

4 ERGEBNISSE

4.1 VORBEREITENDE EXPERIMENTE

Bevor mit der Untersuchung des Einflusses der enzymatischen Aktivitäten der HSV-Helicase UL5 und -Primase UL52 auf die AAV-DNA-Replikation begonnen werden konnte, mussten verschiedene Vorexperimente durchgeführt werden. Zu diesen gehörten:

1. Die Etablierung eines AAV-DNA-Replikationsassays, 2. die Charakterisierung von Antikörpern gegen HSV- und AAV-Proteine für Western Blot- sowie für Immunfluoreszenzanalysen sowie 3. die Etablierung und Validierung eines Immunfluoreszenzassays zur Analyse der Kolokalisation von HSV-ICP8 mit AAV-Rep.

4.1.1 UNTERSUCHUNG DER FÜR DIE AAV-DNA-REPLIKATION MINIMAL ERFORDERLICHEN HSV-HELFERGENE

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass vier HSV-Helfergene für eine minimale AAV-DNA-Replikation ausreichen. Diese Gene codieren das *single-strand DNA-binding protein* ICP8 (UL29) sowie den Helicase-Primase-Komplex, bestehend aus der Helicase UL5, UL8 und der Primase UL52. Durch zusätzliche Expression des HSV-Polymerasekomplexes UL30/UL42 wird die AAV-DNA-Replikation deutlich erhöht (Weindler *et al.*, 1991).

Zur Etablierung des in dieser Arbeit verwendeten AAV-DNA-Replikationsassays wurde zunächst der Versuch von Weindler *et al.* (1991) wiederholt und auch erstmalig mittels Phosphorimageranalyse quantifiziert. Dazu wurden Zellen mit den essenziellen HSV-Helfergenen und dem für AAV-2 codierendem Plasmid pTAV2-0 transfiziert. In einem zweiten Versuch wurden zu den essenziellen Helfergenen noch zusätzlich die HSV-Polymerase UL30 und der *processivity factor* UL42 kotransfiziert. Die eingebrachte methylierte DNA wurde mittels DpnI-Verdau abgebaut.

Das Auftreten nicht methylierter DpnI-resistenter replikativer AAV-Formen, die hauptsächlich aus der monomeren RF1-Form (RF1) und der dimeren RF2-Form (RF2) bestanden (s. 1.2.3.4), konnte nur nach Transfektion aller vier in den vorausgegangenen Studien als essenziell identifizierten Helfergene beobachtet werden (Abb. 4.1A, Spur 7). Die Zugabe der HSV-Polymerase UL30 und des *polymerase accessory protein* UL42 führte zu

einer 10 bis 11-fachen Steigerung der AAV-DNA-Replikation, was auch zu der Überexposition der Spur 2 gegenüber der Spur 3 in Abb. 4.1B führte.

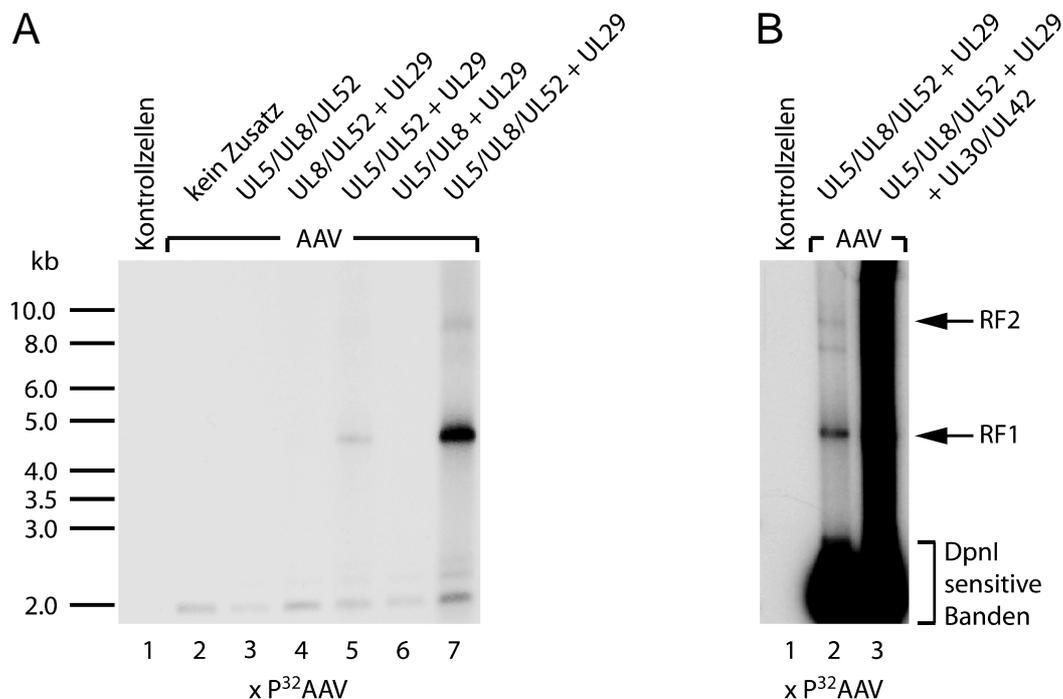


Abb. 4.1: (A) AAV-DNA-Replikation nach Kotransfektion der minimal benötigten HSV-Helfergene. 2×10^6 HeLa-Zellen wurden mit je $1,5 \mu\text{g}$ der HSV-Helfergene und $3 \mu\text{g}$ pTAV2-0 transfiziert. Die DNA wurde mittels Hirt-Extraktion gewonnen, mit DpnI verdaut und im Southern Blot eingesetzt. Als Sonde diente ein Fragment aus pTAV2-0 (s. 3.1.16).

