

Entwicklung eines rekombinanten Adenoassoziierten Virus als
Vektor für die regulierbare Expression des
Blutgerinnungsfaktors IX:
in vitro- und *in vivo*-Studien

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Jan P. Grupp

aus

Bergisch Gladbach

Bonn 2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

1. Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. R. Schwaab
2. Referent: Prof. Dr. D. O. Fürst

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Mai 2008

Erscheinungsjahr: 2008

Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Rainer Schwaab für die Ermöglichung der Dissertation, die Übernahme der Betreuung dieser Promotionsarbeit und für die vielen anregenden Diskussionen während dieser Arbeit

Sehr herzlich danke ich auch Herrn Prof. Dr. D. Fürst für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Oldenburg und Herrn Prof. Dr. Hanfland danke ich für die freundliche Erlaubnis, diese Promotionsarbeit an ihrem Institut anfertigen zu dürfen.

An Dr. Jens Müller ein großes Dankeschön für die zahllosen fruchtbaren Diskussionen und viele gute praktische Tipps.

Bei Frau Prof. Dr. A. Eis-Hübinger und bei Thimo Schwandt bedanke ich mich für die unermüdliche Hilfe während der Tierversuche.

Den Mitarbeitern des Hämophilie-Labors unter der Leitung von Frau Linden danke ich für die zuverlässig und schnell durchgeführten Aktivitätsmessungen.

Herrn Dr. Henry Fechner (Benjamin-Franklin Hospital, Berlin) danke ich für viele Tipps, Ideen, anregenden Diskussionen und ein ständig offenes Ohr für Fragen.

Herzlichen Dank meinen (aktuellen und ehemaligen) Kollegen Alexandra Schmidt, Thilo Albert, Zaid Aburubahia, Monika Saller, Marion Sauer, Julia Becker, Sabine Lange, der Arbeitsgruppe Molekularbiologie, für die gute und angenehme Zusammenarbeit sowie viele fachliche und technische Hilfen. Besonders herzlichen Dank an den ehemaligen Kollegen Mahmoud Srouf für die hervorragende Hilfe und ständige Diskussionsbereitschaft.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Oldenburg und des PCR-Labors für das gute Betriebsklima und die freundschaftliche Atmosphäre.

Allen Angehörigen des Institutes für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin danke ich für die freundliche Hilfe und Unterstützung.

Abkürzungen

| | |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|
| °C | Grad Celsius |
| μ | Mikro (10 ⁻⁶) |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μM | Mikrometer |
| 2x HBS | 2x HEPES-gepufferte Salzlösung |
| a | aktiv |
| AAV | Adenoassoziertes Virus |
| AAV1S | AAV site 1 |
| Abb. | Abbildung |
| Ad | Adenovirus |
| AG | Arbeitsgruppe |
| AK | Antikörper |
| al. | altera (lat.: andere) |
| Amp | Ampicilin |
| APC | Antigenpräsentierende Zelle |
| ApoE | Apolipoprotein E |
| aPTT | aktivierte Partialthromboplastinzeit |
| AS | Aminosäure |
| BDD | B-Domänen-deletiert |
| bgh | bovines Wachstumshormon |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| Ca | Calcium |
| ca. | circa |
| cDNA | copy DNA (aus RNA durch reverse Transkription kopierte DNA) |
| cFIX | canine FIX (Hunde-FIX) |
| CFTR | Cystic Fibrosis Transmembran Conductance Regulator |
| cFVIII | canine FVIII (Hunde-FVIII) |
| CIP | calf intestinal alkaline phosphatase |
| cm | Zentimeter |
| CMV | Cytomegalivirus |
| CsCl | Cäsiumchlorid |
| d.h. | das heisst |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | 2'-desoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat |
| Dox | Doxycyclin |
| ds | doppelsträngig |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH |
| E. coli | Escherichia Coli |
| EDTA | Ethylendiaminotetraessigsäure |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor |

| | |
|---------------------------------|---------------------------------------------------|
| EGFP | enhanced GFP |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| EtOH | Ethanol |
| FCS | fötales Kälberserum |
| FGFR1 | humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 |
| FIX | Faktor IX |
| FIX:Ag | Faktor IX-Antigen |
| FVIII | Faktor VIII |
| FX | Faktor X |
| g | Erdbeschleunigung |
| G | Gauge |
| g | Gramm |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GFP | Grün Fluoreszierendes Protein |
| h | human |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| haat | humanes α 1-Antitrypsin |
| HBV | Hepatitis B-Virus |
| HC-Ad | high capacity Adenovirus |
| HCl | Salzsäure |
| HCR | hepatic control region |
| HCV | Hepatitis C-Virus |
| HD-Ad | helper dependent Adenovirus |
| HEK293 | humane embryonale Nierenzellen |
| HEPES | N 2-Hydroxyethylpiperazin-N'2-ethansulfonsäure |
| HepG2 | humane Hepatomzelllinie |
| hFIX | humaner Faktor IX |
| HIV | Humanes Immundefizienzvirus |
| HJC-15 | Hamster-Glioblastomzelllinie (JC Virus-induziert) |
| HMWK | Hochmolekulares Kallikrein |
| HSPG | Heparinsulfat-Proteoglycan |
| HSV | Herpes simplex Virus |
| ITR | inverted terminal repeat |
| IU | internationale Einheiten |
| Kan | Kanamycin |
| kb | Kilobasenpaare (1000 bp) |
| Kcal | Kilokalorien |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kDA | Kilodalton (1000 Dalton) |
| kg | Kilogramm |
| KH ₂ PO ₄ | Kalium-Di-Hydrogenphosphat |
| KO | knock out |
| Konz. | Konzentration |
| l | Liter |
| lat. | lateinisch |
| LB-Medium | Luria Broth-Medium |
| LD-PCR | long-distance PCR |
| Lsg. | Lösung |
| LSP | leberspezifischer Promotor |
| LTR | long terminal repeat |

| | |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------|
| m | Milli (10^{-6}) |
| M | Molar |
| max. | maximal |
| mFIX | murine FIX (Maus-FIX) |
| mFVIII | murine FVIII (Maus-FVIII) |
| Mg | Magnesium |
| mg | Milligramm |
| mGAPDH | Maus-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| MLV | Maus-Leukämievirus |
| mRNA | messenger RNA |
| MWCO | molecular weight cut off |
| n | nano (10^{-9}) |
| Na | Natrium |
| Na ₂ HPO ₄ | Di-Natrium-Hydrogenphosphat |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaDoc | Natriumdeoxycholat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| OD | Optische Dichte |
| OTC | Ornithintranscarbamylase-Defizienz |
| p.a. | analysenrein (pro analysi) |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBGD | Poshpobilinogen-Desaminase |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PBS-MK | PBS mit Magnesium und Kalium |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglycol |
| pg | Picogramm |
| PL | Phospholipid |
| P _{minCMV} | minimaler CMV-Promotor |
| pmol | Picomol |
| poly(A) | Polyadenylierungssignal |
| qPCR | quantitative PCR |
| rAAV | rekombinantes Adenoassoziiertes Virus |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen |
| RT | Raumtemperatur |
| RT | reverse Transkriptase |
| rt | reverse Transkription |
| rtPCR | reverse Transkription + PCR (in einem Schritt) |
| rtTA | reverses tetracyclinkontrolliertes Transaktivatorprotein |
| s. | siehe |
| sc | selbstkomplementär |
| SCID | Severe Combined Immunodeficiency |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat) |
| sec | Sekunde |

| | |
|------------|-----------------------------------------------|
| ss | einzelsträngig |
| SV | Simian Virus |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TBS | Trisgepufferte Salzlösung |
| Tc | Tetracyclin |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| Tet | Tetracyclin |
| tetO | Tetracyclin-Operator-Bindestelle |
| TetR | Tetracyclin Repressor |
| TF | Tissue Factor |
| TRE | Tetracyclin-reguliertes Element |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| TSR | Template Suppression Reagent |
| tTA | Tetrazyklkontrolliertes Transaktivatorprotein |
| TU | transduzierende Einheiten |
| U | Einheit |
| u.U. | unter Umständen |
| u.a. | unter anderem |
| ü. N. | über Nacht |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| vg | Virusgenom |
| Vol. | Volumen |
| vp | Viruspartikel |
| vWF | von Willebrand Faktor |
| w/v | weight per volume |
| Wdh. | Wiederholung |
| wt | Wildtyp |
| x | mal/-fach |
| z. B. | zum Beispiel |
| ΔG | freie Enthalpie |

| | | |
|--------------|----------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | <u>EINLEITUNG</u> | 1 |
| 1.1 | HÄMOPHILIE B | 1 |
| 1.1.1 | BLUTGERINNUNG UND HÄMOPHILIE | 1 |
| 1.1.2 | FIX – GEN UND PROTEIN: | 3 |
| 1.1.3 | GEGENWÄRTIGE THERAPIE | 5 |
| 1.2 | GENTHERAPIE DER HÄMOPHILIE B | 6 |
| 1.2.1 | HÄMOPHILIE B ALS MODELL FÜR DIE SOMATISCHE GENTHERAPIE | 6 |
| 1.2.2 | ZIELE DER GENTHERAPIE DER HÄMOPHILIE B | 8 |
| 1.2.3 | GENTRANSFERSYSTEME FÜR FIX | 8 |
| 1.2.4 | TIERMODELLE | 10 |
| 1.3 | ADENOASSOZIIERTE VIREN | 12 |
| 1.3.1 | VIRIONSTRUKTUR UND GENOMORGANISATION | 14 |
| 1.3.2 | VIRALE REPLIKATION | 16 |
| 1.4 | VIRALE VEKTOREN AUF AAV-BASIS (RAAV) | 18 |
| 1.4.1 | VORTEILE UND RISIKEN VON VEKTOREN AUF AAV-BASIS | 19 |
| 1.4.2 | AUFBAU VIRALER VEKTOREN AUF AAV-BASIS | 26 |
| 1.4.3 | STEUERBARE TRANSGENEXPRESSION MITTELS TET-SYSTEM | 27 |
| 1.4.4 | VERWENDUNG VON RAAV IN DER GENTHERAPIE VON ERBKRAKHEITEN | 29 |
| 1.5 | PRÄKLINISCHE UND KLINISCHE HÄMOPHILIE B-STUDIEN | 30 |
| 1.5.1 | LEBER- UND MUSKELGERICHTETER FIX-GENTRANSFER | 30 |
| 1.5.2 | PRÄKLINISCHE HÄMOPHILIE B-STUDIEN MIT RAAV | 32 |
| 1.5.3 | KLINISCHE HÄMOPHILIE B-STUDIEN | 35 |
| 1.6 | ZIELE DIESER ARBEIT | 37 |
| 2. | <u>MATERIAL UND METHODEN</u> | 39 |
| 2.1. | CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN | 39 |
| 2.2. | GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN | 40 |
| 2.3. | ZELLINIEN UND KULTURMEDIEN | 42 |
| 2.4. | PLASMIDE | 43 |
| 2.5. | BAKTERIENSTÄMME | 43 |
| 2.6. | NÄHRMEDIEN | 44 |
| 2.7. | MAUSSTÄMME | 44 |
| 2.8. | PUFFER UND LÖSUNGEN | 44 |
| 2.9. | PRIMER UND SONDEN | 46 |
| 2.10. | MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN | 49 |
| 2.10.1. | NUKLEINSÄUREN-ISOLIERUNG | 49 |
| 2.10.2. | DNA- UND RNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG | 51 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.10.3. AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE | 51 |
| 2.10.4. PCR, LD-PCR, qPCR, ONE STEP-RTPCR | 51 |
| 2.10.5. REVERSE TRANSKRIPTION | 54 |
| 2.10.6. POSITIONSSPEZIFISCHE MUTAGENESE | 54 |
| 2.10.7. ENZYMATISCHE DNA-SPALTUNG MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN | 55 |
| 2.10.8. LIGATION | 55 |
| 2.10.9. TRANSFORMATION | 56 |
| 2.10.10. DNA-SEQUENZIERUNG | 56 |
| 2.11. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN | 57 |
| 2.11.1. FIX-ANTIGEN-ELISA | 57 |
| 2.11.2. FIX-AKTIVITÄTSTEST | 58 |
| 2.11.3. SDS-PAGE | 58 |
| 2.11.4. FÄRBUNG VON SDS-GELEN | 58 |
| 2.12. ZELLKULTUR | 59 |
| 2.12.1. AUFTAUEN, KULTIVIERUNG UND LAGERUNG VON ZELLINIEN | 59 |
| 2.12.2. BESTIMMUNG DER ZELLZAHL | 59 |
| 2.12.3. TRANSDUKTION VON ZELLEN MIT RAAV | 60 |
| 2.13. VIRUSPRÄPARATION | 60 |
| 2.13.1. VERPACKUNGSZELLEN | 60 |
| 2.13.2. TRANSFEKTION | 60 |
| 2.13.3. ERNTE DER RAAV-PRODUZIERENDEN ZELLEN | 61 |
| 2.13.4. VIRUSFÄLLUNG AUS ZELLKULTURÜBERSTAND | 61 |
| 2.13.5. ZELLAUFSCHLUß ZUR VIRUSFREISETZUNG | 61 |
| 2.13.6. IODIXANOL-DICHTEGRADIENTEN-ULTRAZENTRIFUGATION | 62 |
| 2.13.7. KONZENTRATION DER VIREN I – HEPARINAGAROSÄULE | 62 |
| 2.13.8. DIALYSE DES VIRUSKONZENTRATS | 63 |
| 2.13.9. KONZENTRATION DER VIREN II – ULTRAFILTRATION | 63 |
| 2.13.10. HERSTELLUNG EINES STANDARDS FÜR DIE RAAV-QUANTIFIZIERUNG | 64 |
| 2.13.11. VIRUSPARTIKELVERDAU | 64 |
| 2.13.12. QUANTIFIZIERUNG DER REKOMBINANTEN VIREN EINER PRÄPARATION | 64 |
| 2.14. EXPRESSIONSVERSUCHE (TRANSDUKTION) | 65 |
| 2.14.1. ZELLKULTURVERSUCHE (<i>IN VITRO</i>) | 65 |
| 2.14.2. TIERVERSUCHE (<i>IN VIVO</i>) | 66 |
| 2.14.3. MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN IM MAUSGEWEBE | 67 |
| 3. ERGEBNISSE | 69 |
| <hr/> | |
| 3.1. HERSTELLUNG EINES REKOMBINANTEN VEKTORPLASMIDES AUF BASIS DES ADENOASSOZIIERTEN VIRUS | 69 |
| 3.1.1. KONSTRUKTION DES VEKTORPLASMIDES | 69 |
| 3.2. ÜBERPRÜFUNG DES AAV-VEKTORPLASMIDES PAAV-FIX-TTA AUF SEQUENZFEHLER | 75 |
| 3.2.1. PRODUKTION DES VIRALEN VEKTORS RAAV-FIX-TTA | 77 |
| 3.3. EXPRESSION VON HFIX MITTELS EINES REGULIERBAREN REKOMBINANTEN VEKTORS AUF BASIS DES AAV | 85 |
| 3.3.1. HERUNTERREGULIERBARE EXPRESSION VON HUMANEM FIX <i>IN VITRO</i> | 85 |
| 3.3.2. GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION VON HFIX <i>IN VITRO</i> | 86 |
| 3.3.3. EXPRESSION VON HUMANEM FIX <i>IN VIVO</i> | 87 |
| 3.4. MOLEKULARGENETISCHE AUFARBEITUNG DER HFIX-EXPRESSIONSVERSUCHE <i>IN VIVO</i> | 91 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.4.1. NACHWEIS VON VEKTOR-DNA IN DER LEBER RAAV6-TRANSDUZIERTER C57BL/6-MÄUSE | 91 |
| 3.4.2. QUANTIFIZIERUNG DER VEKTORGENOMKOPIEN IN UNTERSCHIEDLICHEN ORGANEN UND GEWEBEN RAAV6-TRANSDUZIERTER C57BL/6-MÄUSE | 93 |
| 3.4.3. NACHWEIS DER TRANSKRIPTION DER TRANSGENE HFIX UND TTA IN DER LEBER VON MIT RAAV6-FIX-TTA BEHANDELTEN C57BL/6-MÄUSEN | 95 |
| 4. DISKUSSION | 98 |
| <hr/> | |
| 4.1. KONSTRUKTION EINES REKOMBINANTEN VEKTORPLASMIDES AUF BASIS DES ADENOASSOZIIERTEN VIRUS | 98 |
| 4.1.1. ZIELORGAN UND VERABREICHUNGSWEG | 98 |
| 4.1.2. SEROTYP | 99 |
| 4.1.3. BESTANDTEILE DER EXPRESSIONSKASSETTE | 102 |
| 4.1.4. KLONIERUNG | 107 |
| 4.1.5. ÜBERPRÜFUNG DES FERTIGEN VEKTORPLASMIDES | 108 |
| 4.1.6. PRODUKTION DER REKOMBINANTEN VIREN | 109 |
| 4.2. EXPRESSION VON HFIX <i>IN VITRO</i> | 111 |
| 4.2.1. ABSCHALTBARE EXPRESSION VON HUMANEM FIX <i>IN VITRO</i> | 111 |
| 4.2.2. LEBERZELLSPEZIFISCHE EXPRESSION VON HUMANEM FIX <i>IN VITRO</i> | 115 |
| 4.3. EXPRESSION VON HFIX <i>IN VIVO</i> | 115 |
| 4.4. MOLEKULARGENETIK | 121 |
| 4.5. AUSBLICK | 126 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | 128 |
| <hr/> | |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS | 130 |
| <hr/> | |
| 7. APPENDIX | 150 |
| <hr/> | |

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Hämophilie B

1.1.1 Blutgerinnung und Hämophilie

Das Aktivierungssystem der Blutgerinnung ist kaskadenartig aufgebaut und führt über eine Reihe von enzymatischen Reaktionen zur Bildung eines unlöslichen Fibrinnetzes. Bei diesen Reaktionen werden inaktive Zymogene im Plasma nacheinander proteolytisch aktiviert und dadurch zu Serinproteasen oder essentiellen Kofaktoren umgewandelt (Nawroth, 1999).

Die Auslösung der Gerinnungskaskade erfolgt auf zwei Weisen: extrinsisch oder intrinsisch. Im ersten Fall kommt es durch Gewebeschäden zur Exposition des Lipoproteins Tissue Factor (TF) oder durch Entzündungssignalstoffe zur Expression des TF. Dieses Protein induziert die Aktivierung des Faktor VII (FVII \Rightarrow FVIIa), wobei ein membrangebundener Komplex aus FVIIa und TF entsteht, der FIX und FX aktiviert.

Beim intrinsischen Weg werden nach Gewebeschäden anionische Phospholipide aus Thrombozyten, Blutgefäßen und dem umliegenden Gewebe freigesetzt. Die Exposition dieser negativ geladenen Oberflächen aktiviert FXII, so dass sich ein Komplex aus FXIIa und Kallikrein bildet. FXIIa aktiviert dann FXI, der wiederum FIX aktiviert. In Anwesenheit von Calcium und Phospholipidoberflächen bilden FIXa und der Kofaktor FVIIIa einen aktiven Komplex mit FX, wodurch dieser auf Thrombozytenoberflächen aktiviert wird.

Hier treffen sich extrinsische und intrinsische Gerinnungsaktivierung. FXa aktiviert in Anwesenheit seines durch FIIa aktivierten Kofaktors FVa sowie in Anwesenheit von Calcium und Phospholipiden den FII (Prothrombin). FIIa (Thrombin) löst die Fibrinbildung aus Fibrinogen aus und zusammen mit FXIIIa (ebenfalls durch FIIa aktiviert) entsteht aus dem löslichen Fibrin ein unlösliches, quervernetztes Fibrinnetz. Die Gerinnungskaskade beinhaltet zahlreiche Rückkopplungsschleifen und ist ein diffiziles System aus gegenseitiger Hemmung und Aktivierung der verschiedenen Komponenten. In Abbildung 1 ist die Gerinnungskaskade schematisch dargestellt (Greenberg & Orthner, 1999).

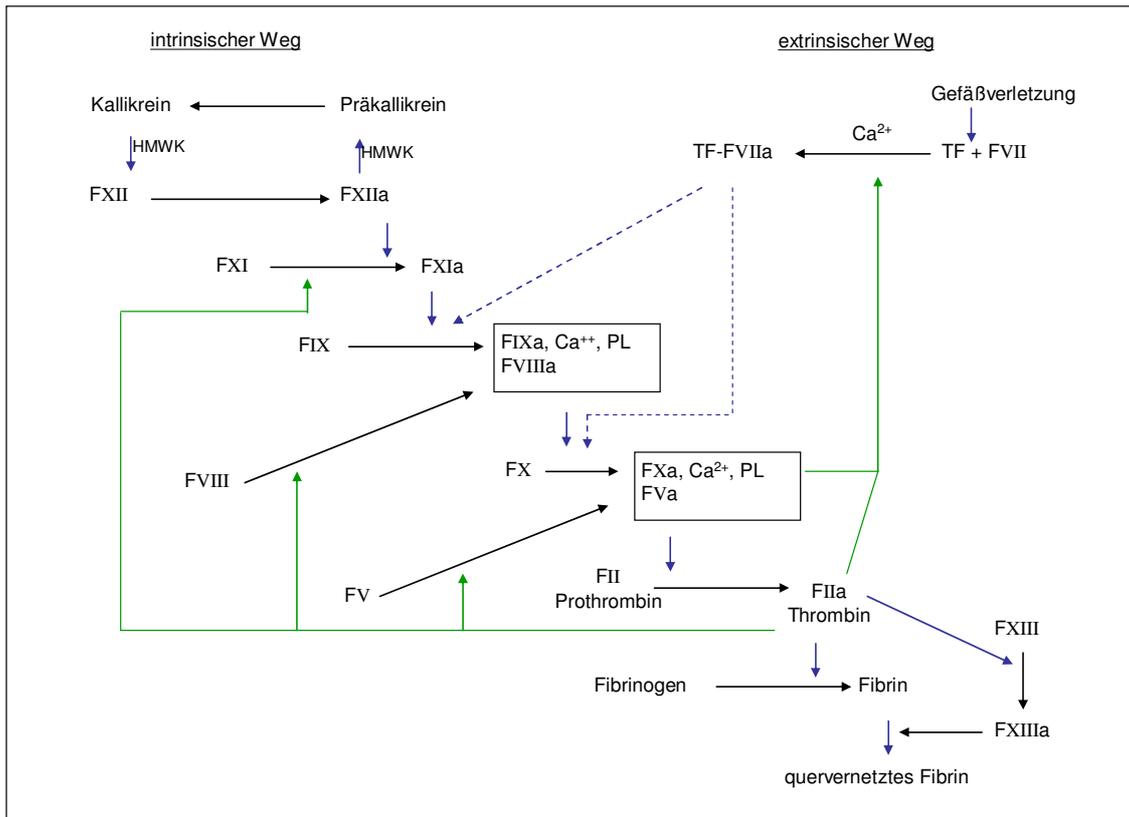


Abb. 1: Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade. Blaue Pfeile: Aktivierung, grüne Pfeile: positive Rückkopplung. Zur besseren Übersicht sind negative Rückkopplungsmechanismen nicht dargestellt. Abkürzungen: HMWK: high molecular weight kininogen; PL: Phospholipid; TF: tissue factor. Modifiziert nach Greenberg & Orthner, 1999.

Die Hämophilie ist eine X-chromosomal bedingte Störung dieser ausgewogenen Gerinnungskaskade. Es gibt zwei Formen, die sich in der Symptomatik nicht unterscheiden. Bei der häufigeren Hämophilie A liegt die Ursache in der verminderten oder fehlenden Aktivität des Faktor VIII-Proteins, bei der Hämophilie B in der des Faktor IX-Proteins. Zum Aktivitätsmangel der Faktoren kommt es durch Mutationen im jeweiligen Gen. Es sind hauptsächlich Männer betroffen, da sowohl das FVIII- als auch das FIX-Gen auf dem X-Chromosom liegen und die Krankheit damit rezessiv vererbt wird.

Die Hämophilie B kommt einmal auf 30.000 Geburten männlichen Geschlechts vor (Roberts & Hoffman, 1995; Soucie *et al.*, 1998). Heterozygote Frauen, Überträgerinnen, haben meist verringerte FIX-Spiegel, die klinisch oft unauffällig bleiben, aber bei operativen Eingriffen eine Prophylaxe erforderlich machen.

Der Schweregrad der Hämophilie B korreliert stark mit der FIX-Aktivität: liegt diese unter 1 %, wird von schwerer Hämophilie gesprochen. Bei 1 - 5 % handelt es sich um eine mittelschwere Verlaufsform, bei 5 - 30 % wird von leichter Hämophilie gesprochen. Die Normalwerte von gesunden Menschen liegen zwischen 60 und 157 %, wobei 100 % FIX-Aktivität einer Antigenkonzentration (FIX:Ag) von 5 µg FIX/ml Blut entspricht (Knobloch & Ludwig, 1998).

Bei der schweren Verlaufsform kommt es bei den meisten Patienten zu spontanen, lebensbedrohlichen Blutungen in Muskelgewebe, Hirn und Gelenke (besonders in Knie, Knöchel und Ellenbogen), so dass letztere im Laufe der Zeit deformieren und eine Verkrüppelung die Folge ist (Center for Diseases Control and Prevention, 2000; Roberts & Lozier, 1991). Ebenso kommen Blutungen nach Operationen oder Verletzungen vor. Die mittelschwere Verlaufsform führt seltener zu spontanen Blutungen; bei leichteren Verlaufsformen treten spontane Blutungen nicht mehr auf (Roberts & Hoffman, 1995; Roberts & Lozier, 1991). Patienten, die an schwerer Hämophilie B leiden, wäre somit bereits geholfen, wenn sich die FIX-Aktivität auf über 1 % steigern ließe (Roberts & Lozier, 1991).

1.1.2 FIX – Gen und Protein:

FIX ist ein Vitamin K-abhängiges Glykoprotein, das als Zymogen einer Serinprotease im Blut zirkuliert (Hedner & Davie, 1982).

Das Gen ist in der distalen Region des langen Arms des X-Chromosoms in der Nähe des Zentromers an der Stelle Xq27 lokalisiert (Chance *et al.*, 1983; Boyd *et al.*, 1984; Camerino *et al.*, 1984). Es besteht aus acht 25 bis 1935 bp großen Exons und sieben Introns (Abb. 2), die sich auf insgesamt etwa 24 kb summieren (Yoshitake *et al.*, 1985). Die hieraus transkribierte mRNA ist 2803 Basen lang und beinhaltet ein offenes Leseraster von 1383 Basen (Bowen, 2002).

Bei der Synthese des FIX-Proteins in den Hepatozyten, dem natürlichen Syntheseort, finden zahlreiche posttranslationale Modifikationen statt. Eine Prä-Pro-Leader-Sequenz von 46 Aminosäuren (AS) Länge wird entfernt und das Protein wird Vitamin K-abhängig γ -carboxyliert, β -hydroxyliert, N- und O-glycosyliert, sulfonamidiert und phosphoryliert (Arruda *et al.* 2001b). Das reife Protein besteht aus 415 AS und hat eine Größe von 57 kDa. Es zirkuliert als Zymogen im Blutplasma. FIX kann in sechs Domänen unterteilt werden. Die von AS 1 - 40 reichende N-terminale Gla-Domäne bindet Calcium-abhängig Lipide. Daran schließen sich sechs AS an, die einen hydro-

phoben Bereich bilden. Die AS 47 - 83 und 88 - 127 bilden zwei epidermale wachstumsfaktorenähnliche Domänen (EGF-like domains), von denen EGF1 eine einzelne Calcium-Bindestelle mit niedriger Affinität aufweist. Ein Aktivierungspeptid reicht von AS 146 - 180 und eine C-terminale katalytische Domäne (mit Proteolysefunktion) von AS 181 - 415. Auch letztere hat eine einzelne Calciumbindestelle mit niedriger Affinität (Schmidt & Bajaj, 2003). Die Aktivierung des FIX-Zymogens erfolgt durch die Abspaltung der Aktivierungsdomäne durch den Komplex aus FVIIa und TF oder durch FXIa. Das resultierende FIXa besteht aus zwei Ketten. Die leichte Kette wird von den Domänen Gla-EGF1-EGF2 gebildet, die schwere aus der katalytischen Serin-Protease-Domäne, welche die funktionelle Aktivität bedingt (Bajaj & Birktoft, 1993). Das FIX-Protein hat eine Halbwertszeit von ca. 18 - 24 Stunden.

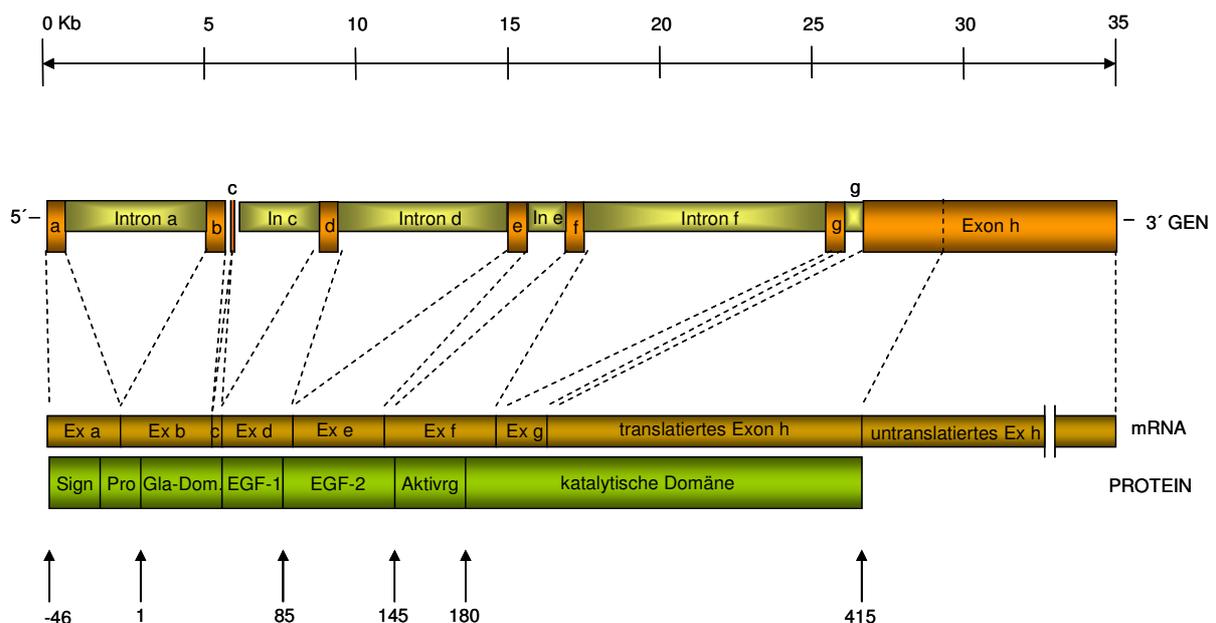


Abb. 2: Schematische Darstellung des FIX-Gens. Ganz oben ist in Kilobasen die Länge der DNA als dünne schwarze Linie angegeben. Darunter sind die Organisation des Gens mit Exons und Introns in relativen Größen, in der 3. Zeile die mRNA und unmittelbar darunter die Domänenstruktur des Faktor IX dargestellt. Die Zahlen an den Pfeilen entsprechen der Nummerierung der Aminosäuren. Abkürzungen: Aktivrg: Aktivierungspeptid; EGF: epidermal growth factor domain; Ex: Exon; Gla-Dom: Gla-Domäne (Domäne mit 12 γ -carboxylierten Glutamaten, kodiert durch die Exons b und c); In: Intron; Pro: Propeptid; Sign: Signalpeptid; kb: Kilobasen. (nach Knobloch & Ludwig; 1998)

1.1.3 Gegenwärtige Therapie

Die gegenwärtige Behandlung der Hämophilie B basiert auf der intravenösen Verabreichung von FIX-Konzentraten, die entweder aus dem Plasma von Blutspendern aufgereinigt oder rekombinant hergestellt wurden. Der Gerinnungsfaktor kann nur intravenös injiziert seine physiologische Wirkung entfalten. Das Spritzen dieser Gerinnungsfaktorkonzentrate erfolgt entweder nach Bedarf nach Blutungen oder prophylaktisch; letzteres besonders bei Patienten die unter der schweren Form der Hämophilie leiden, um der Entwicklung einer chronischen hämophilen Arthropathie vorzubeugen (Lee, 1999; Mannucci, 2003). Die Häufigkeit der Injektionen wird u. a. durch den Schweregrad der Hämophilie B und die individuelle Disposition des Patienten bestimmt (etwa 2 - 3 x/Woche 20 - 30 Einheiten/kg Körpergewicht, Konsensusempfehlung Bundesärztekammer, persönliche Mitteilung G. Goldmann, Hämophiliezentrum Bonn). Bereits der Erhalt einer kontinuierlichen FIX-Aktivität von etwa 1 % (50 ng/ml) kann nicht nur Gelenkschädigungen vorbeugen, sondern auch das Risiko fataler intracranealer Blutungen senken (Ljung, 1998; Lofqvist *et al.*, 1997; Eyster *et al.*, 1978; Bray *et al.*, 1987).

Inzwischen haben Hämophile, die optimal behandelt werden, eine potentiell normale Lebenserwartung (Brackmann *et al.* 1976; Jones & Ratnoff, 1991; Soucie *et al.*, 2000). Zu einer solchen Behandlung haben aber zur Zeit nur etwa 20 % der Patienten Zugang – größtenteils in den reichen Industrienationen, da die Kosten für die prophylaktische Behandlung mit FIX-Konzentraten sehr hoch sind (Srivastava, 1998; Antunes, 2002). Gerade in ärmeren Ländern versterben Patienten ohne Therapie vor Vollendung des 20. Lebensjahres (Isarangkura 2002).

In den 1960er, 1970er und 1980er Jahren wurden FIX-Konzentrate teilweise aus kontaminiertem Blut gewonnen, so dass viele Patienten (60 – 70 % in Westeuropa und Nordamerika) mit HIV infiziert wurden. Auch Kontaminationen mit dem Hepatitis B- und C-Virus (HBV, HCV) führten zu schwerwiegenden Spätfolgen in Form von Lebererkrankungen (Lee, 1999; Giangrande, 1998; Mannucci & Giangrande, 2000). Inzwischen sind aus Plasma gewonnene Produkte durch Virusinaktivierungsverfahren sicher geworden, auch wenn immer noch ein gewisses Risiko der Übertragung neuer pathogener Kontaminanten (Lee, 1999; Evatt, 2000) wie Prionen (Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit) oder lipidkapselfreier Viren (Hepatitis A-Virus, Parvo B19-Virus) besteht (Lyon *et al.*, 1989; Laurian *et al.*, 1984; Roberts & Lozier, 1991; Roberts & Hoffman, 1995; Santagostino *et al.*, 1997; Center for

Diseases Control and Prevention, 2000; US Department of Health and Human Services, 2000). Aber auch bei der Verwendung von rekombinanten FIX-Konzentraten besteht theoretisch die Möglichkeit von pathogenen Kontaminanten, da diese mittels Zellkulturen gewonnen werden (Lyon *et al.*, 1985; Laurian *et al.*, 1994; Santagostino *et al.*, 1997; Linnen *et al.*, 1996; Naoumov *et al.*, 1998)

Nachteile der Therapie mit Faktorenkonzentraten generell sind die hohen Kosten, die limitierte Verfügbarkeit der Medikamente und in seltenen Fällen das Auftreten von allergischen Reaktionen (Mannucci & Tuddenhem, 2001). Dazu kommen die relativ geringe Halbwertszeit des FIX von 18 - 24 h und die damit verbundene Unannehmlichkeit regelmäßiger intravenöser Injektionen (Oldenburg & Brackmann, 1998).

Die schwerwiegendste Komplikation der gegenwärtigen Therapie mit Faktorenkonzentraten ist die Bildung inhibitorischer Anti-FIX-Antikörper gegen das intravenös verabreichte Protein (Inhibitoren), die in 3 – 4 % der Hämophilie B-Patienten vorkommt (Giannelli & Green, 1996). Diese Inhibitoren blockieren die Funktion des FIX Gerinnungsfaktors und erschweren somit die Behandlung von Blutungen (Lusher, 2000). Das Risiko, inhibitorische Antikörper gegen FIX auszubilden, wird von der die Hämophilie verursachenden Mutation und dem individuellen Immunsystem beeinflusst (High, 1995).

1.2 Gentherapie der Hämophilie B

1.2.1 Hämophilie B als Modell für die somatische Gentherapie

Bei der Gentherapie werden somatische Zellen des Patienten bzw. des Versuchstiers durch die Einführung eines funktionellen FIX-Gens modifiziert. Es findet also weder eine Reparatur zelleigener DNA statt, noch werden Keimzellen verändert, welche die DNA-Modifikationen an die Nachkommen weitervererben würden.

Der Gentransfer des intakten FIX-Gens in Form der FIX-cDNA kann mit Hilfe rekombinanter Viren (viraler Vektoren) *in vivo* durchgeführt werden (Transduktion). Es handelt sich hierbei um einen kontrollierten Prozess bei dem die viralen Capsidproteine die Bindung des Vektors an bestimmte Membranrezeptoren der Zielzelle bewirken, was zum Einschleusen der rekombinanten viralen DNA inklusive des FIX-Gens in die Zelle führt. Das FIX-Gen wird in der Zelle anschließend

transkribiert und nach der Translation ins Blut sezerniert (Lozier, 2004; Nathwani *et al.*, 2004; High, 2003; Walsh, 2003).

Die Hämophilie B eignet sich aus einer ganzen Reihe von Gründen hervorragend als Modell für die Etablierung einer somatischen Gentherapie und könnte eine Vorreiterrolle für andere monogenetische oder sogar komplexere Krankheiten übernehmen. Sowohl Molekularbiologie als auch Pathologie der Krankheit sind sehr gut untersucht und verstanden. Die Krankheit wird durch den Defekt nur eines Gens, des FIX-Gens, verursacht, dessen cDNA zudem mit ~1,5 kb relativ klein ist und in Form einer Expressionskassette (Promotor/Enhancer, Gen, poly(A)-Sequenz) in alle viralen Gentherapievektoren eingebaut werden kann. Es gibt ein sehr breites therapeutisches Spektrum, da bereits eine relativ geringe Proteinmenge von über 1 % des Normalwertes (>50 ng/ml) zu einer signifikanten Verbesserung der Hämostase führt. Zudem ist die Effizienz der Therapie durch Messung der zirkulierenden FIX-Mengen, der FIX-Aktivität und der aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit - ein Maß für die Funktionalität der Faktoren des intrinsischen Gerinnungssystems) sehr einfach festzustellen, da diese Werte mit den klinischen Symptomen korrelieren (Oldenburg & Brackmann, 1999).

Des Weiteren ist keine gewebespezifische FIX-Expression nötig, so dass nicht nur der natürliche Syntheseort des FIX-Proteins, die Leber, als Zielorgan für den Gentransfer in Frage kommt. Es reicht, wenn das Protein in einem Gewebe synthetisiert wird, in welchem die nötigen posttranslationalen Prozessierungsschritte durchgeführt werden können (z. B. Muskeln der Extremitäten) und von wo aus es in den Blutkreislauf gelangen kann. Außerdem müssen bei der Hämophilie zur Verbesserung des Krankheitsbildes und auch zur vollständigen Heilung nicht sämtliche Zellen des Organs transduziert werden (Couto, 2004).

Ein weiterer wichtiger Grund, warum die Hämophilie sich hervorragend als Modell eignet eine Gentherapie zu entwickeln, sind die vielen existierenden Tiermodelle - natürlich vorkommende hämophile Hunde, die an ähnlichen Symptomen leiden wie menschliche Patienten (Evans *et al.*, 1989; Hough *et al.*, 2002; Lozier *et al.*, 2002; Mauser *et al.*, 1996) sowie gentechnisch hergestellte FIX-*knock out*-Mäuse (Bi *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 2004; Sabatino *et al.*, 2004) – jeweils mit speziesspezifischen Proteinen (cFIX, Hund bzw. mFIX, Maus).

Hämophilie B-Patienten können jederzeit wieder nach der herkömmlichen Substitutionstherapie behandelt werden und haben optimal therapiert nahezu die Lebens-

erwartung gesunder Menschen (Brackmann *et al.* 1976; Jones & Ratnoff, 1991; Soucie *et al.*, 2000), so dass zudem eine Untersuchung von Langzeiterfolgen und Langzeitrisiken der somatischen Gentherapie möglich ist.

1.2.2 Ziele der Gentherapie der Hämophilie B

Wie bereits erwähnt, besteht die Standardtherapie der Hämophilie B aus der Proteinsubstitution mit aus Plasma gewonnenen oder – seit einigen Jahren – rekombinant hergestellten FIX-Konzentraten. Diese Substitutionstherapie hat die Lebensqualität der Hämophilie B-Patienten deutlich verbessert und zu einer potentiell normalen Lebenserwartung geführt (Brackmann *et al.* 1976; Jones & Ratnoff, 1991; Soucie *et al.*, 2000).

Das Ziel gentherapeutischer Studien in der Hämophilie B ist es, eine Vektor- und Dosiskombination zu finden, die in allen Patienten eine kontinuierliche Synthese des biologisch aktiven Proteins erreicht, die bei mindestens 1 % des Normalwertes liegen sollte. Das Idealziel wäre eine komplette Heilung der Hämophilie. Dies würde bedeuten, dass nach einer (einmaligen) Behandlung (Injektion eines Vektors) Zellen des Patienten in die Lage versetzt würden, konstant FIX in ausreichendem Maße zu produzieren, in den Blutkreislauf zu sezernieren und damit eine normale Hämostase zu bewirken.

Unter Umständen könnten mittels Gentherapie auch die extrem hohen Kosten für (rekombinante) Faktorenkonzentrate deutlich gesenkt werden.

Die Behandlung der Hämophilie B mittels viralen Gentransfers birgt allerdings auch einige Risiken, die in Kapitel 1.2.3 und 1.4.1 näher erläutert werden. Vor- und Nachteile einer möglichen Gentherapie müssen also genau abgewogen werden. Letztlich wird sich die Gentherapie an der Effizienz und Sicherheit der Standardtherapie messen lassen müssen.

1.2.3 Gentransfersysteme für FIX

Ein Gentransfersystem muss vielen verschiedenen Ansprüchen genügen. Allgemein müssen Genterapievektoren dauerhaft reproduzierbar sein und in hohen Konzentrationen zur Verfügung gestellt werden können; das Transgen muss effizient in die gewünschten Gewebe, Organe oder Zelltypen gelenkt werden können, ohne breit zu

streuen. Es sollte im Idealfall gewebespezifisch exprimiert werden, nicht immunogen sein und sowohl Gentransfer als auch Transgenexpression müssen ohne gefährliche Nebenwirkungen möglich sein. Für die Hämophilie sollte der Gentransfer sicher sein und zur dauerhaften Expression therapeutischer Level des Proteins und somit zur Korrektur des Blutungsphänotyps führen. Falls in Zukunft eine sehr hohe Expression im Menschen möglich sein sollte, muss die FVIII- bzw. FIX-Expression regulierbar sein.

Gentransfersysteme können viralen oder nicht viralen Ursprungs sein und *ex vivo* oder *in vivo* in somatische Zellen eingeschleust werden. Die *ex vivo*-Strategie führte in präklinischen Versuchen bisher zu niedrigen Transgenexpressionen (Hoeben *et al.*, 1992; Hao *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2002; Moayeri *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2005; Ogata *et al.*, 2004; Tiede *et al.*, 2003). Die *ex vivo*-Strategie ist zudem relativ aufwendig und kostenintensiv, da jedem Patienten individuell Zellen entnommen werden und nach Transduktion und Kultivierung wieder reimplantiert werden müssen. Von Vorteil ist die Umgehung der Immunogenität des Vektors sowie die Verhinderung einer potentiellen Keimbahntransmission. Die *in vivo*-Verabreichung erfolgt systemisch (intravenös) oder lokal (intramuskulär, intrahepatisch) und ist deutlich effizienter als die *ex vivo*-Therapie. Von Nachteil ist allerdings, dass das Zielorgan nicht genau angesteuert werden kann und somit - zumindest theoretisch - eine Streuung des Vektors in andere Zellen, auch Keimzellen, möglich ist. Vorsicht ist auch im Hinblick auf die Immunogenität einiger Vektoren geboten, wie z. B. im Falle der adenoviralen Vektoren (Brown & Lillicrap, 2002; Brown *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu den viralen Vektoren, sind nichtvirale Vektoren meist sehr ineffizient und vermitteln nur transiente Transgenexpression.

Virale Vektoren basieren zur Zeit hauptsächlich auf Adenoviren (Ad-Vektoren), Adenoassoziierten Viren (rAAV, rekombinante Adenoassoziierte Viren, AAV-Vektoren), Retro- und Lentiviren und werden in zwei Hauptgruppen aufgeteilt: in das Wirtsgenom integrierende (retrovirale, lentivirale) und nicht in das Wirtsgenom integrierende Systeme (adenovirale, rAAV). Eine stabile Integration kann einerseits potentiell zur Langzeitexpression führen, andererseits jedoch durch zufällige Insertion Mutagenesen verursachen. Die nichtintegrierenden Vektoren liegen extrachromosomal (epigenetisch) vor und sind damit in diesem Punkt ungefährlicher. Aller-

dings können sie mit der Zellteilung verloren gehen, so dass eine dauerhafte Expression nur in nicht proliferierenden Zellen möglich ist. Prinzipiell sollten Vektoren so gebaut sein, dass sie Zellen transduzieren können, aber nicht mehr in der Lage sind, sich dort zu replizieren.

Die unterschiedlichen viralen Systeme haben verschiedene Charakteristika in Bezug auf Tropismus, Transduktionseffizienz, Aufnahmekapazität von Transgenen, Persistenz, Toxizität und Immunogenität, die je nach Anwendung sorgfältig gegeneinander abgewogen werden müssen. In Tabelle 1 sind einige wichtige Eigenschaften kurz zusammengefasst.

| virales System | Kapazität * | Sicherheitsbedenken | Zielgewebe | immunologische Konsequenzen |
|-----------------------------|-------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Oncoretrovirus (RNA) | 8 kb | Insertionsmutagenese | proliferierende Zellen | niedriges Entzündungspotential |
| Lentivirus (RNA) | 8 kb | Insertionsmutagenese | breiter Tropismus; Kupffer-Zellen (bewirkt geringe Hepatozytentransduktion) | wird inaktiviert durch Komplementsystem; leichtes Entzündungspotential; APC-Transd. kann Immunantwort auslösen |
| HC-Ad (dsDNA) | 30 kb | Hepatotoxizität; Thrombozytopenie | breiter Tropismus; episomal – limitiert Langzeitexpression; Endocytose durch Kupffer-Zellen sorgt für Schwellenwerteffekt | aktiviert Immunantwort; Endocytose durch Kupffer-Zellen trägt zur adaptiven Immunantwort bei |
| AAV (ssDNA) | ~4,7 kb | Genomintegration in geringem Maße; präexistierende AAV-Immunität | breiter Tropismus; liegen als episomale Konkatemere vor (~5% integrieren zufällig) | kein Entzündungspotential |

Tab. 1: Eigenschaften häufig verwendeter viraler Vektorsysteme. Abkürzungen: AAV: Adenoassoziiertes Virus; APC: antigenpräsentierende Zellen; ds: doppelsträngig; HC-Ad: high capacity adenovirale Vektoren; kb: Kilobasenpaare; ss: einzelsträngig; Transd: Transduktion

*bezieht sich auf die Anzahl der kb, aus der die Expressionskassette maximal bestehen kann

1.2.4 Tiermodelle

Es gibt mehrere Tiermodelle, in denen die gentherapeutische Expression von FIX untersucht werden kann.

Als Kleintiermodell stehen *knock out*-Mäuse für die Hämophilie A und B seit 1995 (Bi *et al.*, 1995) bzw. 1997 (Wang *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997; Kundu *et al.*, 1998) zur Verfügung. Mäuse eignen sich für erste Gentherapieversuche, da sie günstig in der Haltung sind, ihre Generationszeit relativ kurz ist und sie große Würfe haben. Der Vorteil der Verwendung von Inzuchtstämmen ist zudem, dass sie einheitliche Be-

dingungen in verschiedenen Individuen bieten, so dass Versuche gut reproduziert werden können und statistische Signifikanz erreicht werden kann (Gu *et al.*, 1999). Ein Nachteil ihres homogenen genetischen Hintergrundes ist jedoch, dass die Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen mit seinem heterogenen genetischen Hintergrund übertragen werden können: Therapien, die bei verschiedenen Mausstämmen ansetzen, müssen nicht automatisch in klinischen Studien am Menschen funktionieren. Auch ist ein positives Ergebnis bei einem Patienten keine Erfolgsgarantie für eine Therapie bei einem anderen Patienten.

Da FIX/FVIII-*knock out*-Mäuse immunkompetent sind, bilden sie wie manche Patienten Inhibitoren gegen die (humanen) Faktoren. Dies ist in immundefizienten SCID (severe combined immuno-deficiency) -Mäusen nicht der Fall (Gilles *et al.*, 2000).

Neben den Mäusen gibt es mehrere Kolonien von hämophilen Hunden, die als Großtiermodell für Gentherapieversuche zur Verfügung stehen. Während der Wechsel vom Tiermodell Maus zum Menschen eine Gewichtssteigerung um das ~ 2800fache bedeutet, ist die Differenz zwischen Hund und Mensch nur noch drei bis zehnmal so groß, d. h., die Tiere ähneln in Größe und Gewicht immerhin schon Neugeborenen oder Kleinkindern. Im Hund sollten somit realistischere und genauere Untersuchungen, vor allem was benötigte Vektordosen und Verabreichungsmethoden angeht, möglich sein. Weitere Vorteile von Hunden als Tiermodell sind, dass sie eine lange Lebenserwartung haben, die Langzeitstudien zulässt, und dass sie viele physiologische Parameter besitzen, die dem Menschen ähnlicher sind als es beim Mausmodell der Fall ist (z. B. das Immunsystem). Des Weiteren wird die Hämophilie wie beim Menschen zufällig, durch unterschiedlichste Mutationen (*missense*, kleine und große Deletionen, Insertionen, Inversionen) verursacht (Evans *et al.*, 1989; Mauser *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1999; Hough *et al.*, 2002; Lozier *et al.*, 2002).

An der University of North Carolina-Chapel Hill im Francis Owen Blood Research Laboratory (Graham, *et al.*, 1994) leben FIX-defiziente Hunde, deren Hämophilie durch eine Punktmutation in der Sequenz, die für die katalytische Domäne von FIX kodiert, verursacht wird. Das Krankheitsbild dieser Tiere ähnelt sehr dem der menschlichen Hämophilie B (Mitruka *et al.*, 1976). Die Hunde haben im Durchschnitt sechs Blutungen im Jahr, die mit Hunde-Plasma behandelt werden müssen (Russell *et al.*, 2003). Das zugeführte Plasma enthält alle Gerinnungsfaktoren, somit auch FIX.

An der Auburn University existiert eine weitere Kolonie von Hämophilie B-Hunden. Eine Punktmutation führt bei diesen Tieren zu einem verfrühten Stoppcodon bereits im Exon f (Connelly *et al.*, 1996). Diese FIX-Null-Mutante stellt eine wichtige Erweiterung der bereitstehenden Hundemodelle dar, da das Risiko der Antikörperbildung nach FIX-Substitution neben dem individuellen Immunsystem auch von der Art der FIX-Mutation abhängt: so bergen Null-Mutationen ein wesentlich höheres Risiko einer Antikörperbildung, als z. B. *missense*-Mutationen. Bei letztgenanntem Mutationstyp kann noch eine bruchstückhafte Proteinexpression stattfinden, die ausreichen kann eine Immuntoleranz gegenüber dem zugeführten FIX zu bewirken.

Sowohl im Maus- als auch im Hundemodell kann nicht nur die Expression von fremdem (humanem) FIX untersucht werden, sondern auch die homologe Expression, da sowohl das Maus- als auch das Hund-FIX-Gen für Gentherapieversuche zur Verfügung stehen (mFIX bzw. cFIX).

1.3 Adenoassoziierte Viren

Adenoassoziierte Viren (AAV) gehören zur Familie der *Parvoviridae* und zur Gattung der *Dependoviren*. Bisher sind elf natürlich vorkommende Serotypen bekannt, die teilweise unterschiedliche Wirtsorganismen haben. Entdeckt wurden die AAV mittels Elektronenmikroskopie bei der Analyse von Adenovirus-Präparationen, wobei sie anfangs irrtümlich für adenovirale Untereinheiten gehalten wurden. Die Viren lösen keine Entzündungsreaktionen im Wirt aus. Auch wenn AAV bisher nicht mit Krankheiten in Zusammenhang gebracht wurden und somit als nicht pathogen gelten, infizieren einige Serotypen natürlicherweise die oberen Atemwege des Menschen – meist im Zusammenhang mit einer Infektion durch Adeno- oder Herpesviren (Herpes Simplex Virus 1), die als Helferviren dem AAV bestimmte genetische Informationen und Funktionen bereitstellen (Berns, 1990). AAV haben eine Vielzahl an Wirten und einen breiten Zell- und Gewebetropismus. Allgemein können sie sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen in Menschen, Affen und Nagern produktiv infizieren, wenn ein entsprechendes Helfervirus anwesend ist (Berns 1990; Flotte *et al.*, 1993).

Infizieren AAV in Abwesenheit von Helferviren Zellen, bilden sie Latenz aus und persistieren als integriertes Provirus im Wirtszellgenom. Eine zusätzliche Infektion mit

Helferviren führt zum Herauslösen des Provirus aus dem Genom und zur Replikation (Carter, 1990; Flotte *et al.*, 1993).

Zur Zeit sind 11 AAV-Serotypen bekannt. AAV1 wurde als erstes aus Rhesusaffen isoliert und infiziert häufig menschliche Populationen, ist aber bisher nicht aus Menschen isoliert worden (Xiao *et al.*, 1999; Blacklow *et al.*, 1968a,b; Atchison *et al.*, 1965; Parks *et al.*, 1970; Hoggan *et al.*, 1966). AAV2 ist der am besten charakterisierte Serotyp und konnte ebenso wie AAV3 häufig aus Menschen isoliert werden. Beide Typen sind in der Bevölkerung weit verbreitet, wie seroepidemiologische Studien zeigen (Blacklow *et al.*, 1968a,b; Parks *et al.*, 1970). Obwohl menschliche Zellen *in vitro* mit AAV4 infiziert werden können, kommt es bei diesem, aus Affen (Grüne Meerkatzen) stammenden Serotyp sehr selten zur Infektion von Menschen (Chirioni *et al.*, 1997; Parks *et al.*, 1976; Parks *et al.*, 1970). AAV5 kommt ebenfalls sehr selten im Menschen vor (Bantel-Schaal *et al.*, 1984; Georg Fries *et al.*, 1984). AAV6 ist eine natürlich vorkommende Rekombination zwischen AAV1 und AAV2 (Xiao *et al.*, 1999; Rutledge *et al.*, 1998) und seine Capsidproteine weisen eine 99%ige Aminosäuren-Homologie zu denen von AAV1 auf. Es ist bisher nur aus Affen isoliert worden.

Weitere AAV-Serotypen, 7 bis 11, sind erst in den letzten Jahren aus humanen und nichthumanen Primatengeweben isoliert worden: die Serotypen 7 und 8 aus Rhesusaffen (Gao *et al.*, 2004), AAV10 und 11 aus Langschwanzmakaken (Mori *et al.*, 2004). Diese vier Serotypen können jedoch humane Zellen *in vitro* infizieren (Gao *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2004). AAV9 wurde aus Menschen isoliert (Gao *et al.*, 2004).

Die verschiedenen in Gentherapiestudien verwendeten Serotypen haben auch teilweise sehr unterschiedliche Tropismen. AAV1 transduziert hauptsächlich Skelettmuskeln (Chao *et al.*, 2000; Louboutin *et al.*, 2005), Pankreas (Loiler *et al.*, 2003), Herz (Du *et al.*, 2004), vaskuläres Endothel (Chen *et al.*, 2005), Gehirn und zentrales Nervensystem (Burger *et al.*, 2004; Passini *et al.*, 2003) sowie die Leber (Ghosh *et al.*, 2006); Vektoren auf AAV2-Basis transduzieren Hepatocyten (Snyder *et al.*, 1997a, 1999), Muskelzellen (Kessler *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1997; Fisher *et al.*, 1997; Herzog *et al.*, 1999), die Lunge (Flotte *et al.*, 1993b), die Retina (Flannery *et al.*, 1997; Lewin *et al.*, 1998), Neuronen (Kaplitt *et al.*, 1994; Podsakoff *et al.*, 1994) im Gehirn (Klein *et al.*, 2002) und Rückenmark (Peel *et al.*, 2000) und schließlich Pankreaszellen (Prasad *et al.*, 2000) sehr gut. AAV3 hat einen Tropismus für innere Haarzellen der Cochlea (Liu, Y *et al.*, 2005), AAV4 für das Gehirn (Liu, G *et*

al., 2005) und Pigmentepithelzellen der Retina (Weber *et al.*, 2003), AAV5 hauptsächlich für Skelettmuskeln (Hildinger *et al.*, 2001), Gehirn und zentrales Nervensystem (Burger *et al.*, 2004; Cressant *et al.*, 2004), Lunge (Auricchio *et al.*, 2002; De *et al.*, 2004; Sandalon *et al.*, 2004), Auge (Lotery *et al.*, 2003; Reich *et al.*, 2003), entzündete Gelenke (Apparailly *et al.*, 2005) und die Leber (Mingozzi *et al.*, 2002). AAV6 transduziert die Leber (Grimm *et al.*, 2003c; Jiang *et al.*, 2006) Muskeln (Blankinship *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2005a), Herz (Kawamoto *et al.*, 2005), Atemwegsepithelien (Halbert *et al.*, 2000, 2001) und das Auge (Yang *et al.*, 2002), AAV7 Muskeln (Louboutin *et al.*, 2005) und schließlich AAV8 Muskeln (Louboutin *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005b), Pankreas (Wang *et al.*, 2004), Herz (Wang, *et al.*, 2005b) und besonders die Leber (Gao *et al.*, 2002; Sarkar *et al.*, 2004; Wang, *et al.*, 2005a; Conlon *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005b).

1.3.1 Virionstruktur und Genomorganisation

Das relativ stabile AAV-Partikel - unempfindlich gegen Hitze, mildem proteolytischen Verdau sowie nichtionischen Detergentien - hat eine icosahedrale Symmetrie und einen Durchmesser von etwa 20 – 25 nm. Das Capsid besteht aus den drei Proteinen VP1, VP2 und VP3, die im Verhältnis 1:1:8 vorkommen. Die verschiedenen AAV-Serotypen unterscheiden sich in den Capsidproteinen (Xiao *et al.*, 1999; Rutledge *et al.*, 1998; Chirioni *et al.*, 1997; 1999), die für unterschiedliche Wirtsorganismen, Tropismen und Transduktionseffizienzen sorgen (Chao *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 1999; Halbert *et al.*, 2000; Rutledge *et al.*, 1998; Zabner *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2000; Handa *et al.*, 2000). Die Diversität der Capsidproteinsequenzen ist zumindest teilweise auf homologe Rekombinationen koinfizierender Viren zurückzuführen (Gao *et al.*, 2003).

Das Capsid umschließt die lineare, einzelsträngige, 4681 Nukleotide lange Einzelstrang-DNA (ssDNA) mit einem Molekulargewicht von $1,5 \times 10^6$. Es kann jeweils eines der beiden komplementären Genome, genannt „plus“- oder „minus“-Strang, pro Capsid verpackt sein. Die einen „plus“- oder „minus“-Strang enthaltenden Viruspartikel kommen im selben Verhältnis vor (Crawford *et al.*, 1969).

Das Genom besteht aus nur zwei offenen Leserastern (Abb. 3), den rep- und cap-Genen, und wird von 145 Nukleotiden langen ITR-Sequenzen (*inverted terminal repeat*) flankiert, welche eine so genannte Haarnadel-Struktur (*hairpin*) bilden. Diese ITRs dienen als Replikationsursprünge und als Signal für die Verkapselung der repli-

zierten Genome in neu gebildete Virionen. Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom und dem Herausschneiden aus eben diesem (*rescue*) (Samulski *et al.*, 1999). Die DNA enthält drei Transkriptionspromotoren: p_5 und p_{19} für die *rep*-Gene und p_{40} für die *cap*-Gene, welche für die viralen Capsidproteine VP1, VP2 und VP3 kodieren. Das nicht strukturelle *rep*-Gen kodiert für die vier Proteine Rep78, Rep 68, Rep52 und Rep40.

