

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DAS ADENOASSOZIIERTE VIRUS – ERFOLG VERSPRECHENDES VEKTORSYSTEM FÜR DIE GENTHERAPIE

Die Gentherapie ermöglicht der Medizin zum ersten Mal, genetisch bedingte Krankheiten nicht nur symptomatisch, sondern auch kausal zu behandeln. Dazu sollen nicht oder falsch funktionierende Gene repariert oder die defekten Genfunktionen komplementiert werden. Viren entwickelten über Jahrtausende verschiedenste Strategien, ihr Erbgut in Wirtszellen einzubringen um diese genetisch umzuprogrammieren. Somit liegt es nahe, diese Funktionen der Viren auszunutzen und davon abgeleitete virale Vektorsysteme zu etablieren. Die adeno-assoziierten Viren (AAV) weisen zahlreiche biologische Eigenschaften auf, die sie geradezu als Genvektoren prädisponieren.

AAV gilt als apathogen, da trotz der hohen Durchseuchungsrate bisher dem Virus noch keine Erkrankungen zugeordnet werden konnten. Es wird sogar diskutiert, ob das Virus tumor-suppressive Eigenschaften aufweist (Sprecher-Goldberger *et al.*, 1971; Mayor *et al.*, 1976; Georg-Fries *et al.*, 1984; Batchu *et al.*, 1994; Hermonat, 1994a/b).

AAV kann je nach Serotyp verschiedene Zelltypen, auch ruhende, postmitotische Zellen latent infizieren (Mizuno *et al.*, 1998). Das Genom liegt im Zellkern zumeist episomal vor, wodurch das Risiko gefährlicher Mutationen verringert wird (Russell *et al.*, 2003). Bei Mäusen, Hunden, Primaten und Menschen wurde in unterschiedlichen Geweben eine stabile Langzeitexpression nachgewiesen (Flotte *et al.*, 1994; Muzyczka *et al.*, 2001; Monahan *et al.*, 2002). Dabei infizieren AAV-Vektoren antigenpräsentierende Zellen schlecht und exprimieren konstruktionsbedingt keine AAV-Proteine, sodass nur eine milde Immunantwort induziert wird (Fisher *et al.*, 1997; Jooss *et al.*, 1998; Hernandez *et al.*, 1999). So können AAV-Vektoren auch bei sensiblen Geweben wie dem ZNS eingesetzt werden (Davidson *et al.*, 2000).

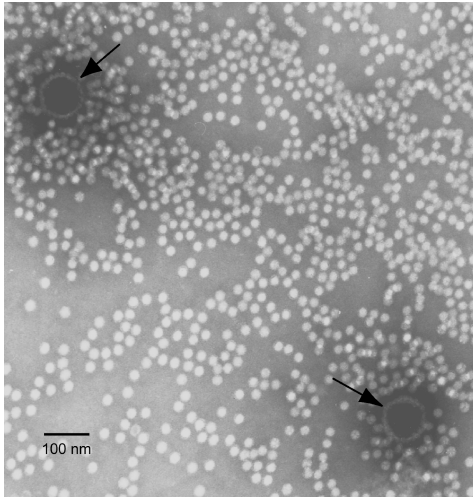
Das Capsid von AAV-Vektoren kann chemisch modifiziert oder das Vektorgenom mit den Capsiden anderer AAV-Serotypen pseudotypisiert werden (Girod *et al.*, 1999; Rabinowitz *et al.*, 2000; Grimm *et al.*, 2002; Burger *et al.*, 2004). So kann auf den Zelltropismus Einfluss genommen und eine neutralisierende Antikörperreaktion bei zu wiederholender Applikation verhindert werden. Die Verpackungskapazität von AAV-Vektoren von ca. 5 kbp reicht für die

Expression vieler Gene aus. Neuere Experimente zeigen, dass diese sogar verdoppelt werden kann. Dazu wird ein Transgen gesplittet, das sich dann im Nukleus durch Heterodimerisation der Vektoren wieder vereint (Nakai *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2000).

Nach zahlreichen erfolgreichen tierexperimentellen Studien wurde 1996 die erste klinische Studie bei Mukoviszidose-Patienten durchgeführt. Inzwischen wurden über 250 Probanden mit AAV-Vektoren in unterschiedlichen klinischen Studien aus den Bereichen der inneren Medizin (autoimmun-bedingte Arthritiden, Hämophilie B, hereditäres Lungenemphysem) und der Neurologie (Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer) behandelt. Weder Toxizität noch Pathogenität von AAV-Vektoren waren bisher ein Problem. Die hohe Seroprävalenz für Antikörper gegen AAV in der Bevölkerung hatte bisher keinen negativen Einfluss auf die Transduktionseffizienz der Targetzellen. Die Expression des Transgens war in der Regel nachweisbar und lang anhaltend. Gelegentlich konnte trotz lokaler Applikation der Vektor in Blut, Sputum, Urin und Stuhl oder nach Injektion in die Gefäßbahn zusätzlich in der Samenflüssigkeit, jedoch nie in den Keimzellen selbst, nachgewiesen werden. Hochkonzentrierte Vektorapplikationen induzierten eine Antikörpersynthese, die aber in den bisherigen Studien auch bei wiederholter Vektorapplikation unproblematisch war (Carter, 2005). Da es sich bislang fast ausschließlich um Phase-I-Studien gehandelt hat, war ein signifikant therapeutischer Erfolg mit niedrigdosierter Vektorgabe nicht zu erwarten.

Trotz dieser Erfolge bleiben noch viele Fragen zu klären. Ein zu lösendes Problem ist die Vektorproduktion. Die in den Studien applizierte Vektormenge betrug, häufig auch wiederholt, bis zu  $10^{13}$  Partikel pro Proband (Carter *et al.*, 2005). Auch für präklinische Studien werden große Mengen aufgereinigter Vektoren benötigt. Die bisherigen Produktionsmethoden sind allerdings technisch aufwendig, kosten- und zeitintensiv. Insofern sind neue Techniken zur Vektorherstellung integraler Bestandteil der Weiterentwicklung der auf AAV-basierenden Gentherapie (Zolotukhin, 2005). AAV ist ein Dependovirus, benötigt für seine Vermehrung die Hilfe eines Helfervirus. Zu diesen gehört das Adenovirus oder ein Virus der Herpesgruppe, hier insbesondere das Herpes-simplex-Virus (HSV) (Muzyczka *et al.*, 2001). Mithilfe rekombinanter HSV, die die AAV-Gene *rep* und *cap* tragen, können AAV-Vektoren im großen Maßstab hergestellt werden (Conway *et al.*, 1999). Für die Weiterentwicklung solcher Helferviren und zur Optimierung der Produktionsverfahren ist es unerlässlich, die molekularen Interaktionen zwischen AAV und HSV im Detail zu verstehen.

## 1.2 DAS ADENOASSOZIIERTE VIRUS (AAV)



**Abb. 1.1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von AAV Typ 2 und HSV Typ 1. Die Herpesviren werden durch Pfeile markiert.

Die Familie der Parvoviren umfasst zwei Unterfamilien. Während die Densovirinae ausschließlich Insekten infizieren, können die Parvovirinae verschiedene Vertebraten einschließlich des Menschen infizieren. Die letzteren unterteilen sich in drei Genera: in die Parvoviren, Erythroviren und Dependoviren, dessen Genus durch die verschiedenen Serotypen von AAV gebildet wird. Diese Viren zeichnen sich dadurch aus, dass sie für ihre Replikation eine Koinfektion mit einem Helfervirus benötigen (Muzyczka *et al.*, 2001). Als Helferviren können dabei Adenoviren, humane Papillomaviren (Walz *et al.*, 1997; Ogston *et al.*, 2000) und fast alle

Mitglieder der Herpesvirusgruppe fungieren (Buller *et al.*, 1981; McPherson *et al.*, 1985; Thomson *et al.*, 1994). Bei Behandlung von Zellen mit karzinogenen Stoffen oder UV-Bestrahlung kann man eine begrenzte Replikation von AAV auch in Abwesenheit von Helferviren beobachten (Yakobson *et al.*, 1987, 1989; Yalkinoglu *et al.*, 1988).

