5% Transduktionseffizienz. Tsunoda (Tsunoda et al., 2000) erzielte nach Transfektion in 0,04-0,06% der Klone G418-Resistenz.

Die Frequenz der ortsspezifischen Integration bezogen auf die Gesamtintegrationsrate wurde in verschiedensten experimentellen Ansätzen untersucht. Hier wurde die Integrationsrate meist durch Analyse selektierter Klone nach Transfektion und/oder Infektion bestimmt. Shelling et al. (Shelling and Smith, 1994) fanden nach Transfektion oder Infektion in 50-89% der selektierten Zellklone Umordnungen der AAVS1-Region, was auf ortsspezifische Integration hindeuten kann. In den im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurde das virale Genom in Plasmidform in die Zellen eingebracht. Tsunoda et al. (Tsunoda et al., 2000) fanden, daß 61% der selektierten Klone ortsspezifische Integration trugen, wenn das *rep*-Gen,

von seinem authentischen p5-Promotor getrieben, innerhalb der AAV-ITR plazierte wurde. Wurde *rep* außerhalb der ITR, jedoch auf demselben Plasmid wie das Reportergen, exprimiert, lag die Frequenz der ortsspezifischen Integration zwischen 7 und 25% (Pieroni et al., 1998), 22-24% (Lamartina et al., 1998) bzw. 38% (Balagué, Kalla, and Zhang, 1997) der stabilen Klone. Diese drei Arbeiten zeigen außerdem, daß die je nach verwendetem Promotor schwankende Rep-Expressionshöhe keinen Einfluß auf die ortsspezifische Integrationsfrequenz hat. Lamartina et al. wiesen in dieser Studie auch nach, daß Rep, in Proteinform durch Lipofektion in die Zelle gebracht, ortsspezifische Integration vermitteln kann. Wurden die AAVS1-Region tragende Fibroblasten transgener Ratten transfiziert, konnte in 14% der selektierten Zellklone Integration nachgewiesen werden (Rizzuto et al., 1999). Palombo et al. (Palombo et al., 1998) gelang die Integration in die AAVS1-Region mittels Infektion mit einem Hybrid-Baculo-AAV-Virus mit einer Frequenz von 36%, was in etwa der Frequenz nach Transfektion entspricht. Die geschätzte Gesamtintegrationsrate lag hier bei 10%. Recchia et al. (Recchia et al., 1999) verfolgten einen ähnlichen Ansatz und konstruierten Adenovirus-AAV-Hybridviren. Die Koinfektion zweier Adenoviren mit *rep*-Expressionskassette bzw. mit AAV-ITR-flankierter Integrationskassette führte zu einer ortsspezifischen Integrationsfrequenz von 35%.

In der vorliegenden Arbeit sollte die ortsspezifische Integrationsfrequenz von AAV-Vektoren in Anwesenheit verschiedener Varianten des Rep-Proteins untersucht werden. Nach Transfektion von AAV-Plasmiden waren nur sehr geringe Kopiezahlen ITR/AAVS1-Fusionssequenzen detektierbar, so daß eine Unterscheidung der Rep-Konstrukte auf diesem Wege nicht möglich war. Im Vergleich zur Infektion mit Wildtyp-Virus waren die detektierten Signale um den Faktor 20 niedriger. Der Grund dafür konnte nicht geklärt werden. Zum einen könnte durch Infektion eine höhere Transduktionsrate erreicht worden sein als durch Transfektion, zum anderen wäre denkbar, daß die DNA in den Viruspartikeln als Einzelstrang ein besseres Integrationsmaterial darstellt als doppelsträngiges Plasmid. Möglicherweise täuscht eine große Menge an Einzelstrang-DNA, wie sie nach Infektion mit hoher MOI in den Zellen vorliegt, einen genomischen Schaden vor und induziert zelluläre DNA-Reparaturmechanismen (Russell and Hirata, 1998), welche wiederum Bestandteil des Integrationsprozesses sind. Das würde auch erklären, warum bei den hier durchgeführten Experimenten die maximale Integrationsrate pro Zelle erst ab einer MOI von 500 erreicht werden konnte (Tabelle 4.3.).

