

1. EINLEITUNG

Wenn man studiert, ist Wissenschaft neu und wunderbar, und alles, was bekannt ist, wird so aufgenommen, als habe man es schon immer gewußt.

Erst viel später, nach jahrelanger Forschung mit fehlgeschlagenen Experimenten, mit falschen Spuren, überraschenden Ergebnissen und Augenblicken echter Erkenntnis wird einem klar, wie hart man sich jedes Körnchen Wissen erarbeiten muß, wie jeder Fortschritt sich auf die gesammelten Fortschritte der Vergangenheit gründet, wie jedes Experiment ein Teil des fortlaufenden Stromes der Wissenschaft ist, ein Teil des wachsenden Schatzes menschlichen Wissens, das uns aus der Dunkelheit geführt hat.

Robert L. Sinsheimer, 21. Juni 1990

1.1. Viren

Viren bevölkern den Bereich zwischen Leben und Unbelebtem, zwischen den Molekülen, die sich selbst verdoppeln können und anderen, die nicht dazu in der Lage sind. Die von Viren hervorgerufenen Krankheiten sind für den Menschen von gewaltiger Bedeutung. Diese Parasiten haben erheblich zur Entwicklung der pflanzlichen und tierischen Wirte beigetragen und sind wesentlich mit dafür verantwortlich, daß wir heute so und nicht anders sind. Die Viren haben eindeutig zwei Funktionen in unserer Evolution. Zum ersten führen die Krankheiten, die sie hervorrufen zur Selektion resistenter oder weniger anfälliger Wirtsorganismen. Zum zweiten wird genetisches Material von Viren in unser eigenes Erbgut eingebaut. Mit ihrer Fähigkeit, sich zwischen Zellen, Wirtsorganismen oder manchmal sogar Arten hin- und herzubewegen, wirken sie bei der entwicklungsgeschichtlichen Veränderung ihrer Wirte mit, weil sie ihnen neue genetische Information bringen. Ursprünglich hatte die Definition Virus ausschließlich die Bedeutung eines Giftes tierischer Provenienz (Schlangengift, Geifer des tollwutkranken Hundes). Während des 19. und noch zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde der Begriff Virus für infektiöse Erreger aller Arten benutzt. Heute nennt man nur solche submikroskopischen Erreger Viren, die kleiner als 3 µm sind und von Filtern, die die meisten Bakterien zurückhalten, noch durchgelassen werden. Man klassifiziert die Viren nach ihrem Wirt, ihrer chemischen Zusammensetzung (Art der Nukleinsäure, Protein, Vorhandensein einer Lipidmembran), ihrer Form, Größe und Symmetrie (Levine, 1993).

1.2. Parvoviren

1.2.1. Morphologie und Eigenschaften

Die Vertreter der Familie der Parvoviridae gehören zu den kleinsten bekannten Viren (parvus=klein). Ihre Kapside haben eine ikosaedrische Form von 18-26 nm Durchmesser. Das Genom besteht aus linearer Einzelstrang-DNA. Parvoviren zeichnen sich durch verhältnismäßig große Stabilität aus. Alle Mitglieder dieser Gruppe enthalten keine essentiellen Lipide und sind daher gegen Äther und Chloroform resistent. Für einige Viren wird auch eine Resistenz gegenüber Natriumdesoxycholsäure und gegenüber Enzymen wie Trypsin, Pepsin, RNase und DNase beobachtet. Parvoviren besitzen eine relativ hohe Temperaturreistenz. Eine einstündige Einwirkung einer Temperatur von 56°C überstehen sie ohne signifikante Verluste an Infektiosität. Alle Parvoviren sind bei pH 3 stabil. Durch UV-Strahlen werden sie jedoch inaktiviert (Starke and Hlinak, 1974).

1.2.2. Systematik

Es werden zwei Subfamilien unterschieden: die Parvovirinae, welche Vögel und Säugetiere befallen und die Densovirinae, die Viren der Insekten. Die Parvovirinae umfassen drei Genera. Dependoviren, auch als adeno-assoziierte Viren (AAV) bezeichnet, sind in der Hinsicht unter den tierischen Viren einzigartig, daß sie in der Regel für ihre Vermehrung auf einen nicht verwandten viralen Helfer angewiesen sind. Parvoviren und Erythroviren sind den Dependoviren im Hinblick auf Genomstruktur, Aufbau und Expression ähnlich, sind jedoch in proliferierenden Zellen zur autonomen Replikation befähigt. Zu den Erythroviren gehört das einzige bisher bekannte humanpathogene Parvovirus, das Parvovirus B19, welches die Ringelröteln verursacht.

1.3. Adeno-assoziierte Viren

1.3.1. Vorkommen und Risikobewertung

Die Bezeichnung adeno-assoziierte Viren (AAV) rührt daher, daß Vertreter dieser Gruppe zuerst als Kontamination in Adenovirus-Isolaten entdeckt wurden (Archetti and Bocciarelli, 1965; Atchinson, Casto, and Hammon, 1965; Hoggan, Blacklow, and Rowe, 1966). Die adeno-assoziierten Viren der Typen 2, 3 und 5 können den Menschen infizieren. Bei über 85% der erwachsenen Bevölkerung der USA und 70% der erwachsenen Bevölkerung Deutschlands lassen sich Antikörper gegen diese Serotypen nachweisen, wobei die Serokonversion meist im Kindesalter erfolgt (Blacklow et al., 1968; Blacklow, Hoggan, and Rowe, 1968; Georg-Fries et al., 1984). Bis heute konnte trotz der hohen Durchseuchungsrate AAV kein Krankheitsbild ursächlich zugeordnet werden. AAV-1 und AAV-4 werden als Affen-Viren betrachtet, da sie aus Affen isoliert wurden. Sie sind in der Lage, humane Zellen *in vitro* zu infizieren, aber sie wurden bislang weder beim Menschen isoliert, noch werden beim Menschen spezifische Antikörper gegen diese Serotypen gefunden. Das natürliche Vorkommen von AAV-6 ist unklar. Es wurde als Kontamination eines Laborbestandes von Adenoviren isoliert und könnte durch Rekombination zwischen AAV-1 und AAV-2 entstanden sein (Xiao et al., 1999). Kürzlich wurden zwei neue Serotypen aus Affengewebe

isoliert und als AAV-7 und AAV-8 bezeichnet (Gao et al., 2002). Weiterhin gibt es adeno-assoziierte Viren, die andere Spezies infizieren, wie z.B. Rinder (BAAV) und Hunde (CAAV).

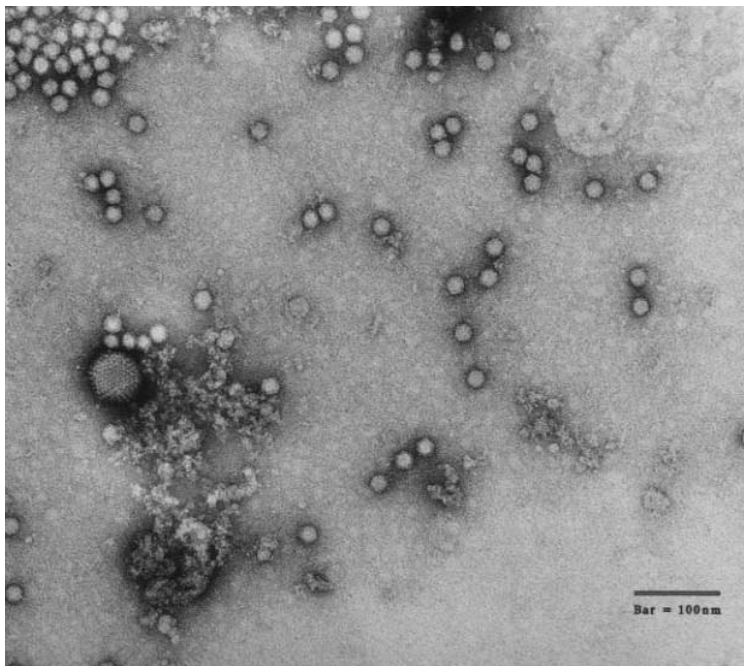


Abb. 1.1. Adenoviren und adeno-assoziierte Viren

AAV-2, -3 und -5 kommen weit verbreitet vor, eine durch diese Infektion hervorgerufene Erkrankung ist nicht bekannt. Sie werden deshalb vom Bundesministerium für Gesundheit der Risikogruppe 1 der Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten zugeordnet. Durch AAV-1, -4 und -6 hervorgerufene Erkrankungen sind bislang ebenfalls nicht bekannt. Da aber natürliche Infektionen des Menschen nicht vorkommen, kann bei diesen Serotypen nicht gesichert von einer Apathogenität ausgegangen werden. Sie werden daher der Risikogruppe 2 zugeordnet (Homepage des Robert-Koch-Instituts).

1.3.2. Lebenszyklus

AAV besitzt unter den eukaryontischen Viren die einzigartige Fähigkeit, an einer bestimmten Stelle ins humane Genom zu integrieren. Diese ortsspezifische Integration erfolgt in einem Bereich von mehreren hundert Basenpaaren auf dem q-Arm von Chromosom 19 (Chr.19), q13.3-ter (Kotin et al., 1991; Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1991). Solch eine latente Infektion wird in Abwesenheit von Helferfunktionen etabliert.

Für eine produktive Infektion ist AAV auf virale Helferfunktionen angewiesen, wie sie von Adenoviren (Ad) und einigen Herpesviren z.B. Herpes Simplex Virus Typ 1 und 2 (HSV-1,2) (Buller et al., 1981), Cytomegalievirus (CMV) (McPherson, Rosenthal, and Rose, 1985) und humanem Herpesvirus 6 (HHV-6) (Thomson et al., 1994) sowie humanen Papillomviren (HPV-16) (Ogston, Raj, and Beard, 2000; Walz et al., 1997) bereitgestellt werden können. AAV wurde deshalb lange Zeit als defektes Virus angesehen. Man nimmt heute an, daß AAV nicht defekt ist, sondern in der gesunden Zelle eine latente Infektion etabliert und erst wenn die Zelle gestreßt wird, in die Phase der produktiven vegetativen Multiplikation übergeht. Es werden Nachkommenviren produziert, die wiederum gesunde Zellen infizieren und einen latenten Zustand etablieren können (Berns and Giraud, 1996).

Der AAV-Lebenszyklus verläuft zweiphasig (Abb. 1.2.). Die AAV-Virionen gelangen in die Zelle, wo das AAV-Genom freigesetzt wird. Als zelluläre Rezeptoren für den viralen Eintritt in die Zelle wurden in den vergangenen Jahren der Heparin-Sulfat-Proteoglycan-Rezeptor (Summerford and Samulski, 1998), der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (Qing et al., 1999) sowie Integrin $\alpha_v\beta_5$ (Summerford, Bartlett, and Samulski, 1999) identifiziert. Die Aufnahme von AAV-2 in die Zelle erfolgt sehr schnell (Halbwertszeit 10 min) durch rezeptorvermittelte Endozytose über Clathrin-bedeckte Einstülpungen der Zellmembran (Bartlett, Wilcher, and Samulski, 2000). Das Freisetzen der DNA (uncoating) erfolgt vor oder

während des Eintritts in den Zellkern (Xiao et al., 2002). Innerhalb von zwei Stunden kann bereits virale DNA im Kern detektiert werden (Muzyczka and Berns, 2001). Unter nicht-permissiven Bedingungen erfolgt eine limitierte Expression der regulatorischen Proteine von AAV. Diese bewirken eine Repression weiterer viraler Genexpression und inhibieren die virale DNA-Replikation. Es kommt zur ortsspezifischen Integration des AAV-Genoms in das humane Chr. 19 (Kotin, Linden, and Berns, 1992; Kotin et al., 1991; Kotin et al., 1990; Samulski, 1993; Samulski et al., 1991).

