

## **7. ANHANG**

### **7.1. Zusammenfassung**

Das adeno-assoziierte Virus Typ 2 (AAV-2) ist das einzige bekannte Virus, welches die Fähigkeit besitzt, ortsspezifisch in das humane Genom zu integrieren. In Abwesenheit eines Helfers etabliert AAV Latenz durch Integration in eine Region auf dem q-Arm von Chromosom 19 (19q13.3-qter), die als AAVS1 bezeichnet wird. Die Integration erfolgt an AAVS1 in einem Bereich von mehreren hundert Basenpaaren. Die Ortspezifität der Integration wird durch das AAV-Replikationsprotein Rep78 bzw. durch seine C-terminal gespleißte Variante Rep68 vermittelt. AAV-basierte Vektorsysteme gewinnen aufgrund der Apathogenität von AAV und der hohen Langzeitexpressionsraten zunehmend an Bedeutung für die Gentherapie.

Inhalt der vorliegenden Arbeit war es, die Kinetik und die Frequenz der ortsspezifischen Integration von AAV-2 in AAVS1 zu untersuchen. Dazu wurden zwei real time PCR-Assays etabliert, die eine Differenzierung der bei der Integration möglichen Orientierungen des AAV-Genoms in Bezug auf AAVS1 zulassen. Die gewählten PCR-Bedingungen erlaubten trotz der bekannten Variabilität in der Fragmentlänge eine verlässliche Quantifizierung der Integration innerhalb von Stunden nach der Infektion. Ortspezifische Integration wurde bei einer Multiplizität der Infektion von 500 zwischen 8 und 16 Stunden p.i. detektierbar und erreichte 4 Tage p.i. ein Maximum. Zu diesem Zeitpunkt lag in 14% der unselektierten HeLa-Zellen das AAV-Genom integriert in Chromosom 19 vor. Es wurde für eine Multiplizität der Infektion von 10 kalkuliert, daß 4 Tage nach der Infektion mindestens 1 von 1000 infektiösen AAV-Partikeln integriert vorlag. Die Analyse der chromosomalen Bruchstellen ohne Selektion zeigte eine Übereinstimmung mit Bruchstellen, wie sie für klonale Zelllinien und transgene Tiere beschrieben wurden. Anhand der Daten beider Assays zu Kinetik, Frequenz und chromosomalen Bruchpunkten konnte dokumentiert werden, daß AAV orientierungsunabhängig in AAVS1 integriert. AAV-Vektoren integrierten in Anwesenheit der AAV-Rep-Proteine, welche die Ortspezifität der Integration vermitteln, weitaus weniger effizient als der Wildtyp.

Der zweite Teil der Promotionsarbeit ergab sich aus einem unerwarteten Befund: Der PCR-Assay detektierte schon sehr früh nach Infektion vermeintlich ortsspezifische Integration.

Untersuchungen zur Herkunft dieser Signale ergaben, daß hochgereinigte AAV-Wildtyp- und Vektorpräparationen AAV-ITR/AAVS1-Fusionssequenzen enthielten. Durch eine Reihe von Kontrollen wurde nachgewiesen, daß diese Fusionssequenzen in Kapside verpackt sind und sie während einer einzigen Produktionsrunde generiert werden. Die Daten befürworten die Annahme, daß der latente Lebenszyklus von AAV, dessen Bestandteil die ortsspezifische Integration ist, und der Helfervirus-abhängige produktive Zyklus in engerer Beziehung zueinander stehen, als bisher angenommen.

Die Anwendung der PCR-Assays ermöglicht die Untersuchung früher Stufen der AAV-Wildtyp- und Vektorintegration und vereinfacht wesentlich die Bestimmung der Integrationseffizienz von AAV-ITR- (invertierte terminale Repetition) und/oder *rep*-Mutanten.

## 7.2. Summary

The adeno-associated virus type 2 (AAV-2) has the unique ability to integrate site-specifically into the human genome. In the absence of a helper virus AAV establishes latency by integration into a region of the q arm of chromosome 19 (19q13.3-qter), called AAVS1. Integration takes place within a region of several hundred base pairs of AAVS1. The site-specificity of AAV integration is mediated by the AAV-replication protein Rep78 or by its C-terminally spliced variant Rep68. AAV based vector systems gain increasingly significance for gene therapy due to the non-pathogenicity of AAV and the high long-term gene expression rates.

The aim of this work was to evaluate kinetics and frequency of AAV-2 site-specific integration into chromosom 19-AAVS1. Two real time PCR assays were established, that allow differentiation of the two possible orientations of the integrated AAV genome with regard to the integration locus. In spite of the variable fragment length, the established PCR conditions ensured reliable quantification of integration rates within hours after infection. At a multiplicity of infection of 500 site-specific integration became detectable between 8 and 16 hours after infection and peaked at day 4 post infection. At this time point 14% of unselected Hela cells were targeted. At least 1 of 1000 infectious AAV particles was found to integrate into AAVS1 at a multiplicity of infection of 10 up to day 4 post infection. Chromosomal breakpoints within AAVS1 obtained without selection agreed with those found in clonal cell lines and transgenic animals. The Data further documented that AAV integrates into AAVS1 in either orientation and with equal kinetics and frequency. AAV vectors integrated with a much lower frequency as compared to AAV wildtype, even in the presence of site-specificity mediating Rep78/68.