Um nun trotzdem die Quantifizierbarkeit der Integration, vermittelt durch verschiedene *rep*-Konstrukte, zu ermöglichen, wurden die Zellen nach Transfektion auf Expression des Neomycin-Resistenzgens selektiert. Es zeigte sich, daß selbst nach Selektion von Zellen, die mit Wildtyp- *rep* transfiziert worden waren, nur sehr wenig ortsspezifische Integration nachzuweisen war (1,6% bei *psubgfpneorepcap* bzw. 2,3% bei *psubgfpneorepcap-*). Wurde *rep* nicht auf demselben Plasmid wie die ITR-flankierte Transgenkassette bereitgestellt, war die Frequenz ungefähr noch eine 10er Potenz niedriger. Hierbei spielte es keine Rolle, ob *rep* vom CMV-Promotor (pRep78) oder p5-Promotor (Δ TR18) getrieben war.

Ungeklärt bleibt ebenfalls, warum nach Transfektion mit dem Wildtypgenom tragenden Plasmid pTAV2-0 im Vergleich zum rekombinanten Genom tragenden *psubgfpneorepcap*-um den Faktor 3 weniger Integrationsereignisse zu detektieren waren. Tsunoda et al. (Tsunoda et al., 2000) fanden, daß nach Integration eines Plasmides mit ITR flankierter *p5repneo*-Kassette die meisten Bruchpunkte in der p5-Region und nicht in den ITR zu finden waren. Liegt die p5-Region innerhalb der ITR, wie im Falle des Wildtyp-Plasmides pTAV2-0, würde durch solche Integrationsereignisse die ITR-Primerbindungsstelle verloren gehen.

Kürzlich wurde gezeigt, daß die Gesamtintegrationsfrequenz von AAV-Vektoren durch Anwesenheit einer p5-Sequenz *in cis* innerhalb der ITR deutlich erhöht werden kann (Philpott et al., 2002a). Ohne diese Sequenzen konnte keine ortsspezifische Integration detektiert werden. Vielmehr lag die provirale DNA in Anwesenheit von Rep episomal vor. Für eine effiziente Integration auf AAVS1 scheint demnach neben der Anwesenheit des Rep-Proteins *in trans* ein *cis*-Element innerhalb oder auch wie bei Balagué et al. (Balagué, Kalla, and Zhang, 1997) und Pieroni et al. (Pieroni et al., 1998) außerhalb der ITR nötig zu sein. Das würde auch die unterschiedlichen Integrationsraten von *psubgfpneorepcap* (*rep in cis*) und *psubgfpneo*+ Δ TR18 (*rep in trans*; vergleiche Tabelle 4.4.) erklären. In einer weiterführenden Arbeit (Philpott et al., 2002b) wurde dieses Integration vermittelnde *cis*-Element auf 138 bp der p5-Region eingeschränkt. Dessen alleinige Anwesenheit *in cis* genügte, um Integration zu vermitteln. Das steht im Kontrast zu der bisherigen Annahme, daß *in cis* ausschließlich die AAV-ITR ortsspezifische Integration vermitteln können.

5.1.6. Anwendungsmöglichkeiten der real time PCR-Assays und Ausblick

Die etablierten PCR-Assays sind sowohl sehr sensitiv als auch hochspezifisch für die Detektion von AAV-ITR/AAVS1-Sequenzen. Sie ermöglichen eine verlässliche Quantifizierung über einen Konzentrationsbereich von mehreren log-Stufen. Es konnte der Verlauf der Integration in Chromosom 19 nach Infektion mit Wildtyp-Virus ohne Selektion der Zellen untersucht werden. Außerdem war es erstmals möglich, Integration innerhalb von Stunden nach der Infektion zu quantifizieren. Die sensitive, schnell durchzuführende Quantifizierung eröffnet die Möglichkeit, Integration in nichtteilenden Zellen nachzuweisen. Die Fähigkeit, nichtteilende Zellen zu infizieren und in deren Genom zu integrieren, ist eine wichtige Eigenschaft von Vektoren, die für die Gentherapie von z. B. Stammzellen oder neuronalen Zellen eingesetzt werden sollen. Es gibt Hinweise darauf, daß AAV in nichtteilenden Zellen integrieren kann, wenn auch mit einer deutlich niedrigeren Frequenz als in teilenden Zellen (Russell, Miller, and Alexander, 1994).

