

Daniel Antonius Waterkamp

Dr. med.

Optimierung und Anwendung einer randomisierten, auf Adeno-assoziierten Viren exprimierten Peptidbank

Geboren am 17.02.1979 in Bielefeld

Staatsexamen am 25.04.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. H. A. Katus

Für den erfolgreichen Einsatz der Gentherapie stellt die Verbesserung der Effizienz und Spezifität verfügbarer Gentherapievektoren eine wichtige Voraussetzung dar. Durch das Targeting zelltypspezifischer Rezeptoren könnten Vektoren spezifisch auf bestimmte Zelltypen umgelenkt werden. Dadurch könnte die Expression des zu transduzierenden Produktes im Zielgewebe erhöht und gleichzeitig negative Effekte auf gesundes Gewebe verringert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die Charakterisierung, Optimierung und Anwendung einer Methode zur Selektion zellspezifisch bindender Gentherapievektoren dargelegt. Basis dieser Methode des Targetings bilden Adeno-assoziierten Viren des Serotyps 2 (AAV2), an deren Capsidoberfläche randomisierte Peptidliganden exprimiert werden, wodurch ein Umlenken der Vektoren von ihrem natürlichen auf einen alternativen Rezeptor ermöglicht wird. Die Peptidliganden werden in der Region des Capsidproteins exprimiert, die an der Bindung von AAV2-Wildtyp an den natürlichen Rezeptor Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) beteiligt ist. Dadurch wird einerseits die Bindung an HSPG abgeschwächt, andererseits ein neuer Bindungstropismus geschaffen. Durch die Randomisierung der Peptidinserts entsteht eine „Bibliothek“ verschiedener Viren, in der jedes Virus ein anderes Oligopeptid mit zufälliger Aminosäuresequenz an der Oberfläche trägt, eine *randomisierte AAV-Peptidbank*. Durch Infektion eines theoretisch beliebigen Zelltyps mit dieser randomisierten AAV-Peptidbank reichern sich die zelltypspezifisch bindenden und amplifizierenden Bibliotheksklone an. Die Viren werden schließlich aus den Zellen isoliert und in einem erneuten Infektionsschritt reappliziert, wodurch eine weitere Anreicherung stattfindet, ein *Selektion* genannter Vorgang.

Der spezifische Klon kann dann charakterisiert und zur Herstellung zelltypspezifisch bindender Vektoren verwendet werden.

Zur Herstellung der randomisierten Peptidbank wurde ein 3-Schritt-System angewandt, welches ermöglicht, daß die auf der Capsidoberfläche präsentierten Oligopeptide auch von dem verpackten Virusgenom codiert werden. Da aufgrund der Produktionsmethodik Rekombinationseffekte mit einem AAV2-Wildtypcapsomere exprimierenden Helferplasmid auftraten, enthielt die produzierte Bibliothek einen gewissen Anteil an AAV2-Wildtypviren, welcher sich nachteilig auf die Einsetzbarkeit dieses Ansatzes auswirkt.

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren entwickelt, welches durch den Einsatz eines synthetischen, sequenzmodifizierten Helferkonstruktes die Produktion einer wildtypfreien Virusbibliothek ermöglicht. In Selektionsexperimenten *in vitro* auf venösen Endothelzellen, Kardiomyoblasten, dendritischen Zellen und auf einer Bronchialkarzinomzelllinie konnte die Überlegenheit der so produzierten wildtypfreien Bibliothek gegenüber der wildtyphaltigen gezeigt werden. Auf allen verwendeten Zelltypen konnten zelltypspezifische Vektoren isoliert werden, die sich gegenüber dem AAV2-Wildtyp durch eine wesentlich höhere Transduktionseffizienz und Zielzellspezifität auszeichnen, was die breite Anwendbarkeit dieses Ansatzes unterstreicht.

Weiterhin wurde ein Verfahren zur Herstellung einer AAV-Peptidbank evaluiert, in der durch Einbringen einer zusätzlichen Mutation an Aminosäureposition 484 des Capsids ein weitere Reduktion des Wildtypotropismus erreicht werden kann. Obwohl dieser Ansatz einige technische Schwierigkeiten mit sich brachte, stellt er eine potentiell bedeutende Optimierung gerade in Bezug auf *in vivo* Selektionsexperimente dar.

Die hier optimierte Methodik der randomisierten, auf AAV exprimierten Peptidbanken dürfte einen wesentlichen Teil zur Verbesserung gegenwärtiger Gentherapieapplikationen beitragen und hat ein großes Anwendungspotential in der Biotechnologie und Medizin.