

4 Diskussion

Auf dem Adeno-assoziierten Virus basierende Gentherapievektoren ermöglichen eine lang anhaltende Expression des Transgens in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen. Gegenüber anderen Vektorsystemen zeichnen sie sich durch ein geringes Sicherheitsrisiko aus (Muzyczka *and* Berns, 2001).

Limitierend für den Einsatz rekombinanter AAV-Vektoren sind die gegenwärtigen arbeitsaufwändigen Verfahren der Vektorherstellung, die auf transienten Transfektionstechniken basieren, und sich daher schlecht auf den Großmaßstab übertragen lassen. In der Regel werden alle für die Vektorproduktion erforderlichen Komponenten in Form von Plasmid-DNA in 293-Zellen kotransfiziert: das rAAV-Vektorgenom, die AAV-Gene *rep* und *cap* sowie adenovirale Helferfunktionen (Grimm *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1998). Zu den wichtigsten alternativen Produktionsmethoden, die in den letzten Jahren entwickelt wurden, zählen (1) die Helfervirusinfektion von stabilen Zelllinien, welche die AAV-Gene *rep* und *cap* sowie das rAAV-Vektorgenom enthalten (Chadeuf *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 2001; Qiao *et al.*, 2002; Mizukami *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2000; Farson *et al.*, 2004), und (2) die Verwendung Rep- und Cap-exprimierender und/oder das rAAV-Vektorgenom tragender rekombinanter Helferviren (Zhang *et al.*, 2001; Conway *et al.*, 1999; Wustner *et al.*, 2002; Booth *et al.*, 2004; Shiao *et al.*, 2005). Verschiedene Kombinationen der genannten Strategien sind ebenfalls beschrieben. Ein weiterer Transfektions-unabhängiger Ansatz ist (3) die Produktion von rAAV-Vektoren mit Hilfe rekombinanter Baculoviren in der Insektenzelllinie Sf9 (Urabe *et al.*, 2002).

Ein Vergleich bzw. eine Beurteilung der verschiedenen Produktionssysteme wird dadurch erschwert, dass jeweils sehr unterschiedliche Protokolle zur Aufarbeitung und Titration der rekombinanten AAV-Vektoren verwendet wurden. Fest steht jedoch, dass bisher keines der alternativen Systeme routinemäßig zur rAAV-Produktion eingesetzt wird, sondern weiterhin die herkömmlichen, auf DNA-Transfektion basierende Verfahren angewendet werden. Eingeschränkt wird die Verwendbarkeit der meisten alternativen Produktionsmethoden durch die toxischen Eigenschaften der AAV-Proteine Rep78/68. So erwiesen sich sowohl *rep* und *cap* enthaltende Zelllinien (Yang *et al.*, 1994), als auch Helfervirusrekombinanten häufig als instabil. In Rep- und Cap-exprimierenden rekombinanten Adenoviren führen nicht-homologe Rekombinationsereignisse beispielsweise nach einigen Passagen zum Verlust des *rep*-Gens (Zhang *et al.*, 2001). Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1), das ebenfalls als Helfer für AAV fungieren kann, toleriert dagegen die Insertion der AAV-Gene (Conway *et al.*, 1999; Wustner *et al.*, 2002; Booth *et al.*, 2004; Heilbronn *et al.*, 2003). Ein ideales, auf den Großmaßstab

übertragbares Produktionssystem wäre somit theoretisch die Infektion einer das rAAV-Vektorgenom enthaltenden Zelllinie mit einem Rep- und Cap-exprimierenden rekombinanten Herpesvirus (rHSVrep/cap). Eine andere Möglichkeit wäre die Koinfektion einer Zelle mit rHSVrep/cap und einem zweiten, das rAAV-Vektorgenom tragenden rekombinanten Herpesvirus. Praktisch ließen sich mit rHSVrep/cap jedoch nur sehr geringe Mengen an rekombinanten AAV-Vektoren produzieren. Ziel dieser Arbeit war, den Grund für die geringe Effizienz dieses Produktionssystems herauszufinden, um dann ein verbessertes rekombinantes Herpesvirus für eine effiziente rAAV-Produktion zu konstruieren.