Die Parvoviren gehören zu den kleinsten bekannten Viren (s. Abb. 1.1). Das DNA-Genom wird von einem ikosaedrischen Capsid mit einem Durchmesser von ca. 22 nm umgeben. Die Parvoviren sind relativ unempfindlich gegenüber lipidlösenden Agenzien, vielen Enzymen, einem weiten pH-Bereich und Hitze einwirkung, was u.a. auf das Fehlen einer Lipidhülle zurückzuführen ist (Muzyczka *et al.*, 2001). Durch DNA-interkalierende UV-Bestrahlung können die Viren inaktiviert werden (Starke *et al.*, 1974).

### 1.2.1 AAV – VORKOMMEN UND RISIKOBEWERTUNG

AAV wurde erstmals 1965 als Kontamination in Adenovirusisolaten identifiziert (Archetti *et al.*, 1965; Atchinson *et al.*, 1965; Hoggan *et al.*, 1966). Inzwischen sind 11 Serotypen bekannt, die Menschen und/oder Affen befallen. Die Serotypen 2, 3 und 5 wurden beim Menschen entdeckt, wo sie sich mit einer Prävalenz von 20 % in Muskelbiopsien (Muzyczka

*et al.*, 2001) und einer Prävalenz von 1 bis 5 % in hämatopoetischen Zellen (Grossman *et al.*, 1992) sowie im Bereich des Genitaltraktes (Friedman-Einat *et al.*, 1997) nachweisen lassen. Über 70 % der erwachsenen Bevölkerung weisen Antikörper gegen diese AAV-Subtypen auf. Die Serokonversion erfolgt dabei meist im Kindesalter (Blacklow *et al.*, 1968a/b; Georg-Fries *et al.*, 1984). Trotz der hohen Durchseuchungsrate konnten bisher keine pathogenen Eigenschaften dieser AAV-Subtypen nachgewiesen werden, weshalb diese drei Subtypen vom Bundesministerium für Gesundheit der Risikogruppe 1 für gentechnische Arbeiten zugerechnet werden.

Die Herkunft von AAV-6 ist unbekannt. Es wurde als Kontamination eines Laborisolats von Adenoviren isoliert und könnte durch Rekombination zwischen AAV-1 und 2 entstanden sein (Xiao *et al.*, 1999). Die Serotypen 1 und 4 sowie die 2002 bzw. 2004 entdeckten Subtypen 7, 8, 10 und 11 wurden aus Affengewebe isoliert, wobei die Typen 1 und 4 *in vitro* humane Zellen infizieren können (Gao *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2004). Auch diesen Subtypen konnten bisher keine Erkrankungen zugeordnet werden. Da aber die natürliche Infektion beim Menschen noch nicht nachgewiesen wurde, kann im Falle einer Infektion nicht mit letzter Sicherheit von Apathogenität ausgegangen werden, weshalb diese Serotypen zur Risikogruppe 2 gezählt werden. Ebenfalls zur Gruppe 2 wird, da momentan Erfahrungen fehlen, der aus humanem Gewebe isolierte Subtyp 9 (Gao *et al.*, 2004).

Daneben gibt es noch AAV(s), die andere Vertebraten, wie z.B. Rinder (BAAV) oder Hunde (CAAV), infizieren können (Muzyczka *et al.*, 2001).

## 1.2.2 DAS GENOM – STRUKTUR, TRANSKRIPTION UND TRANSLATION

### 1.2.2.1 GENOMAUFBAU

Das lineare, einzelsträngige DNA-AAV-Genom enthält 4675 Basenpaare (bp) und liegt zu gleichen Anteilen in positiver als auch in negativer Polarität vor. Es trägt die zwei offenen Leserahmen (ORF) *rep* und *cap* (s. Abb. 1.3). Im linken Bereich (mp 5-40) werden die nichtstrukturellen Rep-Proteine codiert, die z.B. als Regulatoren alle Phasen des Infektionszyklus steuern. Der rechte Leserahmen (mp 50-90) codiert für die drei Strukturproteine VP1, VP2 und VP3. Gesteuert wird die Transkription der AAV-Gene von drei Promotoren, die nach ihrer Kartenposition als p5, p19 und p40 bezeichnet werden (s. Abb. 1.3). Diese

enthalten Bindungselemente für eine Reihe von zellulären und viralen Transkriptionsfaktoren (Muzyczka *et al.*, 2001).

Beidseitig wird das Genom von zwei jeweils identischen 145 bp langen invertierten terminalen Sequenzwiederholungen (ITR(s)) flankiert. Man unterscheidet in diesem Bereich vier Sequenzen: das A-, B-, C- und D-

Palindrom. Durch selbst komplementäre Rückfaltung können diese Sequenzen eine T-förmige Haarnadelstruktur ausbilden, wobei die Umschlagspunkte an nicht palindromischen Basenpaaren im B-

und C-Bereich liegen (Hauswirth *et al.*, 1977; Lusby *et al.*, 1980). Die Ausbildung der Sekundärstruktur kann je nach Lage der B- bzw. C-Palindrome in flip- oder flop-Orientierung erfolgen (s. Abb. 1.2). Die Konfiguration des einen

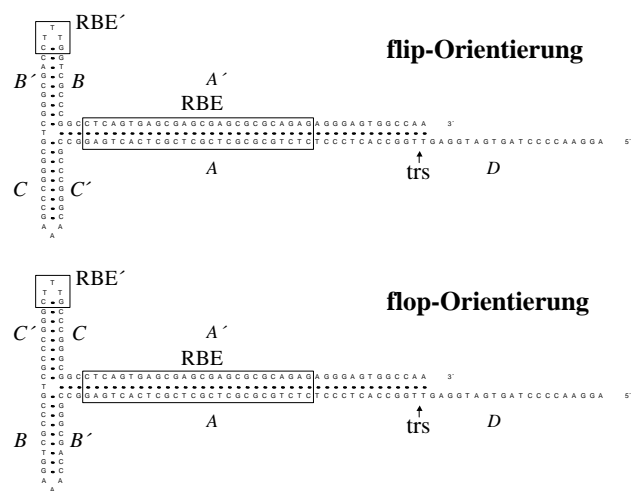
Endes des Genoms ist dabei unabhängig von der des anderen Endes (Lusby *et al.*, 1981; Samulski *et al.*, 1982). Im Bereich der ITR(s) befinden sich jeweils die *rep-binding elements* RBE und RBE' sowie die *terminal resolution site* (trs) (Muzyczka *et al.*, 2001).

1981; Samulski *et al.*, 1982). Im Bereich der ITR(s) befinden sich jeweils die *rep-binding elements* RBE und RBE' sowie die *terminal resolution site* (trs) (Muzyczka *et al.*, 2001).

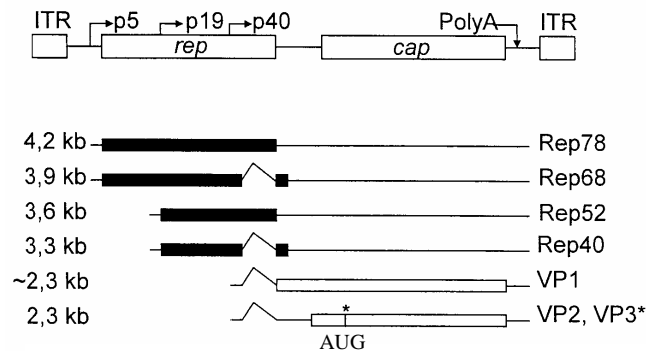
### 1.2.2.2 TRANSKRIPTION UND TRANSLATION

Die AAV-Transkripte werden von den drei RNA-Polymerase II-Promotoren p5, p19 und p40 initiiert. Zwischen den Genompositionen p42 und p46 befindet sich ein Intron, sodass alle Transkripte in ungespleißter und gespleißter Form produziert werden (s. Abb. 1.3).