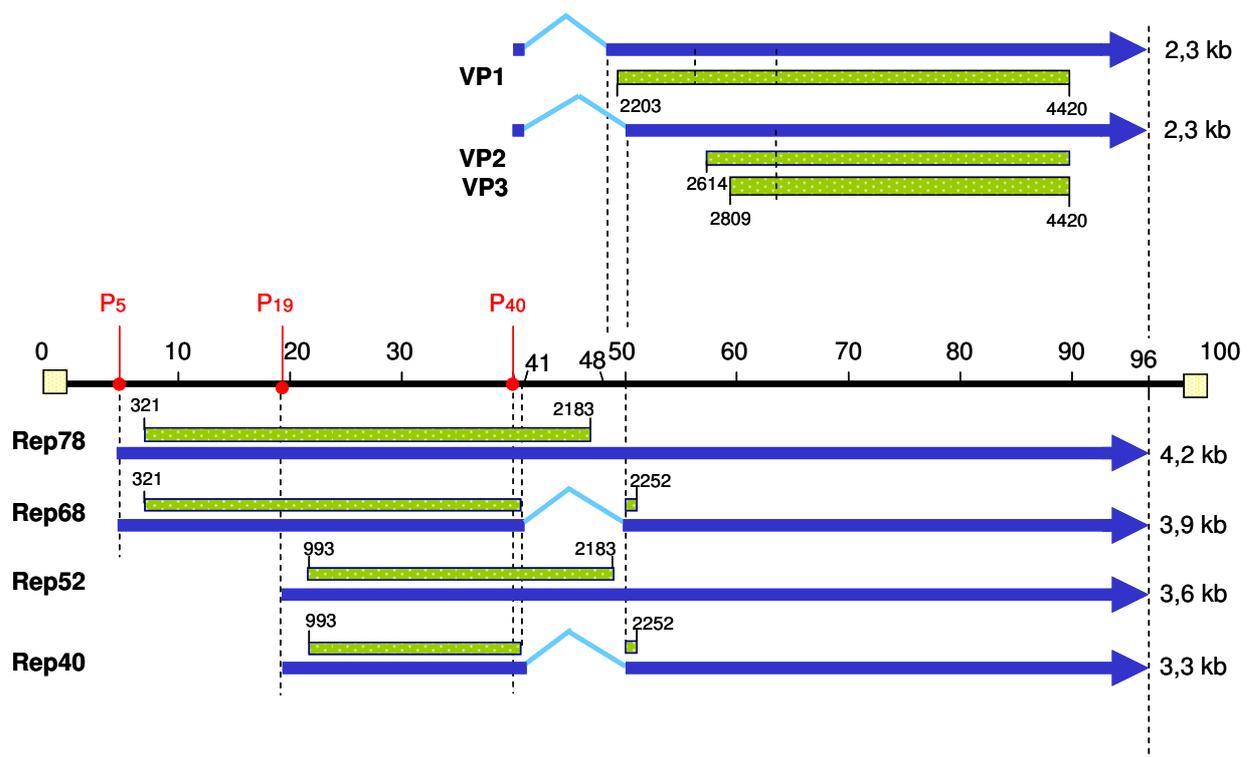


Abb. 3: Struktur des AAV-Genoms. Das AAV-Genom ist in der Mitte als schwarzer Balken mit einer Skala von 100 Einheiten dargestellt, wobei eine Einheit ca. 47 Nukleotiden entspricht. Die *inverted terminal repeats* (ITRs) sind als hellgelbe Quadrate dargestellt. Die roten Punkte zeigen die Transkriptionspromotoren (p_5 , p_{19} , p_{40}) an. Die poly(A)-Sequenz beginnt an Position 96. Die von den Promotoren aus synthetisierten RNAs sind als blaue Pfeile, die Introns als hellblaue Einlässe dargestellt. Die kodierenden Regionen für die vier Rep-Proteine (Rep 78, Rep 68, Rep 52, Rep 40) und für die viralen Capsidproteine (VP1, VP2, VP3) sind als grüne Boxen dargestellt. Die Zahlen an den Boxen zeigen den Beginn und das Ende der Codons an. (Nach Smuda & Carter, 1991)

Rep68 und Rep78 werden für die Replikation benötigt, VP2 und VP3 um das Capsid zu bilden. Rep52 und Rep40 sorgen anscheinend zusammen mit VP1 für die Verkapselung der DNA und stabilisieren die Viruspartikel (Muzyczka, 1992; Carter, 1992).

1.3.2 Virale Replikation

Bei der Infektion binden Viren erst an die Zellen, um dann einzudringen. Für diese rezeptorvermittelte Endocytose nutzt AAV2 Heparansulfat-Proteoglycane (HSPG) (Summerford & Samulski, 1998) und als Korezeptoren $\alpha_v\beta_5$ Integrin (Summerford *et al.*, 1999) und den humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (FGFR1) (Qing *et al.*, 1999). Für andere Serotypen sind mögliche Rezeptoren noch nicht bekannt; sie scheinen jedoch extrazellulär nicht in großen Mengen vorzukommen (Grimm *et al.* 2003a).

Es gibt zwei verschiedene Phasen im Zyklus des AAV, je nachdem ob permissive oder nicht permissive Zellen infiziert werden. In permissiven Zellen ist die Replikation des AAV möglich, da sämtliche benötigten Faktoren, d.h. auch die Gene und Geneprodukte der Helferviren (Adeno- oder Herpesviren), vorliegen. In nicht permissiven Zellen dagegen fehlen einige Faktoren, so dass keine AAV-Replikation stattfinden kann (Carter, 1990; Flotte *et al.*, 1993).

Bei der produktiven Infektion, d.h. beim lytischen Zyklus in permissiven Zellen, muss die Einzelstrang-DNA (ssDNA) in die replikative Form des AAV umgewandelt werden. Dazu wird die ssDNA mit Hilfe der haarnadelförmigen ITRs, die als Primer dienen (Abb.4) in eine doppelsträngige Struktur (dsDNA) überführt, so dass Transkription und Genexpression möglich werden (Gao *et al.*, 2004). Die Replikation der AAV-DNA erfolgt mittels einer zellulären Polymerase. Die dsDNA liegt dabei als Kopf-an-Kopf oder Schwanz-an-Schwanz-Multimer vor und dient als Vorlage für die Synthese der ssAAV-Genome, die anschließend in vorgefertigte AAV-Capside verpackt werden (Carter *et al.*, 1998; Muzyczka, 1992) sowie als Template für Transkription und Expression der AAV-Proteine. Trotz des doppelsträngigen DNA-Molekülintermediates werden nur jeweils ein „plus“- oder „minus“-Strang des AAV-Genoms verpackt (Muzyczka, 1992; Steinbach *et al.*, 1997).

Die Geschwindigkeit der *de novo*-Synthese eines komplementären Strangs - metabolische Aktivierung genannt - wird durch den physiologischen Status der Zelle bestimmt und durch bestimmte Helfervirusfunktionen beschleunigt (Ferrari *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 1996; Atchison *et al.*, 1965; Hoggan *et al.*, 1966; Melnick *et al.*, 1965; Berns, 1996; Muzyczka & Berns, 2002). Eine wichtige Rolle spielen hierbei die adenoviralen Gene E1A, E1B, E2A (Carter, 1990).

Etwa 16-30 Stunden nach der produktiven Infektion akkumulieren reife, infektiöse AAV-Partikel in der Zelle. Aus einer einzigen mit AAV und Helferviren koinfizierten

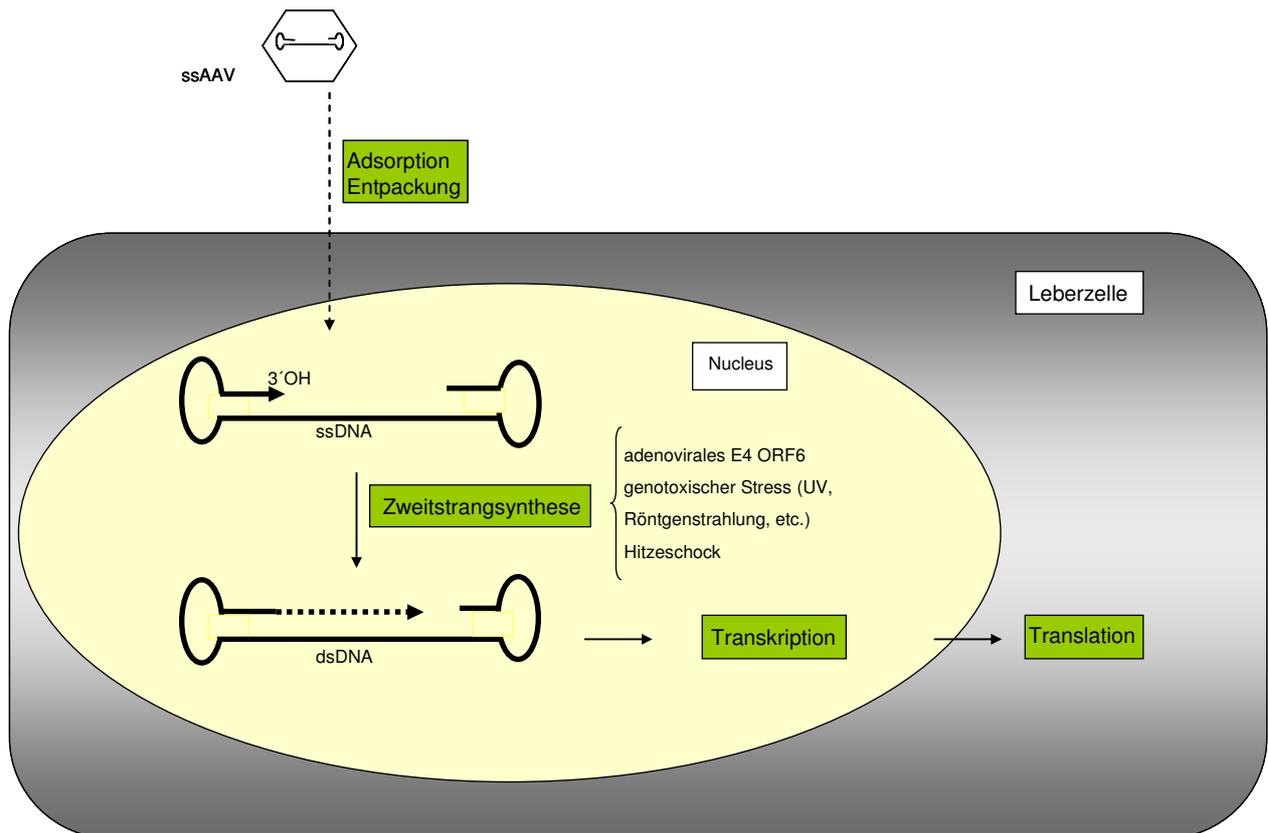


Abb. 4: Metabolischer Weg des AAV-Genoms in der Zelle beim lytischen Zyklus. Adsorption und Eindringen in die Zelle sind unabhängig von Helfervirusfunktionen. Die metabolische Aktivierung (Konvertierung der ssDNA in die doppelsträngige replikative Form) kann durch Helfervirusfunktionen oder genotoxischen Stress beschleunigt werden. Die als Primer dienenden ITRs sind als Haarnadelstruktur dargestellt. Nach Ferrari *et al.* 1996. Abkürzungen: ds: doppelsträngig; ITR: *inverted terminal repeat*; ss: einzelsträngig; ORF: *open reading frame*; UV: ultraviolette Strahlung

Zelle, können weit über 100.000 AAV-partikel hervorgehen (Carter, 1992).

Zellen die nicht mit Helferviren infiziert und somit nicht permissiv sind, können ebenfalls von AAV infiziert werden. Es kommt aber nicht zum lytischen Zyklus. Stattdessen integriert AAV ins Wirtsgenom: es handelt sich hierbei um Latenz. Vor der Integration muss jedoch wie im lytischen Zyklus eine Konvertierung des ssDNA-Stranges in eine dsDNA erfolgen. Diese findet aber ausschließlich durch *annealing* der „plus“- und „minus“-Stränge statt (Nakai *et al.*, 2002). Es bildet sich eine zirkuläre ds-Form. Wird diese zirkuläre Form vervielfältigt (*rolling circle replication*) entstehen dabei Kopf-an-Schwanz-Konkatemere (Duan *et al.*, 1998). Diese integrieren als Tandemwiederholungen in das Genom und bilden die Latenz aus. Das Wildtyp-AAV-Provirus integriert – einzigartig bei eukaryotischen DNA-Viren – bevorzugt (zu über

70%) in eine bestimmte Stelle im menschlichen Chromosom. Diese Integration in die AAV1S (AAV site 1) genannte Stelle im Chromosom 19 (19q13.3-qter) geschieht ohne bekannte klinische Auswirkungen (Kotin *et al.*, 1990, 1991, 1992; Dutheil *et al.*, 2000; Linden & Berns 1996; Samulski 1993; Young *et al.*, 2000a). Effizienz und Spezifität dieses Prozesses werden durch die AAV *rep*-Gene vermittelt.

Eine spätere (Super-) Infektion mit dem Helfervirus kann zum Herauslösen (*rescue*) der AAV-DNA aus dem Wirtsgenom, zur Replikation der viralen DNA und damit zur Bildung neuer Viruspartikel führen.

Da Zellen sehr sensibel auf die Anwesenheit von ssDNA reagieren und diese als Signal für geschädigte DNA verstanden wird (Huang *et al.*, 1996), wird ssDNA von zellulären Mechanismen tendenziell eher abgebaut, anstatt in dsDNA konvertiert zu werden (Hauck *et al.*, 2004). Aus diesem Grund ist die AAV-Infektion nicht ganz so effizient, wie beispielsweise die von Adenoviren. Letztere tragen statt einzelsträngiger doppelsträngige DNA.

1.4 Virale Vektoren auf AAV-Basis

Ein idealer viraler Vektor für die Gentherapie sollte zwar den viralen Infektionsweg nutzen, aber nicht repliziert werden, die Expression viraler Gene vermeiden und keine Zytotoxizität verursachen. Stattdessen soll das therapeutische Gen (hFIX) exprimiert werden. Der Versuch, dies zu erreichen, erfolgt durch die Deletion aller oder der meisten kodierenden Regionen, so dass nur noch die in *cis* (d. h. auf dem selben DNA-Strang vorliegend) benötigten Sequenzen verbleiben, die für die Verpackung des Vektorgenoms in das virale Capsid oder die Integration des Vektors in das Wirtschromosom essentiell sind. Diese essentiellen Sequenzen sind bei Vektoren auf Basis des Adenoassoziierten Virus nur die äußeren DNA-Enden, die ITRs (*inverted terminal repeats*).

Rekombinante Adenoassoziierte Viren (rAAV) wurden zwar in der Mitte der 1980er Jahre erstmals als Gentransfervehikel eingesetzt, aber sind erst lange nach retro-, adeno- und nichtviralen Gentherapievektoren Mitte der 1990er gängig geworden (Muzyczka 1992). Ein Grund war, dass sie über viele Jahre hinweg kaum in ausreichender Menge herzustellen waren, so dass wenige *in vivo*-Versuche durchgeführt werden konnten.

Von den bisher elf bekannten AAV-Serotypen, wurden die Typen 1 - 9 als Gentherapievektoren in Studien eingesetzt. Der am besten charakterisierte und in den ersten Jahren der Verwendung von rAAV am häufigsten verwendete Serotyp ist der Typ 2 (Samulski *et al.*, 1999).

Weniger als 10 % der AAV-Genome integrieren in das Wirtsgenom (Flotte *et al.*, 1993b; Afione *et al.*, 1996; Kaplitt *et al.*, 1994; Xiao *et al.*, 1996). Während dies beim Wildtyp-AAV2 bevorzugt in die so genannte AAVS1-Stelle des Chromosoms 19 geschieht, ist dies bei rekombinanten Viren nicht der Fall. Stattdessen kommt es bei rAAV durch das Fehlen der rep-Gene zu einer zufälligen Integration (Balagué *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2000b). Auf Grund der recht geringen Integrationsrate werden die rAAV zu den nichtintegrierenden Vektoren gezählt.

Nach der Transduktion von Zellen mit rAAV2 steigt die Expression des therapeutischen (hFIX-) Gens langsam an und es dauert ca. 4 - 8 Wochen, bis das Expressionsplateau erreicht ist.

1.4.1 Vorteile und Risiken von Vektoren auf AAV-Basis

Wie alle Vektoren bieten auch rekombinante Adenoassoziierte Viren viele Vorteile, bergen aber auch gewisse Risiken. Beide Punkte sollen im Folgenden betrachtet werden.

Vorteile:

AAV haben viele einzigartige und vorteilhafte Charakteristika, die sie interessant für die Verwendung als Gentransfervehikel machen und die dafür sorgen, dass sie auch heute noch zu den für den FIX-Gentransfer am besten geeigneten Vektoren zählen (Kaufman, 1999; Monahan & Samulski, 2000; Rabinowitz & Samulski, 1998; Samulski *et al.*, 1999). Das Wildtypvirus ist nicht pathogen und daraus entwickelte Vektoren enthalten keine viralen Gene. Somit kann es nicht zur Expression viraler Proteine kommen, die eine zelluläre Immunreaktion oder cytotoxische Reaktion gegen transduzierte Zellen auslösen könnten, wie es bei adenoviralen Vektoren der Fall ist. Toxikologische Untersuchungen zeigten, dass FIX-Gentransfer mittels rAAV sowohl nach intramuskulärer, als auch nach intravenöser und direkter Verabreichung in die Leber gut verträglich ist (Kay *et al.*, 2000; Manno *et al.*, 2003, 2006; Arruda *et al.*, 2002; High 2004a,b). Vor dem Hintergrund des Todesfalles eines 18 jährigen Patienten im Jahre 1999, der an einer milden, gut unter Kontrolle zu haltenden Form der

Ornithintranscarbamylase-Defizienz (OTC) litt, ist die fehlende Toxizität der AAV-Vektoren besonders hoch zu werten. Der Patient war mit $3,8 \times 10^{13}$ adenoviralen Vektorpartikeln behandelt worden, die das OTC-Gen enthielten (Report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee, 2002; Marshall, 1999). Ursachen für die starke Immunreaktion waren wahrscheinlich die adenoviralen Capsidproteine sowie ein durch vorherige Wildtypinfektion sensibilisiertes Immunsystem (Bostanci, 2002).

rAAV transduzieren, anders als Ad-Vektoren, keine antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (Jooss *et al.*, 1998), sondern eine breite Palette von sowohl proliferierenden, als auch ruhenden Zellen, wie z.B. Leber- oder Muskelzellen von Mäusen, Hunden und Primaten (Monahan *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 1997; Samulski *et al.*, 1999). Obwohl der natürliche Infektionsweg für Wildtyp(wt)-AAV2 die oberen Atemwege sind, infizieren rAAV im Tierversuch effizient auch Gehirn, Leber, Lunge, Muskeln, Retina sowie Gefäßsystem und exprimieren dort auch über lange Zeiträume hinweg Transgene (Kaufman, 1999; Monahan & Samulski, 2000; Rabinowitz & Samulski, 1998; Samulski *et al.*, 1999). AAV-Partikel sind sehr stabil und unempfindlich. So können bei der Vektorproduktion relativ unsanfte Methoden verwendet werden und es müssen weder hohe Temperaturen oder Drücke vermieden werden, noch mindern lange Zentrifugations- oder Dialysezeiten ohne Kühlung die Ausbeute.

Nachteile/Risiken:

Der größte Nachteil von rAAV für viele Anwendungen in der Gentherapie ist die relativ geringe Aufnahmekapazität für Expressionskassetten (~ 4,5 kb). Bei Krankheiten, die auf dem Versagen eher kleiner Gene wie dem FIX-Gen (1,4 kb) bei der Hämophilie B beruhen, stellt dies kein Hindernis dar. Anders jedoch z.B. bei der Hämophilie A, da das FVIII-Gen selbst als FVIII-cDNA mit 4,3 kb noch sehr groß ist und umständliche Lösungen gefunden werden müssen, um Platz für Promotor und andere Sequenzen zu schaffen (Burton *et al.*, 1999; Chao *et al.*, 2002; Gnatenko *et al.*, 1999).

Insertionsmutagenese:

Vektoren auf AAV-Basis persistieren größtenteils als Episom, aber mit niedriger Frequenz (<5%) können sie in einigen Geweben von Mäusen, abhängig von

zellulären Proteinen trotzdem ins Wirtszellgenom integrieren (Nakai *et al.*, 2003). Pro Zelle einer Mausleber wurden 0,05 integrierte Kopien beobachtet – was beim Menschen jedoch Milliarden mutierter Zellen in der Leber bedeuten würde (Nakai *et al.*, 2005). Die Integration findet bei rekombinanten AAV wegen des Fehlens der rep-Gene nicht an der Hauptintegrationsstelle AAVS1, sondern zufällig statt (Miao *et al.*, 1998; Nakai *et al.*, 2005).

Rekombinante AAV scheinen bevorzugt nicht homolog in präexistierende Chromosomenbrüche zu integrieren (Russell *et al.*, 1995; Alexander *et al.*, 1994; Nakai *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2004). Somit sind sie nicht die Verursacher der bei der Integration beobachteten Chromosomendeletionen und Rearrangements, sondern deren Nutznießer (Nakai *et al.*, 2003). Dies könnte auch der Grund für die Präferenz der rAAV sein, in transkribierte Bereiche zu integrieren: aktive Gene haben eine größere Wahrscheinlichkeit für Doppelstrangbrüche (Gonzales-Barrera *et al.*, 2002) und/oder die Doppelstrangbrüche sind dort besser zugänglich (Russell, 2003). Des Weiteren scheint die rAAV-Integration in das Genom von der Art des transduzierten Gewebes und vor allem von dessen Proliferationsstatus abzuhängen. Eine *in vitro*-Studie mit menschlichen Zellen zeigte bei der Integration von rAAV eine Präferenz für DNA-Bereiche, in denen häufig die Nukleotidsequenz CG auftaucht (CpG-Inseln) (Miller *et al.*, 2005). Im größtenteils postmitotischem Muskelgewebe dagegen wurde bisher keine rAAV-Integration nachgewiesen (Schnepp *et al.*, 2003).

Auch wenn bisher keine Nebenwirkungen durch Integration von rAAV beobachtet wurden, sollte die Integration durch Tierversuche an einer großen Anzahl von Individuen erforscht werden. Wie wichtig es ist, das Risiko der Insertionsmutagenese genau zu untersuchen, zeigt der Vorfall bei einer Gentherapiestudie mit rekombinanten retroviralen Vektoren. Zwei von elf Kindern, bei denen erstmals eine Heilung durch Gentherapie erreicht worden war (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000), erkrankten später an Leukämie (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Behandelt worden war die tödlich verlaufende Immundefizienz-Krankheit SCID-X1-Syndrom mit hämatopoietischen Stammzellen, die *ex vivo* mit einem Mäuse-Leukämie-Virus- (MLV-) Vektor transduziert worden waren.

Inzwischen wurden einige *in vitro*- und Tierversuche unternommen, um die Integration des rAAV nach AAVS1 zu lenken (Huttner *et al.*, 2003; Gonclaves, 2005; Recchia *et al.*, 2004).

Vertikale Transmission:

Das Risiko der vertikalen Transmission, also der Vererbung an die Nachkommen, hängt von der Fähigkeit der rAAV ab, die Keimbahn zu infizieren und in das Genom der Keimzellen zu integrieren. Im Tierversuch mit Kaninchen zeigte sich, dass rAAV durch Streuung auch ins Gonadengewebe gelangen konnten. Die Menge der Vektorsequenzen in anderen als den Zielgeweben war dosisabhängig (nach einer Injektion mit 5×10^{10} vp in die Portalvene von Mäusen waren die Vektorpartikel vorwiegend in der Leber zu finden, nach einer Injektion von 1×10^{11} vp aber deutlich mehr in der Milz und anderen Geweben [Nathwani *et al.*, 2001]), nahm mit der Zeit ab und im Gonadengewebe war die Konzentration generell 1000-fach geringer als im Zielgewebe. Doch selbst bei relativ hohen Dosen von 1×10^{13} vg (Vektorgenome)/kg Körpergewicht waren in Spermaproben keine positiven Signale zu finden (Arruda *et al.*, 2001a).

Klinische Studien am Menschen zeigten allerdings nach der Injektion von rAAV in die Pfortader (Arruda *et al.*, 2002; Manno *et al.*, 2006) transient positive Spermaproben. Die rAAV lagen jedoch nur in der Samenflüssigkeit vor (High, 2004b) und Untersuchungen an Primaten hatten bereits gezeigt, dass Spermatogonien kein Heparansulfatproteoglycan exprimieren, den wichtigsten Zellrezeptor für AAV2. Diese Zellen sind somit wahrscheinlich nicht permissiv für Vektoren, die eine AAV2-Hülle haben (Summerford & Samulski, 1998). Da der Gewebetropismus vom Capsid abhängig ist, können diese Ergebnisse jedoch nicht auf andere AAV-Serotypen übertragen werden.

Die Exposition von reifen Mausspermien mit hohen AAV2-Konzentrationen (3400-34000 vg/Zelle) zeigte, dass das Risiko der Transduktion extrem gering bis nicht vorhanden ist (Couto *et al.*, 2004). Kürzlich zeigten Schuettrumpf *et al.* (2006), dass im Kaninchen nach intravenöser Vektorverabreichung Samenproben maximal vier Tage positiv waren. Langzeituntersuchungen zeigten, dass positive Signale nicht erneut auftraten. Auch die Autoren dieser Studie gelangten zu dem Schluss, dass AAV2-Vektoren ein minimales Risiko der Keimbahntransmission für Menschen aufweisen.

Immunreaktion:

Es gibt unterschiedliche Teilaspekte der Immunreaktion, die bei der Gentherapie beachtet werden müssen: eine potentielle Gefahr der Gentherapie ist die zelluläre Immunantwort gegen transduzierte Zellen. Des Weiteren können neutralisierende

Antikörper gegen den Vektor selbst, also die Capsidproteine und andere virale Genprodukte gebildet werden, oder aber auch gegen das Transgenprodukt („Inhibitoren“).

Zelluläre Immunantwort: Da weder wtAAV noch rAAV antigenpräsentierende Zellen transduzieren, wurde zunächst angenommen, dass die Gefahr einer zellulären Immunantwort bei Vektoren auf Basis des Adenoassoziierten Virus, ganz im Gegensatz zu adenoviralen Vektoren, nicht besteht (Chirmule *et al.*, 1999).

Unerwartet zeigte sich jedoch, dass es im Menschen, anders als in Mäusen, Ratten, hämophilen Hunden und nichthumanen Primaten, zu einer T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen AAV-Capsidantigene kam. Die Präsentation von Antigenen über das MHC-Klasse I-System mit der Folge der Differenzierung von CD8⁺-T-Zellen in cytotoxische T-Lymphozyten führte zur Zerstörung vektortransduzierter Zellen (Hepatocyten) (Manno *et al.*, 2006). AAV-Capside werden zwar – im Gegensatz zum hFIX-Transgen – in transduzierten Zellen nicht synthetisiert, aber die Proteine können auch passiv aufgenommen, über das MHC-Klasse I-System präsentiert werden und zum Erkennen AAV-transduzierter Hepatocyten durch CD8⁺-T-Zellen führen.

Eine Hypothese (Manno *et al.*, 2006), die den Unterschied zu Tieren erklärt, lautet wie folgt: anders als Tiere werden Menschen natürlicherweise schon im Kindesalter mit AAV infiziert. Da AAV replikationsdefizient sind, findet diese Infektion immer zusammen mit einer Helfervirusinfektion (Adenovirus) statt. Obwohl AAV alleine möglicherweise keine Entzündungsreaktion hervorrufen, die für eine maximale adaptive Immunantwort nötig wäre, führt die Kombination mit der Adenovirusinfektion, welche das angeborene Immunsystem aktiviert, dazu, dass gegen Helfervirus- und AAV-Antigene gerichtete CD8⁺-T-Zellen gebildet werden. Nach Erlangen der Kontrolle über die Infektion nimmt die Frequenz der AAV-spezifischen CD8⁺-T-Zellen ab, aber es bleibt ein kleiner Pool T-Gedächtniszellen zurück. Eine erneute Exposition des AAV-Capsids reaktiviert die CD8⁺-T-Gedächtniszellen und führt zur Zerstörung der AAV-Capsid-haltigen Zellen – der transduzierten Hepatocyten. T-Gedächtniszellen werden schneller aktiviert, als naive Lymphozyten, so dass eine Reexposition im Menschen zu einem anderen Ergebnis führt, als eine primäre Infektion im Tierversuch. Es sind also wohl die AAV-Capside, nicht das Transgen hFIX, dass die zelluläre Immunantwort stimuliert (Manno *et al.*, 2006).

Eine kurzzeitige Immunmodulation zum Zeitpunkt der Vektorverabreichung könnte eine Lösung dieses Problems darstellen (Fields *et al.*, 2001, Manno *et al.* 2006), da das Capsid nur für den Transport des therapeutischen Gens benötigt und anschließend abgebaut wird.

Neutralisierende Antikörper gegen das AAV-Capsid: Ein weiteres Problem könnte die humorale Immunantwort gegen AAV-Capsidproteine darstellen. In 20 – 80 % der Bevölkerung sind präexistierenden neutralisierenden Antikörpern gegen AAV2 zu finden. Die Werte schwanken, abhängig von der Altersgruppe und geographischen Lokalisation (Moskalenko *et al.*, 2000; Parks *et al.*, 1970; Blacklow *et al.*, 1968a; Chirmule *et al.*, 1999; Erles *et al.*, 1999). Studien lieferten widersprüchliche Ergebnisse, ob diese humorale Immunantwort neutralisierende Effekte hat und die Effizienz der *in vivo*-Transduktion des Vektors in Leber, Muskeln und Lunge verschlechtert. Einige Studien zeigten, dass neutralisierende Antikörper die Vektor-Effizienz von *in vivo*-Leber- (Halbert *et al.*, 1997) oder Lungeninfektionen (Moskalenko *et al.*, 2000) negativ beeinflussten. Neutralisierende Antikörper scheinen zwar keine Reinfektion, aber das Entpacken des Virus bzw. Vektors zu verhindern (Blacklow, 1988; Beck *et al.*, 1998).

Andere Studien dagegen zeigten, dass diese humorale Immunantwort keinen Einfluss auf die Transduktionseffizienz des Vektors im Muskel (Fisher *et al.*, 1997) oder der Lunge (Beck *et al.*, 1999) hat.

Wenn die relativ weit verbreitete Immunantwort gegen AAV2 ein Hindernis für den Gentransfer darstellen sollte, könnte ein Wechsel zu anderen AAV-Serotypen eine Lösung sein. Auch gegen die Serotypen 1,3 und 5 kommen zwar neutralisierende Antikörper im Menschen vor und die Prävalenz steigt mit dem Alter, aber ihre neutralisierenden Effekte sind nicht so ausgeprägt, wie die der Anti-AAV2-Antikörper (Xiao *et al.* 1999). Neutralisierenden Antikörper gegen AAV5 kommen zudem sehr selten vor (Hildinger *et al.*, 2001).

„Inhibitoren“: Es ist bekannt, dass Anti-FIX-Antikörper (Inhibitoren) bei der klassischen Substitutionstherapie mit FIX-Konzentraten in Hämophilie B-Patienten auftreten und die Behandlung erheblich erschweren können (Kapitel 1.1.3). Eine humorale Immunantwort auf das Transgenprodukt, hier FIX, würde nicht nur eine Gen-

therapie behindern, sondern im Falle der Hämophilie auch die herkömmliche Therapie mit Faktorenkonzentraten.

Die Inhibitorbildung ist davon abhängig, ob T-Helferzellen aktiviert werden, oder ob in diesen Toleranz induziert wird. Dies wiederum ist vom Aktivierungsstatus der antigenpräsentierenden Zellen abhängig, mit denen die T-Helferzellen interagieren. Bei der Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen spielen zahlreiche Faktoren, wie z.B. der Gewebetyp oder Entzündungssignale, eine Rolle. Entzündungssignale müssen dabei nicht vom Vektor hervorgerufen werden (rAAV haben ein äußerst geringes Entzündungspotential), sondern können auch durch Verletzungen verursacht werden (Sakaguchi *et al.*, 2001).

Viele Studien zeigten weitere Ursachen der Inhibitorbildung bei der Behandlung mit FIX-Konzentraten. Ein wichtiger Punkt ist die Art der Mutation, die den Faktormangel auslöst. So haben große Deletionen oder Stopp-Mutationen, die zum Verlust des Proteins führen, ein größeres Potential als beispielsweise *missense*-Mutationen, die zwar die Funktion des FIX-Proteins beeinträchtigen, aber die dennoch dessen Bildung erlauben, so dass das Immunsystem Wildtypgerinnungsfaktoren (Konzentrate oder gentherapeutische) nicht als fremd ansieht. Ein weiterer Punkt ist die Verabreichungsmethode des Vektors (intravenös, intramuskulär, intrahepatisch). So kam es bei der Verabreichung von AAV-Vektoren über die Leber sowohl bei Mäusen, als auch bei Hunden selten zur Inhibitorbildung – anders als bei intramuskulärer Verabreichung. Auch die Auswahl der Promotoren - gewebespezifisch oder universell - (Pastore *et al.*, 1999) und die Dosis des Vektors beeinflussen die Inhibitorbildung.

Besonders wichtig ist die Dosis/Einstichstelle bei der intramuskulären Verabreichung des Vektors (Herzog *et al.*, 2002). Es scheint, dass die Menge des produzierten Transgens, das lokal synthetisiert wird, der wichtigste, eine Immunantwort auslösende Faktor ist. Virale Vektoren mit AAV1-Pseudotyp, erzielten nämlich nach intramuskulärer Injektion im Hundemodell mit einer geringeren Dosis ($2,4 \times 10^{11}$ vg/kg Körpergewicht bzw. $6,8 \times 10^{10}$ vg/Einstichstelle), eine höhere Transgenexpression als rAAV2-Vektoren in Hunden, die in deutlich höherer Dosis verabreicht worden waren ($5,6 \times 10^{12}$ und $8,5 \times 10^{12}$ vg/kg Körpergewicht bzw. $2,0 \times 10^{12}$ vg/Einstichstelle). Trotz der geringeren Vektordosis entwickelte der mit rAAV1 behandelte Hund inhibitorische Antikörper, die beiden mit rAAV2 behandelten Tiere dagegen nicht (Arruda *et al.*, 2004a).

Dieser Schluss stimmt mit den Daten aus der Literatur über Vakzine überein, die besagen, dass die Menge Antigen, die in einer intramuskulären Einstichstelle verabreicht wird, mit der Stärke der Immunantwort korreliert (Zinkernagel, 2000).

1.4.2 Aufbau viraler Vektoren auf AAV-Basis (rAAV)

Die ITRs sind die einzigen AAV-Sequenzen, die in *cis* im Vektor vorhanden sein müssen. Der Raum zwischen den ITRs im AAV-Vektorplasmid, der durch die Deletion der rep- und cap-Gene entsteht, wird mit der eukaryotischen Expressionskassette (bestehend aus Promotor[en], Regulatorsequenz[en], therapeutischem Gen – in diesem Falle hFIX – und poly-A-Sequenz[en]) ausgefüllt, die bis zu etwa 4,7 kb groß sein darf, um noch effizient in AAV-Capside verpackt zu werden (Abb. 5).

Der Zyklus des AAV ist aber in Bezug auf die Rep- und Cap-Proteinexpression und das Verhältnis zwischen Replikation und Virusassembly, sehr genau koordiniert. Um diese Situation bei der Produktion der rekombinanten Vektoren auf AAV-Basis nachzustellen, müssen die rep- und cap-Gene zur Verfügung gestellt werden. Da es ausreicht, dies in *trans* zu tun (Muzyczka, 1992; Flotte & Carter, 1995; Smuda & Carter,

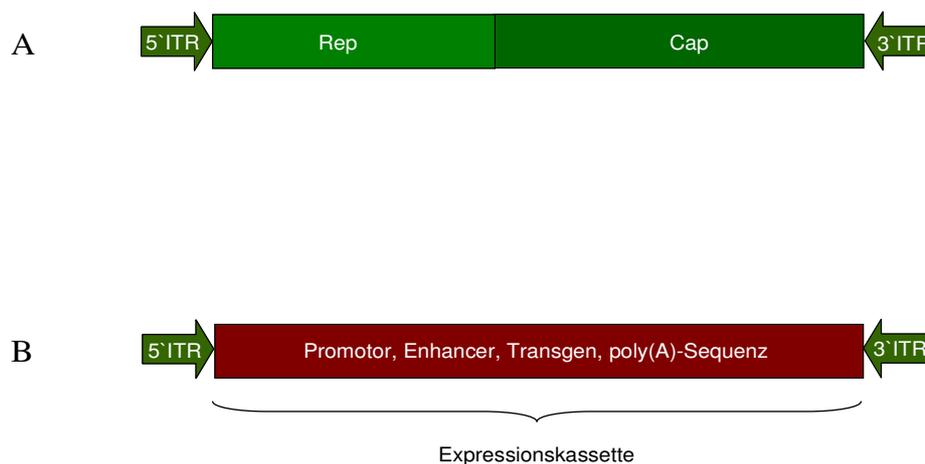


Abb. 5: Vergleich von Wildtyp-AAV und rekombinantem AAV. In grün sind alle Wildtyp-Bestandteile des AAV-Genoms dargestellt, die rekombinante Expressionskassette in rot. **A)** zeigt das Wildtyp-AAV-Genom, bestehend aus den *inverted terminal repeats* (ITRs), den rep- und den cap-Genen. **B)** zeigt die zwischen die ITRs klonierte Expressionskassette, die im Allgemeinen aus Promotor, Enhancer, eventuell regulatorischen Sequenzen, Transgen (therapeutisches Gen, hier hFIX) und poly-(A)-Sequenz besteht.

1991), wird dazu die Produktionszelllinie außer mit dem AAV-Vektorplasmid zusätzlich noch mit einem Helferplasmid kotransfiziert. Dieses zweite Plasmid enthält außer den AAV-Genen *rep* und *cap* auch die für die Vermehrung notwendigen adenoviralen Gene *E2a*, *E4*, und *VA*. Die Integration der adenoviralen Gene in das Helferplasmid macht eine zusätzliche Infektion mit dem Adenovirus überflüssig. Als Produktionszelllinie wird HEK293T verwendet, die bereits das ebenfalls benötigte adenovirale *E1*-Gen stabil enthält.

Werden andere Serotypen als AAV2 als Vektor genutzt, wird meist die so genannte Pseudotyp-Strategie angewandt, bei der die Expressionskassette zwischen die ITRs des AAV2 kloniert wird, während das Helferplasmid aber die *cap*-Gene eines anderen Serotyps enthält, so dass das rekombinante Genom in das Capsid eines anderen AAV-Serotypen verpackt wird.

Inzwischen gibt es auch doppelsträngige AAV (so genannte *self complementary*, scAAV), die den Schritt der Doppelstrangsynthese bzw. des *annealings* von „plus“- und „minus“-Strang überflüssig machen (siehe Kapitel 1.3.1). Dieses scAAV entspricht einem Haarnadelstruktur-Intermediat des AAV-Replikationszyklus. Auch die scAAV2-Vektoren brauchen etwa 4 - 8 Wochen, bis sie das Expressionsplateau erreichen (Thomas *et al.*, 2004), sind dann aber deutlich effizienter (10-100fache Transgenexpressionsrate) (McCarty *et al.*, 2001). Sie haben aber den großen Nachteil, dass sie nur 2,4 kb doppelsträngige DNA aufnehmen können, so dass ihr Nutzen für den therapeutischen Gentransfer eingeschränkt ist (McCarty *et al.* 2001).

1.4.3 Steuerbare Transgenexpression mittels Tet-System

Die endogene Genexpression wird *in vivo* genau reguliert, so dass Vorhandensein und Menge des jeweiligen Genproduktes für jede Zelle spezifisch sind. Um das in Zellen gentherapeutisch erzeugte Protein sicher und effektiv zu handhaben, ist es von Vorteil, wenn die Expression des therapeutischen Gens reguliert werden kann (Clackson, 2000). Das am häufigsten genutzte Genregulations-system ist das binäre Tetracyclin (Tet)-System, mit dem die Expression eines Gens angeschaltet (Tet On) bzw. abgeschaltet (Tet Off) werden kann (Corbel & Rossi, 2002) (Abb. 6).

Das Tet-System basiert auf einer spezifischen Bindung des Regulatorproteins tTA bzw. rtTA ([reverses] Tetracyclin-kontrolliertes Transaktivatorprotein) an den TRE-Promotor (Tetracyclin-reguliertes Element), von dem aus das therapeutischen (hFIX-)

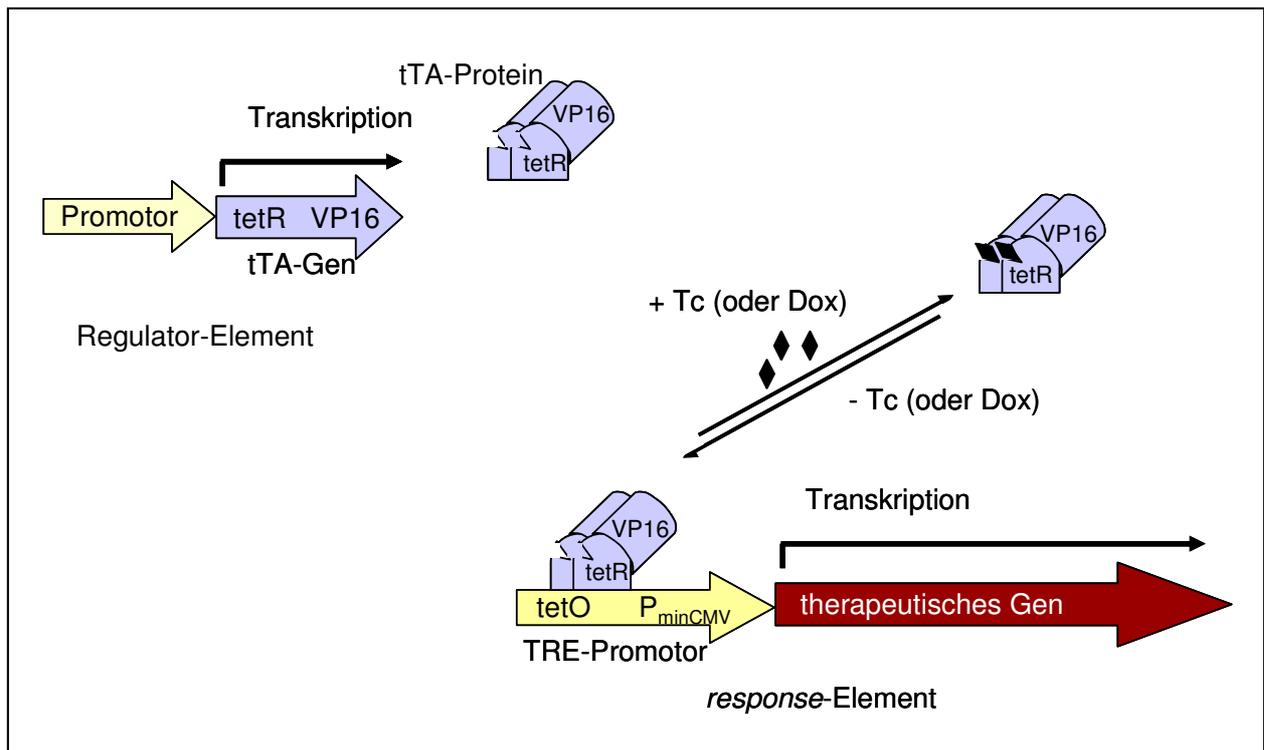


Abb. 6: Schematische Darstellung des Tet Off-Systems. Die Regulator-Sequenz besteht aus einem (gewebespezifischen oder universellen) Promotor und dem tTA-Gen. Dieses ist eine Fusion aus dem prokaryotischem (*E.coli*) Tetracyclin-Repressor TetR, und der C-terminalen Transkriptions-Aktivator-domäne des Herpes Simplex Virus VP16-Proteins. Die *response*-Sequenz setzt sich aus dem TRE-Promotor und dem therapeutischen Gen zusammen. TRE besteht dabei aus sieben Kopien der 19 bp großen prokaryotischen *tetracycline operator binding site* (tetO), fusioniert mit der minimalen CMV-Promotor-Region, die die TATA-Box und die Transkriptionsstartstelle enthält (Gossen & Bujard, 1992). Abkürzungen: Dox: Doxycyclin; $P_{\min CMV}$: minimaler Cytomegali-Virus-Promotor; Tc: Tetracyclin; TRE: Tet reguliertes Element. Abbildung nach CLONTECH Laboratories, Inc.

Gen transkribiert wird. Grundsätzlich wird immer das Regulatorprotein dauerhaft exprimiert. Im Falle des Tet Off-Systems ist der TRE-Promotor aktiv, wenn das tTA-Protein an den Promotor bindet. Gelangt der Koregulator Tetracyclin (Tet) in die Zelle, so bindet dieser an das tTA-Protein, so dass tTA nicht mehr an den Promotor des therapeutischen Gens (TRE) binden kann. Dies bewirkt dessen Abschaltung und damit die Inhibierung der Expression des therapeutischen Gens.

Das Tet On-System funktioniert umgekehrt: hier wird eine mutierte Form des tTA-Gens verwendet, das rtTA-Gen (reverses Tetracyclin-kontrolliertes Transaktivatorprotein-Gen). Das rtTA-Protein bindet nur in Anwesenheit von Tetracyclin an den

TRE-Promotor, so dass durch Zugabe des Koregulators Tetracyclin die Expression des therapeutischen Gens induziert werden kann.

Vorteile des Tet-Systems sind die gute, dosisabhängige Induzierbarkeit, die kurze Reaktionszeit, die Spezifität und die fehlende Interferenz mit zellulären Mechanismen. Als Koregulator und Induktor kann an Stelle von Tetracyclin das medizinisch gebräuchliche Analogon Doxycyclin verwendet werden. Es passiert die Zellmembran und ist sehr verträglich und sicher in der Anwendung im Menschen (Solera, 1996).

Tet-Systeme sind bisher in verschiedenen Vektoren in Kombination mit unterschiedlichen Transgenen verwendet worden, beispielsweise in adenoviralen (Corti *et al.*, 1999), AAV (Habermann *et al.*, 1998), retroviralen (Hofmann *et al.*, 1992) und HSV-Vektoren (Ho *et al.*, 1996).

1.4.4 Verwendung von rAAV in der Gentherapie von Erbkrankheiten

AAV-Vektoren werden inzwischen für die therapeutische Anwendung entwickelt. Nach präklinischen Studien in verschiedenen Tiermodellen wurden klinische Studien der Phase 1 für den Einsatz der Vektoren zur Behandlung von Hämophilie B (Kay *et al.*, 2000; Manno *et al.*, 2003; Manno *et al.*, 2006) sowie verschiedener anderer monogenetischer Krankheiten durchgeführt (siehe auch Kapitel 1.5.3). Die erste dieser Studien wurde an einem an Zystischer Fibrose erkrankten Patienten durchgeführt (Wagner *et al.*, 1998). Diese bestätigte zwar die Sicherheit von rAAV, zeigte aber in Bezug auf Ziele der Studie kaum statistisch signifikante Ergebnisse. Der Vektor auf AAV2-Basis exprimierte in diesem Fall das CFTR-Gen (*cystic fibrosis transmembran conductance regulator*) (Carter, 1996). Bei der Zystischen Fibrose handelt es sich um eine letale, autosomal rezessive Krankheit, die durch die Mutation des CFTR-Gens verursacht wird. Das Fehlen des Genproduktes, einem Ionenkanal, führt zu biochemischen Veränderungen u. a. in der Lunge, die dadurch zunehmend verschleimt und schließlich versagt. Ziel war es, die CFTR cDNA in die Epithelzellen der Lunge zu bringen (Flotte *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1999).

Andere Studien zeigten die Möglichkeit auf, AAV-Vektoren bei der autosomal dominanten *Ophthalmic Disease*, die zur Blindheit führt, einzusetzen (Flannery *et al.*, 1997; Lewin *et al.*, 1998; Guy *et al.*, 1998; Jomary *et al.*, 1997). So wurden Photorezeptorzellen im Nagetiermodell durch Injektionen in den subretinalen Raum transduziert, wobei eine einzige Injektion zu einer Transduktionsrate von 10 - 20 % der gesamten Retina und 100 % im direkten Umfeld der Einstichstelle – insgesamt geschätzten 2,5

Millionen transduzierten Photorezeptoren – führte (Flannery *et al.*, 1997). Eine Studie zeigte im *autosomale retinitis pigmentosa* (ADRP) genannten Rattenmodell, eine signifikante Verlangsamung des Fortschreitens der degenerativen Krankheit über einen Beobachtungszeitraum von drei Monaten (Lewin *et al.*, 1998).

Eine weitere Studie berichtete über den erfolgreichen Einsatz von rAAV bei Muskeldystrophie im natürlich vorkommenden Hamstermodell. Dort führte die Behandlung zu einer effizienten und stabilen genetischen Rekonstitution nach Muskelinjektion des Vektors, der für das humane δ -Sarcoglycan-Gen kodierte (Greelish *et al.*, 1999; Stedman *et al.*, 2000).

1.5 Präklinische und klinische Hämophilie B-Studien

1.5.1 Leber- und muskelgerichteter FIX-Gentransfer

Virale Vektoren können über verschiedene Wege verabreicht werden, um sie in die Zielzellen zu bringen. Möglich sind beispielsweise intramuskuläre Injektionen, systemische Verabreichungen in Arm- und Beinvenen und intrahepatische Injektionen in die Pfortader. Alle Varianten haben Vor- und Nachteile, die kurz dargelegt werden sollen.

In den meisten Muskeln überdauern die Muskelfasern die ganze Lebensspanne des Gesamtorganismus. Eine stabile Transduktion könnte somit theoretisch zu sehr langer, wenn nicht sogar lebenslanger FIX-Expression führen (Tawa & Goldberg, 1994). Muskeln eignen sich gut als Zielgewebe für eine somatische Gentherapie, da leicht größere Volumina an Vektorlösungen mittels multipler Injektionen verabreichbar sind (Breithaupt, 1999; Blau & Springer, 1995), ohne dass das Risiko eines chirurgischen Eingriffs (Blutungskomplikationen) eingegangen werden muss. Muskeln sind gut durchblutet, so dass das sezernierte Protein guten Zugang zum Blutkreislauf hat. Die Muskelzellen können den normalerweise in der Leber hergestellten FIX biologisch aktiv synthetisieren, d. h. posttranslationale Modifikationen von FIX (γ -Carboxylierung etc.) durchführen (Arruda *et al.*, 2001b; Kurachi *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1991; Yao *et al.*, 1992; 1994). Nachteil der Injektionsmethode ist jedoch, dass die Injektionsdosis pro Einstichstelle begrenzt ist (Arruda *et al.*, 2001b). Diese wird auch durch die Anzahl der verfügbaren Rezeptoren, die für die Aufnahme der Vektoren wichtig sind, limitiert (Summerford & Samulski, 1998). Die für eine effektive Transduktion nötige Anzahl an Viren muss daher durch eine erhöhte Einstichsequenz kompensiert

werden. Dies wiederum kann aber das Risiko der Antikörperbildung gegen FIX (Ying *et al.*, 2001) erhöhen, wie z. B. im Falle von AAV-Vektoren berichtet wurde (Herzog *et al.*, 2002).

Präklinische Studien an Mäusen und Hunden führten zu der Hochrechnung, dass für eine effiziente Behandlung eines Hämophilie B-Patienten 1×10^{13} Vektorgenome (vg) pro kg Körpergewicht injiziert werden müssten (Arruda *et al.*, 2005). Um die sichere Dosis/Injektionsstelle nicht zu überschreiten, wären ca. 500 Injektionen nötig, was als nicht praktikabel gilt. Nach Bekanntwerden dieser Ergebnisse wurde eine muskelgerichtete klinische Studie an Hämophilie B-Patienten gestoppt, nachdem bei 2×10^{12} vg/kg Körpergewicht nur subtherapeutische FIX-Level detektiert worden waren (Arruda *et al.*, 2005).

Eine intravenöse Vektorverabreichung führt zu einem deutlich höheren Expressionslevel als die Muskulinjektion. Sie ist relativ einfach durchzuführen und der Patient wird wenig belastet. Durch die starke Durchblutung der Leber ist diese auch automatisch Hauptziel der injizierten Vektoren. Noch erfolgreicher ist es allerdings, den Vektor direkt in die Pfortader zu injizieren. Diese Prozedur ist jedoch aufwändig, macht einen operativen Eingriff nötig und kann zu Blutungskomplikationen führen. In den Hepatozyten können alle nötigen posttranslationalen Modifikationen effizient und exakt durchgeführt werden (Arruda *et al.*, 2001b).

Tierversuche mit mehreren Mausstämmen (C57BL/6, Balb/c, Fv129) und im Hundemodell zeigten, dass das Risiko der Bildung inhibitorischer Antikörper gegen FIX nach lebergerichteter Verabreichung niedriger als nach Injektion in die Muskeln ist (Herzog *et al.*, 1997, 1999, 2002, 2001; Fields *et al.*, 2001; Nathwani *et al.*, 2001; Ge *et al.*, 2001; Mount *et al.*, 2002). Zudem kann eine Beschränkung der FIX-Expression auf Hepatozyten durch die Verwendung leberspezifischer Promotoren die Antikörperbildung gegen FIX weitgehend verhindern, wie zahlreiche präklinische Versuche zeigten (De Geest *et al.*, 2003; Pastore *et al.*, 1999; Nathwani *et al.*, 2001; Mount *et al.*, 2002).

Das häufige Vorkommen von Leberkrankheiten wie Hepatitis B und C bei erwachsenen Hämophiliepatienten (auf Grund von Infektionen die vor 1986 erfolgten, siehe Kapitel 1.1.3) (Aledort *et al.*, 1985; Hanley *et al.*, 1996) macht aber die Leber als Zielorgan möglicherweise für einige Patienten problematisch.

1.5.2 Präklinische Hämophilie B-Studien mit rAAV

Vektoren, die in der Gentherapie eingesetzt werden sollen, müssen auf ihre Sicherheit, Effizienz und Expressionskinetik hin untersucht werden. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über Tierversuche mit rAAV, die für die Behandlung der Hämophilie B entwickelt wurden, gegeben werden.

Es hat sich gezeigt, dass Ergebnisse aus Zellkulturstudien recht unzuverlässig sind, da sie teilweise nicht mit denen aus Tierversuchen übereinstimmen (Miao *et al.*, 2000b). Während in der Zellkultur beispielsweise Vektoren auf AAV2-Basis zu einer höheren FIX-Expression führten, als Vektoren auf AAV1-Basis, war es in verschiedenen kleinen und großen Tiermodellen genau umgekehrt (Arruda *et al.*, 2004a).

Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen und die Effizienz der jeweiligen Vektor-konstrukte sind nicht einfach in Relation zueinander zu bringen, da sich die in den zahlreichen Studien eingesetzten Vektoren sehr im Aufbau unterscheiden. Es spielt aber eine große Rolle, ob z. B. universelle oder leberspezifische Promotoren verwendet werden (Le Bec & Douar, 2006). Auch deren Kombination mit Enhancern, der Einbau von Introns in die cDNA des FIX Gens (De Geest *et al.*, 2000; Van Linthout *et al.*, 2002) und die Einbaurichtung der verschiedenen Elemente (Jiang *et al.*, 2004; Chenuaud *et al.*, 2004) kann die Effizienz einer Expressionskassette deutlich verbessern oder verschlechtern. Ebenso haben bidirektionale Promotoren (Jiang *et al.*, 2004; Chtarto *et al.*, 2003), zusätzliche regulatorische Gene (Toniatti *et al.*, 2004; Goverdhana *et al.*, 2005), die Verwendung von Capsiden (Flotte, 2004; Choi *et al.*, 2005) und ITRs verschiedener AAV-Serotypen (pseudotypisierte Vektoren) (Hildinger *et al.*, 2001; Davidoff *et al.*, 2005), bicistronische Vektoren (Fang *et al.*, 2005; Marasco, 2005) sowie der Einbau von posttranskriptional regulatorischen Elementen (Virella-Lowell *et al.*, 2005; Lipshutz *et al.*, 2003) Einfluss auf eine erfolgreiche Transgenexpression. Wang und Kollegen zeigten zudem, dass bei Mäusen beispielsweise auch der verwendete Stamm eine Rolle spielt (Wang *et al.*, 1999).

Die Tabellen 3 und 4 zeigen eine Auswahl an Studien, die mit verschiedenen Mausstämmen bzw. in unterschiedlichen Hämophilie B-Hunde-Modellen durchgeführt wurden. Es zeigte sich, dass im Tiermodell die schwerwiegendste Nebenwirkung, vor allem nach intramuskulärer Vektorinjektion, die Bildung von Inhibitoren war (Mauser *et al.*, 1996; Herzog *et al.*, 1997; Nathwani *et al.*, 2001; Ge *et al.*, 2001), diese jedoch

durch transiente Immunmodulation zum Zeitpunkt der Vektorverabreichung minimiert oder sogar ganz verhindert werden konnte (Herzog *et al.*, 2001).

| Mausstamm | Transgen | Promotor | Verabreichungsweg | Vektordosis in vg/Maus | Ergebnis (FIX:Ag in µg/ml und %) | Kommentar | Referenz |
|-------------------|----------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| C57BL/6 - SCID | hFIX | MLV-LTR | Pfortader | 8×10^{10} | 2 µg/ml (40 %) | Kein LSP, nicht für Leber optimiert | Snyder <i>et al.</i> , 1997a |
| Hämophilie B-Maus | hFIX | MLV-LTR | Pfortader | $4,2 \times 10^{10}$, $6,3 \times 10^{10}$ | 0,25-1,8 µg/ml (5 % - 36 %) | Blutungskorrektur | Snyder <i>et al.</i> , 1999 |
| Hämophilie B-Maus | cFIX | LSP | Pfortader | 2×10^{11} , $5,6 \times 10^{11}$ | 5,3 µg/ml; 15,8 µg/ml (106 %; 316 %) | superphysiolog. Level; korrigierte aPTT, überlebten <i>tail clip</i> | Wang <i>et al.</i> , 1999 |
| C57BL/6 | hFIX | ApoE/haat | i.v. (hydrodynamisch) | $2,8 \times 10^{10}$, $1,4 \times 10^{11}$, $7,2 \times 10^{11}$, $2,4 \times 10^{12}$ | 2-85 µg/ml (40 % - 1700 %) (vereinzelt: bis zu 130 µg/ml [2600 %]) | Messung über 15 Wochen | Miao <i>et al.</i> , 2000b |
| C57BL/6 | hFIX | ApoE/haat | i.m. | 3×10^{10} | ~1 µg/ml (~20 %) | | Nakai <i>et al.</i> , 1999 |
| C57BL/6 | hFIX | ApoE/haat | Pfortader | 3×10^{10} | ~3 µg/ml (~60 %) | | Nakai <i>et al.</i> , 1999 |
| C57BL/6-SCID | hFIX | CMV-Enhancer+β-Actin-Promotor | i.m. | 5×10^{10} | 143 ng/ml (2,86 %) | immundefizient | Nathwani <i>et al.</i> , 2001 |
| C57BL/6-SCID | hFIX | CMV-Enhancer+β-Actin-Promotor | i.v. | 5×10^{10} | 303 ng/ml (6,06 %) | immundefizient | Nathwani <i>et al.</i> , 2001 |
| C57BL/6-SCID | hFIX | CMV-Enhancer+β-Actin-Promotor | Pfortader | 5×10^{10} | 0,5 µg/ml (10 %) | immundefizient | Nathwani <i>et al.</i> , 2001 |

Tab. 2: Erfolgreiche Gentherapie-Strategien mit rAAV in Mäusen. Abkürzungen: ApoE: Apolipoprotein-Enhancer; aPTT: aktivierte Partialthromboplastinzeit; cFIX: Hunde-Faktor IX; FIX:Ag: FIX-Antigen-Level; haat: humanes Alpha-1-Antitrypsin; hFIX: humaner Faktor IX; i.m.: intramuskulär; i.v.: intravenös; LSP: leberspezifischer Promotor; MLV-LTR: Maus-Leukämie-Virus *long terminal repeat*; Prom.: Promotor; SCID: severe combined immuno deficiency; vg: Vektorgenome.

| Serotyp, Verabreichung in | Verabreichung in | FIX:Ag in % | Dauer der Expression | Vektordosis vg/kg | in Referenz |
|---------------------------|------------------|-------------|----------------------|-----------------------|--------------------------------|
| AAV2, Muskel | | 1-2 | 1 Jahr | $8,5 \times 10^{12}$ | Herzog <i>et al.</i> , (1999) |
| AAV2, Muskel | | 1-2 | 1 Jahr | 10^{12} - 10^{13} | Chao <i>et al.</i> , (1999) |
| AAV2, Muskel* | | 4-14 | 3 und 4 Jahre | 3×10^{12} | Arruda <i>et al.</i> , (2005) |
| AAV2, Muskel** | | 13-25 | 1 Jahr | 3×10^{12} | Arruda <i>et al.</i> , (2004b) |
| AAV2, Leber | | 1-2 | 8 Monate | $2,3 \times 10^{11}$ | Snyder <i>et al.</i> , (1999) |
| AAV2, Leber | | 1-4 | 1 Jahr | $4,6 \times 10^{12}$ | Wang <i>et al.</i> , (2000) |
| AAV2, Leber | | 5-12 | 1 Jahr | 1×10^{12} | Mount <i>et al.</i> , (2002) |
| AAV8, Leber | | 10-26 | > 1 Jahr | $5,25 \times 10^{12}$ | Wang <i>et al.</i> , (2005a) |

Tab. 3: Erfolgreiche Gentherapie-Strategien mit rAAV im hämophilen Hunde Modell. Abkürzung: FIX:Ag: FIX-Antigen-Level

* mit Vaskularsystem-permeabilisierenden, nicht im Menschen untersuchten Agenzien (Histamin) und operativem Eingriff

** mit hydrostatischem Druck; so nicht im Menschen anwendbar

Eine weitere wichtige Erkenntnis war die Feststellung, dass für hohe Expressionslevel und dauerhafte Expression des Transgens die Wahl des Promotors entscheidend ist (Snyder *et al.*, 1999). Der Einsatz eines leberspezifischen Promotors (LSP) ermöglichte nach Pfortaderinjektion in Mäusen, sogar anhaltende und superphysiologische cFIX-Level von bis zu 5,3 und 15,8 µg/ml mit kompletter Phänotypkorrektur (Wang *et al.*, 1999).

