

5 DISKUSSION

Das Verständnis der molekularen Interaktionen zwischen AAV und den für eine effiziente Replikation erforderlichen Funktionen des jeweiligen Helfervirus trägt dazu bei, den Lebenszyklus von AAV und seinen Einfluss auf die Wirtszelle besser zu verstehen. Diese Kenntnisse erhöhen die Sicherheit von AAV-Vektoren und können für die Entwicklung und Optimierung effizienter Verpackungssysteme für die Produktion von AAV-Vektoren eingesetzt werden. Über diese Anwendungen hinaus wird ein Einblick in die Funktionsweise von Proteinen und den Interaktionen zwischen Viren bzw. zwischen Viren und Wirtszelle gewonnen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss zweier essenzieller HSV-Helferfunktionen, die enzymatische UL5-Helicase- und UL52-Primaseaktivität, auf die AAV-DNA-Replikation erstmalig getrennt voneinander untersucht. Folgende Ergebnisse konnten gewonnen werden:

- 1) Weder die enzymatische Aktivität der Primase noch der Helicase wurde für die Ausbildung subnukleärer Replikationskomplexe benötigt. Die ssDNA-abhängige Kolokalisation des HSV *single-strand DNA-binding protein* ICP8 (UL29) und AAV-Rep blieb in der Gegenwart des mutierten oder des Wildtyp-HSV-Helicase-Primase-Komplexes (UL5/UL8/UL52) vollständig erhalten (s. 4.2.3, 4.3.3, 5.1).
- 2) Die enzymatische Aktivität der Primase UL52 ist für die AAV-DNA-Replikation bei Anwesenheit der vier minimal benötigten HSV-Helfergene nicht essenziell. Nach HSV-Infektion stimulierte nur die enzymatisch aktive Primase die AAV-DNA-Replikation (s. 4.2.7, 5.2).
- 3) Die enzymatisch aktive Helicase UL5 führte sowohl in Gegenwart der minimal benötigten HSV-Helferfunktionen als auch nach HSV-Infektion zu einer Steigerung der AAV-DNA-Replikation (s. 4.3.7, 5.3).
- 5) Die Quantifizierung der AAV-DNA-Replikation zeigte, dass diese nach Infektion mit einer enzymatisch defekten UL52- oder UL5-Mutante ca. 25 bis 70 mal stärker ist als nach Transfektion der minimal benötigten HSV-Helfergene. Im Rahmen der Infektion mit HSV müssen somit weitere, bisher noch unbekannte Funktionen die AAV-DNA-Replikation beeinflussen (s. 4.2.6, 4.3.6, 5.2.2).

5.1 BEDEUTUNG DER HSV-REPLIKATIONSKOMPARTIMENTE FÜR AAV

Der Helicase-Primase-Komplex wird für die Ausbildung von Replikationskomplexen benötigt, in denen sich HSV und im Rahmen einer Doppelinfection AAV repliziert (Burkham *et al.*, 1998; Heilbronn *et al.*, 2003). Deshalb sollte in dieser Arbeit analysiert werden, ob bei den enzymatisch defekten HSV-Punktmutanten der UL5-Helicase und der UL52-Primase die Fähigkeit zur Ausbildung von Replikationskomplexen erhalten war.

In vorausgegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass in Zellen, die mit HSV und AAV infiziert sind, HSV-ICP8 und AAV-Rep ssDNA-abhängig kolokalisieren. *In vitro* interagieren beide Proteine in Anwesenheit von ssDNA um den Faktor 10 stärker als ohne DNA oder in Gegenwart von doppelsträngiger DNA (Heilbronn *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass für die ssDNA-abhängige *in vivo*-Kolokalisation von ICP8 und Rep nur der trimere Helicase-Primase-Komplex (UL5/UL8/UL52) als einzige zusätzliche Komponente benötigt wurde (s. 4.1.3.2). Die ssDNA-abhängige Kolokalisation ist auch mit enzymatisch inaktiven Helicase- oder Primase-Punktmutanten voll erhalten (s. 4.2.3, 4.3.3). Dies bestätigte und erweiterte die Befunde von Stracker *et al.* (2004), der die Kolokalisation von ICP8 und Rep in Gegenwart des Helicase-Primase-Komplexes beschrieben hat, jedoch ohne die ssDNA-Abhängigkeit der Interaktionen zu untersuchen.

