Aus dem Institut für Virologie
Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung von Rep78 und ICP8 bei der Initiation der DNA-Replikation des Adeno-assoziierten Virus durch Herpes Simplex Virus

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Alex
aus Lutherstadt Wittenberg

Gutachter/in: 1.: Prof. Dr. R. Heilbronn

2.: Prof. Dr. Dr. Chr. Hagemeier

3.: Prof. Dr. K. Osterrieder

Datum der Promotion: 16.05.2010

Meinen Eltern

&

Anne

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Das adeno-assoziierte Virus (AAV) als Genvektor 1

1.2 Das adeno-assoziierte Virus (AAV) 2

1.2.1 AAV, wichtigster Vertreter der Parvoviridae 2

1.2.2 Morphologie und Lebenszyklus von AAV 3

1.2.3 Genomorganisation, Transkription und Translation 4

1.2.4 AAV-DNA-Replikation 6

1.2.5 Virale Helferfunktionen und zelluläre Faktoren 7

1.2.6 AAV-Vektorherstellung 9

1.3 Das Herpes Simplex Virus (HSV) und seine AAV-Helferfunktionen 10

1.3.1 Aufbau und Lebenszyklus von HSV 10

1.3.2 HSV-Genomorganisation und DNA-Replikation 11

1.3.3 Helferfunktionen von HSV bei der AAV-Replikation 14

1.4 AAV-Rep78, HSV-ICP8 und ihre Interaktion 15

1.4.1 Funktionen von Rep78 im AAV-Lebenszyklus 15

1.4.2 Rep78-Domänen 16

1.4.3 Spezifische DNA-Bindung von Rep78 19

1.4.4 ICP8, das ssDNA-bindende Protein von HSV 22

1.4.5 Interaktion von Rep78 und ICP8 26

1.5 Ziel der Arbeit 27

2 Materialien 28

2.1 Geräte 28

2.2 Computer-Software 28

2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 29

2.4 Kits und Enzyme 29

2.5 Lösungen, Medien und Puffer 30

2.6 Antikörper 32

2.7 Oligonukleotide 33

2.8 Plasmide 33

2.9 Bakterienstämme, Zelllinien, Viren 35

3 Methoden 36

3.1 Molekularbiologische Methoden 36

3.1.1 Transformation chemisch kompetenter Zellen 36

3.1.2 Selektion, Ausplattieren und Kultivierung von Bakterien 36

3.1.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA nach der Lysozym-Methode 37

3.1.4 Midi- und Maxi-Präparationen von Plasmid-DNA 38

3.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA 38

3.1.6 Restriktionsverdau von DNA 39

3.1.7 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung von DNA 39

3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese 40

3.1.9 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen nach der FreezeSquezze-Methode 41

3.1.10 DNA-Gelextraktion mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit 41

3.1.11 Amplifikation und Modifikation von DNA durch PCR 41

3.1.12 Einführen von Punktmutationen durch QuikChange® site-directed mutagenesis 42

3.1.13 Ligation von DNA-Fragmenten 43

3.1.14 Oligo-Klonierung 43

3.1.15 Sequenzierung 44

3.1.16 Southern Blot-Analyse 44

3.2 Proteinbiochemische Methoden 46

3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 46

3.2.2 Western Blot und Immundetektion 46

3.2.3 Synthese in E.coli und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen 47

3.2.4 *In vitro*-Transkription-Translation und radioaktive Markierung von Proteinen 48

3.2.5 *In vitro*-Proteininteraktionsuntersuchungen im GST-*pull-down assay* 49

3.2.5 Autoradiographie und PhosphoImager-Analyse 50

3.2.7 Immunfluoreszenz-Untersuchung 51

3.3 ZellbiologischeMethoden 53

3.3.1 Kultivierung, Passagierung und Aussaat von HeLa-Zellen 53

3.3.2 Calcium-Phosphat-Transfektion von Zellen und Adenovirus-Infektion 53

3.3.3 Tansfektion von Zellen durch Lipofektion 54

3.3.4 Extraktion niedermolekularer DNA nach HIRT 54

3.3.5 Proteinextraktion aus HeLa-Zellen 55

4 Ergebnisse 56

4.1 *In vitro*-Domänenanalyse von AAV-Rep78 zur Charakterisierung der AAV-Einzelstrang-DNA-stimulierten Interaktion von Rep78 und HSV-ICP8 56

4.1.1 Darstellung der Rep78-ICP8-Interaktion im GST-*pull-down assay* 56

4.1.2 Orientierende Domänenanalyse von Rep78 für die Interaktion mit ICP8 60

4.1.2.1 Einfluss der Helikase-Domäne von Rep78 auf die Interaktion mit ICP8 60

4.1.2.2 Einfluss des Rep78-C-Terminus auf die Rep-ICP8-Interaktion 61

4.1.2.3 Einfluss des N-Terminus von Rep78 auf die Rep-ICP8 Interaktion 62

4.1.2.4 Weitere untersuchte Deletionsmutanten 64

4.1.2.5 Untersuchung des Rep-N-Terminus in multimerisierenden Fusionsproteinen 64

4.1.3 Untersuchung N-terminaler Rep78-Punktmutanten zur präzisen Domänenanalyse der Rep-ICP8-Interaktion 65

4.1.4 Zusammenfassung der Domänenanalyse von Rep78 für die Einzelstrang-DNA-abhängige Interaktion mit ICP8 68

4.1.5 Vergleich der Interaktionen von GST-ICP8 und GST-ICP8ΔC mit AAV-Rep78 zur Domänenanalyse von ICP8 70

4.2 Einfluss der Rep78-Punktmutationen auf die *in vivo*-Kolokalisation mit ICP8 71

4.2.1 Darstellung der unabhängigen zellulären Lokalisation von Rep und ICP8 72

4.2.2 Klonierung einer Rep78-exprimierenden AAV-Mutante und deren Vergleich in der Immunfluoreszenzuntersuchung mit dem AAV-Wildtyp-Plasmid 73

4.2.3 Einfluss der Punktmutationen in Rep78 auf die Kolokalisation mit ICP8 75

4.2.4 Zusammenfassung der Kolokalisationsuntersuchung von Rep78 und ICP8 77

4.2.5 Einführung einzelsträngiger rAAV-DNA zur Komplementierung der DNA-Replikationsdefizienz von Rep78K340H in der Immunfluoreszenz 77

4.3 Untersuchung der DNA-Replikationsfähigkeit der Rep78-Punktmutanten 79

4.3.1 Untersuchung der Replikationsfähigkeit durch Kotransfektion mit rAAV-DNA 79

4.3.2 Untersuchung der Replikationsfähigkeit der punktmutierten AAV-Konstrukte 81

4.3.3 Zusammenfassung der Replikationsuntersuchungen der Rep78-Punktmutanten 84

5 Diskussion 85

5.1 Interaktion von Rep78 und ICP8 *in vitro* 86

5.1.1 Direkte Rep78-ICP8-Interaktion 86

5.1.2 Steigerung der Rep78-ICP8-Interaktion durch ssDNA als indirekte, ssDNA-vermittelte Interaktion 87

5.1.3 ssDNA-induzierte Konformationsänderung von ICP8 als Ursache für die erhöhte ssDNA-abhängige Rep78-ICP8-Interaktion 90

5.2 Rep78-ICP8-Kolokalisation *in vivo* in Abhängigkeit von der AAV-Replikation 91

5.3 Molekulare Interaktion von Rep78 und ICP8 *in vivo* 93

5.4 Eigenschaften von Rep78 als AAV-*origin*-bindendes Protein im Vergleich zur Funktion von HSV-UL9 bei der HSV-Replikation 100

6 Zusammenfassung 103

7 Literaturverzeichnis 104

8 Anhang 114

Danksagung 115

Lebenslauf 116

Veröffentlichungen 117

Selbstständigkeitserklärung 118

1 Einleitung

1.1 Das adeno-assoziierte Virus (AAV) als Genvektor

Genetische Defekte sind die Ursache zahlreicher Erkrankungen. Die Gentherapie als modernes Therapieverfahren ermöglicht es, diese Krankheiten kausal zu behandeln. Ihr Ziel ist, die defekten Gene zu komplementieren oder substituieren, um den betroffenen Zellen bzw. systemisch dem gesamten Körper ein funktionelles Genprodukt zur Verfügung zu stellen. Eine Vorraussetzung ist der Transfer des jeweiligen therapeutischen Gens in die Zielzellen. Die Verwendung von Viren bzw. Virusstrukturen als Vektoren ist dabei eine gut etablierte Methode. Sie nutzt die viralen Eigenschaften, an Zellen zu adsorbieren und die auf der RNA oder DNA enthaltene Erbinformation in das Zytoplasma oder den Zellkern einzuschleusen.

Das adeno-assoziierte Virus (AAV) ist neben Retroviren und Adenoviren der wichtigste Vertreter viraler Vektoren (Pfeifer und Verma, 2001; Kay et al., 2001). Rekombinante AAV-Vektoren (rAAV) wurden bereits in zahlreichen klinischen Studien angewandt (Carter, 2005, Mueller und Flotte, 2008). Erfolgreiche Beispiele für die AAV-vermittelte Gentherapie sind z.B. die Substitution des Faktors XI der Blutgerinnung bei der Hämophilie B (Kay et al., 2000, Manno et al., 2003; High et al., 2004), die Expression eines funktionellen Chloridkanals in Bronchialepithelien von Patienten mit Zystischer Fibrose (Flotte et al., 2003; Moss et al., 2004), die intrazerebrale Bildung von Glutamatdecarboxylase (GAD) und *aromatic amino acid decarboxylase* (AADC) zur Therapie des Morbus Parkinson (During et al., 2001; Kaplitt et al., 2007; Eberling et al., 2008) oder die Applikation des RPE65-Proteins, die bei der kongenitalen Leber-Amaurose zu einer Verbesserung der Sehfähigkeit der behandelten Patienten führte (Bennicelli et al., 2008; Maguire et al., 2008; Bainbridge et al., 2008).

Ein entscheidender Vorteil von AAV gegenüber anderen als Genvektoren verwendeten Viren ist die Apathogenität des Wildtyp-Virus. Trotz der über 40 Jahre zurückliegenden Entdeckung von AAV (Archetti und Bocciarelli, 1965; Atchison et al., 1965, Hoggan et al., 1966) und der hohen Durchseuchung der Bevölkerung mit einer Seroprävalenz von AAV-Antikörpern von > 70% (Georg-Fries et al., 1984) konnte bisher keine Erkrankung mit dem Virus in Verbindung gebracht werden. Zugleich ist die Immunantwort auf AAV sehr gering, was eine effektive und mehrfache Applikation von AAV-Vektoren gewährleistet. Die verschiedenen AAV-Subtypen ermöglichen die Transduktion einer Vielzahl von Zellen (Van Vliet et al., 2008). Durch die Pseudotypisierung der Vektoren sowie die Entwicklung mutierter und rekombinanter Kapside konnte die Zell- und Gewebespezifität zusätzlich verbessert werden (Wu et al., 2000; Rabinowitz et al., 2002; Li et al., 2008). In AAV-Vektoren kann DNA von knapp fünf Kilobasen

Länge transportiert werden. Damit sind sie für Substitution der meisten defekten Gene ausreichend. Darüber hinaus wurden auch Methoden entwickelt, die sich z.B. den zellulären *splicing*-Prozeß zunutze machen, um längere Gene zu komplementieren (Duan, et al., 2000; Yan et al., 2000). Im Gegensatz zum Wildtyp-Genom liegt die durch AAV-Vektoren transferierte DNA im Allgemeinen im Zellkern als ringförmiges, episomales Molekül vor (Russell, 2003). Obwohl sie unter bestimmten Vorraussetzungen auch in das Wirtsgenom integrieren kann (Rutledge und Russell, 1997; Yang et al., 1997) ist, im Gegensatz zu lentiviralen Vektoren, die Entstehung von Mutationen bei der Verwendung von AAV aber weitgehend ausgeschlossen.

Die Anwendung von AAV-Vektoren in klinischen, präklinischen und experimentellen Studien bedarf einer großen Menge, konzentrierter und hochgereinigter Virus-Partikel. Eine effiziente und einfache Vektorproduktion ist daher auch in Hinblick auf eine spätere, breite klinische Anwendung unabdingbar. AAV ist replikationsdefizient und benötigt zur Vermehrung eine Koinfektion mit einem Helfervirus wie beispielsweise Adenovirus (Atchison et al., 1965; Hoggan et al., 1966) oder dem Herpes Simplex Virus (HSV) (Blacklow et al., 1971; Buller et al., 1981). Während die Optimierung der Vektorproduktion, die auf den adenoviralen Helferfunktionen basiert, weitgehend erschöpft ist, bieten HSV-basierte Systeme, wie z.B. ein die AAV-Gene exprimierendes rekombinantes HSV, vielversprechende alternative Lösungen für die rAAV-Produktion (Conway et al., 1999). In der fundierten Kenntnis des AAV-Replikationszyklus und einer sorgfältigen Analyse der molekularen Interaktionsmechanismen zwischen AAV und dem Herpes Simplex Virus liegen die Vorraussetzungen für die erfolgreiche Weiterentwicklung dieser HSV-basierten Vektorproduktionsmethoden.

1.2 Das adeno-assoziierte Virus (AAV)

1.2.1 AAV, wichtigster Vertreter der Parvoviridae

Das adeno-assoziierte Virus (AAV) ist der wichtigste Vertreter aus der Familie der Parvoridae. Die Viren dieser Familie sind nicht umhüllt und enthalten ein einzelsträngiges DNA-Genom in einem kleinen, ikosaedrischen Kapsid mit einem Durchmesser von 18-26 nm (*parvus* = klein) (Abb. 1.1). Bei den Parvoviridae unterscheidet man zwischen den Untergruppen Densovirinae und Parvovirinae, von denen die Densovirinae nur Insekten und die Parvovirinae Vertebraten infizieren. Letztere werden nach ihren Eigenschaften in drei Genera unterteilt: Erythroviren – bekannt ist das humanpathogene Parvovirus B19; Parvoviren, die auschließlich Tiere infizieren und Dependoviren. Erythroviren und Parvoviren sind autonome Viren, die sich

selbstständig vermehren können. Ihnen gegenüber stehen die zahlreichen Subtypen des adeno-assoziierten Virus, die das Genus Dependovirus bilden und bei der Replikation die Koinfektion eines weiteren Virus benötigen (Muzyczka und Berns, 2001). Als Helferviren können Adenovirus (Archetti und Bocciarelli, 1965; Atchison et al., 1965; Hoggan et al., 1966) und das Herpes Simplex Virus (Blacklow et al., 1971; Buller et al., 1981), aber auch weitere Viren aus der Herpes-Virus-Familie, wie z.B. CMV, HHV-6 oder EBV (Blacklow et al., 1970; McPherson et al., 1985; Thomson et al., 1994) und humane Papillomaviren fungieren (Walz et al., 1997; Ogston et al, 2000). Insgesamt sind 12 verschiedene AAV-Serotypen bekannt, die überwiegend aus humanem Gewebe (Subtyp 2, 3, 5 & 9) und aus Primatenzellen isoliert wurden (Muzyczka und Berns, 2001; Van Vliet et al., 2008; Schmidt et al., 2008).

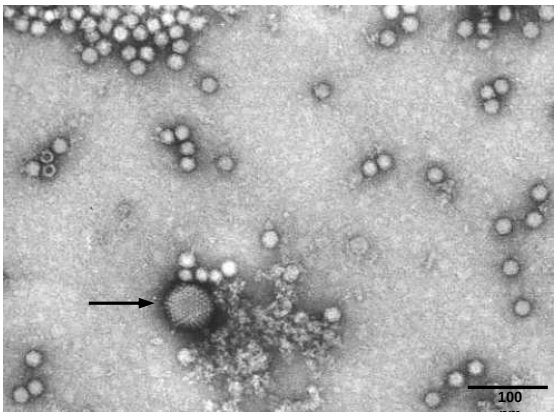


Abb. 1.1: EM-Aufnahme von AAV und Adenovirus. Das elektronenmikroskopische Bild zeigt zahlreiche AAV-Partikel neben einem Adenovirus (Pfeil). AAV-Kapside haben eine Größe von ca. 22 nm, das Adenovirus ist etwa 70 bis 90 nm groß. Die ikosaedrische Struktur der Viren ist gut zu erkennen. Am linken Bildrand befinden sich zwei angeschnittene AAV-Partikel. (Quelle: ICTVdB Picture Gallery/ Prof. Stewart McNulty (Ausschnitt) www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/Images/index.htm)

1.2.2 Morphologie und Lebenszyklus von AAV

Das adeno-assoziierte Virus gehört mit einem Kapsiddurchmesser von 22 nm zu den kleinsten Viren. Das ikosaedrische Kapsid ist nicht umhüllt und setzt sich aus 60 Protein-untereinheiten zusammen. Das Fehlen einer Lipidhülle führt zu einer hohen Stabilität des Virions gegenüber lipophilen Lösungsmitteln und verschiedenen Enzymen. Für AAV wurde zudem eine hohe Temperatur- und pH-Resistenz gezeigt (Muzyczka und Berns, 2001). Die Adsorption des AAV-Kapsids an die Wirtszelle wird vorwiegend über Heparansulfat-Proteoglykan (Summerford und Samulski, 1998) vermittelt. Wichtige Ko-Rezeptoren sind der Fibriblastenwachstumsfaktor-Rezeptor 1 (Qing et al., 1999) und das Integrin $\alpha_V\beta_5$ (Summerford et al., 1999). Das Virus wird durch Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen (Bartlett et al., 2000), die Freisetzung des AAV-Genoms (*uncoating*) erfolgt im Zellkern (Xiao et al., 2002).

Die alleinige Infektion von AAV führt zu einem latenten Infektionszyklus (Cheung et al., 1980; Laughlin et al., 1986; Kotin und Berns, 1989). Dabei liegt die DNA entweder als Episom

vor (Russell et al., 2003) oder wird in das zelluläre Genom integriert. Die Integration findet vorzugsweise in einer als AAVS1 bezeichneten Region auf dem q-Arm von Chromosom 19 (19q13.3) statt (Kotin et al., 1992, Samulski et al., 1991; Hüser et al., 2002 & 2003), in der Homologien zu den terminalen Sequenzwiederholungen (*inverted terminal repeat*, ITR) der AAV-DNA zu finden sind. Inzwischen wurden allerdings weitere, z.B. auf Chr. 5 gelegene Integrationsstellen mit korrelierenden, AAV-homologen DNA-Sequenzen beschrieben. Im Gegensatz zur Latenz führt die Anwesenheit eines Helfervirus zu einer produktiven Infektion (Abb. 1.2). Die Replikation der AAV-DNA und ihre Einschleusung in die durch *self-assembly* gebildeten proviralen Kapside findet im Zellkern statt (Wistuba et al., 1997; King et al., 2001). Die reifen Virionen werden durch Zelllyse, die durch die Helfervirusinfektion vermittelt wird, freigesetzt (Berns und Linden, 1995). Kommt es beim Vorliegen einer latenten AAV-Infektion zu einer Überinfektion mit einem Helfervirus, wird das AAV-Genom reaktiviert (*rescue*) und eine produktive Infektion findet statt (Cheung et al., 1980; Laughlin et al., 1986).

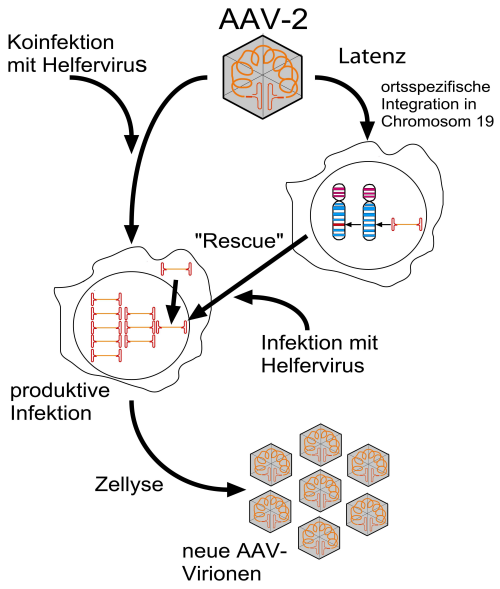


Abb. 1.2: Lebenszyklus von AAV. Eine alleinige AAV-Infektion führt zur Integration der DNA in das Wirtszell-Genom und somit zur Latenz. Der produktive Infektionszyklus findet bei der Koinfektion mit einem Helfervirus statt. Die AAV-Replikation kann aber auch nach einer späteren Helfervirusinfektion durch das *rescue* des integrierten Genoms erfolgen. (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Stefan Weger)

1.2.3 Genomorganisation, Transkription und Translation

Das linear-einzelsträngige DNA-Genom von AAV-2 umfasst 4679 Desoxynukleotide (Srivastava et al., 1983; Samulski et al., 1983). Die DNA-Enden bilden die identischen, jeweils 145 Basen umfassenden ITRs aus (Hauswirth und Berns, 1977; Lusby et al., 1980). Sie enthalten palindromische Sequenzen (A/A', B/B', C/C' und D), die für die selbstkomplementäre Rückfaltung der DNA und die Entstehung der T-förmigen Haarnadelstruktur (*hairpin*) verantwortlich sind (Abb. 1.3). Das A-Palindrom enthält die Bindungsstelle für die großen regulatorischen Rep-Proteine (*rep binding site* (RBS)). Ihm schließt sich die Erkennungssequenz für die Rep-Endonuklease-Aktivität (*terminal resolution site* (trs)) an (Muzyczka und Berns, 2001). Die ITRs sind essentielle Bestandteile der DNA, die bei der Replikation, der Transkription

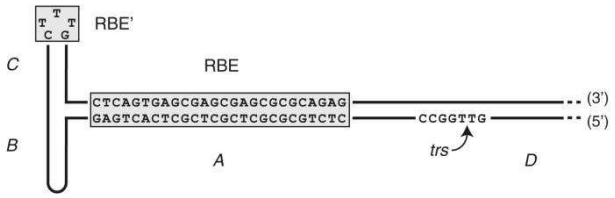


Abb. 1.3: AAV-*terminal repeat* (ITR). Die AAV-ITRs sind essentielle *cis*-Elemente bei der Replikation, Verpackung und Integration des Genoms. Sie formieren sich aufgrund der palindromischen Sequenzen (A-D) durch Rückfaltung der DNA in die *hairpin*-Konfiguration. *RBE, RBE'* und *trs* sind die Erkennungssequenzen für die spezifische DNA-Bindungs- bzw. Endonuklease-Aktivität der großen Rep-Proteine. (aus: Muzyczka und Berns, 2001)

und bei der Verpackung in *cis* vorliegen müssen. Sie sind auch für die Integration und das *rescue* des AAV-Genoms unabdingbar (Samulski et al., 1983; Beaton et al., 1989; Yang et al., 1997).

Die *inverted terminal repeats* flankieren die beiden, im einzelsträngigen DNA-Anschnitt gelegenen, offenen Leserahmen (*open reading frame* = ORF) (Abb. 1.4) (Srivastava et al., 1983). Der 3'-ORF (*rep*) kodiert für vier verwandte regulatorische Nichtstrukturproteine. Das *cap*-Gen des 5'-ORF kodiert für drei sich ebenfalls überschneidende Kapsidproteine (Tratschin et al., 1984; Mendelson et al., 1986). Die Transkription, die durch die zelluläre RNA-Polymerase II vermittelt wird, erfolgt von den drei Promotoren p5, p19 und p40 (mp = *map position*) (Green et al., 1980; Lusby et al., 1982). Durch alternatives *splicing* eines zentral gelegenen Introns (mp 42-64) entstehen während der Transkription insgesamt sechs mRNA-Spezies, die alle am gleichen Polyadenylierungssignal (mp 96) enden (Lusby et al., 1982; Srivastava et al., 1983; Mendelson et al., 1986).

Die vier Translationsprodukte des *rep*-ORF entstehen aus den Transkripten des p5- und des p19-Promotors. Rep78, das größte der vier Proteine hat ein Molekulargewicht von 72 Kilo-Dalton (kDA). Das verwandte, vom gesplicten p5-Transkript translatierte Protein ist Rep68 (62 kDa). Die Produkte des p19-Promotors sind Rep52 (46 kDa) bzw. Rep40 (34 kDa) (Lusby et al., 1982; Mendelson et al., 1986). Die großen Rep-Proteine sind überwiegend im Zellkern lokalisiert (Mendelson et al., 1986; Trempe et al., 1987). Sie besitzen spezifische DNA-Bindungseigenschaften sowie eine Helikase- und Endonuklease-Aktivität, die für die AAV-Replikation essentiell sind (Tratschin et al., 1984; Im und Muzyczka, 1992). Zusätzlich modulieren Rep78/68 die Transkription der AAV-eigenen Promotoren und sind in der Lage heterologe Promotoren zu inhibieren (Kyöstiö et al., 1994; Hörer et

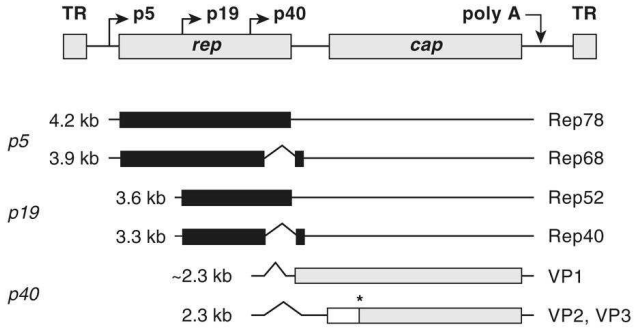


Abb. 1.4: AAV-Genomorganisation, Transkriptions- und Translationsprodukte. Das AAV-2-Genom enthält 4679 Nukleotide. Die beiden Gene *rep* und *cap* werden von den ITRs flankiert. Die drei Promotoren p5, p19 und p40 stehen als Transkriptionsstarts zur Verfügung. Durch alternatives *splicing* resultieren sechs mRNA-Spezies, die alle an der gleichen poly-A-*site* enden. Es werden vier Rep-Proteine und durch die Verwendung eines zusätzlichen Startcodons (Stern) drei verwandte Cap- bzw. VP-Proteine gebildet. (aus: Muzyczka und Berns, 2001)

al., 1995; Weger et al., 1997; Needham et al., 2006). Rep52 und Rep40, die N-terminal verkürzten Varianten von Rep78/68, sind sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch lokalisiert (Mendelson et al., 1986). Sie sind im produktiven Infektionszyklus u.a. für die Verpackung der AAV-DNA in die Kapside verantwortlich, werden für die DNA-Replikation aber nicht benötigt. (Dubielzig et al., 1999; King et al., 2001).

Vom *cap*-ORF werden zwei alternativ gesplicte mRNA transkribiert, von denen durch die Verwendung eines zusätzlichen Startcodons auf dem kleineren Transkript insgesamt drei verwandte Strukturproteine, VP1 (87kDa), VP2 (73 kDa) und VP3 (62 kDa) translatiert werden (Rose et al., 1971). Die Proteine werden in einem Verhältnis von 1:1:10 gebildet. Dieses Verhältnis spiegelt sich auch bei der Zusammensetzung des Kapsids wider, in dem VP3 den Hauptbestandteil ausmacht. Nukleär lokalisiertes VP3 ist allein in der Lage, leere Kapside zu bilden, für die Bildung infektiöser Partikel sind aber alle drei *cap*-Proteine erforderlich (Hoque et al., 1999). Für die Bindung an Heparansulfat-Proteoglykan, den Hauptrezeptor für AAV sind die in allen VP-Proteinen enthaltenen Aminosäuren 509 bis 522 und 561 bis 591 verantwortlich (Summerford und Samulski, 1998; Wu et al., 2000).

1.2.4 AAV-DNA-Replikation

Die AAV-DNA-Replikation erfolgt nach dem *single-strand displacement*-Mechanismus, bei dem das replizierte virale Genom freigesetzt wird, indem es vom komplementären Strang durch die Synthese neuer DNA verdrängt wird (Abb. 1.5) (Straus et al., 1976; Tattersall und Ward, 1976; Hauswirth und Berns, 1977). Grundlegend für den Replikationsprozess ist das Vorhandensein der *inverted terminal repeats* und deren Sekundärstruktur. Durch die Rückfaltung der palindromischen DNA entsteht an einem ITR ein freies 3'-Hydroxylende, das als Primer für die zelluläre Polymerase δ dient und von dem die Synthese des Gegenstrangs ausgeht (Lusby et al., 1980; Ni et al., 1998). Vor der Vervollständigung des AAV-Doppelstrangs muss durch die Rep-Helikase-Aktivität die *hairpin*-Struktur des 5'-ITR aufgelöst werden (*terminal resolution*). Das entstandene Replikationsintermediat wird als *monomer turnaround (replication) form* (mT) oder Replikationsform 1 (RF1) bezeichnet. Der verbliebene 3'-ITR wird durch die Rep-Endonuklease-Aktivität an der *terminal resolution site* (trs) geschnitten, ebenfalls durch die Rep-Helikase entfaltet und die DNA vom entstandenen 3'-OH-Ende vervollständigt. Nach der Endonuklease-Reaktion bleibt am 5'-Ende des ITR ein Rep78- bzw. Rep68-Molekül kovalent gebunden (Snyder et al., 1990; Brister und Muzyczka 1999 & 2000; Davis et al., 2000; Smith und Kotin, 2000). Die Enden des resultierenden linear-doppelsträngigen Moleküls (*monomer*

extended form (mE)) werden denaturiert und wieder in die *hairpin*-Sekundärstrukturen überführt, woraufhin die DNA-Synthese von dem durch das *reannealing* entstandene 3'-Ende reinitiiert wird. Durch die Synthese des komplementären DNA-Strangs wird der vorher gebundene Strang unter Mithilfe der Rep-Helikase vom Matrizenstrang verdrängt (*single strand displacement*) und liegt dann als neues einzelsträngiges AAV-Genom vor. Am resultierenden Doppelstrang beginnt der Prozess von terminaler Auflösung und Reinitiation erneut. Findet beim Ausbleiben der primären Endonuklease-Reaktion am 3'-ITR die Reinitiation der DNA-Synthese am 5'-ITR statt, entsteht die Replikationsform 2 (RF2) oder *dimer turnaround form* (dT), die zwei kovalent verknüpfte, doppelsträngige Genome bzw. vier ssDNA-Genomäquivalente enthält. Von dieser Replikationsform ausgehend können entweder AAV-Einzelstrang-Genome freigesetzt werden oder höhermolekulare Replikationsintermediate entstehen (Straus et al., 1976; Tattersall und Ward, 1976; Ni et al., 1998; Muzyczka und Berns, 2001).

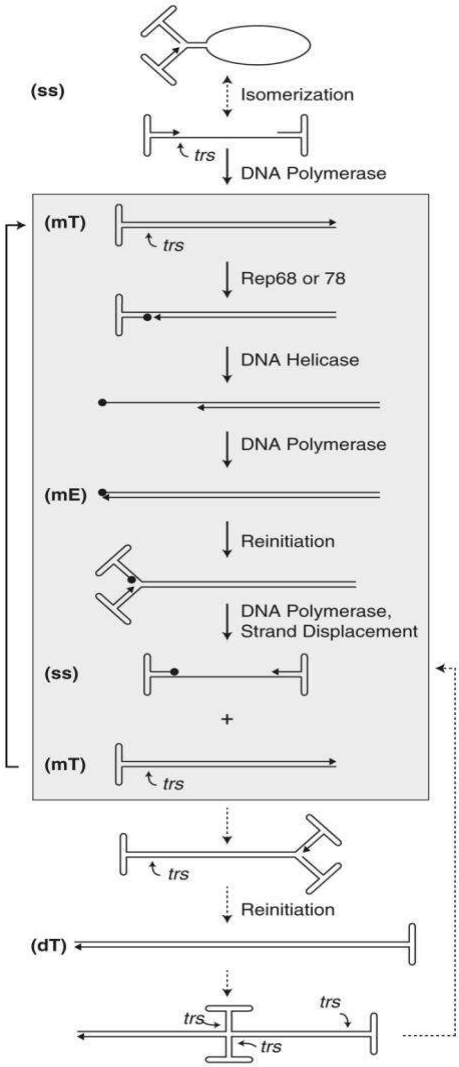


Abb. 1.5: AAV-DNA-Replikation. Nach Freisetzung des einzelsträngigen AAV-Genoms (ss) erfolgt zunächst die Zweitstrangsynthese am freien 3'-Ende des linken ITR. Dabei wird der rechte ITR entwunden. Es resultiert die *monomer turnaround form* (mT). Der linke ITR wird nach Einführung eines Einzelstrangbruches an der *trs* ebenfalls entwunden und die DNA zur *monomoer extended form* (mE) vervollständigt. Nach *reannealing* der ITRs wird die DNA-Synthse am neuen 3'-Ende reinitiiert, wobei der komplementäre Strang, also das replizierte Genom-Äquivalent freigesetzt wird. An der verbliebenen monomeren Replikationsform beginnt der Prozess aus *terminal resolution*, Reinitiation und DNA-Synthese mit Strangverdrängung erneut. Beim Ausbleiben der Endonukleasereaktion entsteht die *dimer turnaround form* (dT). Es werden aber auch höhermolekulare Replikationsintermediate gebildet, aus der die AAV-Genome später freigesetzt werden. (aus: Muzyczka und Berns, 2001)

1.2.5 Virale Helferfunktionen und zelluläre Faktoren

Das adeno-assoziierte Virus ist unter physiologischen Bedingungen nicht in der Lage, sich eigenständig zu vermehren. Aus der Abhängigkeit der produktiven AAV-Replikation von einer Helfervirusinfektion resultiert daher die systematische Bezeichnung *Dependovirus*. Von den bekannten Helferviren sind die Funktionen des Adenovirus und des Herpes Simplex Virus

am besten untersucht. Die Rollen beider Viren bei der AAV-Replikation unterscheiden sich allerdings deutlich voneinander.

Als essentielle adenovirale Helferfunktionen wurden die vier Genprodukte E1A, E1B, E2A und E4 ORF6 sowie die Adenovirus-assoziierte (VA) RNA beschrieben. Die adenovirale Polymerase wird bei der AAV-Replikation nicht benötigt. E2A, das ssDNA-bindende Protein (Ad-DBP) ist das einzige Protein, das direkt an der DNA-Replikation beteiligt ist. Die anderen Faktoren stimulieren die AAV-Replikation indirekt durch die Beeinflussung des zellulären Milieus bzw. des Zellzyklus und die Regulation der AAV-Genexpression. E1A ist für den Eintritt der Zelle in die späte S- oder G2-Phase, die Transaktivierung der AAV-Genexpression und die Transkription der weiteren Adenovirus-Gene verantwortlich. Ad-E1B und E4 ORF6 fördern die AAV-Zweitstrangsynthese und stimulieren die Genexpression über eine Veränderung des mRNA-Transportes. Die VA RNA unterstützt die virale Proteinsynthese, indem sie den immunologischen *host-cell shutoff*, die Interferon-induzierte Abschaltung der Translationsmaschinerie der Wirtszelle verhindert (Muzyczka und Berns, 2001).

Vom Herpes Simplex Virus (HSV) sind vier Gene beschrieben, die die minimalen Helferfunktionen für die AAV-Replikation darstellen. Im Gegensatz zu den adenoviralen Faktoren sind der trimere Helikase-Primase-Komplex (UL5, UL8 & UL52) und das Einzelstrang-DNA-(ssDNA)-bindende Protein ICP8 (*infected cell protein 8*) (UL29) jedoch direkt am Replikationsprozess beteiligt. Die dimere HSV-Polymerase UL30/UL42 wird ebenfalls verwendet, kann aber durch die zelluläre DNA-Polymerase δ substituiert werden (Weindler und Heilbronn, 1991; Ward et al., 2001; Slanina et al., 2006). Auch bei der HSV-vermittelten AAV-Replikation ist durch die Helfervirus-Infektion von einer Veränderung des zellulären Milieus und dadurch einer zusätzlichen Stimulierung der AAV-Vermehrung auszugehen.

Unter bestimmten Voraussetzungen kann eine Zelle zur AAV-Produktion fähig sein, die nicht mit einem Helfervirus überinfiziert wurde (Ni et al., 1998; Meyers et al., 2000). Die notwendige Veränderung des Zellzyklus und des zellulären Replikationsapparats konnte durch toxische Substanzen wie z.B. Hydroxyharnstoff und Cycloheximid oder bei genotoxischem Stress durch UV-Licht experimentell hervorgerufen werden (Yalkinoglu et al., 1988; Yakobson et al., 1987 & 1989). Unter diesen unphysiologischen Konditionen werden sämtliche zur AAV-Replikation benötigte Faktoren von der Zelle zur Verfügung gestellt. Die DNA-Replikation erfolgt dabei z.B. durch die zelluläre DNA-Polymerase δ, die auch bei der Adenovirus-Infektion genutzt wird (Ni et al., 1998; Nash et al., 2007). Das zelluläre ssDNA-bindende Protein *RPA* kann die entsprechenden Virusproteine Ad-DBP (E2A) bzw. HSV-ICP8 ersetzen (Ni et al., 1998; Ward et al., 1998; Stracker et al., 2004).

1.2.6 AAV-Vektorherstellung

Zur Herstellung von AAV-Vektoren muss das Transgen von den AAV-ITRs flankiert vorliegen. Die *inverted terminal repeats* dienen als Replikationsursprung und werden für die Verpackung der replizierten DNA in die Kapside benötigt. Als Replikationsmatrize dient üblicherweise ein Plasmid, das von einem AAV-Wildtyp-Plasmid abgeleitet ist. Dabei darf die rekombinante AAV-DNA eine Gesamtlänge von ca. 110% des AAV-Wildtyp-Genoms, also ungefähr 5.000 Nukleotide nicht überschreiten, da sonst die Verpackungs- und Transduktionseffizienz drastisch sinkt (Dong et al., 1996; Grieger und Samulski, 2005). Für die Vektorproduktion sind außerdem die AAV-Gene sowie die minimalen viralen Helferfunktionen erforderlich. AAV-*rep/cap* können im Gegensatz zu den ITRs ihre Funktion in *trans* erfüllen. Sie sind einschließlich der Promotoren auf einem weiteren Plasmid enthalten und nicht von den ITRs flankiert, wodurch die Entstehung von AAV-Wildtyp-Viren ausgeschlossen ist (Xiao et al., 1998; Grimm et al., 1998). Die Helferfunktionen können auf unterschiedliche Art eingebracht werden. Die Infektion mit Adenovirus oder Herpes Simplex Virus führt zu einer effizienten Vektorproduktion, birgt aber den Nachteil einer möglichen Kontamination der rAAV-Präparation mit dem Helfervirus. Die Transfektion der benötigten Gene ist dagegen, insbesondere bei HSV, weniger effektiv.

Das derzeit am meisten verwendete AAV-Verpackungssystem nutzt die adenoviralen Helferfunktionen und beruht auf der Transfektion zweier Plasmide. Das erste Plasmid enthält das ITR-flankierte Transgen, das zweite kodiert für die AAV-Gene und Ad-E2A, E4 ORF6 und die VA RNA. Die Ad-Proteine E1A und E1B werden in den verwendeten HEK293-Zellen konstitutiv exprimiert (Grimm et al., 1998 & 2003). Die Vektoren werden nach der Zelllyse durch Dichtegradientenzentrifugation in Iodixanol angereichert und anschließend durch Liganden-Affinitätschromatographie in einer Heparin-Agarose-Säule, durch Ionenaustausch-chromatographie oder durch *high performance liquid chromatography* (HPLC) gereinigt (Grieger et al., 2006).

Inzwischen wurden alternative Verfahren der AAV-Vektorproduktion entwickelt, mit den Zielen die Ausbeute an Virionen zu optimieren, den Produktionsprozess zu vereinfachen und eine kostengünstigere Herstellung der Vektoren zu ermöglichen. Eine Möglichkeit ist die Verwendung AAV-*rep/cap*-exprimierender Zelllinien, deren Vorteil allerdings nicht endgültig bewiesen ist (Gao et al., 1998; Chadeuf et al., 2000). Die Nutzung eines Baculovirus-Systems ist effizient, birgt aber den Nachteil, dass die rAAV-Vektoren nicht in humanen, sondern in Insektenzellen hergestellt werden (Urabe et al., 2002; Aucoin et al., 2007). Eine vielversprechende Methode ist der Einsatz rekombinanter Helferviren (Conway et al., 1999; Zhang et al., 2001). Durch die

Integration einer *rep/cap*-Kassette z.B. in ein Herpes Simplex kann so die Transfektion durch eine hocheffiziente Infektion ersetzt werden. Die Verwendung replikationsdefizienter, rekombinanter Helferviren kann dabei eine Kontamination der rAAV-Präparation verhindern.

1.3 Das Herpes Simplex Virus (HSV) und seine AAV-Helferfunktionen

1.3.1 Aufbau und Lebenszyklus von HSV

Das Herpes Simplex Virus Typ 1, HSV-1, ist ein großes, umhülltes Doppelstrang-DNA-Virus. Es gehört zum Genus der Simplexviren, die wiederum Teil der α-Herpesvirus-Unterfamilie der Herpesviridae sind. Die Viruspartikel haben Durchmesser von 150 bis 200 nm. Im Inneren des Virions befindet sich die linear-doppelsträngige DNA, die an das Virus-*core* assoziiert ist. DNA und *core* sind in ein Kapsid eingeschlossen, das aus 162 Capsomeren à 6 Proteinuntereinheiten zusammengesetzt ist (Abb. 1.6). Das Kapsid ist vom Tegument, einer unstrukturierte Matrix umgeben, die Proteine enthält, die im frühen Stadium der HSV-Infektion benötigt werden. Die abschließende Virushülle entstammt der zellulären, inneren Kernmembran und enthält zahlreiche Glycoproteine und Polypeptide, die u.a. die Adsorption an die Zielzellen und die Aufnahme des Virions vermitteln (Modrow und Falke, 1998; Roizman et al., 2007).

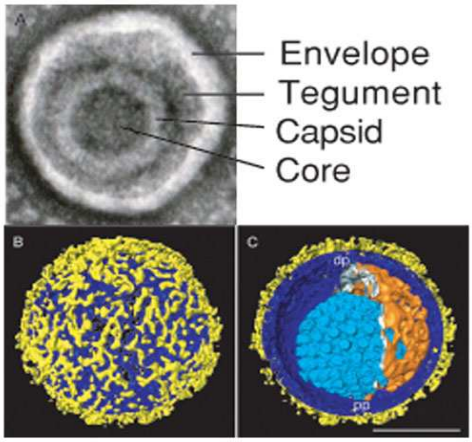


Abb. 1.6: Struktur des Herpes Simplex Virus. (A) Das obere Bild zeigt in einer elektronen-mikrospischen Aufnahme den Querschnitt eines HSV-Virons. Unten ist eine Rekonstruktion der Oberfläche (B) und des Virusinneren dargestellt (C) (aus: Roizman et al., 2007)

Die Replikation des Herpes Simplex Virus kann einem lytisch-produktiven und einem latenten Infektionszyklus folgen. Die Primärinfektion, die in Epithelzellen der Haut stattfindet, ist eine lytische Infektion. Die Viren adsorbieren durch die Interaktion des Glycoproteins gC der Hülle mit dem zellulären Membranmolekül Heparansulfat-Proteoglykan an die Fibroblasten (WuDunn und Spear, 1989; Shieh et al., 1992). Die gemeinsame Nutzung von Heparansulfat als Hauptrezeptor durch AAV und HSV und die damit verbundene Zellspezifität ist ein wichtiger Faktor bei der Funktion von HSV als Helfervirus für die AAV-Replikation (Summerford und Samulski, 1998). Bei der Penetration verschmilzt die virale Lipidhülle mit der Wirtszellmembran und setzt das Kapsid und Tegument in das Zytoplasma frei. Die Infektion nicht primär permissiver Zellen findet durch die Weitergabe des Virus nach der HSV-vermittelten Fusion der

Wirtszelle mit einer Nachbarzelle statt. Das Kapsid wird entlang der Mikrotuboli in den Nukleus geschleust, in dem die Virus-DNA nach der Freisetzung als ringförmig geschlossenes, extrachromosomales Episom vorliegt (Jacob und Roizman, 1977; Becker et al., 1978).

Die HSV-Proteinexpression erfolgt in einer Kaskade sich nacheinander aktivierender Gene. Durch die im Tegument enthaltenen Faktoren wird die Expression der *immediate early*-Proteine transaktiviert, die dann zum großen Teil als Transaktivatoren der *delayed early*- und *late*-Gene fungieren. Die *delayed early*-Gene exprimieren überwiegend die bei der Virusreplikation benötigten Proteine. Die Virionproteine, also Struktur- und Tegumentproteine werden als Produkte der *late*-Gene parallel zur Replikation der HSV-DNA synthetisiert. Die Strukturproteine setzten sich im Zellkern zu einem Vorkapsid zusammen, in das unter Verlust von Stützproteinen eine HSV-Genomkopie eingeschleust wird. Dem Kapsid lagern sich die Tegumentproteine an, um anschließend mit der Kernmembran, die die viralen Glycoproteine enthält, zu assoziieren. Durch das Ausstülpen der Membran bilden sich die umhüllten Partikel, die über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert und freigesetzt werden.

Die latente Infektion, die sich wegen der Weitergabe der Viren durch die Zell-Zell-Fusion auch in neuronalen Zellen etablieren kann, schließt sich der lytischen Primärinfektion an. Die Virus-DNA liegt in Form von zehn bis 100 Episomen überwiegend in den Neuronen der Spinalganglien vor. Eine Ursache für die Latenz des Virus ist das veränderte zelluläre Milieu und damit eine veränderte Expression der viralen Gene, die eine Replikation nicht zulässt. Die in Ganglienzellen transkribierte HSV-LAT-RNA trägt als *antisense*-RNA ebenfalls zur Latenz bei. Aus der latenten Infektion heraus kann es zur Reaktivierung des Virus und zum erneuten lytischen Replikationsprozess kommen (Modrow und Falke, 1998; Roizman et al., 2007).

1.3.2 HSV-Genomorganisation und DNA-Replikation

Das HSV-1-Genom enthält ca. 152.000 Basenpaare und kodiert für über 90 Genprodukte (Kieff et al., 1971; McGeoch et al., 1988; Roizman et al., 2007). Es teilt sich in ein langes, ca. 126 kbp umfassendes Segment, das die *unique long* (U_L)-Region enthält und in ein kurzes Segment von ca. 26 kbp, in dem die *unique short* (U_S)-Region gelegen ist. Die beiden Regionen werden von invertierten, sich wiederholenden DNA-Sequenzen (*repeats*) flankiert, die nach ihrer Position an den Genomenden als *terminal repeats* (TR) und im Zentrum als *internal repeats* (IR) bezeichnet werden (Abb. 1.7). Die beiden *internal repeats* (IR_L und IR_S) grenzen aneinander und verbinden die U_L- und die U_S-Region. Das HSV-Genom enthält drei Replikationsursprünge

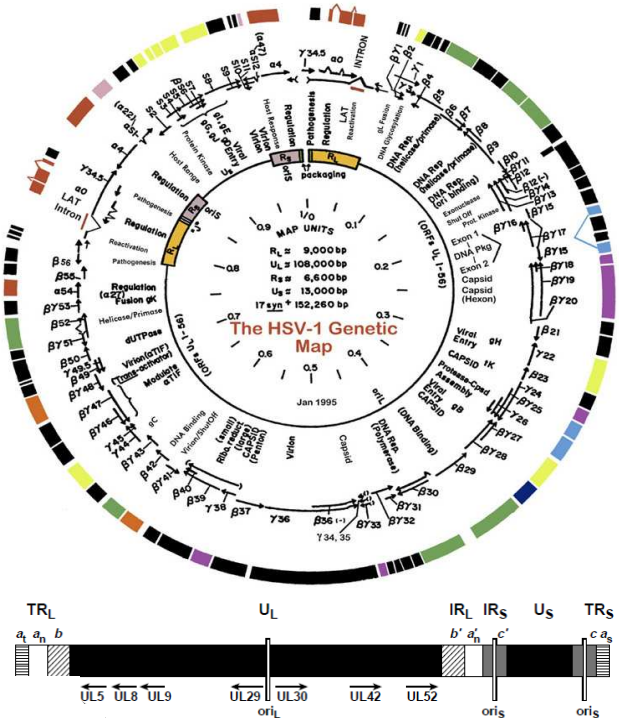


Abb. 1.7: Genom und Gene des Herpes Simplex Virus. Das HSV-Genom umfasst ca. 152.000 Basenpaare und kodiert für über 90 Genprodukte. Sie werden nach ihrem Expressionszeitpunkt im Infektionszyklus in *immediate early*-(α), *delayed early*- (β) und *late*-Proteine (γ) eingeteilt (oben). Das Genom, das im Zellkern zirkularisiert vorliegt, lässt sich in eine *unique long*- (U_L) und eine *unique short*-Region (U_S) einteilen, die jeweils von einem *terminal* (TR) und einem *internal repeat* (IR) flankiert werden. Die HSV-DNA enthält drei *origins*, die nach ihrer Lage als *ori$_L$* bzw. *ori$_s$* bezeichnet werden. Die Positionen der essentiellen Replikationgene liegen in der U_L-Region (unten). (http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv3f.html & Boehmer und Lehman, 1997)

(*origin of replication*, ori), ori$_L$ in der U_L-Region und jeweils ein ori$_S$ in den, die U_S-Region flankierenden *repeats*. Für die Replikation ist das Vorhandensein eines ori$_S$ ausreichend (Stow, 1982; Weller et al., 1985; Weir et al., 1989; Boehmer und Lehman, 1997).

In der infizierten Zelle liegt das HSV-Genom episomal als geschlossenes, zirkuläres Molekül vor (Jacob und Roizman, 1977; Becker et al., 1978). Von einem *origin* ausgehend findet die Replikation der DNA nach dem *rolling-circle*-Mechanismus statt (Abb. 1.8). Nach dem Einführen eines Einzelstrang-Bruchs erfolgt vom 3'-OH-Ende aus die kontinuierliche Führungsstrang-(*leading strand*)-Synthese, für die der ringförmige Gegenstrang als Replikationsmatrize dient. Während der *leading strand* vom 5'-Ende her fortlaufend vom Matrizenstrang gelöst wird, findet unter Bildung von RNA-Primern und Okazaki-Fragmenten daran parallel die Folgestrang-(*lagging strand*)-Synthese statt. Es resultiert ein dsDNA-Molekül, bei dem vielfache HSV-Genomkopien kovalent verknüpft in einer konkatemeren Anordnung vorliegen. Während der Verpackung in die Kapside wird die DNA geschnitten, um die Genomequivalente freizusetzen (Boehmer und Lehman, 1997; Roizman et al., 2007).