Die Transkripte von p5 und p19 werden im Zytoplasma in die vier Rep-Proteine translatiert, die entsprechend ihrem ungefähren Molekulargewicht im SDS-Polyacrylamidgel als Rep78 (72 kDa), Rep68 (62 kDa), Rep52 (46 kDa) und Rep40 (34 kDa) bezeichnet werden (Lusby *et al.*, 1982; Mendelson *et al.*, 1986).



**Abb. 1.2: Flip- und flop-Orientierung der inverted terminal repeats (ITR(s)).** Markiert sind zusätzlich die *rep-binding elements* (RBE, RBE'), die *terminal resolution site* (trs) und die palindromischen Abschnitte (A-D, A'-D') (Berns *et al.*, 1995).

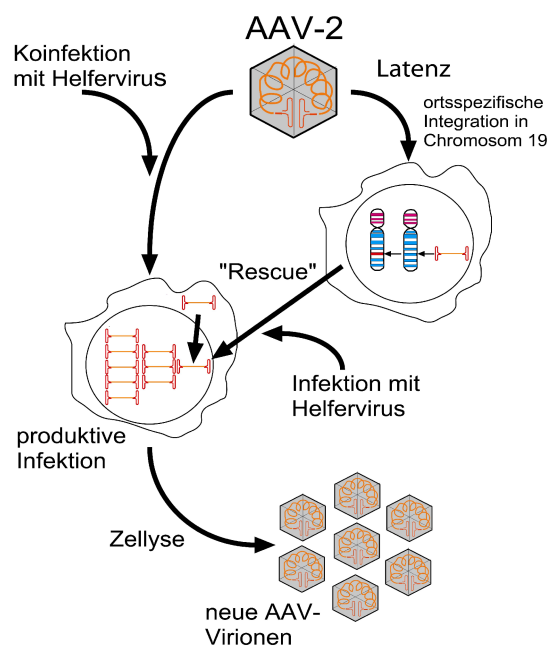


**Abb. 1.3: Genomorganisation und Transkripte.** Im oberen Teil ist das Genom mit den ORF(s), den Promotoren und der Polyadenylierungsstelle abgebildet. Darunter befinden sich die mRNA(s). Die prominenten Balken stellen die codierenden Bereiche, die dünnen Linien die untranslatierten Bereiche, die Zacken die Introns dar. Rechts werden die Produkte der mRNA(s) angegeben (Muzyczka *et al.*, 2001).

Mengenverhältnis für VP1:VP2:VP3 von 1:1:10, wie es auch in den Capsiden vorliegt (Buller *et al.*, 1978).

Die für die Capsidproteine VP1, VP2 und VP3 codierenden Transkripte werden vom p40-Promotor initiiert. Die hauptsächlich vorliegende Spleißvariante codiert für die Proteine VP2 und VP3. Die Translation von VP3 (62 kDa) startet vom ersten AUG-Startkodon aus, während die von VP2 (73 kDa) an einem stromaufwärts gelegenen, nur in ca. 10 % der Fälle benutzten, ACG-Kodon startet. Die seltenere Spleißvariante VP1 (87 kDa) umfasst den ganzen ORF *cap*. Daraus ergibt sich das

### 1.2.3 LATENTER UND PRODUKTIVER LEBENSZYKLUS VON AAV



**Abb. 1.4: Biphasischer Lebenszyklus von AAV.**

In Abwesenheit von Helferviren etabliert AAV eine latente Infektion. Es kann dabei episomal oder im zellulären Genom integriert vorliegen. Kommt es zu einer Koinfektion oder zu einer Superinfektion von latent infizierten Zellen, durchläuft AAV den produktiven Zyklus. Dabei wird das Provirus u.a. mittels der großen Rep-Proteine und der ITR(s) reaktiviert („rescue“) (Samulski *et al.*, 1983). Im Bereich des Zellkerns findet dann die DNA-Replikation, Transkription sowie der größte Teil der Virusreifung statt (s. Abb. 1.4) (Muzyczka *et al.*, 2001).

### 1.2.3.1 ADSORPTION UND PENETRATION

Der am besten untersuchte Subtyp AAV-2 bindet an Heparin-Sulfat-Proteoglycan als primärer Rezeptor (Summerford *et al.*, 1998). Als Korezeptoren dienen die Rezeptoren für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Qing *et al.*, 1999), den Hepatozyten-Wachstumsfaktor c-Met (Kashiwakura *et al.*, 2005) sowie die Integrine  $\alpha_v\beta_5$  (Summerford *et al.*, 1999). Die Aufnahme erfolgt durch Endozytose über „clatharin-coated pits“ (Bartlett *et al.*, 2000). Das Freisetzen des Genoms (*uncoating*) erfolgt während oder nach dem Eintritt in den Zellkern (Xiao *et al.*, 2002). Aufnahme und *uncoating* sind schnelle Prozesse, nach 30 Minuten akkumuliert das Virus perinukleär (Bartlett *et al.*, 2000) und Virus-DNA ist bereits zwei Stunden nach Infektion im Kern nachweisbar (Muzyczka *et al.*, 2001).

### 1.2.3.2 LATENTE INFEKTION VON AAV

Fehlen Helfervirusfunktionen für die produktive AAV-Replikation, werden nach Umwandlung des einzelsträngigen AAV-Genoms zum Doppelstrang nur limitierte Mengen an Rep-Proteinen gebildet. Die großen Rep-Proteine supprimieren dann den p5- und p19-Promotor und unterbinden eine weitere Transkription (Kyöstiö *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 1997). Das DNA-bindungsunfähige kleine Rep-Protein Rep52 weist hier ebenfalls eine inhibitorische Aktivität auf (Kyöstiö *et al.*, 1994; Owens *et al.*, 1993). Weitere Untersuchungen zeigen, dass auch zelluläre Kofaktoren, wie beispielsweise PC4, an der Inhibition der viralen Genexpression beteiligt sind (Ge *et al.*, 1994a/b; Weger *et al.*, 1999).

In bis zu 10 % der infizierten Zellen etabliert AAV eine latente Infektion (Hermonat *et al.*, 1984a; Laughlin *et al.*, 1986). Das Genom liegt dann entweder in der Wirtszell-DNA integriert oder überwiegend als stabiles Episom vor (Russell *et al.*, 2003). In 70 % der Integrationsereignisse kommt es zu einer ortsspezifischen, orientierungsunabhängigen Integration der Virus-DNA mittels nichthomologer Rekombination auf dem Chromosom 19 in der Region 19q13.3-qter Stelle, welche als AAVS1 bezeichnet wird (Kotin *et al.*, 1990, 1991, 1992; Samulski *et al.*, 1991; Hüser *et al.*, 2003). Die Integration erfolgt dabei in einem Bereich von einigen hundert Basenpaaren. In vielen Fällen kommt es hierbei zu Umordnungen und Inversionen der viralen und zellulären Sequenzen (Kotin *et al.*, 1992).

Der Integrationsort AAVS1 enthält ein RBE sowie eine trs in einem definierten Abstand (Wonderling *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2000). Die für die Integration benötigten großen Rep-Proteine bringen dabei das AAV-Genom in räumliche Nachbarschaft zum Integrationsort, indem sie sowohl an das RBE in der AAVS1-Region als auch an den AAV-ITR(s) binden (Weitzman *et al.*, 1994). Der genaue Integrationsmechanismus und welches Gewebe beim Menschen den präferenziellen Latenzort für AAV darstellt, konnten bis heute nicht bis ins Detail geklärt werden.