Die Beobachtung, dass die vier HSV-Gene essenziell für die Ausbildung von präreplikativen Komplexen und für eine AAV-DNA-Replikation sind, bestätigt die Annahme, dass sich AAV in HSV-Replikationskomplexen repliziert (Heilbronn *et al.*, 2003; Stracker *et al.*, 2004). Die AAV-DNA-Replikation würde demnach nach folgender Modellvorstellung ablaufen:

Zunächst binden Rep78/68 sequenzspezifisch an den *rep-binding elements* der AAV-ITR(s), während ICP8 im ssDNA-Bereich des AAV-Genoms bindet und diesen entwunden hält (Ruyechan *et al.*, 1983; Heilbronn *et al.*, 2003). Für ICP8 ist eine sequenzspezifische, hohe Bindungsaktivität zu ssDNA dokumentiert (Lee *et al.*, 1985). Dieses Modell erklärt sehr gut die klare ssDNA-Abhängigkeit der Kolokalisation von ICP8 und Rep, da das AAV-Genom Rep und ICP8 in räumliche Orientierung zueinander bringt. In Analogie zur sequenziellen Rekrutierung der einzelnen Komponenten des HSV-Replikationskomplexes am HSV-*ori* sollte dann der Helicase-Primase-Komplex (UL5/UL8/UL52) binden (Burkham *et al.*, 1998, 2001). Bei einer HSV-Infektion werden dann der HSV-Polymerasekomplex (UL30/UL42), PML und weitere, die DNA-Replikation beeinflussende virale und zelluläre Proteine

rekrutiert (Liptak *et al.*, 1996; Ni *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2004; s. 1.3.2.3). Es bilden sich volle HSV-Replikationskompartimente aus (Burkham *et al.*, 1998). Diese würden bei Rekrutierung von AAV-DNA auch diese replizieren können. (s. Abb. 5.1).