4.1 Untersuchung von rHSVrep/cap

Zunächst wurde untersucht, ob die Konstruktionsweise von rHSVrep/cap für die mit diesem Virus erzielten geringen rAAV-Ausbeuten verantwortlich ist (Kapitel 3.1). Nachdem dies ausgeschlossen werden konnte, wurden kritische Schritte der rAAV-Produktion zum einen bei einem Transfektions-basierten Verfahren zur Produktion von rekombinantem AAV und vergleichend dazu die Produktion von rekombinantem AAV mit rHSVrep/cap untersucht (Kapitel 3.2). Der Vergleich der beiden Systeme ergab, dass rHSVrep/cap zu wenig Rep52/40 und zu wenig Cap für eine effiziente rAAV-Produktion bildet. Dies zeigte sich an der geringen Expressionsstärke von Rep52/40 und Cap im *Westernblot* (Kapitel 3.2.1) sowie der geringen Menge an rAAV-Einzelstrang-DNA im *Southernblot* (Kapitel 3.2.2). Durch zusätzliche Transfektion eines Rep52/40- und Cap-exprimierenden Plasmids kann rHSVrep/cap vollständig komplementiert werden. So ist in diesem Fall deutlich rAAV-Einzelstrang-DNA zu erkennen (Kapitel 3.2.5), und die Ausbeute an infektiösen rAAV-Partikeln entspricht der Ausbeute, die mit dem Transfektions-basierten Produktionsverfahren erzielt wird (Kapitel 3.2.4). Rep52/40 und Cap erwiesen sich in den beschriebenen Experimenten als gleich wichtig für die Komplementierung von rHSVrep/cap (Kapitel 3.2.4). Festgestellt werden konnte außerdem, dass die HSV-Helferfunktionen von rHSVrep/cap sowie die Menge an Rep78/68 bei der rAAV-Produktion mit rHSVrep/cap nicht limitierend sind (Kapitel 3.1.4 bzw. 3.2.4). Eine zusätzliche Transfektion eines Rep78/68-exprimierenden Plasmids führte ganz im Gegenteil zu einem weiteren Rückgang der mit rHSVrep/cap erzielten rAAV-Ausbeute (Kapitel 3.2.4).

Eine mögliche Erklärung für die geringe Rep52/40- und Cap-Expression von rHSVrep/cap ist Folgende: Das von rHSVrep/cap exprimierte Rep78/68 könnte eine effiziente DNA-Replikation von rHSVrep/cap behindern. Aus diesem Grund würden nur wenige Kopien der *rep*- und *cap*-Gene und somit auch wenig Rep52/40- und Cap-Proteine entstehen. Für diese Theorie spricht, dass eine zusätzliche Expression von großen Rep-Proteinen alleine die Ausbeute an rekombinantem AAV weiter reduziert (Kapitel 3.2.4). Werden dagegen zusammen mit Rep78/68 zusätzlich auch Rep52/40 und Cap exprimiert, stehen auch ohne Replikation von rHSVrep/cap bereits genügend AAV-Proteine zur Verfügung. Dies würde erklären, warum die großen Rep-Proteine in diesem Fall keinen Rückgang der rAAV-Ausbeute bewirken (Kapitel 3.2.4). Ein Rückgang der rAAV-Ausbeute konnte auch dann beobachtet werden, wenn die DNA-Replikation von rHSVrep/cap mit Hilfe einer transdominant-negativen Variante des HSV *origin binding proteins* und somit auf einem von Rep78/68 unabhängigen Weg blockiert wurde (Kapitel 3.5). Dieser Befund unterstützt die Vermutung, dass die durch Rep78/68 verminderte rAAV-Ausbeute auf eine Hemmung der

DNA-Replikation von rHSVrep/cap zurückzuführen ist, und nicht auf einer anderen Funktion von Rep78/68 beruht.

Für Rep konnte bereits gezeigt werden, dass es die zelluläre DNA-Replikation (Yang *et al.*, 1994; 1995) sowie die Replikation des viralen Genoms von Adenovirus (Casto *et al.*, 1967; Carter *et al.*, 1979) Herpes-Simplex-Virus (Bantel-Schaal *and* zur Hausen, 1988; Heilbronn *et al.*, 1990), Simian Virus 40 (Schlehofer *et al.*, 1983), des Humanen Immundefizienzvirus (Antoni *et al.*, 1991; Rittner *et al.*, 1992) und verschiedener Papillomviren (Hermonat *et al.*, 1992; 1994) - wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß - behindern kann. In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass Rep78/68 die HSV-induzierte Amplifikation eines den HSV-Replikationsursprung (oriS) tragenden Plasmids sowie die HSV-DNA-Replikation hemmt (Kapitel 3.4). Zudem wurde gezeigt, dass ein rekombinantes Herpesvirus, das sehr wenig Rep78/68 exprimiert, besser repliziert als ein rekombinantes Herpesvirus mit stärkerer Rep78/68-Expression (Kapitel 3.6.6). Di Pasquale und Chiorini fanden, dass Adeno-assoziierte Viren, deren Rep-Proteine aufgrund einer Mutation nicht in der Lage sind, Adenovirus zu hemmen, in einer Kokultur mit Adenovirus nach wenigen Passagen verloren gehen (Di Pasquale *and* Chiorini, 2003). Möglicherweise ist somit für AAV eine gewisse Kontrolle über die Replikation seines Helfervirus essentiell.

Zur Erhöhung der Expression von Rep52/40 und Cap wurde versucht, ein rekombinantes Herpesvirus zu konstruieren, das neben einer intakten Kopie der *rep*- und *cap*-Gene eine weitere Kopie besitzt, von der nur Rep52/40 und Cap gebildet werden (Kapitel 3.3). Die Herstellung eines Virus mit zwei hintereinander liegenden Kopien der AAV-Gene war jedoch nicht möglich. Auch wenn die zweite Kopie keinen p5-Promotor besaß, traten Rekombinationsereignisse auf, die dazu führten, dass keine Rep-Proteine exprimiert wurden. Die Cap-Expression der Rep-negativen rekombinanten Herpesviren erwies sich 48 Stunden nach Infektion als fast so stark wie bei herkömmlichen Systemen zur rAAV-Produktion (Kapitel 3.3.2). Diese Beobachtung ist vermutlich auf die in Abwesenheit von Rep78/68 effiziente DNA-Replikation der untersuchten Viren zurückzuführen.

