

# **Alternative Produktion rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren für die Gentherapie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Diplom-Humanbiologin Annette Kuhrs  
aus Helmstedt

2005

Diese Arbeit wurde am Institut für Virologie, Campus Benjamin Franklin, der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Die Verfasserin versichert, die Arbeit eigenständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

1. Gutachter: Prof. Dr. Regine Heilbronn
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup

Datum der Disputation: 17.02.2006

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>01</b>
1.1	Das Adeno-assoziierte Virus Typ 2.....	01
1.1.1	Charakteristische Eigenschaften.....	01
1.1.2	Aufbau des Viruspartikels und Organisation des Genoms.....	01
1.1.3	Virale Proteine.....	03
1.1.4	Latente Infektion.....	04
1.1.5	Produktive Infektion.....	05
1.2	Ein Helfervirus für AAV: das Herpes-Simplex-Virus Typ 1.....	08
1.2.1	Aufbau des Viruspartikels und des Genoms.....	08
1.2.2	Produktive Infektion.....	08
1.3	Rekombinantes AAV als Vektor für die Gentherapie.....	11
1.3.1	Eigenschaften rekombinanter AAV-Vektoren.....	11
1.3.2	Produktion von rekombinanten AAV-Vektoren.....	12
1.4	Aufgabenstellung.....	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1	Geräte.....	15
2.2	Chemikalien und Reagenzien.....	15
2.3	Zellkulturtechnik.....	15
2.4	Transiente Transfektion mit Calciumphosphat.....	17
2.5	Transiente Transfektion mit Lipofectamine.....	17
2.6	Virusinfektion von Zellen.....	18
2.7	<i>Westernblot</i> Analyse.....	18
2.8	Extraktion niedermolekularer DNA nach der Methode von Hirt (Hirt, 1967).....	20
2.9	Extraktion hochmolekularer DNA.....	20
2.10	Dpnl-Assay.....	21
2.11	<i>Southernblot</i> Analyse.....	21
2.12	Produktion und Titration von rekombinanten AAV-Vektoren.....	23
2.13	Herstellung eines Herpesvirusstocks (nach Rixon and McLauchlan, 1993).....	24
2.14	Plaqueassay.....	24
2.15	Isolierung von HSV-DNA (nach Rixon und McLauchlan, 1993).....	25
2.16	Herstellung rekombinanter Herpesviren durch direkte Ligation.....	25
2.17	Herstellung rekombinanter Herpesviren durch homologe Rekombination.....	26
2.18	Herstellung rekombinanter Herpesviren durch <i>Red/ET</i> -Rekombination.....	27
2.19	Einfügen von Mutationen in Plasmid-DNA durch <i>site-directed mutagenesis</i> .....	29

2.20	Amplifikation von DNA durch PCR.....	30
2.21	Ligation von DNA.....	30
2.22	TOPO TA-Klonierung.....	31
2.23	Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen.....	31
2.24	Präparation von Plasmid-DNA.....	32
2.25	Präparation von <i>Bacterial Artificial Chromosome</i> (BAC)-DNA.....	32
2.26	Plasmide und Oligonukleotide.....	33
2.27	DNA-Fragmente für <i>Red/ET</i> -Rekombination.....	39
2.28	<i>Bacterial Artificial Chromosomes</i> (BACs).....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
3.1	Überprüfung von rHSVrep/cap.....	43
3.1.1	Sequenzierung der AAV-Gene <i>rep</i> und <i>cap</i> in rHSVrep/cap.....	43
3.1.2	Untersuchung des Einflusses der <i>lacZ</i> -Kassette auf die rAAV-Produktion.....	44
3.1.3	Eignung des Stammes HSV1802 für die Produktion von rAAV.....	44
3.1.4	Überprüfung der Helferfunktionen von rHSVrep/cap.....	45
3.2	Vergleich zweier Systeme zur Produktion von rekombinantem AAV.....	46
3.2.1	Untersuchung der Rep- und Cap- Expression beider Systeme.....	47
3.2.2	Untersuchung der rAAV-DNA-Replikation beider Systeme.....	48
3.2.3	Herstellung verschiedener Konstrukte zur Komplementierung des Systems pTR-UF5 x rHSVrep/cap.....	49
3.2.4	Komplementierung des Systems pTR-UF5 x rHSVrep/cap.....	51
3.2.5	Untersuchung der rAAV-DNA-Replikation des komplementierten Systems pTR-UF5 x rHSVrep/cap.....	52
3.3	Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus mit zwei Kopien des AAV- Genoms.....	54
3.3.1	Herstellung von rHSVrep/2cap.....	54
3.3.2	Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSVrep/2cap.....	54
3.3.3	Überprüfung von rHSVrep/2cap im <i>Southernblot</i> .....	55
3.3.4	Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus mit einer vollständigen und einer verkürzten Kopie der AAV-Gene.....	57
3.4	Untersuchung des Einflusses von Rep78/68 auf die HSV-DNA-Replikation.....	58
3.5	Untersuchung des Einflusses der HSV-DNA-Replikation auf die Ausbeute an rekombinantem AAV.....	60