Sieben virale Proteine, die alle Produkte der *delayed-early*-Gene sind (UL5, 8, 9, 29, 30, 42 & 52), sind für die HSV-DNA-Replikation essentiell (Challberg, 1986; McGeoch et al., 1988; Wu et al., 1988). Die DNA-Polymerase (UL30) bildet mit dem *processivity factor* (UL42) einen dimeren Komplex, der neben einer 5'-3'-Polymerasefunktion eine 3'-5'-Exonuklease-aktivität und damit eine *proof-reading*-Funktion besitzt. Der trimere Helikase-Primase-Komplex (UL5, UL8 und UL52) ist für die Entwindung der DNA, damit zur Freisetzung des *leading strand* und für die gleichzeitige Synthese der RNA-Primer, die zur Bildung der Okazaki-Fragmente benötigt

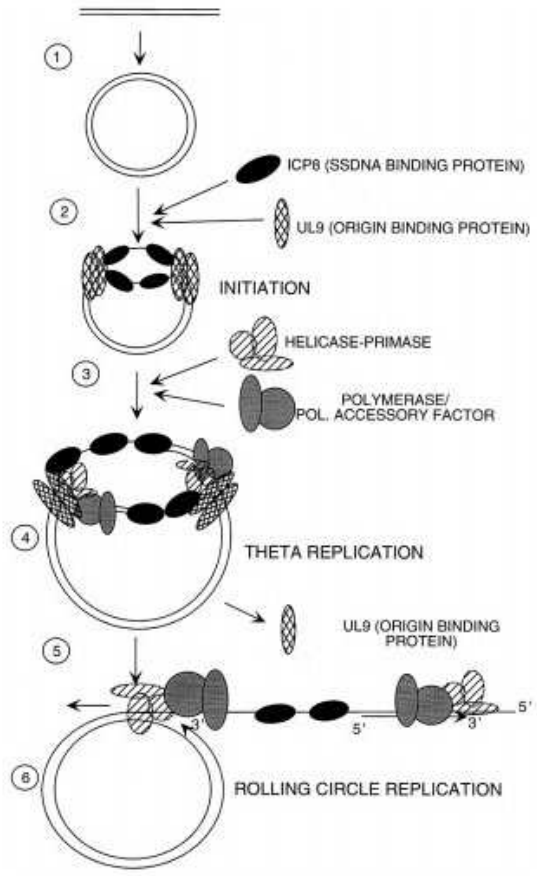


Abb. 1.8: HSV *rolling-circle*-Replikation. Nach der Zirkularisierung der HSV-DNA bindet UL9 an das *origin* und entwindet dieses unter Mithilfe von ICP8. Die Einzelstrang-Konfiguration wird während der gesamten Replikation durch ICP8 stabilisiert. Über UL9 und ICP8 vermittelt, lagern sich der Helikase-Primase-Komplex und die dimere HSV-Polymerase an. Ein Strang der Genoms wird geschnitten und vom entstandenen 3'-Ende beginnt die DNA-Synthese, bei der der geschlossene Gegenstrang als Matrize dient. Durch die fortlaufende DNA-Synthese wird der *leading strand* verdrängt. An ihm findet die Bildung des Gegenstrangs (*lagging strand*) statt. Die resultierenden Genomkopien sind kovalent verknüpft und werden erst bei der Verpackung in die Kapside freigesetzt. (aus: Roizman et al., 2007)

werden, verantwortlich. Die 5'-3'-Helikaseaktivität wird durch UL5 vermittelt. UL52 enthält die Primasefunktion. UL8, für das keine eigene enzymatische Funktion nachgewiesen ist, stimuliert die Aktivität der beiden anderen Proteine und ist für die Kernlokalisation des Komplexes und dessen Interaktion mit UL30/42, UL9 und ICP8 verantwortlich (Boehmer und Lehman, 1997; Roizman et al., 2007). UL9 ist das *origin-binding protein* von HSV. Es lagert sich an ein *ori* an und entwindet es in 3'-5'-Orientierung (Boehmer et al., 1993; Elias und Lehman, 1988). Das UL29-Produkt ICP8 (*infected cell protein 8*), das HSV-ssDNA-bindende Protein, bindet zusammen mit UL9 an das *origin* und stabilisiert die entstandene DNA-Konfiguration (Fierer und Challberg, 1992; Makhov et al., 1996a & b; Lee und Lehman, 1997). Zusätzlich wird über ICP8 und UL9 die Rekrutierung des Helikase-Primase-Komplexes und der UL30/UL42-Polymerase an das *origin* vermittelt (Vaughan et al., 1985; Bush et al., 1991).

Die HSV-Replikation findet in subnukleären Replikationskompartimenten statt, die sich aus zellulären und den viralen Replikationsproteinen zusammensetzen (Quinlan et al. 1984; de Bruyn Kops und Knipe, 1988; Lukonis und Weller, 1996; Liptak et al., 1996). Der Verlauf der HSV-Infektion kann anhand von morphologischen Veränderungen der Replikationskompartimente in Stadien (I bis IV) eingeteilt werden (Abb. 1.9). Die Einteilung orientiert an der nukleären Umverteilung von ICP8 und des zellulären *promyelocytic leukemia protein* (PML) (Burkham et al., 1998 & 2001). ICP8 ist im Zellkern ab dem Stadium II homogen verteilt nachweisbar. Im Stadium III bilden sich die zahlreichen kleinen Präreplikationskomplexe, die sich zunächst aus der HSV-DNA, ICP8, UL9 und dem Helikase-Primase-Komplex zusammensetzen. Im Stadium IV findet die Vergrößerung

und Vereinigung der präreplikativen Komplexe zu den reifen Replikationskompartimenten statt (Taylor et al., 2003b; Taylor und Knipe, 2004; Burkham et al., 2001).

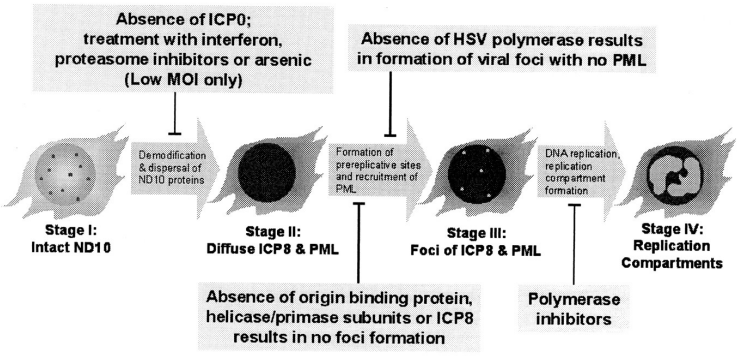


Abb. 1.9: HSV-Replikationskomplexe. Die Replikation der HSV-DNA findet in nukleären Replikationskompartimenten statt. Diese lassen sich über ICP8 nachweisen und anhand ihrer Morphologie in Stadien einteilen. Nach der Infektion und der transaktiviert ICP0 die HSV-Proteinexpression (Stage I → Stage II). Für die Formierung der präreplikativen Komplexe aus dem diffusen ICP8 ist der Helikase-Primase-Komplex nötig (Stage II → III). Die DNA-Synthese findet in den sich vereinigenden Replikations-komplexen (Stage IV) unter dem Einfluss der Polymerase statt. (aus: Burkham et al., 2001)

1.3.3 Helferfunktionen von HSV bei der AAV-Replikation

Bei der Herpes-Simplex-Virus-vermittelten AAV-DNA-Replikation sind sechs der sieben HSV-Proteine beteiligt, die auch für die HSV-eigene Replikation essentiell sind. Diese Replikationsfaktoren sind der Helikase-Primase-Komplex (UL5, UL8 und UL52), das *single-strand DNA-binding protein* ICP8 (UL29) und die UL30/42-Polymerase (Challberg, 1986; Wu et al., 1988; Weindler und Heilbronn, 1991; Ward et al., 2001). Das HSV-*origin-binding protein* UL9 ist nicht involviert, da die Funktion von UL9 durch die sequenzspezifische DNA-Bindung vermittelt wird, zwischen der Erkennungssequenz von HSV-UL9 und der AAV-DNA aber keine Homologien bestehen (Srivastava et al., 1983; Koff und Tegtmeyer, 1988; Hazuda et al., 1991; Ryan et al., 1996). Als minimale Helferfaktoren für die AAV-Replikation *in vivo* sind nur die vier HSV-Gene UL5, UL8 & UL52 und UL29 erforderlich. Die HSV-Polymerase (UL30/42) wird nicht benötigt, ihre Anwesenheit führt allerdings zu einer effektiveren DNA-Replikation (Weindler und Heilbronn, 1991). Mit dem Nachweis der AAV-DNA-Synthese *in vitro* durch HSV-UL30, UL42, ICP8 und AAV-Rep68 konnte die Beteiligung der HSV-Polymerase an der AAV-Replikation bestätigt werden (Ward et al., 2001).

Der Helikase-Primase-Komplex und ICP8 können sich im Zellkern unabhängig von einer HSV-Infektion und dem Vorhandensein von HSV-DNA zu Präreplikationskomplexen formieren. Die Kotransfektion der vier beteiligten Gene führt wie bei einer HSV-Wildtyp-Infektion zur Bildung der intranukleären Foci. Dabei ist die Anwesenheit aller Komponenten erforderlich, weil es sonst lediglich zu einer diffusen Proteinverteilung im Zellkern kommt (Liptak et al., 1996; Lukonis und Weller, 1997; Slanina et al., 2006). Bei der AAV-Replikation sind die Proteine des

Helikase-Primase-Komplexes vor allem als strukturelle Bestandteile von Bedeutung. Die UL52-Primase-Aktivität ist nicht erforderlich. Auch eine enzymatisch aktive Helikase (UL5) ist nicht essentiell, wird aber für eine effiziente AAV-DNA-Replikation benötigt (Stracker et al., 2004; Slanina et al., 2006).

Der Einfluss von ICP8 auf die AAV-Replikation wird durch die Interaktion mit dem AAV-Nichtstrukturprotein Rep78 deutlich. Sowohl die *in vivo*-Kolokalisation von Rep78 und ICP8 in den AAV-Replikationskompartimenten als auch ihre Interaktion *in vitro* ist AAV-ssDNA-abhängig (Heilbronn et al., 2003; Stracker et al., 2004; Slanina et al., 2006). Bei der HSV-Replikation nimmt ICP8 zahlreiche Funktion wahr, die auch bei der AAV-DNA-Synthese von Bedeutung sein dürften. ICP8 bindet zusammen mit UL9 and das HSV-*origin* und ist für dessen Entwindung mitverantwortlich (Lee und Lehman, 1997; Makhov et al., 1996b & 2003; He und Lehman, 2000). Durch die Stabilisierung der einzelsträngigen DNA-Konformation ist es zudem für die Synthese des neuen DNA-Strangs von Bedeutung (Ruyechan, 1983; de Bruyn Kops und Knipe, 1988; Boehmer und Lehman, 1993a). Zusätzlich rekrutiert ICP8 den Helikase-Primase-Komplex und interagiert mit der UL30/42-Polymerase und regulatorischen zellulären Proteinen (Bush et al., 1991; de Bruyn Kops et al., 1998; Taylor und Knipe, 2004). Die genaue Funktion von ICP8 bei der AAV-Replikation und die molekularen Mechanismen bei der Interaktion mit AAV-Rep78 sind aber noch nicht endgültig geklärt worden.

1.4 AAV-Rep78, HSV-ICP8 und ihre Interaktion

1.4.1 Funktionen von Rep78 im AAV-Lebenszyklus

Rep78 ist das größte der vier AAV-Nichtstrukturproteine. Es besteht aus 621 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 72 Kilodalton (kDa). In der Zelle ist es überwiegend nukleär lokalisiert. Das alternativ gesplicte Protein Rep68 enthält im Vergleich einen verkürzten C-Terminus, Rep52 und Rep40 fehlt gegenüber den großen Rep-Proteinen der N-Terminus von Aminosäure 1 bis einschließlich 224 (Mendelson et al., 1986; Trempe et al., 1987; Im und Muzyczka, 1992). Im Replikationszyklus von AAV nimmt Rep78 eine Vielzahl von Aufgaben wahr. Die Rep-Funktionen beinhalten eine 3’-5’-Helikase-Aktivität, eine sequenzspezifische dsDNA-Bindung und eine strang- und sequenzspezifische Endonuklease-Aktivität. Darüber hinaus besitzt Rep78 ssDNA-bindende Eigenschaften, ein Kernlokalisationssignal und eine Zinkfinger-Dömane (Im und Muzyczka, 1992; Yang et al., 1992; Hörer et al., 1995). Rep78 reguliert die AAV-Genexpression durch die Inhibition und

Transaktivierung der drei AAV-Promotoren p5, p19 und p40. Zusätzlich kann Rep78 auch heterologe virale Promotoren inhibieren (Beaton et al., 1989; Hörer et al., 1995; Needham et al., 2006). Die Interaktion mit den regulatorischen DNA-Sequenzen wird überwiegend durch die spezifische DNA-Bindung an Rep-Erkennungssequenzen in der AAV-DNA und in den heterologen Promotoren vermittelt (McCarty et al. 1994a; Ryan et al., 1995; Casper et al., 2005; Needham et al., 2006).

Rep78 ist für die AAV-DNA-Replikation essentiell (Hermonat et al., 1984; Tratschin et al., 1984). Diese findet in AAV-Replikationszentren statt, die sich durch die Interaktion von Rep78 mit den Helfervirusproteinen formieren (Weitzman et al., 1996a; Heilbronn et al., 2003; Stracker et al., 2004; Glauser et al., 2007). Vorraussetzung für die Replikation ist die Assoziation von Rep78 an die ITRs, die durch die sequenzspezifische DNA-Bindung vermittelt wird. Die Helikase-Aktivität wird benötigt, um die ITRs zu entwinden und so die vollständige Synthese der AAV-DNA zu gewährleisten (Ward et al., 2001). Die Helikase-Aktivität ist abhängig von der ATP-Bindungs- und ATPase-Funktion des Proteins, die durch ATP-Hydrolyse die nötige Energie zur Verfügung stellt. Durch die Endonuklease-Aktivität wird strang- und sequenzspezifisch ein Einzelstrangbruch im ITR einführt, der für die Reinitiation der AAV-Replikation und für die Freisetzung der replizierten Genomäquivalente unabdingbar ist. Da die Rep-Endonuklease ein ssDNA-Substrat erfordert und ihre doppelsträngige Erkennungssequenz zunächst entwunden werden muss, ist für die Endonuklease-Funktion eine funktionelle Helikase-Aktivität notwendig. Die Verwendung von partiell einzelsträngigen AAV-ITR-Substraten ermöglicht es aber, die Endonuklease-Aktivität auch unabhängig von der Rep-Helikase zu untersuchen (Im und Muzyczka, 1992; McCarty et al., 1992; Brister und Muzyczka, 1999; Zhou et al., 1999)

1.4.2 Rep78-Domänen

Die funktionellen Domänen von Rep78 konnten in verschiedenen Studien eingegrenzt und zum Teil auch deren kritische Aminosäuren definiert werden (Abb. 1.10). Im N-Terminus (Aa. 1-224), der auch in Rep68, aber nicht in Rep52/40 enthalten ist, sind die spezifische dsDNA-Bindung und die Endonuklease-Aktivität lokalisiert (Im und Muzyczka, 1992; Weitzman et al., 1996b). Die N-terminalen 187 Aminosäuren sind zur AAV-DNA-Bindung und zur endonukleatischen Spaltung eines partiell einzelsträngigen Substrates in der Lage. Für die über eine Residualaktivität hinausgehende Endonuklease-Aktivität sind allerdings ca. 200 Rep-Aminosäuren erforderlich (Davis et al., 2000; Yoon et al., 2001). Trotz der DNA-Bindung der isolierten 187 Aminosäuren wurde vermutet, dass die Sequenzspezifität durch den, über den N-

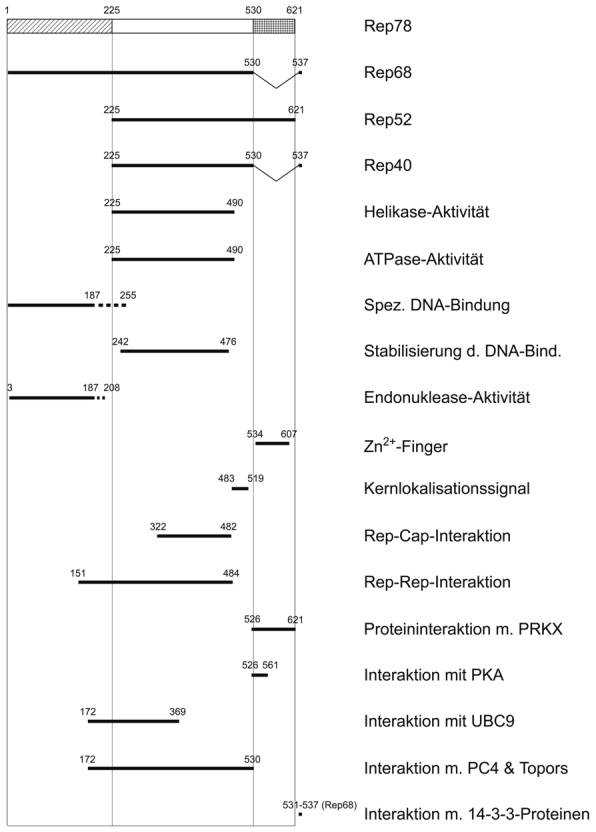


Abb. 1.10: Rep78-Domänen im Überblick. Rep78 gliedert sich in drei Abschnitte: den mit Rep68 übereinstimmenden N-Terminus, die in allen Rep-Proteinen enthaltene zentrale Domäne und den C-Terminus, über den auch Rep52 verfügt. Rep68/40 besitzen stattdessen sieben eigene Aminosäuren. In der Abbildung sind die funktionellen Domänen von Rep78 dargestellt. Die Aminosäurepositionen, die verschiedenen Publikationen (siehe Text) entnommen wurden, geben die Grenzen von funktionell noch aktiven Polypeptiden wieder.

Terminus hinausgehenden Teil vermittelt wird (Yoon et al., 2001). Eine die DNA-Bindung unterstützende Aktivität ist für den zentralen Teil von Rep78 beschrieben worden (McCarty et al., 1992; Davis et al., 1999). Eine Differenzierung der sich überschneidenden N-terminalen Domänen konnte durch die Beschreibung unterschiedlicher kritischer Aminosäuren erreicht werden. Dabei haben zahlreiche Mutationen Einfluss auf deren Aktivität, einige Aminosäuren sind aber durch ihre Lage in konservierten Bereichen und/oder ihre biochemische Funktion von besonderer Bedeutung. Für die Endonuklease-Aktivität ist z.B. Tyrosin (Y) 156 essentiell, über das nach der Endonuklease-Reaktion ein Rep-Molekül kovalent mit dem entstandenen 5'-DNA-Ende verknüpft wird (Snyder al., 1990; Davis et al., 2000). Weitere kritische Aminosäuren sind z.B. Glutaminsäure (E) 6, E83 oder Y152. Sie liegen in konservierten Bereichen, die mit RCR-Motiven anderer Endonukleasen übereinstimmen (Urabe et al., 1999; Walker et al, 1997a; Smith und Kotin, 2000; Davis et al., 2000; Hickman et al., 2002; Yoon-Robarts und Linden, 2003). Für die DNA-Bindungsdomäne wurden z.B. Arginin (R) 107 und 138 oder Lysin (K) 136 als kritische Aminosäuren, aber auch Aminosäurecluster wie D40/42/44 beschrieben, deren Mutation zur Aufhebung der DNA-Bindung führt (Davis et al., 1999; Urabe et al., 1999).

Im zentralen Teil von Rep78 (Aa. 225 bis 530), der in allen Rep-Spezies enthalten ist, ist die Helikase-Aktivität von Rep mit den zugehörigen sekundären Funktionen, wie der ssDNA-Bindung und ATPase-Aktivität lokalisiert. Außerdem ist die zentrale Rep-Domäne für die Multimeriserung der Proteine verantwortlich (Im und Muzyczka, 1992; Walker et al., 1997b; Smith et al., 1997; Davis et al., 1999; James et al., 2004; Yoon-Robarts et al., 2004). Die Rep-Helikase, mit Rep40 als charakteristischem Vertreter lässt sich der Superfamilie der SF3-

Helikasen, einer Gruppe hexamerer Ring-Helikasen zuordnen (James et al., 2003; Hickman und Dyda, 2005). Für eine funktionelle Helikase-Aktivität sind die Aminosäuren 225 bis 490 ausreichend. Sie enthalten damit auch die sekundären Funktionen, wie für die ATPase-Aktivität nachgewiesen wurde (James et al., 2003). Die kritischen Aminosäuren liegen innerhalb konservierter Strukturen, sogenannter Walker-Motive (Walker A: 329-342; B: 473-479; B':391-404; C: 416-421) (Walker et al., 1997b; James et al., 2003). Für die ATPase-Aktivität ist eine Nukleotid-Bindungstasche essentiell. Sie wird von gegenüberliegenden *loops* in der Proteinstruktur (Aa. 337 bis 342 und 457 bis 461) gebildet (James et al., 2004). Eine häufig beschriebene kritische Aminosäure ist Lysin 340. Ihre Mutation (K340H) führt zum Verlust der ATPase-Aktivität und damit der Helikase-Aktivität des Proteins (Chejanovsky und Carter, 1990; Kyöstiö und Owens, 1996; Walker et al., 1997b). Über Lysin 404 und 406 wird die ssDNA-Bindung der Helikase vermittelt. Die Mutation der Aminosäuren hebt die ssDNA-Bindung der kleinen Rep-Proteine, aber nicht von Rep68, auf. Die Helikase-Funktion erlischt allerdings in allen Rep-Spezies. Eine weitere kritische Aminosäure ist Arginin 444 (R444). Sie ist Bestandteil eines essentiellen Arginin-Fingers (Yoon-Robarts et al., 2004).

Der zentrale Teil von Rep78 enthält die Rep-Multimerisierungsdomäne. Sie stimmt zum Teil mit der Helikase-Domäne, die als Hexamer funktionell ist, überein, reicht aber bis in den N-Terminus hinein. Kritische Bereiche für die Rep-Rep-Interaktion (z.B. 151-188 und 334-337) liegen zwischen den Aminosäuren 151 und 484. Lysin 165 ist dabei eine singuläre, kritische Aminosäure innerhalb eines hydrophoben *heptad repeats* einer α-Helix-Domäne (Smith et al., 1997; Davis et al., 1999). Die Multimerisierung wird durch die Rep-Bindung an AAV-DNA stimuliert. Die Nukleotid-Bindungsstelle hat ebenfalls Einfluss auf die Formierung der Rep-DNA-Komplexe, da diese durch die Anwesenheit von ATP gefördert wird (Weitzman et al., 1996b; Li et al., 2003). Mutationen in der zentralen Domäne führen zu einer reduzierten Rep-DNA-Interaktion, obwohl der N-Terminus als eigentlich DNA-Bindungsdomäne charakterisiert wurde (McCarty et al., 1992; Davis et al., 1999). Die unterstützende DNA-Bindungsaktivität wird vermutlich durch die Rep-Multimerisierung vermittelt, die den Protein-DNA-Komplex stabilisiert. Über die Aa. 322 bis 482 im zentralen Teil des Proteins wird auch die Interaktion mit den AAV-Cap-Proteinen vermittelt (Dubielzig et al., 1999).

Am C-terminalen Ende der zentralen Domäne befindet sich das gemeinsame Kernlokalisationssignal (*nuclear localisation signal*, NLS) der Rep-Proteine. Das zweigeteilte NLS enthält konservierte Bereiche, die auch in Nucleoplasmin und weiteren nukleären Proteinen zu finden ist (Yang et al., 1992). Interne Deletionen der Codons 456 - 520 und 482 – 556 und die Deletion des C-Terminus ab Aminosäure 481 resultieren in einer zytoplasmatischen Lokalisation

der Rep-Proteine (Yang et al, 1992; Hörer er al. 1995; Kleinschmidt et al., 1995). Durch die Mutation der Aminosäuren 492 bis 494 und 506/507 & 509 wird die Kernlokalisation von Rep78/68 aufgehoben und ihre Interaktion mit Importin α beeinträchtigt. Durch die Konstruktion chimärer Proteine mit den Rep-Aminosäuren 464 bis 529 konnte gezeigt werden, dass sich das Rep-NLS übertragen lässt (Cassell und Weitzman, 2004).

Der C-Terminus von Aminosäure 531 bis 621 ist nur in Rep78 und Rep52 enthalten. Die *splicing*-Varianten Rep68 bzw. Rep40 besitzen stattdessen sieben eigene C-terminale Aminosäuren (531-537). Der Rep78/52-eigene C-Terminus enthält ein konserviertes Zinkfingermotiv (Aa. 534-607), dessen Mutation die Zink-Bindung aufhebt (Hörer et al., 1995). Der C-Terminus ist zudem für die Interaktion mit den Proteinkinasen PKA (Aa. 526-561) und PRKX (Aa. 526-621) verantwortlich (Di Pasquale und Stacey, 1998; Schmidt et al., 2002) Die Rep68/40-eigenen sieben Aminosäuren vermitteln die Bindung an zelluläre 14-3-3 Proteine, die für Rep78 nicht nachweisbar ist. Die kritische Aminosäure ist Serin 535 (Han et al., 2004). Die Interaktion beider großen Rep-Proteine mit dem zellulären Transaktivator PC4 und den regulatorischen Proteinen Topors (Aa. 172-530) und UBC9 (Aa. 172-369) werden durch eine Domäne vermittelt, die sich vom N-Terminus bis in die zentralen Rep-Domäne erstreckt (Weger et al., 1999, 2002 & 2004). Für die zahlreichen weiteren zellulären Interaktionspartner, die für Rep78 beschrieben worden sind (Nash et al., 2007 & 2009) ist nicht bekannt, über welche Rep-Domäne sie interagieren bzw. ob die Interaktionen indirekt oder über eine direkte Bindung vermittelt werden.

1.4.3 Spezifische DNA-Bindung von Rep78

Die spezifische DNA-Bindung ist eine essentielle Funktion von AAV-Rep78. Sie ist die Vorraussetzung für die sequenzspezifische Endonuklease-Aktivität, die Rep-vermittelte Integration der AAV-DNA in das Wirtsgenom und die Promotor-regulierenden Eigenschaften des Proteins. Die verantwortliche Domäne ist im N-Terminus lokalisiert (Im und Muzyczka, 1992; Owens et al., 1993). Die Rep-DNA-Bindung wurde überwiegend in *gel shift assays* untersucht und die Interaktion mit verschiedenen Substraten, wie z.B. vollständigen AAV-ITRs, isolierten RBS-Oligonukleotiden oder mit DNA-Sequenzen aus heterologen zellulären und viralen Promotoren analysiert. Dadurch konnten die DNA-Sequenzen definiert werden, die bei der Rep78-Bindung von Bedeutung sind. Ihre Spezifität wurde durch kompetitive Bindungsexperimente bestätigt. Darüber hinaus konnte auch in *DNAse protection assays* die

Größe und Sequenz der Rep-gebundenen DNA-Moleküle bestimmt werden (McCarty et al., 1992 & 1994b; Chiorini et al., 1994a & b; Casper et al., 2005; Needham et al., 2006).

Der entscheidende Teil der spezifischen DNA-Sequenz ist ein *GAGC*-Motif (Owens et al., 1993; McCarty et al., 1994a; Ryan et al., 1996). In allen von Rep78/68 gebundenen DNA-Substraten sind Wiederholungen und Varianten dieses Tetranukleotids enthalten. Für eine Rep-Bindung ist es ausreichend, wenn zwei benachbarte Tetranukleotide vorhanden sind, die von unspezifischer DNA flankiert werden (Chiorini et al., 1995). Für die Funktionalität ist es von Bedeutung, dass die *rep binding site* in der korrekten Orientierung vorliegt. Eine invertierte und/oder komplementäre DNA-Sequenz führt trotz weitgehend erhaltener Rep-Bindung zu einer starken Reduktion der spezifischen Endonuklease-Aktivität an der benachbarten *terminal resolution site* (trs) (Brister und Muzyczka, 2000). In der *RBS* der AAV-ITRs ist das *GAGC*-Motiv fünfmal nebeneinander enthalten, allerdings sind nur die drei mittleren Wiederholungen „perfekte“ Motive, die von Motiven mit Sequenzabweichungen flankiert werden (Abb. 1.11). Innerhalb der AAV-Serotypen ist diese Nukleotidabfolge, mit gewissen Variationen, konserviert (Ryan et al., 1996; Hickman et al., 2004). Eine weitere *RBS* befindet sich in der AAVS1-*site* auf Chromosom 19. Hier ist das *GAGC*-Motiv viermal enthalten, dreimal davon perfekt (Weitzman et al., 1994). Innerhalb des humanen Genoms sind zahlreiche weitere DNA-Sequenzen beschrieben worden, die entsprechende Übereinstimmungen zeigen (Wonderling et al., 1997). Diese korrelieren mit inzwischen beschriebenen AAV-Integrationsstellen außerhalb von Chromosom 19, bei denen, wie z.B. auf Chr. 5, eine lokale Häufung von Integrationsereignissen zu beobachten ist. Auch die Regulierung von Promotoren durch Rep78 wird teilweise über die DNA-Bindung vermittelt. Der AAV-p5-Promotor enthält eine *rep binding site* mit vier Wiederholungen des Quadruplets, von denen allerdings nur eins die genaue Sequenz aufweist. Auch im p19- und p40-Promotor von AAV sind rudimentäre Erkennungssequenzen vorhanden (Kyöstiö et al., 1995; McCarty et al., 1991 & 1994a; Ryan et al., 1996). Der Adenovirus E2A-Promotor, der von Rep78 inhibiert wird, beinhaltet ebenfalls eine DNA-Sequenz, für die eine Rep-Bindung nachgewiesen wurde und in der mehrere rudimentäre *GAGC*-Motive erkennbar sind (Casper et al., 2005).

AAV2 (CTCT) GCGC **GCTC GCTC GCTC** ACTG (AGGC)
AAV3 (CTAT) GCGC ACTC **GCTC GCTC** GGTG (GGGC)
AAV4 (CTAT) GCGC **GCTC GCTC** ACTC ACTC (GGCC)
AAV6 (CTCT) GCGC **GCTC GCTC GCTC** ACTG (AGGC)
AAV5 (TCGC) GTTC **GCTC GCTC** GCTG **GCTC** (GTTT)
AAVS1 (GGCT) CGGC **GCTC GCTC GCTC** GCTG (GGCG)

Abb. 1.11: DNA-Erkennungssequenz von Rep78. Über den N-Terminus wird die spezifische DNA-Bindung von Rep78/68 und damit auch die Spezifität konsekutiver Rep-Funktionen vermittelt. Die Erkennungssequenz beinhaltet mehrere Wiederholungen eines *GAGC*-Motivs. Die Tetranukeotid-*repeats* der *rep bindings sites* sind innherhalb der AAV-Serotypen konserviert und mit Abweichungen auch in der AAVS1-*site* auf Chr. 19, dem AAV-p5-Promotor und in heterologen Promotorsequenzen zu finden. (nach: Hickman et al., 2004)

Bei der DNA-Bindung von Rep78 spielt die Multimerisierung des Proteins eine wichtige Rolle. In *gel shift assays* und *cross-linking*-Experimenten wurden hexamere Rep-Komplexe, aber auch Zwischenstufen mit einer geringeren Anzahl von Rep-Molekülen an der DNA nachgewiesen (McCarty et al., 1994b; Weitzman et al., 1996b; Smith et al., 1997). Darüber hinaus konnte in einer Röntgenstrukturanalyse demonstriert werden, dass mehrere Moleküle des isolierten Rep-Terminus helikal nebeneinander an die AAV *rep binding site* binden (Abb. 1.12) (Hickman et al., 2004). Das molekulare Protein-DNA-Verhältnis der Komplexe von 6:1 wurde in weiteren Experimenten, wie z.B. *gel filtration assays* bestätigt (Hickman et al., 2004). Obwohl sich die Multimerisierungsdomäne als Bestandteil der Helikase-Domäne im zentralen Teil des Proteins befindet, wird die Komplexbildung von Rep78 durch den N-Terminus und dessen spezifische DNA-Bindung stimuliert. Umgekehrt hat auch die Multimerisierung stimulierenden Einfluss auf die DNA-Bindung, wie durch die Untersuchung des mit heterologen Multimerisierungsdomänen fusionierten Rep-N-Terminus gezeigt wurde (Cathomen et al., 2000).

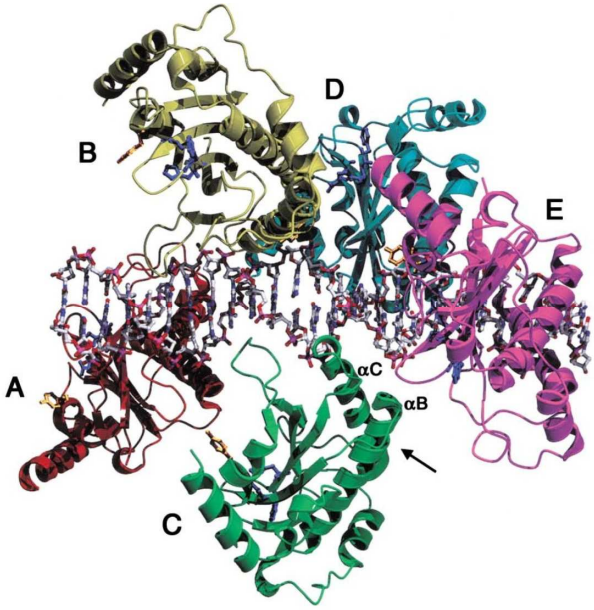


Abb. 1.12: Multimerisierung von Rep an den AAV-ITRs. Kristallstruktur von fünf gebundenen Rep-N-Termini an einem AAV-*RBS*-Oligonukleotid. Rep78/68 bildet multimere Komplexe an der DNA-Erkennungssequenz, die über den N-Terminus vermittelt und die zentrale Rep-Domäne stabilisiert werden. Das Protein-DNA-Verhältnis beträgt 6:1, wird *in vitro* aber nur bei einem entsprechend langen DNA-Substrat erreicht. (aus: Hickman et al., 2004)

Die Eingrenzung der Rep-DNA-Bindungsdomäne ist von der Länge und Struktur des DNA-Substrates und der Art des Experimentes abhängig. Die ersten 187 Aminosäuren des N-Terminus sind mit verringerter Aktivität in der Lage, *in vitro* ein 45 bp langes, lineares AAV-*ori*-Fragment zu binden, während 208 Aminosäuren eine gute spezifische DNA-Bindung zeigen (Yoon et al., 2001). Für die *in vivo*-Bindung sind mindestens 220 Aminosäuren erforderlich, aber erst die 244 N-terminalen Aminosäuren zeigen eine volle Aktivität (Cathomen et al., 2000). Durch die Fusion des Rep78-N-Terminus mit dem C-Terminus des verwandten *Goose Parvovirus* Rep1-Proteins konnte die AAV-spezifische DNA-Bindung übertragen und so die Rep78-DNA-Bindungsdomäne auf 232 Aminosäuren eingegrenzt werden. Dabei wurde vermutet, dass die Spezifität insbesondere durch die Aminosäuren 201 bis 210 vermittelt wird, da diese kaum Übereinstimmung mit den verwandten Sequenzen der parvoviralen Nichtstruktur-Proteine

zeigen. Die ersten 200 Aminosäuren von Rep78/68 sind dagegen hoch konserviert und stimmen zu 99,5% mit dem *Goose Parvovirus* Rep1 überein (Yoon et al., 2001).

Durch interne Deletionen und Mehrfach-Aminosäure-Substitutionen im Rep-N-Terminus konnten kritische Bereiche für die DNA-Bindung eingegrenzt werden (McCarty et al., 1992; Yang und Trempe, 1993; Davis et al., 1999; Cathomen et a., 2000). Allerdings kann die gezeigte Aufhebung der Rep-DNA-Interaktion bei diesen Mutationen auch auf einer Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins beruhen. Bei einer Untersuchung von Einzelaminosäureaustauschmutanten, die diesen Effekt weitgehend ausschließen, konnten drei kritische Aminosäuren, Arginin (R) 107 & 138 und Lysin (K) 136, definiert werden, deren Mutation zu einer vollständigen Aufhebung der DNA-Bindung von Rep78 führte (Urabe et al, 1999). Unterstützt wird die Charakterisierung dieser drei Punktmutanten durch eine Kristallstrukturanalyse des DNA-gebundenen Rep-N-Terminus von AAV-5. Sie beschreibt die entsprechenden konservierten Aminosäuren (R106, K135 & K137) als wichtige direkte Interaktionspartner mit der AAV-DNA (Hickman et al., 2004).

Die Bindungsaffinitäten der Rep78/68-DNA-Interaktion wurden in mehreren Studien bestimmt (Chiorini et al., 1994b; McCarty et al., 1994b; Han et al., 2004). Trotz verschiedener DNA-Substrate, wie vollständigen ITRs, der isolierten *RBS* (*A-stem*) oder der AAV-S1-*site* konnten für die Dissoziationskonstanten (K_D) vergleichbare Werte zwischen $8x10^{-10}$ M und $2x10^{-8}$ M ermittelt werden. Dabei war allerdings eine höhere Rep-Affinität zum vollständigen ITR gegenüber dem *RBS*-Oligonukleotid zu beobachten. Eine mögliche Erklärung ist die zusätzlich zur *RBS*-Bindung gezeigte spezifische Interaktion des Rep-N-Terminus mit dem *hairpin*-Arm (*stem 2*) des ITR (Ryan et al., 2004; Hickman et al., 2004). Neben der spezifischen dsDNA-Bindung ist für Rep78/68 auch eine unspezifische ssDNA-bindende Aktivität bekannt (Im und Muzyczka, 1992). Die Affinität der ssDNA-Interaktion liegt mit einer K_D von $1,5x10^{-10}$ M im Bereich der Rep-dsDNA-Bindung. Die Domäne der großen Rep-Proteine für die Interaktion mit ssDNA wird im N-Terminus vermutet (Yoon-Robarts et al., 2004).

1.4.4 ICP8, das ssDNA-bindende Protein von HSV

Das ssDNA-bindende Protein ICP8 (*infected cell protein 8*) des Herpes Simplex Virus ist das Produkt des UL29-Gens und einer der sieben essentiellen Faktoren bei der HSV-Replikation (Challberg, 1986; Conley et al., 1981; McGeoch et al., 1988). Es hat eine Größe von 1196 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 128 kDa (Quinn, 1985; Honess und Roizman, 1973). ICP8 besteht aus einer großen N-terminalen (Aa. 9-1038) und einer kleinen C-terminalen

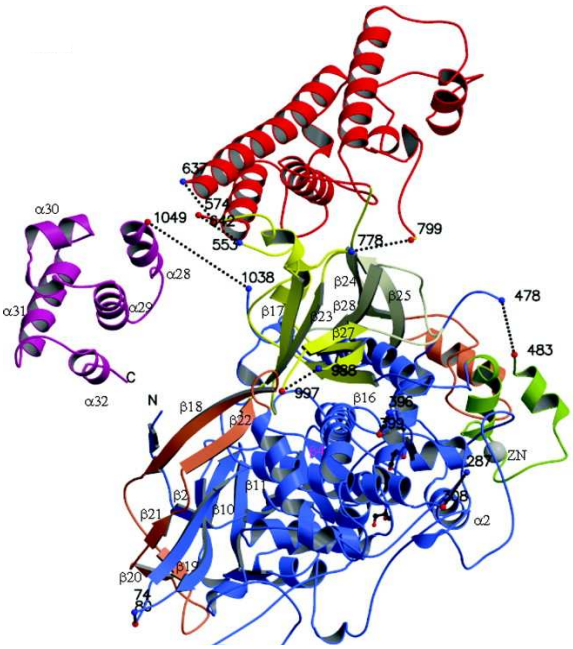


Abb. 1.13: Struktur von ICP8. Das Bild zeigt die Rekonstruktion der Proteinstruktur von ICP8 aus einer Röntgenstukturanalyse. ICP8 setzt sich aus einer großen N-terminalen Domäne und einem kleinen C-Terminus zusammen. Der N-Terminus lässt sich darüber hinaus in die drei Regionen *head* (rot), *shoulder* (blau) und *neck* (gelb/grau) unterteilen. Die die Regionen verbindenden Elemente sind in orange, die Zink-Bindungsdomäne ist grün dargestellt. (aus: Mapelli et al., 2005)

Domäne (Aa. 1049-1129) (Abb. 1.13). Die N-terminale Domäne ist in drei weitere Regionen, *head*, *shoulder* und *neck* gegliedert. Mit dem C-Terminus ist diese Domäne über eine *linker*-Sequenz (Aa. 1038-1049) verknüpft (Mapelli et al., 2005). Über den äußersten C-terminalen Teil des Proteins (1129-1196) sind keine strukturellen Informationen bekannt.

Obwohl die biochemischen Eigenschaften von ICP8 gut charakterisiert sind, konnten die zugehörigen funktionellen Domänen nur bedingt abgegrenzt werden. Für die DNA-Bindung wurden verschiedene Bereiche, wie die C-terminale Hälfte (Leinbach und Heath, 1989), die Aminosäuren 564-1100 (Gao und Knipe, 1989) oder auch die Regionen zwischen den Aa. 300-849 (Wang und Hall, 1990) bzw. Aa. 386-902 (White und Boehmer, 1999) verantwortlich gemacht. Strukturelle Übereinstimmungen mit Domänen, die in anderen ssDNA-bindenden Proteinen die DNA-Interaktion vermitteln, sind für die *neck*-Region (Aa. 530-1028) des N-Terminus von ICP8 beschrieben worden. Die konservierten aromatischen und geladenen Aminosäuren Y543, N551, R772, K774, R776, Y988 und N1002 dürften dabei durch ihre exponierte Lage an der Oberfläche der *neck*-Region an der ssDNA-Binding beteiligt sein (Mapelli et al., 2005). Die Länge eines durch ein ICP8-Molekül abgedeckten ssDNA-Moleküls konnte auf 12-22 bzw. 14-25 Nukleotide eingegrenzt werden. Die Interaktion des Proteins mit ssDNA ist von der DNA-Sequenz unabhängig (Ruyechan, 1983; Dudas und Ruyechan, 1998, Makhov et al., 1996; Gourves et al., 2000; Mapelli et al., 2005).

Die DNA-Bindung von ICP8 wird durch die Kooperativität des Proteins stabilisiert (Dudas und Ruyechan, 1998; Mapelli, 2000). Die ICP8-Moleküle lagern sich auf der ssDNA nebeneinander an und halten diese in einer ausgestreckten Konfiguration (Abb. 1.14) (Ruyechan, 1983; Ruyechan und Weir, 1984; Lee und Knipe, 1985). Bei der DNA-Bindung können so auch Sekundärstrukturen aufgelöst (Ruyechan, 1983) und kleine doppelsträngige Bereiche getrennt werden (Boehmer und Lehman, 1993a). ICP8 ist in Zusammenarbeit mit

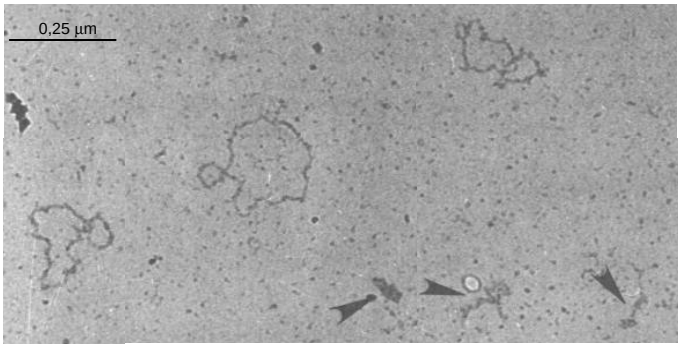


Abb. 1.14: Einfluss von ICP8 auf die DNA-Konfiguration. Bei der DNA-Bindung lagern sich die ICP8-Moleküle nebeneinander auf der ssDNA an und halten diese ein einer ausgestreckten Konfiguration. Auf dem elektronenmikroskopischen Bild sind drei entwundende mit und drei kondensierte DNA-Moleküle ohne ICP8-Bindung (Pfeile) zu erkennen. (aus: Ryuechan et al., 1983 (Ausschnitt))

dem Helikase-aktiven UL9-Protein neben der Entwindung des HSV-*origin* außerdem in der Lage, lange, kondensierte, unspezifische DNA zu entwinden (Boehmer et al., 1993; Makhov et al., 1996a & b). Die Kooperativität des Proteins führt dazu, dass sich die ICP8-Moleküle an einer Lipidmembran bereits ohne DNA in helikalen Filamenten anordnen (Makhov et al., 2004). An der ssDNA folgt die spiralförmige Anordnung des gebundenen Proteins der helikalen DNA-Struktur, die im elektronenmikroskopischen Nachweis, abhängig von der Achse der EM-Aufnahme, ringförmig oder ebenfalls filamentös erscheint (Abb. 1.15) (Makhov et al, 1996b; Mapelli et al, 2005). Wie eine Kristallstrukturanalyse zeigt, wird die kooperative Bindung dadurch erreicht, dass der C-Terminus eines ICP8-Moleküls mit der *neck*-Region im N-Terminus des nächsten ssDNA-gebundenen Proteins interagiert (Mapelli et al., 2005). Übereinstimmend wurde in einer funktionellen Untersuchung demonstriert, dass die 60 C-terminalen Aminosäuren von ICP8 für die kooperative DNA-Bindung benötigt werden (Mapelli et al., 2000). Durch die DNA-Bindung erfährt ICP8 eine Konformationsänderung, die in der Zelle zu einer Veränderung seiner biochemische Eigenschaften (Knipe und Spang, 1982; Knipe et al., 1982) und zu einer veränderten Zugänglichkeit der ICP8-Epitope für verschiedene Antikörper führt (Uprichard und Knipe, 2003). Die Konformationsänderung ist vermutlich eine Voraussetzung für die stabilisierende, kooperative Bindung von ICP8 an der ssDNA (Mapelli et al., 2000; Dudas et al., 2001).

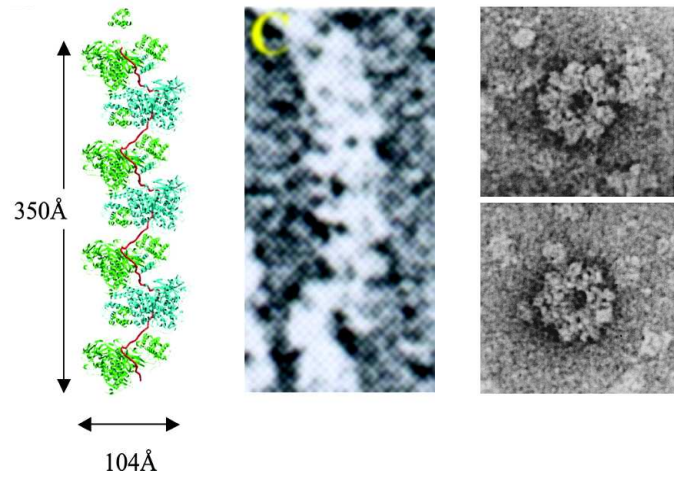


Abb. 1.15: Kooperative DNA-Bindung von ICP8. Die ICP8-Moleküle ordnen sich auf der ssDNA nebeneinander an und folgen dabei deren helikaler Struktur. Die Kooperativität des Proteins wird dadurch vermittelt, dass der C-Terminus eines gebundenen Moleküls mit der *neck*-Region des nächsten interagiert. Im Bild ist modellhaft die DNA-Bindung von sieben ICP8-Molekülen dargestellt (links), sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen der Protein-DNA-Filamente im Längs- (mitte) und Querschnitt (rechts). (aus: Mapelli et al., 2005 & Makhov et al., 1996b (Ausschnitt))

Neben einzelsträngiger DNA kann ICP8 auch doppelsträngige DNA (Lee und Knipe, 1985) und RNA (Boehmer, 2004) binden. Die Bindung an ssDNA ist aber fünffach stärker als an dsDNA und RNA. ssDNA-gebundenes ICP8 kann durch dsDNA auch kompetitiv nicht verdrängt werden (Lee und Knipe, 1985; Boehmer, 2004). Die Dissoziations- bzw. Assoziationskonstanten (K_D) der ICP8-ssDNA-Bindung variieren abhängig von der Untersuchung und der verwendeten DNA deutlich: $1x10^{-6}$ M (bzw. 10^6 M^{-1}) bei dT_{14} (Mapelli et al., 2000), $2,1x10^{-7}$ M bei dT_{25} (Dudas und Ruyechan, 1998), $1x10^{-7}$ M bei 100mer ssDNA (Boehmer, 2004) und $1,8x10^{-8}$ M (bzw. $5,5x10^7$ M^{-1}) bei 32mer ssDNA (Gourves et al., 2000). Dass mit längeren DNA-Substraten höhere Affinitäten erreicht werden, spricht für den unterstützenden Einfluss der, bei langen Oligonukleotiden stärker zum Tragen kommenden kooperativen Bindung von ICP8.

Neben der DNA-Bindungsdomäne konnte bei ICP8 auch eine Zinkfinger-Domäne charakterisiert werden. Diese liegt im Bereich der Aminosäuren 499 bis 512 in der Mitte des Proteins. Die Mutation der Zinkfinger-Domäne resultiert in einem nicht-funktionellen Protein, die DNA-Bindung wird dadurch aber nicht beeinträchtigt (Gao et al., 1988 ; Gupte et al., 1991). Die C-terminalen 28 Aminosäuren von ICP8 sind für die Translokation des Proteins in den Zellkern essentiell (Gao und Knipe, 1989 & 1992). Außerdem ist der C-Terminus für intranukleäre Lokalisierung, also die Zuordnung von ICP8 zu den HSV-Replikations-kompartimenten von Bedeutung (Taylor und Knipe, 2003a). Neben dem eigentlichen Kernlokalisationssignal sind noch weitere Bereiche von ICP8 für die nukleäre Lokalisation wichtig (Gao und Knipe, 1992).

ICP8 interagiert mit einer Vielzahl von viralen und zellulären Proteinen. Dabei muss zwischen einer direkten Proteininteraktion und einer indirekten, DNA-vermittelten Interaktion unterschieden werden, da viele der Interaktionspartner ebenfalls DNA-Bindungseigenschaften besitzen. Eine verantwortliche Domäne wurde bisher nicht beschrieben, allerdings wird vermutet, dass die Interaktion mit heterologen Proteinen durch die *shoulder*-Region im N-Terminus von ICP8 vermittelt wird (Mapelli et al., 2005). Die zahlreichen Proteininteraktionen weisen darauf hin, dass ICP8 während der HSV-Replikation eine wichtige Funktion einnimmt. Neben seinen Eigenschaften als ssDNA-bindendes Protein unterstützt ICP8 den Ablauf der HSV-DNA-Synthese so auch, in dem es ICP8 virale und zelluläre Faktoren in die Replikationskompartimente rekrutiert oder z.B. die Helikase-Aktivität von UL9 stimuliert. Die meisten zellulären Interaktionspartner sind dabei an der DNA-Replikation, den DNA-Reparaturmechanismen und am mRNA-*splicing* beteiligt sind. Bei den viralen Proteinen handelt es sich neben dem *origin-binding*-Proteine UL9 und der UL30-Polymerase u.a. um die regulatorischen Proteine ICP4, ICP27 und UL12 (Taylor und Knipe, 2004; Boehmer und Lehman 1997; Roizman et al., 2007).