4.2 Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus mit reduzierter Rep78/68-Expression

Die genannten Ergebnisse führten zu dem Konzept, ein rekombinantes Herpesvirus herzustellen, das eine im Vergleich zu rHSVrep/cap reduzierte Rep78/68-Expression zeigt. Ein solches Virus sollte sich besser replizieren können als rHSVrep/cap, so dass die Kopienzahl der AAV-Gene und folglich die Proteinlevel von Rep52/40 und Cap erhöht werden.

Für Transfektions-basierte Systeme zur rAAV-Produktion wurde beschrieben, dass eine Reduktion der Rep78/68-Expression eine gesteigerte Expression der Cap-Proteine und dadurch eine verbesserte Ausbeute an rekombinalem AAV zur Folge haben soll. Die Idee, Rep78/68 könnte die rAAV-Produktion negativ beeinflussen, stammt ursprünglich von Vincent *et al.* und Li *et al.* (Vincent *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997). In beiden Arbeiten wurden *rep* und *cap* tragende Helferplasmide konstruiert, in denen der AAV p5-Promotor durch starke heterologe Promotoren ersetzt wurde. Mit diesen Konstrukten wurde eine starke Rep78/68-Expression, eine verminderte Cap-Expression sowie eine verminderte rAAV-Ausbeute erzielt. Durch Austausch des p5-Promotors wurden in den untersuchten Konstrukten allerdings Sequenzen entfernt, die für die Genexpression von den AAV-Promotoren p19 und p40 *in cis* erforderlich sind. Für die verminderte Cap-Expression und die reduzierte rAAV-Ausbeute kann in den hier untersuchten Beispielen daher nicht die erhöhte Rep78/68-Expression verantwortlich gemacht werden. Die Cap-Expression und die rAAV-Ausbeute gehen auch dann zurück, wenn der p5-Promotor in einem *rep* und *cap* tragenden Helferplasmid gegen einen schwächeren Promotor ausgetauscht wird (Grimm *et al.*, 1998; Kapitel 3.7).

Auch wenn die in Vincent *et al.* und Li *et al.* gemachten Beobachtungen andere Gründe haben, soll nicht ausgeschlossen werden, dass Rep78/68 unter bestimmten Bedingungen die Produktion von rekombinalem AAV negativ beeinflussen kann. Für die Aktivierung der AAV-Promotoren und die Replikation der rAAV-DNA ist eine bestimmte Menge an Rep78/68 erforderlich. Wird diese Menge unterschritten, geht die Ausbeute an rekombinalem AAV zurück. So führte die Umwandlung des Rep78/68-Startcodons in die Sequenz ACG in einem *rep* und *cap* tragenden Helferplasmid nicht nur zu einer minimalen Rep78/68-Expression (Kapitel 3.6.2), sondern auch zu einer stark verminderten Cap-Expression (Kapitel 3.6.2), einer verringerten rAAV-DNA-Replikation (Kapitel 3.6.4) und zu einem Rückgang der rAAV-Ausbeute (Kapitel 3.6.5). Dieses Bild ergab sich sowohl mit HSV als auch mit Adenovirus als Helfer. Die für die Aktivierung der AAV-Promotoren und die Replikation der rAAV-DNA

erforderliche Rep78/68-Menge ist allerdings sehr gering. Die Rep78/68-Expression kann in einem *rep* und *cap* tragenden Helferplasmid sehr weit reduziert werden, ohne dass diese Grenze unterschritten wird (Kapitel 3.8.2, 3.8.4, 3.8.5). Bei relativ geringer AAV-Genexpression, z.B. wenn Adenovirus als Helfer eingesetzt wird, ist es vermutlich auch sinnvoll, diesen Spielraum auszunutzen, da Rep78/68 anderenfalls die Cap-Expression und dadurch die Ausbeute an rekombinantem AAV senken kann. Dies könnte wie in Trempe *et al.* vorgeschlagen auf Ebene der Translation erfolgen (Trempe *and* Carter, 1988). Setzt man HSV als Helfer ein, erhält man bei gleicher Menge des *rep* und *cap* tragenden Helferplasmids eine sehr viel stärkere AAV-Genexpression als mit Adenovirus als Helfer (Daten nicht gezeigt). Die Cap-Expression und die Ausbeute an rekombinantem AAV werden in diesem System weder durch eine gesteigerte (Kapitel 3.5), noch durch eine verminderte Rep78/68-Expression (Kapitel 3.8.2 und 3.8.5) beeinflusst, sofern die erforderliche Mindestmenge an Rep78/68 nicht unterschritten wird.

