

2 MATERIALIEN UND GERÄTE

2.1 GERÄTE

Neben Geräten, die zur Standardausrüstung eines Labors gehören, wurden ein Geldokumentationssystem (Pharmacia), das Spektralphotometer DU-530 (Beckmann), der Ultraschall-Desintegrator Sonifier 450 (Branson), der Hybridisierungs-ofen Mini Oven MK II (MWG Biotech), der Kontaminationsmonitor LB122 (β - und γ -Detektor von Berthold), ein Elektroporationsgerät (Bio-Rad), der Brutschrank B6120 (Heraeus Sepatech), der Inkubationsschüttler Model G25 (New Brunswick Scientific), die Entwicklermaschine Curix 60 (Agfa), die PCR-Geräte Gene Amp® PCR System 1700 und 2400, der UV Stratalinker 2400 (Stratagene) sowie der Phosphorimager Storm 840 (Molecular Dynamics) verwendet. Die Zentrifugen Avanti™ J-25 mit dem Rotor JLA 16250 (Beckmann), die Vakuum-zentrifuge DNA Speed Vac DNA 110 (Savant), die Sigma-Ausschwingzentrifuge 3-10, die Zentrifuge 5417R von Eppendorf sowie die Megafuge 3.OR (Heraeus Sepatech) kamen zum Einsatz. Für die Zellkultur fanden die Sterilbank Technoflow 2F 180-II GS (Integra Biosciences) und ein Inkubator (Forma Scientific) Verwendung. Als Mikroskope dienten das inverse Lichtmikroskop CK2 (Olympus), das inverse Fluoreszenz-Mikroskop DMIL (Leica) und das konfokale Zeiss LSM Fluoreszenzmikroskop.

2.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Laborchemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) bezogen. Zellkulturmedien und fötales Kälberserum (1x FCS) stammten von der Firma Gibco BRL (Karlsruhe). Rinderserumalbumin (10xBSA) wurde bei der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Photochemikalien bei der Firma Agfa (München) bestellt. Bacto™ Trypton, Bacto™ BBL Yeast-Extract und granuliertes Agar-Agar stammten von Becton, Dickinson & Company (Sparks, USA), Biogel® P10 von Bio-Rad (München). N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES) wurde bei Calbiochem (La Jole, CA) und Penicillin/Streptomycin bei Biochrom AG (Berlin) bestellt.

[α - ^{32}P]dCTP (3000 Ci/mmol; 110 TBq/mmol) und Full Range RainbowTM protein molecular weight Marker 800 wurden von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen. Der Größenmarker Gene RulerTM 1 kbp DNA Ladder stammte von MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

Die Alkalische Phosphatase Calf Intestinal (CIP), Restriktionsendonukleasen und die T4 DNA Ligase stammten von New England Biolabs (Frankfurt am Main), RNase und Lysozym von Sigma (Taufkirchen). Die Proteinase K wurde bei Roth (Karlsruhe) und Trypsin/EDTA bei der Biochrom AG (Berlin) bestellt.

Alle Lösungen, Puffer und Medien wurden mit zweifach destilliertem Wasser (bidest.) angesetzt und werden bei den jeweiligen Methoden beschrieben. Ausnahmen werden gesondert im Methodenteil erwähnt. Häufig verwendete Puffer wurden nach der Methodensammlung von Sambrook und Asubel (Sambrook *et al.*, 1989; Asubel *et al.*, 1987) hergestellt. Zur Sterilisierung wurden Lösungen, sofern die Bestandteile eine Hitzebehandlung erlaubten, bei 121 °C und 2 at für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.3 KITS

Die während dieser Arbeit verwendeten fertigen Reaktionssysteme (Kits) sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Produktname	Verwendung	Hersteller
Expand High Fidelity PCR System	Mutagenese von pCM-UL5 (s. 3.1.14.1, 4.3.1)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Lipofectamine TM Reagent Plus TM Reagent	Transfektion von HeLa-Zellen (s. 3.2.4)	Invitrogen (Karlsruhe)
Qiagen Plasmid Midi und Maxi Kit	Präparation von Plasmid-DNA (s. 3.1.6)	Qiagen (Hilden)
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Mutagenese von pCM-UL5 und pCM-UL52 (s. 3.1.14.2, 4.2.1, 4.3.1)	Stratagene Europe (Amsterdam)

Rediprime II DNA Labeling System	Herstellung einer radio-aktiven Sonde (s. 3.1.16)	Amersham Biosciences (Freiburg)
Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Auswertung von Western Blots (s. 3.3.2)	Pierce (Rockford, USA)

Tab. 2.1 : Verwendete Kits

2.4 ANTIKÖRPER

Primärantikörper:

ATCC HB-8180 (anti-ICP8)

ATCC (Rockville)

Referenz: Showalter *et al.*, 1981

polyklonaler Anti-rabbit Rep-Ak

erhalten von Jim P. Trempe;

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Ohio, Toledo

Anti-UL5-Antikörper:

mAk 17, mAk 59,
mAk 81, mAk 125,
mAk 152, mAk 209,
mAk 246, mAk 367,
mAk 376, mAk 385,
mAk 386, mAk 413

erhalten von Nigel D. Stow;
MRC Virology Unit, Institute of Virology, Glasgow;
Bis auf mAk 14462 wurden die Antikörper bisher noch nicht auf ihre Spezifität getestet (s. 4.1.2).

