

Abb. 4.8: Helfereffekt von HSV-UL52-Punktmutanten für die AAV-DNA-Replikation in Gegenwart aller HSV-Helfergene.

(A) 2×10^6 HeLa-Zellen wurden mit $6,5 \mu\text{g}$ pTAV2-0 und $5,5 \mu\text{g}$ UL52 bzw. den Punktmutanten mittels $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ transfiziert. Nach 20 h wurde mit hr114 (HSV Δ UL52) mit einer MOI von 10 überinfiziert. Nach 16 h wurde die DNA durch Hirt-Extraktion gewonnen, mit DpnI und XbaI verdaut und im Southern Blot verwendet.

(B) Für den Western Blot wurden parallel 4×10^5 HeLa-Zellen mit $1,5 \mu\text{g}$ pTAV2-0 und $1 \mu\text{g}$ UL52 bzw. den Punktmutanten transfiziert. Wie beim Southern Blot erfolgte nach 20 h die Infektion mit hr114. Nach weiteren 16 h wurden die Proteinextrakte gewonnen, mittels SDS-Page aufgetrennt und UL5 mit dem mAk 152 (1:15 in Milch verdünnt) markiert.

Die Daten sprechen für eine enzymatische Bedeutung der HSV-Primase. Die AAV-DNA-Replikation änderte sich bei Komplementierung des Assays durch die strukturgebenden Primase-Punktmutanten im Vergleich zum vollständigen Fehlen der Primase nicht. Erst die Komplementierung durch die enzymatisch aktive Primase führte zu einer Steigerung der AAV-DNA-Synthese.

4.2.5 EINFLUSS DER HSV-UL52-PRIMASEAKTIVITÄT AUF DIE AAV-DNA-REPLIKATION NACH TRANSFEKTION DER MINIMALEN HELFERFUNKTIONEN

In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss der Primaseaktivität in einem „Minimalsystem“ getestet. Im Gegensatz zum vorherigen Infektionsassay standen dem AAV hier nur die

essenziellen HSV-Helferfunktionen zur Verfügung. Hierdurch konnten die Punktmutanten ohne Artefakte durch andere HSV-Helfergene analysiert werden.

Zellen wurden mit dem Wildtyp-UL52-Plasmid, den DXD-Mutanten UL52(D628Q) bzw. UL52(D630A) oder der Zinkfinger-Mutante UL52(CC3,4AA) sowie den übrigen drei essenziellen Helfergenen UL5, UL8 und UL29 und dem Wildtyp-AAV-Plasmid transfiziert. 40 Stunden nach Transfektion wurde die AAV-DNA-Replikation analysiert.

Die UL52-DXD-Mutanten replizierten AAV genauso gut wie die Wildtyp-Primase (Abb. 4.9A, Spur 2, 4, 5). In Abwesenheit der Primase ließ sich erwartungsgemäß keine replizierte DpnI-resistente AAV-DNA nachweisen (Abb. 4.9A, Spur 3).

In Abb. 4.9B wurde die UL52-Zinkfinger-Mutante mit der Wildtyp-Primase verglichen. Das Experiment zeigte eine abgeschwächte AAV-DNA-Synthese bei Verwendung von UL52(CC3,4AA) im Vergleich zur Wildtyp-Primase (Abb. 4.9B, Spur 2, 4).