Zudem könnte mit einem sensitiven Assay, der ohne Klonierung von Einzelzellen auskommt, ortsspezifische Integration *in vivo* quantifiziert werden. Dies wäre besonders interessant, wenn es gelänge, AAV-basierte Vektoren zu entwickeln, die über die attraktive Eigenschaft der ortsspezifischen Integration verfügen. Erste Konzepte dazu wurden bereits vorgestellt (Palombo et al., 1998; Philpott et al., 2002a; Recchia et al., 1999). Darüber hinaus bietet der Assay die Möglichkeit, AAV-Rep-Mutanten und Mutanten des *cis*-Integrationselements (ITR, p5) auf ihre Fähigkeit, ortsspezifische Integration des Transgens zu vermitteln, zu screenen. Jede Deletion von Komponenten, die nicht essentiell für die Integration sind, würde den Platz für therapeutische Gene erhöhen. Möglicherweise ließen sich auch unerwünschte Nebeneffekte, wie sie durch die Expression des *rep*-Gens auftreten, reduzieren. Aufgrund der Schnelligkeit des Assays und dem Verzicht auf die Expansion von Zellklonen könnte eine Vielzahl von Proben innerhalb kürzester Zeit analysiert werden. Der Assay ist für eine Analyse eines Zellpools mit verschiedensten Integrationsereignissen sehr gut geeignet. Auf Einzelklonniveau kann es vorkommen, daß einige Klone aus technischen Gründen nicht erfaßt werden.

Kürzlich wurde gefunden, daß andere AAV-Serotypen (AAV-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8) bestimmte Gewebe effizienter und mit höherer Spezifität transduzieren können als AAV-2 (Grimm, 2002; Zolotukhin et al., 2002). Mittels Pseudotypisierung, wobei DNA auf AAV-2 basierender Vektoren in Kapside anderer Serotypen verpackt wird, versucht man, diesen Umstand auszunutzen. Ortspezifische Integration könnte mit dem vorgestellten Assay

analysiert werden. Bei Verwendung der ITR anderer Serotypen könnte der Assay in modifizierter Form zur Anwendung kommen.

Nicht zuletzt kann der hier etablierte Assay dazu beitragen, die Biologie und den Mechanismus der ortsspezifischen Integration aufzuklären und die möglichen Auswirkungen einer AAV-basierten Gentherapie besser abzuschätzen.

5.2. Verpackung von humanen Chr.19-Sequenzen in AAV-Virionen während der Virusproduktion

Im zweiten Teil dieser Promotionsarbeit wurde der unerwartete Befund erhoben, daß sowohl hochgereinigte AAV-2 Wildtyppräparationen als auch AAV-Vektorpräparationen zelluläre Sequenzen enthalten, die vom humanen AAVS1-Lokus der ortsspezifischen Integration stammen. Untersuchungen dieser humanen Sequenzen zur Sensitivität gegenüber DNasen belegten, daß sie in Virionen verpackt vorliegen.

5.2.1. Vergleich der unter permissiven Bedingungen generierten Fusionssequenzen mit in Abwesenheit von Helfervirus generierten Fusionssequenzen

Während einer produktiven Infektion können AAV-Partikel entstehen, deren Viriongenom kovalent an zelluläre DNA gebunden ist. Die DNA-Sequenzanalyse der Fusionsstellen ergab, daß AAV-ITR-Sequenzen fusioniert mit AAVS1-Sequenzen vorliegen, ähnlich wie nach latenter Infektion (Hüser, Weger, and Heilbronn, 2003). Jedoch lassen die Sequenzen der verpackten DNA, im Gegensatz zu den Fusionssequenzen nach latenter Infektion, auf starke Genomumordnungen schließen. Es ist daher anzunehmen, daß Rekombinations- und Replikationsereignisse vor der Verpackung stattfanden und nicht durch PCR-Amplifikation oder Subklonierung entstanden sind. Dieses wird auch durch den Fakt untermauert, daß es möglich war, aus einer AAV-Präparation mehrmals dieselben umgeordneten Sequenzen zu isolieren.