1.4.5 Interaktion von Rep78 und ICP8

Die helferabhängige AAV-Replikation, aber auch die Replikation der beiden wichtigsten AAV-Helferviren, Herpes Simplex Virus und Adenovirus findet in umschriebenen Replikations-Foci in den Nuclei der Wirtszellen statt (Wistuba et al., 1997; Heilbronn et al., 2003; Quinlan et al., 1984; Lukonis et al., 1997; Pombo et al., 1994). Bei einer AAV-Adenovirus-Koinfektion wird die AAV-DNA in die adenoviralen Replikationszentren rekrutiert und darin repliziert (Weitzman et al., 1996a). Bei der HSV-vermittelten AAV-Replikation ist eine intranukleäre Komplexbildung und Kolokalisation der AAV- und HSV- Replikationsproteine nachweisbar. Nach der Koinfektion beider Viren kolokalisieren AAV-Rep und HSV-ICP8 fast vollständig im Zellkern. Die Kolokalisation ist von der Anwesenheit einzelsträngiger AAV-DNA abhängig. Die Rep-Expression mit Hilfe eines rekombinanten Herpes Simplex Virus führte zwar zur Bildung von intranukleären ICP8-Foci, ohne die AAV-DNA aber nur zur homogenen Verteilung des AAV-Proteins und damit nicht zu Kolokalisation. Durch die zusätzliche Infektion eines rekombinanten AAV konnte die AAV-DNA komplementiert und der Wildtyp-Effekt wiederhergestellt werden (Heilbronn et al., 2003).

Die Kolokalisation von Rep und ICP8 kann in einem Transfektionssystem nachvollzogen werden. Dabei führt die Kotransfektion der vier für die AAV-Replikation essentiellen HSV-Helfergene UL5, UL8, UL29 und UL52 zur Formierung der präreplikativen HSV-Komplexe und die zusätzliche Transfektion eines AAV-Wildtyp-Plasmids zur Kolokalisation von Rep und ICP8 in den intranukleären Komplexen (Slanina et al., 2006; Stracker et al., 2004). Für die Kolokalisation müssen die AAV *inverted terminal repeats* vorhanden sein. Ein ITR-deletiertes AAV-Plasmid führt lediglich zu einer homogenen Rep-Expression und nicht zur Kolokalisation mit den ICP8-Komplexen (Slanina et al., 2006). *In vitro* besteht eine schwache direkte Interaktion zwischen Rep78 und ICP8 (Heilbronn et al., 2003; Stracker et al., 2004). Durch die Anwesenheit ITR-flankierter AAV-ssDNA erhöht sich die Proteininteraktion um den Faktor 10. Auch ssDNA ohne ITRs hat einen, allerdings nicht so stark stimulierenden Effekt. Für dsDNA ist kein positiver Effekt im Vergleich zur direkten Rep78-ICP8-Interaktion *in vitro* nachweisbar (Heilbronn et al., 2003).

1.5 Ziel der Arbeit

Das Interesse und die Forschung am adeno-assoziierten Virus beruht auf dessen Nutzung als Vektor in der Gentherapie. Ein Augenmerk liegt auf der Untersuchung der strukturellen Beschaffenheit der verschiedenen Serotypen bzw. deren Kapside, um eine höhere Transduktionseffizienz und eine verbesserte Zellspezifität der Vektoren zu erreichen. Die Charakterisierung der Interaktion von AAV mit seinen Helferviren und die Untersuchung der Helferfunktionen bei der AAV-Replikation dienen dagegen dem Studium der Replikation von ssDNA-Viren und gleichzeitig der Optimierung von Helfervirus-basierten Verpackungssystemen für die rekombinanten AAV-Vektoren.

Die Interaktion zwischen Rep78 und ICP8 ist der Initiationsschritt bei der HSV-vermittelten AAV-Replikation. ICP8, dessen DNA-abhängige Interaktion mit Rep78 *in vivo* und *in vitro* gezeigt wurde, ist dabei eins von vier essentiellen HSV-Proteinen. Schon im HSV-Lebenszyklus erfüllt ICP8 eine Vielzahl von Aufgaben, die z.B. mit der Rekrutierung von Replikationsfaktoren oder der Stimulierung enzymatischer Funktionen von Interaktionspartnern über die bloße ssDNA-Bindung hinaus gehen. Rep78 vereint ebenfalls viele verschiedene Eigenschaften, die von der spezifischen DNA-Bindung, über eigene enzymatische Aktivitäten bis hin zu zahlreichen Proteininteraktionen reichen.

In dieser Arbeit sollte, ausgehend von der DNA-vermittelten Rep78-ICP8-Interaktion, die Domäne von AAV-Rep78 bestimmt werden, die für diese Interaktion verantwortlich ist. Ausgehend von *in vitro*-Experimenten sollte zudem versucht werden, die gewonnenen Ergebnisse wieder in den *in vivo*-Kontext zu übertragen, in dem die Interaktion der beiden Proteine zuerst beschrieben wurde. Im Zusammenhang mit den bereits bekannten molekularen Prozessen sollten die gewonnenen Erkenntnisse über die Rep-ICP8-Interaktion als grundlegender Mechanismus bei der AAV-Replikation diskutiert werden. Durch eine Erstellung von Interaktionsmodellen konnte die Initiation der DNA-Replikation von AAV in Abhängigkeit von den Herpes-Simplex-Virus-Faktoren nachvollziehbar gemacht werden.

2 Materialien

2.1 Geräte

Ausschwingzentrifuge 3-10	Sigma, Osterode
Brutschrank B6120	Heraeus Sepatech, Osterode
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA, München
Geldokumentationssystem	Pharmacia Biotech, Freiburg
Geldokumentationssystem	INTAS, Göttingen
Gelgießapparatur Dual Gel Caster Mighty Small SE246	Hoefer, Holliston, USA
Hochdruck-Homogenisator French® Press	Thermo Spectronic, NY, USA
Hybridisierungsofen Mini Oven MK II	MWG Biotech, Ebersberg
Inkubator	Forma (Thermo) Scientific, Waltham, USA
Inkubationsschüttler Model G25	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Inverses Lichtmikroskop CK2	Olympus, Hamburg
Inverses Fluoreszenz-Mikroskop DMIL	Leica, Wetzlar
Konfokales Fluoreszenzmikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Kontaminationsmonitor LB122	Berthold Technologies, Bad Wildbad
PCR-Geräte Gene Amp® PCR System 1700 & 2400	Applied Biosystems, Foster City, USA
PhosphoImager Storm 840	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
Spektralphotometer DU-530	Beckmann Coulter, Krefeld
Sterilbank Technoflow 2F 180-II GS	Integra Biosciences, Fernwald
Ultraschall-Desintegrator Sonifier 450	Branson, Danbury, USA
Vakuum-Geltrockner	Bio-Rad, München
UV-Crosslinker Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA
Vakuumzentrifuge DNA Speed Vac DNA 110	Savant (Thermo Scientific), Waltham, USA
Zentrifuge Avanti™ J-25/Rotor JLA 16250	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 3.OR	Hereus Sepatech, Osterode

2.2 Computer-Software

Gene Construction Kit® 2, Version 2.0.8 (Textco Inc.)	Planung von Klonierungen & PCRs; Erstellung von Plasmidkarten
Blast2Seq (National Center for Biotechnology Information – blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)	Überprüfung von Nukleotidsequenzen nach Sequenzierungen
Image Quant 5.1 (Molecular Dynamics)	Quantifizierungen der *in vitro*-Interaktionsexperimente
Microsoft Excel (Microsoft)	Berechnungen und Erstellung von Diagrammen
LSM Image Browser (Zeiss)	Auswertung der Immunfluoreszenzdaten
Adobe Photoshop CS & Adobe Illustrator CS (Adobe Systems Inc.)	Bildbearbeitungen und Erstellen von Abbildungen

2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die Laborchemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden bis auf die nachfolgend angegebenen Ausnahmen bei den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), Serva (Heidelberg) und Merck (Darmstadt) erworben. Weitere Chemikalien und Materialien:

Bacto® Trypton	Becton, Dickinson & Company, Sparks, USA
Bacto® BBL Yeast-Extract	Becton, Dickinson & Company, Sparks, USA
BES (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure)	Calbiochem, La Jole, USA
Biogel® P10	Bio-Rad, München
DNA-Größenmarker Gene Ruler® 1 kbp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Fluoromount-G®	SouthernBiotech, Birmingham, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Karlsruhe
Granuliertes Agar-Agar	Becton, Dickinson & Company, Sparks, USA
Glutathion-Sepharose-*beads*	Pharmacia Biotech, Freiburg
Nitrocellulose-Transfermembran BA-85	Schleicher & Schüll, Dassel
Lipofectamine Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Nylon-Blotting-Membran Hybond®-N	Amersham Biosciences, Freiburg
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Photochemikalien	AGFA, München
^{32}Phosphor-dCTP	Amersham Biosciences, Freiburg
Protein-Größenmarker Full Range Rainbow® protein molecular weight marker	Amersham Biosciences, Freiburg
Rinderserumalbumin (10xBSA)	New England Biolabs, Frankfurt/M.
Zellkulturmedium DMEM	Gibco BRL, Karlsruhe

2.4 Kits und Enzyme

CIP (alkalische Phosphatase)	New England Biolabs, Frankfurt/M.
DNA-Polymerase Pfu Turbo	Stratgene, La Jolla, USA
Expand High Fidelity PCR-System	Roche, Mannheim
Gel Extraction Kit QIAquick	QIAGEN, Hilden
HighPrime®	Roche, Mannheim
Plasmid Midi & Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt/M.
Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrates	Pierce, Rockford, USA
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt/M.
TNT® Coupled Reticulocyte Lysate	Promega, Madison, USA

2.5 Lösungen, Medien und Puffer

Sämtliche Lösungen und Puffer, bis auf die angegebenen Ausnahmen, wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Lösungen für die Zellkultur und Bakterienkulturen wurden durch Autoklavierung (20' bei 121°C/2 Bar) sterilisiert. Nicht hitzestabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Die Lösungen sind alphabetisch aufgeführt:

Ampicillin Stock-Lösung	100 mg/ml	Ampicillin
APS-Stocklösung	10 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
2x BBS pH 6,87-6,91	50 mM 280 mM 1,5 mM	BES (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure) NaCl Na_2HPO_4 x $2H_2O$ NaOH zur Titration
Bindungspuffer für GST-pull-down assay	25 mM 50 mM 10 mM 1 mM 2 % (v/v) 0,01 % (v/v) 12,5 µg/ml 0,1 mM	HEPES/KOH pH 7,5 NaCl $MgCl_2$ DTT Glycerin Nonidet P-40 BSA PMSF (vor Gebrauch zugegeben)
$CaCl_2$-Lösung	220 und 250 mM	Calciumchlorid
Coomassie-Färbelösung für Proteingele	40 % (v/v) 7 % (v/v) 0,2 % (w/v)	Methanol 100 % Essigsäure Coomassie Brillant-Blau R250
10x DNA-Ladepuffer	25 % (w/v) 10 mM 0,25 % (w/v) 0,25 % (w/v) 0,25 % (w/v)	Ficoll Typ 400 EDTA Bromphenolblau Xylen Cyanol (optional) Orange G (optional)
DTT-Stocklösung	1 M	Dithiothreitol
EDTA pH 8,0	0,5 M	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 10 N NaOH zur Titration
Entfärbelösung für Proteingele	20 % (v/v) 7 % (v/v)	Methanol 100 % Essigsäure
70% Ethanol	70 % (v/v)	Ethanol
Freeze-Squeeze-Puffer	0,3 M 1 mM	Natriumacetat pH 7,0 EDTA
HEPES/KOH pH 7,5	1 M	HEPES 5 N KOH zur Titration
Hybridisierungslösung für Southern Blot	45 % (v/v) 1 mM 250 mM 125 mM 5 % (w/v)	Formamid EDTA/NaOH pH 8,0 NaCl Phosphatpuffer 7,2 SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
IPTG-Lösung	0,1 M	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB-Medium	1 % (w/v) 0,5 % (w/v) 1 % (w/v)	Bacto® Trypton Bacto® BBL Yeast Extract NaCl

LB-Medium mit Ampicillin	100 µg/ml	Ampicillin in LB-Medium
LB-Medium-Platten + Ampicillin	1,5 % (w/v) 100 µg/ml	Agar in LB-Medium Ampicillin
Lysepuffer French® Press für GST-Fusionsproteine	50 mM 300 mM 1 mM	Phosphatpuffer pH 7,8 NaCl PMSF
Lysepuffer für Hirt-Extraktion	10 mM 1 mM 1 % (w/v) 50 µg/ml	Tris/HCl pH 8,0 EDTA SDS Proteinase K
Lysozym-Lösung	10 mg/ml	Lysozym (frisch angesetzt)
Milch für Western Blots (*blocking*)	6 % (w/v)	Milchpulver in 1xPBS
Milch für Western Blots (Antikörper)	6 % (w/v) 0,3 % (w/v)	Milchpulver Tween® 20 in 1xPBS
Natriumsalicylatlösung	1 M	Natriumsalicylat
1x PBS pH 7,4 (Phophate buffered saline)	8 mM 2 mM 150 mM	Na_2HPO_4 x $2H_20$ NaH_2PO_4 x H_2O NaCl
10x PBS ph7,4	80 mM 20 mM 1,5 M	Na_2HPO_4 x $2H_20$ NaH_2PO_4 x H_2O NaCl
PBS-T	0,1 % (w/v)	Tween® 20 in 1x PBS
0,5 M Phosphatpuffer pH 7,2 und pH 7,8	0,5 M 0,5 M	Na_2HPO_4 x 2 H_2O NaH_2PO_4 x H_2O zur Titration
PMSF-Lösung	0,1 M	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in Iso-Propanol
Protein-Transferpuffer pH 8,0	25 mM 192 mM 20 (v/v)	Tris Glycin Methanol
RNase A-Lösung	20 mg/ml	RNase A
Sammelgelpuffer pH 6,8 (für SDS-PAGE nach Lämmli)	0,75 M 0,4 % (w/v)	Tris/HCl pH 6,8 SDS
SOB-Medium	2 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,05 % (w/v)	Bacto® Tryptone Bacto® BBL Yeast Extract NaCl
SOC-Medium	20 mM	Glukose in SOB-Medium
1x SDS-Laufpuffer für Proteingele	50 mM 0,38 M 0,1 % (w/v)	Tris Glycin SDS
5x SDS-Laufpuffer	0,25 M 1,9 M 0,5 % (w/v)	Tris Glycin SDS
2x SDS-Proteinprobenpuffer	0,1 M 2 mM 20 % (v/v) 4 % (w/v) 10 % (w/v) 0,02 % (w/v)	Tris/HCl pH 7,5 EDTA Glycerin SDS 2-Mercaptoethanol Bromphenolblau

20x SSC pH 7,0	3 M 0,3 M	NaCl Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
STET-Puffer (*sodium chloride*, Tris, EDTA, Triton-*buffer*)	8 % (w/v) 5 % (v/v) 50 mM 10 mM	Saccharose Triton X-100 EDTA pH 8,0 Tris/HCl pH 8,0 10 N NaOH zur Titration
1x TAE-Puffer pH 8,5 (Tris-Acetate-EDTA-Puffer)	40 mM 1 mM 0,114 % (v/v)	Tris EDTA 100 % Essigsäure
50x TAE-Puffer pH 8,5	2 M 50 mM 5,71 % (v/v)	Tris EDTA 100 % Essigsäure
1x TE-Puffer pH 7,6 (Tris-EDTA-Puffer)	10 mM 1 mM	Tris/HCl pH 7,6 EDTA
Trenngelpuffer pH 8,8 (für SDS-PAGE nach Kornberg)	1,5 M 0,4 % (w/v)	Tris/HCl pH 8,8 SDS
Trypsin/EDTA-Lösung	1 x	Trypsin/EDTA
Vollmedium für HeLa-Zellen	500 ml 10 % (v/v) 100 U/ml 100 µg/ml	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) fetales Kälberserum (FCS inaktiviert) Penicillin Streptomycin
Waschpuffer für GST-Fusionsporteine	50 mM 300 mM 1 % (v/v) 1 mM	Phosphatpuffer pH 7,8 NaCl Triton X-100 PMSF
Waschpuffer I für Southern Blot	10 % (v/v) 0,1 % (w/v)	20x SSC SDS
Waschpuffer II für Southern Blot	0,5 % (v/v) 0,1 %	20x SSC SDS

2.6 Antikörper

Primärantikörper:

ATCC HB-8180 (mouse anti-ICP8)	ATCC, Rockville, USA
Polyklonaler rabbit anti-Rep-Ak	Erh. von Jim P. Trempe; Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Ohio, Toledo
mouse anti-Rep 303.9	Labor AG Heilbronn – Wistuba et al., 1995
mouse anti-VP1, VP2, VP3	PROGEN, Heidelberg

Sekundärantikörper:

Fab goat anti-mouse (H+L) FITC	Dianova, Hamburg
IgG goat anti-rabbit Alexa Flour 594	Invitrogen, Karlsruhe
Fab/Fc goat anti-mouse IgG (H+L), Peroxidase-konjugiert	Dianova, Hamburg

2.7 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide, verwendet als PCR-Primer, Primer für QuikChange®-Mutationen und für Oligo-Klonierungen, wurden bei der Firma MWG Biotech/Eurofins MWG Operon, Ebersberg, bestellt. Nicht-homologe Sequenzen und veränderte Basenpaare sind unterstrichen.

Name	**Sequenz (5'-3')**	**Verwendung**
EcoRI_for	AAAGACAGTTGACTGTATCGC	Primer I zur PCR-Klonierung von pBS-M1/243 und pBS-M1/369
243_rev	TATATCTAGATTAGATCCACT GCTTCTCCGAGGT	Primer II zur PCR-Klonierung von pBS-M1/243 aus pGBT-M1/243 – Einführung Stop-Codon & XbaI-*site* am 3'-Terminus
369_rev	TATATCTAGATTAGTCGACAC AGTCGTTGAAGGG	Primer I zur PCR-Klonierung von pBS- pBS-M1/369 aus pGBT-M1/369 – Einf. Stop-Codon & XbaI-*site* am 3'-Terminus
R107A_for	GGTGAAATCAATGGTTTTGGG AGCTTTCCTGAGTCAGATTC	Primer I zur PCR-Mutagenese von pBSRep78R107A aus pBS-Rep78
R107A_rev	GAATCTGACTCAGGAAAGCTC CCAAAACCATTGATTTCACC	Primer II zur PCR-Mutagenese von pBSRep78R107A aus pBS-Rep78
K136A_for	CTGGTTCGCGGTCACAGCGAC CAGAAATGGC	Primer I zur PCR-Mutagenese von pBSRep78K136A aus pBS-Rep78
K136A_rev	CCTCCGGCGCCATTTGCGGTC TTTGTGACC	Primer II zur PCR-Mutagenese von pBSRep78K136A aus pBS-Rep78
R138A_for	GGTCACAAAGACCGCAAATG GCGCCGGAGG	Primer I zur PCR-Mutagenese von pBSRep78R138A aus pBS-Rep78
R138A_rev	CCTCCGGCGCCATTTGCGGTC TTTGTGACC	Primer II zur PCR-Mutagenese von pBSRep78R138A aus pBS-Rep78
PGK_1	AATTCGATATCTCGAGATCTG CTAGCGGCCGCG	Oligonukleotid I zur Oligo-Klonierung von pPGK – Erweiterung der *multiple cloning site* in pPGK.LHA-SceI unter Entf. des vorher. Inserts
PGK_2	GATCCGCGGCCGCTAGCAGAT CTCGAGATATCG	Oligonukleotid II zur Oligo-Klonierung von pPGK

2.8 Plasmide

Die folgenden Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet:

Name	**Beschreibung**	**Herkunft – Referenz**
pBluescript II KS(+)	Leervektor für Klonierungen – T7/T3-Promotor	Stratagene, La Jolla, USA
pBS-Rep78	AAV-Rep78-Wildtyp unter T7-Promotor-Kontrolle	Labor AG Heilbronn – Weger et al., 1999
pBS-Rep52	AAV-Rep52-Wildtyp unter T7-Promotor-Kontrolle	Labor AG Heilbronn – Weger et al. 1999
pBS-M1/481	Rep78-Deletionsmutante (Δ482-621) unter T7-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pKEXStop482 (Labor AG Heilbronn – Hörer et al., 1995)
pBS-M1/369	Rep78-Deletionsmutante (Δ370-621) unter T7-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pGBT-M1/369 (Labor AG Heilbronn – Weger et al., 2002)

pBS-M1/243	Rep78-Deletionsmutante (Δ244-621) unter T7-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pGBT-M1/243 (Labor AG Heilbronn – Weger et al., 2002)
pBS-MET172	Rep78-Deletionsmutante (Δ1-171) unter T7-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pM172 (Labor AG Heilbronn – Kleinschmidt et al., 1995)
pBS-Rep78R107A	Rep78-Punktmutante (R107A) unter T7-Promotor-Kontrolle	PCR-Mutagenese (QuikChange) von pBS-Rep78
pBS-Rep78K136A	Rep78-Punktmutante (K136A) unter T7-Promotor-Kontrolle	PCR-Mutagenese (QuikChange) von pBS-Rep78
pBS-Rep78R138A	Rep78-Punktmutante (R138A) unter T7-Promotor-Kontrolle	PCR-Mutagenese (QuikChange) von pBS-Rep78
pBS-Rep78 R107A/K136A	Rep78-Doppelmutante (R107A & K136A) unter T7-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pBS-Rep78R107A und pBS-Rep78K136A
pBS-Rep78 R107A/R138A	Rep78-Doppelmutante (R107A & R138A) unter T7-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pBS-Rep78R107A und pBS-Rep78R138A
pBS-Rep78K340H	Rep78-Punktmutante (K340H) unter T7-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pKEXK340H (Labor AG Heilbronn – Hörer et al., 1995)
pBS-Rep.NLS	Rep-Fusionsprotein: Rep-N-Terminus (Aa. 1-244) + Kernlokalisationssignal (NLS) + *myc*-Tag unter T7-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pcDNA.Rep.NLS (erh. von Prof. T. Cathomen – Cathomen et al., 2000)
pBS-Rep.LZ	Rep-Fusionsprotein: Rep-N-Terminus (Aa. 1-244) + Dimerisierungsdomäne + NLS + *myc*-Tag unter T7-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pcDNA.Rep.LZ (erh. von Prof. T. Cathomen – Cathomen et al., 2000)
pBS-Rep.TZ	Rep-Fusionsprotein: Rep-N-Terminus (Aa. 1-244) + Tetramerisierungsdomäne + NLS + *myc*-Tag unter T7-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pcDNA.Rep.TZ (erh. von Prof. T. Cathomen – Cathomen et al., 2000)
pTAV2-0	AAV2-Wildtyp-Genom	Labor AG Heilbronn – Heilbronn et al., 1990
pTAV-Rep78	Rep78-Wildtyp-exprimierendes AAV2-Genom	kloniert aus: pTAV2-0 und pBS-Rep78
pTAV-Rep78R107A	Rep78R107A-exprimierendes AAV2-Genom	kloniert aus: pTAV2-0 und pBS-Rep78R107A
pTAV-Rep78K136A	Rep78K136A-exprimierendes AAV2-Genom	kloniert aus: pTAV2-0 und pBS-Rep78 K136A
pTAV-Rep78R138A	Rep78R138A-exprimierendes AAV2-Genom	kloniert aus: pTAV2-0 und pBS-Rep78 R138A
pTAV-Rep78 R107A/K136A	Rep78R107A/K136A-exprimierendes AAV2-Genom	kloniert aus: pTAV2-0 und pBS-Rep78 R107A/K136A
pTAV-Rep78 R107A/R138A	Rep78R107A/ R138A-exprimierendes AAV2-Genom	kloniert aus: pTAV2-0 und pBS-Rep78R107A/R138A
pTAV-Rep78K340H	Rep78K340H-exprimierendes AAV2-Genom	kloniert aus: pTAV2-0 und pBS-Rep78K340H
pPGK	Leervektor mit modifizierter *multiple cloning site* und PKG-Promotor	kloniert aus: pPGK.LHA-SceI (erh. von Prof. T.Cathomen – Alwin et al., 2005)
pPGK-Rep78	Rep78-Wildtyp unter PGK-Promotor-Kontrolle	kloniert: aus pPGK und pBS-Rep78
pPGK-Rep78R107A	Rep78-Punktmutante (R107A) unter PGK-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pPGK und pBS-Rep78R107A
pPGK-Rep78K136A	Rep78-Punktmutante (K136A) unter PGK-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pPGK und pBS-Rep78K136A

pPGK-Rep78R138A	Rep78-Punktmutante (R138A) unter PGK-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pPGK und pBS-Rep78R138A
pPGK-Rep78 R107A/K136A	Rep78-Doppelmutante (R107A & K136A) unter PGK-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pPGK und pBS-Rep78R107A/K136A
pPGK-Rep78 R107A/R138A	Rep78-Doppelmutante (R107A & R138A) unter PGK-Promotor-Kontrolle	kloniert aus: pPGK und pBS-Rep78R107A/R138A
pPGK-Rep78K340H	Rep78-Punktmutante (K340H) unter PGK-Promotor-Kontrolle	kloniert: aus pPGK und pBS-Rep78K340H
pTR-UF5	Rekombinates AAV-Genom – GFP-Gen & CMV-Promotor flankiert v. AAV-ITRs	Labor AG Heilbronn – Klein et al., 1998
pSub201(+)	AAV2-Genom mit modifizierten ITRs	Labor AG Heilbronn – Samulski et al., 1987
pEGFP-C1	*green fluorescent protein* (GFP) unter CMV-Promotor-Kontrolle	BD Biosciences Clonetech, Heidelberg
pCM-UL5	HSV-Helikase UL5 unter CMV-Promotor-Kontrolle	Labor AG Heilbronn – Heilbronn et al., 1989
pCM-UL8	HSV-UL8 unter CMV-Promotor-Kontrolle	Labor AG Heilbronn – Heilbronn et al., 1989
pCM-UL29	HSV-UL29 (ICP8) unter CMV-Promotor-Kontrolle	Labor AG Heilbronn – Heilbronn et al., 1989
pCM-UL52	HSV-Primase UL52 unter CMV-Promotor-Kontrolle	Labor AG Heilbronn – Heilbronn et al., 1989
pGEX-ICP8	Fusionsprotein GST-ICP8 (HSV-UL29) unter IPTG-induzierbarem tac-Promotor	Labor AG Heilbronn – Heilbronn et al., 2003
pGEX-ICP8ΔC	Fusionsprotein GST-ICP8ΔC (ICP8-Deletionsmutante (Δ1123-1196)) unter IPTG-induzierbarem tac-Promotor	Labor AG Heilbronn

2.9 Bakterienstämme, Zelllinien, Viren

Die folgenden *Escherichia coli*-Stämme wurden zur Plasmidtransfektion, Plasmidamplifikation und Proteinexpression verwendet:

Name	**Genotyp**	**Herkunft**
E.coli HB101	supE44 ara14 galK2 lacY1 Δ(gpt-proA)62 rpsL20 (Str^r) xyl-5 mtl-1 recA13 Δ(mcrC-mar) $HsdS^-(r^-m^-)$	Labor AG Heilbronn
E.coli BL21	B F- dcm ompT hsdS(r_B^- m_B^-) gal	Stratagene, La Jolla, USA
E.coli SURE	endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14- Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[$proAB^+$ $lacI^q$ lacZΔM15 Tn10]	Stratagene, La Jolla, USA
E.coli XL1-Blue Super competent cells	RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB $lacI^qZ$ΔM15Tn10(Te t^r)]	Stratagene, La Jolla, USA

Für die Zellkultur wurde die humane Cervixcarcinomzellinie **HeLa KB** (Labor AG Heilbronn) verwendet. Für Infektionen wurde **Adenovirus Typ 2** (Labor AG Heilbronn) genutzt.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Bei der Transformation kompetenter Zellen wurde (Plasmid-)DNA in unterschiedliche Stämme des Bakteriums Escherichia coli (E.coli) eingebracht. Für unkomplizierte Klonierungen und Amplifikationen wurde der Stamm HB101 benutzt. DNA, die hairpin-Strukturen wie z.B. die *inverted terminal repeats* von AAV enthielt, wurde im Rekombinase-negativen Stamm E.coli *Sure* prozessiert. Mittels QuikChange®-PCR amplifizierte DNA wurde in XL1-Blue-Zellen transformiert, da diese in der Lage sind, die nach der Amplifikation in den Plasmiden enthaltenen Einzelstrangbrüche zu ligieren. Zur Expression von Proteinen wurde E.coli BL21 verwendet. Zur Transformation wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen ca. 15' auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 µl der Bakteriensuspension mit einem Ligationsansatz (12 bis 16 µl) oder einer geringen Menge (0,5 bis 2 µl) reiner, konzentrierter DNA gemischt und für 20 bis 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 sec bei 42°C und dem Abkühlen auf Eis für weitere 2 min zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurden der Suspension 200 bis 300 µl vorgewärmtes Bakterienmedium ohne Antibiotikum (LB bzw. SOB/SOC nach QuikChange®-Mutation) hinzugefügt und der gesamte Ansatz für 15 bis 45 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Wenn ausreichende Mengen (ca. 1 µg) gereinigter DNA vorhanden waren und auf eine hohe Transfektionseffizienz verzichtet werden konnte, wurde eine Schnelltransformation durchgeführt. Dabei wurde die DNA mit den aufgetauten kompetenten Zellen vermischt, die Suspension für zwei bis 20 min auf Eis inkubiert und anschließend direkt weiterverarbeitet.

3.1.2 Selektion, Ausplattieren und Kultivierung von Bakterien

Die o.g. primäre Inkubation in antibiotikafreiem Medium diente zur Expression des auf dem Plasmid enthaltenen Resistenzgens. Die folgende Kultivierung der Bakterien wurde in Medien durchgeführt, die das entsprechende Antibiotikum (üblicherweise Ampicillin) enthielten, um eine Selektion der transformierten Zellen zu erreichen und das Wachstum nicht transformierter und evtl. kontaminierender Bakterien verhindern. Bei Klonierungen wurde zur Vereinzelung der Bakterien und Gewinnung einzelner DNA-Klone der Transformationsansatz auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Der 300 µl-Ansatz wurde mit Hilfe eines

Drigalski-Spatels auf den Agar-Platten ausgestrichen. Anschließend wurden die Petrischalen über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Amplifikation der DNA in Mini-, Midi- oder Maxipräparationen wurden entsprechende Volumina sterilen LB/Ampicillin-Mediums mit einer Bakterienkolonie der Agar-Platte angeimpft und unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Midi- und Maxi-Prep-Kulturen wurden zum Teil auch direkt mit einem Transformationsansatz oder einer vorherigen Mini-Prep-Kultur überimpft.

3.1.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA nach der Lysozym-Methode

Mini-Prep-Kulturen dienten der Präparation von DNA im kleinen, analytischen Maßstab, um zu untersuchen, ob Kolonien auf einer Agar-Platte das richtige Klonierungsprodukt, einen „positiven Klon“ enthielten. Dazu wurden 3 ml LB/Amp-Kulturen mit je einer Kolonie angeimpft und über Nacht inkubiert. Es wurden immer 6 oder 12 Kolonien bzw. Klone parallel analysiert. Jeweils 1 ml der Übernacht-Kultur wurde in ein Eppendorf-*tube* überführt, die Bakterien durch Zentrifugation von 5 min bei 20800 g und 4°C pelletiert und nach Abgießen des Überstandes in 150 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 12 µl Lysozym wurden die Bakterienzellen durch Erhitzen (60 Sek. bei 90°C) lysiert und anschließend 10 min bei 20800 g und 4°C erneut zentrifugiert. Der pelletierte Zelldetritus wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze entfernt und die in der Lösung enthaltene DNA und RNA durch Zugabe von 150 µl Iso-Propanol und eine 20 minütige Inkubation auf Eis gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert (10 min bei 20800 g und 4°C), in 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 30 µl bzw. 50 µl 1xTE-Puffer aufgenommen.

Die gewonnene DNA wurde mit den in der Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen verdaut und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Der DNA-Ladepuffer war mit RNase A versetzt, um die RNA zu entfernen und damit die Beurteilung der DNA, insbesondere kleinerer Fragmente zu erleichtern. Wenn ein Klon das gewünschte Klonierungsprodukt enthielt, wurden entweder 10 µl der entsprechenden Mini-Prep-DNA schnelltransformiert und damit eine 100 ml (bzw. 250 ml) LB/Amp-Kultur überimpft oder 100 µl der Mini-Prep-Kultur direkt in die große Kultur überführt und dann über Nacht bei 37°C inkubiert..

2.1.4 Midi- und Maxi-Präparationen von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden das Plasmid Midi Kit (100 ml Kultur) bzw. das Plasmid Maxi Kit (250 ml Kultur) von QIAGEN® benutzt. Das QIAGEN®-Protokoll, das leicht abgewandelte durchgeführt wurde, beinhaltet als wichtigste Komponente die Isolierung und Reinigung der DNA über Anionen-Austauscher-Säulen. Die Übernachtkultur wurde abzentrifugiert, das Bakterienpellet in Puffer P1 resuspendiert und zur Zelllyse mit den Puffern P2 und P3 versetzt. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis wurde die Suspension für 10 min bei ca. 15000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand durch ein Filterpapier auf die mit Puffer QBT equilibrierte Säule gegeben. Nach dem Abtropfen der Flüssigkeit wurde die in der Säulenmatrix gebundene DNA zweimal mit Puffer QC gewaschen und anschließend mit Puffer QF eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens Iso-Propanol und Inkubation für 20 min auf Eis gefällt, abzentrifugiert (10 min bei 15000 g und 4°C), in 70%igem Ethanol gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und dem Abgießen des Überstandes an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl 1xTE gelöst, in ein Eppendorf-*tube* überführt und die DNA-Lösung nach photometrischer Konzentrationsbestimmung auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl verdünnt.

3.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte im Spektralphotometer. Dabei wurde die Absorption (optische Dichte = OD) der nukleinsäurehaltigen Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette von 1 cm Dicke mit 1:50 (in 1xTE) vorverdünnten Proben. Vor der Messung der Proben wurde mit 1xTE der Vergleichs- bzw. Leerwert (*blank*) bestimmt. Da eine (1) OD_{260nm} einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger (ds) DNA entspricht, wurde die Nukleinsäurekonzentration der Ausgangslösung folgendermaßen berechnet:

DNA-Konzentration (µg/ml) = OD_{260nm} x Verdünnungsfaktor (= 50) x Faktor [dsDNA (= 50)]

Neben der OD_{260nm} wurde parallel die Extinktion bei 280 nm bestimmt, da man aus dem Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA-Lösung ziehen kann. Ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 ist dabei ideal.

3.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen diente der anschließenden Rekombination der resultierenden DNA-Fragmente (Klonierung) sowie der Analyse der neuen DNA-Konstrukte. Restriktionsendonukleasen sind ursprünglich aus Bakterien gewonnene Enzyme, die spezielle palindromische DNA-Sequenzen „erkennen“ und an den entsprechenden Stellen schneiden. Je nach Enzym wird die DNA so getrennt, dass entweder ein 5’- oder ein 3’-Überhang mehrerer (häufig 3 bis 4) Basen oder aber eine Ende ohne Überhang (*blunt end*) entsteht. Es wurden rekombinant produzierte Endonukleasen von *New England Biolabs* mit den Standard-Reaktionspuffern des Herstellers verwendet. Für einen Standardansatz wurden 0,5 bis 1 µg DNA mit 5 bis 10 Units des Restriktionsenzyms und 1/10 Volumen des 10x-Reaktionspuffers versetzt und mit ddH2O zum gewünschten Gesamtvolumen (meist 10 bis 15 µl) aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei der für das jeweilige Enzym angegebenen Temperatur, in der Regel 37 °C, für mindestens 1 h inkubiert. Nach der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese wurde das Restriktionsmuster beurteilt und ein oder mehrere Fragmente isoliert. Der Restriktionsverdau mit zwei Endonukleasen (Doppelverdau) wurde bei übereinstimmenden Puffer- und Inkubationsbedingungen in einem Ansatz durchgeführt. Bei stark abweichenden Reaktionsbedingungen wurde in einem sequentiellen Verdau die DNA nacheinander mit den Enzymen inkubiert. Dazu wurden entweder die Pufferbedingungen angepasst oder die DNA nach der ersten Endonuklease-Reaktion per Phenol-Chloroform-Extraktion oder Gelextraktion gereinigt und mit dem zweiten Reaktionsansatz inkubiert.

3.1.7 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung von DNA

Die Reinigung von DNA, insbesondere zur Entfernung von Proteinen, wurde mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Sie wurde beim sequentiellen Verdau und zur Aufreinigung von PCR-Produkten angewandt. Die DNA-Lösung wurde dazu 1:1 mit einem Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) versetzt und gemischt (Vortex). Anschließend wurde die Lösung kurz zentrifugiert, um eine schnellere Trennung der entstehenden Phasen zu erreichen. Die wässrige Oberphase wurde abpipettiert, in ein neues *tube* überführt und die darin enthaltene DNA mit 100 % Ethanol gefällt. Durch die Ethanolfällung konnte die DNA konzentriert und gleichzeitig von z.B. Salzen gereinigt werden. Die Proben wurden hierzu mit 1/10 Volumen 3 M NaAcetat (pH 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen 100 % Ethanol versetzt. Die DNA wurde für 10 min bei –80°C bzw. 20 min bei –20°C gefällt und

anschließend abzentrigugiert (10 min bei 4°C und 20800 g). Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifuiert und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 1xTE aufgenommen.

3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese bewegt sich die DNA aufgrund einer angelegten Spannung durch die Poren einer Agarose-Matrix und wird dabei nach ihrer Größe, Konfiguration und Ladung getrennt. Dadurch können DNA bzw. DNA-Fragmente zur anschließenden Darstellung und Beurteilung sowie zur Weiterverarbeitung aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden damit nach dem Restriktionsverdau von Plasmiden dessen Muster bewertet und bestimmte Fragmente isoliert, PCR-Produkte überprüft und von Nebenprodukten sowie Primern und Nukleotiden getrennt und die Replikationsprodukte viraler DNA dargestellt. Je nach Größe der DNA wurden Gele mit Agarosekonzentrationen zwischen 0,7 % (w/v) für sehr hochmolekulare und 2 % (w/v) für kleine DNA-Fragmente benutzt. Für DNA-Größen zwischen 500 bp und 8000 bp wurden vorwiegend Gele mit einem Agarose-Puffer-Verhälntnis von 1 % (w/v) verwendet . Zur Vorbereitung wurde die Agarose in 1xTAE-Puffer aufgekocht und gelöst, in eine Elektrophoresekammer gegossen und zur Aussparung der Taschen mit einem Kamm versehen. Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die Elektrophoresekammer mit 1xTAE-Puffer gefüllt bis das Gel leicht bedeckt war. Die Proben wurden in die ausgesparten Taschen pipettiert und je nach Größe und Konzentration des Gels für 1 h bis 2h eine Spannung von 70 V bis 140 V angelegt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10-Volumen 10x DNA-Ladepuffer versetzt. Der Ladepuffer erhöht die Dichte der DNA-Lösung, was beim Füllen der Taschen eine Diffusion der Proben in den Laufpuffer verhindert und enthält einen oder mehrere Farbstoffe, an denen der Eletrophorese-Fortschritt abgeschätzt werden kann. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Größenstandard aufgetragen, mit dessen Hilfe die Größe der Banden bestimmt werden konnte. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 30 min in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt und anschließend für 15 min in ddH2O entfärbt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit DNA interkaliert, wodurch diese in kurzwelligem UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht, beurteilt und dokumentiert werden konnte. Gelstücke mit zu gewinnenden DNA-Fragmenten wurden zum Schutz der DNA unter langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und die DNA anschließend extrahiert.

3.1.9 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen nach der FreezeSquezze-Methode

Zur Extraktion der DNA aus einem Gelstückchen wurde dieses zunächst für 30 min in 1 ml Freeze-Squeeze-Puffer äquilibriert und dann in ein kleines (0,5 ml) Eppendorf-*tube* überführt. Dessen Boden wurde vorher mit einer heißen Nadel perforiert und das entstandene Loch mit Glaswolle gestopft. Das präparierte *tube* mit dem Gelstück wurde in ein 1,5 ml tube gesetzt und über Nacht, mindestens aber für 1 h bei –80°C eingefroren, um die Gelmatrix zu zerstören. Während des Auftauens wurde das Gelstück zentrifugiert (15 min bei 666 g und Raumtemperatur) und die Flüssigkeit im unteren *tube* aufgefangen, während die Gelreste durch die als Filter fungierende Glaswolle zurückgehalten wurden. Die im Zentrifugat enthaltene DNA wurde mit 100 % Ethanol gefällt, gewaschen und getrocknet und das Pellet in 30 µl 1xTE gelöst.

3.1.10 DNA-Gelextraktion mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit

Für manche Gelextraktionen, insbesondere vor schwierigen *blunt-end*-Ligationen wurde das QIAquick®-Protokoll von QIAGEN® benutzt. Es beruht auf der Verwendung kleiner Chromatographiesäulen, in denen die DNA an eine Silica-Membran gebunden wird. Die Puffer wurden durch Zentrifugation in einer Micro-Zentrifuge entfernt. Den Anweisungen des Herstellers folgend wurde das Gelstückchen bei 50°C in Puffer QG gelöst, mit Iso-Propanol versetzt und auf die Säule gegeben. Nach Bindung der DNA und Entfernen des Puffers wurde die Säule mit Puffer QG und Puffer PE gewaschen, durch erneute Zentrifugation getrocknet und die DNA schließlich in 30 µl Puffer EB eluiert. Die eluierte DNA wurde direkt weiterverarbeitet.

3.1.11 Amplifikation und Modifikation von DNA durch PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) beruht auf der *in-vitro*-Synthese von DNA, bei der mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase und Primern gezielt DNA-Segmente eines *templates* amplifiziert und modifiziert werden können. Die Spezifität der PCR, die Länge des PCR-Produktes und die DNA-Modifikation wird durch das „Design“ des Primers bzw. die Wahl seiner Nukleotidsequenz bestimmt. In dieser Arbeit wurde die PCR hauptsächlich genutzt, um deren Amplifikationsprodukte in nachfolgenden Klonierungen zu verwenden. Bei der Wahl der Primer wurde darauf geachtet, dass die ca. 20 Nukleotide umfassende, zum *template* vollständig homologe Sequenz einen G/C-Gehalt von 50-60 % aufwies und die später in

der Klonierung verwendete Restriktionsschnittstelle mit einbezog bzw. *upstream* von ihr lag. Um die Modifikation eines DNA-Endes zu erreichen, z.B. zum Einführen eines Stop-Codons und einer zusätzlichen Restriktionsschnittstelle, wurden die Primer so gewählt, dass der nicht homologe, ca. 12-14 bp lange DNA-Abschnitt mit der modifizierenden Sequenz einer 18 bis 25 Nukleotide langen, zum Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts homologen Sequenz folgte. Durch die Homologiesequenz am 3'-Ende des Primers wurde die Bindung des Oligonukleotids gewährleistet. Der nicht-homologe Abschnitt war durch die Abhängigkeit des Amplifikationsprozesses vom Primer und die daran erfolgende Initiation der DNA-Synthse im späteren PCR-Produkt enthalten. Der PCR-Ansatz aus *template*-DNA, Primern, Desoxynukleotiden, Enzymen und Puffer wurde wie unten angegeben gemischt und die DNA in einer PCR-Maschine amplifiziert. Dabei wurde der Reaktionsansatz mehreren Temperaturzyklen ausgesetzt, bei denen abwechselnd die Denaturierung der DNA, das *annealing*, also Anlagern der Primer und die Elongation der DNA bei verschiedenen Temperatur erfolgte (s.u.). Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und anschließend aus dem Gel isoliert. Nach Restriktionsverdau und Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanolfällung wurde das Fragment in einen Vektor kloniert.

Standard-PCR-Reaktionsansatz

10 µl	Template-DNA (1 ng/µl)	= 10 ng
1,5 µl	Primer I (10 pmol/µl)	= 15 pmol
1,5 µl	Primer II (10 pmol/µl)	= 15 pmol
1 µl	dNTP (10 mmol/l)	= 2,5 pmol je dATP, dCTP, dGTP, dTTP
5 µl	10x-Reaktionspuffer	
0,6 µl	Taq-Polymerase	
30,4 µl	ddH_2O	

Standard-PCR-Programm

94°C	3 min	initiale Denat.	
94°C	30 sec	Denaturierung	
42°C	30 sec	Annealing	→ 26 Zyklen
72°C	90 sec	Elongation	
72°C	7 min	finale Elongation	
4°C	∞		

3.1.12 Einführen von Punktmutationen durch QuikChange® site-directed mutagenesis

Zum Einführen von Punktmutationen in Plasmid-DNA durch PCR-Mutagenese wurde das QuikChange®-Protokoll genutzt. Die verwendeten Primer waren dabei zueinander vollständig und zur *template*-DNA weitgehend komplementär. Der in der Mitte der Primer gelegene, in der Regel zwei Basen umfassenden Nukleotidausstausch war durch jeweils ca. 15 bis 20 bp lange, homologe Sequenzen flankiert. Durch die Homologiesequenzen wurde trotz des *mismatch* zur *template*-DNA die effektive DNA-Synthese gewährleistet. In der PCR wurde das gesamte Plasmid reamplifiziert, das dann im Bereich der Primer die gewünschte Mutation trug. Um die

nicht mutierte Ausgangs-DNA zu entfernen wurde dem Ansatz anschließend das Restriktionsenzyms DpnI zugesetzt. Durch den DpnI-Verdau wurde nur die methylierte, in Bakterien amplifizierte *template*-DNA geschnitten, während das nicht-methylierte PCR-Produkt erhalten blieb. Die Amplifikationsprodukte wurden in der Agarose-Gelelektrophorese überprüft, von den PCR-Nebenprodukten getrennt und extrahiert. Anschließend wurde die DNA in XL1-Blue *supercompetent cells* transformiert und ausplattiert. In diesen Bakterienzellen wurden die nach der PCR verbliebenen Einzelstrangbrüche ligiert.

3.1.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung neuer DNA-Konstrukte wurden die entweder durch Restriktionsverdau oder PCR gewonnenen DNA-Fragmente (*Insert*) in ein Vektorplasmid-Fragment kloniert. Die Vektorplasmide wurden dazu mit den selben Enzymen verdaut wie die *Inserts*. Zur Verhinderung der Re- bzw. Selbstligation wurde das Vektorfragment im Anschluss an den Restriktionsverdau mit alkalischer Phosphatase (CIP) versetzt (0,5 units/µg DNA) und durch Inkubation für 60 min bei 37°C dephosphoryliert. Im Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 12 µl wurden die überprüften und gereinigten Insert- und Vektorfragmente im Verhältnis von üblicherweise 3:1 mit 1/10 Volumen 10x-Ligationspuffer und 0,8 µl (320 units) T4-Ligase gemischt und bei Raumtemperatur für 3-4 h oder über Nacht bei 12°C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz in kompetente E.coli transformiert und ausplattiert.

3.1.14 Oligo-Klonierung

Um kleinere DNA-Abschnitte in ein Plasmid einzufügen wurde die Oligo-Klonierung benutzt. Dazu wurden synthetische, die gewünschte DNA-Sequenz enthaltende, komplementäre Oligonukleotide von 30 bis 40 Basen Länge hybridisiert und in einen Vektor kloniert. Die DNA-Sequenz wurde so gewählt, dass das Doppelstrang-Molekül nach dem *annealing* 3'- bzw. 5'-Überhänge enthielt, die mit denen des restriktionsverdauten Vektor-Plasmids komplementär waren. Je 100 pmol pro Oligonukleotid wurden in insgesamt 100 µl 150 mM NaCl für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend über 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Zur Ligation wurden 25 ng des Vektors mit 1 pmol des doppelsträngiges Oligonukleotids, 1/10 Volumen 10x-Ligationspuffer und 0,8 µl T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 12 µl für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert und der Ansatz anschließend in kompetente Zellen transformiert.

3.1.15 Sequenzierung

Zur Überprüfung von Plasmiden und eingeführten Mutationen wurde die DNA zur Sequenzierung eingeschickt. Je 10 µg DNA wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und versandt. Sämtliche Sequenzierungen wurden mit T7- bzw. T3- Standardprimern durchgeführt.