3.6	Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus mit reduzierter Rep78/68-Expression durch Einführung eines alternativen Startcodons.....	62
3.6.1	Klonierung von p $\Delta$ TRrepACG.....	62
3.6.2	Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von p $\Delta$ TRrepACG.....	62
3.6.3	Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSVrepACG/cap.....	63
3.6.4	Untersuchung der rAAV-DNA-Replikation bei Verwendung von p $\Delta$ TRrepACG und rHSVrepACG/cap.....	66
3.6.5	Produktion von rekombinantem AAV mit p $\Delta$ TRrepACG und rHSVrepACG/cap....	68
3.6.6	Untersuchung der DNA-Replikation von rHSVrep/cap und rHSVrepACG/cap.....	69
3.7	Reduzierung der Rep78/68-Expression durch Austausch des p5-Promotors gegen einen MMTV-Promotor.....	71
3.8	Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus mit reduzierter Rep78/68-Expression durch Mutation der Kozak-Sequenz.....	73
3.8.1	Klonierung der Kozak-Konstrukte p $\Delta$ TRK1- p $\Delta$ TRK4.....	73
3.8.2	Untersuchung der Rep- und Cap-Expression der Kozak-Konstrukte.....	74
3.8.3	Untersuchung der verkürzten großen Rep-Proteine.....	75
3.8.4	Untersuchung der rAAV-DNA-Replikation bei Verwendung von p $\Delta$ TRK1-p $\Delta$ TRK4 als Helferplasmid.....	78
3.8.5	Untersuchung der rAAV-Produktion mit p $\Delta$ TRK1-p $\Delta$ TRK4.....	80
3.8.6	Herstellung von rHSVK3SV40EGFP.....	80
3.8.7	Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSVK3SV40EGFP.....	81
3.8.8	Untersuchung der rAAV-DNA-Replikation durch rHSVK3SV40EGFP.....	82
3.8.9	Untersuchung der rAAV-Produktion mit rHSVK3SV40EGFP.....	84
3.9	Herstellung eines verpackungsdefizienten rekombinanten Herpesvirus.....	85
3.9.1	Konstruktion von rHSV $\Delta$ 27K3SV40EGFP.....	85
3.9.2	Untersuchung der rAAV-Produktion mit rHSV $\Delta$ 27K3SV40EGFP.....	85
3.9.3	Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSV $\Delta$ 27K3SV40EGFP.....	86
3.9.4	Produktion von rekombinantem AAV durch Koinfektion.....	87
3.9.5	Konstruktion von rHSV $\Delta$ 27K3FRT.....	88
3.9.6	Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSV $\Delta$ 27K3FRT.....	88
3.10	Herstellung rekombinanter Herpesviren durch <i>Red/ET</i> -Rekombination.....	90
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>91</b>
4.1	Untersuchung von rHSVrep/cap.....	93

## Inhaltsverzeichnis

---

4.2	Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus mit reduzierter Rep78/68-Expression.....	95
4.3	Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus mit mittlerer Rep78/68-Expression.....	99
4.4	Herstellung eines verpackungsdefizienten rekombinanten Herpesvirus.....	102
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>117</b>
6.1	Zusammenfassung.....	117
6.2	Summary.....	118