5.2.2. Modell der ortsspezifischen Integration

Für eine ortsspezifische Integration werden die folgenden Komponenten benötigt, die zusammen einen ternären Komplex (Weitzman et al., 1994) bilden: eines der großen Rep-Proteine *in trans*, die Chr. 19-AAVS1-Integrationsstelle sowie ein Rep-bindendes Integrationselement von AAV *in cis*. Nach latenter Infektion liegt AAV als Provirus in integrierter Form vor. Meist findet man konkatemere Strukturen in Kopf-Schwanzende-(head to tail) Konformation. Um die Kopf-Schwanz-Konkatemere bei der Integration zu erklären,

postulierten Linden et al. (Linden et al., 1996) ein Modell der „rolling circle“-Replikation von zirkulären AAV-Intermediaten. Die Integration wird durch einen Rep-vermittelten Strangbruch an der Chr. 19-*trs* eingeleitet. Rep soll dann an das freie 5'-Ende binden, ähnlich wie es für die Bindung an das einzelsträngige AAV-Genom beschrieben wurde (Snyder, Im, and Muzyczka, 1990). Das freie 3'-Ende des gespaltenen Chromosomstranges kann als Primer für die Polymerase dienen. Bei gleichzeitiger Verdrängung des Rep-gebundenen Stranges repliziert die Polymerase entlang der entstandenen Lücke. Integration wird durch Templatewechsel hin zum AAV-Genom, welches, ebenfalls an Rep gebunden, in zirkulärer Form im Komplex vorliegt, erklärt. Durch mehrfache Replikation an einem AAV-Genom entstehen die beschriebenen Kopf-Schwanz-Konkatemere. Young und Samulski wiesen in Zellkulturexperimenten nach, daß ein Strangbruch an der AAV-ITR-*trs* für ortsspezifische Integration nicht nötig ist und die alleinige Überexpression des *rep*-Gens ausreichend ist, um Umordnungen an Chr. 19-AAVS1 zu induzieren (Young et al., 2000). Auf diesen Beobachtungen basiert die Vermutung, daß Rep78/68 durch Bindung an RBS und *trs* auf Chr. 19 eine Replikation initiiert. Das AAV-Genom soll dann in den Rep-AAVS1-Komplex eintreten. Nach diesem Modell nimmt man weiter an, daß Integration auf zellulären Rekombinationsmechanismen beruht, die auch in der Genamplifikation aktiv sind (Young and Samulski, 2001). Die Studie von Urcelay et al. (Urcelay et al., 1995) zeigt, daß Rep-abhängige Initiation der DNA-Synthese von einer ori-Sequenz innerhalb AAVS1 startet, und untermauert damit das Modell.

Die beschriebene Fähigkeit von Rep, DNA nicht nur ortsspezifisch zu spalten, sondern auch freie einzelsträngige DNA in Verbindung mit ternärer Komplexbildung zu ligieren (Smith and Kotin, 2000), könnte die Beobachtung kovalent an AAVS1-Sequenzen gebundener ITR erklären. Unabhängig vom genauen Mechanismus der Integration können die gefundenen Fusionssequenzen als Zwischenverbindungen, die während der Integration entstehen und episomal vorliegen, angesehen werden. Aufgrund vorhandener Verpackungssignale auf den ITR können sie in Virionen verpackt werden. Zu diesem Zeitpunkt war es nur möglich, die DNA-Sequenzen zwischen den bekannten AAVS1- und ITR-Primern zu analysieren. Es gibt keine experimentellen Daten, ob noch andere kovalent gebundene DNA verpackt wird. Um diese zu detektieren, müßten ganze verpackte Genome kloniert werden, was aufgrund des geringen Prozentsatzes an Fusionssequenzen im Virionstock einen beträchtlichen Aufwand darstellen würde und den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte.

5.2.3. Möglicher Mechanismus der Generierung von Fusionssequenzen während einer produktiven Infektion

Der AAV-Lebenszyklus läuft zweiphasig ab. Allgemein anerkannt ist, daß eine AAV-Infektion von Zellen zur Integration von AAV führt und somit Latenz etabliert wird. Davon unabhängig gesehen werden kann der produktive lytische Zyklus, bei welchem die Anwesenheit eines Helfervirus, typischerweise Herpes- oder Adenovirus, nötig ist. Dieser induziert hochgradige Replikation des episomal vorliegenden AAV-Templates (Muzyczka and Berns, 2001). Im Falle einer latent infizierten Zelllinie erfolgt ein Wiedereintritt in den lytischen Zyklus. Dabei bleibt unklar, ob das AAV-Genom ausgeschnitten und dann repliziert wird oder ob die integrierte Form als Vorlage für die Replikation dient.

