

3 Ergebnisse

3.1 Überprüfung von rHSVrep/cap

Als Basis für eine Produktion von rekombinanten AAV-Vektoren in größerem Maßstab wurde das rekombinante Herpes-Simplex-Virus rHSVrep/cap konstruiert, das die *rep*- und *cap*-Gene von AAV-2 enthält (Heilbronn *et al.*, 2003). Um herauszufinden, warum mit rHSVrep/cap nur geringe Ausbeuten an rekombinanten AAV-Vektoren erzielt werden, sollte zunächst die Integrität von rHSVrep/cap überprüft werden.

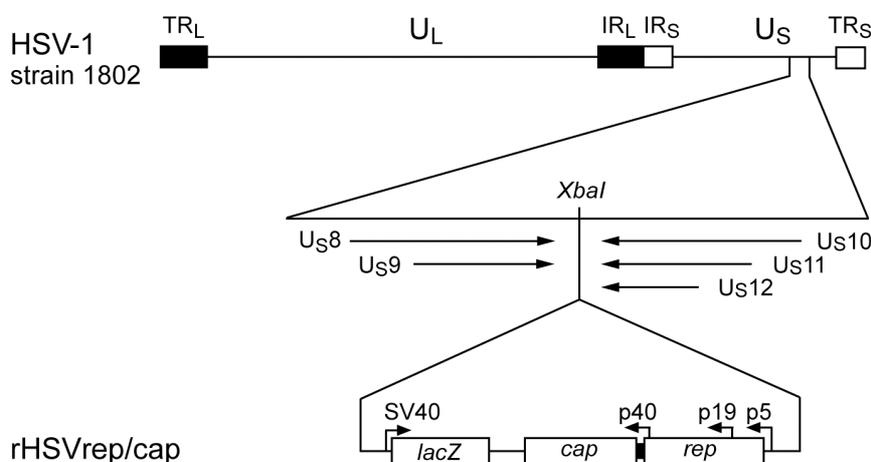


Abbildung 3.1: Konstruktion von rHSVrep/cap. Der Stamm HSV1802 besitzt in der U_S -Region eine einzelne *XbaI*-Schnittstelle, die von nicht-essentiellen HSV-Genen flankiert wird. In diese Schnittstelle wurde ein DNA-Fragment kloniert, das die *rep*- und *cap*-Gene von AAV-2 (Nukleotidposition 190 bis 4492) sowie als Markergen *lacZ* unter Kontrolle des frühen SV40-Promotors trägt.

(aus Heilbronn *et al.*, 2003)

3.1.1 Sequenzierung der AAV-Gene *rep* und *cap* in rHSVrep/cap

Die *rep*- und *cap*-Gene in rHSVrep/cap wurden sequenziert, um ausschließen zu können, dass es bei der Virusherstellung zu Mutationsereignissen gekommen war. Hierzu wurden BHK-Zellen mit rHSVrep/cap infiziert und zwei Tage später Gesamt-DNA mit dem *QIAampDNAMiniKit* isoliert. Mittels PCR wurden *rep* und *cap* amplifiziert und das PCR-Produkt in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Eine Sequenzierung dieses Konstruktes ergab, dass die *rep*- und *cap*-Gene in rHSVrep/cap keine Mutationen enthalten, sondern exakt der publizierten AAV-2-Sequenz von Nukleotidposition 190 bis 4492 entsprechen (Strivastava *et al.*, 1983).

3.1.2 Untersuchung des Einflusses der *lacZ*-Kassette auf die rAAV-Produktion

rHSVrep/cap enthält als Markergen *lacZ* unter Kontrolle des frühen SV40-Promotors. Durch folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob diese Sequenzen die Produktion von rekombinantem AAV negativ beeinflussen. Die gesamte *rep/cap-lacZ*-Kassette, die zur Herstellung von rHSVrep/cap verwendet wurde, ist in dem Plasmid psub201lac enthalten. Dieses Plasmid wurde mit dem Plasmid p Δ TR verglichen, das im Unterschied zu psub201lac nur die AAV-Gene *rep* und *cap* ohne Markergen und SV40-Promotor enthält (siehe 2.26). Beide Plasmide wurden als Helferplasmid bei der Produktion von rekombinantem AAV eingesetzt. Hierzu wurden BHK-Zellen mit jeweils einem der beiden Helferplasmide und dem Konstrukt pTR-UF5, welches das klonierte rAAV-Genom enthält, kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit HSV1802 infiziert. Nach zwei Tagen wurde das entstandene rekombinante AAV geerntet und titriert. Mit beiden Helferplasmiden wurde dabei die gleiche Ausbeute an rekombinantem AAV von etwa 100 infektiösen Partikeln pro Zelle erzielt. Die *lacZ*-Kassette mit dem SV40-Promotor beeinflusst die Produktion von rekombinantem AAV auf Plasmidebene somit nicht.

3.1.3 Eignung des Stammes HSV1802 für die Produktion von rAAV

Das rekombinante Herpesvirus rHSVrep/cap geht auf den Stamm HSV1802 zurück, der eine einzelne XbaI-Schnittstelle in der U_S-Region besitzt (Rixon *and* McLauchlan, 1990). Um zu untersuchen, ob dieser HSV-Stamm für die Produktion von rekombinantem AAV geeignet ist, wurde er mit den HSV-1 Wildtyp-Stämmen KOS und 17 verglichen. BHK-Zellen bzw. 293-Zellen wurden mit dem Konstrukt pTR-UF5, welches das klonierte rAAV-Genom enthält, und dem Helferplasmid p Δ TR kotransfiziert und anschließend mit den HSV-Stämmen 1802, KOS bzw. 17 infiziert. Zwei Tage später wurde das entstandene rekombinante AAV geerntet und titriert. Sowohl in BHK- als auch in 293-Zellen ergaben sich zwischen den verschiedenen HSV-Stämmen keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Funktion als Helfervirus bei der rAAV-Produktion. Mit allen Ansätzen wurde eine Ausbeute von etwa 100 infektiösen rAAV-Partikeln pro Zelle erzielt. Der Stamm HSV1802 eignet sich somit genauso gut für die Produktion von rekombinantem AAV wie die HSV-1 Wildtyp-Stämme KOS und 17.

3.1.4 Überprüfung der Helferfunktionen von rHSVrep/cap

Zur Überprüfung der Helferfunktionen von rHSVrep/cap wurden die folgenden beiden Ansätze miteinander verglichen. Zum einen wurden BHK-Zellen mit pTR-UF5 und p Δ TR kotransfiziert und anschließend mit HSV1802 infiziert. Im zweiten Ansatz wurden BHK-Zellen ebenfalls mit pTR-UF5 und p Δ TR kotransfiziert, dann aber mit rHSVrep/cap infiziert. rHSVrep/cap wurde in diesem Fall nicht als Lieferant von *rep* und *cap* verwendet, da diese Gene schon durch das Plasmid p Δ TR bereitgestellt werden, sondern lediglich auf seine Funktion als Helfervirus überprüft. Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und die Menge an rekombinantem AAV bestimmt. Zwischen den verwendeten Helferviren HSV1802 und rHSVrep/cap konnte dabei kein Unterschied festgestellt werden. Mit beiden Viren wurden etwa 100 infektiöse Partikel pro Zelle produziert. Die HSV-Helferfunktionen von rHSVrep/cap sind somit intakt.

3.2 Vergleich zweier Systeme zur Produktion von rekombinantem AAV

Im Weiteren wurden die beiden folgenden Methoden zur Herstellung von rekombinantem AAV genauer untersucht. Bei der hier so bezeichneten Standardmethode wird das Konstrukt pTR-UF5, welches das klonierte rAAV-Genom enthält, zusammen mit dem Plasmid p Δ TR, das die für die Verpackung und Replikation notwendigen *rep*- und *cap*-Gene von AAV liefert, in Zellen kotransfiziert. Anschließend werden die transfizierten Zellen mit HSV1802 als Helfervirus infiziert. In der hier verwendeten Kurzschreibweise lautet dies: (pTR-UF5 + p Δ TR) x HSV1802. Die beschriebene Standardmethode entspricht dem klassischen System zur Herstellung von rekombinantem AAV, mit dem Unterschied, dass anstelle von Adenovirus HSV als Helfer eingesetzt wird (siehe 1.3.2). Verglichen wurde die Standardmethode mit einem System, bei dem Zellen mit pTR-UF5 transfiziert und anschließend mit rHSVrep/cap infiziert werden. rHSVrep/cap exprimiert zusätzlich zu seinen Helferfunktionen die für die Vektorproduktion erforderlichen AAV-Proteine, die nun nicht mehr durch Transfektion in die Zellen eingebracht werden müssen. Das rAAV-Vektorgenom wurde für die Untersuchungen an rHSVrep/cap vorerst noch transfiziert und nicht als Bestandteil eines rekombinanten Virus oder stabil integriert in das Zellgenom bereitgestellt. Die Kurzschreibweise für dieses System ist: pTR-UF5 x rHSVrep/cap. Erntet und titriert man zwei Tage nach Transfektion und Infektion das entstandene rAAV, so ergibt sich für die Standardmethode ein Wert von etwa 100 infektiösen Partikeln pro Zelle, während mit dem System pTR-UF5 x rHSVrep/cap nur etwa 0,5 infektiöse Partikel pro Zelle gebildet werden. Durch vergleichende Untersuchungen der beiden Systeme sollte herausgefunden werden, warum die Standardmethode gut funktioniert, mit dem System pTR-UF5 x rHSVrep/cap aber nur sehr wenig rekombinantes AAV produziert wird.

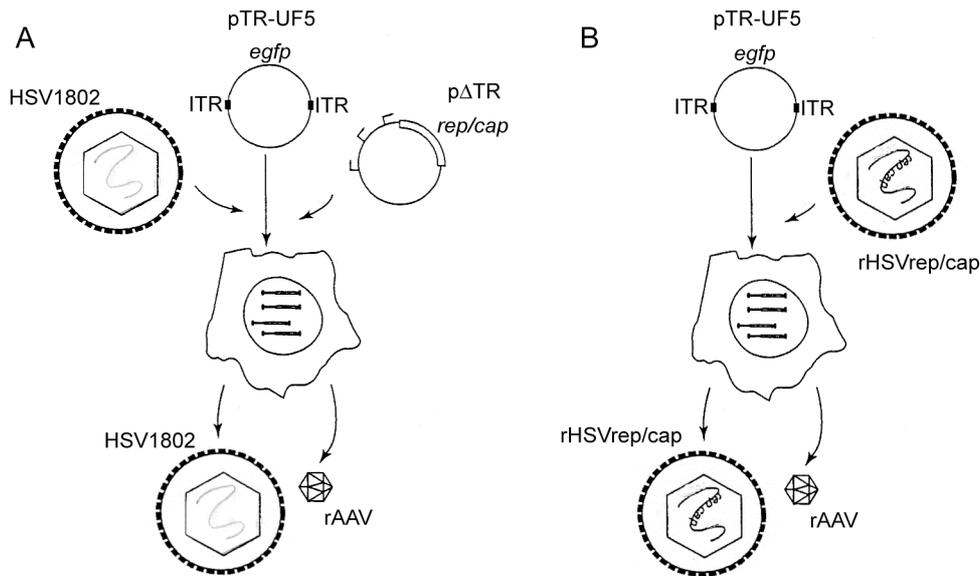


Abbildung 3.2: Produktion von rekombinantem AAV nach der Standardmethode (A) und mit rHSVrep/cap (B).
(modifiziert aus Monahan *and* Samulski, 2000)

3.2.1 Untersuchung der Rep- und Cap- Expression beider Systeme

Zur Untersuchung der Rep- und Cap-Expression der beiden Vergleichssysteme wurden BHK-Zellen nach beiden Methoden transfiziert und infiziert. Nach 24 und 48 Stunden wurde aus den Zellen Proteinextrakt hergestellt und ein *Westernblot* durchgeführt. Rep und Cap wurden hierbei durch monoklonale Antikörper erkannt und mittels Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper detektiert. Abbildung 3.3 zeigt, dass die Expression von Rep und Cap bei dem System pTR-UF5 x rHSVrep/cap sehr viel schwächer ist als bei der Standardmethode. Dies wird besonders für Rep52/40 und Cap deutlich. Möglicherweise repliziert rHSVrep/cap sich nicht so stark, dass nach 24 und 48 Stunden genauso viele Kopien der *rep*- und *cap*-Gene vorliegen wie bei Transfektion eines Rep- und Cap-exprimierenden Plasmids.

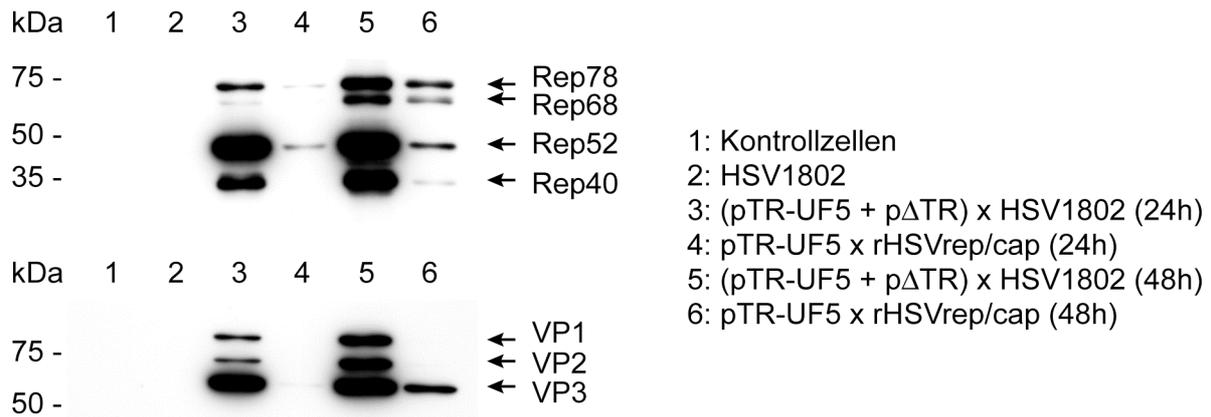


Abbildung 3.3: *Westernblot* Analyse von BHK-Zellen, die mit pTR-UF5 und pΔTR kotransfiziert und mit HSV1802 infiziert bzw. mit pTR-UF5 transfiziert und mit rHSVrep/cap infiziert wurden. Rep und Cap wurden durch die Antikörper 303.9 (oberer Blot) bzw. B1 (unterer Blot) erkannt und mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen.

3.2.2 Untersuchung der rAAV-DNA-Replikation beider Systeme

Um die rAAV-DNA-Replikation beider Systeme miteinander vergleichen zu können, wurden BHK-Zellen wie oben beschrieben transfiziert und infiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet und niedermolekulare DNA nach der Hirt-Methode extrahiert. Die DNA-Extrakte wurden mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut, das selektiv die eingangs transfizierte DNA, nicht aber die in den Zellen neu synthetisierte DNA abbaut (siehe 2.10). Nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine Nylonmembran wurde durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gegen das Gen für das *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) rAAV-DNA nachgewiesen. In Abbildung 3.4 sieht man, dass mit der Standardmethode die typischen Replikationsformen von rAAV entstehen (Spuren 3 und 4). In dem System pTR-UF5 x rHSVrep/cap wird kaum rAAV-Einzelstrang-DNA gebildet, während die anderen replikativen Formen in vergleichbarer Menge zur Standardmethode vorliegen (Spuren 7 und 8). Dies lässt sich damit erklären, dass zu wenige Cap-Proteine und damit Capside zur Verfügung stehen, in welche die Einzelstrang-DNA verpackt werden kann. So erfordert die Akkumulierung von Einzelstrang-DNA ihre Verkapselung (Ruffing *et al.*, 1994). Eine weitere Möglichkeit ist, dass nicht genügend kleine Rep-Proteine vorhanden sind, um die DNA-Einzelstränge in die Capside einzuschleusen (King *et al.*, 2001). Dass die anderen replikativen Formen genauso stark zu sehen sind wie bei der Standardmethode, zeigt, dass die großen Rep-Proteine in ausreichender Menge vorhanden sind.

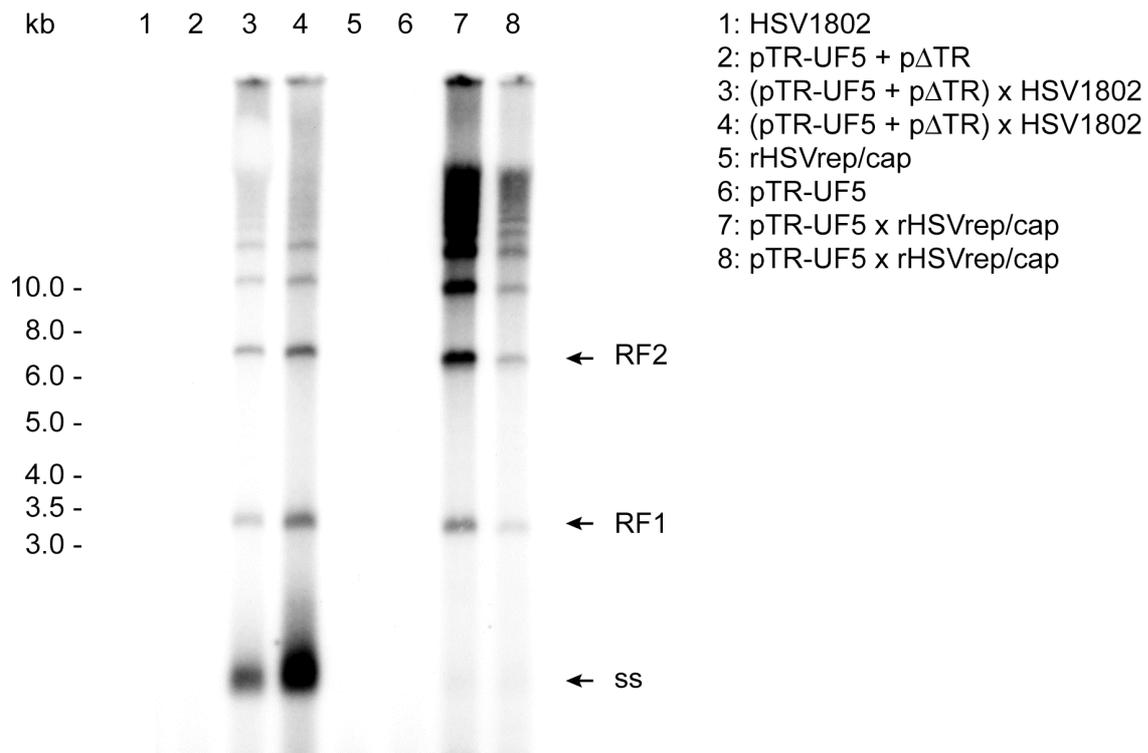


Abbildung 3.4: *Southernblot* Analyse von DpnI-verdauten Hirt-Extrakten aus BHK-Zellen, die 24 Stunden zuvor mit pTR-UF5 und pΔTR kotransfiziert und mit HSV1802 infiziert bzw. mit pTR-UF5 transfiziert und anschließend mit rHSVrep/cap infiziert wurden. Als Sonde wurde ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment gegen *egfp* verwendet. Die Pfeile zeigen die Position des einzelsträngigen rAAV-Genoms (ss) sowie der monomeren (RF1) und dimeren (RF2) Replikationsform an.