In Li *et al.* ist beschrieben, dass eine Umwandlung des Rep78/68-Startcodons in die Sequenz ACG eine verminderte Expression von Rep78/68 und dadurch eine erhöhte Expression der Cap-Proteine sowie eine verbesserte Ausbeute an rekombinantem AAV zur Folge haben soll (Li *et al.*, 1997). Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen und lässt sich vermutlich folgendermaßen erklären: Die AAV-Gene *rep* und *cap* sind in dem in Li *et al.* untersuchten Helferplasmid von adenoviralen *terminal repeats* flankiert, welche die AAV-Promotoren stimulieren (Samulski *et al.*, 1989). Möglicherweise werden aus diesem Grund trotz der ACG-Mutation noch ausreichende Mengen an Rep78/68 für die Aktivierung der p19- und p40-Promotoren und die Replikation der rAAV-DNA exprimiert. Die Einführung der ACG-Mutation hat in diesem Fall vermutlich sogar einen positiven Einfluss auf die rAAV-Ausbeute, da die durch die adenoviralen *terminal repeats* erhöhten Rep78/68-Level zumindest mit Adenovirus als Helfer sonst hemmend wirken können. Die stimulierende Wirkung der adenoviralen *terminal repeats* auf die AAV-Promotoren wird auch in folgendem in Grimm *et al.* beschriebenen Beispiel deutlich (Grimm *et al.*, 1998): Ein Austausch des p5-Promotors gegen den schwächeren *mouse mammary tumor virus long terminal repeat* (MMTV-LTR)-Promotor führte in einem *rep* und *cap* tragenden Helferplasmid zu einem Rückgang der Rep78/68-Expression und zu einem Rückgang der Cap-Expression. Wurden die so veränderten *rep/cap*-Sequenzen von adenoviralen *terminal repeats* (und adenoviralen Helfergen) flankiert, ließen sich dagegen erhöhte Cap-Level feststellen.

In einem Helferplasmid, dessen *rep*- und *cap*-Gene nicht von adenoviralen *terminal repeats* flankiert werden, hat die Umwandlung des Rep78/68-Startcodons in die Sequenz ACG einen

Rückgang sowohl der Rep78/68-Expression als auch der Cap-Expression zur Folge (Kapitel 3.6.2). Die verminderte Cap-Expression lässt sich damit erklären, dass der p40-Promotor durch die geringen Rep78/68-Mengen nicht ausreichend aktiviert wird. Dementsprechend führt eine zusätzliche Transfektion eines Rep78/68-exprimierenden Plasmids zu einem Anstieg der Cap-Expression auf normale Level (Kapitel 3.6.2). Im Kontext eines rekombinanten Herpesvirus, das die *rep*- und *cap*-Gene von AAV enthält, hat die Einführung der ACG-Mutation allerdings den gegenteiligen Effekt. So bewirkte die Umwandlung des Rep78/68-Startcodons in die Sequenz ACG und die daraus resultierende minimale Rep78/68-Expression in diesem Fall einen Anstieg der Cap-Expression (Kapitel 3.6.3). Bei Verwendung eines *rep* und *cap* tragenden Herpesvirus ist die Kopienzahl der AAV-Gene und damit die Menge an entstehenden AAV-Proteinen direkt an die DNA-Replikation des rekombinanten Herpesvirus gekoppelt. Da Rep78/68 HSV in seiner DNA-Replikation behindert, entstehen bei der Replikation von rHSVrepACG/cap, das minimale Mengen an Rep78/68 bildet, sehr viel mehr Kopien der AAV-Gene als bei der Replikation von rHSVrep/cap (Kapitel 3.6.6). Dies erklärt vermutlich die starke Cap-Expression von rHSVrepACG/cap. Wird in dieses System zusätzlich ein Rep78/68-exprimierendes Plasmid eingebracht, wird rHSVrepACG/cap in seiner DNA-Replikation behindert und die Menge an entstehenden Cap-Proteinen geht zurück (Kapitel 3.6.3). Bei Transfektion eines Rep- und Cap-exprimierenden Helferplasmids liegen von Anfang an viele Kopien der *rep*- und *cap*-Gene vor. In diesem Fall haben unterschiedliche Mengen an Rep78/68 eine unterschiedlich starke Aktivierung des p40-Promotors zur Folge, während bei den rekombinanten Herpesviren die replikationshemmende Wirkung der großen Rep-Proteine diesen Effekt überwiegt.

Trotz der verbesserten DNA-Replikation und erhöhten Rep52/40- und Cap-Expression von rHSVrepACG/cap ließ sich mit diesem Virus nicht mehr rekombinantes AAV produzieren als mit dem ursprünglichen Virus rHSVrep/cap (Kapitel 3.6.5). So erwies sich die von rHSVrepACG/cap exprimierte Rep78/68-Menge als zu gering für eine effiziente Replikation von rAAV-DNA (Kapitel 3.6.4). Für die beiden rekombinanten Herpesviren rHSVrep/cap und rHSVrepACG/cap könnte somit folgendes Modell gelten: rHSVrep/cap exprimiert zu viel Rep78/68, was die HSV-DNA-Replikation behindert. Dadurch bleibt auch die Kopienzahl der kolinearen AAV-Gene gering, so dass zu wenig *template* für die Expression von Rep52/40 und Cap vorliegt. rAAV-DNA wird in diesem System zwar effizient repliziert, kann aber nicht als Einzelstrang-DNA verpackt werden, da nicht genügend Rep52/40 und Cap zur Verfügung stehen. rHSVrepACG/cap exprimiert dagegen so wenig Rep78/68, dass diese Proteine im *Westernblot* kaum detektiert werden können. Die HSV-DNA-Replikation von rHSVrepACG/cap verläuft dadurch effizienter als bei rHSVrep/cap, so dass mehr Rep52/40-

und Cap-Proteine entstehen. Die Menge an Rep78/68 ist aber so gering, dass die Replikation der rAAV-DNA ineffizient wird.

