

Kai-Philipp Linse
Dr. med.

Untersuchung der natürlichen Diversität humaner Bocaviren 1 zur Verbesserung bocaviraler Gentransfer-Vektoren an primärem humanem respiratorischem Epithel

Fach/Einrichtung: Infektiologie
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Paul Schnitzler

Die zystische Fibrose (CF) ist eine autosomal-rezessive, monogenetische Stoffwechselerkrankung, bei der es zu einer Funktionsstörung des CFTR-Transmembranproteins kommt. Dies führt zur Destruktion verschiedener Organsysteme, allen voran der Lunge, sodass die mediane Lebenserwartung derzeit geborener Patienten nur etwa 45 Jahre beträgt.

Die medizinische Forschung verfolgt das Ziel, monogenetische Erkrankungen durch Einschleusung des entsprechenden fehlerfreien Genmaterials in den menschlichen Organismus heilen zu können. Im Zuge dessen rückte das humane Bocavirus 1 (HBoV1) aufgrund seiner natürlichen Spezifität zu respiratorischem Epithel und der Verwandtschaft zu den gentherapeutisch bereits etablierten Adeno-assoziierten Viren (AAV) in das Blickfeld der viralen Vektorentwicklung. Auf dem Weg zu einer ultimativen klinischen Anwendung in der Therapie der CF hat die Detektion von möglichst spezifischen, effektiven und immunologisch vorteilhaften Vektorvarianten oberste Priorität.

Aus diesem Grund setzte sich die Studie als Basis für die Entwicklung hocheffizienter bocaviraler Vektorsysteme zum Ziel, die Kapsidgen-Diversität natürlich vorkommender HBoV1-Varianten aus insgesamt 64 Patientenproben mittels PCR und Sanger-Sequenzierung zu untersuchen. Identifizierte Mutationen wurden im Anschluss in Form von replikationsinkompetenten chimären rAAV2/HBoV1-Vektoren in Transduktionsexperimenten auf ihren Einfluss hinsichtlich Titerproduktion und Funktionalität an primärem respiratorischem Epithel (HAE) in An- und Abwesenheit von intravenösen Immunglobulinen (IVIG) charakterisiert und quantifiziert.

In der molekulargenetischen Untersuchung des HBoV1-Kapsidgens konnten 34 Nukleotidveränderungen sowie vier Aminosäureveränderungen an den Positionen D68N, A149T, S474N und T590S im Vergleich zur erstbeschriebenen Variante DQ000495.1 identifiziert werden. Dabei wurde in Patientenproben mit der Aminosäure T590 eine signifikant höhere Viruslast detektiert als in Patientenproben mit T590S.

Beobachtungen an zwei Patienten zur molekulargenetischen Entwicklung von HBoV1 im zeitlichen Verlauf gaben zudem erste Hinweise darauf, dass die genetischen Eigenschaften des HBoV1-Kapsidgens während einer HBoV1-Infektion einer Dynamik unterliegen, die im Verlauf zu der Aminosäureveränderung T590S zu führen scheint.

Im Rahmen der Vektorproduktion konnten für die unterschiedlichen Varianten aus je neun 15cm-Zellkulturplatten Vektortiter im Bereich von $4,67E+09$ bis $2,40E+11$ vg, bei einer durchschnittlichen Vektorausbeute von $1,11E+11$ vg, erzielt werden. Vektorvarianten mit der Aminosäure T590S konnten dabei mit signifikant höheren Vektortitern produziert werden als Varianten mit T590.

Aus den Transduktionsexperimenten an HAE gehen mit den Kapsidvarianten DQ000495.1, welche die vermutlich vorteilhafte Aminosäure A149 trägt, und V1512195 zwei erfolgversprechende Kandidaten mit hoher Transduktionsleistung bei gleichzeitig geringer Immunreaktivität hervor. Beide Varianten tragen die Aminosäure T590, welche zumindest in den Transduktionsexperimenten unter immunologischem Druck mit IVIG Vorteile gegenüber T590S zeigen konnte.

Insgesamt ermöglichen die Erkenntnisse aus der vorliegenden Studie zur genetischen Diversität von HBoV1 erstmals einen umfassenden, quantitativen Vergleich der Auswirkungen unterschiedlicher HBoV1-Kapsideigenschaften auf die Titerproduktion, Infektiosität sowie Immunreaktivität. Zusätzlich liefert die Arbeit ausdrückliche Hinweise dafür, dass Aminosäure 590 des HBoV1-Kapsids eine bedeutende Sonderrolle in Bezug auf die Virus-/Vektorfunktionalität von HBoV1 einnimmt.

Zur Optimierung bocaviraler Gentransfer-Vektoren empfehlen sich, aufbauend auf den Kapsideigenschaften der Varianten DQ000495.1 und V1512195, weitere Transduktionsstudien mit einer möglichst hohen Anzahl an HAE-Patientenreihen und Replikaten. Zudem sollte die HAE-Zellzusammensetzung mithilfe von FACS-Analysen bestimmt werden, um die Ergebnisse zusätzlich in Bezug auf die patientenindividuelle Verteilung der Zielzellen validieren zu können.

Die Ergebnisse zur Virusevolution bei der Untersuchung von Patientenproben zu mehreren Zeitpunkten im Verlauf einer Infektion sind vor allem im Hinblick auf eine Vakzinentwicklung sowie für Innovationen in der Virusdiagnostik relevant, weshalb eine Fortführung der Untersuchungen mithilfe neuer SMRT-Sequenzierungsmethoden vielversprechende Ergebnisse liefern könnte.