3.2.3 Herstellung verschiedener Konstrukte zur Komplementierung des Systems pTR-UF5 x rHSVrep/cap

Um überprüfen zu können, ob sich das System pTR-UF5 x rHSVrep/cap durch zusätzliche kleine Rep-Proteine und/oder Cap-Proteine komplementieren lässt, wurden zunächst verschiedene Konstrukte kloniert (siehe auch 2.26). Diese gehen alle auf das Plasmid pΔTR zurück, das für die Rep- und Cap-Proteine von AAV kodiert. In pΔTR wurde hinter dem Startcodon von Rep78/68 ein Stopp eingeführt. Von dem so erhaltenen Plasmid pΔTRp5TAA werden keine großen Rep-Proteine mehr gebildet, sondern nur noch Rep52/40 und Cap. pΔTRp5TAA wurde als Ausgangskonstrukt für zwei weitere Plasmide verwendet. So wurde zum einen das Startcodon der kleinen Rep-Proteine in die Sequenz GGG umgewandelt. Das entstandene Plasmid pΔTRp5TAAp19GGG exprimiert weder Rep78/68 noch Rep52/40. Zum anderen wurde in pΔTRp5TAA hinter dem Startcodon von VP3 ein weiteres Stoppcodon eingeführt. Auf diese Weise konnte das Plasmid pΔTRp5TAAcapTAA erhalten werden, von dem nur die kleinen Rep-Proteine gebildet werden. Als weiteres Konstrukt wurde das

Plasmid p Δ TRp19GGGcapTAA generiert, das nur die großen Rep-Proteine exprimiert. Dies geschah durch Einfügen des schon beschriebenen Stoppcodons hinter dem Startcodon von VP3 sowie der Umwandlung des Startcodons von Rep52/40 in die Sequenz GGG. Die Mutation des Startcodons der kleinen Rep-Proteine hat einen Aminosäureaustausch in der Sequenz der großen Rep-Proteine zur Folge, was deren Funktion aber nicht beeinträchtigt (Chejanovsky *et al.*, 1989). Zum Auffüllen von Transfektionsansätzen wurde außerdem das Plasmid p Δ TRp5TAAp19GGGcapTAA hergestellt, das alle beschriebenen Mutationen besitzt und somit keines der AAV-Proteine exprimiert. Abbildung 3.5 zeigt die Rep- und Cap-Expression der hergestellten Konstrukte.

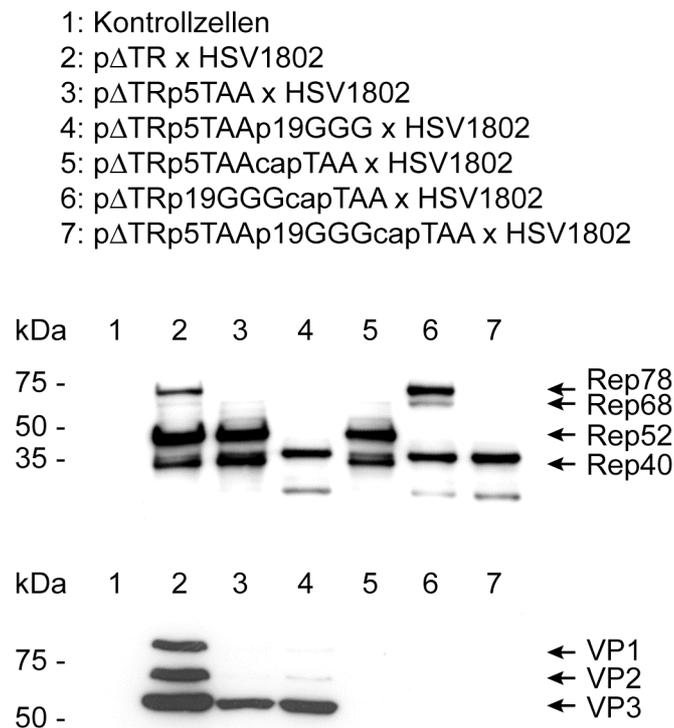


Abbildung 3.5: *Westernblot* Analyse von BHK-Zellen, die mit p Δ TR (Rep78/68, Rep52/40, Cap), p Δ TRp5TAA (Rep52/40, Cap), p Δ TRp5TAAp19GGG (Cap), p Δ TRp5TAAcapTAA (Rep52/40), p Δ TRp19GGGcapTAA (Rep78/68) bzw. p Δ TRp5TAAp19GGGcapTAA (-) transfiziert und anschließend mit HSV1802 infiziert wurden. Rep und Cap wurden durch die Antikörper 303.9 (oberer Blot) bzw. B1 (unterer Blot) erkannt und mit Hilfe eines Peroxidasegekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen. Die Mutation des Startcodons von Rep52/40 führt zur Verwendung weiter 3'- liegender Startcodons, so dass nicht funktionelle N-terminal verkürzte Proteine entstehen (Spuren 4, 6, 7).

3.2.4 Komplementierung des Systems pTR-UF5 x rHSVrep/cap

Mit Hilfe der hergestellten Konstrukte wurden Komplementierungsversuche durchgeführt. Diese sollten Aufschluss darüber geben, ob in dem System pTR-UF5 x rHSVrep/cap zu wenige kleine Rep-Proteine und/oder Cap-Proteine vorhanden sind. BHK-Zellen wurden wie folgt transfiziert und infiziert. Zwei Tage später wurde das entstandene rekombinante AAV geerntet und titriert:

1) [pTR-UF5 + p Δ TR (Rep78/68, Rep52/40, Cap)]	x HSV1802	→100 IP/Zelle
2) [pTR-UF5 + p Δ TR (Rep78/68, Rep52/40, Cap)]	x rHSVrep/cap	→100 IP/Zelle
3) [pTR-UF5 + p Δ TRp5TAAp19GGGcapTAA (-)]	x rHSVrep/cap	→ 0,5 IP/Zelle
4) [pTR-UF5 + p Δ TRp5TAAcapTAA (Rep52/40)]	x rHSVrep/cap	→ 7 IP/Zelle
5) [pTR-UF5 + p Δ TRp5TAAp19GGG (Cap)]	x rHSVrep/cap	→ 7 IP/Zelle
6) [pTR-UF5 + p Δ TRp5TAA (Rep52/40, Cap)]	x rHSVrep/cap	→100 IP/Zelle
7) [pTR-UF5 + p Δ TRp19GGGcapTAA (Rep78/68)]	x rHSVrep/cap	→ 0,2 IP/Zelle

Dieser Versuch ergab, dass sich die Ausbeute an rekombinantem AAV, die mit dem System pTR-UF5 x rHSVrep/cap erzielt wird (3), durch zusätzliche Transfektion eines Rep52/40- bzw. Cap-exprimierenden Plasmids jeweils um den Faktor 14 auf etwa 7 infektiöse Partikel pro Zelle steigern lässt (4, 5). Transfiziert man ein Plasmid, das sowohl Rep52/40 als auch Cap bildet, kommt es zu einer Steigerung der rAAV-Ausbeute um den Faktor 200 auf etwa 100 infektiöse Partikel pro Zelle (6). Dies entspricht der Ausbeute an rekombinantem AAV, die mit der Standardmethode erreicht wird (1). Das System pTR-UF5 x rHSVrep/cap lässt sich also durch zusätzliches Rep52/40 und Cap vollständig komplementieren. Eine zusätzliche Expression von großen Rep-Proteinen durch Transfektion des Plasmids p Δ TRp19GGGcapTAA bewirkt dagegen, dass noch weniger rAAV-Partikel gebildet werden (7). Zu beachten ist, dass Letzteres nicht der Fall ist, wenn das System pTR-UF5 x rHSVrep/cap mit dem Plasmid p Δ TR komplementiert wird, das nicht nur die großen Rep-Proteine, sondern auch Rep52/40 und Cap liefert (2).

Die Experimente legen den Schluss nahe, dass die großen Rep-Proteine, die von rHSVrep/cap gebildet werden, eine effiziente DNA-Replikation dieses Virus behindern. Dadurch werden nur wenige Kopien der *rep*- und *cap*-Gene generiert, was erklärt, warum in dem System pTR-UF5 x rHSVrep/cap zu wenig Rep52/40 und Cap vorhanden sind. Eine zusätzliche Expression von großen Rep-Proteinen durch Transfektion des Plasmids p Δ TRp19GGGcapTAA behindert demnach die Replikation von rHSVrep/cap noch mehr, so dass noch weniger Kopien der *rep*- und *cap*-Gene und somit Rep52/40 und Cap-Proteine

gebildet werden. Dies erklärt den beobachteten Rückgang an produzierten rAAV-Partikeln. Eine Transfektion von p Δ TR liefert dagegen sehr viele Kopien von *rep* und *cap* und somit auch Rep52/40- und Cap-Proteine, so dass Rep78/68 in diesem Fall keinen Rückgang der rAAV-Ausbeute bewirken kann.

3.2.5 Untersuchung der rAAV-DNA-Replikation des komplementierten Systems pTR-UF5 x rHSVrep/cap

Durch folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob die Komplementierung des Systems pTR-UF5 x rHSVrep/cap durch zusätzliches Rep52/40 und Cap auch auf Ebene der rAAV-DNA-Replikation sichtbar wird. Wie im vorangegangenen Experiment wurden BHK-Zellen transfiziert und infiziert. 24 Stunden später wurde nach der Methode von Hirt DNA isoliert. Die Extrakte wurden mit DpnI verdaut, in einem Agarosegel aufgetrennt und auf Nylon geblottet. rAAV-DNA wurde mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gegen *egfp* detektiert. Wie bereits in Abbildung 3.4 gezeigt, sieht man in Abbildung 3.6, dass in dem System pTR-UF5 x rHSVrep/cap kaum Einzelstrang-DNA gebildet wird (Spur 5). Eine Quantifizierung der Daten im Phosphoimager ergab, dass mit der Standardmethode (Spur 3) etwa die zehnfache Menge entsteht. Fügt man dem System pTR-UF5 x rHSVrep/cap ein Rep52/40- bzw. Cap-exprimierendes Plasmid hinzu, kommt es jeweils zu einer leichten Zunahme der Menge an Einzelstrang-DNA (Spuren 6 bzw. 7). Wird das System um ein Plasmid ergänzt, das sowohl Rep52/40 als auch Cap exprimiert, entsteht genauso viel Einzelstrang wie bei der Standardmethode (Spur 8). Eine zusätzliche Expression von Rep78/68 bewirkt dagegen keine Zunahme an rAAV-Einzelstrang-DNA (Spur 9). Nur wenn zusammen mit Rep78/68 zusätzlich auch Rep52/40- und Cap-Proteine gebildet werden, entspricht die Menge an Einzelstrang der Menge, die mit der Standardmethode erzielt wird (Spur 4). Die Komplementierbarkeit des Systems pTR-UF5 x rHSVrep/cap durch zusätzliches Rep52/40 und Cap wird also auch auf Ebene der rAAV-DNA-Replikation sichtbar.

- 1: Kontrollzellen
- 2: pTR-UF5 + pΔTR (**Rep78/68, Rep52/40, Cap**)
- 3: {pTR-UF5 + pΔTR (**Rep78/68, Rep52/40, Cap**)} x HSV1802
- 4: {pTR-UF5 + pΔTR (**Rep78/68, Rep52/40, Cap**)} x rHSVrep/cap
- 5: {pTR-UF5 + pΔTRp5TAAp19GGGcapTAA (-)} x rHSVrep/cap
- 6: {pTR-UF5 + pΔTRp5TAAcapTAA (**Rep52/40**)} x rHSVrep/cap
- 7: {pTR-UF5 + pΔTRp5TAAp19GGG (**Cap**)} x rHSVrep/cap
- 8: {pTR-UF5 + pΔTRp5TAA (**Rep52/40, Cap**)} x rHSVrep/cap
- 9: {pTR-UF5 + pΔTRp19GGGcapTAA (**Rep78/68**)} x rHSVrep/cap

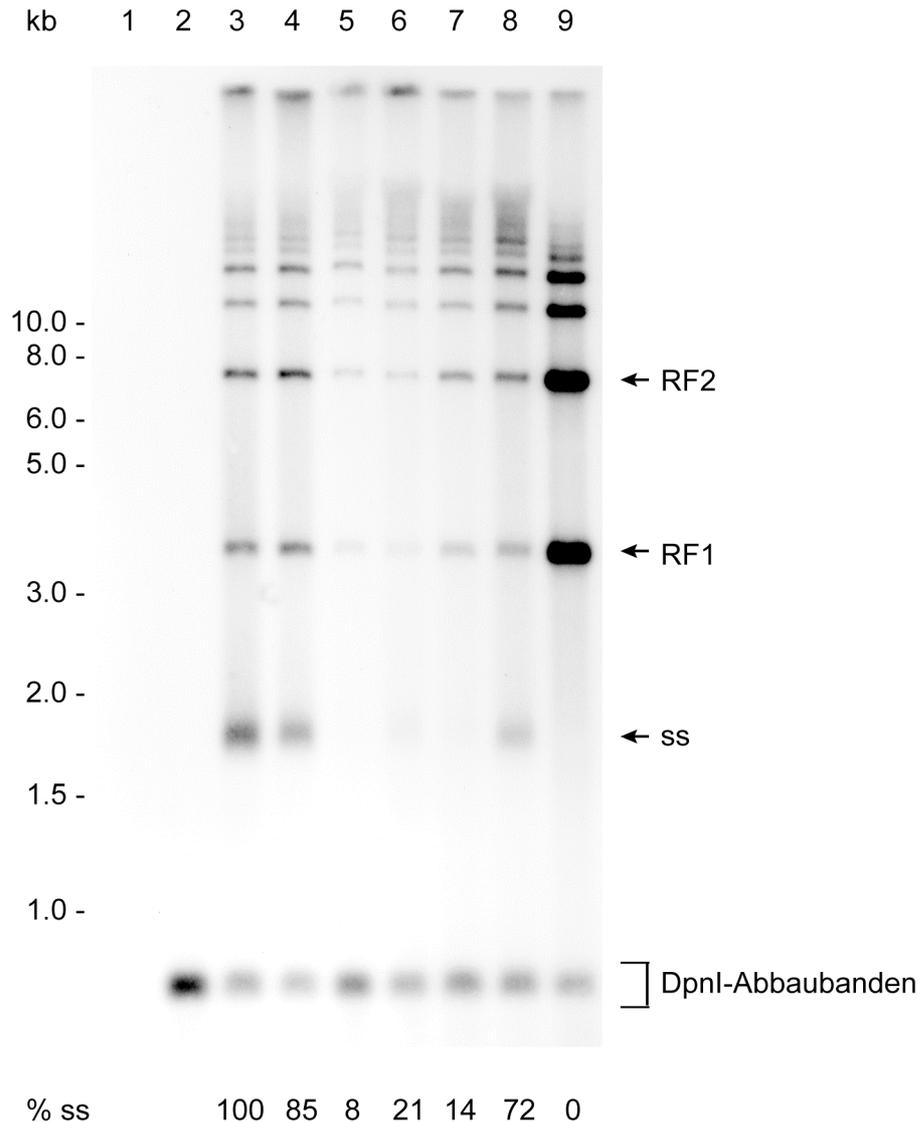


Abbildung 3.6: *Southernblot* Analyse von DpnI-verdauten Hirt-Extrakten aus BHK-Zellen, die 24 Stunden zuvor mit pTR-UF5 und pΔTR kotransfiziert und mit HSV1802 infiziert wurden. Alternativ wurden BHK-Zellen mit pTR-UF5 und pΔTR bzw. den angegebenen pΔTR-Mutanten kotransfiziert und mit rHSVrep/cap infiziert. Als Sonde wurde ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment gegen *egfp* verwendet. Die Pfeile zeigen die Position des einzelsträngigen rAAV-Genoms (ss) sowie der monomeren (RF1) und dimeren (RF2) Replikationsform an. Unter der Abbildung sind die bei der Quantifizierung des rAAV-Einzelstranges erhaltenen Werte in Prozent angegeben.

3.3 Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus mit zwei Kopien des AAV-Genoms

3.3.1 Herstellung von rHSVrep/2cap

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass rHSVrep/cap zu wenig Rep52/40 und Cap für eine effiziente rAAV-Produktion bildet. Um eine höhere Expression dieser Proteine zu erzielen, sollte ein neues rekombinantes Herpesvirus mit zwei Kopien der *rep/cap*-Gene konstruiert werden. Von der zweiten Kopie sollten dabei keine großen Rep-Proteine, sondern nur Rep52/40 und Cap gebildet werden. Hierzu wurde das Konstrukt p Δ TR Δ TRp5TAA hergestellt, das zwei hintereinander liegende Kopien der AAV-Gene enthält (siehe 2.26). Ein Stoppcodon hinter dem Start-ATG der großen Rep-Proteine verhindert in der zweiten Kopie die Expression dieser Proteine. Abbildung 3.7 zeigt die Rep- und Cap-Expression von p Δ TR Δ TRp5TAA. Durch Ligation der beiden *rep/cap*-Kopien in XbaI-geschnittene HSV1802-DNA konnte wie im Methodenteil beschrieben das Virus rHSVrep/2cap erhalten werden (siehe 2.16).

