

Silke Steinbach

Dr. med.

Untersuchungen zur *In-vitro*-Rekonstitution des Adeno-assoziierten Virus Typ 2

Geboren am 05.06.1971 in Offenburg

Reifeprüfung am 07.05.1990 in Mosbach - Neckarelz

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1991 bis WS 1999

Physikum am 23.03.1993 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in San Francisco / London / Heidelberg

Staatsexamen am 23.11.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ)

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. A. Bürkle

Bisherige Studien haben gezeigt, daß Adeno-assoziierte Viren (AAV) viele Vorteile als Genthapievektoren haben. Für einen klinischen Einsatz werden hohe Mengen an AAV-Vektoren benötigt. Diese können mit der konventionellen Vektorproduktion noch nicht hergestellt werden. Eine Alternative könnte daher ein *In-vitro*-Zusammenbau (*In-vitro*-"Assembly") von AAV-Vektoren sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst leere AAV-Kapside aus den drei Kapsidproteinen herzustellen.

VP1, VP2 und VP3 werden von überlappenden Sequenzen des gleichen Leserahmens kodiert. Ihre Produktion im Verhältnis VP1:VP2:VP3 = 1:1:10 kommt aufgrund eines ungewöhnlichen Translations-Start-Codons für VP2, eines alternativen Spleißvorganges und dessen Beeinflußung durch Helferviren zustande. Dies verhindert die Expression von VP1:VP2:VP3 im Verhältnis 1:1:10 in Insektenzellen mit Hilfe rekombinanter Baculoviren, die das nicht modifizierte cap-Gen von AAV-2 exprimieren. Ruffing et al. 1992 stellten deshalb drei

separate, rekombinante Baculovirusstocks für die Einzelexpression von VP1, VP2 und VP3 her.

Im Rahmen vorliegender Arbeit führte die Koinfektion von Insektenzellen mit diesen Baculovirusstocks zur Produktion von VP1+2+3-Partikeln, die jedoch keine AAV-ähnliche Konformation hatten. Es konnten nur VP2+3-Partikel mit AAV-ähnlicher Konformation gewonnen werden. Eine *In-vitro*-Anlagerung von einzeln exprimiertem VP1 an VP2+3-Partikel gelang nicht. VP1 liegt vermutlich im Kapsidinneren und kann nicht mehr in die Struktur der VP2+3-Partikel eingebaut werden. Unter dem Einfluß eines HeLa-Zellextraktes im *In-vitro*-Ansatz wurden die VP2+3-Partikel dissoziiert, VP1 hingegen oligomerisiert. Ein "Reassembly" von leeren Partikeln aus VP2, VP3 und zusätzlichem VP1 fand nicht statt. Für ein erfolgreiches *In-vitro*-Assembly unter Einfluß von HeLa-Zellextrakt scheinen monomere Kapsidproteine Voraussetzung zu sein.

Einzeln exprimierte Kapsidproteine häuften sich in den Insektenzellen zu über 90 % als unlösliche Aggregate an. Mit 8 M Harnstoffpuffer wurden sie in Lösung gebracht, gleichzeitig jedoch denaturiert. Die Renaturierung gestaltete sich äußerst schwierig, wurde aber letztendlich in Argininpuffer erzielt. Die Kapsidproteine konnten nun *in vitro* in der gewünschten VP1:VP2:VP3 = 1:1:10 Stöchiometrie gemischt werden. Analysen der gemischten Kapsidproteine in verschiedensten Konzentrationen und unter unterschiedlichsten Pufferbedingungen zeigten, daß das Assembly von AAV-Kapsiden unter diesen Bedingungen nicht abläuft und möglicherweise zelluläre Helferproteine (wie z. B. Chaperone) notwendig sind. Daher wurden die renaturierten Kapsidproteine (VP1:VP2:VP3 = 1:1:10) mit HeLa-Zellextrakt inkubiert. Damit konnten *in vitro* produzierte, leere, AAV-ähnliche Kapside aus VP1, VP2 und VP3 detektiert und sichtbar gemacht werden, allerdings mit niedriger Effizienz. Ein Extrakt aus Hitzeschock-behandelten bzw. Adenovirus-infizierten HeLa-Zellen sowie ganze HeLa-Zellkerne, CaCl₂, ATP oder verschieden konzentrierte Kapsidproteinmengen brachten keine Vorteile für das *In-vitro*-Assembly von AAV-Kapsiden. Vermutlich kann die *In-vitro*-Produktion von AAV-Kapsiden gesteigert werden, wenn die "Disassembly"-Komponente des HeLa-Zellextraktes ausgeschaltet werden könnte. Während für den HeLa-Zytoplasmaanteil des HeLa-Zellextraktes die dissoziierende Wirkung auf VP2+3-Partikel und AAV-2 offenkundig wurde, konnte sie für den HeLa-Kernanteil nicht eindeutig belegt werden. Die Charakterisierung des HeLa-Zellextraktes ergab, daß die dissoziierende Wirkung durch HeLa-Zellproteine ausgelöst wird.

Das zweite Ziel beinhaltete die *In-vitro*-Anlagerung und eventuelle Verpackung von DNA in die leeren AAV-Kapside.

Es stellte sich heraus, daß durch den Einsatz von rekombinanten Adenoviren, die das AAV-2 vp-Gen enthielten, leere AAV-Kapside (Ad-VP-Partikel) wesentlich effizienter als *in vitro* produziert werden konnten. Im Gegensatz zu doppelsträngiger (ds)-AAV-DNA und einzelsträngiger (ss)-AAV-DNA ohne terminale Repetitionen (tr) konnte ss-AAV-DNA plus tr effizienter an Ad-VP-Partikel angelagert werden. Die Anlagerungsinformation liegt daher nicht in der Nukleotidsequenz der AAV-DNA, sondern in der intakten Sekundärstruktur des tr. Zudem fand eine Anlagerung nur bei AAV-ähnlichen Kapsiden aus VP1, VP2 und VP3 statt.

Um möglicherweise eine Verpackung von ss-AAV-DNA plus tr in die leeren AAV-Kapside zu erreichen, wurde das Nichtstrukturprotein Rep 78 im *In-vitro*-Ansatz mitinkubiert. Auch wenn unter Einfluß von Rep 78 keine komplette DNA-Verpackung in allen leeren AAV-Kapsiden nachgewiesen werden konnte, scheint es in den Verpackungsvorgang einzugreifen.

Die *In-vitro*-DNA-Verpackung in leere AAV-Kapside scheint ein aussichtsreiches Verfahren zu sein, und könnte eine Perspektive für die Nutzung leerer AAV-Kapside für die Gentherapie bieten.