(B) Einfluss des HSV-Polymerasekomplexes auf die AAV-DNA-Replikation. Die replikativen DNA-Formen RF1 und RF2 in den Spuren 1, 2 und 3 wurden mittels Phosphorimager quantifiziert. Für Spur 2 ergab sich für die Summe der Intensitäten der replikativen DNA-Formen RF1 und RF2 der Wert 8,3 % in Relation zu Spur 3.

4.1.2 CHARAKTERISIERUNG VON MONOKLONALEN UL5- UND UL52-ANTIKÖRPERN

Um die Expression transfizierter HSV-Genkonstrukte zu kontrollieren, wurden bislang ungetestete monoklonale Antikörper (mAk) gegen die HSV-Primase (UL52) und Helicase (UL5), welche uns von Nigel D. Stow (Institute of Virology, Glasgow, U.K.) zur Verfügung gestellt wurden, untersucht (s. 2.4, 8.1).

Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität der Antikörper wurden Zellen transient mit UL5 bzw. UL52 transfiziert und die entsprechenden Proteinextrakte im Western Blot mit den verschiedenen Antikörpern markiert.

Mit dem UL52-Antikörper mAk 14462 sowie keinem der UL5-Antikörper konnte ein spezifisches Signal nach UL52-Expression detektiert werden (Abb. 4.2A). Hingegen zeigten die Antikörper mAk 152, 376 und 386 eine sehr starke spezifische Reaktion gegen UL5 (Abb. 4.2B). Bei weiteren Experimenten zeigten diese keine Kreuzreaktionen zu zellulären Proteinen aus HeLa-Zellen und zu anderen HSV- oder AAV-Proteinen (ohne Abbildungen). Für die weiteren Analysen wurde primär der mAk 152 in einer Verdünnung von 1:15 verwendet.

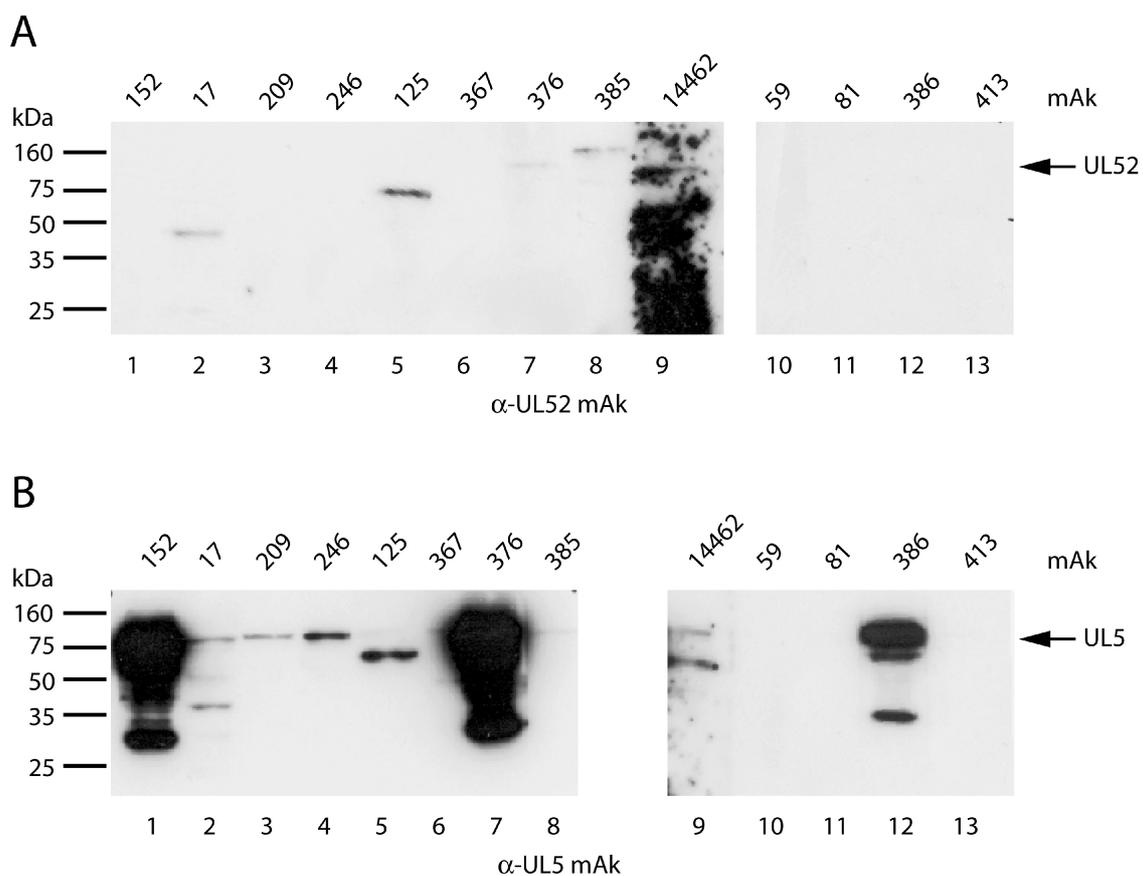


Abb. 4.2: Analyse der Spezifität und Sensitivität von Antikörpern gegen (A) UL52 und (B) UL5. 2×10^6 HeLa-Zellen wurden mit je $12 \mu\text{g}$ UL52 bzw. UL5 transfiziert und die Proteinextrakte mittels SDS-Page aufgetrennt. Nach Ponceaurotfärbung wurden die Nitrocellulosemembranen zerschnitten und die einzelnen Streifen mit den verschiedenen mAk (1:15 in Milch verdünnt) für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Streifen wieder aneinandergelegt und mit einem peroxidase markierten Sekundäntikörper (1:2000 in Milch verdünnt) für weitere 1,5 h inkubiert. Die sich anschließende lichtaussendende Peroxidasereaktion wurde auf einem Röntgenfilm festgehalten.