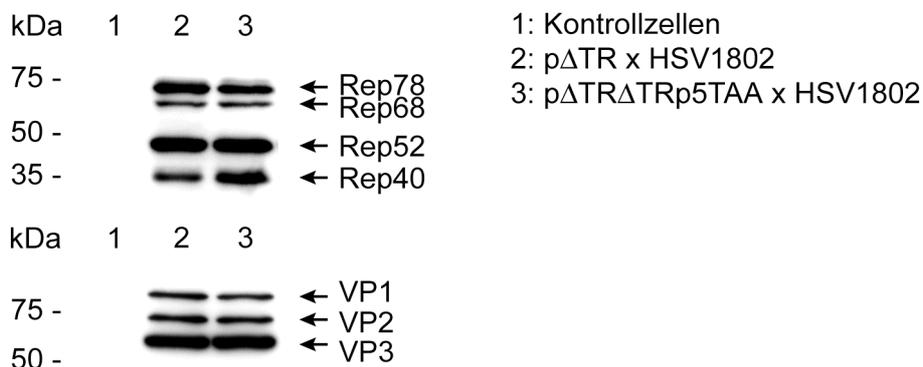


Abbildung 3.7: *Western blot* Analyse von BHK-Zellen, die mit p Δ TR bzw. p Δ TR Δ TRp5TAA transfiziert und anschließend mit HSV1802 infiziert wurden. Rep und Cap wurden durch die Antikörper 303.9 (oberer Blot) bzw. B1 (unterer Blot) erkannt und mit Hilfe eines Peroxidasegekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen. Die hohe Transfektionseffizienz hat zur Folge, dass bereits bei Transfektion von p Δ TR eine Sättigung erreicht wird. Durch Transfektion von p Δ TR Δ TRp5TAA kann die Expression der AAV-Proteine daher nicht weiter gesteigert werden. Deutlich gemacht werden soll hier lediglich, dass p Δ TR Δ TRp5TAA Rep und Cap exprimiert.

3.3.2 Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSVrep/2cap

Zur Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSVrep/2cap wurden BHK-Zellen nach der Standardmethode, mit dem System pTR-UF5 x rHSVrep/cap sowie mit pTR-UF5 x

rHSVrep/2cap transfiziert und infiziert. 24 und 48 Stunden nach Infektion wurde aus den Zellen Proteinextrakt hergestellt und ein *Westernblot* durchgeführt. Rep und Cap wurden durch monoklonale Antikörper erkannt und mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen. In Abbildung 3.8 sieht man, dass rHSVrep/2cap 48 Stunden nach Infektion eine sehr viel stärkere Cap-Expression zeigt als rHSVrep/cap. Allerdings werden keine Rep-Proteine exprimiert, was vermuten ließ, dass bei der Virusherstellung Rekombinationsereignisse aufgetreten sind.

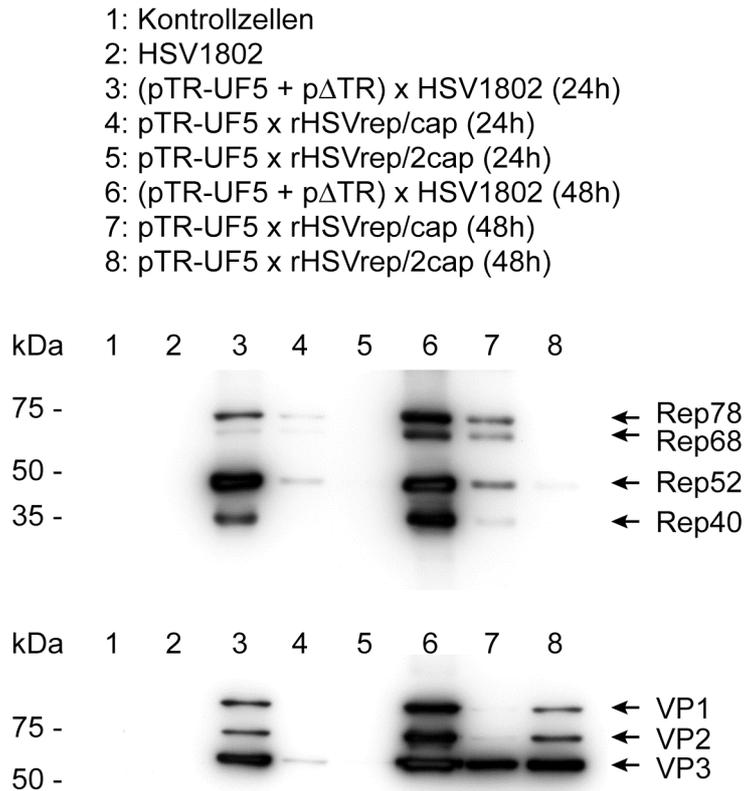


Abbildung 3.8: *Westernblot* Analyse von BHK-Zellen, die zum einen mit pTR-UF5 und pΔTR kotransfiziert und mit HSV1802 infiziert wurden, zum anderen mit pTR-UF5 transfiziert und mit rHSVrep/cap bzw. rHSVrep/2cap infiziert wurden. Rep und Cap wurden durch die Antikörper 303.9 (oberer Blot) bzw. B1(unterer Blot) erkannt und mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen.

3.3.3 Überprüfung von rHSVrep/2cap im *Southernblot*

Um zu untersuchen, ob es bei der Herstellung von rHSVrep/2cap zu Rekombinationen gekommen war, sollte die Integrität der *rep/cap*-Sequenzen im *Southernblot* überprüft werden. Hierzu wurden BHK-Zellen mit rHSVrep/2cap infiziert. Als Positivkontrolle wurde das Konstrukt pΔTRΔTRp5TAA, aus dem die beiden *rep/cap*-Kopien für rHSVrep/2cap isoliert worden waren, in BHK-Zellen transfiziert. 24 Stunden später wurde aus den Zellen Gesamt-

DNA extrahiert. Die DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, im Agarosegel aufgetrennt und auf Nylon geblottet. Mit Hilfe einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gegen *cap* wurden die Fragmente sichtbar gemacht. Hierbei ergab sich für die *rep/cap*-Sequenzen in rHSVrep/2cap nicht das gleiche Bandenmuster wie für die *rep/cap*-Sequenzen in pΔTRΔTRp5TAA. Stattdessen zeigte sich eine Vielzahl nicht einzuordnender Fragmente (siehe Abbildung 3.9). Die Vermutung, dass bei der Herstellung von rHSVrep/2cap Rekombinationsereignisse aufgetreten waren, konnte somit bestätigt werden.

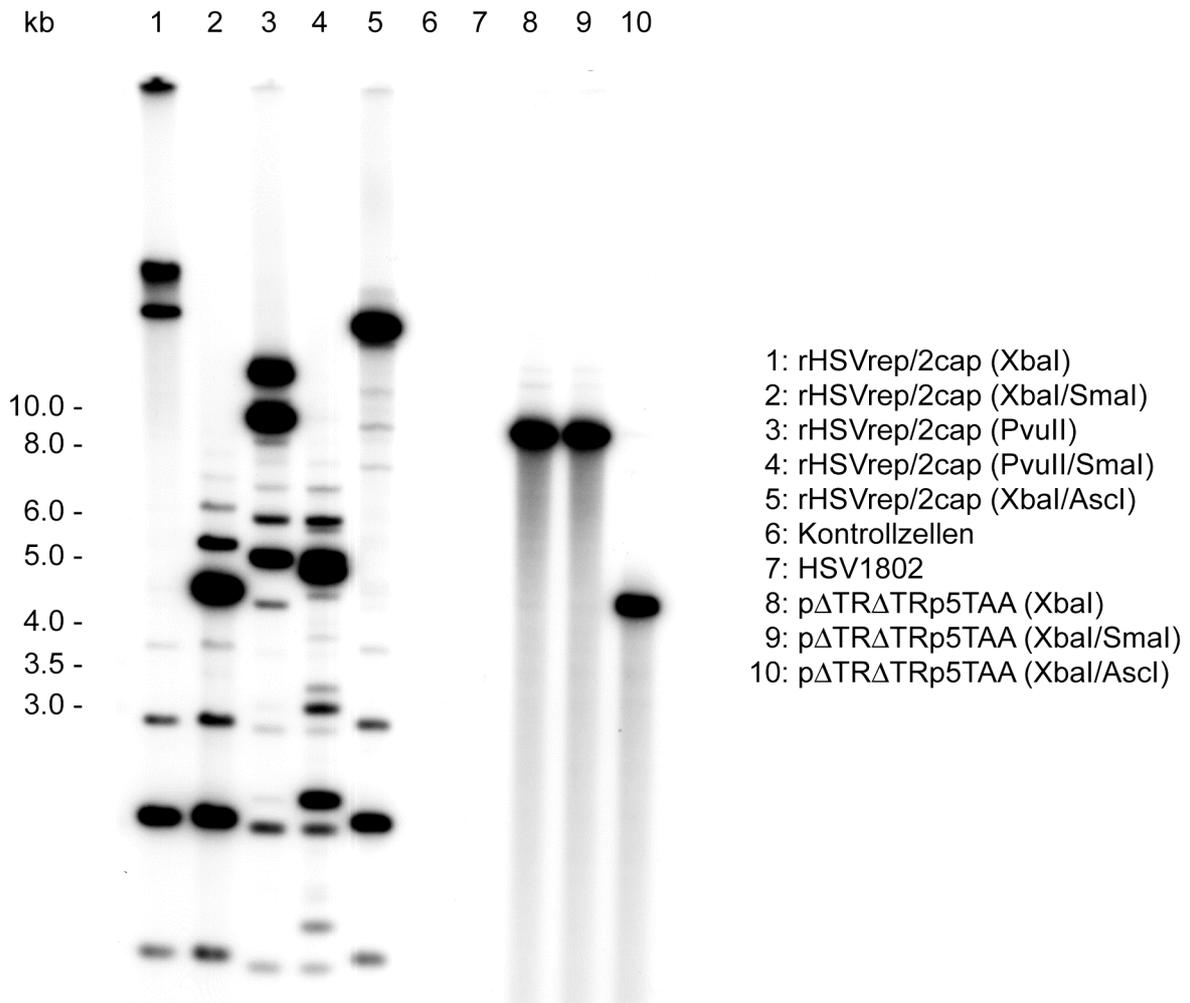


Abbildung 3.9: *Southernblot* Analyse von Gesamt-DNA aus BHK-Zellen, die mit rHSVrep/2cap infiziert bzw. mit pΔTRΔTRp5TAA transfiziert wurden. Die isolierte DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und die Fragmente mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gegen *cap* nachgewiesen. Da die *rep/cap*-Sequenzen in rHSVrep/2cap von XbaI-Schnittstellen flankiert werden, sollte in den Spuren 1 und 2 genauso wie in den Spuren 8 und 9 ein 8,6 kb großes Fragment zu sehen sein. Zwischen den beiden *rep/cap*-Kopien befindet sich eine Ascl-Schnittstelle. In Spur 5 wären daher wie in Spur 10 zwei 4,3 kb große Fragmente zu erwarten gewesen. Die in den Spuren 3 und 4 gezeigten Verdauansätze hätten bei intakten *rep/cap*-Sequenzen Aufschluss über deren Orientierung im HSV-Genom gegeben.

Das Virus rHSVrep/2cap bildet somit keine Rep-Proteine, zeigt aber eine Cap-Expression, die 48 Stunden nach Infektion fast so stark ist wie bei der Standardmethode (siehe Abbildung 3.8). Dies stützt die Hypothese, dass Rep78/68 eine effiziente Replikation der rekombinanten Herpesviren behindert. Demnach müsste rHSVrep/2cap sich sehr gut replizieren können, so dass viele Kopien der *rep*- und *cap*-Gene entstehen. Dies würde die starke Cap-Expression von rHSVrep/2cap erklären.

3.3.4 Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus mit einer vollständigen und einer verkürzten Kopie der AAV-Gene

Bei der Herstellung von rHSVrep/2cap war es zu Rekombinationsereignissen gekommen. Durch Bindung von Rep78/68 an die p5-Promotoren der beiden *rep/cap*-Kopien und gleichzeitiger Rep-Rep-Interaktion könnten die homologen AAV-Sequenzen in räumliche Nachbarschaft gebracht worden sein. Möglicherweise wurde auf diesem Weg die Rekombination vermittelt. Um dies zu verhindern, wurde ein Plasmid konstruiert, das neben den vollständigen *rep/cap*-Sequenzen eine weitere Kopie der AAV-Gene ohne p5-Promotor besitzt (p Δ TR Δ TR Δ p5, siehe 2.26). Analog zur Herstellung von rHSVrep/2cap wurden die beiden *rep/cap*-Kopien in XbaI-geschnittene HSV1802-DNA ligiert. Einzelne Plaques des neuen Virus wurden expandiert und im Westernblot auf die Expression von Rep und Cap getestet (Daten nicht gezeigt). Hierbei konnten nur Cap-positive Plaques, aber keine Rep-positiven Plaques gefunden werden, so dass davon auszugehen ist, dass es auch in diesem Fall zu Rekombinationsereignissen gekommen ist.

3.4 Untersuchung des Einflusses von Rep78/68 auf die HSV-DNA-Replikation

Da die zuvor beschriebenen Experimente darauf hindeuten, dass die großen Rep-Proteine die Replikation der rekombinanten Herpesviren behindern, sollte der Einfluss der großen Rep-Proteine auf die HSV-DNA-Replikation untersucht werden. Das Plasmid pH10 besitzt einen HSV-Replikationsursprung (oriS) und eine einzelne XbaI-Schnittstelle. Transfiziert man dieses Plasmid in Zellen und infiziert anschließend mit HSV, so wird pH10 parallel zur HSV-DNA repliziert. Dabei entstehen vielfache Kopien des Plasmids in konkatermerer Anordnung, die mit XbaI auseinander geschnitten werden können. Die Menge an entstehenden pH10-Kopien ist ein Maß für die Effizienz der HSV-Replikation (Heilbronn *et al.*, 1990). Um zu überprüfen, ob die großen Rep-Proteine die Replikation von pH10 behindern, wurden BHK-Zellen mit pH10 sowie mit steigenden Mengen an p Δ TRp19GGGcapTAA (Rep78/68) transfiziert und anschließend mit HSV1802 infiziert. Zwei Tage nach Transfektion und Infektion wurde aus den Zellen Gesamt-DNA isoliert, die DNA-Proben mit DpnI und XbaI verdaut und in einem Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden auf Nylon geblottet und mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gegen den HSV-Replikationsursprung (oriS) hybridisiert. Abbildung 3.10 zeigt, dass die Menge an entstandenen pH10-Kopien in Gegenwart von Rep78/68 deutlich abnimmt. Eine Quantifizierung der Banden ergab einen Rückgang um den Faktor 2 bei Transfektion von 1 μ g p Δ TRp19GGGcapTAA (Spur 6) bzw. um den Faktor 5 bei Transfektion von 2 μ g dieses Plasmids (Spur 7). Die eingesetzte Sonde hybridisiert auch mit den Replikationsursprüngen in HSV1802. Daher lässt sich die Hemmung der HSV-Replikation durch Rep78/68 auch direkt an der Virus-DNA erkennen. Die Quantifizierung ergab eine Abnahme der HSV-DNA-Menge um den Faktor 3 bzw. 14 in Gegenwart von 1 bzw. 2 μ g p Δ TRp19GGGcapTAA. Die in Abbildung 3.10 zu erkennende Heterogenität der HSV-Banden ist darauf zurückzuführen, dass die U_S- und die U_L-Region in unterschiedlichen Orientierungen zueinander angeordnet sein können (siehe 1.2.1).

Ergebnisse

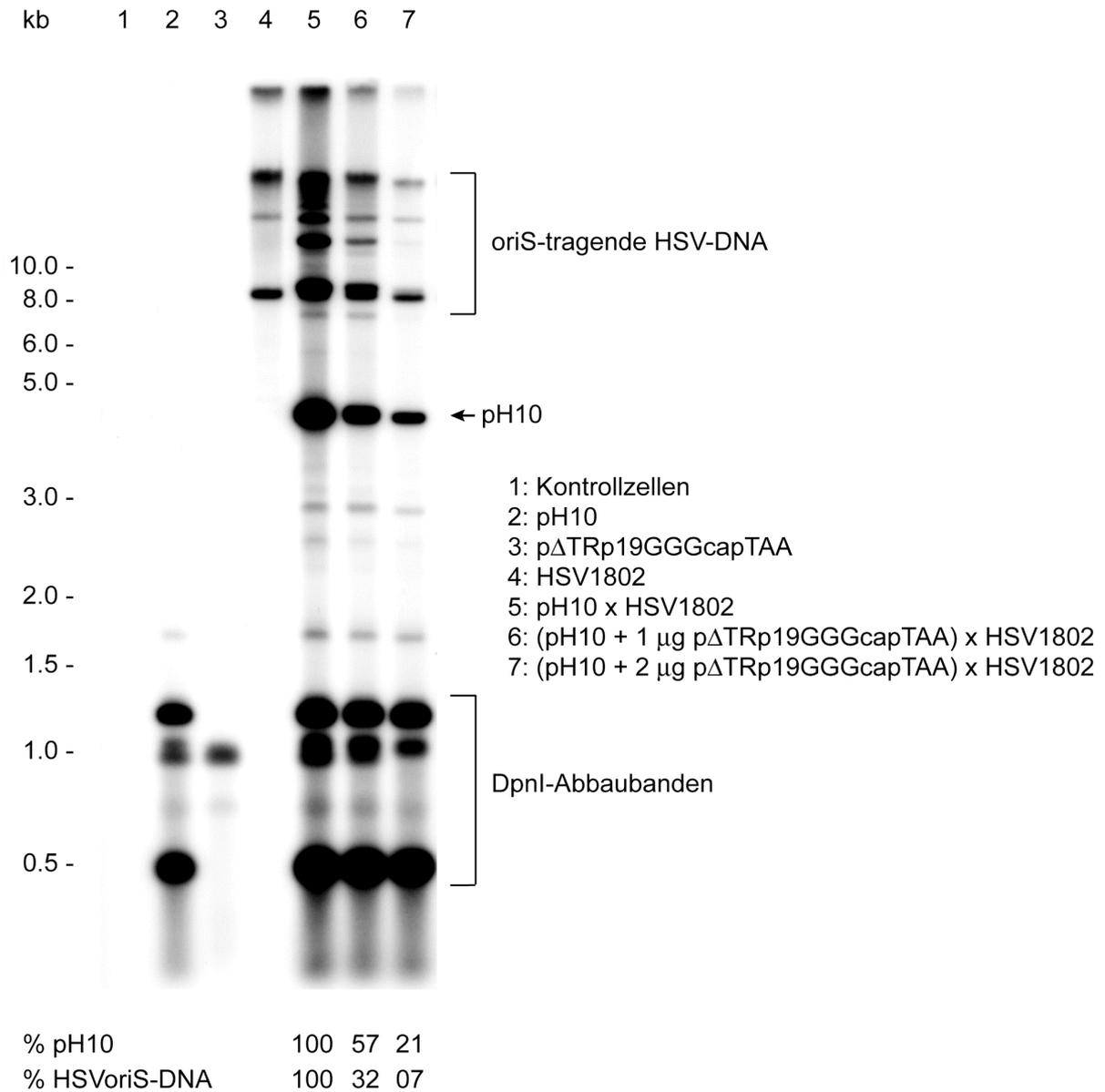


Abbildung 3.10: *Southernblot* Analyse von *Xba*I- und *Dpn*I-verdauter Gesamt-DNA aus BHK-Zellen, die mit pH10 sowie mit steigenden Mengen an pΔTRp19GGGcapTAA (Rep78/68) transfiziert und anschließend mit HSV1802 infiziert wurden. Aufgefüllt wurden die Ansätze mit dem Konstrukt pΔTRp5TAAp19GGGcapTAA, so dass jeweils gleiche DNA-Mengen transfiziert wurden. Als Sonde wurde ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment gegen den HSV-Replikationsursprung (oriS) eingesetzt. Der Pfeil zeigt die Position der entstandenen pH10-Kopien an. Unter der Abbildung sind die bei der Quantifizierung der pH10-Kopien bzw. der oriS-tragenden HSV-DNA erhaltenen Werte in Prozent angegeben.