Die zweite Phase im Lebenszyklus von AAV ist die Phase der produktiven Infektion. Diese tritt ein, wenn AAV und Helfervirus die Zelle koinfizieren oder wenn eine mit AAV latent infizierte Zelle mit einem Helfervirus superinfiziert wird. In diesem Fall wird das Provirus reaktiviert (rescue) und die ehemals latent infizierte Zelle tritt in den produktiven Zyklus ein. Im Zellkern findet virale DNA-Replikation und Transkription statt. Die viralen mRNAs werden ins Zytoplasma transportiert, wo die Synthese der AAV-regulatorischen Proteine und Strukturproteine erfolgt. Aus den Strukturproteinen werden im Zellkern die Kapside zusammengesetzt und mit viralen Genomen beladen. Die kleinen regulatorischen Proteine scheinen die Einzelstranggenome von ihrem 3'-Ende her in die Kapside zu pumpen (King et al., 2001). Durch Zellyse werden die Virionen freigesetzt.

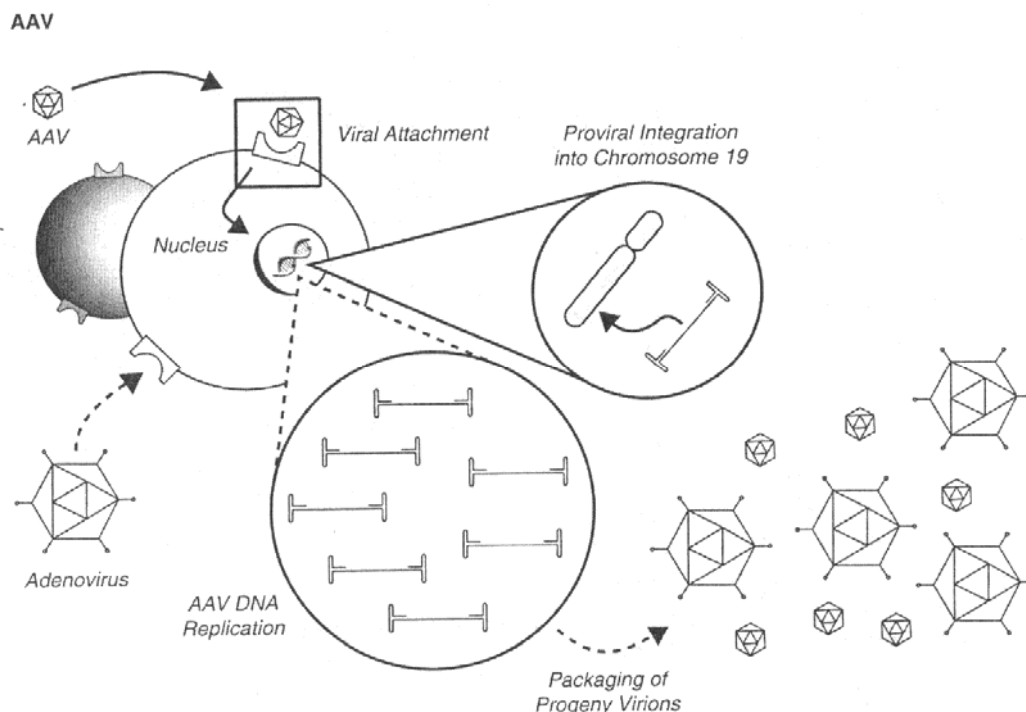


Abb. 1.2. Biphasischer AAV-Lebenszyklus. Unter nichtpermissiven Bedingungen integriert AAV in den q-Arm des humanen Chromosom 19. Dort verbleibt es in inaktivem Zustand, bis es durch die Infektion eines Helfervirus, wie z.B. Adenovirus, reaktiviert wird und in den lytischen Zyklus eintritt. Unter permissiven Bedingungen (z.B. bei Anwesenheit eines Helfervirus) wird das AAV-Genom repliziert und in Kapside verpackt. Die fertigen Virionen werden durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt (Muzyczka and Berns, 2001).

1.3.3. Genomstruktur

Die meisten Untersuchungen zur Biologie von AAV wurden an AAV-2 durchgeführt. Die vollständige Nukleotidsequenz wurde 1983 von Srivastava et al. bestimmt (Srivastava, Lusby, and Berns, 1983). Studien zur AAV-Genetik wurden wesentlich einfacher, als man entdeckte, daß die in bakterielle Plasmide klonierte Doppelstrangform einer AAV-DNA infektiös ist (Laughlin et al., 1983; Samulski et al., 1982 {Laughlin, 1983 #131}). Durch Transfektion humaner Zellen und anschließende Überinfektion mit Adenovirus konnten infektiöse Virionen produziert werden. So konnte man Mutationen einfach ins AAV-Genom einführen, in *E. coli* propagieren und den Phänotyp der Mutante direkt untersuchen (Hermonat et al., 1984; Samulski et al., 1983; Senapathy, Tratschin, and Carter, 1984; Tratschin, Miller, and Carter, 1984). Das AAV-Genom besteht aus einzelsträngiger DNA mit einer Länge von 4675 bp. In den Kapsiden werden entweder Stränge von positiver oder negativer Polarität verpackt, wobei keine der beiden Orientierungen bevorzugt wird. Die kodierende Region umfaßt zwei offene Leserahmen (open reading frame=ORF). Der ORF in der linken Hälfte kodiert für vier Nicht-Strukturproteine, der in der rechten Hälfte für drei Strukturproteine, wobei sich die Nukleinsäuresequenzen für die einzelnen Proteine in den beiden ORFs jeweils überlappen (Abb. 1.3.). Der linke ORF wurde mit *rep* bezeichnet, weil sämtliche Mutationen in dieser Region, die zu einer Leserasterverschiebung (frameshift) oder signifikanten Deletionen führen, die DNA-Replikation von AAV blockieren (Hermonat and Muzyczka, 1984; Tratschin, Miller, and Carter, 1984). Die Rep-Proteine spielen in jeder Phase des AAV-Lebenszyklus eine kritische Rolle. Unter nichtpermissiven Bedingungen regulieren die beiden großen Rep-Proteine die AAV-Genexpression und DNA-Replikation negativ und vermitteln die ortsspezifische Integration ins humane Genom. Unter permissiven Bedingungen vermitteln sie die Reaktivierung des AAV-Genoms (Hermonat et al., 1984), transaktivieren die AAV-Genexpression (Labow, Hermonat, and Berns, 1986) und sind an der DNA-Replikation beteiligt. Der rechte ORF kodiert für die Kapsidproteine und wird mit *cap* bezeichnet. Mutationen im rechten ORF blockieren nicht die DNA-Replikation, verhindern aber die Akkumulation von Einzelstrang-DNA, weil diese Verkapselung voraussetzt (Labow, Hermonat, and Berns, 1986). Mutationen in der 5'-Region von *cap* führen zwar zu DNA-enthaltenden Viruspartikeln, die aber von niedrigerer Infektiösität sind. Im AAV-Genom wurden drei Promotoren charakterisiert und nach ihren Kartenpositionen benannt: p5, p19 und p40 (Berns and Bohenzky, 1987).

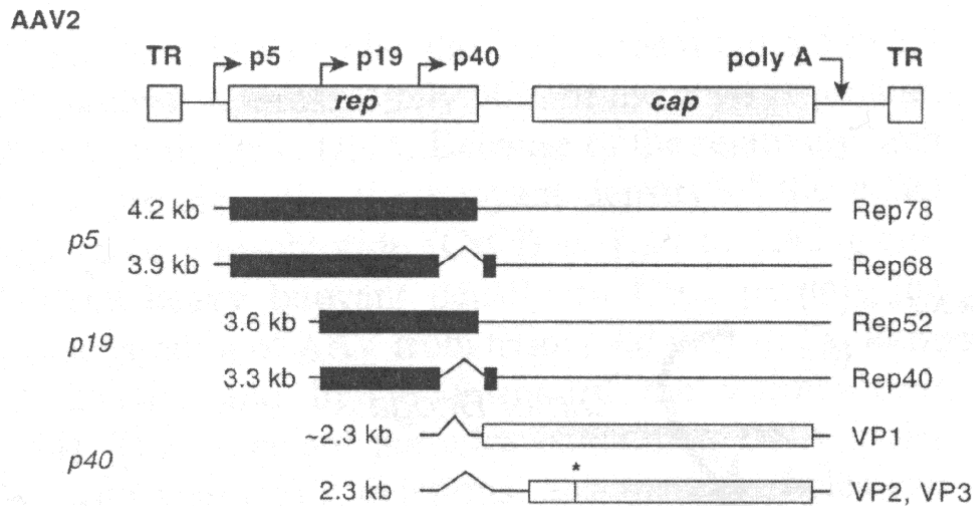


Abb. 1.3. Transkriptionskarte von AAV. Die terminalen Palindrome und die ORFs sind als Kästchen eingezeichnet. Die Positionen der drei Promotoren und der Polyadenylierungsstelle sind als Pfeile gekennzeichnet. Unter dem Genom sind die synthetisierten mRNAs dargestellt und links mit ihrer Größe beschriftet. Rechts sind die translatierten Proteine angegeben (Muzyczka and Berns, 2001).

Die kodierende Region des AAV-Genoms wird von zwei invertierten terminalen Sequenzwiederholungen (inverted terminal repeat=ITR) eingerahmt, die 145 Nucleotide lang und identisch sind. Die ersten 125 Nucleotide der ITR weisen eine komplexe palindromische Sequenz auf, die durch selbstkomplementäre Rückfaltung zur Bildung einer T-förmigen Sekundärstruktur führt (Hauswirth and Berns, 1977; Lusby, Fife, and Berns, 1980). Je nach Sequenzabfolge können die ITR unabhängig voneinander in zwei Orientierungen, flip und flop genannt, vorliegen (Lusby, Bohensky, and Berns, 1981) (Abb 1.4.). Von der flip-Orientierung spricht man, wenn das B-Palindrom näher am Ende des AAV-Genoms liegt als das C-Palindrom, wohingegen bei der flop-Orientierung C näher am Ende des Genoms liegt. Mutationen im *rep*- und *cap*-ORF können *in trans* komplementiert werden. Die ITR sind dagegen *in cis* für DNA-Replikation und Transkription (Enhancer) nötig (Beaton, Palumbo, and Berns, 1989; Senapathy, Tratschin, and Carter, 1984). Neben diesen Funktionen sind sie außerdem für die Verpackung der replizierten AAV-DNA (McLaughlin et al., 1988), für die Integration in das Wirtsgenom bei Herausbildung einer latenten Infektion (Yang et al., 1997) und für die Wiederfreisetzung des AAV-Genoms nach Helferinfektion (Samulski et al., 1983) erforderlich.

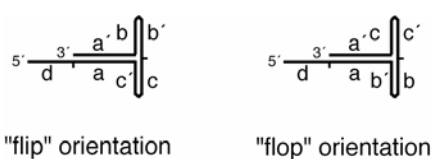


Abb. 1.4. AAV-ITR. Die Haarnadelstruktur kann sowohl in flip als auch in flop-Orientierung ausgebildet werden. Die kleinen Buchstaben bezeichnen einzelne Sequenzelemente des Palindromes.

1.3.4. Transkription

Das AAV-Genom hat die drei Promotoren p5, p19 und p40. Die an ihnen initiierten Transkripte enden alle an dem gleichen Polyadenylierungssignal bei Kartenposition 96 (Abb. 1.3.). Während einer produktiven Infektion werden von jedem der drei Promotoren durch die zelluläre RNA-Polymerase II Transkripte synthetisiert. An Kartenposition 42-46 befindet sich ein Intron, was dazu führt, daß von jeder Art Transkripte gespleißte und ungespleißte Formen produziert werden. Bei den p5- und p19-Transkripten überwiegt die ungespleißte Form, hingegen wird bei p40 mehr gespleißte mRNA gebildet. Die translatierten Produkte der p5-Transkripte werden aufgrund ihres Molekulargewichts als Rep78 und in der gespleißten Form als Rep68, die der p19-Transkripte als Rep52 bzw. gespleißt als Rep40 bezeichnet (Lusby and Berns, 1982; Mendelson, Trempe, and Carter, 1986). Die mit 2,3 kb kleinste RNA wird von p40 initiiert und stellt die vorwiegende RNA-Spezies dar (Jay, Laughlin, and Carter, 1981; Laughlin et al., 1979). Von ihr werden alle drei Kapsidproteine translatiert. Die 2,3 kb RNA wird alternativ gespleißt. Die hauptsächlich verwendete Spleißstelle erzeugt die mRNA, die für VP2 (73 kDa) und VP3 (62 kDa) kodiert. Die Translation des Haupthüllproteins VP3 startet von AUG aus, hingegen die Synthese von VP2 von dem stromaufwärts gelegenen Kodon ACG startet. Für VP1 (87 kDa) wird von dem selteneren Spleißprodukt der gesamte *cap* ORF translatiert. Aus dieser Regulation des Spleißens und der Translation ergibt sich ein Mengenverhältnis von VP1:VP2:VP3=1:1:10, wie es auch in den Kapsiden vorliegt (Buller and Rose, 1978). Die Rolle des ungespleißten p40-Transkripts (2,6 kb) konnte bisher noch nicht geklärt werden.