Für die Produktion von rekombinantem AAV mit Hilfe eines *rep* und *cap* tragenden Herpesvirus ist die Menge an Rep78/68 somit von entscheidender Bedeutung. Einerseits muß die Rep78/68-Konzentration so niedrig wie möglich sein, damit das rekombinante Herpesvirus sich gut replizieren kann und genügend Kopien der AAV-Gene entstehen. Andererseits muß ausreichend Rep78/68 für die Replikation der rAAV-DNA zur Verfügung stehen.

4.3 Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus mit mittlerer Rep78/68-Expression

Die weiteren Versuche konzentrierten sich auf die Herstellung eines *rep* und *cap* tragenden Herpesvirus, dessen Rep78/68-Expression zwischen der von rHSVrep/cap und rHSVrepACG/cap liegt.

Zunächst wurde in Erwägung gezogen, den AAV p5-Promotor in rHSVrep/cap gegen einen schwächeren Promotor auszutauschen (Kapitel 3.7). Bereits in den Vorversuchen zeigte sich jedoch, dass nicht nur das im p5-Promotor gelegene *Rep binding element* (McCarty *et al.*, 1991), sondern weitere, bisher nicht charakterisierte Bereiche innerhalb des p5-Promotors für die Aktivierung der p19- und p40-Promotoren *in cis* verantwortlich sein müssen. Der Ansatz, den p5-Promotor durch einen schwächeren Promotor zu ersetzen, wurde aus diesem Grund nicht weiter verfolgt.

Stattdessen sollte wie schon bei der Umwandlung des Rep78/68-Startcodons in die Sequenz ACG eine Reduzierung der Rep78/68-Expression auf Ebene der Translation erreicht werden (Kapitel 3.8). Hierzu wurde die Sequenzumgebung des Rep78/68-Startcodons, welche für eine effiziente Erkennung des Translationsstartpunktes mitverantwortlich ist (Kozak, 1987), in einem *rep* und *cap* tragenden Helferplasmid auf verschiedene Weise verändert (Kapitel 3.8.1). Bei der Umwandlung des Rep78/68-Startcodons in die Sequenz ACG hatte sich gezeigt, dass dieses alternative Startcodon ein so schwaches Signal ist, dass hauptsächlich das auf der mRNA nächstgelegene AUG als Translationsstart benutzt wird. Der überwiegende Anteil an entstehenden großen Rep-Proteinen war daher N-terminal um 42 Aminosäuren verkürzt, während die Menge an Volllänge-Rep78/68 im *Westernblot* kaum detektiert werden konnte (Kapitel 3.6.2). Auch die Mutation der Sequenzumgebung des Rep78/68-Startcodons führte dazu, dass dieses Startcodon von einem Teil der Ribosomen nicht erkannt und erst am zweiten AUG der mRNA mit der Translation begonnen wurde. Je mehr dabei von der Kozak-Konsensussequenz abgewichen wurde, desto weniger Volllänge-Rep78/68 wurde zugunsten der verkürzten Proteine gebildet (Kapitel 3.8.2).

Die verkürzten großen Rep-Proteine sind vermutlich aufgrund einer veränderten Konformation nicht funktionell. So zeigte sich, dass diese Proteine weder die AAV-Promotoren aktivieren (Kapitel 3.8.3), noch rAAV-DNA replizieren können (Kapitel 3.8.4). Weiterhin sind die verkürzten großen Rep-Proteine nicht mehr in der Lage, HSV in seiner DNA-Replikation zu behindern (Kapitel 3.8.3). Für große Rep-Proteine, die N-terminal um 42

Aminosäuren verkürzt sind, wurde bereits beschrieben, dass sie keinerlei reprimierende Wirkung mehr auf heterologe Promotoren ausüben (Diplomarbeit Markus Hörer).