3.5 Untersuchung des Einflusses der HSV-DNA-Replikation auf die Ausbeute an rekombinalem AAV

In 3.2.4 konnte gezeigt werden, dass die mit rHSVrep/cap erzielte rAAV-Ausbeute durch zusätzliches Rep78/68 weiter reduziert wird. Diese Beobachtung wurde damit erklärt, dass Rep78/68 die DNA-Replikation von rHSVrep/cap behindert, was dazu führt, dass weniger Kopien der AAV-Gene und somit weniger Rep52/40 und Cap-Proteine entstehen. Dass Rep78/68 in der Lage ist, HSV in seiner Replikation zu behindern, ist in 3.4 gezeigt. Um deutlich zu machen, dass die durch Rep78/68 verminderte rAAV-Ausbeute auf die Hemmung der DNA-Replikation von rHSVrep/cap zurückzuführen ist, und nicht auf einer anderen Funktion von Rep78/68 beruht, sollte die DNA-Replikation dieses Virus auf einem von Rep78/68 unabhängigen Weg blockiert werden. Hierzu wurde eine transdominant negative Variante des HSV *origin binding proteins*, UL9-C535C, verwendet, die nur die C-terminalen Aminosäuren 535 bis 851 des Proteins umfasst. UL9-C535C bindet wie das Wildtyp *origin binding protein* spezifisch an die HSV-Replikationsursprünge. Im Gegensatz zu dem Wildtyp-Protein ist UL9-C535C aber nicht in der Lage, mit den anderen für die DNA-Replikation notwendigen HSV-Proteinen zu interagieren, so dass die Ausbildung eines produktiven Replikationskomplexes verhindert wird (Stow *et al.*, 1993; Malik *and* Weller, 1996). Um zu überprüfen, ob die mit rHSVrep/cap erzielte Ausbeute an rekombinalem AAV durch UL9-C535C abgesenkt wird, wurden BHK-Zellen mit pTR-UF5 und dem leeren Expressionsvektor pKEX-XL bzw. mit pTR-UF5 und pKEXUL9-C535C (siehe 2.26) transfiziert und anschließend mit rHSVrep/cap infiziert. Außerdem wurden BHK-Zellen mit pTR-UF5, p Δ TR und pKEX-XL bzw. pKEXUL9-C535C transfiziert und anschließend mit HSV1802 infiziert. Zwei Tage später wurde das entstandene rekombinante AAV geerntet und titriert:

1) (pTR-UF5 + pKEX-XL)	x rHSVrep/cap	→ 0,5 IP/Zelle
2) (pTR-UF5 + pKEXUL9-C535C)	x rHSVrep/cap	→ 0,1 IP/Zelle
3) (pTR-UF5 + p Δ TR + pKEX-XL)	x HSV1802	→ 100 IP/Zelle
4) (pTR-UF5 + p Δ TR + pKEXUL9-C535C)	x HSV1802	→ 100 IP/Zelle

Der Versuch ergab, dass die Menge an rekombinalem AAV, die mit rHSVrep/cap produziert wird, in Gegenwart der transdominant negativen Variante des *origin binding proteins*, UL9-C535C, weiter abnimmt (1 bzw. 2). Die Hemmung der DNA-Replikation von rHSVrep/cap führt somit zur weiteren Reduktion der mit diesem Virus erzielten rAAV-Ausbeute. Die mit der Standardmethode produzierte rAAV-Menge wird durch UL9-C535C dagegen nicht beeinflusst (3 bzw. 4). Dies lässt sich damit erklären, dass die Anzahl der *rep/cap*-Kopien und damit die Menge an entstehenden Rep- und Cap-Proteinen in diesem Fall nicht an die

DNA-Replikation von HSV gekoppelt ist. Genauso wenig wird die mit der Standardmethode erzielte rAAV-Ausbeute durch zusätzlich exprimiertes Rep78/68 reduziert. Für dieses Experiment wurden BHK-Zellen mit pTR-UF5, p Δ TR und p Δ TRp5TAAp19GGGcapTAA (-) bzw. p Δ TRp19GGGcapTAA (Rep78/68) transfiziert und anschließend mit HSV1802 infiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen geerntet und die Menge an rekombinantem AAV bestimmt:

- 5) [pTR-UF5 + p Δ TR + p Δ TRp5TAAp19GGGcapTAA (-)] x HSV1802 → 100 IP/Zelle
- 6) [pTR-UF5 + p Δ TR + p Δ TRp19GGGcapTAA (Rep78/68)] x HSV1802 → 100 IP/Zelle

Mit beiden Ansätzen wurde die gleiche Menge an rekombinantem AAV produziert.

3.6 Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus mit reduzierter Rep78/68-Expression durch Einführung eines alternativen Startcodons

3.6.1 Klonierung von p Δ TRrepACG

In Versuch 3.4 konnte gezeigt werden, dass Rep78/68 die Replikation von HSV behindert. Daher sollte ein neues rekombinantes Herpesvirus mit reduzierter Expression von Rep78/68 hergestellt werden. Ein solches Virus sollte sich besser replizieren können als rHSVrep/cap und somit auch mehr Rep52/40 und Cap bilden. In dem Plasmid p Δ TR wurde das Startcodon der großen Rep-Proteine von ATG zu ACG umgewandelt, wobei das Konstrukt p Δ TRrepACG entstand (siehe 2.26). Die eingeführte Mutation wurde durch eine Sequenzierung überprüft. Später wurden die *rep*- und *cap*-Gene in p Δ TRrepACG vollständig sequenziert. Eine solche Mutation wurde in der Literatur bereits für ein Konstrukt beschrieben, das bei dem herkömmlichen Verfahren zur Produktion von rekombinantem AAV (siehe 1.3.2) als Helferplasmid eingesetzt wird (Li *et al.*, 1997). Nach Li *et al.* führt die Umwandlung des Start-ATGs der großen Rep-Proteine in ACG zu einer reduzierten Expression von Rep78/68. Dies soll eine erhöhte Expression der Cap-Proteine zur Folge haben, so dass mit einem Helferplasmid, das diese Mutation trägt, eine bessere Ausbeute an rekombinantem AAV erzielt werden soll. Die in Li *et al.* beschriebenen Versuche wurden in 293-Zellen und mit Adenovirus als Helfer durchgeführt.

3.6.2 Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von p Δ TRrepACG

Zur Untersuchung der Rep- und Cap-Expression des ACG-Konstruktes wurden BHK-Zellen mit p Δ TR bzw. p Δ TRrepACG transfiziert und mit HSV1802 infiziert. 24 Stunden später wurde aus den Zellen Proteinextrakt hergestellt und ein *Westernblot* durchgeführt. Abbildung 3.11 zeigt, dass die großen Rep-Proteine, die von p Δ TRrepACG gebildet werden, etwas schneller laufen als das von dem Ausgangskonstrukt p Δ TR exprimierte Rep78/68. Offensichtlich ist das ACG in p Δ TRrepACG ein so schwaches Signal, dass hauptsächlich das nächstgelegene AUG als Translationsstart benutzt wird. Die entstehenden großen Rep-Proteine sind demnach um 42 Aminosäuren verkürzt und nicht mehr funktionell (siehe auch Abschnitt 3.8). Der Anteil an Volllänge-Rep78/68 ist so gering, dass er im *Westernblot* kaum detektiert werden kann. Dieses Bild ergab sich in BHK- und in 293-Zellen, sowohl mit HSV als auch mit Adenovirus als Helfer. Die verkürzten großen Rep-Proteine sind bei genauer Betrachtung auch in Li *et al.* zu erkennen. In Abbildung 3.11 sieht man, dass nicht nur die Rep78/68-

Menge, sondern auch die Cap-Expression von p Δ TRrepACG gegenüber dem Ausgangskonstrukt p Δ TR deutlich reduziert ist. Dies lässt sich damit erklären, dass der p40-Promotor in p Δ TRrepACG aufgrund der geringen Rep78/68-Mengen weniger stark aktiviert wird. Dementsprechend führt eine zusätzliche Transfektion des Rep78/68-exprimierenden Plasmids p Δ TRp19GGGcapTAA zu einem Anstieg der Cap-Expression auf normale Level (siehe Abbildung 3.11). Auch dieser Versuch wurde in BHK- und in 293-Zellen, sowohl mit HSV als auch mit Adenovirus als Helfer durchgeführt. Eine reduzierte Expression der großen Rep-Proteine führt somit nicht zwangsläufig zu einem Anstieg der Cap-Expression. Diese Beobachtung ist auch in Grimm *et al.* beschrieben (Grimm *et al.*, 1998).

- 1: Kontrollzellen
- 2: 1 μ g p Δ TR x HSV1802
- 3: 1 μ g p Δ TRrepACG x HSV1802
- 4: (1 μ g p Δ TRrepACG + 0,25 μ g p Δ TRp19GGGcapTAA) x HSV1802
- 5: (1 μ g p Δ TRrepACG + 0,5 μ g p Δ TRp19GGGcapTAA) x HSV1802
- 6: (1 μ g p Δ TRrepACG + 1 μ g p Δ TRp19GGGcapTAA) x HSV1802

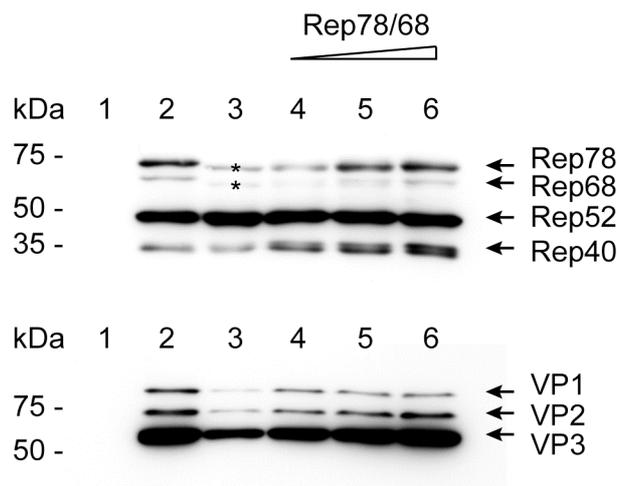


Abbildung 3.11: *Westernblot* Analyse von BHK-Zellen, die mit p Δ TR, p Δ TRrepACG bzw. p Δ TRrepACG und steigenden Mengen an p Δ TRp19GGGcapTAA transfiziert und mit HSV1802 infiziert wurden. Aufgefüllt wurden die Ansätze mit dem Konstrukt p Δ TRp5TAAp19GGGcapTAA, so dass jeweils gleiche DNA-Mengen transfiziert wurden. Rep und Cap wurden durch die Antikörper 303.9 (oberer Blot) bzw. B1 (unterer Blot) erkannt und mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen. Die verkürzten großen Rep-Proteine sind mit einem Stern markiert.

3.6.3 Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSVrepACG/cap

Parallel zu den Untersuchungen mit dem Plasmid p Δ TRrepACG wurde das rekombinante Herpesvirus rHSVrepACG/cap hergestellt, das die beschriebene Mutation des Rep78/68-Startcodons trägt. Hierzu wurden die *rep/cap*-Sequenzen aus dem Plasmid p Δ TRrepACG

Stunden später wurde aus den Zellen Proteinextrakt hergestellt und ein *Westernblot* durchgeführt. Wie schon in Abbildung 3.12 gezeigt, sieht man in Abbildung 3.13, dass rHSVrepACG/cap sehr viel mehr Cap exprimiert als rHSVrep/cap. Bei zusätzlicher Transfektion von steigenden Mengen eines Rep78/68-exprimierenden Plasmids geht die Cap-Expression von rHSVrepACG/cap zurück. rHSVrep/cap und rHSVrepACG/cap verhalten sich bezüglich ihrer Cap-Expression genau entgegengesetzt zu den Plasmiden p Δ TR und p Δ TRrepACG. Dies lässt sich damit erklären, dass Rep78/68 die Replikation der rekombinanten Herpesviren behindert. rHSVrepACG/cap exprimiert sehr wenig Rep78/68 und kann sich daher relativ gut replizieren. Aus diesem Grund entstehen viele Kopien der AAV-Gene, was die hohe Cap-Expression dieses Virus erklärt. Wird zusätzlich ein Rep78/68-exprimierendes Plasmid transfiziert, wird rHSVrepACG/cap in seiner Replikation behindert, so dass weniger Cap gebildet wird. Bei Transfektion der Plasmide p Δ TR und p Δ TRrepACG liegen dagegen von Anfang an sehr viele Kopien der *rep*- und *cap*-Gene vor. In diesem Fall kann sich die unterschiedlich starke Aktivierung des p40-Promotors durch Rep78/68 bemerkbar machen, während bei den Viren die replikationshemmende Wirkung der großen Rep-Proteine diesen Effekt überwiegt.

- 1: rHSVrep/cap
- 2: rHSVrepACG/cap
- 3: rHSVrepACG/cap + 0,5 μ g p Δ TRp19GGGcapTAA
- 4: rHSVrepACG/cap + 1 μ g p Δ TRp19GGGcapTAA
- 5: rHSVrepACG/cap + 2 μ g p Δ TRp19GGGcapTAA

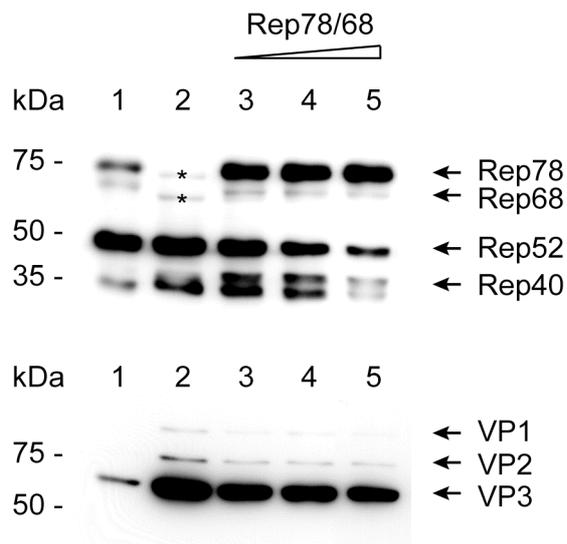


Abbildung 3.13: *Westernblot* Analyse von BHK-Zellen, die mit rHSVrep/cap bzw. rHSVrepACG/cap infiziert wurden. Alternativ wurden BHK-Zellen mit steigenden Mengen an p Δ TRp19GGGcapTAA transfiziert und mit rHSVrepACG/cap infiziert. Aufgefüllt wurden die Ansätze mit dem Konstrukt p Δ TRp5TAAp19GGGcapTAA, so dass jeweils gleiche DNA-Mengen transfiziert wurden. Rep und Cap wurden durch die Antikörper 303.9 (oberer Blot)

bzw. B1 (unterer Blot) erkannt und mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen. Die verkürzten großen Rep-Proteine sind mit einem Stern markiert.

3.6.4 Untersuchung der rAAV-DNA-Replikation bei Verwendung von p Δ TRrepACG und rHSVrepACG/cap

Um zu untersuchen, wie sich die Mutation des Startcodons der großen Rep-Proteine auf die Replikation von rAAV-DNA auswirkt, wurden BHK-Zellen mit pTR-UF5 und p Δ TR bzw. p Δ TRrepACG transfiziert und mit HSV1802 infiziert. Außerdem wurden BHK-Zellen mit pTR-UF5 transfiziert und anschließend mit rHSVrep/cap bzw. rHSVrepACG/cap infiziert. 24 Stunden später wurde aus den Zellen niedermolekulare DNA nach der Methode von Hirt extrahiert, die Extrakte mit DpnI verdaut und ein *Southernblot* durchgeführt. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gegen *egfp* konnte hierbei rAAV-DNA nachgewiesen werden. Abbildung 3.14 zeigt, dass rAAV-DNA bei Verwendung von p Δ TRrepACG (Spur 3) und rHSVrepACG/cap (Spur 5) sehr viel schlechter repliziert wird als mit p Δ TR (Spur 2) bzw. rHSVrep/cap (Spur 4). Eine Quantifizierung der DNA-Banden im Phosphoimager ergab Unterschiede um den Faktor 4 bzw. 5. Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, dass p Δ TRrepACG und rHSVrep/cap nur minimale Mengen an funktionellem Rep78/68 exprimieren.