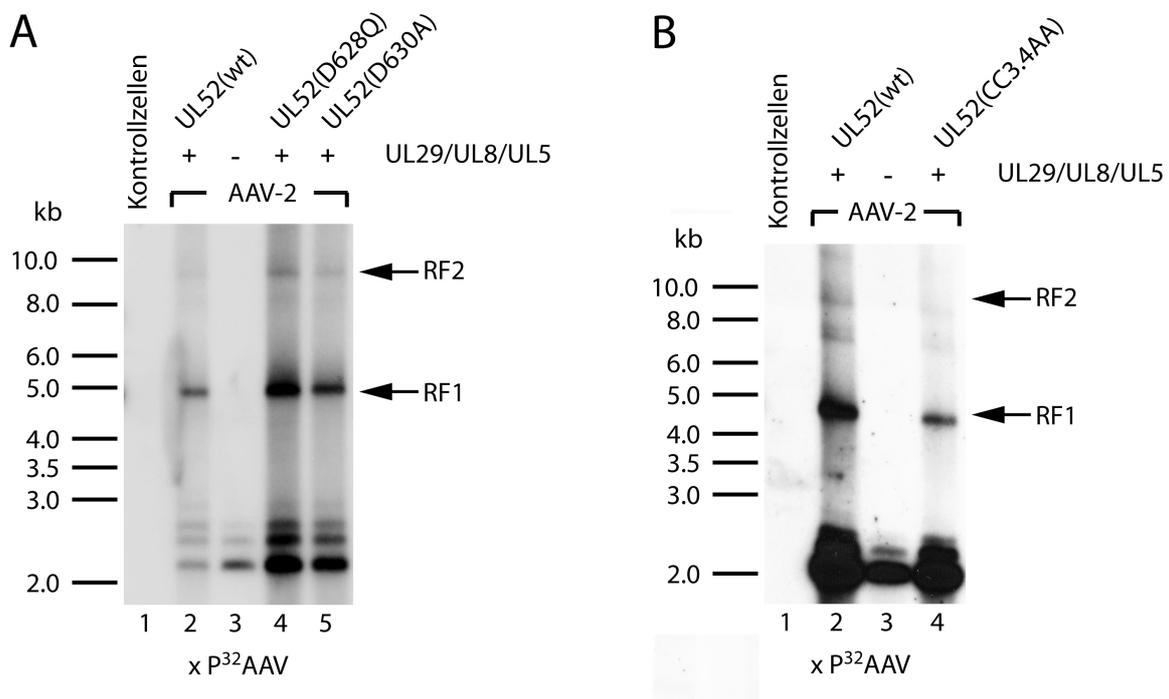


Abb. 4.9: Helfereffekt von HSV-UL52-Punktmutanten für die AAV-DNA-Replikation in Gegenwart der minimalen HSV-Helfergene. (A) DXD-Mutanten. (B) Zinkfinger-Mutante. 2×10^6 HeLa-Zellen wurden mit $4 \mu\text{g}$ pTAV2-0 und mit $2 \mu\text{g}$ je HSV-Gen transfiziert. 40 h später wurden die Zellen geerntet, die extrachromosomale DNA mittels Hirt-Extraktion gewonnen, diese mit DpnI und XbaI verdaut und im Southern Blot eingesetzt.

Im Gegensatz zum Infektionsassay sprachen die Daten aus dem „Minimalsystem“ für eine strukturelle Bedeutung der Primase. Ohne Primase war keine AAV-DNA-Synthese zu verzeichnen. Die Punktmutanten und Wildtyp-Primase wiesen eine vergleichbare AAV-DNA-Replikation auf.

Für die Zinkfinger-Mutation war zuvor gezeigt worden, dass sie zu einer Aufhebung der eigentlichen Primaseaktivität und gleichzeitig zu einer Inhibition der Helicaseaktivität des Helicase-Primase-Komplexes führt (Biswas *et al.*, 1999; vgl. 5.2). Da keine Abschwächung bei den DXD-Mutanten im vorherigen Experiment zu beobachten war (vgl. 4.9A), war die Ursache für die verringerte AAV-DNA-Replikation am ehesten auf die Inhibition der Helicaseaktivität zurückzuführen.

4.2.6 VERGLEICH DER AAV-DNA-REPLIKATIONSRATE NACH INFEKTION MIT HSV UND NACH TRANSFEKTION DES MINIMALSATZES VON HSV-HELPERFUNKTIONEN

Die Ergebnisse bezüglich der Notwendigkeit der HSV-Primase UL52 für die AAV-DNA-Replikation waren in den beiden Untersuchungssystemen, dem Transfektionssystem mit dem Minimalsatz von HSV Helferfunktionen und dem Infektionssystem, nicht identisch. Um diese Widersprüche besser bewerten zu können, wurden vergleichende quantitative Untersuchungen zum Ausmaß der AAV-DNA-Replikation in den beiden Systemen durchgeführt. Dazu wurden Proben der in den Abbildungen 4.8 und 4.9 dargestellten Versuche gemeinsam auf ein Gel aufgetragen, mit einer radioaktiv markierten AAV-Sonde hybridisiert und die replikativen AAV-Formen mittels Phosphorimager ausgewertet.

Es zeigte sich, dass bei der Transfektion mit den minimalen HSV-Helfergenen nur 1 % der AAV-DNA-Replikation gegenüber der Infektion mit 100 % gemessen werden konnte. Bei einer Transfektionseffizienz von ca. 40 % der Zellen bei beiden Ansätzen konnte die Diskrepanz nicht auf unterschiedliche Transduktionseffizienzen zurückgeführt werden. Eine stärkere AAV-DNA-Replikation hätte darauf beruhen können, dass beim Infektionssystem 2,5 µg pTAV2-0 mehr transfiziert wurde als beim Transfektionssystem. Dies würde aber eine über 166-fache Erhöhung der AAV-DNA-Replikation nicht erklären. Selbst in Abwesenheit der Primase wurde im Infektionssystem noch eine über 28-mal höhere Effizienz als im Transfektionssystem beobachtet (Abb. 4.10).

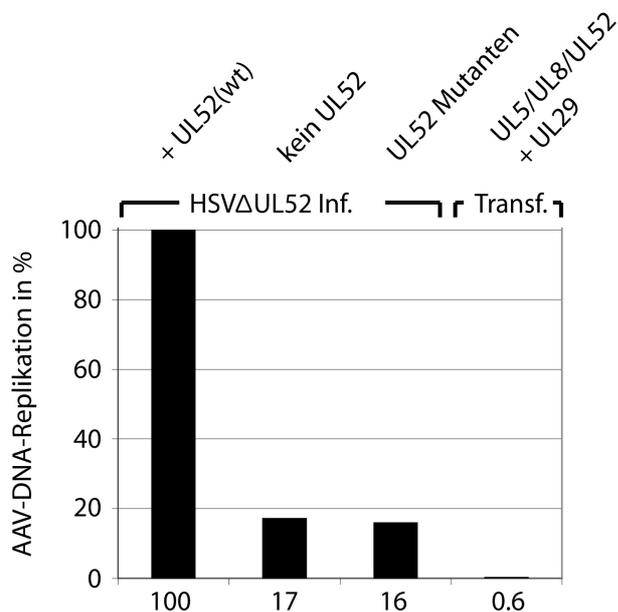


Abb. 4.10: Quantitativer Vergleich der AAV-DNA-Replikation in den verschiedenen Untersuchungssystemen.

Die Positivkontrollen von Abb. 4.9 und die Spuren 2, 5, 6, 7, 8 von Abb. 4.8 wurden einer gemeinsamen Southern Blot-Analyse unterzogen. Die Banden RF1 und RF2 wurden mittels Phosphorimager quantifiziert. Die AAV-DNA-Replikation der Positivkontrolle des Infektionssystems (Abb. 4.8, Spur 2) wurde gleich 100 % und die anderen Werte dazu in Relation gesetzt. Für die drei UL52-Mutanten (Abb. 4.8, Spur 6-8) und für die Positivkontrollen vom Transfektionssystem (Abb. 4.9A und B, jeweils Spur 2) wurden Mittelwerte berechnet und angegeben.