Der Schritt von der erfolgreichen Behandlung der Hämophilie in der Maus zu der im Hund hat ca. 5 - 8 Jahre in Anspruch genommen und es hat sich gezeigt, dass die Höhe des zirkulierenden cFIX-Levels von der zugeführten Vektordosis abhängig zu sein scheint (Herzog *et al.*, 1999). Trotzdem blieben die bei Hunden erzielten Werte deutlich hinter denen bei Mäusen zurückblieben. Eine Studie von Wang *et al.* aus dem Jahre 2005 führte schließlich mit einem Vektor auf Basis des AAV8 auch im Hund zu sehr guten Ergebnissen (zirkulierender FIX-Level von bis zu 26 %). Bei ersten Versuche mit nichthumanen Primaten (Rhesusaffen) wurden mit AAV2 hFIX-Level von bis zu 10 % erreicht (Nathwani *et al.*, 2002).

Viele Studien, die die Effizienz alternativer AAV-Serotypen (1 - 9) zu AAV2 testeten, kamen sowohl in Mäusen, als auch in Hunden zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen (Rabinowitz *et al.*, 2002; Chao *et al.*, 2000; Chao *et al.*, 2001; Arruda *et al.*, 2003; Grimm *et al.*, 2003a; Mingozzi *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2002). Sicher scheint nur, dass AAV6 eine schnellere FIX-Expressionskinetik hat, als AAV2.

Studien in insgesamt fünf Spezies (Kaninchen, Ratte, Maus, Hund, nichthumane Primaten) haben die Sicherheit, Studien in drei Spezies (Maus, Hund, nichthumane Primaten) die Effizienz der Verabreichung von rAAV mit therapeutischem Wirkungsgrad in Muskelgewebe und Leber belegt, wobei lebergerichteter Gentransfer den Vorteil höherer FIX-Produktion (bis zu 40 x) und eines geringeren Risikos der Bildung inhibitorischer Antikörper aufwies. Die therapeutische FIX-Expression wurde dabei mit rAAV-Dosen erreicht, die keine Sicherheitsbedenken hervorrufen. Einziger Nebeneffekt war, dass nach intravenöser Verabreichung geringe Mengen Vektor in Spermaproben detektiert worden waren. Es konnte jedoch keine Integration in Spermien, auch nach Exposition sehr hoher AAV-Konzentrationen in nachfolgenden Studien, nachgewiesen werden, so dass das Risiko einer Keimbahntransmission äußerst gering bis nicht vorhanden zu sein scheint (Arruda *et al.*, 2001a)

1.5.3 Klinische Hämophilie B-Studien

Nachdem verschiedene virale und nicht virale Vektorsysteme, Transduktionsarten (*ex vivo*, *in vivo*) und Verabreichungsrouten (intramuskulär, intravenös, intrahepatisch) ausführlich in präklinischen Versuchen mit unterschiedlichen Tierarten (Maus, Ratte, Kaninchen, Hund, nichthumane Primaten) untersucht wurden, sind in den vergangenen Jahren die ersten klinischen Studien durchgeführt und bisher insgesamt knapp 40 Patienten behandelt worden.

Für alle Studien wurden die Teilnehmer sehr sorgfältig ausgewählt. Besonders wurde darauf geachtet, dass sie keine Tendenz zur Bildung inhibitorischer Antikörper aufwiesen. Vorrangiges Ziel der meisten dieser klinischen Studien war die Sicherheit des eingesetzten Gentransfersystems in Bezug auf Vektortoxizität, Immunreaktionen und Keimbahntransmission zu untersuchen. Die Verbesserung des klinischen Bildes mit oder ohne messbare Faktor-Aktivitätssteigerung war ein weiteres Ziel. Tabelle 4 fasst alle wichtigen Daten über diese abgeschlossenen Studien zusammen.

Bei einigen Patienten konnte in den verschiedenen Studien ein leichter Anstieg der Konzentration zirkulierender Faktoren im Blut nachgewiesen werden, die teilweise auch zu einer verminderten Blutungstendenz führten bzw. den Faktorenkonzentratverbrauch senkten. In den meisten Fällen war jedoch keine klare Dosis-Antwort zu beobachten; ebenso machte das Fehlen von Placebo-Kontrollgruppen die Interpretation der Ergebnisse schwierig. Während die Verabreichung von adenoviralen Vektoren zu leichten Nebenwirkungen wie leichtem Fieber, Schüttelfrost, Kopf-, Rücken- und Gliederschmerzen sowie erhöhten Transaminasewerten führte (White 2003; Vandendriesche *et al.*, 2003), belegte die Muskel-Genttransfer-Studie mit einem Vektor auf AAV-Basis erstmals die Sicherheit parenteral injizierter rAAV und zeigte, dass die allgemeinen Charakteristika der AAV-Muskeltransduktion im Menschen den in Tierversuchen ermittelten sehr ähneln. Die AAV-Leber-Studie führte allerdings zum transienten Auftreten von Vektorsequenzen in der Samenflüssigkeit.

Die Ergebnisse zeigen, dass in weiteren präklinischen Studien die Effizienz und teilweise auch die Sicherheit weiterentwickelter Vektoren untersucht werden muss. Parallel dazu sind klinische Studien mit den erfolgversprechendsten Vektoren am Menschen unumgänglich, da nicht alle Erkenntnisse aus Tierversuchen auf den Menschen übertragbar sind.

Zur Zeit wird eine Studie von der Arbeitsgruppe um Manno durchgeführt, bei der bisher ein Patient einen AAV-Vektor lebergerichtet verabreicht bekommen hat. Während

| durchgeführt von | Jahr | Vektor | Trans-gen | Prom. | Pat. | Maximale FIX-Aktivität; klinische Effekte | Dauer der Expression | Verabreichungs-methode | Ref. |
|-------------------------------------------------------|------|-------------|------------|--------------|------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------|------------|
| Chin. Studie (Fudan Univ. Shanghai, VR China) | 1991 | Retro | hFIX | CMV | 2 | FIX-Aktivität stieg von 2 % auf 4 %; reduzierte Blutungsneigung | 420d | ex vivo-Transduktion in autologe Fibroblasten | (1,2) |
| Transkaryotic Therapies, Cambridge, MA, USA | 1998 | Plasmid-DNA | hBDD-FVIII | Fibro-nectin | 6 | bis 4 %; reduzierter Konzentratverbrauch | bis zu 18 Monate | ex-vivo-Elektroporation autologer Fibroblasten | (3) |
| Chiron Corp. Emeryville, CA, USA | 1999 | Retro | hBDD-FVIII | LTR | 13 | 1-1,8 %; Einzelwerte: 2,3-6,2 %; 6 Pat. mit reduzierter Blutungsneigung | 1 Jahr | Infusion in periphere Vene | (4) |
| Avigen, Alameda, CA, USA | 1999 | AAV | hFIX | CMV | 8 | bis 1,6 %; reduzierter Konzentratverbrauch in 2 Pat. | transient | i.m. | (5,6) |
| GeneStar Therapeutics Corporation, San Diego, CA, USA | 2000 | HC-Ad | hFVIII | Albumin | 1 | 1 % (kurzfristig 3 %) | mehrere Monate | i.v., periphere Vene | (7, 8) |
| Avigen, Alameda, CA, USA | 2001 | AAV | hFIX | hAAT/ apoE | 7 | 2-12 % | 8 Wochen | i.v., Pfortader | (9,10, 11) |

Tab. 4: Übersicht über abgeschlossene klinische Studien an Hämophilie A- und B-Patienten. Abkürzungen: AAV: Adenoassoziertes Virus; apoE: Apolipoprotein-Enhancer; CMV: Cytomegalivirus; haat: humanes alpha-1-antitrypsin gene; hBDD-FVIII: humaner B-Domänen deletierter Faktor VIII; HC-Ad; *High Capacity* adenoviraler Vektor; i.m.; intramuskulär; i.v.; intravenös; LTR: *long terminal repeat*; Pat.: Patientenanzahl; Prom.: Promotor; Ref.: Referenz. (1) Qiu *et al.*, 1996; (2) Hsueh, 1992; (3) Roth *et al.*, 2001; (4) Kelley *et al.*, 2002; (5) Kay *et al.*, 2000; (6) Manno *et al.*, 2003; (7) White, 2001; (8) Kelley *et al.*, 2002; (9) Arruda *et al.*, 2002; (10) ausführlicher Übersichtsartikel: High. 2004a.b; (11) Manno *et al.*. 2006:

des ersten Monats erreichte dieser Patient 10 % FIX-Aktivität. Eine andere Studie ist von Nathwani *et al.* geplant und sollte im Laufe des Jahres 2007 beginnen. Hier sollte erstmals ein selbstkomplementärer AAV-Vektor (scAAV, siehe Kapitel 1.4.2) eingesetzt werden (Nathwani, persönliche Mitteilung).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Als Alternative zur Substitutionstherapie bei der Hämophilie B wird seit vielen Jahren an der gentherapeutischen Behandlung dieser Krankheit geforscht. In den vergangenen Jahren wurden in zahlreichen Studien sowohl im Kleintiermodell Maus, als auch im Großtiermodell Hund relativ hohe, teilweise sogar superphysiologische humane FIX (hFIX)-Werte erreicht. Zu hohe FIX-Level, können im Menschen jedoch Thrombosen auslösen (van Hylckama Vlieg *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wird es in naher Zukunft wichtig sein, einen regulierbaren, hFIX exprimierenden Vektor zu entwickeln, um die Transgenexpression gegebenenfalls drosseln zu können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war somit die Entwicklung eines regulierbaren Gen-expressionssystems für den humanen Faktor IX auf Basis von Adenoassoziierten Viren der Serotypen 2 und 6 und deren Untersuchung auf Funktionsfähigkeit. Die Regulierbarkeit der Expression des therapeutischen Gens hFIX sollte mit Hilfe des Tet Off-Systems ermöglicht werden. Um später eine Kotransduktion von Zellen zu vermeiden, war beabsichtigt beide benötigten Expressionskassetten in einen einzigen Vektor zu integrieren. Die erste Expressionskassette sollte das Gen für das regulatorische tTA-Protein unter der Kontrolle eines leberspezifischen Promotor/Enhancer-Komplexes (haat-apoE 4x) enthalten (Regulator-Element). Der Promotor sollte später sicherstellen, dass eine Expression nur in den Zielzellen erfolgen würde, um potentielle Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten. Die zweite Expressionskassette sollte als *response*-Element das hFIX-Gen mit dem TRE-Promotor enthalten, von dem aus die Expression therapeutischen Gens stattfinden würde.

Nach der Klonierung des Vektors galt es, diesen in HEK293T-Zellen herzustellen und hinterher aus diesen aufzureinigen und zu konzentrieren. Anschließend war vorgesehen, die Leberspezifität des Vektors sowie die Regulierbarkeit der Transgenexpression *in vitro* in HEK293 und HepG2-Zellen zu untersuchen.

Im nächsten Schritt sollte die Verwendbarkeit der Vektoren in verschiedenen Mausstämmen präklinisch ausgetestet werden. Hierzu war an Hand der Literatur eine

Methode zu etablieren, mit der die rekombinanten Viren in größeren Mengen hergestellt und präpariert werden könnten. Nach Anreichern der rAAV sollten sowohl immunkompetente (C57BL/6), als auch immundefiziente Mäuse (SCID) die rekombinanten Viren intravenös verabreicht bekommen. Die Effektivität der Vektoren sollte dabei durch Messung der FIX-Aktivität im Mäuseblut, das retroorbital gewonnen werden sollte, erfolgen. Da rAAV-Vektoren – je nach Serotyp – verzögert mit der Expression der Transgene (des tTA-Gens und des therapeutischen hFIX-Gens) beginnen, war zudem vorgesehen einen sinnvollen Zeitpunkt für den Beginn der Blutabnahmen zu finden.

Letztlich sollte die Effizienz der Vektoren noch molekulargenetisch untersucht werden. Hierbei sollte ermittelt werden welche Organe transduziert würden, ob eine unerwünschte Streuung des Vektors stattfände und in wieweit eine Transskription der beiden Transgene (Regulatorgen und therapeutisches Gen) nachzuweisen wäre.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Alle in der nachfolgenden Liste nicht aufgeführten Chemikalien stammten von Appli Chem (Darmstadt), KMF (Lohmar), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen).

| | |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Applied Biosystems (Weiterstadt) | BigDye Terminator, Template suppression reagent |
| BD Biosciences Clontech (Heidelberg) | Doxycyclin |
| Bio-Rad (München) | Precision protein standard (10-250 kDa); 30 % Acrylamid/Bis-Lösung 37,5:1 |
| Biozym (Hess. Oldendorf) | Agarose |
| C.C.Pro (Neustadt) | Fötale Kälberserum |
| Dade Behring (Marburg) | Humanes FIX-defizientes Plasma; aPTT-Reagenz; Lyophilisiertes humanes Standardplasma; Owren's Veronal-Puffer |
| Delta Select (Dreieich) | Isotonische NaCl-Lösung für Injektionszwecke |
| Difco (Lawrence, Kansas USA) | Bacto Yeast Extract (Hefeextrakt); Bacto Tryptone |
| Eurogentec (Seraing, Belgien) | TransPEI |
| Fluka (Neu Ulm) | Chloroform:Isoamylalkohol (24;1); SDS; Tris-Base; Glycin; Formaldehyd; Chloroform; |
| Fresenius (Bad Homburg) | OptiPrep (60 % Iodixanol: 5,5[(2-hydroxy-1-3-propandiyol)-bis(acetylamino)]bis[N,N'-bis(2,3dihydroxypropyl-2,4,5-triiodo-1,3-benzencarboxamid)]) |
| Invitrogen (Leek, Niederlande) | DMEM, RPMI, Dulbecco's PBS; steriles H ₂ O für die Zellkultur; EDTA-Trypsin; Trizol; EDTA; Ethanol; Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1); DNA-Polymerase; Platinum Taq Methanol; Isopropanol; Glycerol; Natrium-Chlorid; Natrium-Azetat; Natrium-Citrat; PBS-Tabletten; Superscript III (reverse Transkriptase) |
| KMF (Lohmar) | Ethanol; Methanol; Isopropanol |

| | |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Macherey-Nagel (Düren) | NucleoSpin Extract |
| Merck (Darmstadt) | Coomassi Brilliant Blue; β -Merkaptoethanol; Chloroform; Ethidiumbromid; Ethanol; Methanol; Isopropanol; Glycerol |
| New England Biolabs (Schwalbach, Taunus) | Restriktionsenzyme; CIP (calf intestinal alkaline phosphatase) |
| Peqlab (Erlangen) | Pwo DNA-Polymerase |
| Qiagen (Hilden) | DNeasy Tissue-, RNeasy Tissue-, DyeEx 2.0 Spin-, QIAquick Gel-Extraktion-, QIAEXII Gel Extraction-, QIAprep Spin Mini-, Midi-, Maxi- und EndoFree Mega-Plasmid-, qPCR-Kit; Omniscript Reverse Transcriptase; Proteinase K; T4 DNA-Ligase |
| Roche Biochemicals (Basel) | dNTPs (10 mM); Expand Long Template PCR-Kit; Proteinase K; DNA molecular weight markers; T4 DNA-Ligase; Restriktionsenzyme |
| Roche Diagnostics (Mannheim) | Lipofectamine |
| Sartorius (Göttingen) | Vivaspin 20 (100.000 MWCO) |
| Sigma (Taufkirchen) | Agarose Typ VII low gelling temperature; Vitamin K1; Heparinagarose Typ I; Temed; DMSO; LB broth und Agar; DEPC |
| Stago (Asnières, Frankreich) | Asserachrom IX:Ag ELISA-Kit |
| PAA (Pasching, Österreich) | Fötale Kälberserum; DMEM; Dulbecco's PBS; Trypsin-EDTA; Penicillin-Streptomycin-Lösung |

2.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

| | |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) | Photometer Gene Quant II |
| Applied Biosystems (Weiterstadt) | GeneAmp PCR System 9700 |
| Beckman Coulter (Unterschleissheim) | Zentrifuge Optima L-70K; Optiseal Polyallomer Centrifuge Tubes; Spacer 361670 |
| Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ USA) | Spritzen (5, 10, 20 ml); Kanülen (18G, 23G); Micro Fine+ U40 Insulinspritzen 29G |

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Biometra (Göttingen) | Wasserbad; UV-Tisch; Gelelektrophoresekammern Agagel Maxi, -Mini; Taumel-Wipp-Tisch |
| Bio-Rad (München) | Gel Doc 1000 |
| Biozym (Hess. Oldendorf) | Spitzen (1,5, 10, 100, 1000 ml) |
| Brand (Wertheim) | Pasteurpipetten |
| BBraun (Melsungen) | 50 ml Perfusor-Spritzen; Perfusor Secura; Einwegskalpelle |
| Colora Messtechnik (Lorch) | Magnetrührer Magnetomix MI |
| Corning Inc. (Corning, NY USA) | Zellkulturschaber |
| Eppendorf (Hamburg) | Zentrifugen: 5414, 5415C; Pipetten: research 2,5, 10, 100, 1000; Mastercycler gradient; Wasserbad Thermostat 2761; Thermomixer Comfort; Reaktionsgefäße SafeLock (0,5, 1,5, 2 ml) |
| Greiner (Frickenhausen) | Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser); Pipetten (5, 10 und 25 ml); Polystyrol- und Polycarbonat-Reaktionsgefäße (14 und 50 ml Volumen) |
| Julabo (Seelbach) | Wasserbad SW21 |
| Millipore (Eschborn) | Centricon 30; Spritzenaufsatzfilter (0,45 und 5 µm) |
| Nunc (Wiesbaden) | Zellkulturschalen (15 cm Durchmesser), 6-well Schalen |
| Heidolph (Schwalbach, Taunus) | Heiz-Magnetrührer MR 2002 und 3001 |
| Heraeus (Hanau) | Multifuge 3 S-R; Brutschränke Function Line; Sterilbänke Hera Safe und HLB2448 GS; Inkubator |
| Hirschmann Laborgeräte (Herrenberg) | Pipettierhilfe Pipetus |
| Jahnke & Kunkel IKA (Staufen) | Heiz-Magnetrührer Combimag; Vortexer VF2 |
| Kendro (Langenselbold) | Minifuge II |
| Knick (Berlin) | Präzisions pH-Meter |
| Labomedic (Bonn) | Sterilfilter 0,2 µm |
| Memmert (Schwalbach, Taunus) | Wasserbad |
| Mettler (Giessen) | Feinwaage |
| New Brunswick (Edison, | Incubator Stator G25 |

| | |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| New Jersey, USA) | |
| Pechiney Plastic Packaging (Menasha, WI, USA) | Parafilm |
| Pierce (Bonn) | Slide-A-Lyzer Dialysis Kit |
| Sarstedt (Nümbrecht) | Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser); Pipetten (5, 10 und 25 ml), Polystyrol- und Polycarbonat-Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2, 14 und 50 ml); Spitzen (1,5, 10, 100, 1000 ml) |
| Sartorius (Göttingen) | Waage 1265 MP |
| Sigma (Taufkirchen) | Zentrifuge 3K30 |
| Tecan (Crailsheim) | SLT-ELISA-Washer |
| Sorvall (Bad Homburg) | Zentrifuge RC-5B |
| Thermo Electron (Ober- schleissheim) | Varioklav Dampfsterilisator |
| Zeiss (Oberkochen) | Mikroskop HBO50 |

2.3. Zelllinien und Kulturmedien

| Zelllinie | Kulturmedium | Zellen bezogen von |
|-----------|-----------------------|----------------------------|
| HEK293 / | DMEM (1 oder 4,5 g/ml | H. Fechner, AG W. Poller |
| HEK293T | Glukose) | (Freie Universität Berlin) |
| HepG2 | RPMI 1640 | DSMZ (Braunschweig) |

Tab. 5: Für diese Arbeit verwendete Zelllinien und Kulturmedien. Die Kulturmedien stammten von Invitrogen (Leek, Niederlande) oder PAA (Pasching, Österreich) und enthielten alle L-Glutamin.

2.4. Plasmide

| Name | Für diese Arbeit wichtige Eigenschaft/Funktion | Herkunft |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| pAd5-TRE2-FIX | verwendet zur Zwischenklonierung; Quelle des TRE-CMVmin-Promotors, des hFIX, der bGHpoly(A)-Sequenz | M. Srouf, AG R. Schwaab (Universität Bonn) |
| pCI-neo | Quelle der SV40poly(A)-Sequenz | Promega (Madison WI, USA) |
| pDG | AAV2 <i>rep</i> und <i>cap</i> Gene, adenovirale Helferfunktionen E2A, E4 und VA | J. Kleinschmidt (DKFZ, Heidelberg) |
| pDP6 | AAV6 <i>rep</i> und <i>cap</i> Gene, adenovirale Helferfunktionen E2A, E4 und VA | J. Kleinschmidt (DKFZ, Heidelberg) |
| pEGFPc1 | Transfektionskontrolle | Clontech (Heidelberg) |
| pTet-Off | Quelle des tTA-Gens | Clontech (Heidelberg) |
| pTR-UF5 | AAV 3' + 5' ITR | S. Weger, AG Heilbronn (Freie Universität Berlin) |
| pUC19-apoE(4x) | Quelle des apoE(4x)-Enhancer | |
| pZS2-haat-rtTAM2 | Quelle des haat-Promotors; verwendet zur Zwischenklonierung | M. Srouf, AG R. Schwaab (Universität Bonn) |

Tab. 6: Für diese Arbeit verwendete Plasmide und deren Eigenschaften

2.5. Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind Derivate des *E. coli* K12-Stammes: XL10-Gold, DH5 α , XL2 Blue MRF' und SURE2 stammten von der Firma Stratagene (Heidelberg), Top10 OneShot von Invitrogen (Leek, Niederlande).

2.6. Nährmedien

| | |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LB-Medium | 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l dH ₂ O |
| LB-Amp-Medium/ LB-Kan-Medium | 250 µg Ampicillin bzw. Kanamycin / ml LB-Medium |
| LB-Agar | 1 l LB-Medium 15 g Agar 30 min bei 123° C autoklavieren |
| LB-Amp-Agar/ LB-Kan-Agar | pro ml LB-Agar nach Abkühlung 250 µg Ampicillin bzw. Kanamycin in dH ₂ O gelöst zugeben |

2.7. Mausstämme

Es wurden Fox Chase SCID Mäuse verwendet (CiB-17/lcrCrl-scid-BR). Dieser Stamm weist eine autosomal rezessiv vererbte Mutation (scid) auf, welche eine schwere kombinierte Immundefizienz (severe combined immuno deficiency – SCID) auslöst, die B- und T-Lymphozyten betrifft. Es handelt sich um Albinos und Inzuchttiere. Die Tiere stammten von Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA.

Des Weiteren wurde die Eigenzucht von C57BL/6J-Mäusen des HET (Haus für Experimentelle Therapie), Universitätsklinikum Bonn, verwendet.

Bei allen Tieren handelte es sich um 8 - 9 Wochen alte Weibchen.

2.8. Puffer und Lösungen

| | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2x HBS | 50 mM HEPES 10 mM KCl 12 mM Glucose 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,05 (sehr genau, frisch einstellen!), sterilfiltrieren |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

| | |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DEPC-H ₂ O (RNase-freies Wasser) | 0,1 % Diethylpyrocarbonat, 4 h bei 37° C inkubieren, 45 min bei 120° C autoklavieren |
| DNA-Gel Ladepuffer | 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 30 % (w/v) Glukose in dH ₂ O |
| DNA-Gel Ladepuffer (Kristallviolett-Puffer) | 245 µM Kristallviolett (Hexamethyl-(6x-pararosanilin-HCl) 100 µM EDTA 30 % Glycerin |
| Iodixanol 15 % | 1 Vol. Optiprep 2,2 Vol. PBS-MK 0,8 Vol. 5 M NaCl |
| Iodixanol 25 % | 2,5 Vol. Optiprep 3,5 Vol. PBS-MK 100 µl Phenolrot |
| Iodixanol 40 % | 2 Vol. Optiprep 1 Vol. PBS-MK |
| Iodixanol 54 % | 9 Vol. Optiprep 1 Vol. PBS-MK 80 µl Phenolrot |
| NaCl/HEPES-Lsg. | 50 mM HEPES 0,5 M NaCl 25 mM EDTA, pH 8,0 sterilfiltrieren |
| PBS-MK | 1 mM MgCl ₂ 137 mM NaC 2,5 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,5 |
| PBS-MK-NaCl | PBS-MK 1 M NaCl |
| PEG/NaCl-Puffer | 24 % PEG (Polyethylenglycol) 1,86 M NaCl |
| Säulenaufbewahrungspuffer | 0,5 M NaCl 0,02 % Thimerosal |
| Säulenwaschpuffer | 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 2,4 mM NaCl |

| | |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SDS-PAGE- Ladepuffer (2x) | 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 50 % Glycerin 20 % SDS 0,5 % Bromphenolblau vor Nutzung 50 µl β-Mercaptoethanol pro 950 µl Puffer zusetzen |
| SDS-PAGE- Laufpuffer (10x) | 250 mM Tris-Base (pH 8,3) 1,92 M Glycin 1 % SDS |
| TAE-Puffer (50x) | 2 M Tris-Base (pH 8,0) 1 M Eisessig 0,05 M EDTA (pH 8,0) |
| TBS (10x) | 200 mM Tris-Base, pH 7,6 1,379 M NaCl |
| TE-Puffer | 10 mM Tris (pH 8,0) 1 mM EDTA |
| Tris-HCl | 10 mM Tris, pH8 2,4 M NaCl |

2.9. Primer und Sonden

Alle Primer und Sonden sind in Tabelle 3 in 5'-3'-Richtung aufgeführt, enthaltene Restriktionsschnittstellen sind grau unterlegt. „s“ und „a“ am Ende des Primernamens geben die Orientierung des Oligonukleotids an, wobei „s“ für *sense* steht und den Primer benennt, von dem aus der kodierende Strang synthetisiert wird und „a“ für *antisense* steht und den Primer bezeichnet, von dem aus der nicht kodierende Strang synthetisiert wird. Die Primer wurden lyophilisiert von Operon (Köln) oder Invitrogen (Leek, Niederlande) bezogen.

Tab. 7: Auflistung aller Primer und deren Verwendungszweck. Abkürzungen:

AAV: Adenoassoziiertes Virus; apoE: Apolipoprotein-Enhancer; bGHp(A): bovine growth hormone poly(A)-Sequenz; haat: humanes Alpha-1-Antitrypsingen; hFIX: humanes Faktor IX-Gen; ITR: *inverted terminal repeat*; LD-PCR: *long distance polymerase chain reaction*; mGAPDH: Maus-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; Seq.: Sequenzierung; SV40: Simian Virus 40; tTA: *tetracycline-responsive transcriptional activator*; TRE: *Tetracyclin response element*; Wdh.: Wiederholung

| Name | Sequenz | verwendet für |
|---------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3' bGH-BglIII.a | ATA ATA <u>GAT CTA</u> CCC CAG CTG G | Amplifikation von haat-apoE(4x)-bGHp(A) |
| AD3424BglIII | CCT CTA <u>GAT CTT</u> TTG TGT TAC TCA TAG CGC G | Seq. von TRE und hFIX |
| bGH112.s | TGC ATC GCA TTG TCT GAG TAG | Seq. von bGHp(A) bis zum hairpin des 3' ITR |
| bGH123.a | ACA ATG CGA TGC AAT TTC CTC | Seq. von bGHp(A) bis tTA |
| CMV479.a | GCT CTG CTT ATA TAG GCC TC | Seq. von TRE bis zum hairpin im 5' ITR |
| CMV480s | AGG TCT ATA TAA GCA GAG CT | Seq. von Übergang TRE/hFIX; Vektornachweis in Lebergewebe |
| FIX1.s | ATG CAG CGC GTG AAC ATG AT | Seq. von hFIX |
| FIX1110.a | TAC TGA AGA ACT AAA GCT GA | Seq. von hFIX |
| FIX2162.s | GGT ATC CCG GTA TGT CAA CTG | Seq. von hFIX bis haat |
| FIX2220XbaI.a | TAG <u>ACT CTA GAA</u> GCT CTT TCA TTA AGT GAG C | Seq. von hFIX |
| FIX4.a | CAT GAT CAT GTT CAC GCG CTG | Seq. von Übergang TRE/hFIX |
| FIX410.s | GCT GAT AAC AAG GTG GTT TGC T | Seq. von hFIX |
| FIX653.a | GAT TGG GTG CTT TGA GTG AT | Seq. von hFIX; Vektornachweis in Lebergewebe; hFIX-cDNA-Amplifikation (mRNA-Nachweis) |
| FIX-FAM-Probe | [6~FAM]TGA GGG ATA TCG ACT TGC AGA AAA CC [TAMRA~6~ FAM] | Sonde zur rAAV-Quantifizierung (real time PCR) |
| FIX-FW | AAC AAG GTG GTT TGC TCC TGT A | Vektorquantifizierung mit Sonde (sense-Primer); hFIX-cDNA-Amplifikation (mRNA-Nachweis) |
| FIX-reverse | CAC TGC TGG TTC ACA GGA CTT C | Vektorquantifizierung mit Sonde (antisense-Primer) |
| haat185.s | CAG TGG AAG CTG TAC ACT GC | Seq. von haat bis apoE(4x) (2.Wdh.) |
| haat289.s | GGT GAC CTT GGT TAA TAT TCA CCA G | Seq. haat + Übergang zu apoE(4x) |
| haat56EcoRI.a | GCG <u>GAA TTC</u> ACT TAC GAT TCA CTG TCC CAG G | Seq. von haat + Übergang zu hFIX |
| haat-PacI-BglIIKO.s | GGT ATT AAT TAA TGG TGG ATC TTG CTA CCA GTG | Seq. von haat bis apoE(4x) (1.Wdh.) |
| haat-BglIII-KO.s2 | CTA GCT TAA TTA ATG GTG GAT CTT GCT ACC AGT GGA ACA G | für Schnittstellenänderung (BglIII PacI) |
| hFIX489s | TTG CAG AAA ACC AGA AGT CC | Virusquantifizierung mittels Sybr-Green; Bestimmung der Vektor-genomkopien/diploidem Genom |

| | | |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| hFIX579a | TCA GCA CGG GTG AGC TTA G | Virusquantifizierung mittels Sybr-Green Bestimmung der Vektor-genomkopien/diploidem Genom |
| mGAPDH682.s | CAA GGC TGT GGG CAA GGT CAT | mGAPDH cDNA-Amplifikation |
| mGAPDH826.s | CAC CAC CTT CTT GAT GTC ATC A | mGAPDH cDNA-Amplifikation |
| mPBGD1207.a | GAA CGG GAG AAG GCG TGT AA | Standardfragmentgenerierung aus Houskeeping-Gen PBGD |
| mPBGD410.2 | GGC TTT CTG GGT GCA ATG AT | Bestimmung der diploidem Genome/Probe genomischer DNA |
| mPBGD497.s | TGC AGT GGA CTT GAG CGA AG | Standardfragmentgenerierung aus Houskeeping-Gen PBGD |
| mPBGD597.a | CGG ACC ACC TTT CCA CTC AC | Bestimmung der diploidem Genome/Probe genomischer DNA |
| NheI-PacI-haat.s | ATA <u>TGC TAG C</u> <u>TT AAT TAA</u> TGG TAG ATC TTG C | Amplifikation von haat-apoE(4x)-bGHp(A) |
| NheI-SV40.s | CCA <u>TGC TAG CAG</u> ACA TGA TAA GAT AC | Amplifikation von SV40p(A); Seq. SV40p(A) + haat |
| PacI-SV40.a | GCG CTT AAT TAA TAC CAC ATT TGT AGA GG | Amplifikation von SV40p(A) |
| pTetOff1791.a | ATA <u>GTA AGC TTC</u> TAC CCA CCG TAC TCG | Amplifikation + Seq.von tTA, generiert HindIII-Schnittstelle |
| pTetOff-tTA.s | GCG CAG <u>CAA GCT TCA</u> TAT GTC AAG ATT AG | Amplifikation von tTA; Seq. von tTA |
| pTRE2Ad5-3408.a | TGT TCA TGG CAG CCA GCA TAT GGC ATA TGT TGC | LD-PCR der Expressionskassette zur Umklonierung zwischen die AAV-ITRs; für Schnittstellenänderung (BglII PacI) |
| pTRUF5-6190.s | CAT TCA GGC TAC GCA ACT G | Teilseq des 5`ITRs in pTR UF5 |
| tTA1165.s | TAT ATG CAC TCA GCG CTG TG | Seq. von tTA |
| tTA1700.s | CTA CGG CGC TCT GGA TAT GGC C | Seq. von tTA bis hairpin im 3`ITR |
| pAAV-tTA183.s | TTT GTG TTA CTC ATA GCG CGT AA | Vektornachweis in Lebergewebe |
| pAAV-tTA541.a | CCA CCG TAC ACG CCT ACC T | Vektornachweis in Lebergewebe |
| tTA824.s | TAA TGA GGT CGG AAT CGA AG | Seq. von tTA bis bGHp(A); tTA-cDNA-Amplifikation (mRNA-Nachweis) |
| tTA900.a | AAT ACA ATG TAG GCT GCT CTA CAC C | Seq. tTA nach apoE.4x (2. - 4. Wdh.) |
| tTARev.a | GCC AGC TTT CCC CTT CTA AA | tTA-cDNA-Amplifikation (mRNA-Nachweis) |
| XhoI-BglII-pTRE2-Ad5-294.s | TCG GCA <u>CTC GAG</u> <u>CAG ATC TCT</u> GAA TAA GAG GAA | LD-PCR der Expressionskassette zur Umklonierung zwischen die AAV-ITRs |

2.10. Molekularbiologische Methoden

2.10.1. Nukleinsäuren-Isolierung

Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus den *E. coli*-Stämmen, DH5 α (Invitrogen), XL2 Blue MRF', Sure2, XL10-Gold (alle Stratagene) isoliert. Die Bakterienkulturen wurden dazu bei 37° C auf dem Rüttler bei ca. 300 rpm in LB-Medium 10 - 18 Stunden inkubiert. Zur Selektion wurde, je nach Resistenzgen im Plasmid, Ampicillin oder Kanamycin (je 50 μ g/ml) eingesetzt. Für die Verwendung der Plasmide für Sequenzierungen, Klonierungen und Plasmidanalysen mittels PCR, wurden die QIAprep Spin Miniprep oder Midiprep kits (Qiagen) verwendet. Für Transfektionen wurden die Plasmide mittels QIAGEN Plasmid Maxi Kit und für Transfektionen zur Viruspräparation mittels EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen) isoliert. Die Aufreinigung erfolgte nach Anleitung des Kit-Herstellers.

Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus Lebern, Nieren, Milzen, Lungen, Herzen und Muskeln von Mäusen mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit (Qiagen) isoliert. Die Mäuse wurden mit CO₂ getötet, die Organe entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20° C gelagert. Bis zu 25 mg (10 mg bei Milz) der Organe wurden pulverisiert und nach Anleitung des Kitherstellers aufgearbeitet.

Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Agarosegel-Elektrophorese wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und entweder nach Herstelleranweisung mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit oder dem QIAquick Gel Extraction Kit (beide Qiagen) oder mittels einer Phenolextraktion aufgereinigt (s.u.).

Virus-DNA-Extraktion

Nach dem Verdau der Viruspartikel wurde Virus-DNA für PCRs wie folgt extrahiert: zur Lösung verdauter Viruspartikel wurden SDS (0,5 %), EDTA (10 mM) sowie Pro-

teinase K (50 µg/ml) zugegeben und anschließend 60 min bei 37° C inkubiert. Die Proben wurden auf Eis mit 0,25 Vol 5 M NaCl versetzt und vorsichtig durch invertieren vermischt. Anschließend folgte die DNA-Extraktion mittels Na-Azetat:

Phenolextraktion und DNA-Fällung mittels Na-Azetat

DNA-Proben wurden mit Phenol/Chloroform behandelt, um die Salzkonzentration zu reduzieren und Proteinverunreinigungen zu beseitigen. Die DNA wurde in 200 µl ddH₂O suspendiert und mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Zentrifugation bei ~800 x g für 5 min bei RT extrahiert. Die DNA in der wässrigen, oberen Phase wurde abgenommen und durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na⁺-Azetat (pH 4,8) und 2 Volumen eiskaltem Ethanol in 30 min bei -80°C präzipitiert. Anschließend wurde 20 min bei ~12.000 x g zentrifugiert und das DNA-Pellet 2 x mit 1 ml 70 % kaltem Ethanol (4° C) (Zentrifugation bei ~12.000 x g, 4° C für 5 min) gewaschen, im Vakuum getrocknet und in TE-Puffer oder ddH₂O (pH 8,0) bei 4° C (2 h) gelöst.

Isolierung von RNA

Die RNA-Isolierung erfolgte aus Gewebeproben, die direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren worden waren. Etwa 50 mg wurden in Alufolie gewickelt, mit einem Hammer zertrümmert und anschließend mit Hilfe eines Pistills (Qiagen) und Akku-Schraubendrehers im 1,5 ml-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Kits von Qiagen oder wie folgt: 50 mg pulverisiertes Gewebe wurde in 1 ml Trizol durch wiederholtes auf- und abpipettieren und fünfminütige Inkubation bei RT lysiert. 0,2 Volumen Chloroform wurden zugeben, 15 sec kräftig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde 15 min bei 4° C und 12.000 x g zentrifugiert und anschließend aus der oberen wässrigen Phase die RNA mit 0,1 Volumen Isopropanol durch 15- minütige Inkubation auf Eis und anschließende Zentrifugation für 15 min bei 4° C und 12.000 x g präzipitiert. Das RNA-Pellet wurde mit 75 % eiskaltem Ethanol gewaschen (0,8 ml pro erwartete 50 - 100 µg RNA), 8 min bei 4° C und 7500 x g abzentrifugiert, kurz im Vakuum getrocknet, in 30 - 100 µl DEPC-H₂O gelöst und 10 min bei 60° C inkubiert, um das Lösen des Pellets zu unterstützen (Chomczynski & Sacchi, 1987).

2.10.2. DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-/RNA-Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA- bzw. RNA-Proben wurden 1:40 in H₂O oder TE-Puffer bzw. RNase-freiem (DEPC-) H₂O verdünnt und anschließend die Extinktion in einer Quarzküvette im Photometer gegen H₂O bzw. TE-Puffer als Referenz gemessen. Eine Absorptionseinheit (OD von 1,0) entspricht 50 µg doppelsträngiger DNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml.

2.10.3. Agarosegel-Elektrophorese

Das Verfahren der Agarosegel-Elektrophorese (Meyers *et al.*, 1976) wurde verwendet um (i) mit Restriktionsenzymen geschnittene Plasmid-DNA aufzutrennen und deren Fragmentgröße zu kontrollieren, (ii) PCR-Produkte auf ihre Reinheit und Größe zu überprüfen und (iii) einzelne Plasmidfragmente zu isolieren. Die DNA-Fragmente wurden in 1 %-Agarosegelen aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung unter UV-Licht (λ 302 nm) wurde dem Agarosegel Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt (Sambrook *et al.*, 1989). Kristallviolett (0,8 µg/ml, Invitrogen) wurde anstelle von Ethidiumbromid verwendet, wenn DNA-Fragmente bei Tageslicht sichtbar sein sollten (um UV-Schäden zu vermeiden). Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 1/10 Volumenanteil Ladepuffer vermischt. Die Elektrophorese fand in 1x TAE-Puffer bei 100-140 V statt. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen wurde der Molekulargewichtsstandard X (0,07-12,2 kb, Roche) verwendet. Das DNA-Bandenmuster wurde unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert.

2.10.4. PCR, LD-PCR, qPCR, one step-rtPCR

(LD-) PCR

Zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurde Platinum Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen) oder Pwo-Poylmerase (PeqLab) mit Fehlerkorrekturfunktion (*proof reading*) verwendet (zur Herstellung von für Klonierungen benötigten DNA-Fragmenten).

Die Amplifikation der Expressionskassette (über 4 kb) zur Klonierung zwischen die AAV-ITRs erfolgte mit einer *long distance*-PCR (LD-PCR). Dazu wurde eine Mischung aus der Fehlerkorrektur-Polymerase Pfu und der Taq-DNA-Polymerase

(Clontech, Stratagene) verwendet. Pfu und Pwo haben eine 12- bzw. 10-fach höhere Genauigkeit als Taq. Im Folgenden sind typische PCR-Reaktionen aufgezeigt:

| | Taq | Pwo | LD (Pfu+Taq) |
|--------------------------------------|--------|--------|--------------|
| 10x-Puffer (ohne Mg ²⁺) | 1x | 1x | 1x |
| MgCl ₂ , 50 mM | 1,5 mM | --- | 2,25 mM |
| MgSO ₄ , 25 mM | --- | 4 mM | --- |
| dNTPs, 10 mM | 200 µM | 400 µM | 500 µM |
| <i>sense</i> Primer, 100 µM | 1 µM | 1 µM | 0,33 µM |
| <i>antisense</i> Primer, 100 µM | 1 µM | 1 µM | 0,33 µM |
| Polymerase | 1 U | 1 U | 2,5 U |
| DNA-Template | 250 ng | 100 ng | 10-40 ng |
| mit ddH ₂ O auffüllen auf | 50 µl | 50 µl | 50 µl |

Für die Taq- und Pwo-Reaktionen wurden nach einem ersten, vierminütigen Denaturierungsschritt bei 94° C 35 Zyklen im Thermalcycler durchgeführt, von denen jeder aus einer Denaturierung bei 94° C für 30 sec bei Taq und 15 sec bei Pwo bestand. Das *annealing* (Anlagerung der Primer) wurde unabhängig von der verwendeten Polymerase bei 54-64° C (abhängig von der Schmelztemperatur der Primer: *annealing*-Temperatur sollte ca. 5° C unter der Schmelztemperatur liegen) für 30 sec durchgeführt. Die Elongation erfolgte bei 72° C. Die Dauer dieses Schrittes war abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments: 1 min/kb (mit einer Zunahme der Elongationszeit von 20 sec/Zyklus während der letzten 20 Zyklen bei Pwo). Nach Abschluss der Zyklen wurde ein letzter Elongationsschritt bei 72° C für 7 min durchgeführt. Für die LD-PCR wurde ebenfalls ein erster Denaturierungsschritt für 2 min bei 94° C mit anschließenden 30 Zyklen durchgeführt. Diese bestanden aus der Denaturierung für 10 sec bei 94° C, dem *annealing* für 30 sec bei 60-62° C (mit einer Abnahme der Temperatur von 0,2° C/Zyklus) und der Elongation bei 68° C (1 min/kb), mit einer Zunahme der Elongationszeit von 20 sec/Zyklus bei den letzten 20 Zyklen. Eine abschließende Elongation fand für 7 min bei 68° C statt.

Durchgeführt wurden die Reaktionen mit dem GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer) oder dem Mastercycler Gradient (Eppendorf).

Die theoretische Schmelztemperatur (Td) der Primer wurde wie folgt berechnet:

$$Td \text{ in } ^\circ\text{C} = 4 \times (\text{Anzahl der G- und C-Basen}) + 2 \times (\text{Anzahl der A- und T-Basen}).$$

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde (i) direkt mit dem NucleoSpin Kit aufgereinigt (ii) eine Natriumazetat-Fällung (Kapitel 2.10.1) durchgeführt oder (iii) eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt (Kapitel 2.10.3).

Quantitative PCR

Die Konzentration von rAAV in einer Viruspräparation sowie die Menge von rAAV-DNA in den Mäuseorganen wurde mit Hilfe der quantitativen *real time*-PCR (qPCR) und einem ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) ermittelt. Genaueres hierzu findet sich im Kapitel 2.13.12 unter „Quantifizierung der rekombinanten Viren“.

one step RT-PCR

Zum Nachweis der Transkription der Transgen-DNA wurde eine *one step* RT-PCR durchgeführt, bei der in einem Schritt die mRNA in cDNA umgeschrieben und direkt im Anschluss eine PCR durchgeführt wird. Es wurde die reverse Transkriptase Superscript III mit dem dazugehörigen Puffer von Invitrogen verwendet. Ein RT-PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

| | |
|------------------------------------------------------|--------|
| MgCl ₂ | 1,5 mM |
| dNTPs (10 mM) | 800 µM |
| Platinum Taq | 1,25 U |
| 10 x Puffer | 1 x |
| <i>Sense</i> Primer | 0,4 µM |
| <i>antisense</i> Primer | 0,4 µM |
| reverse Transkriptase (Superscript III, 200 U/µl) | 10 U |
| mRNA-Probe | 2 µl |
| mit DEPC-dH ₂ O auffüllen auf | 25 µl |

Nachdem bei 55° C für 20 min die reverse Transkription durchgeführt worden war, folgten die üblichen PCR-Schritte: 5 min Denaturierung bei 95° C zu Beginn, gefolgt von 40 Zyklen, bestehend aus: 30 sec Denaturierung bei 94° C, 40 sec *annealing* bei 54° C und 30 sec Elongation bei 72° C. Im Anschluss an den letzten Zyklus fand eine abschließende Elongation ebenfalls bei 72° C für 7 min statt.

2.10.5. Reverse Transkription

Um die RNA-Proben nicht zu häufig auftauen zu müssen, wurde mit Hilfe des Omniscript Reverse Transcription Kit von Qiagen cDNA hergestellt (DNA ist wesentlich stabiler als RNA), mit der anschließend verschiedene PCRs durchgeführt werden konnten. Als Primer wurden zufällige Hexamerprimer von Invitrogen eingesetzt.

Die RNA wurde 5 min bei 65° C denaturiert und anschließend der Reaktionsansatz auf Eis zusammen pipettiert:

| | |
|------------------------------------------|-------------|
| 10x Puffer RT | 1 x |
| dNTP (5 mM/dNTP) | 0,5 mM/dNTP |
| Random Hexamer Primer (100 µM) | 10 µM |
| RNase Inhibitor (10 U/µl) | 10 U |
| Omniscript RT | 4 U |
| RNA-Probe | 2 µg |
| auffüllen mit DEPC-dH ₂ O auf | 20 µl |

Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die reverse Transkription wurde bei 37° C und einer Dauer von 60 min durchgeführt.

Bei der folgenden PCR (mit Taq-Polymerase) wurden 2 µl dieses Reaktionsansatzes als Template und je 2 µM Primer eingesetzt.

2.10.6. Positionsspezifische Mutagenese

Mit der positionsspezifischen Mutagenese wurden einzelne Basenpaare gezielt ausgetauscht, um unerwünschte Restriktionsschnittstellen zu entfernen, bzw. neue zu erzeugen. Hierzu wurde das QuickChange XL Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Herstelleranweisung verwendet. Kurz zusammengefasst wurden zwei komplementäre *sense*- und *antisense*-Primer verwendet, die ein oder zwei veränderte Nukleotide enthielten. Mit diesen Primern wurde das gewünschte Plasmidfragment in einer LD-PCR amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt (das komplette Plasmid) mit DpnI-Endonuklease inkubiert. Diese Nuklease erkennt spezifisch die methylierte (Ausgangs-) DNA und schneidet diese. Nicht geschnitten wird jedoch die neusynthetisierte, die Mutation enthaltende DNA, da diese nicht methyliert

ist. Zwei Mikroliter dieser DpnI-verdauten DNA wurden nun zur Transformation kompetenter *E. coli* (XL 10 Gold, Stratagene) eingesetzt, um das Plasmid zu vervielfältigen.

2.10.7. Enzymatische DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden mit den entsprechenden Puffern der jeweiligen Hersteller verwendet (New England Biolabs, Roche). Doppelrestriktionen wurden, wenn möglich, gleichzeitig in kompatiblen Puffern, andernfalls nacheinander durchgeführt. Für analytische Restriktionen wurden etwa 0,1 - 2 µg DNA mit je 2 U des Restriktionsenzym versetzt (u. U. mit Zugabe von BSA nach Herstellerangabe) und für 1 – 2 h bzw. ü. N. in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei der jeweils optimalen Temperatur (37° C bzw 25° C) inkubiert. 1 Einheit (1 U) entspricht der Menge Restriktionsenzym, die in 1 h 1 µg Lambda-DNA bei der jeweils angegebenen optimalen Temperatur schneidet.

Bei präparativen Restriktionen für Klonierungen wurden die zu verdauende DNA-Menge und die Volumina der anderen Substanzen entsprechend erhöht. Die gewonnenen DNA-Fragmente wurden anschließend über Agarosegel-Elektrophorese (s. Kapitel 2.10.3) mit nachfolgender Extraktion (s. Kapitel 2.10.1) oder mittels Phenol/Chloroform (s. Kapitel 2.10.1) aufgereinigt.

2.10.8. Ligation

Die Verknüpfung von DNA-Enden bei Klonierungen erfolgte mit T4 DNA-Ligase aus verschiedenen Kits unterschiedlicher Hersteller nach deren Anleitung (Rapid DNA-Ligation, Roche; DNA-Ligation Kit, Stratagene; T4 DNA-Ligase, Invitrogen). Linearisiertes Plasmid und einzuklonierendes DNA-Fragment (Insert) wurden im molaren Verhältnis 1:3 eingesetzt.

Vor der Ligation wurden komplementäre, kohesive Enden des linearisierten Plasmids mit 0,5 U Phosphatase (CIP - calf intestinal alkaline phosphatase, New England Biolabs) / µg DNA für 1 h bei 37° C dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern. Anschließend wurde eine Phenolextraktion der DNA durchgeführt (siehe Kapitel 2.10.4).

Wenn DNA-Fragmente (Inserts) mit nicht komplementären Restriktionsschnittstellen in ein Plasmid kloniert werden sollten, mussten die 5'-Überhänge aufgefüllt werden,

um glatte Enden zu erhalten. Das Auffüllen erfolgte mit Hilfe des Klenow-Fragmentes (Large Fragment of DNA Polymerase I, Invitrogen) nach Herstelleranleitung.

2.10.9. Transformation

Kompetente *E. coli*-Bakterien wurden mittels Hitzeschock mit 20 – 50 ng Ligationsprodukt oder 100 - 200 ng Plasmid-DNA nach Anleitung der Vertreiber der Stämme transformiert. Transformierte Zellen wurden in LB-Medium für 1 h bei 37° C schüttelnd (225 rpm) inkubiert. Anschließend wurde eine Probe, bestehend aus 50–200 µl der Bakterienkultur, auf LB-Agar-Platten ausplattiert, die das Antibiotikum enthielten, für welches das Plasmid eine Resistenz vermittelte (Ampicillin bzw. Kanamycin). Nach der Inkubation der Platten bei 37° C für 8 – 24 h wurden Klone gepickt, in LB-Medium mit dem entsprechenden Medium ü. N. bei 37° C unter schütteln inkubiert und anschließend eine Plasmidpräparation durchgeführt. Bestätigte die Analyse der Plasmide mittels PCR oder Sequenzierung die korrekte Sequenz des gewünschten Plasmids, wurden Stocklösungen bei -80° C gelagert. Dazu wurden 800 µl einer sich in exponentiellen Wachstum befindlichen Bakterienkultur mit 200 µl Glycerin (87 %) vermischt und eingefroren.

Agarplatten, auf denen Klone kultiviert wurden, die mit AAV-ITR enthaltenden Plasmiden transformiert worden waren, wurden bei 32° C inkubiert. Da die ITR-Sequenzen palindrome Strukturen sind, kann es bei Transformationen zu Deletionen oder Rekombinationen kommen. Die niedrigere Temperatur senkt die Rekombinationsfreudigkeit der Plasmide (Schnepf & Clark, 2003). Trotzdem ist es wichtig, nach der Transformation die Intaktheit der ITR-Sequenzen der Plasmid-DNA des Bakterienstocks durch Restriktionskontrollen sicherzustellen (Kapitel 2.10.7).

2.10.10. DNA-Sequenzierung

DNA wurde vor und/oder nach Klonierungsschritten sequenziert, um die Richtigkeit der Nukleotidabfolge sicherzustellen und um Plasmide zu analysieren. Dafür wurde eine zyklische Sequenzierreaktion gestartet, für die DNA-Template (100 - 200 ng bei PCR-Produkten, 200 - 500 ng bei Plasmid-DNA) mit 20 pmol *sense*- oder *antisense*-Primer, 2 µl Big Dye Terminator (enthält fluoreszenzmarkierte ddNTPs, dNTPs, AmpliTaq DNA-Polymerase FS und Taq-Puffer; Applied Biosystems) und ddH₂O auf

10 µl Gesamtvolumen gebracht wurde. Die Reaktion wurde im Mastercycler Gradient (Eppendorf) durchgeführt und sah wie folgt aus: eine initiale Denaturierung bei 95° C für 2 min, gefolgt von 25 Zyklen bestehend aus 10 sec Denaturierung bei 95° C, 5 sec *annealing* bei 50-55° C und 4 min Elongation bei 60° C.

Die Produkte der zyklischen Sequenzierreaktion wurden nach Herstelleranweisung mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) oder wie folgt aufgereinigt: sie wurden mit 90 µl ddH₂O, 250 µl Ethanol (100%) und 10 µl 3 M Na⁺-Azetat (pH 4,6) vermischt und durch Zentrifugation für 15 min bei ~12.000 x g präzipitiert. Das Pellet wurde einmal mit 400 µl 70 %-Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 20 µl Template Supression Reagent (TSR, Applied Biosystems) resuspendiert. Anschließend wurde die DNA in TSR für 2 min bei 90° C denaturiert, auf Eis gekühlt und mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) sequenziert.

2.11. Proteinbiochemische Methoden

2.11.1. FIX-Antigen-ELISA

Die hFIX-Antigen-Konzentration im Zellkulturmedium bzw. Mausplasma wurde unverdünnt oder verdünnt mit dem Asserachrom IX:Ag-Kit (Diagnostica Stago, Asnières, Frankreich) nach Herstelleranleitung bestimmt. Dieses Kit bestimmt spezifisch humane FIX-Antigene, da die verwendeten Antikörper nicht mit Maus-FIX interagieren. Die Extinktion wurde gemessen und anschließend die Konzentration wie folgt berechnet (wobei die Werte der Extinktionen 1 und 2 und Konzentrationen 1 und 2 der Eichkurve entnommen wurden – Wert 1 ist jeweils der nächst höhere, Wert 2 der nächst niedrigere Wert der Eichkurve im Vergleich zum Wert der Probe deren Konzentration berechnet werden soll):

$$(1) \text{ Steigung: } (m) = (\text{Extinktion 1} - \text{Extinktion 2}) / \text{Konzentration 1} - \text{Konzentration 2}$$

$$(2) \quad \text{Achsenabschnitt (b)} = \text{Extinktion 1} - m \times \text{Konzentration 1}$$

$$(3) \quad \text{Konzentration} = (\text{Extinktion} - b) / m$$

Die in % Antigenkonzentration ausgegebenen Resultate wurden in pg sezerniertes hFIX/Zelle/ml Medium umgerechnet (100 % entsprechen 5 µg/ml).

2.11.2. FIX-Aktivitätstest

Zur FIX-Aktivitätsbestimmung wurde das Plasma der Mäuse je nach Menge des Ausgangsmaterials unverdünnt eingesetzt oder mit Owren's Veronal-Puffer (Dade Behring), einem Barbitalpuffer pH 7,35, verdünnt. 50 µl (verdünntes) Mausplasma wurden mit 50 µl humanem FIX-defizientem Plasma (Dade Behring) und 50 µl aPPT-Reagenz vermischt. Nach 3 min Inkubation bei 37° C wurden 50 µl 25 mM CaCl₂ hinzugegeben und die Zeit bis zur Bildung eines Gerinnsels gemessen. Als Referenz wurde lyophilisiertes humanes Standardplasma (Dade Behring) verwendet. Ergebnisse wurden in % angegeben, wobei 100 % 1 IU (*international unit*)/ml entsprechen. Da dieser Test nicht zwischen humaner und Maus-FIX-Aktivität unterscheiden kann, wurde mit Kontrollmäusen die basale Maus-FIX-Aktivität bestimmt. In mit hFIX enthaltenden Vektoren behandelten Mäusen wurde die Gesamtaktivität von Maus- und humaner FIX-Aktivität gemessen, um die Steigerung im Vergleich zum basalen Level zu ermitteln.

2.11.3. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (SDS-Poyacrylamidgel-Elektrophorese) wurde nach dem Protokoll von Laemmli (1970) in 10 %-Gelen durchgeführt. 17,5 µl der Viruseluatfraktionen wurden 4 min bei 95° C in 17,5 µl 2 x Probenpuffer denaturiert und auf Eis abgekühlt. Das Gel lief in 1 x SDS-Gel-Laufpuffer bei ca. 100 V für ca. 10 min und anschließend bei ca. 150 V für 1–1,5 h. Ein Protein-Molekulargewichtsmarker (10 – 250 KDa, Bio-rad) lief parallel mit den Proben, um die Größe der sich in den Proben befindenden Proteine ermitteln zu können.

2.11.4. Färbung von SDS-Gelen

Die Gele wurden anschließend unterschiedlich gefärbt: (i) mit SYPRO Orange Stain (Bio-Rad) nach Herstelleranleitung, (ii) mittels einer Silberfärbung (ProteoSilver Silver Stain Kit, Sigma) ebenfalls nach Herstelleranleitung, oder (iii) mit einer Coomassie-Färbelösung (Kapitel 2.8). Für Letzteres wurde das Gel 5 min in eine Schale mit

Färbelösung gegeben, die dann zweimal kurz im Mikrowellengerät aufgeköcht wurde. Zum Entfärben wurde das Gel in Entfärbelösung gegeben und 1 - 3 h auf dem Taumel-Wipp-Tisch geschüttelt, bis es klar oder die Banden gut sichtbar waren.

2.12. Zellkultur

2.12.1. Auftauen, Kultivierung und Lagerung von Zelllinien

Zum Auftauen wurde das Zellen enthaltende Kryogefäß aus dem Stickstofftank sofort in 37° C warmes Wasser gegeben. Direkt nach dem völligen Auftauen wurden die Zellen vorsichtig in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10 ml Zellkulturmedium mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin-G und 100 µg/ml Streptomycin versehen. Nach 10 min Zentrifugation bei 4° C und 100 x g wurden die Zellen in 10 ml frischem Medium (+ FCS, + P/S) resuspendiert und in eine Zellkulturschale (Nunc, Greiner, Sarstedt) überführt. Nach einer Inkubation ü. N bei 37° C und 5 % CO₂ wurde das Medium gewechselt. Alle 3 - 4 Tage, wenn die Zellen konfluent waren, wurden sie vereinzelt indem sie mit Dulbecco`s-PBS (Invitrogen, PAA) gewaschen, mit Trypsin-EDTA (Invitrogen, PAA) gelöst und in gewünschter Verdünnung (1:10 bis 1:30) in neuen Zellkulturschalen ausgesäht wurden.