Die Antikörper wurden auch auf ihre Tauglichkeit für die Immunfluoreszenz getestet. Dies setzte voraus, dass die Proteine in ihrer natürlichen Konformation erkannt wurden. Zellen

wurden, wie im Methodenteil beschrieben, auf Deckgläschen ausgesät, mittels Lipofectamin mit UL5 oder UL52 transfiziert und fixiert.

Keiner der getesteten Antikörper eignete sich für die Immunfluoreszenz, da sich nach der Inkubation mit den Primärantikörpern von Nigel D. Stow sowie einem entsprechenden fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper keine Signale im Nukleus in der Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisen ließen (ohne Abbildung).

4.1.3 ANALYSE DER BENÖTIGTEN HSV-HELFERGENE FÜR EINE KOLOKALISATION VON REP MIT ICP8

Da sich die Antikörper von Nigel D. Stow nicht für die Immunfluoreszenz eigneten, wurde ein indirekter Nachweis für die Kolokalisation des Helicase-Primase-Komplexes mit ICP8 und AAV-Rep etabliert.

Heilbronn *et al.* (2003) konnten zeigen, dass ICP8 und AAV-Rep in Gegenwart eines AAV-ssDNA-Genoms nach HSV/AAV-Koinfektion in subnukleären HSV-Replikationszentren kolokalisieren. Diese Daten legten nahe, dass AAV in den von HSV gebildeten Replikationskompartimenten repliziert. Für die Ausbildung der HSV-Replikationskompartimente wird der Helicase-Primase-Komplex und ICP8 benötigt (s. 1.3.2.3, 5.1) (Lukonis *et al.*, 1996, 1997; Liptak *et al.*, 1996).

Der Nachweis einer Kolokalisation von Rep mit ICP8 spricht somit für die Akquirierung des Helicase-Primase-Komplexes in die HSV-Replikationskompartimente.

4.1.3.1 CHARAKTERISIERUNG DER IN DER IMMUNFLUORESZENZ BENÖTIGTEN ANTI-KÖRPER GEGEN ICP8 UND REP

Zunächst wurden die für die Immunfluoreszenz benötigten Primär- und Sekundärantikörper auf Spezifität und Sensitivität getestet. Gegen AAV-Rep wurde ein polyklonaler Anti-rabbit Rep-Ak sowie gegen ICP8 der monoklonale Anti-mouse HB8180 verwendet. Als Sekundärantikörper dienten ein mit TRITC konjugierter Anti-mouse- und ein mit FITC konjugierter Anti-rabbit-Ak (s. 2.4).

Zellen wurden mit den vier HSV-Genen UL5/UL8/UL52 (Helicase-Primase-Komplex) und UL29 (ICP8) bzw. mit einem unter CMV-Promotor stehenden *Rep78*-tragendem Plasmid (pCMV-Rep) transfiziert. Die Zellen wurden dann mit jeweils verschiedenen Antikörpern markiert, um unspezifische Bindungen, Kreuzreaktionen sowie ein Überstrahlen von immunfluoreszenzmarkierten Antikörpern in den jeweils anderen Kanal auszuschließen.

Während sich nach Transfektion des Helicase-Primase-Komplexes und ICP8 mit dem monoklonalen ICP8-Antikörper HB-8180 nukleäre HSV-Replikationskompartimente nachweisen ließen (Abb. 4.3, B), zeigten der verwendete polyklonale Rep-Antikörper und der TRITC-konjugierte Detektionsantikörper keine Kreuzreaktionen (Abb. 4.3, C). Umgekehrt konnte man nach alleiniger Expression des AAV-Rep78-Proteins ausschließlich eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem polyklonalen Rep-Antiserum (Abb. 4.3, D), jedoch keinerlei Kreuzreaktion des monoklonalen ICP8-Antikörpers oder des verwendeten FITC-markierten Detektionsantikörpers beobachten (Abb. 4.3, E). Eine Kreuzreaktivität der beiden Primär- und auch der verwendeten Sekundärantikörper mit zellulären Proteinen konnte