Die hier vorgestellten Daten lassen die Interpretation zu, daß Integration von AAV und produktive Replikation enger miteinander in Beziehung stehen als bisher angenommen. Die verpackten ITR/AAVS1-Fusionssequenzen können als Zwischenprodukte der Integration angesehen werden. Es scheint, daß AAV ein gewisses Potential besitzt, an AAVS1 zu integrieren und zwar unabhängig von der Anwesenheit eines Helfervirus (Abb. 5.2.). Man kann vermuten, daß bei einer produktiven AAV-Replikation mit Helfervirus kurz nach der AAV-Infektion ausreichend Rep gebildet wird, um Integration zu initiieren noch bevor die Ad-Helferfunktionen vollständig exprimiert sind und die AAV-Genomreplikation startet. Ad-induzierte Rep78 Bildung und AAV DNA-Replikation wurde 10-12 h p.i. nachgewiesen (Redemann, Mendelson, and Carter, 1989). In Abwesenheit von Helfer, also unter Bedingungen der Rep-Autoregulation, wurde Rep78 auf Western Blots schon 8 h p.i. detektiert. Mit Methoden der Immunfluoreszenz konnte schon 5 h p.i. eine Rep-positive Zelle gefunden werden (Heilbronn et al., 2003). In latent infizierten Zellklonen wurden einige tausend Rep-Moleküle pro Zelle gemessen (Young et al., 2000). Weiterhin konnte schon 8 h p.i. ortsspezifische Integration nachgewiesen werden (Hüser, Weger, and Heilbronn, 2002), wie im ersten Teil dieser Arbeit dargestellt wurde. Demzufolge scheint es möglich zu sein, daß limitierte ortsspezifische Integration sehr früh nach AAV-Infektion stattfindet, noch bevor die Ad-stimulierte AAV-Replikation startet. Die kürzlich erschienene Studie zur Integration eines Rep78 kodierenden ITR-enthaltenden Ad-Vektors unterstützt diese Interpretation (Philpott et al., 2002a). Mit fortschreitender Replikation des AAV-Genoms tritt die in hoher Kopiezahl vorliegende Rep-Bindestelle der ITR zunehmend in Konkurrenz zur AAVS1-Bindestelle. Wie in *in vitro* Versuchen demonstriert wurde (Young et al., 2000), ist die Affinität von Rep zur ITR-Bindestelle höher als zur AAVS1-Bindestelle. Zusätzlich dürfte die

später im Verlauf der Infektion auftretende Kompartimentbildung der AAV-Genome und von Rep in nukleären Ad-Replikationszentren (Weitzman, Fisher, and Wilson, 1996) das Chromosom 19-Targeting entscheidend behindern. Aus diesen Gründen ist anzunehmen, daß das Dirigieren von AAV zum Chromosom 19 nur in den ersten Stunden nach AAV- und Ad-Koinfektion stattfinden kann. Im übrigen hätte ein Integrationsereignis wegen der Lyse nach Ad-Infektion keine Auswirkungen auf die infizierte Zelle.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die gefundenen verpackten Fusionssequenzen auf das begrenzte Auftreten ortsspezifischer Integrationsereignisse während einer produktiven Infektion hinweisen. Offensichtlich stehen der latente und der produktive AAV-Replikationszyklus in engerer Beziehung zueinander als bisher angenommen.