Zur Lagerung wurden Zellen in antibiotikafreiem Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff aufbewahrt (Freshney, 2000).

Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt.

2.12.2. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (Invitrogen, PAA) gelöst. Anschließend wurde Medium zugegeben, so dass die Zellen in 1 ml Medium/Trypsin-EDTA-Lösung vorlagen. 100 µl dieser Lösung wurden mit 100 µl Dulbecco`s-PBS und 100 µl Trypan-Blue versetzt. Von diesem Ansatz wurde ein Tropfen unter Standardbedingungen in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und 4 Quadrate ausgezählt. Mit folgender Formel wurde die Anzahl der Zellen berechnet:

$$\text{gezählte Zellen/Anzahl ausgezählter Quadrate} \times \text{Verdünnung} \times 10000 = \text{Zellzahl.}$$

2.12.3. Transduktion von Zellen mit rAAV

Die Zellen wurden in 6 well-Platten (2 cm Durchmesser/Vertiefung) ausgesät, so dass sie bei Versuchsbeginn eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht hatten. Unmittelbar vor der Transduktion wurden die Zellen eines wells zur Zellzahlbestimmung verwendet. Die zu transduzierenden Zellen wurden mit Dulbecco's-PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml OptiMem (Invitrogen)/Vertiefung mit 1×10^4 vg/Zelle hinzugefügt. Die Zellen wurden 4 h im Brutschrank inkubiert und dann das Medium gewechselt. HepG2-Zellen wurden mit RPMI-Medium und HEK293-Zellen mit DMEM high Glucose, jeweils ohne Antibiotika, aber mit 10 % FCS und mit 10 µg/ml Vitamin K (Sigma) versetzt. Da die transduzierten Zellen hFIX exprimieren sollten, war die Zugabe von Vitamin K unerlässlich. Vitamin K ist wichtig für die γ -Carboxylierung und somit die Funktionalität des Proteins.

2.13. Viruspräparation

2.13.1. Verpackungszellen

Zur Produktion von rAAV wurden HEK293T-Zellen verwendet. Es handelt sich hierbei um eine modifizierte HEK293-Zelllinie (humane embryonale Nierenzellen), die das SV40 T-Antigen stabil exprimieren, wodurch die Effizienz der Transgen-Expression erhöht wird. Wie HEK293-Zellen exprimieren sie außerdem die adenoviralen Gene E1A und E1B.

Die Zellen wurden so in Zellkulturschalen mit 15 cm Durchmesser oder Flaschen mit 185 cm² Grundfläche in Standardmedium kultiviert, dass sie am Tag der Transfektion 30-60 % Konfluenz erreicht hatten.

2.13.2. Transfektion

Die Transfektion wurde mit der Calciumphosphat-Methode (Okayama & Chen, 1991) durchgeführt. Pro 15 cm-Kulturschalen wurden 42,2 µg Verpackungsplasmid und 15,1 µg rAAV-Plasmid in einem Polystyrol-Falcon mit 2 ml 0,25 M CaCl₂ vermischt und unter leichtem Schütteln tropfenweise 2 ml 2x HBS, pH 7.05 hinzugegeben und sofort gut untergemischt. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT inkubiert. Sobald nach 10 bis 45 min eine deutliche Trübung, die eine Präzipitatbildung anzeigt, sicht-

bar war, wurde die Lösung tropfenweise vorsichtig auf die Zellen geträufelt. Dabei wurde die Zellkulturschale ständig leicht geschwenkt, um eine schnelle Verteilung des Präzipitats zu gewährleisten und pH-Schwankungen möglichst gering zu halten. Anschließend wurden die Zellen ü. N. im Brutschrank inkubiert und je nach Zustand der Zellen das Medium am nächsten Tag gewechselt oder beibehalten. Als Transfektionskontrolle wurde jeweils eine Zellkulturschale mit 48 µg pEGFPc1 transfiziert und anhand der grün leuchtenden Zellen die Transfektionsrate abgeschätzt.

2.13.3. Ernte der rAAV-produzierenden Zellen

48 - 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen im Kulturmedium durch Abschaben gelöst, resuspendiert und 10 min bei ~1300 x g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde für eine separate rAAV-Fällung abgenommen (siehe Kapitel 2.13.4) und die Zellpellets von je zweieinhalb 15 cm-Zellkulturschalen in 10 ml Dulbecco's-PBS resuspendiert. Die Vereinigung mehrerer Zellpellets, Zentrifugation und Resuspension in frischem PBS wurde wiederholt (der PBS-Überstand jeweils verworfen), bis die Zellen von 20 Kulturschalen in 10 ml resuspendiert waren.

2.13.4. Virusfällung aus Zellkulturüberstand

4 ml CaCl₂ (2,5 M) wurden mit 200 ml rAAV-haltigen Zellkulturüberstand gut vermischt, 1 h auf Eis inkubiert und 30 min bei 4° C und ~1700 x g zentrifugiert. 300 ml virushaltiger Überstand wurde mit 100 ml 24 % PEG/NaCl (1,86 M) vermischt und ü. N. im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde die PEG/NaCl-Virus-Suspension 30 min bei 4° C und 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jedes Pellet einer 50 ml Suspension in 500 µl NaCl/HEPES-Lösung resuspendiert. Die gelösten Pellets wurden anschließend gepoolt und 15 min bei 4° C 10.000 x g abzentrifugiert. Der virushaltige Überstand wurde bei -80° C bis zur Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation gelagert.

2.13.5. Zellaufschluß zur Virusfreisetzung

10 ml Zellsuspension (s. Kapitel 2.13.3) wurden mit 500 µl 10 % Na-Doc (Natrium-Deoxycholatsäure) und 20 µl (500 U) Benzonase (Merck, Reinheitsgrad II) versetzt und 1 h bei 37° C im Wasserbad unter mehrmaligem Aufschütteln inkubiert. Durch

dreimaliges Einfrieren (-80°C , 30 min) und Auftauen (37°C im Wasserbad, 15 min) wurden die Zellen lysiert. Na-Doc zerstört die Zellkerne und sorgt damit für die Freisetzung der Viruspartikel, während Benzoyl-DNAse (ein DNase-RNase-Gemisch) unverpackte Virus-DNA abbaut. Anschließend wurde 30 min bei $\sim 3500 \times g$ zentrifugiert, der Überstand in neue Röhrchen überführt und erneut 20 min bei $\sim 3500 \times g$ zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mindestens zweimal wiederholt, bis nahezu kein Pellet mehr sichtbar war. Der virushaltige, zelltrümmerarme Überstand wurde bis zur Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation bei -20°C gelagert.

2.13.6. Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

OptiSeal-Röhrchen (Beckman) mit 32,5 ml Fassungsvermögen wurden jeweils mit 11 ml virushaltigem Na-Doc-Lysat beladen. Mittels steriler Kanülen wurden Iodixanol-Lösungen in den Konzentrationen 15 %, 25 %, 40 % und 54 %, mit der niedrigsten Konzentration beginnend und der jeweils nächst höheren folgend, untergeschichtet. Die 25 und 54 %-Lösungen waren vorher jeweils mit Phenolrot gefärbt worden.

Die Röhrchen wurden mit 1 x PBS-MK bis zum Rand aufgefüllt, austariert, mit Stopfen und Spacer möglichst luftblasenfrei verschlossen und im 70-TI-Rotor zweieinhalb Stunden bei 18°C und $296\,000 \times g$ in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Zentrifuge wurde anschließend ohne Bremse auslaufen gelassen, um die Banden unterschiedlicher Dichten nicht zu zerstören. Die (fast) farblose Virusbande zwischen der 54 %- und der 25 %-Iodixanol-Schicht (bis zu 4 ml, s. Kapitel 3.2.1., Abb. 16) wurde mit einer 18G-Kanüle abgezogen und bei -20°C bis zur Aufkonzentrierung der rekombinanten Viren aufgehoben.

2.13.7. Konzentration der Viren I – Heparinagarosesäule

Bei den ersten Viruspräparationen wurden die Virus-Iodixanol-Lösungen auf eine Heparinagarosesäule gegeben und mit Puffern gewaschen und eluiert, um die Viren nicht nur aufzukonzentrieren, sondern auch von unerwünschten Proteinen zu befreien.

Dazu wurde eine Säule (Econo-Column, Bio-Rad) mit 8 ml Heparinagarose (Heparin Typ I, Sigma H-6508) beladen und mit 50 ml PBS-MK equilibriert. Die Iodixanol-Virus-Lösung wurde auf Eis aufgetaut und bei Bedarf – wenn sie zu dickflüssig war – bis 1:20 verdünnt. Anschließend wurde die Säule mit der Viruslösung beladen. Dabei

wurde der Durchfluss aufgefangen und ein zweites Mal auf die Säule gegeben, um eine möglichst hohe Bindungsrate der Viren an der Säulenmatrix zu erreichen. Daraufhin wurde die Säule mit dem 10-fachen Volumen einer PBS-MK-Lösung gewaschen und die Viruspartikel mit 10 ml PBS-MK-NaCl eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufgehoben. Die Säule wurde anschließend mit 50 ml Säulenwaschpuffer gewaschen. Für eine längere Säulenlebensdauer (bis zu 10 l Viruslösung) zusätzlich mit 40 ml 0,5 M NaOH gespült und anschließend in 20 % Ethanol oder Säulenaufbewahrungspuffer bei 4°C aufbewahrt.

Mittels SDS-PAGE und Coomassie-, Sypro-Orange- und/oder Silberfärbung wurden die Eluat-Fractionen mit den höchsten Viruskonzentrationen ermittelt und anschließend die Fractionen gepoolt, welche am meisten Viruspartikel enthielten. Dieser Virus-Pool wurde anschließend wie in Kapitel 2.13.9 beschrieben dialysiert und die Viruspartikel quantifiziert (s. Kapitel 2.13.12.).

2.13.8. Dialyse des Viruskonzentrats

Das Viruskonzentrat wurde nun, wenn nötig, mit PBS-MK auf 3 ml verlängert und mittels Dialyserähmchen (Slide-A-Lyzer 0,5-3 ml, Pierce) gegen PBS-MK dialysiert: 2 x ca. 2 h bei RT und 1 x ü. N. bei 4°C in jeweils 800 ml PBS-MK. Das dialysierte Viruskonzentrat wurde danach nochmals mit einem $0,45\ \mu\text{m}$ PVDF-Filter filtriert und in einem (neuen) Vivaspin-Röhrchen auf ca. 500 μl eingeeengt. Möglicherweise an der Membran haftende Viruspartikel wurden abgewaschen und mit dem Konzentrat gepoolt. Anschließend wurden Aliquots zur Quantifizierung und für die SDS-PAGE entnommen (2,5 und 17,5 μl) und der Rest mit 5 % Glycerol bei -80°C gelagert.

2.13.9. Konzentration der Viren II – Ultrafiltration

Da Iodixanol sehr viskos ist, wurde die Virus-Iodixanol-Lösung mindestens 1:10 (wenn nötig bis zu 1:40) mit PBS-MK verdünnt, über PVDF-Filter ($5\ \mu\text{m}$ und $0,45\ \mu\text{m}$ Porengröße) filtriert und anschließend mittels Vivaspin 20-Röhrchen (100.000 MWCO) (Sartorius) durch Zentrifugation bei 18°C und $3000 \times g$ auf ca. 200 μl aufkonzentriert. Diese 200 μl -Überstände aus den Vivaspin-Reservoirs wurden gepoolt. Zusätzlich wurden die an den Vivaspin-Filtermembranen haftenden Viruspartikel mit

300 µl PBS-MK abgespült und zu dem Viruskonzentrat geben. Dieses Viruskonzentrat wurde dann dialysiert.

2.13.10. Herstellung eines Standards für die rAAV-Quantifizierung

Der Standard zur Quantifizierung der Viren mittels qPCR wurde aus Vektorplasmid-DNA hergestellt und bestand aus rAAV-Genomäquivalenten.

Das Plasmid wurde durch Restriktion mit EcoRI fragmentiert und ein 2068 bp großes, das FIX-Gen enthaltendes DNA-Fragment nach Agarosegel-Elektrophorese aus dem Gel extrahiert (Qiagen-Extraction-Kit). Daraus wurde ein Plasmid-DNA-Fragment Stock mit 10^{10} Kopien/ml hergestellt. Dafür wurde die Kopienzahl im Eluat mit folgender Formel bestimmt:

$$(x \text{ g} / \mu\text{l DNA} / [\text{Plasmidlänge in bp} \times 660]) \times 6,022 \times 10^{23} = y \text{ Moleküle}/\mu\text{l}$$

Anschließend wurde seriell verdünnt, so dass in der quantitative real time-PCR Reaktionsansätze mit $10^2 - 10^7$ Moleküle/Reaktion eingesetzt werden konnten, um eine Standardkurve zu generieren.

2.13.11. Viruspartikelverdau

Die Quantifizierung erfolgte über die Feststellung der Anzahl der DNase-resistenten Viruspartikel mittels quantitativer real time-PCR (qPCR). Dazu wurde der Virusstock seriell in ddH₂O (pH 8,0) verdünnt ($10^{-2} - 10^{-5}$) und anschließend die Viruspartikel verdaut: 100 µl jeder Verdünnung wurden mit 1 µl (10 U) DNaseI für 30 min bei 37° C inkubiert. Als Kontrolle wurden parallel 100 µl jeder Verdünnung 30 min bei 4° C stehengelassen, anstatt mit DNaseI verdaut zu werden. Anschließend wurden 10 µg Proteinase K hinzugefügt und die Proben 60 min bei 50° C inkubiert. Die Proteinase K wurde danach durch 20 minütiges Erhitzen bei 95° C inaktiviert.

2.13.12. Quantifizierung der rekombinanten Viren einer Präparation

Die Konzentration von rAAV in einer Viruspräparation sowie die Menge von rAAV-Genomen in den Mäuseorganen wurde mit Hilfe der quantitativen real-time PCR

(qPCR) mit dem ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) ermittelt. Die qPCR wurde teilweise mit Sybr-Green, teilweise mit Hydrolysierungssonden durchgeführt.

Für die qPCR mit Sybr-Green wurden die Primer hFIX489.s und hFIX579.a (Endkonzentration jeweils 0,4 μM) eingesetzt, bzw. bei Durchführung der qPCR mit der Sonde die Primer pAAV-FIX-tTA1205 und pAAV-FIX-tTA1134 (Endkonzentration 0,4 μM) sowie die Sonde FIX-FAM-Probe (Endkonzentration 0,15 μM) (siehe Kapitel 2.9). Für die Sybr Green – qPCR wurden 12,5 μl QuantiTect Sybr Green PCR Mastermix (Qiagen), für die Quantifizierung mittels Sonde 2x QuantiTect Probe PCR Mastermix (Qiagen) hinzugegeben und mit RNase-freiem ddH₂O auf 21 μl aufgefüllt. Dann wurden jedem Ansatz 4 μl Standard (mit 10^2 - 10^7 Molekülen) bzw. 4 μl Lösung der zu quantifizierenden DNase-resistenten Viruspartikel in den Verdünnungen 10^{-2} – 10^{-5} zugegeben. Als Kontrolle wurden Ansätze mit 4 μl RNase-freiem Wasser mitgeführt (NTC, *no template control*).

Die PCR sah bei Sybr-Green wie folgt aus: nach einer Aktivierung von 15 min bei 95° C folgten 35 Zyklen mit jeweils 15 sec bei 94° C (Denaturierung), 30 sec bei 55° C (*Annealing*) und 30 sec bei 72° C (Extension). Bei der Verwendung einer Sonde folgten nach einer ebenfalls 15 minütigen Aktivierung 40 Zyklen mit jeweils 15 sec bei 94° C (Denaturierung), gefolgt von 60 sec bei 60° C (*Annealing*, Extension).

Das Ergebnis wurde als Kopienzahl/Reaktion ausgegeben und musste in DNase-resistente rAAV-Genome/ml umgerechnet werden. Dazu wurde mit 250 multipliziert, um die eingesetzten 4 μl Probenvolumen auf 1 ml umzurechnen. Dann wurde noch mit dem Verdünnungsfaktor und schließlich mit 2 multipliziert, um zu berücksichtigen, dass die Standard-DNA doppelsträngig, die rAAV-DNA aber einzelsträngig ist.

Jede Probe wurde zumindest in Doppelansätzen untersucht.

2.14. Expressionsversuche (Transduktion)

2.14.1. Zellkulturversuche (*in vitro*)

Die Regulation der Expression von humanem FIX und die Gewebespezifität des haat/apoE4x Promotor-Enhancer-Komplexes wurde in HEK293- und HepG2-Zellen überprüft. HepG2-Zellen sind humane Leberkarzinomzellen (human hepatocellular liver carcinoma cells) und somit sollte in diesen der leberspezifische Promotor (LSP)

aktiv sein. Dieser sorgt für die Expression des Regulatorgens tTA. Das tTA-Protein induziert den TRE-Promotor, so dass es zu einer Expression des hFIX-Gens kommt. Durch Zugabe des Koregulators Doxycyclin kann der Regulator tTA an der Bindung an TRE gehindert werden, womit die hFIX-Expression inaktiviert wird. Im Gegensatz dazu sollten HEK293-Zellen, humane embryonale Nierenzellen, kein hFIX exprimieren. Da in diesen der leberspezifische Promotor - unabhängig von Doxycyclin - inaktiv bleiben sollte, wäre keine tTA-Expression zu erwarten und auch der TRE-Promotor, der die hFIX-Expression vermittelt, dürfte nicht aktiv werden.

Die Transduktion wurde wie in Kapitel 2.12.3 beschrieben durchgeführt.

Je nach Zielsetzung des Versuches wurde den Zellen optional Doxycyclin in der Konzentration 50 ng/ml Medium hinzugefügt. Nach 2, 4 und 6 Tagen Inkubation im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und von dem abgenommenen Medium 250 µl für die Bestimmung der hFIX-Antigenkonzentration im ELISA eingesetzt. Der Rest wurde in Centricons 30 (Millipore) für den FIX-Aktivitätstest aufkonzentriert.

2.14.2. Tierversuche (*in vivo*)

Es wurden 8 - 9 Wochen alte weibliche SCID und C57BL/6J-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden über die Schwanzvene intravenös mit unterschiedlich hohen Dosen rekombinanter AAV (rAAV-FIX-tTA) infiziert. Dazu wurden die Mäuse mit Rotlicht bestrahlt, um durch die Erwärmung eine stärkere Durchblutung der Schwanzvene zu erreichen und die Injektion zu erleichtern. Die Verabreichung der Viren erfolgte mit Hilfe einer Konstruktion, in der die Tiere sich nicht bewegen konnten, so dass der Schwanz gut zugänglich war und kaum von der Maus bewegt werden konnte. Die Vektoren waren in PBS-MK verdünnt. Maximal wurden 250 µl pro Injektion verabreicht. Wenn der Virustiter zu niedrig war, um die gewünschte Dosis mit einer Injektion zu verabreichen, wurden die Tiere zweimal im Abstand von 24 h behandelt. Kontrollmäuse bekamen NaCl oder PBS-MK desselben Volumens.

Um die FIX-Aktivität zu untersuchen und eine mögliche Steigerung nachzuweisen, musste den Tieren Blut abgenommen werden. Dazu wurden die Mäuse narkotisiert (Forene, Abbott, Wirkstoff Isofluran) und Blut retroorbital abgenommen: die Maus wurde so im Nacken gehalten, dass die Augäpfel leicht hervorquollen und eine Glaskapillare (die abgebrochen Spitze einer Pasteurpipette) von etwa 2,5 – 3,5 Länge vorsichtig mit leichten Drehbewegungen an der Innenseite des Auges vorbei geschoben, um die retrobulbären Blutgefäße anzuritzen. Diese Methode hat den

Vorteil, dass die Wunde nach dem Entfernen der Kapillare und Loslassen der Maus durch den Druck des Augapfels sofort verschlossen wird und zu bluten aufhört. Um den Durchfluss des Blutes durch die Kanüle nicht durch die Gerinnung des Blutes zu verhindern, wurde die verwendete Kanüle vorher mit 3,2 % Natrium-Citrat benetzt. Auch in die Reaktionsgefäße wurde vorher 3,2 % Natrium-Citrat vorgelegt und je nach Menge des gewonnenen Blutes zusätzliches Natrium-Citrat zugegeben, so dass direkt nach der Abnahme ein Blut-Natrium-Citrat-Verhältnis von 9:1 vorlag. Die Blutproben wurden schnellstmöglich bei 2000 x g und 4° C 15 min zentrifugiert. Das Plasma wurde in ein anderes Reaktionsgefäß überführt und bei -80° C bis zur weiteren Analyse verwahrt.

2.14.3. Molekulargenetische Untersuchungen im Mausgewebe

C57BL/6-Mäuse wurden 7 Wochen nach der intravenösen Infektion von $3,1 \times 10^{11}$ – 1×10^{12} (n = 5) bzw. nach der Injektion von NaCl (0,9 %) (n = 2) getötet und Leber, Lunge, Herz, Nieren, Milz sowie Muskelgewebe entnommen. Genomische DNA und Gesamt-RNA wurden wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben extrahiert. Die DNA- bzw. RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Nachweis der Vektor-DNA in Organ- und Gewebeproben

Gesamt-DNA aus oben genannten Geweben wurde als Template für PCRs mit den Primern CMV480.s und FIX-2220XbaI.a in eine PCR eingesetzt. Diese Primer amplifizieren spezifisch ein 1,5 kb großes TRE/hFIX-Fragment aus der Vektor-DNA, da der Primer CMV480.s innerhalb des TRE-Bereichs bindet, der vor der hFIX-cDNA lokalisiert ist (*upstream*) und im Säuger genom nicht vorkommt.

Bestimmung der Anzahl der Vektorgenomkopien in Organ- und Gewebeproben

Die Anzahl der AAV-Vektor-Genome in einer Probe genomischer DNA wurde mittels quantitativer real-time PCR (Sybr Green) mit den Primern hFIX489.s und hFIX579.a; wie in Kapitel 2.13.12 beschrieben bestimmt. Um Ergebnisse mit der Einheit Vektorgenom/diploides Genom zu erhalten (d.h. um zu erfahren wie viele Viren durchschnittlich eine Zelle transduzierten) mussten die Vektorgenomzahlen mit Hilfe eines Gens relativiert werden, das nur einmal im Genom vorkommt. Es wurde das PBGD-Gen, von dem es keine Pseudogene gibt, verwendet, um die Anzahl diploider Genome/Probenvolumen zu ermitteln: mit den Primern mPBGD497.s und mPBGD-1207.a

(siehe Kapitel 2.9) wurde ein Fragment amplifiziert, mit dem, entsprechend der in Kapitel 2.13.10 beschriebenen Methode, ein PBGD-Standard hergestellt wurde. Anschließend wurde mit den Primern mPBGD410.s und mPBGD597.a, die innerhalb dieses Fragmentes binden, eine quantitative PCR durchgeführt.

Da die Zellen diploid sind und somit die PBGD-DNA in jeder Zelle doppelt vorkommt, musste der ermittelte Wert vorliegender PBGD-Kopien durch zwei dividiert werden, um die Anzahl Zellen pro Probe zu ermitteln. Weiterhin musste einkalkuliert werden, dass die zelluläre DNA doppelsträngig, das (r)AAV-Genom hingegen einzelsträngig ist. Aus diesem Grund musste der Wert ermittelter rAAV-Kopien pro Probe mit zwei multipliziert werden. Durch Division der Anzahl rAAV-Genome durch die Anzahl Zellen pro Probe konnte schließlich die Anzahl Vektorgenome pro Zelle (= pro diploidem Genom) für die verschiedenen Organ- und Gewebeproben angegeben werden.

Nachweis der Transkription der Transgene hFIX und tTA

Aus Gesamt-RNA-Proben der Leber wurde in einer reversen Transkription (Kapitel 2.10.6) cDNA hergestellt und dann PCR-Reaktionen zum Nachweis der Transkription der Transgene durchgeführt. Es wurden die Primer FIX-FW und FIX-653.a, die ein 182 bp langes Fragment aus der hFIX-cDNA erzeugen, sowie die Primer tTA824.s und tTA-Rev.a, die ein 138 bp langes Fragment aus der tTA-cDNA erzeugen, eingesetzt. Als Vergleich und Positivkontrolle wurde auch auf das Houskeeping-Gen GAPDH getestet. Hierfür wurden die Primer mGAPDH682.s und mGAPDH826.a verwendet, die ein 144 bp langes Fragment aus der GAPDH-cDNA erzeugen.

3. Ergebnisse

Mit verschiedenen Vektorsystemen werden gentherapeutisch bereits hohe hFIX-Expressionslevel in verschiedenen Tiermodellen erreicht. Zu hohe Spiegel können im Menschen jedoch das Thromboserisiko erhöhen. In diesem Zusammenhang sollte ein auf dem Adenoassoziierten Virus basierender Vektor konstruiert werden, bei dem durch die Verwendung des Tet OFF-Systems die hFIX-Transgenexpression mittels Doxycyclin regulierbar ist.

3.1. Herstellung eines rekombinanten Vektorplasmides auf Basis des Adenoassoziierten Virus

3.1.1. Konstruktion des Vektorplasmides

Die Klonierung des rekombinanten Virus war sehr aufwendig und musste genau geplant werden. Da sehr viele Klonierungsschritte nötig waren und mehrere Ausgangs- (s. Appendix) und Zwischenvektoren verwendet werden mussten, war es nicht möglich, mit den vorhandenen Restriktionsschnittstellen alle Klonierungsschritte zu vollziehen, so dass mehrere Schnittstellen zusätzlich eingefügt oder mittels Mutagenese zerstört werden mussten.

Zur Klonierung des Vektorplasmides pAAV-FIX-tTA (Abb. 11) wurden zunächst die vierfache Wiederholung der Enhancersequenz apoE (apoE.4x) aus puc19-apoE.4x durch Schneiden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII gewonnen (Abb. 7). Durch das Öffnen des pZS2-haat-rtTAM2 mit den gleichen Restriktionsenzymen, wurde die zwischen dem haat-Promotor und der bgh.p(A)-Sequenz lokalisierte rtTAM2-Sequenz entfernt und dort apoE.4x hineinligiert, so dass das Plasmid pZS2-haat-apoE.4x-bgh.p(A) entstand (Abb. 7; Ligation 1). Aus diesem wurde mit den Primern NheI-PacI-haat.s und 3' bgh-BglII.a das Fragment haat-apoE.4x-bgh.p(A) amplifiziert, wobei mehrere Schnittstellen generiert wurden: am 5'-Ende eine NheI-, gefolgt von einer PacI- und am 3'-Ende eine BglII-Schnittstelle (Abb. 7; PCR 1).

Das Plasmid pAd5-TRE2-FIX enthält das humane FIX-Gen gefolgt von einer bgh.p(A)-Sequenz (Abb. 7). Letztere musste allerdings entfernt (und später durch eine SV40.p(A)-Sequenz ersetzt) werden, da sonst zwei bgh.p(A)-Sequenzen in dem

Zwischenprodukt vorgelegen hätten, die eine im weiteren Verlauf der Klonierung unumgängliche PCR verhindert hätten. Beim Öffnen dieses Plasmides mit den Restriktionsenzymen NheI und BglII wurde diese bgh.p(A)-Sequenz entfernt und anschließend das geschnittene Plasmid mit dem Fragment haat-apoE.4x-bgh.p(A) ligiert, so dass dieses Fragment hinter der hFIX-Sequenz integriert wurde (Abb. 7; Ligation 2). Das hierbei entstandene Plasmid pAd5-TRE2-FIX-haat-apoE.4x-bgh.p(A) wurde nun durch eine Restriktion zwischen der apoE.4x-Sequenz und der bgh.p(A)-Sequenz mit HindIII linearisiert.

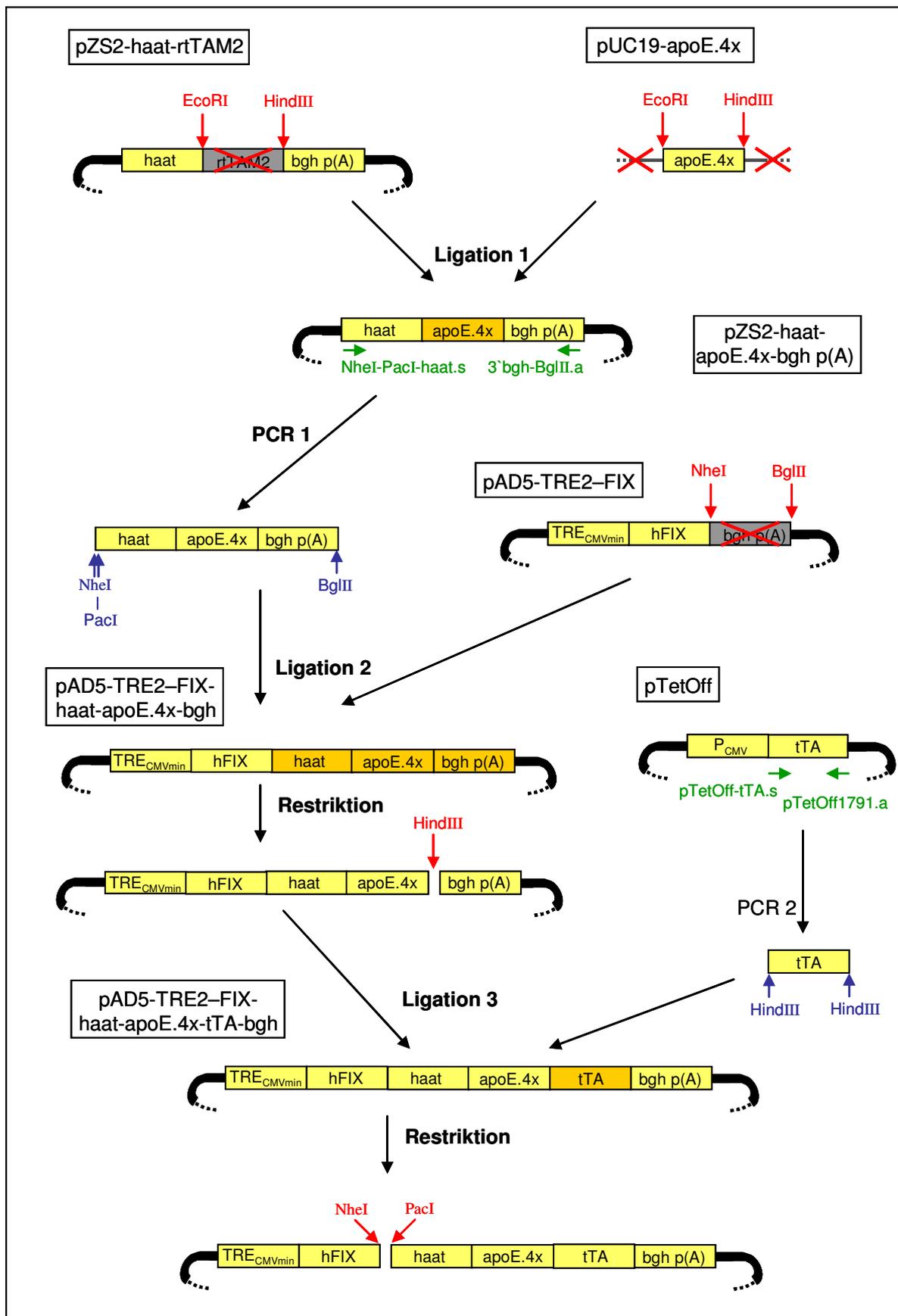
Das für das Tet-kontrollierte Aktivatorprotein kodierende tTA-Gen wurde mittels der HindIII-Schnittstellen generierenden Primer pTet-Off-tTA.s und pTEToff-1791.a aus dem Plasmid pTet-Off herausamplifiziert (Abb. 7; PCR 2) und in das HindIII-linearisierte pAd5-TRE2-FIX-haat-apoE.4x-bgh.p(A) hineinligiert (Abb. 7; Ligation 3).

Im nächsten Schritt wurde das entstandene Plasmid mittels NheI und PacI zwischen dem hFIX-Gen und dem haat-Promotor geschnitten (Abb. 7). In diese Lücke sollte die SV40.p(A)-Sequenz eingebaut werden, um die die vorher entfernte bgh.p(A)-Sequenz zu ersetzen. SV40.p(A) wurde aus dem Plasmid pCI-neo mittels der Primer NheISV40.s und PacISV40.a gewonnen, wobei die Schnittstellen NheI bzw. PacI generiert wurden (Abb. 8; PCR 3). Durch eine Ligation dieses Fragmentes mit dem geöffneten Plasmid (Abb. 8; Ligation 4) entstand das Plasmid pAd5-TRE2-FIX-SV40.p(A)-haat-apoE.4x-tTA-bgh.p(A), welches die gesamte, fast einsatzbereite Expressionskassette enthielt. Diese sollte in BglII-Schnittstellen zwischen die aus dem Adenoassoziierten Virus stammenden ITRs des pTRUF5-Plasmides kloniert werden, um das vollständige Vektorplasmid zu erhalten. Zu diesem Zweck musste zuvor eine BglII-Schnittstelle im haat-Promotor eliminiert werden (Abb. 8). Mit den Primern haat-PacI-BglIIKO.s2 und pTRE-Ad5-3408.a wurde aus pAd5-TRE2-FIX-SV40.p(A)-haat-

Abb. 7: Schematische Darstellung der Vektorplasmidkonstruktion –Teil 1.

Genaue Ausführungen der einzelnen Klonierungsschritte: siehe Text. Plasmide sind durch gebogene, teilweise gestrichelte Enden angedeutet, nur relevante Sequenzen sind als Kästchen (hellgelb unterlegt) dargestellt und benannt. Dunkelgelb unterlegt sind durch Ligationen neu eingefügte oder entstandene Sequenzen. Grau unterlegte Bereiche sind für die Vektor-konstruktion nicht von Bedeutung oder wurden mittels Restriktion entfernt. Mit von oben auf die Sequenzen gerichteten roten Pfeilen wurden die verwendeten Restriktionsschnittstellen markiert; mittels PCR eingefügte Restriktionsschnittstellen sind als von unten auf die PCR-Produkte gerichtete blaue Pfeile dargestellt; die herausgeschnittenen Bereiche sind rot durchgestrichen. Primer sind als grüne Pfeile dargestellt.

Abb. 7: (Fortsetzung)



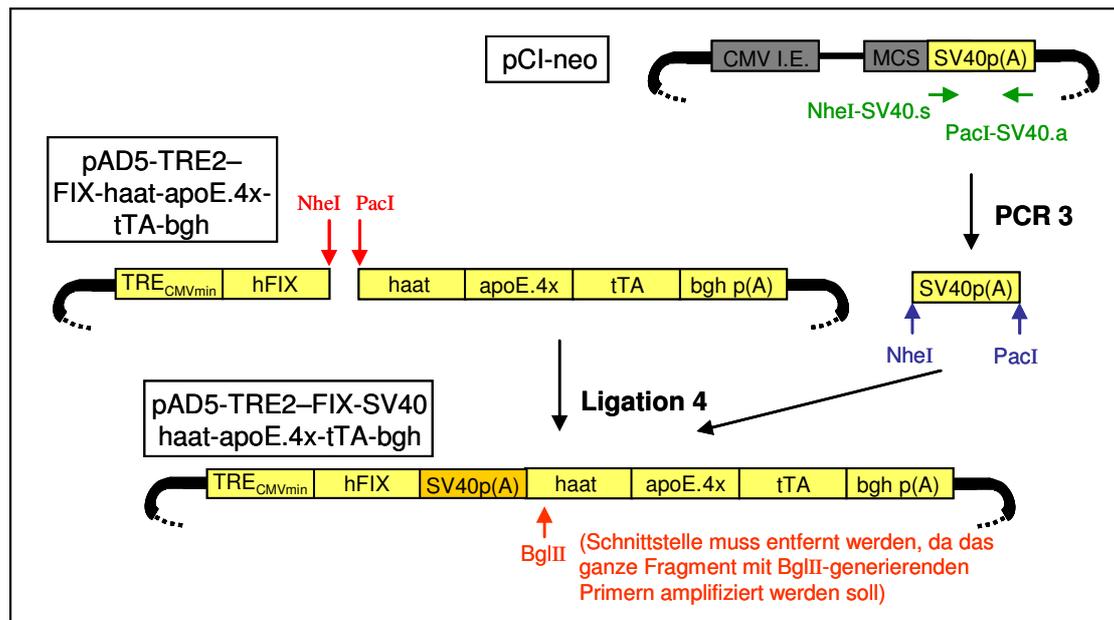


Abb. 8: Schematische Darstellung der Vektorplasmidkonstruktion – Teil 2. Erklärung: siehe Abbildung 7. Zusätzlich ist orange die Position der zu entfernenden BglII-Schnittstelle als von unten auf die Sequenz gerichteter Pfeil markiert.

apoE.4x-tTA-bgh.p(A) ein von haat bis bgh.p(A) reichendes Fragment generiert (Abb. 9, PCR 4). Der *sense*-Primer war so beschaffen, dass die BglII-Schnittstelle durch einen Basenaustausch in eine PacI-Schnittstelle umgewandelt wurde, ohne dass es zum Aminosäureaustausch kam. Außerdem wurde ein Aliquot des gleichen Plasmides [pAd5-TRE2-FIX-SV40.p(A)-haat-apoE.4x-tTA-bgh.p(A)] nochmals als Ausgangsprodukt verwendet, um diesmal mit PacI und BglII geschnitten zu werden. Hierbei wurde das von haat bis bgh.p(A) reichende Fragment entfernt (Abb. 9). Dieses entfernte Fragment wurde anschließend durch das mutierte, per PCR (Abb. 9; PCR 4) gewonnene Fragment ersetzt, indem letzteres in das linearisierte Plasmid zwischen die Schnittstellen PacI und BglII ligiert wurde (Abb. 9; Ligation 5). Die somit entstandene fertige Expressionskassette konnte nun mittels *long distance*-PCR mit den Primern XhoI BglII-pTRE.Ad5-294.s und pTRE-Ad5-3408.a amplifiziert und anschließend mit BglII geschnitten werden.

Letztendlich mussten die AAV-3'- und 5'-ITRs eingefügt werden. Da sich die AAV-ITRs auf Grund ihrer Sekundärstruktur nicht per PCR amplifizieren ließen und auch eine synthetische Herstellung unmöglich war (die Reaktion der Haarnadelstrukturbildung weist eine ΔG von -88 Kcal auf [Eurogentec, Seraing, Belgien]), blieb nur die Möglichkeit, die Expressionskassette zwischen die AAV-ITRs eines bereits existierenden Vektors zu klonieren. Hierzu wurde aus dem Plasmid pTR-UF5 die vorhandene

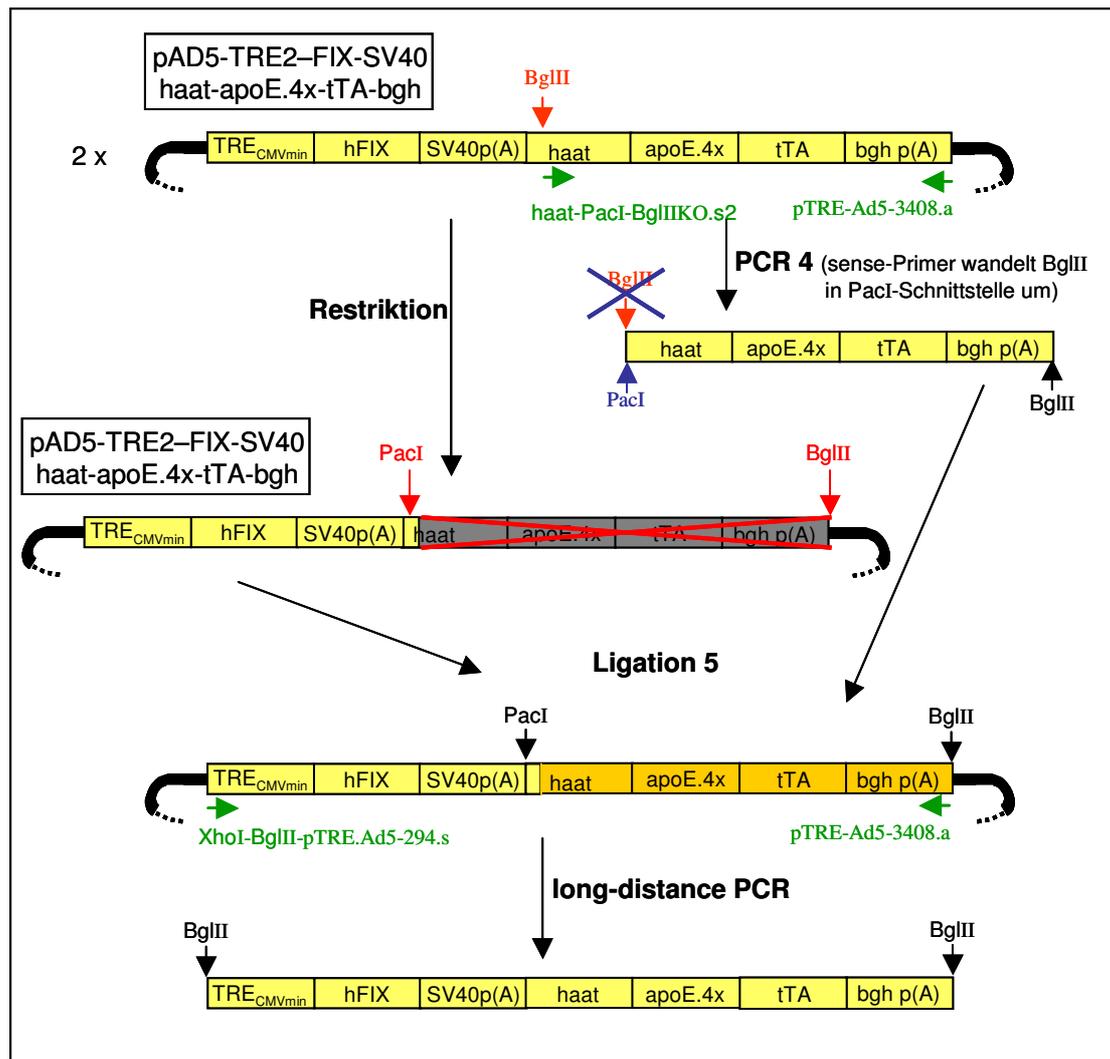


Abb. 9: Schematische Darstellung der Vektorplasmidkonstruktion – Teil 3. Erklärung: siehe Abbildung 7. Zusätzlich ist orange die Position der zu entfernenden BglII-Schnittstelle als von oben auf die Sequenz gerichteter Pfeil markiert. Die durch PCR entfernte BglII-Schnittstelle ist blau durchgestrichen. Bereits vorhandene Schnittstellen sind als schwarze Pfeile dargestellt.

ne Expressionskassette zwischen dem 5´- und 3´-ITR durch eine Restriktion mit BglII entfernt (Abb. 10). Da bei dieser Restriktion zwei exakt gleich große Fragmente entstanden, so dass die nicht benötigte Plasmidhälfte nicht von der gewünschten, die ITRs enthaltenden Hälfte isoliert werden konnte, wurde zusätzlich mit NotI geschnitten. NotI schnitt nur in der unerwünschten Expressionskassette, so dass das für die Vektorkonstruktion benötigte Plasmidfragment leicht aufgereinigt werden konnte. Im letzten Schritt wurde eine Ligation des linearisierten pTR-UF5 mit den AAV-ITRs und der amplifizierten hFIX-Expressionskassette durchgeführt (Abb. 10; Ligation 6). Es entstand das auf pTR-UF5 basierende Vektorplasmid pAAV-FIX-tTA (Abb. 10; siehe auch Abb. 11).

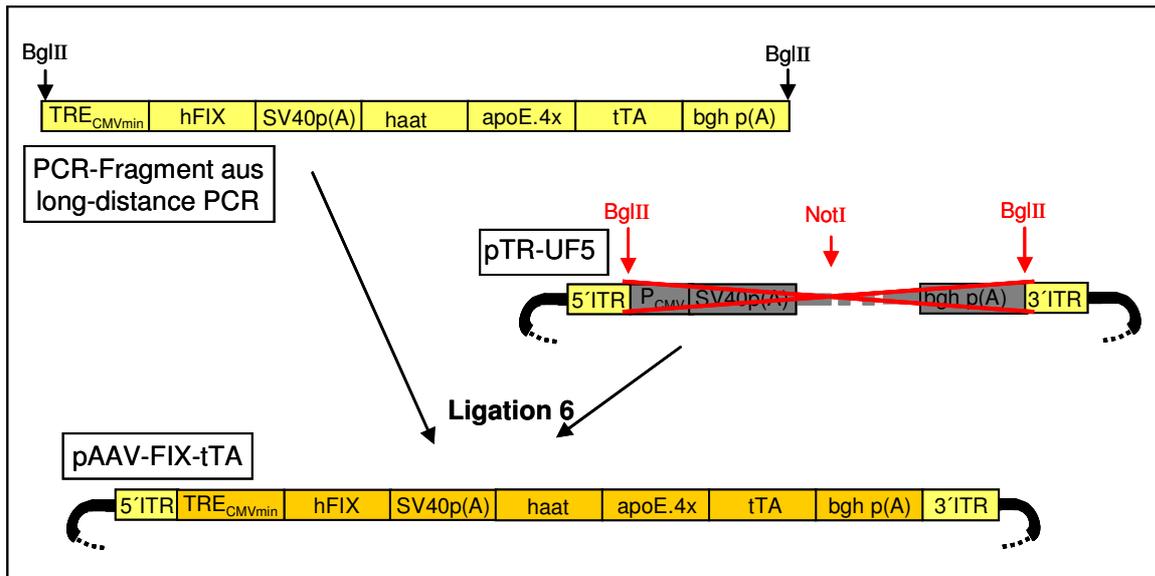


Abb. 10: Schematische Darstellung der Vektorplasmidkonstruktion – Teil 4.
Erklärung: siehe Abbildung 7.

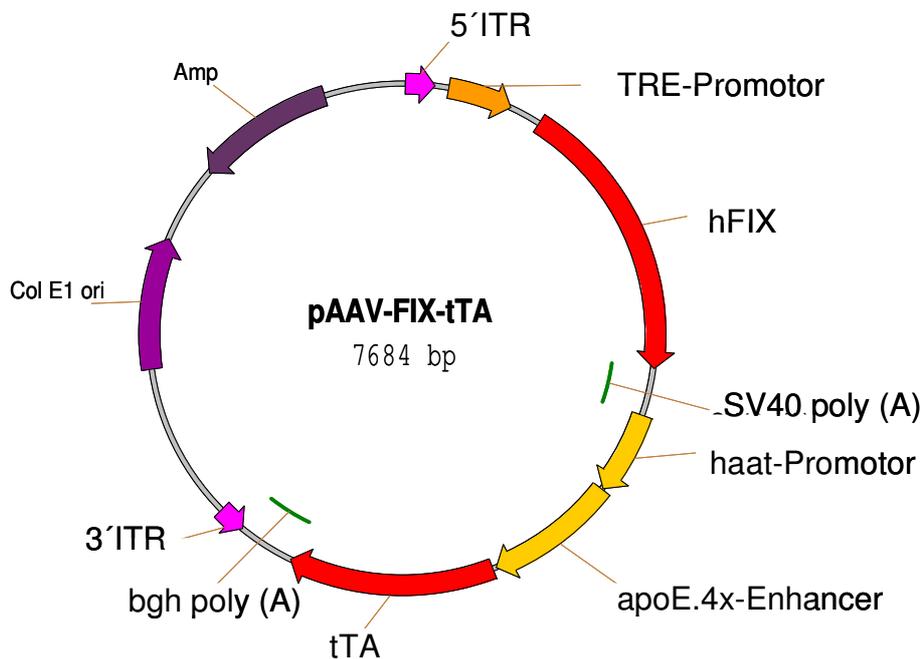


Abb. 11: Vektorplasmid pAAV-FIX-tTA. Die Abbildung zeigt das auf pTRE2 basierende Vektorplasmid. Abkürzungen: Amp: Ampicillinresistenzgen; apoE.4x: vierfache Wiederholung des Apolipoprotein-Enhancers; bgh: *bovine growth hormone polyadenylation signal*; Col E1 ori: Replikationsursprung; haat: humanes α 1-Antitrypsin; hFIX: humaner Faktor IX; ITR: *inverted terminal repeat*; TRE: *Tet-response element*; tTA: Tetracyclin-aktiviertes Transaktivatorprotein

3.2. Überprüfung des AAV-Vektorplasmides pAAV-FIX-tTA auf Sequenzfehler

Die Integrität der palindromen ITR-Sequenzen ist für eine erfolgreiche rAAV-Produktion essentiell. Um die Anzahl der Rekombinationsereignisse bei der Transformation des klonierten Plasmids zu minimieren, wurde die Inkubationstemperatur nach der Transformation von 37° C auf 32° C gesenkt. Um trotzdem sporadisch auftretende Deletionen ausschließen zu können, mussten die ITRs auf ihre Vollständigkeit hin untersucht werden. Da die ITRs auf Grund ihrer Haarnadelstruktur und vielen Sequenzwiederholungen nicht sequenziert werden konnten, wurde das Plasmid nach SmaI- oder AseI-Restriktionen anhand des Bandenschemas im Agarose-Gel überprüft. Abbildung 12 zeigt als Beispiel das Bandenmuster im Gel nach Restriktion mit AseI (Ergebnis der SmaI-Restriktion nicht dargestellt). Es waren die erwarteten Fragmente der Größen 3,2 kb, 2,6 kb, 1,2 kb und 0,6 kb zu erkennen.

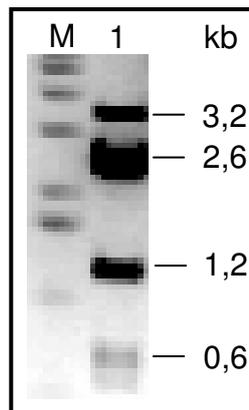


Abb. 12: Kontrollrestriktion mit AseI. 0,5 µg Plasmid wurde mit 2 U AseI geschnitten, um das Vorhandensein der korrekten, vollständigen ITRs zu überprüfen. Abkürzungen: M: DNA-Größenstandard; kb: Kilobasenpaare; U: Einheiten

Mit Ausnahme der nicht sequenzierbaren Bereiche der ITRs wurde die gesamte zusammengestellte Sequenz auf Mutationen hin überprüft. Hierzu wurden mit folgenden Primern Sequenzierreaktionen angesetzt: FIX653.a, FIX2162.s, haatBglII-KO.s, haat185.s, tTA900.a, tTA1700.s, pTEToff1791.a, pTRUF5-6190.s, FIX410.s, FIX-2220XbaI.a, CMV480.s, tTA824.s, bgh112.s, FIX4.a (s. auch Kapitel 2.9). In Abb. 13 ist dargestellt, welche Bereiche die Primer hierbei abdeckten. Alle sequenzierten

Regionen stellten sich als fehlerfrei und damit das Vektorplasmid als für die Herstellung von rAAV zur Regulation der hFIX-Expression geeignet heraus.

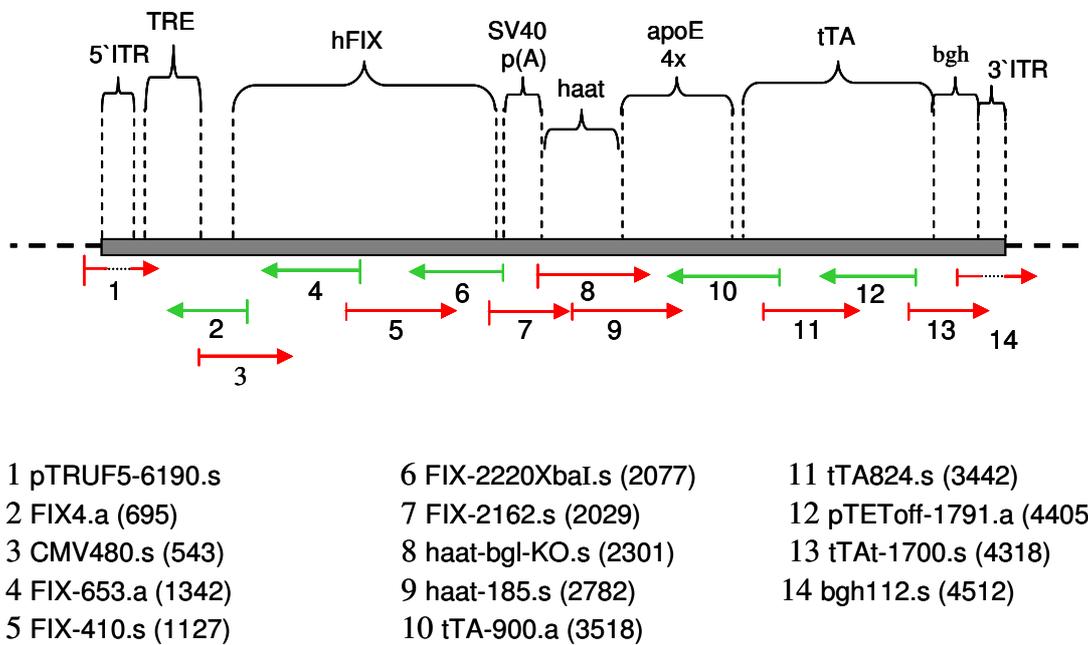


Abb. 13: Schematische Darstellung des Vektorplasmids pAAV-FIX-tTA, mit den Positionen der für die Kontrollsequenzierung verwendeten Primer und der Bereiche, die diese abdecken. Die rAAV-DNA des Plasmids ist als grauer Balken dargestellt. Darüber sind die ITRs und Gensequenzen der Expressionskassette benannt. Der Rest des Plasmids ist als gestrichelte Linie vor und hinter dem rAAV-Bereich angedeutet. Die Primer sind als grüne (*anti-sense*) und rote (*sense*) vertikale kurze Striche dargestellt; die hieraus entspringenden horizontalen Pfeile zeigen den Bereich der DNA an, die mit dem jeweiligen Primern mittels Sequenzierung abgedeckt wird. Die Zahl in der Klammer hinter den Primernamen entspricht dem Startpunkt des Primers in der Sequenz des Plasmids pAAV-FIX-tTA (s. Appendix). Der Primer pTRUF5-6190.s liegt *upstream* des 5'ITRs im Plasmid; in den Primern 1 und 14 sind die 5'- und 3'ITR-Bereiche, die auf Grund der hairpin-Struktur nicht korrekt gelesen wurden, schwarz gepunktet. Abkürzungen: ITR: *inverted terminal repeat*; TRE: tetracyclinreguliertes Element; hFIX: humaner Faktor IX; SV40: Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40; LSP: leberspezifischer Promotor; tTA: Tetracyclin-aktiviertes Transaktivatorprotein; bgh: Polyadenylierungssignal des *bovine growth hormone*

3.2.1. Produktion des viralen Vektors rAAV-FIX-tTA

Um aus dem Vektorplasmid pAAV-FIX-tTA rekombinante Viren herzustellen, müssen Zellen nicht nur mit dem Vektorplasmid, sondern auch noch mit den fehlenden AAV- und adenoviralen DNA-Sequenzen versehen werden. Als Produktionszelllinie wurde HEK293T verwendet, da diese bereits die adenoviralen Gene E1A und E1B im Chromosom enthält. Die restlichen fehlenden Gene (rep und cap, sowie die adenoviralen

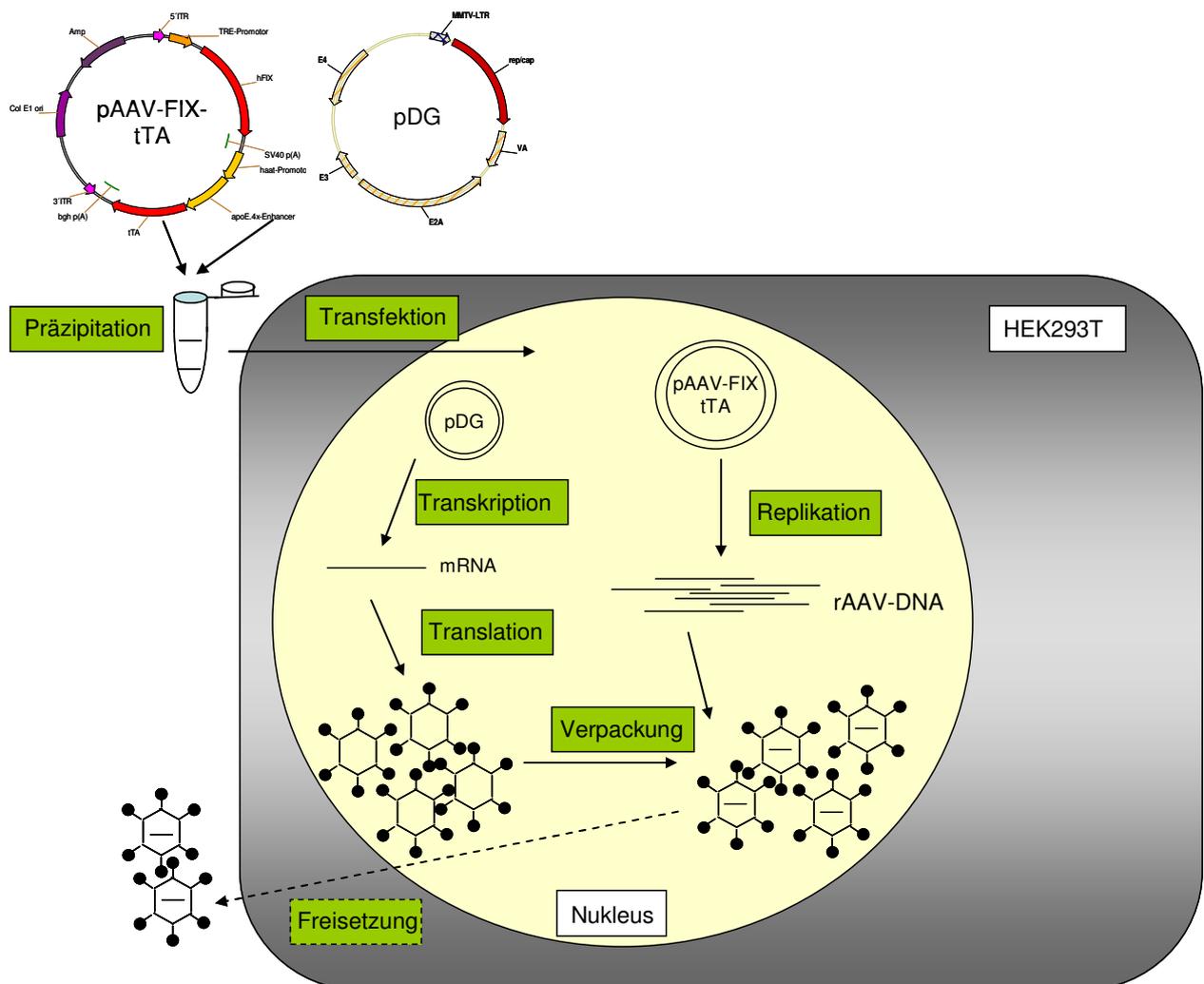


Abb. 14. Vereinfachte Darstellung der Herstellung des rekombinanten Virus in der Produktionszelllinie HEK293T. Vektor- und Verpackungsplasmid wurden im Reaktionsgefäß im molaren Verhältnis 1:3 gemischt und die Produktionszellen HEK293T mit dem Präzipitat transfiziert. Vom Helferplasmid wurden die AAV-Gene ebenso wie die adenoviralen Gene exprimiert, was zur Capsidbildung und Replikation der rekombinanten Virus-DNA vom Vektorplasmid aus führte. Anschließend fand die Verpackung der rAAV-Genome in die leeren Capside statt. Nur ein kleiner Teil der fertigen Viren wurde ins Zellkulturmedium freigesetzt, der überwiegende Teil verblieb im Zellkern.

Gene VA, E2A, E3, E4) wurden den Produktionszellen über ein zweites Plasmid, das so genannte Verpackungsplasmid, zur Verfügung gestellt. In der Praxis wurde das Vektorplasmid pAAV-FIX-tTA mit dem Verpackungsplasmid im molaren Verhältnis 1:3 gemischt und zur Kotransfektion auf die HEK293T-Zellen gegeben (Abb. 14). Je nachdem welchem Serotyp die Proteinhülle des Virus entsprechen sollte, wurde als Verpackungsplasmid pDG oder pDP6 verwendet. pDG enthält die cap-Gene, die für die Capsidproteine des AAV2-Serotypen kodieren, pDP6 die für den AAV6-Serotyp. Die fertigen Vektoren wurden dementsprechend rAAV2- bzw. rAAV6-FIX-tTA genannt (Abb. 15).