Die Quantifizierung der replizierten AAV-DNA zeigte, dass offenbar noch weitere, bisher noch nicht identifizierte HSV-Funktionen über noch unbekannte Mechanismen die AAV-Replikation verstärkten. Diese konnten zumindest teilweise die fehlende HSV-Primase ersetzen.

4.2.7 ZUSAMMENFASSUNG DER DATEN ZUR BEDEUTUNG DER PRIMASEAKTIVITÄT FÜR DIE AAV-DNA-REPLIKATION

In der Transfektion mit den vier essenziellen Helfergenen wiesen die DXD-Punktmutanten eine zum Wildtyp vergleichbare AAV-DNA-Synthese auf. Nur die Zinkfinger-Mutante zeigte eine erniedrigte AAV-DNA-Synthese, was am ehesten auf die durch die Mutation ebenfalls enzymatisch inaktive HSV-Helicase zurückzuführen war (Biswas *et al.*, 1999; s. 4.2.5, 5.2, 5.2.1). Die Primase wurde also nicht als Enzym, sondern als Strukturkomponente des nukleären HSV-Replikationskomplexes benötigt.

In Anwesenheit sämtlicher HSV-Gene im Infektionsassay ersetzen andere virale oder zelluläre Proteine die Primase strukturell. Hier führte nur die enzymatisch aktive Primase zu einer Steigerung der AAV-DNA-Replikation (s. 4.2.4). Daher musste die Primase neben ihrer strukturellen Bedeutung im Kontext anderer HSV-Gene noch eine zusätzliche enzymatische Bedeutung haben, die indirekt die AAV-DNA-Replikation förderte (s. 5.2.1).

Die Phosphorimageranalyse ergab, dass die AAV-DNA-Replikation im Infektionssystem selbst beim Fehlen der Primase signifikant höher lag als im Transfektionssystem, was auf einen fördernden Einfluss weiterer nicht essenzieller HSV-Helfergene hinwies (s. 4.2.6, 5.2.2).

4.3 ANALYSE DER HELFERFUNKTION DER HSV-1-HELICASE UL5

Für die Untersuchungen der Helicaseaktivität wurde die gleiche Vorgehensweise wie für die Analyse der Primase-Punktmutanten gewählt.

4.3.1 MUTAGENESE VON UL5

Um den Einfluss der Helicaseaktivität auf die AAV-DNA-Replikation zu untersuchen, wurden enzymatisch inaktive Punktmutanten mittels PCR-Mutagenese generiert. Wie bei den Primase-Punktmutanten wurde auch für die Helicase-Mutanten beschrieben, dass sie trotzdem weiterhin zu Protein-Protein-Interaktionen fähig sind (Zhu *et al.*, 1992b).

Die Punktmutationen UL5(G101V) und UL5(K102A) in Motiv I der Helicase wurden mittels

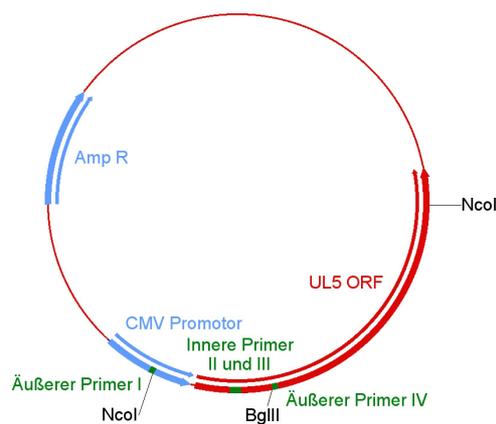


Abb. 4.11: Ausgangsplasmid pCM-UL5 für die Site-directed mutagenese. Eingetragen sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen, die codierenden Bereiche und die für die Mutagenese verwendeten Primerpositionen.

Site-directed mutagenesis eingeführt. Bei der Auszählung der Basen wichen die Ortsangaben in der Literatur aufgrund eines Sequenzfehlers um eine Nukleotidstelle ab (vgl. Zhu *et al.*, 1992b). Als Template für die PCR diente das UL5-tragende Plasmid pCM-UL5 (s. Abb. 4.11). Die Mutagenese selbst wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die beiden mit den äußeren Primern und den inneren Primern (G101V) II, III bzw. (K102A) II, III generierten mutierten PCR-Fragmente wurden nach Aufreinigung in einer zweiten PCR mit den äußeren Primern fusioniert (s. 2.5, 3.1.14.1). Das entstandene Produkt wurde mittels der Restriktionsenzyme BglII und NcoI

geschnitten und in einen entsprechenden Vektor, welcher ebenfalls mit BglII und partiell mit NcoI geschnitten wurde, zurückkloniert.

Die gewünschte Punktmutation UL5(R345K) im Motiv IV der Helicase war nicht mittels Site-directed mutagenese einzuführen, was auf einen ca. 10 % höheren C/G-Gehalt in der Umgebung der Mutationsstelle im Vergleich zu den Stellen 101 und 102 zurückzuführen war. Daher wurde das bei der Primase schon erfolgreich verwendete QuikChange Mutagenesis Kit