Zur Herstellung eines *rep* und *cap* tragenden Herpesvirus wurde ein als Kozak 3 bezeichnetes Konstrukt ausgewählt, das Volllänge-Rep78/68 und verkürzte Proteine zu etwa gleichen Anteilen exprimiert (Kapitel 3.8.2). Während bei der Konstruktion des Virus rHSVrepACG/cap, das minimale Mengen an funktionellem Rep78/68 exprimiert, auf ein zusätzliches Markergen verzichtet werden konnte, erwies sich dies bei einem Virus mit stärkerer Rep78/68-Expression als nicht möglich. Vermutlich hat ein *rep* und *cap* tragendes Herpesvirus ab einer bestimmten Menge an exprimiertem Rep78/68 einen so großen Replikationsnachteil gegenüber dem Wildtypvirus, dass ein Markergen erforderlich wird, um das rekombinante Herpesvirus zu finden. Das unter Verwendung eines Markergens hergestellte Virus rHSVK3SV40EGFP stellte sich als instabil heraus, was vermutlich auf die gegenläufige Anordnung der AAV-Promotoren zum Promotor des Markergens zurückzuführen ist (Kapitel 3.8.6). Trotzdem zeigte rHSVK3SV40EGFP die erwarteten Eigenschaften. So lag nicht nur die Rep78/68-Expression, sondern auch die Cap-Expression von rHSVK3SV40EGFP 48 Stunden nach Infektion zwischen der von rHSVrep/cap und rHSVrepACG/cap (Kapitel 3.8.7). 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. Auch bezüglich seiner Fähigkeit rAAV-DNA zu replizieren, lag rHSVK3SV40EGFP zwischen rHSVrep/cap und rHSVrepACG/cap (Kapitel 3.8.8). So korreliert die jeweils gebildete Menge an funktionellem Rep78/68 mit der Menge an replizierter rAAV-DNA. Während bei Verwendung des Virus rHSVrep/cap aber kaum rAAV-Einzelstrang-DNA entsteht, da nicht genügend Rep52/40- und Cap-Proteine vorhanden sind, ist der Anteil an rAAV-Einzelstrang-DNA an den übrigen Replikationsformen bei Verwendung von rHSVK3SV40EGFP deutlich höher. Im Vergleich zu den Viren rHSVrep/cap und rHSVrepACG/cap konnte mit rHSVK3SV40EGFP eine Steigerung der rAAV-Ausbeute um den Faktor 20 erzielt werden (Kapitel 3.8.9). 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 DNA-Replikation von rHSVK3SV40EGFP zu gewährleisten, so dass auch ausreichend Rep52/40- und Cap-Proteine für die Verpackung der rAAV-DNA gebildet werden.

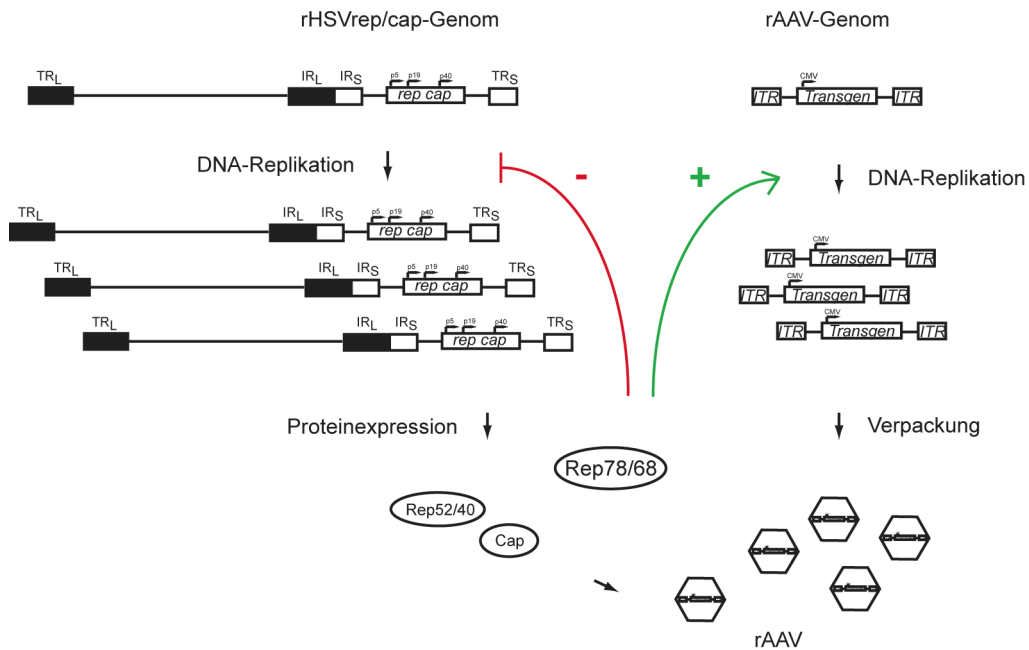


Abbildung 4.1: Produktion von rAAV mit einem die AAV-Gene *rep* und *cap* tragenden rekombinanten Herpesvirus (rHSVrep/cap). Das von rHSVrep/cap exprimierte Rep78/68 hemmt die HSV-DNA-Replikation und damit die Amplifizierung der AAV-Gene. Rep78/68 limitiert dadurch die Menge an zur Verfügung stehendem *template* für die Expression von Rep52/40 und Cap, welche für die Verpackung der rAAV-DNA erforderlich sind. Andererseits wird Rep78/68 für die DNA-Replikation des rekombinanten AAVs benötigt.

4.4 Herstellung eines verpackungsdefizienten rekombinanten Herpesvirus

Bei der Produktion von rekombinatem AAV mit dem Virus rHSVK3SV40EGFP wird nicht nur das rekombinante AAV, sondern auch rHSVK3SV40EGFP vermehrt. Zur Herstellung von rAAV-Vektorpräparationen, die das HSV-Helfervirus nicht enthalten, wurde parallel zur Konstruktion von rHSVK3SV40EGFP das Virus rHSV Δ 27K3SV40EGFP generiert, das im Unterschied zu rHSVK3SV40EGFP kein ICP27 exprimiert (Kapitel 3.9.1). ICP27 ist ein für HSV essentielles, multifunktionales *immediate early*-Protein, ohne das 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). Die Bildung infektiöser Viruspartikel findet in Abwesenheit von ICP27 daher nicht statt.