Abb. 15: Das rekombinante Vektorgenom von rAAV2-FIX-tTA und rAAV6-FIX-tTA. Beide Vektorgenome sind identisch, die Vektoren unterscheiden sich nur durch die Capsidhülle, die hier nicht dargestellt ist. Die wichtigen Elemente des Vektors sind schematisch abgebildet. Gelb sind die einzigen AAV-Sequenzen (ITRs), blau die Promotoren (TRE, LSP), rot die Transgene (hFIX als therapeutisches, tTA als regulatorisches Gen) und grau die poly(A)-Sequenzen dargestellt. Abkürzungen: ITR: *inverted terminal repeat*; TRE: Tetracyclin-reguliertes Element; hFIX: humaner Faktor IX; SV40: Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40; LSP: leberspezifischer Promotor; tTA: Tetracyclin-aktiviertes Transaktivatorprotein; bgh: Polyadenylierungssignal des *bovine growth hormone*

Optimierung der Transfektion:

Zur Optimierung der Ausbeute bei der Virusherstellung wurden parallel Transfektionen mit Lipofectamine, TransPEI und der CaPO₄-Methode durchgeführt (Kapitel 2.13.2) und anschließend die Virustiter in den Rohlysaten bestimmt. Es wurde jeweils eine 10 cm-Zellkulturschale transfiziert. Lipofectamine wurde nach Herstellerangaben verwendet. Bei den Transfektionen mit TransPEI wurde sowohl die nach Herstellerangabe optimale DNA-Menge, als auch eine 3 x höhere DNA-Menge eingesetzt, die für die rAAV-Produktion besonders geeignet ist (persönliche Mitteilung S. Weger, Benjamin Franklin Hospital, Berlin). Zusätzlich wurde das Verhältnis DNA – TransPEI variiert. Auch bei der CaPO₄-Methode wurden unterschiedliche Mengen DNA-Präzipitat-Lösungen eingesetzt (Tab. 8). Anschließend wurden die Virusgenome mittels

qPCR quantifiziert (Kapitel 2. 13.12). Dafür wurden die rAAV-Partikel aus den Zellen isoliert und zuerst mit DNase behandelt, um jegliche freie (Plasmid-)DNA zu entfernen. Anschließend wurden die Partikel verdaut, so dass die Vektor-DNA freigesetzt wurde. Bei der dann folgenden *real time*-PCR wurde also nur die DNA amplifiziert, die aus Vektorcapsiden stammte und somit vorher nicht von der DNase degradiert werden konnte. Das Ergebnis wurde in Vektorgenomen/ml (vg/ml) angegeben.

| Transfektions- methode | Verhältnis DNA:Reagenz | Menge Transfektions- Reagenz (bei CaPO ₄) [#] | vg/ml |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Lipofectamine* | --- | --- | 1,52 x 10 ¹⁰ |
| TransPEI** | 2:1 | --- | 8,9 x 10 ⁷ |
| TransPEI | 1:2 | --- | 1,16 x 10 ¹⁰ |
| TransPEI | 1:2 | --- | 9,08 x 10 ⁹ |
| TransPEI | 1:6 | --- | 1,54 x 10 ¹⁰ |
| CaPO ₄ | --- | 1 ml | 2,94 x 10 ¹⁰ |
| CaPO ₄ | --- | 2 ml | 2,82 x 10 ¹⁰ |

Tab. 8: Verschiedene Transfektionsmethoden und damit erhaltene Virustiter

Abkürzungen: CaPO₄: Calcium-Phosphat-Transfektion; vg/ml: Viruspartikel/Milliliter. # Volumen erhöht, bei gleichbleibender DNA-Menge und gleichbleibender CaPO₄-Konzentration von 250 mM. *Hersteller: Roche Diagnostics (Mannheim); **Hersteller: Eurogentec (Seraing, Belgien)

Die höchsten Virustiter konnten mit der CaPO₄-Methode erreicht werden (Tab. 8). Die Ergebnisse mit TransPEI waren ähnlich gut, jedoch ist die CaPO₄-Transfektion deutlich kostengünstiger, so dass diese Methode später bei den für die Tierversuche notwendigen umfangreichen Virusproduktionen zum Einsatz kam. Um diese Methode weiter zu optimieren und möglichst hohe Transfektionsraten zu erzielen, wurden verschiedene 2xHBS-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten zwischen 6,95 und 7,1 und unterschiedlichen CaCl₂-Konzentrationen von 165 – 290 mM im Transfektionsansatz getestet (Daten nicht abgebildet). Des Weiteren wurde noch der Einsatz von Natriumbutyrat auf eine möglicherweise die Transfektionsrate steigernde Wirkung untersucht. Die höchste Transfektionseffizienz von regelmäßig ca. 70 % erreichten letztlich Transfektionsansätze die mit 250 mM CaCl₂ und einem 2xHBS-Puffer mit

einem pH von 7,05 durchgeführt wurden. In späteren Transfektionen konnten unter diesen Bedingungen teilweise Transfektionsraten von bis zu 90 % erreicht werden.

Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation:

Nach Ernte und Lyse der transfizierten Zellen mussten die rekombinanten Viren aufgereinigt werden. Dazu wurde die Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation durchgeführt. Hierzu wurde durch Zentrifugation zuerst der Zellschrott aus dem Zelllysate entfernt. Anschließend wurde das virushaltige Zelllysate in ein Polyallomer-Röhrchen gegeben und mit verschiedenen stark verdünnten Iodixanollösungen unterschichtet (Abb. 16A). Zur Unterscheidung waren die unterschiedlichen Iodixanollösungen teilweise mit Phenolrot gefärbt worden. Da rAAV-Partikel mit den Proteinen im Zelllysate aggregieren und sich damit die Dichte der Viren ändert, enthielt die oberste (15 %) Iodixanolschicht 1 M NaCl, wodurch die Ioneninteraktionen zwischen den Makromolekülen destabilisiert werden sollten. Um die Röhrchen luftblasenfrei verschließen zu können, wurden sie mit PBS-MK aufgefüllt.

Nach zweistündiger Zentrifugation bei 300.000 x g sollten sich die Viruspartikel in der farblosen 40 %-Iodixanolfraktion direkt über der 54 %-Fraktion gesammelt haben, die aus ca. 4 ml besteht. Wie in Abbildung 16B zu sehen ist, war nach der Ultrazentrifugation deutlich eine weiße Virusbande zu erkennen; direkt darüber lag eine dünne, feste Schicht aus Zellschrott. Mit Hilfe einer Spritze und Kanüle wurde durch die Wand des Polyallomer-Röhrchens gestochen und möglichst viel der Viruslösung entnommen. Um die nachfolgende weitere Aufreinigung nicht zu erschweren, musste sehr genau darauf geachtet werden, möglichst wenig Zelltrümmer mit abzunehmen.

Kontrolle der virushaltigen Iodixanollösung aus der Ultrazentrifugation:

Um zu bestätigen, dass die abgenommene Bande aus dem Polyallomer-Röhrchen nach der Ultrazentrifugation tatsächlich Viruspartikel enthielt, wurde eine Probe entnommen und eine PCR mit den Primern pTEToff-tTA.s und pTEToff-1791.a durchgeführt (s. Kapitel 2.9). Das erwartete 1007 bp große Fragment war sowohl in der Probe als auch in der Positivkontrolle (pAAV-tTA-FIX) zu sehen (Abb. 17). Als Negativprobe wurde eine Probe aus der Bande entnommen, die direkt über der Virusbande im Polyallomer-Röhrchen lag. Hier konnte kein 1007 bp großes Vektor-DNA-Fragment nachgewiesen werden.

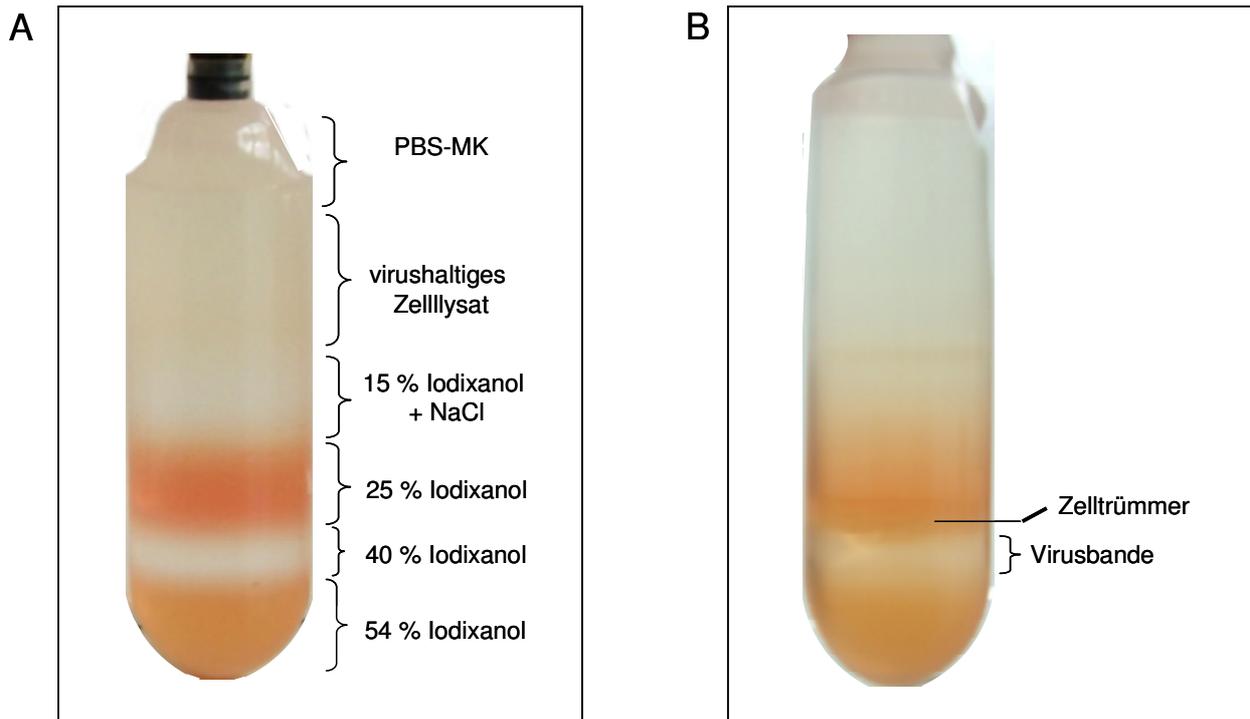


Abb. 16: Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation der virushaltigen Zelllysate. Die Abbildung zeigt ein beladenes Polyallomergefäß vor und nach der Ultrazentrifugation. **A** zeigt die Schichtung im Polyallomergefäß vor der Zentrifugation. Die 15 %- und 54 %- Iodixanollösungen wurden zur Sichtbarmachung mit Phenolrot gefärbt. NaCl in der 15 %-Iodixanollösung sollte einer Verklumpung der Viruspartikel entgegen wirken. Über das virushaltige Zelllysate wurde PBS-MK geschichtet, um das Röhrchen aufzufüllen und damit luftblasenfrei verschließen zu können. **B** zeigt das Polyallomergefäß nach der Zentrifugation bei 300.000 x g. Die Viruspartikel haben sich in der 40 %-Iodixanolfraction gesammelt, die als (fast) farblose Bande erkennbar ist (ca. 4 ml). Direkt darüber befindet sich eine Schicht mit Zelltrümmern und -proteinen. Abkürzung: PBS-MK: Phosphat gepufferte Salzlösung mit Magnesium u. Kalium

Virusaufreinigung mittels Heparin-Agarosesäule :

Die Viren enthaltende Iodixanolfraction aus der Dichtegradientenzentrifugation wurde nach Verdünnen mit PBS-MK und Filtration durch 5 µm- und 0,4 µm-Spritzenaufsatzfilter auf eine mit PBS-MK equilibrierte Heparin-Agarosesäule gegeben. Nach dem Waschen mit PBS-MK wurde mit PBS-MK + 1 M NaCl eluiert, wobei das Eluat in Fraktionen gesammelt wurde. Um die Eluate zu ermitteln, die Viruspartikel in hohen Konzentrationen enthielten, wurden Aliquots von 15 µl unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch untersucht (Abb. 18). Im SDS-Polyacrylamidgel konnten nach einer Silberfärbung die denaturierten Hüllproteine VP1, VP2 und VP3 des rAAV mit den Molekulargewichten 87, 73 und 61 kDa identifiziert werden (Pfeile in Abb. 18). Die Fraktionen 4–9 enthielten relativ viele Viruspartikel, aber auch starke Verun-

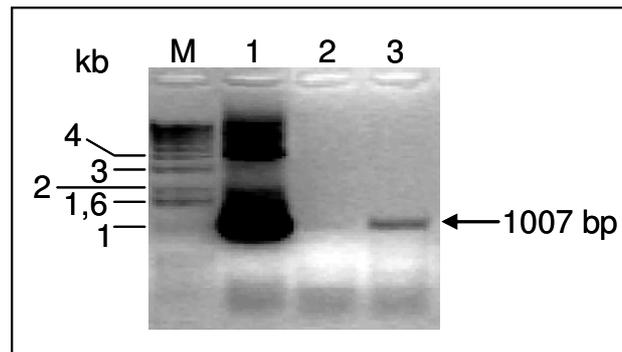


Abb. 17: Kontrolle der Virusbande nach der Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation. Eine 100 μ l-Probe der Virusbande wurde nach der Ultrazentrifugation mit Proteinase K verdaut und 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Aus dem gewonnenen Überstand wurden 4 μ l für eine PCR unter Verwendung der Primer pTEToff-tTA.s und pTEToff-1791.a eingesetzt. Die erwartete Größe des Fragments beträgt 1007 bp. Bahn 3 mit der Probe zeigt die erwartete Bande bei ca. 1 kb. Bahn 1 zeigt die Positivkontrolle (mit Plasmid pAAV-FIX-tTA als *template*); in Bahn 2 wurde als Negativkontrolle eine Probe eingesetzt, die der roten Fraktion über der Zellschrottschicht entnommen worden war. Abkürzungen: bp: Basenpaare; M: DNA-Größenstandard

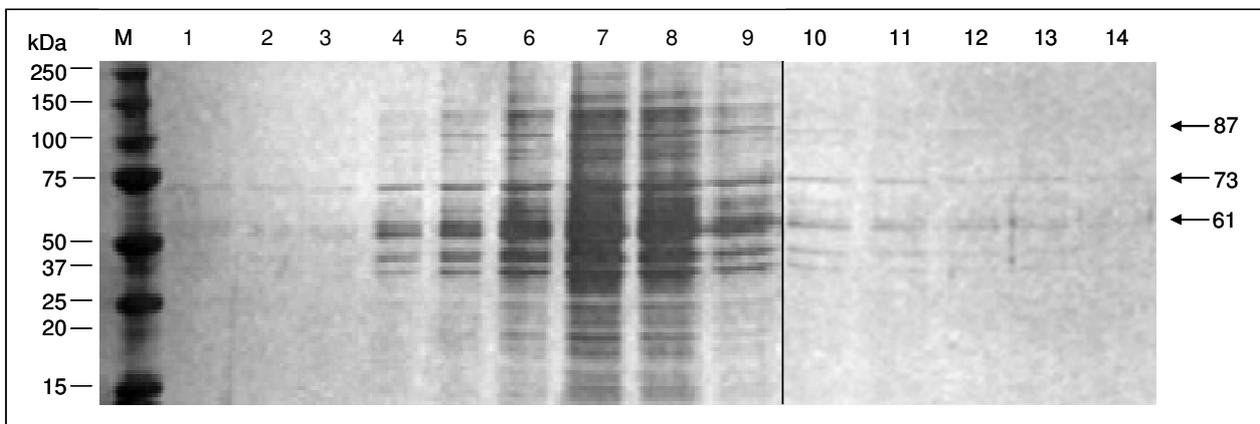


Abb. 18: Silberfärbung der in den Eluatfraktionen vorhandenen Proteine. 20 ml Eluat der Heparinagarosesäule wurden in 1 ml-Fraktionen gesammelt. Mit 15 μ l-Aliquots wurden SDS-PAGE und Silberfärbung durchgeführt. Bahnen 1 - 14 Eluatfraktionen 1 - 14 (je 1 ml); Pfeile: markieren die Höhe, auf der die Capsidproteine VP1, VP2 und VP3 laufen. Abkürzungen: kDa: Kilodalton; M: Molekulargewichtsmarker

reinigen durch andere Proteine. Die Eluatfraktionen, die am meisten Viruspartikel enthielten, wurden gepoolt und mittels Centricons aufkonzentriert.

Um den Prozess der Virusaufräumung zu kontrollieren, wurden Proben an unterschiedlichen Punkten des Aufräumungsprozesses entnommen, auf ein SDS-Gel auf-

getragen und anschließend mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 19). Die Bahn 1 der Abbildung 19A zeigt eine Probe vor dem Auftragen auf die Heparinsäule. Neben den Capsidprotein-Banden sind viele weitere kontaminierende Banden sichtbar. In Bahn 2 der Abbildung 19A wurde eine Probe der Heparinagarose (mit etwas PBS-MK-Puffer) aufgetragen, nachdem die Säule eluiert worden war. Hier zeigte sich, dass auch nach der Elution noch sehr viele Viruspartikel an der Säulenmatrix hafteten. In der Bahn 3 desselben Bildes ist eine Probe der mit Centricons aufkonzentrierten Eluate zu sehen. Hier sind die Virusproteinbanden trotz der Aufkonzentrierung äußerst schwach sichtbar – die Ausbeute war also sehr gering. In Abbildung 19B ist in Bahn 1 die Probe einer weiteren mit Centricons aufkonzentrierten Viruspräparation zu sehen. Hier ist die Ausbeute offensichtlich höher, aber es sind auch relativ starke Kontaminationen mit weiteren Proteinen zu sehen. In den Bahnen 2 und 3 aus Abbildung 19B sind Proben von zwei aufeinander folgenden Waschgängen (nach Auftragen der Virusfraktionen auf die Säule) zu sehen.

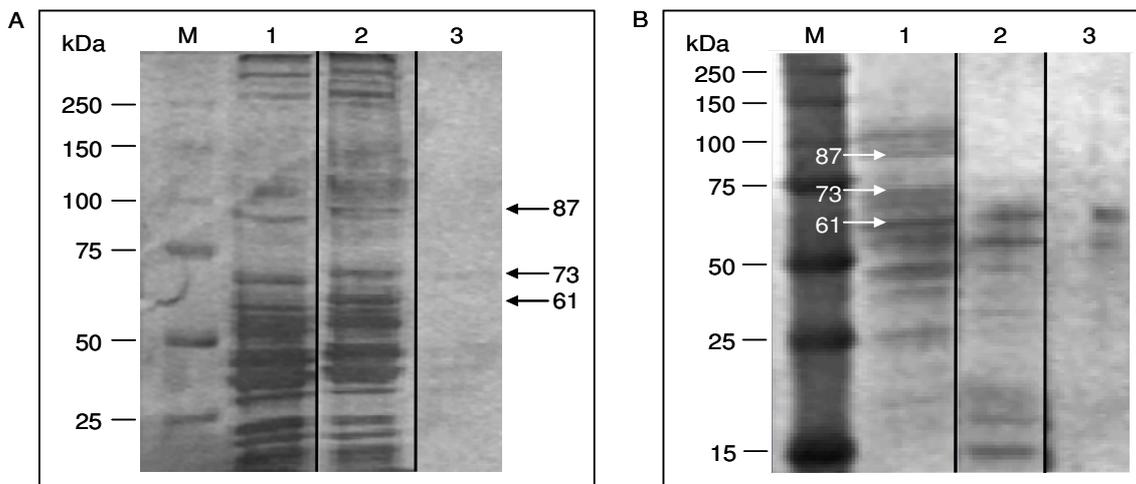


Abb. 19: Analyse von Proben unterschiedlicher Schritte der Virusaufreinigung über die Heparinagarosesäule mittels SDS-PAGE und Silberfärbung. Mit 15 µl-Aliquots verschiedener Proben wurden SDS-PAGE und Silberfärbung durchgeführt. **A** zeigt eine Probe der virushaltigen Iodixanolfraktion aus der Dichtegradientenzentrifugation (Bahn 1), eine Probe der Heparinagarose nach der Elution (Bahn 2) und eine Probe des aufkonzentrierten Eluats (Bahn 3). **B**: Bahn 1: Probe des aufkonzentriertes Eluats (einer anderen Präparation als in A); die Bahnen 2 und 3 zeigen Proben von zwei nacheinander durchgeführten Waschvorgängen der beladenen Heparinagarosesäule. Schwarze Pfeile: Laufhöhe der drei Capsidproteine VP1, VP2 und VP3 mit Angabe des Molekulargewichts; weiße Pfeile: VP1-, VP2- und VP3-Bande. Abkürzungen: kDa: Kilo-dalton; M: Molekulargewichtsstandard

Beide zeigen relativ wenige Proteinbanden im Vergleich zum Ausgangsmaterial (Abb. 19A, Bahn 1). Über die unterschiedlichen Ergebnisse des Aufreinigungsprozesses kann zusammengefasst gesagt werden, dass (i) die Heparinsäule die Proteinkontamination der Viruspräparation nur in sehr geringem Maße verringerte, (ii) die Heparinsäule die Viruspartikel zwar band, diese jedoch anschließend nur teilweise eluiert werden konnten, so dass es zu einer relativ schlechten Ausbeute kam und (iii) die Aufkonzentrierung der Eluatfraktionen mittels Centricons nochmals zu einer Reduktion der Viruspartikel um bis zu 90 % führte (Daten nicht dargestellt). Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurde an Stelle der Aufreinigung mittels der Heparinsäule und Konzentrierung mittels Centricons eine Ultrafiltration mit Vivaspin-20-Röhrchen (Sartorius) etabliert. Abbildung 20 zeigt in Bahn 1 eine Probe aus einer Viruspräparation, die mit Vivaspin-20 aufkonzentriert wurde. In Bahn 2 ist eine Probe aufgetragen, die dem Durchfluss dieses Konzentrierungsprozesses entnommen worden war. Es ist offensichtlich, dass diese Methode keinerlei Proteinkontaminationen aus der Präparation entfernt. Ziel dieser Filtration war jedoch auch nur die Konzentrierung der rekombinanten Viren. Auf diese Weise hergestellte Viruspräparationen können problemlos in präklinischen Versuchen mit Mäusen eingesetzt werden (per-

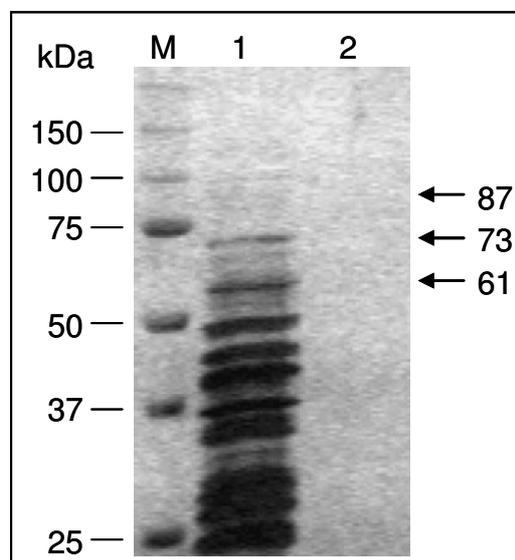


Abb. 20: Silberfärbung der SDS-PAGE von Proben der Viruskonzentrierung mit Vivaspin 20-Röhrchen. Die Viren aus der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation wurden in Vivaspin 20-Röhrchen (MWCO 100.000) konzentriert. Mit 15 ml-Aliquots wurden SDS-PAGE und anschließend Silberfärbung durchgeführt. Bahn 1: Probe der konzentrierten Viruspräparation; Bahn 2: Durchfluss der Vivaspin 20-Zentrifugation; Pfeile: Laufhöhe der drei Capsidproteine VP1, VP2 und VP3 mit Angabe des Molekulargewichts. Abkürzungen: kDa: Kilodalton; M: Molekulargewichtsstandard; MWCO: *molecular weight cut-off*

sönliche Mitteilung H. Fechner, Benjamin Franklin Hospital, Berlin). Mit dieser Methode konnte unter Umgehung der Heparinsäule die maximale Ausbeute der Virenpräparationen um einen Faktor von weit über 100 gesteigert werden (von 6×10^{10} vg/ml mit der Heparin-Agarosesäule auf bis zu 8×10^{12} vg/ml mit den Vivaspin-Röhrchen).

3.3. Expression von hFIX mittels eines regulierbaren rekombinanten Vektors auf Basis des AAV

3.3.1. Herunterregulierbare Expression von humanem FIX *in vitro*

Um zu testen, ob der Vektor rAAV2-FIX-tTA die Fähigkeit hat, Zellen zur Expression von humanem FIX zu bringen, und ob diese Expression abgeschaltet werden kann, wurden HepG2-Zellen transduziert. Es wurden parallel zwei Versuchsreihen durchgeführt. In der einen wurden die Zellen nach Transduktion ganz normal im Standardmedium inkubiert; diese Zellen sollten somit, wenn die Transduktion erfolgreich verlief, hFIX produzieren und in das Medium sezernieren. Im zweiten Ansatz wurden die Zellen nach der Transduktion 48 h mit 10 ng/μl Doxycyclin (Dox) im Medium inkubiert. Hiermit sollte untersucht werden, ob Dox die Expression des therapeutischen Gens hFIX inhibieren kann. Im Mediumüberstand wurde das humane FIX-Antigen (hFIX:Ag) mittels ELISA bestimmt.

Die Transduktion in Abwesenheit von Dox führte zu einer Expression von 23,8 pg hFIX/Zelle/ml Medium, während die Dox-Zugabe zum Medium eine hFIX-Expression zur Folge hatte, die weniger als ein Viertel betrug: 5,12 pg hFIX/Zelle/ml Medium (Abb. 21). Unbehandelte Kontrollzellen zeigten fast gar keine Expression (0,45 pg hFIX/Zelle/ml Medium). Diese Ergebnisse belegen die Funktionalität des rekombinanten Virus *in vitro* und die Herunterregulierbarkeit der Transgenexpression durch Dox-Zugabe.

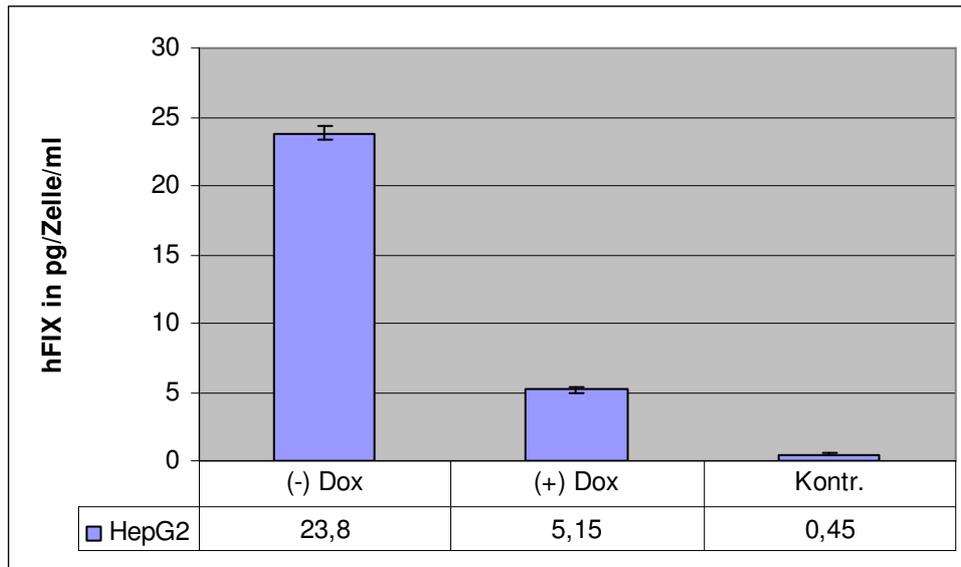


Abb. 21: Herunterregulierbare Expression von humanem FIX in HepG2-Zellen.

$1,5 \times 10^6$ HepG2-Zellen wurden mit 1×10^4 vg (rAAV2-FIX-tTA)/Zelle transduziert und ohne bzw. mit 10 ng/ μ l Dox 48 h inkubiert. Die Werte sind Durchschnittswerte von jeweils zwei Zellkulturschalen, bei denen nach 48 h die hFIX-Antigenkonzentration (hFIX:Ag) im Mediumüberstand mittels ELISA bestimmt wurde (s. Kapitel 2.11.1). Die Kontrollzellen wurden nicht infiziert und ohne Dox inkubiert. Abkürzung: Dox: Doxycyclin; Kontr.: Kontrolle

3.3.2. Gewebespezifische Expression von hFIX *in vitro*

Um die Leberspezifität des im rAAV2-FIX-tTA verwendeten haat-Promotors zu untersuchen, wurden außer HepG2-Zellen auch nicht aus der Leber stammende humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) transduziert. Beide Zelllinien wurden mit jeweils 1×10^4 vg/Zelle transduziert. Nach 48 h und 96 h wurde Mediumüberstand zur hFIX:AG-Bestimmung abgenommen. Auch hier wurden Zellen parallel ohne oder mit 10 ng/ μ l Dox inkubiert. Abbildung 22 zeigt, dass die Transduktion von HEK293-Zellen mit dem rekombinanten Virus zu einer sehr geringen hFIX-Expression führte, unabhängig davon, ob der Promotor durch Dox-Zugabe inhibiert wurde oder nicht. Bei den Leberzellen dagegen führte die Transduktion mit dem Vektor zu einer deutlichen hFIX-Expression, die, wie in Kapitel 3.2.1 schon gezeigt, durch Dox deutlich reduziert werden konnte – in diesem Fall auf ein Fünftel. In den HEK293-Zellen lag die hFIX-Expression unabhängig von Dox ungefähr so hoch wie bei Leberzellen, in denen die Expression durch Dox-Zugabe inhibiert wurde.

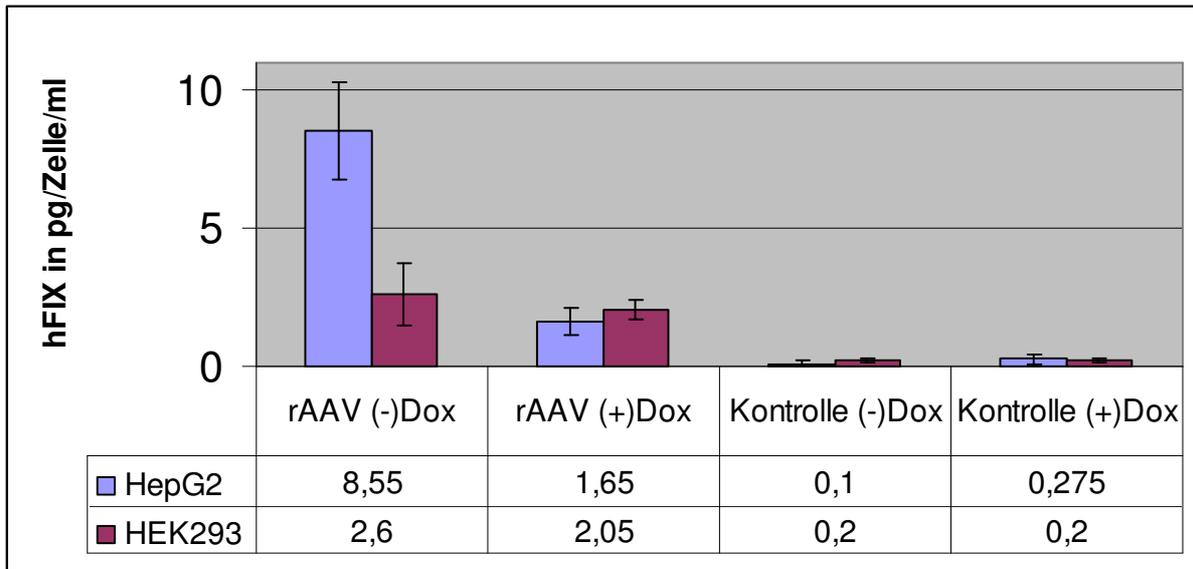


Abb. 22: Gewebespezifische Expression von hFIX *in vitro*. HepG2- und HEK293-Zellen wurden mit 1×10^4 vg (rAAV2-FIX-tTA)/Zelle transduziert und ohne bzw. mit 10 ng/ μ l Doxycyclin inkubiert. Die Werte sind Durchschnittswerte von jeweils einer (infizierte Zellen) bzw. zwei (Kontrollzellen) Zellkulturschalen, bei denen nach 48 und 96 h die hFIX-Antigen-Konzentration (hFIX:Ag) im Mediumüberstand mittels ELISA bestimmt wurde. Kontrollzellen wurden nicht infiziert und mit bzw. ohne Dox inkubiert. Abkürzung: Dox: Doxycyclin; Kontr.: Kontrolle; vg: DNase-resistente Vektorgenome; rAAV: rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus

3.3.3. Expression von humanem FIX *in vivo*

Nachdem das virale Gentransfersystem rAAV2-FIX-tTA erfolgreich *in vitro* getestet worden war und sowohl die Leberspezifität als auch die Herunterregulierbarkeit belegt werden konnte, sollte dieser Vektor, sowie ein pseudotypisiertes Konstrukt mit der identischen Expressionskassette (rAAV6-FIX-tTA) *in vivo* an Mäusen getestet werden.

Dazu wurden SCID- und C57BL/6-Mäusen zwischen $3,6 \times 10^{10}$ und 1×10^{12} Vektorgenome (vg) intravenös über die Schwanzvene injiziert. Im Abstand von einigen Tagen oder Wochen wurde regelmäßig bis zu drei Monate lang ca. 200 μ l Blut für die Bestimmung der FIX-Aktivität und -Antigenkonzentration (FIX:Ag-) abgenommen. Durch Mischen mit 3,2 % Natrium-Citrat im Verhältnis 1:9 wurde die Blutgerinnung unterbunden. Da die hFIX-Aktivität nicht von der Maus-FIX- (mFIX-) Aktivität unterschieden werden kann, wurde immer auch von unbehandelten Mäusen sowie von

Kontrollmäusen Blut untersucht, denen an Stelle des Vektors NaCl oder PBS-MK gleichen Volumens injiziert worden war.

In einem ersten Vorversuch wurde 2 SCID-Mäusen $3,6 \times 10^{10}$ vg AAV2-FIX-tTA intravenös über die Schwanzvene verabreicht. Nach bereits 4 Tagen war bei einem Tier ein Anstieg der FIX-Aktivität von knapp über 50 % auf 90 % zu beobachten (Abb. 23, Maus 2). Der höchste Wert von 185 % wurde nach 7 Tagen gemessen (Abb. 23, Maus 1), allerdings sank die Aktivität wieder sehr schnell ab. Eine Kontrollmaus hatte in einer Blutprobe am Tag 14 ebenfalls eine erhöhte FIX-Aktivität (101,6%). Für Messungen der FIX:Ag erwies sich der ELISA als nicht sensitiv genug. Nachdem dieser Vorversuch gezeigt hatte, dass der Vektor rAAV2-FIX-tTA anscheinend eine hFIX-Expression ermöglicht, sollten Versuche mit einer größeren Anzahl Individuen durchgeführt werden, um statistische Signifikanz zu erreichen. Um sicherzustellen, dass keine Antikörper gegen das hFIX-Transgen entwickelt werden,

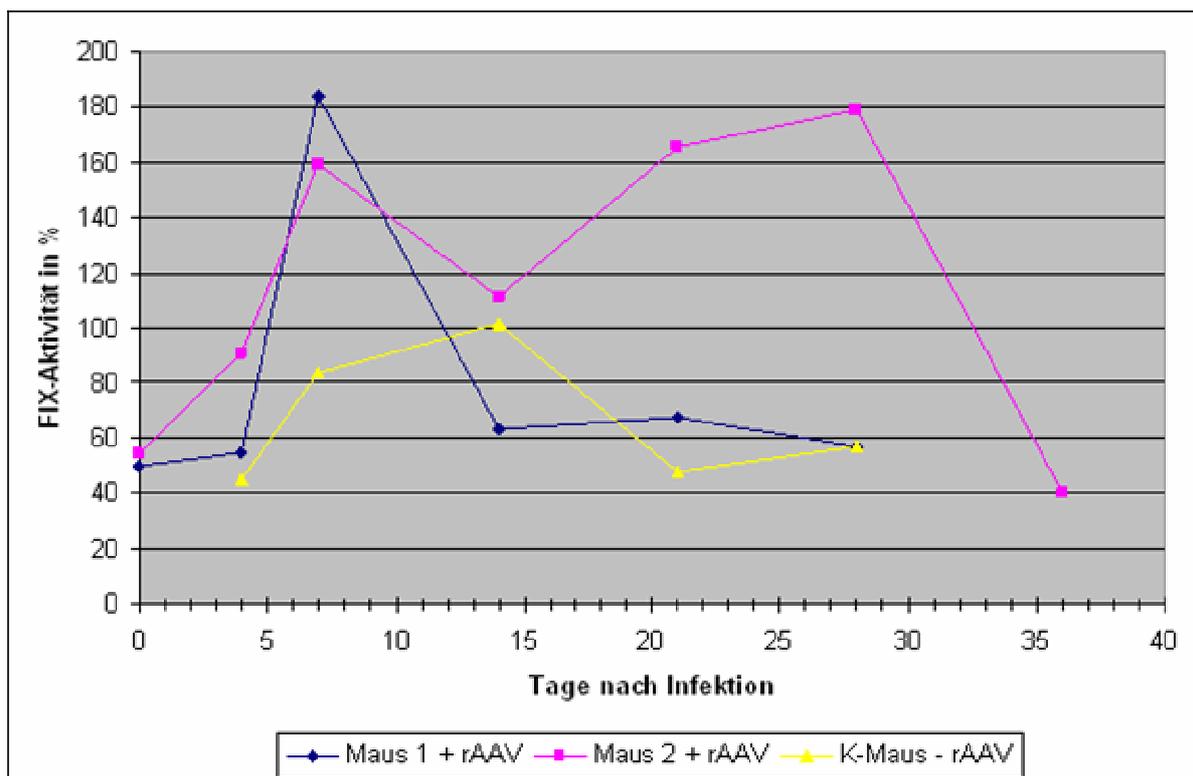


Abb. 23: FIX-Aktivität *in vivo* nach Infektion mit rAAV2-FIX-tTA. 2 SCID-Mäusen wurden $3,6 \times 10^{10}$ vg rAAV2-FIX-tTA intravenös injiziert und retroorbital ca. 160 μ l Blut abgenommen. Im Plasma wurde die FIX-Aktivität in % gemessen. Die blaue und violette Kurve zeigen die Werte der Versuchsmäuse, die gelbe die Werte der mit NaCl anstatt Vektor behandelten Kontrollmaus. Abkürzung: K-Maus: Kontrollmaus; rAAV: rekombinantes Adenoassoziiertes Virus

und somit den Nachweis der FIX-Expression *in vivo* über einen längeren Zeitraum zu ermöglichen, wurden SCID-Mäuse verwendet. Eine Expression über mehrere Wochen war wichtig, da (i) rAAV2 mit einer relativ langsamen Kinetik Transgene exprimiert und das Maximum der hFIX-Expression erst etwa sechs Wochen nach Injektion des Vektors zu erwarten war und (ii) da die wiederholte An- und Abschaltung der Transgenexpression mittels Doxycyclin-Zufütterung bzw. –Entzug nachgewiesen werden sollte. Ein Versuchsreihe mit sieben Mäusen, denen ca. 1×10^{11} vg verabreicht wurden ($2 \times 220 \mu\text{l}$ innerhalb von 24 h) und zwei Kontrollmäusen scheiterte an einer zu spät entdeckten bakteriellen Kontamination der injizierten Viruspräparation. Fünf der sieben Tiere starben innerhalb von 30 Stunden daran. Die zwei überlebenden Exemplare zeigten nach 15 Tagen keinerlei gesteigerte hFIX-Aktivität.

Für die nächste Versuchsreihe wurde der mittlerweile fertiggestellte pseudotypisierte Vektor rAAV6-FIX-tTA verwendet. Dieser Vektor hat unter anderem den Vorteil, dass er mit höherer Ausbeute gewonnen werden kann als rAAV2. Es wurden nun fünf SCID-Mäuse mit 1×10^{11} vg des rAAV6-FIX-tTA behandelt ($80 \mu\text{l}$ Volumen). Parallel dazu wurden zwei Kontrollmäuse mit PBS-MK-Lösung behandelt. Die FIX-Aktivitätsmessungen der gewonnenen Plasmaproben zeigten, dass die FIX-Aktivität der zwei Kontrolltiere sowie der vektorinfizierten Mäuse erheblich schwankten. Während die Kontrollmäuse Aktivitäten zwischen 16 % und 71 % aufwiesen, lagen die der Versuchsmäuse zwischen 24 % und 94 %. Erwähnenswert ist hier besonders, dass die FIX-Aktivitätswerte nicht nur zwischen den Tieren schwankten, sondern auch jeweils bei einem Individuum, bei dem Blut zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen wurde. Zwei vektorbehandelten Mäusen wurde über das Trinkwasser Dox ($200 \mu\text{g/ml}$) verabreicht, um zu sehen, ob – trotz schwankender FIX-Aktivität – eine abnehmende Tendenz zu beobachten sein würde. Nach dreitägiger Dox-Verabreichung über das Trinkwasser wurde erneut Blut abgenommen und der FIX-Aktivitätswert bestimmt. Während dieser bei einem Tier ungefähr gleich blieb (47 %, 55 %), sank die FIX-Aktivität bei dem Zweiten von 84 % auf 45 %. Diese Werte lagen jedoch noch innerhalb der Bandbreite der gemessenen FIX-Aktivitäten der vektorbehandelten und nicht Dox ausgesetzten Tiere (24 - 94 %), so dass nicht zwingend auf eine Wirkung des Dox geschlossen werden kann.

Da bekannt ist, dass die Transgenexpression bei verschiedenen Mausstämmen sehr unterschiedlich ausfallen kann, wurde die nächste Versuchsreihe an dem immun-

kompetenten C57BL/6-Stamm durchgeführt. Wieder wurden zwei Kontrolltiere eingesetzt und fünf Mäuse mit 1×10^{11} vg infiziert (100 μ l). Auch hier schwankten die FIX-Aktivitäten der Tiere wieder relativ stark. Die Werte der Kontrolltiere lagen zwischen 52 % und 96 %, die der mit rAAV6-FIX-tTA infizierten Tiere zwischen 40 % und 152 %.

Für die nächste Versuchsserie wurde die Vektordosis auf bis zu 1×10^{12} vg (220 μ l) gesteigert ($4,5 \times 10^{11}$ vg – 1×10^{12} vg). Wieder wurden Tiere des C57BL/6-Stamms verwendet (5 Versuchs-, 2 Kontrolltiere) und wieder waren die FIX-Werte sehr schwankend: in den Kontrolltieren zwischen 46 % und 67 % und in den infizierten Tieren zwischen 54 % und 86 %.

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass in den verschiedenen Versuchsreihen bei Vektordosen von 1×10^{11} bis 1×10^{12} vg weder in SCID- noch C57BL/6-Mäusen eine klare FIX-Aktivitätssteigerungen in den einzelnen Tieren nachgewiesen werden

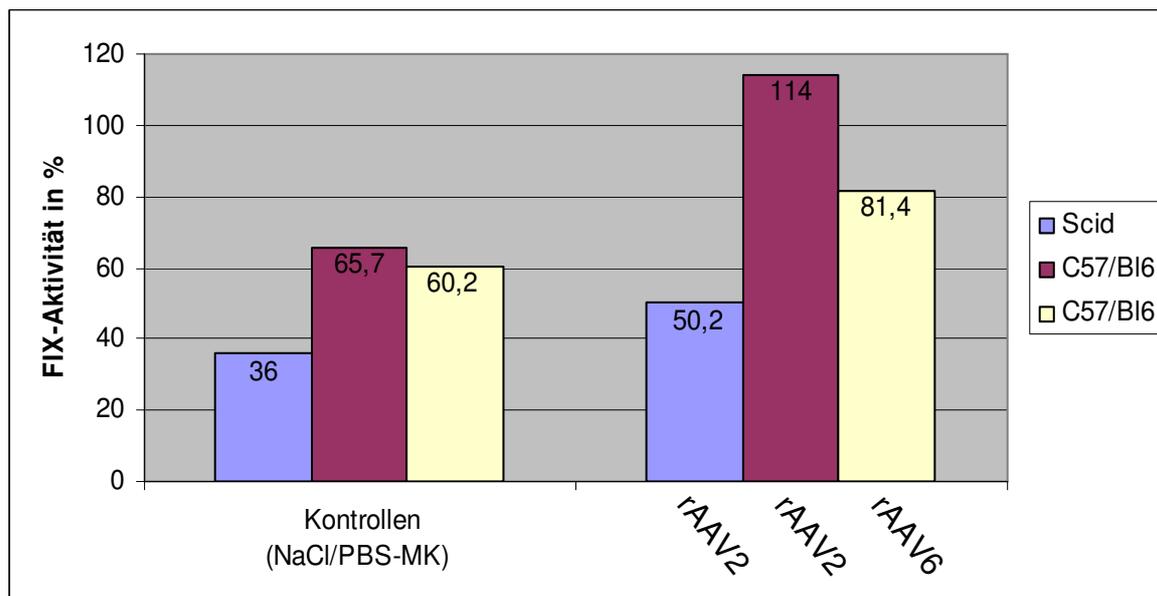


Abb. 24: FIX-Aktivitätssteigerung in Mäusen nach Behandlung mit auf AAV2 bzw AAV6 basierenden Vektoren. SCID- und C57BL/6-Mäusen wurde rAAV2-FIX-tTA bzw. rAAV6-FIX-tTA intravenös injiziert und 4 bis 46 Tage nach Infektion Blut retroorbital abgenommen. Im Plasma wurde die FIX-Aktivität in % gemessen. Die statistische Auswertung zeigt Durchschnittswerte von SCID-Mäusen, die Vektoren auf rAAV2-Basis (n=5) bzw. als Kontrolle PBS-MK (n=2) verabreicht bekommen hatten (blaue Balken) sowie C57BL/6-Mäusen die mit auf rAAV2 (n=2) bzw. rAAV6 (n=10) basierenden Vektoren, oder. NaCl bzw. PBS-MK als Kontrolle (n=7 bzw. n=4) behandelt worden waren (violette bzw. gelbe Balken). Abkürzungen: NaCl: Natriumchlorid; PBS: Phosphat gepufferte Salzlösung; rAAV: rekombinantes Adenoassoziiertes Virus

konnte. Die Verwendung des rAAV6 an Stelle des rAAV2 führte nicht zu besseren Ergebnissen: die Werte bei den einzelnen Tieren, sowohl den Kontroll- als auch den Versuchstieren, schwankten innerhalb einer Gruppe und von Blutabnahme zu Blutabnahme zu stark, als dass eindeutige Ergebnisse auszumachen gewesen wären.

Eine statistische Auswertung der FIX-Aktivitätswerte zeigte jedoch in allen Versuchsreihen eine signifikante Steigerung der durchschnittlichen Aktivität durch die Verabreichung sowohl des Vektors rAAV2-FIX-tTA als auch des Vektors rAAV6-FIX-tTA in beiden Maustypen (Abb. 24). Bei SCID-Mäusen, die mit dem Vektor rAAV2-FIX-tTA behandelt wurden ($n = 5$), lag die FIX-Aktivität durchschnittlich bei 50,2 %, während sie bei den Kontrollmäusen ($n = 2$) bei nur 36 % Aktivität lag. Dies entspricht einer Steigerung um ca. 40 % ($p < 0,021$). Bei C57BL/6-Mäusen, die mit rAAV2-FIX-tTA behandelt worden waren ($n = 2$), lag die durchschnittliche Fix-Aktivität bei 114 %, während sie bei den Kontrolltieren ($n = 7$) bei 65,7 % lag. Hier war somit eine Steigerung der durchschnittlichen Aktivität um über 73 % zu beobachten ($p < 0,033$). Die rAAV6-FIX-tTA-behandelten Mäuse ($n = 10$) zeigten eine FIX-Aktivität von 81,4 %, verglichen mit 60,2 % bei den Kontrolltieren ($n = 4$), was einem Anstieg um über 35 % bedeutet ($p < 0,013$).

FIX:Ag-Konzentrationen im Mausplasma konnten mittels ELISA nicht gemessen werden, da sie aufgrund der supprimierenden Wirkung des Mausplasmas unter der Sensitivitätsgrenze lagen.

3.4. Molekulargenetische Aufarbeitung der hFIX-Expressionsversuche *in vivo*

3.4.1. Nachweis von Vektor-DNA in der Leber rAAV6-transduzierter C57 BL/6-Mäuse

Die Ergebnisse der hFIX-Messungen nach der intravenösen Verabreichung der Vektoren führten überraschenderweise nicht zu direkt erkennbaren Aktivitätssteigerungen. Da die Anstiege nur statistisch nachweisbar waren, sollte nun molekulargenetisch untersucht werden, in wie weit die Transduktion der Leber erfolgreich war und ob Vektorgenome außer im Zielgewebe auch in anderen Organen und Geweben nachweisbar wären.

Um die Transduktion und die Streuung des Vektors rAAV6-FIX-tTA zu untersuchen, wurden fünf Tiere (C57BL/6-Mäuse) acht bis neun Wochen nach der Infektion mit 4×10^{11} vg ($n = 1$) oder 1×10^{12} vg ($n = 4$) getötet und Herz, Lunge, Leber, Nieren, Milz sowie eine Muskelgewebeprobe entnommen. Mit aus diesen Geweben extrahierter DNA wurden mit den Primern CMV480.s und FIX2220XbaI.a PCRs durchgeführt (s. Kapitel 2.9), die spezifisch nur hFIX-DNA aus dem Vektor nachweisen. Der Primer CMV480.s bindet an den in Mäusen nicht vorkommenden Cytomegali-Virus (CMV)-Promotor, der im Vektor dem hFIX-Gen vorgeschaltet ist. Der zweite Primer bindet im

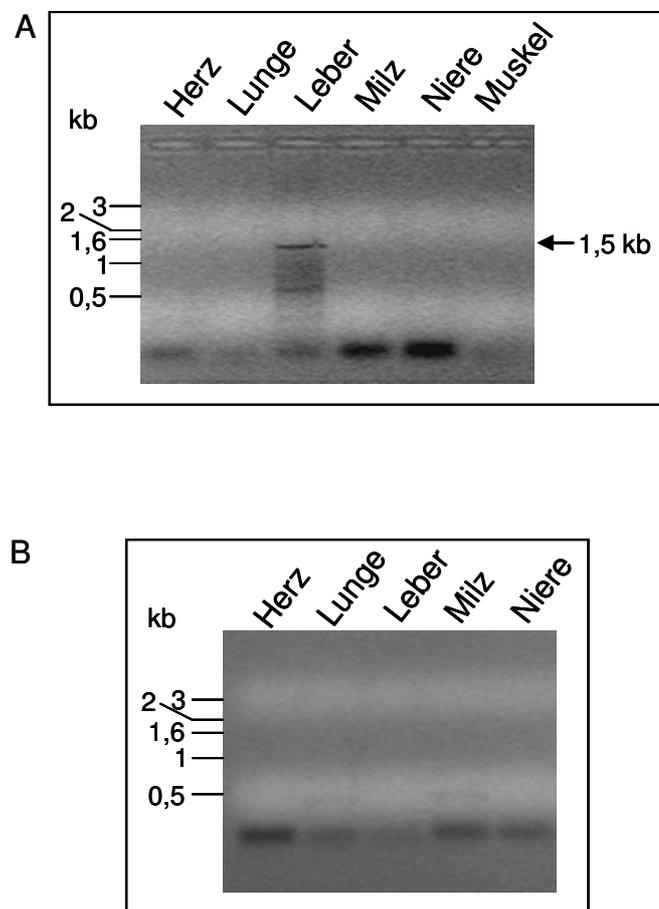


Abb. 25: Vektor-DNA ausschließlich in der Leber nachweisbar. Gesamt-DNA aus verschiedenen Geweben von C57BL/6-Mäusen wurde isoliert und mit den Primern CMV480.s und FIX-2220XbaI.a eine PCR durchgeführt, die spezifisch ein hFIX-Fragment aus der Vektor-DNA amplifiziert. **A** zeigt exemplarisch das Ergebnis aus einer mit dem Vektor rAAV6-FIX-tTA transduzierten Maus (Tier Nr. 3). Das 1,5 kb große Fragment war nur in der Leber nachweisbar (Pfeil). **B** zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Kontrollmaus (Tier Nr. 2), der statt Vektorpartikel NaCl injiziert worden war. Es war kein PCR-Produkt nachweisbar. Abkürzungen: kb: Kilobasenpaare

hFIX-Gen, so dass bei Vorhandensein von Vektorgenomen in den DNA-Proben ein 1,5 kb großes PCR-Produkt amplifiziert werden kann. In Abbildung 25 ist zu sehen, dass dies nur bei aus der Leber stammenden Proben der Fall war. Proben aus Herz, Lunge, Milz, Niere und Muskel waren negativ. Als Negativkontrolle wurde die DNA aus Organen verwendet, die völlig unbehandelten Mäusen entnommen worden waren oder aus Mäusen stammten, die an Stelle des Vektors NaCl bzw. PBS-MK injiziert bekommen hatten. Mit dieser Methode konnte, wie Abbildung 25 belegt, gezeigt werden, dass der Vektor – wie erwartet - nur die Leber infiziert.

3.4.2. Quantifizierung der Vektorgenomkopien in unterschiedlichen Organen und Geweben rAAV6-transduzierter C57BL/6-Mäuse

Mittels einer quantitativen PCR (qPCR) wurde in den verschiedenen Organen der getöteten C57BL/6-Mäuse die Anzahl der rAAV-Genomkopien pro Zelle ermittelt. Damit sollte die Lebertransduktionseffizienz des Vektors ermittelt werden und – sensitiver als es mit der vorher durchgeführten einfachen PCR möglich war – dessen Streuung in andere Organe genauer untersucht werden.

Die absoluten Werte, die bei der Messung der hFIX-PCR anfielen, gaben allerdings nur Auskunft über die Anzahl der Vektorgenome in der jeweiligen Probe. Um zu ermitteln, wie viele Vektorgenome auf jedes diploide Genom, also auf jede Zelle des jeweiligen Organs/Gewebes kamen, wurde eine weitere qPCR mit Primern durchgeführt, die ein Fragment des PBDG- Gens amplifizieren. Da von PBDG keine Pseudogene existieren, konnte somit mittels der beiden qPCRs errechnet werden, wie viele Vektorgenome durchschnittlich in jeder Zelle vorlagen.

Die fünf Mäuse, die über die Schwanzvene den Vektor intravenös verabreicht bekommen hatten, hatten zwischen 0,418 (Tier mit der geringsten Vektordosis) und 5,382 Vektorgenomkopien/diploidem Leberzellgenom (Tab. 9). Die Anzahl bei den beiden Kontrollmäusen lag bei bzw. nahezu bei null.

In der Tabelle 10 sind jeweils die Durchschnittswerte der Kopienanzahl von Vektorgenomen für die verschiedenen Organe aufgeführt. In der Leber waren durchschnittlich 2,396 (+/- 2,166) Vektorgenom pro Zelle zu finden, während in Niere, Milz, Lunge und im Muskelgewebe die Anzahl kaum höher war, als die in den Organen der Kontrolltiere. Nur im Herz waren immerhin noch 0,326 (+/- 0,338) Vektorgenomkopien pro Zelle zu finden.

| Leber | |
|--------------------|-------|
| Maus 1 (Kontrolle) | 0,002 |
| Maus 2 (Kontrolle) | 0,000 |
| Maus 3 (rAAV) | 1,808 |
| Maus 4 (rAAV) | 5,382 |
| Maus 5 (rAAV) | 0,528 |
| Maus 6 (rAAV) | 3,846 |
| Maus 7 (rAAV) | 0,418 |

Tab. 9: AAV-Vektorgenomkopien pro diploidem Leberzellgenom. rAAV-Genome wurden in der Leber von mit dem Vektor rAAV6-FIX-tTA behandelten Mäusen sowie Kontrolltieren (jeweils C57BL/6-Mäuse) mittels qPCR detektiert (s. Kapitel 2.14.3). Gezeigt ist jeweils die relative Anzahl von Genomkopien/Zelle.

| | Leber | Niere | Milz | Lunge | Herz | Muskel |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| rAAV- infizierte Mäuse | 2,396 +/- 2,166 | 0,017 +/- 0,015 | 0,010 +/- 0,014 | 0,003 +/- 0,002 | 0,326 +/- 0,338 | 0,015 +/- 0,015 |
| Kontroll- mäuse | 0,001 +/- 0,002 | 0,002 +/- 0,003 | 0,000 +/- 0,000 | 0,000 +/- 0,001 | 0,034 +/- 0,046 | 0,015 |

Tab. 10: AAV-Vektorgenomkopien pro Zelle in verschiedenen Organen. rAAV-Genome wurden in mehreren Organen von mit rAAV6-FIX-tTA transduzierten C57BL/6- und Kontrollmäusen (NaCl) mittels qPCR detektiert (s. Kapitel 2.14.3). Angegeben sind die Durchschnittswerte von fünf vektorbehandelten bzw. zwei Kontrollmäusen in Form von Genomkopien pro Zelle, inklusive Standardabweichung. Muskelgewebeproben lagen nur aus vier infizierten Mäusen und einer Kontrollmaus vor. Abkürzung: rAAV: rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus

3.4.3. Nachweis der Transkription der Transgene hFIX und tTA in der Leber von mit rAAV6-FIX-tTA behandelten C57BL/6-Mäusen

Um die Transkription der Transgene nach der Transduktion mit rAAV6-FIX-tTA nachzuweisen und sicherzustellen, dass nicht eine verminderte tTA-Transkription für die schlecht erkennbare FIX-Aktivitätssteigerung verantwortlich ist, wurde Gesamt-RNA aus den Lebern transduzierter Mäuse (C57BL/6) sowie von Kontrollmäusen isoliert. Als Kontrollen fungierten sowohl unbehandelte Tiere als auch Mäuse, denen an Stelle des Vektors NaCl verabreicht worden war. Es wurden ausschließlich Proben aus der Leber untersucht, da in den anderen Organen – wenn überhaupt - nur minimale Vektormengen detektiert worden waren und da, wegen des leberspezifischen Promotors, in den anderen Organen keine Transkription zu erwarten war.

Mit den RNA-Proben wurde eine reverse Transkription (RT) durchgeführt und anschließend die cDNA dazu verwendet, die verschiedenen Transkripte mittels PCR zu amplifizieren und im Gel sichtbar zu machen. In den Proben, die aus Lebern der mit dem Vektor behandelten Mäuse stammten, konnte sowohl die mRNA-Synthese des therapeutischen Transgens hFIX als auch die des regulatorischen Transgens tTA nachgewiesen werden (Abb. 26). Die Abbildungen 26A und 26B zeigen, dass in allen getesteten Leberproben der mit rAAV6-FIX-tTA behandelten Mäuse hFIX- und tTA-mRNA vorhanden war (Bahnen 3 - 7), nicht jedoch in denen der Kontrollmäuse (Bahnen 1 und 2). Um sicherzustellen, dass die PCR-Produkte wirklich auf cDNA und somit reversen Transkripten der mRNA basierten und nicht auf Vektor-DNA-Kontaminationen der Gesamt-RNA, wurden auch PCRs aus Kontrollansätzen durchgeführt, die parallel zur reversen Transkription, aber ohne reverse Transkriptase, angesetzt worden waren. Bei diesen Proben kann in der rt-Reaktion nur dann ein Produkt amplifiziert werden, wenn Vektor-DNA als Template vorliegt. Die Abbildung 26C zeigt das Gel mit dem Ergebnis einer solchen Kontrollreaktion für das Transgen tTA. Dort sind keine Banden zu sehen, so dass die Proben offensichtlich frei von Vektor-DNA waren. Als Positivkontrolle und zum Vergleich wurde auch auf das *housekeeping*-Gen GAPDH hin getestet (Abb. 26D). Dieses Gen wird dauerhaft exprimiert und sollte somit in jeder RT-Reaktion mit anschließender PCR nachweisbar sein. Sowohl die RNA-Proben von behandelten Tieren als auch die von Kontrollmäusen waren wie erwartet positiv.

Abb. 26: Nachweis der Transkription der Transgene hFIX und tTA. Aus Gesamt-RNA-Proben, die den Lebern von mit rAAV6-FIX-tTA behandelten C57BL/6-Mäusen (n = 5; A - D jeweils Bahnen 3 - 7) sowie Kontrollmäusen (n = 2; A - D jeweils Bahnen 1 und 2) entnommen worden waren, wurde von den Transgenen hFIX und tTA in einer reversen Transkription cDNA hergestellt, diese in PCRs amplifiziert und im Agarosegel sichtbar gemacht. Kontrollmäuse sind unbehandelte Tiere (A - D jeweils Bahn 1) oder wurden mit NaCl an Stelle des viralen Vektors (A - D jeweils Bahn 2) behandelt. Alle Primersequenzen sind in Kapitel 2.9 aufgeführt.