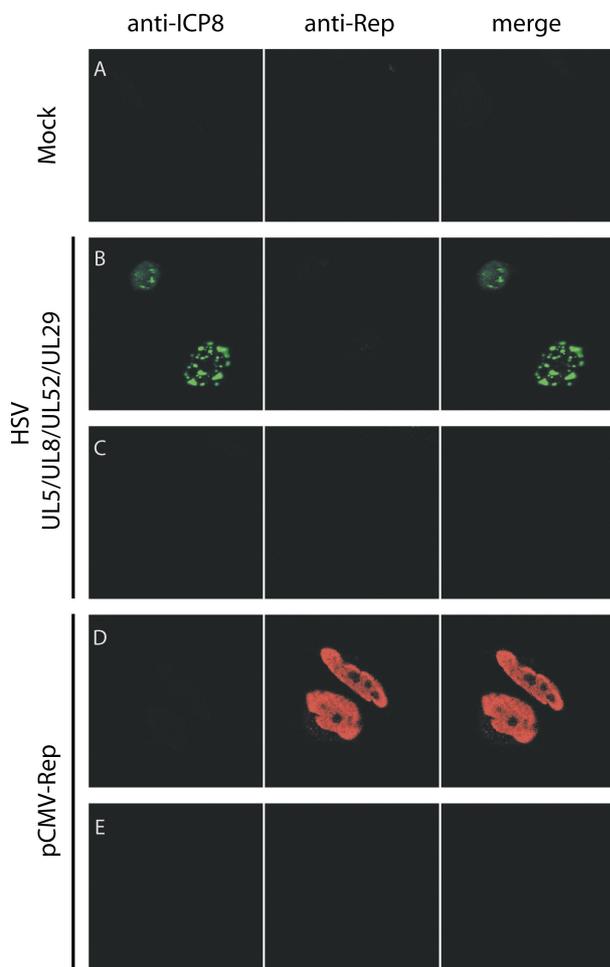


Abb. 4.3: Überprüfung der verwendeten Rep- und ICP8-Antikörper.

Nicht transfizierte (A) bzw. mittels Lipofectamin transfizierte (0,4 µg je Gen) HeLa-Zellen (B-E) wurden nach 19 h mit Formaldehyd/Triton X-100 wie im Methodenteil beschrieben fixiert, permeabilisiert und markiert (s. 3.3.3).

In (B) und (C) wurden die vier minimalen HSV-Helfergene UL5/UL8/UL52/UL29 und in (D) und (E) das AAV-*rep78*-Gen unter CMV-Promotor-Kontrolle transfiziert.

Folgende Antikörperkombinationen wurden verwendet:

(A) α -ICP8, FITC bzw. α -Rep, TRITC

(B) α -ICP8, FITC, TRITC

(C) α -ICP8, α -Rep, TRITC

(D) α -Rep, FITC, TRITC

(E) α -Rep, α -ICP8, FITC

Die Auswertung erfolgte mit dem konfokalen Zeiss LSM Mikroskop bei einer Laserwellenlänge von 488 nm für FITC (grün) und 543 nm für TRITC (rot). Die Bilder repräsentieren jeweils einen 0,6 µm dicken Schnitt. Ein berechneter *merge* zwischen Rep und ICP8 würde gelb erscheinen.

mithilfe von nicht transfizierten Zellen (Mock) ausgeschlossen werden (Abb. 4.3, A). Alle untersuchten Primär- und Sekundärantikörper waren sensitiv und spezifisch, konnten also für die nachfolgenden Immunfluoreszenzanalysen verwendet werden.

4.1.3.2 MINIMAL BENÖTIGTE KOMPONENTEN FÜR DIE KOLOKALISATION VON REP MIT ICP8

Um die für die Kolokalisation zwischen Rep und ICP8 minimal benötigten Komponenten zu definieren, wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen AAV-Plasmiden sowie mit den für die AAV-DNA-Replikation essenziellen HSV-Genen UL5/UL8/UL52 und UL29 (ICP8) kotransfiziert. Es wurde bereits gezeigt, dass diese vier Genprodukte für die Ausbildung der präreplikativen HSV-Komplexe, Stadium IIIa, ausreichend sind (Liptak *et al.*, 1996).

Wie bei der HSV-Infektion kolokalisierte das AAV-Rep-Protein auch mit dem minimalen Satz von HSV-Helfergenen in replikativen Strukturen (Abb. 4.4, A.I ohne Filter und A.II mit Filter). Die Kotransfektionen wurden aus Kontrollzwecken sowohl mit einem vollständigen AAV-Genom als auch mit einem ITR-deletierten AAV-Genom (p Δ TR) durchgeführt. Heilbronn *et al.* (2003) zeigten, dass eine Kolokalisation von AAV-Rep mit ICP8 in HSV-Replikationskompartimenten nur in Anwesenheit von ITR(s), d.h. der Möglichkeit zur Bildung von replikativen, einzelsträngigen AAV-DNA-Formen, möglich ist. Bei Transfektion eines ITR-deletierten AAV-Genoms kann keine einzelsträngige AAV-DNA gebildet werden. Dementsprechend kam es zur Ausbildung von HSV-Replikationskomplexen, in denen aber AAV-Rep nicht kolokalisierte (s. Abb. 4.4, B).

Das Fehlen der HSV-Helicase bzw. -Primase führte zu einem diffusen Verteilungsmuster von ICP8; beide Proteine waren also für die Ausbildung von präreplikativen Komplexen essenziell (Lukonis *et al.*, 1996; Liptak *et al.*, 1996). Das Fehlen der präreplikativen Komplexe führte neben einem diffusen ICP8-Verteilungsmuster auch zu einer entsprechend diffusen Rep-Verteilung im Nukleus (Abb. 4.4, C und D).

Dieser Assay war geeignet, um in nachfolgenden Experimenten die Kolokalisationsfähigkeit der HSV-Primase- und Helicase-Punktmutanten zu überprüfen. Sollten die Punktmutationen zu einer Störung der Ausbildung oder Lokalisierung des Helicase-Primase-Komplexes führen, könnten Rep und ICP8 nicht mehr kolokolalisieren.