3.1.16 Southern Blot-Analyse

Der Southern Blot wurde genutzt, um mit Hilfe radioaktiv markierter DNA-Sonden spezifische DNA, in diesem Fall AAV-Wildtyp- und rAAV-Replikationsprodukte nachzuweisen. Die DNA wurde dazu mittels Hirt-Extraktion gewonnen. Zur Vorbereitung wurden 6 µg DNA pro Probe mit je 2 µl RNase A versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die folgende Gelelektrophorese wurde zur besseren Auftrennung der DNA über Nacht in einem 24 cm langen, 0,7 %igen Agarose-Gel bei 40 V durchgeführt. Anschließend wurde die DNA im Gel mit Ethidiumbromid markiert und das Bandenmuster dokumentiert. In einem HCl-Bad (10 min in einer 0,25 M HCl-Lösung) wurde die DNA depuriniert, um kürzere, später leichter zu transferierende DNA-Fragmente zu erhalten. Das Gel wurde in ddH_2O gewaschen und zur Denaturierung der DNA dreimal für 20 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl, und zur Neutralisation dreimal für 20 min in 0,5 M Tris-HCl/1,5 M NaCl geschwenkt. Nach erneutem Waschen des Gels in ddH_2O wurde der Kapillarblot aufgebaut. Dazu wurde eine Glasplatte auf den Rand einer mit Transferpuffer gefüllten Glasschale gelegt. Auf die Glasplatte wurden 2 Lagen in Puffer getränktes 3MM-Filterpapier gelegt, so dass die Enden in die gefüllte Glasschale reichten. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf den Filterpapieren platziert und darauf die passend zugeschnittene, in Puffer getränkte Nylonmembran sowie zwei weitere getränkte und zwei trockene Filterpapiere geschichtet. Es folgte eine ca. 10 cm Schicht von Papierhandtüchern, die abschließend mit einer weiteren Glasplatte stabilisiert und einem Gewicht beschwert wurde. Während der Inkubation über Nacht bildete sich über die in die Glasschale hineinreichenden Filterpapiere ein kapillarer Flüssigkeitsstrom vom Transferpufferreservoir, durch das Gel und die Nylonmembran bis in die saugfähigen Papierhandtücher aus. Die DNA wurde dabei vom Flüssigkeitsstrom zur Nylonmembran transportiert und daran aufgehalten und gebunden. Nach dem Abbau des Blots wurde die Membran kurz getrocknet und anschließend die DNA durch UV-Crosslinking auf der Membran fixiert. Die Sonden für die nachfolgende Hybridisierung wurden mit dem Roche® High Prime Kit hergestellt, bei dem mit Hilfe zufällig bindender Hexanuklotide (*random prime*) und Klenow-Polymerase an einer *template*-DNA komplementäre DNA-

Fragmente synthetisiert wurden. Neben dem Enzym, den Hexanukleotiden und dem Reaktionspuffer waren auch die Nukleotide dATP, dGTP und dTTP bereits im Kit enthalten. Nach dem Hinzufügen der DNA wurde die Reaktion durch die Zugabe von ^{32}P-dCTP initiiert und die synthetisierten Sonden radioaktiv markiert. Als *template* für die AAV-Wildtyp-Sonde diente ein 1590 bp langes HincII-Fragment aus dem AAV Cap-Gen des Plasmids pTAV 2-0. Für die Herstellung der rAAV-GFP Sonde wurde ein 732 bp langes, für GFP codierendes NotI-Fragment aus pTR-UF5 gewonnen. Zuerst wurden je 25 ng *template*-DNA in einem Gesamtvolumen von 11 µl durch Erhitzen von 5 min auf 95°C und Abkühlen auf Eis denaturiert. Anschließend wurden 4 µl High Prime-Lösung und 5 µl ^{32}P-dCTP hinzugegeben und der Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA und 28 µl 1xTE wurden die nicht eingebauten Nukleotide über eine Biogel® P10 –Säule entfernt. Zur Herstellung der Säule wurde in den Boden eines 0,5 ml Reaktions-*tubes* ein Loch gestochen, mit Glaswolle ausgestopft und das kleine *tube* anschließend in ein 1,5 ml *tube* gestellt. Auf den Glaswollepropf wurden 650 µl in 1x TE äquilibriertes Biogel® P10 pipettiert, die Säule durch Zentrifugation für 10 min bei 666 g gepackt und das 1,5 ml Eppendorf-*tube* durch eine neues ersetzt. Die radioaktive Probe wurde auf die vorbereitete Säule gegeben und für 15 min zentrifugiert, wodurch die synthetisierte Sonde im unteren *tube* gesammelt und von den im Biogel zurückgehaltenen nicht eingebauten Nukleotiden getrennt wurde. Zur Abschätzung der Aktivität der Sonde, der Wert sollte ca. 200 bis 1000 CPM betragen, wurde 1 µl des Eluates mit einem Kontaminationsmonitor ausgezählt. Die Sonde wurde daraufhin mit 500 µl Hybridisierungslösung für 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Membran wurde in einer Hybridisierungsröhre für 1 h bei 42°C mit Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Zur anschließenden Hybridisierung wurde die Lösung gewechselt, mit der Sonde versetzt und über Nacht bei 42°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Danach wurde der Blot viermal für 10 min bei 42°C mit Waschlösung I und zweimal für 30 min bei 55°C mit Waschlösung II gewaschen, um die nicht und unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Nach dem Trocknen auf Filterpapier wurde die Membran in Klarsichtfolie verpackt. Für die nachfolgende Autoradiographie wurde der Southern Blot in einer Expositionskassette für eine Dauer von 24 h bis 7 d mit einem Röntgenfilm exponiert. Nach Entwicklung der Filme konnte die DNA anhand der geschwärzten Banden nachgewiesen werden.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen bzw. Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) genutzt. Dabei wurden die Proteine nach der Fokussierung in einem niedrig konzentrierten PAA-Sammelgel in einem 10 bis 12 % Polyacrylamid enthaltenden Trenngel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurden zunächst je eine gereinigte Glas- und eine Aluminiumplatte von 10 x 8,5 cm, seitlich durch 1 mm Abstandhalter (*Spacer*) getrennt, in eine Gelgießapparatur eingespannt. Zuerst wurde das flüssige Trenngel bis zu ¾ der Gesamthöhe zwischen die Platten pipettiert und zum Glätten der Oberkante mit Iso-Propanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Iso-Propanol abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel bis zum Rand der Platten pipettiert. Mit einem Kamm wurden die Taschen zum Auftragen der Proben ausgespart. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde das vollständige PAA-Gel aus der Apparatur entfernt und bis zur Verwendung, in feuchte Tücher und Haushaltsfolie verpackt, im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Entfernung des Kamms wurde das Gel in eine Gelkammer eingespannt und die Pufferreservoirs mit 1x-SDS-Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden ein Protein-Größenmarker und die Proben in die ausgesparten Taschen pipettiert und ein Strom von 12 mA angelegt. Nach Übertritt der Proben vom Sammelgel in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 18 mA erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Lauffront der Proben den unteren Rand des Gels erreicht hatten. Für einen nachfolgenden autoradiographischen Nachweis ^{35}S-markierter Proteine wurden die Gele für 20 bis 30 min in einer 1 M Natriumsalicylat-Lösung gebadet, gewässert und anschließend auf 3MM-Filterpapier überführt und für 2 h bei 80°C auf einem Vakuum-Geltrockner getrocknet und fixiert. Für den Proteinnachweis mittels Western-Blot wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet.

3.2.2 Western Blot und Immundetektion

Der Western Blot mit nachfolgender Immundetektion diente zur Kontrolle der Expression der AAV-Rep- und Cap-Proteine und der Rep-Mutanten in den Zellkulturexperimenten. Zuerst wurden mit Hilfe des *Semi-Dry-Electroblotting*-Verfahrens die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurden pro Gel sechs 3MM-Filterpapiere und die Membran auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Zunächst wurden drei in 1x-

Proteintransferpuffer getränkte Filterpapiere auf die Unterseite einer Blotapparatur geschichtet. Darauf wurde die in Puffer äquilibrierte Membran gelegt, gefolgt von dem in Transferpuffer geschwenkten Trenngel. Abschließend wurden drei weitere getränkte Filterpapiere aufgelegt, die aus dem Stapel ausgetretene Flüssigkeit entfernt und der Deckel aufgesetzt. Die Proteine wurden bei 4°C mit 1 mA/cm^2 Gelfläche für 1,5 h geblottet. Die Unterseite der Apparatur fungierte dabei als Anode, der Deckel als Kathode. Anschließend wurde der gesamte Aufbau auseinandergenommen und die Banden des Proteingrößenmarkers auf der Membran mit einem Kugelschreiber nachgezogen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran über Nacht bei 4°C, mindestens jedoch für 1 h bei Raumtemperatur in einer 6 %igen Milchlösung geschwenkt. Für die Immundetektion wurde die Membran mit dem in Milchlösung verdünnten Primärantikörper, je nach Antikörper 1:1000 bis 1:10, in einer Folie eingeschweißt für 1 bis 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abgießen des Primärantikörpers wurde die Membran zur Entfernung ungebundener Antiköper dreimal für 5 bis 10 min in 1x PBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem in Milchlösung verdünnten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für weitere 1 bis 1,5 h. Der Sekundärantikörper war gegen die jeweilige Spezies des Primärantikörpers, z.B. als anti-Maus-Ak, gerichtet und Peroxidase gekoppelt. Zur Detektion wurde die Membran für 60 sek. mit einem Chemilumineszenz-Substrat, bestehend aus einem 1:1 Gemisch einer Peroxidase- und einer Enhancer-Lösung, inkubiert. Der Nachweis der gesuchten Proteine erfolgte durch die Reaktion des Chemolumineszenz-Substrates mit der an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase. Durch die Fluoreszenz wurde ein auf die Membran aufgelegter Röntgenfilm belichtet und anschließend entwickelt. Im Bereich der nachzuweisenden Proteinbanden war eine Schwärzung zu erkennen, deren Stärke auch mit der jeweiligen Proteinmenge korrelierte.

3.2.3 Synthese in E.coli und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen, in diesem Fall GST-ICP8 und GST-ICP8ΔC, wurden die zugehörigen Plasmide in den E.coli BL21-Stamm transformiert und ausplattiert. Mit einer Einzelkolonie wurde eine 100 ml LB/Amp-Kultur angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die ÜN-Kultur in eine Kultur von insgesamt 500 ml überführt und für ca. 1,5 h bei 30°C bis zum Erreichen einer $OD_{600\ nm}$ von 0,6 bis 0,8 inkubiert. Die OD wurde in einer Glasküvette im Spektralphotometer bestimmt. Nach Erreichen der entsprechenden Bakteriendichte wurde die Kultur mit 1 ml 0,1 M IPTG induziert. Nach einer

weiteren Inkubationszeit von 4 bis 5 Stunden wurde die Kultur in 50 ml-Röhrchen aliquotiert und 10 min bei 3500 rpm (2506 g) und 4°C abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Bakterienpellets bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Die aufgetauten Pellets wurden in jeweils 5 ml Aufschlusspuffer resuspendiert, zu 25 ml Aliquots vereinigt und die Bakterien mit Hilfe eines Hochdruck-Homogenisators (French® Press) lysiert. Dazu wurde die Suspension in den Kolben der French® Press gegeben, der am unteren Ende mit einem Ventil verschlossenen war. Nach dem Aufsetzten des Stempels wurde dieser bei offenem Ventil bis zum Entweichen sämtlicher Luft vorgeschoben. Anschließend wurde der Kolben in eine hydraulische Presse eingespannt und diese auf einen Druck von 1000 bar eingestellt. Durch vorsichtiges Öffnen des Ventils wurde die Supension tropfenweise abgelassen und in einem 50 ml-Falcon-*tube* aufgefangen. Zur Optimierung des Lyse wurde der Vorgang mit jedem Aliquot wiederholt. Zur Verhinderung der Degradation der Fusionsproteine wurden die Röhrchen auf Eis aufbewahrt und transportiert. Nach der Lyse wurden die Suspensionen mit Triton X-100 versetzt, gemischt und danach für 10 min. bei 10000 rpm (15008 g) und 4°C zentrifugiert, um den Zelldetritus zu entfernen. Der die Fusionsproteine enthaltende Überstand von je 2 Falcon-*tubes* wurde vereinigt (insgesamt 50 ml) und in ein neues *tube* überführt. Pro 50 ml Proteinlösung wurden 100 µl Glutathion-Sepharose-*beads* zugegeben und im Überkopfschüttler bei 4°C für 1,5 bis 2 h inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde das Fusionsprotein über seinen GST-Anteil an die Glutathion-Sepharose gebunden. Anschließend wurde die Lösung abzentrifugiert (5 min bei 2000 rpm (818 g) und 4°C) und der Überstand zur Schonung des Glutathion-Sepharose-Pellets abgesaugt. Zur Entfernung nicht gebundener, unspezifischer Proteine wurden die Pellets in jeweils 10 ml Waschpuffer resuspendiert, gevortext und erneut abzentrifugiert. Der Waschschritt wurde insgesamt 4 mal wiederholt und die vereinigten Pellets in 1 ml Waschpuffer aufgenommen. Die Suspension mit dem Glutathion-Sepharose-gebundenen Fusionsprotein wurde mit Proteinase-Inhibitoren versetzt und bei 4°C aufbewahrt. Die Expression und Reinheit des produzierten Proteins wurde durch PAA-Gelelektrophorese und anschließende Coomassie-Färbung überprüft.

3.2.4 *In vitro*-Transkription-Translation und radioaktive Markierung von Proteinen

Für die *in vitro*-Synthese der radioaktiv markierten Rep-Proteine wurde das TNT® *coupled reticulocyte lysat*-System von Promega® verwendet. Das Rep78-Gen lag dabei im Kontext des pBluescript-Plasmids unter Kontrolle des T7-Promotors vor. Die untersuchten Rep-

Mutanten wurden, sofern sie noch nicht in dem Vektor vorlagen, entsprechend umkloniert. Von der Rep-DNA ausgehend wurde die mRNA mit Hilfe der DNA-abhängigen T7-RNA-Polymerase trankribiert. Sämtliche zur Translation notwendigen Bestandteile waren im Kaninchenretikulozyten-Lysat des Promega®-Kits enthalten. Für die Transkription/Translation wurden 25 µl Lysat mit 16,5 µl DEPC-H2O, 1 µl (1 µg) DNA, 2 µl 25x-Reaktionspuffer, 1 µl Aminsoäuremix ohne Methionin sowie 1 µl der T7-Polymerase versetzt. Anschließend wurden der Reaktion 3,5 µl ^{35}S-markiertes Methionin zugegeben und der Ansatz für 1,5 h bei 30°C inkubiert. Zur Überprüfung der Proteinsynthese und der Sicherstellung einer vergleichbaren Expression sämtlicher untersuchter Mutanten wurde jeweils 1 µl des in Ansatzes durch SDS-PAGE und Autoradiographie überprüft.

3.2.5 *In vitro*-Proteininteraktionsuntersuchungen im GST-*pull-down assay*

Die Untersuchung der DNA-abhängigen Proteininteraktion zwischen Rep78 bzw. den Rep78-Mutanten und HSV-ICP8 wurde in einem GST-*pull-down assay* durchgeführt. Das Glutathion-S-Transferase- (GST-) gekoppelte ICP8 fungierte dabei als *bait*-Protein. Das Fusionsprotein war über den GST-Anteil an eine Glutathion-Sepharose Matrix gebunden, was die Zentrifugation und Reinigung des Ansatzes ermöglichte. Nicht gebundene Bestandteile wurden durch Waschschritte entfernt, während die spezifischen Interaktionspartner an das *bait*-Protein gebunden blieben. Um auszuschließen, dass der GST-Anteil des ICP8-Fusionsproteins einen Einfluss auf die untersuchte *in vitro*-Interaktion hatte, wurden Kontrollansätze mitgeführt, in denen an Stelle des GST-ICP8 Glutathion-Sepharose-gebundenes GST enthalten war. Um die DNA-Abhängigkeit der Rep-ICP8-Proteininteraktion zu bestimmen, wurden alle Versuchsansätze parallel ohne DNA, nach Zugabe von AAV-dsDNA bzw. AAV-ssDNA durchgeführt. Die AAV-DNA wurde aus dem Plasmid pSub201(+) gewonnen. Dazu wurde das Plasmid mit dem Enzym PvuII verdaut, die DNA in einem 0,8 %igen Agarose-Gel aufgetrennt, das 4,7 kpb große AAV-Fragment isoliert und durch FreezeSqueeze-Gelextraktion gereinigt. Die Konzentration der in TE gelösten DNA wurde im Photometer bestimmt. Zur Vorbereitung des GST-*pull-down assays* wurden pro Ansatz 5 µg GST-ICP8 bzw. GST, gebunden an 20 µl Glutathion-Sepharose, abzentrifugiert (3 min bei 2000 rpm und RT) und der Überstand unter Schonung des Pellets abgesaugt. Das GST-ICP8- bzw. GST/Glutathion-Sepharose-Pellet wurde zweimal in je 500 µl Bindungspuffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand erneut abgesaugt. Danach wurde das Pellet in 500 µl Bindungspuffer resuspendiert. Anschließend wurde

den entsprechenden Ansätzen 200 ng der AAV-DNA zugegeben und sämtliche Proben für 15 min. im Überkopfschüttler bei 4°C vorinkubiert. Die dsDNA wurde ohne weitere Präparation zugesetzt, während die einzelsträngige Konformation der AAV-DNA durch Hitzedenaturierung von 5 min. bei 95°C und anschließender Abkühlung auf Eis generiert wurde. Bei der Hitzedenaturierung falten sich die *inverted terminal repeats* (ITRs) in ihre *hairpin*-Konfiguration zurück, wodurch die Enden der AAV-ssDNA doppelsträngig vorlagen. Während der Vorinkubation der GST/GST-ICP8-Ansätze wurden die *in vitro* synthetisierten Rep-Proteine umgepuffert. Dazu wurden pro Ansatz, abhängig von der zuvor kontrollierten Proteinexpression, 1 bis 2 µl des Transkription-Translations-Ansatzes in 500 µl Bindungspuffer gelöst, gevortext und anschließend für 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das im Bindungspuffer gelöste Rep-Protein wurde in die vorinkubierten GST/GST-ICP8-Ansätze überpipettiert, während evtl. ausgefallene Salze am Boden des vorherigen Eppendorf-*tubes* zurückblieben Nach erneutem Vortexen wurden die vollständigen Ansätze für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben insgesamt viermal in einer Ausschwingzentrifuge (3 min. bei 2000 rpm (666 g) und RT) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml Bindungspuffer resuspendiert. Dadurch wurden unspezifische Bestandteile und der ungebundene Anteil der Rep-Proteine entfernt. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand vollständig entfernt, das Pellet in 30 µl 2x-Proteinprobenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 95°C denaturiert. Dadurch wurden die Bindungen der Interaktionspartner und des GST bzw. GST-ICP8 mit den Glutathion-Sepharose-*beads* gelöst, um die Auftrennung der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese zu gewährleisten. Als *Input*-Kontrolle wurde parallel die in der Untersuchung eingesetzte Menge an *in vitro*-translatiertem Rep-Protein mit 2x-Proteinprobenpuffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgekocht. Sämtliche Proben wurden kurz abzentrifugiert und 15 µl der GST/GST-ICP8-Ansätze und 5 µl des *Inputs* (entsprach 50 % der ursprünglich eingesetzten Menge) auf ein PAA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend entfärbt. Durch die Färbung konnten die Proteinbanden sichtbar gemacht und so die Menge des eingesetzten Fusionsproteins kontrolliert und die Vergleichbarkeit der Ansätze sichergestellt werden. Das Gel wurde kurz in ddH2O gespült und dann für 20 min. in einer 1 M Natriumsalicylatlösung geschwenkt. Nach erneutem Waschen in ddH_20 wurde das Gel auf ein 3MM-Filterpapier überführt und für 2 h bei 80°C in einem Vakuumgeltrocker getrocknet.

3.2.5 Autoradiographie und PhosphoImager-Analyse

Zur Visualisierung der im GST-*pull-down assay* gebundenen Proteinfraktion und zur vorherigen Kontrolle der radioaktiv markierten, *in vitro* synthetisierten Proteine wurde das getrocknete PAA-Gel in eine Expositionskassette eingeklebt und über vier und zehn Tage ein Röntgenfilm exponiert. Zur Verbesserung des Signals wurde auf den Film ein *Intensifier Screen* gelegt und die Kassette bei –80°C gelagert. Nach der Exposition wurde der Röntgenfilm entwickelt und beurteilt. Zur Quantifizierung des *pull-down assays* wurde in einer PhosphoImager®-Kassette mit dem Gel ein *Storage Phosphor Screen* für 14 Tage exponiert. Der *Screen* wurde im Storm 840 Scanner abgelesen und die Stärke der Proteinbanden mit dem Auswertungsprogramm ImageQuant® bestimmt. Die im *pull-down assay* gebundene Rep-Fraktion wurde im Vergleich zum eingesetzten *Input* berechnet und damit die Stärke der Proteininteraktion bestimmt. Für jede getestete Rep-Mutante wurden die Werte von fünf unabhängigen Experimenten gemittelt und mit der Standardabweichung in einem Diagramm angegeben. Bei der Untersuchung von Mutanten, die sich als bindungsnegativ herausstellten, wurde bei den folgenden Versuchen darauf geachtet parallel eine bindungspositive Rep78-Mutante zu analysieren, um falsch-negative Ergebnisse ausschließen zu können.

3.2.7 Immunfluoreszenz-Untersuchung

In der Immunfluoreszenz-Analyse wurde die intranukleäre Verteilung von Rep78 bzw. dem Rep78-Mutanten und HSV-ICP8 und die *in vivo*-Kolokalisation der Proteine in den präreplikativen HSV-Komplexen untersucht, um die *in vivo*-Interaktion der Rep-Mutanten mit ICP8 im Vergleich zum Wildtyp-Protein zu bestimmen. Dazu wurden in einer 24-*well*-Platte $5x10^4$ HeLa-Zellen pro *well* auf Deckgläschen einer Größe von ∅ = 13 mm ausgesät und über Nacht kultiviert. Mittels Lipofektion wurden die Zellen mit pTAV2-0 bzw. den jeweiligen abgeleiteten Rep-Expressionsplasmiden und den vier HSV-Helferplasmiden mit je 150 ng DNA pro Plasmid transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Deckgläschen aus den *wells* in ein Trägernetz überführt und nach dem Abtropfen des Mediums kurz in 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen für 30 min. in einer 3,7 % Formaldehyd/1x PBS-Lösung inkubiert. Dadurch vernetzten sich die zellulären Strukturen, während gleichzeitig die Zellen auf dem Deckgläschen fixiert wurden. Nach drei kurzen Waschschritten in 1xPBS folgte ein Bad in einer 1 % Triton X-100/ 1x PBS-Lösung, wodurch die Membranen der Zellen perforiert und für die markierenden Antiköper durchlässig wurden. Die Deckgläschen wurden

erneut drei mal für 10 min. in 1x PBS gewaschen, anschließend mit einem Papiertuch leicht getrocknet und in eine feuchte Kammer überführt. Dazu wurde der Boden einer Plastikschale mit einem dicken, mit ddH_2O-getränktem Filterpapier versehen und mit einem entsprechend großen Stück Parafilm bedeckt. Die feuchte Kammer verhinderte während der Inkubation mit den Antikörpern eine zu starke Austrocknung der Zellen. Zur Markierung der untersuchten Proteine wurden zunächst die Primärantikörper in 1x PBS/ 2% FCS verdünnt, der Maus-anti-ICP8-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:10 und der Kaninchen-anti-Rep-Antikörper 1:150. Die Deckgläschen wurden mit je 80 µl der Antikörperlösung überschichtet und in der mit einem Deckel verschlossen feuchten Kammer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen vorsichtig auf Papiertüchern abgetropft, in das Trägernetz überführt und 3 x 15 min. in 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut in eine feuchte Kammer gelegt, mit den Sekundärantikörpern überschichtet und für eine weitere Stunde inkubiert. Bei den fluoreszierenden Antikörpern handelte es sich um einen Fluorescein-gekoppelten FITC-Ziege-anti-Maus-Antikörper und einen Alexa-Fluor594-Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper. Beide wurden 1:500 in 1x PBS/ 2 % FCS verdünnt und die Lösung zusätzlich 10 µg/ml DAPI versetzt. Sämtliche Arbeitsschritte mit den Sekundärantikörpern wurden, soweit möglich, unter Lichtabschluss durch geführt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Nach der Inkubation wurden die Deckgläschen dreimal in 1xPBS gewaschen, abgetropft und leicht getrocknet. Anschließend wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Fluoromount G® mit der Zellseite nach unten auf einem Objektträger fixiert und über Nacht getrocknet. Die Mikroskopie wurde an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 510 von Zeiss mit einem 63x/1,4 oil DIC-Objektiv durchgeführt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden in den Wellenlängen 405 nm, 488 nm und 543 nm angeregt und das spezifisch emittierte Signal gefiltert und gescannt. Die Schichtdicke der dargestellten Ebene betrug 0,8 µm. Zur Auswertung der Bilder wurde der LSM Image Browser von Zeiss verwandt. Um bei der Untersuchung die Spezifität der Antikörper für die verschiedenen Proteine zu gewährleisten wurden neben den eigentlichen Proben verschiedene Leer- und Kontrollansätze mitgeführt.

3.3 ZellbiologischeMethoden

3.3.1 Kultivierung, Passagierung und Aussaat von HeLa-Zellen

Sämtliche Zellkulturexperimente wurden mit HeLa- Zellen durchgeführt. Diese wurden in 75 cm^2- bzw. 175 cm^2–Zellkulturflaschen in DMEM-Zellkulturmedium, das mit fötalem Kälberserum (FCS) und Penicillin/ Streptomycin versetzt war bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer CO_2- Konzentration von 5 % im Brutschrank inkubiert. Die Dichte des Zellrasens wurde mit einem inversen Lichtmikroskop bestimmt. Bei Konfluenz der Einzelzellschicht, in der Regel alle drei bis vier Tage, wurden die Zellen vereinzelt. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen in auf 37°C vorgewärmten 1x PBS gewaschen. Um die Zellen von Boden des Zellkultur zu lösen wurden sie für 1 min. mit Trypsin überschichtet und dieses anschließend wieder abgenommen. Nach einer Inkubation von 5 min. bei 37°C wurden die Zellen durch Abklopfen und vorsichtiges Resuspendieren in Vollmedium vollständig gelöst. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen je nach Dichte 1:3 bis 1:4 in frischem, vorgewärmtem DMEM verdünnt und in eine neuen Zellkulturflasche überführt. Für die Zellkulturexperimente wurde die Zelldichte vor dem Aussäen in einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen in der entsprechenden Verdünnung in die Zellkulturschalen gegeben.

3.3.2 Calcium-Phosphat-Transfektion von Zellen und Adenovirus-Infektion

Die Calcium-Phosphat-Transfektion nach Chen & Okayama diente dem Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen. Sie beruht auf der Ausbildung von Calcium-Phosphat-DNA-Komplexen, die von den Zellen endozytiert werden (Chen und Okayama, 1988). Die zu transfizierenden HeLa-Zellen wurden drei bis vier Stunden vor der Transfektion in Ø = 6 cm- bzw. 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Für die Replikationsexperimente (10 cm-Schalen) wurden je 12 µg der pTAV-Konstrukte bzw. 6 µg der pPGK-Rep-Plasmide und 6 µg pTR-UF5 in 450 µl einer 220 mM bzw. 250 mM $CaCl_2$-Lösung gelöst. Zur parallelen Kontrolle der Proteinexpression (6 cm-Schalen) wurden 4 µg der pTAV-Plasmide bzw. 2 µg der pPGK-Rep-Konstrukte und 2 µg pTR-UF5 in 150 µl $CaCl_2$-Lösung verdünnt. Nach Zugabe von 450 µl bzw. 150 µl 2x-BBS-Puffer wurden die Ansätze für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise und unter vorsichtigem Schwenken der Kulturschale in das Medium pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 16 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, die Zellen für eine weitere Stunde inkubiert und anschließend das Medium abgenommen. Die

nachfolgende Infektion mit Adenovirus Typ 2 wurde in einem minimalen Volumen, 0,5 ml/ 6 cm- Schale und 2 ml /10 cm- Schale durchgeführt, um die Infektionseffizienz zu erhöhen. Der Virusstock wurde so verdünnt, dass eine MOI (*multiplicity of infection*) von 100, also 100 Viruspartikel pro Zelle erreicht wurde. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde und dem regelmäßigen Schwenken der Kulturschale zur Verhinderung der Austrocknung der Zellen wurde das Zellkulturgefäß mit Vollmedium auf das ursprüngliche Gesamtvolumen aufgefüllt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde parallel das Plasmid pEGFP-C1 transfiziert und im inversen Fluoreszenzmikroskop die Zahl der GFP- (*green fluorescent protein*) exprimierenden Zellen überprüft.

3.3.3 Tansfektion von Zellen durch Lipofektion

Zur Transfektion kritischer Experimente, die in kleine Ansätzen durchgeführt wurden und bei denen eine hohe Transfektionseffizienz erforderlich war, wurde die Lipofectamine® Reagent von Initrogen benutzt. Diese Methode beruht auf dem Einschluss der DNA in Micellen, die von den Zellen mit hoher Effizienz endozytiert werden. Die Zellen wurden am Vortag ca. 12 h vor Transfektion in einer Dichte von ca. 2/3 der zum Transfektionszeitpukt gewünschten Zelldichte ausgesät. In serumfreien Medium wurde die DNA in einem Verhältnis von 2:5 **??** mit der Lipofectamine Reagenz gemischt. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit wurde der Ansatz unter leichtem Schwenken auf das Medium gegeben und die Zellen im Brutschrank inkubiert. Ein Mediumwechsel war bei dieser Methode nicht erforderlich.

3.3.4 Extraktion niedermolekularer DNA nach HIRT

Die HIRT-Extraktion (Hirt, 1967) diente der Gewinnung niedermolekularer, extrachromosomaler DNA, in diesem Fall der viralen DNA bei den Replikationsexperimenten, aus eukaryotischen Zellen. Dabei wurde nach der Lyse der Zellen die hochmolekulare, chromosomale DNA durch Präzipitation entfernt und die zurückbehaltene niedermolekulare DNA anschließend gefällt. Im Anschluss an die Inkubationszeit nach der Transfektion und Infektion der Zellen in den 10 cm-Schalen wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen zweimal in 1x PBS gewaschen. Danach wurden sie in 3 ml 1x PBS abgeschabt und in ein 15 ml-Falcon-*tube* überführt. Nach Zentrifugation in einer Ausschwingzentrifuge wurde das PSB abgegossen, das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert und die Röhrchen im Wasserbad für 2 h bei

37°C inkubiert. Nach vollständiger Lyse des Zellpellets wurde der Lösung unter Vortexen 500 µl 5 M NaCl- Lösung tropfenweise zugegeben. Die hochmolekulare DNA bildete dabei einen weißen Niederschlag, der sich während der folgenden Übernachtinkubation bei 4°C absetzte. Die Lösung wurde anschließend für 15 min. bei 12000 rpm (21612 g) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Röhrchen überführt, mit 2 ml Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) gemischt und dann für 5 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und die darin enthaltene DNA in eine neuen *tube* durch Zugabe von 200 µl (1/10 Volumen) 3 M Natriumacetat und 5 ml (2,5-faches Volumen) 100 % Ethanol auf Eis gefällt. Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocken in 50 µl TE- Puffer gelöst. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die DNA im Southern Blot analysiert.

3.3.5 Proteinextraktion aus HeLa-Zellen

Zur Kontrolle der Proteinexpression der Replikationsexperimente wurden Gesamtzellextrakte und im Western Blot analysiert. Von den Zellen in der 6 cm-Schalen wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen anschließend zweimal in vorgewärmten 1x PBS gewaschen. Das PBS wurde vollständig entfernt und 2x-Proteinprobenpuffer direkt auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 10 min. wurden die Zellen abgeschabt, der Zellextrakt in ein Eppendorf-*tube* überführt und anschließend für 5 min. bei 95°C denaturiert. Nach dem Abkühlen wurde die Proteinextrakte mit einem Ultraschallgerät für 15 sek. beschallt, um die Viskosität der Lösung zu verringern und dann zur Elektrophorese und nachfolgenden Western Blot-Untersuchung auf ein PAA-Gel aufgetragen.

4. Ergebnisse

4.1 *In vitro*-Domänenanalyse von AAV-Rep78 zur Charakterisierung der AAV-Einzelstrang-DNA-stimulierten Interaktion von Rep78 und HSV-ICP8

Die Interaktion von AAV-Rep78 und HSV-ICP8 ist ein grundlegender Prozess der AAV-Replikation. Sie wurde in verschiedenen Voruntersuchungen *in vivo* und *in vitro* beschrieben und teilweise charakterisiert (Heilbronn et al., 2003; Slanina et al., 2006; Stracker et al., 2004). Eine Immunfluoreszenzanalyse konnte die intranukleäre Kolokalisation von Rep und ICP8 zeigen und die Abhängigkeit der Interaktion von einzelsträngiger AAV-DNA (ssDNA) darstellen. *In vitro* wurde eine direkte Interaktion der isolierten Proteine gezeigt und die Stimulation der Rep78-ICP8-Interaktion durch die ssDNA demonstriert. Durch ssDNA wurde gegenüber der Bindung ohne DNA bzw. mit doppelsträngiger DNA eine zehnfach höhere Interaktion von Rep78 und ICP8 induziert (Heilbronn et al., 2003). Vor diesem Hintergrund wurde dem ternären Komplex aus AAV-ssDNA, Rep78 und ICP8 eine Schlüsselrolle bei der Initiation der HSV-induzierten AAV-DNA-Replikation zugeschrieben. Die genannten Resultate bildeten die Grundlage für die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen und Ergebnisse. Mit Hilfe eines GST-*pull-down assays* sollten *in vitro* die Domäne bzw. Domänen von Rep78 bestimmt werden, die für die ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8 verantwortlich sind.

4.1.1 Darstellung der Rep78-ICP8-Interaktion im GST-*pull-down assay*

In dieser Interaktionsstudie wurde ICP8 als GST-Fusionsprotein verwendet. Das Protein wurde in E.coli exprimiert und über eine Glutathion-Sepharose-Matrix gereinigt (Abb. 4.1 A). Die Glutathion-Sepharose-Bindung wurde über die an den N-Terminus von ICP8 fusionierte Glutathion-S-Transferase (GST) vermittelt. Auf der Matrix-Bindung des GST-ICP8 basierte die Durchführung des *pull-down assays*, da sie die Co-Präzipitation und Aufreinigung der untersuchten Rep-ICP8-Komplexe erlaubte. Rep78 und die Rep78-Mutanten wurden *in vitro* mit Hilfe eines Transkriptions-Translations-Systems synthetisiert. Die radioaktive Markierung durch ^{35}S-Methionin ermöglichte die Kontrolle der Proteinexpression (Abb. 4.1 B), den späteren autoradiografischen Nachweis der im *pull-down assay* gebundenden Rep-Fraktion und ihre Quantifizierung der Rep78-ICP8-Interaktion in der PhosphoImager-Analyse. Die in den Experimenten eingesetzte AAV-2-Wildtyp-DNA wurde durch Restriktionsverdau aus dem Plasmid pSub201(+) (Samulski et al., 1987) gewonnen und durch Gelextraktion isoliert und

gereinigt (Abb. 4.1 C). Zur Untersuchung der ssDNA-abhängigen Interaktion von Rep78 und ICP8 wurde die AAV-DNA hitzedenaturiert und auf Eis schockgekühlt. Durch diesen Schritt wurde die intermolekulare Renaturierung weitgehend verhindert, die intramolekulare Renaturierung blieb unbeeinflusst. Die *inverted terminal repeats* (ITRs) falteten sich in ihre Haarnadel-Struktur zurück. Die in der Untersuchung eingesetzte ssDNA mit haarnadelförmigen invertierten Repetitionen an den Enden entsprach damit der typischen Konfiguration des AAV-Genoms.

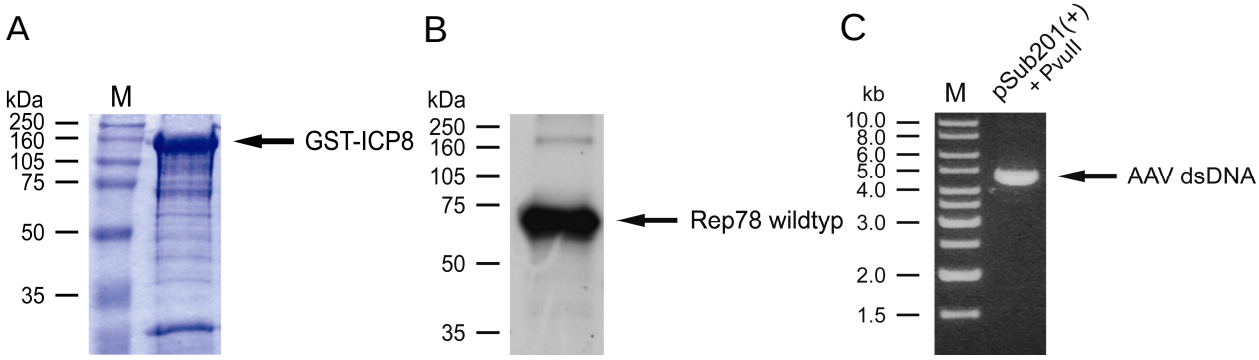


Abb. 4.1: Komponenten des GST-*pull-down assays*. (A) HSV-ICP8 wurde als GST-Fusionsprotein in E.coli exprimiert und über Glutathion-Sepharose gereinigt. Nach PAA-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung wurde im Vergleich mit den Markerbanden (M) die Größe des Proteins ca. 160 kDa kontrolliert und seine Konzentration abgeschätzt. (B) AAV-Rep78 und die Rep78-Mutanten wurden durch *in vitro*-Transkription/Translation synthetisiert und mit Hilfe von ^{35}S-Methionin radioaktiv markiert. Zur Kontrolle wurde eine Aliquot des Proteins in der PAA-Elektrophorese untersucht und durch Autoradiographie dargestellt. (C) Das 4,7 kb AAV-wildtyp-Fragment wurde durch einen PvuII-Verdau aus dem Plasmid pSub201(+) gewonnen, über eine Agarose-Gelelektrophorese isoliert und gelextrahiert. Die gereinigte DNA wurde in einer erneuten Elektrophorese überprüft und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die ssDNA-Konformation (nicht dargstellt) wurde durch Hitzedenaturierung und Abkühlen auf Eis generiert.

Die Interaktion von GST-ICP8 und Rep78 im *pull-down assay* wurde in parallelen Ansätzen ohne DNA, mit doppelsträngiger und nach Zugabe von einzelsträngiger AAV-DNA untersucht. Außerdem wurden Ansätze nur mit Glutathion-S-Transferase (GST) mitgeführt, um den Einfluss des GST-Anteils von GST-ICP8 bei der Proteininteraktion zu kontrollieren. Die gebundene Rep78-Fraktion wurde durch die PhosphoImager®-Analyse quantifiziert und in Prozent zur ursprünglich eingesetzten Proteinmenge, dem *Input*, angegeben. Von fünf unabhängigen Experimenten wurden die Mittelwerte bestimmt und mit der Standardabweichung in einem Diagramm angegeben (Vgl. Abb. 4.4).

Um die Vergleichbarkeit der eingesetzten Proteinmengen an GST und GST-ICP8 zu gewährleisten, wurde in allen Ansätzen ein konstantes Volumen an Protein/Sepharose-Suspension eingesetzt. Darüber hinaus wurden die Proteinbanden durch *Coomassie*-Färbung nach der SDS-Gelelektrophorese kontrolliert. In Abb. 4.2 ist exemplarisch ein Gel eines *pull-down assays* dargestellt. In den Spuren 3, 5 und 7 waren auf der Höhe von ca. 160 kDa die GST-ICP8-Bande zu erkennen. Die Negativkontrollen eingesetzte GST war in den Spuren 2, 4 und 6 bei

etwa 26 kDa nachweisbar. In Spur 1 wurde die Rep78-Einsatzkontrolle aufgetragen, die allerdings nur autoradiographisch nachweisbar war.

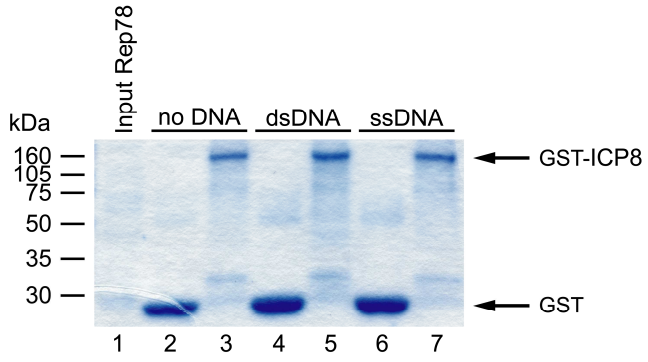


Abb. 4.2: PAA-Gel eines GST-*pull-down assays*. Die Interaktion von Rep78 mit GST-ICP8 wurde ohne DNA (no DNA), in Anwesenheit von Doppelstrang- (dsDNA) bzw. Einzelstrang-DNA (ssDNA) unter-sucht Die Spezifität der Bindung wurde durch parallele Ansätze mit Glutathion-S-Transferase (GST) kontrolliert. Die aufgereinigten Proteinkomplexe wurden bei 95°C in 2x-Protein-probenpuffer denaturiert und durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dargestellt ist ein PAA-Gel nach *Coomassie*-Färbung.

Die Darstellung der AAV-ssDNA-stimulierten Interaktion von Rep78-Wildtyp und GST-ICP8 war notwendig, um im Vergleich die Aktivität der untersuchten Rep78-Mutanten einzuschätzen und so die verantwortliche Domäne einzugrenzen. Durch die Verwendung eines anderen DNA-Substrates ging sie zudem über die Reproduktion der Ergebnisse aus der zugrunde liegenden Studie hinaus (Heilbronn et al., 2003). In der Voruntersuchung wurde die eingesetzte aus dem Plasmid pTR-UF5 gewonnen. Sie enthielt das EGFP-Gen und regulatorische DNA-Sequenzen, die von den *inverted terminal repeats* (ITRs) von AAV flankiert wurden. Im Gegensatz zu der rekombinanten, also mit Ausnahme der AAV-ITRs unspezifischen DNA wurde in dieser Arbeit AAV-Wildtyp-DNA verwendet. Dadurch konnte beurteilt werden, ob die veränderte DNA-Zusammensetzung Einfluss auf die Rep78-ICP8-Interaktion hat und eine Abhängigkeit der Interaktion von der DNA-Sequenz besteht.

In Abbildung 4.3 ist die Autoradiographie des *pull-down assays* mit Rep78 dargestellt. Die Bande des Rep78-*Input* in Spur 1 war unterhalb von 75 kDa nachweisbar. Um eine Überstrahlung der benachbarten Spuren zu vermeiden, wurden nur 50% des *Input* aufgetragen und bei der Berechnung der Bindungsaktivität entsprechend kalkuliert. Bei der visuellen Beurteilung des Blots waren bereits Unterschiede in der Stärke der Banden zu erkennen und eine grobe Einschätzung der Proteininteraktion möglich. Der Einfluss der AAV-ssDNA war beim

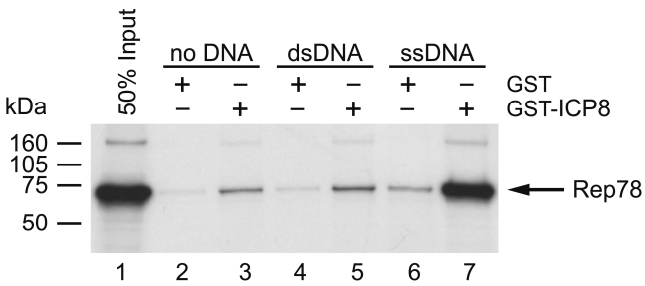


Abb. 4.3: Autoradiographischer Blot eines *pull-down assays*. Durch die radioaktive Markierung war das Rep78 bzw. die an GST und GST-ICP8 gebundene Rep-Fraktion autoradiographisch nachweis-bar. Die Banden konnten nach der Exposition eines Röntgenfilms auf dem getrockneten PAA-Gel nachgewiesen werden. Die Stärke der Interaktion ohne DNA (no DNA), bzw. mit Doppelstrang- (dsDNA) und Einzelstrang-DNA (ssDNA) ohne DNA konnte im Vergleich zum Input beurteilt werden.

Vergleich der Ansätze mit GST-ICP8 nachweisbar. Wie an der starken Rep78-Bande zu erkennen war, führte die Inkubation von GST-ICP8 und Rep78 mit ssDNA (Spur 7) zu einer deutlich stärkeren Interaktion als ohne DNA (Spur 3) oder mit dsDNA (Spur 5). Die Rep78-ICP8-Bindung war ohne DNA und in Anwesenheit von dsDNA jeweils nur als schwache Bande nachweisbar. Beim Vergleich von GST und GST-ICP8 konnte in allen Ansätzen nur eine geringe unspezifische Bindung von Rep78 an Glutathion-S-Transferase festgestellt werden. Somit war die unabhängige Analyse der Rep78-ICP8-Interaktion gewährleistet.

Die Quantifizierung der gebundenen Rep-Fraktion in der PhosphoImager-Analyse ist in Abb. 4.4 dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD von fünf unabhängigen Experimenten. Die Rep78-ICP8-Interaktion war ohne DNA und in Anwesenheit von AAV dsDNA sehr gering. Im Durchschnitt wurden ca. 1,5 % bzw. ca. 2,5 % des Rep78-Inputs an GST-ICP8 gebunden. Trotz der schwachen Interaktion konnte im Vergleich mit den GST-Kontrollen gezeigt werden, dass die gemessene Bindung ICP8-spezifisch war. Durch Zugabe von AAV-ssDNA stieg die Bindung im Mittel auf ca. 20 % des eingesetzten Rep78. Das bedeutete eine durchschnittliche Steigerung der Interaktion von Rep78 und GST-ICP8 um das Zehnfache in Anwesenheit von ssDNA gegenüber den Ansätzen ohne DNA und mit dsDNA. Diese Werte waren mit den Ergebnissen der Voruntersuchung (Heilbronn et al., 2003) vergleichbar.

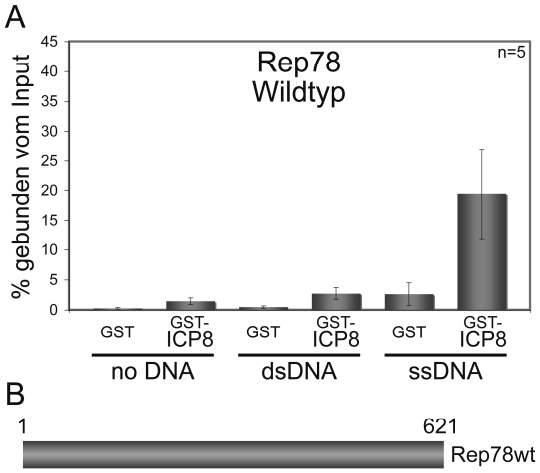


Abb. 4.4: Quantifizierung der Rep78-ICP8-Interaktion. (A) Die Interaktionswerte wurden in der PhosphoImager-Analyse durch die Messung der gebundenen Rep78-Fraktion bestimmt und in Abhängigkeit vom *Input* berechnet. Die Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten wurden zusammen mit der Standardabweichung angegeben. Im Diagramm ist die spezifische Interaktion von Rep78 mit ICP8 ohne DNA (no DNA) gegenüber der GST-Kontrolle dargestellt. Die Stimulation der Proteininteraktion durch einzelsträngige (ssDNA), aber nicht durch doppelsträngige (dsDNA) AAV-DNA war deutlich zu erkennen. Mit einer gebundenen Rep-Fraktion von etwa 20 % vom *Input* betrug die Erhöhung im Durchschnitt das Zehnfache im Vergleich zur Interaktion ohne DNA und in Anwesenheit von dsDNA. (B) Das Modell von Rep78 dient in kommenden Abbildungen als Vergleich zu den verwendeten Mutanten.

Es ließ sich feststellen, dass bereits Rep78 und ICP8 allein interagierten, wodurch frühere Ergebnisse bestätigt wurden (Heilbronn et al. 2003; Stracker et al., 2004). Der Vergleich der Interaktionswerte ohne DNA und in Anwesenheit von dsDNA ließ darüber hinaus den Schluss zu, dass die AAV-dsDNA die direkte Interaktion nicht beeinflusste. Im Gegensatz dazu steigerte AAV-ssDNA die Rep78-ICP8-Interaktion um den Faktor 10. Diese Resultate führten zu der Vermutung, dass die wesentliche Interaktion der beiden Proteine über die Bindung an AAV-ssDNA vermittelt wurde. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Protein-

interaktion nach Zugabe von ssDNA zum Beispiel durch eine Konformationsänderung von ICP8 (Dudas et al., 2001; Uprichard und Knipe, 2003) oder Rep stimuliert wurde. Die veränderte Zusammensetzung der eingesetzten DNA im Vergleich zur Voruntersuchung hatte keinen Einfluss auf die ssDNA-vermittelte Interaktion von Rep78 und ICP8. Die vergleichbaren Resultate, die mit den unterschiedlichen DNA-Substraten erreicht wurden, legten die Vermutung nahe, dass die ssDNA-stimulierte Interaktion auf einer sequenzunabhängigen DNA-Bindung eines oder beider Proteine beruhen musste. Für ICP8 wurde eine ausgeprägte, unspezifische ssDNA-Bindung nachgewiesen und auch Rep78 verfügt über ssDNA-bindende Eigenschaften (Lee und Knipe, 1985; Im und Muzyczka, 1992; Yoon-Robarts et al., 2004).

4.1.2 Orientierende Domänenanalyse von Rep78 für die Interaktion mit ICP8

Von der zuvor demonstrierten ssDNA-abhängigen Interaktion zwischen ICP8 und Rep78 ausgehend sollten die Domäne bzw. Domänen von Rep78 bestimmt werden, die für diese *in vitro*-Komplexbildung verantwortlich waren. Zur Eingrenzung der gesuchten Domäne wurden mit Hilfe des beschrieben GST-*pull-down assays* mehrere Rep78-Mutanten analysiert, bei denen der Einfluss der jeweiligen Mutation auf die Funktionalität des Rep-Proteins bzw. seiner Domänen bereits gut charakterisiert war. Zusätzlich sollten Informationen zum Verhalten der Mutanten bei Proteininteraktionen vorhanden und die Proteinstabilität gewährleistet sein.

4.1.2.1 Einfluss der Helikase-Domäne von Rep78 auf die Interaktion mit ICP8

Zunächst wurde die Mutante Rep78K340H untersucht. Der Aminosäureaustausch in der ATP-Bindungsstelle im zentralen Teil von Rep78 resultiert im Verlust der ATPase- und konsekutiv der Helikase-Aktivität des Proteins (Walker et al., 1997a & b; Davis et al., 1999; James et al, 2004). Die Mutante ist DNA-replikationsdefizient (Chejanovsky und Carter, 1990; Kleinschmidt et al., 1995). Die sequenzspezifische DNA-Bindung und die Endonuklease-Aktivität an partiell einzelsträngigen DNA-Susbtraten sind dagegen erhalten (Owens et al., 1993; Weitzman et al, 1996b; Davis et al., 2000). Auch die nukleäre Lokalisation (Kleinschmidt et al., 1995; Hörer et al., 1995), die Multimerisierung (Weitzman et al., 1996b; Davis et al., 1999) und die Interaktion mit zellulären Proteinen (Weger et al., 1999; 2002; & 2004) sind bei Rep78K340H nicht beeinträchtigt.

Bei der Untersuchung der Interaktion von Rep78K340H und GST-ICP8 im *pull-down assay* konnte im Vergleich zu Rep78-Wildtyp kein negativer Einfluss durch die Mutation der Helikase-Domäne gezeigt werden (Abb. 4.5). In den Ansätzen ohne DNA und in Anwesenheit von AAV-dsDNA wurden jeweils ca. 3,5 % des eingesetzten Proteins an GST-ICP8 gebunden. In Anwesenheit von AAV-ssDNA betrug die Interaktion der Rep78-Mutante mit GST-ICP8 knapp 31,5 %. Ein Einfluss des GST-Anteils auf die ICP8-Interaktion mit Rep78K340H konnte bei allen Ansätzen ausgeschlossen werden. Damit war wie bei Wildtyp-Rep78 von einer vergleichbaren, basalen Rep-ICP8-Bindung ohne DNA und mit dsDNA ausgehend in Anwesenheit von ssDNA eine relative Steigerung der Interaktion um den Faktor 10 festzustellen.

Beim Vergleich der Experimente, die in Anwesenheit von ssDNA durchgeführt wurden, war bei Rep78K340H eine Steigerung der Rep-ICP8-Interaktion gegenüber Rep78-Wildtyp um 50 % festzustellen. Bei diesem Ergebnis war aber zu beachten, dass bereits die basale Interaktion von Rep78K340H im Vergleich zum Wildtyp-Protein leicht gesteigert war. In anderen Studien wurde gezeigt, dass die Mutation K340H bei Rep68 ebenfalls zu leichten Steigerungen von Proteininteraktionen führte (Weger et al., 2002 & 2004). Die Bedeutung ist allerdings zur Zeit noch unklar.