1.3.5.1. Regulatorische Elemente

In der p5-Promotor-Region wurden mehrere regulatorische Sequenzen kartiert. Eine Sequenz korrespondiert zu einer Sequenz im „Ad major late“ Promotor (Ad MLP), die durch das adenovirale E1A-Protein aktiviert wird. Eine zweite Sequenz bindet den zellulären Transkriptionsfaktor YY1 und ist in der p5-Region zweimal vertreten (Chang, Shi, and Shenk, 1989). Zwischen TATA-Box und der stromabwärts gelegenen YY1-Stelle wurde ein Rep-bindendes Element gefunden (McCarty et al., 1994a). Diese Elemente scheinen zusammen mit den Rep-bindenden Elementen der ITR die AAV p5-Transkription zu regulieren (Kyöstiö, Wonderling, and Owens, 1995; Pereira, McCarty, and Muzyczka, 1997). Im p19 und p40

Promotor wurden neben der TATA-Box unter anderem noch Sequenzen, die den zellulären Transkriptionsfaktor Sp1 binden, gefunden (Pereira and Muzyczka, 1997a; Pereira and Muzyczka, 1997b). Sp1 interagiert wiederum selbst mit Rep78/68 (Hermonat, Santin, and Batchu, 1996; Pereira and Muzyczka, 1997b). Die Regulation der AAV-Transkription ist aufgrund des zweigeteilten Lebenszyklus sehr komplex. Das Umschalten zwischen latenter und produktiver Phase wird vorrangig durch Ad E1A und AAV Rep kontrolliert.

1.3.5.2. Transkription während latenter Infektion

In Abwesenheit von Helferfunktionen wird nur eine geringe Menge des Rep78-Proteins produziert. Dieses bindet an die p5-Bindestelle und verhindert jede weitere p5-Transkription (Kyöstiö, Wonderling, and Owens, 1995; Pereira, McCarty, and Muzyczka, 1997). Auch von Rep52 wurde gezeigt, daß es den p5 und p19 Promotor reprimieren kann, obwohl es nicht an RBS bindet (Kyöstiö et al., 1994; Owens et al., 1993). Somit scheint es möglicherweise neben der Bindung an RBS auch für Rep78/68 noch andere Mechanismen der Repression z. B. durch Interaktion mit einer Reihe von Transkriptionsfaktoren zu geben (Muzyczka and Berns, 2001). Weger et al. (Weger et al., 1999) wiesen eine Interaktion von Rep 78/68 mit dem transkriptionellen Koaktivator PC4 nach und demonstrierten, daß nach Überexpression von PC4 in Abwesenheit von Helfer alle drei Promotoren herunterreguliert wurden.

1.3.5.3. Transkription während produktiver Infektion

In Anwesenheit von Helfervirus wird die Synthese aller AAV-Transkripte kaskadenartig induziert. Zuerst initiiert das Ad E1A transaktivierende Protein die Transkription vom p5 Promotor. Rep 78/68 aktivieren dann die eigene Synthese, indem sie den p5 Promotor durch Bindung an die AAV-ITRs stimulieren. Rep78/68 aktivieren auch p19 und p40 über Bindung an die ITR (Pereira, McCarty, and Muzyczka, 1997; Weger et al., 1997), Bindung an p5-RBS sowie an weitere Elemente von p19 und p40 (McCarty, Christensen, and Muzyczka, 1991; Pereira and Muzyczka, 1997a; Pereira and Muzyczka, 1997b).

1.3.6. Helferfunktionen

Die Rolle der Helferfunktionen besteht teilweise darin, ein zelluläres Milieu zu induzieren, in dem AAV-DNA-Replikation effektiv stattfinden kann. Das impliziert die Vermutung, daß es möglich sein könnte, solch ein Milieu ohne Helferviren zu erzeugen. Tatsächlich konnten einige Gruppen zeigen, daß transformierte oder immortalisierte Zelllinien durch genotoxische Agentien wie UV-Bestrahlung, Cycloheximid, Hydroxyurea, Aphidocholin, Topoisomerase-Inhibitoren sowie verschiedene chemische Carcinogene semipermissiv für AAV-Replikation gemacht werden können (Yakobson, Koch, and Winocour, 1987). Die adenoviralen und Herpes-Simplex-viralen Helferfunktionen wurden identifiziert. Vier adenovirale Proteine, die alle in der frühen Region liegen, sind für eine vollständige Helferfunktion essentiell: Das Transaktivator-Protein E1A, das E1B 55 kDa-Protein, das E4orf6 34 kDa-Protein und das E2A DNA-bindende Protein. Die Synthese der Ad-Virus assoziierten (VA) RNA ist ebenfalls nötig.

Die Expression von **E1A** ist Voraussetzung für die Transkription der anderen frühen Proteine von Ad (Muzyczka, 1992). Es wurden zwei E1A-Proteine, 289 bzw. 243 Aminosäuren lang, identifiziert. Das Erstere ist für die Transaktivierung der AAV-Genexpression verantwortlich (Chang, Shi, and Shenk, 1989). E1A induziert ebenfalls den Eintritt der Wirtszelle in die S-Phase und die Synthese zellulärer Replikationsproteine.

Von mehreren Gruppen wurde gezeigt, daß die Expression von **E1B** Voraussetzung für die AAV DNA-Replikation ist (Janik, Huston, and Rose, 1981; Laughlin, Jones, and Carter, 1982; Richardson and Anderson, 1984; Samulski and Shenk, 1988). Außerdem kann E1B mit E4orf6 einen Komplex bilden (Huang and Hearing, 1989) und die AAV-Genexpression, wahrscheinlich auf der Ebene des mRNA-Transportes ins Zytoplasma, regulieren (Samulski and Shenk, 1988).

E4 wurde ursprünglich als Helferfunktion für AAV-DNA-Replikation identifiziert. Grifman et al. (Grifman et al., 1999) zeigten, daß E4orf6 die Degradation von Cyclin A fördert und die Kinaseaktivität von cdc 2 inhibiert, was einen Zellzyklusstop in der späten S-Phase oder der G2-Phase zur Folge hätte. Die Tatsache, daß in dieser Phase zelluläre DNA-Replikationsenzyme gebildet werden, könnte den Effekt von E4 auf die AAV-DNA-Replikation erklären. Jüngere Studien schlagen weiterhin vor, daß E4 die Konversion der Input-Einzelstrang AAV-Genome zur Doppelstrangform beschleunigt, indem es die Zweitstrangsynthese fördert (Ferrari et al., 1996; Fisher et al., 1996).

Das DNA-Einzelstrang-bindende Protein **E2A** wird für die adenovirale DNA-Synthese benötigt, scheint aber für die AAV-DNA-Replikation nicht essentiell zu sein (Carter, Antoni, and Klessig, 1992). Jedoch beschleunigt E2A durch Interaktion mit Rep78/68 die AAV-DNA-Replikation (Stracker et al., 2004). Der Zusammenbau der Virionen wird allerdings durch verschiedene E2A Mutationen stark inhibiert (Jay, Laughlin, and Carter, 1981). E2A stimuliert die AAV-Transkription (Carter, Antoni, and Klessig, 1992); (Chang and Shenk, 1990), ist möglicherweise am Transport der mRNA beteiligt und beeinflusst die Stabilität der mRNA.

Die adenovirale VA-RNA stimuliert die AAV-Translation (Janik et al., 1989), indem sie die Interferon-induzierte Ausschaltung der Translationsmaschinerie der Wirtszelle (host cell shut off) verhindert.

Für HSV-1 wurden in zwei Studien die Helferfunktionen für eine produktive AAV-Replikation beschrieben. Weindler et al. (Weindler and Heilbronn, 1991) identifizierten das ICP8 Einzelstrang-bindendes Protein und die Komponenten des Helikase-Primase-Komplexes UL5, UL8 und UL52 als Helferfunktionen. Mishra und Rose (Mishra and Rose, 1990) definierten den ICP4 Transaktivator, die DNA-Polymerase, ICP8 sowie UL5 und UL8 als Helferfunktionen. ICP8 kolokalisiert einzelstrangabhängig mit Rep (Heilbronn et al., 2003) und beschleunigt *in vitro* ebenfalls die AAV-DNA-Replikation (Stracker et al., 2004).

1.3.7. DNA-Replikation

Das Basismodell für Parvovirus-DNA-Replikation wurden erstmals von Straus et al. (Straus, Ginsberg, and Rose, 1976) und von Tattersall und Ward (Tattersall and Ward, 1976) beschrieben. Dieses Modell wurde mit der Beschreibung der AAV-terminalen Sequenzen erweitert (Lusby, Fife, and Berns, 1980) (Hauswirth and Berns, 1977; Hauswirth and Berns, 1979).

Die palindromischen ITR am Ende jedes AAV-Stranges können durch Rückfaltung eine Haarnadelstruktur bilden. Somit kann das 3'-Ende als Primer für die DNA-Polymerase dienen.

Im ersten Schritt der DNA-Replikation synthetisiert die zelluläre DNA-Polymerase vom 3'-Hydroxylende aus den komplementären Strang (Abb. 1.5.). Unter Auflösung der T-Struktur am 5'-Ende entsteht ein lineares doppelsträngiges Molekül, dessen ursprüngliches 3'-Ende kovalent geschlossen in Haarnadelform vorliegt. Die großen Rep-Proteine spalten strang- und sequenzspezifisch am Ende des Palindroms. Dieser Prozess wird als terminale Auflösung (terminal resolution) der T-Struktur bezeichnet und findet an einer bestimmten Stelle auf der ITR, der „terminal resolution site“ (*trs*), statt. Damit entsteht ein neues 3'-Hydroxylende, an das bei gleichzeitiger Verdrängung des ursprünglichen Stranges durch eine Helicase weitere Nukleotide anpolymerisiert werden können. Das Resultat ist ein vollständiges, lineares Doppelstrang-Molekül. Jedes der beiden Enden kann dann denaturieren und durch „Reannealing“ eine doppelte Haarnadelstruktur bilden. Das 3'-Ende kann jetzt wieder für die Initiation einer neuerlichen Polymerisierungs- und Strangverdrängungsreaktion benutzt werden. Daraus entsteht sowohl ein Einzelstrang-Genom, welches verpackt wird, als auch ein an einem Ende kovalent geschlossenes Doppelstrang-Genom. Letzteres Molekül durchläuft erneut den Prozeß der terminalen Auflösung der T-Struktur und der Reinitiation der Polymerisierung. Mit jedem vollendeten Zyklus entsteht ein neues Einzelstrang-Molekül. Die ITR wird mit jedem Zyklus durch Übertragung auf den anderen Strang invertiert und liegt dann in der jeweils anderen Orientierung (flip oder flop) vor.

Wird das an einem Ende geschlossene Doppelstrang-Molekül zuerst einer Polymerisierungs- und Strangverdrängungsreaktion vom anderen Ende her unterzogen, und nicht einer Auflösungsreaktion, entsteht ein konkatemeres Dimer-Molekül. Dieses enthält dann zwei AAV-Genome in invertierter Orientierung („head to head“ oder „tail to tail“) mit einer ITR dazwischen.

