

# **Capsid-engineering overcomes barriers toward endothelial cell transduction**

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. nat. med.  
der Medizinischen Fakultät  
und  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Li-Ang Zhang

aus Beijing, China

Köln  
2015

Berichtersteller/Berichterstellerin: Prof. Dr. Dagmar Mörsdorf

Prof. Dr. Roman Thomas

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 15.03.2016

## SUMMARY

Adeno-associated viral (AAV) vectors are characterized by an excellent safety profile and low immunogenicity, but demonstrated relatively poor transduction efficiencies for endothelial cells (EC) in comparison with other cell types. EC are, however, highly relevant targets in gene and cell therapy.

Aiming to develop an optimized AAV variant for EC transduction and to identify barrier/s hampering EC transduction by natural occurring serotypes, we conducted AAV peptide display selection, a technology that enables screening for viral capsid variants that overcome both pre- and post-entry barriers. Using an improved selection and monitoring protocol through a novel NGS-based amplification and cloning strategy, we identified two capsid variants, which were delivered efficiently and fast to the cell. These variants - when produced as AAV vectors - transduced EC with a higher efficiency than the parental serotype AAV2 or first generation capsid-engineered vectors. The most efficient variant, AAV-V, not only featured fast nuclear delivery, but also transduced EC in less than 4 h as indicated by onset of transgene expression. This mutant reached a transduction efficiency of up to 60% on primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with a particle-per-cell ratio as low as 1000. The transduction efficiency of both proliferating and quiescent EC was significantly improved. Using these variants as tools, we then performed infection biology analysis that allowed identifying multiple barriers toward AAV-mediated transduction of EC, including cellular uptake, accessibility of vector genomes and second-strand synthesis.

In conclusion, we here describe novel AAV capsid variants identified by a directed evolution approach and a comprehensive screening assay for improved EC transduction and their contribution to deciphering AAV-EC interactions.

## ZUSAMMENFASSUNG

Adeno-assoziierte virale (AAV) Vektoren sind als gentherapeutische Vektoren durch ein hervorragendes Sicherheitsprofil und eine geringe Immunogenität gekennzeichnet. Endothelzellen (EC) sind besonders wichtige Ziele in der Gen- und Zelltherapie von chronischen Erkrankungen sowie bei der Tumorbehandlung. Jedoch ist die Transduktionseffizienz von AAV Vektoren für EC gegenüber anderen Zelltypen gering.

Um optimierte AAV-Varianten für die EC-Transduktion zu entwickeln und die Barrieren zu identifizieren, die die Transduktion von EC durch natürlich vorkommende AAV Serotypen behindern, selektionierten wir aus einer AAV Peptid Display-Bibliothek Kapsid-Varianten, die die prä- und post-Eintrittsbarrieren überwinden. Mit einem verbesserten Auswahl- und Überwachungsprotokoll, in dem eine neuartige Amplifikation und Klonierungsstrategie an die Selektion durch Next Generation Sequencing gekoppelt wurde, wurden zwei Kapsid-Varianten identifiziert, die effizient und schnell in die Zelle gelangen konnten. Aus diesen Varianten wurden AAV-Vektoren generiert, die EC mit einer höheren Effizienz transduzierten als der natürlich Serotyp AAV2 oder kapsidmodifizierte Vektoren der ersten Generation. Die effizienteste Variante, AAV-V, gelangte nicht nur schnell in den Zellkern, sondern transduzierte EC auch in weniger als vier Stunden, wie durch die AAV initiierte Transgen-Expression dargestellt werden konnte. Diese Variante erreichte eine Transduktionseffizienz von bis zu 60% in primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) mit einem Partikel-pro-Zelle-Verhältnis von nur 1000. Die Transduktionseffizienz wurde hier sowohl von proliferierenden als auch von ruhenden EC deutlich verbessert. Die identifizierten Varianten wurden dann in infektiologischen Analysen verwendet, die die Identifizierung von Barrieren erlaubten, die die Transduktion von EC mit AAV behindern, wie die zelluläre Aufnahme, die Zugänglichkeit der Vektorgenome und die Zweitstrangsynthese.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in der vorgelegten Studie neue AAV-Kapsid-Varianten durch einen gerichteten Evolutions-Ansatz und eine neuartige, umfassende Sichtung generiert und beschrieben werden konnten, die EC besser transduzieren und zur Entschlüsselung der Wechselwirkungen von EC und AAV beitragen.