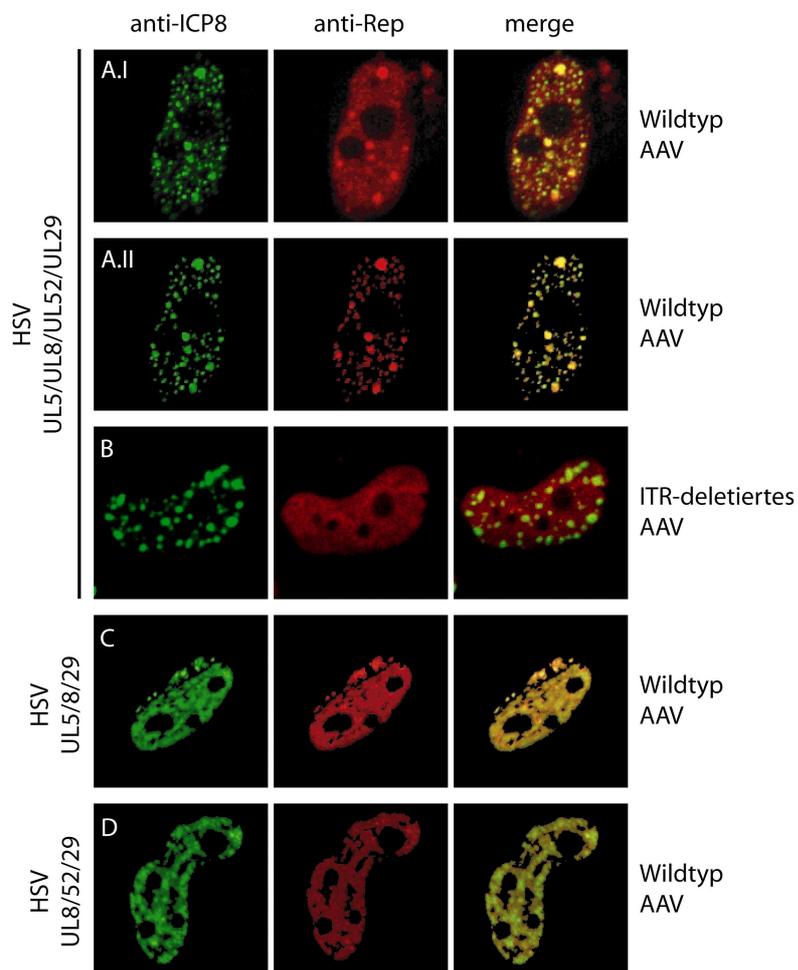


Abb. 4.4: Analyse der für die Kolokalisation von Rep und ICP8 benötigten Strukturen.

HeLa-Zellen wurden mit einem infektiösen AAV-Genom oder einem ITR-deletierten AAV-Genom sowie verschiedenen Kombinationen der minimal benötigten HSV-Helferfunktionen kotransfiziert.

Die Doppelimmunfluoreszenz wurde mit dem polyklonalen Rep-Antiserum bzw. monoklonalen ICP8-Antikörper und mit FITC (ICP8)- bzw. TRITC (Rep)-konjugierten Zweitantikörpern durchgeführt (vgl. Abb. 4.3).

4.1.4 ZUSAMMENFASSUNG DER BISHERIGEN DATEN

Die bisherigen Daten zeigen, dass die minimal für die AAV-DNA-Replikation benötigten HSV-Helfergene, bestehend aus dem Helicase-Primase-Komplex und dem *single-strand DNA-binding protein* ICP8, für die Bildung subnukleärer HSV-Replikationskomplexe ausreichen (s. 4.1.1, 4.1.3.2). Bei Kotransfektion von Wildtyp-AAV mit diesen vier HSV-Helfergenen ließ sich, abhängig von der Präsenz einzelsträngiger AAV-DNA, eine Kolokalisation zwischen dem AAV-Rep und dem HSV-ICP8 nachweisen (s. 4.1.3.2).

Fehlten die HSV-Helicase oder Primase, kam es zu einer Aufhebung der AAV-DNA-Replikation (Weindler *et al.*, 1991; s. 4.1.1), was mit dem Verlust der Fähigkeit zur Ausbildung von HSV-Replikationskomplexen, welche im Kontext der Kotransfektion von essenzieller Bedeutung zu sein scheint, erklärt werden konnte (s. 5.1).

4.2 UNTERSUCHUNG DER HELFERFUNKTION DER HSV-1-PRIMASE UL52

4.2.1 MUTAGENESE VON UL52

Ausgang der Arbeit war die Fragestellung, ob die enzymatische Aktivität der HSV-Primase für die AAV-DNA-Replikation von Bedeutung ist. Für die Untersuchungen der Helferfunktion von UL52 wurden die Punktmutationen D628Q und D630A im DXD-Motiv des Gens eingeführt, was zu einer Aufhebung der enzymatischen Aktivität führte bei weiterbestehender Fähigkeit mit anderen Proteinen zu interagieren (Klinedinst *et al.*, 1994; s. 5.2).

Aufgrund eines bis zu 68 % hohen G/C-Gehalts war es nicht möglich, die Mutationen direkt mit der Site-directed mutagenesis einzuführen, trotz Variation der PCR-Parameter, Änderung

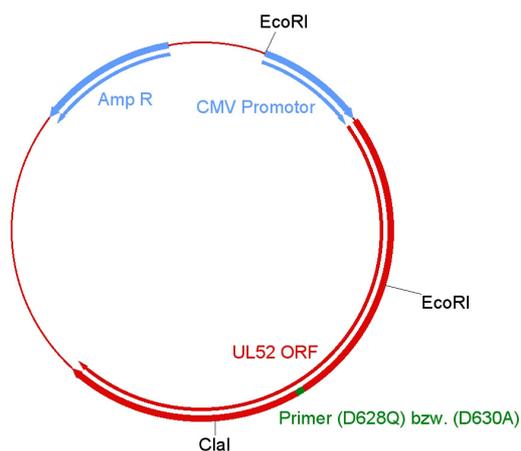


Abb. 4.5: Ausgangsplasmid pCM-UL52 für die PCR-Mutagenese. Eingetragen sind die verwendeten Restriktionschnittstellen, die codierenden Bereiche und die für die Mutagenese verwendete Primersposition.

der Mg^{++} -Konzentrationen und des Einsatzes von Dimethylsulfoxid (DSMO) oder Sulfolan (Chakrabati *et al.*, 2001). Deshalb wurde zunächst ein UL52-Fragment, welches das DXD-Motiv enthielt, aus dem Plasmid pCM-UL52 in einen pBluescript II SK(+)-Vektor subkloniert. Da die benötigte Schnittstelle von ClaI eine Methylierungssequenz enthielt, musste das Plasmid zuvor in den nicht methylierungsfähigen *E. coli*-Stamm K12 GM2163 eingebracht werden.