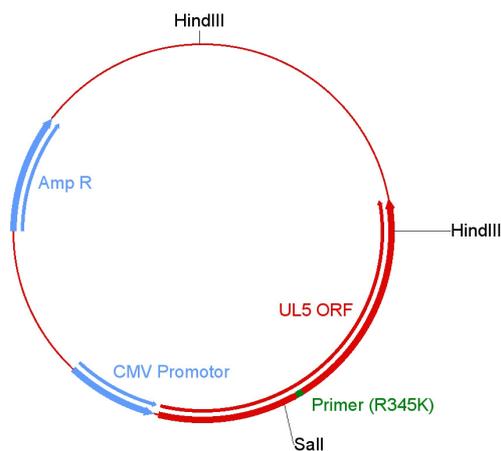


Abb. 4.12: Ausgangskonstrukt pCM-UL5 für die Mutagenese von UL5(R345K). Markiert sind die benötigten Restriktionsschnittstellen, die codierenden Bereiche und die Primerposition.

verwendet (vgl. 4.2.1). Es wurde ein UL5-Fragment mittels der Restriktionsenzyme SalI und HindIII aus pCM-UL5 gewonnen und in einen entsprechenden Bluescript II SK(+)-Vektor subkloniert, welcher dann als Template für das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit diente (s. 3.1.14.2). Verwendet wurden die Primer I und II (R345K) (s. 2.5). Nach Transformation der PCR-Produkte wurden Klone mit einem richtigen XbaI/XhoI-Restriktionsmuster sequenziert. Anschließend wurde ein entsprechendes SalI/HindIII-Fragment gewonnen und in einen durch Partialverdau gewonnenen pCM-UL5-Vektor zurückkloniert.

Bei allen UL5-Punktmutanten wurden abschließend die korrekten Punktmutationen und der korrekte Einbau durch Sequenzierung im Bereich des PCR-Amplifikationsproduktes und der Restriktionsschnittstellen nachgewiesen.

4.3.2 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER HSV-HELICASEMUTANTEN IM HSV-REPLIKATIONSASSAY

Um den Nachweis zu erbringen, dass die HSV-Helicase-Punktmutanten enzymatisch defekt waren, wurde analog zu den Primase-Punktmutanten ein HSV-Replikationsassay durchgeführt. Auch die Helicase gehört zu den essenziellen HSV-DNA-Replikationsgenen (Wu *et al.*, 1988; McGeoch *et al.*, 1988). Die Punktmutationen in Motiv I führten zu einem Verlust der Hydrolysefähigkeit von ATP, die Mutation in Motiv IV zu einem Verlust der eigentlichen Helicaseaktivität. Dementsprechend dürften die Helicase-Punktmutanten keine HSV-DNA mehr replizieren (Zhu *et al.*, 1992b).

Zellen wurden mit den sieben essenziellen HSV-Replikationsgenen (UL9, UL5, UL8, UL29, UL30, UL42 und UL52) und dem HSV-tragenden Plasmid pH10 transfiziert. Die genomische DNA wurde gewonnen und auf DpnI-resistente HSV-*ori_S*-DNA untersucht. Parallel wurde ein Western Blot angefertigt, um unterschiedliche Expressionsniveaus zwischen der Wildtyp-Helicase und den Punktmutanten auszuschließen.

Nur bei Verwendung der Wildtyp-Helicase ließ sich eine DpnI-resistente Bande (Abb. 4.13A, Spur 4) bei vergleichbarer Expression der verschiedenen UL5-Konstrukte (Abb. 4.13B) erkennen.

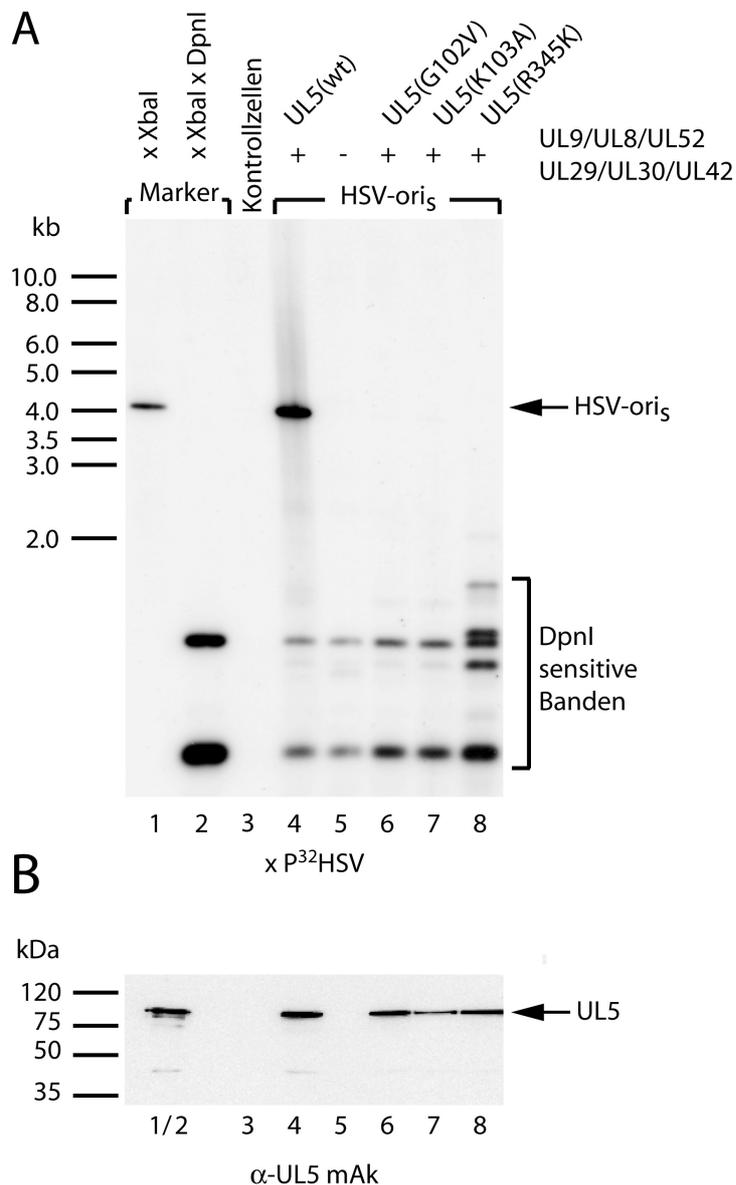


Abb. 4.13: Funktionelle Charakterisierung der UL5-Punktmutanten.