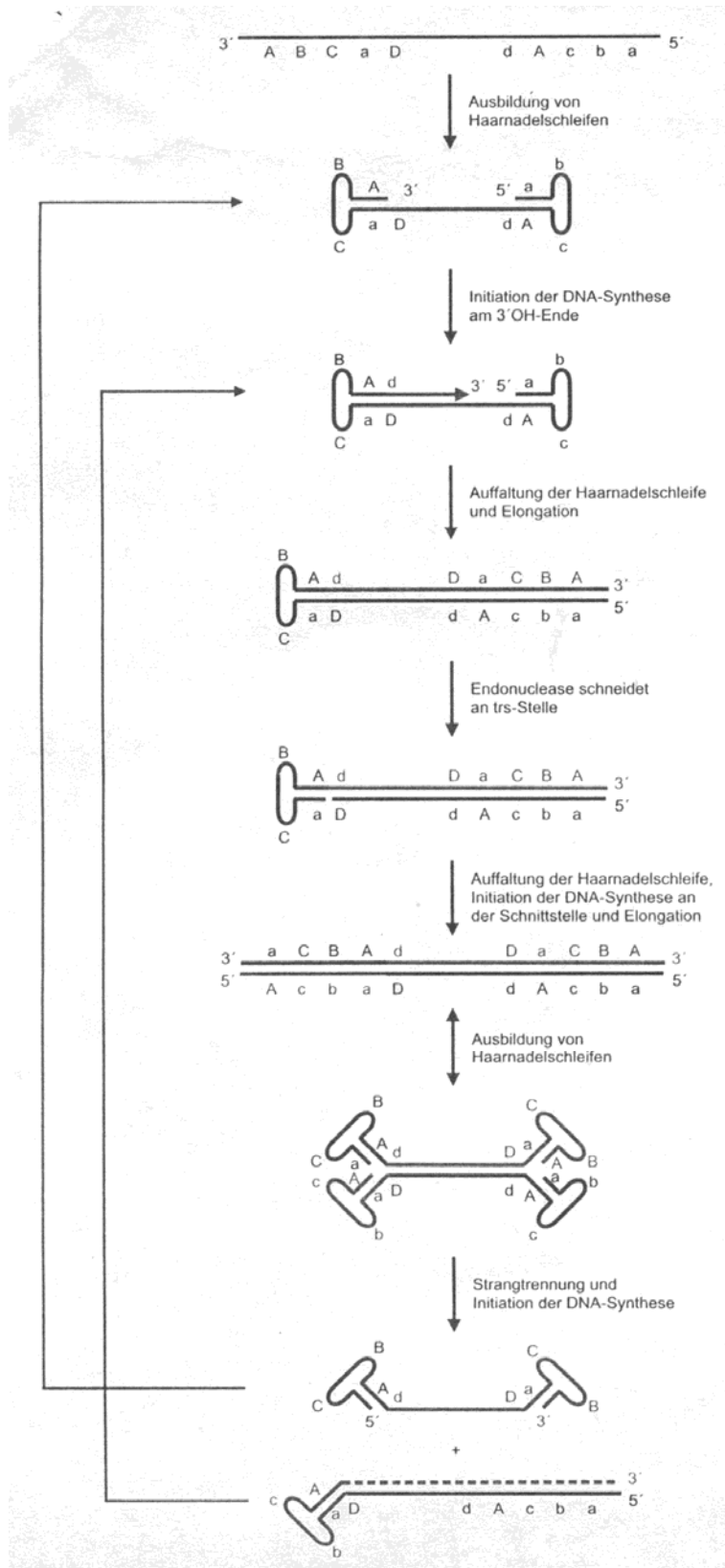


Abb. 1.5. Modell der AAV-Replikation (Modrow and Falke, 1997). Die DNA-Synthese beginnt am 3'-OH-Ende des zu einer Haarnadelschleife gefalteten ITR-Elements. Mit fortschreitender Elongation wird die Sekundärstruktur der 5'-ITR aufgelöst und die DNA-Synthese bis zum Genomende fortgesetzt. Durch strangspezifische Spaltung an der trs-Stelle der Haarnadelschleife entsteht wiederum ein 3'-OH-Ende, an dem DNA-Synthese initiiert wird. Die Elongation bis zum Genomende führt zu einem über alle Bereiche doppelsträngigen Molekül, dessen Genomenden sich erneut zu Haarnadelschleifen falten und für die Initiation einer neuerlichen Polymerisierungs- und Strangverdrängungsreaktion benutzt werden können.

Die Richtigkeit dieses Modells wird durch verschiedene Studien belegt. Die Replikationsintermediate wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen (Ni et al., 1998; Snyder, Samulski, and Muzyczka, 1990; Straus, Sebring, and Rose, 1976). Die beiden Orientierungen der ITRs (flip und flop) wurden als Bestandteile von Replikationsintermediaten und verpackter DNA gefunden. Die Konfiguration des einen Endes des AAV-Genoms ist dabei unabhängig von der des anderen Endes (Lusby, Bohensky, and Berns, 1981; Samulski et al., 1982). Biochemische Untersuchungen der großen Rep-Proteine Rep78 und Rep68 belegten erstens ihre Fähigkeit, an die ITR zu binden (Ashktorab and Srivastava, 1989; Im and Muzyczka, 1990; Snyder, Im, and Muzyczka, 1990), zweitens ihre DNA-DNA-Helicase- und ATPase-Aktivität (Im and Muzyczka, 1990) und drittens ihre sequenzspezifische Endonukleaseaktivität, die für die Spaltung an *trs* essentiell ist.

1.3.7.1. Elemente des AAV-Replikationsursprungs und deren Funktion

Die T-Struktur der ITR ist sehr stabil. Die Helicase muß diese Struktur als Vorbereitung für die endonukleolytische Spaltung aktiv auflösen. Zum zweiten enthalten die linearen replikativen Formen natürlich ebenfalls die *trs*-Sequenz, eine Spaltung erfolgt an diesen Substraten jedoch selten. Die ITR enthält mindestens drei Sequenzen, die die Rep-vermittelte *trs*-Endonuklease-Reaktion dirigieren. Ein Element von 20-22 bp ist für die Bindung eines Rep78- oder Rep68-Komplexes aus zwei bis sechs Rep-Molekülen ausreichend (Chiorini et al., 1995; McCarty et al., 1994b; Ryan, Zolotukhin, and Muzyczka, 1996; Snyder et al., 1993) und wird als Rep-Bindestelle (RBS) bezeichnet (Abb. 1.6.). Die RBS-Sequenz besteht meist aus Wiederholungen von GAGC, wobei schon zwei Wiederholungen eine Rep-Bindung vermitteln können (Chiorini et al., 1995; Wonderling and Owens, 1997). Durch die Bindung an RBS wird Rep in einer bestimmten räumlichen Orientierung gehalten, die für die nachfolgende *trs*-Endonukleasereaktion wichtig ist. Die Bindungsaktivität ist auf der N-terminalen Domäne von Rep lokalisiert. Der Rep-Komplex assoziiert ebenfalls mit einem GTTTC-Motiv im kleinen internen Palindrom, welches als RBS' bezeichnet wird. Dieses Motiv führt in Verbindung mit anderen Basen im Palindrom zu einer ca. 100-fach höheren Bindungsaffinität von Rep zur Haarnadelform gegenüber der linearen Form (McCarty et al., 1994b; Snyder et al., 1993). Im nächsten Schritt wird die ITR durch die im C-Terminus des Proteins lokalisierte Helicase-Aktivität von Rep unter ATP-Hydrolyse entwunden und es entsteht eine einzelsträngige *trs*-Region (Brister and Muzyczka, 1999; Davis, Wu, and Owens, 2000). Die *trs*-Sequenz hat die Basenabfolge 3'-CCGGT/TG-5' und wird ebenfalls von Rep

erkannt. Die Spaltung von *trs* durch Rep erfolgt strangspezifisch zwischen den beiden T. Rep führt hierbei mittels seiner Endonuklease-Aktivität eine Veresterungsreaktion durch, woraus eine kovalente Verknüpfung des Tyrosins der Rep-Aminosäure 156 mit dem 5'-Phosphatende des gespaltenen DNA-Stranges resultiert (Davis, Wu, and Owens, 2000; Im and Muzyczka, 1990; Smith and Kotin, 2000). Diese Reaktion verläuft ATP-unabhängig. Der AAV-Replikationsursprung ist somit auf den ITR lokalisiert und besteht aus den drei Sequenzen RBS, RBS' und *trs*.

Wie bei vielen DNA-Viren werden auch bei der AAV-DNA-Replikation defekte Genome generiert. Diese Strukturen enthalten interne Deletionen in der kodierenden Region oder auch invertierte Duplikationen von Sequenzen der Genom-Enden, die von den ITR flankiert werden. Virionen mit solchen Genomen weisen aufgrund des unterschiedlichen DNA-Gehaltes im CsCl-Dichtegradienten andere Schwebedichten auf (de la Maza and Carter, 1981; Hauswirth and Berns, 1979).

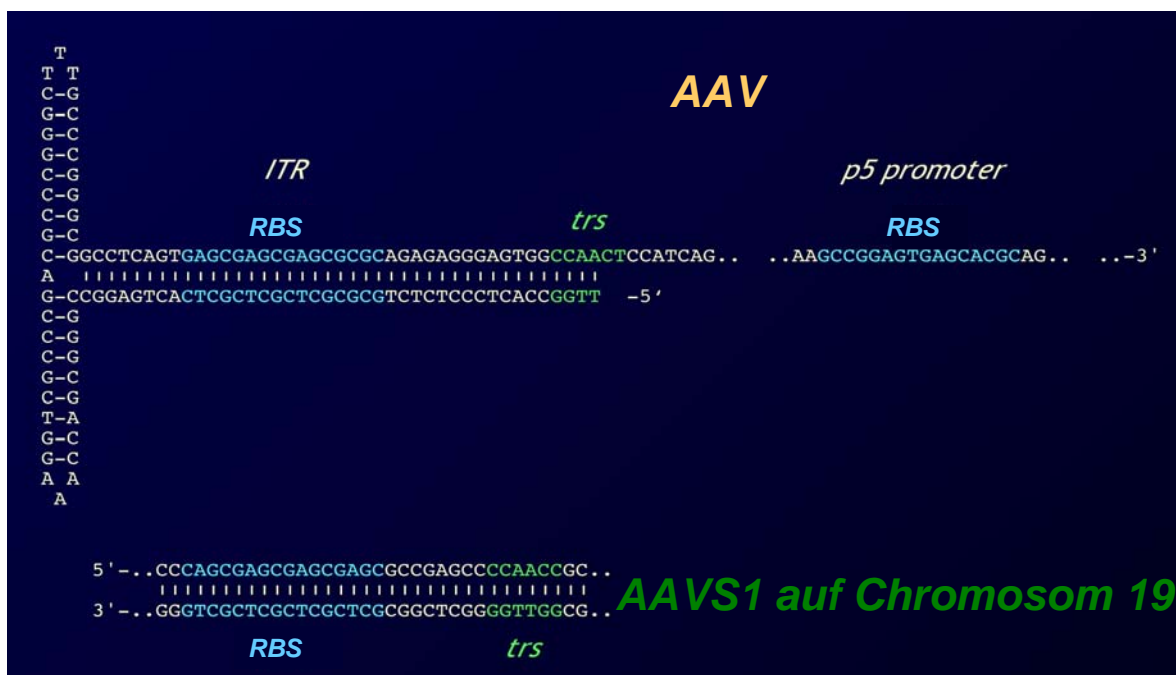


Abb. 1.6. Rep-Bindungsstellen (RBS) auf der invertierten terminalen Wiederholung von AAV und auf humanem Chromosom 19. Der lange Arm der haarnadelförmigen ITR-Struktur enthält ein Element von GAGC-Wiederholungen, an das ein Komplex aus 2-6 großen Rep-Molekülen binden kann. Diese Stelle wird als Rep-Bindestelle (RBS) bezeichnet. In der Nähe ist die sogenannte terminal resolution site (*trs*) lokalisiert. An dieser Stelle erfolgt während der DNA-Replikation die Spaltung des DNA-Stranges. Die ITR sind die einzigen Elemente von AAV, die für eine chromosomale Integration nötig sind.

Innerhalb der AAVS1-Region auf Chromosom 19 wurden Sequenzen identifiziert, die homolog zu RBS und *trs* der viralen ITR sind. RBS und *trs* auf AAVS1 sowie eine Sequenz dazwischen, die den richtigen Abstand beider vorgibt, sind für die ortsspezifische Integration essentiell. Bei der ortsspezifischen Integration wird das AAV-Genom durch die gleichzeitige Bindung eines Rep-Komplexes an die Bindungsstellen auf den ITR und Chromosom 19 zur Zielsequenz dirigiert.