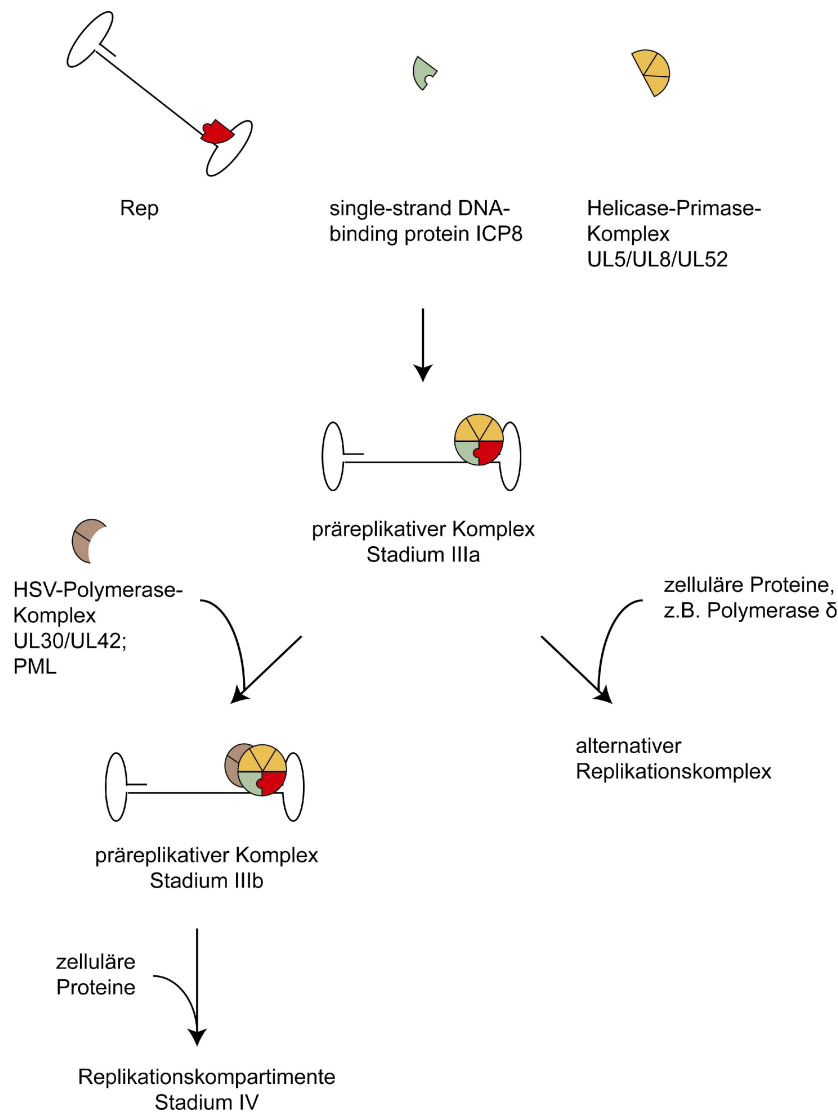


Abb. 5.1: Ausbildung von Replikationskompartimenten bei Anwesenheit des gesamten HSV-Genoms und in Anwesenheit der minimal benötigten HSV-Helferfunktionen. Rep bindet an den ITR(s) während ICP8 an den ssDNA-Abschnitten bindet. Anschließend kann sich der Helicase-Primase-Komplex anlagern. Bei Infektion mit HSV bilden sich HSV-ähnliche Replikationskompartimente aus. Fehlt der HSV-Polymerasekomplex, ersetzen zelluläre Proteine die HSV-Funktionen. Es entsteht ein alternativer Replikationskomplex.

Alle in dieser Arbeit verwendeten enzymatisch defekten Punktmutanten der Helicase oder Primase waren noch in der Lage, HSV-Replikationskomplexe auszubilden und mit Rep präreplikative subnukleäre Komplexe zu bilden. Folglich werden für die AAV-DNA-Replikation die UL5-Helicasen und die UL52-Primasen vor allem als Strukturkomponenten nukleärer Replikationskomplexe benötigt (s. 4.2.3, 4.3.3). Deren Ausbildung scheint für die AAV-Replikation essenziell zu sein, da nur in Anwesenheit der hierfür minimal benötigten Faktoren, ICP8 und der Helicase-Primase-Komplex, eine AAV-DNA-Replikation nachzuweisen war (Weindler *et al.*, 1991; vgl. 4.1.1 mit 4.1.3.2). In diesem Minimalkomplex fehlt der HSV-Polymerasekomplex. Daher müssen für die AAV-DNA-Replikation in diesem Fall zelluläre Polymerasen, beispielsweise die Polymerase δ , die fehlende HSV-Polymerase ersetzt haben (s. Abb. 5.1). Auch bei Adenovirus als Helfer für die AAV-Replikation wird die codierte DNA-Polymerase nicht benötigt (Muzyczka *et al.*, 2001). Stattdessen wurde die zelluläre Polymerase δ als Replikationsenzym nachgewiesen (Ni *et al.*, 1998).

5.2 EINFLUSS DER HSV-PRIMASE UL52 AUF DIE AAV-DNA-REPLIKATION

Ausgang dieser Arbeit war die Frage, ob AAV angesichts der Fähigkeit sein lineares ssDNA-Genom durch palindromische Rückfaltung der terminalen Sequenzwiederholungen (ITR(s)) selbst zu „primen“ überhaupt eine Primaseaktivität für die Replikation benötigt oder ob die Primase UL52 nur als strukturelle Komponente für die Ausbildung präreplikativer Komplexe Bedeutung hat. Um eine Unterscheidung zwischen den enzymatischen bzw. den komplexbildenden Eigenschaften der HSV-Primase treffen zu können, wurden beschriebene Punktmutationen gezielt im katalytischen Zentrum der Primase gesetzt (Klinedinst *et al.*, 1994; Dracheva *et al.*, 1995; s. 4.2.1).