Anschließend konnte das Fragment mittels der Restriktionsenzyme ClaI und Eco-RI gewonnen werden. Das Plasmid pBluescript II SK(+)-UL52 diente dann als Ausgangssubstrat für die QuikChange Site-Directed Mutagenesis (s. 3.1.14.2). Für die beiden PCR(s) wurden die Primerpaare I (D628Q) bzw. II (D628Q) sowie die Primer I (D630A) bzw. II (D630A) verwendet (s. 2.5).

Nach Transformation der PCR-Produkte in XL1-Blue supercompetent cells wurden mehrere Klone mit einem korrekten XbaI/XhoI-Restriktionsmuster sequenziert. Plasmide, welche die gewünschte Mutation trugen, wurden erneut in den *E. coli*-Stamm K12 GM2163 transformiert, daraus das mutierte ClaI/Eco-RI-Fragment isoliert und zurück in das pCM-UL52-Ausgangsplasmid kloniert, wobei dieses wegen des Vorhandenseins einer zweiten Eco-

der Mg^{++} -Konzentrationen und des Einsatzes von Dimethylsulfoxid (DSMO) oder Sulfolan (Chakrabati *et al.*, 2001). Deshalb wurde zunächst ein UL52-Fragment, welches das DXD-Motiv enthielt, aus dem Plasmid pCM-UL52 in einen pBluescript II SK(+)-Vektor subkloniert. Da die benötigte Schnittstelle von ClaI eine Methylierungssequenz enthielt, musste das Plasmid zuvor in den nicht methylierungsfähigen *E. coli*-Stamm K12 GM2163 eingebracht werden. Anschließend konnte das Fragment mittels der Restriktionsenzyme ClaI und Eco-RI gewonnen werden. Das Plasmid pBluescript II SK(+)-UL52 diente dann als Ausgangssubstrat für die

RI-Schnittstelle einem Partialverdau unterzogen werden musste. Abschließend musste das Plasmid in den methylierungsfähigen *E. coli*-Stamm HB101 eingebracht werden, um DpnI-sensitive Ausgangsplasmide für die nachfolgenden Versuche zu bekommen. Eine abschließende Sequenzierung bestätigte den korrekten Einbau des ClaI/Eco-RI-Fragments in den pCM-UL52-Vektor.

Zur Vervollständigung der Ergebnisse wurde zusätzlich die Zinkfinger-Mutante UL52(CC3,4AA) von Sandra K. Weller (University of Connecticut Health Center, Department of Microbiology, Farmington, USA) in den Experimenten mitgeführt. Die Mutation im Zinkfinger-Motiv führt sowohl zu einer Aufhebung der eigentlichen Primase- als auch im Kontext des Helicase-Primase-Komplexes zu einer Inhibition der Helicase-Aktivität (Biswas *et al.*, 1999).

4.2.2 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER UL52-PUNKTMUTANTEN IM HSV-REPLIKATIONSASSAY

Um zu überprüfen, ob die eingeführten Punktmutationen in der Primase die enzymatische Aktivität aufheben, wurden die Punktmutationen in einem HSV-Replikationsassay eingesetzt. Die Primase UL52 gehört neben dem *origin-binding protein* UL9, UL5/UL8, UL29 und dem Polymerase-Komplex UL30/UL42 zu den essenziellen HSV-DNA-Replikationsproteinen (Wu *et al.*, 1988; McGeoch *et al.*, 1988).

Die eingeführten Punktmutationen im DXD-Motiv führten entweder zu einem Verlust der metallvermittelten Koordination von NTP(s) oder der Bindungsfähigkeit des Enzyms am Template; die Mutation im Zinkfinger-Motiv wahrscheinlich zu einem Verlust der sequenzspezifischen DNA-Bindung (Klinedinst *et al.*, 1994; Biswas *et al.*, 1999; vgl. 5.2). Dementsprechend müssten die Punktmutationen in der Primase zu einer Aufhebung der HSV-DNA-Replikation führen. Skaliter *et al.* (1996) zeigten, dass die funktionellen Replikationsproteine ein HSV-*ori*-tragendes Plasmid replizieren können, wobei die Verwendung des *ori_S* statt des *ori_L* zu einer etwas höheren DNA-Synthese führt (Warren *et al.*, 1972). Entsprechend wurden Zellen mit den essenziellen HSV-Genen und einem HSV-*ori_S*-tragendem Plasmid (pH10) transfiziert. Da bei der Replikation große DNA-Konkatamere entstanden, wurde hier, im Gegensatz zu den AAV-Replikationsassays, genomische DNA

extrahiert. Wie erwartet, war nur in Spur 4 der Abb. 4.6 repliziertes, nicht methyliertes und somit DpnI-resistentes pH10 nachzuweisen.

Das Experiment bestätigte, dass alle Primase-Punktmutanten die HSV-DNA-Replikation nicht mehr unterstützen konnten, also enzymatisch defekt waren.