### 1.2.3.3 PRODUKTIVE INFEKTION VON AAV

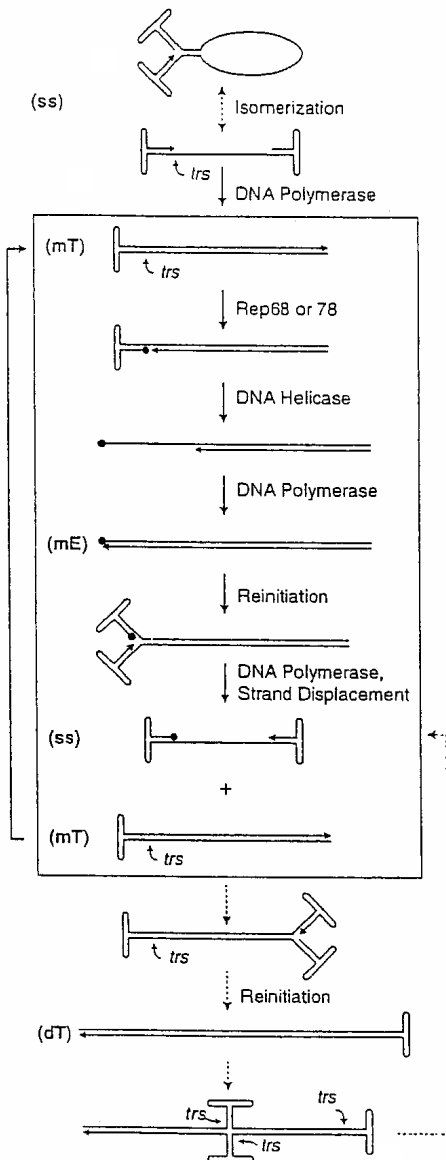
In Gegenwart von Helferviren durchläuft AAV eine produktive Infektion. Initial gebildetes Rep78 und 68 wirken jetzt nicht mehr inhibitorisch, sondern aktivieren alle drei AAV-Promotoren durch Bindung an das RBE in den ITR(s) und der p5-Region (Pereira *et al.*, 1997; Weger *et al.*, 1997) sowie an Elemente im p19- und p40-Promotor (McCarty *et al.*, 1991; Pereira *et al.*, 1997). Daneben interagiert Rep mit zahlreichen zellulären Proteinen. Die Expression der großen, v.a. im Zellkern lokalisierten Rep-Proteine ist essenziell für die DNA-Replikation (Hermonat *et al.*, 1984b; Tratschin *et al.*, 1984).

Die Reifung von AAV findet im Zellkern statt. An der Translokation der Genome in die durch *self-assembly* vorgefertigten Capside (Ruffing *et al.*, 1992) sind die kleinen, im Zytoplasma lokalisierten Rep-Proteine Rep52/40 mit ihrer Helicaseaktivität und die ITR(s) beteiligt (McLaughlin *et al.*, 1988; Dubielzig *et al.*, 1999; King *et al.*, 2001). Durch abschließende Helfervirus-vermittelte Zelllyse werden die neu gebildeten Virionen freigesetzt (Berns *et al.*, 1995).

### 1.2.3.4 DNA-REPLIKATION VON AAV

Das AAV-Genom repliziert nach dem sogenannten *single strand displacement*-Mechanismus (Straus *et al.*, 1976; Tattersall *et al.*, 1976; Hauswirth *et al.*, 1977, 1979; Lusby *et al.*, 1980). Dabei nimmt die DNA-Replikation von AAV ihren Ausgang an dem ITR, der durch Rückfaltung eine Haarnadelstruktur mit 3'-Ende ausbildet und somit als Primer für die zellulären DNA-Polymerasen  $\delta$  und/oder  $\epsilon$  dienen kann (Ni *et al.*, 1998). Bevor ein vollständiger





**Abb. 1.5: DNA-Replikationsmodell von AAV.** **ss:** single-stranded viral DNA, **trs:** terminal resolution site, **mE:** monomer extended replication form, **mT:** monomer extended form, **dT:** dimer turnaround replication form (Muzyczka *et al.*, 2001).

komplementärer Strang synthetisiert werden kann, muss der zweite ITR am 5'-Ende durch die ATP-abhängige Helicaseaktivität von Rep aufgewunden werden. Um auch den ursprünglichen 3'-ITR zu replizieren, der die komplementären Stränge verbindet, wird der 3'-ITR und damit die trs durch die Rep-assoziierte Helicase entwunden (Brister *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000). In einem zweiten Schritt binden Rep78/68 an das RBE, RBE' und die trs, wodurch die Proteine und die AAV-DNA in einer bestimmten räumlichen Orientierung zueinander stehen. Erst dann erzeugen die großen Rep-Proteine mittels ihrer Endonukleaseaktivität einen Einzelstrangbruch. Die Affinität zu RBE' hängt vor allem von der Ausbildung von Haarnadelstrukturen ab. Somit kann ein Strangbruch an linearen Molekülen nicht stattfinden (Im *et al.*, 1990; Snyder *et al.*, 1993; Chiorini *et al.*, 1994; McCarty *et al.*, 1994). Dieser Prozess wird als terminale Auflösung (*terminal resolution*) bezeichnet und generiert ein neues freies 3'-Ende. Dieses dient wiederum als Primer für die Polymerisation zum doppelsträngigen Volllänge-Replikationsintermediat (s. Abb. 1.5 [mE]). Dessen Enden können wieder die energetisch bevorzugten Haarnadelstrukturen ausbilden, sodass es zu einer Reinitiation der DNA-Synthese kommt. Es kommt zu einer Verdrängungsreaktion zwischen dem neu synthetisiertem Strang und dem alten komplementären Strang. Die Helicaseaktivität der großen Rep-Proteine spielt möglicherweise sowohl bei der Ausbildung der Haarnadelstrukturen, die ein Entwinden der linearen Duplex-Moleküle voraussetzt, als auch bei der Verdrängungsreaktion eine wichtige Rolle (Im *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1999). Es entsteht pro Zyklus ein neues Einzelstrang-Molekül, dessen

Polarität davon abhängt, welcher Strang von welchem verdrängt wurde. Das Molekül kann jetzt als Replikationsmatrize dienen oder verpackt werden. Kommt es zu einer Polymerisierungs- und Verdrängungsreaktion vom anderen Ende her, bevor ein Strangbruch durch die großen Rep-Proteine erzeugt werden konnte, bilden sich dimere Replikationsformen [dT]. Die monomeren oder dimeren Replikationsformen werden auch als RF1 und RF2 bezeichnet.

### 1.2.3.5 VIRALE UND ZELLULÄRE HELFERFUNKTIONEN

Das AAV benötigt für seine Replikation ein geeignetes zelluläres Milieu, welches entweder durch die Infektion mit Helferviren oder zellulären Stress induziert werden kann.

Die erforderlichen zellulären Faktoren sind bei der *leading strand*-Synthese der Zelle beteiligt. Essenziell sind das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) und die ssDNA-bindenden *replication factors A* und *C* (RFA und RFC). Diese Proteine bilden zusammen mit den DNA-Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$  an einem 3'-Primer einen Komplex (Ni *et al.*, 1998). Weitere Faktoren, beispielsweise die mit Rep-interagierende *high mobility group 1* (HMG1), scheinen von Bedeutung zu sein (Costello *et al.*, 1997).