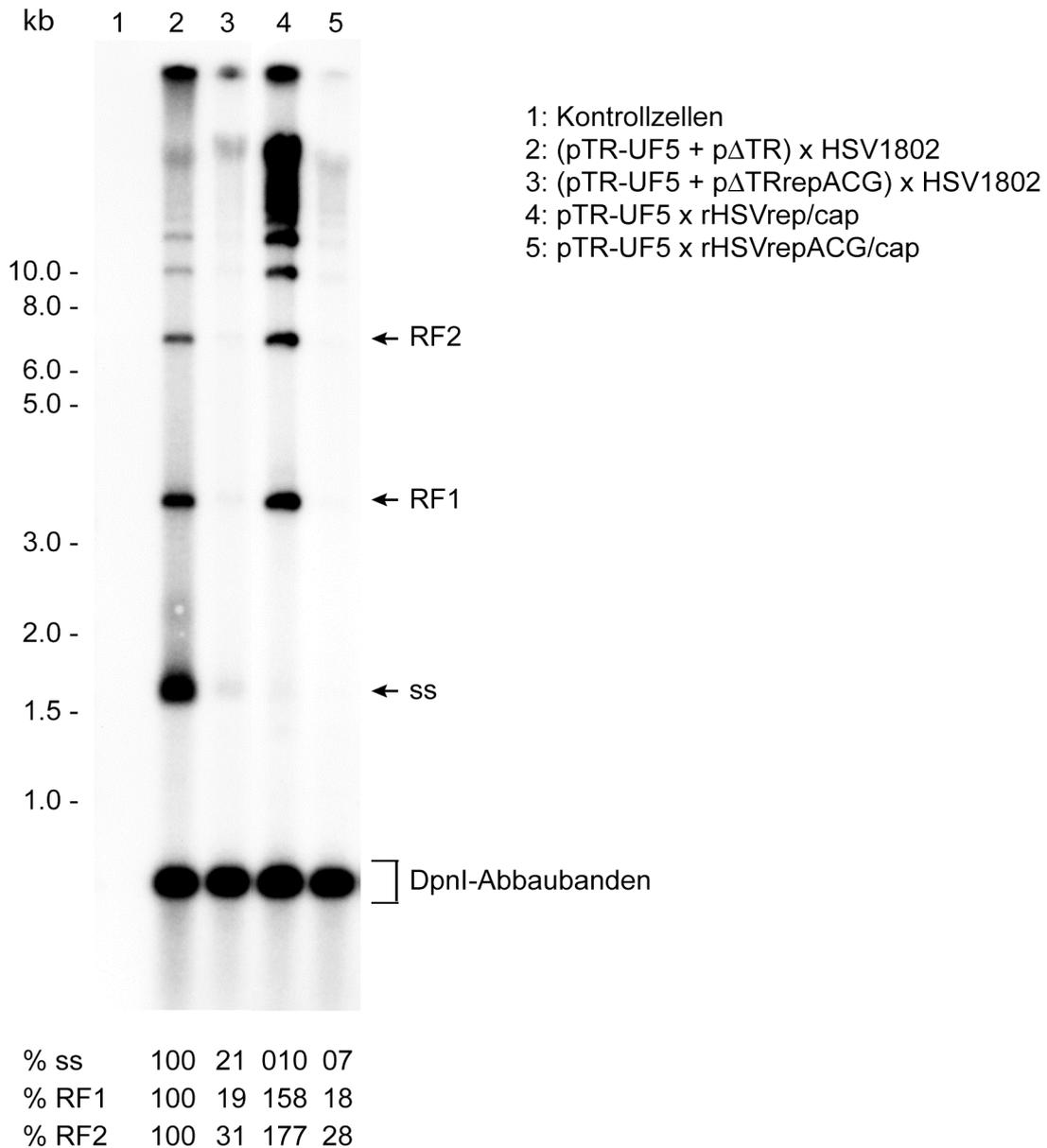


Abbildung 3.14: *Southernblot* Analyse von DpnI-verdauten Hirt-Extrakten aus BHK-Zellen, die 24 Stunden zuvor mit pTR-UF5 und pΔTR bzw. pΔTRrepACG transfiziert und mit HSV1802 infiziert wurden. Außerdem wurden BHK-Zellen mit pTR-UF5 transfiziert und anschließend mit rHSVrep/cap bzw. rHSVrepACG/cap infiziert. Als Sonde wurde ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment gegen *egfp* eingesetzt. Die Pfeile zeigen die Position des einzelsträngigen rAAV-Genoms (ss) sowie der monomeren (RF1) und dimeren (RF2) Replikationsform an. Unter der Abbildung sind die bei der Quantifizierung der verschiedenen rAAV-Replikationsformen erhaltenen Werte in Prozent angegeben.

Für die Plasmide pΔTR und pΔTRrepACG wurde der gleiche Versuch auch in 293-Zellen und mit Adenovirus als Helfer durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Auch hier zeigte sich, dass sich die Mutation des Rep78/68-Startcodons negativ auf die rAAV-DNA-Replikation auswirkt. Der Unterschied zwischen pΔTR und pΔTRrepACG ist mit Adenovirus als Helfer allerdings nicht so stark ausgeprägt wie mit HSV. Dies liegt vermutlich an den unterschiedlich langen

Replikationszyklen der beiden Viren. Die rAAV-DNA-Replikation kann erst starten, wenn eine bestimmte Konzentration an großen Rep-Proteinen erreicht ist. Da p Δ TRrepACG nur minimale Mengen an Volllänge-Rep78/68 bildet, setzt die Replikation verzögert ein, wenn dieses Konstrukt als Helferplasmid verwendet wird. HSV hat einen sehr schnellen Replikationszyklus, so dass für die Vermehrung von rekombinantem AAV nur wenig Zeit zur Verfügung steht. Möglicherweise ist dieser zeitliche Rahmen bei Verwendung von p Δ TRrepACG nicht ausreichend, um genügend rAAV-DNA zu bilden. Adenoviren haben dagegen einen langsameren Replikationszyklus, so dass sich ein verzögerter Start der rAAV-DNA-Replikation demnach nicht so stark bemerkbar macht.

3.6.5 Produktion von rekombinantem AAV mit p Δ TRrepACG und rHSVrepACG/cap

Um zu überprüfen, wie viel rekombinantes AAV mit p Δ TRrepACG bzw. rHSVrepACG/cap produziert wird, wurden BHK-Zellen wie im vorhergehenden Versuch transfiziert und infiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen geerntet und die Menge an rekombinantem AAV bestimmt:

1) (pTR-UF5 + p Δ TR)	x HSV1802	→	100 IP/Zelle
2) (pTR-UF5 + p Δ TRrepACG)	x HSV1802	→	5 IP/Zelle
3) pTR-UF5	x rHSVrep/cap	→	0,5 IP/Zelle
4) pTR-UF5	x rHSVrepACG/cap	→	0,5 IP/Zelle

Der Versuch ergab, dass mit p Δ TRrepACG als Helferplasmid (2) sehr viel weniger rekombinantes AAV gebildet wird als mit p Δ TR (1). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die rAAV-DNA-Replikation bei Verwendung von p Δ TRrepACG sehr viel ineffizienter ist als bei Verwendung von p Δ TR (siehe Abbildung 3.14). Außerdem exprimiert p Δ TRrepACG vermutlich auch nicht genügend Capsid-Proteine für die Verpackung der rAAV-DNA. Die Ausbeute an rekombinantem AAV, die mit rHSVrepACG/cap erzielt wird (4), entspricht dagegen der rAAV-Menge, die mit rHSVrep/cap produziert wird (3). Mit beiden Viren wird somit das gleiche Ergebnis erzielt, allerdings aus entgegengesetzten Gründen: rHSVrep/cap exprimiert zu viel Rep78/68, was die Replikation dieses Virus behindert. Dadurch werden nur wenige Kopien der AAV-Gene gebildet, so dass zu wenig Rep52/40- und Cap-Proteine entstehen. rAAV-DNA wird in diesem System zwar effizient repliziert, kann aber nicht verpackt werden, da nicht genügend Rep52/40 und Cap zur Verfügung stehen. rHSVrepACG/cap exprimiert dagegen so wenig Volllänge-Rep78/68, dass diese Proteine im *Westernblot* kaum detektiert werden können. rHSVrepACG/cap kann sich dadurch zwar

besser replizieren als rHSVrep/cap und bildet somit auch mehr Rep52/40- und Cap-Proteine. Die Menge an funktionellem Rep78/68 ist aber so gering, dass die Replikation der rAAV-DNA nicht effizient ablaufen kann.

Auch dieser Versuch wurde für p Δ TR und p Δ TRrepACG zusätzlich in 293-Zellen und mit Adenovirus als Helfer durchgeführt. Entsprechend zu den Beobachtungen, die bei der Untersuchung der rAAV-DNA-Replikation gemacht wurden, zeigte sich, dass mit p Δ TRrepACG als Helferplasmid eine schlechtere Ausbeute an rekombinantem AAV erzielt wird als mit p Δ TR. Dieser Unterschied ist aber wieder nicht so deutlich wie mit HSV als Helfer. So bewirkt die Mutation des Rep78/68-Startcodons eine Abnahme an produziertem AAV um den Faktor 5, wenn Adenovirus als Helfer eingesetzt wird, während bei HSV als Helfer ein Rückgang um den Faktor 20 beobachtet wurde. Dies lässt sich vermutlich wieder damit erklären, dass Adenoviren einen langsameren Replikationszyklus haben als HSV, so dass auch bei Verwendung von p Δ TRrepACG als Helferplasmid noch ausreichend Zeit für die rAAV-Produktion zur Verfügung steht.

3.6.6 Untersuchung der DNA-Replikation von rHSVrep/cap und rHSVrepACG/cap

Bei Verwendung der rekombinanten Herpesviren rHSVrep/cap und rHSVrepACG/cap ist die Kopienzahl der AAV-Gene und somit die Menge an entstehenden AAV-Proteinen direkt an die DNA-Replikation der rekombinanten Herpesviren gekoppelt. Da die großen Rep-Proteine die HSV-DNA-Replikation hemmen, sollte sich rHSVrep/cap, das viel Rep78/68 exprimiert, schlechter replizieren können als rHSVrepACG/cap, das nur minimale Mengen an funktionellem Rep78/68 bildet. Um zu zeigen, dass bei der Replikation von rHSVrepACG/cap mehr Kopien der AAV-Gene entstehen als bei der Replikation von rHSVrep/cap, wurden BHK-Zellen mit rHSVrep/cap bzw. rHSVrepACG/cap infiziert. Nach 1 Stunde und 16 Stunden, also zu Beginn und gegen Ende des HSV-Replikationszyklus, wurde aus den Zellen Gesamt-DNA isoliert. Die DNA-Proben wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, in einem Agarosegel aufgetrennt, auf Nylon geblottet und mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gegen *cap* hybridisiert. In Abbildung 3.15 sieht man, dass rHSVrepACG/cap sich sehr viel besser replizieren kann als rHSVrep/cap. Eine Quantifizierung der DNA-Banden im Phosphoimager ergab, dass im Fall von rHSVrepACG/cap 16 Stunden nach Infektion 91-mal so viele Kopien der AAV-Gene vorliegen wie 1 Stunde nach Infektion. Bei rHSVrep/cap erhöht sich die Kopienzahl der AAV-Gene in diesem Zeitraum dagegen nur um den Faktor 23.

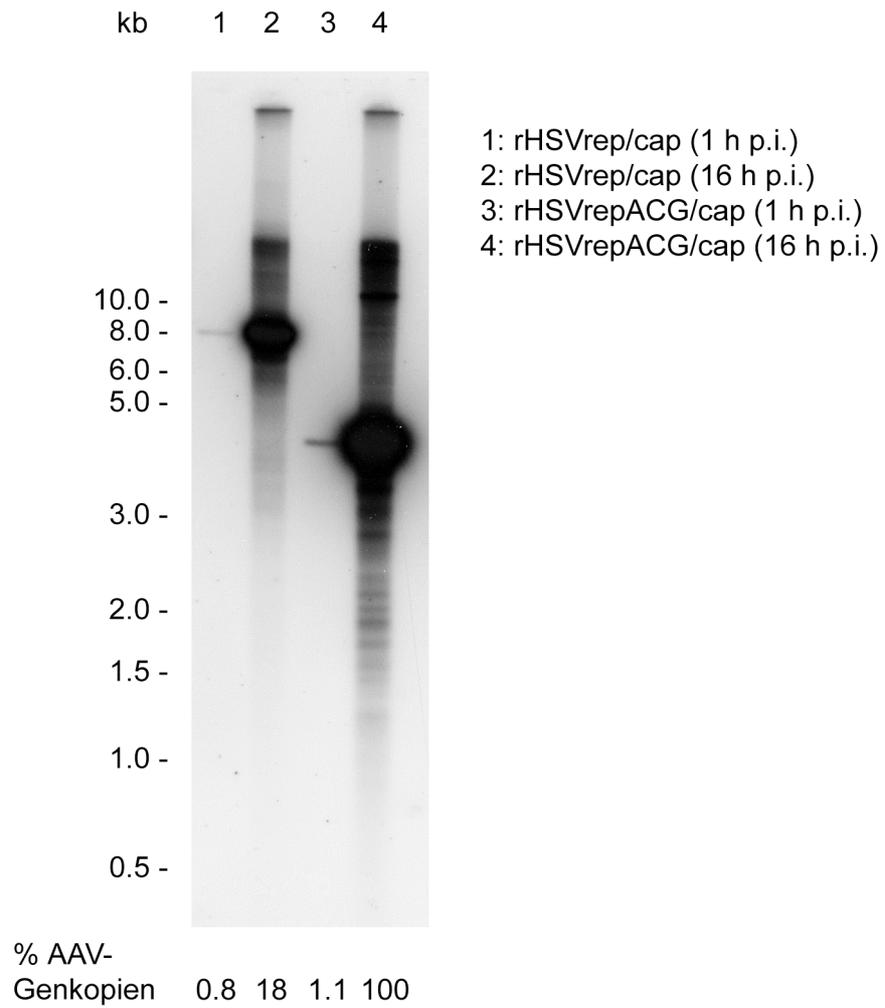


Abbildung 3.15: *Southernblot* Analyse von *Xba*I- und *Sma*I-verdauter Gesamt-DNA aus BHK-Zellen, die mit rHSVrep/cap bzw. rHSVrepACG/cap infiziert wurden. Als Sonde wurde ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment gegen *cap* eingesetzt. Unter der Abbildung sind die bei der Quantifizierung der AAV-Genkopien erhaltenen Werte in Prozent angegeben.

3.7 Reduzierung der Rep78/68-Expression durch Austausch des p5-Promotors gegen einen MMTV-Promotor

Als weitere Möglichkeit, die Expression der großen Rep-Proteine herunterzuregulieren, sollte der p5-Promotor von rHSVrep/cap gegen einen schwächeren Promotor ausgetauscht werden. Hierzu wurde zunächst das Plasmid pMMTVrep/cap hergestellt, das die AAV-Gene *rep* und *cap* trägt. Rep78/68 steht in pMMTVrep/cap unter transkriptioneller Kontrolle des *mouse mammary tumor virus long terminal repeat* (MMTV-LTR)-Promotors (siehe 2.26). Das *Rep Binding Element* im p5-Promotor, das auch die Transkription von den p19- und p40-Promotoren beeinflusst (McCarty *et al.*, 1991), ist in pMMTVrep/cap erhalten. Zur Untersuchung der Rep- und Cap- Expression von pMMTVrep/cap wurden BHK-Zellen mit p Δ TR bzw. pMMTVrep/cap transfiziert und anschließend mit HSV1802 infiziert. 24 Stunden später wurde aus den Zellen Proteinextrakt hergestellt und ein *Westernblot* durchgeführt. Abbildung 3.16 zeigt, dass die Rep78/68-Expression von pMMTVrep/cap im Vergleich zu p Δ TR deutlich reduziert ist. Allerdings ist auch die Cap-Expression von pMMTVrep/cap sehr viel schwächer als bei dem Konstrukt mit p5-Promotor. Durch zusätzliche Transfektion des Rep78/68-exprimierenden Plasmids p Δ TRp19GGGcapTAA kann pMMTVrep/cap nicht komplementiert werden. So kommt es in diesem Fall nur zu einem minimalen Anstieg der Cap-Expression (siehe Abbildung 3.16). Die reduzierte Cap-Expression von pMMTVrep/cap lässt sich daher nicht nur damit erklären, dass weniger Rep78/68 gebildet und somit der p40-Promotor weniger stark aktiviert wird. Vielmehr wurden durch Austausch des p5-Promotors gegen den MMTV-Promotor offenbar Sequenzen entfernt, die auch für die Regulierung des p40-Promotors wichtig sind. Neben dem *Rep Binding Element* scheinen bei der Aktivierung des p40-Promotors noch weitere Elemente innerhalb des p5-Promotors eine Rolle zu spielen. Der Ansatz, den p5-Promotor durch einen schwächeren Promotor auszutauschen, wurde aus diesem Grund nicht weiter verfolgt.

- 1: Kontrollzellen
- 2: 1 μg p ΔTR x HSV1802
- 3: 1 μg pMMTVrep/cap x HSV1802
- 4: (1 μg pMMTVrep/cap + 0,5 μg p $\Delta\text{TRp19GGGcapTAA}$) x HSV1802
- 5: (1 μg pMMTVrep/cap + 1 μg p $\Delta\text{TRp19GGGcapTAA}$) x HSV1802
- 6: (1 μg pMMTVrep/cap + 2 μg p $\Delta\text{TRp19GGGcapTAA}$) x HSV1802

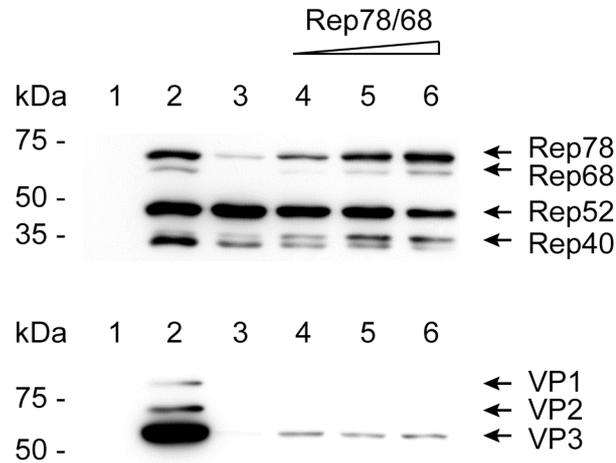


Abbildung 3.16: *Westernblot* Analyse von BHK-Zellen, die mit p ΔTR , pMMTVrep/cap bzw. pMMTVrep/cap und steigenden Mengen an p $\Delta\text{TRp19GGGcapTAA}$ transfiziert und mit HSV1802 infiziert wurden. Aufgefüllt wurden die Ansätze mit dem Konstrukt p $\Delta\text{TRp5TAAp19GGGcapTAA}$, so dass jeweils gleiche DNA-Mengen transfiziert wurden. Rep und Cap wurden durch die Antikörper 303.9 (oberer Blot) bzw. B1 (unterer Blot) erkannt und mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen.