Das katalytische Zentrum wird als DXD-Motiv bezeichnet, wobei X für eine beliebige hydrophobe Aminosäure steht. Dieses Motiv ist, manchmal auch ohne X, hochkonserviert und findet sich in vielen reversen Transkriptasen, RNA- bzw. DNA-Polymerasen sowie Primasen, beispielsweise in den meisten Primasen anderer Herpesviren, in der Maus-Primase p49, der Hefe-Primase 1 und in der Bakteriophagen T7-Primase (Argos, 1988; Klinedinst *et al.*, 1994). Die genaue Bedeutung dieses Motivs ist noch nicht endgültig geklärt. Mögliche Funktionen wären die Bindung von Mg^{++} -Kationen, von NTP(s) bzw. des Templates oder eine direkte Rolle in der Primase- bzw. Polymeraseaktivität (Argos, 1988; Klinedinst *et al.*, 1994; Dracheva *et al.*, 1995).

Für die HSV-Primase UL52 beschrieben Klinedinst *et al.* (1994) und Dracheva *et al.* (1995) Punktmutanten innerhalb des DXD-Motivs an der Position 628 und 630, welche zu einer Aufhebung der enzymatischen Aktivität bei gleichzeitig weiterbestehender Interaktionsfähigkeit mit anderen Proteinen führen (Klinedinst *et al.*, 1994). Um die enzymatische Aktivität der Primase getrennt von den anderen Funktionen im Helicase-Primase-Komplex untersuchen zu können, durften die Funktionen von UL8 und der HSV-Helicase UL5 nicht beeinträchtigt werden. *In vitro* Experimente von Klinedinst *et al.* (1994) zeigten, dass die Punktmutante D628Q weiterhin in der Lage ist, den Helicase-Primase-Komplex auszubilden. Im Vergleich zum Komplex mit Wildtyp UL52 zeigt der Komplex mit der Primase-Mutante eine ATPase-Aktivität von 98 % und eine Helicaseaktivität von 90 %. Auch die Mutation D630A beeinträchtigte die Helicase- und ATPase-Aktivität des trimeren Komplexes nicht (Dracheva *et al.*, 1995).

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit auch eine Primase-Mutante untersucht, die zwei Punktmutationen im Zinkfinger-Motiv an den Positionen 988 und 1028 (auch als C3 und C4 bezeichnet) enthält (Biswas *et al.*, 1999). Wie das DXD-Motiv ist auch das Zinkfinger-Motiv hoch konserviert und lässt sich in zahlreichen anderen Primasen nachweisen, z.B. in vielen Primasen anderer Herpesviren, Bakteriophagen, der Maus und der Hefe (Ilyina *et al.*, 1992; Mendelman *et al.*, 1994). Die Zinkfinger spielen u.a. eine Rolle bei der sequenzspezifischen DNA-Bindung (Ilyina *et al.*, 1992). Obwohl die Stärke der Komplexbildung mit der Helicase nicht beeinflusst wird, zeigt die Zinkfinger-Mutante im Gegensatz zu den DXD-Mutanten neben dem Verlust der Primaseaktivität auch einen Verlust der Helicaseaktivität des trimeren Komplexes. Zusätzlich findet sich eine deutliche Reduktion der ATPase-Aktivität auf nur 9 % im Vergleich zur Wildtyp-Helicase. Die DNA-Bindungsfähigkeit des Komplexes verringert sich bei Verwendung der Zinkfinger-Mutante, sie beträgt nur noch 2 % von der des Wildtyp-Komplexes (Biswas *et al.*, 2001).