Für HSV-Mutanten, bei denen das Gen für ICP27 deletiert ist, wurde beschrieben, dass sie eine gegenüber dem Wildtypvirus verminderte Expression vieler HSV-Replikationsproteine und vermutlich aus diesem Grund eine reduzierte DNA-Replikation zeigen (Uprichard *and* Knipe, 1996; Rice *and* Knipe, 1990). Eine Deletion des Gens für ICP27 müsste demnach den durch Einführung der Kozak 3-Mutation erzielten positiven Effekt auf die rAAV-Ausbeute wieder etwas dämpfen. So führt die Reduktion der DNA-Replikation eines *rep* und *cap* tragenden rekombinanten Herpesvirus zu einem Rückgang der mit diesem Virus produzierten rAAV-Menge (Kapitel 3.5). Die Deletion des Gens für ICP27 scheint aber über einen anderen, bisher ungeklärten Mechanismus die Produktion von rekombinatem AAV positiv zu beeinflussen. Booth *et al.* konnten zeigen, dass mit einem *rep* und *cap* tragenden rekombinanten Herpesvirus sehr viel mehr rekombinantes AAV produziert wird, wenn in diesem Virus das Gen für ICP27 deletiert ist (Booth *et al.*, 2004). Dieses Ergebnis konnte bestätigt werden: Obwohl sich auch rHSV Δ 27K3SV40EGFP als instabil erwies und daher eine Viruspräparation verwendet werden musste, die dieses Virus nur anteilmäßig enthält, konnte mit rHSV Δ 27K3SV40EGFP eine weitere deutliche Erhöhung der rAAV-Ausbeute erzielt werden (Kapitel 3.9.2).

Die Deletion des Gens für ICP27 wirkt sich nur im Kontext eines *rep* und *cap* tragenden rekombinanten Herpesvirus günstig auf die Ausbeute an rekombinatem AAV aus. Werden die AAV-Gene *rep* und *cap* durch DNA-Transfektion bereitgestellt, ist ein ICP27-negatives Herpesvirus kein besserer Helfer als das Wildtypvirus (Kapitel 3.9.2). Dieser Befund lässt sich damit erklären, dass die Deletion des Gens für ICP27 in einem *rep* und *cap* tragenden rekombinanten Herpesvirus eine erhöhte Expression der AAV-Gene zur Folge hat (Kapitel 3.9.3). In einem System, in dem die AAV-Proteine nicht limitierend sind, wie es bei der

Transfektion eines Rep- und Cap-exprimierenden Helferplasmids der Fall ist, kann eine Deletion des Gens für ICP27 die Ausbeute an rekombinantem AAV demnach nicht weiter steigern. Weshalb die Deletion des Gens für ICP27 im Kontext eines *rep* und *cap* tragenden Herpesvirus zu einer erhöhten Expression der AAV-Gene führt, bleibt allerdings offen.

In Conway *et al.* (Conway *et al.*, 1999) werden zwei mögliche Gründe für den positiven Effekt der ICP27-Deletion genannt. Zum einen wird angeführt, dass ein rekombinantes Herpesvirus, bei dem das Gen für ICP27 deletiert ist, das für AAV wichtige Helferprotein ICP8 überexprimieren soll. Conway *et al.* beziehen sich bei dieser Aussage auf eine Arbeit von Rice und Knipe (Rice *and* Knipe, 1990). Eine spätere detailliertere Analyse derselben Gruppe ergab allerdings, dass die Deletion des Gens für ICP27 die Expressionslevel von ICP8 nicht signifikant beeinflusst (Uprichard *and* Knipe, 1996). In Kapitel 3.1.4 konnte zudem gezeigt werden, dass die HSV-Helferfunktionen bei der rAAV-Produktion mit Hilfe eines *rep* und *cap* tragenden rekombinanten Herpesvirus nicht limitierend sind. Eine erhöhte ICP8-Expression hätte daher vermutlich gar keine verbesserte Ausbeute an rekombinantem AAV zur Folge. Conway *et al.* vermuten außerdem, dass die Deletion des Gens für ICP27 das Spleißen der AAV-Transkripte verbessern könnte. So konnte gezeigt werden, dass ICP27 das Spleißen zellulärer pre-mRNAs behindert (Sandri-Goldin *and* Mendoza, 1992; McLauchlan *et al.*, 1992). Das Verhältnis von gespleißten zu ungespleißten AAV-Proteinen wirkt bei dem ICP27-negativen *rep* und *cap* tragenden rekombinanten Herpesvirus allerdings nicht verändert oder ungewöhnlich (Conway *et al.*, 1999). Möglicherweise lässt sich die erhöhte AAV-Genexpression eines ICP27-negativen *rep* und *cap* tragenden rekombinanten Herpesvirus auch damit erklären, dass in Abwesenheit von ICP27 die späten HSV-Genprodukte nicht gebildet werden und somit Transkriptions- und Translationsapparat für AAV zur Verfügung stehen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass mit einem die AAV-Gene tragenden rekombinanten Herpesvirus nur dann eine effiziente Ausbeute an rekombinantem AAV erzielt wird, wenn die Rep52/40- und Cap-Expression dieses Virus erhöht wird. Eine Möglichkeit, um dies zu erreichen, ist die Verbesserung der durch Rep78/68 reduzierten HSV-DNA-Replikation. Ein anderer bzw. zusätzlicher Weg, der zur Erhöhung der AAV-Genexpression führt, ist die Deletion des Gens für ICP27. Durch Einführung dieser Modifikationen können mit einem *rep* und *cap* tragenden rekombinanten Herpesvirus genauso hohe Vektorausbeuten erzielt werden wie mit einem herkömmlichen, Transfektions-basierten System. Eine weitere Steigerung der rAAV-Ausbeute wird erreicht, wenn das rAAV-Vektorgenom als Bestandteil eines zweiten rekombinanten Herpesvirus in die Zellen eingebracht wird (Kapitel 3.9.4). Die Koinfektion von Zellen mit einem modifizierten *rep* und *cap* tragenden rekombinanten