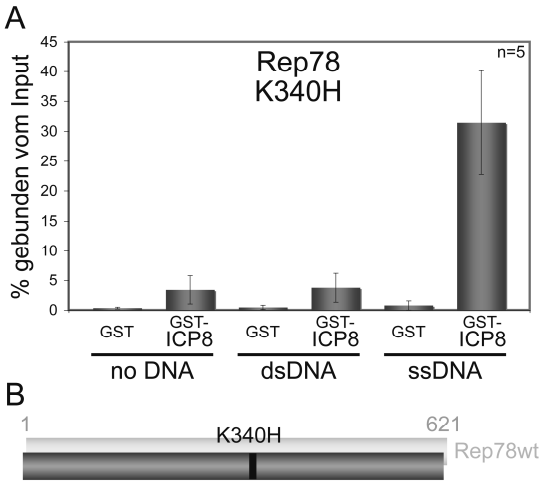


Abb. 4.5: Einfluss der Helikase-Domäne auf die Rep78-ICP8-Interaktion. (A) Bei der ATP-bindungs- und Helikase-defizienten Mutante Rep78K340H konnte wie bei Rep78-Wildtyp eine relative Steigerung der Rep-ICP8-Interaktion in Anwesenheit von ssDNA um etwa das Zehnfache im Vergleich zur Interaktion ohne DNA und mit dsDNA gemessen werden. Im Vergleich zur Wildtyp-Interaktion wurde eine leichte absolute Erhöhung sowohl der basalen als auch der ssDNA-stimulierten Interaktion auf ca. 3,5 % bzw. 31, 5 % vom *Input* festgestellt. (B) Im Modell ist die Lage der Mutation im untersuchten Protein im Vergleich mit Rep78-Wildtyp dargestellt.

4.1.2.2 Einfluss des Rep78-C-Terminus auf die Rep-ICP8-Interaktion

Um festzustellen, ob der C-Terminus von Rep78 einen Einfluss auf die ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8 hat, wurde die Mutante M1/481 untersucht. Sie enthält die N-terminalen 481 Aminosäuren von Rep78 und Rep68. Die Ergebnisse sind daher auf beide Proteine übertragbar. Die Deletion umfasst die Zink-Bindungsdomäne von Rep78 (Hörer et al, 1995) und das in Rep78/68 enthaltene Kernlokalisationssignal (Yang et al., 1992; Cassell et al., 2004). Die

spezifische DNA-Bindung, die Endonuklease-Aktivität und die Rep-Rep-Interaktion sind bei M1/481 und vergleichbaren Deletionsmutanten dagegen erhalten. (Weitzman et al., 1996; Hickman et al., 2002). Auf heterologe Proteininteraktionen hat die Deletion des C-Terminus unterschiedliche Auswirkungen. Die Interaktion mit UBC9 ist z.B. erhalten, während die Interaktion mit KCTD5 aufgehoben ist (Weger et al., 2004 & 2007). M1/481 ist replikationsdefizient (Kleinschmidt et al., 1995).

Bei der Untersuchung von M1/481 konnte kein Einfluss des C-Terminus auf die Rep-ICP8-Interaktion festgestellt werden (Abb. 4.6). Die Bindung der Deletionsmutante an GST-ICP8 in Anwesenheit von ssDNA betrug über 18 % vom *Input*. Diese Interaktion war mit der von Wildtyp-Rep78 vergleichbar. Die ICP8-Bindung von M1/481 ohne DNA und in Anwesenheit von dsDNA betrug jeweils ca. 2,5 % des eingesetzten Proteins. Das entsprach ebenfalls annähernd den Rep78-Wildtyp-Werten. Die GST-Kontrollansätze bestätigten auch hier die ICP8-spezifische Interaktion. Die Ergebnisse zeigten, dass die Aminosäuren 1 bis 481 von Rep78/68 für die ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8 und auch für die schwache direkte Bindung der Proteine ausreichten, während die im C-Terminus von Rep78 enthaltenen Domänen entbehrlich waren.

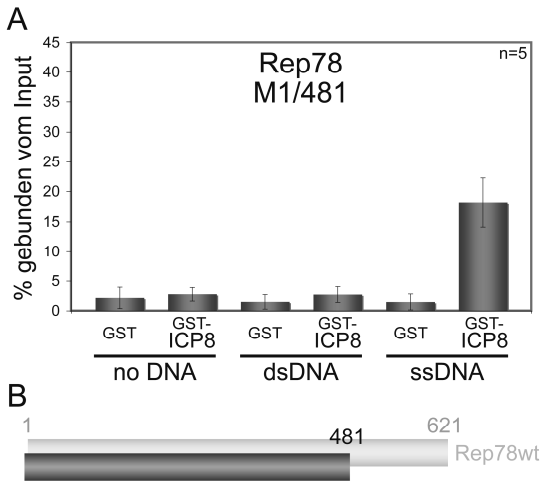


Abb. 4.6: Einfluss des Rep78-C-Terminus auf die Interaktion mit ICP8. (A) Die ssDNA-abhängige Rep-Interaktion mit GST-ICP8 war bei der C-terminalen Deletionsmutante M1/481 vollständig erhalten. Es wurden ca. 18 % vom *Input* gebunden. Diese Werte entsprachen etwa denen von Rep78-Wildtyp. Auch die basale Bindung ohne DNA bzw. in Anwesenheit von dsDNA an GST-ICP8 war mit der des Wildtyp-Proteins vergleichbar. (B) Im Modell ist die Mutante M1/481 dargestellt. Die Deletion umfasste die C-teminalen 140 Aminosäuren von Rep78.

4.1.2.3 Einfluss des N-Terminus von Rep78 auf die Rep-ICP8 Interaktion

Zur Aufklärung, ob der N-Terminus von Rep78 für die *in vitro*-Interaktion mit ICP8 notwendig ist, wurden die Rep-Variante Rep52 und die Mutante MET172 untersucht. Rep52 ist ein natürliches AAV-Protein, das den C-terminalen Aminosäuren 225 bis 621 von Rep78 entspricht. MET172 ist eine N-terminale Deletionsmutante, die die Aminosäuren 172 bis 621 beinhaltet. Rep52 besitzt weder die sequenzspezifische DNA-Bindungsfähigkeit noch eine

Endonuklease-Aktivität. Bei MET172 konnte ebenfalls vom Verlust beider Funktionen ausgegangen werden, da diese bei einer Deletion von nur 30 N-terminalen Aminosäuren bereits aufgehoben sind (Owens et al., 1993; Weitzman et al., 1996b). Rep52 und MET172 sind replikationsdefizient (Kleinschmidt et al., 1995). Unterschiede zwischen beiden Proteinen bestehen bei der Rep-Rep-Interaktion und bei heterologen Proteininteraktionen. Bei Rep52 sind diese Interaktionen weitgehend aufgehoben, während bei MET172 bzw. vergleichbaren Deletionsmutanten eine Restaktivität erhalten ist (Smith et al., 1997; Weger et al., 1999 & 2002).

Bei der Untersuchung der Rep-ICP8-Interaktion zeigten Rep52 und MET72 das gleiche Verhalten (Abb. 4.7). Für beide Proteine war in sämtlichen Ansätzen nur eine geringe Interaktion mit ICP8 erkennbar, unabhängig davon, ob ssDNA, dsDNA oder keine DNA im Ansatz vorhanden war. Bei der Rep52-Interaktion mit ICP8 wurden ca. 1,3 % bis 2,2 % des eingesetzten Proteins gebunden. Für MET172 betrugen die Interaktionwerte zwischen 0,7 % und 1,3 % vom *Input*. Die Werte der GST-Kontollen lagen jeweils nur noch leicht unter den zugehörigen GST-ICP8 Ansätzen. Die spezifische, direkte Interaktion von Rep52 und MET172 mit ICP8 war auf diesem geringen Niveau kaum noch nachzuweisen.

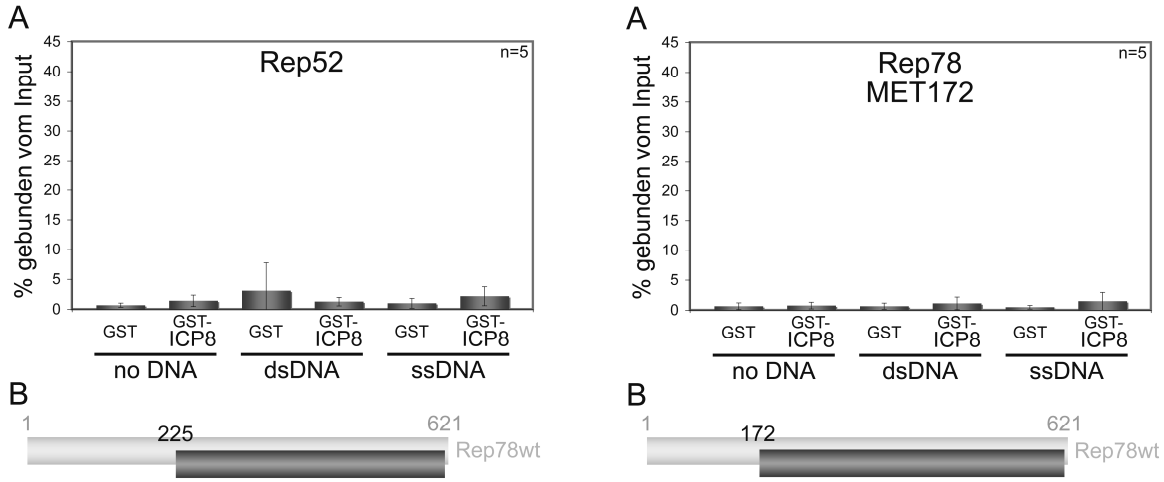


Abb. 4.7: Einfluss des Rep-N-Terminus auf die Interaktion mit ICP8. (A) Bei der Untersuchung der N-terminal verkürzten Rep-Proteine Rep52 und MET 172 wurde der Einfluss des N-Terminus auf die Interaktion deutlich. Es war keine Erhöhung der Rep-ICP8-Bindung in Anwesenheit von ssDNA mehr zu erkennen. Zudem war im Vergleich mit Rep78 die spezifische basale Interaktion mit GST-ICP8 gegenüber den GST-Kontrollen reduziert. (B) Die Modelle der Deletionsmutanten sind unterhalb der Diagramme dargestellt.

Durch die Ergebnisse mit Rep52 und MET172 konnte gezeigt werden, dass der Rep-N-Terminus bzw. N-terminalen 171 Aminosäuren von Rep78 für die ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8 *in vitro* essentiell waren. Die bei Rep78 und den anderen Mutanten vorhandene Stimulation der Proteininteraktion durch ssDNA war hier vollkommen aufgehoben. Auch die sonst in Abgrenzung zur GST-Bindung darstellbare basale Interaktion mit GST-ICP8 war

deutlich eingeschränkt. Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass auch die DNA-unabhängige Interaktion mit ICP8 durch den Rep-N-Terminus vermittelt wird. Eine präzise Aussage über die direkte Interaktion ließen diese Daten und die dafür nicht ausreichende Sensitivität des Experiments allerdings nicht zu.

4.1.2.4 Weitere untersuchte Deletionsmutanten

Zur weiteren Eingrenzung der für die Rep-ICP8-Interaktion verantwortlichen Domäne wurden anfangs die C-terminalen Deletionsmutanten M1/369 und M1/243 untersucht. Diese Mutanten stellten sich im *in vitro pull-down assay* jedoch als instabil heraus, sodass deren Untersuchung nicht weiterverfolgt wurde. Die ebenfalls untersuchte N-terminale Deletionsmutante MET43 war zwar stabil, zeigte aber ein auch in den Kontrollen stark abweichendes Bindungsverhalten, möglicherweise aufgrund einer fehlerhaften Konformation, und wurde deshalb nicht weiter untersucht.

4.1.2.5 Untersuchung des Rep-N-Terminus in multimerisierenden Fusionsproteinen

Nachdem die Rep-Interaktionsdomäne eingegrenzt werden konnte, sollten durch die Untersuchung des isolierten Rep-N-Terminus zusätzliche Erkenntnisse zu dessen ssDNA-abhängigen Interaktion mit ICP8 gewonnen werden. Dazu wurden Rep-Mutanten gewählt, die in einer Voruntersuchung bereits charakterisiert worden waren und deren Proteinstabilität gewährleistet war (Cathomen et al., 2000). Es handelte sich um Fusionsproteine, die neben den Aminosäuren 1 bis 244 von Rep78/68 eine Dimerisierungs- (Rep.LZ) oder Tetramerisierungsdomäne (Rep.TZ) sowie ein Kernlokalisationssignal und ein *myc-tag*

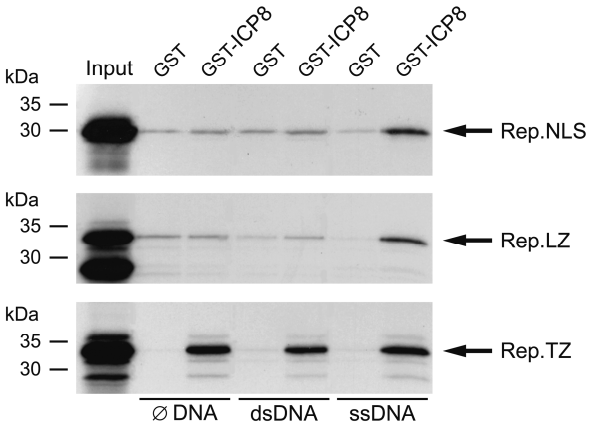


Abb. 4.8: Untersuchung des Rep-N-Terminus mit Hilfe multimerisierender Fusionsproteine. Rep.NLS enthielt die N-terminalen 244 Aminosäuren von Rep gefolgt von einem *myc-tag* und einem Kernlokalisationssignal. Rep.LZ enthielt zusätzlich eine Dimerisierungs-, Rep.TZ eine Tetramerisierungsdomäne (Cathomen et al., 2000). Bei der Untersuchung der ICP8-Interaktion der Proteine wurden mit Rep.NLS und Rep.LZ plausible Ergebnisse erzielt. Aufgrund eines abweichenden und schwer interpretierbaren Interaktionsverhaltens von Rep.TZ und der geringen Aussagekraft der anderen Konstrukte wurde von der weiterführenden Untersuchung der Fusionsproteine abgesehen.

enthielten. Ein drittes Konstrukt (Rep.NLS) enthielt nur die Rep-Sequenz, die NLS-Domäne und das *myc-tag*. Rep.NLS und Rep.LZ zeigten in Gegenwart von AAV-ssDNA eine geringgradige Bindungsverstärkung bei der Interaktion mit GST-ICP8 *in vitro* (Abb. 4.8). Rep.TZ zeigte allerdings ein deutlich verändertes Bindungsverhalten. Die Rep.TZ-ICP8-Bindung war in den Ansätzen ohne DNA und mit dsDNA so stark wie in Anwesenheit von ssDNA. Dieses Resultat war angesichts der heterologen Multimerisierungsdomänen schwer interpretierbar. Die weitere Analyse die Fusionsproteine wurde daher zugunsten der Untersuchung gezielter Punktmutationen im N-Terminus des Rep78-Wildtyp-Proteins aufgegeben.

4.1.3 Untersuchung N-terminaler Rep78-Punktmutanten zur präzisen Domänenanalyse der Rep-ICP8-Interaktion

Mit den bisher gewonnenen Ergebnissen konnte die verantwortliche Domäne für die ssDNA-abhängige Rep78-ICP8-Interaktion auf die ersten 171 Aminosäuren des Rep-N-Terminus eingegrenzt werden. Der N-Terminus beinhaltet zwei funktionelle Domänen, die Domäne für die sequenz- und strangspezifische Endonukleaseaktivität (Davis et al., 2000; Yoon et al., 2001) und die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne (Owens et al., 1993; Cathomen et al., 2000). Um zu klären, welche dieser beiden Funktionen die Rep-ICP8-Interaktion beeinflusste, wurde der *pull-down assay* mit N-terminalen Aminosäureaustauschmutanten von Rep78 weitergeführt. Die Untersuchung von Punktmutanten bot gegenüber einer Analyse von Mutanten mit internen Deletionen eine größere Sicherheit, dass die Aufhebung der untersuchten Funktion nicht auf einer Änderung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins beruhte. Zudem erlaubte die Verwendung von Punktmutanten eine bessere Differenzierung zwischen der N-terminalen DNA-Bindungs- und Endonuklease-Domäne, da in mehreren Studien verschiedene kritische Aminosäuren für die jeweilige Rep-Aktivität beschrieben wurden (Walker et al, 1997a; Urabe et al., 1999; Davis et al., 1999 & 2000; Hickman et al., 2002; Yoon-Robarts und Linden, 2003). Für die Domänenanalyse der ssDNA-vermittelten Rep78-ICP8-Interaktion lag die Untersuchung der Rep-DNA-Bindungsdomäne nahe. Ein Einfluss der Endonuklease-Aktivität war zwar nicht auszuschließen, angesichts des untersuchten Zusammenhangs und der experimentellen Konzeption aber weniger wahrscheinlich.

Für die Mutationsanalyse und Charakterisierung der verantwortlichen Rep78-Domäne für die ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8 wurden die Aminosäuren Arginin (R) 107, Lysin (K) 136 und Arginin (R) 138 ausgewählt. In einer Studie, in der sämtliche geladenen Aminosäuren des N-Terminus analysiert wurden, stellten sich die Mutanten Rep78R107A, Rep78K136A und

Rep78R138A als die Proteine heraus, bei denen die DNA-Bindung an die AAV-ITRs vollständig aufgehoben war (Urabe et al., 1999). Zudem wurden in einer Kristallstrukturanalyse des ITR-gebundenen Rep-N-Terminus die entsprechenden konservierten Aminosäuren R106, K135 und K137 von AAV-5 als Hauptinteraktionspartner mit der AAV-DNA indirekt bestätigt (Abb. 4.9) (Hickman et al., 2002 & 2004). Die Rep78-Mutanten R107A, K136A und R138A waren also aussichtsreiche Kandidaten, um den Einfluss der DNA-Bindungsdomäne von Rep78 auf die Interaktion mit ICP8 und AAV-ssDNA zu untersuchen. Zusätzlich wurden Doppelmutanten untersucht, die den Aminosäureaustausch R107A in Kombination mit entweder der K136A- oder der R138A-Mutation trugen.

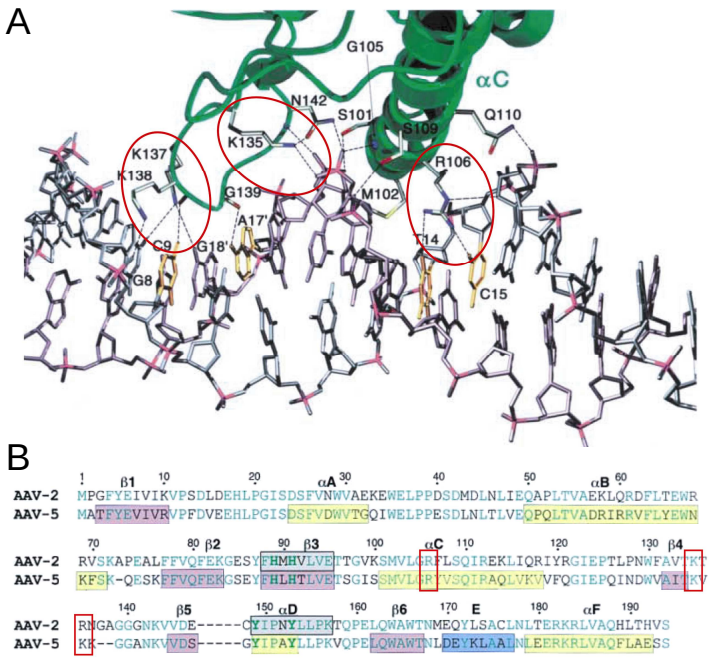


Abb. 4.9: Kristallstrukturanalyse des DNA-gebundenen Rep-N-Terminus von AAV-5 und *Alignment* der N-Termini von AAV-2 und AAV-5. (A) Die Aminosäuren Arginin (R) 106, Lysin (K) 135 und Lysin 137 (rot markiert) von Rep78 (AAV-5) wurden in einer Röntgenstruktur-Analyse als entscheidende Interaktionspartner mit der AAV-DNA charakterisiert. (B) Es handelt sich um konservierte Aminosäuren, die in AAV-2 den Aminosäuren R107, K136 und R138 entsprechen. Sie sind im *Alignment* ebenfalls markiert. (aus: Hickman et al., 2002 & 2004)

Im GST-*pull-down assay* wurden die Rep78-Punktmutanten auf ihre Interaktion mit ICP8 untersucht (Abb.4.10). Die Ansätze mit ssDNA zeigten einen eindeutigen Effekt der Mutationen. Bei Rep78K136A und Rep78R138A war eine deutliche Abnahme der Rep-ICP8-Interaktion im Vergleich zum Wildtyp-Protein zu erkennen. Mit durchschnittlich 6,1 % bzw. 5,7 % gebundenen Inputs war der Einfluss der ssDNA auf die Interaktion mit ICP8 aber gerade noch nachweisbar. Bei Rep78R107A war die Stimulation der ICP8-Bindung in Anwesenheit von ssDNA dagegen nicht mehr zu erkennen. Die ICP8-Bindung dieser Mutante lag mit durchschnittlich vom 2,7 % vom *Input* im Bereich der basalen Interaktion. Die direkte, basale Interaktion von Rep mit ICP8 wurde durch die Einzelmutationen R107A, K136A und R138A nicht beeinträchtigt. Die durchschnittliche Bindung an GST-ICP8 ohne DNA und in Anwesenheit von AAV-dsDNA lag zwischen 1,6 % und 3,5 % der eingesetzten Proteinmenge und war mit der Interaktion von Rep78-Wildtyp vergleichbar.

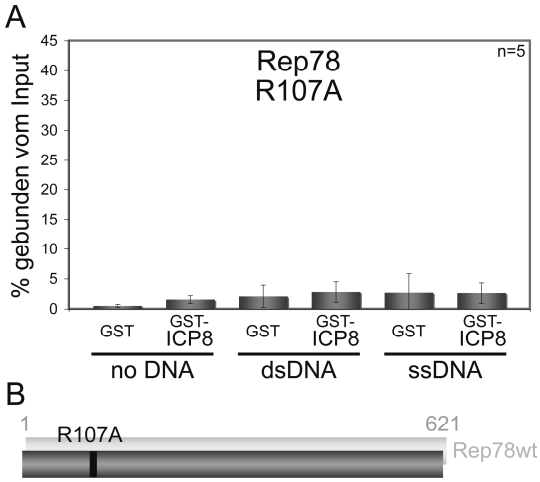
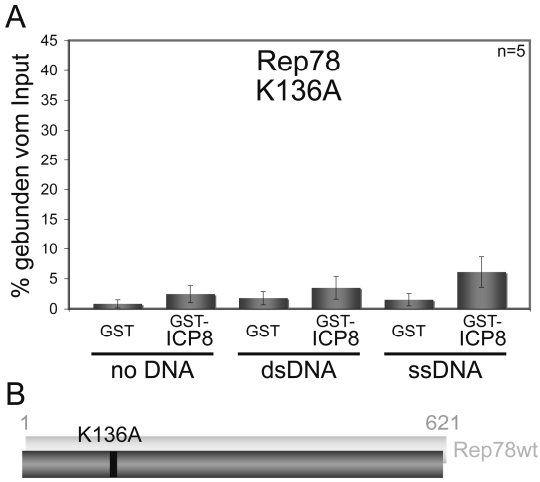
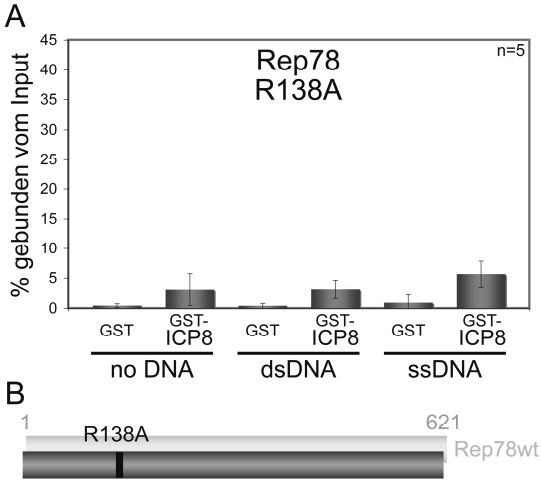


Abb. 4.10: Einfluss der N-Terminalen Punktmutationen in der DNA-Bindungs-Domäne von Rep78 auf die Interaktion mit ICP8. (A) Die Aminosäureaustauschmutanten zeigten jeweils eine drastische Reduktion der ssDNA-stimulierten Rep-ICP8-Interaktion. Am deutlichsten war der Effekt bei der Rep78R107A, bei der keine Erhöhung gegenüber der basalen Interaktion mehr zu beobachten war. Bei den Mutanten K136A und R138A war die ssDNA-stimulierte Interaktion mit ICP8 reduziert, aber auf geringem Niveau noch nachweisbar. Bei den Mutanten K136A und R138A war die basale Rep-ICP8-Interaktion deutlicher erhalten als bei R107A. (B) Die Modelle zeigen die Lage der Punktmutationen im Rep78-N-Terminus.





Bei den Doppelmutanten Rep78R107A/K136A und Rep78R107A/R138A war ebenfalls keine Stimulation der Rep78-ICP8 Interaktion durch ssDNA gegenüber der Bindung ohne DNA oder in Anwesenheit von Doppelstrang-DNA mehr zu erkennen. Die gemessene Bindung in den ssDNA-Ansätzen betrug ca. 1,9 % bzw. etwa 2,1 % vom *Input* (Abb.4.11). Da ein ähnlich deutlicher Effekt bereits für die Mutation R107A demonstriert worden war, war er vor allem auf diesen Aminosäureaustausch zurückzuführen. Allerdings lagen bei R107A/K136A und R107A/R138A die Interaktionswerte mit ICP8 und ssDNA noch unter denen von R107A, was den additiven Effekt zusätzlichen Mutation belegte. Bei den Ansätzen ohne DNA und mit dsDNA betrug die Interaktion zwischen ca. 1,5 % und 2,3 % vom *Input* und lag nur noch knapp über den GST-Kontrollen.

Durch die gezeigte Aufhebung der ssDNA-stimulierten Rep-ICP8-Interaktion bei der Verwendung der DNA-Bindungsdefizienten Aminosäureaustauschmutanten konnte bewiesen werden, dass die N-terminale DNA-Bindungsdomäne in von Rep78 für die Interaktion verantwortlich war.

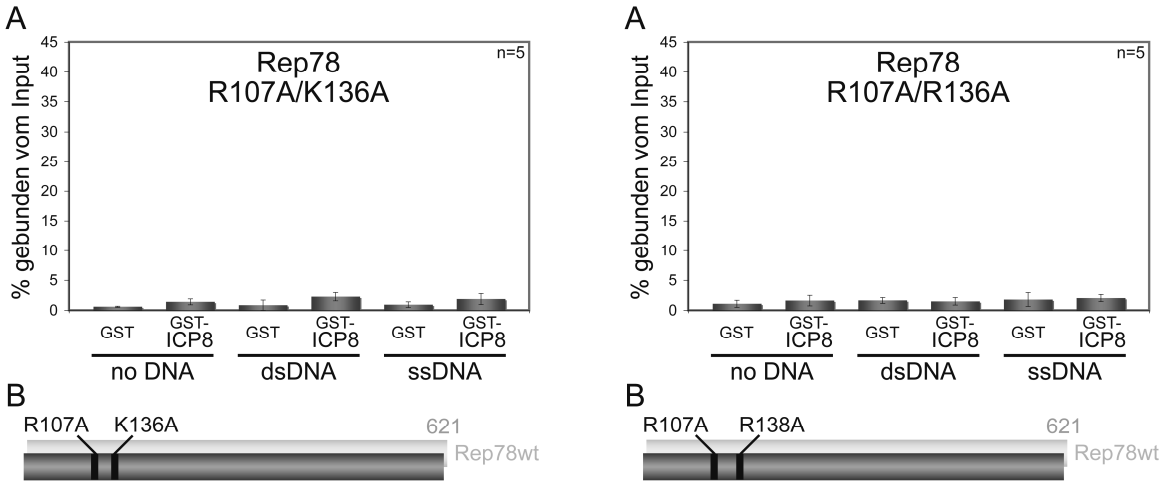


Abb. 4.11: Einfluss der N-Terminalen Doppelmutationen auf die Rep-ICP8-Interaktion. (A) Im Vergleich mit den Einzelmutanten war die Interaktion zwischen den Rep78-Mutanten R107A/K136A bzw. R107AR138A und ICP8 weiter vermindert. Die Stimulierung der Rep-ICP8-Interaktion durch ssDNA war bei den Doppelmutanten vollständig aufgehoben. Beide Mutanten zeigten außerdem nur noch eine geringe basale Bindung an GST-ICP8. (B) Die Punktmutationen liegen benachbart in der N-terminalen Rep-DNA-Bindungsdomäne.

4.1.4 Zusammenfassung der Domänenanalyse von Rep78 für die Einzelstrang-DNA-abhängige Interaktion mit ICP8

In der vorgestellten Untersuchung wurde die Interaktion von AAV-Rep78 und HSV-ICP8 *in vitro* in einem GST-*pull-down assay* analysiert. Zum einen konnte die geringe direkte Interaktion von Rep78-Wildtyp und GST-ICP8 demonstriert werden, die auch durch die Anwesenheit von AAV-dsDNA nicht beeinflusst wurde. Zum anderen konnte die Stimulation der Rep-ICP8-Interaktion durch die Anwesenheit von AAV-ssDNA dargestellt werden. Wie in der zugrunde liegenden Studie (Heilbronn et al., 2003) wurde eine Erhöhung der Interaktion um den Faktor 10 in Anwesenheit von ssDNA gegenüber der Bindung ohne DNA oder mit dsDNA gemessen. Als Erweiterung der bestehenden Erkenntnisse konnte gezeigt werden, dass die DNA-Sequenz des einzelsträngigen Bereichs der eingesetzten AAV-DNA für die beschriebene Interaktion unerheblich war.

Die Untersuchung der Wildtyp-Interaktion war die Vorraussetzung für die Domänenanalyse von Rep78 (Abb. 4.12). Die Domäne, die für die ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8 verantwortlich war, konnte auf die ersten 171 Aminosäuren des Rep-N-Terminus eingegrenzt werden. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass sowohl eine funktionelle Helikase-Domäne als auch der Rep-C-Terminus für die Komplexbildung mit ICP8 und ssDNA entbehrlich waren. Damit konnten auch der Einfluss der Zinkfingerdomäne, der zentral gelegenen

Rep-Rep- und Rep-Cap-Interaktionsdomänen und der Domänen für verschiedene heterologen Proteininteraktion ausgeschlossen werden.

Nach der Eingrenzung der Domäne auf den N-Terminus konnte durch die Analyse der Punktmutanten R107A, K136A und R138A und der Doppelmutanten R107A/K136A und R107A/R138A schließlich bewiesen werden, dass die DNA-Bindungsdomäne im N-Terminus von Rep78 für die ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8 verantwortlich ist. Die Aminosäuren 107, 136 und 138 in der DNA-Bindungsdomäne waren in verschiedenen Studien als entscheidende Interaktionspartner von Rep78 bei der Bindung an AAV-DNA beschrieben worden. Bei der Untersuchung der DNA-bindungsdefizienten Punktmutanten im *pull-down assay* war die ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8 bei Rep78 K136A und R138A deutlich verringert und bei den anderen Mutanten vollständig aufgehoben.

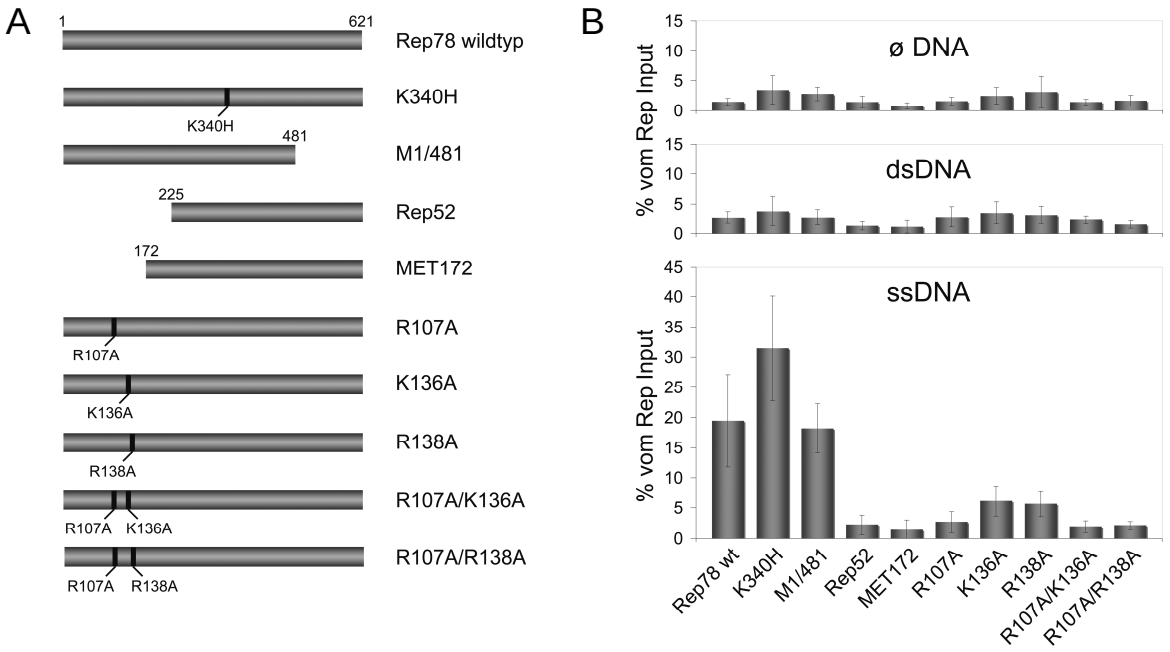


Abb. 4.12: Zusammenfassung der *in vitro*-Domänenanalyse der ssDNA-abhängigen Rep-ICP8-Interaktion. (A) Links sind die Mutanten, die zur Eingrenzung und präzisen Analyse der Rep-Interaktionsdomäne untersucht wurden im Vergleich zu Rep78-wildtyp dargestellt. (B) Im Diagramm sind die Mittelwerte der Interaktionen der Rep-Mutanten mit GST-ICP8 ohne DNA (oben), in Anwesenheit von Doppelstrang-DNA (mitte) und AAV-Einzelstrang-DNA (unten) aufgeführt. Die GST-Kontrollen sind hier nicht gezeigt. Als verantwortliche Domäne konnte die N-terminal gelegene Rep-DNA-Bindungsdomäne charakterisiert werden.

4.1.5 Vergleich der Interaktionen von GST-ICP8 und GST-ICP8ΔC mit AAV-Rep78 zur Domänenanalyse von ICP8

Zusätzlich zur Rep78-Domänenanalyse sollten auch bei ICP8 Hinweise auf die verantwortliche Interaktionsdomäne bei der ssDNA-vermittelten Rep-ICP8-Interaktion gewonnen werden. Zwar wurde die Struktur von ICP8 beschrieben (Mapelli et al., 2005), über die funktionellen Domänen des Protein sind dagegen nur unvollständige Informationen vorhanden. Zum Zeitpunkt der Untersuchung lag die Beschreibung einer ICP8-Mutante vor, deren C-Terminus um 60 Aminosäuren deletiert war und deren biochemische Funktionen teilweise charakterisiert waren (Mapelli und Tucker, 1999; Mapelli et al., 2000). Insbesondere wurde für diese ICP8-Variante eine stark reduzierte kooperative DNA-Bindung gezeigt. In der Annahme, das eine C-terminale Deletion von ICP8 auch die ssDNA-abhängige Interaktion mit Rep78 beeinträchtigen würde, wurde im *pull-down assay* neben GST-ICP8 auch die Mutante GST-ICP8ΔC analysiert, die C-terminal um 73 Aminosäuren verkürzt und mit der Deletionsmutante aus der Voruntersuchung vergleichbar war.

Die *in vitro*-Bindungsexperimente wurden für GST-ICP8 und GST-ICP8ΔC parallel mit Rep78, Rep52 und den Rep-Mutanten Rep78K340H und M1/481 durchgeführt. Aus den autoradiographischen Blots und orientierenden Quantifizierungsdaten ließen sich Hinweise auf eine verändertes Bindungsverhalten von ICP8ΔC ableiten (Abb. 4.13). Die Interaktion von

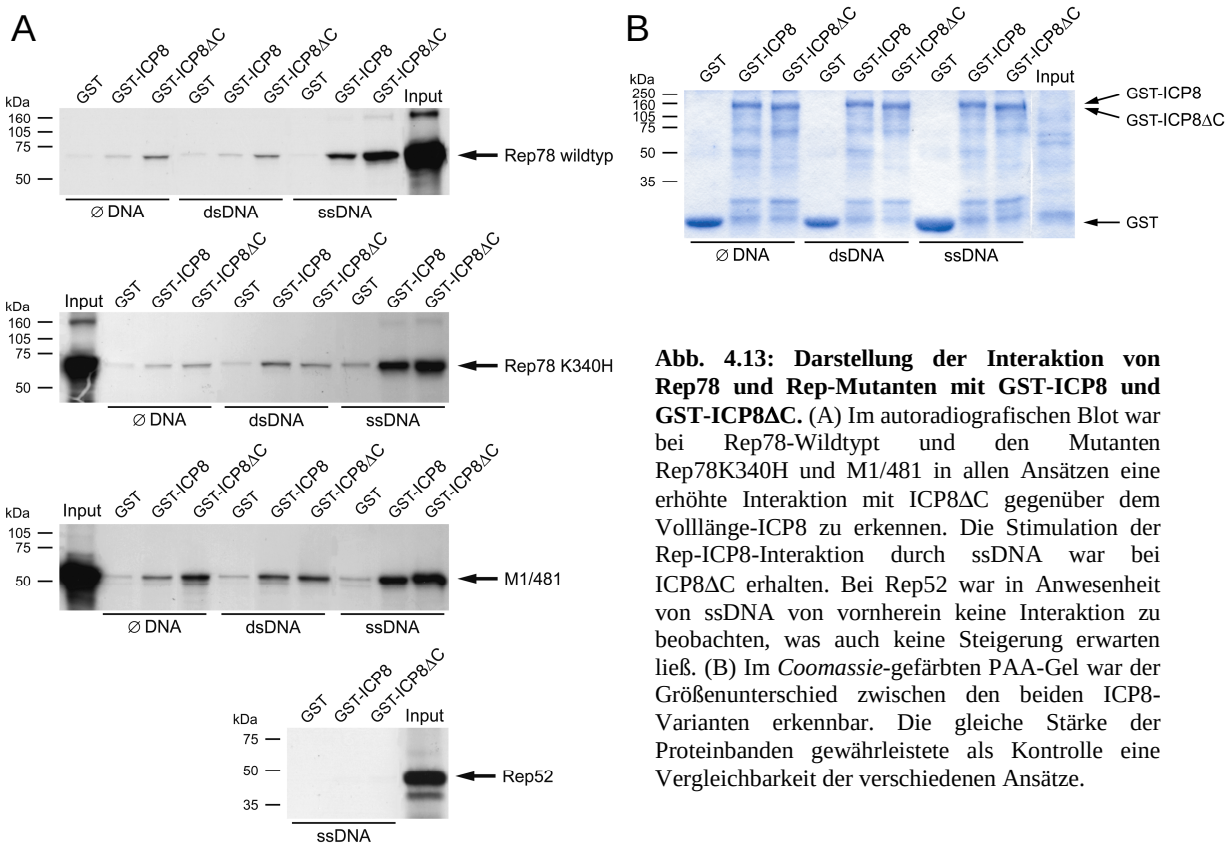


Abb. 4.13: Darstellung der Interaktion von Rep78 und Rep-Mutanten mit GST-ICP8 und GST-ICP8ΔC. (A) Im autoradiografischen Blot war bei Rep78-Wildtypt und den Mutanten Rep78K340H und M1/481 in allen Ansätzen eine erhöhte Interaktion mit ICP8ΔC gegenüber dem Volllänge-ICP8 zu erkennen. Die Stimulation der Rep-ICP8-Interaktion durch ssDNA war bei ICP8ΔC erhalten. Bei Rep52 war in Anwesenheit von ssDNA von vornherein keine Interaktion zu beobachten, was auch keine Steigerung erwarten ließ. (B) Im *Coomassie*-gefärbten PAA-Gel war der Größenunterschied zwischen den beiden ICP8-Varianten erkennbar. Die gleiche Stärke der Proteinbanden gewährleistete als Kontrolle eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Ansätze.

Rep78-Wildtyp, Rep78K340H und M1/481 mit ICP8ΔC war in allen Ansätzen, ohne DNA, mit dsDNA und mit ssDNA gegenüber der Interaktion mit dem Volllänge-ICP8 deutlich gesteigert. Der Effekt war auf den Blots in Anwesenheit von ssDNA am besten zu erkennen. Eine orientierende Quantifizierung ergab für alle Ansätze eine Verdopplung der Interaktion mit GST-ICP8ΔC im Vergleich zu GST-ICP8. Die Stimulation durch ssDNA gegenüber der Interaktion ohne DNA und mit dsDNA war auch bei der Untersuchung von ICP8ΔC nachweisbar. Bei Rep52 wurde der Versuch mit der ICP8-Variante nur in Anwesenheit ssDNA durchgeführt. Bei dem N-terminal verkürzten Rep-Protein war sowohl mit dem Volllänge-GST-ICP8 als auch mit GST-ICP8ΔC kaum eine Interaktion zu erkennen. Der Rep-N-Terminus war demnach auch für die ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8ΔC essentiell.

Entgegen der Erwartung, dass sich die C-terminale Deletion von ICP8 negativ auf die Interaktion mit Rep78 auswirkt, wurde durch die Ergebnisse gezeigt, dass sich der grundlegende Interaktionsmechanismus der ssDNA-vermittelten Komplexbildung von Rep78 und ICP8 nicht änderte. Eine Bewertung der erhöhten Interaktion von ICP8ΔC mit Rep78 im Vergleich zum Volllänge-Protein war aufgrund der geringen Informationen über die ICP8-Domänen jedoch nicht möglich.

4.2 Einfluss der Rep78-Punktmutationen auf die *in vivo*-Kolokalisation mit ICP8

Die Analyse der Rep78-ICP8-Interaktion *in vitro* beruhte auf Immunfluoreszenz-untersuchungen, in denen bereits die *in vivo*-Kolokalisation der beiden Proteine nach der AAV/HSV-Koinfektion demonstriert worden war (Heilbronn et al., 2003). Darüber hinaus konnte die Kolokalisation von Rep und ICP8 durch die Transfektion eines AAV-Wildtyp-Plasmids mit den für die AAV-Replikation minimal erforderlichen HSV-Genen UL5, UL8, UL29 und UL52 nachvollzogen werden (Stracker et al., 2004; Slanina et al., 2006). In den Untersuchungen konnte die Interaktion der Proteine sowohl in kleinen, intranukleären Foci als auch in großen, fast den gesamten Zellkern einnehmenden Rep-ICP8-Komplexen gezeigt werden. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die Kolokalisation die Anwesenheit von AAV-ssDNA und ITR-flankierter AAV-DNA erfordert.

In dieser Arbeit konnte durch die *in vitro*-Untersuchung die DNA-Bindungsdomäne von Rep78 als verantwortliche Domäne für die ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8 beschrieben werden. Durch die nachfolgend beschriebenen Experimente sollte überprüft werden, ob sich die Ergebnisse mit den dabei analysierten Rep78-Aminosäureaustauschmutanten, also den N-

terminalen Punkt- und Doppelmutanten und der Mutante Rep78K340H auf die Immunfluoreszenzanalyse übertragen ließen. Der Vergleich der *in vivo*-Interaktion von Rep78-Wildtyp und der Rep78-Mutanten mit ICP8 erfolgte auf Grundlage des oben genannten Transfektionssystems. Dafür wurden Plasmide konstruiert, die das vollständige AAV-Genom enthielten, aber auf Grund zusätzlich eingeführter Mutationen ausschließlich Wildtyp-Rep78 bzw. die Rep78-Punktmutanten exprimierten. Um die Verteilung und die Kolokalisation der Proteine in der Doppelimmunfluoreszenz zu analysieren wurden Rep78 und ICP8 mit spezifischen Antikörpern und fluoreszierenden Sekundärantikörpern markiert. Die Bilder wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes gewonnen. Die Schichtdicke der untersuchten Ausschnitte betrug 0,8 µm, wodurch beim Nachweis einer Kolokalisation von Rep78 und ICP8 eine tatsächliche Interaktion gewährleistet war.

4.2.1 Darstellung der unabhängigen zellulären Lokalisation von Rep und ICP8

Zur Überprüfung der zellulären Lokalisation von AAV-Rep und der ICP8-Komplexe wurden die beteiligten Proteine zunächst unabhängig voneinander untersucht. Nach der Transfektion der an der Komplexbildung HSV-Gene UL5, UL8, UL29 und UL52 ließ sich in der Immunfluoreszenz das erwartete ICP8-Verteilungsmuster darstellen. (Abb. 4.14 A). In den untersuchten Zellen waren die zahlreichen kleinen, für eine HSV-Infektion typischen, intranukleär disseminierten ICP8-Foci nachweisbar. Nur vereinzelt waren auch größere Komplexe zu erkennen. Der gegen den primären ICP8-Antikörper gerichtete fluoreszierende Sekundärantikörper war Fluorescein-(FITC)-gekoppelt, weshalb das Protein in dieser Untersuchung grün repräsentiert war.

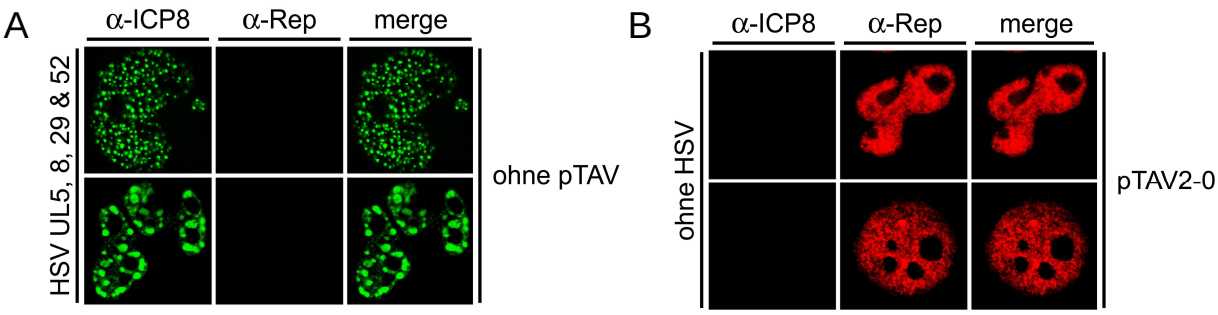


Abb. 4.14: Überprüfung der Komponenten der *in vivo*-Immunfluoreszenzuntersuchung. (A) Die Transfektion der vier HSV-Helfergene UL5,UL8, UL29 und UL52 führte überwiegend zur Formierung zahlreicher kleiner, intranukleärer Komplexe. Es waren aber teilweise auch Nuklei mit größeren Komplexen nachweisbar. (B) Die alleinige Trankfektion des AAV-Wildtyp-Plasmids pTAV2-0 resultierte in einer schwachen bis mäßigen Rep-Expression und einer homogenen, intranukleären Verteilung des Proteins. Die untersuchten Zellen wurden nach dem Formaldehyd-Triton-Protokoll fixiert, mit spezifischen α-Rep und α-ICP8-Primär- und fluoreszierenden Sekundärantikörpern markiert und im konfokalen Laser-scanning-Mikroskop untersucht. Die Schichtdicke betrug 0,8 µm.

Zur Überprüfung der Rep-Expression und Rep-Verteilung wurde das AAV-wildtyp-Plasmid pTAV2-0 transfiziert. Rep78/68 zeigten eine schwache Expression und waren wie erwartet intranukleär homogen verteilt (Abb. 4.14 B). Der verwendete Antikörper erkannte sowohl Rep78 als auch Rep68, daher konnte bei dieser Transfektion nicht zwischen beiden Proteinen differenziert werden. Durch die Detektion mit einem Alexa-Fluor594-gekoppelten Sekundärantikörper war Rep im roten Kanal nachweisbar und wurde in den Abbildungen entsprechend dargestellt.

Trotz der Transfektion der einzelnen an der Interaktion beteiligten Komponenten wurden die Zellen mit sämtlichen in der Kolokalisationsuntersuchung verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern versetzt. In der Auswertung konnte dadurch die Spezifität der verwendeten Antikörper für die beteiligten Proteine gewährleistet werden.

4.2.2 Klonierung einer Rep78-exprimierenden AAV-Mutante und deren Vergleich in der Immunfluoreszenzuntersuchung mit dem AAV-Wildtyp-Plasmid

Um die Immunfluoreszenzanalyse von Rep78 und der Rep78-Mutanten im Transfektionssystem unabhängig von den weiteren AAV-Genprodukten durchführen zu können, mussten AAV-Plasmide generiert werden, die ausschließlich das jeweils untersuchte Protein exprimierten. Grundlage dieser Expressions-Konstrukte war das AAV-2-Wildtyp-Plasmid pTAV2-0, das die ITR-flankierten Rep- und Cap-Gene enthielt (Samulski et al., 1987). Für das Rep78-Wildtyp-exprimierende AAV-Konstrukt wurde über einen SfiI/SwaI-Restriktionsverdau der größte Teil des Rep-Leserahmens von pTAV2-0 durch den Rep78-Leserahmens des Plasmids pBS-Rep78 ersetzt. Dadurch wurden unter Beibehaltung der AAV-Sequenz zwei Mutationen in das Genom eingeführt. Ein Codon-Austausch an Aminosäureposition 225 (M225G) des Rep-Gens deletierte das Startcodon der kleinen Rep-Proteine Rep52 und Rep40. Eine Punktmutation

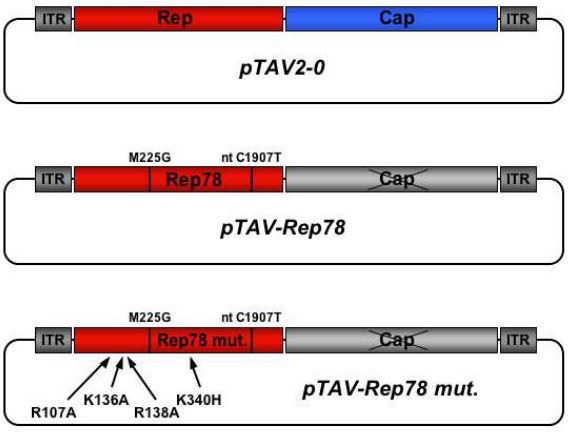


Abb. 4.15: Modell der in der Immunfluoreszenz verwendeten AAV-Plasmide. Das AAV-Wildtyp-Plasmid pTAV2-0 (oben) enthielt das gesamte Genom von AAV-2. Das davon abgeleitete Konstrukt pTAV-Rep78 (mitte) war durch die Mutation M225G des Rep52/40-Start-Codons und der *splice-donor-site* (nt C1907T) nur noch zur Rep78-Expression in der Lage. Zur Untersuchung der Punktmutanten wurden Plasmide konstruiert, die zusätzlich den entsprechenden Aminosäureausstausch trugen und damit ebenfalls nur die jeweilige Rep-Mutante exprimierten (unten).

an der AAV-Nukleotidposition 1907 (C1907T) resultierte in der Deletion der *splice-donor-site*, die bei der Bildung von Rep68/40 und der Cap-Proteine benötigt wird (Abb. 4.15). Das entstandene Plasmid pTAV-Rep78 war damit nur noch zur Expression von Rep78 in der Lage. Die Klonierung der AAV-Konstrukte zur Expression der Rep78-Punktmutanten erfolgte parallel zu pTAV-Rep78 unter Verwendung der entsprechenden mutierten Vorläuferplasmide. Die Mutante Rep78K340H trug als einzige Ausnahme nicht die M225G-Mutation und exprimierte deshalb zusätzlich Rep52K340H. Die Einführung der Mutationen wurde durch den Nachweis der veränderten Proteinexpression in der Zellkultur kontrolliert. Die zugehörigen *Western-blot*s sind in Abb. 4.19 im Kapitel 4.3.2 gezeigt und beschrieben.