Für diese Befunde wurden verschiedene Erklärungsmodelle herangezogen. Denkbar ist, dass durch die fehlende DNA-Bindung die Helicase und/oder Primase nicht aktiv werden und so die DNA-bindungsabhängige ATPase-Aktivität nicht optimal stimuliert wird (Biswas *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005). Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung, dass Helicasen mindestens zwei DNA-Bindungsstellen benötigen, um enzymatisch aktiv werden zu können. Vielleicht bildet der Zinkfinger der Primase im Komplex die zweite DNA-Bindungsstelle (Biswas *et al.*, 2001). Alternativ kann es durch die Mutation natürlich auch zu einer die Interaktion mit UL5 störenden Konformationsänderung oder zu einer Veränderung einer gemeinsamen DNA-Bindungsdomäne zwischen UL5 und UL52 kommen (Chen *et al.*, 2005). Für die zuletzt genannte Möglichkeit spricht, dass Helicase-Primase-Inhibitoren typischerweise in einem Bereich zwischen den beiden Subeinheiten binden (Betz *et al.*, 2002; Kleymann *et al.*, 2002; Liuzzi *et al.*, 2004).

Alle verwendeten Primase-Punktmutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit funktionell überprüft. Wie erwartet führten sämtliche DXD- und Zinkfinger-Mutationen zu einem kompletten Verlust der HSV-Replikation bei gleichzeitig weiterbestehender Fähigkeit zur Ausbildung präreplikativer Komplexe (s. 4.2.2, 4.2.3). Die Integration von AAV-Rep in diese Komplexe blieb vollständig erhalten. Die Primase-Punktmutanten waren somit enzymatisch defekt, konnten aber weiterhin den für die Komplexbildung essenziellen Helicase-Primase-Komplex ausbilden. Die Mutationen selbst haben, bis auf die Zinkfinger-Mutation, keinen

Einfluss auf die Helicaseaktivität. Insofern können alle in den Experimenten gesammelten Daten auf die enzymatische Primaseaktivität zurückgeführt werden.

5.2.1 MÖGLICHE FUNKTION DER HSV-PRIMASEAKTIVITÄT BEI DER AAV-DNA-REPLIKATION

Der Einfluss der Primase-Punktmutanten auf die AAV-DNA-Replikation wurde in zwei komplementären Assays untersucht. Bei Transfektion der minimal benötigten Helferfunktionen wurden neben dem Wildtyp-AAV-Genom nur noch das *single-strand DNA-binding protein* ICP8 und der trimere Helicase-Primase-Komplex kotransfiziert, wobei die Wildtyp-Primase durch die entsprechenden Punktmutanten ersetzt wurde. Im Infektionssystem wurde zunächst das AAV-Genom mit einem Primase-Konstrukt, welches entweder für die Wildtyp-Primase oder die Punktmutanten codierte, kotransfiziert und dieser Ansatz anschließend mit einem Primase-deletierten Virus überinfiziert. Durch den Ablauf der natürlichen HSV-Infektion standen sämtliche HSV-Gene für die AAV-DNA-Replikation zur Verfügung.

Bei Transfektion mit den minimalen HSV-Helferfunktionen zeigte sich kein Unterschied zwischen der Verwendung der Wildtyp-Primase und den DXD-Punktmutanten. Dies ist vereinbar mit dem bisherigen Modell der AAV-DNA-Replikation, bei dem es über die Palindrom-Struktur der AAV-ITR(s) zu einem „Selbst-Priming“ der DNA-Synthese kommt (Tattersall *et al.*, 1976). Dagegen beobachtete man bei der Zinkfinger-Mutante eine Abschwächung der AAV-DNA-Replikation (s. 4.2.5). Dieses Motiv hat allerdings auch eine Bedeutung für die Helicase- und ATPase-Aktivität, die, wie gezeigt, die AAV-DNA-Replikation stimulieren (Biswas *et al.*, 2001; vgl. 4.3.7). Insofern basierte der Phänotyp der Zinkfinger Mutante in diesem Assay wohl eher auf einer Beeinflussung der übrigen enzymatischen Aktivitäten des Helicase-Primase-Komplexes als auf einer direkten Rolle der Primaseaktivität. Die Primase diente lediglich als Strukturkomponente, die zur Bildung der Replikationskomplexe benötigt wurde.