(A) 2×10^6 HeLa-Zellen wurden mit je $2 \mu\text{g}$ der 7 essenziellen HSV-Replikationsgene und $2 \mu\text{g}$ pH10 transfiziert. Dabei wurde UL5 in den Spuren 6-8 durch die Punktmutanten ersetzt. Nach 40 h wurde die genomische DNA extrahiert, mit DpnI und XbaI vollständig verdaut und im Southern Blot eingesetzt. Als Template für die Sonde diente ein *ori_S*-Fragment.

(B) Parallel wurden 4×10^5 HeLa-Zellen mit je $0,4 \mu\text{g}$ je HSV-Gen transfiziert. Nach 40 h wurden Gesamtzellextrakte im Western Blot mit dem monoklonalen UL5-Antikörper mAk 152 analysiert.

4.3.3 UNTERSUCHUNG DER KOLOKALISATION ZWISCHEN REP UND ICP8 BEI VERWENDUNG DER HELICASE-PUNKTMUTANTEN

Um auszuschließen, dass die Punktmutationen die Eigenschaften von UL5 als strukturelle Komponente der präreplikativen HSV-Zentren negativ beeinflussen, wurde eine Rep/ICP8-

Doppelimmunfluoreszenz nach Kotretransfektion der HSV-UL5-Mutanten mit den übrigen drei für die AAV-DNA-Replikation essenziellen HSV-Helferfunktionen und einem Wildtyp-AAV-Genom (Abb. 4.14, A-D) bzw. einem ITR-deletierten AAV-Genom (Abb. 4.14, E-H) durchgeführt.

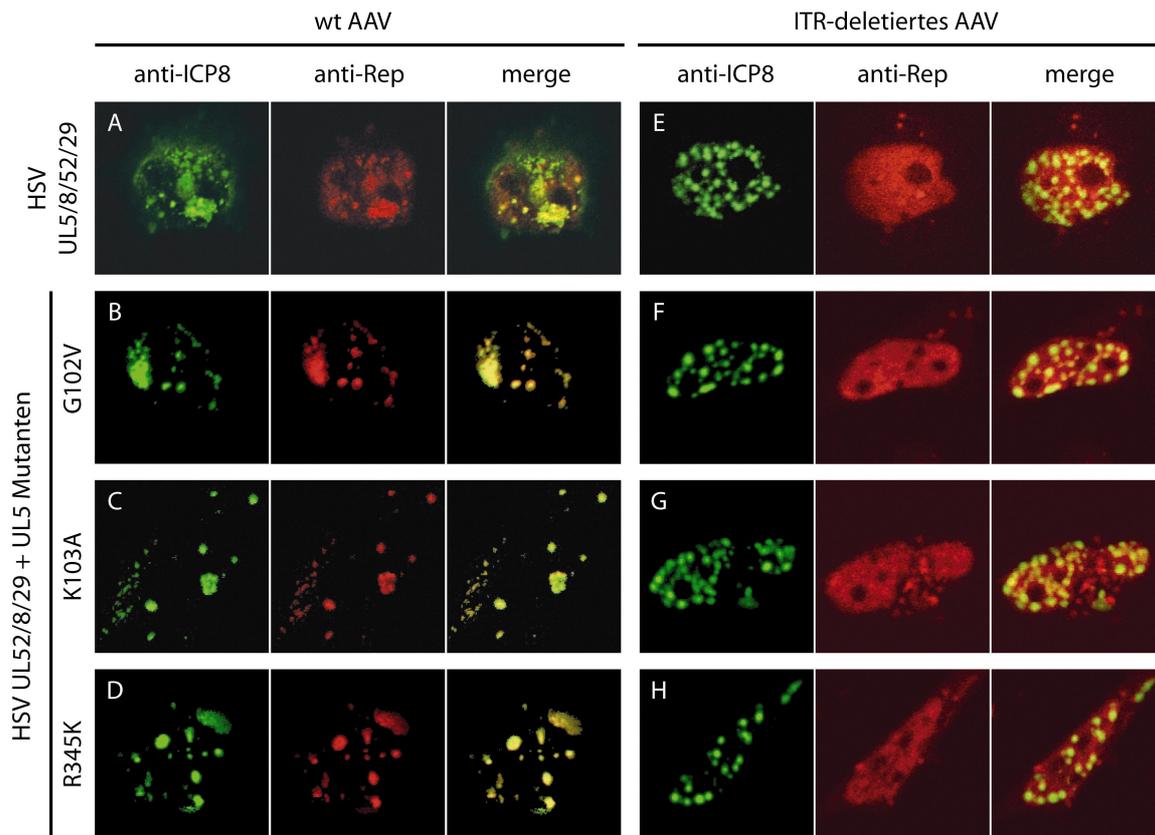


Abb. 4.14: Strukturelle Charakterisierung der HSV-Helicase-Punktmutanten. HeLa-Zellen wurden mit jeweils 0,4 µg UL8, UL52, UL29, UL5 (A, E) bzw. den Punktmutanten (B-D, F-H) sowie 0,4 µg pTAV2-0 (A-D) oder pΔTR (ITR-deletiertes AAV, E-H) mittels Lipofectamine transfiziert. Die Doppelimmunfluoreszenz erfolgte mit den Antikörpern HB-8180 (Anti-mouse ICP8, 1:3 in 1xPBS/2 % FCS verdünnt) und Anti-rabbit Rep (1:80 in 1xPBS/2 % FCS), gefolgt von einer Inkubation mit FITC (ICP8)- und TRITC (Rep)-konjugierten Sekundärantikörpern (jeweils 1:400 in 1xPBS/2 % FCS).