Der Helfereffekt von Helferviren kann auf verschiedenen Mechanismen basieren. Das Adenovirus stellt für die AAV-Replikation die Adenovirus-assoziierte RNA und die Genprodukte E1A, E1B, E4 ORF6 sowie E2A zur Verfügung (Janik *et al.*, 1981; Richardson *et al.*, 1984; Carter *et al.*, 1992). Diese Helferproteine wirken vorwiegend auf die Regulation der AAV-Expression (Muzyczka *et al.*, 2001). Zugleich sorgen sie für ein geeignetes Zellmilieu durch die Synthese zellulärer Replikationsproteine, den Eintritt der Zelle in die S-Phase und einen Zellzyklusstopp in der späten S- oder G2-Phase (Muzyczka *et al.*, 1992, 2001). Bis auf das ssDNA-bindende E2A werden die anderen adenoviralen Replikationsproteine nicht für die AAV-DNA-Synthese benötigt.

Im Gegensatz zu Adenovirus codieren sämtliche HSV-Helfergene für Replikationsproteine. Zu den essenziellen Helfereffekten gehören der Helicase-Primase-Komplex (UL5/UL8/UL52) und das *single-strand DNA-binding protein* ICP8 (UL29). Die HSV-Polymerase (UL30) und der dazugehörige *processivity factor* (UL42) sind nicht essenziell, erhöhen aber die AAV-DNA-Replikation (Weindler *et al.*, 1991). Der Helfereffekt der HSV-1-Funktionen für die AAV-Replikation wird in Kapitel 1.3.3 ausführlicher beschrieben.

#### 1.2.4 HERSTELLUNG VON AAV-VEKTOREN

Für die Generierung von AAV-Vektoren werden alle AAV-Sequenzen, mit Ausnahme der ITR(s), deletiert und durch das gewünschte Transgen ersetzt. Bei der klassischen Methode der Vektorherstellung wird für die eigentliche Verpackung dieses sogenannte Vektorplasmid mit einem ITR-negativen *rep/cap*-AAV-Helferplasmid sowie einem Helferplasmid mit den adenoviralen Helferfunktionen in Säugertierzellen kotransfiziert. Die Bildung von Wildtyp-AAV ist dabei durch Verzicht auf homologe Sequenzen zwischen dem AAV-Helferplasmid und dem zu verpackenden Vektorplasmid praktisch ausgeschlossen (Xiao *et al.*, 1998; Grimm *et al.*, 1998). Die Aufreinigung der Virionen erfolgt dann mittels Dichtegradientenzentrifugation mit inertem Iodixanol, welches auch eine Aggregatbildung verhindert, und zusätzlich mittels Liganden-Affinitätschromatographie. Die hauptsächlichen Nachteile bei transfektionsbasierten Systemen sind die praktisch ausschließliche Beschränkung auf adhärente Zellen für die Verpackung, die technische Störanfälligkeit und eher geringen Vektortiter. Daher eignet sich diese Produktionsmethode weitgehend nur für den Laborbedarf. Für große klinische Studien reicht diese Methode kaum aus (Zolotukhin, 2005).

Alternative Produktionsmethoden sind der Einsatz stabiler Zelllinien und der Einsatz rekombinanter Helferviren, welche die AAV-Gene *rep* und *cap* und/oder das Vektor-Genom enthalten. Da eine Überexpression von Rep auf eukaryontische Zellen zytotoxisch wirkt, kommt es zu einer Einschränkung Rep/cap-exprimierender Zelllinien (Yang *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu rekombinantem HSV, welches *rep* und *cap* enthält, haben sich die entsprechenden rekombinanten Adenoviren als instabil erwiesen (Conway *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001). Daneben gibt es noch ein vielversprechendes Baculovirussystem, bei dem SF9 Zellen mit einem *rep*-, einem *cap*- sowie einem Transgen-ITR-Baculovirus infiziert werden (Urabe *et al.*, 2002).

Zukunftsträchtig sind v.a. das Baculovirussystem und die auf HSV basierenden rekombinanten Helferviren. Beide Methoden ermöglichen einen hohen AAV-Vektor-Titer ohne Wildtyp-AAV und, bei Verwendung replikationsdefekter Helferviren, auch ohne Helferviruskontaminationen.

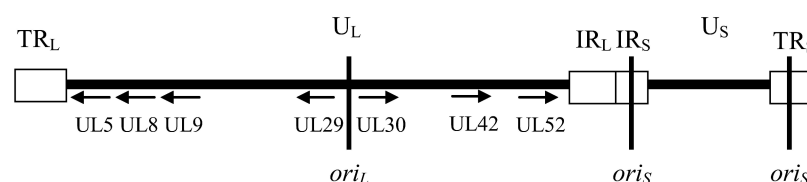
### 1.3 DAS HERPES-SIMPLEX-VIRUS TYP 1 (HSV-1) - HELFERVIRUS FÜR AAV

Das human pathogene Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) gehört zum Genus der Simplexviren, die zur Unterfamilie der  $\alpha$ -Herpesviren gehören. Wie fast alle Herpesviren weist auch das HSV-1 Helferfunktionen für die AAV-Replikation auf. Da alle für die AAV-Vermehrung essenziellen Proteine HSV-Replikationsproteine sind, wird hier ausführlich nur auf die produktive HSV-DNA-Replikation eingegangen (Roizman *et al.*, 2001).

#### 1.3.1 AUFBAU VON HSV-1

Die Virionen haben einen Durchmesser von 150 bis 200 nm. Das HSV-1-Genom ist mit einem inneren Protein-Core assoziiert. Umgeben ist dieser Kern von einem ikosaedrischen Capsid, welches wiederum von einem variabel breiten Tegument umhüllt wird (s. Abb. 1.1). Das Core und das Tegument enthalten neben der DNA auch für die HSV-1-Replikation wichtige Proteine sowie noch in ihrer Funktion unbekannte mRNA(s). In die umgebende Lipidhülle sind verschiedene virale Glycoproteine und nichtglykolisierte Polypeptide eingelagert (Roizman *et al.*, 2001).

Das lineare, doppelsträngige DNA-Genom umfasst 152 kbp und codiert für über 80 verschiedene Proteine. Es unterteilt sich in ein langes ( $U_L$ ) und ein kurzes Segment ( $U_S$ ). Flankiert werden beide Segmente von sich wiederholenden, invertierten Sequenzen, die je nach äußerer oder innerer Lage als *terminal repeat* ( $TR$ ) bzw. *internal repeat* ( $IR$ ) bezeichnet werden (s. Abb. 1.6) (Wadsworth *et al.*, 1975). Durch intramolekulare Rekombination der Segmente mit ihren *repeats* kann das Genom in vier verschiedenen isomeren Formen vorliegen, die äquimolar zueinander vorliegen (Hayward *et al.*, 1975; Delius *et al.*, 1976).



**Abb. 1.6: Struktur des HSV-1-Genoms.**  $U_L$ : *unique long*,  $U_S$ : *unique short*,  $TR$ : *terminal repeat*,  $IR$ : *internal repeat*, **ori**: *origin of replication*. Zusätzlich eingetragen sind die sieben essenziellen Replikationsgene (nach Boehmer *et al.*, 1997).

An drei Stellen im Genom befinden sich Replikationsursprünge; einer in der  $U_L$ -Region ( $ori_L$ ) und zwei in den Wiederholungseinheiten, welche die  $U_S$ -Region flankieren ( $ori_S$ ) (s. Abb. 1.6) (Frenkel *et al.*, 1976; Locker *et al.*, 1982).