In der Immunfluoreszenzanalyse wurden pTAV2-0 und pTAV-Rep78 unter Kotransfektion der vier HSV-Gene parallel untersucht. Die Auswahl der beurteilten Zellen ergab sich dabei zwangläufig aus deren Morphologie. In den Zellkernen musste neben der Rep-Expression auch die Komplexbildung der HSV-Proteine nachweisbar sein. Zellen mit detektierbarer, aber homogener ICP8-Expression wurden nicht in die Bewertung aufgenommen, weil von dem Fehlen mindestens eines weiteren HSV-Gens, also einer nicht vollständigen Kotransfektion ausgegangen werden musste.

In Abbildung 4.16 sind jeweils drei Beispiele für die intranukleäre Rep-ICP8-Kolokalisation dargestellt. Im Vergleich der beiden untersuchten AAV-Plasmide ergaben sich fast identische Ergebnisse. Das jeweils erste Beispiel für pTAV2-0 (A) bzw. pTAV-Rep78 (B) zeigt Zellkerne mit einer schwachen Rep-Expression, in denen mehrere kleine, gut abgrenzbare Rep-Foci nachweisbar waren, die mit einigen der zahlreichen ICP8-Komplexe kolokalisierten.

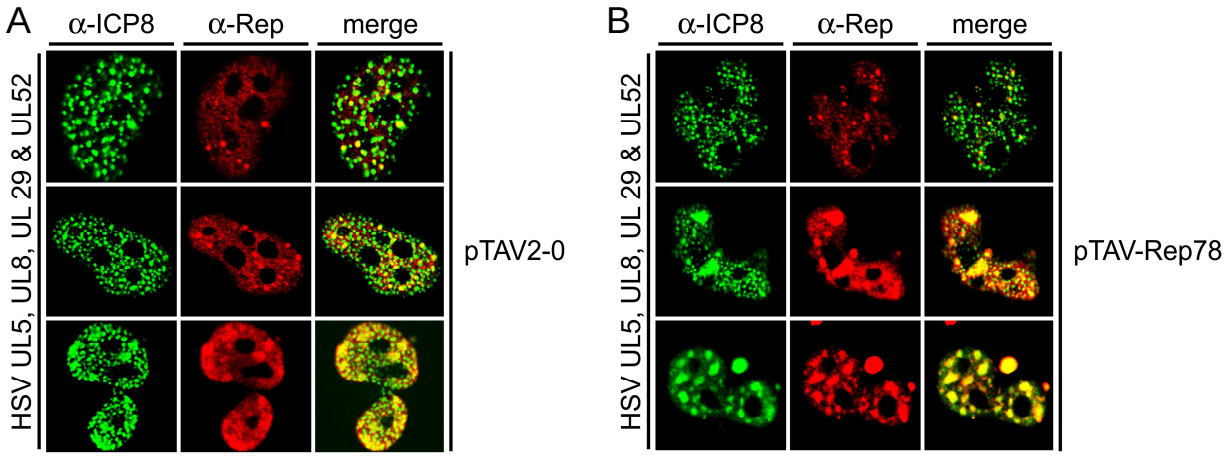


Abb. 4.16: Vergleich der Rep-ICP8-Kolokalisation bei pTAV2-0 (A) und pTAV-Rep78 (B) in der Immunfluoreszenz. Die AAV-Plasmide wurden zusammen mit den vier HSV-Helfergenen transfiziert und die Proteinverteilung und Kolokalisation von Rep und ICP8 analysiert. Bei beiden Plasmiden waren im Zellkern die charakteristischen, kleinen Rep-Foci nachweisbar, die mit einzelnen ICP8-Komplexen kolokalisierten. In der geringeren Anzahl von Zellen war auch auch die Formierung von großen Rep-ICP8-Komplexen und teilweise auch eine vollständige Umverteilung und Kolokalisation beider Proteine zu detektieren.

Dieses Verteilungsmuster war in einem Großteil der analysierten Zellen vorherrschend. Wie in den anderen Beispielen gezeigt ist, waren in manchen Nuclei auch größere Rep-Komplexe zu erkennen, die in ihrer Form und Lokalisation den ICP8-Komplexen entsprachen. In diesen Zellkernen waren neben den Rep-ICP8-Komplexen zum Teil auch noch die ursprünglichen, kleinen ICP8-Foci ohne Rep-Kolokalisation nachweisbar. In einzelnen Zellen war eine komplette intranukleäre Umverteilung von Rep und ICP8 und die vollständige Kolokalisation der untersuchten Proteine nachweisbar.

Die vergleichbaren Resultate der beiden Konstrukte pTAV2-0 und pTAV-Rep78 ließen den Schluss zu, dass Rep78 für eine Kolokalisation mit ICP8 ausreichend ist und weder die kleinen Rep- noch die Cap-Proteine für die Interaktion *in vivo* benötigt werden. Darüber hinaus war durch die Reproduktion der Kolokalisation mit dem Rep78-exprimierenden AAV-Konstrukt die Grundlage für die Untersuchung der Rep78-Punktmutanten mit Hilfe der von pTAV-Rep78 abgeleiteten Plasmide geschaffen.

4.2.3 Einfluss der Punktmutationen in Rep78 auf die Kolokalisation mit ICP8

Ausgehend von den Ergebnissen mit pTAV-Rep78 wurden die bereits *in vitro* charakterisierten Aminosäureaustauschmutanten, also die Helikase-defiziente Mutante Rep78K340H, die drei N-terminalen Einzelmutanten R107A, K136A und R138A sowie die beiden Doppelmutanten R107A/K136A und R107A/138A auf ihre *in vivo*-Interaktion mit ICP8 untersucht (Abb. 4.17).

Die Immunfluoreszenzuntersuchung ergab bei Rep78K340H eine vollständige Aufhebung der für das Wildtyp-Protein beschriebenen Interaktion. Die Verteilung der Rep78-Mutante war in sämtlichen Zellkernen homogen. Die Ausbildung der überwiegend kleinen ICP8-Komplexe waren dagegen vollständig erhalten. Eine Kolokalisation zwischen beiden Proteinen war nicht erkennbar.

Auch die N-terminalen Punktmutanten Rep78R107A, K136A und R138A zeigten in der Immunfluoreszenz ein verändertes Verhalten. In den meisten Zellkernen war eine homogene Verteilung der Mutanten und demnach keine Interaktion mit den ICP8-Komplexen nachzuweisen. Insbesondere waren in keiner der Zellen die kleinen, vereinzelten und gut abgegrenzbaren Rep-Foci zu erkennen, die für die Rep78-Wildtyp-Interaktion mit ICP8 charakteristisch waren. Allerdings konnte bei diesen Mutanten nicht von einer vollständigen Aufhebung der Interaktion ausgegangen werden, da in wenigen Nuclei eine Kolokalisation nachweisbar war. Diese war hauptsächlich in großen, schlecht abgrenzbaren Komplexen

darstellbar. Am ehesten war bei der Mutante R138A ein an das Wildtyp-Verhalten erinnerndes Bild zu erkennen, während die Mutante R107A die geringsten Wildtyp-Eigenschaften zeigte. Da sich bei den nachgewiesenen Kolokalisationen durch eine starke Rep-Expression und die inhomogenen Komplexe ein vom bekannten Muster abweichendes Bild ergab, war nicht endgültig differenzieren, ob die Mutanten zu einer residuale Interaktion in der Lage waren oder ob es sich um ein Artefakt handelte.

Die Untersuchung der N-terminalen Doppelmutanten ergab ein einheitlicheres Bild. Die Verteilung der Rep78-Mutante R107A/K136A im Zellkern war vollständig homogen und eine Kolokalisation mit den ICP8-Foci nicht nachweisbar. Auch bei der Mutante R107A/R138A war eine weitgehend homogene Verteilung zu erkennen und die Interaktion mit ICP8 bis auf wenige Ausnahmen aufgehoben. Nur noch in einzelnen Nuclei war eine schwache und schlecht abgrenzbare Rep-ICP8-Kolokalisation erkennbar, die auch in diesem Fall am ehesten als Artefakt einzuschätzen war.

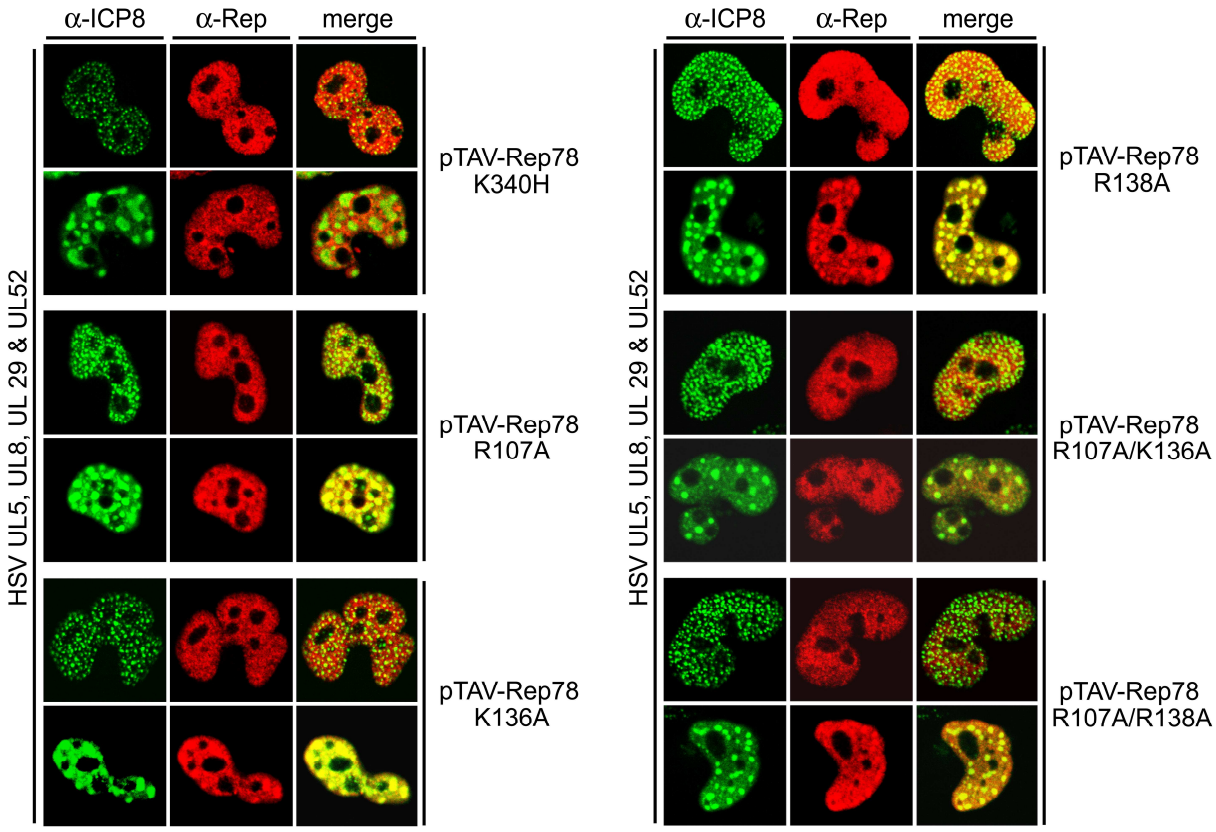


Abb. 4.17: Untersuchung der Kolokalisation der Rep78-Punktmutanten mit ICP8 in der Immunfluoreszenz. Die Untersuchung der Rep78-Aminosäureaustauschmutanten wurde im Vergleich mit dem pTAV-Rep78wt-Konstrukt durchgeführt. Für jede analysierte Rep-Mutante sind jeweils zwei repräsentative Zellkerne dargestellt. In den meisten Nuclei war die Verteilung von ICP8 in zahlreichen kleinen Foci, zum Teil aber auch in großen Komplexen zu beobachten. Das Kolokalisationsverhalten sämtlicher Rep78-Punktmutanten war im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein verändert. Eine vollständige Aufhebung der Interaktion war nur bei der Mutante K340H und der Doppelmutante R107A/K136A nachweisbar. Bei den anderen Mutanten war in manchen Zellkernen eine residuale Komplexbildung mit ICP8 zu erkennen. In der überwiegenden Zahl der analysierten Zellen war allerdings auch bei ihnen die *in vivo*-Interaktion erloschen.

4.2.4 Zusammenfassung der Kolokalisationsuntersuchung von Rep78 und ICP8

In der Immunfluoreszenzuntersuchung wurden die Rep78-Punktmutanten untersucht, die bereits in *vitro* auf ihre Interaktion mit ICP8 getestet wurden. Dabei sollte der Einfluss der Mutationen auf die Rep-ICP8-Kolokalisation aufgeklärt werden. Das Experiment basierte auf der Kotransfektion von mutierten AAV-Plasmiden mit den vier minimal erforderlichen HSV-Helfergenen. Mit der Untersuchung des Konstruktes pTAV-Rep78 wurde zunächst demonstriert, dass Rep78-Wildtyp allein in der Lage war, mit ICP8 zu kolokalisieren. Davon ausgehend konnte gezeigt werden, dass alle Mutationen zu einer veränderten intranukleären Verteilung und einem veränderten Kolokalisationsverhalten der entsprechenden Rep78-Mutante führten. Aus den Mutationen K340H und R107A/K136A resultierte eine vollständige, bei der Doppelmutante R107A/R138A eine fast vollständige Aufhebung der Rep78-ICP8-Komplexbildung. Bei den N-terminalen Einzelmutanten R107A, K136A und R138A war ebenfalls eine deutlich beeinträchtigte *in vivo*-Interaktion zu beobachten. Neben der großen Zahl an Zellkernen mit homogener Rep-Verteilung und aufgehobener Kolokalisation waren aber insbesondere bei R138A noch Nuclei mit erhaltener Kolokalisation nachzuweisen. Dabei zeigten die entsprechenden Kolokalisationen allerdings ein weitgehend atypisches Bild. Insbesondere waren die charakteristischen, kleinen Kolokalisations-Foci nicht nachweisbar.

Mit der Immunfluoreszenzanalyse konnte sowohl die Notwendigkeit einer funktionellen Helikase- als auch einer intakten DNA-Bindungsdomäne von Rep78 für die Interaktion mit ICP8 *in vivo* demonstriert werden. Bei den N-terminalen Punktmutanten konnten damit die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchung bestätigt werden. Die Resultate mit der replikationsdefizienten Mutante Rep78K340H, bei der die ICP8-Interaktion *in vivo* ebenfalls aufgehoben, die ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8 *in vitro* aber erhalten war, führten dagegen zu der Vermutung, dass die Rep78-ICP8-Interaktion *in vivo* zusätzlich von der AAV-DNA-Replikation abhängig ist.

4.2.5 Einführung einzelsträngiger rAAV-DNA zur Komplementierung der DNA-Replikationsdefizienz von Rep78K340H in der Immunfluoreszenz

Bei der Mutante Rep78K340H wurden in den Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* abweichende Ergebnisse erzielt. Während die ssDNA-abhängige Interaktion *in vitro* erhalten war, war die Kolokalisation *in vivo* vollständig aufgehoben. Da bei dieser Mutante die DNA-Bindung erhalten war, wurde vermutet, dass ihre Replikationsdefizienz Ursache der erloschenen *in vivo*-Interaktion war. Um die Annahme zu bestätigen, dass durch die aufgehobene DNA-Replikation

bei Rep78K340H keine ssDNA für die Interaktion mit ICP8 mehr zur Verfügung gestellt werden konnte, wurde ein zusätzliches Immunfluoreszenzexperiment durchgeführt, in dem versucht wurde, die Replikationsdefizienz durch das Einführen von AAV-ssDNA zu komplementieren.

Zunächst wurde das Konzept verfolgt, das AAV-Konstrukt pTAV-Rep78K340H gemeinsam mit einem Rep68-exprimierenden Plasmid zu transfizieren. Durch das Wildtyp-Rep68 sollte die AAV-DNA repliziert und die zur Kolokalisation mit ICP8 notwendige ssDNA zu Verfügung gestellt werden. Damit wäre eine Interaktion der replikationsdefizienten, aber DNA-bindungskompetenten Mutante Rep78K340H mit ICP8 möglich gewesen. Die Eigenschaft der Rep-Proteine zu multimerisieren hätte allerdings dazu geführt, dass sich Komplexe aus Wildtyp-Rep68 und der Rep78K340K bilden und die Aktivität der beiden Proteine bei der Kolokalisation mit ICP8 nicht mehr zu differenzieren gewesen wäre. Darüber hinaus hätte Rep78K340H als *trans*-dominant negative Mutante die AAV-Replikation inhibiert (Chiorini et al., 1994a; Kyöstiö et al., 1995; Kyöstiö und Owens, 1996). Weil dadurch zusätzlich die für die Rep-ICP8-Interaktion notwendig DNA-Synthese in Frage gestellt worden wäre, wurde dieses Konzept verlassen.

In einem Modellexperiment wurde stattdessen versucht, die fehlende AAV-ssDNA durch eine rAAV-Infektion einzuführen. Dazu wurde Rep78K340H unter einem heterologen Promoter mit den vier essentiellen HSV-Genen kotransfiziert und die Zellen anschließend mit einem rekombinantem AAV überinfiziert. Durch eine hohe MOI (*multiplicity of infection*) von 10^5 Partikeln pro Zelle sollte eine ausreichende Menge an ssDNA in die Zelle eingebracht werden, um eine Umverteilung von Rep78K340H und die Kolokalisation mit ICP8 zu erreichen. In der Auswertung der Immunfluoreszenzdaten zweier unabhängiger Versuche ergaben sich allerdings keine belastbaren Ergebnisse. Eine Begründung war darin zu suchen, dass der erwartete Prozess in diesem sehr unphysiologisch aufgebauten Experiment generell nicht nachvollziehbar war. Eine weitere mögliche Ursache war, dass trotz der sehr hohen MOI nicht genügend ssDNA-Moleküle für eine lichtmikroskopisch nachweisbare Kolokalisation von Rep78 und ICP8 vorlagen, insbesondere wenn man bedenkt, dass im Falle einer schlechten Transduktionseffizienz von 1:100, also einem transduziertem rAAV-Genom pro100 Partikel, nur noch 100 DNA-Moleküle den Zellkern erreichen.

4.3 Untersuchung der DNA-Replikationsfähigkeit der Rep78-Punktmutanten

In den bisher vorgestellten Experimenten wurde der Einfluss der Punktmutationen auf die Rep78-ICP8-Interaktion *in vitro* und *in vivo* analysiert. Um eine bessere Beurteilung und Diskussion der *in vivo*-Kolokalisationsuntersuchungen zu erlauben, wurde zusätzlich die Replikationsfähigkeit der Rep78-Mutanten untersucht. Da Rep78R107A, K136A und R138A in Voruntersuchungen als DNA-bindungsdefizient, Endonuklease-negativ und integrationsdefizient charakterisiert wurden, konnte bereits eine Beeinträchtigung ihrer Replikationskompetenz vermutet werden (Urabe et al., 1999). Da die N-terminalen Einzelmutanten in dieser Arbeit aber *in vitro* zum Teil noch mit ICP8 interagierten und auch *in vivo* kein einheitliches Interaktionsverhalten zeigten, sollte diese Untersuchung klären ob bei den genannten Punktmutanten und den Doppelmutanten R107A/K136A und R107A/R138A eine Restaktivität bei der DNA-Replikation erhalten war. Rep78K340H wurde bereits als replikationsdefizient beschrieben und daher als Kontrolle mitgeführt (Chejanovsky und Carter, 1990; Kleinschmidt et al., 1995).

Die Rep78-Mutanten wurden in zwei unabhängigen Experimenten untersucht. Im ersten Versuch wurden Plasmide, die nur die Rep78-Mutanten exprimierten, mit einem rAAV-Plasmid als Replikationsmatrize in kotransfiziert. Im zweiten Ansatz wurden die in der Immunfluoreszenz verwendeten pTAV-Plasmide transfiziert. In beiden Fällen wurden die Zellen anschließend mit Adenovirus überinfiziert, da eine Infektion im Vergleich zur Transfektion der Helfergene als effizienter und dadurch ein besserer Nachweis von Replikationsprodukten gewährleistet war. Die niedermolekulare Virus-DNA wurde aus den kultivierten Zellen nach dem Hirt-Protokoll isoliert (Hirt, 1976) und die Replikationsprodukte und Replikationsintermediate im *Southern-Blot* mit spezifischen DNA-Sonden nachgewiesen.

4.3.1 Untersuchung der Replikationsfähigkeit durch Kotransfektion mit rAAV-DNA

Bei der ersten Untersuchung wurde die Replikationsfähigkeit der Punktmutanten durch die Kotransfektion des rekombinanten AAV-Plasmids pTR-UF5 mit Rep78- bzw. den Rep78-Mutanten und anschließender Adenovirusinfektion überprüft. In diesem Experiment war eine von der AAV-DNA-Replikation unabhängige Rep-Expression und damit eine bessere Beurteilung der untersuchten Mutanten gewährleistet. Das AAV-Konstrukt pTR-UF5, das das von den AAV-ITRs flankierte EGFP-Gen und regulatorische DNA-Sequenzen enthielt, diente in diesem Versuch als Replikationsmatrize (Klein et al., 1998). Rep78 bzw. die Rep78-Mutanten wurden in

trans unter PGK-(Phosphoglyceratkinase)-Promoterkontrolle exprimiert. Die Überinfektion erfolgte mit Adenovirus Typ 2 mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 100 Viren pro Zelle. Die extrahierte rAAV-DNA wurde im *Southern-Blot* mit einer spezifischen, ^{32}P-dCTP-markierten EGFP-Sonde detektiert.

In Abbildung 4.18 ist der *Southern-Blot* des beschriebenen Experiments (A) zusammen mit dem *Western-Blot* zur Kontrolle der Rep-Expression (B) dargestellt. Auf der rechten Seite (Spuren 6 bis 12) sind die Ergebnisse der Replikationsuntersuchung von Rep78 und der Rep78-Mutanten dargestellt. In Anwesenheit von Wildtyp-Rep78 und nach Adenovirus-Infektion waren die verschiedenen Replikationsintermediate und damit die rAAV-Replikation nachweisbar (Spur 6). Auf der Höhe von 3,4 Kilobasenpaaren (kbp) war die monomer-duplex, also doppelsträngige, ein rAAV-Genom umfassende Replikationsform (RF1) zu erkennen. Bei ca. 6,8 kbp konnte die dimer-duplex, also zwei Genome enthaltende Replikationsform (RF2) detektiert werden. Außerdem waren mehrere höhermolekulare Replikationsintermediate erkennbar. Einzelsträngige rAAV-DNA war, vermutlich aufgrund der geringen Inkubationszeit in der Zellkultur, nicht nachzuweisen. Mit dem Nachweis der rAAV-Replikation durch Wildtyp-Rep78 als

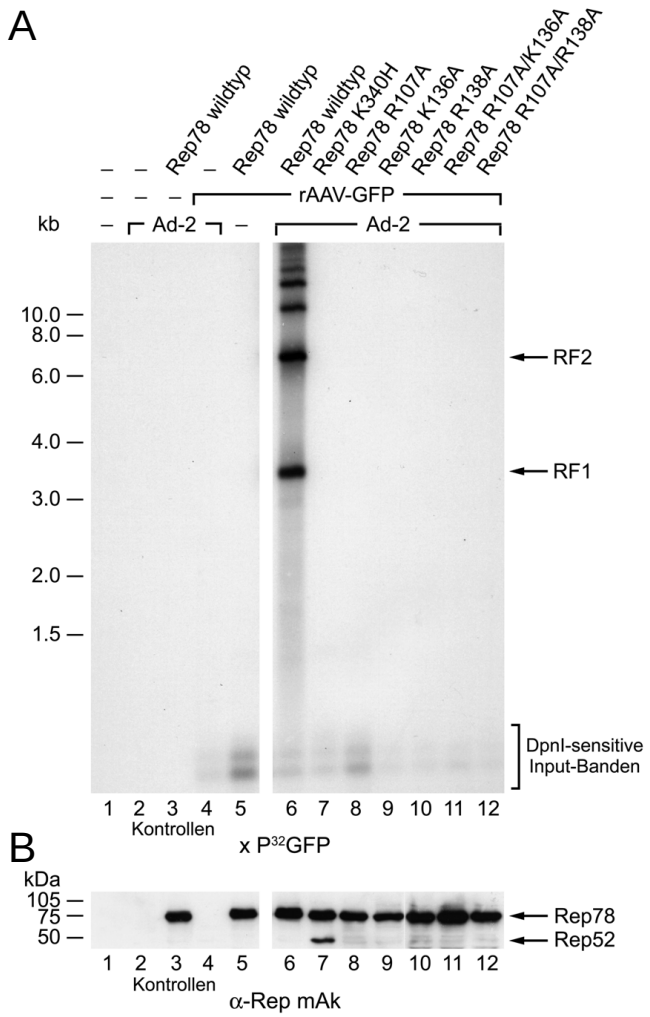


Abb. 4.18: Untersuchung der Replikationsfähigkeit der Rep78-Punktmutanten unter heterologer Promotorkontrolle. (A) Um bei der Untersuchung der Rep78-Punktmutanten eine von der Proteinexpression unabhängige AAV-Replikation zu gewährleisten wurden die Mutanten unter Kontrolle des heterologen PGK-Promoters exprimiert. Sie wurden mit dem rekombinanten AAV-Kontrukt pTR-UF5 (rAAV-GFP) als Replikationsmatrize in HeLa-Zellen kotransfiziert nach 24h mit Adenovirus (Ad-2) überinfiziert. Nach Hirt-Extraktion wurde die replizierte rAAV-DNA mit einer spezifischen pTR-UF5-(GFP)-Sonde im *Southern-Blot* detektiert. Auf der linken Seite (Spuren 1-5) wurden die Kontrollen aufgetragen. Eine Replikation war nicht nachweisbar. Rechts wurden die Mutanten im Vergleich zu Rep78 dargestellt. Nur beim Wildtyp-Protein (Spur 6) waren die charakteristischen Replikationsbanden (RF1/RF2 = Replikationsform 1 bzw. 2) nachweisbar. Sämtliche Mutanten waren replikationsdefizient. Am unteren Bildrand wurde die DpnI-verdaute eingesetzte Plasmid-DNA detektiert. (B) Die gleichmäßige Rep-Expression wurde im Western-Blot kontrolliert. Wegen des Fehlens der M225G-Mutation bei Rep78K340H (Spur 7) war bei dieser Mutante zusätzlich Rep52K340H nachweisbar.

Positivkontrolle war die Untersuchung der Rep78-Mutanten gewährleistet. Rep78K340H wurde bereits in mehreren Veröffentlichungen als replikationsdefizient beschrieben (Chejanovsky und Carter, 1990; Kleinschmidt et al., 1995). Erwartungsgemäß wurden bei dieser Mutante keine DNA-Replikationsbanden nachgewiesen (A, Spur 7). Die Spuren 8 bis 12 zeigen die Ergebnisse der Replikationsexperimente der N-terminalen Aminosäureaustauschmutanten von Rep78. Weder bei den drei Einzelmutanten R107A, K136A bzw. R138A (8 bis 10) noch bei den Doppelmutanten R107A/K136A und R107A/R138A (11 & 12) konnten spezifische rAAV-Replikationsbanden detektiert und damit bei keiner der Mutanten DNA-Replikation nachgewiesen werden. Auch nach längerer Exposition des *Southern-Blots* zum Nachweis geringerer Mengen DNA waren keine Banden zu erkennen. Alle getesteten Mutanten waren demnach vollständig replikationsdefizient. Dieses Resultat widersprach der Vermutung, dass neben der teilweise erhaltenen Rep78-ICP8-Interaktion *in vitro*, insbesondere bei den Mutanten K136A und R138A, auch eine Restaktivität bei der DNA-Replikation vorhanden sein könnte.

In den Kontrollen (Spuren 1 bis 5) war erwartungsgemäß keine rAAV-Replikation nachweisbar. Dadurch dass in den Ansätzen, in denen keine rAAV-DNA transfiziert wurde (1 bis 3) auch keine *Input*-Banden nachweisbar waren, wurde die Spezifität der *Southern-Blot*-Sonde bestätigt. In allen anderen Spuren (4 bis 12) wurde die DpnI-verdaute *Input*-DNA am unteren Bildrand des pTR-UF5-Plasmids detektiert. Im *Western-Blot* (B) wurde die gleichmäßige Expression von Rep78 und der Rep78-Mutanten sichergestellt. Die Proteinextrakte wurden parallel zu den Ansätzen des Replikationsexperimentes bearbeitet. In Spur 7 war neben Rep78K340H eine weitere Proteinbande nachweisbar. Es handelte sich um Rep52, da in diesem Plasmid das Start-Codon der kleinen Rep-Proteine nicht deletiert war. Das Protein, das ebenfalls die Mutation K340H trug, hatte aber keinen Einfluss auf das Ergebnis des Experiments.

4.3.2 Untersuchung der Replikationsfähigkeit der punktmutierten AAV-Konstrukte

In der zweiten Replikationsuntersuchung wurden die AAV-Plasmide analysiert, die bereits in der Immunfluoreszenzuntersuchung verwendet wurden. Im Gegensatz zur vorherigen Analyse handelte es sich bei diesem Experiment um eine einfache Transfektion mit nachfolgender Adenovirusinfektion. Der experimentelle Ablauf folgte der zuvor beschriebenen Untersuchung. Die radioaktiv markierte Sonde wurde so synthetisiert, dass sie spezifisch das Cap-Gen der AAV-DNA detektierte.

Im *Southern Blot* (Abb. 4.19 A) war nur bei den Plasmiden pTAV2-0 (Spur 4) und pTAV-Rep78 (Spur 5) AAV-DNA-Replikation nachweisbar. Bei beiden Konstrukten waren

jeweils zwei deutliche Banden zu erkennen. Die untere Bande repräsentierte die monomere, doppelsträngige Replikationsform (RF1) von AAV. Die Molekülgröße entsprach den erwarteten 4,7 Kilobasenpaaren (kbp). Die zweite Bande bei 9,4 kbp stellte die dimer-duplex Replikationsform (RF2) dar. Höhermolekulare Banden und einzelsträngige Replikationsprodukte waren nicht nachweisbar. Im Vergleich der beiden Ansätze von pTAV2-0 und pTAV-Rep78 ließ sich feststellen, dass das ausschließlich Rep78 exprimierende Konstrukt die gleiche Aktivität bei der AAV-DNA Replikation besaß wie das Wildtyp-Plasmid, bei dem sämtliche AAV-Proteine exprimiert wurden. Das Rep78-Konstrukt eignete sich damit auch als Grundlage für die Untersuchung der Punktmutanten und als Positivkontrolle bei der Kontrolle ihrer Replikationsfähigkeit.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit pTAV2-0 bzw. dem Wildtyp-Rep78 exprimierenden Konstrukt war in keiner der untersuchten Rep78-Einfach- und Doppelmutanten eine AAV-Replikation nachweisbar (Spuren 6-11). Bei pTAV-Rep78 K340H (Spur 6) war dieses Resultat von vornherein zu erwarten (Chejanovsky und Carter, 1990; Kleinschmidt et al., 1995).

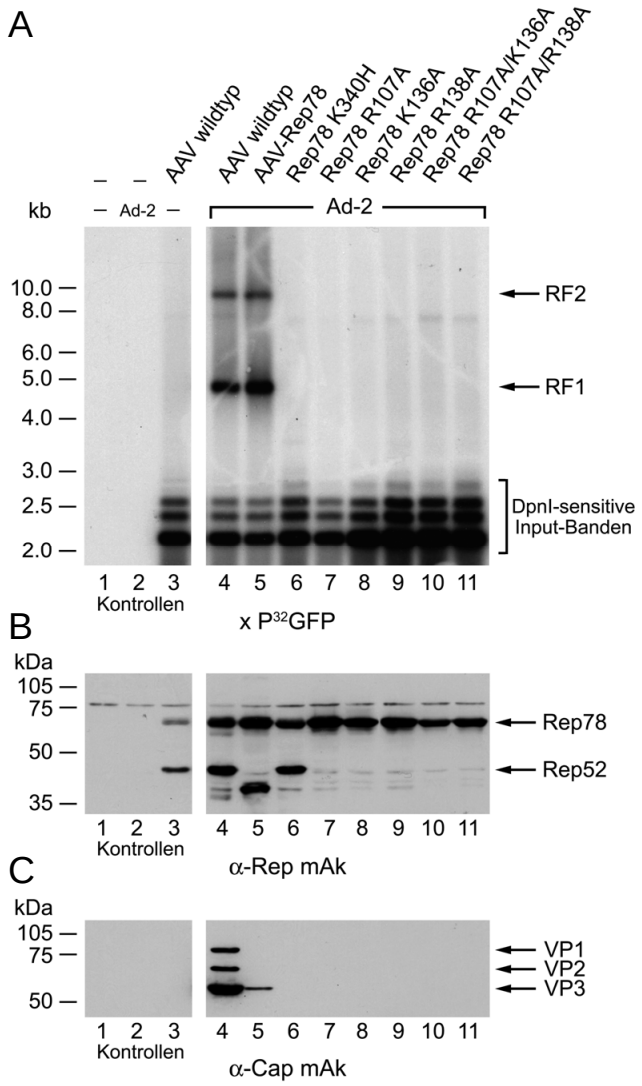


Abb. 4.19: Untersuchung der Replikationsfähigkeit und die Überprüfung der Proteinexpression der pTAV-Konstrukte. (A) Zur Untersuchung der Wildtyp- und der mutierten pTAV-Konstrukte wurden diese in HeLa-Zellen transfiziert und mit Adenovirus überinfiziert. Die extrahierte DNA wurde im *Southern-Blot* mit einer AAV-(Cap)-Sonde detektiert. In den Kontrollen wurde keine AAV-Replikation nachgewiesen (Spur 1-3). Im Vergleich des AAV-Wildtyp-Plasmids pTAV2-0 mit pTAV-Rep78 ließ sich durch den Nachweis der typischen AAV-Replikationsformen (RF1/RF2) feststellen, dass das nur Rep78-exprimierende Konstrukt zur vollen AAV-Replikation in der Lage war (Spur 4 und 5). Die Untersuchung bestätigte zudem die Replikationsdefizienz der Punktmutanten. In diesem *Southern-Blot* wurden die verdauten Plasmid-*Input*-Banden und teilweise noch ungeschnittene *Input*-DNA bei ca.7,7 kb detektiert. (B) Im anti-Rep-*Western-Blot* war zu erkennen, dass die Rep78-Expression entgegen der Annahmen bei allem Konstrukten eine vergleichbare Stärke zeigte. Das Fehlen von weiteren Rep-Proteinen und der Cap-Proteine im anti-Cap-*Western-Blot* (C) bei den Mutanten war als Nachweis für die korrekt eingeführten Mutationen in pTAV-Rep78 zu betrachten. Die Rep52-Expression bei der Mutante K340H war bekannt (B/Spur 6). Die zusätzlich vorhandenen Banden in Spur 5 in B und C waren als artifizielles Ereignis einzuschätzen.

Bei den N-terminalen Mutanten wurden mit diesem Resultat die vorherigen Ergebnisse bestätigt. Eine vermutete Restaktivität einiger Mutanten bei der Replikation, zurückzuführen auf die teilweise erhaltene *in vitro*-Interaktion mit ICP8, war auch hier nicht zu erkennen.

Auch bei dieser Untersuchung war in keiner der Negativkontrollen AAV-Replikation nachweisbar. Bei den in allen Spuren 3 bis 11 detektierten Banden handelte es sich um die DpnI-verdaute DNA der eingesetzten Plasmide. Zusätzlich waren in einigen Spuren auch noch geringe Mengen nicht verdaute *Input*-DNA auf Höhe von ca. 7,7 kbp nachweisbar.

Die zu diesem Experiment gehörenden *Western-Blots* sind in Abbildung 4.17 B und C abgebildet. Die Proteinextrakte wurden mit anti-Rep- (B) und anti-Cap-Antikörpern (C) untersucht. Dabei war die Sicherstellung einer vergleichbaren Rep78-Expression im *Western-Blot* in diesem Experiment von besonderer Bedeutung. Unter der Voraussetzung, dass die Menge des exprimierten Rep78 bzw. der Rep78-Mutanten von der Anzahl der vorhandenen Genomkopien abhängig war, musste bei replikationsbeeinträchtigten oder replikationsdefizienten Mutanten von einer geringeren Menge AAV-DNA und konsekutiv von einer reduzierten Proteinexpression ausgegangen werden. Die resultierende negative Regulierung des gesamten Replikationssystem hätte eine Beurteilung der Rep-abhängigen DNA-Replikation bei den Mutanten nicht zugelassen. Im Gegensatz zur angestellten Vermutung ließ sich im anti-Rep-*Western-Blot* (B) jedoch eine vergleichbare Expression der Rep78-Mutanten untereinander (Spuren 6-11) und im Vergleich zum Wildtyp-Rep78 der Konstrukte pTAV2-0 bzw. pTAV-Rep78 nachweisen. Dass trotz einer einschränkten Replikation eine starke Proteinexpression erreicht wurde, war durch die hohe Plasmid-Kopienzahl, die nach der Transfektion in der Zelle vorlag zu erklären. Durch die im West*ern-Blot* demonstrierte vergleichbare Expression von Rep78 und sämtlichen Rep78-Mutanten war damit die Beurteilung und Vergleichbarkeit des zugehörigen Replikationsexperimentes gewährleistet.

Anhand des veränderten Rep- und Cap-Expressionsmusters im Vergleich zum Wildtyp-AAV-Plasmid wurden außerdem die in die pTAV-Konstrukte eingeführten Mutationen bestätigt (siehe Kapitel 4.2.2). Beim AAV-Wildtyp-Plasmid waren Rep78 und Rep52 deutlich zu erkennen und zusätzlich Rep68 als schwache Bande nachzuweisen (B, Spur 4). Rep40 war von einer in allen Ansätzen vorhandenen Hintergrundbande nicht deutlich abzugrenzen. Außer den Rep-Proteinen waren auch alle drei Cap-Spezies, VP1, VP2 und VP3 nachweisbar, von denen VP3 am stärksten exprimiert wurde (C, Spur 4). Nach der Transfektion von pTAV-Rep78 ließen sich im anti-Rep-*Western-Blot* zwei Banden nachweisen (B, Spur 5). Rep78 wurde stark exprimiert, im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt waren aber weder Rep68, noch Rep52 zu erkennen. Das Expressionsmuster stimmte mit den Erwartungen an die eingeführten Mutationen überein. Rep68

wurde wegen der deletierten *splice donor site* nicht gebildet. Die Mutation M225G, die das Startcodon der kleine Rep-Proteine deletiert, führte zum Fehlen von Rep52. Diese Mutationen schlossen auch die Bildung von Rep40 aus. Bei der im *Blot* zusätzlich vorhandenen Bande, die etwa auf der Höhe von Rep40 zu sehen war, handelte es sich daher vermutlich um das Protein eines artifiziellen Transkriptionsprodukte oder um eine unspezifische Bande. Im anti-Cap-*Western-Blot* war bei pTAV-Rep78 eine Bande auf Höhe von VP3 zu erkennen (C, Spur 5). Da die Bildung von Cap-Proteinen durch die Mutation der *splice-donor site* ausgeschlossen war, handelte es sich bei der Darstellung dieser Bande ebenfalls um ein artifizielles Ereignis. Die Mutation der *splice-donor site* wurde bei diesem Konstrukt durch das Fehlen von Rep68 und durch das Fehlen der Cap-Proteine in den aus diesem Plasmid abgeleiteten Mutanten (C, Spuren 6-11) bestätigt. Bei der Mutante Rep78K340H war im anti-Rep-*Western-Blot* Rep52K340H nachweisbar, da dieses Plasmid nicht den Codonaustausch M225G enthielt (B, Spur 6). Bei allen anderen pTAV-Konstrukten bewies das Fehlen spezifischer Rep- oder Cap-Banden mit Ausnahme der Rep78-Bande die eingeführten Mutationen.

4.3.3 Zusammenfassung der Replikationsuntersuchungen der Rep78-Punktmutanten

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die Replikationsfähigkeit der Rep78-Punktmutanten in zwei unabhängigen Systemen untersucht. Bei einem Experiment handelte es sich um die Kotransfektion eines rAAV-Plasmids mit einem Rep-Expressionskonstrukt, beim anderen Versuch um die Transfektion von AAV-Konstrukten, die Rep78 und dessen Mutanten exprimierten. Die Replikation der einzelnen Mutanten nach Adenovirusinfektion wurde im *Southern-Blot* analysiert. Die Verwendung von AAV-verwandten Konstrukten entsprach dabei der *cis*-regulierten Wildtyp-Replikation. Das ausschließlich Rep78 exprimierende AAV-Plasmid pTAV-Rep78 war replikationskompetent und zeigte die gleiche Aktivität wie das Wildtyp-Konstrukt pTAV2-0. Damit war eine auf diesem Plasmid basierende Untersuchung der Mutanten möglich. Die Verwendung einer rekombinanten AAV-Matrize und eines heterologen Promoters zur Rep-Expression ließ dagegen die unabhängige Beurteilung der AAV-Replikation zu. Dieses Experiment schloss eine negative Regulierung der sich gegenseitig beeinflussenden Proteinexpression und Replikation aus.

Im Ergebnis wurde bei beiden Untersuchungen gezeigt, dass Rep78 allein zur AAV-DNA-Replikation in der Lage war. Die N-terminalen Einzelmutanten R107A, K136A und R138A und die Doppelmutanten R107A/K136A und R107A/R138A konnten dagegen sämtlich als replikationsdefizient charakterisiert werden.

5 Diskussion

Die Interaktion zwischen dem multifunktionellen Nichtstrukturprotein Rep78 des adeno-assoziierten Virus und dem Einzelstrang-DNA-bindenden Protein ICP8 des Herpes Simplex Virus initiiert die HSV-vermittelte AAV-Replikation. Die Analyse der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dient dem Verständnis der besonderen Abläufe bei der Helfervirus-abhängigen Vermehrung einzelsträngiger DNA-Viren. Die Anwendung von AAV-basierten Vektoren in der Gentherapie, die sichere und effiziente Produktionssysteme erfordert, misst der genauen Kenntnis der AAV-Replikationsprozesse eine zusätzliche Bedeutung bei.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Domäne von Rep78 charakterisiert, die für die AAV-ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8 und damit für Initiation der HSV-abhängigen Replikation von AAV verantwortlich ist. Folgende Ergebnisse konnten gewonnen werden:

1) Die ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8 wird über die DNA-Bindungsdomäne von Rep78 vermittelt. Die Mutation einzelner konservierter Aminosäuren im Rep78-N-Terminus führte *in vitro* zum Verlust der ssDNA-stimulierten Interaktion mit ICP8. Der C-Terminus und die Helikase-Domäne von Rep78 haben auf *in vitro*-Interaktion dagegen keinen Einfluss.

2) Die DNA-Bindungsdomäne ist auch für die Interaktion von Rep78 und ICP8 *in vivo* essentiell. Die N-terminalen Punktmutationen resultierten in der Aufhebung der intranukleären Kolokalisation beider Proteine. Zudem ist die Rep78-Helikase-Aktivität für die *in vivo*-Interaktion mit ICP8 von Bedeutung.

3) Die N-terminalen Rep78-Punktmutanten sind DNA-replikationsdefizient. Unter Verwendung von heterologen und AAV-basierten Rep-Expressionkonstrukten wurde die Aufhebung der AAV-DNA-Replikation im Vergleich zum Wildtyp-Protein nachgewiesen.

5.1 Interaktion von Rep78 und ICP8 *in vitro*

5.1.1 Direkte Rep78-ICP8-Interaktion

In den *in vitro*-Untersuchungen zur Interaktion von AAV-Rep78 mit HSV-ICP8 lag das Hauptaugenmerk auf deren Beeinflussung bzw. Stimulation durch AAV-ssDNA. In Übereinstimmung mit Voruntersuchungen konnte jedoch festgestellt werden, dass beide Proteine bereits unabhängig von der DNA interagieren (Heilbronn et al., 2003; Stracker et al., 2004). Die direkte Bindung von Rep78 mit ICP8 dürfte auch bei der zellulären Interaktion beider Proteine eine zentrale Rolle spielen und ist damit als grundlegender Prozess bei der HSV-vermittelten AAV-Replikation zu betrachten. Aus den *in vitro*-Ergebnissen konnten, trotz schwieriger Beurteilbarkeit wegen der nur schwachen Interaktion beider Proteine, Hinweise auf die verantwortlichen Domänen von Rep78 und ICP8 abgeleitet werden. Der Rep-N-Terminus ist für die direkte Interaktion von Rep78 mit ICP8 nötig, während der C-Terminus und die Helikase-Domäne von Rep wohl nicht essentiell sind. Die N-terminalen Einzelmutationen beeinflussten die Rep-ICP8-Interaktion nicht, allerdings war eine leichte Verringerung der spezifischen Bindung der Rep78-Doppelmutanten an ICP8 beobachten. Ein ähnliche Interaktion wie mit Rep78 besteht zwischen ICP8 und dem HSV-*origin*-bindenden Protein UL9. Auch bei diesem Protein überschneiden sich die DNA-Bindungsdomäne und die Domäne für die Interaktion mit ICP8, liegen im Gegensatz zu Rep78 aber im C-Terminus des Proteins (Weir et al., 1989; Deb und Deb, 1991). Obwohl für Rep78 und UL9 keine Strukturübereinstimmungen beschrieben sind, stützt diese Erkenntnis die Vermutung einer N-terminal gelegenen Rep-Interaktionsdomäne mit ICP8.

Die Experimente mit der Deletionsmutante ICP8ΔC, bei der die Interaktion mit Rep78 im Vergleich zum Wildtyp-ICP8 erhalten bzw. gesteigert war, schließen eine Beteiligung der C-terminalen 73 Aminosäuren, vermutlich aber des gesamten C-Terminus von ICP8 an der Interaktion mit Rep78 aus. Dagegen beinhaltet der N-Terminus von ICP8 eine Domäne, über die heterologe Proteininteraktionen, wie z.B. mit Rep78, vermittelt werden könnten (Mapelli et al., 2005). Auch hier bietet sich ein Vergleich mit dem HSV-*ori-binding*-Protein UL9 an. Dessen Bindungsstelle wird innerhalb des N-Terminus von ICP8, in der Nähe der DNA-Bindungsdomäne vermutet (Manolaridis et al., 2009). Allerdings lässt sich die Frage nach der ICP8-Domäne für die Interaktion mit Rep78, auch auf Grund der unvollständigen Charakterisierung der funktionellen Bereiche von ICP8 zur Zeit nicht endgültig klären.

Über die Ergebnisse zur basalen Interaktion von Rep78 und ICP8 hinaus konnte festgestellt werden, dass AAV-dsDNA keinen Einfluss auf die direkte Bindung der beiden

Proteine hat. Die Interaktionswerte von Rep78 und ICP8 in Anwesenheit von dsDNA entsprachen denen bei Bindung ohne DNA. In der verwendeten AAV-dsDNA lagen die *inverted terminal repeats* (ITRs) nicht in ihrer *hairpin*-Konfiguration vor. Die spezifische Rep78-Bindung an die *rep binding sites* (RBS), die durch die Entfaltung der ITRs sogar doppelt vorlagen, war aber möglich (Abb. 5.1 A/Mitte). Somit ist anzunehmen, dass unter diesen Voraussetzungen ein Teil des eingesetzten Rep78 an die dsDNA bindet. Da dsDNA aber zu keiner Erhöhung der Rep-Interaktion mit ICP8 führt, ist davon auszugehen, dass die dsDNA nicht oder kaum durch ICP8 gebunden wird. Für das HSV-Protein ist zwar eine dsDNA-Bindungsfähigkeit beschrieben worden, diese ist aber wesentlich schwächer als die ssDNA-Bindung (Lee und Knipe, 1985). Eine Interaktion von ICP8 mit der dsDNA dürfte also, sofern vorhanden, nicht ausreichen, um das ITR-gebundene Rep78 im *pull-down assay* indirekt zu präzipitieren. Die in Anwesenheit von AAV-dsDNA gemessene Rep-ICP8-Interaktion beruht demnach auch hier auf der direkten Bindung von freiem, also nicht DNA-gebundenem Rep78.

5.1.2 Steigerung der Rep78-ICP8-Interaktion durch ssDNA als indirekte, ssDNA-vermittelte Interaktion

Im Vergleich zur direkten Bindung wurde in Anwesenheit von AAV-ssDNA eine zehnfach stärkere Interaktion von Rep78 und ICP8 gemessen. Als verantwortliche Domäne konnte in dieser Arbeit die DNA-Bindungsdomäne von Rep78 charakterisiert werden. Dadurch ist eine weiterführende Diskussion der ssDNA-abhängigen Rep78-ICP8-Interaktion und die Darstellung von Interaktionsmodellen möglich. Die AAV-ssDNA, mit der die gesteigerte Interaktion zwischen Rep78 und ICP8 nachgewiesen wurde, bestand aus einer einzelsträngigen DNA-Sequenz, die von den AAV-ITRs in *hairpin*-Konfiguration flankiert war. Die doppelsträngigen ITRs enthielten somit auch die *rep binding sites*, die wie bei der dsDNA eine Rep78-Bindung ermöglichten. Da es sich bei der Steigerung der Interaktion von Rep78 und ICP8 aber um einen ssDNA-vermittelten Prozess handelt und für ICP8 ist eine starke, sequenzunabhängige, kooperative ssDNA-Bindung bekannt ist, liegt als Ursache die Interaktion von ICP8 mit der ssDNA nahe. Zudem wurden in der Untersuchung die Proteinkomplexe über das (GST)-ICP8 präzipitiert, was ebenfalls die Beteiligung von ICP8 belegt. Dass dsDNA im Gegensatz zu ssDNA kein adäquates Substrat für eine ICP8-Bindung darstellt, erklärt dabei, warum nur in Anwesenheit von ssDNA eine erhöhte Interaktion gemessen wurde. Durch die kooperative Bindung deckt ICP8 den ssDNA-Strang sehr dicht ab und hält ihn in einer ausgesteckten Konfiguration (Ruyechan, 1983; Lee und Knipe, 1985). Im *in vitro*-Experiment

wurde ICP8 mit der DNA vorinkubiert. Es ist also davon auszugehen, dass das HSV-Protein die ssDNA vor Zugabe von Rep78 vollständig abgesättigt hatte und als Rep78-Bindungsstellen nur die RBS in den endständigen ITRs blieben (Abb. 5.1 A/rechts). Das führt zu der Schlussfolgerung, dass das ITR-gebundene Rep78 über den ICP8-ssDNA-Komplex präzipitiert wurde. Die Stimulation der Rep78-ICP8-Interaktion durch die AAV-ssDNA ist demnach auf eine indirekte, DNA-vermittelte Bindung zurückzuführen. Zusätzlich ist vom Bestehen der direkten Rep78-ICP8-Interaktion auszugehen. Da diese basale Bindung aber ohne DNA sehr schwach war, dürfte sie in Anwesenheit von ssDNA ebenfalls nur einen geringen Anteil der gemessenen Interaktion ausmachen.