Beim Infektionsassay zeigte sich entgegen den Erwartungen eine verminderte AAV-DNA-Replikation bei allen Primasemutanten (s. 4.2.4). Dieser Unterschied zu den Daten aus den Transfektionsansätzen scheint am ehesten mit der Präsenz weiterer HSV-Gene zusammenzuhängen. Carrington-Lawrence *et al.* berichteten 2003, dass die Rekrutierung der HSV-

Polymerase (UL30) und des *accessory protein* (UL42) in die HSV-Replikationskomplexe abhängig sei von einer enzymatisch aktiven Primase. Offenbar müssen erst RNA-Primer synthetisiert werden, bevor sich der HSV-Polymerasekomplex an den ICP8-Helicase-Primase-Komplex anlagern kann. Erst dann können sich die präreplikativen Komplexe von Stadium IIIa in IIIb weiterentwickeln. Durch die Anlagerung weiterer zellulärer Proteine entstehen dann im Stadium IV voll ausgebildete Replikationskompartimente, in denen die Virusreplikation unter optimalen Bedingungen stattfinden kann (s. 5.1). Die fehlende Rekrutierung des HSV-Polymerasekomplexes, von dem gezeigt wurde, dass er einen stimulierenden Einfluss auf die AAV-DNA-Replikation ausübt, ist daher wahrscheinlich die Hauptursache für die verminderte AAV-DNA-Replikation bei Verwendung der Primasemutanten im Infektionssystem (Weindler *et al.*, 1991; s. 4.1.1, 5.2.2; s. Abb. 5.2).