### 1.3.2 LEBENSZYKLUS VON HSV-1

HSV-1 adsorbiert mit hoher Effizienz an zellulären Heparin-Sulfat-Proteoglycan-Rezeptoren (Shieh *et al.*, 1992). Als Korezeptoren fungieren Zellrezeptoren aus der Immunglobulin-superfamilie oder der TNF-Rezeptorfamilie (Geraghty *et al.*, 1998; Montgomery *et al.*, 1996; Shukla *et al.*, 1999). Die Lipidmembran der Virionen verschmilzt mit der Membran der Wirtszelle (Morgan *et al.*, 1968), und das Capsid mit dem Tegument gelangt in das Zytoplasma, wo es sich an die Mikrotubuli anlagert (Sodeik *et al.*, 1997). Die DNA und die Proteine mit nukleärer Funktion werden dann durch die Kernporen in das Nukleoplasma befördert (Ojala *et al.*, 2000). Während dieser Vorgänge zirkularisiert das Genom und liegt zunächst als Episom im Nukleus vor (Poffenberger *et al.*, 1985; Garber *et al.*, 1993).

HSV-1 kann dann in einen latenten oder in einen produktiv-lytischen Replikationszustand übergehen (Roizman *et al.*, 2001).

#### 1.3.2.1 PRODUKTIV-LYTISCHER REPLIKATIONSZYKLUS VON HSV-1

Das vom Virion mitgebrachte Tegumentprotein VP16 induziert zusammen mit zellulären Transkriptionsfaktoren eine kaskadenartige Proteinexpression (Campbell *et al.*, 1984), bei der die *immediate early*-Proteine mithilfe der zellulären RNA-Polymerase II zuerst transkribiert werden (Honest *et al.*, 1974; Constanzo *et al.*, 1977). Ihren Peak erreichen sie zwei bis vier Stunden nach der Infektion. Bei den *immediate early*-Proteinen handelt sich um Transaktivatoren, die den Ablauf der lytischen Replikation steuern, indem sie die Expression der *delayed early*- und *late*-Proteine fördern und die eigene Genexpression supprimieren. Zu den *immediate early*-Proteinen gehören u.a. das ICP0 und das ICP4 (Roizman *et al.*, 2001). ICP0 und ICP4 haben neben ihrer regulierenden Wirkung auch noch Bedeutung für die Ausbildung von Replikationskompartimenten, in denen die HSV-Replikation stattfindet (s. 1.3.2.3) (de Bruyn Kops *et al.*, 1994; Maul *et al.*, 1994; Everett *et al.*, 2005).

Als nächstes werden die *delayed early*-Proteine synthetisiert, mit einem Peak nach fünf bis sieben Stunden. Hierbei handelt es sich zumeist um Nichtstrukturproteine, die an der HSV-DNA-Replikation beteiligt sind (s. 1.3.2.4). Die Replikationsphase beginnt nach drei Stunden und endet ca. 15 Stunden nach Infektion. Zu den für die HSV-DNA-Replikation essenziellen *delayed early*-Proteinen gehören das *origin-binding protein* UL9, das *single-strand DNA-binding protein* UL29 (auch als *infected cell protein 8* (ICP8) bezeichnet), die DNA-Polymerase UL30, der *processivity factor* UL42 sowie die Helicase UL5 und die Primase UL52, die zusammen mit UL8 den Helicase-Primase-Komplex bilden (Wu *et al.*, 1988; McGeoch *et al.*, 1988; Roizman *et al.*, 2001). Daneben gibt es noch weitere *delayed early*-Proteine, die die Genomreplikation zwar fördern, indem sie in den Nukleinsäurestoffwechsel eingreifen, deren Aufgaben aber auch von zellulären Faktoren übernommen werden können. Durch DNA-Replikation und Rekombination entstehen vielfache Einheiten des Genoms in konkatalamerer Anordnung, die als Template für die späte Genexpression dienen (Roizman *et al.*, 2001).

Zuletzt werden die Strukturproteine exprimiert, die als *late*-Proteine bezeichnet werden. Diese werden in den Nukleus zu den Replikationskompartimenten transportiert, wo der Zusammenbau der Virionen stattfindet (Lamberti *et al.*, 1998). Die tegumenthaltigen Partikel gelangen anschließend in das Zytoplasma (Vlazny *et al.*, 1991). Ob die Lipidhülle von der inneren Kernmembran oder vom Golgiapparat abstammt, ist noch ungeklärt. Die Virionen gelangen in sekretorischen Partikeln zur Zellmembran, wo sie durch Exozytose freigesetzt oder durch Zell-zu-Zell-Kontakte weitergegeben werden (Cocchi *et al.*, 2000). Der gesamte Replikationszyklus dauert ca. 18 bis 20 Stunden (Roizman *et al.*, 2001).

### 1.3.2.2 DER HELICASE-PRIMASE-KOMPLEX

Der Helicase-Primase-Komplex setzt sich aus den *delayed early*-Genprodukten UL5, UL8 und UL52 im Verhältnis 1:1:1 zusammen (Crute *et al.*, 1989a). Er nimmt eine zentrale Stellung bei der HSV-DNA-Replikation und dem HSV-Helfereffekt für die AAV-DNA-Replikation ein (Zhu *et al.*, 1992a/b; Weindler *et al.*, 1991). Seine Bedeutung liegt bei der HSV-Replikation v.a. bei der Ausbildung von Replikationskompartimenten und der Elongation der Virus-DNA (Boehmer *et al.*, 1997; Marintcheva *et al.*, 2001). Die

Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinen des Komplexes sind für seine Funktion essenziell. Die einzelnen Komponenten für sich weisen keine enzymatischen Aktivitäten auf. Erst ein Subkomplex aus UL52 und UL5 weist eine im Vergleich zum Gesamtkomplex abgeschwächte enzymatische Aktivität auf (Dodson *et al.*, 1991).

Das UL8-Protein stimuliert die Primersynthese und Nutzung (Sherman *et al.*, 1992; Tenney *et al.*, 1994) und stimuliert die ATPase- sowie Helicaseaktivität des Komplexes in Anwesenheit von ICP8 gebundener ssDNA um das Dreifache (Tenney *et al.*, 1994; Gac *et al.*, 1996; Falkenberg *et al.*, 1997). Eine eigene enzymatische Aktivität oder DNA-Bindung konnte nicht nachgewiesen werden (Dodson *et al.*, 1991; Parry *et al.*, 1993). UL8 interagiert mit UL9, UL30 sowie UL29 (McLean *et al.*, 1994; Tenney *et al.*, 1995; Hamatake *et al.*, 1997; Constantin *et al.*, 1999), vermittelt deren Kolokalisation mit der Replikationsmaschinerie und scheint für die Kernlokalisierung des initial im Zytoplasma gebildeten Helicase-Primase-Komplexes verantwortlich zu sein (Calder *et al.*, 1992; Falkenberg *et al.*, 1997).

UL5 weist hochkonservierte ATP-Bindungs- und Helicase motive auf und wird zu der Helicasensuperfamilie 1 gezählt. UL5 kann im Bereich der Replikationsgabel an die DNA binden, wo es eine 5'-3'-Helicaseaktivität entfaltet, wenn es zusammen mit UL52 einen Komplex gebildet hat. Die Energie wird durch die Hydrolyse von NTP(s) gewonnen (Sherman *et al.*, 1992; Biswas *et al.*, 2001; Marintcheva *et al.*, 2001). UL52 ist die eigentliche Primase des Komplexes und bindet im Gegensatz zu UL5 an den Abschnitten einzelsträngiger DNA, an denen sie kurze RNA-Primer synthetisiert (Chen *et al.*, 2005).

Die jeweiligen DNA-Bindungsfähigkeiten von UL5 und UL52 werden durch die Komplexbildung zusätzlich verstärkt (Biswas *et al.*, 1999; Marintcheva *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005).