Referenz: s. Anhang 8.1

Anti-UL52-Antikörper:

mAk 14462

Sekundärantikörper:

Fab Goat Anti-mouse (H+L) FITC

Dianova (Hamburg)

IgG Goat Anti-rabbit (H+L) TRITC

Dianova (Hamburg)

Fab/Fc Goat Anti-mouse IgG (H+L), Peroxidase-konjugiert

Dianova (Hamburg)

2.5 OLIGONUKLEOTIDE

Alle benötigten Oligonukleotide für die Einbringung von Punktmutationen in die HSV-Helicase bzw. Primase wurden durch die Firma MWG Biotech in Ebersberg synthetisiert.

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
Verwendete Primer für die Mutagenese von UL52:		
Primer I (D628Q)	CACAAACATCATCCTG <u>C</u> A <u>A</u> CTCGACATCGC CCTGAAG	Mutagenese von pCM- UL52 im DXD-Motiv
Primer II (D628Q)	CTTCAGGGCGATGTTCGAG <u>T</u> <u>T</u> GAGGATGAT GTTTGTG	(s. 3.1.14.2, 4.2.1)
Primer I (D630A)	CATCATCCTGGATCTCG <u>C</u> ATCGCCCTGAA	Mutagenese von pCM-
Primer II (D630A)	GGAGC GCTCCTTCAGGGCGATGG <u>C</u> GAGATCCAGG ATGAG	UL52 im DXD-Motiv (s. 3.1.14.2, 4.2.1)
Verwendete Primer für die Mutagenese von UL5 an den Stellen (G101V) und (K102A):		
Äußerer Primer I	CTTCGTGAGGTCCAAAAT	Mutagenese von pCM-
Äußerer Primer IV	CATCTACGTATTAGTCAT	UL5 in Motiv I (s. 3.1.14.1, 4.3.1)
Innerer Primer (G101V) II	GCTCTTT <u>A</u> CGGAGCCAGCGTTGCCGGT	Mutagenese von pCM- UL5 in Motiv I
Innerer Primer (G101V) III	GCTGGCTCCG <u>T</u> AAAGAGCACGTGCGTGCA G	(s. 3.1.14.1, 4.3.1)
Innerer Primer (K102A) II	CGTGCTC <u>G</u> CTCCGGAGCCAGCGTTGCC	Mutagenese von pCM- UL5 in Motiv I
Innerer Primer (K102A) III	GGCTCCGGAG <u>C</u> GAGCACGTGCGTGCAGAC A	(s. 3.1.14.1, 4.3.1)
Verwendete Primer für die Mutagenese von UL5 an den Stellen (R345K):		
Primer I (R345K)	CTCGTGCTCGACGCACT <u>T</u> TTTGTGTTAATA AAAATGGC	Mutagenese von pCM- UL5 in Motiv IV
Primer II (R345K)	GCCATTTTTATTAACAACAAAA <u>A</u> GTGCGTC GAGCACGAG	(s. 3.1.14.2, 4.3.1)

Tab. 2.2: Primersequenzen. Veränderte Basenpaare sind unterstrichen.

2.6 PLASMIDE

Die folgenden Plasmide kamen im Rahmen der Mutagenese sowie der Replikations-, Transfektions- und Infektionsassays zum Einsatz.