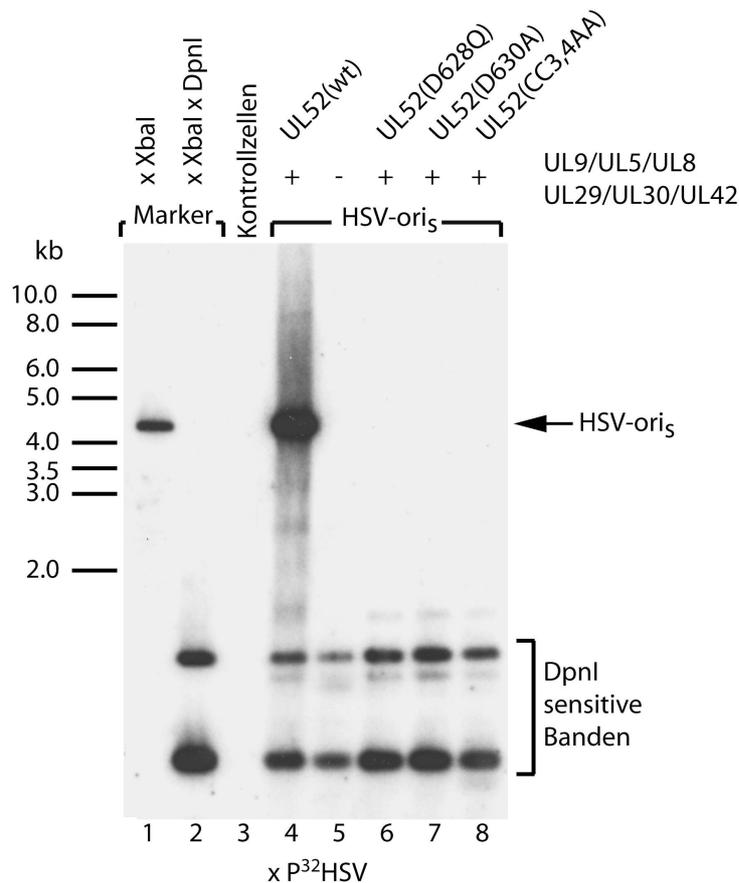


Abb. 4.6: Funktionelle Charakterisierung der UL52-Punktmutanten.

2×10^6 HeLa-Zellen wurden mittels $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mit jeweils $2 \mu\text{g}$ DNA je Plasmid transfiziert. Nach 40 h wurde die genomische DNA extrahiert, mit XbaI und DpnI verdaut und im Southern Blot verwendet. Als Sonde diente ein Fragment aus pH10 (s. 3.1.16).

4.2.3 EINFLUSS DER PUNKTMUTATIONEN IN DER PRIMASE AUF DIE KOLOKALISATIONS-FÄHIGKEIT VON ICP8 MIT REP

Die Ausbildung von subnukleären HSV-Replikationskomplexen ist von essenzieller Bedeutung für die AAV-DNA-Replikation (s. 4.1.4). Um zu zeigen, dass die Primase-Punktmutanten weiterhin diese Komplexe ausbilden können, in denen AAV-Rep in Abhängigkeit von einzelsträngiger AAV-DNA kolokalisiert, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Dazu wurden Zellen mit einem Wildtyp-AAV- bzw. einem ITR-deletierten AAV-Genom sowie den HSV-Helfergenen UL5, UL8, UL52 und UL29

transfiziert. Die Wildtyp-Primase wurde durch die verschiedenen punktmutierten Primase-Konstrukte ersetzt.

Alle verwendeten UL52-Punktmutanten zeigten eine mit dem Wildtyp vergleichbare Bildung von ICP8 positiven präreplikativen Strukturen sowie eine vergleichbare Kolo-kalisation der AAV-Rep-Proteine in diesen Strukturen (Abb. 4.7, A-D). Auch die ITR-Abhängigkeit der Rep-Rekrutierung in die HSV-Replikationszentren blieb vollständig erhalten. Bei Verwendung des ITR-deletierten AAV-Genoms zeigte Rep in allen Fällen eine diffuse nukleäre Verteilung (vgl. Abb. 4.7 E-H mit A-D).