### 1.3.2.3 ENTSTEHUNG VON HSV-REPLIKATIONSKOMPARTIMENTEN

Die HSV-DNA-Replikation, Transkription und der Zusammenbau der HSV-Virionen finden in distinkten subnukleären Strukturen statt, den sogenannten Replikationskompartimenten. Die im Infektionsverlauf gebildeten Strukturen wurden dabei von Burkham *et al.* (1998) nach der Verteilung des *single-strand DNA-binding protein* ICP8 (UL29) von HSV und des nukleären *promyelocytic leukemia protein* (PML) in verschiedene Stadien eingeteilt:

**Stadium I:** Direkt nach Infektion kann nur PML in sogenannten *promyelocytic leukemia nuclear bodies* (ND10-Domänen) im Zellkern, wie sie auch bei nicht infizierten Zellen vorkommen, nachgewiesen werden. Die genaue Funktion dieser Domänen ist noch weitgehend ungeklärt. Sie könnten als Proteinspeicherorte für zellregulatorische Proteine fungieren (Maul *et al.*, 1994; Negorev *et al.*, 2001; Borden, 2002) und scheinen eine Rolle bei vielen zellulären Prozessen zu spielen, wie z.B. Zellzyklusregulation, Genexpression, DNA-Reparaturvorgängen, Chromatin-Metabolismus, Virusabwehr und Apoptose (Regad *et al.*, 2001; Everett *et al.*, 2006a/b). Das virale Protein ICP4 bindet virale DNA und lagert sich an den ND10-Domänen an (Everett *et al.*, 2005). Der sich ebenfalls anlagernde virale Transaktivator ICP0 führt zu einer Degradation verschiedener PML-Isoformen und anderer ND10-Proteine, verbunden mit einer beginnenden Auflösung der ND10-Domänen (Maul *et al.*, 1993, 1994; Everett *et al.*, 2006b).

**Stadium II:** Dadurch wird das nächste Stadium eingeleitet, bei dem sich keine ND10-Domänen mehr finden lassen und die Proteine PML und ICP8 diffus im Zellkern verteilt sind.

**Stadium IIIA:** Das HSV *origin-binding protein* UL9 und ICP8 bilden an der HSV-DNA im Bereich der *origins* einen Komplex, an den sich der Helicase-Primase-Komplex anlagert. Es entstehen zahlreiche kleine präreplikative nukleäre Komplexe (Liptak *et al.*, 1996; Carrington-Lawrence *et al.*, 2003).

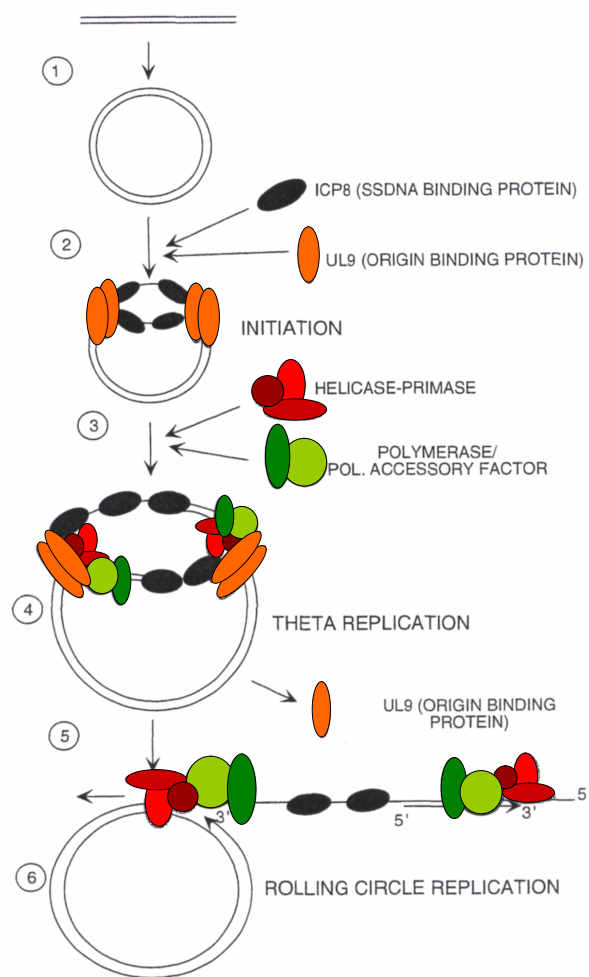
**Stadium IIIB:** An den Komplex lagern sich im Folgenden die HSV-Polymerase (UL30), der *processivity factor* (UL42) und PML an (Liptak *et al.*, 1996; Carrington-Lawrence *et al.*, 2003). Die Polymerase ist essenziell für die Rekrutierung von PML, wofür die enzymatische Funktion des Proteins allerdings nicht benötigt wird. UL42 ist hingegen verzichtbar, verstärkt aber die Bindung von PML (Burkham *et al.*, 2001).

**Stadium IV:** Das Stadium IV ist erreicht, wenn sich aus den präreplikativen Komplexen durch Akquirierung weiterer zellulärer Proteine, die u.a. auch aus den ND10-Domänen stammen, bzw. weiterer inzwischen exprimierter viraler Proteine die reifen Replikationskompartimente entwickelt haben. In diesem Zusammenhang wurde beispielsweise eine Kolo-kalisation von ICP8 mit zahlreichen zellulären Proteinen, die u.a. in der DNA-Replikation, Reparatur und Rekombination sowie der RNA-Bindung und Spleißung Aufgaben übernehmen und als Transkriptionsfaktoren wirken, nachgewiesen (Ebert *et al.*, 1994; Ni *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2004).



### 1.3.2.4 DIE HSV-DNA-REPLIKATION

Das Replikationsmodell des *rolling circle*-Mechanismus geht von einer episomalen genomischen Struktur aus (s. Abb. 1.7 [1]). Das *origin-binding protein* UL9 und das *single-strand DNA-binding protein* ICP8 lagern sich an einem *ori* an, wobei mindestens ein *ori<sub>S</sub>* für die korrekte Replikation vorhanden sein muss [2] (Weir *et al.*, 1989; Makhov *et al.*, 2003).



**Abb. 1.7: Replikationsmodell von HSV-1 nach dem *rolling circle*-Mechanismus.** (Roizman *et al.*, 2001)

Der *ori* wird durch die 3'-5'-Helicaseaktivität des sich anlagernden UL9 entwunden (Lee *et al.*, 1997). ICP8 stabilisiert die entstehende ssDNA-Konformation (Lee *et al.*, 1985; Ruyechan *et al.*, 1983), interagiert mit zahlreichen weiteren viralen und zellulären Proteinen und vermittelt so deren Rekrutierung an den DNA-Replikationskomplex (de Bruyn Kops *et al.*, 1988; Bush *et al.*, 1991; Liptak *et al.*, 1996). Als nächstes interagieren ICP8 und UL9 mit dem Protein UL8 und rekrutieren so den schon im Zytoplasma zusammengesetzten Helicase-Primase-Komplex [3]. Der Helicase-Primase-Komplex entwindet das doppelsträngige Genom und generiert Primer. Die Primer sind Voraussetzung für die Bindung des HSV-Polymerase-Komplexes an den DNA-Replikationskomplex (Carrington-Lawrence *et al.*, 2003). Dieser besteht aus der 5'-3'-DNA-Polymerase UL30, die für ihre aktive Form zuvor eine Einheit mit dem *processivity factor* UL42 eingehen muss. UL42 ist auch der Bestandteil, der die Bindung zum Replikationskomplex und zur DNA vermittelt [3] (McGeoch *et al.*, 1988; Parris *et al.*, 1988; Gottlieb *et al.*, 1990; Hernandez *et al.*, 1990). Zusätzlich besitzt die Polymerase durch ihre 3'-5'-Exonucleaseaktivität einen Mechanismus zur Überprüfung der Lesegenauigkeit (Knopf *et al.*, 1979; O'Donnell *et al.*, 1987). Primer