1.3.8. Latenz und ortsspezifische Integration

In Abwesenheit einer Helfervirus-Koinfektion kann das AAV-Genom in die zelluläre DNA integrieren. AAV etabliert so in der Zelle eine latente Infektion und wird bei anschließender Infektion mit einem Helfervirus reaktiviert. In Zellkultur können humane Zellen einfach latent infiziert werden, indem sie mit AAV bei hoher Multiplizität der Infektion (10 bis 1000) infiziert werden. Frühe Studien schätzen, daß AAV in bis zu 10% der infizierten Zellen Latenz etabliert (Hermonat and Muzyczka, 1984; Laughlin, Cardellicchio, and Coon, 1986). Man nimmt an, daß ca. 70% der Integrationsereignisse auf Chromosom 19 erfolgen (Kotin et al., 1990). AAV integriert auf Chromosom 19 an der Stelle 19q13.3-qter (Kotin et al., 1991; Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1991). Die Integration erfolgt über nichthomologe Rekombination und ist oft mit Umordnungen und Inversionen der viralen und zellulären Sequenzen assoziiert. Obwohl das Integrationsereignis ortsspezifisch erfolgt, ist es nicht auf Nukleotidebene spezifisch, sondern erfolgt in einem Bereich von einigen hundert Basenpaaren. Die Region im Chr. 19, wo ortsspezifische Integration nachgewiesen wurde, wurde als 8 kb-Fragment kloniert. Die ersten 4 kb wurden sequenziert und als AAVS1 bezeichnet (Kotin, Linden, and Berns, 1992).

AAV kann in der Zelle auch episomal persistieren. AAV wurde in Proben aus dem Genitaltrakt weiblicher Patienten (Friedman-Einat et al., 1997), in einem kleinen Anteil (1-5%) hematopoetischer Zellen (Grossman et al., 1992) und in Muskelbiopsien (Dutheil et al., 2000) gefunden. Bisher konnte allerdings weder geklärt werden, welches Gewebe oder Organ beim Menschen den präferentiellen Latenzort darstellt, noch konnte man in humanen Proben Integration am Chr. 19-Ort nachweisen (Muzyczka and Berns, 2001).

1.3.8.1. Elemente im Chromosom 19

Innerhalb der AAVS1-Region wurden DNA-Sequenzen gefunden, die homolog zu RBS und *trs* der viralen ITR sind (Kotin, Linden, and Berns, 1992; Samulski et al., 1991) (Abb. 1.6.). Die ortsspezifische Integration wurde mit Hilfe eines Epstein-Barr-Virus Shuttle Modell-Systems untersucht. Dazu wird ein AAVS1-Vektor als stabiles extrachromosomales Episom in 293 Zellen in 50 bis 100 Kopien pro Zelle propagiert, das bei Bedarf auch in *E. coli* vermehrt werden kann. Giraud et al. (Giraud, Winocour, and Berns, 1994; Giraud, Winocour, and Berns, 1995) grenzten so die kritische Region auf Chr. 19 auf 500 bp ein. Später gelang der Nachweis, daß eine 33-bp-Sequenz bereits ausreichend ist, um Ortspezifität zu vermitteln.

RBS und *trs* der AAVS1-Region sowie eine Sequenz zwischen beiden, die den korrekten Abstand zwischen RBS und *trs* vorgibt und ein bestimmtes Motiv enthält, sind hierfür essentiell (Linden, Winocour, and Berns, 1996; Meneses, Berns, and Winocour, 2000). Die Integrationsstellen variieren in einem Bereich von einigen 100 bp um die RBS von AAVS1. Der Chr. 19-Integrationsbereich enthält Elemente, die eine offene Chromatin-Konformation fördern (Lamartina et al., 2000). Diese DNA-Konformation könnte für die Initiierung der Interaktion von Rep mit AAVS1 essentiell sein. Es bleibt noch zu klären, ob die DNase hypersensitive Region, die in der 33 bp-Minimalsequenz nicht enthalten ist, für ein effizientes Targeting *in vivo* nötig ist.

1.3.8.2. Elemente von AAV

Die ITR sind die einzigen AAV-Elemente, die für eine chromosomale Integration nötig sind (Linden et al., 1996). Der Verknüpfungspunkt mit zellulären Sequenzen liegt meist innerhalb der ITR, variiert aber von Fall zu Fall. Verknüpfungspunkte wurden auch in der p5-Promoter-Region gefunden (Kotin and Berns, 1989; Yang et al., 1997). Oft sind Teile der ITR deletiert. Die virale DNA liegt bei den meisten latent infizierten Zelllinien als Tandemanordnung mehrerer Genome vor (head to tail) (Cheung et al., 1980; Laughlin, Cardellichio, and Coon, 1986; McLaughlin et al., 1988). Zwischen zwei Tandem-Wiederholungen findet man eine einzelne ITR, die an beiden Seiten von einer D-Sequenz flankiert wird (Duan et al., 1999; McLaughlin et al., 1988; Xiao et al., 1997). Invertierte Genomwiederholungen (tail to tail oder head to head) kommen selten vor (Kotin and Berns, 1989). Kürzlich wurde gezeigt, daß die *trs*-Sequenz der ITR für die ortsspezifische Integration nicht von Bedeutung ist (Young and Samulski, 2001). Eine *trs*-Mutante integrierte mit gleicher Frequenz wie der Wildtyp. Rep-abhängige DNA-Replikation ist demnach keine Voraussetzung für ortsspezifische Integration. Die Genome mit den modifizierten ITR konnten allerdings nur sehr ineffizient reaktiviert werden und eine produktive Replikation der Virionen war inhibiert.

1.3.8.3. Rolle von Rep

ITR flankierte Sequenzen integrieren ohne Anwesenheit von Rep in verschiedene Chromosomen des humanen Genoms (Kearns et al., 1996; Miller, Rutledge, and Russell, 2002). Die Ortspezifität wird durch die Anwesenheit eines der beiden großen Rep-Proteine vermittelt. *In vitro* Studien zeigten, daß Rep 68 einen Komplex mit der AAV-ITR und Chr.

19-RBS bildet (Weitzman et al., 1994). Es wurde ebenfalls berichtet, daß Rep multiple Protein-DNA-Komplexe bildet (McCarty et al., 1994b) und das Rep 78 möglicherweise als Hexamer selbstassoziiieren kann (Smith et al., 1997). Somit scheint das AAV-Genom durch einen Rep-Rep-Kontakt in die Nähe der Chr.19-Zielsequenz gebracht zu werden.

Chiorini et al. (Chiorini et al., 1995) demonstrierten mit Hilfe einer Zufalls-Oligonukleotidselektion, daß es sich bei der RBS um die 8 bp-Sequenz 5'-GAGYGAGC-3' handelt. Diese Basenfolge ist statistisch 2×10^5 mal im humanen Genom vertreten. Rep-Bindungsaffinitätsstudien (Wonderling and Owens, 1997; Young et al., 2000) belegen, daß genomische DNA sehr viele potentielle Rep-Bindungsstellen enthält und daß diese mit der Chr.19-RBS um Rep-Bindung kompetetieren. Folglich reicht die Bindung an RBS offensichtlich nicht aus, um Ortspezifität zu vermitteln. Die RBS-Sequenz in Verbindung mit der *trs*-Sequenz im richtigen Abstand stellt jedoch eine einzigartige Basenfolge im menschlichen Genom dar (Urcelay et al., 1995; Young et al., 2000). Nachdem Rep an RBS gebunden hat, führt also die Anwesenheit von *trs* im richtigen Abstand zu einer zielgerichteten Integration.

Young et al. (Young et al., 2000) kalkulierten mittels Immunopräzipitations-Westernblotanalyse und anschließender Bild-Quantifizierung eine ungefähre Anzahl von 1000 bis 4000 Rep78/68-Molekülen pro latent infizierter Zelle. Die meisten DNA-Bindungsproteine assoziieren mit ihrer Bindestelle mit einer Rate von mehr als $10^9/M$ sec (von Hippel and Berg, 1989). Das weist darauf hin, daß in einer latent infizierten Zelle genügend Rep-Moleküle vorhanden sind, um innerhalb von Minuten mit allen vorhandenen RBS, also auch der Chr.19-RBS, zu interagieren (Young et al., 2000).

1.3.8.4. Ortspezifische Integration von rAAV

Ortspezifische Integration wird nicht nur nach Infektion mit Wildtyp-AAV beobachtet, sondern auch nach Infektion mit einem rekombinanten AAV (rAAV), wo *cap* deletiert und durch ein Transgen ersetzt ist (Shelling and Smith, 1994) oder wenn Rep *in trans* zugeführt wird. Rekombinante AAV integrieren ohne die Anwesenheit von Rep zwar auch ins Genom, jedoch nicht spezifisch an Chr. 19 (Kearns et al., 1996; Yang et al., 1997). Plasmide, die eine von ITR flankierte Expressionskassette enthalten, integrieren ebenfalls ortsspezifisch, wenn sie *rep* tragen oder mit einem Rep-kodierenden Plasmid in humane Zellen kotransfiziert werden (Balagué, Kalla, and Zhang, 1997; Pieroni et al., 1998; Surosky et al., 1997; Tsunoda et al., 2000). Rep kann auch als Protein selbst bereitgestellt werden, indem man es mit Hilfe von

Liposomen in die Zellen schleust (Lamartina et al., 1998). Ebenso kann ein rAAV-Genom, das durch Herpes-, Adeno- oder Baculovirusvektoren, die auch Rep bereitstellen, eingeschleust wird, in AAVS1 integrieren (Heister et al., 2002; Johnston et al., 1997; Palombo et al., 1998; Recchia et al., 1999; Wang et al., 2002). Rizzuto et al. (Rizzuto et al., 1999) zeigten, daß die Wirtsfaktoren für ortsspezifische Integration auch in Nagetierzellen vorhanden sind. Sie wiesen nach Transfektion mit einem rAAV-Rep-Plasmid in Ratten- und Mausfibroblasten aus transgenen Tieren, die ein 3,5 kb-Fragment des humanen AAVS1-Lokus trugen, Integration nach.

1.3.8.5. Integrationsmodell

Linden et al. stellten 1996 (Linden, Winocour, and Berns, 1996) ein Modell der ortsspezifischen Integration auf. Wie bei der DNA-Replikation ist hier ein grundlegender Mechanismus die Strangverdrängung. Der zweite grundlegende Mechanismus beruht im Gegensatz zur DNA-Replikation auf der Tendenz des Rep-Replikationskomplexes, den Templatestrang zu wechseln. Tatsächlich fand man in *in vitro* Replikationsversuchen mit Extrakten von Adenovirus-infizierten Zellen, daß der elongierte DNA-Strang auf dem originalen Template bleibt, daß aber bei Verwendung von Zellextrakten uninfizierter Zellen ein Strangwechsel und eine Unterbrechung des normalen Replikationszyklus stattfindet (Ward and Berns, 1996).

Das Modell der Integration geht von vier bekannten Voraussetzungen aus: 1. Die RBS- und *trs*-Sequenzen der AAVS1-Region sind involviert. 2. Die AAVS1-Region ist nach Integration rund um den Verknüpfungspunkt zu AAV oft umgeordnet. 3. Das AAV-Genom integriert tandemartig in „head to tail“-Anordnung. 4. Die Integrationsereignisse finden trotz distinkter RBS- und *trs*-Signale auf AAVS1 in einem Bereich von vielen hundert Basenpaaren statt.