3.8 Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus mit reduzierter Rep78/68-Expression durch Mutation der Kozak-Sequenz

3.8.1 Klonierung der Kozak-Konstrukte p Δ TRK1- p Δ TRK4

Um die transkriptionelle Kontrolle durch die AAV-Promotoren zu erhalten, sollte der p5-Promotor in rHSVrep/cap intakt gelassen werden. Eine Reduzierung der Rep78/68-Expression sollte stattdessen auf Ebene der Translation erfolgen. Gewöhnlich beginnt die Translation an dem AUG, das am nächsten zum 5'-Ende der mRNA liegt. Die Ribosomen lagern sich an das *Cap* am 5'-Ende an und bewegen sich dann schrittweise in 3'-Richtung, bis das erste AUG-Codon gefunden ist (Cigan *et al.*, 1988; Kozak, 1983; Kozak, 1995). Für eine effiziente Erkennung dieses Startcodons ist außerdem die Sequenzumgebung wichtig, in der es liegt. Der optimale Kontext eines Startcodons, die Kozak-Konsensussequenz, lautet **GCC**A**/GCC**a**ug**G**** (Kozak, 1987). Hierbei sind die fett gedruckten Positionen besonders wichtig (Kozak, 1986; Kozak, 1997). Befindet sich das erste AUG in einem starken Kontext, stoppen (fast) alle Ribosomen an dieser Stelle (Kozak, 1986; Kozak, 1997). Liegt das erste AUG dagegen in einem schwachen Umfeld, initiieren nur einige Ribosomen hier, während andere Ribosomen das erste AUG überlesen und ihren Abtastprozess entlang der mRNA fortsetzen (Kozak, 1999; Kozak, 1991). In einigen Fällen kann die Translation auch an einem ACG, CUG oder GUG beginnen. Diese alternativen Startcodons sind normalerweise zu schwach, um ein AUG zu ersetzen (Kozak, 1999). Besonders bei GC-reichen *Leader*-Sequenzen kann die Initiation aber zusätzlich zu einem normalen AUG-Codon an einem weiter 5'-liegenden nicht-AUG-Codon stattfinden (Kozak, 1991). Vermutlich verlangsamt eine starke Sekundärstruktur der *Leader*-Region die Fortbewegung der Ribosomen entlang der mRNA, so dass das nicht-AUG-Codon mehr Zeit hat, sich mit der Met-t-RNA zu paaren. Die Erkennung eines alternativen Startcodons erfordert einen starken Kontext (Portis *et al.*, 1994). Trotzdem stoppen normalerweise nur wenige Ribosomen hier, da das Initiationscodon an sich schwach ist.

In Abschnitt 3.6 war die Umwandlung des Start-AUGs der großen Rep-Proteine in die Sequenz ACG beschrieben worden. Hierbei hatte sich gezeigt, dass dieses alternative Startcodon ein so schwaches Signal ist, dass hauptsächlich das nächstgelegene AUG als Translationsstart benutzt wird. Die Menge an entstehendem Volllänge-Rep78/68 hatte sich als zu gering für eine effiziente Replikation von rAAV-DNA erwiesen. Als weitere Möglichkeit, die Expression von Rep78/68 herabzusetzen, sollte das Startcodon der großen Rep-Proteine in einen schwächeren Kontext gesetzt werden. Die Sequenzumgebung des Rep78/68-Startcodons lautet normalerweise GCCGCCaugC, entspricht also mit Ausnahme des C an

Position +4 der Kozak-Konsensussequenz. Ausgehend von dem Plasmid p Δ TR wurden Konstrukte hergestellt, in denen diese Sequenz folgendermaßen verändert wurde (mutierte Positionen sind fett gedruckt): p Δ TRK1: GCCTCCatgC, p Δ TRK2: GCCT**GT**atgC, p Δ TRK3: **AATTGT**atgC, p Δ TRK4: **AATGGT**atgC (siehe auch 2.26).

3.8.2 Untersuchung der Rep- und Cap-Expression der Kozak-Konstrukte

Um die Rep- und Cap-Expression der hergestellten Konstrukte zu untersuchen, wurden BHK-Zellen mit diesen Plasmiden transfiziert und anschließend mit HSV1802 infiziert. 24 Stunden später wurde aus den Zellen Proteinextrakt hergestellt und ein *Westernblot* durchgeführt. Abbildung 3.17 A zeigt, dass die Rep78/68-Expression der neuen Konstrukte im Vergleich zu dem Ausgangsplasmid p Δ TR zum Teil deutlich reduziert ist. Die Cap-Expression ist dagegen unverändert. Im Gegensatz zu p Δ TRrepACG bilden die Kozak-Konstrukte somit noch so viel Rep78/68, dass die Aktivierung des p40-Promotors nicht abgeschwächt ist. Bei dem Konstrukt p Δ TRK3, bei dem die gesamte Kozak-Konsensussequenz zerstört ist, sind für Rep78/68 jeweils Doppelbanden zu erkennen. Offensichtlich wurde das Initiationssignal durch die Mutation so weit abgeschwächt, dass nur ein Teil der Ribosomen das erste AUG erkennen, während andere Ribosomen dieses Startcodon überlesen und am zweiten AUG initiieren. Um dies deutlicher darzustellen, wurden die Extrakte noch einmal in einem niedriger-prozentigen Gel aufgetrennt (Abbildung 3.17 B). In Abbildung 3.17 B erkennt man auch bei den anderen Kozak-Konstrukten schwach Doppelbanden für Rep78/68. Anders als bei dem Konstrukt p Δ TRrepACG, bei dem hauptsächlich verkürzte große Rep-Proteine entstehen und nur minimale Mengen an Volllänge-Rep78/68 gebildet werden, exprimiert p Δ TRK3 Volllänge-Rep78/68 und verkürzte Proteine zu etwa gleichen Anteilen. Bei p Δ TRK1, p Δ TRK2 und p Δ TRK4 entstehen ganz geringe Mengen an verkürzten Proteinen, der überwiegende Anteil ist Volllänge-Rep78/68. Je schwächer somit das Initiationssignal für die Translation ist, desto weniger Volllänge-Rep78/68 wird zugunsten der verkürzten Proteine gebildet.

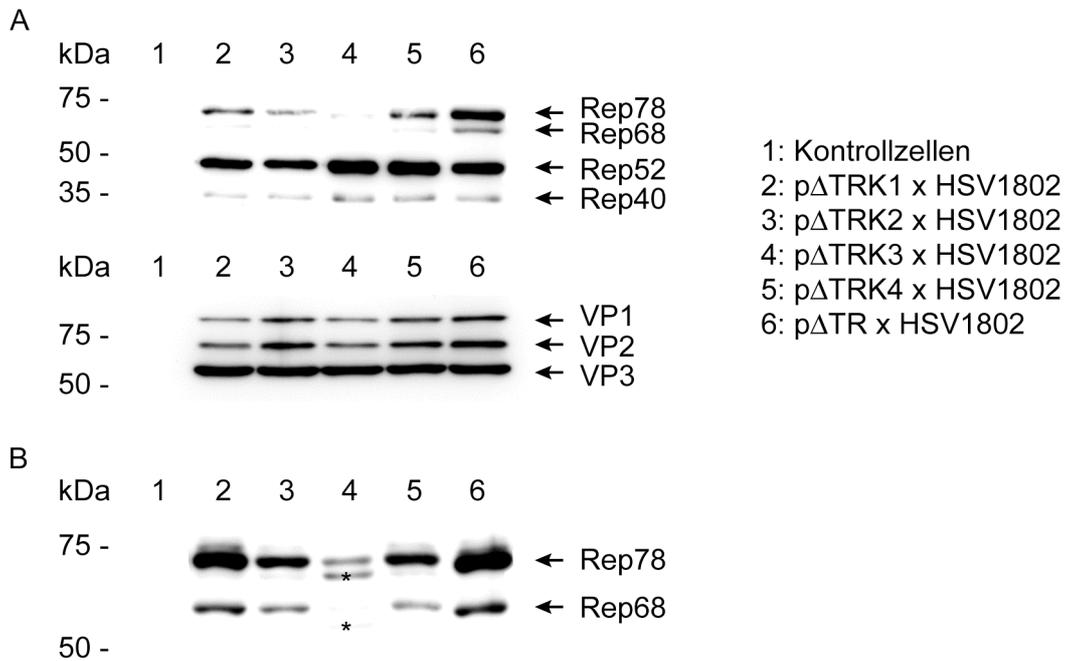


Abbildung 3.17: *Westernblot* Analyse von BHK-Zellen, die mit pΔTRK1 bis pΔTRK4 bzw. mit pΔTR transfiziert und mit HSV1802 infiziert wurden. Rep und Cap wurden durch die Antikörper 303.9 bzw. B1 erkannt und mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen. Abbildung A zeigt 12% Polyacrylamidgele, Abbildung B die gleichen Proben in einem 8% Polyacrylamidgel. Die verkürzten großen Rep-Proteine sind mit einem Stern markiert.

3.8.3 Untersuchung der verkürzten großen Rep-Proteine

Zur Untersuchung der verkürzten großen Rep-Proteine konnte die folgende zufällige Beobachtung genutzt werden. Wird in dem Plasmid pΔTR kurz nach dem Startcodon von Rep78/68 ein Stopp eingeführt (pΔTRrep-42, siehe 2.2.6), werden verkürzte große Rep-Proteine exprimiert. Dies geschieht vermutlich durch Reinitiation der Ribosomen am zweiten AUG-Codon der mRNA. So tritt Reinitiation häufig bei mRNAs auf, die einen kleinen Leserahmen nahe dem 5'-Ende besitzen (Kozak, 2001). Erst bei Einführung eines Stoppcodons nach dem zweiten ATG (pΔTRp5TAA, siehe 2.2.6) werden keine großen Rep-Proteine mehr gebildet. Die verkürzten großen Rep-Proteine sind nicht funktionell. Abbildung 3.18, in der die Rep- und Cap-Expression der beschriebenen Konstrukte zu sehen ist, zeigt, dass die verkürzten großen Rep-Proteine die AAV-Promotoren nicht aktivieren können. So entspricht die Cap-Expression des Konstruktes pΔTRrep-42, das ausschließlich verkürzte große Rep-Proteine exprimiert, der Cap-Expression von pΔTRp5TAA, das keine großen Rep-Proteine bildet.

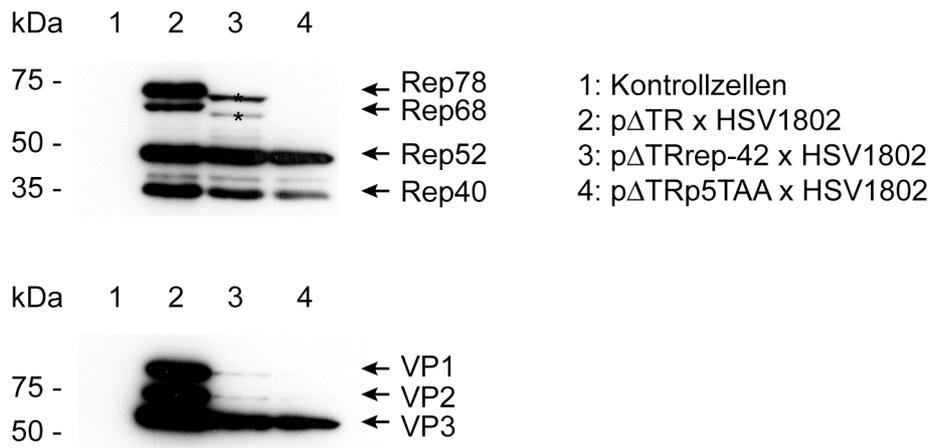


Abbildung 3.18: *Westernblot* Analyse von BHK-Zellen, die mit pΔTR, pΔTRrep-42 bzw. pΔTRp5TAA transfiziert und mit HSV1802 infiziert wurden. Rep und Cap wurden durch die Antikörper 303.9 (oberer Blot) bzw. B1 (unterer Blot) erkannt und mit Hilfe eines Peroxidasegekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen. Die verkürzten großen Rep-Proteine sind mit einem Stern markiert.

Des Weiteren sind die verkürzten großen Rep-Proteine nicht mehr in der Lage, HSV in seiner DNA-Replikation zu hemmen. Um dies deutlich zu machen, wurden BHK-Zellen mit dem HSV oriS tragenden Plasmid pH10 sowie mit steigenden Mengen an pΔTR bzw. pΔTRrep-42 transfiziert und anschließend mit HSV1802 infiziert. Zwei Tage nach Transfektion und Infektion wurde aus den Zellen Gesamt-DNA isoliert, die DNA-Proben mit DpnI und XbaI verdaut und in einem Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden auf Nylon geblottet und mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gegen den HSV oriS hybridisiert. In Abbildung 3.19 sieht man, dass die HSV-induzierte Amplifikation von pH10 mit steigenden Mengen des Rep78/68-exprimierenden Plasmids pΔTR zunehmend behindert wird. In Gegenwart des Konstruktes pΔTRrep-42, von dem ausschließlich verkürzte große Rep-Proteine gebildet werden, nimmt die Menge an entstehenden pH10-Kopien dagegen nicht ab.

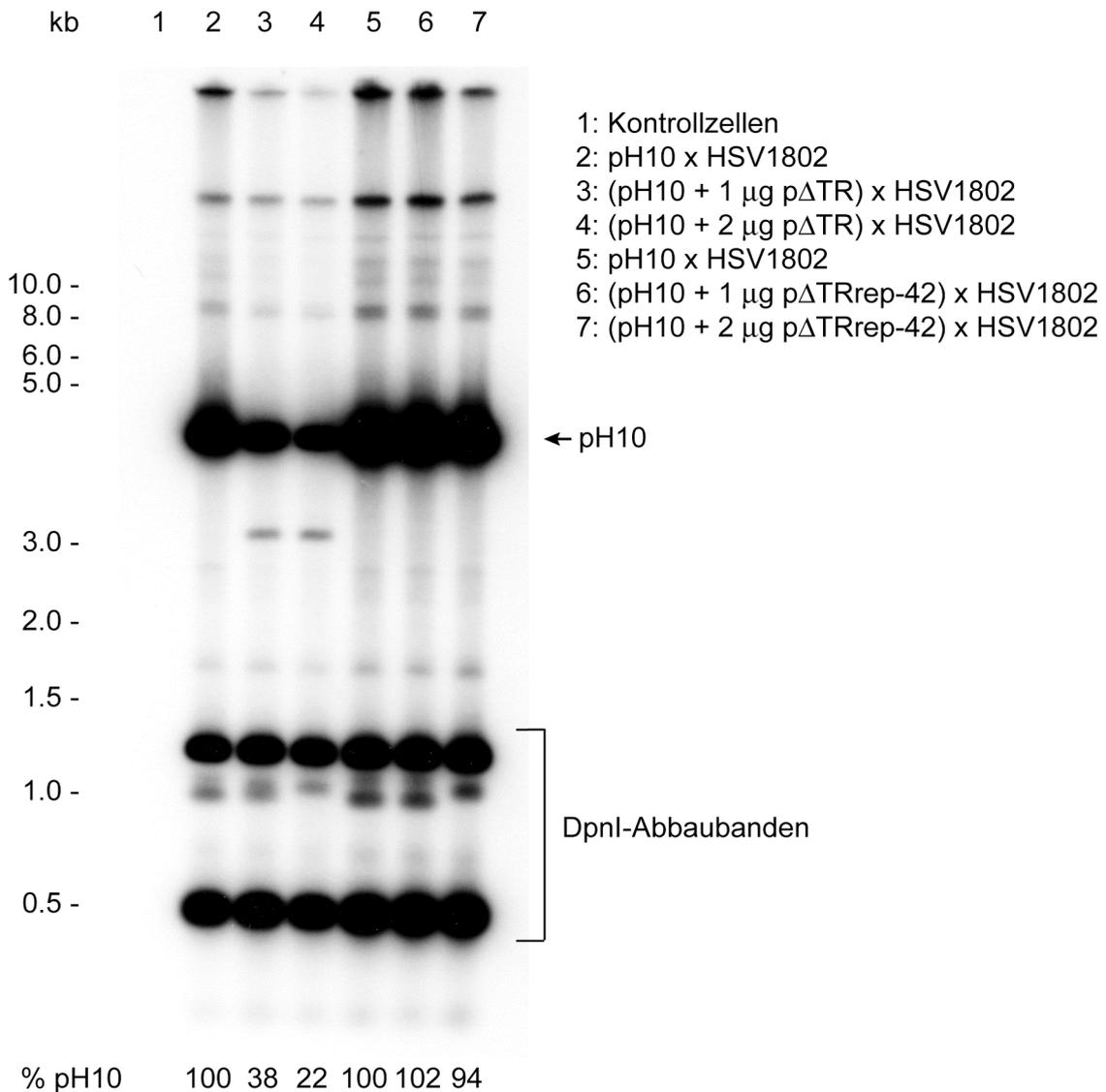


Abbildung 3.19: *Southernblot* Analyse von *Xba*I- und *Dpn*I-verdauter Gesamt-DNA aus BHK-Zellen, die mit pH10 sowie mit steigenden Mengen an pΔTR bzw. pΔTRrep-42 transfiziert und anschließend mit HSV1802 infiziert wurden. Aufgefüllt wurden die Ansätze mit dem Konstrukt pBluescriptIIISK+, so dass jeweils gleiche DNA-Mengen transfiziert wurden. Als Sonde wurde ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment gegen den HSV-Replikationsursprung (*oriS*) eingesetzt. Der Pfeil zeigt die Position der entstandenen pH10-Kopien an. Unter der Abbildung sind die bei der Quantifizierung der pH10-Kopien erhaltenen Werte in Prozent angegeben.

Bei den weiteren Untersuchungen zur rAAV-DNA-Replikation und rAAV-Produktion wurde das Konstrukt pΔTRrep-42, das nur die verkürzten großen Rep-Proteine exprimiert, mitgeführt.

3.8.4 Untersuchung der rAAV-DNA-Replikation bei Verwendung von p Δ TRK1-p Δ TRK4 als Helferplasmid

Die Kozak-Konstrukte wurden als Helferplasmide bei der Replikation von rAAV-DNA eingesetzt. Hierzu wurden BHK-Zellen mit pTR-UF5 sowie verschiedenen Helferplasmiden kotransfiziert und mit HSV1802 infiziert. 24 Stunden später wurde nach der Methode von Hirt niedermolekulare DNA extrahiert. Die DNA-Extrakte wurden mit DpnI verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylon geblottet. rAAV-DNA wurde mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gegen *egfp* detektiert. In Abbildung 3.20 sieht man, dass bei Verwendung des Konstruktes p Δ TRrep-42, von dem ausschließlich verkürztes Rep78/68 gebildet wird, keine rAAV-DNA-Replikation stattfindet (Spur 2). Setzt man als Helferplasmid p Δ TRrepACG ein, das minimale Mengen an Volllänge-Rep78/68 exprimiert, sind die verschiedenen Replikationsformen von rAAV schwach zu erkennen (Spur 3). Bei Verwendung der Konstrukte p Δ TRK1, p Δ TRK2 und p Δ TRK4 (Spuren 4, 5 und 7) wird rAAV-DNA kaum schlechter repliziert als mit dem Ausgangskonstrukt p Δ TR (Spur 1). Bei p Δ TRK3 zeigt sich dagegen eine deutlich abgeschwächte rAAV-DNA-Replikation (Spur 6), die aber immer noch sehr viel stärker ist als bei dem Konstrukt p Δ TRrepACG (Spur 3). Eine Quantifizierung der Banden im Phosphoimager ergab, dass rAAV-DNA etwa um den Faktor 8 schlechter repliziert wird, wenn anstelle des Ausgangskonstruktes p Δ TR p Δ TRrepACG als Helferplasmid eingesetzt wird. Der Unterschied zwischen p Δ TR und p Δ TRK3 liegt etwa bei Faktor 3.