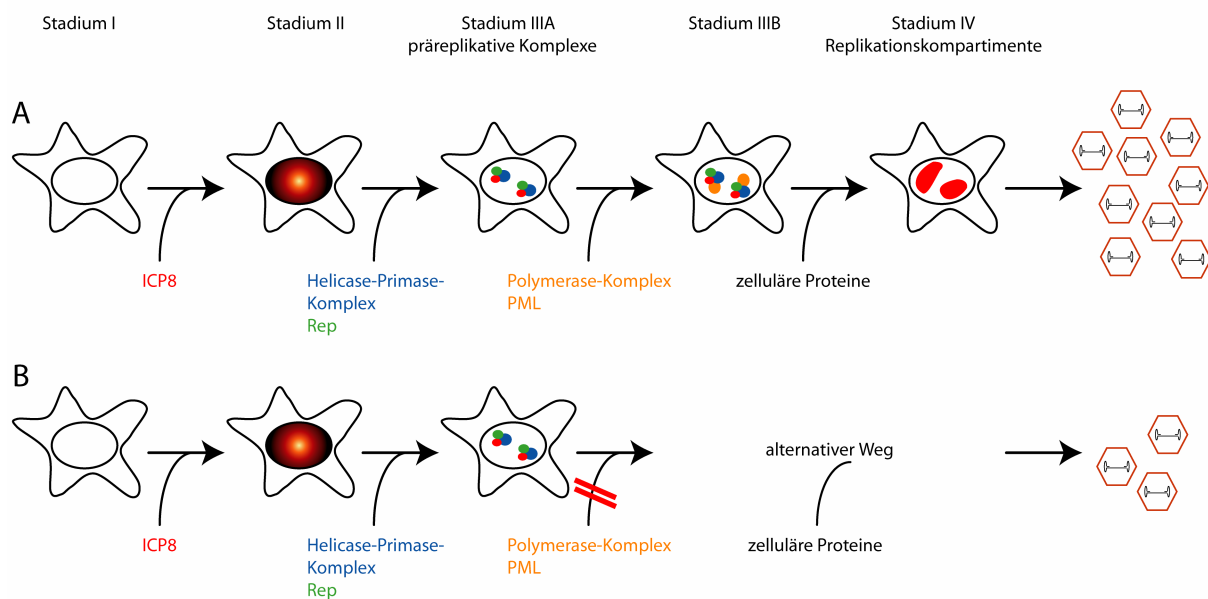


Abb. 5.2: Unterschied der Replikationskomplexbildung bei enzymatisch (A) aktiver HSV-Primase und (B) inaktiver HSV-Primase. Ohne Primaseaktivität bleibt die Komplexbildung in Stadium IIIA stehen. Ein alternativer Weg führt zu einer abgeschwächten AAV-Replikation.

Zusammenfassend stützen diese Befunde die Annahme, dass die HSV-Primase bei der AAV-DNA-Replikation ausschließlich als strukturelle Komponente für die Ausbildung der HSV-Replikationszentren benötigt wird, während die enzymatische Aktivität keine direkte Rolle

bei der AAV-DNA-Replikation besitzt. Sie ist allenfalls Voraussetzung für die Rekrutierung des HSV-Polymerasekomplexes und gegebenenfalls weiterer HSV- oder zellulärer Proteine.

5.2.2 MÖGLICHER EINFLUSS VIRALER UND ZELLULÄRER FUNKTIONEN IM TRANSFEKTIONS- UND INFEKTIONSASSAY AUF DIE AAV-DNA-REPLIKATION

Der von Weindler *et al.* (1991) etablierte AAV-DNA-Replikationsassay zeigte erstmalig, dass der Helicase-Primase-Komplex (UL5/UL8/UL52) und das *single-strand DNA-binding protein* ICP8 (UL29) für eine AAV-DNA-Replikation ausreichend sind. Die HSV-Polymerase (UL30) und das *accessory protein* (UL42) sind für die AAV-Replikation nicht essenziell, erhöhen aber die Replikationsrate. *In vitro* lässt sich eine AAV-DNA-Replikation in Anwesenheit von ICP8, dem Helicase-Primase-Komplex und dem HSV-Polymerasekomplex (UL30/UL42) nachweisen (Ward *et al.*, 2001).

In dem in dieser Arbeit verwendeten Transfektionsassay, in dem nur die essenziellen HSV-Helferfunktionen - ICP8 und der Helicase-Primase-Komplex - mit AAV kotransfiziert wurden, fehlte der HSV-Polymerasekomplex. Trotzdem war eine AAV-DNA-Replikation zu verzeichnen. In diesem Fall muss eine zelluläre Polymerase, beispielsweise die Polymerase δ , für die AAV-DNA-Elongation zur Verfügung gestanden haben (Ni *et al.*, 1998). Dass zelluläre Proteine bei der AAV-DNA-Replikation Funktionen übernehmen können, zeigt u.a. die Beobachtung, dass sich AAV in genotoxisch gestressten Zellen, z.B. nach UV-Behandlung oder Zugabe von karzinogenen Stoffen, auch ohne Helferviren vermehren kann (Yakobson *et al.*, 1987, 1989; Yalkinoglu *et al.*, 1988). Bei einer Koinfektion mit Adenoviren als Helfervirus wird ebenfalls eine zelluläre Polymerase für die AAV-DNA-Synthese benötigt, da die Adenovirus-Polymerase nicht zu den Helfereigenschaften für AAV gehört (Muzyczka *et al.*, 2001). Im Kontext von HSV als Helfervirus können zelluläre Proteine aber die Abwesenheit der HSV-Polymerase nicht voll kompensieren, was die Reduktion der AAV-Replikationsrate um etwa den Faktor 10 im Vergleich zur Kontrolle mit dem HSV-Polymerasekomplex zeigt (s. 4.1.1). Warum bei HSV, im Gegensatz zum Adenovirus, die zellulären Faktoren weniger effektiv sind, ist unbekannt. Vorstellbar wäre ihre Funktion als integraler Bestandteil bei der Maturation der Replikationskomplexe. Bei Verwendung einer temperatursensitiven HSV-Mutante für die HSV-Polymerase wurde in der Tat gezeigt, dass bei der nicht-permissiven Temperatur, d.h., wenn die Polymerase zwar vorhanden aber nicht