Nach dem viralen Eintritt in die Zelle wird die virale DNA freigesetzt und zum Doppelstrang konvertiert. Dieser dient als Matrize für die mRNA-Synthese, die wiederum Rep-Expression ermöglicht. Die Rep-Expression ist limitiert, da Rep weitere virale Genexpression inhibiert. Rep wird in den Zellkern transportiert, wo es die ortsspezifische Integration des AAV-Genoms in das humane Genom vermittelt. Das Integrationsereignis stellt eine nichthomologe Rekombination zwischen humaner und viraler DNA dar. Es wird eingeleitet durch die gleichzeitige Bindung eines oligomeren Rep78/68-Komplexes an seine Bindungsstellen auf Chr.19-AAVS1 und der AAV-ITR (Abb. 1.7.,(I)). Damit liegt das zirkuläre doppelsträngige

AAV-Genom in räumlicher Nähe zu AAVS1 vor. Rep schneidet nun strangspezifisch an der *trs* von AAVS1 und generiert ein freies 3'-OH-Ende, das Replikation initiieren kann (II). Es lagern sich zelluläre Replikationsfaktoren an. Von *trs* aus startet jetzt die DNA-Synthese, wobei ein Elternstrang verdrängt wird (III). Rep bleibt dabei weiterhin an das 5'-Ende des verdrängten Stranges kovalent gekoppelt und liegt im Komplex mit AAV vor. Das Ausmaß der Replikation bestimmt die Lage der Integrationsstelle. Im Verlauf der Elongation kommt es zu einem Wechsel des Templatestranges (IV). Der verdrängte Einzelstrang wird jetzt als Template benutzt. Der neu synthetisierte Strang erhält eine invertierte AAVS1-Sequenz. Nun findet erneut ein Templatewechsel statt und die zirkuläre AAV-DNA wird repliziert (V). Damit entsteht der erste Verknüpfungspunkt von AAVS1 zu AAV. Die Replikation auf dem AAV-Template kann länger als eine AAV-Einheit sein, womit die konkatemeren „head to tail“-Strukturen erklärt werden können. Nach weiterer DNA-Synthese erfolgt ein dritter Templatewechsel zurück auf AAVS1, in dessen Verlauf der zweite AAVS1-AAV-Verknüpfungspunkt entsteht (VI). DNA-Strukturen, die nichtkomplementäre Stränge enthalten, werden durch zelluläre Enzyme repariert. Als Ergebnis liegen eine oder mehrere Kopien von AAV im humanen Genom integriert in der Chr. 19-AAVS1-Region vor.

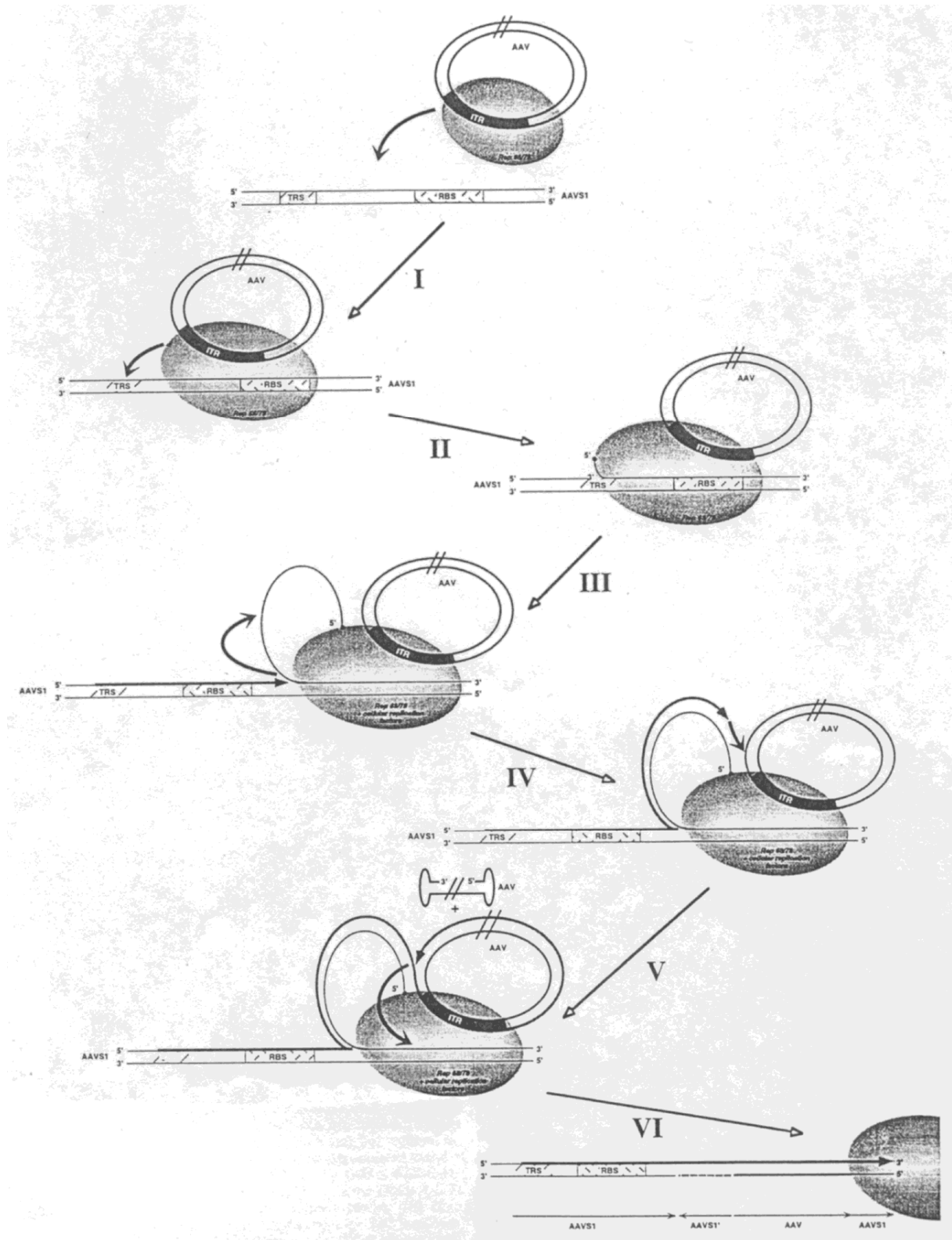


Abb. 1.7. Modell der ortspezifischen Integration von AAV-2 nach Linden et al (Linden, Winocour, and Berns, 1996). Parallele Linien in den AAV-Molekülen symbolisieren die disproportionalen Größen der DNA-Strukturen. Die dicke schwarze Linie veranschaulicht den neu synthetisierten DNA-Strang. Die gestrichelte Linie zeigt den verdrängten Strang von Chr. 19-AAVS1. (I) Rep-vermittelte Komplexbildung zwischen AAV und AAVS1. (II) Strangspezifische Spaltung an der AAVS1-*trs*. (III) DNA-Synthese mit Einzelstrangverdrängung und anschließendem Templatewechsel auf den verdrängten Strang. (IV) Nach Elongation erneuter Templatewechsel auf AAV. (V) DNA-Synthese und Templatewechsel zurück auf AAVS1. (VI) Reparatur der nichtkomplementären Stränge durch zelluläre Enzyme. Als Ergebnis liegt eine Kopie des AAV-Genoms innerhalb AAVS1 integriert vor (Linden et al., 1996).

Young et al. fanden (Young et al., 2000), daß die Anwesenheit von Rep in der Zelle auch ohne ITR-flankierte Sequenzen zu Amplifikationen und Umordnungen der AAVS1-Region führt. Sie gehen deshalb davon aus, daß Rep am Chr. 19-Ort konstant Replikation initiiert. Der gerade neu synthetisierte Strang wird laut ihrem Integrationsmodell von Rep an der *trs*-Stelle gespalten. An dem neuen 3'-OH-Ende beginnt wiederum eine neue DNA-Synthese. Damit entsteht an der AAVS1-Region eine Anhäufung von Rep-gebundenen 5'-Enden (Zwiebelschalenmodell). Zwischen diesen aktiv replizierenden Chr.19-Sequenzen und dem Rep-gebundenen AAV-ITR kommt es nun zu einer Komplexbildung. Wirtsenzyme sorgen für eine Auflösung dieser Strukturen, deren Ergebnisse sowohl amplifizierte invertierte Chr.19-Sequenzen als auch AAV „head to tail“ Konkatemere sind (Young and Samulski, 2001). Der genaue Mechanismus der ortsspezifischen Integration konnte bis heute nicht im Detail geklärt werden.

1.3.9. Veränderungen der biologischen Eigenschaften der Wirtszellen

Ursprünglich dachte man, eine AAV-Infektion hat keinen Einfluß auf das phänotypische Erscheinungsbild der Zelle. Durch detaillierte Studien fand man jedoch eine reduzierte Plattierungseffizienz und eine erhöhte Sensitivität für genotoxische Agentien (Walz and Schlehofer, 1992). Nach AAV-Infektion wurde eine Hemmung der Proliferation transformierter und nichttransformierter Zellen durch Blockade des Zellzyklus an verschiedenen Kontrollpunkten und eine Akkumulation der Zellen in der G1/S-Phase beobachtet (Bantel-Schaal, 1995; Klein-Bauernschmitt, zur Hausen, and Schlehofer, 1992; Winocour, Callaham, and Huberman, 1988). Das Rep-Protein erwies sich als zytostatisch (Yang, Chen, and Trempe, 1994) und interferiert mit der zellulären DNA-Replikation (Yang et al., 1995). Selbst geringe konstitutive Rep-Expression senkt die Zellteilungsrate (Muzyczka and Berns, 2001).

1.3.10. Effekte einer AAV-Infektion auf heterologe Virusreplikation und heterologe Promotoren

AAV kann die adenovirale Replikation beeinflussen (Carter et al., 1979; Casto et al., 1967; Casto, Atchison, and Hammon, 1967; Casto and Goodheart, 1972). Je nach MOI kann AAV die Ad-Genexpression so stark hemmen, daß die Helferaktivität nicht mehr in ausreichendem Maße gewährleistet ist. Die Inhibition scheint hierbei auf Rep-Expression zu beruhen, da defekte AAV-Partikel mit großen Deletionen im Genom keine hemmende Wirkung auf Ad-Replikation zeigen (de la Maza and Carter, 1980). Mit Herpesvirus wird dieser Effekt nur nach Überexpression von Rep beobachtet, wahrscheinlich weil die Herpesinfektion viel schneller verläuft (Kleinschmidt et al., 1995).

Rep interferiert ferner mit der Replikation des humanen Papillomvirus (HPV) (Hermonat, 1992; Labow and Berns, 1988; Yang et al., 1995), inhibiert die HSV-induzierte Ampifikation von chromosomal integrierter SV40 DNA (Heilbronn et al., 1990) und reprimiert eine Reihe von viralen Promotoren (Hörer et al., 1995) wie den frühen Promotor von SV40 (Labow, Graf, and Berns, 1987; Trempe and Carter, 1988), den HSV-1 Thymidinkinase(tk)-Promotor, den HIV-1 long terminal repeat (LTR) (Antoni et al., 1991) und die HPV-16 und 18 stromaufwärts gelegenen regulatorischen Regionen (URRs) (Hermonat, 1994a). Weiterhin führt die Anwesenheit von Rep zu einer Veränderung der Genexpression unter der Kontrolle der zellulären onkogenen Promotoren c-H-ras, c-fos und c-myc (Batchu, Kotin, and

Hermonat, 1994; Hermonat, 1991; Hermonat, 1994b; Klein-Bauernschmitt, zur Hausen, and Schlehofer, 1992).

1.3.11. Tumorprotektive Wirkung von AAV

Es konnte gezeigt werden, daß eine AAV-Infektion neugeborener Nagetiere die durch onkogene Adenoviren induzierte Tumorigenese hemmen kann (Kirschstein, Smith, and Peters, 1968; Mayor, Houlditch, and Mumford, 1973; Ostrove, Duckworth, and Berns, 1981). Daneben lassen sich *in vivo* auch reduzierte Wachstumsgeschwindigkeiten induzierter Tumore nachweisen (de la Maza and Carter, 1981; Katz and Carter, 1986). AAV hemmt *in vitro* die zelluläre Transformation durch das Rinder-Papillomvirus und das humane Papillomvirus Typ 16 (Hermonat, 1992; Walz et al., 1997). Hermonat et al. (Hermonat et al., 1998) zeigten, daß die Hemmung auf der Bindung von Rep an den HPV-16 Promotor und der direkten Interaktion zwischen Rep und dem HPV-16 Onkoprotein E7 beruht. Rep hemmt ebenfalls die Zelltransformation durch die E1A/ humanes EJras Onkogen-Kombination (Khleif et al., 1991).