The second part of this work resulted from an unexpected observation: The PCR assay detected putative site-specific integration very early post infection. Detailed studies proved that integration signals originated from AAV/ITR-AAVS1 junctions which were contained in highly purified AAV wildtype and vector preparations. A series of control experiments documented that junctions were packaged in AAV capsids and were newly generated during a single round of AAV production. These Data suggest that AAV latency established by site-specific integration and the helper virus dependent productive cycle are more closely related than previously thought.

In conclusion, the use of the established assays will facilitate the study of early steps of wildtype and vector integration and will considerably simplify quantification of integration rates of AAV-ITR (inverted terminal repeat) and /or *rep* mutants.

### **7.3. Lebenslauf**

## 7.4. Publikationen, Poster, Vorträge

### 7.4.1. Publikationen

Ernst, W., Grabherr, R., Wegner, D., Borth, N., Grassauer, A., Katinger, H. (1998). Baculovirus surface display: construction and screening of a eukaryotic epitope library. *Nucleic Acids Res* **26**(7), 1718-1723

Wegner, D., Weger, S., Heilbronn, R. (2000). Highly Sensitive and Rapid Detection of AAV-Mediated Site-Specific Integration. *Infect Dis Rev* **2**(3)166

Hüser, D., Weger, S., and Heilbronn, R. (2002). Kinetics and Frequency of Adeno-Associated Virus Site-Specific Integration into Human Chromosome 19 Monitored by Quantitative Real-Time PCR. *J Virol* **76**(15).7554-7559

Hüser, D., and Heilbronn, R. (2003). Adeno-associated virus integrates site-specifically into human chromosome 19 in either orientation and with equal kinetics and frequency. *J Gen Virol* **84**,133-137

Hüser, D., Weger, S., and Heilbronn, R. (2003). Packaging of Human Chromosome 19-Specific Adeno-Associated Virus (AAV) Integration Sites in AAV Virions during AAV Wild-Type and Recombinant AAV Vector Production. *J Virol* **77**(8).4881-4887

### 7.4.2. Poster und Abstracts

Wegner, D., Weger, S. und Heilbronn, R. (2000). Highly Sensitive and Rapid Detection of AAV-Mediated Site-Specific Integration. *VIII<sup>th</sup> Parvovirus Workshop*, Mont-Tremblant, Kanada

Hüser, D., Weger, S. und Heilbronn, R. (2001). Specific and Rapid Detection of AAV-Mediated Site-Specific Integration. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie*, Dresden

Hüser, D., Weger, S. und Heilbronn, R. (2001). Specific and rapid detection of adeno-associated virus (AAV) type 2-mediated site-specific integration. *Jahrbuch UKBF*, FU Berlin

Hüser, D., Weger, S. und Heilbronn, R. (2002). Kinetics of AAV Site-Specific Integration Monitored by Real Time PCR. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie*, Erlangen

Hüser, D., Weger, S. und Heilbronn, R. (2002). Kinetics of Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Integration into Human Chromosome 19 Monitored by Real Time PCR. *Jahrbuch UKBF*, FU Berlin

Hüser, D., Weger, S. und Heilbronn, R. (2002). Packaging of Human Chromosome 19-Specific AAV Integration Sites in AAV Virions during AAV Wildtype and rAAV Vector Production. *IX Parvovirus Workshop*, Bologna, Italien

### **7.4.3. Vorträge**

Hüser, D., Weger, S. und Heilbronn, R. (2002). Kinetics of AAV-2 Mediated Site-Specific Integration Monitored by Real Time PCR. *IX Parvovirus Workshop*, Bologna, Italien

## **7.5. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die sich mit meinen wissenschaftlichen Problemen auseinandergesetzt haben und mich mit ihrem Rat und ihrer Erfahrung unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Regine Heilbronn für die Bereitstellung des interessanten Themas und die engagierte fachliche Betreuung.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Dr. Stefan Weger, der mir mit seiner umfangreichen experimentellen Erfahrung und fundierten Sachkenntnis stets für Diskussionen zur Verfügung stand.

Ein großes Dankeschön möchte ich den Mitarbeitern der Abteilung Virologie insbesondere den Laborkollegen der Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft aussprechen. Für die hervorragende technische Unterstützung bei der Vektorstockproduktion danke ich Maja Gere.

Darüber hinaus möchte ich mich insbesondere bei meiner Familie für die immerwährende Unterstützung bedanken.