Name	Beschreibung	Herkunft (Referenz)
pBluescript II SK(+)	eingesetzt zur Klonierung und als Leervektor	Stratagene (Amsterdam)
pCM-UL5	enthält die HSV-Helicase UL5 unter CMV-Promotor-Kontrolle	Labor AG Heilbronn (Heilbronn <i>et al.</i> , 1989)
pCM-UL5(G101V)	enthält eine Punktmutation in Motiv I von UL5	kloniert aus pCM-UL5 (s. 4.3.1)
pCM-UL5(K102A)	enthält eine Punktmutation in Motiv I von UL5	kloniert aus pCM-UL5 (s. 4.3.1)
pCM-UL5(R345K)	enthält eine Punktmutation in Motiv IV von UL5	kloniert aus pCM-UL5 (s. 4.3.1)
pCM-UL8	enthält UL8 von HSV unter CMV-Promotor-Kontrolle	Labor AG Heilbronn (Heilbronn <i>et al.</i> , 1989)
pCM-UL9	codiert das <i>origin-binding protein</i> von HSV unter CMV-Promotor-Kontrolle	Labor AG Heilbronn (Heilbronn <i>et al.</i> , 1989)
pCM-UL29	codiert das <i>single-strand DNA-binding protein</i> ICP8 von HSV unter CMV-Promotor-Kontrolle	Labor AG Heilbronn (Heilbronn <i>et al.</i> , 1989)
pCM-UL30	codiert die DNA-Polymerase von HSV unter CMV-Promotor-Kontrolle	Labor AG Heilbronn (Heilbronn <i>et al.</i> , 1989)
pCM-UL42	codiert den <i>processivity factor</i> der HSV-Polymerase unter CMV-Promotor-Kontrolle	Labor AG Heilbronn (Heilbronn <i>et al.</i> , 1989)
pCM-UL52	enthält die HSV-Helicase UL5 unter CMV-Promotor-Kontrolle	Labor AG Heilbronn (Heilbronn <i>et al.</i> , 1989)
pCM-UL52(D628Q)	enthält eine Punktmutation im DXD-Motiv der HSV-Primase	kloniert aus pCM-UL52 (s. 4.2.1)
pCM-UL52(D630A)	enthält eine Punktmutation im DXD-Motiv der HSV-Primase	kloniert aus pCM-UL52 (s. 4.2.1)
pF1 UL52(CC3,4AA)	enthält eine UL52-Zinkfinger-Punktmutation unter CMV-Promotor-Kontrolle	S. K. Weller (Biswas <i>et al.</i> , 1999)

pH10	enthält den <i>ori_s</i> von HSV	Labor AG Heilbronn (Heilbronn <i>et al.</i> , 1990)
pEYFP-C1	codiert das <i>yellow fluorescent protein</i> (YFP) unter CMV-Promotor-Kontrolle	BD Biosciences Clontech (Heidelberg)
pTAV2-0	auf pBluescript II SK(+) basierendes Plasmid mit vollständigem Wildtyp-AAV-2- Genom	Labor AG Heilbronn (Heilbronn <i>et al.</i> , 1990)
pΔTR	AAV-2-Genom ohne die <i>inverted terminal repeats</i> in pBluescript II SK(+)	Labor AG Heilbronn
pCMV-Rep	codiert Rep78 unter CMV-Promoter-Kontrolle	Labor AG Heilbronn

Tab. 2.3: Verwendete Plasmide

2.7 BAKTERIENSTÄMME

Folgende *Escherichia coli*-Stämme wurden zur Plasmidtransformation und -amplifikation verwendet:

E. coli-Stamm	besondere Merkmale	Genotyp	Herkunft/Referenz
K12 GM2163	nicht methylierender Stamm	F ⁻ ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL136 dam13:: Tn9 xylA5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
HB101	<i>E. coli</i> K12 x <i>E. coli</i> B - Hybrid	supE44 ara14 galK2 lacY1 Δ(gpt-proA)62 rpsL20 (Str ^r) xyl-5 mtl-1 recA13 Δ(mcrC- mar) HsdS ^(r⁻m⁻)	Labor AG Heilbronn (Boyer <i>et al.</i> , 1969)
XL1-Blue supercompetent cells	rekombinationsdefizienter Stamm	RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F ['] proAB lacI ^q ZΔM15Tn10(Te t ^r)]	Stratagene (Amsterdam)

Tab. 2.4: Verwendete *E. coli*-Stämme

2.8 ZELLINIE

HeLa-Zelllinie

humane Cervixcarcinomzellen

Referenz: Gey *et al.*, 1952

2.9 VIREN

Name	Besondere Merkmale	Titer (pfu/ml)	Herkunft (Referenz)
HSV1802	HSV mit singulärer XbaI- <i>Site</i> im Genom	$2,5 \times 10^7$	Labor AG Heilbronn (Rixon <i>et al.</i> , 1990)
hr99	UL5-negatives HSV	$2,5 \times 10^8$	S. K. Weller, University of Connecticut Health Center, Farmington, USA (Zhu <i>et al.</i> , 1992a)
hr114	UL52-negatives HSV	3×10^7	Labor AG Heilbronn (Goldstein <i>et al.</i> , 1988)

Tab. 2.5: Verwendete Viren

2.10 COMPUTERSOFTWARE

Alle Arbeiten erfolgten an Macintosh-Computern. Microsoft Office XP (Microsoft) wurde für Textarbeiten und Tabellenkalkulationen verwendet. Zeichnungen und Abbildungen wurden mit den Programmen Adobe Photoshop CS und Adobe Illustrator CS (Adobe Systems Inc.) erstellt. Zur Planung von Klonierungen, PCR(s) und zur Erstellung von Plasmidkarten diente Gene Construction Kit™ 2 Version 2.0.8 von Textco Inc. Für die quantitativen Southern Blot-Auswertungen wurden die Programme Storm Scanner Control sowie Image Quant 5.1 (Molecular Dynamics) verwendet. Die Immunfluoreszenzdaten wurden mit den Programmen LSM Image Browser (Zeiss) und IPLab Scientific Imaging Software Version 3.5 (Scanalytics Inc.) ausgewertet.