Seroepidemiologische Studien weisen auch auf eine tumorprotektive Wirkung von AAV beim Menschen hin: Hohe Antikörpertiter gegen AAV-2, 3 und 5 korrelieren mit verminderter Inzidenz von Cervixkarzinomen (Georg-Fries et al., 1984; Mayor et al., 1976; Sprecher-Goldberger et al., 1971). Dieser Effekt könnte darauf beruhen, daß AAV das onkogene Potential von HPV-16, welches an der Entstehung von Cervixkarzinomen beteiligt ist, senkt (Hermonat, 1994a).

Eine AAV-Infektion könnte also für den Wirt dann von Vorteil sein, wenn ein onkogenes Virus den Wirt koinfiziert. Möglicherweise wird dann das latente AAV durch das onkogene Virus aktiviert und hemmt im aktiven Zustand die Onkogenese (Muzyczka and Berns, 2001).

1.3.12. AAV als Gentherapievektor

Virale Vektorsysteme nutzen die in Koevolution mit dem Wirt erlangte Fähigkeit von Viren aus, ihr Genom in die Wirtszelle zu transduzieren. Die gegenwärtig am weitesten entwickelten viralen Vektoren sind Retroviren, Adenoviren und adeno-assoziierte Viren aber auch Poxviren und Herpes-Simplex-Viren. Im Unterschied zu den anderen existierenden Vektorsystemen wurde die Weiterentwicklung von rekombinanten adeno-assoziierten Viren für die Therapie zahlreicher genetischer Erkrankungen in den letzten zehn Jahren immer stärker vorangetrieben. Eine Reihe von *in vivo* Versuchen verlief sehr vielversprechend. An ein gutes Vektorsystem werden folgende Anforderungen gestellt: (1) die Möglichkeit der Produktion von hochtritigen Virusstocks, (2) die Expression des Transgens über einen langen Zeitraum, (3) möglichst keine Induktion einer Immunantwort und (4) keine Toxizität nach Applikation. Anfangs stellte die Produktion von reinen hochtritigen AAV-Präparationen das größte Problem dar. Mit zunehmender Aufklärung der Biologie von AAV konnten die Produktionstechniken immer mehr verbessert werden, so daß heute hochtrigige hochgereinigte rAAV Präparationen für erste klinische Studien am Menschen zur Verfügung stehen. So wurde das Risiko einer Kontamination der AAV-Präparation mit Helfervirus ausgeschlossen, indem bei der Produktion das Helfer-Adenovirus durch ein die Helferfunktionen E2A, E4orf6 und VA tragendes Plasmid substituiert wurde. Die Produktion erfolgt auf Ad E1A und E1B konstitutiv exprimierenden 293 Zellen. Die Möglichkeit einer Revertierung zum AAV-Wildtyp und daraus folgender Wildtyp-Kontamination der Vektorstocks konnte durch Verwendung eines AAV-Helferplasmides, das nur *rep* und keine homologen Sequenzen zum Vektorplasmid trägt, eliminiert werden. Die Toxizität der Vektorpräparationen wurde drastisch reduziert, nachdem als Medium zur Dichtegradientenzentrifugation nicht mehr das toxische CsCl₂ sondern das isoosmotische, inerte Iodixanol verwendet wurde. Iodixanol verhindert gleichzeitig in einer hochkonzentrierten Lösung eine Aggregatbildung der Virionen, welche ebenfalls im Organismus toxisch wirken würde. Die Identifizierung von Heparansulfatproteoglykan als zellulären Rezeptor von AAV und die Generation Virion-spezifischer monoklonaler Antikörper ermöglichen überdies eine Reinigung mittels Ligand-Affinitätschromatographie, wie sie in den meisten Vektorproduktionsanlagen bereits standardmäßig eingesetzt wird (Monahan and Samulski, 2000). Als vielversprechend gilt auch die verhältnismäßig kostengünstige Produktion von AAV-2-Vektoren mittels Baculovirus-Insektenzellsystem, wie sie kürzlich vorgestellt wurde (Urabe, Ding, and Kotin, 2002).

AAV-Vektoren haben eine Reihe von Vorteilen, beispielsweise das breite Infektionsspektrum von Zellen, eine hohe Transduktionseffizienz (Mizuno and Yoshida, 1998) sowie die Fähigkeit sowohl ruhende als auch proliferierende Zellen zu infizieren. AAV gilt als apathogen, da beim Menschen bis heute keine Krankheit mit AAV ursächlich in Zusammenhang gebracht werden konnte. Von AAV abgeleitete rekombinante Vektoren sind frei von viralen Genen. Die Transgene persistieren meist episomal in der Zelle (Russell, 2003). Die Vektoren haben jedoch auch die Fähigkeit zur chromosomalen Integration, wenn auch nicht ortsspezifisch wie der Wildtyp. Im Gegensatz zu adenoviralen Vektoren wird mit AAV-Vektoren eine langanhaltende Transgenexpression ohne toxische oder immunologische Nebenwirkungen *in vivo* beobachtet (Monahan, Jooss, and Sands, 2002). Sie dauerte bis zu zwei Jahren in Mäusen und mehrere Monate in Hunden, nicht-humanen Primaten und im Menschen an (Conrad et al., 1996; Donahue et al., 1999; Linden and Woo, 1999; Wagner et al., 1998). Dabei wurde Langzeitexpression in verschiedenen Organen, darunter Leber (Snyder et al., 1997), Lunge (Halbert et al., 2000), Skelettmuskel (Pruchnic et al., 2000), Auge (Guy et al., 1999) und Gehirn (Davidson et al., 2000), nachgewiesen. Die Verwendung von rAAV-Vektoren anderer Serotypen als AAV-2 bzw. AAV-2-ITR-enthaltender Vektoren, die mit Kapsiden anderer Serotypen pseudotypisiert wurden, ermöglicht es, bestimmte Gewebe effizienter und mit anderer Spezifität als rAAV-2 zu transduzieren (Grimm, 2002; Zolotukhin et al., 2002). Die langandauernde Transgenexpression scheint auch auf die geringe Immunogenität von AAV-Vektoren zurückzuführen zu sein: AAV verursacht, im Gegensatz zu adenoviralen Vektoren, nur eine geringfügige T-Zellantwort des infizierten Organismus, was unter anderem mit der Unfähigkeit von AAV zur Infektion von dendritischen Zellen erklärt wurde (Fisher et al., 1997; Herzog et al., 1997).

Dong et al. (Dong, Fan, and Frizzell, 1996) demonstrierten eine dramatische Abnahme der Verpackungseffizienz bei rekombinanten Genomen, die 110% der Größe des Wildtyp-Genoms überschritten. Damit sind die Einsatzmöglichkeiten von AAV durch sein geringes Verpackungsvermögen (<5 kb) stark eingeschränkt. In letzter Zeit wurden Technologien entwickelt, die die Verpackungskapazität von rAAV erhöhen sollen. So macht man sich bei der Heterodimerisierungs-Technologie die Eigenschaft der AAV-Genome zunutze, während der Latenz zirkuläre Konkatemere zu bilden. Für diesen Konkatemerisierungsprozeß charakteristisch ist eine intermolekulare Rekombination zwischen unabhängigen Genomen (Yang et al., 1999). So können zwei unabhängige Vektoren, die jeweils ein Segment einer Transgenexpressionskassette tragen, bei Einschleusung in eine Zelle zu einer einzigen Transkriptionseinheit rekombinieren. Die ITR zwischen den Genomen werden zusammen mit

Intronsequenzen während der mRNA-Prozessierung herausgespleißt. Durch diese auch als Trans-splicing bezeichnete Technologie wird die Verpackungskapazität auf 10 kb erhöht (Nakai, Storm, and Kay, 2000; Sun, Li, and Xiao, 2000; Yan et al., 2000), was für die meisten klinischen Anwendungen ausreichend sein dürfte.

Als nachteilig könnte sich die hohe Seroprävalenz von AAV-Antikörpern in der Bevölkerung erweisen. Obwohl Studien darauf hindeuten, daß sich nur bei 1/3 neutralisierende Antikörper finden lassen (Chirmule et al., 1999), könnte eine humorale Immunantwort nach initialer oder wiederholter Verabreichung des Vektors eine erfolgreiche Gentherapie verhindern. Hier muß ebenfalls berücksichtigt werden, daß bei einer Therapie oftmals mehr als 10^{13} Vektorgenome an bestimmten Stellen des Organismus appliziert werden. Die Auswirkungen, die solche immensen Mengen im Immunsystem hervorrufen, lassen sich kaum durch Vergleich mit einer natürlichen Infektion abschätzen.

Wenn auch selten, so kann rAAV an den verschiedensten Stellen in das Genom primärer Zellen integrieren. Zwei Studien zeigten, daß diese Integrationsstellen in der Nähe aktiv transkribierter Gene liegen können (Miller, Rutledge, and Russell, 2002; Nakai et al., 2003). Das Langzeitrisiko einer Insertionsmutagenese muß abgeklärt werden. Dieses könnte durch die Wiedereinführung der Chr. 19-Targetingeigenschaft des Wildtypvirus vermindert werden. Dazu wäre eine Bereitstellung einer möglicherweise verkürzten Variante des Rep-Proteins *in trans* nötig und aufgrund der Toxizität von Rep eine regulierbare Expressionsrate wünschenswert. Aber auch die ortsspezifische Integration könnte Risiken mit sich bringen. Die AAVS1 Integrationsstelle ist eng mit dem TNNT1-Gen verknüpft, welches für die, normalerweise im Skelettmuskel exprimierte, Troponin I Isoform kodiert (Dutheil et al., 2000). In latent infizierten Zellen wurden Wildtyp-AAV-Sequenzen gefunden, die das TNNT1-Gen unterbrechen.

Bis zu einer möglichen breiten klinischen Anwendung bleiben noch weitere Fragen zu klären: Transduziert rAAV Keimbahnzellen *in vivo*? Wie können rAAV-Vektoren verschiedener Serotypen sinnvoll eingesetzt werden? Wird eine zell- und gewebespezifische Anwendung von rAAV möglich sein? Wie hoch sind dann die Transduktionseffizienzen in verschiedenen Geweben? Wird die Produktion von Vektoren kostengünstig und im großen Maßstab erfolgen können? Mit welchem Mechanismus integriert rAAV und mit welcher Frequenz?

1.4. Quantitative PCR

1.4.1. Grundlagen der Quantifizierung

1.4.1.1. Methoden der Quantifizierung

Es gibt zwei Methoden der Quantifizierung: Bei der absoluten Quantifizierung wird die Probennukleinsäuremenge als absoluter Wert in Kopiezahl oder Masse angegeben. Bei der relativen Quantifizierung wird die Zielnukleinsäure in Relation zur Menge eines endogenen Haushaltsgenes in der Probe angegeben. Die absolute Quantifizierung benutzt man in der Regel zur Untersuchung von Viren- und Bakterienproben, die relative Quantifizierung zur Bestimmung von mRNA. Bei beiden Methoden wird die Quantifizierung durch Vergleich mit einer Standardreihe vorgenommen. Der Standard kann z.B. linearisierte Plasmid-DNA, gereinigtes PCR Produkt oder in vitro transkribierte RNA sein. Ein Standard heterologer Art unterscheidet sich in seiner Nukleinsäuresquenz von der Zielsequenz und wird mit einem anderen Primerpaar amplifiziert, ein homologer Standard unterscheidet sich nur geringfügig in Länge und/oder Sequenz von der Zielsequenz und wird mit dem gleichen Primerpaar amplifiziert.