Das oben dargestellte Modell geht von einer ausschließlichen Rep78-Bindung an die *rep binding sites* in den endständigen ITRs der AAV-ssDNA aus. Für Rep78 wurde aber neben der spezifischen dsDNA-Bindung auch eine, im Vergleich der Dissoziationskonstanten nur geringfügig schwächere, nicht sequenzspezifische Interaktion mit ssDNA nachgewiesen (Im und Muzyczka, 1992; Yoon-Robarts et al., 2004; Casper et al., 2005). Es besteht daher die

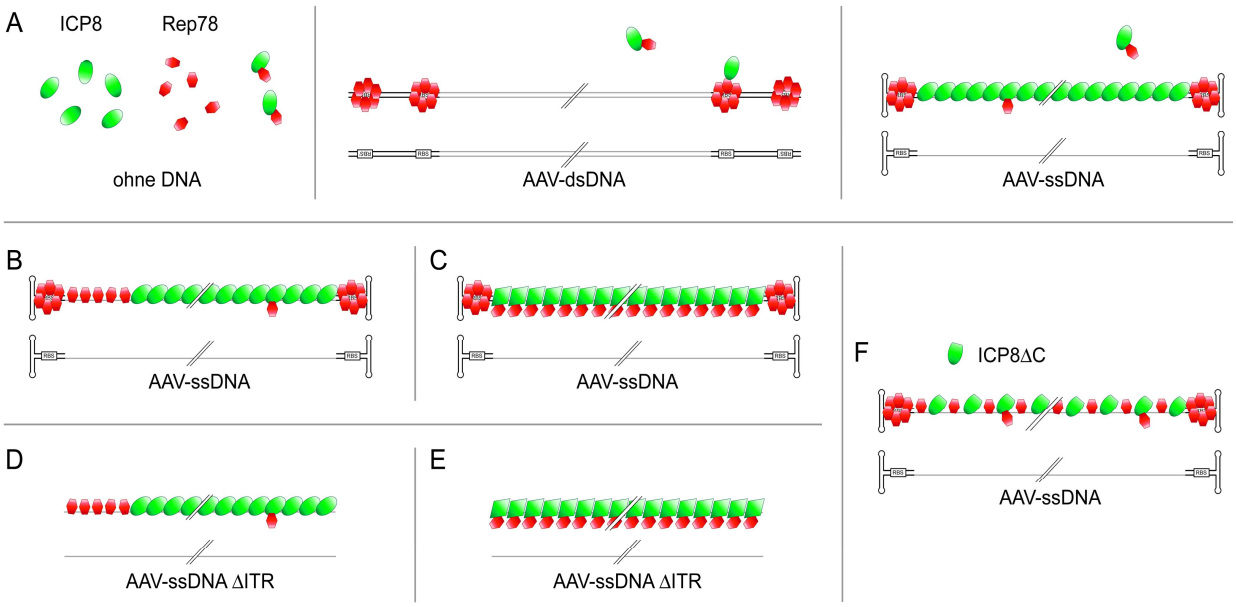


Abb. 5.1: Modelle der Rep78-ICP8-Interaktion *in vitro*. Im *in vitro*-Experiment wurde die Interaktion von Rep78 (rot) und ICP8 (grün) untersucht. (A) Ohne DNA besteht nur eine geringe direkte Interaktion zwischen den Proteinen. In Anwesenheit von AAV-dsDNA bindet Rep78 an die enthaltenen *rep binding sites*. Die schwache direkte Interaktion mit ICP8 ist erhalten. Die Stimulation der Interaktion durch AAV-ssDNA beruht auf einer indirekten, DNA-vermittelten Interaktion, bei der ICP8 an den ssDNA-Teil und Rep78 an die AAV-ITRs bindet. (B) Wenn die ssDNA nicht vollständig durch ICP8 abgedeckt ist, kann die indirekte Interaktion über eine zusätzliche Rep78-ssDNA-Bindung erfolgen. Die modellhafte Anordnung von Rep78 und ICP8 auf der ssDNA nebeneinander ist aber eher unwahrscheinlich. (D) Eine Rep-ssDNA-Bindung kann im Modell der indirekten Interaktion auch die geringere Stimulation der Interaktion durch ITR-deletierte AAV-ssDNA erklären. Die Differenz zur Interaktion mit vollständiger AAV-DNA beruht dabei auf der fehlenden Rep78-ITR-Bindung. (F) Die aufgehobene kooperative DNA-Bindung der Deletionsmutante ICP8ΔC könnte ebenfalls eine Rep78-ssDNA-Bindung erlauben, wodurch die gesteigerte Interaktion dieser Mutante mit Rep78 im Vergleich zum Volllänge-ICP8 erklärbar wäre. (C & E) Die ssDNA-Bindung ruft eine Konformationsänderung von ICP8 hervor. Dadurch könnte die direkte Rep78-Bindung gesteigert und die Stimulation der Interaktion erklärt werden. Auch hierbei würde das Fehlen der ITRs eine geringere Interaktion begründen, da über die Rep78-ITR-Bindung eine teilweise indirekte Interaktion erhalten bliebe.

Möglichkeit, dass Rep78 nicht nur an die ITRs, sondern auch an die dazwischen liegende ssDNA bindet. Auch so könnte die indirekte Interaktion vermittelt werden. Das setzt allerdings voraus, dass die ssDNA für Rep78 zugänglich, also nicht vollständig von ICP8 abgedeckt ist (Abb. 5.1 B). Dass Rep78 bereits gebundenes ICP8 von der DNA verdrängt, ist wegen der starken, kooperativen DNA-Bindung von ICP8 nicht wahrscheinlich. Zwei Untersuchungen stützen diese These: zum einen wurde gezeigt, dass ein DNA-Substrat, das nicht von ITRs flankiert, also vollkommen einzelsträngig war, auch zu einer gesteigerten Interaktion von ICP8 und Rep78 führte (5.1 D). Sie erreichte mit einer Steigerung von ca. fünf Prozent gegenüber der basalen Interaktion allerdings nicht so hohe Werte wie die ITR-flankierte DNA (Heilbronn et al., 2003). Die Differenz ist hierbei durch die fehlende Rep78-ITR-Bindung zu erklären. Das zweite Argument für eine Beteiligung der Rep78-ssDNA-Bindung beruht auf Ergebnissen dieser Arbeit mit der C-terminal verkürzten Mutante ICP8ΔC, deren Interaktion mit Rep78 im Vergleich zum Volllänge-Protein deutlich gesteigert war. Für den C-Terminus von ICP8 wurde gezeigt, dass er für die kooperative DNA-Bindung entscheidend ist (Mapelli et al., 2000). In der Annahme, dass die ICP8-Moleküle wegen der fehlenden Kooperativität nicht so dicht auf der ssDNA binden, wäre diese auch für Rep78 zugänglich und dadurch eine erhöhte Bindung des AAV-Proteins und die indirekte Interaktion mit ICP8 zu erklären (5.1 F). Bei ICP8ΔC war bereits ohne DNA eine leicht erhöhte Rep78-Bindung nachweisbar, deren Ursache nicht geklärt ist. Die direkte Bindung lag aber deutlich unter der ssDNA-vermittelten Interaktion, so dass ihr Einfluss in Anwesenheit von ssDNA unwahrscheinlich ist.

Beim Modell der ssDNA-vermittelten Interaktion zwischen Rep78 und ICP8 stellt sich zusätzlich die Frage, ob ein Protein, in diesem Fall das zuerst gebundene ICP8, das andere über seine direkte Bindung an die DNA rekrutiert. Beide Proteine besitzen unabhängig voneinander starke DNA-bindende Eigenschaften, die es ihnen ermöglichen, selbstständig an das Substrat zu binden. Die an den 4500 einzelsträngigen Nukleotiden eines AAV-DNA-Moleküls kooperativ gebundenen ICP8-Moleküle bieten allerdings eine deutlich größere Interaktionsfläche für die direkte Rep78-ICP8-Bindung als die lediglich 20 Basenpaare umfassenden *rep binding site* in den endständigen ITRs für die Rep78-DNA-Bindung. Daher ist eine Rekrutierung von Rep78 durch ICP8 und damit die Unterstützung der Rep78-DNA-Bindung durch die ICP8-vermittelte Annäherung von Rep78 an die AAV-DNA wahrscheinlich. Zusätzlich dürfte ICP8 die Rep78-DNA-Bindung unterstützen, da die ssDNA durch die kooperative ICP8-Bindung nicht-helikal entwunden wird und so die ITRs für Rep78 besser zugänglich sind. Die Stimulation der Rep78-Bindung an den isolierten ITR durch ICP8 wurde in einer anderen Untersuchung bereits nachgewiesen (Stracker et al., 2004).

5.1.3 ssDNA-induzierte Konformationsänderung von ICP8 als Ursache für die erhöhte ssDNA-abhängige Rep78-ICP8-Interaktion

Eine weitere mögliche Ursache für die Stimulation der Interaktion von Rep78 und ICP8 durch ssDNA gegenüber der Interaktion ohne DNA besteht in einer durch die ssDNA hervorgerufenen Konformationsänderung von ICP8, die die Bindung von Rep78 beeinflusst. Die Konformationsänderung von ICP8 ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beschrieben und dabei der Einfluss von ssDNA auf die ICP8-Konformation demonstriert worden (Knipe und Spang, 1982; Knipe et al., 1982; Mapelli et al., 2000; Dudas et al., 2001; Uprichard und Knipe, 2003). Dass die Konformationsänderung zu einer Veränderung von Proteininteraktionen führen kann, ist z.B. für die Interaktion von ICP8 mit HSV-UL9 gezeigt worden. Dabei ist allerdings keine Zunahme, sondern eine Aufhebung der ICP8-UL9-Bindung durch die Zugabe eines ssDNA-Oligonukleotids beschrieben worden (Gustafsson et al., 1995). Da zwischen UL9 und Rep78 keine strukturellen Übereinstimmungen bekannt sind, besteht für die Rep78-ICP8-Interaktion also auch die Möglichkeit, dass aus der ssDNA-abhängigen Konformationsänderung von ICP8 eine Stimulation der Interaktion resultiert.

Da auch bei diesem Modell von einer Rep78-ITR-Bindung auszugehen ist, würde zusätzlich zum direkt ICP8-gebundenen Rep78 das ITR-assoziierte Protein über eine ICP8-ssDNA-Interaktion präzipitiert werden (Abb. 5.1 C). Die Verbindung einer gesteigerten direkten und einer indirekten Interaktion besteht ebenfalls, wenn man annimmt, dass Rep78 zusätzlich an ssDNA bindet, die von ICP8 nicht abgedeckt wurde. Die Annahme einer ICP8-Konformationsänderung eröffnet auch eine weitere Erklärung für die geringere Interaktion von Rep78 und ICP8 in Anwesenheit von AAV-ssDNA ohne ITRs (Heilbronn et al., 2003). Vorausgesetzt Rep78 würde bei der vollständigen AAV-DNA sowohl an die ITRs als auch an das konformationsveränderte ICP8 binden, stünde bei der ssDNA ohne ITRs eine wichtige Interaktionsfläche für Rep78 nicht zur Verfügung (5.1 E). Die auf der Konformationsänderung beruhende, erhöhte direkte Bindung bliebe bestehen, würde aber nur einen Teil der Gesamtinteraktion ausmachen. Die Differenz zur starken Interaktion bei ITR-flankierter DNA wäre demnach durch die fehlende Rep78-ITR-Bindung begründet.

5.2 Rep78-ICP8-Kolokalisation *in vivo* in Abhängigkeit von der AAV-Replikation

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von Rep78 und ICP8 auch *in vivo* untersucht. In einem Koloklisationsexperiment wurden die Rep78-Punktmutanten analysiert, die für die Untersuchung der ssDNA-abhängigen *in vitro*-Interaktion von Rep78 und ICP8 verwendet wurden. Voruntersuchungen, in denen bereits verschiedene Aspekte der Proteininteraktion *in vivo* charakterisiert wurden, lassen vermuten, dass die Kolokalisation von Rep78 und ICP8 von der Replikation der AAV-DNA abhängig ist (Heilbronn et al., 2003; Slanina et al., 2006). Die hier gewonnenen Resultate unterstützen diese Annahme. Die Rep-ICP8-Interaktion wurde nach der Koinfektion von AAV und HSV als *in vivo*-Kolokalisation in intranukleären Kompartimenten nachgewiesen (Heilbronn et al., 2003). In derselben Studie wurde demonstriert, dass es zu einer Abweichung von der zuvor gezeigten Rep-Proteinverteilung kommt, wenn das *rep*-Gen nicht durch eine AAV-Infektion, sondern als *rep/cap*-Kassette in einem rekombinanten Herpes Simplex Virus eingebracht wird. Die Infektion mit rHSV*rep/cap* führte lediglich zu einer homogenen Rep-Expression im Zellkern. Die zuvor beschriebenen Rep-Foci und die Kolokalisation von Rep78 mit den weiterhin bestehenden ICP8-Kompartimenten konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Die Kolokalisation konnte allerdings durch die zusätzliche Infektion eines rekombinanten AAV und dem damit verbundenen Einbringen von AAV-ssDNA rekonstruiert werden. Daraus resultierte die Folgerung, dass die *in vivo*-Interaktion von Rep und ICP8 von der Anwesenheit der AAV-ssDNA abhängig ist. Dies ist unter Betrachtung der biochemischen Eigenschaften von ICP8 als ssDNA-bindendes Protein und der gezeigten ssDNA-stimulierten *in vitro*-Interaktion mit Rep78 schlüssig. Allerdings sind im zuletzt genannten Versuch auch die Voraussetzungen für eine AAV-DNA-Replikation gegeben. An der durch Infektion eingebrachten rAAV-DNA dürfte zwar eine Interaktion von Rep78 und ICP8 stattfinden, es ist jedoch fraglich, ob die Menge der anfangs eingebrachten DNA ausreichend ist, um lichtmikroskopisch nachweisbare Kolokalisationskomplexe zu erreichen. Die bei einer AAV-Replikation entstehenden einzelsträngigen Replikationsintermediate und Replikationsprodukte bieten dagegen ausreichend Substrat, um eine starke Proteininteraktion zwischen Rep78 und ICP8 und deutlich nachweisbare Kolokalisation zu gewährleisten.

Auch aus einer weiteren Untersuchung lässt sich die Replikationsabhängkeit der Rep-ICP8-Interaktion *in vivo* ableiten (Slanina et al., 2006). Hier wurde die Kolokalisation der Proteine durch die Kotransfektion der beteiligten HSV-Gene UL5, UL8, UL29 und UL52 und des AAV-Wildtyp-Plasmids pTAV2-0 rekonstruiert. Von pTAV2-0 ausgehend ist eine AAV-Replikation und die Bildung infektiöser Viruspartikel möglich. Das Einbringen der AAV-DNA

auf Plasmidebene bedeutet, dass diese zunächst doppelsträngig vorliegt. Wie in dieser Arbeit bestätigt wurde, hat AAV-dsDNA aber keinen Einfluss auf die Interaktion von Rep78 und ICP8. Die replikationsabhängige Bildung von ssDNA als Grundlage für die nach der Transfektion gezeigte Kolokalisation liegt also auf der Hand. Gestützt wird diese Annahme von den Ergebnissen eines zusätzlichen Experiments, in dem anstelle des AAV-Wildtyp-Plasmids ein AAV-Plasmid verwendet wurde, das keine ITRs enthielt. Dabei wurde zwar eine homogene Rep-Expression, aber keine Kolokalisation mit den ICP8-Foci demonstriert. Da die ITRs essentielle *cis*-Elemente für die Replikation der AAV-DNA sind, konnte, in Übereinstimmung mit der hier diskutierten Annahme, also auch keine replikationsabhängige Kolokalisation erreicht werden.

In dieser Arbeit wurde die Kolokalisationsfähigkeit der Rep78-Punktmutanten auf Basis des Transfektionssystems untersucht. Während mit einem Wildtyp-Rep78-exprimierenden AAV-Plasmid die Interaktion mit ICP8 demonstriert werden konnte, zeigten die Mutanten eine überwiegend homogene Rep-Expression und eine Aufhebung der Kolokalisation mit ICP8. In einem zusätzlichen Experiment konnte festgestellt werden, dass die Replikationsfähigkeit der Punktmutanten vollständig erloschen war. Die Ergebnisse mit den N-terminalen Rep78-Mutanten (R107A, K136A, R138A, R107A/K136A und R107A/R138A) lassen so ebenfalls auf die Replikationsabhängigkeit der *in vivo*-Interaktion schließen. Bei diesen DNA-bindungsdefizienten Mutanten konnte aber nicht endgültig zwischen der *in vitro* nachgewiesenen Aufhebung der ssDNA-abhängigen Rep78-ICP8-Interaktion und der aus der Mutation resultierenden Replikationsdefizienz als Ursache für die erloschene Interaktion *in vivo* unterschieden werden. Auch bei der ebenfalls replikationsdefizienten Mutante Rep78K340H war die *in vivo*-Kolokalisation mit ICP8 erloschen und das AAV-Protein homogen im Zellkern verteilt. Da diese Mutante DNA-bindungskompetent ist und auch die ssDNA-abhängige Interaktion mit ICP8 *in vitro* bei Rep78K340H vollständig erhalten war, muss der beobachtete Effekt auf der aufgehobenen DNA-Replikation beruhen.

Ein weiterer Hinweis auf den Zusammenhang zwischen der AAV-Replikation und der Rep-ICP8-Interaktion ergibt sich aus der Beobachtung, dass sich die nukleären Rep-ICP8-Komplexe mit dem Fortschreiten der Infektion vergrößern (Weitzman et al., 1996a, Wistuba et al., 1997). Auch bei der alleinigen HSV-Infektion ist eine Vergrößerung der ICP8-Foci, die die HSV-Replikationskomplexe repräsentieren, zu beobachten. Dabei ist der Übergang in das Stadium IV der HSV-Infektion und die Formierung der eigentlichen Replikationskompartimente aus den präreplikativen Komplexen von der HSV-Polymeraseaktivität abhängig und kann durch deren Inhibition verhindert werden (Burkham et al., 2001). Für die AAV-HSV-Koinfektion lässt

sich daraus ableiten, dass die Ausbildung bzw. Vergrößerung der Rep-ICP8-Komplexe ebenfalls von der Polymeraseaktivität und damit von der DNA-Replikation abhängig ist.

In der Zusammenfassung von Ergebnissen dieser Arbeit und der aufgeführten Studien lässt sich belegen, dass die Interaktion von Rep78 und ICP8 *in vivo* von der AAV-DNA-Replikation abhängig ist. Da dsDNA für eine Stimulation der Rep78-ICP8-Interaktion *in vitro* nicht ausreicht, kann bei den Transfektionsversuchen mit AAV-Plasmiden davon ausgegangen werden, dass die zur Kolokalisation notwendige ssDNA durch die AAV-Replikation zur Verfügung gestellt wird. Nur bei der Rep-Expression in *trans* durch rHSV*rep/cap* und der durch rAAV-Koinfektion zur Verfügung gestellten ssDNA ist eine Interaktion der Proteine von vornherein möglich. Dabei dürfte aber die Menge der anfangs im Zellkern vorhandenen ssDNA für den Nachweis der Kolokalisation nicht ausreichen. Zudem ist bei diesem Experiment von einer rAAV-Replikation auszugehen, also nicht zwischen einer bestehenden und einer replikationsabhängigen Interaktion zu differenzieren. Letztendlich beweist die aufgehobene Kolokalisation bei der Untersuchung der replikationsdefizienten Rep78-Mutanten und bei der Verwendung nicht replizierbarer, ITR-deletierter AAV-DNA die Abhängigkeit der *in vivo*-Interaktion von Rep78 und ICP8 von der AAV-DNA-Replikation.

5.3 Molekulare Interaktion von Rep78 und ICP8 *in vivo*

Im vorangegangenen Kapitel wurde die Abhängigkeit der *in vivo*-Interaktion von Rep und ICP8 von der AAV-Replikation diskutiert. In diesem Abschnitt werden die intranukleären Interaktionsmechanismen und molekularen Abläufe detaillierter erörtert. Die Interaktion von Rep78 und ICP8 steht am Anfang der AAV-Replikation und ist die Voraussetzung für die Initiation und den Fortlauf der DNA-Synthese. Die Abhängigkeit der Interaktion vom DNA-Substrat bzw. von der DNA-Konformation ist dabei ein wichtiger Aspekt, der sich im gesamten Verlauf der AAV-Replikation widerspiegelt. Eine weitere grundlegende Frage bei der HSV-vermittelten Replikation ist, wie die AAV-DNA in die präreplikativen HSV-Komplexe rekrutiert wird und welche Rolle die Rep-ICP8-Interaktion dabei einnimmt.

Die Formierung der AAV-Replikationskompartimente, geht, wie auch bei der HSV-Infektion beschrieben, vermutlich nur von einzelnen der zahlreichen Präreplikationskomplexe aus (Lukonis et al., 1997). Hinweise darauf liefern die Kolokalisationsexperimente, in denen in den frühen Stadien der AAV-Replikation im Nukleus kleine, disseminierte Rep-ICP8-Komplexe neben zahlreichen ICP8-Foci ohne assoziiertes Rep78 nachweisbar sind. Abhängig vom Fortschritt der DNA-Synthese vergrößern sich die Komplexe und verschmelzen schließlich zu

den Replikationskompartimenten, die weite Teile des Zellkerns einnehmen (Glauser et al., 2005). Diese Entwicklung der Replikationskomplexe ist auch im Verlauf der alleinigen HSV-Infektion gezeigt worden (Quinlan et al., 1984; de Bruyn Kops und Knipe, 1988; Taylor et al., 2003b). Dass sich die Replikationskompartimente nur aus einzelnen präreplikativen Foci entwickeln, wird auch dadurch deutlich, dass die Replikation von HSV und AAV in voneinander getrennten, intranukleären Kompartimenten stattfindet (Glauser et al., 2007). Die Rekrutierung der jeweiligen viralen DNA in die verschiedenen HSV-Foci am Beginn der Infektion muss demnach unabhängig voneinander geschehen.

Die zelluläre Rep-ICP8-Interaktion kann abhängig vom AAV-Lebenszyklus oder im Rahmen einer experimentellen Untersuchung von verschiedenen Konstellationen ausgehen. Bei der Erörterung der Interaktion ist daher zu beachten, zu welchem Zeitpunkt und in welcher Form die beteiligten Komponenten zur Verfügung stehen. Bei der AAV-DNA muss man zwischen einer nach der Infektion vorhandenen ssDNA und der doppelsträngigen Konformation eines integrierten Genoms in der Latenz bzw. funktionell vergleichbarer Plasmid-DNA unterscheiden. Bei Rep78 ist zu differenzieren, ob das Protein bereits im Zellkern vorhanden ist, beispielsweise durch die Expression von einem integrierten Genom oder durch eine Expression in *trans* in einem artifiziellen Untersuchungssystem, oder ob es nach einer Infektion bzw. Transfektion erst exprimiert werden muss. Am einfachsten stellt sich die Ausgangssituation bei ICP8 dar, da bekannt ist, dass die ICP8-Expression und die Bildung der präreplikativen Komplexe bereits kurz nach der HSV-Infektion erfolgt (Honess und Roizmann, 1973; de Bruyn Kops und Knipe, 1988; Taylor und Knipe, 2003b). Aus diesen Aspekten lassen sich verschienene Möglichkeiten und Abläufe bei der Interaktion zwischen Rep, ICP8 und der AAV-DNA ableiten, die sich vermutlich im Verlauf der Replikation alle wiederfinden und ineinander übergehen.

Bei der AAV-Infektion wird das Virus-Genom im Zellkern freigesetzt. Hier liegt es zunächst als einzelsträngige, ITR-flankierte DNA vor. Rep78 ist noch nicht vorhanden, da das Protein erst nach der Zweitstrangsynthese exprimiert werden kann. Diese kann, insbesondere in postmitotischen Zellen, mehrere Stunden bis Tage benötigen. Bei einer Koinfektion mit HSV läuft sie durch die Anwesenheit der zusätzlichen viralen Faktoren und die Veränderung des zellulären Milieus schneller ab. Da die ICP8-Expression und die Formierung der präreplikativen Komplexe sehr früh stattfindet, ist davon auszugehen, dass nach einer AAV-HSV-Koinfektion zunächst nur ICP8 und die AAV-ssDNA im Zellkern vorhanden sind. Die Rep-ICP8-Interaktion kann somit wegen des Fehlens von Rep78 noch nicht stattfinden (Abb. 5.2/I). Eine Assoziation der AAV-ssDNA an das ICP8 ist wegen dessen ubiquitären Vorkommens im Zellkern und seiner starken ssDNA-bindenden Eigenschaften dagegen anzunehmen. Vermutlich unterstützt ICP8 die

AAV-Zweitstrangsynthese, indem es an die ssDNA bindet und sie in einer ausgestreckten und damit für Replikationsfaktoren zugänglicheren Konformation hält. Auf diese Weise stimuliert ICP8 z.B. die HSV-eigene Polymeraseaktivität (Ruyechan, 1983; Ruyechan und Weir, 1984). Wahrscheinlich wird auch bereits die Zweitstrangsynthese, wie die AAV-DNA-Replikation, durch den über ICP8 assoziierten Helikase-Primase-Komplex und die HSV-Polymerase vermittelt. Eine weniger wahrscheinliche Ausgangssituation am Beginn der AAV-Infektion ist, dass die ssDNA zunächst nicht an das ICP8 assoziiert und die AAV-Zweitstrangsynthese abseits der HSV-Komplexe stattfindet. In beiden Fällen erfolgt die Transkription und Translation der AAV-Gene und damit die Rep-Expression aber erst nach der Vervollständigung des Zweitstrangs. Da die DNA anschließend jedoch als Doppelstrang vorliegt, ist, wie auch das *in vitro*-Experiment dieser Arbeit zeigt, eine Interaktion von Rep78 mit ICP8, die über die schwache direkte Bindung hinaus geht, nicht mehr möglich. Im Fall einer vorherigen ICP8-ssDNA-Bindung wird das HSV-Protein vermutlich bei der dsDNA-Synthese dissoziiert. Obwohl nach der AAV-Zweistrangsynthese Rep78 und ICP8 also im Zellkern vorliegen, kommt es ohne die ssDNA nicht zur Interaktion (Abb. 5.2/II).

In Anbetracht der nun zur Verfügung stehenden Komponenten Rep78, ICP8 und AAV-dsDNA ist davon auszugehen, dass zunächst Rep78 an die ITRs bzw. an die *rep binding site* der AAV-dsDNA bindet. Die Rep-DNA-Interaktion ist als stark und hochspezifisch charakterisiert (McCarty et al., 1994b; Chiorini et al., 1004b; Casper et al., 2005). Daneben ist zusätzlich die schwache direkte Rep-ICP8-Interaktion möglich, die eventuell auch mit dem DNA-gebundenen

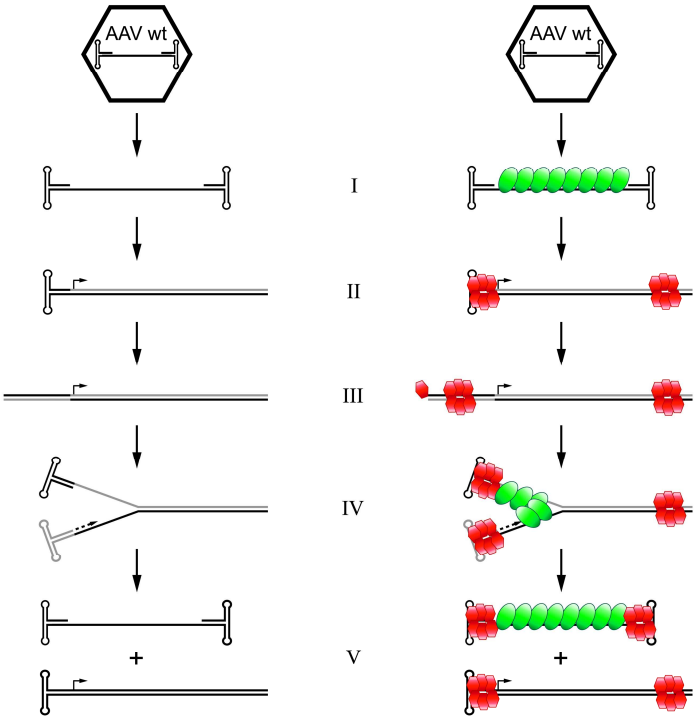


Abb. 5.2: Möglichkeiten der Rep78-ICP8-Interaktion am Beginn der AAV-Replikation: (I) Nach der Infektion liegt das AAV-Genom einzelsträngig vor und kann durch ICP8 gebunden werden. Eine Rep78-Expression und daher dessen Interaktion mit ICP8 sind dagegen ausgeschlossen. (II) Nach der Zweitstrangsynthese wird Rep78 exprimiert und kann und an die ITRs binden. Da ICP8 nicht an die AAV-dsDNA bindet, ist eine indirekte, DNA-vermittelte Interaktion nicht möglich. ICP8 kann nur über seine schwache direkte Bindung mit dem DNA-gebundenen Rep78 interagieren (nicht dargestellt). (III) Nach der Entwindung des ITR wird das AAV-Genom zur linear-doppelsträngigen Replikationsform vervollständigt. Eine ssDNA-vermittelte Interaktion der Proteine kann auch hier nicht stattfinden. (IV) Unter Zurückfaltung der ITRs und der Entstehung einer Replikationsgabel, die durch ICP8 stabilisiert wird, wird die DNA-Replikation (re)-initiiert. Dadurch ist eine DNA-vermittelte Rep78-ICP8-Interaktion möglich. (V) Im Anschluss an den ersten Replikationszyklus liegen ein AAV-ssDNA-Genom, Rep78 und ICP8 vor. Damit ist die Situation der ssDNA-vermittelten Interaktion gegeben, die in der *in vitro*-Untersuchung nachvollzogen wurde.

Rep78 erfolgt. Das AAV-Protein hexamerisiert an der *RBS* und entwindet durch seine Helikase-Aktivität die nahegelegene *terminal resolution site* (Abb. 5.3). Die ssDNA-Konformation im Bereich der *trs* ist die Voraussetzung für das Einführen des Einzelstrangbruchs durch die Rep-Endonuklease. Ein Modell stellt die einzelsträngige *trs* als *loop* in einer zusätzlich zu den ITR-*stems* aufgefalteten *hairpin*-Konfiguration dar (5.3/II - links) (Brister und Muzyczka, 1999 & 2000; Smith und Kotin, 2000). Im Anschluss an die Endonuklease-Reaktion, nach der ein Rep-Molekül kovalent an das 5'-Ende gebunden bleibt, wird die AAV-DNA durch die Rep-eigene 3'-5'-Helikase-Aktivität entwunden, der geschnittene ITR-Strang verdrängt und das AAV-Genom zur *monomer extended*-Replikationsform vervollständigt (Snyder et al., 1990; Smith und Kotin, 1998 & 2000; Zhou et al., 1999). Da angenommen wird, dass die Entwindung und Vervollständigung des ITR parallel ablaufen, steht für eine ssDNA-vermittelte Interaktion kein Substrat zur Verfügung. Auch am resultierenden doppelsträngigen ITR ist nur eine geringe direkte Interaktion von ICP8 mit dem DNA-gebundenen Rep78 möglich (5.3/III & 5.2/III).

Neben dem genannten Modell besteht auch die Möglichkeit, dass die Einzelstrang-Konformation an der *trs* erreicht wird, indem in diesem Bereich durch die Rep-Helikase eine kleine Replikationsblase generiert wird (5.3/II – rechts). Mit dieser Annahme ist vereinbar, dass Rep nicht nur Substrate mit 3'-ssDNA-Überhängen sondern auch dsDNA, die eine *rep binding site* enthält, entwinden kann (Zhou et al., 1999). Ähnlich der Initiation der HSV-Replikation, bei der ICP8 durch das *origin-binding*-Protein UL9 an das entwundene *origin* rekrutiert wird, könnte auch die ssDNA-Konformation einer AAV-Replikationsblase durch ICP8 stabilisiert werden

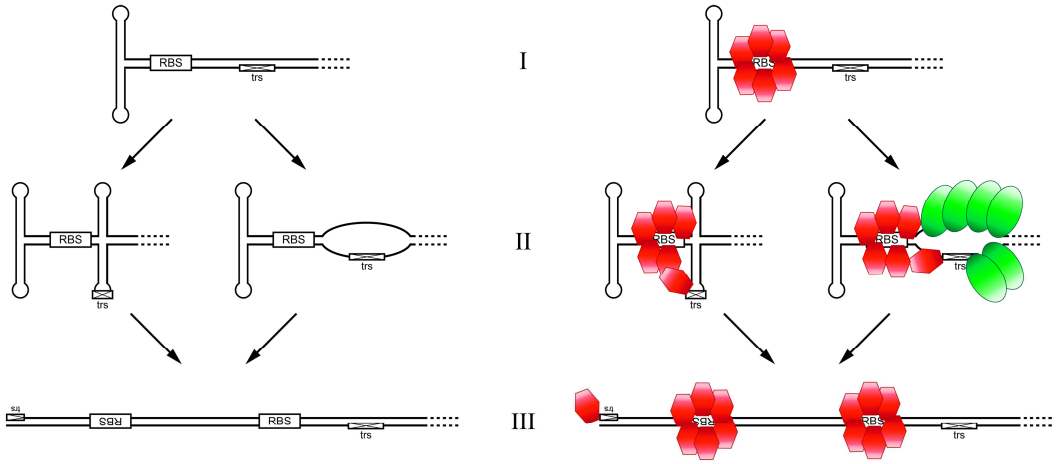


Abb. 5.3: Mögliche Mechanismen der Rep78-Endonuklease-Reaktion am AAV-ITR. (I) Vor der Entwindung des AAV-ITR hexamerisiert Rep78 an der enthaltenen *rep binding site* (RBS). (II) Zur Endonuklease-Reaktion muss die *terminal resolution site* (trs) einzelsträngig vorliegen. Ein Modell beschreibt die Rep-Helikase-vermittelte Auffaltung eines zusätzlichen *hairpins*, durch die die ssDNA-Konformation erreicht wird (links). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Entwindung der *trs* unter Entstehung einer ssDNA-Blase (rechts). Die Rep-Helikase-Aktivität und die Stabilisierung der ssDNA-Konformation könnten dabei durch ICP8 unterstützt werden. (III) Mit der Vervollständigung des ITR ist wieder nur eine Rep78-Bindung an die RBS möglich. Zusätzlich bleibt nach der Endonuklease-Reaktion ein Rep78-Molekül kovalent an das 5'-DNA-Ende gebunden.

(Boehmer und Lehman, 1993b & 1997; Makhov et al., 2003). Die direkte Interaktion von Rep78 mit ICP8 legt hier einen Ablauf nahe, bei dem Rep78 die UL-9-Funktion einnimmt. In diesem Modell besteht somit die Möglichkeit einer ssDNA-vermittelten Rep-ICP8-Interaktion nach der Entwindung der AAV-*trs* und vor Einführung des Einzelstrangbruchs, bei der Rep78 über den N-Terminus an die *RBS* gebunden bleibt, während ICP8 mit der entstandenen ssDNA interagiert. Die Assoziation des HSV-Proteins an die AAV-DNA erfolgt über die direkte Rep-ICP8-Interaktion, seine DNA-bindende Aktivität ist dann stark genug, um eigenständig an die ssDNA zu binden. Nach der Endonuklease-Reaktion durch Rep78, die durch ICP8 stimuliert wird (Stracker et al., 2004) folgt die Entwindung des ITR. Dabei könnte auch die Helikase-Aktivität von Rep, ähnlich wie die von UL9, von ICP8 unterstützt werden (Boehmer et al., 1993; Makhov et al., 1996b; Boehmer, 1998). Das Modell einer ICP8-stabilisierten Replikationsblase könnte zudem mit der Vervollständigung des ITR in Zusammenhang gebracht werden und schließt so auch die Beteiligung der weiteren HSV-Helferfaktoren, deren Rekrutierung über ICP8 erfolgt, an der AAV-DNA-Synthese ein. Im Anschluss ist durch den doppelsträngigen ITR auch hier keine ssDNA-vermittelte Interaktion von Rep78 und ICP8 mehr möglich (5.3/III).

Von der *monomer extended*-Replikationsform (5.2/III) ausgehend, folgt die Reinitiation der DNA-Synthese, bei der das *reannealing* der ITRs durch Rep78 vermittelt wird (5.2/IV) (Ward und Berns, 1996; Muzyczka und Berns, 2001). Zudem ist ein Einfluss der Rep-Helikase-Aktivität auf die vorherige Denaturierung der DNA-Enden zu vermuten, da die wieder doppelsträngige *rep binding site* eine erneute Rep-Bindung ermöglicht. Nach der Reinitiation kann die an der Replikationsgabel entstandene ssDNA wieder durch ICP8 besetzt werden. Über ICP8 werden die weiteren HSV-Replikationsproteine, der Helikase-Primase-Komplex (UL5/UL8/UL52) und die dimere Polymerase (UL30/UL42) rekrutiert (Vaughan et al., 1985; Bush et al., 1991). Mit dem Fortschreiten der DNA-Synthese wird der komplementäre Strang verdrängt und dabei vermutlich ebenfalls durch ICP8 besetzt. Nach Abschluss der Elongation liegen eine neue *monomer turnaround form* und das freigesetzte, einzelsträngige AAV-Tochtergenom vor. Mit dem Vorliegen von AAV-ssDNA, Rep78 und ICP8 ist in diesem Stadium der Replikation nun die Situation gegeben, die im *in vitro*-Experiment nachvollzogen wurde. Während ICP8 den einzelsträngigen Mittelteil der DNA besetzt, bindet Rep78 an die endständigen, doppelsträngigen ITRs (5.2/V). Die aus dem ersten Replikationszyklus entstandenen Produkte dienen als Ausgangspunkt für den weiteren Replikationsprozess. Bei der AAV-DNA-Replikation entstehen auch höhermolekulare Replikationsformen, bei denen mehrere doppelsträngige AAV-Genome verknüpft sind. Daraus ergeben sich während der Replikation viele verschiedene DNA-Konformationen und zahlreiche Möglichkeiten der Rep-ICP8-

Interaktion an der DNA. Diese sind alle mit den beschrieben Ausgangssituationen verwandt. Die Rep-Moleküle können an mehrere ITR-Äquivalenten binden. Für die Bindung von ICP8 wird die erforderliche ssDNA entweder bei der Entwindung der ITRs oder durch die Verdrängung des Gegenstrangs bei der DNA-Synthese bereitgestellt.

In den Rep78-ICP8-Interaktionsmodellen, bei denen die AAV-Replikation von doppelsträngiger DNA, also von einem integrierten AAV-Genom (Abb. 5.4 B) oder einem transfizierten Wildtyp-AAV-Plasmid (5.4 C) ausgeht, ist anfangs ebenfalls keine ssDNA-vermittelte Interaktion der Proteine möglich. Im Gegensatz zur AAV-Infektion (5.4 A) kann Rep78 zwar direkt exprimiert werden und an die AAV-ITRs binden, die Interaktion mit ICP8 bei einer HSV-Überinfektion geht ohne ssDNA aber nicht über die schwache, direkte Bindung hinaus. Erst mit der Entstehung einzelsträngiger DNA-Konformationen beim Entwinden der ITRs und bei der Einleitung der DNA-Replikation ist die ssDNA-vermittelte Interaktion zwischen beiden Proteinen möglich (Vgl. Abb. 5.2/III–V). Nach der Freisetzung des ersten Tochtergenoms aus der integrierten DNA oder aus dem AAV-Plasmid können der Replikationsprozess und die Rep-ICP8-Interaktion dann wie oben beschrieben ablaufen. Die einzige Situation, in der eine ssDNA-vermittelte Rep78-ICP8-Interaktion *in vivo* von vornherein möglich ist, ist die Koinfektion von rHSV*rep/cap* und rAAV, bei der die Rep- und ICP8-Expression durch das rekombinante HSV erfolgt und die ssDNA durch rAAV eingebracht wird (5.4 D).

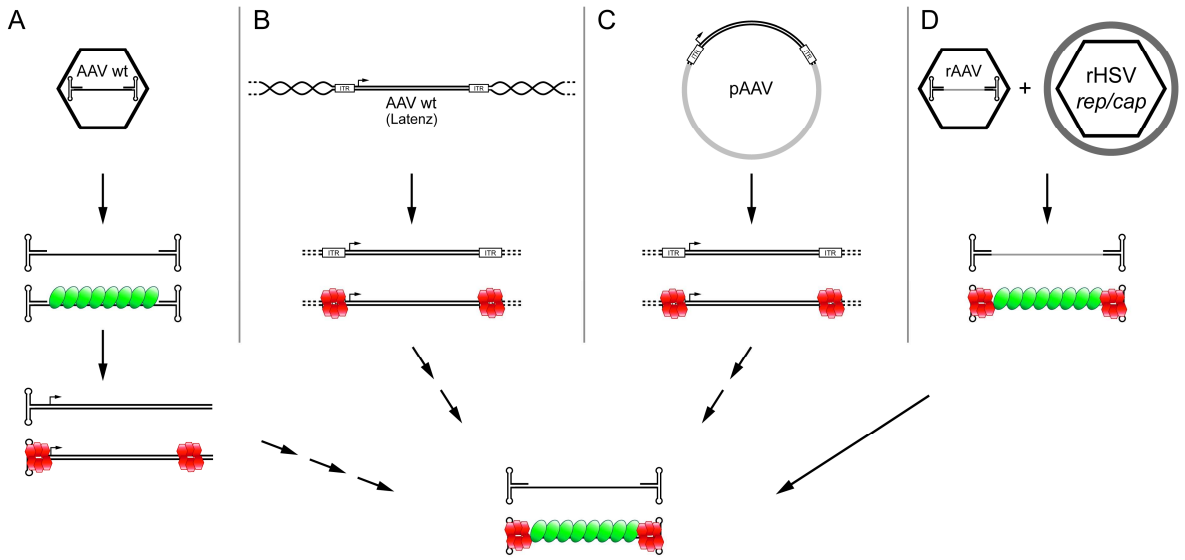


Abb. 5.4: Die Rep78-ICP8-Interaktion *in vivo* in Abhängigkeit von der AAV-DNA-Konformation. (A) Nach der Infektion kann Rep78 erst nach der Zweitstrangsynthese exprimiert werden. Eine Interaktion mit ICP8 ist daher zunächst ausgeschlossen. (B & C) Im integrierten Genom und im Plasmid liegt die AAV-DNA doppelsträngig vor. Eine Rep-Expression und Rep-ITR-Bindung ist möglich, die Interaktion mit ICP8 kann ohne ssDNA aber nicht stattfinden. (A-C) Erst im Verlauf der Replikation und mit der Freisetzung von Tochtergenomen sind die Voraussetzungen für die ssDNA-vermittelte Rep78-ICP8-Interaktion gegeben. (D) Nur bei der Einführung von AAV-ssDNA durch eine rAAV-Infektion und die gleichzeitige Rep78-Expression in *trans*, z.B. durch ein rekombinantes HSV ist von vornherein die ssDNA-abhängige Rep78-ICP8-Interaktion möglich.

Auch bei der Replikation, die von doppelsträngiger DNA ausgeht, stellt sich die Frage, wie die AAV-DNA in die HSV-Präreplikationskomplexe rekrutiert wird. Insbesondere bei einem integrierten AAV-Genom kann sich erst die, nach der Replikation freigesetzte, ssDNA den nukleären ICP8-Foci zuordnen. Bei der Transfektion eines AAV-Plasmids besteht hingegen die Möglichkeit, dass die Rekrutierung der DNA in die HSV-Kompartimente über das ITR-gebundene Rep78 und dessen direkte Interaktion mit ICP8 stattfindet. Dass sich die Replikationskompartimente über die Rep-ICP8-Interaktion um die AAV-DNA formieren ist nicht wahrscheinlich, da sich die nukleären HSV-Foci bereits unabhängig von der DNA-Replikation bilden (Lukonis und Weller, 1996 & 1997; Uprichard und Knipe, 1997; Burkham et al., 2001).

Wie die Diskussion aufzeigt, gibt es im Laufe der AAV-DNA-Replikation viele verschiedene Möglichkeiten der DNA-vermittelten Interaktion von Rep78 und ICP8. Die *in vitro* untersuchte Komplexbildung stellt dabei nur eine Variante dar. Zu Beginn der Replikation kann nur eine direkte Interaktion von ICP8 mit dem ITR-gebundenen Rep78 stattfinden, da die AAV-DNA zur Rep-Expression zunächst doppelsträngig vorliegen muss. Erst die Entwindung der *terminal resolution site* und bzw. des gesamten ITRs kann eine ssDNA-vermittelte Interaktion ermöglichen. Dabei unterstützt ICP8 mit seinen ssDNA-bindenden und konformations-stabilisierenden Eigenschaften die Rep-Aktivität. Bei der folgenden AAV-DNA-Synthese rekrutiert das an die ssDNA der Replikationsgabel gebundene ICP8 die weiteren Helferfaktoren, den Helikase-Primase-Komplex und die UL30/42-Polymerase, und gewährleistet so den Fortschritt der AAV-Replikation. Im Verlauf entstehen zahlreiche Replikationsprodukte und Replikationsintermediate. An ihnen findet die indirekte, DNA-vermittelte Interaktion von Rep78 und ICP8 überwiegend statt. Rep ist dabei an die ITRs bzw. *rep binding sites* assoziiert, während ICP8 ssDNA-gebunden ist. Die indirekte Interaktion wird vermutlich durch die direkte Bindung der beiden Proteine und die damit verbundene, gegenseitige Rekrutierung an die DNA unterstützt.

Wie die AAV-DNA in die HSV-Foci rekrutiert wird, konnte nicht vollständig erörtert werden, da sich hierzu nur wenige Daten zusammenführen lassen. Die AAV-DNA-Replikation findet nicht in den HSV-Replikationskomplexen statt, sondern geht von unabhängigen Präreplikationskompartimenten aus. Die Rekrutierung der DNA in diese Kompartimente erfolgt vermutlich nicht durch einen aktiven bzw. spezifischen Prozess, sondern beruht auf den biochemischen Eigenschaften von ICP8. Wahrscheinlich wird die Assoziation der AAV-ssDNA an die Präreplikations-Foci durch die starke unspezifische ssDNA-Bindungskapazität des Proteins und wegen seines ubiquitären Vorkommens im Zellkern bereits kurz nach der HSV-Infektion vermittelt. Ein Einfluss der direkten oder DNA-vermittelten Rep-ICP8-Interaktion kann

zu diesem Zeitpunkt der AAV-Infektion ausgeschlossen werden, da Rep von dem einzelsträngigen AAV-Genom noch nicht exprimiert werden konnte. Die Interaktion der Proteine, die vermutlich in der Rep78-vermittelten Assoziation von ICP8 an die AAV-ITRs ihren Ausgang nimmt, ist erst bei der Einleitung und im Verlauf der AAV-Replikation von Bedeutung.

5.4 Eigenschaften von Rep78 als AAV-*origin*-bindendes Protein im Vergleich zur Funktion von HSV-UL9 bei der HSV-Replikation

Für die DNA-Replikation des Herpes Simplex Virus sind sieben Virusproteine essentiell. Sechs dieser sieben Proteine, das Einzelstrang-DNA-bindende Protein ICP8 (UL29), der Helikase-Primase-Komplex (UL5/UL8/UL52), die UL30-Polymerase und der processivity factor (UL42) werden bei der AAV-Replikation verwendet. Als minimale Helferfaktoren werden jedoch nur ICP8 und der Helikase-Primase-Komplex benötigt (Weindler und Heilbronn, 1991). Das für die HSV-Replikation ebenfalls essentielle *origin*-bindende UL9 wird bei der AAV-DNA-Synthese dagegen nicht verwendet, sondern durch Rep78 ersetzt. Rep78 nimmt zahlreiche Aufgaben im AAV-Lebenszyklus wahr. Es ist z.B. bei der Regulierung der Expression eigener und heterologer Gene, bei der Vermittlung der sequenzabhängigen Integration oder bei der DNA-Replikation von Bedeutung. Hier sollen im Vergleich mit UL9 die Eigenschaften von Rep78 erörtert werden, die es als *origin*-bindendes Protein charakterisieren. Im Vordergrund stehen dabei die DNA-Bindung von Rep78 und seine Interaktion mit ICP8, die das Untersuchungsfeld dieser Arbeit darstellen.

Eine grundlegende Eigenschaft von UL9 und Rep78 ist die sequenzspezifische DNA-Bindung. Sie bedingt die Interaktion der Proteine mit den jeweiligen *origins*. Dass zwischen den Bindungsstellen in der HSV- und der AAV-DNA keine Sequenzübereinstimmung besteht, stellt gleichzeitig den wichtigste Unterschied in der Funktion beider Proteine dar. Er begründet zudem, warum UL9 nicht an der AAV-Replikation beteiligt ist, sondern seine Funktion durch Rep78 wahrgenommen wird. Rep78 bindet spezifisch an *GAGC*-Tetranukleotid-Wiederholungen, die die *rep binding site* innerhalb der ITRs darstellen (Owens et al., 1993; McCarty et al., 1994a; Ryan et al., 1996). Die Lage in den endständigen *terminal repeats* gewährleistet, dass die lineare DNA repliziert und als einzelsträngiges Genom freigesetzt werden kann. Die *origins* von HSV liegen innerhalb der *repeat*-Abschnitte (ori_S) und in der U_L-Region (ori_L). Sie enthalten jeweils 10 Nukleotide umfassende palindromische Erkennungssequenzen, die als Box I, II bzw. III bezeichnet werden und eine AT-reiche Region flankieren (Stow, 1982; Weller et al., 1985; Elias und Lehman, 1988; Koff und Tegtmeyer, 1988; Hazuda et al., 1991).

Eine weitere Übereinstimmung beider Proteine besteht darin, dass sie an ihren DNA-Bindungsstellen multimerisieren. Allerdings unterscheiden sich die Multimere in ihrer Art und Zusammensetzung. Rep78 hexamerisiert ringförmig an der *rep binding site*, während UL9 gleichgerichtete Homodimere an den Erkennungssequenzen des HSV-*origins* bildet (Fierer und Chalberg, 1992; Stabell und Olivo; 1993; Makhov et al, 1996a & b). Dass die Boxen im HSV-*origin* die AT-reiche Sequenz flankieren führt dazu, dass zwei Dimere, also insgesamt vier UL9-Moleküle, unter Ausbildung eines DNA-loops interagieren (Koff et al., 1991; Boehmer und Lehmann; 1997).