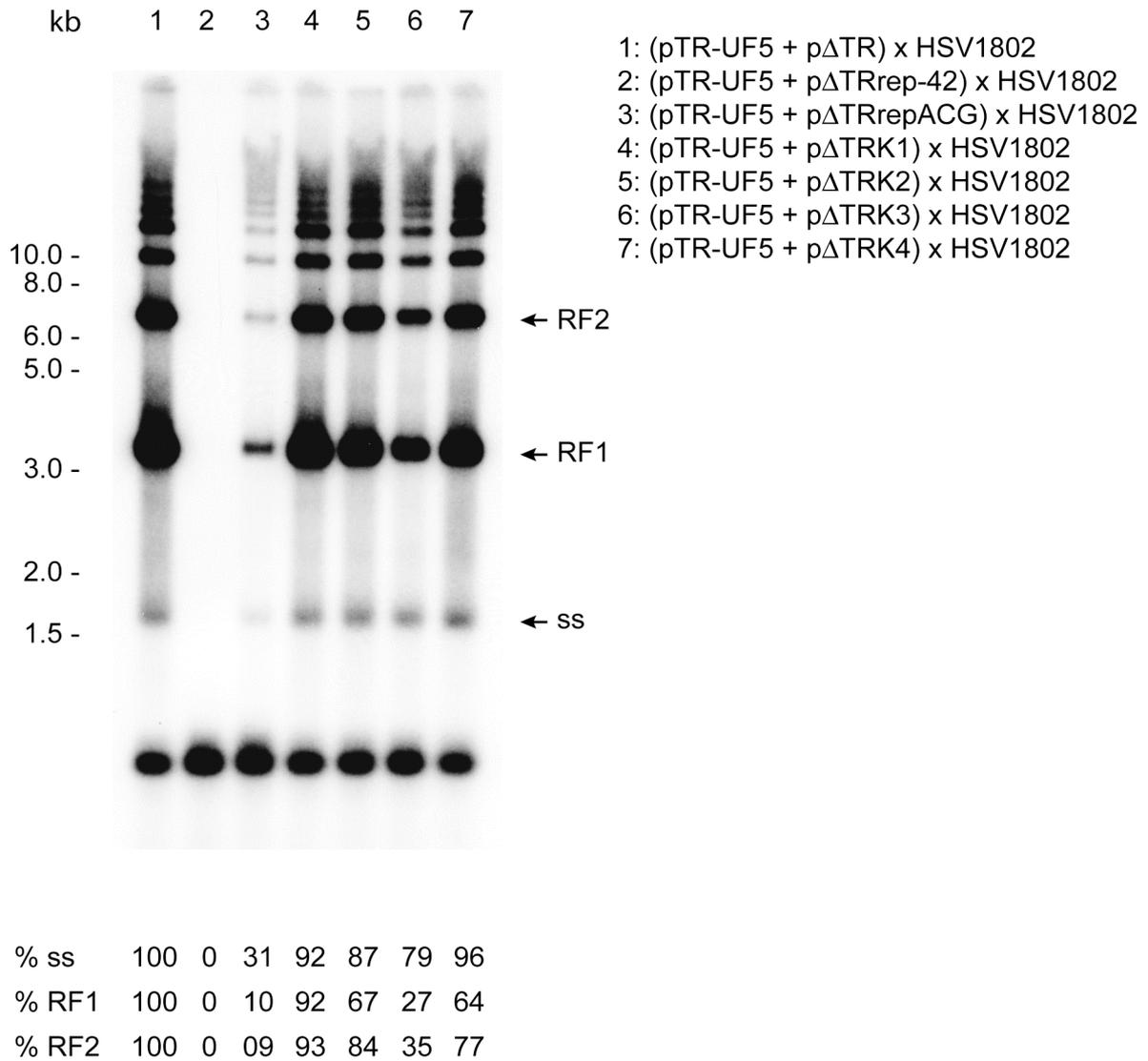


Abbildung 3.20: *Southernblot* Analyse von DpnI-verdauten Hirt-Extrakten aus BHK-Zellen, die mit pTR-UF5 und pΔTR bzw. verschiedenen pΔTR-Mutanten kotransfiziert und mit HSV1802 infiziert wurden. Als Sonde wurde ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment gegen *egfp* eingesetzt. Die Pfeile zeigen die Position des einzelsträngigen rAAV-Genoms (ss) sowie der monomeren (RF1) und dimeren (RF2) Replikationsform an. Unter der Abbildung sind die bei der Quantifizierung der verschiedenen rAAV-Replikationsformen erhaltenen Werte in Prozent angegeben.

3.8.5 Untersuchung der rAAV-Produktion mit p Δ TRK1-p Δ TRK4

Um zu überprüfen, wie viel rekombinantes AAV mit den Konstrukten p Δ TRK1-p Δ TRK4 produziert wird, wurden BHK-Zellen wie im vorhergehenden Versuch transfiziert und infiziert. Zwei Tage später wurde das entstandene rekombinante AAV geerntet und titriert:

1) (pTR-UF5 + p Δ TR)	x HSV1802	→	100 IP/Zelle
2) (pTR-UF5 + p Δ TRrepACG)	x HSV1802	→	5 IP/Zelle
3) (pTR-UF5 + p Δ TRrep-42)	x HSV1802	→	0 IP/Zelle
4) (pTR-UF5 + p Δ TRK1)	x HSV1802	→	100 IP/Zelle
5) (pTR-UF5 + p Δ TRK2)	x HSV1802	→	100 IP/Zelle
6) (pTR-UF5 + p Δ TRK3)	x HSV1802	→	100 IP/Zelle
7) (pTR-UF5 + p Δ TRK4)	x HSV1802	→	100 IP/Zelle

Wie schon in 3.6.5 beschrieben, zeigt dieser Versuch, dass bei Verwendung von p Δ TRrepACG als Helferplasmid (2) deutlich weniger rekombinantes AAV produziert wird als mit dem Ausgangskonstrukt p Δ TR (1). Dies ist darauf zurückzuführen, dass p Δ TRrepACG hauptsächlich verkürzte große Rep-Proteine bildet, die nicht funktionell sind. So entsteht auch kein rekombinantes AAV, wenn als Helferplasmid p Δ TRrep-42 eingesetzt wird, das ausschließlich verkürzte große Rep-Proteine exprimiert (3). Mit den Konstrukten p Δ TRK1-p Δ TRK4 (4-7) wird genauso viel rekombinantes AAV gebildet wie mit dem Ausgangskonstrukt p Δ TR (1). Die zum Teil reduzierte Rep78/68-Expression und dadurch abgeschwächte rAAV-DNA-Replikation der Kozak-Konstrukte wirkt sich also nicht auf die Ausbeute an rekombinantem AAV aus. Erst wenn die Rep78/68-Expression wie bei p Δ TRrepACG auf ein Minimum reduziert wird, geht die Menge an rekombinantem AAV zurück.

3.8.6 Herstellung von rHSVK3SV40EGFP

Zur Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus, das die beschriebene Kozak 3-Mutation trägt, wurde das Plasmid p Δ TRK3SV40EGFP kloniert (siehe 2.26). Zusätzlich zu den AAV-Genen mit zerstörter Kozak-Sequenz um das Startcodon der großen Rep-Proteine enthält dieses Plasmid *egfp* unter Kontrolle des frühen SV40-Promotors. Durch Einbau des Markergens sollte die Suche nach einem positiven Plaque erleichtert werden. Die gesamte *rep/cap-egfp*-Kassette wurde in XbaI-geschnittene HSV 1802-DNA ligiert, wobei das Virus

rHSVK3SV40EGFP entstand. rHSVK3SV40EGFP erwies sich als instabil. So traten immer wieder Revertanten auf, bei denen die gesamte *rep/cap-egfp*-Kassette verloren gegangen war. Eine mögliche Erklärung für die Instabilität von rHSVK3SV40EGFP ist folgende: analog zur SV40-*lacZ*-Kassette in rHSVrep/cap ist die SV40-*egfp*-Kassette in rHSVK3SV40EGFP in gegenläufiger Orientierung zu den *rep/cap*-Sequenzen angeordnet. Aufgrund der Größe des *lacZ*-Gens sind SV40-Promotor und AAV-Promotoren in rHSVrep/cap aber sehr viel weiter voneinander entfernt als in rHSVK3SV40EGFP. Möglicherweise wirkt sich die gegenläufige Anordnung der Promotoren in rHSVK3SV40EGFP daher störend aus, während bei rHSVrep/cap nur selten Revertanten auftreten. Zur Untersuchung der Kozak 3-Mutation in rHSVK3SV40EGFP wurde in den folgenden Experimenten eine Viruspräparation verwendet, die dieses Virus zu einem überwiegenden Anteil enthält. Da rHSVK3SV40EGFP bereits *egfp* als Markergen trägt, wurde dabei nicht wie bisher pTR-UF5 als rAAV-Vektorkonstrukt eingesetzt, sondern pTR-CMV-RedExpress, das anstelle von *egfp* das Gen für RedExpress besitzt.

3.8.7 Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSVK3SV40EGFP

Zur Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSVK3SV40EGFP wurden BHK-Zellen nach der Standardmethode, mit dem System pTR-CMV-RedExpress x rHSVrep/cap sowie mit den Systemen pTR-CMV-RedExpress x rHSVrepACG/cap und pTR-CMV-RedExpress x rHSVK3SV40EGFP transfiziert und infiziert. 24 und 48 Stunden nach Infektion wurde aus den Zellen Proteinextrakt hergestellt und ein *Westernblot* durchgeführt. Wie schon auf Plasmidebene beobachtet, sieht man in Abbildung 3.21, dass rHSVK3SV40EGFP sowohl Volllänge-Rep78/68 als auch verkürzte Proteine bildet. Um dies deutlicher darzustellen wurden die von rHSVK3SV40EGFP exprimierten Proteine zusätzlich in einem niedriger prozentigen Gel aufgetrennt (Abbildung 3.21 B). Die Cap-Expressionsstärke von rHSVK3SV40EGFP liegt 48 Stunden nach Infektion wie erwartet zwischen der von rHSVrep/cap und rHSVrepACG/cap. Je weniger Volllänge- und damit funktionelles Rep78/68 ein rekombinantes Herpesvirus bildet, desto besser kann es sich replizieren und desto mehr Kopien der AAV-Gene entstehen. Da die Menge an funktionellem Rep78/68 von rHSVrep/cap über rHSVK3SV40EGFP zu rHSVrepACG/cap abnimmt, steigt die Cap-Expression dementsprechend in dieser Reihenfolge an.

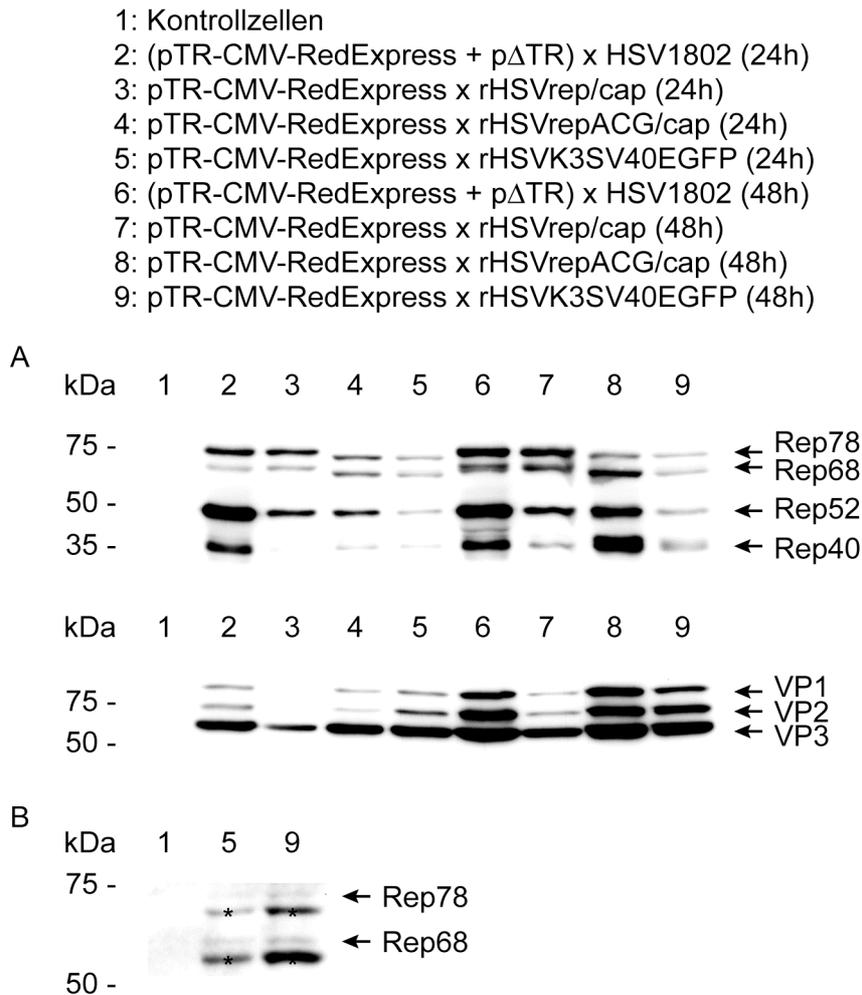


Abbildung 3.21: *Westernblot* Analyse von BHK-Zellen, die mit pTR-CMV-RedExpress und pΔTR kotransfiziert und mit HSV1802 infiziert wurden. Alternativ wurden BHK-Zellen mit pTR-CMV-RedExpress transfiziert und mit rHSVrep/cap, rHSVrepACG/cap bzw. rHSVK3SV40EGFP infiziert. Rep und Cap wurden durch die Antikörper 303.9 bzw. B1 erkannt und mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen. Abbildung A zeigt 12% Polyacrylamidgelle, Abbildung B die Proben 1, 5 und 9 in einem 8% Polyacrylamidgel. Die verkürzten großen Rep-Proteine sind mit einem Stern markiert.

3.8.8 Untersuchung der rAAV-DNA-Replikation durch rHSVK3SV40EGFP

Um zu überprüfen wie gut rHSVK3SV40EGFP rAAV-DNA replizieren kann, wurden BHK-Zellen wie im vorhergehenden Versuch transfiziert und infiziert. 24 Stunden später wurde aus den Zellen niedermolekulare DNA nach der Methode von Hirt extrahiert, die Extrakte mit DpnI verdaut und ein *Southernblot* durchgeführt. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gegen das Gen für RedExpress wurde dabei rAAV-DNA nachgewiesen. Abbildung 3.22 zeigt, dass rHSVK3SV40EGFP auch bezüglich seiner Fähigkeit rAAV-DNA zu replizieren zwischen rHSVrep/cap und rHSVrepACG/cap liegt. So korreliert die jeweils gebildete Menge an funktionellem Rep78/68 mit der Menge an

replizierter rAAV-DNA. Während in dem System pTR-CMV-RedExpress x rHSVrep/cap aber kaum rAAV-Einzelstrang-DNA entsteht, da nicht genügend Rep52/40- und Cap-Proteine vorhanden sind, ist der Anteil an Einzelstrang an den übrigen Replikationsformen in dem System pTR-CMV-RedExpress x rHSVK3SV40EGFP deutlich höher. Dies lässt sich auf die stärkere (Rep52/40- und) Cap-Expression von rHSVK3SV40EGFP zurückführen.

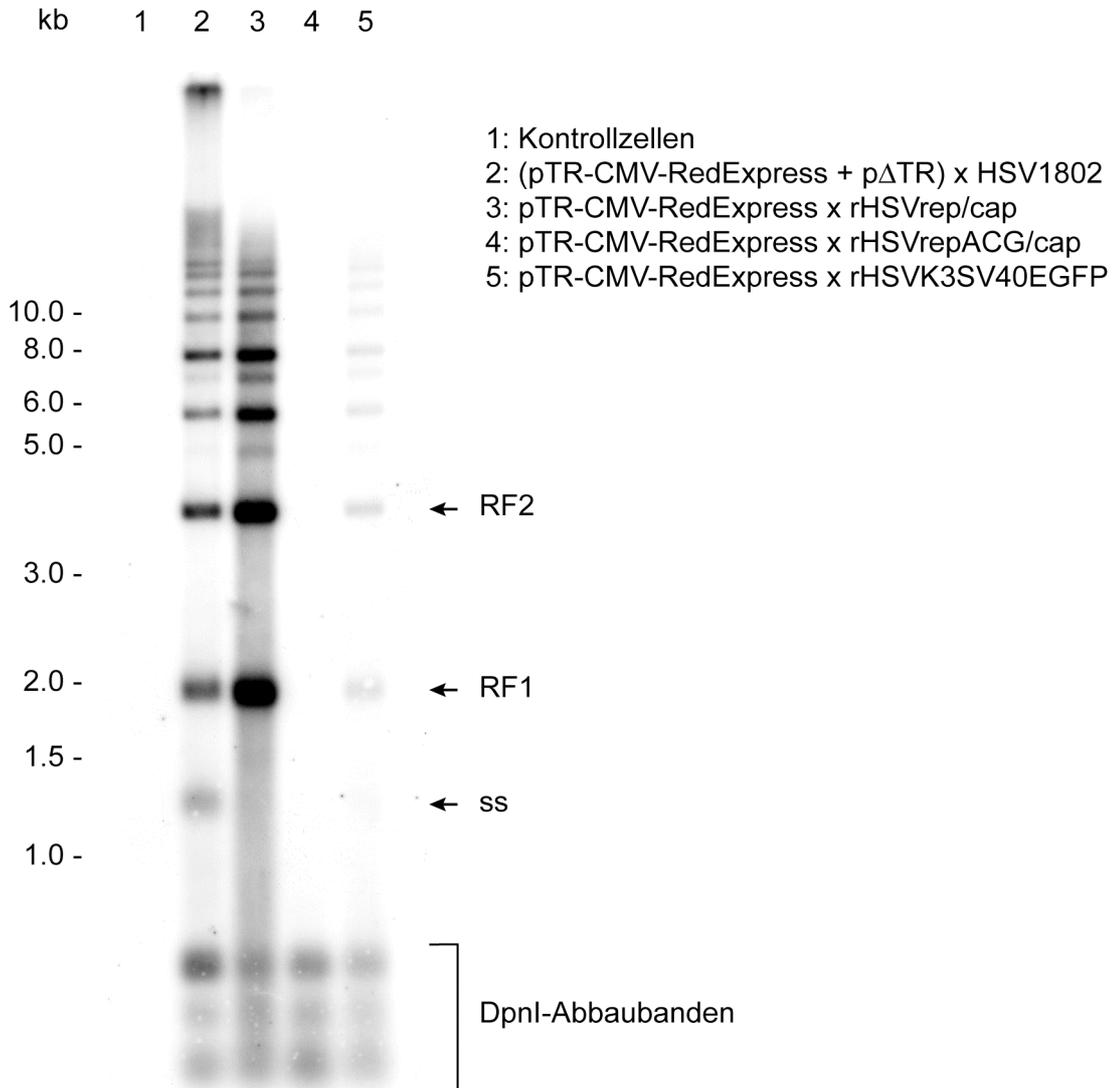


Abbildung 3.22: *Southernblot* Analyse von DpnI-verdauten Hirt-Extrakten aus BHK-Zellen, die 24 Stunden zuvor zum einen mit pTR-CMV-RedExpress und pΔTR kotransfiziert und mit HSV1802 infiziert wurden, zum anderen mit pTR-CMV-RedExpress transfiziert und anschließend mit rHSVrep/cap, rHSVrepACG/cap bzw. rHSVK3SV40EGFP infiziert wurden. Als Sonde wurde ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment gegen das Gen für RedExpress eingesetzt. Die Pfeile zeigen die Position des einzelsträngigen rAAV-Genoms (ss) sowie der monomeren (RF1) und dimeren (RF2) Replikationsform an.