Herpesvirus und einem zweiten, das rAAV-Vektorgenom tragenden rekombinanten Herpesvirus stellt somit ein System dar, mit dem eine effiziente Produktion rekombinanter AAV-Vektoren möglich ist. Im Gegensatz zu den herkömmlichen, Transfektions-basierten Methoden lässt sich dieses System gut auf den Großmaßstab übertragen.

Wie bereits erwähnt, hatten sich rHSV_{K3SV40EGFP} und rHSV Δ _{27K3SV40EGFP} als instabil erwiesen, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass in diesen Viren die AAV-Promotoren in gegenläufiger Orientierung zum Promotor des Markergens angeordnet sind (Kapitel 3.8.6). Diese Konstellation wurde gewählt, um einen möglichst großen Abstand zwischen den AAV-Promotoren und dem Promotor des Markergens zu erzielen und auf diese Weise eine gegenseitige Beeinflussung der Promotoren zu vermeiden. So hatte sich bereits auf Plasmidebene gezeigt, dass die Expression von dem AAV p40-Promotor stark abgeschwächt ist, wenn AAV-Gene und Markergens in gleicher Orientierung hintereinander liegen (Daten nicht gezeigt). Vermutlich binden die meisten Transkriptionsfaktoren in diesem Fall nicht an den p40-Promotor, sondern bevorzugt an den stärkeren Promotor des Markergens. Mit zunehmendem Abstand zwischen AAV-Genen und Markergens werden die beschriebenen Wechselwirkungen zwischen den Promotoren geringer. Um eine gegenseitige Beeinflussung vollständig auszuschließen, müsste der Abstand zwischen AAV-Genen und Markergens und damit das in das HSV-Genom einzubringende DNA-Fragment aber sehr groß gewählt werden, was die Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus erschweren würde. Auch die Verwendung eines schwachen Promotors zur Expression des Markers ist wahrscheinlich keine Lösung, da dies die Suche nach einem positiven Virusplaque sehr mühsam oder sogar unmöglich machen würde. Zur Herstellung eines stabilen *rep* und *cap* tragenden Herpesvirus, das die erwähnten Modifikationen zur Verbesserung der rAAV-Ausbeute trägt, wurde daher ein Ansatz gewählt, bei dem Markergens und Promotor mit Hilfe von Flp-Rekombinase wieder entfernt werden können (Kapitel 3.9.5). Die nach der Rekombination im HSV-Genom verbleibende einzelne FRT-Sequenz wirkte sich überraschenderweise aber negativ auf die Cap-Expression des hergestellten Virus aus (Kapitel 3.9.6).

Möglicherweise hätte ein Markergens oder eine einzelne FRT-Sequenz keinen störenden Einfluß, wenn sie nicht wie bei den in dieser Arbeit konstruierten Viren hinter, sondern vor den AAV-Genen liegen würde. Eine andere Möglichkeit, das Problem zu umgehen, ist die Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus, das nur das Markergens enthält. In einem zweiten Schritt könnte das Markergens durch eine weitere homologe Rekombination gegen

die AAV-Gene ausgetauscht werden. In diesem Fall müsste ein Virusplaque gesucht werden, der das Markergen nicht exprimiert.

Parallel zur Konstruktion der rekombinanten Herpesviren durch direkte Ligation bzw. homologe Rekombination wurde eine weitere Methode zur Herstellung rekombinanter Herpesviren etabliert (Kapitel 3.10). Bei dieser Methode wird das als *Bacterial Artificial Chromosome* klonierte HSV durch homologe Rekombination in Bakterien verändert. Zurzeit wird an einer Erweiterung dieses Systems gearbeitet, die es ermöglicht, Mutationen innerhalb eines *Bacterial Artificial Chromosome* vorzunehmen, ohne dass unerwünschte Fremdsequenzen zurückbleiben.