In **A** ist der Nachweis der hFIX-Transkription dargestellt. Es wurden die Primer FIX-FW und FIX-653.a eingesetzt, die ein 182 bp langes Fragment aus der hFIX-cDNA erzeugen. Bahnen 1 und 2: Proben aus Kontrollmäusen; Bahnen 3 – 7: Proben aus mit rAAV6-FIX-tTA transduzierten Mäusen; Bahn 8: Negativkontrolle der rT-Reaktion ohne Template.

In **B** ist der Nachweis der tTA-Transkription dargestellt. Es wurden die Primer tTA-824.s und tTA-Rev.a eingesetzt, die ein 177 bp langes Fragment aus der tTA-cDNA erzeugen. Bahnen 1 und 2: Proben aus Kontrollmäusen; Bahnen 3 – 7: Proben aus mit rAAV6-FIX-tTA transduzierten Mäusen; Bahn 8: Negativkontrolle der rT-Reaktion ohne Template; Bahn 9: PCR-Positivkontrolle mit Vektor-DNA als Template.

C zeigt den Nachweis, dass die RNA-Proben nicht mit Vektor-DNA kontaminiert waren. Bei der reversen Transkription wurde keine reverse Transkriptase eingesetzt. Es wurden die Primer tTA824.s und tTA-Rev.a verwendet, die ein 138 bp langes Fragment aus der tTA-cDNA erzeugen. Bahnen 1 und 2: Kontrollmausproben; Bahnen 3 – 7: Proben aus mit rAAV6-FIX-tTA transduzierten Mäusen; Bahn 8: PCR-Negativkontrolle ohne Template; Bahn 9: PCR-Positivkontrolle mit Vektor-DNA als Template.

D: Nachweis der Transkription des GAPDH, um als Vergleich zu den Transgenen die Banden eines konstant exprimierten *housekeeping*-Gens darzustellen. Es wurden die Primer mGAPDH682.s und mGAPDH826.a eingesetzt, die ein 144 bp langes Fragment aus der GAPDH-cDNA erzeugen. Bahnen 1 und 2: Proben aus Kontrollmäusen; Bahnen 3 – 7: Proben aus mit rAAV6-FIX-tTA transduzierten Mäusen; Bahn 8: Negativkontrolle der rT-Reaktion ohne Template.

Die Pfeile deuten auf die Laufhöhe der PCR-Produkte, zusätzlich angegeben ist die genau Basenpaarlänge. Abkürzungen: bp: Basenpaare; GAPDH: Glycerin-aldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; hFIX: humaner Faktor IX; M: DNA-Größenstandard; NaCl: Natriumchlorid; Neg.Kontrolle: Negativkontrolle; Pos.Kontrolle: Positivkontrolle; rAAV6: rekombinantes Adenoassoziiertes Virus Typ 6; Rkt.: Reaktion; rT: reverse Transkription; tTA: Tetracyclin-kontrolliertes Transaktivatorprotein

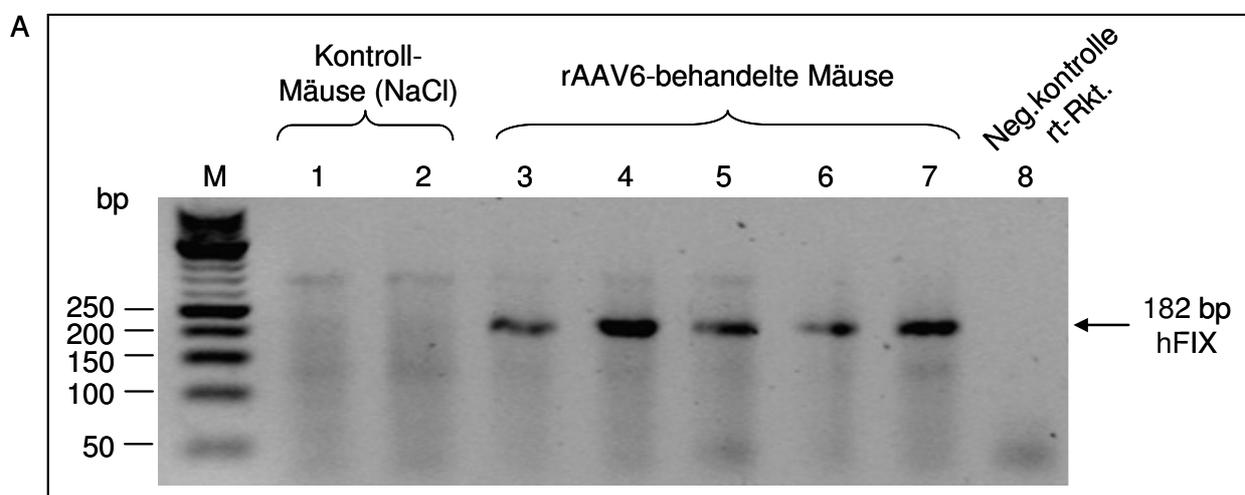
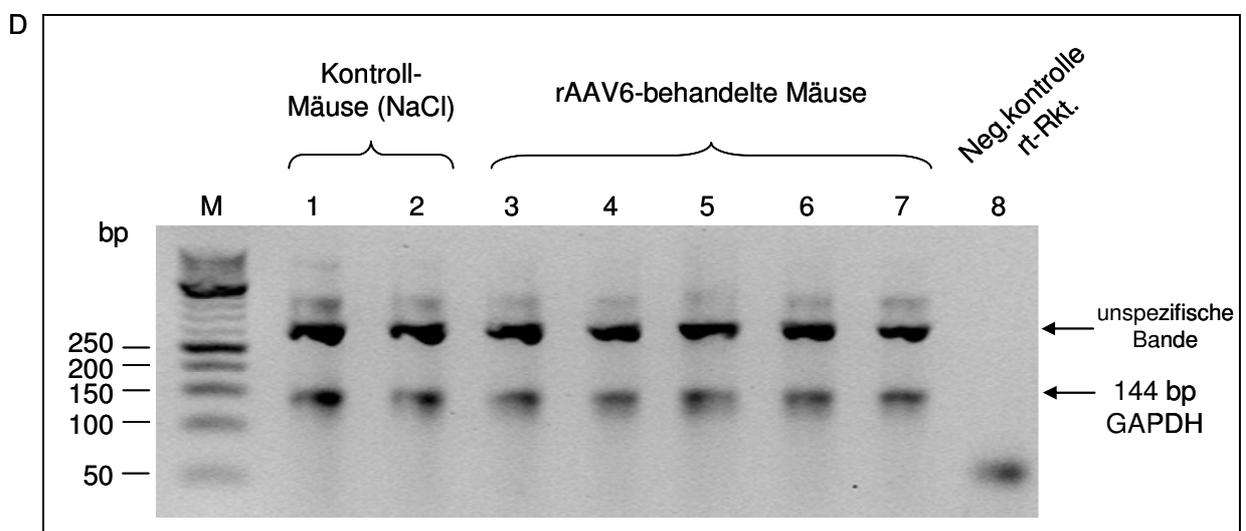
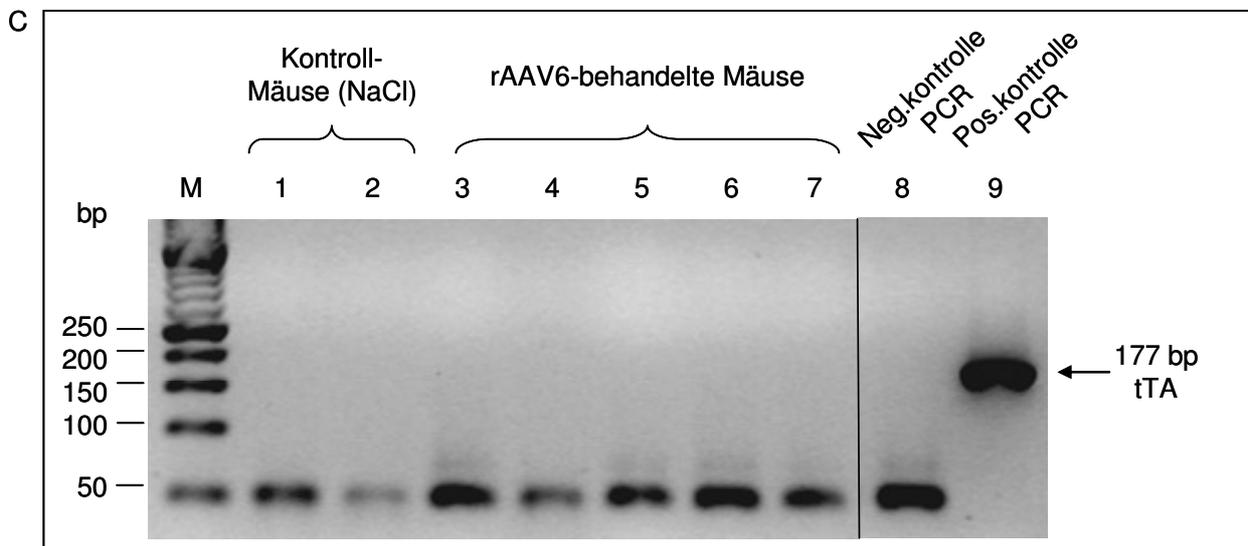
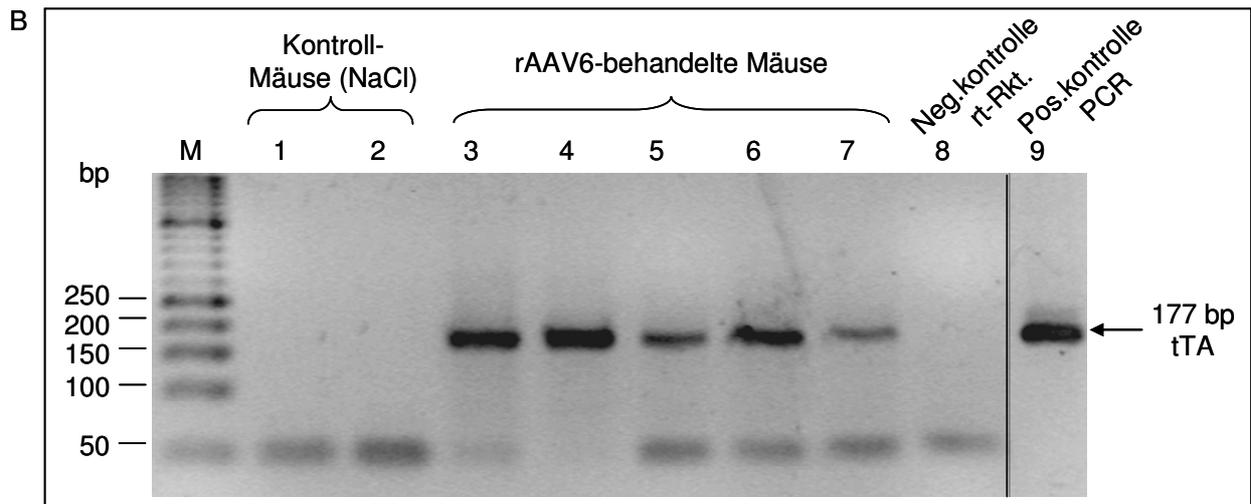


Abb. 25: (Fortsetzung)



4. Diskussion

In den vergangenen 15 Jahren wurde sehr intensiv an der Gentherapie der Hämophilie gearbeitet und zahlreiche Strategien sind bisher *in vitro* und *in vivo* in Tierversuchen und in klinischen Studien evaluiert worden. Mit Vektoren auf Basis des Adenoassoziierten Virus sind bisher sehr unterschiedliche FIX-Antigen-Level in den verschiedenen Tiermodellen erreicht worden. Sie reichten von wenigen ng/ml bis hin zu 130 µg/ml, was einem FIX-Level von 2600 % (Miao *et al.*, 2000b) entspricht. Solche superphysiologischen Werte stellen ein zukünftiges Problem dar, da es sich gezeigt hat, dass beim Menschen schon FIX-Aktivitätsspiegel von 129 U/dl – also nur 29 % über dem normalen Wert - das Risiko für eine tiefe Venenthrombose um den Faktor zwei bis drei erhöhen (van Hylckama Vlieg *et al.*, 2000). Auch Weltermann *et al.* (2003) stellten ein deutlich erhöhtes Risiko bei FIX-Aktivitätsspiegeln von über 138 U/dl fest.

Um dieses Risiko für gentherapeutisch behandelte Hämophilie B-Patienten zu minimieren, sollte die FIX-Expression möglichst schnell und effektiv gedrosselt/reguliert werden können. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, einen Vektor zu konstruieren, dessen Genexpression regulierbar ist.

4.1. Konstruktion eines rekombinanten Vektorplasmides auf Basis des Adenoassoziierten Virus

Bei der Planung des Vektors mussten einige grundlegende Überlegungen angestellt werden: so galt es, ein Zielorgan auszuwählen, zu entscheiden, welcher AAV-Serotyp verwendet werden sollte, wie der Vektor aufgebaut sein sollte, welches Regulationssystem der Vektor zu enthalten habe und wie er verabreicht werden sollte.

4.1.1. Zielorgan und Verabreichungsweg

Als Zielorgan wurde die Leber gewählt, da sie gegenüber den für die gentherapeutische hFIX-Expression ebenfalls häufig genutzten Muskeln einige Vorteile aufweist. Dazu gehört, dass sich in mehreren Mausstämmen (C57BL/6, Balb/c, Fv129) gezeigt

hat, dass intramuskuläre Injektionen – im Gegensatz zu lebergerichteter Verabreichung des Vektors – die Gefahr einer Antikörperbildung gegen das exprimierte FIX-Transgen erhöhen (Fields *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 1999; Herzog *et al.*, 1997; Nathwani *et al.*, 2001; Ge *et al.*, 2001). Zwar bildeten auch nach lebergerichteten rAAV-Verabreichungen einige Mausstämme Inhibitoren, jedoch wurde bei höheren FIX-Expressionsspiegeln Toleranz induziert (Mingozzi *et al.*, 2003) oder die Inhibitoren lagen nur transient vor (Arruda *et al.*, 2004a). Weitere Vorteile der Leber als Zielorgan sind die korrekt und vollständig stattfindende posttranslationale Modifikation des Proteins sowie bessere hFIX-Expressionsraten.

Als Verabreichungsweg bot sich die intravenöse Schwanzveneninjektion an, da sie im Vergleich zur intrahepatischen Verabreichung unkompliziert und für die Tiere gut verträglich ist. Außerdem ermöglicht diese Technik relativ gute Lebertransduktionsraten bei geringer Streuung in andere Organe sowie gute Transgenexpressionsraten. Fields *et al.* (2000) berichteten, dass nach der Verabreichung des Vektors über die Schwanzvene Expressionslevel erreicht wurden, die erstaunlich nahe an denen lagen, die nach intrahepatischer Verabreichung direkt in die Pfortader erzielt wurden (60 - 80 %).

4.1.2. Serotyp

AAV2

Eine weitere Frage, die es zu beantworten galt, war die des zu verwendenden AAV-Serotyps. Wir entschieden uns aus Gründen, die im Folgenden kurz dargelegt werden sollen, für die Serotypen AAV2 und AAV6.

In den meisten früheren Gentherapiestudien mit rekombinanten Adenoassoziierten Viren, wurde Vektoren auf Basis des Serotyps 2 verwendet, da dieser als erster intensiv untersucht worden war und über ihn am meisten bekannt ist (Samulski *et al.*, 1999): unter anderem seine bevorzugte Integrationsstelle AAVS1 auf Chromosom 19 (Balagué *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2000b), seine Bindung an den Zelloberflächenrezeptor Heparansulfat-Proteoglycan (HSPG) (Summerford & Samulski, 1998) sowie an die Korezeptoren $\alpha_v\beta_5$ -Integrin (Summerford *et al.*, 1999) und humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (FGFR1) (Qing *et al.*, 1999). Als diese Arbeit begonnen wurde, galt der AAV2-Serotyp als sehr vielversprechend, da er in verschiedenen Tiermodellen (Maus, Ratte, Hund, nichthumane Primaten) bereits

gute Ergebnisse geliefert hatte (Flannery *et al.*, 1997; Lewin *et al.*, 1998; Greelish *et al.*, 1999; Stedman *et al.*, 2000; Herzog *et al.*, 1999; Chao *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Mount *et al.*, 2002; Nathwani *et al.*, 2002) und auch schon in klinischen Studien eingesetzt worden war, und sich dabei bewährt hatte (Wagner *et al.*, 1998; Kay *et al.*, 2000; Manno *et al.*, 2003; Arruda *et al.*, 2002). Hinzu kam, dass zu Beginn dieser Arbeit nur wenige alternative Serotypen zur Verfügung standen und über diese auch noch relativ wenig bekannt war.

Zwei Nachteile von rAAV2-Vektoren bei der *in vivo*-Verwendung sind jedoch – im Vergleich zu adenoviralen Vektorsystemen oder auch aus heutiger Sicht im Vergleich zu anderen AAV-Serotypen (AAV8, Sarkar *et al.*, 2004; Nakai *et al.*, 2005) – (i) die relativ niedrige Transduktionsrate der Leberzellen, da nur ein begrenzter Anteil der Hepatozyten empfänglich für eine AAV2-Infektion ist (Miao *et al.*, 2000a) und (ii) die weite Verbreitung neutralisierende Antikörper gegen AAV2 in der Bevölkerung (je nach Alter und Wohnort 35 % – 80 % der Bevölkerung; Chirmule *et al.*, 1999; Erles *et al.*, 1999; Moskalenko *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2002). Besonders der zweite Punkt würde eventuell dazu führen, dass der Gentransfer mittels rAAV2 bei einer ganzen Reihe von Patienten ineffektiv sein könnte. Die Ursache der Antikörperentwicklung gegen AAV2 dürfte in der Präexposition zum Virus liegen, da AAV2 den Menschen – im Gegensatz zum Tier – auf natürliche Weise oft schon in der Kindheit infiziert. Eine nach Beginn der vorliegenden Arbeit durchgeführte klinische Studie führte zu dem Schluss, dass diese präexistierenden Antikörper gegen AAV2 möglicherweise die Transduktion nach intravenöser Verabreichung blockieren und den *Output* des Gentransfers verhindern (High *et al.*, 2004a). Gegen die meisten anderen Serotypen dagegen sind nur selten neutralisierende Antikörper in menschlichen Populationen zu finden (Gao *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 1999; Hildinger *et al.*, 2001).

Zu Beginn dieser Arbeit fiel die Entscheidung für das AAV2 somit auf Grund folgender Merkmale dieses Serotyps: (i) AAV2 war und ist bis heute der bestuntersuchte Serotyp, (ii) er galt als sehr risikoarm, (iii) er hatte – trotz geringer Lebertransduktionsraten – in verschiedenen Tiermodellen gute FIX-Expressionsspiegel bewirkt und er war (iv) für so vielversprechend befunden worden, dass er bereits in klinischen Studien, d.h. im Menschen, eingesetzt worden war.

AAV6

Einige neuere Studien besagen, dass pseudotypisierte Vektoren, bei denen die (zwischen den AAV2-ITRs lokalisierte) gentherapeutische Expressionskassette in Capside anderer AAV-Serotypen, z.B. AAV6, verpackt wurden (rAAV2/6, im folgenden rAAV6 genannt), effizienter die Leber transduzierten als rAAV2 (Gao *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2004). Der Grund hierfür sei möglicherweise das schnellere Entpacken der AAV-DNA (*uncoating, shedding*). Hierdurch lägen mehr Einzelstranggenome gleichzeitig nackt im Zellkern vor, so dass das *annealing* von (+)- und (-)-Strängen besser stattfinden könnte und die DNA somit stabilisiert würde, bevor sie von der Wirtszelle degradiert werden könne (Thomas *et al.*, 2004). Möglicherweise erreichen (r)AAV2-Partikel ein bestimmtes nukleares Kompartiment, in dem der Verpackungsvorgang stattfinden könnte, nicht so gut wie der AAV6-Serotyp. Xiao *et al.* (2002) stellten Ergebnisse aus HeLa-Zellkulturversuchen vor, die tatsächlich darauf hindeuten, dass ineffizientes *trafficking* Ursache für die etwas schlechtere Transduktionsfähigkeit von AAV2 ist.

Den besten Vergleich der auf unterschiedlichen AAV-Serotypen basierenden Vektoren beschrieben Grimm *et al.* (2003c). Hier waren, im Gegensatz zu anderen Studien (Zolotukhin *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2002; Auricchio *et al.*, 2001a,b; Kaludov *et al.*, 2002), alle Vektoren exakt identisch produziert und aufgereinigt worden (CsCl-Ultrazentrifugation), so dass ein zuverlässiger Vergleich möglich war. Dabei erwies sich die Transgenexpressionsrate von Serotyp 6-Vektoren in der Leber als nur geringfügig besser (1,3 x) als die von rAAV2; es stellte sich aber heraus, dass AAV6 eine deutlich schnellere Kinetik besitzt als AAV2 und damit auf AAV6 basierende Vektoren schneller höhere Transgenexpressionslevel erreichen (Grimm *et al.*, 2003c). Während außerdem die intravenöse Verabreichung viraler Vektoren auf Basis der meisten Serotypen zu niedrigeren hFIX-Werten führte als die Verabreichung direkt in die Leber (in Einzelfällen bis zu 84 x, bei rAAV2 etwa 3 x [Grimm *et al.*, 2003c; Mingozi *et al.*, 2002; Nakai *et al.*, 1999]), war bei rAAV6 bei der relativ hohen Dosis von 2×10^{12} vg/Maus die intravenöse Verabreichung über die Schwanzvene genau so produktiv wie jene über die Portalvene. (Grimm *et al.*, 2003b).

Es wurde festgestellt, dass die Transduktionseffizienz der unterschiedlichen AAV-Serotypen ferner von der Virusdosis und dem Zeitpunkt der Untersuchung abhängt. Auch dies erklärt die beobachteten Effizienzunterschiede in vielen Studien, da dort

oft nur eine Dosis und/oder nur ein Abnahmezeitpunkt untersucht worden war (Rabinowitz *et al.*, 2002).

Aus jüngster Zeit gibt es Hinweise, dass auch speziesspezifische Tropismen eine Rolle spielen. Eine Studie wies deutliche Effizienzvorteile von rAAV6 gegenüber rAAV2 in der Maus nach, während Unterschiede im Hundemodell nur gering waren (Jiang *et al.*, 2006). Auch in der Zellkultur hatte sich schon dieser speziesspezifische Tropismusunterschied gezeigt. Dort waren rAAV1 und rAAV2 in Maus- und menschlichen Pankreaszellen verglichen worden: während Mauszellen von einem rAAV1 effizienter transduziert wurden als von einem rAAV2, war es bei menschlichen Zellen genau umgekehrt (Zhang *et al.*, 2005).

Ein praktischer Vorteil von rAAV6 im Vergleich zu rAAV2 liegt bei der Präparation der Vektoren. So werden bei der rAAV2-Produktion nur 10 % der Viruspartikel ins Zellkulturmedium entlassen, während es bei der rAAV6-Produktion 40-60% sind. Dies führt zu einer gut doppelt so hohen Rate an Vektorpartikeln, die bei der Produktion entstehen (Grimm *et al.*, 2003b).

In Kürze zusammengefasst hat die Verwendung von rAAV6-Vektoren drei Vorteile: (i) sie zeigen einen guten Lebertropismus, (ii) sie liefern eine gute Ausbeute bei der Vektorpräparation und (iii) es gibt weniger präexistierende neutralisierende Antikörper in der Bevölkerung gegen AAV6 als gegen AAV2.

Nachdem die vorliegende Arbeit mit einem Vektor auf AAV2-Basis begonnen worden war, sich im weiteren Fortgang jedoch die Hinweise in der Literatur verdichteten, dass AAV6 eine Reihe von Vorteilen besitzt, wurde später mit einem pseudotypisierten Vektor auf Basis dieses Serotyps weitergearbeitet.

4.1.3. Bestandteile der Expressionskassette

Ein weiteres Problem bei der Verwendung von rAAV (und anderen Vektorsystemen) ist es, die bestmögliche Kombination aus Elementen wie Promotoren, Enhancern, regulatorischen Sequenzen, poly(A)-Sequenzen und zusätzlichen Fragmenten wie z.B. Introns zu finden, um eine gut funktionierende, effiziente Expressionskassette für das therapeutische Gen zu entwickeln. In mehreren Studien hat sich gezeigt, dass das Vektordesign empirisch erfolgen muss und immer wieder zu unvorhergesehenen Ergebnissen führt (Nathwani *et al.*, 2001). Die Entwicklung einer optimalen Expressionskassette ist eine der wichtigsten Strategien, um den therapeutischen Index von rAAV zu steigern.

In dieser Arbeit wurde daher ein Vektor aus verschiedenen Elementen kombiniert, die in vorhergehenden Studien in anderen Vektoren jeweils vielversprechende Ergebnisse geliefert hatten. Dabei musste berücksichtigt werden, dass die Größe der Expressionskassette durch die Aufnahmekapazität der AAV-Capside auf ca. 4,7 kb beschränkt ist. Als einzige virale Elemente kamen in dem Vektor die *inverted terminal repeats* (ITR) vor, da nur diese zwingend in *cis* vorliegen müssen, um den Ablauf des Lebenszyklus des rAAV zu ermöglichen.

Regulationssystem

Als Expressionsregulationssystem wurde das Tet-System – erstmals von Gossen & Bujard (1992) beschrieben - unter anderem deshalb gewählt, weil dessen Bestandteile, z.B. das tTA-Gen, im Vergleich zu anderen Regulationssystemen wie etwa dem durch Rapamycin induzierbaren, klein sind, so dass es sich gut für einen viralen Vektor mit geringer Aufnahmekapazität wie AAV eignet (Baron & Bujard, 2000). Außerdem hat das Tet-System den Vorteil einer guten an/aus-Regulation mit einer guten dosisabhängigen Induzierbarkeit, einer kurzen Reaktionszeit und einer hohen Spezifität (Urlinger *et al.*, 2000). Des Weiteren gibt es keine Interferenzen mit zellulären Mechanismen, da es aus einem prokaryotischen Organismus stammt. Somit ist keine endogene Expression in Säugerzellen möglich (Gossen *et al.*, 1993). Mit Tetracyclin (Tet) liegt zudem ein verträglicher Induktor vor, der auch durch sein Analogon Doxycyclin (Dox) ersetzt werden kann. Dox ist als Antibiotikum gebräuchlich, passiert Zellmembranen und hat keine Nebenwirkungen wie sie die Induktoren anderer Systeme, z. B. Schwermetallionen, Isopropyl- β -D-thiogalactoside, Hormone (Corticosteroide, Progesteron-Antagonisten), haben.

Bereits sehr geringe Dosen Dox (im ein- bis zweistelligen Nanogrammbereich) reichen aus, um die Genexpression zu regulieren (Kringstein *et al.*, 1998; Corti *et al.*, 1999; Hasan *et al.*, 2001). Die Aktivierung des TRE-Promotors durch Dox ist zudem dosisabhängig, so dass die Transgenexpression über ein breites Fenster an Induktorkonzentrationen kontrolliert werden kann (Urlinger *et al.*, 2000).

Es gibt zwei Möglichkeiten, das Tet-System einzusetzen. Erstens die Verwendung von zwei Vektoren (Gossen und Bujard, 1992; Rendahl *et al.*, 1998) und zweitens die Kombination beider Expressionskassetten zu einer einzigen dualen Kassette in nur einem Vektor (Corti *et al.*, 1999; Dugray *et al.*, 2001; Ogueta *et al.*, 2001; Fitzsimons *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Chtarto *et al.*, 2003). Im ersten Fall enthalten beide

Vektoren jeweils eine Expressionskassette: entweder die regulierende oder die therapeutische. Die therapeutische Expressionskassette enthält das therapeutische Gen unter der Kontrolle des TRE-Promotors, die regulierende das Transaktivatorgen (tTA), welches für das tetracyclinsensible tTA-Protein kodiert, welches unter der Kontrolle eines konstitutiven, viralen oder gewebespezifischen Promotors steht (s. Abb. 6). Der Vorteil der Zwei-Vektoren-Variante ist die stringenter an/aus-Regulierung, auf die im weiteren Verlauf noch genauer eingegangen wird. Für die vorliegende Arbeit wurde die Verwendung der dualen Expressionskassette in nur einem Vektor vorgezogen. Auf diese Weise konnten geringere Mengen rekombinanter Viren verabreicht werden, was sowohl die Belastung für die Tiere verringerte als auch den Zeit-, Material- und Kostenaufwand für die Vektorpräparation senkte. Alle transduzierten Zellen exprimierten nun sowohl das Transgen als auch das Regulatorgen. Die Zusammenfassung der beiden Expressionskassetten zu einer einzigen dualen Kassette war nur auf Grund der relativ geringen Größe des Tet-Systems möglich. Das komplette Konstrukt war kleiner als 4,7 kb und konnte somit problemlos in die AAV-Capside verpackt werden.

Zusammengefasst sprachen somit viele Faktoren für die Verwendung des Tet-Systems: (i) es ist relativ klein, was für die Verwendung im AAV-Vektor, besonders unter Berücksichtigung des Gebrauchs einer dualen Expressionskassette, wichtig ist, (ii) es besitzt eine gute Regulierbarkeit mit einem gut verträglichen Induktor und (iii) es ist prokaryotischer Herkunft, wodurch keine Gefahr zellulärer Interferenzen besteht.

Nachdem die Wahl auf das Tet-System gefallen war, musste noch zwischen Tet Off- und Tet On-System gewählt werden. Hier waren das zu exprimierende therapeutische hFIX-Gen und die zu behandelnde Krankheit, die Hämophilie B, ausschlaggebend: da die transduzierten Zellen im Idealfall dauerhaft hFIX exprimieren sollten und nur im Ausnahmefall, bei zu starker hFIX-Expression, die Aktivität des hFIX-Gens herunterreguliert werden sollte, bot sich das Tet Off-System an. Hier muss Dox nur verabreicht werden, wenn die Expression inhibiert werden soll, während beim Tet On-System dauerhaft Dox verabreicht werden muss und erst ein Absetzen des Dox die Expression des Transgens herunterreguliert. Außerdem reagiert das Tet Off-System sensibler und schneller auf geringere Mengen Dox als das Tet On-System (Mizuguche & Hayakawa, 2002). Ein Organismus nimmt offensichtlich schneller zugeführtes Dox auf, als er nach Beenden der Dox-Gabe (wie beim Tet On-System nötig wäre) das noch im Körper vorhandene Dox völlig abbaut und/oder ausscheidet.

Promotor

Der Einsatz des Tet Off-Systems bedeutete, dass das hFIX-Gen somit im Vektor unter der Kontrolle des *Tet response elements* (TRE) stehen würde. Nun musste ein Promotor gewählt werden, der die tTA-Expression steuern würde. Die Wahl des Promotors ist entscheidend für hohe Expressionslevel und eine dauerhafte Expression des therapeutischen Gens (Snyder *et al.*, 1999b). Dabei stehen grundsätzlich mehrere Möglichkeiten zur Verfügung: der Einsatz eines ubiquitären Promotors aus Säugetieren, der in allen Zellen funktioniert (z. B. *elongation factor 1 α* -Promotor), die Verwendung von viralen Promotoren, die oft eine starke Transgenexpression in allen Zellen bewirken (z.B. CMV-Promotor), oder die eines gewebespezifischen Promotors. Ubiquitäre Promotoren wurden unseres Wissens in Gentherapieprotokollen so gut wie nie verwendet. Der Grund dürfte die relativ schwache Expression sein, die von ihnen ausgeht. Der oft in Gentherapieprotokollen verwendete CMV-Promotor ermöglicht eine deutlich höhere Expression als gewebespezifische Promotoren, auch in primären Hepatocyten *in vitro*. Er wird aber in der Leber durch transkriptionelles *silencing* effizient stillgelegt und vermittelt dort nur eine geringe Transgenexpression (Ponder *et al.*, 1991; Kay *et al.*, 1992; Everett *et al.*, 2004). Gerade die Leber ist jedoch der natürliche Syntheseort des FIX und hält somit die nötige zelluläre Maschinerie für die natürlichen posttranslationalen Modifikationen des reifen Proteins bereit. Letzteres könnte möglicherweise auch ein Grund dafür sein, dass die Leber eine bessere Umgebung für rAAV-vermittelte FIX-Synthese darstellt als Muskeln (Snyder *et al.*, 1999b).

Da die Interaktion des Promotors und der regulatorischen Elemente mit dem Transkriptionsapparat der Wirtszelle wichtig für eine effiziente Transkription ist, wurde schließlich ein gewebespezifischer Promotor eingesetzt. Ein weiterer Grund, der für die Wahl eines leberspezifischen Promotors (LSP) sprach, war der Sicherheitsaspekt. Die Leberspezifität des Promotors beschränkt die Expression des hFIX-Gens auf das Zielgewebe, so dass durch die in geringem Maße vorkommende Streuung des Vektors in andere Organe nicht die Gefahr besteht, dass FIX in anderen Geweben exprimiert wird. Dies war besonders deshalb wichtig, weil der Vektor systemisch (intravenös) über die Schwanzvene verabreicht werden sollte (Ge Y, 2001) und somit die Verteilung des Vektors im Organismus nach der Verabreichung nicht beeinflusst werden konnte.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der für die Verwendung eines LSP sprach, war das geringere Risiko einer Anti-FIX-Antikörperbildung (Inhibitorbildung). Wie die konventionelle Therapie der Hämophilie mit Faktorenkonzentraten beinhalten auch Gentherapieprotokolle das Risiko der Inhibitorbildung. Studien haben jedoch gezeigt, dass das Risiko verringert werden kann, indem die Expression des Transgens auf Hepatozyten beschränkt wird (Follenzi *et al.*, 2004; De Geest *et al.*, 2003; Nathwani *et al.*, 2001; Mount *et al.*, 2002; Mingozi *et al.*, 2003; Chuah *et al.*, 2003).

Letztlich fiel die Wahl auf den leberspezifischen Promotor *haat*. Dieser war bereits in verschiedenen Vektoren für den lebergerichteten Gentransfer eingesetzt worden: in retroviralen Vektoren (Hafenrichter *et al.*, 1994; Okuyama *et al.*, 1996), in adenoviralen Vektoren (Morrall *et al.*, 1998; Schiedner *et al.*, 1998; De Geest *et al.*, 2000; Van Linthout *et al.*, 2002, Srour *et al.*, 2003) und beim Gentransfer mit einem Vektor auf Basis des HSV1-Virus (Lam *et al.*, 2007) sowie auf Basis des AAV (Lee *et al.*, 2004). Auf Grund der geringen Aufnahmekapazität der AAV-Capside (höchstens 4,7 kb) wurde für diese Arbeit eine 405 bp kurze Version dieses Promotors verwendet, die – nur um 15 Basenpaare länger - bereits in einem adenoviralen Vektor erfolgreich eingesetzt werden konnte (Srour *et al.*, 2003). Die 420 bp große Version von Srour *et al.* konnte in der vorliegenden Arbeit aus klonierungstechnischen Gründen nicht eingesetzt werden, da eine BglII-Schnittstelle am Anfang des Promotors entfernt werden mußte.

Der Promotor wurde für die vorliegende Arbeit mit einer vierfachen Wiederholung des Apolipoprotein-Enhancers (apoE.4x) kombiniert, die *downstream* des Promotors in den Vektor eingebaut wurde. In einer Studie mit einem adenoviralen Vektor hatte sich herausgestellt, dass die Transgenexpression (in jenem Fall Apolipoprotein A-I) signifikant höher war (bis zu 8,9 x), wenn der apoE-Enhancer in einer vierfachen Wiederholung eingesetzt wurde. Wie wichtig die richtige Promotor-Enhancer-Kombination ist, zeigten folgende Ergebnisse: wurde diese vierfach wiederholte Enhancersequenz zusammen mit dem apoE-Promotor eingesetzt, war die Steigerung der Transgenexpression dauerhaft. Wurde dagegen der apoE.4x-Enhancer mit einer Kombination aus CMV- und apoE-Promotor verwendet, war die Transgenexpression nur transient (De Geest *et al.*, 2000).

Für eine 3'-Platzierung des Enhancers entschieden wir uns auf Grund der Ergebnisse von Van Linthout *et al.* (2002). Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass ein *haat*-Promotor mit 3'-platziertem apoE.4x-Enhancer im Vergleich zu einem Vektor, der nur

den haat-Promotor enthielt, eine enorme, allerdings transiente Transgenexpressionssteigerung herbeiführte (140 x am Tag 6). Als längerfristig erfolgreich erwies sich zwar eine 5'-Platzierung der apoE.4x-Wiederholung, in diesem Fall war die Expressionsrate aber deutlich geringer als bei dem Vektor, der den haat-Promotor ohne diesen Enhancer enthielt.

Die Kombination eines rAAV mit dem haat-Promotor (schätzungsweise zwischen 400 bp und 500 bp groß) und einem 5'-gelegenen apoE-Enhancer hat sich 2004 zumindest *in vitro* in HepG2-Zellen als erfolgreich herausgestellt (Lee *et al.*, 2004). Schuettrumpf *et al.* (2005) verwendeten erfolgreich einen rAAV2-Vektor, der *in vivo* (C57BL/6-Mäuse) unter Kontrolle eines haat-apoE-Promotor/Enhancer-Komplexes FIX exprimierte (4 µg/ml FIX:Ag).

4.1.4. Klonierung

Die Klonierung des Vektors war außerordentlich aufwendig, da die verschiedenen Elemente aus unterschiedlichen Plasmiden herausgeschnitten oder –amplifiziert werden mussten. Ebenso war die Verwendung von Zwischenplasmiden nötig. Einige sorgfältig geplante Klonierungsschritte funktionierten überhaupt nicht, so dass viele Restriktionsstellen generiert bzw. entfernt oder ganze Fragmente in andere Plasmide umkloniert werden mussten. So sollte beispielsweise ein großer Teil der Expressionskassetten im Plasmid pZS2-haat-rtTAM2 (s. Appendix) zusammengefügt werden. Nachdem das Fragment apoE.4x einkloniert worden war, sollte im nächsten Schritt das mit HindIII-Schnittstellen versehene tTA-Gen zwischen die haat-apoE.4x- und die bgh.p(A)-Sequenz eingebaut werden. Dieser Klonierungsschritt erwies sich aber als nicht machbar. Erst eine Umklonierung des haat-apoE.4x-bgh-Fragments in ein anderes Plasmid (pAd5-TRE2-FIX; PCR 1 und Ligation 2 in Abb. 7) ermöglichte schließlich den nun völlig problemlosen Einbau des tTA-Gens an der gewünschten Stelle in der

richtigen Orientierung. In diesem Plasmid wurden dann auch die weiteren Klonierungsschritte durchgeführt und die gesamte Expressionskassette zusammenkloniert.

Des Weiteren war ursprünglich geplant gewesen, die beiden AAV-ITRs in zwei letzten Schritten an die beiden Enden der fertigen dualen Expressionskassette zu klonieren, um möglichst wenig Plasmidpräparationen mit Plasmiden, welche die ITRs enthielten, durchführen zu müssen. Der Grund dafür war die palindromische Sekundärstruktur (mit *hairpin*-Bildung), die eine sehr starke Neigung der ITRs zur Rekombination

ination bewirkt. Es war aber – eben wegen dieser besonderen Struktur – weder möglich, die ITRs nach der Isolierung durch Restriktionen in das gewünschte Plasmid zu klonieren, noch sie mittels PCR (auch nicht Fragmente mit großen Überhängen 3' und 5' der ITRs) zu amplifizieren oder sie extern (Eurogentec, Seraing, Belgien) synthetisieren zu lassen. So blieb nur die Möglichkeit, die gesamte Expressionskassette komplett mittels *long distance*-PCR zu amplifizieren und in das bereits ITRs enthaltende pTR-UF5-Plasmid (s. Appendix) einzubauen (s. Abb. 9 und Ligation 6 in Abb. 10).

Auch die BglII-Schnittstelle im haat-Promotor erschwerte die Klonierung. Da nach der *long distance*-PCR, welche die benötigten BglII-Schnittstellen generierte, mit diesem Restriktionsenzym geschnitten werden musste, um überhängende Enden für die Ligation zwischen die ITRs zu schaffen, musste diese Schnittstelle unbedingt aus dem haat-Promotor entfernt werden (s. Abb. 9). Ihr Vorhandensein fiel aber erst nach mehreren vergeblichen Klonierungsversuchen durch Restriktionen mit Enzymen unterschiedlicher Hersteller auf.

Die abschließende Klonierung der kompletten Restriktionskassette zwischen die ITRs war auf Grund der oben erwähnten palindromischen Struktur und der dadurch bedingten Rekombinationsfreudigkeit besonders problematisch. Um die Rekombinationsereignisse auf ein Minimum zu reduzieren, wurde nach Transformation der Bakterien die Kultur nicht wie üblich bei 37° C, sondern bei 32° C inkubiert (Schnepf und Clark, 2002).

4.1.5. Überprüfung des fertigen Vektorplasmides

Die komplette Expressionskassette wurde nach Fertigstellung des Vektorplasmides durchsequenziert, um mögliche Mutationen zu finden. Dazu wurden Primer verwendet, von denen aus in *sense*- oder *antisense*-Richtung überlappende Expressionskassettbereiche sequenziert und anschließend überprüft wurden. So konnte die komplette duale Kassette abgedeckt werden (s. Abb. 13). Die Bereiche der ITRs, die Haarnadelstrukturen ausbildeten, waren jedoch nicht sequenzierbar, so dass diese mit Hilfe von Restriktionen und Vergleich des Bandenmusters im Agarosegel auf ihre Korrektheit überprüft wurden. Es zeigte sich, dass das Vektorplasmid fehlerfrei vorlag.

4.1.6. Produktion der rekombinanten Viren

Ein besonders kritischer Punkt bei der Herstellung rekombinanter Adenoassoziierter Viren war die Transfektion der Produktionszellen, da diese einen sehr großen Einfluss auf die Viruskonzentration (Virustiter) der fertigen Präparation hat.

Bei der Herstellung der rekombinanten Viren in der Zellkultur mussten in den Produktionszellen die fehlenden AAV-Gene *rep* und *cap* ebenso wie die adenoviralen Helfergene bereitgestellt werden. Eine einfache Möglichkeit böte hierbei die Verwendung einer Produktionszelllinie, die stabil die *rep*- und *cap*-Gene ins Chromosom integriert hat. Eine zusätzliche Infektion mit Adenoviren könnte die erforderlichen helferviralen Gene beisteuern. Die Entfernung bzw. Inaktivierung der kontaminierenden Helferviren ist jedoch nur unvollständig möglich oder geht mit einem 50 %-Verlust der rAAV-Partikelaktivität einher. Ebenso hat sich gezeigt, dass bei der Herstellung einer stabilen Produktionszelllinie die Rep-Proteine zytotoxisch wirken (Saudan *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2000).

Alternativ werden die in *trans* benötigten Gene oft in Form von zwei Helferplasmiden bereitgestellt: ein AAV-Plasmid mit den *rep*- und *cap*-Genen sowie ein Helfervirusplasmid mit den adenoviralen Helfergenen. Diese beiden Plasmide müssen dann zusammen mit dem konstruierten Vektorplasmid in einer Tripletransfektion in die Zellen eingebracht werden. Da diese Tripletransfektion jedoch recht ineffizient ist, wurde das Verpackungsplasmid pDG (Grimm *et al.*, 1998) bzw. pDP6 (Grimm *et al.*, 2003b) verwendet. Beide enthalten sämtliche in *trans* benötigten Gene (AAV-*rep* und -*cap*, sowie die adenoviralen Gene E2a, E3, E4 und VA). Diese Verpackungsplasmide unterscheiden sich in den *cap*-Genen: während pDG für AAV2-Capside kodiert, kodiert pDP6 für AAV6-Capside. Die Produktionszellen mussten also nur noch mit dem Vektor- und einem der Verpackungsplasmide kotransfiziert werden.

Beim Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden stellte sich die CaPO₄-Methode als für die rAAV-Produktion am effektivsten heraus. Obwohl mit anderen Techniken wie TransPEI oder Lipofectamine höhere Transfektionsraten in den GFP-Kontrollen erreicht werden konnten (über 90 % im Gegensatz zu durchschnittlich ca. 70 % mit CaPO₄), führten CaPO₄-Transfektionen zu den höchsten Virustitern (s. Tab. 8). Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass diese Methode die mit Abstand kostengünstigste ist. Da die Transfektionsrate einen entscheidenden Einfluss auf den Virustiter hat, wurde die CaPO₄-Transfektion unter verschiedenen Bedingungen getestet, so dass schließlich ein optimaler pH-Wert von 7.05 und eine optimale CaCl₂-Konzentration

von 250 mM ermittelt wurden. Da kleinste Abweichungen im für die Transfektionen benötigten 2x HBS-Puffer zu sehr variablen Ergebnissen führten, machte das Aufbrauchen einer Puffercharge trotzdem jeweils neue Austestungen erforderlich, um von mehreren Pufferansätzen (mit kaum noch beeinflussbaren Ionenkonzentrations- und pH-Unterschieden) den besten herauszusuchen. Nach der Transfektion der Produktionszellen folgte die Ernte und Aufarbeitung der rekombinanten Viren mittels Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation.

Für die Präparation der Vektoren auf Basis des rAAV2 (rAAV2-FIX-tTA) wurde zuerst die weitere Aufreinigung mittels Heparinagarose versucht, da die Capsidproteine dieses Serotyps an Heparin binden (Summerford & Samulski, 1998). Dazu musste die virushaltige abgenommene Iodixanolphase erst verdünnt werden, da die 40 %-Iodixanollösung recht zähflüssig ist. Nun wurden durch zwei Filter erst Zelltrümmer und mögliche bakterielle Kontaminationen entfernt (5 und 0.2 µm-Filter). Die stark verdünnte Viruslösung wurde schließlich auf die Heparinagarosesäule gegeben. Das Verdünnen stellte sich als sehr wichtig heraus, da die Säule sehr leicht verstopfte. Durch Waschen mit einem Waschpuffer sollte ein Großteil kontaminierender Proteine entfernt werden. Die Abbildungen 17A und B machen deutlich, wie unterschiedlich konzentriert die verschiedenen Virenpräparationen ausfallen können und wie wenig effizient bzw. wie verlustreich die Säulenaufreinigung ist. Für die starken Verluste ist allerdings auch die auf die Säule folgende Aufkonzentrierung mit Centricons mitverantwortlich. In deren Membran blieben nämlich bis zu 90 % der von der Säule eluierten Viruspartikel zurück. Insgesamt war somit die Virusaufreinigung mittels der Heparinagarosesäule sehr ineffizient und nicht zufriedenstellend. Auch andere Gruppen stellten diesen Mangel der Heparinsäulenaufreinigung bereits fest (Anderson *et al.*, 2000). Kaludov *et al.* (2002) zeigten, dass es außer zu Verlusten von bis zu 50 % durch die Heparinagarosesäule auch zu einer Ansammlung leerer Capside kam, die die Infektiosität der Präparation herabsetzte.

Die nicht zufriedenstellenden Ergebnisse der Heparinsäulenaufreinigung führten schließlich zu der Entscheidung, diesen Schritt bei der Viruspräparation zu umgehen. Besonders auch, da ein weiterer, pseudotypisierter Vektor auf Basis des AAV-Serotyps 6 untersucht werden sollte (rAAV6-FIX-tTA). Dieser Serotyp bindet nicht an Heparin (unseres Wissens ist zur Zeit kein Rezeptor für AAV6 bekannt), so dass ohnehin eine Alternative zur Heparinsäule gefunden werden musste. Eine Möglichkeit wäre gewesen, an Stelle der Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation zu der

seit längerer Zeit bekannten Methode der CsCl-Ultrazentrifugation zurückzukehren (Matsushita *et al.*, 1998). Dies war jedoch keine sinnvolle Option, da diese Methode sehr langwierig ist und, wie die Heparinagarosesäule, zu hohen Verlusten führt. Da eine nicht allzu große Menge Iodixanol in der Virenpräparation bei *in vivo*-Versuchen in Mäusen keine nachweisbaren Schäden verursacht (persönliche Mitteilung, H. Fechner, Benjamin Franklin Hospital, Berlin), wurde entschieden, die Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation beizubehalten, aber auf die Heparinagarosesäule zu verzichten und die Virus-Iodixanol-Lösung mit Vivaspin 20-Röhrchen direkt aufzukonzentrieren.

Für die Quantifizierung der Viruspräparationen wurde eine Methode gewählt, bei der nicht die Capside quantifiziert werden, sondern die rAAV-Genome, da bei der Herstellung der rekombinanten Viren auch leere Viruspartikel anfallen, die bei der Präparation mitisoliert werden. Aus diesem Grund wurden alle Angaben über die Virusdosis in dieser Arbeit in Vektorgenomen (vg) und nicht Vektorpartikeln (vp) gemacht. Durch die verschiedenen Modifikationen der Viruspräparation konnte der Virustiter letztlich von zu Beginn ca. 6×10^{10} auf ca. 8×10^{12} vg/ml gesteigert werden.

4.2. Expression von hFIX *in vitro*

4.2.1. Abschaltbare Expression von humanem FIX *in vitro*

Bevor der rAAV2-FIX-tTA-Vektor in Tierversuchen getestet würde, sollte seine Funktionalität *in vitro* nachgewiesen werden. Außerdem sollte auf diese Weise eine Basis geschaffen werden, um später Vergleiche mit den geplanten *in vivo*-Studien zu ermöglichen. Die Transduktion von humanen Hepatom- (HepG2-) Zellen mit 1×10^4 Vektorgenomen (vg)/Zelle des Vektors rAAV2-FIX-tTA führte nach einer Inkubationszeit von 48 h in Abwesenheit von Dox zu einer Expression von 23,8 pg humanem FIX/Zelle/ml Medium. Dieser Wert lag noch etwas höher als die Ergebnisse des besten von vier untersuchten Vektoren einer Studie von Nathwani *et al.* (2001). Dort wurden in HepG2 mit konstitutiven Promotoren zwischen 1 und 21 pg hFIX/Zelle/ml und mit einem leberspezifischen etwa 6 pg hFIX/Zelle/ml erreicht.

Dass der Vektor abschaltbar war, zeigte die Inkubation von transduzierten Zellen in mit 10 ng Dox/ml versetztem Medium. Hier zeigte sich auch der Vorteil des Tet Off-

Systems im Vergleich zum Tet On-System: das System hatte nur eine kurze Reaktionszeit bis Dox wirkte und es war nur eine geringe Dox-Konzentration nötig. In der Zellkultur dauerte es beim Tet On-System sechs Tage, bis nach Doxycyclin-Entzug der niedrigste Level (3,5 % des Maximums) erreicht war (Haberman *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit dagegen wurde unter Verwendung des Tet Off-Systems die minimale Transgenexpression nach Dox-Zugabe innerhalb von 48 Stunden erreicht. Dieses Minimum (5,12 pg/Zelle/ml Medium) lag bei ca. 25 % der maximalen Expressionsrate (Abb. 21). *In vitro*-Vergleiche in einer Reihe von Zellen mit den beiden Systemen Tet On und Tet Off in einem adenoviralen Vektor hatten gezeigt, dass sich das Tet Off-System bereits mit einer Dox-Konzentration von 10 ng/ml, die auch in diesem Versuch verwendet wurde, komplett herunterregulieren ließ, während zur Induktion des Tet On-Systems 1000 ng/ml Dox benötigt wurden (Mizuguche & Hayakawa, 2002). Außerdem hatte das Tet Off-System in dieser Studie angeschaltet zu einer 3 - 25 x höheren Transgenexpression geführt als das Tet On-System (Mizuguche & Hayakawa, 2002).

Kontrollzellen der vorliegenden Arbeit, die nicht mit dem Vektor behandelt worden waren, zeigten erwartungsgemäß keine hFIX-Expression. Der genaue Wert lag bei 0,45 pg hFIX/Zelle/ml Medium, was den Werten der Negativkontrolle des ELISA-Kits entspricht. Der Vektor rAAV2-FIX-tTA war somit funktional und die hFIX-Expression ließ sich durch Dox-Zugabe in geringer Konzentration deutlich und schnell reduzieren.

In dieser Arbeit konnte – wie auch bei anderen Studien mit transient transfizierten Zellen (Habermann *et al.*, 1998) – die An- und Abschaltbarkeit mit Doxycyclin in der Zellkultur auf Grund der starken Zellproliferation nicht über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Eine Lösung dieses Problems wäre die Herstellung einer stabilen Zelllinie gewesen. Da aber die Übertragbarkeit von Zellkulturergebnissen auf *in vivo*-Studien nicht gegeben ist (Arruda *et al.*, 2004a) und *in vitro*-Versuche einen hohen Zeit- und Kostenaufwand bedeuten (Zellkulturversuche verbrauchen mit allen Kontrollansätzen relativ große Mengen rekombinanter Viren, da die Ansätze nicht zu wenige Zellen enthalten dürfen, um gut mittels ELISA detektierbare hFIX-Mengen zu erzeugen), wurde für die vorliegende Arbeit darauf verzichtet.

Die im abgeschalteten Zustand immer noch erkennbare hFIX-Expression kann mit dem für das Tet-System bekannten Phänomen der „Durchlässigkeit“ (*leakyness*) erklärt werden. Verantwortlich hierfür können die ITRs sein, die Enhancer und Pro-

motorkontrollelemente enthalten (Flotte *et al.*, 1993a, Haberman *et al.*, 2000). Während bei Retroviren diese Bereiche der den AAV-ITRs entsprechenden LTRs (*long terminal repeats*) deletiert werden können (Hofmann *et al.*, 1992; Unsinger *et al.*, 2001), führt dies bei den AAV-ITRs zu replikations- und verpackungsdefizienten Konstrukten (Habermann *et al.*, 2000). Bei Vektoren mit dualen Expressionskassetten, welche die regulatorische tTA- ebenso wie die therapeutische hFIX-Kassette gemeinsam enthalten, könnten auch Interferenzen zwischen dem *Tet response element* TRE und dem die tTA-Expression steuernden Promotor für die vorhandene schwache hFIX-Restexpression verantwortlich sein.

Die etwas höhere Durchlässigkeit des Tet Off-Systems im aus-Zustand kann zwar problematisch werden, wenn toxische Gene verwendet werden (z.B. bei der Gentherapie von Krebs), sollte im Falle der in dieser Arbeit anvisierten hFIX-Expression für die Behandlung der Hämophilie B aber keine negativen Einflüsse haben. Die Abschaltung des Expressionssystems braucht hier nicht die völlige Einstellung der Transgenexpression zu bewirken, sondern soll nur superphysiologische FIX-Konzentrationen verhindern.

Falls nötig bestehen jedoch Möglichkeiten diese Durchlässigkeit zu minimieren. Als wirkungsvoll hierbei erwies sich die räumliche Trennung der beiden Expressionskassetten und damit der beiden Promotoren durch Verwendung von zwei unterschiedlichen Vektoren (McGee Sanftner *et al.*, 2001). Dadurch kann es nicht zu Interferenzen zwischen dem TRE-Promotor und dem *hFIX*-Promoter, der zur Transaktivatorproteinexpression (tTA) genutzt wird, kommen. Von Nachteil ist jedoch die erforderliche Kotransduktion der Zielzellen mit zwei Plasmiden, da nicht anzunehmen ist, dass der Transaktivator zwischen den Zellen diffundiert. Dies führt dazu, dass die Belastung des Organismus durch die doppelte Vektordosis erheblich größer wird.

Weitere Möglichkeiten, die Expressionskassetten für Aktivator- und Transgen in einem Vektor zu kombinieren und gleichzeitig die Durchlässigkeit zu minimieren, wären (i) die Verwendung eines bidirektionalen Promotors (Chtarto *et al.*, 2003), der für die Expression von Transgen und Regulator zuständig und in der Mitte zwischen den Expressionskassetten lokalisiert ist – dadurch wäre gewährleistet, dass dieser bidirektionale Promotor die größtmögliche Entfernung zu den ITRs hat – und (ii) der Einbau beider Elemente in gegensätzliche Richtungen, so dass beide Promotoren die größtmögliche Entfernung zueinander haben. Möglicherweise könnte nämlich die

basale Expression auch vom Abstand der beiden Promotoren und deren Orientierung zueinander abhängen (Baron & Bujard, 2000).

Bei der Austestung von drei rAAV mit dualen Expressionskassetten, in denen die beiden Promotoren des Regulator- und des Transgens in allen möglichen Varianten zueinander kombiniert worden waren, zeigten sich sehr unterschiedliche Hintergrundexpressionen. Diese variierten zwischen 2,13 % und 36,67 %. Im ersten Fall hatten die Promotoren den größtmöglichen Abstand zueinander gehabt – sie lagen jeweils direkt an den ITRs, von diesen weg- und einander zugewandt (Entfernung der Promotoren voneinander >3 kb), im zweiten Fall hatten die Promotoren den geringstmöglichen Abstand zueinander – hier lagen beide in der Mitte, zwischen den Expressionskassetten und waren voneinander weg- und den ITRs zugewandt (Entfernung der Promotoren voneinander schätzungsweise ~ 0,3 kb) (Jiang *et al.*, 2004). Die mit 20 - 25 % zwar innerhalb dieses Rahmens liegende aber relativ hohe Hintergrundexpression des rAAV2-FIX-tTA-Vektors der vorliegenden Arbeit lag somit wahrscheinlich daran, dass die Promotoren einen Abstand von nur ca. 2,2 kb voneinander hatten. Der TRE-Promotor war am 5' ITR lokalisiert, der haat-Promotor in der Mitte des Vektors hinter der therapeutischen Expressionskassette; zudem hatten beide Promotoren dieselbe Orientierung (s. Abb. 11 und 15).

Noch eine Variante, mit der die Regulation der Transgenexpression präzisiert werden könnte, ist der Einbau von *stuffer regions* (Corti *et al.*, 1999) oder eines *insulators* zwischen die Expressionskassetten (Urlinger *et al.*, 2000; Baron & Bujard, 2000; Fitzsimons *et al.*, 2001). Diese Optionen konnten jedoch in dieser Arbeit auf Grund der bereits ausgeschöpften Aufnahmekapazität des Vektors nicht in Betracht gezogen werden.

Die Verwendung eines selbstregulatorischen Vektors, bei dem nicht nur die Expression des therapeutischen Gens, sondern auch die des tTA-Gens selbst von einem TRE-Promotor kontrolliert wurde (Haberman *et al.*, 1998), hatte den Nachteil, dass wahrscheinlich die zu hohe tTA-Expression toxisch war (Gallia *et al.*, 1998). Im nicht inhibierten Zustand führt eine positive Rückkopplungsschleife (tTA aktiviert seine eigene Expression) zu einem relativ hohen tTA-Spiegel in der Zelle. Die im tTA-Protein enthaltene VP16-Region steht jedoch im Verdacht toxische Nebenwirkungen zu verursachen (Gossen und Bujard, 1992). Tatsächlich beobachteten Gallia *et al.* (1998) morphologische Veränderungen, eine Abnahme der Wachstumsrate und

Veränderungen im Zellzyklus in Zellen (HJC-15), die mit einem selbstregulatorischen Vektor transduziert worden waren.

4.2.2. Leberzellspezifische Expression von humanem FIX *in vitro*

Parallele Transduktionsansätze von HepG2- und HEK293-Zellen mit erneut 1×10^4 rAAV2-FIX-tTA vg/Zelle zeigten, dass die haat-apoE.4x-Promotor-Enhancer-Kombination wie erwartet leberzellspezifisch die hFIX-Expression steuerte. Bei den HepG2-Zellen lag die Expression nach Inhibierung durch 10 ng Doxycyclin/ml Medium bei ca. 20 %. In den HEK293-Zellen war kaum ein Unterschied bei der Expression in ohne oder mit Dox inkubierten Zellen zu sehen. Hier lag die hFIX:Ag-Konzentration jeweils in etwa auf Höhe des Levels der inhibierten Leberzellen HepG2. Diese basale Expression lässt sich in allen drei Fällen durch die oben erläuterte Durchlässigkeit des Tet-Systems erklären.