Der *ori* wird durch die 3'-5'-Helicaseaktivität des sich anlagernden UL9 entwunden (Lee *et al.*, 1997). ICP8 stabilisiert die entstehende ssDNA-Konformation (Lee *et al.*, 1985; Ruyechan *et al.*, 1983), interagiert mit zahlreichen weiteren viralen und zellulären Proteinen und vermittelt so deren Rekrutierung an den DNA-Replikationskomplex (de Bruyn Kops *et al.*, 1988; Bush *et al.*, 1991; Liptak *et al.*, 1996). Als nächstes interagieren ICP8 und UL9 mit dem Protein UL8 und rekrutieren so den schon im Zytoplasma zusammengesetzten Helicase-Primase-Komplex [3]. Der Helicase-Primase-Komplex entwindet das doppelsträngige Genom und generiert Primer. Die Primer sind Voraussetzung für die Bindung des HSV-Polymerase-Komplexes an den DNA-Replikationskomplex (Carrington-Lawrence *et al.*, 2003). Dieser besteht aus der 5'-3'-DNA-Polymerase UL30, die für ihre aktive Form zuvor eine Einheit mit dem *processivity factor* UL42 eingehen muss. UL42 ist auch der Bestandteil, der die Bindung zum Replikationskomplex und zur DNA vermittelt [3] (McGeoch *et al.*, 1988; Parris *et al.*, 1988; Gottlieb *et al.*, 1990; Hernandez *et al.*, 1990). Zusätzlich besitzt die Polymerase durch ihre 3'-5'-Exonucleaseaktivität einen Mechanismus zur Überprüfung der Lesegenauigkeit (Knopf *et al.*, 1979; O'Donnell *et al.*, 1987). Primer

werden vermutlich durch ihre RNase H-Aktivität abgebaut (Crute *et al.*, 1989b). Nach der ersten Replikationsrunde wird ein DNA-Strang geschnitten, sodass ein *leading* und ein *lagging strand* entstehen. Aus der  $\theta$ -Replikation wird somit ein *rolling circle*-Mechanismus [4-5]. Welches Protein für den Strangbruch verantwortlich ist, konnte noch nicht geklärt werden. Im weiteren Verlauf fährt der Replikationskomplex den *leading strand* ab und verdrängt kontinuierlich den entstehenden *lagging strand* am 5'-Ende. Der *lagging strand* wird durch Okazaki-Fragmente aufgefüllt [6]. Die entstehenden konkatenären *head-to-tail* Einheiten des Genoms dienen dann als weitere Matrizen für die DNA-Replikation oder werden geschnitten in Capside verpackt (Boehmer *et al.*, 1997; Roizman *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen zeigen, dass neben dem *rolling circle*-Mechanismus homologe Rekombinationsvorgänge ebenfalls eine wichtige Rolle bei der HSV-Replikation einnehmen (Wilkinson *et al.*, 2003).

### 1.3.3 HSV-1-HELPERFUNKTIONEN FÜR DIE AAV-REPLIKATION

Auf welche Mechanismen sich der Helfereffekt von HSV-1 für die AAV-Replikation gründet, ist noch sehr unzureichend geklärt. Alle essenziellen Proteine für die AAV-DNA-Synthese weisen aber replikative HSV-Funktionen auf. Hierzu zählen der Helicase-Primase-Komplex (UL5/UL8/UL52), das *single-strand DNA-binding protein* ICP8 (UL29) und der nicht essenzielle, aber förderliche HSV-Polymerasekomplex (UL30/UL42) (Weindler *et al.*, 1991). Es konnte bisher gezeigt werden, dass ICP8 mit Rep78 in Gegenwart einzelsträngiger AAV-DNA in den entsprechenden HSV-1-Replikationskompartimenten kolokalisiert und dort die AAV-DNA-Replikation stattfindet (de Bruyn Korps *et al.*, 1994; Heilbronn *et al.*, 2003; Stracker *et al.*, 2004).

Die Tatsache, dass für die AAV-Replikation nur der Helicase-Primase-Komplex und das *single-strand DNA-binding protein* ICP8 essenziell sind, zeigt, dass der von diesen Proteinen gebildete Komplex für die AAV-Replikation von wesentlicher Bedeutung ist (Weindler *et al.*, 1991). ICP8 bindet dabei unspezifisch ssDNA und hält sie in einer entwundenen und ausgestreckten Form (Ruyechan *et al.*, 1983).

Die zusätzliche Anwesenheit des HSV-Polymerasekomplexes (UL30/UL42) erhöht die AAV-DNA-Replikationsrate (Weindler *et al.*, 1991). In Übereinstimmung konnten Ward *et al.*

(2001) zeigen, dass sich AAV-DNA *in vitro* mithilfe der Proteine ICP8, UL30, UL40 und Rep68 replizieren lässt. Eine weitere Steigerung ist zu beobachten, wenn die Gesamtheit der HSV-Funktionen durch Infektion mit HSV bereitgestellt wird (Weindler *et al.*, 1991). Somit liegt es nahe, dass verschiedene zusätzliche HSV-Proteine entweder direkt oder indirekt durch die Modulation zellulärer Mechanismen ebenfalls die AAV-DNA-Replikation fördern können.

## 1.4 ZIELSETZUNG

Rekombinantes AAV (rAAV) findet als Gentherapievektor ein breites Anwendungsfeld. Der anwendungsbezogenen Forschung sind momentan durch die arbeitsaufwendigen, teuren und relativ ineffektiven Produktionsmethoden Grenzen gesetzt.

Ein zukunftssträchtiges Verfahren zur Produktion großer Mengen an rAAV ist die unkomplizierte Bereitstellung der benötigten Helferfunktionen und den AAV-Genen *rep* und *cap* durch Infektion mit einem rekombinanten *rep* und *cap* tragenden Herpesvirus (Conway *et al.*, 1999). Für die Weiterentwicklung replikationsdefekter rHSV(s) als Helferviren ist es unerlässlich, die Interaktionen zwischen den beteiligten AAV- und HSV-Funktionen auf der molekularen Ebene zu verstehen.

Weindler *et al.* (1991) zeigten, dass der Helicase-Primase-Komplex von HSV essenziell für die AAV-DNA-Replikation ist. Da AAV durch seine ITR(s) ein sich selbst „primendes“ DNA-Genom besitzt und die Rep-Proteine selbst eine Helicaseaktivität aufweisen, ist die funktionelle Bedeutung des Helicase-Primase-Komplexes für die AAV-DNA-Replikation bisher unklar. Bekannt ist, dass die einzelsträngige AAV-DNA und die Rep-Proteine nach Koinfektion von AAV mit HSV in HSV-Replikationskomplexen lokalisieren, in denen die DNA-Replikation stattfindet. Dabei interagiert Rep mit ICP8 (Heilbronn *et al.*, 2003). ICP8 bildet den Ausgangspunkt eines HSV-Replikationskomplexes, der sich in seiner vollständig assemblierten Form aus den HSV-Replikationsproteinen und weiteren zellulären Faktoren zusammensetzt. Die Anlagerung des Helicase-Primase-Komplexes an ICP8 ist Voraussetzung für die Ausbildung der weiteren Replikationsmaschinerie. Ohne ihn kommt es auch zu keiner Ausbildung von Replikationskompartimenten (Liptak *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit sollte die Funktion des HSV-Helicase-Primase-Komplexes bei der AAV-DNA-Replikation geklärt werden. Im Vordergrund stand dabei die Fragestellung, ob die einzelnen Bestandteile dieses Komplexes ausschließlich als strukturelle Komponenten für die Bildung der nukleären Replikationszentren oder zusätzlich als enzymatische Funktionen mit einer direkten Beteiligung an der AAV-DNA-Replikation benötigt werden.