Es zeigte sich, dass Rep und ICP8 ssDNA-abhängig in Gegenwart der Helicase-Punktmutanten kolokalisierten (Abb. 4.14). Dies sprach indirekt für die korrekte Entstehung und Lokalisierung des Helicase-Primase-Komplexes (s. 4.1.3.2).

Die Daten aus dem HSV-Replikationsassay und der Immunfluoreszenzanalyse bestätigten, dass die Punktmutanten enzymatisch inaktiv waren, was allerdings keinen Einfluss auf die

Kolokalisationsfähigkeit von AAV-Rep in den subnukleären präreplikativen HSV-Strukturen hatte.

4.3.4 ANALYSE DES EINFLUSSES DER HSV-UL5-PUNKTMUTATIONEN AUF DIE AAV-DNA-REPLIKATION NACH HSV-INFEKTION

Zunächst wurde der Einfluss der Helicase-Punktmutanten auf die AAV-DNA-Replikation in Anwesenheit des gesamten HSV-Genoms untersucht.

Zellen wurden mit Wildtyp-AAV (pTAV2-0) und UL5 bzw. den UL5-Punktmutanten transfiziert und mit einem UL5-deletiertem Virus (hr99) überinfiziert. So standen alle HSV-Helferfunktionen für die AAV-DNA-Replikation zur Verfügung. Die Zellernte erfolgte 16 Stunden nach Infektion, also noch vor dem Ablauf eines vollständigen HSV-Replikationszyklus (Roizman *et al.*, 2001; s. 1.3.2.1). So konnte eine Verfälschung der Ergebnisse durch Reinfektion mit HSV weitgehend ausgeschlossen werden. Parallel wurden Western Blots angefertigt, um die Expressionshöhe der Helicasekonstrukte mit dem Wildtyp vergleichen zu können.

Trotz eines vergleichbaren UL5-Expressionsniveaus (Abb. 4.15B) kam es zu einer verminderten AAV-DNA-Replikation bei Verwendung der UL5-Punktmutanten (Abb. 4.15A, Spur 2, 6-8). Das Weglassen der Helicase führte zu einer weiteren Reduktion der AAV-DNA-Synthese gegenüber den Punktmutanten (Abb. 4.15A, Spur 5, 6-8).

Das Experiment legte nahe, dass die Helicase sowohl strukturell als auch enzymatisch für die AAV-DNA-Replikation von Bedeutung war. Die Anwesenheit der strukturgebenden Helicase-Punktmutanten alleine erhöhte schon die AAV-DNA-Synthese. Eine weitere Steigerung war bei Verwendung der enzymatisch aktiven Wildtyp-Helicase zu verzeichnen.

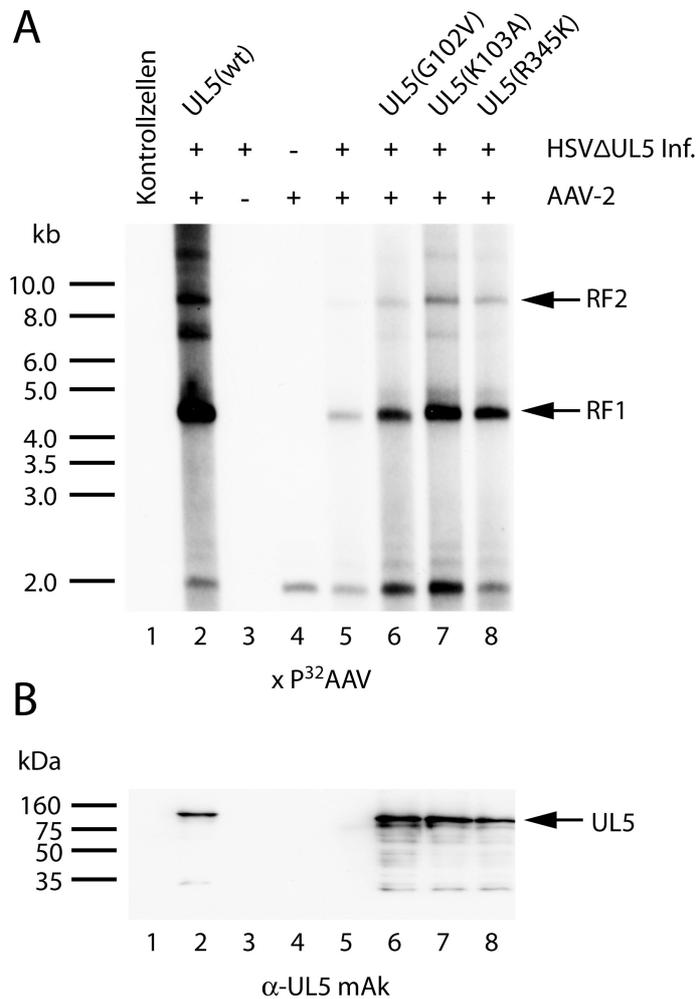


Abb. 4.15: Helfereffekt von Helicase-Punktmutanten für die AAV-DNA-Replikation nach Komplementation einer UL5-negativen Virusmutante.

(A) 2×10^6 HeLa-Zellen wurden mit 6,5 μg pTAV2-0 und 5,5 μg UL5 bzw. den UL5-Punktmutanten mittels $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit hr99 (HSVΔUL5) mit einer MOI von 10 überinfiziert. Nach weiteren 16 h wurde die extrachromosomale DNA durch Hirt-Extraktion gewonnen. Nach DpnI- und XbaI-Verdau wurde die DNA im Southern Blot mit einer AAV/HincII-Probe analysiert.