4.3. Expression von hFIX *in vivo*

Nach den erfolgreichen Tests des rAAV2-FIX-tTA *in vitro* sollten dieser und der pseudotypisierte Vektor rAAV6-FIX-tTA *in vivo* getestet werden, da positive Ergebnisse aus der Zellkultur nicht ohne weiteres auf *in vivo*-Versuche übertragen werden können (Arruda *et al.*, 2004a). Hierfür wurden zwei verschiedene Mausstämme verwendet, weibliche SCID- und C57/BL6-Mäuse. SCID-Mäuse wurden eingesetzt, da zu Beginn die Sorge bestand, dass eine Inhibitorenbildung in immunkompetenten Tieren – wie bereits bei C57BL/6- und Hämophilie B-Mäusen sowie bei Hund gezeigt – nur eine relativ kurze FIX-Aktivitätssteigerung erlauben würde (Herzog *et al.*, 1997, 1999; Fields *et al.*, 2000; Herzog & Dobrzynski, 2004). Dies sollte jedoch verhindert werden, da (i) nach der Transduktion der Zellen mehrere Wochen bis zur maximalen Expression vergehen und (ii) das wiederholte Ab- und Anschalten der hFIX-Expression über einen längeren Zeitraum untersucht werden sollte. Es hatte sich nämlich bereits gezeigt, dass auch nach lebergerichteter Verabreichung von rAAV einige immunkompetente Mausstämme Inhibitoren bildeten und in diesen Fällen nur durch transiente Immunsuppression zum Zeitpunkt der Vektorverabreichung oder durch hohe Expressionslevel Toleranz induzierbar war (Mingozzi *et al.*, 2003). Außerdem zeigten Wang *et al.* (1999), dass unterschiedliche Mausstämme das Transgen

FIX unterschiedlich stark exprimierten. So konnten in C57BL/6-Tieren cFIX-Expressionslevel von 70 %, in 129Sv-Mäusen aber nur von 20 % erzielt werden.

Nachdem in der vorliegenden Arbeit in einem ersten Vorversuch zwei SCID-Mäuse mit $3,6 \times 10^{10}$ vg AAV2-FIX-tTA behandelt worden waren und es aussah, als ob der Vektor einen Effekt verursachte (s. Abb. 23), wurden drei Versuchsreihen mit SCID- und C57BL/6-Mäusen durchgeführt, denen entweder der rAAV2- oder der rAAV6-Vektor intravenös über die Schwanzvene verabreicht wurde (s. Kapitel 3.3.3).

Es stellte sich jedoch als großes Problem heraus, dass sämtliche Tiere im Gegensatz zu früheren Messungen der Arbeitsgruppe (Srouf *et al.*, 2003) keine konstanten Grundwerte der FIX-Aktivität zeigten, obwohl die FIX-Aktivitätstests ohne die geringsten Änderungen – weder in der Durchführung noch bei den verwendeten Materialien – im selben Routinelabor durchgeführt worden waren. Während die Grundwerte der FIX-Aktivität bei den Mäusen von Srouf *et al.*, (2003) konstant bei ca. 100 % gelegen hatten, schwankten sie – bei beiden für diese Arbeit verwendeten Mausstämmen – zwischen 21,2 % und 101,6 %. Hierbei ist besonders hervorzuheben, dass sich nicht nur die Werte verschiedener Individuen unterschieden, sondern dass die Werte auch von Blutabnahme zu Blutabnahme bei den einzelnen Tieren schwankten. Ebenfalls ein sehr breites Spektrum bei dem FIX-Level zeigte sich konsequenterweise bei den mit Vektoren behandelten Mäusen. Hier lag der niedrigste Wert bei 23,7 % (rAAV2) bzw. 40,8 % (rAAV6) und der höchste bei 165,2 % bzw. 152 % (s. Kapitel 3.3.3). Der Grund für diese starken Schwankungen könnte in der Methode der Blutabnahme liegen. Diese wurde retroorbital durchgeführt und könnte zu einer sofortigen Gerinnungsaktivierung geführt haben, wodurch die gemessenen Werte verfälscht würden. Da die Technik der retroorbitalen Blutabnahme sehr viel Geschick und Routine erfordert und sich bei manchen Tieren die Blutabnahme recht schwierig gestaltete, musste die Prozedur bei mehreren Tieren innerhalb einiger Minuten bis zu dreimal vorgenommen werden, um genügend Blut zu bekommen. Durch Vernarbung des Gewebes hinter dem Auge nach mehrmaligem Verletzen wurde die Blutabnahme zudem mit jedem weiterem Abnahmetermin schwieriger. Bei den Blutabnahmen für die Studie von Srouf *et al.*, (2003) schien dies jedoch keinen Effekt gehabt zu haben.

Da die FIX-Aktivitätsspiegel stark schwankten, war es unwahrscheinlich, dass ein Wirkung von Dox nachzuweisen sein würde. Zwei Mäusen wurde jedoch versuchsweise Dox verabreicht. Bei einem Tier sank daraufhin die FIX-Aktivität stark ab, aber

die Messwerte vor und nach der Dox-Verabreichung lagen beide innerhalb der Streubreite der FIX-Aktivitätswerte der Kontrolltiere (s. Kapitel 3.3.3). Bei dem zweiten Tier war keine nennenswerte Änderung zu beobachten. In beiden Fällen konnte eine Wirkung des Dox somit weder eindeutig bewiesen noch ausgeschlossen werden.

Eine statistische Auswertung aller drei Versuchsreihen ergab, dass die infizierten Tiere im Durchschnitt signifikant höhere FIX-Level aufwiesen als die Kontrolltiere: die mit rAAV2 infizierten SCID-Mäuse hatten eine um knapp 40 % ($p < 0,021$), die C57BL/6-Mäuse einen um über 70 % erhöhte FIX-Aktivität ($p < 0,033$). Bei den mit rAAV6 infizierten C57BL/6-Mäusen lag der Anstieg bei über 35 % ($p < 0,013$).

Insgesamt waren aber auch diese Aktivitätssteigerungen relativ gering, obwohl die Zellkulturversuchsergebnisse sich wie bereits erwähnt – gerade im Vergleich mit der Literatur (Nathwani *et al.*, 2001) – als sehr vielversprechend gezeigt hatten. Der Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen der Literatur ist nicht ganz einfach, da in den meisten Studien nur der FIX:Ag-Spiegel und nicht die FIX-Aktivität gemessen worden war. Prinzipiell ist es jedoch zur Beurteilung des Erfolges einer Gentherapie wesentlich sinnvoller, die Aktivität des FIX zu messen, da eine hohe FIX:Ag-Konzentration im Blut alleine keinerlei Vorteile für den Patienten erbringt, wenn der Gerinnungsfaktor nicht aktiv ist. Eine Unstimmigkeit zwischen der Höhe des FIX:Ag und der FIX-Aktivität im Blut von Mäusen wurde schon in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen (Srouf *et al.*, 2003). Hier konnte gezeigt werden, dass im Mausplasma deutlich höhere FIX-Aktivitäten gemessen werden (1,5 – 4 x) als die hFIX:Ag-Konzentrationen eigentlich erwarten lassen würden. Der Grund ist, dass die hFIX-Werte, die mit dem ELISA gemessen werden, im Mausplasma supprimiert werden (Smith *et al.*, 1993). Dieses Ergebnis erklärt, warum in der vorliegenden Arbeit trotz teilweiser Steigerung der FIX-Aktivität keine hFIX:Ag-Konzentrationen im Mausplasma ermittelt werden konnten.

Vektoren und Expressionskassetten, die in der Gentherapie eingesetzt werden, müssen selbstverständlich auch vor präklinischen Studien mittels Zellkulturversuchen auf ihre Sicherheit, Effizienz und Kinetik hin untersucht werden. Auch in dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass *in vitro*-Studien keine zuverlässigen Voraussagen einer FIX-Transgenexpression in Tieren erlauben. In vorangegangenen Studien hatte sich dies bei verschiedenen Vektorsystemen (retroviralen [Hafenrichter *et al.*, 1994; Rettinger *et al.*, 1994]; AAV [Loeb *et al.*, 1999; Miao *et al.*, 2000b; Harding *et al.*, 2004]) und mit

verschiedenen Zelltypen (primären Fibroblasten [Palmer *et al.*, 1991; Scharfman *et al.*, 1991]) bereits gezeigt. Während meist die *in vitro*-Versuche bessere Transgenexpressionslevel zeigten als *in vivo*-Studien (Palmer *et al.*, 1991; Scharfman *et al.*, 1991), trat auch der umgekehrte Fall auf: Miao *et al.* (2000b) untersuchten im AAV-Vektorsystem den Einfluss verschiedener *cis*-regulatorischer Sequenzen auf die Transgenexpression (FIX) *in vitro* (in Hepatocyten) und *in vivo* (in der Mausleber) nach intravenöser und intrahepatischer Verabreichung. Während diese Elemente *in vitro* nur zu einer anderthalb bis zweifach gesteigerten Expression führten, bewirkte die beste Kombination (haat-Promotor, apoE *locus controle region*, intron A von hFIX) *in vivo* eine 65 x Steigerung. Es kam bei Effektivitätsstudien verschiedener AAV-Serotypen sogar zu konträren Ergebnissen in Zellkulturversuchen und *in vivo*-Untersuchungen: in unterschiedlichen Zelltypen *in vitro* erwies sich beispielsweise die FIX-Expression mit AAV2-Vektoren als 2 – 4 x höher als mit rAAV1. Arruda *et al.* (2004a) stellten jedoch den umgekehrten Fall fest, wo *in vivo* sowohl im kleinen (immundefiziente Maus) als auch großen Tiermodell (Hämophilie B-Hund) bessere Resultate erzielt wurden als *in vitro*: in der Maus erreichten rAAV1- und rAAV6-Vektoren 10 – 20 x höhere und im Hund sogar 50 x höhere hFIX-Expressionswerte als ein rAAV2 (Arruda *et al.*, 2004a).

Gründe für die teilweise erheblichen Differenzen zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnissen dürften Unterschiede zwischen proliferierende Hepatocyten in der Zellkultur und ruhenden Hepatocyten *in vivo* sein. Beide haben eine unterschiedliche Zusammensetzung aktiver Transkriptionsfaktoren, die erstens zu unterschiedlichen Transkriptionsraten führt und zweitens dazu, dass Gene jeweils unterschiedlich posttranskriptional reguliert werden (Isom *et al.*, 1987). Bisher existiert unseres Wissens kein Zellkulturmodell, das die Genexpression von Hepatocyten *in vivo* gut genug simuliert. Auch weiterhin werden somit Tierversuche im Anschluss an die Zellkultur unumgänglich bleiben.

Obwohl für diese Arbeit der Vektor aus bewährten und in verschiedenen Studien erfolgreich eingesetzten Elementen bestand, unterstreichen die Ergebnisse die weiterhin herrschende Unvorhersehbarkeit und die empirische Natur des Vektordesigns.

Die Wahl des Promotors ist entscheidend für hohe Expressionslevel und eine dauerhafte Expression (Snyder *et al.*, 1999). Varianten verschiedener Länge des in der

vorliegenden Arbeit verwendeten haat-Promotors wurden bereits in einer Reihe von Vektorsystemen für den lebergerichteten Gentransfer eingesetzt: in retroviralen (Hafenrichter *et al.*, 1994; Okuyama *et al.*, 1996), in adenoviralen (Morral *et al.*, 1998; Schiedner *et al.*, 1998; De Geest *et al.*, 2000; Van Linthout *et al.*, 2002) und beim Gentransfer mit einem Vektor auf Basis des HSV1-Virus (Lam *et al.*, 2007) oder des AAV (Lee *et al.*, 2004). Im Vergleich mit anderen leberspezifischen Promotoren erwies sich eine 1,5 kb lange Version des haat-Promotors zusammen mit der dahintergeschalteten apoE(4x)-Sequenz als überlegen (Van Linthout *et al.*, 2002). Die Verwendung eines so langen Promotors war auf Grund der sehr beschränkten Aufnahmekapazität des AAV-Vektors aber nicht möglich. Stattdessen wurde ein haat-Promotor von 405 bp Länge mit einer nachfolgenden vierfachen Wiederholung des apoE-Enhancers eingesetzt. Diese Kombination lieferte in der Zellkultur sehr gute Ergebnisse (s. Abb. 21 und 22).

Es ist möglich, dass bei der Kürzung des Promotors von ursprünglich 1500 bp auf knapp über 400 bp Bereiche entfernt wurden, die für eine *in vivo*-Expression wichtig sind. Andererseits hatte ein fast identischer, nur um 15 Basenpaare längerer Promotor im adenoviralen Umfeld bereits sein Potential zur Transgenexpression sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt (Srour *et al.*, 2003). Dieser minimale Längenunterschied von wenigen Basenpaaren sollte keinen negativen Effekt haben, da haat-Promotoren unterschiedlichster Längen – von 420 bp (Srour *et al.*, 2003) bis 1,5 kb (vollständige Länge des Promotors; Van Linthout *et al.*, 2002) – problemlos in anderen Studien funktioniert hatten. Ein AAV-Vektor mit einem ca. 450 bp langen haat-Promotor und einem apoE(4x)-Enhancer – allerdings 5' des Promotors – erzielte in Hämophilie B-Hunden sehr gute Ergebnisse (5 % bis 12 % cFIX-Level [nach 8×10^{11} - $3,4 \times 10^{12}$ vg/kg]; Mount *et al.*, 2002).

Letztlich ist jedoch nicht völlig auszuschließen, dass die minimale Kürzung um 15 bp – von 420 bp (haat-Promotor der Studie von Srour *et al.*, 2003) auf 405 bp (haat-Promotor der vorliegenden Studie) – die Potenz des Vektors gesenkt hat. Die Verwendung eines noch kürzeren haat-Promotors von weniger als 400 bp Länge führte nämlich (in einem retroviralen Vektor) *in vitro* ebenfalls zu einer recht guten Expression des Transgens, *in vivo* aber nur zu 1 % der *in vitro*-Ergebnisse (Hafenrichter *et al.*, 1994).

Ein Grund könnte sein, dass Promotoren in verschiedenen viralen Vektorsystemen unterschiedlich effizient sein können (Sandig *et al.*, 1996) und dies in unserem Fall (haat-Promotor, apoE.4x-Enhancer, AAV-Vektor) auch eingetreten ist.

Prinzipiell scheint es so zu sein, dass im adenoviralen Vektor bestimmte Elemente der Expressionskassette, wie z.B. der haat-Promotor, grundsätzlich eine bessere Funktionalität aufweisen als im AAV-Vektor. Es ist zu vermuten, dass hierbei auch die restlichen viralen Sequenzen eine Rolle spielen, die eine Expression viraler Gene im adenoviralen Vektor ermöglichen. Diese viralen Elemente könnten mit der Transgenexpression interferieren. Im von viralen Genen komplett befreiten rAAV dagegen ist dies nicht möglich.

Auch folgende Studien zeigen, zu welchen unvorhersehbaren Ergebnissen die Promotorauswahl führen kann:

Sandig *et al.* (1996) stellten fest, dass ein leberspezifischer Promotor (leberspezifische regulatorische Elemente des HBV) in auf AAV basierenden Vektoren bei Experimenten in Hepatocyten schlechter als in adenoviralen Vektoren abschnitt. Ebenfalls in rAAV zeigte sich, dass eine CMV-Promotor/Enhancer-Kombination, die in der Leber eigentlich effizient hätte stillgelegt werden sollen (Ponder *et al.*, 1991; Kay *et al.*, 1992; Everett *et al.*, 2004), sehr effizient die FIX-Expression in der Leber ermöglichte (Daly *et al.*, 1999).

Zusammengefasst kommen für die nicht zufriedenstellende *in vivo*-FIX-Expression in der vorliegenden Arbeit einer oder mehrere der folgenden Faktoren in Betracht, die alle die Promotorwahl betreffen: (i) der Promotor war mit 405 bp für eine *in vivo*-Expression des Transgens möglicherweise zu kurz, (ii) die apoE.4x-Enhancer-Sequenz konnte eventuell mit dem kurzen Promotor nicht richtig interagieren oder (iii) die gewählte Kombination aus dem sehr kurzen Promotor und dem Enhancer funktioniert grundsätzlich nicht besonders gut in auf Adenoassoziierten Viren basierenden Vektoren.

Die Ergebnisse zeigen, dass an dem Promotorproblem weiter gearbeitet werden muss und dass gute Resultate die durch Promotoren *in vitro* verursacht werden, nicht ohne weiteres auch *in vivo* zu erreichen sind. Stattdessen muss die Funktionalität und Effizienz von Promotoren für das jeweilige Vektorsystem (retro-, adenoviral, HSV- oder AAV-basiert) ebenso wie für jede Tierspezies einzeln untersucht werden. Dies gilt natürlich auch für den Einsatz im Menschen.

4.4. Molekulargenetik

Im vorausgehenden Kapitel wurde die Transgenexpression erörtert. Nachdem die Aktivität des exprimierten Transges hFIX aber *in vivo* nicht den Erwartungen entsprochen hatte, wurde im Verlauf der Studie auch die Transduktionsrate der Leberzellen untersucht. Die Transduktionsrate gibt an, wie viele (rekombinante) Viren durchschnittlich in eine Zelle eingedrungen sind. Im Falle des (r)AAV wird sie in Vektorgenomen pro Zelle angegeben. Wie die Expressionsrate des Transgens ist auch die Transduktionsrate der Zellen mit dem Vektor von den im vorigen Kapitel diskutierten Faktoren abhängig.

Die molekulargenetische Untersuchung von Leber, Lunge, Niere, Milz, Herz und Muskelgewebe aus fünf mit dem rAAV6-FIX-tTA infizierten C57BL/6-Mäusen zeigte, dass die Transduktion der Leber durchaus erfolgreich war. Acht bis neun Wochen nach der intravenösen Verabreichung des Vektors konnte dieser mit einer PCR in den Lebern aller untersuchten infizierten Tiere nachgewiesen werden. Proben aus Milz, Niere, Lunge, Muskel und Herz dagegen waren negativ.

Für den Nachweis wurden Primer verwendet, die spezifisch das hFIX-Gen (Abb. 25) des Vektors bzw. das tTA-Gens (nicht dargestellt) amplifizieren. Die Spezifität für Vektorsequenzen wurde bei der hFIX-Amplifikation durch den *sense*-Primer sichergestellt, der an den viralen Cytomegali-Virus (CMV)-Promotor bindet. Das prokaryotische tTA-Gen kommt in der Maus nicht vor, so dass es wie erwartet ausschließlich in transduzierten Tieren nachweisbar war. Die Negativkontrollen mit Kontrollmäusen bestätigten die Spezifität.

Mittels einer quantitativen *real time*-PCR wurde anschließend die Anzahl der Vektorgenomkopien in den einzelnen Organen der verschiedenen Tiere ermittelt. Diese lag zwischen 0,418 (Vektordosis $\sim 4 \times 10^{11}$ vg) und 5,382 (Vektrodosis $\sim 1 \times 10^{12}$ vg) Vektorgenomkopien/diploidem Leberzellgenom (s. Tab. 9). Durchschnittlich waren 2,396 (+/- 2,166) Vektorgenome pro Zelle zu finden (s. Tab. 10). Verglichen mit den rAAV6-Ergebnissen einer Studie von Thomas *et al.* (2004) ist dieser Wert ausgesprochen gut: in jener Studie fanden sich 0,9 Vektorkopien/Leberzelle. Allerdings war den Versuchstieren eine wesentlich niedrigere Vektordosis (1×10^{11} vg) nicht intravenös, sondern intrahepatisch verabreicht worden und die Messung schon drei Tage nach Infektion der Mäuse erfolgt. Bei dieser Studie spielten somit Faktoren mit gegensätzlicher Wirkung eine Rolle: die intrahepatische Verabreichung ließ eine höhere, die geringe Vektordosis dagegen eher eine niedrigere Transduktionsrate

erwarten. In derselben Studie von Thomas *et al.* (2004) wurde nach Injektion von 3×10^{11} vg rAAV6 (Transgen cFVIII) in Hämophilie A-Mäuse eine Transduktionsrate erreicht, die mit 5,78 (+/- 2,29) Kopien/Zelle etwas über der in der vorliegenden Arbeit erreichten lag. Bei einer Dose von 6×10^{11} vg stieg sie sogar auf 14,97 (+/- 6,57) Kopien/Zelle.

Grimm *et al.* (2003c) hatten die Auswirkung der unterschiedlichen Verabreichungswege der rAAV auf die Vektorgenomkopienzahl verglichen: eine Dosis von 2×10^{11} vg führte nach intravenöser Verabreichung bei einem rAAV2 zu 0,057 (+/- 0,023) und bei dem entsprechenden rAAV6 zu 0,112 (+/- 0,036) Vektorgenomen/Zelle. Die Portalveneninjektion dagegen erhöhte diese Werte jeweils um den Faktor 9. Grundsätzlich zeigte sich bei diesem Versuch, dass rAAV6 – unabhängig von der Verabreichungsmethode – hier zu einer höheren Kopienzahl in den Zellen führte als rAAV2. In einer weiteren Studie mit einem Vektor auf AAV2-Basis zeigte die Verabreichungsrouten keinen Unterschied in Bezug auf die Vektorgenomkopienzahl/Leberzelle: Portalvenen- und Schwanzveneninjektion (jeweils 3×10^{11} vg) führten beide jeweils zu 1,3 Kopien/Leberzelle (Harding *et al.*, 2004). Die Arbeiten verschiedener Gruppen kommen somit bei der Frage, ob die Verabreichungsmethode Einfluss auf die Transduktionsrate hat, zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Trotz der für die vorliegende Arbeit intravenösen Verabreichung des AAV6-Vektors über die Schwanzvene wurden in Milz, Niere, Lunge und Muskel kaum mehr Kopien detektiert als in den Kontrolltieren, so dass die Streuung in diese Organe nahezu bei Null zu liegen scheint. Obwohl die Analyse der Proben aus den Herzen mittels PCR und Agarosegel keine Banden zeigte (Abb. 25), konnte mittels quantitativer PCR eine Vektorgenomkopienzahl von 0,326 (+/- 0,338) Kopien/Herzzelle nachgewiesen werden. Dies entspricht etwa 13 % des Wertes der Leber. Wie in der vorliegenden Arbeit waren bei Grimm *et al.* (2003c) in den meisten Geweben sehr geringe, aber noch detektierbare rAAV6-Vektormengen vorhanden. Bei dem rAAV2-Vektor aber stellten Grimm und Kollegen fest, dass der Wert in der Milz fast genauso hoch wie in der Leber war. Harding *et al.* (2004) fanden nur nach intrahepatischer rAAV2-Verabreichung erhöhte Mengen von Vektorgenomen in der Milz ($< 0,1$) nicht aber nach intravenöser. In Herz und Lunge waren weniger als 5 % der in der Leber gefundenen Vektorkopien zu detektieren. Festzustellen bleibt also, dass eine gewisse minimale Streuung sowohl bei rAAV2 als auch bei rAAV6 vorzukommen

scheint, was die Verwendung gewebespezifischer Promotoren durchaus nicht nebensächlich erscheinen lässt

In der einzigen uns bekannten Studie, in welcher vergleichbar hohe Vektordosen verwendet wurden wie in der vorliegenden Arbeit und in der auch Angaben über die Vektorgenomkopienanzahl pro Zelle gemacht wurden, wurde ein rAAV2-Vektor mit einem rAAV1-Vektor verglichen und cFIX als Transgen verwendet. Hier zeigte sich, wie unterschiedlich die Transduktionsraten verschiedener AAV-Serotypen sein können. Die Dosen von 2×10^{11} , 1×10^{12} und 4×10^{12} vg führten bei rAAV2 zu 0,4, 3 und 15, bei rAAV1 dagegen zu 14,5, 20 und 33 Vektorgenomkopien pro Zelle (Arruda *et al.*, 2004a).

Es ist zu beachten, dass der Vergleich der molekulargenetischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen anderer Studien nur sehr bedingt möglich ist. In sehr vielen Studien wurde nur die Konzentration des Transgenproduktes im Blut bestimmt, nicht jedoch die Vektorgenomkopienzahl pro Zelle. Die Studien, in denen dieser Punkt doch untersucht worden war und in denen Angaben darüber gemacht worden sind, hatten jeweils unterschiedliche AAV-Serotypen (AAV1 – AAV8, doppel- bzw. einzelsträngig), Transgene (hFIX, cFIX, cFVIII, mFVIII, GFP, etc.), Vektordosen (1×10^{10} – 4×10^{12} vg), Verabreichungswege (intramuskulär, intravenös, intrahepatisch), Zielgewebe (Muskel, Leber) und Versuchstiere verwendet (Maus [SCID, FVIII-KO, C57BL/6, etc.], Hund) (Harding *et al.*, 2004; Sarkar *et al.*, 2003; 2004; Wang *et al.*, 2003; Snyder *et al.*, 1997a; Grimm *et al.*, 2003b; Mount *et al.*, 2002; Scallan *et al.*, 2003; Nakai *et al.*, 2001; Arruda *et al.*, 2004a; Nathwani *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2006). Dazu kommen noch die unterschiedlichen Aufreinigungsmethoden bei der Präparation der Vektoren (CsCl-Zentrifugation, Heparinsäule, Filtration) sowie der jeweilige Zeitpunkt der Blutabnahme – beides Faktoren, die ebenfalls Einfluss auf die Ergebnisse einer Studie haben.

Da sich im Verlauf der vorliegenden Arbeit herausgestellt hat, dass die Transduktionsrate im Vergleich zu Literaturdaten durchaus gut, die FIX-Aktivität jedoch weit hinter den Erwartungen zurückgeblieben war, soll im Folgenden der Zusammenhang zwischen Transduktionsrate und Expression des Transgens diskutiert werden. Es gibt Studienergebnisse, die gegen einen Zusammenhang von Transduktion und Transgenexpression sprechen. Nach intrahepatischer Injektion von je 1×10^{11} vg der AAV-Serotypen 2, 6 bzw. 8 in C57BL/6-Mäuse fanden sich am 3. Tag 5,8 AAV2-

Vektorkopien, 0,9 AAV6-Vektorkopien und 4,03 AAV8-Vektorkopien pro Zelle. Gleichzeitig war aber der hFIX-Plasmaspiegel mit dem AAV6-Vektor 5 x höher als mit dem AAV2-Vektor und mit AAV8 sogar 54 x höher als mit rAAV2 (Thomas *et al.*, 2004). Die Vektorgenomkopienzahl/Zelle korrelierte in diesem Fall also nicht mit der Transgenexpression.

Ganz anders sah es bei einer anderen Studie aus, bei der cFVIII als Transgen in mehreren pseudotypisierten AAV-Vektoren Hämophilie A-Mäusen ebenfalls intrahepatisch verabreicht worden waren (Jiang *et al.*, 2006). Hier zeigte sich bei den Mausversuchen ein Zusammenhang zwischen der FVIII-Aktivität und dem verwendeten Serotyp ebenso wie zwischen der Aktivität und den unterschiedlich hohen Vektorgenomkopienzahlen/Zelle.

Für einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Vektorgenomkopien pro Zelle und der Transgenexpressionsrate sprechen auch die Studienergebnisse von Grimm *et al.* (2003c) und Gao *et al.* (2002): Grimm *et al.* haben wie bereits erwähnt – unseres Wissens bisher als einzige – eine Reihe von AAV-Serotypen unter exakt gleich bleibenden Bedingungen getestet (identische Expressionskassette, gleiche Aufreinigungsmethode der Viruspartikel für alle Serotypen) und sowohl eine Korrelation zwischen der Anzahl der Vektorgenomkopien pro Zelle und dem Transgenexpressionsspiegel (hFIX) als auch nur sehr geringe Effizienzunterschiede zwischen den Serotypen 2 und 6 feststellen können. Bei Gao *et al.* (2002) war ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Transduktionsrate und Expression festzustellen: Gao *et al.* (2002) stellten mit rAAV2 eine deutlich niedrigere Transgenexpression und ebenso eine deutlich schlechtere Transduktionsrate fest als mit pseudotypisierten Vektoren. Bei Grimm *et al.*, 2003 jedoch hatte, wie bereits erwähnt, der Serotyp 2 in Bezug auf diese beiden Parameter nicht wesentlich schlechter abgeschnitten als andere Serotypen, und es waren auch wesentlich mehr Vektorgenomkopien pro Leberzelle infizierter Mäuse gefunden worden, als bei Gao *et al.*. Der Grund dürfte sein, dass in der Studie von Gao *et al.* der AAV2-Vektor mit einer anderen Methode aufgereinigt worden war als die restlichen pseudotypisierten Vektoren. Die wahrscheinlich dadurch bedingte schlechtere Transduktionsfähigkeit des AAV2-Vektors führte offensichtlich zu einer niedrigeren Transgenexpression.

Die Frage, ob Transgenexpression und Transduktionsrate miteinander in Zusammenhang stehen, wirft auch eine Studie von Nathwani *et al.* (2002) auf. Dort zeigte sich im Blut von Rhesusaffen eine nur doppelt so hohe hFIX:Ag-Konzentration wie

bei Mäusen, obwohl bei den Affen 40 Vektorgenomkopien/Zelle und bei den Mäusen nur 0,65 Kopien/Zelle messbar waren. Es scheint also Faktoren zu geben, die bei sehr hoher Kopienzahl/Zelle die hFIX-Produktion limitieren. Die Messungen dieser Studie sind allerdings nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar, da für die Untersuchungen in Mäusen und Affen unterschiedliche Antikörper verwendet wurden, um hFIX zu binden, und verschiedene Methoden angewandt wurden, um den Hintergrund zu reduzieren. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass dies alleine den großen Unterschied um den Faktor 60 erklärt.

Ein Grund für eine in einigen Studien nicht nachweisbare Korrelation zwischen Expressionslevel und Vektorgenomkopienzahl pro Zelle könnte die Bildung von Anti-hFIX-Antikörpern (Inhibitoren) sein (Jiang *et al.*, 2006). Durch diese wird das hFIX-Protein neutralisiert und aus der Blutbahn entfernt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass gerade die interessante Frage der Korrelation von Vektorgenomkopien pro Zelle (Transduktionseffizienz) und Transgenexpressionslevel, d.h. ob hohe Transduktionsraten auch hohe Transgenexpressionslevel nach sich ziehen, noch nicht endgültig geklärt ist und dass es wünschenswert wäre, weitere Studien so zu koordinieren, damit sie besser miteinander vergleichbar würden.

Da trotz der guten Transduktionsrate *in vivo* in der vorliegenden Arbeit die hFIX-Expression nur *in vitro* gut war, *in vivo* Expression und Aktivität relativ gering geblieben sind, sollte auch die Transkription der beiden Transgene, dem therapeutischen hFIX und dem regulatorischen tTA, untersucht werden.

Durch den Anstieg der Durchschnittswerte der FIX-Aktivität in den behandelten Mäusen war zu erwarten, dass eine Transkription beider Transgene stattgefunden hatte. Dies bestätigte sich bei der Untersuchung von Gesamt-RNA, die aus der Leber der behandelten Tiere isoliert wurden (Abb. 26 A und B). Es wurden nur Leberproben untersucht, da die anderen untersuchten Organe – wenn überhaupt – nur sehr geringe Mengen Vektor enthielten und zudem ein leberspezifischer Promotor eingesetzt worden war.

4.5. Ausblick

Neben den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Serotypen 2 und 6 gibt es einige weitere vielversprechende Serotypen, die in Zukunft weiter intensiv untersucht werden sollten. So haben sich in den letzten Jahren die Hinweise verdichtet, dass der seit wenigen Jahren bekannte Serotyp AAV8, ganz besonders effizient Hepatozyten transduziert (Gao *et al.*, 2002; Nakai *et al.*, 2005), u. a. auch deshalb, weil seine DNA in der Zelle besonders schnell freigesetzt wird (*uncoating*) (Thomas *et al.*, 2004). Auch ein pseudotypisierter Vektor mit AAV5-Capsid erreichte sehr schnell hohe Expressionswerte (Maximum nach 7 Tagen). Verantwortlich hierfür könnte das durch das zügige *uncoating* effizienter stattfindende *annealing* von (+)- und (-)-Strang in Maus-Hepatozyten sein (Nakai *et al.*, 2001). Allerdings kam es zu einem schnellen Abfallen der Genexpression nach dem Höhepunkt.

Eine Möglichkeit, die Transgenexpression in Zukunft zu steigern, scheint auch im Einsatz von ITRs des AAV-Serotyps 5 zu liegen. Diese ITRs, die eine Homologie von nur 60 % zum AAV2-ITR aufweisen (alle anderen bekannten AAV-ITRs sind zu 90 % den AAV2-ITRs homolog), konnten bei muskelgerichtetem Vektortransfer eine Transgenexpressionssteigerung um das 2 - 3 x gegenüber Vektoren mit AAV2-ITRs bewirken (Hildinger *et al.*, 2001). (Bisher konnte dies aber nicht bei lebergerichteter Verabreichung der rekombinanten Viren gezeigt werden [Davidoff *et al.*, 2005]). Weiteres Potential, die Transgenexpression zu erhöhen, scheint darin zu liegen, posttranskriptionale regulatorische Elemente wie das *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* (WPRE) in die 3' untranslatierte Region des Transgens einzufügen. Dabei waren bereits gesteigerte mRNA-Spiegel des Transgens und eine Translationseffizienzsteigerung zu beobachten (Virella-Lowell *et al.*, 2005; Lipshutz *et al.*, 2003). Allerdings ist dieses Element mit 600 bp für den in rAAV knapp bemessenen Raum sehr groß. Möglicherweise könnte auch der Einbau von Introns die Expressioneffizienz positiv beeinflussen, da Spleißen die Menge cytoplasmatischer mRNA stark steigern kann.

Ein ebenfalls interessanter, wenig erforschter Punkt ist die Rolle des Geschlechts in Bezug auf die Transduktionseffizienz. Eine Studie ermittelte nach intrahepatischer Verabreichung von Vektoren auf AAV2- und AAV5-Basis eine 5 – 13 x höhere Genexpression in männlichen Mäusen im Vergleich zu weiblichen. Hierfür könnten möglicherweise Androgene verantwortlich sein (Davidoff *et al.*, 2003).

Die präklinischen Untersuchungen haben bisher gezeigt, dass Expressionskassetten nur durch Versuch und Irrtum weiter verbessert werden können. Ein Zusammenfügen von einzelnen Elementen, die in unterschiedlichen Vektoren sehr gut funktionieren, führt nicht automatisch zu einem besonders guten Expressionsvektor. Offenbar brauchen die verschiedenen Elemente jeweils ein bestimmtes Umfeld und funktionieren nur in bestimmten Kombinationen wirklich gut. Ein weiterer Punkt, an dem intensiv gearbeitet wird, ist die Frage des zu verwendenden AAV-Serotyps – egal ob zur einmaligen, besonders wirkungsvollen Behandlung oder ob zum Zwecke einer wiederholten Behandlung mit verschiedenen Serotypen. Für die Verwendung alternativer Serotypen an Stelle von AAV2 spricht nicht nur eine möglicherweise höhere Expression der Transgene bzw. eine bessere therapeutische Effizienz, sondern auch die Möglichkeit, den in der Bevölkerung vorkommenden präexistierenden Anti-AAV2-Antikörpern zu entgehen.

5. Zusammenfassung

Die Hämophilie B ist eine Blutgerinnungsstörung, die aus einer Faktor IX-Defizienz resultiert. Hämophile können inzwischen dank der Substitutionstherapie mit humanen Faktor IX-Konzentraten ein annähernd normales Leben führen. Dennoch stellt die Gentherapie eine interessante Alternative zur klassischen Therapie dar, die in Tierversuchen bereits zu lang anhaltenden und teilweise extrem hohen Faktor IX-Expressionsspiegeln, die bei einem Vielfachen (2600 %) des normalen Levels lagen, geführt hat.

Val Hylckama Vlieg *et al.* (2000) stellten jedoch fest, dass beim Menschen eine relativ geringe Erhöhung des humanen Faktor IX-Spiegels (Steigerung um >29 % gegenüber dem normalen Wert) das Risiko einer tiefen Beinvenenthrombose um das zwei- bis dreifache steigert. Für zukünftige gentherapeutische Studien am Menschen ist es somit wichtig, Protokolle zu schaffen, die effizient und zuverlässig die Herunterregulierung zu hoher Expressionsraten ermöglichen, um die humane Faktor IX-Aktivität im therapeutischen Fenster zu halten. Aus diesem Grund sollte ein Vektorsystem entwickelt werden, das eine einfache und schnelle Regulation der Genexpression erlaubte.

Um die Regulation der humanen Faktor IX-Expression zu ermöglichen, wurde das Tet OFF-System in einem auf dem Adenoassoziierten Virus (AAV) basierendem Vektor eingesetzt. Hierfür waren zwei Expressionskassetten notwendig. Eine therapeutische Kasette, die das humane Faktor IX-Gen unter der Kontrolle eines TRE-Promotors enthielt und eine regulatorische, welche durch die Synthese eines Transaktivatorproteins die Expression des humanen Faktor IX-Gens initiierte. Um die Transgenexpression auf das Zielorgan zu beschränken, stand die regulatorische Expressionskasette unter der Kontrolle eines leberspezifischen Promotors (haat-Promotor, apoE.4x-Enhancer). Somit sollte das Transaktivatorprotein nur in den Leberzellen synthetisiert werden, dort an den TRE-Promotor binden und dadurch die humane Faktor IX-Produktion bewirken. Die Zugabe von Doxycyclin sollte eine Komplexbildung von Transaktivator und Doxycyclin bewirken, wodurch die Transaktivatorbindung an den TRE-Promotors verhindert werden sollte. Hierdurch sollte die humane Faktor IX-Expression eingestellt werden.

Da eine hohe Dosis rekombinanter Viren den Organismus des Patienten belasten würde und zu unerwünschten Nebenwirkungen führen könnte, wurden beide Expressionskassetten (regulatorische und therapeutische) zu einer einzigen, dualen Kasette kombiniert und in nur einen AAV-Vektor verpackt. Auf Grund der sehr begrenzten Kapazität von Vektoren auf AAV-Basis wurde als leberspezifischer Promotor eine Kombination eines kurzen *haat*-Promotors mit einer vierfachen Wiederholung der apoE-Enhancer-Sequenz verwendet.

Im Anschluss an die Konstruktion der dualen Expressionskassette wurde diese zwischen AAV2-ITRs kloniert und die rekombinanten Viren in einer Produktionszelllinie hergestellt. Nach Dichtegradienten-Zentrifugation, Aufreinigung und Konzentrierung der rekombinanten AAV mit einer anhand der Literatur etablierten Methode, wurden die Virusgenome mittels einer quantitativen *real time*-PCR quantifiziert und *in vitro* sowie *in vivo*-Studien durchgeführt.

Die Expressionsstudien *in vitro* zeigten, dass die Transgenexpression nur leberspezifisch in HepG2-Zellen stattfand, nicht jedoch in einer anderen (HEK293-) Zelllinie. Durch Hinzufügen von Doxycyclin konnte die durch das rekombinante AAV vermittelte humane Faktor IX-Expression in HepG2-Zellen innerhalb von 48 Stunden auf ein Minimum reduziert werden. Die Infektion von immundefizienten SCID- und immunkompetenten C57BL/6-Mäusen führte zu einer durchschnittlich signifikant höheren Faktor IX-Aktivität, die jedoch hinter den Erwartungen zurückblieb. Die Wirkung von Doxycyclin konnte auf Grund stark schwankender Blutwerte der Tiere nicht nachgewiesen werden. Molekulargenetische Untersuchungen mittels quantitativer *real time*-PCR zeigten jedoch eine gute Lebertransduktion – es befanden sich jeweils mehrere rekombinante AAV-Genome innerhalb einer Leberzelle – sowie eine geringe bis kaum nachweisbare Streuung in andere untersuchte Organe und Gewebe. Auf mRNA-Ebene konnte mittels reverser Transkription und anschließender PCR die Transkription des regulatorischen tTA-Gens und des humanen Faktor IX-Gens nachgewiesen werden. Auf Grund der Ergebnisse kann vermutete werden, dass die Kombination des verkürzten *haat*-Promotors mit der vierfachen Wiederholung des apoE-Enhancers für die geringe humane Faktor IX-Aktivität im Blut Mäusen verantwortlich war.

6. Literaturverzeichnis

Afione SA, Conrad CK, Kearns WG, Chunduru S, Adams R, Reynolds TC, Guggino WB, Cutting GR, Carter BJ, Flotte TR. *In vivo* model of adeno-associated virus vector persistence and rescue. *J Virol* 1996;70(5):3235-3241.

Aledort LM, Levine PH, Hilgartner M, Blatt P, Spero JA, Goldberg JD, Bianchi L, Desmet V, Scheuer P, Popper H. A study of liver biopsies and liver disease among hemophiliacs. *Blood* 1985;66(2):367-372.

Alexander IE, Russell DW, Miller AD. DNA-damaging agents greatly increase the transduction of non-dividing cells by adeno-associated virus vectors. *J Virol* 1994;68(12):8282-8287.

Anderson R, Macdonald I, Corbett T, Whiteway A, Prentice H. A method for the preparation of highly purified adeno-associated virus using affinity column chromatography, protease digestion and solvent extraction. *J Virol Methods* 2000;85(1-2):23-34.

Antunes SV. Haemophilia in the developing world: the Brazilian experience. *Haemophilia* 2002;8(3):199-204.

Apparailly F, Khoury M, Vervoordeldonk MJ, Adriaansen J, Gicquel E, Perez N, Riviere C, Louis-Pence P, Noel D, Danos O, Douar AM, Tak PP, Jorgensen C. Adeno-associated virus pseudotype 5 vector improves gene transfer in arthritic joints. *Hum Gene Ther* 2005;16(4):426-434.

Arruda VR, Couto L, Leonard D, Addya K, Sommer J, Herzog RW, Kay MA, Glader B, Manno C, Chew A, High KA. Risk of inadvertent germline transmission of vector DNA following intravascular delivery of recombinant AAV Vector. *Mol Ther* 2002; 5:159-160 (abstr 487) [5th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy]

Arruda VR, Fields PA, Milner R, Wainwright L, De Miguel MP, Donovan PJ, Herzog RW, Nichols C, Biegel JA, Razavi M, Dake M, Huff, D, Flake AW, Couto L, Kay MA, High KA. Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males. *Mol Ther* 2001a;4(6):586-492.

Arruda VR, Hagstrom JN, Deitch J, Heiman-Patterson T, Camire RM, Chu K, Fields PA, Herzog RW, Couto LB, Larson PJ, High KA. Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood* 2001b;97(1):130-138.

Arruda VR, Schuettrumpf J, Herzog RW, Nichols TC, Robinson N, Lotfi Y, Mingozzi F, Xiao W, Couto LB, High KA. Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood* 2004a;103(1):85-92.

Arruda VR, Stedman HH, Nichols TC, Haskins ME, Nicholson M, Herzog RW, Couto LB, High KA. Regional intravascular delivery of AAV2-FIX to skeletal muscle achieves long-term correction of hemophilia B in a large animal model. *Blood* 2005;105(9):3458-3464.

Arruda VR, Stedman HH, Schuettrumpf J, Jiang H, Pierce G, Nichols T, High KA. A novel method of regional intravenous delivery of AAV vector in skeletal muscle results in correction of canine hemophilia B phenotype. *Blood* 2004b;104:868a.

Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 1965; 149: 754-759.

Auricchio A, Hildinger M, O'Connor E, Gao GP, Wilson JM. Isolation of highly infectious and pure adeno-associated virus type 2 vectors with a single-step gravity-flow column. *Hum Gene Ther* 2001a;12(1):71-76.

Auricchio A, O'Connor E, Hildinger M, Wilson JM. A single-step affinity column for purification of serotype-5 based adeno-associated viral vectors. *Mol Ther* 2001b;4:372-374.

- Auricchio A**, O'Connor E, Weiner D, Gao GP, Hildinger M, Wang L, Calcedo R, Wilson JM. Noninvasive gene transfer to the lung for systemic delivery of therapeutic proteins. *J Clin Invest* 2002;110(4): 499-504.
- Aurisicchio L**, Bujard H, Hillen W, Cortese R, Ciliberto G, La Monica N, Palombo F. Regulated and prolonged expression of mIFN(alpha) in immunocompetent mice mediated by a helper-dependent adenovirus vector. *Gene Ther* 2001;8(24):1817-1825.
- Bajaj SP**, Birktoft JJ. Human factor IX and factor IXa. *Methods Enzymol* 1993; 222: 96-128.
- Balagué C**, Kalla M, Zhang WW. Adeno-associated virus Rep 78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J Virol* 1997;71(4):3299-3306.
- Bantel-Schaal U**, Hausen H. Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* 1984;134(1):52-63.
- Baron U**, Bujard H. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol* 2000; 327: 401-421.
- Beck SE**, Jones L, Chesnut K, Reynolds T, Flotte T, Guggino WB. Repeat airway delivery of AAV vectors results in gene expression. *Pediatr Pulmonol* 1998;17(11):262-263.
- Beck SE**, Jones LA, Chesnut K, Walsh SM, Reynolds TC, Carter BJ, Askin FB, Flotte TR, Guggino WB. Repeated delivery of adeno-associated virusvectors to the rabbit airway. *J Virol* 1999;73(11): 9446-6455.
- Berns KI**. Paroviridae: The viruses and their replication. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
- Berns KI**. In: Fields BN, Knipe DM, *et al.*, eds. *Virology*. New York: Raven Press, 1990:1743-1764.
- Bi L**, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH Jr. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet* 1995;10(1):119-121.
- Blacklow NR**. Adeno-associated viruses of human. In: Patisson JR, ed. *Parvoviruses and Human Disease*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988: 165-174.
- Blacklow NR**, Hoggan MD, Kapikian AZ, Austin JB, Rowe WP. Epidemiology of adenovirus-associated virus infection in a nursery population. *Am J Epidemiol* 1968b;88(3):368-378.
- Blacklow NR**, Hoggan M, Rowe W. Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *J Natl Cancer I* 1968a;40(2): 319-327.
- Blankinship MJ**, Gregorevic P, Allen JM, Harper SQ, Harper H, Halbert CL, Miller DA, Chamberlain JS. Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther* 2004;10(4):671-678.
- Blau H**, Springer M. Muscle-mediated gene therapy. *N Engl J Med* 1995;333(23):1554-1556.
- Bostanci A**. Blood test flags agent in death of penn subject. *Science* 2002;295(5555):604-605.
- Bowen DJ**. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 2002;55(1):1-18.
- Boyd Y**, Buckle VJ, Munro EA, Choo KH, Migeon BR, Craig IW. *Ann Hum Genet* 1984;48(Pt.2):145-152.
- Brackmann HH**, Hofmann P, Etzel F, Egli H. Home care of hemophilia in West Germany. *Thromb Haemost* 1976;35(3):544-552.
- Bray GL**, Luban NL. Hemophilia presenting with intracranial hemorrhage. An approach to the infant with intracranial bleeding and coagulopathy. *Am J Dis Children* 1987;141(11):1215-1217.
- Breithaupt H**. AAV muscles ahead. *Nat Biotechnol* 1999;17(9):838.

Brown BD, Lillicrap D. Dangerous liaisons: the role of "danger" signals in the immune response to gene therapy. *Blood* 2002;100(4):1133-1140.

Brown BD, Shi CX, Rawle FE, Tinlin S, McKinven A, Hough C, Graham FL, Lillicrap D. Factors influencing therapeutic efficacy and the host immune response to helper-dependent adenoviral gene therapy in hemophilia A mice. *J Thromb Haemost* 2004;2(1):111-118.

Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, Peden CS, Williams P, Zolotukhin S, Reier PJ, Mandel RJ, Muzyczka N. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther* 2004;10(2):302-317.

Burton M, Nakai H, Colosi P, Cunningham J, Mitchell R, Couto L. Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(2):12725-12730.

Camerino G, Grzeschik KH, Jaye M, De La Salle H, Tolstoshev, P Lecocq JP, Heilig R, Mandel JL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81(2):498-502.

Carter BJ. Adeno-associated virus helper functions. In: Tjissen P, ed. *Handbook of Parvoviruses*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990: 255-282.

Carter BJ. Adeno-associated virus vectors. *Current Opinion Biotechnol* 1992;3(5):533-539.

Carter BJ. Adeno-associated virus vectors. *Nature Biotechnol* 1996;14:1725-1726.

Carter BJ, Mendelson E, Trempe JP. AAV DNA replication, integration and genetics. In: Tjissen P, ed. *Handbook of Parvoviruses*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1998: 169-226.

Cavazzana-Calvo, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000;288(5466):669-672.

Center for Diseases Control and Prevention. Report on the Universal Data Collection Program (UDC), Includes data collected from May 1998 through February 2000. Atlanta (GA).

Chance PF, Dyer KA, Kurachi K, Yoshitake S, Ropers HH, Wieacker P, Gartler SM. Regional localization of the human factor IX gene by molecular hybridization. *Hum Genet* 1983;65(2):207-208.

Chao H, Liu Y, Rabinowitz J, Li C, Samulski RJ, Walsh CE. Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther* 2000;2(6):619-623.

Chao H, Monahan PE, Liu Y, Samulski RJ, Walsh CE. Sustained and complete phenotype correction of hemophilia B mice following intramuscular injection of AAV1 serotype vectors. *Mol Ther* 2001;4(3):217-222.

Chao H, Samulski R, Bellinger D, Monahan P, Nichols T, Walsh C. Persistent expression of canine factor IX in hemophilia B canines. *Gene Ther* 1999;6(10):1695-1704.

Chao H, Sun L, Bruce A, Xiao X, Walsh CE. Expression of human factor VIII by splicing between dimerized AAV vectors. *Mol Ther* 2002;5(6):716-722.

Chen S, Kapturczak M, Loiler SA, Zolotukhin S, Glushakova OY, Madsen KM, Samulski RJ, Hauswirth WW, Campbell-Thompson M, Berns KI, Flotte TR, Atkinson MA, Tisher CC, Agarwal A. Efficient transduction of vascularendothelial cells with recombinant adeno-associated virus serotype 1 and 5 vectors. *Hum Gene Ther* 2005;16(2):235-247.

Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE, Provost N, Joussemet B, Bujard H, Samulski RJ, Favre D, Moullier P. Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther* 2004;9(3):410-418.

- Chiorini JA**, Kim F, Yang L, Kotin RM. Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *J Virol* 1999;73(2):1309-1319.
- Chiorini JA**, Yang L, Liu Y, Safer B, Kotin RM. Cloning of adeno associated virus type 4 and generation of recombinant AAV4 particles. *J Virol* 1997;71(9):6823-6833.
- Chirmule N**, Probert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* 1999;6(9):1574-1583.
- Choi VW**, McCarty DM, Samulski RJ. AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther* 2005;5(3): 299-310.
- Chomczynski P**, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-159.
- Ch tarto A**, Bender HU, Hanemann CO, Kemp T, Lehtonen E, Levivier M, Brotchi J, Velu T, Tenenbaum L. Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector. *Gene Therapy* 2003;10(1):84-94.
- Chuah MK**, Schiedner G, Thorrez L, Brown B, Johnston M, Gillijns V, Hertel S, Van Rooijen N, Lillicrap D, Collen D, Van den Dreissche T, Kochanek S. Therapeutic factor VIII levels and negligible toxicity in mouse and dog models of hemophilia A following gene therapy with high-capacity adenoviral vectors. *Blood* 2003;101(5):1734-1743.
- Clark KR**, Sferra TJ, Johnson PR. Recombinant adeno-associated viral vectors mediate long-term transgene expression in muscle. *Hum Gene Ther*. 1997;8(6):659-669.
- Clackson T**. Regulated gene expression systems. *Gene Ther* 2000;7(2):120-125.
- Conlon TJ**, Cossette T, Erger K, Choi YK, Clarke T, Scott-Jorgensen M, Song S, Campbell-Thompson M, Crawford J, Flotte TR. Efficient hepatic delivery and expression from a recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped alpha1-antitrypsin vector. *Mol Ther* 2005;12(5):867-875.
- Connelly S**, Mount J, Mauser A, Gardner JM, Kaleko M, McClelland A, Lothrop CD Jr. Complete short-term correction of canine hemophilia A by *in vivo* gene therapy. *Blood* 1996;88(10):3846-3853.
- Corbel SY**, Rossi FM. Latest developments and *in vivo* use of the Tet system: *ex vivo* and *in vivo* delivery of tetracycline-regulated genes. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13(5):448-452.
- Corti O**, Sabaté O, Horellou P, Colin P, Dumas S, Buchet D, Buc-Caron MH, Mallet J. A single adenovirus vector mediates doxycycline-controlled expression of tyrosine hydroxylase in brain grafts of human neural progenitors. *Nat Biotechnol* 1999;17(7):349-354.
- Couto LB**. Preclinical gene therapy studies for hemophilia using adeno-associated virus (AAV) vectors. *Sem Thromb Hemostasis* 2004;30(2):161-171.
- Couto LB**, Parker A, Gordon JW. Direct exposure of mouse spermatozoa to very high concentrations of a serotype-2 adeno-associated virus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction. *Hum Gene Ther* 2004;15(3):287-291.
- Crawford LV**, Follett EA, Burdon MG, McGeoch DJ. The DNA of a minute virus of mice. *J Gen Virol* 1969;4(1):37-48.
- Cressant A**, Desmaris N, Verot L, Bréjot T, Froissart R, Vanier MT, Maire I, Heard JM. Improved behavior and neuropathology in the mouse model of Sanfilippo type IIIB disease after adeno-associated virus-mediated gene transfer in the striatum. *J Neurosci* 2004; 24(45): 10229-10239.
- Daly TM**, Okuyama T, Vogler C, Haskins ME, Muzczka N, Sands MS. Neonatal intramuscular injection with recombinant adeno-associated virus results in prolonged beta-glucuronidase expression *in situ* and correction of liver pathology in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Hum Gene Ther* 1999;10(1): 85-94.

- Davidoff AM**, Gray JT, Ng CY, Zhang Y, Zhou J, Spence Y, Bakar Y, Nathwani AC. Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5 and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. *Mol Ther* 2005;11(6):875-888.
- Davidoff AM**, Ng CY, Zhou J, Spence Y, Nathwani AC. Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood* 2003;102(2):480-488
- Davidson B**, Stein C, Heth J, Martins I, Kotin RM, Derksen TA, Zabner J, Ghodsi A, Chiorini JA. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(7):3428-3432.
- De B**, Heguy A, Leopold PL, Wasif N, Korst RJ, Hackett NR, Crystal RG. Intrapleural administration of a serotype 5 adeno-associated virus coding for alpha 1-antitrypsin mediates persistent, high lung and serum levels of alpha 1-antitrypsin. *Mol Ther* 2004;10(6):1003-1010.
- De Geest BR**, Van Linthout SA, Collen D. Humoral immune response in mice against a circulating antigen induced by adenoviral transfer is strictly dependent on expression in antigen-presenting cells. *Blood* 2003;101(7):2551-2556.
- De Geest B**, Van Linthout S, Lox M, Collen D, Holvoet P. Sustained expression of human apolipoprotein A-1 after adenoviral gene transfer in C57BL/6 mice: role of apolipoprotein A-1 Promoter, apolipoprotein A-1 introns, and human apolipoprotein E enhancer. *Hum Gene Ther* 2000;11(1):101-112.
- Du L**, Kido M, Lee DV, Rabinowitz JE, Samulski RJ, Jamieson SW, Weitzman MD, Thistlethwaite PA. Differential myocardial gene delivery by recombinant serotype-specific adeno-associated viral vectors. *Mo Ther* 2004;10(3):04-08.
- Duan D**, Sharma P, Yang J, Yue Y, Dudus L, Zhang Y, Fisher KJ, Engelhardt JF. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Viro* 1998;72(11):7567-7577.
- Dugray A**, Geay JF, Foudi A, Bonnet ML, Vainchenker W, Wendling F, Louache F, Turhan AG. Rapid generation of a tetracycline-inducible BCR-ABL defective retrovirus using a single autoregulatory retroviral cassette. *Leukemia* 2001;15(10):1658-1662.
- Dutheil N**, Shi F, Dupressoir T, Linden RM. Adeno-associated virus site-specifically integrates into a muscle-specific DNA region. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97(9): 4862-4866.
- Erles K**, Sebokova P, Schlehofer JR. Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol* 1999;59(3):406-411
- Evans JP**, Brinkhous KM, Brayer GD, Reisner HM, High KA. Canine hemophilia B resulting from a point mutation with unusual consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(24):10095-10099.
- Evatt B**. Creutzfeldt-Jakob disease and haemophilia: assessment of risk. *Haemophilia* 2000;6 Suppl 1:94-99.
- Everett RS**, Evans HK, Hodges BL, Ding EY, Serra DM, Amalfitano A. Strain-specific rate of shutdown of CMV enhancer activity in murine liver confirmed by use of persistent[E1(-),E2b(-)] adenoviral vectors. *Virology* 2004;325(1):96-105.
- Eyster ME**, Gill FM, Blatt PM, Hilgartner MW, Ballard JO, Kinney TR. Central nervous system bleeding in hemophiliacs. *Blood* 1978;51(16):1179-1188.
- Fang J**, Qian JJ, Yi S, Harding TC, Tu GH, VanRoey M, Jooss K. Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat Biotechnol* 2005;23(5):584-590.
- Ferrari FK**, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 1996;70(5):3227-3234.

Fields PA, Arruda VR, Armstrong E, Chu K, Mingozi F, Hagstrom JN, Herzog RW, High KA. Risk and prevention of anti-factor IX formation in AAV-mediated gene transfer in the context of a large deletion of FIX. *Mol Ther* 2001;4(3):201-210.

Fields PA, Kowalczyk DW, Arruda VR, Armstrong E, McClelland ML, Hagstrom JN, Pasi KJ, Ertl HC, Herzog RW, High KA. Role of vector in activation of T cell subsets in immune responses against the secreted transgene product factor IX. *Mol Ther* 2000;1(3):225-235.

Fisher KJ, Gao GP, Weitzman MD, DeMatteo R, Burda JF, Wilson JM. Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J Virol* 1996;70(1):520-532.

Fisher KJ, Jooss K, Alston J, Yang Y, Haecker SE, High K, Pathak R, Raper SE, Wilson JM. Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med* 1997;3(3):306-312.

Fitzsimons HL, McKenzie JM, During MJ. Insulators coupled to a minimal bidirectional tet cassette for tight regulation of rAAV-mediated gene transfer in the mammalian brain. *Gene Ther* 2001;8(22):1675-1681.

Flannery JG, Zolotukhin S, Vaquero MI, LaVail MM, Muzyczka N, Hauswirth WW. Efficient photoreceptor-targeted gene expression *in vivo* by recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(13):6916-6921.

Flotte TR. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 2004;11(10):805-810.

Flotte TR, Afione SA, Solow R, Drumm ML, Markakis D, Guggino WB, Zeitlin PL, Carter BJ. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* 1993a;268(5):3781-3790.

Flotte TR, Afione SA, Solow R, McGrath SA, Conrad C, Zeitlin PL, Guggino WB, Carter BJ. Stable *in vivo* expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993b;90(22):10163-10617.

Flotte TR, Carter BJ. Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther* 1995;2(6):357-362.

Flotte T, Carter B, Conrad C, Guggino W, Reynolds T, Rosenstein B, Taylor G, Walden S, Wetzel R. A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 1996;7(9):1145-1159.

Follenzi A, Battaglia M, Lombardo A, Annoni A, Roncarolo MG, Naldini L. Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. *Blood* 2004;103(10):3700-3709.

Gallia GL, Khalili K. Evaluation of an autoregulatory tetracycline regulated system. *Oncogene* 1998;16(14):1879-1884.

Gao G, Alvira MR, Somanathan S, Lu Y, Vandenberghe LH, Rux JJ, Calcedo R, Sanmiguel J, Abbas Z, Wilson JM. Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(10):6081-6086.

Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(18):11854-11859.

Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 2004;78(12):6381-6388.

Ge Y, Powell S, Van Roey M, McArthur JG. Factors influencing the development of an anti-factor IX immune response following administration of adeno-associated virus-FIX. *Blood* 2001;97(12):3733-3737.

