

Qingxin Chen

Dr. sc. Hum

## **Influence of the SUMOylation pathway on adeno-associated virus vector transduction**

Fach/Einrichtung: Universitätsklinikum Heidelberg

Doktorvater: Prof. Dr. med. Oliver Müller

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV) gehört zur Familie der *Parvoviridae* und besitzt eine nicht-umhüllte und ikosaedrische Kapsidstruktur. Rekombinante AAVs (rAAV) sind nicht-pathogene Vektoren, die eine geringe Immunogenität und einen breiten Zell- und Gewebstropismus aufweisen. Deshalb kann rAAV als sicherer Gentherapievektor eingesetzt werden. Zurzeit werden einige klinische Studien durchgeführt, die auf dem AAV-Vektor basieren. Das erste kommerziell verfügbare Medikament wurde 2012 in Europa zugelassen.

Eine Limitierung des AAV-Vektors ist jedoch die vergleichbar schlechte Transduktionseffizienz. Um Wirtsfaktoren zu identifizieren, die eine Rolle bei der AAV2-Transduktion spielen, wurde ein RNAi-Screen durchgeführt. Die Enzyme des SUMOylierungsweges, Sae2 und Ubc9, wurden als Restriktionsfaktoren der AAV-Infektion identifiziert. Ähnlich wie die Ubiquitinierung, ist die SUMOylierung eine posttranslationale Proteinmodifikation, die durch ein E1-aktivierendes Enzym (bestehend aus Sae1 und Sae2) und ein E2-konjugierendes Enzym (Ubc9) katalysiert wird.

Weitere Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigen, dass der *Knockdown* der SUMOylierung zu einer höheren AAV-Transduktionsleistung führt, und die AAV2-Infektion die gesamte SUMOylierungsaktivität der Wirtszellen erhöhen kann. Darüber hinaus beeinflusst die SUMOylierung die Transduktion von AAV-Vektoren mit einzelsträngiger DNA (ssAAV) und

selbstkomplementärer DNA (scAAV).

Um herauszufinden, was das Zielobjekt der SUMOylierung ist, wurde eine Ko-Immünpräzipitation für AAV2-Partikel durchgeführt, welche darauf hindeutet, dass das AAV2-Kapsidprotein SUMOyliert wird. Die ortsspezifische Mutagenese und die Transduktion mit dem modifizierten Viruskapsid zeigen, dass die Aminosäuren K142/143 und K169 eine Rolle bei der SUMOylierung von VP2 spielen. Darüber verhindert die Fusion des N-Terminus mit verschiedenen Liganden wie GFP und HA die SUMOylierung von VP2, was darauf hindeutet, dass die AAV2-Kapsid-SUMOylierung eine bestimmte VP2 räumliche Struktur erfordert.

Darüber hinaus deutet die verstärkte AAV2-Transduktion in der Daxx Knockout-Zelllinie, im Vergleich zur wt-Zelllinie darauf hin, dass es sich bei dem Daxx-Protein um einen weiteren Restriktionsfaktor der AAV-Infektion handelt. Im Vergleich zu Wildtyp-Zelllinien wurden die verstärkenden Effekte nach dem Ubc9-Knockdown in der Daxx-Knockout-Zelllinie offensichtlich reduziert, was bedeutet, dass das Daxx-Protein und die SUMOylierung auf dem gleichem oder sich überlappenden Wegen funktionieren könnten. Ausgehend davon könnte nicht nur das AAV2-Kapsidprotein, sondern auch das SUMOylierte Daxx-Protein die AAV-Transduktion regulieren.

Der subzelluläre Transport von AAV2 umfasst mehrere Schritte. Die Menge an AAV2-Vektor-DNA in den Zellmembran- und den Zytoplasmafraktionen ändern sich nicht nach dem Sae2-Knockdown, was darauf hinweist, dass die Beeinträchtigung der SUMOylierung die Bindung von AAV an die Zellmembran, den intrazellulären Transport und damit die AAV-Transduktion nicht beeinflusst. Darüber hinaus gibt es zwei Hypothesen für die Akkumulation von SUMOylierten AAV2-Partikeln im Zellkern. Die SUMOylierung könnte die Anzahl der AAV2 Partikel begrenzen, die den Zellkern erreichen und transduzieren können. Im Gegenteil, könnte SUMOylierung die Anzahl von AAV2 Partikeln nicht beeinflussen, sondern die AAV Transduktion verbessern, indem AAV-uncoating und ssDNA Freisetzung im Zellkern gefördert werden.

English version:

Adeno-associated virus (AAV) is a member of the *Parvoviridae* family with a non-enveloped and icosahedral capsid structure. Recombinant AAVs (rAAV) are non-pathogenic with the low immunogenicity and broad cell/tissue tropism, thus AAV is widely used as a gene therapy tool. Currently, many clinical trials involving AAV vectors are ongoing and the marketed drug Glybera® was approved in Europe in 2012, followed by the Luxturna by FDA approval in 2017.

However, the limitation of this vector is the poor AAV transduction efficiency. To reveal the regulation of the host factors in AAV2 transduction, an RNAi screen was performed previously to identify host proteins interfering with AAV2 transduction. Sae2 and Ubc9, which are key enzymes of the SUMOylation pathway, were identified as restriction factors of AAV infection. Similar to the ubiquitination, SUMOylation is a post-translational protein modification catalyzed by an E1 activating enzyme (consisting of Sae1 and Sae2) and an E2 conjugating enzyme (Ubc9).

Further investigations in this thesis confirmed that the impairment of SUMOylation via Sae2 or Ubc9 knockdown resulted in a higher AAV transduction efficiency, and AAV2 infection can also enhance the total SUMOylation activity of host cells. Moreover, SUMOylation affects the transduction of AAV vectors with single stranded DNA (ssAAV) and self-complementary DNA (scAAV).

To determine the target of SUMOylation in the AAV life cycle, a pull-down assay was performed for AAV2 particles indicating that the AAV2 capsid protein is SUMOylated. Site-directed mutagenesis and modified virus transduction shows involvement of K142/143 and K169 of VP2 in capsid SUMOylation. In addition, the data suggests that the N-terminus of VP2 needs to be free, as addition of protein tags such as GFP or HA abolishes SUMOylation. This indicates that the AAV2 capsid SUMOylation has VP2 spatial structure

requirements.

Moreover, the observed increased AAV2 transduction in a Daxx knockout cell line indicates that Daxx is another restriction factor of AAV. Compared with wild type HeLa cell line, the enhancing effects after Ubc9 knockdown in Daxx knockout cell line was dramatically reduced, which means the Daxx protein and SUMOylation may work in the same or overlapping pathways. Thence, not only the AAV2 capsid protein, but also SUMOylated Daxx could regulate AAV transduction.

AAV2 subcellular trafficking involves multiple steps. AAV2 vector DNA in the cell membrane and cytoplasmic fractions are not altered after Sae2 knockdown indicating that impairment of the SUMOylation-pathway cannot affect AAV binding and the intracellular transport and therefore have no influence on AAV transduction. Other than this, there are two possibilities for SUMOylated AAV2 particles to accumulate in the nucleus: SUMOylation pathway could restrict the number of particles that reach the nucleus and undergo transduction; Alternatively, SUMOylation could not affect the amount of AAV2 particles but instead enhance AAV transduction by promoting AAV uncoating and ssDNA release in the nucleus.