(B) Parallel wurden 5×10^5 HeLa-Zellen mit 1,5 μg pTAV2-0 und 1 μg UL5 bzw. den Punktmutanten transfiziert und später mit hr99 überinfiziert. Die Proteinextrakte wurden dann mittels SDS-Page aufgetrennt und UL5 mit dem mAk 152 markiert.

4.3.5 EINFLUSS DER HELICASE-PUNKTMUTATIONEN AUF DIE AAV-DNA-REPLIKATION NACH TRANSFEKTION MIT DEN MINIMALEN HSV-HELPERFUNKTIONEN

Um eine Beeinflussung durch nicht essenzielle HSV-Funktionen auszuschließen, wurde im nächsten Schritt der Einfluss der Helicaseaktivität bei Transfektion der minimal benötigten vier HSV-Helfergene untersucht.

Dafür wurden Zellen mit Wildtyp-AAV und den vier essenziellen HSV-Genen UL5, UL8, UL52 und UL29 transfiziert. UL5 wurde durch die entsprechenden Punktmutanten ersetzt. Analog zu den vorangegangenen Experimenten wurde auch hier die UL5-Expression mittels Western Blot untersucht.

Es zeigte sich, dass alle untersuchten Punktmutanten, unabhängig von der jeweiligen Mutation, zu einer verminderten AAV-DNA-Replikation im Vergleich zur Transfektion des

Wildtyp-Proteins führten (Abb. 4.16A, Spur 2, 4-6). Ohne Helicase war keine replizierte AAV-DNA zu detektieren (Abb. 4.16A, Spur 3). Die UL5-Expression war bei den Punktmutanten eher höher als bei der Wildtyp-Helicase, sodass die abgeschwächte Helferaktivität nicht durch ein vermindertes Expressionsniveau erklärbar war (Abb. 4.16B).

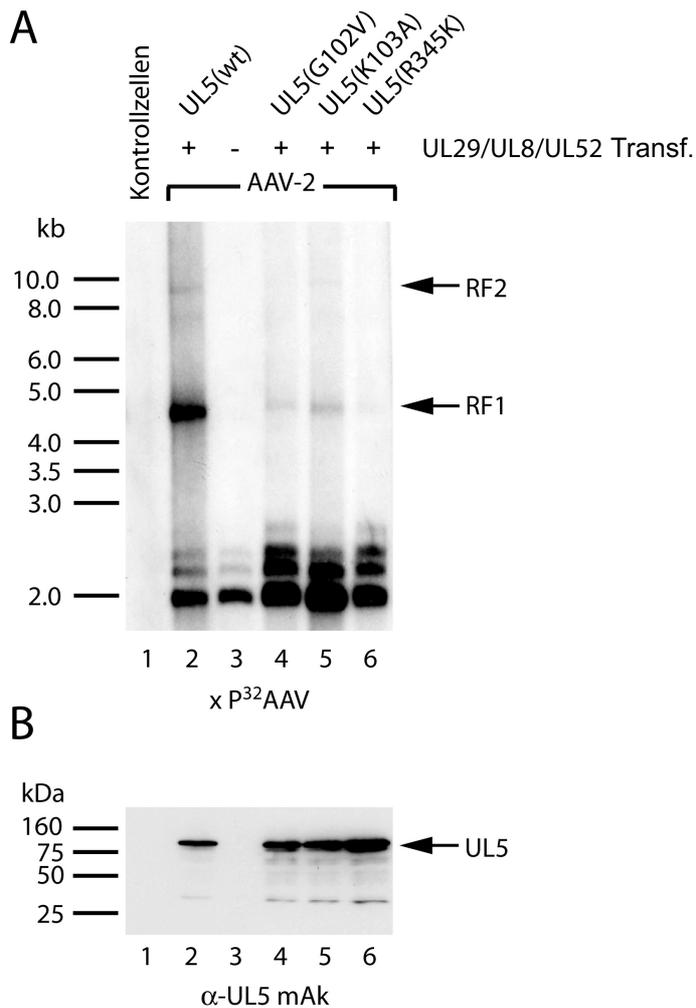


Abb. 4.16: Helfereffekt der Helicasemutanten für die AAV-DNA-Replikation nach Transfektion der minimalen HSV-Helferfunktionen.

(A) 2×10^6 HeLa-Zellen wurden mit 4 μ g pTAV2-0 und mit 2 μ g Plasmid-DNA je HSV-Gen mittels $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation transfiziert. Nach 40 h wurde die DNA mittels Hirt-Extraktion gewonnen und nach DpnI/XbaI-Verdau im Southern Blot mit einer AAV-2/HincII-Sonde analysiert.

(B) Für den Western Blot wurden parallel 4×10^5 HeLa-Zellen mit 0,8 μ g pTAV2-0 und je HSV-Plasmid mit 0,4 μ g DNA transfiziert. Nach 40 h wurden die Proteinextrakte gewonnen, per SDS-Page aufgetrennt und mit dem mAk 152 markiert.

Die Ergebnisse waren konsistent mit den Infektionsexperimenten. Es bestätigte sich, dass die UL5-Helicase eine strukturelle und eine direkte enzymatische Bedeutung für die AAV-DNA-Replikation einnahm. Die strukturgebenden Helicase-Punktmutanten führten zu einer Steigerung der AAV-DNA-Synthese, die durch die enzymatische Aktivität zusätzlich erhöht wurde.