- Georg Fries B**, Biederlack S, Wolf J, Hausen H. Analysis of proteins, helper dependence, and sero-epidemiology of a new human parvovirus. *Virology* 1984;134(1):64-71.
- Ghosh A**, Allamarvdasht M, Pan CJ, Sun MS, Mansfield BC, Byrne BJ, Chou JY. Longterm correction of murine glycogen storage disease type Ia by recombinant adeno-associated virus-1-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2006;13(4):321-329.
- Giangrande PL**. Hepatitis in haemophilia. *Br J Haematol*. 1998;103(1):1-9.
- Giannelli F**, Green PM. The molecular basis of hemophilia a and B. *Baillieres Clin Haematol* 1996;9(2):211-228.
- Gilles JG**, Vanzielegem B, Saint-Remy JM. Animal models to explore mechanisms of tolerance induction to FVIII: SCID mice and SCID-FVIII-KO mice. *Haematologica* 2000;85:103-106.
- Gnatenko DV**, Saenko EL, Jesty J, Cao LX, Hearing P, Bahou WF. Human factor VIII can be packaged and functionally expressed in an adeno-associated virus background: applicability to haemophilia A gene therapy. *Br J Haematol* 1999;104(1):27-36.
- Gonclaves MA**. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Viol J* 2005;2:43.
- González-Barrera S**, Garcia-Rubio M, Aguilera A. Transcription and doublestrand breaks induce similar mitotic recombination events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2002;162(2):603-614.
- Gossen M**, Bonin AL, Bujard H. Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *Trend Biochem Sci* 1993;18(12):471-475.
- Gossen M**, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(12):5547-5551.
- Goverdhan S**, Puntel M, Xiong W, Zirger JM, Barcia C, Curtin JF, Soffer EB, Mondkar S, King GD, Hu J, Sciascia SA, Candolfi M, Greengold DS, Lowenstein PR, Castro MG. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther* 2005;12(2):189-211.
- Graham JB**, Buckwalter JA, Hartley LJ, Brinkhous KM. Canine hemophilia: Observations on the course, the clotting anomaly, and the effect of blood transfusions. *J Exp Med* 1994;90:97-111.
- Greelish JP**, Su LT, Lankford EB, Burkman JM, Chen H, König SK, Mericier IM, Desjardins PR, Mitchell MA, Zheng XG, Leferovich J, Gao GP, Balice-Gordon RJ, Wilson JM, Stedman HH. Stable restoration of the sarcoglycan complex in dystrophic muscle perfused with histamine and a recombinant adeno-associated viral vector. *Nat Med* 1999;5(4):439-443.
- Greenberg CS**, Orthner CL. Blood coagulation and fibrinolyses. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM (eds). *Wintrobe's clinical hematology*, 19th ed., vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins 1999. pp. 1: 684-764.
- Grimm D**, Kay MA. From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 2003a;3(4):281-304.
- Grimm D**, Kay MA, Kleinschmidt JA. Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol Ther* 2003b;7(6):839-50.
- Grimm D**, Kern A, Ritter K, Kleinschmidt JA. Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* 1998;9(18):2745-2760.
- Grimm D**, Zhou S, Nakai H, Thomas CE, Storm TA, Fuess S, Matsushita T, Allen J, Surosky R, Lochrie M, Meuse L, McClelland A, Colosi P, Kay MA. Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy. *Blood* 2003c;102(7):2412-2419.

- Guy J**, Qi X, Hauswirth WW. Adeno-associated viral-mediated catalase expression suppresses optic neuritis in experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(23):13847-13852.
- Gu W**, Brooks M, Catalfamo J, Ray J, Ray K. Two distinct mutations cause severe hemophilia B in two unrelated canine pedigrees. *Thromb Haemost* 1999;82(4):1270-1275.
- Haberman RP**, McCown TJ, Samulski RJ. Inducible long-term gene expression in brain with adeno-associated virus gene transfer. *Gene Ther* 1998;5(12):1604-1611.
- Haberman RP**, McCown TJ, Samulski RJ. Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. *J Virol* 2000;74(18):8732-8739.
- Hacein-Bey-Abina S**, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003;348(3):255-256.
- Hafenrichter DG**, Wu X, Rettinger SD, Kennedy SC, Flye MW, Ponder KP. Quantitative evolution of liver-specific promoters from retroviral vectors after *in vivo* transduction of hepatocytes. *Blood* 1994;84(10):3394-3404.
- Halbert CL**, Allen JM, Miller AD. Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV3 vectors. *J Virol* 2001;75(14):6615-6624.
- Halbert CL**, Rutledge E, Allen J, Russel DW, Miller AD. Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol* 2000;74(3):1524-1532.
- Halbert CL**, Standaert TA, Aitken ML, Alexander IE, Russell DW, Miller AD. Transduction by adeno-associated virus vectors in the rabbit airway: efficiency, persistence, and readministration. *J Virol* 1997;71(8):5932-5941.
- Handa A**, Muramatsu S, Qiu J, Mizukami H, Brown KE. Adeno-associated virus (AAV)-3-based vectors transduce haematopoietic cells not susceptible to transduction with AAV-2-based vectors. *J Gen Virol* 2000;81(8):2077-2084.
- Hanley J**, Jarvis L, Andrews J. Investigation of chronic hepatitis C infection in individuals with haemophilia. *Br J Haematol* 1996;94(1):159-165.
- Hao QL**, Malik P, Salazar R, Tang H, Gordon EM, Kohn DB. Expression of biologically active human factor IX in human hematopoietic cells after retroviral vector-mediated gene transduction. *Hum Gene Ther* 1995;6(7):873-880.
- Harding TC**, Koprivnikar KE, Tu GH, Zayek N, Lew S, Subramanian A, Sivakumaran A, Frey D, Ho K, VanRoey MJ, Nichols TC, Bellinger DA, Yendluri S, Waugh J, McArthur J, Veres G, Donahue BA. Intravenous administration of an AAV-2 vector for the expression of factor IX in mice and a dog model of hemophilia B. *Gene Ther* 2004;11(2):204-213.
- Hasan MT**, Schönig K, Berger S, Graewe W, Bujard H. Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis* 2001;29(3):116-122.
- Hauck B**, Zhao W, High K, Xiao W. Intracellular viral processing, not single-stranded DNA accumulation, is crucial for recombinant adeno-associated virus transduction. *J Virol* 2004;78(24):13678-13686.
- Hedner U**, Davie EW. Hemostasis and Thrombosis 1982 (Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, Eds) pp 29-38, Lippincott, Philadelphia.
- Herzog RW**, Dobrzynski E. Immune implications of gene therapy for hemophilia. *Semin Thromb Hemost* 2004;30(2):215-226.

- Herzog RW**, Fields PA, Arruda VR, Brubaker JO, Armstrong E, McClintock D, Bellinger D, Coutor L, Nichols T, High KA. Influence of vector dose on factor IX-specific T and B cell responses in muscle-directed gene therapy. *Hum Gene Ther* 2002;13(11):1281-1291.
- Herzog RW**, Hagstrom JN, Kung SH, Tai SJ, Wilson JM, Fisher KJ, High KA. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(11):5804-5809 .
- Herzog RW**, Mount JD, Arruda VR, High KA, Lothrop CD Jr. Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther* 2001;4(3):192-200.
- Herzog RW**, Yang EY, Couto LB, Hagstrom JN, Elwell D, Fields PA, Burton M, Bellinger DA, Read MS, Brinkhous KM, Podsakoff GM, Nichols TC, Kurtzman GJ, High KA. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nature Med* 1999;5(1):56-63.
- High KA**. Clinical gene transfer studies for hemophilia B. *Semin Thromb Hemost* 2004b;30(2):257-267.
- High KA**. Factor IX: Molecular structure, epitopes, and mutations associated with inhibitor formation. *Adv Exp Med Biol* 1995; 368: 79-86.
- High KA**. Gene transfer as an approach to treating hemophilia. *Semin Thromb Hemost* 2003;29(1):107-120.
- High KA**, Tigges M, Manno C, Sabatino D, Arruda V, Herzog R, Rustagi P, Rasko J, Sommer J, Jaworski K, Ragni M, Dladler B, Lessard R, Luk A, Couto L, Jiang H, Pierce G, Kay M. Human immune response to AAV-2 capsid may limit duration of expression in liver-directed gene transfer in humans with hemophilia B. *Blood* 2004a;104(Suppl):121(abstract).
- Hildinger M**, Auricchio A, Gao G, Wang L, Chrimule N, Wilson JM. Hybrid vectors based on adeno-associated virus serotypes 2 and 5 for muscle-directed gene transfer. *J Virol* 2001;75(13):6199-6203.
- Ho DY**, McLaughlin JR, Sapolsky RM. Inducible gene expression from defective herpes simplex virus vectors using the tetracycline-responsive promoter system. *Brain Res Mol* 1996 5;41(1-2):200-209.
- Hoeben RC**, Einerhand MP, Briet E, van Ormondt H, Valerio D, van der Eb AJ. Toward gene therapy in haemophilia A: retrovirus-mediated transfer of a factor VIII gene into murine haematopoietic progenitor cells. *Thromb Haemost* 1992;67(3):341-345.
- Hofmann A**, Nolan GP, Blau HM. Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;93(11):5185-5190.
- Hoggan M**, Blacklow N, Rowe W. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966;55(6):1467-1474.
- Hough C**, Kamisue S, Cameron C, Notley C, Tinlin S, Giles A, Lillicrap D. Aberrant splicing and premature termination of transcription of the FVIII gene as a cause of severe canine hemophilia A: similarities with the intron 22 inversion mutation in human hemophilia. *Thromb Haemost* 2002;87(4):659-656.
- Hsueh JL**. Clinical protocol of human gene transfer for hemophilia B. *Hum Gene Ther* 1992;3(5):543-542.
- Huang L-C**, Clarkin KC, Wahl GM. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G₁ arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(10):4827-4832.
- Huttner NA**, Girod A, Schnittger S, Schloch C, Hallek M, Buning H. Analysis of site-specific transgene integration following cotransduction with recombinant adeno-associated virus and a rep encoding plasmid. *J Gene Med* 2003;5(2):120-129.

- Isarangkura P.** Haemophilia care in the developing world: benchmarking for excellence. *Haemophilia* 2002;8(3):205-10.
- Isom I,** Georgoff I, Salditt-Georgieff M, Darnell JE JR. Persistence of liver-specific messenger RNA in cultured hepatocytes: Different regulatory events for different genes. *J Cell Biol* 1987;105(6 Pt2):2877-2885.
- Jiang H,** Lillicrap D, Patarroyo-White S, Liu T, Qian X, Scallan CD, Powell S, Keller T, McMurray M, Labelle A, Nagy D, Vargas JA, Zhou S, Couto LB, Pierce GF. Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2,6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. *Blood* 2006;108(1):107-115
- Jiang L,** Rampalli S, George D, Press C, Bremer EG, O’Gorman MR, Bohn MC. Tight regulation from a single tet-off rAAV vector as demonstrated by flow cytometry and quantitative, real-time PCR. *Gene Ther* 2004;11(13):1057-1067.
- Jin DY,** Zhang TP, Gui T, Stafford DW, Monahan PE. Creation of a mouse expressing defective human factor IX. *Blood* 2004;104(6):1733-1739.
- Jomary C,** Vincent KA, Grist J, Neal MJ, Jones SE. Rescue of photoreceptor function by AAV-mediated gene transfer on a mouse model of inherited retinal degeneration. *Gene Ther* 1997;4(7):683-690.
- Jones PK,** Ratnoff OD. The changing prognosis of classic hemophilia (factor VIII “deficiency”). *Ann Intern Med* 1991;114(8):641-648.
- Jooss K,** Yang Y, Fisher KJ, Wilson JM. Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J Virol* 1998;72(5):4212-4223.
- Kaludov N,** Handelsman B, Chiorini JA. Scalable purification of adeno-associated virus type 2,4, or 5 using ion-exchange chromatography. *Hum Gene Ther* 2002;12(10):1235-1243.
- Kaplitt MG,** Leone P, Samulski RJ, Xiao X, Pfaff DW, O’Malley KL, During MJ. Long-term gene expression and phenotypic connection using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nature genetics* 1994;8(2):148-154.
- Kaufman RJ.** Advances toward gene therapy for hemophilia at the millennium. *Hum Gene Ther* 1999;10(13):2091-2107.
- Kawamoto S,** Shi Q, Nitta Y, Miyazaki J, Allen MD. Widespread and early myocardial gene expression by adeno-associatedvirus vector type 6 with a beta-actin hybrid promoter. *Mol Ther.* 2005;11(6):980-985.
- Kay MA,** Li Q, Liu TJ, Leland F, Toman C, Finegold M, Woo SL. Hepatic gene therapy: Persistent expression of human alpha 1-antitrypsin in mice after direct gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther* 1992;3(6):641-647.
- Kay MA,** Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 2000;24(3):257-261.
- Kelley K,** Verma I, Pierce GF. Gene therapy: reality or myth for the global bleeding disorder community? *Haemophilia* 2002;8(3):261-267.
- Kessler PD,** Podsakoff GM, Chen X, McQuiston SA, Colosi PC, Matelis LA, Kurtzman GJ, Byrne BJ. Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(24):14082-14087.
- Kikuchi J,** Mimuro J, Ogata K, Tabata T, Ueda Y, Ishiwata A, Kimura K, Takano K, Madoiwa S, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y. Sustained transgene expression by human cord blood derived CD34+ cells transduced with simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vectors carrying the human coagulation factor VIII gene in NOD/SCID mice. *J Gene Med* 2005;6(10):10590-1060.

- Klein RL**, Hamby ME, Sonntag CF, Millard WJ, King MA, Meyer EM. Measurements of vector-derived neurotrophic factor and green fluorescent protein levels in the brain. *Methods*. 2002;28(2):286-92.
- Knobloch O**, Ludwig M. Molekularbiologie und Genetik der Hämophilie B. In Müller-Bergausen G, Pötzsch B, Hrsg. Hämostaseologie. Berlin; Springer; 1998. S 149-171.
- Kotin RM**, Linden RM, Berns KI. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J* 1992;11(13):5071-5078.
- Kotin RM**, Menninger JC, Ward DC, Berns KI. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* 1991;10(3):831-834.
- Kotin RM**, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(6):2211-2215.
- Kringstein AM** Rossi FM, Hofmann A, Blau HM. Graded transcriptional response to different concentrations of a single transactivator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(23):13670-13675.
- Kundu RK**, Sangiogi F, Wu LY, Kurachi K, Anderson WF, Maxson R, Gordon EM. Targeted inactivation of the coagulation factor IX gene causes hemophilia B in mice. *Blood* 1998;92(1):168-174.
- Kurachi S**, Pantazatos DP, Kurachi K. The carboxyl-terminal region of factor IX is essential for its secretion. *Biochemistry* 1997;36(14):4337-4344.
- Laemmli UK**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(259):680-685.
- Lam PY**, Sia KC, Khong JH, De Geest B, Lim KS, Ho IA, Wang GY, Miao LV, Huynh H, Hui KM. An efficient and safe herpes simplex virus type 1 amplicon vector for transcriptionally targeted therapy of human hepatocellular carcinomas. *Mol Ther* 2007;15(6):1129-1136.
- Laurian Y**, Dussaix E, Parquet A, Chalvon-Demersay A, d'Oiron R, Tchernia G. Transmission of human parvovirus B19 by plasma derived factor VIII concentrates. *Nouv Rev Fr Haematol* 1994; 36(6):449-453.
- Le Bec C**, Douar AM. Gene therapy progress and prospects--vectorology: design and production of expression cassettes in AAV vectors. *Gene Ther* 2006;13(10):805-13.
- Lee C**. Recombinant clotting factors in the treatment of hemophilia. *Thromb Haemost* 1999;82(2):516-524.
- Lee JS**, Lee M, Kim SW. A new potent hFIX plasmid for hemophilia B gene therapy. *Pharm Res*. 2004;21(7):1229-1232.
- Lewin AS**, Drenser KA, Hauswirth WW, Nishikawa S, Yasumura D, Flannery JG, LaVail MM. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in transgenic model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature Med* 1998;4(8):967-971.
- Lin H-F**, Maeda N, Smithies O, Straight DL, Stafford DW. A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B. *Blood* 1997;90(10):3962-3966.
- Lin Y**, Chang L, Solovey A, Healey JF, Lollar P, Hebbel RP. Use of blood outgrowth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A. *Blood* 2002;99(2):457-462.
- Linden RM**, Ward P, Giraud C, Winocour E, Berns KI. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(21):11288-11297.
- Linnen J**, Wages Jr. J, Zhang-Keck ZY, Fry K, Krawczynski K, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Karayiannis P, Fung K, Nakatsuji Y, Shih JWK, Young L, Piatak Jr. M, Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zou JC, Morris T, Hyams K, Ismay S, Lifson J, Hess G, Fong S, Thomas H,

Bradley D, Margolis H, Kim J. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent. *Science* 1996;271:505-508.

Lipshutz GS, Titre D, Brindle M, Bisconte AR, Contag CH, Gaensler KM. Comparison of gene expression after intra-peritoneal delivery of AAV2 or AAV5 *in utero*. *Mol Ther* 2003;8(1):90-98.

Liu G, Martins I, Wemmie JA, Chiorini JA, Davidson BL. Functional correction of CNS phenotypes in a lysosomal storage disease model using adeno-associated virus type 4 vectors. *J Neurosci* 2005; 25(41):9321-9327.

Liu Y, Okada T, Sheykholslami K, Shimazaki K, Nomoto T, Muramatsu S, Kanazawa T, Takeuchi K, Ajalli R, Mizukami H, Kume A, Ichimura K, Ozawa K. Specific and efficient transduction of Cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther* 2005;12(4):725-733.

Ljung RC. Can haemophilic arthropathy be prevented? *Br J Haematol* 1998;101(2):215-219.

Loeb JE, Cordier WS, Harris ME, Weitzman MD, Hope TJ. Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 1999;10(14):2295-2305.

Lofqvist T, Nilsson IM, Berntorp E, Pettersson H. Haemophilia prophylaxis in young patients – a long term follow up. *J Intern Med* 1997;241(5):395-400.

Loiler SA, Conlon TJ, Song S, Tang Q, Warrington KH, Agarwal A, Kapturczak M, Li C, Ricordi C, Atkinson MA, Muzyczka N, Flotte TR. Targeting recombinant adeno-associated virus vectors to enhance gene transfer to pancreatic islets and liver. *Gene Ther* 2003;10(18):1551-1558.

Lotery AJ, Yang GS, Mullins RF, Russell SR, Schmidt M, Stone EM, Lindbloom JD, Chiorini JA, Kotin RM, Davidson BL. Adeno-associated virus type 5: transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina. *Hum Gene Ther* 2003;14(17):1663-1571.

Louboutin JP, Wang L, Wilson JM: Gene transfer into skeletal muscle using novel AAV serotypes. *J Gene Med*. 2005;7(4):442-451.

Lozier J. Gene therapy of the hemophilias. *Semin Hematol* 2004;41(4):287-296.

Lozier JN, Dutra A, Pak E, Zhou N, Zheng Z, Nichols TC, Bellinger DA, Read M, Morgan RA. The Chapel Hill hemophilia A dog colony exhibits a factor VIII gene inversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(20):12991-12996.

Lusher JM. Inhibitor antibodies to factor VIII and XI: management. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(2):179-188.

Lyon DJ, Chapman CS, Martin C, Brown KE, Clewley JP, Flower AJE und Mitchell VE. Symptomatic parvovirus B19 infection and heat treated factor IX concentrate. (letter). *Lancet* 1989;1(8648):1985.

Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, Tai SJ, Ragni MV, Thompson A, ozelo M, Couto LB, Leonard DG, Johnson FA, McClelland A, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, Kay MA, High KA, Glader B. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 2003;101(8):2963-2972.

Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJE, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, Rustagi PK, Nakai H, Chew A, Leonard D, Wright JF, Lessart RR, Sommer JM, Tigges M, Sabatino D, Luk A, Jiang H, Mingozzi F, Couto L, Ertl HC, High KA, Kay MA. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006;12(3):342-347.

Mannucci PM. Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. *J Thromb Haemost* 2003;1(7):1349-1355.

Mannucci PM, Giangrande PL. Choice of replacement therapy for hemophilia: recombinant products only? *Hematol J* 2000;1(2):72-76.

- Mannucci PM**, Tuddenham EG. Medical progress: the hemophilias – from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med* 2001;344(23):1773-1779.
- Marasco WA**. Therapeutic antibody gene transfer. *Nat Biotechnol* 2005;23(5):551-552.
- Marshall E**. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 1999;286(5448):2244-2245.
- Matsushita T**, Okada T, Inaba T, Mizukami H, Ozawa K, Colosi P. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 1998;5(7):938-945.
- Mauser AE**, Whitlark J, Whitney KM, Lothrop CD Jr. A deletion mutation causes hemophilia B in Lhasa Apso dogs. *Blood* 1996;88(9):3451-3455.
- McCarty DM**, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 2001; 8(16):1248-1254.
- McGee Sanftner LH**, Rendahl KG, Quiroz D, Coyne M, Ladner M, Manning WC, Flannery JG. Recombinant AAV mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina. *Mol Ther* 2001; 3(5 Pt 1):688-696.
- Melnick JL**, Mayor HD, Smith KO, Rapp F. Association of 20millimicron particles with adenoviruses. *J Bacteriol* 1965;90(1):271-274.
- Miao CH**, Nakai H, Thompson AR, Storm TA, Chiu W, Snyder RO, Kay MA. Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction. *J Virol* 2000a;74(8):3793-3803.
- Miao CH**, Ohashi K, Patijn GA, Meuse L, Ye X, Thompson AR, Kay MA. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro. *Mol Ther* 2000b;1(6):522-532.
- Miao CH**, Snyder RO, Schowalter DB, Patijn GA, Donahue B, Winther B, Kay MA. The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nat Genet*. 1998;19(1):13-15.
- Miller DG**, Petek LM, Russell DW. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat Genet* 2004;36(7):767-773.
- Miller DG**, Trobridge GD, Petek LM, Jacobs MA, Kaul R, Russell DW. Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells. *J Virol* 2005;79(17):11434-11442.
- Mingozzi F**, Liu YL, Dobrzynski E, Kaufhold A, Liu JH, Wang Y, Arruda VR, High KA, Herzog RW. Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by *in vivo* hepatic gene transfer. *J Clin Invest* 2003;111(9):1347-1356.
- Mingozzi F**, Schuettrumpf J, Arruda VR, Liu Y, Liu YL, High KA, Xiao W, Herzog RW. Improved hepatic gene transfer by using an adeno-associated virus serotype 5 vector. *J Virol* 2002;76(20):10497-10502.
- Mitruka BM**, Rawnsley HM, Vadehra DV. *Animals for Medical Research-Models for the Study of Human Disease*. 216; John Wiley & Sons, New York, 1976.
- Mizuguchi H**, Hayakawa T. The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector. *J Gene Med* 2002;4(3):240-247.
- Moayeri M**, Ramezani A, Morgan RA, Hawley TS, Hawley RG. Sustained phenotypic correction of hemophilia A mice following oncoretroviral-mediated expression of a bioengineered human factor VIII gene in long-term hematopoietic repopulating cells. *Mol Ther* 2004;10(5):892-902
- Monahan PE**, Samulski RJ. AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther* 2000;7(1):24-30.

- Monahan PE**, Samulski RJ, Tazelaar J, Xiao X, Nichols TC, Bellinger DA, Read MS, Walsh CE. Direct intramuscular injection with recombinant-AAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia. *Gene Ther* 1998;5(1):40-49.
- Mori S**, Wang L, Takeuchi T, Kanda T. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 2004;330(2):357-383.
- Morral N**, Parks RJ, Zhou H, Langston C, Schiedner G, Quinones J, Graham FL, Kochanek S, Beaudet AL. High doses of a helper-dependent adenoviral vector yield supraphysiological levels of alpha 1-antitrypsin with negligible toxicity. *Hum Gene Ther* 1998;9(18):2709-2716.
- Moskalenko M**, Chen L, van Roey M, Donahue BA, Snyder RO, McArthur JG, Patel SD. Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol* 2000;74(4):1761-1766
- Mount JD**, Herzog RW, Tillson DM, Goodman SA, Robinson N, McClelland ML, Bellinger D, Nichols TC, Arruda VR, Lothrop CD Jr, High KA. Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood* 2002;99(8):2670-2676.
- Muzyczka N**. Use of adeno-associated virus as a generalized transduction vector in mammalian cells. *Current Topics Microbiol Immunol* 1992;158:97-129.
- Muzyczka N**, Berns KI. Parvoviridae: the viruses and their replication, p 2327-2360. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ed.), *Fields virology*, 4th ed. 2002 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Nakai H**, Iwaki Y, Kay MA, Couto LB. Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver. *J Virol* 1999;73(7):5438-5447.
- Nakai H**, Montini E, Fuess S, Storm TA, Grompe M, Kay MA. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 2003;34(3):297-302.
- Nakai H**, Thomas CE, Storm TA, Fuess S, Powell S, Wright JF, Kay MA. A limited number of transducible hepatocytes restricts a wide-range linear vector dose response in recombinant adeno-associated virus-mediated liver transduction. *J Virol* 2002;76(22):11343-11349.
- Nakai H**, Wu X, Fuess S, Storm TA, Munroe D, Montini E, Burgess SM, Grompe M, Kay MA. Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver. *J Virol* 2005;79(6):3606-3614.
- Nakai H**, Yant SR, Storm TA, Fuess S, Meuse I, Kay MA. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction *in vivo*. *J Virol* 2001;75(15):6969-6976
- Naoumov NV**, Petrova EP, Thomas MG, Williams R. Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* 1998;352:195-197.
- Nathwani AC**, Davidoff A, Hanawa H, Hu Y, Hoffer FA, Nikanorov A, Slaughter C, Ng CY, Zhou J, Lozier JN, Mandrell TD, Vanin EF, Nienhuis AW. Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques. *Blood* 2002;100(5):1662-1669.
- Nathwani AC**, Davidoff A, Hanawa H, Zhou JF, Vanin EF, Nienhuis AW. Factors influencing *in vivo* transduction by recombinant adeno-associated viral vectors expressing the human factor IX cDNA. *Blood* 2001;97(5):1258-1265
- Nathwani AC**, Davidoff AM, Tuddenham EG. Prospects for gene therapy of haemophilia. *Haemophilia* 2004;10(4):309-318.
- Nawroth PP**. Die Regulation der plasmatischen Gerinnung. In: Müller-Bergausen G, Pötzsch B, Hrsg. *Hämostaseologie*; Springer-Verlag Berlin; 1999:113-121.

- Ogata K**, Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Naito M, Madoiwa S, Takano K, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y. Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy. *Gene Ther* 2004;11(3):253-259.
- Ogueta SB**, Yao F, Marasco WA. Design and *in vitro* characterization of a single regulatory module for efficient control of gene expression in both plasmid DNA and a self-inactivating lentiviral vector. *Mol Med* 2001;7(8):569-579.
- Okayama H**, Chen C. Calcium phosphate mediated gene transfer into established cell lines. *In: Gen transfer and expression protocols*, Murray EJ (ed.). Clifton, New Jersey: Humana Press 1991pp.15-21.
- Okuyama T**, Huber RM, Bowling W, Pearline R, Kennedy SC, Flye MW, Ponder KP. Liver-directed gene therapy: Retroviral vector with a complete LTR and the Apo E enhancer-alpha 1-antitrypsin promoter dramatically increases expression of human alpha 1-antitrypsin *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1996;7(5):637-645.
- Oldenburg J**, Brackmann HH. Diagnostik, Klinik und Therapie der Hämophilie A und B. *In: Müller-Bergausen G, Pötzsch B, Hrsg. Hämostaseologie*. Springer-Verlag Berlin; 1998. S 185-197.
- Palmer TD**, Rosman G, Osborne W, Miller AD: Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(4):1330-1334.
- Parks WP**, Boucher DW, Melnick JL, Taber LH, Yow MD. Seroepidemiological and ecological studies of the adenovirus-associated satellite viruses. *Infect Immun* 1970;2(6):716-722.
- Parks WP**, Melnick J, Rongey R, Mayor H. Physical assay and growth cycle studies of a defective adeno-satellite virus. *J Virol* 1976;1(1):171-180.
- Passini MA**, Watson DJ, Vite CH, Landsburg DJ, Feigenbaum AL, Wolfe JH. Intraventricular brain injection of adeno-associated virus type 1 (AAV1) in neonatal mice results in complementary patterns of neuronal transduction to AAV2 and total long-term correction of storage lesions in the brains of beta-glucuronidase-deficient mice. *J Virol* 2003;77(12):7034-7040.
- Pastore L**, Morral N, Zhou H, Garcia R, Parks RJ, Kochanek S, Graham FL, Lee B, Beaudet AL. Use of liver-specific promoter reduces immune response to the transgene in adenoviral vectors. *Hum Gene Therapy* 1999;10(11):1773-1781.
- Peel AL**, Klein RL. Adeno-associated virus vectors: activity and applications in the CNS. *J Neurosci Methods*. 2000;98(2):95-104.
- Podsakoff G**, Wong KK Jr, Chatterjee S. Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J Virol*. 1994;68(9):5656-66.
- Ponder KP**, Dunbar RP, Wilson DR, Darlington GJ, Woo SL. Evaluation of relative promoter strength in primary hepatocytes using optimized lipofection. *Hum Gene Ther* 1991;2(1):41-52.
- Prasad KM**, Yang Z, Bleich D, Nadler JL. Adeno-associated virus vector mediated gene transfer to pancreatic beta cells. *Gene Ther* 2000;7(18):15553-1561.
- Qing K**, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 1999;5(1):71-77.
- Qiu X**, Lu D, Zhou J, Wang J, Yang J, Meng P, Hsueh JL. Implantation of autologous skin fibroblast genetically modified to secrete clotting factor IX partially corrects the hemorrhagic tendencies in two hemophilia B patients. *Chin Med J* 1996;109(11):832-839.
- Rabinowitz JE**, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002;76(2):791-801.

- Rabinowitz JE**, Samulski J. Adeno-associated virus expression system for gene transfer. *Curr Opin Biotechnol* 1998;9(5):470-475.
- Recchia A**, Perani L, Sartori D, Olgiati C, Mavilio F. Site-specific integration of functional transgenes into the human genome by adeno/AAV hybrid vectors. *Mol Ther* 2004;10(4):660-667.
- Reich SJ**, Auricchio A, Hildinger M, Glover E, Maguire AM, Wilson JM, Bennett J. Efficient trans-splicing in the retina expands the utility of adeno-associated virus as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther* 2003;14(1):37-44.
- Rendahl KG**, Leff SE, Otten GR, Spratt SK, Bohl D, Van Roey M, Donahue BA, Cohen LK, Mandel RJ, Danos O, Snyder RO. Regulation of gene expression *in vivo* following transduction by two separate rAAV vectors. *Nat Biotechnol* 1998;16(8):757-761.
- Report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee.** Assessment of adenoviral vector safety and toxicity. *Hum Gene Ther* 2002;13(1):3-13.
- Rettinger SD**, Kennedy SC, Wu X, Saylor RS, Hafenrichter DG, Flye MW, Ponder KP: Liver-directed gene therapy: Quantitative evaluation of promoter elements using *in vivo* retroviral transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(6):510-517
- Roberts H**, Hoffman M. Hemophilia and related conditions – inherited deficiencies of prothrombin (factor II), factor V, and Factor VII to XII. In: Beutler E, Lichtman M, Coller B, Kipps T Williams hematology 5th ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 1995. Pp. 1415-1416.
- Roberts H**, Lozier J. Clinical aspects and therapy for hemophilia B. In Hoffman R, Benz E, Shattil S, et al., editors. Hematology, basic principles and practice. New York; Churchill- Livingstone; 1991. Pp. 1325-1331.
- Roth DA**, Tawa NE Jr, O'Brien JM, Treco DA, Selden RF; Factor VIII Transkaryotic Therapy Study Group. Non-viral gene transfer of blood coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N Engl J Med*. 2001;344(23):1735-42
- Russell DW**, Alexander IE, Miller AD. DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(12):5719-5723.
- Russell KE**, Olsen EH, Raymer RA, Merricks EP, Bellinger DA, Read MS, Rup BJ, Keith JC Jr, McCarthy KP, Schaub RG, Nichols TC. Reduced bleeding events with subcutaneous administration of recombinant human factor IX in immune-tolerant hemophilia B dogs. *Blood* 2003;102(13):4393-4398.
- Rutledge EA**, Halbert CL, Russell DW. Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus serotypes other than AAV type 2. *J Virol* 1998;72(1):309-319.
- Sabatino DE**, Armstrong E, Edmonson S, Liu YL, Pleimes M, Schuettrumpf J, Fitzgerald J, Herzog RW, Arruda VR, High KA. Novel hemophilia B mouse models exhibiting a range of mutations in the Factor IX gene. *Blood* 2004;104(9):2767-2774.
- Sakaguchi S**, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001;182:18-32.
- Sambrook J**, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual; 2nd ed. Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Laboratory press 1989.
- Samulski RJ**. Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3(1):74-80.
- Samulski RJ**, Sally M, Muzyczka N. Adeno-associated viral vectors. In: Friedman T. The development of human gene therapy. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999. pp. 131-172.

- Sandalon Z**, Bruckheimer EM, Lustig KH, Rogers LC, Peluso RW, Burstein H. Secretion of a TN-FR:Fc fusion protein following pulmonary administration of pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol* 2004;78(22):12355-12365.
- Sandig V**, Loser P, Lieber A, Kay MA, Strauss M. HBV-derived promoters direct liver-specific expression of an adenovirally transduced LDL receptor gene. *Gene Ther.* 1996;3(11):1002-1009.
- Santagostino E**, Mannucci PM, Gringeri A, Azzi A, Morfini M, Musso R, Santoro R, Schiavoni M. Transmission of parvovirus B19 by coagulation factor concentrates exposed to 100°C heat after lyophilization. *Transfusion* 1997;37(5):517-522.
- Sarkar R**, Tetreault R, Gao G, Wang L, Bell P, Chandler R, Wilson JM, Kazazian Jr HH. Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV8 serotype. *Blood* 2004;103(4):1253-1260.
- Sarkar J**, Xiao W, Kazazian HH Jr. A single adeno-associated virus (AAV)-murine factor VIII vector partially corrects the hemophilia A phenotype. *J Thromb Haem* 2003;1(2):220-226.
- Saudan P**, Vlach J, Beard P. Inhibition of S-phase progression by adeno-associated virus Rep78 protein is mediated by hypophosphorylated pRb. *EMBO J* 2000;19(16):4351-4361
- Scallan CD**, Liu T, Parker AE, Patarroyo-White SL, Chen H, Jiang H, Vargas J, Nagy D, Powell SK, Wright JF, Sarkar R, Kazazian HH, McClelland A, Couto LB. Phenotypic correction of a mouse model of hemophilia A using AAV2 vectors encoding the heavy and light chains of FVIII. *Blood.* 2003;102(12):3919-3926.
- Scharfmann R**, Axelrod JH, Verma IM: Long-term *in vivo* expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(11):4626-4630.
- Schiedner G**, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus results in improved *in vivo* gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 1998;18(3):180-183.
- Schmidt AE**, Bajaj SP. Structure-function relationships in factor IX and factor IXa. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13(1):39-45.
- Schmidt M**, Afione S, Kotin RM. Adeno-associated virus type 2 Rep 78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53. *J Virol* 2000;74(20):9441-9450.
- Schnepp BC**, Clark KR. Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors *In: Methods in molecular medicine*, Vol 69, Gene therapy protocols, Morgan JR (ed) 2nd Ed. Totowa, New Jersey. Humana Press 2002.pp 427-443.
- Schnepp BC**, Clark KR, Klemanski DL, Pacak CA, Johnson PR. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* 2003;77(6):3495-3504.
- Schuettrumpf J**, Herzog RW, Schlachterman A, Kaufhold A, Stafford DW, Arruda VR. Factor IX variants improve gene therapy efficacy for hemophilia B. *Blood.* 2005;105(6):2316-2323
- Schuettrumpf J**, Liu JH, Couto LB, Addya K, Leonard DG, Zhen Z, Sommer J, Arruda VR. Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol Ther* 2006;13(6):1643-1673.
- Smith TA**, Mehaffey MG, Kayda DB, Saunders JM, Yei S, Trapnell BC, McClelland A, Kaleko M. Adenovirus mediated expression of therapeutic plasma levels of human factor IX in mice. *Nat Genet* 1993;5(4):397-402.
- Smuda JW**, Carter BJ. Adeno-associated viruses having nonsense mutations in the capsid gene: growth in mammalian cells having an inducible amber suppressor. *Virology* 1991;184(1):310-318.

- Snyder RO**, Miao C, Meuse L, Tubb J, Donahue BA, Lin HF, Stafford DW, Patel S, Thompson AR, Nichol T, Read MS, Bellinger DA, Brinkhous KM, Kay MA. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 1999;5(1):64-70.
- Snyder RO**, Miao CH, Patijn GA, Spratt SK, Danos O, Nagy D, Gown AM, Winther B, Meuse L, Cohen LK, Thompson AR, Kay MA. Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 1997a;16(3):270-276.
- Snyder RO**, Spratt SK, Lagarde C, Bohl D, Kaspar B, Sloan B, Cohen LK, Danos O. Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum Gene Ther* 1997b;8(16):1891-1900.
- Solera J**, Espinosa A, Geijo P, Martínez-Alfaro E, Sáez L, Sepúlveda MA, Ruiz-Ribó MD. Treatment of human brucellosis with netilmicin and doxycycline. *Clin Infect Dis*. 1996;22(3):441-5.
- Soucie JM**, Evatt B, Jackson D. Occurrence of hemophilia in the United States. The Hemophilia Surveillance System Project Investigators. *Am J Hematol* 1998;59(4):288-294.
- Soucie JM**, Nuss R, Evatt B, Abdelhak A, Cowan L, Hill H, Kolakoski M, Wilber N. Mortality among males with hemophilia: relations with source of medical care. *Blood* 2000;96(2):437-442.
- Srivastava A**. Delivery of haemophilia care in the developing world. *Haemophilia* 1998;4(Suppl 2):33-40.
- Srour MA**, Fechner H, Wang X, Siemetzki U, Albert T, Oldenburg J, Hanfland P, Poller W, Brackmann HH, Schwaab R. Regulation of human factor IX expression using doxycycline-inducible gene expression system. *Thromb Haemost* 2003;90(3):398-405.
- Stedman H**, Wilson JM, Finke R, Kleckner AL, Mendell J. Phase I clinical trial utilizing gene therapy for limb girdle muscular dystrophy: alpha-, beta-, gamma-, or delta-sarcoglycan gene delivered with intramuscular instillations of adeno-associated vectors. *Hum Gene Ther* 2000;11(5):777-790.
- Steinbach S**, Wistuba A, Bock T, Kleinschmidt JA. Assembly of adeno-associated virus type 2 capsids in vitro. *J Gen Virol* 1997;78(Pt6):1453-1462.
- Summerford C**, Bartlett JS, Samulski RJ. $\alpha_v\beta_5$ integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 1999;5(1):78-82.
- Summerford C**, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 1998;72(2):1438-1445.
- Sun B**, Zhang H, Franco LM, Brown T, Bird A, Schneider A, Koeberl DD. Correction of glycogen storage disease type II by an adeno-associated virus vector containing a muscle-specific promoter. *Mol Ther* 2005a;11(6):889-898.
- Sun B**, Zhang H, Franco LM, Young SP, Schneider A, Bird A, Amalfitano A, Chen YT, Koeberl DD. Efficacy of an adeno-associated virus 8-pseudotyped vector in glycogen storage disease type II. *Mol Ther* 2005b;11(1):57-65.
- Tawa N**, Goldberg A. *Myology*. New York, McGraw-Hill, Inc. 1994.
- Thomas CE**, Storm TA, Huang Z, Kay MA. Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol* 2004;78(6):3110-3122.
- Tiede A**, Eder M, von Depka M, Battmer K, Luther S, Kiem HP, Ganxer A, Scherr M. Recombinant factor VIII expression in hematopoietic cells following lentiviral transduction. *Gene Ther* 2003;10(22):1917-1925.
- Toniatti C**, Bujard H, Cortese R, Ciliberto G. Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Therapy* 2004;11(8):649-657.

Unsinger J, Kröger A, Hauser H, Wirth D. Retroviral vectors for the transduction of autoregulated, bidirectional expression cassettes. *Mol Ther* 2001;4(5):484-489.

Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W. Exploring the Sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(14):7963-68.

US Department of Health and Human Services. 2000. Vol 2. No.2.

van Hylckama Vlieg A, van der Linden IK, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2000;95(12):3678-3682.

VandenDriessche T, Collen D, Chuah MK. Gene therapy for the hemophilias. *J Thromb Haemost* 2003;1(7):1550-1558.

Van Linthout S, Collen D, De Geest B. Effect of promoters and enhancers on expression, transgene DNA persistence, and hepatotoxicity after adenoviral gene transfer of human apolipoprotein A-1. *Hum Gene Ther* 2002;13(7):829-840.

Virella-Lowell I, Zusman B, Foust K, Loiler S, Conlon T, Song S, Chesnut KA, Ferkol T, Flotte TR. Enhancing rAAV vector expression in the lung. *J Gene Med* 2005;7(7):842-850.

Wagner JA, Messner AH, Moran ML, Daifuku R, Kouyama K, Desch JK, Manley S, Norbash AM, Conrad CK, Friborg A, Reynolds T, Guggino WB, Moss RB, Carter BJ, Wine JJ, Flotte TR, Gardner P. Safety and biological efficacy of an adeno-associated virus vector-cystic fibrosis transmembrane regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus. *Laryngoscope* 1999;109(2Pt1): 2666-274.

Wagner JA, Moran ML, Messner AH, Daifuku R, Conrad CK, Reynolds T, Guggino WB, Moss RB, Carter BJ, Wine JJ, Flotte TR, Gardner P. A phase I/II study of tgAAV-CF for the treatment of chronic sinusitis in patients with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther*. 1998;9(6):889-909.

Walsh CE. Gene therapy progress and prospects: gene therapy for the hemophilias. *Gene Ther* 2003;10(12):999-1003.

Wang AY, Peng PD, Ehrhardt A, Storm TA, Kay MA. Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery *in vivo*. *Hum Gene Ther* 2004;15(4):405-413.

Wang L, Calcedo R, Nichols TC, Bellinger DA, Dillow A, Verma IM, Wilson JM. Sustained correction of disease in naïve and AAV2-pre-treated hemophilia B dogs; AAV2/8 mediated, liver-directed gene therapy. *Blood* 2005a;105(8):3079-3086.

Wang L, Nichols TC, Read MS, Bellinger DA, Verma IM. Sustained expression of therapeutic level of factor IX in hemophilia B dogs by AAV-mediated gene therapy in liver. *Mol Ther* 2000;1(2):154-158.

Wang L, Takabe K, Bidlingmaier SM, III CR, Verma IM. Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(7):3906-3910.

Wang L, Zoppe M, Hackeng TM, Griffin JH, Lee KF, Verma IM. A factor IX-deficient mouse model for hemophilia B gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(21):115623-11566.

Wang Z, Ma H-I, Li J, Sun L, Zhang J, Xiao X. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors *in vitro* and *in vivo*. *Gen Ther* 2003;10(26):2105-2111.

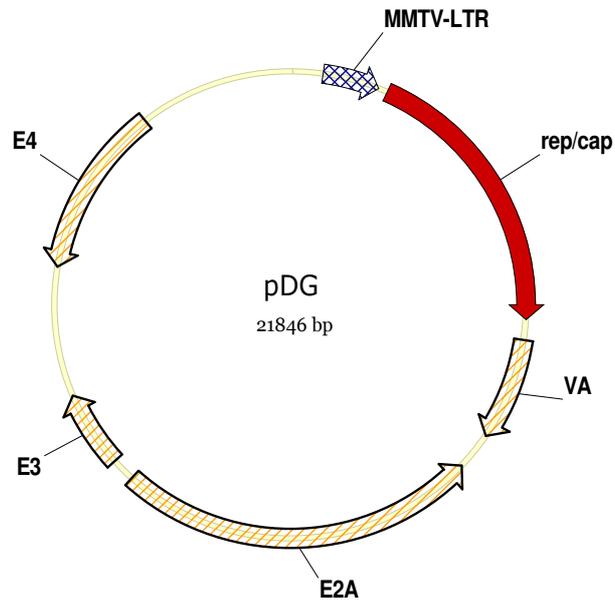
Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, Chen C, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* 2005b;23(3):321-328.

Weber M, Rabinowitz J, Provost N, Conrath H, Folliot S, Briot D, Chérel Y, Chenuaud P, Samulski J, Moullier P, Rolling F. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther*. 2003;7(6):774-81.

- Weltermann A**, Eichinger S, Bialonczyk C, Minar E, Hirschl M, Quehenberger P, Schonauer V, Kyrle PA. The risk of recurrent venous thromboembolism among patients with high factor IX levels. *J Thromb Haemost* 2003;1(1): 28-32.
- White GC**. Clinical trial results with MaxAdFVIII, a gutless adenovirus vector driving liver-specific expression of full-length factor VIII. Paper presented at: Sixth NHF Workshop on Gene Therapy for Hemophilia; April 26, 2003; Salk Institute; La Jolla, CA; 2003.
- Wu SM**, Cheung WF, Frazier D, Stafford DW. Cloning and expression of the cDNA for human gamma-glutamyl coxylase. *Science* 1991;254 (5038):1634-1636.
- Xiao W**, Chirmule N, Berta SV, McCullough B, Gao G, Wilson JM. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* 1999;73(5):3994-4003.
- Xiao W**, Warrington KH Jr, Hearing P, Hughes J, Muzycka N. Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2. *J Virol* 2002;76(22):11505-11517.
- Xiao X**, Li J, Samulski RJ. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 1996;70(11):8098-8108.
- Xu R**, Janson CG, Mastakov M, Lawlor P, Young D, Mouravlev A, Fitzsimons H, Choi KL, Ma H, Dragunow M, Leone P, Chen Q, Dicker B, During MJ. Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV2) brain-specific gene cassettes. *Gene Therapy* 2001;8(17):1323-1332.
- Yang GS**, Schmidt M, Yan Z, Lindbloom JD, Harding TC, Donahue BA, Engelhardt JF, Kotin R, Davidson BL. Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol* 2002;76(15):7651-7660.
- Yao S-N**, Kurachi K. Expression of human factor IX in mice after injection of genetically modified myoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(8):3357-3361.
- Yao S-N**, Smith KJ, Kurachi K. Primary myoblast-mediated gene transfer: Persistent expression of human factor IX in mice. *Gene Ther* 1994;1(2):99-107.
- Ying G**, Powell S, Van Roey M, McArthur JG. Factors influencing the development of an anti-factor IX (FIX) immune response following administration of adeno-associated virus-FIX. *Blood* 2001;97(12):3733-3737.
- Yoshitake S**, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry* 1985;24(14):3736-3750.
- Young SM Jr**, McCarty DM, Degtyareva N, Samulski RJ. Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination. *J Virol* 2000a;74(9):3953-3966.
- Young SM Jr**, Xiao W, Samulski RJ. Site-specific targeting of DNA plasmids to chromosome 19 using AAV cis and trans sequences. *Methods Mol Biol* 2000b;133:111-126.
- Zabner J**, Seiler M, Walters R, Kotin RM, Fulgeras W, Davidson BL, Chiorini JA. Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol* 2000;74(8):3852-3858.
- Zhang N**, Clement N, Chen D, Fu S, Zhang H, Rebollo P, Linden RM, Bromberg JS. Transduction of pancreatic islets with pseudotyped adeno-associated virus: effect of viral capsid and genome conversion. *Transplantation* 2005;80(5):683-690.
- Zinkernagel RM**. Localization dose and time of antigens determine immune reactivity. *Seminars in Immunology* 2000;12(3):163-171.
- Zolotukhin S**, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, jChesnut K, Summerford C, Samulski R, Muzycka N. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 1999;6(6):973-985.

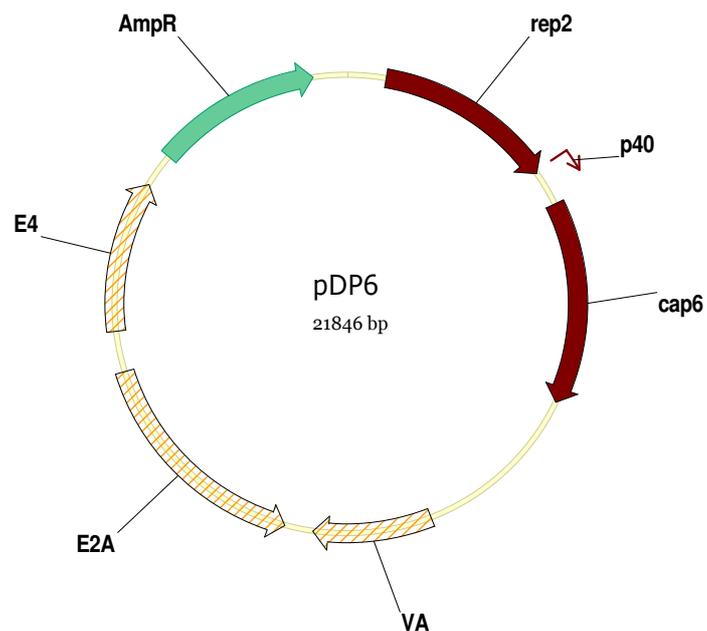
7. Appendix

Plasmid pDG:

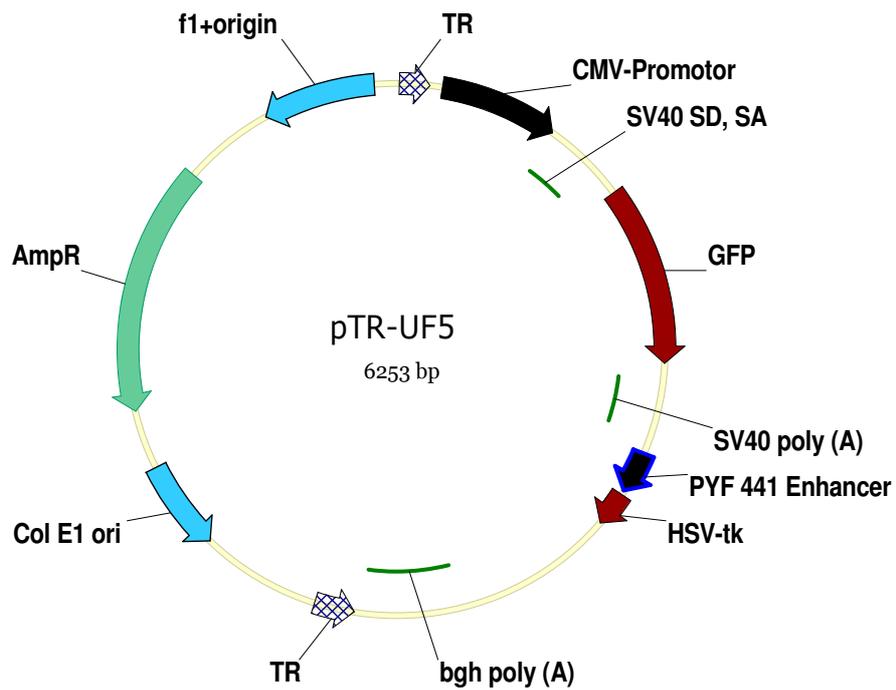
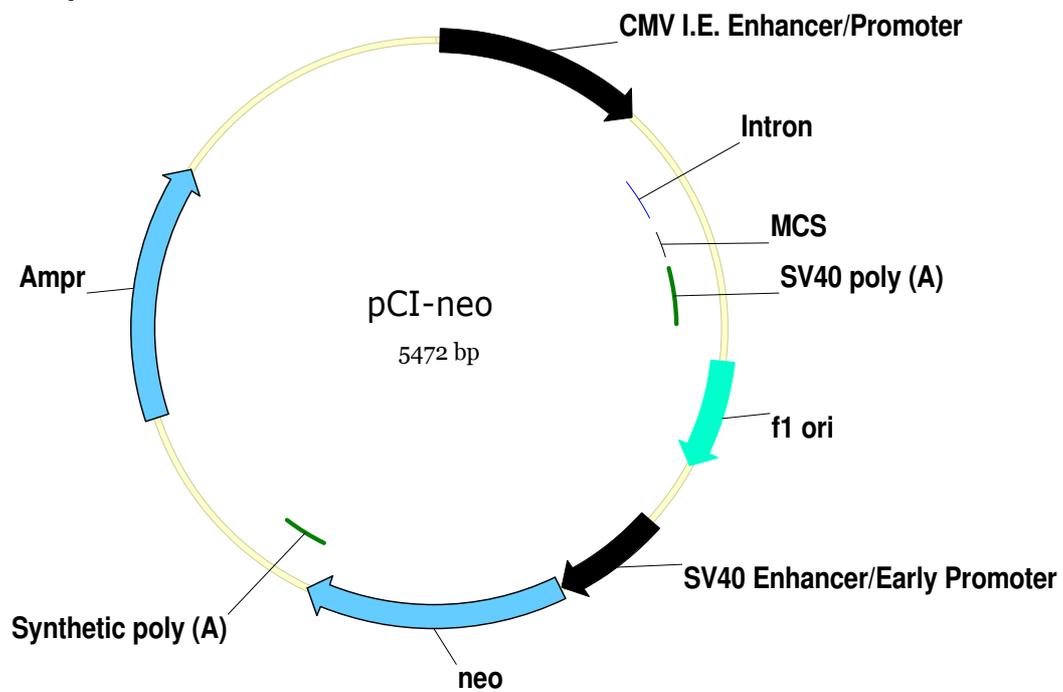


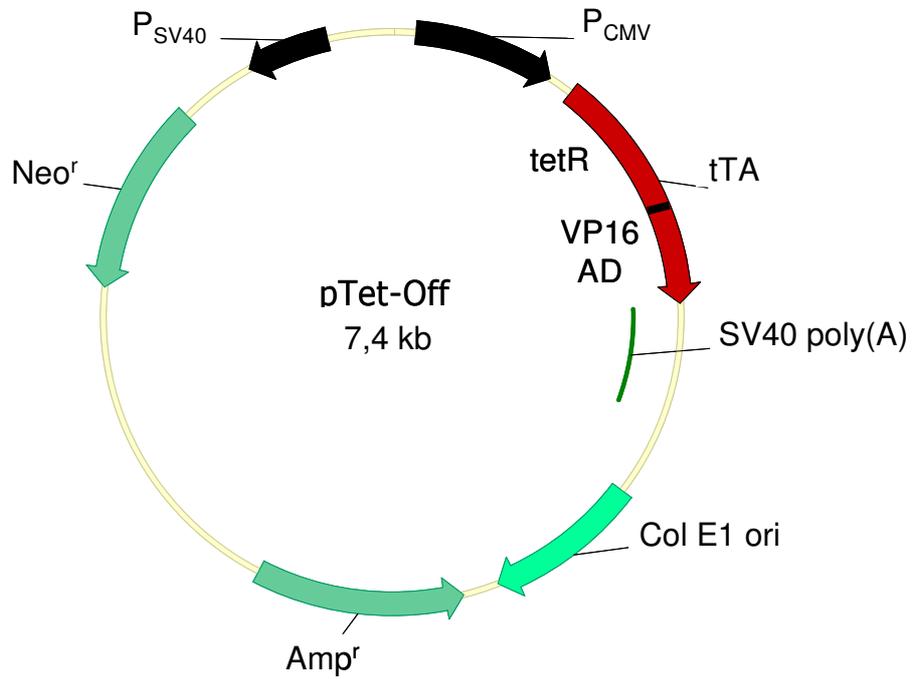
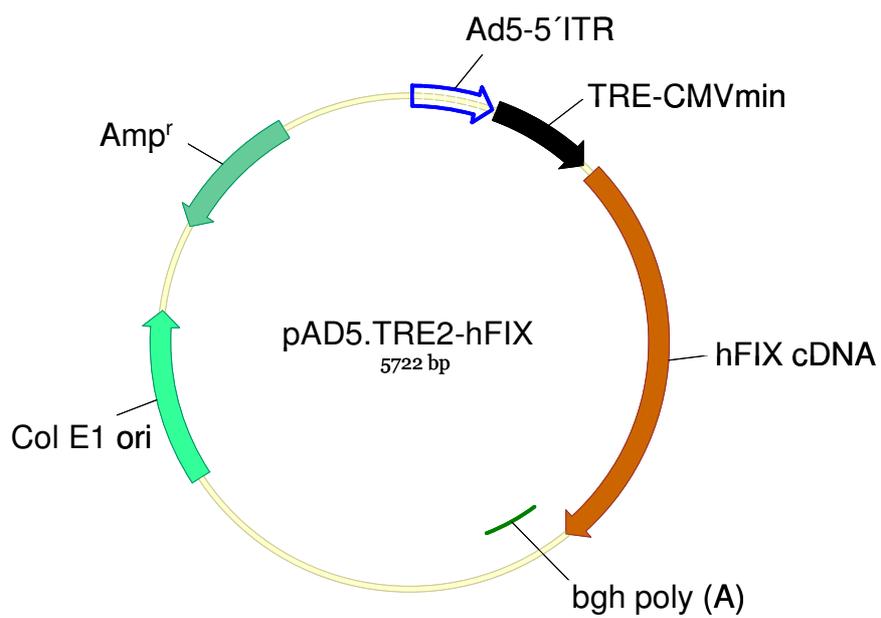
Das Verpackungsplasmid pDG2 enthält die adenoviralen Gene VA, E2A, E3 und E4, sowie die Gene rep und cap des AAV2-Serotyps.

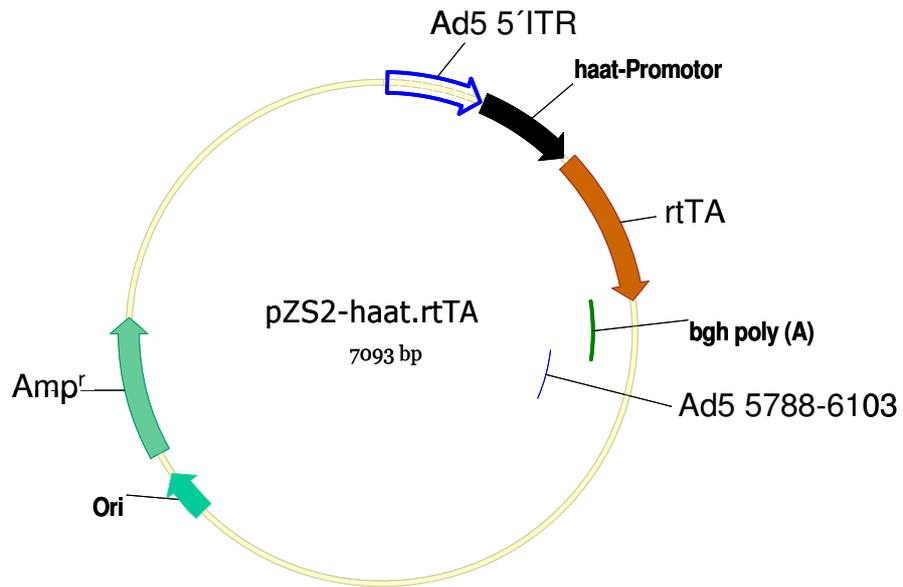
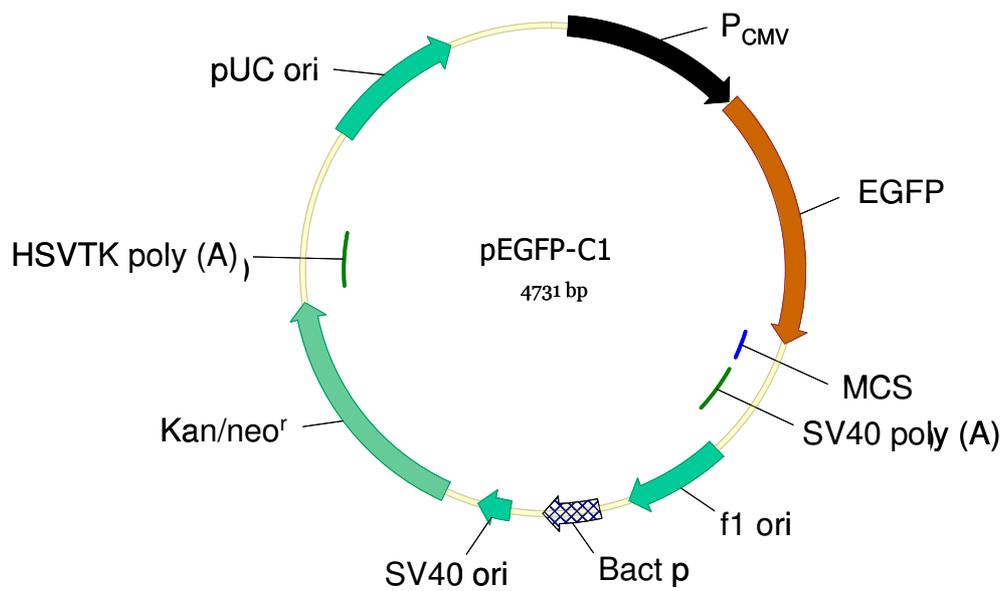
Plasmid pDP6:



Das Verpackungsplasmid pDP& enthält die adenoviralen Gene VA, E2A, E3 und E4, sowie die Gene rep des AAV2- und cap des AAV6-Serotyps.

Plasmid pTR-UF5:**Plasmid pCI-neo:**

Plasmid pTet-Off:**Plasmid pAD5.TRE2-hFIX:**

Plasmid pZS2-haat.rtTA:**Plasmid pEGFP-C1:**

Plasmid pUC19-apoE.4x: