

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Adeno-assoziierte Virus Typ 2

### 1.1.1 Charakteristische Eigenschaften

Das Adeno-assoziierte Virus Typ 2 (AAV-2) gehört als Mitglied der Parvovirus-Familie zu den kleinsten und strukturell am einfachsten aufgebauten DNA-Viren (Muzyczka *and* Berns, 2001). Ursprünglich wurde es als Kontamination in Adenoviruspräparationen gefunden, woher sich der Name des Virus ableitet. Eine Besonderheit von AAV ist, dass es für eine produktive Vermehrung auf bestimmte Helferfunktionen angewiesen ist, die durch andere, unverwandte Viren, wie Adeno- oder Herpesviren, bereitgestellt werden können (Atchison *et al.*, 1965; Buller *et al.*, 1981). In Abwesenheit von Helferviren kann es eine latente Infektion etablieren, in deren Verlauf das virale Genom stabil in die DNA der Wirtszelle integriert wird (Cheung *et al.*, 1980; Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991). Durch Infektion der Zelle mit einem geeigneten Helfervirus wird das integrierte AAV aus der Latenz reaktiviert und eine produktive Vermehrung eingeleitet (Cheung *et al.*, 1980; Laughlin *et al.*, 1986; McLaughlin *et al.*, 1988). AAV-2 infiziert den Menschen, konnte aber trotz seiner weiten Verbreitung bislang nicht mit einer Krankheit in Verbindung gebracht werden (Berns *and* Linden, 1995). Medizinisch interessant ist es aufgrund seiner im Tiermodell gezeigten tumorsuppressiven Eigenschaften (Kirschstein *et al.*, 1968; Mayor *et al.*, 1973; Ostrove *et al.*, 1981) sowie seines Einsatzes als Gentherapievektor.

### 1.1.2 Aufbau des Viruspartikels und Organisation des Genoms

AAV-2 besitzt ein nicht umhülltes ikosaedrisches Capsid von 20-25 nm Durchmesser, das sich aus den drei Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 zusammensetzt (Muzyczka *and* Berns, 2001). Im Innern des Capsids befindet sich das lineare einzelsträngige DNA-Genom mit einer Länge von 4679 Basenpaaren (bp) (Strivastava *et al.*, 1983). DNA-Stränge beider Polaritäten werden von AAV mit gleicher Häufigkeit verpackt (Rose *et al.*, 1969). Das Genom umfasst zwei offene Leserahmen, die von 145 bp langen *inverted terminal repeats* (ITRs) flankiert werden (Strivastava *et al.*, 1983; Lusby *et al.*, 1980). Der offene Leserahmen in der rechten Hälfte des Genoms reicht von *map position* 50 bis 90 und kodiert für die Capsidproteine. Von dem linken offenen Leserahmen, der sich von *map position* 5 bis 40 erstreckt, werden die Nichtstrukturproteine oder Rep-Proteine abgelesen (Mendelson *et al.*, 1986). Die Wiederholungseinheiten an den Genomenden können sich auf sich selbst

zurückfalten und dadurch T-förmige Strukturen ausbilden (Lusby *et al.*, 1980). Sie beinhalten die sogenannte *terminal resolution site*, an der das Genom im Verlauf der DNA-Replikation geschnitten wird, sowie zwei *Rep binding elements*, an die sequenzspezifisch die großen Rep-Proteine binden können (Im *and* Muzyczka, 1990; Chiorini *et al.*, 1994; McCarty *et al.*, 1994; Ryan *et al.*, 1996). Die ITRs wirken als *cis*-Elemente bei der Regulation der Genexpression und der DNA-Replikation und sind für die Verpackung des AAV-Genoms in die viralen Capside erforderlich (Senapathy *et al.*, 1984; Beaton *et al.*, 1989; McLaughlin *et al.*, 1988). Zudem sind sie an der chromosomalen Integration des Genoms und dessen Reaktivierung aus dem integrierten Zustand beteiligt (Yang *et al.*, 1997; Samulski *et al.*, 1983).

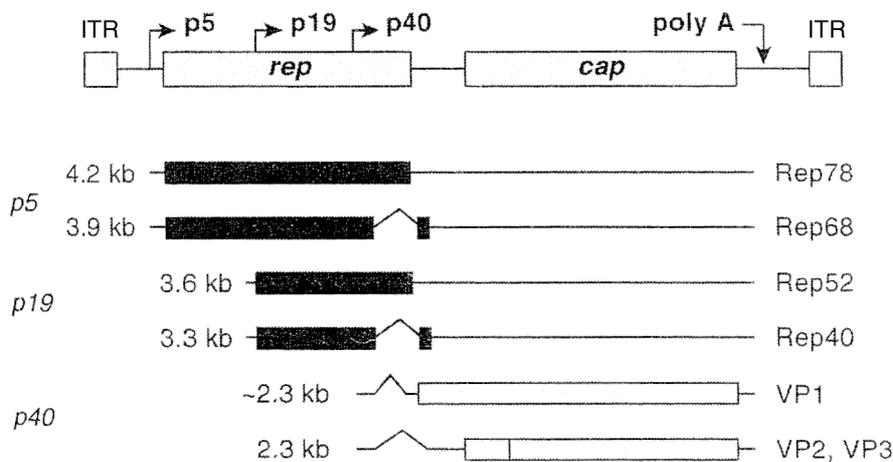


Abbildung 1.1: Genomorganisation und Expression von AAV-2. Dargestellt ist das Genom von AAV-2 mit der Lage der offenen Leserahmen, der *inverted terminal repeats*, der Promotoren und der Polyadenylierungsstelle. Der untere Teil der Abbildung zeigt die während einer produktiven Infektion gebildeten Transkripte sowie die dazugehörigen viralen Proteine.

(modifiziert aus Muzyczka *and* Berns, 2001)

Im Laufe einer produktiven Infektion werden ausgehend von drei RNA-Polymerase II-Promotoren an *map position* 5, 19 und 40 wenigstens sechs verschiedene polyadenylierte und mit einer *Cap*-Struktur versehene mRNAs gebildet (Green *and* Roeder, 1980; Lusby *and* Berns, 1982; Laughlin *et al.*, 1979). Alle Transkripte enden hinter derselben Polyadenylierungsstelle an *map position* 96 (Strivastava *et al.*, 1983). Von *map position* 42 bis 46 befindet sich ein gemeinsam genutztes Intron. Der p5-Promotor initiiert die Bildung einer mRNA, die ungespleißt für Rep78 und gespleißt für Rep68 kodiert. Analog werden vom p19-Promotor die mRNAs für Rep52 und Rep40 gebildet (Mendelson *et al.*, 1986). Die Translation der Strukturproteine erfolgt von zwei alternativ gespleißten Transkripten, die ausgehend vom p40-Promotor synthetisiert werden. VP2 und VP3 werden von derselben

gespleißten mRNA abgelesen, wobei VP2 ein unkonventionelles ACG als Startcodon nutzt, das stromaufwärts des VP3-Startcodons liegt (Muralidhar *et al.*, 1994).

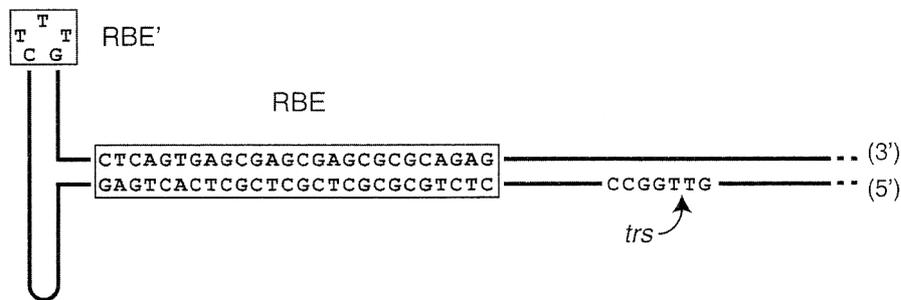


Abbildung 1.2: Die *inverted terminal repeats* von AAV-2. RBE: *Rep binding element*, *trs*: *terminal resolution site* (aus Muzyczka and Berns, 2001)

In allen Promotoren konnten eine Reihe *cis*-regulatorischer Sequenzen identifiziert werden (Chang *et al.*, 1989; Pereira and Muzyczka, 1997). Im p5-Promotor befindet sich unter anderem ein weiteres *Rep binding element* (McCarty *et al.*, 1994).

### 1.1.3 Virale Proteine

Die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 werden im Verhältnis 1:1:10 synthetisiert und weisen Molekulargewichte von 87, 73 und 62 kDa auf (Buller and Rose, 1978; Rose *et al.*, 1971). VP1 besitzt ein Phospholipase A-Motiv, das für die Infektiosität der Viruspartikel essentiell ist (Zadori *et al.*, 2001; Girod *et al.*, 2002). VP1 und VP2 enthalten zumindest ein Kernlokalisierungssignal (Hoque *et al.*, 1999). In Insektenzellen konnte gezeigt werden, dass die Expression der Strukturproteine zu einem spontanen *self-assembly* der Capside führt (Ruffing *et al.*, 1992). Von den 60 Proteinuntereinheiten, aus denen die Capside aufgebaut sind, stellt VP3 mit etwa 90% die Hauptkomponente (Xie *et al.*, 2002).

Die Nichtstrukturproteine Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40 weisen Molekulargewichte von 72, 62, 46 und 34 kDa auf. Der N-Terminus der beiden großen Rep-Proteine besitzt spezifische DNA-Bindungs- und Endonukleaseaktivität (Im and Muzyczka, 1990; Owens *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 2000). Dieser Bereich fehlt den kleinen Rep-Proteinen, und dementsprechend zeigen sie diese Eigenschaften nicht (Im and Muzyczka, 1992; Snyder *et al.*, 1990). Im zentralen Teil der großen Rep-Proteine, der auch in Rep52 und Rep40 enthalten ist, befinden sich ein Kernlokalisierungssignal sowie Sequenzen, die für die ATPase- und Helikaseaktivität der Rep-Proteine verantwortlich sind (Yang and Trempe,

1993; Im *and* Muzyczka, 1990; Wonderling *et al.*, 1995; Smith *and* Kotin, 1998). Die großen Rep-Proteine sind multifunktional. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der AAV-Genexpression, der DNA-Replikation, der ortsspezifischen Integration sowie der Reaktivierung des AAV-Genoms aus dem integrierten Zustand (Muzyczka *and* Berns, 2001). Darüber hinaus haben sie eine Reihe von Effekten auf andere virale und auf zelluläre Funktionen. So konnte gezeigt werden, dass Rep78/68 die Aktivität heterologer Promotoren herunter regulieren und die zelluläre Transformation verhindern können (Antoni *et al.*, 1991; Batchu *et al.*, 1994; Hermonat, 1994; Labow *et al.*, 1987; de la Maza *and* Carter, 1981; Hermonat, 1989; Khleif *et al.*, 1991). Des Weiteren hemmen die großen Rep-Proteine direkt oder indirekt die Replikation anderer Viren sowie die Replikation zellulärer DNA (Casto *et al.*, 1967; Hermonat, 1992; Kleinschmidt *et al.*, 1995; Labow *and* Berns, 1988; Yang *et al.*, 1994; 1995). Die kleinen Rep-Proteine sind für die Verpackung des einzelsträngigen AAV-Genoms in die vorgefertigten Capside erforderlich (Dubielzig *et al.*, 1999; King *et al.*, 2001).

### 1.1.4 Latente Infektion

Die Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose (Bartlett *et al.*, 2000). Die Adsorption wird im Fall von AAV-2 durch Heparinsulfat-Proteoglykan sowie den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1, den Hepatocyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor c-Met und das Integrin  $\alpha_v\beta_5$  als Korezeptoren vermittelt (Summerford *and* Samulski, 1998; Summerford *et al.*, 1999; Qing *et al.*, 1999; Kashiwakura *et al.*, 2005). Nach Translokation in den Zellkern und Umwandlung des einzelsträngigen AAV-Genoms zum Doppelstrang werden in Abwesenheit eines Helfervirus nur limitierte Mengen an großen Rep-Proteinen gebildet. Diese binden an das *Rep binding element* im p5-Promotor, wodurch jede weitere virale Genexpression unterdrückt wird (Kyostio *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 1997; McCarty *et al.*, 1991). Das AAV-Genom kann zur Etablierung einer latenten Infektion stabil in die chromosomale DNA integriert werden. In 70% aller Fälle geschieht dies in einer bestimmten Region auf Chromosom 19 (Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991). Der spezifische Integrationsort, AAVS1, enthält ein *Rep binding element* sowie eine verkürzte *terminal resolution site* (Giraud *et al.*, 1994; Linden *et al.*, 1996). Die Ortsspezifität der Integration wird durch die großen Rep-Proteine vermittelt. Rekombinante AAV-Vektoren, in denen die *rep*-Gene deletiert sind, integrieren nur in Anwesenheit von Rep78/68 in die AAVS1-Region (Kearns *et al.*, 1996; Shelling *and* Smith, 1994). Vermutlich bringen die großen Rep-Proteine das AAV-Genom in räumliche Nachbarschaft zum Integrationsort, indem sie sowohl an das *Rep binding element* in der AAVS1-Region als auch der AAV-ITR-DNA binden (Weitzman *et al.*, 1994). Die Integration erfolgt durch nicht-

homologe Rekombination und ist häufig mit Rearrangements und Inversionen in viralen und zellulären Sequenzen verbunden (Kotin *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1997). In den meisten latent infizierten Zelllinien sind mehrere Kopien des AAV-Genoms in tandemartiger Anordnung integriert (Laughlin *et al.*, 1986; McLaughlin *et al.*, 1988). Durch Überinfektion mit einem Helfervirus kann das integrierte AAV aus der Latenz reaktiviert und eine produktive Vermehrung eingeleitet werden.

### 1.1.5 Produktive Infektion

Nach Aufnahme des Virus und Translokation in den Zellkern erfolgt in Anwesenheit eines Helfervirus die Expression aller AAV-Gene (Muzyczka *and* Berns, 2001). Rep78/68 wirkt dabei als Transaktivator und induziert die Transkription von allen drei AAV-Promotoren (Labow *et al.*, 1986; Pereira *et al.*, 1997). Die Aktivierung der AAV-Promotoren durch Rep78/68 ist abhängig von den *Rep binding elements* in den ITRs und im p5-Promotor (McCarty *et al.*, 1991; Weger *et al.*, 1997).

Das AAV-Genom wird nach dem sogenannten *single strand displacement*-Mechanismus repliziert (Straus *et al.*, 1976; Tattersall *and* Ward, 1976; Lusby *et al.*, 1980; Hauswirth *and* Berns, 1977; 1979). Hierbei dient die zur T-Struktur gefaltete ITR am 3'-Ende des AAV-Genoms als Primer, an dem die DNA-Synthese initiiert und bis zum Genomende fortgesetzt wird. Die Sekundärstruktur der 5'-ITR wird dabei aufgelöst. Die großen Rep-Proteine binden an die *Rep binding elements* innerhalb der ursprünglichen 3'-ITR, entwinden die DNA partiell und schneiden den parentalen Strang an der *terminal resolution site* (Im *and* Muzyczka, 1990; 1992; Brister *and* Muzyczka, 1999; 2000). Dieser Prozess wird als *terminal resolution* bezeichnet. Rep78/68 wird dabei kovalent an das 5'-Ende der Schnittstelle gebunden (Snyder *et al.*, 1990). An dem 3'-Ende des Schnitts wird erneut die DNA-Synthese initiiert und bis zum Genomende fortgesetzt. Das Ergebnis ist ein über alle Bereiche doppelsträngiges DNA-Genom. Die Genomenden können denaturieren und doppelte T-Strukturen ausbilden. Da hierdurch neue Initiationsstellen für die Polymerisation geschaffen werden, bezeichnet man diesen Vorgang als Reinitiation. Bei der DNA-Synthese ausgehend von dem 3'-Ende einer T-Struktur wird der eine DNA-Strang verdrängt und kann in ein Capsid verpackt werden. Außerdem entsteht ein doppelsträngiges Molekül, das an einem Ende kovalent geschlossen ist und in eine neue Runde der *terminal resolution* und Reinitiation eingehen kann. Wird ein solches Molekül vor der Strangverdrängung nicht aufgelöst, bildet sich eine dimere Replikationsform aus, die zwei Genome in invertierter

Orientierung mit einer ITR an deren Verbindung enthält. Die monomeren und dimeren Replikationsformen werden als RF1 bzw. RF2 bezeichnet.

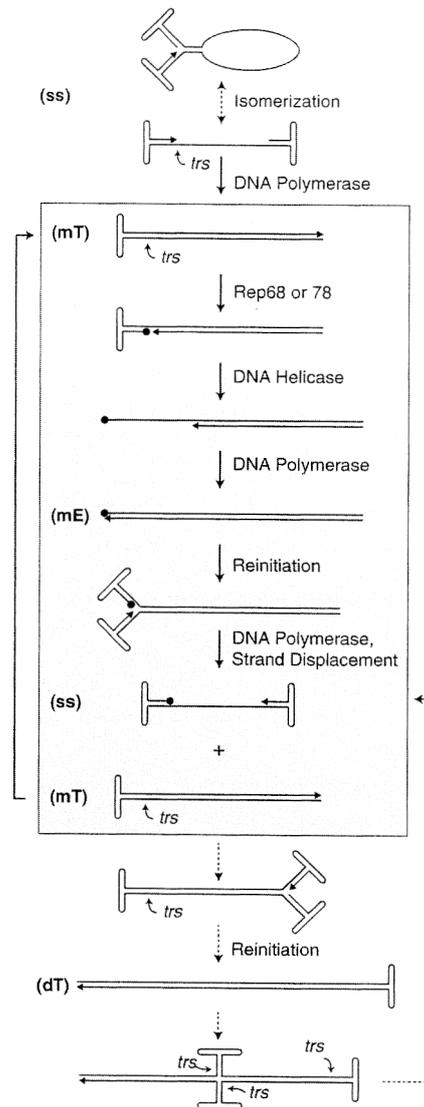


Abbildung 1.3: Modell der DNA-Replikation von AAV-2. ss: *single strand*, mT: *monomer turnaround*, mE: *monomer extended*, dT: *dimer turnaround* (aus Muzyczka and Berns, 2001)

Helferviren für eine produktive AAV-Infektion können Adeno- oder Herpesviren sein (Atchinson *et al.*, 1965; Buller *et al.*, 1981). Für den Helfereffekt sind im Fall der Adenoviren die Proteine E1A, E1B 55kDa, E4 34kDa und E2A sowie die VA RNA I verantwortlich (Janik *et al.*, 1981; Richardson and Westphal, 1981). Die adenoviralen Helferproteine wirken vorwiegend auf die Regulation der AAV-Genexpression (Muzyczka and Berns, 2001). Daneben induzieren sie verschiedene Veränderungen in der zellulären Genexpression, die unter anderem zum Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus und damit zur Synthese zellulärer Replikationsproteine führen (Muzyczka, 1992). Die Aufgabe der Helferproteine

könnte somit zum Teil darin bestehen, ein geeignetes zelluläres Milieu zu schaffen, in der die Replikation der AAV-DNA stattfinden kann (Muzyczka *and* Berns, 2001). Diese Annahme wird durch den Befund unterstützt, dass AAV-Replikation unter bestimmten zellulären Voraussetzungen wie z.B. der Behandlung von Zellen mit UV-Licht oder chemischen Karzinogenen auch in Abwesenheit eines Helfervirus möglich ist (Schlehofer *et al.*, 1986; Yakobsen *et al.*, 1987; 1989; Yalkinoglu *et al.*, 1988). Die adenoviralen Replikationsproteine werden mit Ausnahme des Einzelstrang-bindenden Proteins E2A für die AAV-Replikation nicht benötigt. Dagegen gehören die Proteine von Herpes Simplex Virus Typ1 (HSV-1), die eine Helferfunktion bei der AAV-Vermehrung ausüben, alle zu den HSV-Replikationsproteinen. Hierbei handelt es sich um die Genprodukte der Leserahmen UL5, UL8 und UL52, die zusammen den Helikase-Primase-Komplex bilden, sowie um das Einzelstrang-bindende Protein ICP8, das von dem Leserahmen UL29 abgelesen wird (Weindler *and* Heilbronn, 1991). Unterstützende Funktion kann außerdem die HSV-Polymerase mit ihrem Prozessivitätsfaktor haben, für welche die Leserahmen UL30 bzw. UL42 kodieren. Das *origin binding protein* (UL9), das ebenfalls zu den HSV-Replikationsproteinen gehört, spielt bei der Replikation von AAV keine Rolle (Weindler *and* Heilbronn, 1991).

Als Folge der Infektion mit dem Helfervirus stirbt die Zelle ab, wobei die AAV-Partikel freigesetzt werden.

## 1.2 Ein Helfervirus für AAV: das Herpes-Simplex-Virus Typ 1

### 1.2.1 Aufbau des Viruspartikels und des Genoms

Das Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) zählt zu den humanpathogenen Herpesviren. Seine Virionen haben eine Größe von etwa 200 nm und bestehen aus über 30 Strukturproteinen. Im Innern der Partikel befindet sich das Virus-Core, eine fibrilläre Proteinmatrix, mit der das lineare, doppelsträngige DNA-Genom assoziiert ist. Umgeben ist das Virus-Core von einem ikosaedrischen Capsid sowie einer Lipidmembran, in die verschiedene glykosylierte und nicht-glykosylierte Polypeptide eingelagert sind. Zwischen Capsid und Hüllmembran liegt eine unstrukturierte Proteinmatrix, die als Tegument bezeichnet wird (Modrow, 1997). Das HSV-1-Genom umfasst 152 kb und kodiert für über 80 Proteine (Roizman *and* Knipe, 2001). Es wird in eine lange (126 kb) und eine kurze Region (26 kb) unterteilt (Dolan *et al.*, 1998). Beide Regionen enthalten einen Bereich einmalig vorkommender Sequenzen, die *unique long* ( $U_L$ -) bzw. *unique short* ( $U_S$ -) Region, sowie invertierte Abschnitte sich wiederholender Sequenzen, welche die *unique* Regionen flankieren (Wadsworth *et al.*, 1975). Durch intramolekulare Rekombination der Wiederholungseinheiten, die je nach ihrer Lage im Genom als *terminal repeat* oder *internal repeat* bezeichnet werden, können die  $U_L$ - und die  $U_S$ -Region in unterschiedlichen Orientierungen zueinander angeordnet sein (Delius *and* Clements, 1976; Hayward *et al.*, 1975). An drei Stellen im Genom befinden sich Replikationsursprünge, einer in der  $U_L$ -Region ( $ori_L$ ) und zwei in den Wiederholungseinheiten, welche die  $U_S$ -Region flankieren ( $ori_S$ ) (Frenkel *et al.*, 1976; Locker *et al.*, 1982).

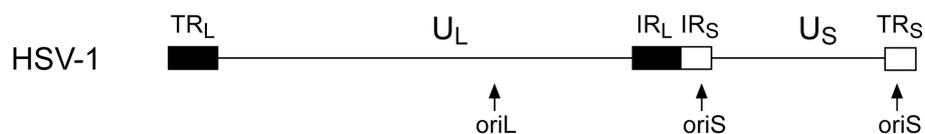


Abbildung 1.4: Genomaufbau von HSV-1.  $U_L$ : *unique long*,  $U_S$ : *unique short*, TR: *terminal repeat*, IR: *internal repeat*, ori: *origin of replication*

### 1.2.2 Produktive Infektion

HSV-1 interagiert mit einem Glykosaminoglykan sowie einem zweiten zellulären Rezeptor aus der Immunglobulinsuperfamilie oder der TNF-Rezeptorfamilie (Shieh *et al.*, 1992; WuDunn *and* Spear, 1989; Montgomery *et al.*, 1996; Geraghty *et al.*, 1998). Durch Fusion von viraler und zellulärer Membran werden das Capsid und die Tegumentproteine in das Cytoplasma aufgenommen (Morgan *et al.*, 1968). Das Capsid wird über Mikrotubuli zu den

Kernporen transportiert, durch die das Genom in den Zellkern gelangt (Sodeik *et al.*, 1997; Newcomb *and* Brown, 1994). Hier erfolgt die Expression der viralen Gene nach einem kaskadenartig regulierten Programm (Hones *and* Roizman, 1974). Das Tegumentprotein VP16 stimuliert zusammen mit zellulären Transkriptionsfaktoren die Synthese der *immediate early*-Proteine ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 und ICP47 (Batterson *and* Roizman, 1983; Campbell *et al.*, 1984; Post *et al.*, 1981). Die *immediate early*-Proteine steuern den Ablauf der HSV-Infektion, indem sie die Expression der *early*- und der *late*-Gene aktivieren. Absolut essentiell sind dafür ICP4 und ICP27 (Roizman *and* Knipe, 2001). ICP4 aktiviert die Transkription der meisten *early*- und *late*-Gene, während es die Transkription von bestimmten *immediate early*-Genen reprimiert (DeLuca *and* Schaffer, 1985; DeLuca *et al.*, 1985; Godowski *and* Knipe, 1986; Kuddus *et al.*, 1995; O'Hare *and* Hayward, 1985; Preston, 1979). Für ICP27 konnte gezeigt werden, dass es die Synthese vieler *early*-Proteine und vermutlich aus diesem Grund auch die HSV-DNA-Replikation stimuliert (Uprichard *and* Knipe, 1996). Später in der Infektion vermittelt ICP27 den Übergang zur späten Genexpression, indem es die Expression von bestimmten *immediate early*- und *early*-Genen unterdrückt und die Expression der *late*-Gene induziert (McCarthy *et al.*, 1989; Rice *and* Knipe, 1988; 1990; Sacks *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1992). ICP27 wirkt dabei sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene (Jean *et al.*, 2001; Ellison *et al.*, 2000; Hann *et al.*, 1998; McGregor *et al.*, 1996; McLauchlan *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1995; Sandri-Goldin, 2004). Des Weiteren trägt ICP27 zum *host shut-off* bei, indem es das Spleißen zellulärer pre-mRNAs verhindert (Hardwicke *and* Sandri-Goldin, 1994; Hardy *and* Sandri-Goldin, 1994; Lindberg *and* Kreivi, 2002) und Intron-enthaltende Transkripte im Zellkern zurückhält (Phelan *et al.*, 1996). Zu den *early*-Proteinen gehören die HSV-Replikationsproteine, die kurz nach ihrem Erscheinen die Replikation des Virusgenoms einleiten. Neben der HSV-Polymerase und ihrem Prozessivitätsfaktor, die von den Leserahmen UL30 und UL42 abgelesen werden, handelt es sich dabei um die Genprodukte der Leserahmen UL5, UL8 und UL52, die zusammen den Helikase-Primase-Komplex bilden, sowie um das Einzelstrang-bindende Protein ICP8 und ein *origin binding protein*, für welche die Leserahmen UL29 bzw. UL9 kodieren (Crute *et al.*, 1989; Gottlieb *et al.*, 1990; Weller *et al.*, 1983; Olivo *et al.*, 1988). Durch DNA-Replikation und Rekombination entstehen vielfache Einheiten des Genoms in konkatemerer Anordnung, die als *template* für die späte Genexpression dienen. Die *late*-Proteine sind vorwiegend Strukturproteine (Heine *et al.*, 1974; Spear *and* Roizman, 1972). Sie setzen sich zu Partikelvorläufern zusammen, in die jeweils ein Genomäquivalent hineingeschleust wird (Deiss *et al.*, 1986; Varmuza *and* Smiley, 1985). Die so entstandenen Nukleocapside knospen in das Lumen zwischen innerer und äußerer Kernmembran, wobei sie von einer Hüllmembran umgeben werden (Vlazny *et al.*, 1982). Diese verschmilzt mit der äußeren Kernmembran, so dass die Nukleocapside ins

Cytoplasma gelangen (Siminoff *and* Menefee, 1966; Stackpole, 1969). Nach Knospung in das *trans*-Golgi-Netzwerk, bei der sie ihre endgültige Hüllmembran erhalten, werden die Virionen über Golgi-Vesikel zur Plasmamembran transportiert und durch Exocytose freigesetzt (Johnson *and* Spear, 1982; van Genderen *et al.*, 1994).

## 1.3 Rekombinantes AAV als Vektor für die Gentherapie

### 1.3.1 Eigenschaften rekombinanter AAV-Vektoren

Ein idealer Gentherapievektor ermöglicht (1) die Transduktion sowohl von proliferierenden als auch von ruhenden Zellen, (2) eine zell- und gewebespezifische Anwendung sowie (3) eine stabile Langzeitexpression des Transgens durch ortsspezifische Integration in das Wirtsgenom oder durch Persistenz als Episom, das repliziert und bei der Zellteilung an die Tochterzellen weiter gegeben wird. Weiterhin stellt der Vektor (4) keine Größenbeschränkung an das Transgen und induziert (5) keine Immunantwort.

In rekombinanten AAV (rAAV)-Vektoren sind in der Regel alle viralen Gene deletiert. Sie bestehen somit nur aus dem Transgen, das von den AAV-ITRs flankiert wird (McLaughlin *et al.*, 1988). rAAV-Vektoren sind in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Zelltypen zu transduzieren, darunter sowohl sich teilende als auch ruhende, terminal differenzierte Zellen (Muzyczka *and* Berns, 2001). Um den Tropismus dieser Vektoren für bestimmte Applikationen auf ein spezielles Zielgewebe zu beschränken, können receptorspezifische Epitope in die Capsidproteine eingefügt werden (Rabinowitz *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000; Warrington *et al.*, 2004). Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz verschiedener AAV-Serotypen, die unterschiedliche Rezeptoren und Korezeptoren benutzen (Grimm *et al.*, 2003). Nach Aufnahme des Vektors in die Zelle muss das einzelsträngige Vektorgenom in ein stabiles doppelsträngiges Molekül umgewandelt werden. Um diesen limitierenden Schritt zu umgehen, wurden selbstkomplementierende Vektoren entwickelt, die doppelsträngigen AAV-Replikationsintermediaten gleichen (McCarty *et al.*, 2001). Neben der Umwandlung zum Doppelstrang ist für die Etablierung einer stabilen Expression des Transgens die Ausbildung hochmolekularer Strukturen entscheidend (Vincent-Lacaze *et al.*, 1999). So können rAAV-Vektoren in konkatemerer Form über sehr lange Zeit als Episom persistieren, ohne dass eine Abnahme der Transgenexpression erkennbar ist (Muzyczka *and* Berns, 2001). Die Integration einzelner oder konkatemerer Genome in die zelluläre DNA erfolgt zufällig und mit sehr niedriger Frequenz (Tenenbaum *et al.*, 2003). Um die Fähigkeit zur ortsspezifischen Integration wiederherzustellen und so das mögliche Risiko der Insertionsmutagenese einzuschränken, muss die Rep78/68-Funktion in *trans* komplementiert werden (Balague *et al.*, 1997; Lamartina *et al.*, 1998; Surosky *et al.*, 1997). Für das Transgen sowie regulatorische Elemente stehen in rAAV-Vektoren etwa 4,9 kb Klonierungskapazität zur Verfügung. Die Fähigkeit von AAV, in infizierten Zellen Konkatemere auszubilden, ermöglicht die Verteilung längerer Gensequenzen auf zwei verschiedene Vektoren. Durch Heterodimerisierung dieser Vektoren und späterem Herausspleißen der zwischen den

beiden Genomen liegenden ITRs aus der m-RNA, kann das komplette Gen wiederhergestellt werden (Sun *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2000; Nakai *et al.*, 2000). Neben der stabilen Langzeitexpression des Transgens ist ein weiterer wichtiger Vorteil von rAAV-Vektoren ihre Apathogenität. Auch die zelluläre Immunantwort scheint sehr viel schwächer zu sein als bei den meisten anderen Vektorsystemen (Beck *et al.*, 1999; Chirmule *et al.*, 2000; Hernandez *et al.*, 1999), was sich zum Teil damit erklären lässt, dass rAAV-Vektoren keine viralen Gene enthalten und außerdem nicht in der Lage sind, Antigen-präsentierende Zellen effizient zu transduzieren (Jooss *et al.*, 1998). Sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunreaktion ist aber abhängig von der Natur des jeweiligen Transgens und der Art der rAAV-Verabreichung (Monahan *and* Samulski, 2000). Das AAV-Capsid kann eine humorale Immunantwort induzieren, was eine eventuell nötige Readministration von rAAV-Vektoren erschweren könnte (Brockstedt *et al.*, 1999). Das Problem neutralisierender Antikörper könnte aber durch die Verwendung alternativer Serotypen oder durch selektive Capsidmodifikationen umgangen werden (Chiorini *et al.*, 1999).

Zahlreiche präklinische Studien mit rAAV-Vektoren verliefen in verschiedenen Tiermodellen sehr vielversprechend (Acland *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; De *et al.*, 2004). In einer klinischen Studie am Menschen werden rAAV-Vektoren bereits zur Behandlung von Hämophilie B eingesetzt (Kay *et al.*, 2000; Manno *et al.*, 2003).

### **1.3.2 Produktion von rekombinanten AAV-Vektoren**

Die klassische Methode zur Herstellung rekombinanter AAV-Vektoren erfordert die Kotransfektion des klonierten rAAV-Vektorgenoms mit einem Helferplasmid, das die für die Replikation und Verpackung des rAAV-Genoms notwendigen *rep*- und *cap*-Gene von AAV enthält. Die adenoviralen Helferfunktionen werden durch eine anschließende Infektion der transfizierten Zellen mit Adenovirus bereitgestellt (Samulski *et al.*, 1989). Alternativ können die adenoviralen Helferproteine E2A und E4 34kDa sowie die VA RNA I entweder von dem *rep* und *cap* enthaltenden Plasmid oder einem dritten Plasmid in 293-Zellen exprimiert werden. Die ebenfalls für die rAAV-Vermehrung erforderlichen Proteine der adenoviralen E1-Region werden von den 293-Zellen geliefert. Eine Kontamination der entstehenden rekombinanten AAV-Vektoren mit dem Helfervirus wird auf diese Weise vermieden (Xiao *et al.*, 1998; Grimm *et al.*, 1998).