3.8.9 Untersuchung der rAAV-Produktion mit rHSVK3SV40EGFP

Um zu untersuchen wie viel rekombinantes AAV mit dem System pTR-CMV-RedExpress x rHSVK3SV40EGFP produziert wird, wurden BHK-Zellen wie folgt transfiziert und infiziert. Zwei Tage später wurde das entstandene rekombinante AAV geerntet und titriert:

1) (pTR-CMV-RedExpress + p Δ TR)	x HSV1802	→	100 IP/Zelle
2) pTR-CMV-RedExpress	x rHSVrep/cap	→	0,5 IP/Zelle
3) pTR-CMV-RedExpress	x rHSVrepACG/cap	→	0,5 IP/Zelle
4) pTR-CMV-RedExpress	x rHSVK3SV40EGFP	→	10 IP/Zelle

Wie schon in 3.6.5 beschrieben zeigt dieser Versuch, dass mit den Systemen pTR-CMV-RedExpress x rHSVrep/cap und pTR-CMV-RedExpress x rHSVrepACG/cap jeweils nur 0,5 infektiöse rAAV-Partikel pro Zelle gebildet werden (2 und 3). Mit dem System pTR-CMV-RedExpress x rHSVK3SV40EGFP werden dagegen 10 infektiöse Partikel pro Zelle produziert, was einer Steigerung der rAAV-Ausbeute um den Faktor 20 entspricht (4). Von der Standardmethode (1) unterscheidet sich dieses System nur um den Faktor 10. Die von rHSVK3SV40EGFP exprimierte Menge an großen Rep-Proteinen ist somit ausreichend für eine effiziente Replikation von rAAV-DNA. Gleichzeitig ist die Rep78/68-Menge niedrig genug, um die Replikation von rHSVK3SV40EGFP zu gewährleisten, so dass auch ausreichend Rep52/40- und Cap-Proteine für die Verpackung der rAAV-DNA gebildet werden.

3.9 Herstellung eines verpackungsdefizienten rekombinanten Herpesvirus

Bei der Produktion von rekombinanten AAV mit dem Virus rHSVK3SV40EGFP wird nicht nur das rekombinante AAV, sondern auch rHSVK3SV40EGFP vermehrt. Um eine Kontamination des rekombinanten AAVs mit seinem Helfervirus zu vermeiden, sollte ein verpackungsdefizientes rekombinantes Herpesvirus hergestellt werden. Als geeignet erschien ein Virus, welches das *immediate early*-Protein ICP27 nicht exprimiert, ohne dass nach der HSV-DNA-Replikation der Übergang zur späten Genexpression nicht erfolgt (McCarthy *et al.*, 1989; Rice and Knipe, 1988; 1990; Sacks *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1992). So ist in der Literatur beschrieben, dass sich eine Deletion des Gens für ICP27 günstig auf die Produktion von rekombinanten AAV auswirkt (Conway *et al.*, 1999; Booth *et al.*, 2004).

3.9.1 Konstruktion von rHSV Δ 27K3SV40EGFP

Parallel zur Herstellung von rHSVK3SV40EGFP wurde das Virus rHSV Δ 27K3SV40EGFP generiert, das im Unterschied zu rHSVK3SV40EGFP kein ICP27 exprimiert. Verwendet wurde hierfür das Stamm 27-lacZ, eine Variante von HSV-1 KOS, in der das Gen für ICP27 durch Insertion eines DNA-Fragmentes zerstört ist, das *lacZ* unter Kontrolle des HSV ICP6-Promotors enthält (Smith *et al.*, 1992). Die *rep/cap-egfp*-Kassette, die bereits für die Herstellung von rHSVK3SV40EGFP verwendet wurde, wurde durch homologe Rekombination in den intergenischen Bereich von 27-lacZ eingebracht, in dem bei HSV1802 die XbaI-Schnittstelle liegt (siehe 2.16 und 2.17). Hierzu wurde die *rep/cap-egfp*-Kassette in das Plasmid pUC131HSV-1XbaC3/Not kloniert, das die entsprechenden homologen HSV-Sequenzen besitzt (siehe 2.26). Wie schon für rHSVK3SV40EGFP beschrieben, erwies sich auch rHSV Δ 27K3SV40EGFP als instabil. Anders als bei rHSVK3SV40EGFP war es in diesem Fall aber nicht möglich, eine Viruspräparation herzustellen, die rHSV Δ 27K3SV40EGFP zu einem überwiegenden Anteil enthält.

3.9.2 Untersuchung der rAAV-Produktion mit rHSV Δ 27K3SV40EGFP

Um zumindest abschätzen zu können, wie sich eine Deletion des Gens für ICP27 auf die Produktion von rekombinanten AAV auswirkt, wurden BHK-Zellen nach der Standardmethode, mit dem System pTR-CMV-RedExpress x rHSVK3SV40EGFP sowie mit pTR-CMV-RedExpress x rHSV Δ 27K3SV40EGFP transfiziert und infiziert. Verwendet wurde

dabei eine rHSV Δ 27K3SV40EGFP-enthaltende Viruspräparation. Außerdem wurden BHK-Zellen mit pTR-CMV-RedExpress und p Δ TR kotransfiziert und anschließend mit den HSV-Stämmen KOS bzw. 27-lacZ infiziert. Zwei Tage nach Transfektion und Infektion wurde das entstandene rekombinante AAV geerntet und titiert:

- | | | |
|---|------------------------------|----------------|
| 1) (pTR-CMV-RedExpress + p Δ TR) | x HSV1802 | → 100 IP/Zelle |
| 2) pTR-CMV-RedExpress | x rHSVK3SV40EGFP | → 10 IP/Zelle |
| 3) pTR-CMV-RedExpress | x rHSV Δ 27K3SV40EGFP | → 75 IP/Zelle |
| 4) (pTR-CMV-RedExpress + p Δ TR) | x HSV KOS | → 100 IP/Zelle |
| 5) (pTR-CMV-RedExpress + p Δ TR) | x 27-lacZ | → 100 IP/Zelle |

Der Versuch ergab, dass mit der verwendeten rHSV Δ 27K3SV40EGFP-Präparation (3) fast genauso viel rekombinantes AAV produziert wird wie mit der Standardmethode (1). Der positive Einfluss der ICP27-Deletion wird somit schon bei Verwendung einer Viruspräparation deutlich, die rHSV Δ 27K3SV40EGFP nur anteilmäßig enthält. Im Kontext eines Rep- und Cap-exprimierenden Herpesvirus wirkt sich eine Mutation des Gens für ICP27 günstig auf die Ausbeute an rekombinantem AAV aus. Bei Transfektion eines Rep- und Cap-exprimierenden Plasmids, wenn also viele Kopien der AAV-Gene vorliegen, führt eine Mutation des Gens für ICP27 dagegen nicht zu einer Steigerung der rAAV-Ausbeute. So konnte zwischen den als Helferviren verwendeten HSV-Stämmen KOS und 27-lacZ kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (4 bzw. 5). In rHSV Δ 27K3SV40EGFP bewirkt die ICP27-Deletion vermutlich eine erhöhte Expression der AAV-Gene.

3.9.3 Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSV Δ 27K3SV40EGFP

Zur Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSV Δ 27K3SV40EGFP wurden BHK-Zellen nach der Standardmethode sowie mit dem System pTR-CMV-Red-Express x rHSV Δ 27K3SV40EGFP transfiziert und infiziert. 48 Stunden später wurde aus den Zellen Proteinextrakt hergestellt und ein *Westernblot* durchgeführt. Abbildung 3.23 zeigt, dass sowohl die Rep52/40- als auch die Cap-Expression des Systems pTR-CMV-Red-Express x rHSV Δ 27K3SV40EGFP mit der Rep52/40- und Cap-Expression der Standardmethode vergleichbar ist.

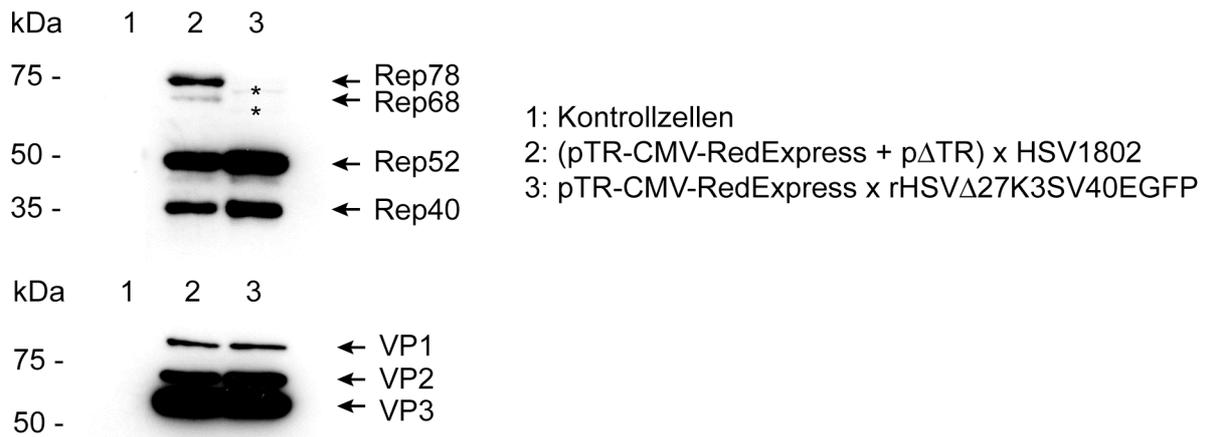


Abbildung 3.23: *Westernblot* Analyse von BHK-Zellen, die zum einen mit pTR-CMV-Red-Express und pΔTR transfiziert und mit HSV1802 infiziert wurden, zum anderen mit pTR-CMV-Red-Express transfiziert und anschließend mit rHSVΔ27K3SV40EGFP infiziert wurden. Rep und Cap wurden durch die Antikörper 303.9 (oberer Blot) bzw. B1 (unterer Blot) erkannt und mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen. Die verkürzten großen Rep-Proteine sind mit einem Stern markiert.

3.9.4 Produktion von rekombinantem AAV durch Koinfektion

Das rAAV-Vektorgenom wurde in den bisher durchgeführten Experimenten durch DNA-Transfektion in die Zellen eingebracht. Um zu überprüfen, wie viel rekombinantes AAV produziert wird, wenn das rAAV-Vektorgenom als Bestandteil eines zweiten rekombinanten Herpesvirus bereitgestellt wird, wurden BHK-Zellen mit rHSVΔ27K3SV40EGFP und rHSV-AAV2/GFP koinfiziert. rHSV-AAV2/GFP (erhalten von N. Muzyczka) enthält das rAAV-Vektorgenom und exprimiert wie rHSVΔ27K3SV40EGFP kein ICP27. Beide Viren wurden mit einer Multiplizität der Infektion von 10 eingesetzt. 48 Stunden nach Infektion wurde das entstandene rekombinante AAV geerntet und titriert:

$$\text{rHSV-AAV2/GFP} \times \text{rHSV}\Delta\text{27K3SV40EGFP} \rightarrow 500 \text{ IP/Zelle}$$

Der Versuch ergab, dass bei einer Koinfektion von BHK-Zellen mit rHSVΔ27K3SV40EGFP und einem zweiten, das rAAV-Vektorgenom tragenden rekombinanten Herpesvirus etwa 500 infektiöse rAAV-Partikel pro Zelle gebildet werden. Dies übersteigt die mit der Standardmethode erzielte rAAV-Ausbeute um etwa den Faktor 5.

3.9.5 Konstruktion von rHSV Δ 27K3FRT

Zur Herstellung eines stabilen rekombinanten Herpesvirus wurde das Konstrukt pUC131HSV-1 Δ TRK3-EGFP-FRT kloniert (siehe 2.26). Dieses Konstrukt enthält die AAV-Gene *rep* und *cap* mit zerstörter Kozak-Sequenz um das Rep78/68-Startcodon sowie eine *FLP Recombinase Target* (FRT)-flankierte EGFP-Expressionskassette. Die AAV-Promotoren in pUC131HSV-1 Δ TRK3-EGFP-FRT sind in gleicher Orientierung zum Promotor des Markergens angeordnet. Flankiert wird die *rep/cap-egfp-frt*-Kassette von HSV-Sequenzen, so dass sie durch homologe Rekombination in den HSV-Stamm 27-lacZ eingebracht werden konnte (siehe 2.17). Das Markergen wurde anschließend durch FLP/FRT-Rekombination wieder entfernt (siehe 2.16). Neben den AAV-Genen enthält das entstandene Virus rHSV Δ 27K3FRT eine einzelne FRT-Sequenz.

3.9.6 Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSV Δ 27K3FRT

Zur Untersuchung der Rep- und Cap-Expression von rHSV Δ 27K3FRT wurden BHK-Zellen nach der Standardmethode sowie mit dem System pTR-CMV-Red-Express x rHSV Δ 27K3FRT transfiziert und infiziert. 24 und 48 Stunden nach Infektion wurde aus den Zellen Proteinextrakt hergestellt und ein *Westernblot* durchgeführt. Abbildung 3.24 zeigt, dass die Rep52/40-Expression des Systems pTR-CMV-Red-Express x rHSV Δ 27K3FRT wie erwartet mit der Rep52/40-Expression der Standardmethode vergleichbar ist. Die Cap-Expression des Systems pTR-CMV-Red-Express x rHSV Δ 27K3FRT ist dagegen sehr viel schwächer als bei der Standardmethode. In rHSV Δ 27K3FRT scheint die einzelne FRT-Sequenz den p40-Promotor negativ zu beeinflussen. Dieses Ergebnis ist überraschend, da in der Literatur keine Wechselwirkung von FRT mit anderen Sequenzen beschrieben ist. Daß bei der Herstellung von rHSV Δ 27K3FRT Mutationen in den AAV-Genen aufgetreten sind, konnte durch Sequenzierung ausgeschlossen werden.

- 1: (pTR-CMV-RedExpress + p Δ TR) x HSV1802 (24h)
- 2: pTR-CMV-RedExpress x rHSV Δ 27K3FRT (24h)
- 3: (pTR-CMV-RedExpress + p Δ TR) x HSV1802 (48h)
- 4: pTR-CMV-RedExpress x rHSV Δ 27K3FRT (48h)

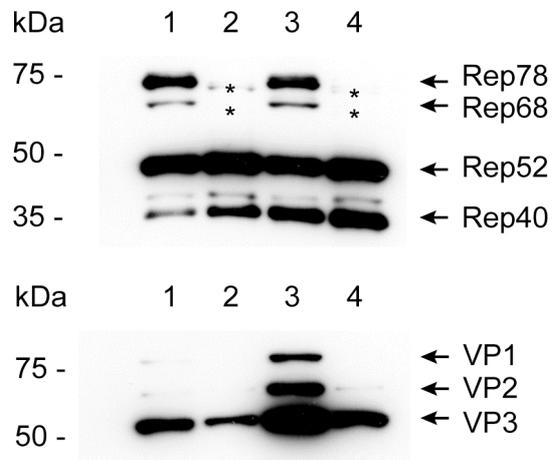


Abbildung 3.24: *Westernblot* Analyse von BHK-Zellen, die zum einen mit pTR-CMV-Red-Express und p Δ TR transfiziert und mit HSV1802 infiziert wurden, zum anderen mit pTR-CMV-Red-Express transfiziert und anschließend mit rHSV Δ 27K3FRT infiziert wurden. Rep und Cap wurden durch die Antikörper 303.9 (oberer Blot) bzw. B1 (unterer Blot) erkannt und mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen. Die verkürzten großen Rep-Proteine sind mit einem Stern markiert.

3.10 Herstellung rekombinanter Herpesviren durch *Red/ET-Rekombination*

Limitierend für den Fortgang dieser Arbeit war die sehr zeitintensive Herstellung der rekombinanten Herpesviren durch direkte Ligation bzw. durch homologe Rekombination. Eine Möglichkeit, rekombinante Herpesviren einfacher herzustellen, ist die Mutagenese Herpesvirus-tragender *Bacterial Artificial Chromosomes* (BACs) durch *Red/ET-Rekombination* (siehe 2.18). Mit Hilfe dieser Technik wurden die AAV-Gene *rep* und *cap* sowie die bisher untersuchten Modifikationen zur Verbesserung der rAAV-Ausbeute in das den HSV-1 Stamm 17 tragende BAC pHSV1(17+)blueLox eingebracht (siehe 2.28). Hergestellt wurde zum einen pHSV1(17+)blueLoxp Δ TR, das die AAV-Gene *rep* und *cap* in unveränderter Form enthält. Außerdem wurde pHSV1(17+)blueLoxp Δ TRK3 generiert, bei dem die Sequenzumgebung um das Rep78/68-Startcodon mutiert ist („Kozak3-Mutation“). Von beiden BACs wurde zusätzlich jeweils eine Variante hergestellt, in der das Gen für ICP27 deletiert ist: pHSV1(17+)blueLox Δ 27p Δ TR bzw. pHSV1(17+)blueLox Δ 27p Δ TRK3. Die Transfektion der rekombinanten BAC-DNAs in eukaryotische Zellen führte zu produktiven Herpesvirusinfektionen. Die auf diese Weise erhaltenen Viren tragen wie rHSV Δ 27K3FRT eine einzelne FRT-Sequenz (siehe 3.9.3). Die dazugehörigen *Bacterial Artificial Chromosomes* können aber als Ausgangspunkt für die Herstellung weiterer rekombinanter Herpesviren verwendet werden, die keine FRT-Sequenz enthalten.