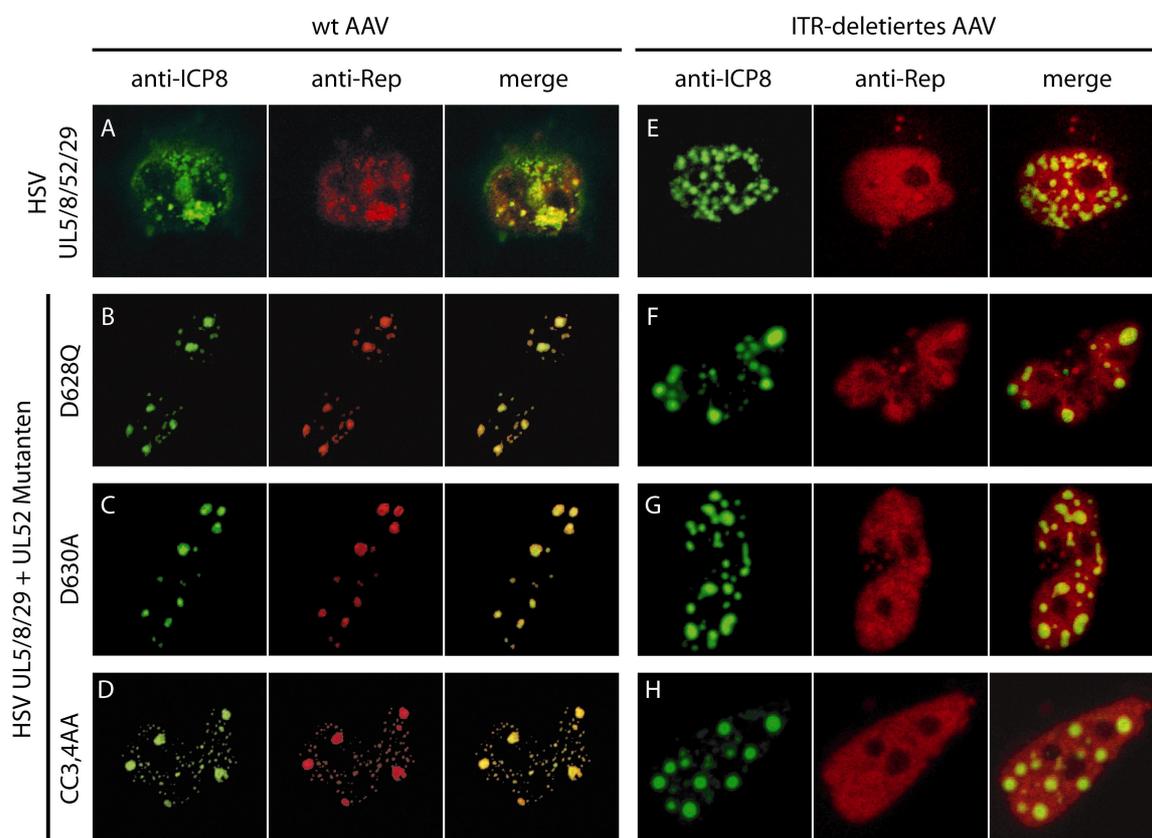


Abb. 4.7: Strukturelle Charakterisierung der HSV-Primase-Punktmutanten. HeLa Zellen wurden mit einem infektiösen AAV-Genom (A-D) oder einem ITR-deletierten AAV-Genom (E-H) und den minimalen HSV Helferfunktionen kotransfiziert, wobei das UL52 Wildtyp-Protein durch die verschiedenen Punktmutanten ersetzt wurde. Anschließend wurde eine Doppelimmunfluoreszenz mit dem polyklonalen Rep-Antiserum und dem monoklonalen ICP8-Antikörper und den FITC (ICP8)- bzw TRITC (Rep)-Zweitantikörpern durchgeführt.

Diese Daten ermöglichten eine genauere Interpretation der sich anschließenden AAV-DNA-Replikationsassays, da eine herabgesetzte AAV-DNA-Replikation nicht auf eine verminderte

Bildung von replikativen Strukturen oder eine verminderte Rekrutierung des AAV-Rep-Proteins zurückgeführt werden konnte.

4.2.4 EINFLUSS DER HSV-UL52-PRIMASEAKTIVITÄT AUF DIE AAV-DNA-REPLIKATION NACH HSV-INFESTION

Nachdem sichergestellt war, dass die Primase-Punktmutanten trotz enzymatischen Defekts eine Kolo­kalisierung zwischen ICP8 und Rep in HSV-Replikationskomplexen erlaubten, wurde der Einfluss der enzymatischen Aktivität auf die AAV-DNA-Replikation untersucht.

HeLa-Zellen wurden mit pTAV2-0 und den Primasemutanten bzw. der Wildtyp-Primase transfiziert und mit einem UL52-deletierten HSV (hr114) überinfiziert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen geerntet und die extrachromosomale DNA gewonnen und analysiert.

Um zu verhindern, dass bei der Positivkontrolle mit Wildtyp-UL52 sich HSV repliziert und über Reinfektion eine Steigerung der AAV-DNA-Replikation induziert wird, wurden die Zellen früh nach Infektion geerntet, also noch vor einem vollständigen Replikationszyklus von HSV (Roizman *et al.*, 2001; s. 1.3.2.1). Zu Kontrollzwecken wurde zusätzlich die UL5-Expression im Western Blot überprüft. UL5 wurde ersatzweise verwendet, da kein UL52-Antikörper zur Verfügung stand (s. 4.1.2). Sowohl UL52 als auch UL5 gehören zu den *delayed early*-Proteinen von HSV, werden also zur selben Zeit exprimiert. Die vergleichbare Expressionshöhe von UL5 diente somit als Marker für vergleichbare HSV-Expressionslevels. Alle UL52-Punktmutanten zeigten eine abgeschwächte AAV-DNA-Replikation gegenüber der Wildtyp-Primase (Abb. 4.8A, Spur 2, 6-8). Die AAV-DNA-Synthese war bei Verwendung der Punktmutanten nicht höher als bei dem vollständigen Fehlen der Primase (Abb. 4.8A, Spur 5-8). Auch die Zinkfinger-Mutante UL52(CC3,4AA) war nicht in der Lage, die fehlende Primase der Virusmutante zu komplettieren (Abb. 4.8A, Spur 8). Der Western Blot zeigte eine gleichmäßige UL5-Expression bei Komplementation des UL52-deletierten HSV mit dem Wildtyp-UL52 oder den UL52-Mutanten. Dies schloss einen indirekten Einfluss der mutierten UL52-Proteine auf die Expression der übrigen für den Helfereffekt verantwortlichen frühen HSV-Funktionen weitgehend aus. Ohne UL52 zeigte sich eine reduzierte UL5-Expression (Abb. 4.8B, Spur 5), was möglicherweise auf eine erhöhte Degradation der Helicase als Folge fehlender Komplexbildung mit UL52 zurückzuführen war.