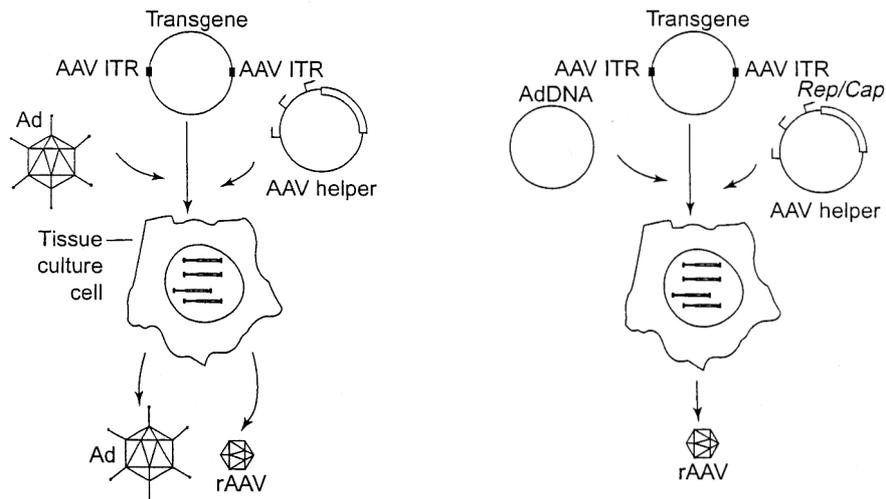


Abbildung 1.5: Produktion von rekombinantem AAV durch transiente Transfektion. (aus Monahan *and* Samulski, 2000)

Die beschriebenen Produktionsmethoden sind für den Laborbedarf und für *proof of principle*-Experimente optimiert. Für die Herstellung größerer Mengen rekombinanter AAV-Vektoren, wie sie für klinische Studien oder eventuelle spätere Routineanwendungen benötigt werden, eignen sich Systeme, die eine transiente Transfektion von Zellen erfordern, nicht. In der Literatur sind diverse Alternativen zu den bisherigen arbeitsaufwändigen und stör anfälligen Verfahren der Vektorproduktion beschrieben. Hierzu gehören die Verwendung von stabilen Zelllinien und der Einsatz rekombinanter Helferviren, welche die AAV-Gene *rep* und *cap* und/oder das rAAV-Vektorgenom enthalten. Als hinderlich hatten sich in vielen Fällen die komplexen Funktionen der großen Rep-Proteine erwiesen. Beispielsweise ist eine konstitutive Rep78/68-Expression für die meisten eukaryotischen Zellen cytotoxisch, was die Verwendbarkeit von Rep- und Cap-exprimierenden Zelllinien einschränkt (Yang *et al.*, 1994). Rekombinante Adenoviren, welche die *rep*- und *cap*-Gene von AAV enthalten, hatten sich als instabil herausgestellt (Zhang *et al.*, 2001). Auch die Ausbeuten an rekombinanten AAV-Vektoren, die mit Rep- und Cap-exprimierenden Herpes-Simplex-Virus-Rekombinanten erzielt werden, entsprechen bisher nicht den Erwartungen (Heilbronn *et al.*, 2003). So konnte sich bislang keine Methode gegenüber den herkömmlichen Verfahren durchsetzen, und ein effizientes Produktionssystem für rekombinante AAV-Vektoren bleibt dringend erforderlich.

## 1.4 Aufgabenstellung

Rekombinantes AAV findet als Gentherapievektor ein breites Anwendungsfeld. Der Gebrauch von rekombinanten AAV-Vektoren ist durch die gegenwärtigen arbeitsaufwändigen Verfahren der Vektorherstellung jedoch eingeschränkt. Ausgehend von der Überlegung, dass AAV für seine Vermehrung bestimmte Helferfunktionen benötigt, die z.B. durch Herpesviren bereitgestellt werden können, wurde das rekombinante Herpes-Simplex-Virus rHSVrep/cap konstruiert, das zusätzlich zu den HSV-Helfergenen die für die Vektorproduktion erforderlichen AAV-2-Gene *rep* und *cap* exprimiert (Heilbronn *et al.*, 2003). Während herkömmliche Verfahren zur Vektorherstellung auf DNA-Transfektion beruhen, ist mit rHSVrep/cap eine Vermehrung von rekombinantem AAV durch Infektion möglich. Dieses System sollte die Basis für eine Produktion von rekombinanten AAV-Vektoren in größerem Maßstab legen, wie sie für klinische Studien benötigt werden. Die mit rHSVrep/cap erzielten Ausbeuten an rekombinanten AAV-Vektoren bleiben bislang allerdings hinter den Erwartungen zurück. Im Rahmen dieser Arbeit soll rHSVrep/cap systematisch untersucht und basierend auf diesen Untersuchungen ein verbessertes rekombinantes Herpesvirus für eine effiziente rAAV-Produktion konstruiert werden.

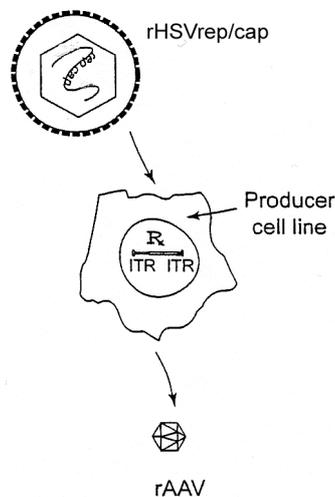


Abbildung 1.6: Produktion von rekombinantem AAV durch Infektion. Dargestellt ist die Infektion einer Zelle mit rHSVrep/cap, in der das zu vermehrende rAAV-Vektorgenom stabil integriert ist. Alternativ kann das rAAV-Genom auch als rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus oder als Bestandteil eines zweiten rekombinanten Herpesvirus bereitgestellt werden. Das hier gezeigte rHSVrep/cap ist replikationsdefizient. (modifiziert aus Monahan *and* Samulski, 2000)