1.4.1.2. Endpunktanalyse

Die konventionelle Methode zur quantitativen Erfassung von kleinen Nukleinsäuremengen ist die kompetitive PCR. In einer kompetitiven PCR konkurrieren die Ziel-DNAs um Primer, Polymerase und Nukleinsäuren. Unterscheiden sich die Konzentrationen der Ziel-DNAs und die Effizienz der PCR-Reaktionen, wird ein Target bevorzugt amplifiziert. Die Amplifikation des anderen wird inhibiert. Dieser Umstand wird bei der klassischen Quantifizierung mittels kompetitiver PCR genutzt. Es werden zwei Zielsequenzen mit zwei Primerpaaren in einem Ansatz amplifiziert. Eine Nukleinsäure bekannter Konzentration wird zwischen 10^1 und 10^9 Kopien pro Reaktion eingesetzt. Von der Probe unbekannter Konzentration werden zu denselben Reaktionen konstante Mengen addiert. Die Reaktionsprodukte werden nach der Amplifikation gelelektrophoretisch getrennt und einer Endpunktanalyse unterzogen. In dem Ansatz, in dem beide Nukleinsäuren ähnliche Amplifikatmengen ergeben, entspricht die Konzentration der bekannten Nukleinsäure der Konzentration der Probe. Der Bereich, in dem beide Amplifikate nachgewiesen werden können, erstreckt sich nur über wenige log-Stufen.

Die Methode ist sehr aufwendig, da um eine Konzentration zu ermitteln eine ganze Reihe von Ansätzen amplifiziert werden muß.

1.4.1.3. Prinzipien der kinetischen Quantifizierung

Jede PCR verläuft in drei Segmenten: die frühe Phase, die exponentielle Phase (log-lineare Phase) und die Plateauphase. Mit einer real time Überwachung kann man die drei Phasen direkt beobachten. Die frühe Phase endet, wenn das Fluoreszenzsignal des PCR-Produktes größer wird als das Hintergrundsignal der Probe. Die PCR Amplifikation ist zwar abhängig von der Ausgangskonzentration, aber Proben mit niedrigerer Startmolekülzahl können in der Plateauphase die gleiche Endmolekülzahl erreichen wie Proben mit höherer Startmolekülzahl. Die Analyse in der log-Phase einer PCR produziert daher Daten von höherer Genauigkeit als die Analyse in der Plateauphase. Im Unterschied zur Endpunktanalyse ermöglicht die real time Messung die kinetische Quantifizierung. Die Amplifikation während der log-Phase kann mit der Gleichung $N=N_0 \times E_{\text{konst}}^n$ beschrieben werden (LightCycler Operator's Manual, Roche). Dabei ist N die Anzahl der amplifizierten Moleküle im Zyklus n, N_0 ist die Anfangsmolekülzahl, E die Amplifikationseffizienz und n die Zykluszahl. In den meisten Fällen erfolgt die Amplifikation nicht mit der maximalen Effizienz $E=2$ (Verdopplung der Amplifikationsprodukte pro Zyklus). E ist abhängig von Sequenz, Fragmentlänge und Reinheit der Nukleinsäure. Die Effizienz ist während der log-Phase konstant. Die Menge N_0 des Ausgangsmaterials kann hier leicht ermittelt werden, da ein Anstieg des Fluoreszenzsignals während der log-linearen Phase direkt mit einem Anstieg der Anzahl der PCR-Produkte korrespondiert. Die Quantifizierung erfolgt über Vergleich mit einer Standardgeraden. Meist wird die Standardnukleinsäure seriell über fünf log-Stufen, die den erwarteten Konzentrationsbereich der Probe abdecken, verdünnt und in separaten Reaktionen aber im gleichen PCR-Lauf wie die Proben amplifiziert (externer Standard).

1.4.2. Das LightCycler PCR Analysesystem

1.4.2.1. Das LightCycler Instrument

Das LightCycler System ermöglicht PCR-Läufe und deren Analyse in sehr kurzer Zeit. Die Amplifikation kann in real time und online überwacht werden. Mit Hilfe der LightCycler Technologie kann sowohl über einen breiten Bereich und sehr sensitiv quantifiziert werden als auch Mutationsanalysen oder Produktanalysen durchgeführt werden.

Das LightCycler Instrument besteht aus einer Cycler Komponente, zu der ein Probenkarussell für 32 Stück 20µl Glaskapillaren und eine Thermalkammer gehört, und aus einer optischen Einheit. Die Thermalkammer wird mit heißer und kalter Luft temperiert, was eine Temperaturwechselrate von 20°C/sec ermöglicht. Ein kompletter PCR-Lauf mit 30-40 Zyklen kann so in 20-30 min erfolgen. Die optische Einheit enthält eine Diode als Lichtquelle zur Anregung der Proben und drei Kanäle, die drei unterschiedliche Wellenlängen des von den Proben emittierten Lichtes detektieren können. Während jeder Datenerfassung (meist einmal pro Zyklus) wird mit Hilfe einer Präzisionsmechanik die optische Einheit und jede Kapillare im Probenkarussell justiert und gemessen. Um alle 32 Kapillaren zu positionieren und zu messen, werden ca. 5 sec benötigt.

1.4.2.2. Detektionsformate

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I bindet an doppelsträngige DNA und wird zur sequenzunabhängigen Detektion während einer LightCycler PCR benutzt. SYBR Green I wird durch die Diode mit 470 nm angeregt und emittiert Licht, wenn es an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet. Das Emissionsmaximum liegt bei 521 nm, gemessen wird im Kanal 1 bei 530 nm. Mit diesem Format kann mittels Durchführung einer Schmelzkurve im Anschluß an den PCR-Lauf die Bildung von Primerdimeren erkannt und die Identität des PCR-Produktes überprüft werden.

Das Format der Hybridisierungssonden bietet ein Maximum an Spezifität in Bezug auf die Produktidentifikation während der PCR. Bei diesem Format werden zwei sequenzspezifische Oligonukleotide, die jeweils mit einem Farbstoff markiert sind, zur Detektion benutzt. Das 5'-Oligonukleotid (Donor) ist an seinem 3'-Ende mit Fluorescein markiert, während das 3'-Oligonukleotid (Akzeptor) entweder LightCycler Red 640 oder LightCycler Red 705 am 5'-Ende trägt. Das Emissionsspektrum des Donorfluorophors überlappt das

Absorptionsspektrum des Akzeptorfluorophors. Hybridisieren beide Oligonukleotide an das einzelsträngige Amplifikationsprodukt sequenzbedingt in einer „head to tail“-Anordnung, werden die Farbstoffe in enge räumliche Nähe gebracht. Das Fluorescein wird durch die Diode angeregt, emittiert grünes Licht und gibt einen Teil der Emissionsenergie an den Akzeptor weiter. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet. Der angeregte Akzeptor emittiert dann seinerseits Licht, das im Falle von LightCycler Red 640 im Kanal 2 bei 640 nm oder im Falle von LightCycler Red 705 im Kanal 3 bei 705 nm gemessen wird. Dieses Detektionsformat ist besonders bei Amplifikation genomischer DNA geeignet, da es auch sehr kleine Template-Kopiezahlen bei großem unspezifischen Hintergrund zuverlässig nachweisen kann. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse im Anschluß an die PCR kann bei Verwendung geeigneter Hybridisierungssonden sehr schnell und einfach eine Genotypisierung von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) oder eine Mutationsanalyse vorgenommen werden. (Brown and Young, 1997)

1.4.2.3. Standardkurve und Quantifizierung mit der LightCycler Software

Die LightCycler Software stellt zwei Methoden zur Verfügung, um anhand der Fluoreszenzkurven eine Standardgerade zu erstellen. Der Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal der jeweiligen Probe über das Hintergrundsignal steigt, wird als Crossing Point bezeichnet. Die Fit Points Methode bestimmt den Crossing Point der Standards und Proben, indem sie im log-linearen Bereich eine Gerade über die Fluoreszenzkurve legt und deren Schnittpunkt mit einer waagerechten Crossing Linie ermittelt (Abb. 1.8.). Bei dieser Methode kann der Benutzer die Datenkalkulation durch Festlegen einiger Variablen beeinflussen. Die Methode ist besonders für niedrige Konzentrationen geeignet.

Die Second Derivative Maximum Methode arbeitet vollautomatisch, hier kann der Benutzer nichts beeinflussen. Der Crossing Point liegt bei dem Zyklus, wo der Anstieg der Kurve sich maximal erhöht, d.h. wo die zweite Ableitung der Fluoreszenzkurve einen Maximalwert erreicht.

Anhand der Crossing Points und der bekannten Konzentrationen der Standards wird die Standardgerade erstellt (Abb. 1.8.). Die Probenkonzentration wird von der Software anhand der Standardgeraden und der ermittelten Crossing Points kalkuliert.

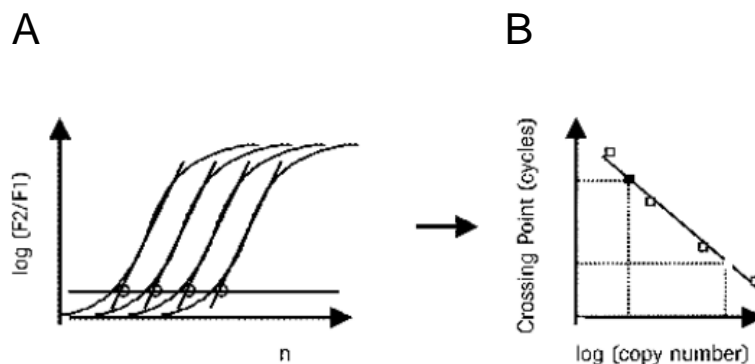


Abb. 1.8. Erstellung einer Standardgeraden. (A) Anhand der Schnittpunkte der Geraden über den log-linearen Bereich der Fluoreszenzkurven bekannter Standardkonzentrationen mit der waagerechten Crossing Linie werden die Crossing Points (Zykluszahl) ermittelt. (B) Die jeweiligen Crossing Points als Funktion der Logarithmen der eingesetzten Kopiezahlen aufgetragen, ergeben die Standardgerade. Anhand dieser kann durch Abtragen des Crossing Points auf die unbekannte Kopiezahl einer mitgeführten Probe geschlossen werden.

1.5. Zielsetzung

Das adeno-assoziierte Virus Typ 2 integriert mit hoher Spezifität in einen bestimmten Locus auf dem humanen Chromosom 19. Die genaue Integrationsstelle variiert dabei um einige hundert Basenpaare.

In der vorliegenden Dissertation wurden thematisch zwei Fragestellungen untersucht. Im ersten Teil sollte geklärt werden, mit welcher Frequenz AAV-2 Wildtyp in das humane Chr. 19 integriert und mit welcher Kinetik diese ortsspezifische Integration erfolgt. Dazu sollte zunächst einmal ein quantitativer Assay etabliert werden, mit welchem die sensitive und parallele Erfassung eines Gemisches unterschiedlicher Chr. 19-Integrationsstellen bei einem hohen Hintergrund humaner genomischer DNA möglich ist. Mit Hilfe dieses Assays sollte dann die Anzahl der humanen Genome ermittelt werden, in welchen nach bestimmten Zeitpunkten nach der Virusinfektion das AAV-Genom integriert vorlag. Um zusätzlich die Orientierung des AAV-Genoms in Bezug zur Integrationsstelle zu unterscheiden, sollten zwei verschiedene sich komplementierende Assays zur Anwendung kommen.

Aus den Daten beider Assays sollten dann die Integrationsfrequenzen pro Zelle kalkuliert und eine entsprechende Kinetik aufgestellt werden. Weiterhin sollte auf die Integrationsfrequenz pro infektiöser Einheit rückgeschlossen werden.

Die durch die Integration entstandenen Bruchpunkte innerhalb der AAV-invertierten terminalen Wiederholungen und des humanen Genoms am Integrationsort sollten charakterisiert werden. Die Chr. 19-Integrationsstellen, die kurz nach der Infektion in Abwesenheit von Selektion gefunden wurden, sollten mit den beschriebenen Integrationsstellen klonaler Zelllinien und transgener Tiere verglichen werden.

Eine unerwartete Beobachtung während der Durchführung der Experimente zum ersten Teil dieser Arbeit führte zu einer Fragestellung, die im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte: Der etablierte quantitative Assay detektierte vermeintliche ortsspezifische Integration in Zellen, die unmittelbar nach der Virusadsorption geerntet wurden, während mock-infizierte Zellen stets negativ waren. Daten aus Vorarbeiten verschiedenster Gruppen zu Viruseintritt und viraler Genexpression machten eine ortsspezifische Integration zu einem so frühen Zeitpunkt höchst unwahrscheinlich. Ziel des zweiten Teils der Dissertation war daher, die Herkunft dieser Signale zu ermitteln und sie näher zu charakterisieren.