4.3.6 QUANTITATIVER VERGLEICH DER AAV-DNA-REPLIKATION ZWISCHEN DEN BEIDEN UNTERSUCHUNGSSYSTEMEN

Zur quantitativen Bewertung des Helfereffekts der verschiedenen Helicase-Proteine wurden wie für die Primase die entsprechenden DNA-Proben aus den Infektions- (Abb. 4.15, Spur 2 sowie 5-8) und Transfektionsexperimenten (Abb. 4.16, Spur 2) in einem gemeinsamen Southern Blot analysiert. Es zeigte sich, dass im Transfektionssystem im Vergleich zur HSV-Überinfektion nur eine um den Faktor 200 verminderte AAV-DNA-Replikation induziert werden konnte. Zwar wurde im Infektionssystem mit einer etwas höheren pTAV2-0-DNA-Menge transfiziert, jedoch konnte dies die starke Differenz in der AAV-DNA-Syntheserate zwischen den beiden Systemen nicht erklären.

Deutlich konnte man in der quantitativen Auswertung auch erkennen, dass die Helicase-Punktmutanten eine Intermediärstellung zwischen der Wildtyp-Helicase und den Ansätzen ohne Helicase einnahmen (Abb. 4.17).

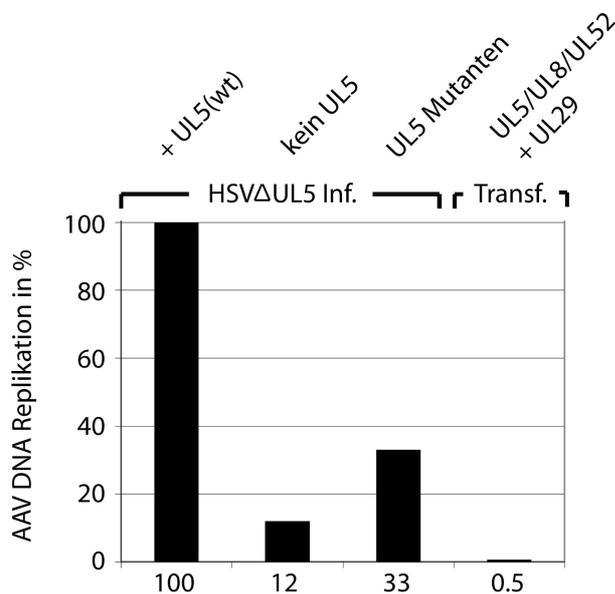


Abb. 4.17: Quantitative Auswertung der AAV-DNA-Replikation der UL5-Punktmutanten.

Proben aus den Experimenten Abb. 4.15 (Spur 2, 5-8) und 4.16 (Spur 2) wurden gemeinsam im Southern Blot mit einer radioaktiven AAV-Sonde markiert. Die RF1- und RF2-Banden wurden mittels Phosphorimager vermessen. RF1 und RF2 von der Positivkontrolle von Abb. 4.15 wurden addiert und 100 % gesetzt. Alle weiteren Werte wurden dazu in Relation gesetzt. Für die UL5-Mutanten wurde ein gemeinsamer Mittelwert berechnet und im Diagramm aufgetragen.

Die quantitative Auswertung ließ darauf schließen, dass es Unterschiede in der AAV-DNA-Replikation nach Transfektion der minimalen Helfereinheit und der HSV-Infektion gab. Ein vollständiges Fehlen der Helicase konnte im Infektionssystem durch unbekannte HSV-Funktionen zum Teil kompensiert werden, im Transfektionssystem hingegen nicht.

4.3.7 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE AUS DEN EXPERIMENTEN MIT DEN HELICASE-PUNKTMUTANTEN

Zusammenfassend war sowohl nach Transfektion der minimalen HSV-Helferfunktionen als auch nach Komplementierung einer Helicase-defizienten Virusmutante eine deutlich reduzierte AAV-DNA-Replikation in Anwesenheit der Helicase-Punktmutanten im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Gegenüber den Ansätzen in Abwesenheit der Helicase war jedoch auch mit den enzymatisch inaktiven Punktmutanten eine deutliche Steigerung der AAV-DNA-Synthese zu verzeichnen. Diese Beobachtungen konnten nicht auf ein unterschiedliches Expressionsniveau zwischen der Wildtyp-Helicase und den Punktmutanten oder die fehlende Formation subnukleärer präreplikativer HSV-Strukturen, in denen AAV-Rep kolokalisieren kann, zurückgeführt werden (s. 4.3.3, 4.3.4, 4.3.5, 4.3.6).

Vor diesem Hintergrund bestätigte sich auch die Vermutung, warum die Zinkfinger-Mutante im Bereich der Primase im Vergleich zu den DXD-Punktmutationen eine verminderte AAV-DNA-Replikation aufwies (s. 4.2.5). Die Punktmutation führte neben dem Verlust der Primase- auch zu einem Verlust der Helicaseaktivität des Helicase-Primase-Komplexes und somit auch zu einer verringerten AAV-DNA-Synthese (Biswas *et al.*, 1999).

Diese Ergebnisse gaben deutliche Hinweise darauf, dass dem Helfereffekt der Helicase sowohl eine strukturelle Komponente als auch eine enzymatische Aktivität zugrunde lagen. Über welche Mechanismen die Helicase wirkte, ist unbekannt. Vorstellbar wären stöchiometrische, funktionell ergänzende oder sich auf Rekombination stützende Modelle (s. 5.3.1).

Die Beobachtung, dass die Helicase bei Transfektion des minimalen Satzes an HSV-Helfergenen essenziell für die AAV-Replikation war, nicht aber im Infektionsassay, zeigte, dass weitere HSV-Faktoren einen unbekanntem Einfluss auf AAV ausübten (s. 4.3.4, 4.3.5, 5.2.2).