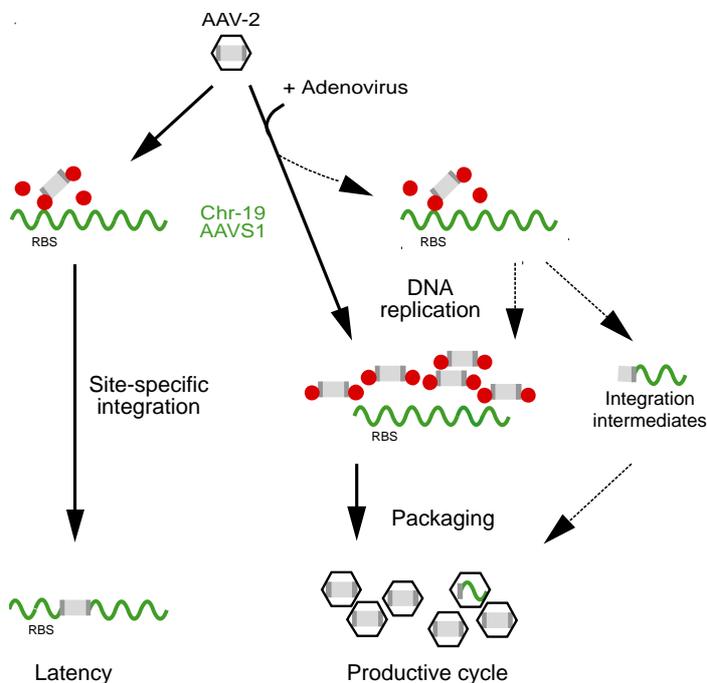


Abb. 5.2. Rep-abhängige Generierung von verpackten AAV-ITR/Chr. 19-Fusionssequenzen während einer produktiven AAV-Infektion. Der zweigeteilte AAV-Lebenszyklus ist schematisch dargestellt. Das AAV-Genom ist grau gezeichnet mit dunklen ITR. Die Rep-Moleküle sind rot, der humane Chr. 19-Integrationsort AAVS1 ist als grüne Wellenlinie dargestellt. Die allgemein akzeptierten Teile des AAV-Lebenszyklus sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Gestrichelte Pfeile zeigen weitere Nebenwege an, die postuliert wurden, um die Entstehung von verpackten Fusionssequenzen zu erklären. Eine AAV-2-Infektion führt in Abwesenheit von Helfervirus zu limitierter, autoregulierter *rep*-Genexpression und zur Etablierung von Latenz. Dabei wird die Integration von AAV an AAVS1 auf Chr. 19 durch ternäre Komplexbildung von Rep mit seinen Bindungsstellen der AAV-ITR und AAVS1 vermittelt. Durch adenovirale Koinfektion tritt AAV in den produktiven Zyklus ein; *rep* wird exprimiert und die episomale AAV-Genomreplikation wird angeschaltet. Unter diesen Bedingungen ist das meiste Rep an die Rep-Bindungsstellen der replizierten AAV-Genome gebunden. Die replizierten Genome werden von AAV-Kapsidproteinen verpackt. Dieses Konzept wird durch die Vermutung erweitert (gestrichelte Pfeile), daß in Anwesenheit von Ad eine begrenzte Integration stattfinden kann. Diese führt zur Generierung von Integrationszwischenprodukten, welche ebenfalls als Template für weitere Replikation dienen können. Da die Zwischenprodukte die ITR mit den Verpackungssignalen enthalten, können sie in AAV-Kapside verpackt werden.

5.2.4. Konsequenzen für die Gentherapie und für die rAAV-Vektorproduktion

Die verpackten Fusionssequenzen wurden nicht nur in AAV-Wildtyppräparationen sondern auch in vergleichbaren Mengen in Vektorstocks gefunden. In Tierversuchen zu AAV-vermittelten Gentransfer werden bei Mäusen und Ratten typischerweise zwischen 10^{11} und 10^{13} Genomäquivalente injiziert. Bei dieser Dosis kann man erwarten, daß 10^4 bis 10^6 verpackte ITR/Chr. 19-Fusionssequenzen verabreicht werden.

Es wurden lediglich Vektoren untersucht, die auf dem Plasmid *psub201* (Samulski, Chang, and Shenk, 1987) basieren. Es wäre interessant zu sehen, wie sich optimierte rAAV-Vektoren wie z.B. die pUF2 Serie (Zolotukhin et al., 1996) und deren abgeleitete Vektoren verhalten. Man muß in Betracht ziehen, daß viele, wenn nicht sogar die meisten, AAV-Vektorpräparationen geringe, bis jetzt noch nicht detektierte Mengen an verpackten Sequenzen enthalten, die humanen Ursprungs sind. Dieser Punkt sollte kritisch hinterfragt werden. Wie auch immer, auf verpackte Fusionssequenzen zurückzuführende ungewollte Nebenwirkungen einer AAV-Gentherapie sind bis jetzt nicht dokumentiert worden.