

## 6 Anhang

### 6.1 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die Konstruktion und Untersuchung rekombinanter Herpes-Simplex-Viren (HSV), welche die Gene *rep* und *cap* des Adeno-assoziierten Virus Typ 2 (AAV-2) tragen. Mit Hilfe dieser Viren können rekombinante AAV-2-Vektoren für die Gentherapie durch Infektion hergestellt werden – ein Verfahren, das sich im Gegensatz zu herkömmlichen Produktionsmethoden gut auf den Großmaßstab übertragen lässt.

Als problematisch erwies sich in diesem Zusammenhang die hemmende Wirkung der AAV-Proteine Rep78/68 auf die HSV-DNA-Replikation. Direkt gekoppelt an die DNA-Replikation der rekombinanten Herpes-Simplex-Viren ist die Anzahl der entstehenden AAV-Genkopien und damit die Menge an zur Verfügung stehenden AAV-Proteinen. Bei nicht reduzierter Rep78/68-Expression werden aus diesem Grund die für die Verpackung der rekombinanten AAV-DNA erforderlichen Proteine Rep52/40 und Cap nicht in ausreichender Menge gebildet. Eine zu schwache Rep78/68-Expression hat andererseits eine ineffiziente Replikation der rekombinanten AAV-DNA zur Folge. Durch Mutation der Sequenzumgebung des Rep78/68-Startcodons konnte eine mittlere Rep78/68-Expressionsmenge gefunden werden, die sowohl die Replikation der rekombinanten AAV-DNA als auch der rekombinanten HSV-DNA in ausreichendem Maße ermöglicht. Zusätzlich wurde die Ausbeute an rekombinanten AAV-Vektoren durch Verwendung eines ICP27-negativen rekombinanten Herpesvirus gesteigert.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit ein *rep* und *cap* tragendes Herpes-Simplex-Virus konstruiert werden, mit dessen Hilfe rekombinante AAV-Vektoren effizient produziert werden können. Eine Methode zur Herstellung rekombinanter Herpes-Simplex-Viren mit verbesserter Stabilität wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit etabliert.

## 6.2 Summary

The topic of this work was the construction and investigation of recombinant Herpes simplex viruses (HSV) encoding the *rep* and *cap* genes of Adeno-associated virus type 2 (AAV-2). With the help of these viruses recombinant AAV-2 vectors for gene therapy can be produced by infection – a procedure which in contrast to conventional methods can be easily scaled up.

In this context the inhibiting effect of the AAV proteins Rep78/68 on HSV DNA replication turned out to be a problem. The DNA replication of the recombinant Herpes simplex viruses is directly coupled to the amount of generated AAV gene copies and thus to the amount of AAV proteins available. For this reason the Rep52/40 and Cap proteins necessary for packaging the recombinant AAV DNA are not produced in sufficient quantities when expression of Rep78/68 is not reduced. On the other hand an efficient replication of rAAV DNA is not possible when Rep78/68 protein levels are too low. By mutating the sequence around the Rep78/68 startcodon a medium expression of Rep78/68 could be achieved, which allows the replication of the recombinant HSV DNA as well as the recombinant AAV DNA to sufficient quantities. In addition the yield of rAAV vectors could be further improved by using an ICP27 negative recombinant HSV strain.

The result of this work is a *rep* and *cap* containing Herpes simplex virus which allows an efficient production of recombinant AAV vectors. A method for generating recombinant Herpes simplex viruses with improved stability was established, too.