Um zur Einleitung der Replikation den Doppelstrang des *origins* in einzelsträngige DNA zu überführen, müssen *origin-binding*-Proteine über Helikase-Aktivität verfügen. Sowohl für Rep78 als auch für UL9 wurde eine 3'-5'-Helikase-Aktivität nachgewiesen (Im und Muzyczka, 1992; Fierer und Chalberg, 1992; Lehman et al., 1993; Walker et al., 1997). Zur Bereitstellung der benötigten Energie besitzen beide Proteine zudem eine ATPase-Aktvität und können wie alle Helikasen an ssDNA binden (Im und Muzyczka, 1992; Marintcheva und Weller, 2003; Yoon-Robarts et al., 2004). Strukturell sind Rep und UL9 unterschiedlichen Helikase-Superfamilien zuzuordnen. UL9 ist eine SF2-, Rep78 eine SF3-Helikase (Martinez et al., 1992; James et al., 2003). Für Rep78 wurde demonstriert, dass das Protein in der Lage ist, neben DNA mit einem 3'-Überhang auch doppelsträngige Substrate zu entwinden, sofern diese eine *rep binding site* enthalten (Zhou et al., 1999). Die Entwindung von dsDNA, die für die Auflösung des *origins* von besonderer Bedeutung ist, ist für UL9 nicht nachgewiesen worden. Beim HSV-Protein nimmt man an, dass durch die *loop*-Bildung bei der Multimerisierung die AT-reiche Sequenz zwischen den UL9-Bindungsstellen mit ihren schwachen Wasserstoffbrückenbindungen leicht dissoziiert und die so entstandene ssDNA für ICP8 zugänglich wird (He und Lehman, 2000).

Rep78 und UL9 interagieren direkt mit dem ssDNA-bindenden Protein ICP8 (Boehmer und Lehman, 1993b; Heilbronn et al., 2003; Stracker et al., 2004). Durch diese Interaktionen wird ICP8 vermutlich an die jeweilige DNA rekrutiert. Zudem konnte der Einfluss von ICP8 auf die funktionellen Eigenschaften von Rep78 und UL9 nachgewiesen werden. Durch die Anwesenheit von ICP8 wird die Helikase-Aktivität von UL9 stimuliert. Außerdem können längere DNA-Substrate entwunden werden (Fierer und Chalberg, 1992; Boehmer et al., 1993; Makhov et al., 1996b). Auch die biochemischen Funktionen von Rep78 werden durch ICP8, aber auch durch die ssDNA-bindenden Proteine Ad-DBP und RPA beeinflusst (Stracker et al., 2004). Durch die Anwesenheit von ICP8 wird die Endonuklease-Aktivität von Rep78 stimuliert. Es ist zu vermuten, dass auch dieser Einfluss auf der Stimulation der Rep-Helikase-Aktivität beruht, die

durch die Entwindung des doppelsträngigen Substrates die für die Endonkuklease-Reaktion notwendige ssDNA zur Verfügung stellt.

Neben den Funktionen, die auf ähnliche Weise von beiden Proteinen vermittelt werden, besitzt Rep78 im Gegensatz zu UL9 eine sequenz- und strangspezifische Endonuklease-Aktivität. Bei der AAV-Replikation ist sie von Bedeutung, um ein freies 3'-OH-Ende für die Vervollständigung der ITRs und das Fortschreiten der DNA-Synthese zu generieren. Die Endonuklease-Reaktion ist auch für die Freisetzung der replizierten AAV-ssDNA-Genome von Bedeutung. Am Beginn des *rolling-circle*-Mechanismus der HSV-Replikation muss ebenfalls ein freies 3'-Ende vorhanden sein. Da für UL9 keine Endonuklease-Aktivität bekannt ist, wird diese Funktion vermutlich von anderen viralen oder zellulären Faktoren übernommen. Dass die UL9-Bindung an das HSV-*origin* zu einer Hypersensitivität der enthaltenen AT-reichen Sequenz für die zelluläre Dnase I führt, ist ein Hinweis darauf, dass UL9 auch bei diesem Aspekt eine Rolle spielt (Koff et al., 1991; Stabell und Olivo, 1993).

Im Vergleich von Rep78 und UL9 lässt sich feststellen, dass Rep78 über alle Funktionen des HSV-Proteins verfügt und somit als eigenständiges AAV-*origin*-bindendes Protein anzusehen ist. Grundlage ist die sequenzspezifische DNA-Bindung von Rep78 an die AAV-ITRs. Darüber hinaus verfügt das Protein über die notwendige Helikase-Funktion und die damit verbundene ATPase-Aktivität und ssDNA-Bindung. Zusätzlich besitzt Rep78 eine spezifische Endonuklease-Aktivität, die bei UL9 nicht nachzuweisen ist.

Die sowohl für UL9 als auch für Rep78 beschriebene Interaktion mit ICP8 führt schließlich an den Ausgangspunkt dieser Arbeit zurück und unterstreicht die Bedeutung der Rep78-ICP8-Interaktion bei der Initiation der AAV-DNA-Replikation. Im Anschluss an die Rekrutierung des AAV-ssDNA-Genoms in die HSV-Replikationkompartimente, die wahrscheinlich bereits durch ICP8 vermittelt wird, bildet die gegenseitige Assoziation von Rep78 und ICP8 und die ssDNA-vermittelte Interaktion beider Proteine die Grundlage für zahlreiche der nachfolgenden Replikationsprozesse. Unter anderem stimuliert ICP8 dabei die Rep-Endonuklease- und vermutlich auch dessen Helikase-Aktivität, die für die Entwindung und Zurückfaltung der AAV-ITRs und damit die (Re)-Initiation der AAV-DNA-Synthese entscheidend sind. Anschließend werden über ICP8 die weiteren HSV-Replikationsproteine an die AAV-DNA assoziiert, durch die der Replikationskomplex vervollständigt und der Ablauf der HSV-abhängigen AAV-Replikation letztendlich vermittelt wird.

6 Zusammenfassung

Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind als Gentherapie-Vektoren in klinischen Studien zunehmend erfolgreich. Mit der Aussicht auf eine breite klinische Anwendung stellt die Optimierung der AAV-Vektorproduktion eine besondere Herausforderung dar. Für die effiziente Replikation von Wildtyp-AAV und der davon abgeleiteten Vektoren wird Herpes Simplex Virus (HSV) als wichtigstes Helfervirus eingesetzt. Durch die AAV-ssDNA-abhängige Interaktion des multifunktionellen AAV-Proteins Rep78 mit dem HSV-Einzelstrang-DNA-bindenden Protein ICP8 wird die HSV-vermittelte AAV-DNA-Replikation initiiert.

In dieser Arbeit sollten die Rep78-Domänen charakterisiert werden, die die Bildung des ternären Komplexes aus Rep78, ICP8 und dem AAV-ssDNA-Genom vermitteln. Eine systematische Mutationsanalyse führte zur Identifizierung der Rep78-DNA-Bindungsdomäne als essentielles Interaktionselement. Der Austausch einzelner konservierter Aminosäuren im N-Terminus von Rep78, die als Kontaktpunkte mit der Rep-binding site auf dem AAV-Genom beschrieben waren, resultierte im Verlust der AAV-ssDNA-stimulierten Interaktion *in vitro* und der Aufhebung der nukleären Kolokalisation beider Proteine *in vivo*. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Rep78-Punktmutationen zu einem Verlust der AAV-DNA-Replikationskompetenz führen. Die Ergebnisse lassen sich am besten über eine indirekte Interaktion von AAV-Rep78 und HSV-ICP8 auf dem AAV-Genom erklären, wodurch die nächsten Schritte der AAV-DNA-Replikation eingeleitet werden. Die Rep78-vermittelte Rekrutierung von ICP8 und darüber weiterer HSV-Replikationsfaktoren an das AAV-Genom unterstreicht die Rolle von Rep78 als Replikationsinitiator bzw. AAV *origin*-binding Protein.

Die vorliegenden Ergebnisse erweitern das Verständnis der molekularen Mechanismen bei der besonderen Helfervirus-abhängigen AAV-DNA-Replikation. Sie bilden die Grundlage für aufbauende Untersuchungen wie die Analyse der ICP8-Domänen und weiterer an der AAV-Replikation beteiligter HSV- und zellulärer Replikationsfaktoren. Dies dient auch der Weiterentwicklung der bereits erfolgreich eingesetzten HSV-basierten AAV-Vektorproduktion, um eine breite und sichere Verwendung von AAV in der klinischen Gentherapie zu gewährleisten.

7 Literaturverzeichnis

Archetti, I and Bocciarelli, D S (1965). Structure and biological characteristics of a small, still unclassified virus. *Ann Ist Super Sanita* 1(1): 103-6.
Atchison, R W, Casto, B C and Hammon, W M (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149: 754-6.
Aucoin, M G, Jacob, D, Chahal, P S, Meghrous, J, Bernier, A and Kamen, A A (2007). Virus-like particle and viral vector production using the baculovirus expression vector system/insect cell system: adeno-associated virus-based products. *Methods Mol Biol* 388: 281-96.
Bainbridge, J W, Smith, A J, Barker, S S, et al. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358(21): 2231-9.
Bartlett, J S, Wilcher, R and Samulski, R J (2000). Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 74(6): 2777-85.
Beaton, A, Palumbo, P and Berns, K I (1989). Expression from the adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in trans by the rep protein. *J Virol* 63(10): 4450-4.
Becker, Y, Asher, Y, Weinberg-Zahlering, E, Rabkin, S, Friedmann, A and Kessler, E (1978). Defective herpes simplex virus DNA: circular and circular-linear molecules resembling rolling circles. *J Gen Virol* 40(2): 319-35.
Bennicelli, J, Wright, J F, Komaromy, A, et al. (2008). Reversal of blindness in animal models of leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Mol Ther* 16(3): 458-65.
Berns, K I and Linden, R M (1995). The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* 17(3): 237-45.
Blacklow, N R, Hoggan, M D and McClanahan, M S (1970). Adenovirus-associated viruses: enhancement by human herpesviruses. *Proc Soc Exp Biol Med* 134(4): 952-4.
Blacklow, N R, Dolin, R and Hoggan, M D (1971). Studies of the enhancement of an adenovirus-associated virus by herpes simplex virus. *J Gen Virol* 10(1): 29-36.
Boehmer, P E, Dodson, M S and Lehman, I R (1993). The herpes simplex virus type-1 origin binding protein. DNA helicase activity. *J Biol Chem* 268(2): 1220-5.
Boehmer, P E and Lehman, I R (1993a). Physical interaction between the herpes simplex virus 1 origin-binding protein and single-stranded DNA-binding protein ICP8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18): 8444-8.
Boehmer, P E and Lehman, I R (1993b). Herpes simplex virus type 1 ICP8: helix-destabilizing properties. *J Virol* 67(2): 711-5.
Boehmer, P E and Lehman, I R (1997). Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem* 66: 347-84.
Boehmer, P E (2004). RNA binding and R-loop formation by the herpes simplex virus type-1 single-stranded DNA-binding protein (ICP8). *Nucleic Acids Res* 32(15): 4576-84.
Brister, J R and Muzyczka, N (1999). Rep-mediated nicking of the adeno-associated virus origin requires two biochemical activities, DNA helicase activity and transesterification. *J Virol* 73(11): 9325-36.
Brister, J R and Muzyczka, N (2000). Mechanism of Rep-mediated adeno-associated virus origin nicking. *J Virol* 74(17): 7762-71.
Buller, R M and Rose, J A (1978). Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells. *J Virol* 25(1): 331-8.
Buller, R M, Janik, J E, Sebring, E D and Rose, J A (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* 40(1): 241-7.
Burkham, J, Coen, D M and Weller, S K (1998). ND10 protein PML is recruited to herpes simplex virus type 1 prereplicative sites and replication compartments in the presence of viral DNA polymerase. *J Virol* 72(12): 10100-7.
Burkham, J, Coen, D M, Hwang, C B and Weller, S K (2001). Interactions of herpes simplex virus type 1 with ND10 and recruitment of PML to replication compartments. *J Virol* 75(5): 2353-67.
Bush, M, Yager, D R, Gao, M, et al. (1991). Correct intranuclear localization of herpes simplex virus DNA polymerase requires the viral ICP8 DNA-binding protein. *J Virol* 65(3): 1082-9.
Carter, B J (2005). Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gene Ther* 16(5): 541-50.
Casper, J M, Timpe, J M, Dignam, J D and Trempe, J P (2005). Identification of an adeno-associated virus Rep protein binding site in the adenovirus E2a promoter. *J Virol* 79(1): 28-38.

Cassell, G D and Weitzman, M D (2004). Characterization of a nuclear localization signal in the C-terminus of the adeno-associated virus Rep68/78 proteins. *Virology* 327(2): 206-14.
Cathomen, T, Collete, D and Weitzman, M D (2000). A chimeric protein containing the N terminus of the adeno-associated virus Rep protein recognizes its target site in an in vivo assay. *J Virol* 74(5): 2372-82.
Chadeuf, G, Favre, D, Tessier, J, et al. (2000). Efficient recombinant adeno-associated virus production by a stable rep-cap HeLa cell line correlates with adenovirus-induced amplification of the integrated rep-cap genome. *J Gene Med* 2(4): 260-8.
Challberg, M D (1986). A method for identifying the viral genes required for herpesvirus DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(23): 9094-8.
Chejanovsky, N and Carter, B J (1990). Mutation of a consensus purine nucleotide binding site in the adeno-associated virus rep gene generates a dominant negative phenotype for DNA replication. *J Virol* 64(4): 1764-70.
Chen, C A and Okayama, H (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6(7): 632-8.
Cheung, A K, Hoggan, M D, Hauswirth, W W and Berns, K I (1980). Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J Virol* 33(2): 739-48.
Chiorini, J A, Weitzman, M D, Owens, R A, Urcelay, E, Safer, B and Kotin, R M (1994). Biologically active Rep proteins of adeno-associated virus type 2 produced as fusion proteins in Escherichia coli. *J Virol* 68(2): 797-804.
Chiorini, J A, Wiener, S M, Owens, R A, Kyöstiö, S R, Kotin, R M and Safer, B (1994). Sequence requirements for stable binding and function of Rep68 on the adeno-associated virus type 2 inverted terminal repeats. *J Virol* 68(11): 7448-57.
Chiorini, J A, Yang, L, Safer, B and Kotin, R M (1995). Determination of adeno-associated virus Rep68 and Rep78 binding sites by random sequence oligonucleotide selection. *J Virol* 69(11): 7334-8.
Conley, A J, Knipe, D M, Jones, P C and Roizman, B (1981). Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Characterization of a temperature-sensitive mutant produced by in vitro mutagenesis and defective in DNA synthesis and accumulation of gamma polypeptides. *J Virol* 37(1): 191-206.
Conway, J E, Rhys, C M, Zolotukhin, I, et al. (1999). High-titer recombinant adeno-associated virus production utilizing a recombinant herpes simplex virus type I vector expressing AAV-2 Rep and Cap. *Gene Ther* 6(6): 986-93.
Davis, M D, Wonderling, R S, Walker, S L and Owens, R A (1999). Analysis of the effects of charge cluster mutations in adeno-associated virus Rep68 protein in vitro. *J Virol* 73(3): 2084-93.
Davis, N L, Caley, I J, Brown, K W, et al. (2000). Vaccination of macaques against pathogenic simian immunodeficiency virus with Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J Virol* 74(1): 371-8.
de Bruyn Kops, A and Knipe, D M (1988). Formation of DNA replication structures in herpes virus-infected cells requires a viral DNA binding protein. *Cell* 55(5): 857-68.
Deb, S and Deb, S P (1991). A 269-amino-acid segment with a pseudo-leucine zipper and a helix-turn-helix motif codes for the sequence-specific DNA-binding domain of herpes simplex virus type 1 origin-binding protein. *J Virol* 65(6): 2829-38.
Di Pasquale, G and Stacey, S N (1998). Adeno-associated virus Rep78 protein interacts with protein kinase A and its homolog PRKX and inhibits CREB-dependent transcriptional activation. *J Virol* 72(10): 7916-25.
Dong, J Y, Fan, P D and Frizzell, R A (1996). Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* 7(17): 2101-12.
Duan, D, Yue, Y, Yan, Z and Engelhardt, J F (2000). A new dual-vector approach to enhance recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression through intermolecular cis activation. *Nat Med* 6(5): 595-8.
Dubielzig, R, King, J A, Weger, S, Kern, A and Kleinschmidt, J A (1999). Adeno-associated virus type 2 protein interactions: formation of pre-encapsidation complexes. *J Virol* 73(11): 8989-98.
Dudas, K C and Ruyechan, W T (1998). Identification of a region of the herpes simplex virus single-stranded DNA-binding protein involved in cooperative binding. *J Virol* 72(1): 257-65.
Dudas, K C, Scouten, S K and Ruyechan, W T (2001). Conformational change in the herpes simplex single-strand binding protein induced by DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 288(1): 184-90.

During, M J, Kaplitt, M G, Stern, M B and Eidelberg, D (2001). Subthalamic GAD gene transfer in Parkinson disease patients who are candidates for deep brain stimulation. *Hum Gene Ther* 12(12): 1589-91.
Eberling, J L, Jagust, W J, Christine, C W, et al. (2008). Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 70(21): 1980-3.
Elias, P and Lehman, I R (1988). Interaction of origin binding protein with an origin of replication of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(9): 2959-63.
Fierer, D S and Challberg, M D (1992). Purification and characterization of UL9, the herpes simplex virus type 1 origin-binding protein. *J Virol* 66(7): 3986-95.
Flotte, T R, Zeitlin, P L, Reynolds, T C, et al. (2003). Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther* 14(11): 1079-88.
Gao, G P, Qu, G, Faust, L Z, et al. (1998). High-titer adeno-associated viral vectors from a Rep/Cap cell line and hybrid shuttle virus. *Hum Gene Ther* 9(16): 2353-62.
Gao, M, Bouchey, J, Curtin, K and Knipe, D M (1988). Genetic identification of a portion of the herpes simplex virus ICP8 protein required for DNA-binding. *Virology* 163(2): 319-29.
Gao, M and Knipe, D M (1989). Genetic evidence for multiple nuclear functions of the herpes simplex virus ICP8 DNA-binding protein. *J Virol* 63(12): 5258-67.
Gao, M and Knipe, D M (1992). Distal protein sequences can affect the function of a nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 12(3): 1330-9.
Georg-Fries, B, Biederlack, S, Wolf, J and zur Hausen, H (1984). Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology* 134(1): 64-71.
Glauser, D L, Saydam, O, Balsiger, N A, et al. (2005). Four-dimensional visualization of the simultaneous activity of alternative adeno-associated virus replication origins. *J Virol* 79(19): 12218-30.
Glauser, D L, Strasser, R, Laimbacher, A S, et al. (2007). Live covisualization of competing adeno-associated virus and herpes simplex virus type 1 DNA replication: molecular mechanisms of interaction. *J Virol* 81(9): 4732-43.
Gourves, A S, Tanguy Le Gac, N, Villani, G, Boehmer, P E and Johnson, N P (2000). Equilibrium binding of single-stranded DNA with herpes simplex virus type I-coded single-stranded DNA-binding protein, ICP8. *J Biol Chem* 275(15): 10864-9.
Green, M R and Roeder, R G (1980). Definition of a novel promoter for the major adenovirus-associated virus mRNA. *Cell* 22(1 Pt 1): 231-42.
Grieger, J C and Samulski, R J (2005). Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. *J Virol* 79(15): 9933-44.
Grieger, J C, Choi, V W and Samulski, R J (2006). Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc* 1(3): 1412-28.
Grimm, D, Kern, A, Rittner, K and Kleinschmidt, J A (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* 9(18): 2745-60.
Grimm, D, Kay, M A and Kleinschmidt, J A (2003). Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol Ther* 7(6): 839-50.
Gupte, S S, Olson, J W and Ruyechan, W T (1991). The major herpes simplex virus type-1 DNA-binding protein is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* 266(18): 11413-6.
Gustafsson, C M, Falkenberg, M, Simonsson, S, Valadi, H and Elias, P (1995). The DNA ligands influence the interactions between the herpes simplex virus 1 origin binding protein and the single strand DNA-binding protein, ICP-8. *J Biol Chem* 270(32): 19028-34.
Han, S I, Kawano, M A, Ishizu, K, et al. (2004). Rep68 protein of adeno-associated virus type 2 interacts with 14-3-3 proteins depending on phosphorylation at serine 535. *Virology* 320(1): 144-55.
Hauswirth, W W and Berns, K I (1977). Origin and termination of adeno-associated virus DNA replication. *Virology* 78(2): 488-99.
Hazuda, D J, Perry, H C, Naylor, A M and McClements, W L (1991). Characterization of the herpes simplex virus origin binding protein interaction with OriS. *J Biol Chem* 266(36): 24621-6.
He, X and Lehman, I R (2000). Unwinding of a herpes simplex virus type 1 origin of replication (Ori(S)) by a complex of the viral origin binding protein and the single-stranded DNA binding protein. *J Virol* 74(12): 5726-8.

Heilbronn, R, Engstler, M, Weger, S, Krahn, A, Schetter, C and Boshart, M (2003). ssDNA-dependent colocalization of adeno-associated virus Rep and herpes simplex virus ICP8 in nuclear replication domains. *Nucleic Acids Res* 31(21): 6206-13.

Hickman, A B, Ronning, D R, Kotin, R M and Dyda, F (2002). Structural unity among viral origin binding proteins: crystal structure of the nuclease domain of adeno-associated virus Rep. *Mol Cell* 10(2): 327-37.

Hickman, A B, Ronning, D R, Perez, Z N, Kotin, R M and Dyda, F (2004). The nuclease domain of adeno-associated virus rep coordinates replication initiation using two distinct DNA recognition interfaces. *Mol Cell* 13(3): 403-14.

Hickman, A B and Dyda, F (2005). Binding and unwinding: SF3 viral helicases. *Curr Opin Struct Biol* 15(1): 77-85.

High, K A (2004). Clinical gene transfer studies for hemophilia B. *Semin Thromb Hemost* 30(2): 257-67.

Hirt, B (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* 26(2): 365-9.

Hoggan, M D, Blacklow, N R and Rowe, W P (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55(6): 1467-74.

Honess, R W and Roizman, B (1973). Proteins specified by herpes simplex virus. XI. Identification and relative molar rates of synthesis of structural and nonstructural herpes virus polypeptides in the infected cell. *J Virol* 12(6): 1347-65.

Hoque, M, Ishizu, K, Matsumoto, A, et al. (1999). Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation. *J Virol* 73(9): 7912-5.

Hörer, M, Weger, S, Butz, K, Hoppe-Seyler, F, Geisen, C and Kleinschmidt, J A (1995). Mutational analysis of adeno-associated virus Rep protein-mediated inhibition of heterologous and homologous promoters. *J Virol* 69(9): 5485-96.

Hüser, D, Weger, S and Heilbronn, R (2002). Kinetics and frequency of adeno-associated virus site-specific integration into human chromosome 19 monitored by quantitative real-time PCR. *J Virol* 76(15): 7554-9.

Hüser, D, Weger, S and Heilbronn, R (2003). Packaging of human chromosome 19-specific adeno-associated virus (AAV) integration sites in AAV virions during AAV wild-type and recombinant AAV vector production. *J Virol* 77(8): 4881-7.

Im, D S and Muzyczka, N (1992). Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *J Virol* 66(2): 1119-28.

Jacob, R J and Roizman, B (1977). Anatomy of herpes simplex virus DNA VIII. Properties of the replicating DNA. *J Virol* 23(2): 394-411.

James, J A, Escalante, C R, Yoon-Robarts, M, Edwards, T A, Linden, R M and Aggarwal, A K (2003). Crystal structure of the SF3 helicase from adeno-associated virus type 2. *Structure* 11(8): 1025-35.

James, J A, Aggarwal, A K, Linden, R M and Escalante, C R (2004). Structure of adeno-associated virus type 2 Rep40-ADP complex: insight into nucleotide recognition and catalysis by superfamily 3 helicases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(34): 12455-60.

Kaplitt, M G, Feigin, A, Tang, C, et al. (2007). Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 369(9579): 2097-105.

Kay, M A, Manno, C S, Ragni, M V, et al. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 24(3): 257-61.

Kay, M A, Glorioso, J C and Naldini, L (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7(1): 33-40.

Kieff, E D, Bachenheimer, S L and Roizman, B (1971). Size, composition, and structure of the deoxyribonucleic acid of herpes simplex virus subtypes 1 and 2. *J Virol* 8(2): 125-32.

King, J A, Dubielzig, R, Grimm, D and Kleinschmidt, J A (2001). DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *Embo J* 20(12): 3282-91.

Kleinschmidt, J A, Mohler, M, Weindler, F W and Heilbronn, R (1995). Sequence elements of the adeno-associated virus rep gene required for suppression of herpes-simplex-virus-induced DNA amplification. *Virology* 206(1): 254-62.

Knipe, D M, Quinlan, M P and Spang, A E (1982). Characterization of two conformational forms of the major DNA-binding protein encoded by herpes simplex virus 1. *J Virol* 44(2): 736-41.

Knipe, D M and Spang, A E (1982). Definition of a series of stages in the association of two herpesviral proteins with the cell nucleus. *J Virol* 43(1): 314-24.
Koff, A and Tegtmeyer, P (1988). Characterization of major recognition sequences for a herpes simplex virus type 1 origin-binding protein. *J Virol* 62(11): 4096-103.
Koff, A, Schwedes, J F and Tegtmeyer, P (1991). Herpes simplex virus origin-binding protein (UL9) loops and distorts the viral replication origin. *J Virol* 65(6): 3284-92.
Kotin, R M and Berns, K I (1989). Organization of adeno-associated virus DNA in latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 170(2): 460-7.
Kotin, R M, Linden, R M and Berns, K I (1992). Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *Embo J* 11(13): 5071-8.
Kyöstiö, S R, Owens, R A, Weitzman, M D, Antoni, B A, Chejanovsky, N and Carter, B J (1994). Analysis of adeno-associated virus (AAV) wild-type and mutant Rep proteins for their abilities to negatively regulate AAV p5 and p19 mRNA levels. *J Virol* 68(5): 2947-57.
Kyöstiö, S R, Wonderling, R S and Owens, R A (1995). Negative regulation of the adeno-associated virus (AAV) P5 promoter involves both the P5 rep binding site and the consensus ATP-binding motif of the AAV Rep68 protein. *J Virol* 69(11): 6787-96.
Kyöstiö, S R and Owens, R A (1996). Identification of mutant adeno-associated virus Rep proteins which are dominant-negative for DNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 220(2): 294-9.
Laemmli, U K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.
Laughlin, C A, Cardellichio, C B and Coon, H C (1986). Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *J Virol* 60(2): 515-24.
Lee, C K and Knipe, D M (1985). An immunoassay for the study of DNA-binding activities of herpes simplex virus protein ICP8. *J Virol* 54(3): 731-8.
Lee, S S and Lehman, I R (1997). Unwinding of the box I element of a herpes simplex virus type 1 origin by a complex of the viral origin binding protein, single-strand DNA binding protein, and single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7): 2838-42.
Leinbach, S S and Heath, L S (1989). Characterization of the single-stranded DNA-binding domain of the herpes simplex virus protein ICP8. *Biochim Biophys Acta* 1008(3): 281-6.
Li, W, Asokan, A, Wu, Z, et al. (2008). Engineering and selection of shuffled AAV genomes: a new strategy for producing targeted biological nanoparticles. *Mol Ther* 16(7): 1252-60.
Li, Z, Brister, J R, Im, D S and Muzyczka, N (2003). Characterization of the adenoassociated virus Rep protein complex formed on the viral origin of DNA replication. *Virology* 313(2): 364-76.
Liptak, L M, Uprichard, S L and Knipe, D M (1996). Functional order of assembly of herpes simplex virus DNA replication proteins into prereplicative site structures. *J Virol* 70(3): 1759-67.
Lukonis, C J and Weller, S K (1996). Characterization of nuclear structures in cells infected with herpes simplex virus type 1 in the absence of viral DNA replication. *J Virol* 70(3): 1751-8.
Lukonis, C J, Burkham, J and Weller, S K (1997). Herpes simplex virus type 1 prereplicative sites are a heterogeneous population: only a subset are likely to be precursors to replication compartments. *J Virol* 71(6): 4771-81.
Lukonis, C J and Weller, S K (1997). Formation of herpes simplex virus type 1 replication compartments by transfection: requirements and localization to nuclear domain 10. *J Virol* 71(3): 2390-9.
Lusby, E, Fife, K H and Berns, K I (1980). Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J Virol* 34(2): 402-9.
Lusby, E W and Berns, K I (1982). Mapping of the 5' termini of two adeno-associated virus 2 RNAs in the left half of the genome. *J Virol* 41(2): 518-26.
Maguire, A M, Simonelli, F, Pierce, E A, et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358(21): 2240-8.
Makhov, A M, Boehmer, P E, Lehman, I R and Griffith, J D (1996a). The herpes simplex virus type 1 origin-binding protein carries out origin specific DNA unwinding and forms stem-loop structures. *Embo J* 15(7): 1742-50.
Makhov, A M, Boehmer, P E, Lehman, I R and Griffith, J D (1996b). Visualization of the unwinding of long DNA chains by the herpes simplex virus type 1 UL9 protein and ICP8. *J Mol Biol* 258(5): 789-99.

Makhov, A M, Lee, S S, Lehman, I R and Griffith, J D (2003). Origin-specific unwinding of herpes simplex virus 1 DNA by the viral UL9 and ICP8 proteins: visualization of a specific preunwinding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(3): 898-903.

Makhov, A M, Taylor, D W and Griffith, J D (2004). Two-dimensional crystallization of herpes simplex virus type 1 single-stranded DNA-binding protein, ICP8, on a lipid monolayer. *Biochim Biophys Acta* 1701(1-2): 101-8.

Manno, C S, Chew, A J, Hutchison, S, et al. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101(8): 2963-72.

Manolaridis, I, Mumtsidu, E, Konarev, P, et al. (2009). Structural and biophysical characterization of the proteins interacting with the herpes simplex virus 1 origin of replication. *J Biol Chem* 284(24): 16343-53.

Mapelli, M and Tucker, P A (1999). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on the herpes simplex virus 1 single-stranded DNA binding protein. *J Struct Biol* 128(2): 219-22.

Mapelli, M, Muhleisen, M, Persico, G, van Der Zandt, H and Tucker, P A (2000). The 60-residue C-terminal region of the single-stranded DNA binding protein of herpes simplex virus type 1 is required for cooperative DNA binding. *J Virol* 74(19): 8812-22.

Mapelli, M, Panjikar, S and Tucker, P A (2005). The crystal structure of the herpes simplex virus 1 ssDNA-binding protein suggests the structural basis for flexible, cooperative single-stranded DNA binding. *J Biol Chem* 280(4): 2990-7.

Marintcheva, B and Weller, S K (2003). Helicase motif Ia is involved in single-strand DNA-binding and helicase activities of the herpes simplex virus type 1 origin-binding protein, UL9. *J Virol* 77(4): 2477-88.

Martinez, R, Shao, L and Weller, S K (1992). The conserved helicase motifs of the herpes simplex virus type 1 origin-binding protein UL9 are important for function. *J Virol* 66(11): 6735-46.

McCarty, D M, Christensen, M and Muzyczka, N (1991). Sequences required for coordinate induction of adeno-associated virus p19 and p40 promoters by Rep protein. *J Virol* 65(6): 2936-45.

McCarty, D M, Ni, T H and Muzyczka, N (1992). Analysis of mutations in adeno-associated virus Rep protein in vivo and in vitro. *J Virol* 66(7): 4050-7.

McCarty, D M, Pereira, D J, Zolotukhin, I, Zhou, X, Ryan, J H and Muzyczka, N (1994). Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adeno-associated virus Rep protein. *J Virol* 68(8): 4988-97.

McCarty, D M, Ryan, J H, Zolotukhin, S, Zhou, X and Muzyczka, N (1994). Interaction of the adeno-associated virus Rep protein with a sequence within the A palindrome of the viral terminal repeat. *J Virol* 68(8): 4998-5006.

McGeoch, D J, Dalrymple, M A, Davison, A J, et al. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 69 (Pt 7): 1531-74.

McPherson, R A, Rosenthal, L J and Rose, J A (1985). Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* 147(1): 217-22.

Mendelson, E, Trempe, J P and Carter, B J (1986). Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. *J Virol* 60(3): 823-32.

Meyers, C, Mane, M, Kokorina, N, Alam, S and Hermonat, P L (2000). Ubiquitous human adeno-associated virus type 2 autonomously replicates in differentiating keratinocytes of a normal skin model. *Virology* 272(2): 338-46.

Modrow S und Falke D. (1998) Herpesviren. In: *Molekulare Virologie* (S Morow, Hrsg.) (Kapitel 18.4): 411-463. Spektrum, Heidelberg

Moss, R B, Rodman, D, Spencer, L T, et al. (2004). Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* 125(2): 509-21.

Mueller, C and Flotte, T R (2008). Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 15(11): 858-63.

Muzyczka, N and Berns K I (2001). Parvoviridae: the Viruses and their Replication. In: *Fields Virology* (P M Howley, Ed.) Vol. 2 (Chapter 69): 2327-2359. 2 vols. Lippincott, Philadelphia.

Nash, K, Chen, W, McDonald, W F, Zhou, X and Muzyczka, N (2007). Purification of host cell enzymes involved in adeno-associated virus DNA replication. *J Virol* 81(11): 5777-87.

Nash, K, Chen, W, Salganik, M and Muzyczka, N (2009). Identification of cellular proteins that interact with the adeno-associated virus rep protein. *J Virol* 83(1): 454-69.

Needham, P G, Casper, J M, Kalman-Maltese, V, Verrill, K, Dignam, J D and Trempe, J P (2006). Adeno-associated virus rep protein-mediated inhibition of transcription of the adenovirus major late promoter in vitro. *J Virol* 80(13): 6207-17.

Ni, T H, McDonald, W F, Zolotukhin, I, et al. (1998). Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection. *J Virol* 72(4): 2777-87.

Ogston, P, Raj, K and Beard, P (2000). Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV-16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV-16 E2 protein. *J Virol* 74(8): 3494-504.

Owens, R A, Weitzman, M D, Kyöstiö, S R and Carter, B J (1993). Identification of a DNA-binding domain in the amino terminus of adeno-associated virus Rep proteins. *J Virol* 67(2): 997-1005.

Pfeifer, A and Verma, I M (2001). Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 177-211.

Pombo, A, Ferreira, J, Bridge, E and Carmo-Fonseca, M (1994). Adenovirus replication and transcription sites are spatially separated in the nucleus of infected cells. *Embo J* 13(21): 5075-85.

Qing, K, Mah, C, Hansen, J, Zhou, S, Dwarki, V and Srivastava, A (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 5(1): 71-7.

Quinlan, M P, Chen, L B and Knipe, D M (1984). The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication. *Cell* 36(4): 857-68.

Quinn, J P and McGeoch, D J (1985). DNA sequence of the region in the genome of herpes simplex virus type 1 containing the genes for DNA polymerase and the major DNA binding protein. *Nucleic Acids Res* 13(22): 8143-63.

Rabinowitz, J E, Rolling, F, Li, C, et al. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 76(2): 791-801.

Roizman, B, Knipe, D M and Whitley R J (2007). Herpes Simplex Viruses. In*: Fields Virology* (P M Howley, Ed.) Vol. 2 (Chapter 67): 2479-2499. 2 vols. Lippincott, Philadelphia.

Rose, J A, Maizel, J V, Jr., Inman, J K and Shatkin, A J (1971). Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J Virol* 8(5): 766-70.

Russell, D W (2003). AAV loves an active genome. *Nat Genet* 34(3): 241-2.

Rutledge, E A and Russell, D W (1997). Adeno-associated virus vector integration junctions. *J Virol* 71(11): 8429-36.

Ruyechan, W T (1983). The major herpes simplex virus DNA-binding protein holds single-stranded DNA in an extended configuration. *J Virol* 46(2): 661-6.

Ruyechan, W T and Weir, A C (1984). Interaction with nucleic acids and stimulation of the viral DNA polymerase by the herpes simplex virus type 1 major DNA-binding protein. *J Virol* 52(3): 727-33.

Ryan, J H, Zolotukhin, S and Muzyczka, N (1996). Sequence requirements for binding of Rep68 to the adeno-associated virus terminal repeats. *J Virol* 70(3): 1542-53.

Samulski, R J, Srivastava, A, Berns, K I and Muzyczka, N (1983). Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV. *Cell* 33(1): 135-43.

Samulski, R J, Chang, L S and Shenk, T (1987). A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J Virol* 61(10): 3096-101.

Samulski, R J, Zhu, X, Xiao, X, et al. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *Embo J* 10(12): 3941-50.

Schmidt, M, Chiorini, J A, Afione, S and Kotin, R (2002). Adeno-associated virus type 2 Rep78 inhibition of PKA and PRKX: fine mapping and analysis of mechanism. *J Virol* 76(3): 1033-42.

Schmidt, M, Voutetakis, A, Afione, S, Zheng, C, Mandikian, D and Chiorini, J A (2008). Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J Virol* 82(3): 1399-406.

Shieh, M T, WuDunn, D, Montgomery, R I, Esko, J D and Spear, P G (1992). Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* 116(5): 1273-81.

Slanina, H, Weger, S, Stow, N D, Kuhrs, A and Heilbronn, R (2006). Role of the herpes simplex virus helicase-primase complex during adeno-associated virus DNA replication. *J Virol* 80(11): 5241-50.

Smith, R H, Spano, A J and Kotin, R M (1997). The Rep78 gene product of adeno-associated virus (AAV) self-associates to form a hexameric complex in the presence of AAV ori sequences. *J Virol* 71(6): 4461-71.

Smith, R H and Kotin, R M (1998). The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity. *J Virol* 72(6): 4874-81.
Smith, R H and Kotin, R M (2000). An adeno-associated virus (AAV) initiator protein, Rep78, catalyzes the cleavage and ligation of single-stranded AAV ori DNA. *J Virol* 74(7): 3122-9.
Snyder, R O, Im, D S and Muzyczka, N (1990). Evidence for covalent attachment of the adeno-associated virus (AAV) rep protein to the ends of the AAV genome. *J Virol* 64(12): 6204-13.
Srivastava, A, Lusby, E W and Berns, K I (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 45(2): 555-64.
Stabell, E C and Olivo, P D (1993). A truncated herpes simplex virus origin binding protein which contains the carboxyl terminal origin binding domain binds to the origin of replication but does not alter its conformation. *Nucleic Acids Res* 21(22): 5203-11.
Stow, N D (1982). Localization of an origin of DNA replication within the TRS/IRS repeated region of the herpes simplex virus type 1 genome. *Embo J* 1(7): 863-7.
Stracker, T H, Cassell, G D, Ward, P, et al. (2004). The Rep protein of adeno-associated virus type 2 interacts with single-stranded DNA-binding proteins that enhance viral replication. *J Virol* 78(1): 441-53.
Straus, S E, Sebring, E D and Rose, J A (1976). Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(3): 742-6.
Summerford, C and Samulski, R J (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72(2): 1438-45.
Summerford, C, Bartlett, J S and Samulski, R J (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5(1): 78-82.
Tattersall, P and Ward, D C (1976). Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* 263(5573): 106-9.
Taylor, T J and Knipe, D M (2003). C-terminal region of herpes simplex virus ICP8 protein needed for intranuclear localization. *Virology* 309(2): 219-31.
Taylor, T J, McNamee, E E, Day, C and Knipe, D M (2003). Herpes simplex virus replication compartments can form by coalescence of smaller compartments. *Virology* 309(2): 232-47.
Taylor, T J and Knipe, D M (2004). Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8. *J Virol* 78(11): 5856-66.
Thomson, B J, Weindler, F W, Gray, D, Schwaab, V and Heilbronn, R (1994). Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* 204(1): 304-11.
Tratschin, J D, Miller, I L and Carter, B J (1984). Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J Virol* 51(3): 611-9.
Trempe, J P, Mendelson, E and Carter, B J (1987). Characterization of adeno-associated virus rep proteins in human cells by antibodies raised against rep expressed in Escherichia coli. *Virology* 161(1): 18-28.
Uprichard, S L and Knipe, D M (2003). Conformational changes in the herpes simplex virus ICP8 DNA-binding protein coincident with assembly in viral replication structures. *J Virol* 77(13): 7467-76.
Urabe, M, Hasumi, Y, Kume, A, et al. (1999). Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the N-terminal half of adeno-associated virus type 2 Rep78 protein. *J Virol* 73(4): 2682-93.
Urabe, M, Ding, C and Kotin, R M (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther* 13(16): 1935-43.
Van Vliet, K M, Blouin, V, Agbandje-McKenna, M and Snyder R O. (2008) The Role of the Adeno-Associated Virus Capsid in Gene Transfer. *Methods Mol Biol* 437:51-91
Vaughan, P J, Purifoy, D J and Powell, K L (1985). DNA-binding protein associated with herpes simplex virus DNA polymerase. *J Virol* 53(2): 501-8.
Walker, S L, Wonderling, R S and Owens, R A (1997a). Mutational analysis of the adeno-associated virus Rep68 protein: identification of critical residues necessary for site-specific endonuclease activity. *J Virol* 71(4): 2722-30.
Walker, S L, Wonderling, R S and Owens, R A (1997b). Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 Rep68 protein helicase motifs. *J Virol* 71(9): 6996-7004.

Walz, C, Deprez, A, Dupressoir, T, Durst, M, Rabreau, M and Schlehofer, J R (1997). Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J Gen Virol* 78 (Pt 6): 1441-52.
Wang, Y S and Hall, J D (1990). Characterization of a major DNA-binding domain in the herpes simplex virus type 1 DNA-binding protein (ICP8). *J Virol* 64(5): 2082-9.
Ward, P and Berns, K I (1996). In vitro replication of adeno-associated virus DNA: enhancement by extracts from adenovirus-infected HeLa cells. *J Virol* 70(7): 4495-501.
Ward, P, Dean, F B, O'Donnell, M E and Berns, K I (1998). Role of the adenovirus DNA-binding protein in in vitro adeno-associated virus DNA replication. *J Virol* 72(1): 420-7.
Ward, P, Falkenberg, M, Elias, P, Weitzman, M and Linden, R M (2001). Rep-dependent initiation of adeno-associated virus type 2 DNA replication by a herpes simplex virus type 1 replication complex in a reconstituted system. *J Virol* 75(21): 10250-8.
Weger, S, Wistuba, A, Grimm, D and Kleinschmidt, J A (1997). Control of adeno-associated virus type 2 cap gene expression: relative influence of helper virus, terminal repeats, and Rep proteins. *J Virol* 71(11): 8437-47.
Weger, S, Wendland, M, Kleinschmidt, J A and Heilbronn, R (1999). The adeno-associated virus type 2 regulatory proteins rep78 and rep68 interact with the transcriptional coactivator PC4. *J Virol* 73(1): 260-9.
Weger, S, Hammer, E and Heilbronn, R (2002). Topors, a p53 and topoisomerase I binding protein, interacts with the adeno-associated virus (AAV-2) Rep78/68 proteins and enhances AAV-2 gene expression. *J Gen Virol* 83(Pt 3): 511-6.
Weger, S, Hammer, E and Heilbronn, R (2004). SUMO-1 modification regulates the protein stability of the large regulatory protein Rep78 of adeno associated virus type 2 (AAV-2). *Virology* 330(1): 284-94.
Weindler, F W and Heilbronn, R (1991). A subset of herpes simplex virus replication genes provides helper functions for productive adeno-associated virus replication. *J Virol* 65(5): 2476-83.
Weir, H M, Calder, J M and Stow, N D (1989). Binding of the herpes simplex virus type 1 UL9 gene product to an origin of viral DNA replication. *Nucleic Acids Res* 17(4): 1409-25.
Weitzman, M D, Kyöstiö, S R, Kotin, R M and Owens, R A (1994). Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(13): 5808-12.
Weitzman, M D, Fisher, K J and Wilson, J M (1996). Recruitment of wild-type and recombinant adeno-associated virus into adenovirus replication centers. *J Virol* 70(3): 1845-54.
Weitzman, M D, Kyöstiö, S R, Carter, B J and Owens, R A (1996). Interaction of wild-type and mutant adeno-associated virus (AAV) Rep proteins on AAV hairpin DNA. *J Virol* 70(4): 2440-8.
Weller, S K, Spadaro, A, Schaffer, J E, Murray, A W, Maxam, A M and Schaffer, P A (1985). Cloning, sequencing, and functional analysis of oriL, a herpes simplex virus type 1 origin of DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 5(5): 930-42.
White, E J and Boehmer, P E (1999). Photoaffinity labeling of the herpes simplex virus type-1 single-strand DNA-binding protein (ICP8) with oligodeoxyribonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 264(2): 493-7.
Wistuba, A, Kern, A, Weger, S, Grimm, D and Kleinschmidt, J A (1997). Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol* 71(2): 1341-52.
Wonderling, R S and Owens, R A (1997). Binding sites for adeno-associated virus Rep proteins within the human genome. *J Virol* 71(3): 2528-34.
Wu, C A, Nelson, N J, McGeoch, D J and Challberg, M D (1988). Identification of herpes simplex virus type 1 genes required for origin-dependent DNA synthesis. *J Virol* 62(2): 435-43.
Wu, P, Xiao, W, Conlon, T, et al. (2000). Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism. *J Virol* 74(18): 8635-47.
WuDunn, D and Spear, P G (1989). Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol* 63(1): 52-8.
Xiao, W, Warrington, K H, Jr., Hearing, P, Hughes, J and Muzyczka, N (2002). Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2. *J Virol* 76(22): 11505-17.
Xiao, X, Li, J and Samulski, R J (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72(3): 2224-32.
Yakobson, B, Koch, T and Winocour, E (1987). Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. *J Virol* 61(4): 972-81.

Yakobson, B, Hrynko, T A, Peak, M J and Winocour, E (1989). Replication of adeno-associated virus in cells irradiated with UV light at 254 nm. *J Virol* 63(3): 1023-30.
Yalkinoglu, A O, Heilbronn, R, Burkle, A, Schlehofer, J R and zur Hausen, H (1988). DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res* 48(11): 3123-9.
Yan, Z, Zhang, Y, Duan, D and Engelhardt, J F (2000). Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12): 6716-21.
Yang, C C, Xiao, X, Zhu, X, et al. (1997). Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro. *J Virol* 71(12): 9231-47.
Yang, Q, Kadam, A and Trempe, J P (1992). Mutational analysis of the adeno-associated virus rep gene. *J Virol* 66(10): 6058-69.
Yang, Q and Trempe, J P (1993). Analysis of the terminal repeat binding abilities of mutant adeno-associated virus replication proteins. *J Virol* 67(7): 4442-7.
Yoon-Robarts, M and Linden, R M (2003). Identification of active site residues of the adeno-associated virus type 2 Rep endonuclease. *J Biol Chem* 278(7): 4912-8.
Yoon-Robarts, M, Blouin, A G, Bleker, S, et al. (2004). Residues within the B' motif are critical for DNA binding by the superfamily 3 helicase Rep40 of adeno-associated virus type 2. *J Biol Chem* 279(48): 50472-81.
Yoon, M, Smith, D H, Ward, P, Medrano, F J, Aggarwal, A K and Linden, R M (2001). Amino-terminal domain exchange redirects origin-specific interactions of adeno-associated virus rep78 in vitro. *J Virol* 75(7): 3230-9.
Zhang, H G, Wang, Y M, Xie, J F, et al. (2001). Recombinant adenovirus expressing adeno-associated virus cap and rep proteins supports production of high-titer recombinant adeno-associated virus. *Gene Ther* 8(9): 704-12.
Zhou, X, Zolotukhin, I, Im, D S and Muzyczka, N (1999). Biochemical characterization of adeno-associated virus rep68 DNA helicase and ATPase activities. *J Virol* 73(2): 1580-90.

Ja, ich habe schon oft nachgedacht über den Grund dieser zärtlichen Liebe so Vieler zum Staatsdienst. ... Ich fürchte es ist bei den Meisten der Reiz der Bequemlichkeit, ... die Satisfaktion, fast alle Stunde etwas Rundes fertig zu machen, während die Kunst und die Wissenschaften auf Erden niemals fertig werden, ja in alle Ewigkeit kein Ende absehen.

Joseph von Eichendorff
„Dichter und ihre Gesellen“

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Regine Heilbronn, die mir mit der freundlichen Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, der Überlassung des anspruchsvollen Themas und ihrer Betreuung die Möglichkeit gegeben hat, diese Dissertation zu erarbeiten.

Herrn Dr. Stefan Weger danke ich für die Einführung in das wissenschaftlich-experimentelle Arbeiten, seine Unterstützung bei der Durchführung meiner Experiment und die geduldige Beantwortung aller Fragen.

Eva Hammer und Kerstin Winter waren im Labor wichtige Gesprächspartner, denen ich für die fachliche Hilfe und den Austausch über viele andere Dinge des Lebens sehr dankbar bin. Mein Dank schließt aber auch zahlreiche weitere Kollegen ein, die ich während meiner Arbeit kennen gelernt habe. Frau Ruth Joncker war immer sehr zuvorkommend, freundlich und eine große Hilfe im Institutsalltag.

Michaela Mahn möchte ich für die Durchsicht meines Manuskripts, ihre Hinweise, die Beantwortung vieler weiterer Fragen und zahlreiche andere Gespräche danken.

Meine gesamte Familie hat sowohl diese Arbeit als auch mein Studium immer mit großem Interesse und ihrer Fürsorge, Unterstützung und Geduld begleitet. Danke!

Anne Markwardt hat durch ihre Motivation, ihr Vertrauen und ihre Hilfe während der gesamten Zeit einen großen Anteil an dieser Arbeit. Ihr will ich aber vor allem auch für die vielen besonderen Momente und die vielen anderen Themen außerhalb der Naturwissenschaft danken.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Veröffentlichungen

Artikel

Alex M, Weger S, Slanina H, Cathomen T and Heilbronn R. (2010) AAV Rep78 N-Terminal Amino Acids Mediate Ternary Complex Formation with HSV ICP8 on AAV ssDNA. Journal of Virology. *Date of Submission: 02/26/2010*

Vorträge

Alex M, Weger S, Slanina, H & Heilbronn R. (2008) ssDNA-dependent formation of a ternary complex of HSV ICP8 and AAV Rep78 needed for AAV DNA replication. XII Parvovirus Workshop, Córdoba, Spanien

Poster

Alex M, Weger S, Slanina, H & Heilbronn R. (2008) ssDNA-dependent formation of a tripartite complex of HSV ICP8 and AAV Rep78 needed for AAV DNA replication. 18th Annual Meeting, Gesellschaft für Virologie, Heidelberg

Alex M, Weger S, Slanina, H & Heilbronn R. (2007) ssDNA-dependent formation of a tripartite complex of HSV ICP8 and AAV Rep78 needed for AAV DNA replication. Third European Congress of Virology, Nürnberg

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Martin Alex, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
„Die Bedeutung von Rep78 und ICP8 bei der Initiation der DNA-Replikation des Adeno-assoziierten Virus durch Herpes Simplex Virus“
selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 31. August 2009