funktionell ist, AAV zu gleichen Titern wie bei der Infektion mit HSV-Wildtyp repliziert (Weindler *et al.*, 1991).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Quantifizierung der AAV-DNA-Replikation nach Transfektion der minimal benötigten HSV-Helferfunktionen im Vergleich zum Infektionssystem in Anwesenheit sämtlicher HSV-Gene durchgeführt. Es zeigte sich, dass sich durch die Bereitstellung der zusätzlichen HSV-Gene die AAV-DNA-Replikation um den Faktor 166 steigern ließ (s. 4.2.6). Dieser Unterschied ließ sich mittels geeigneter Kontrollen nicht auf eine Reinfektion von repliziertem HSV zurückführen (s. 4.2.4). Selbst die nach Transfektion der minimal benötigten Helfergene essenzielle strukturenbende Funktion der Primase wurde im Infektionsassay so gut kompensiert, dass trotzdem noch eine etwa um 27-fach höhere AAV-DNA-Replikation als nach Transfektion zu beobachten war (s. 4.2.6). Somit musste die Steigerung der AAV-DNA-Replikation im Infektionssystem auf zusätzlichen, bisher nicht charakterisierten Funktionen anderer HSV-Proteine basieren. Folgende direkte oder indirekte Funktionen wären denkbar:

Das HSV-Protein ICP0 lagert sich an den ND10-Domänen im Nukleus an und führt zu einer Degradation verschiedener Proteine, z. B. von einigen PML-Isoformen. Damit verbunden ist die Auflösung der Domänen (Maul *et al.*, 1994; Everett *et al.*, 2006b). Dadurch könnten zelluläre Faktoren, die sich in diesen Domänen ansammeln und Einfluss auf den Zellzyklus, die Genexpression, auf DNA-Reparaturvorgänge, den Chromatin-Metabolismus oder die Virusabwehr und Apoptose ausüben, beeinflusst und somit indirekt die AAV-DNA-Replikation stimuliert werden (Regad *et al.*, 2001; Everett, 2006a/b). Neben dieser Funktion fördert ICP0 die Expression der AAV-Rep-Proteine und scheint eine Bedeutung für den Übergang vom latenten zum produktiven AAV-Replikationszyklus zu haben (Cai *et al.*, 1993; Geoffroy *et al.*, 2004).

Daneben weist HSV-1 viele Proteine auf, die den Wirtszellmetabolismus, den Zellzyklus und die Immunantwort der Wirtszelle beeinflussen (Roizman *et al.*, 2001). Exemplarisch sei hier u.a. auf den durch HSV bedingten Block des *centromeric protein* CENP-C verbunden mit einem G₂/M-Zellzyklusarrest (Everett *et al.*, 1999), auf die Verhinderung der Antigenpräsentation für CD8⁺ Zellen durch das HSV-Protein U_S12 (York *et al.*, 1994) und den HSV-Einfluss auf die Zellzyklus- und Apoptose-regulierenden Proteine p53 sowie das Retinoblastomprotein Rb verwiesen (Wilcock *et al.*, 1991). Andere HSV-Funktionen greifen

in den Nukleotid-Metabolismus ein und unterdrücken die Genexpression der Wirtszelle (Roizman *et al.*, 2001).

Worauf aber der genaue fördernde Einfluss der anderen HSV-Gene basiert, ist bislang nicht untersucht. Vermutlich ist die Schaffung eines geeigneten zellulären Milieus, z.B. durch Rekrutierung von zellulären Proteinen in die Replikationszentren, die ohne HSV-Infektion nicht gebildet würden, von essenzieller Bedeutung.

5.3 DIE ROLLE DER HSV-HELICASE UL5 BEI DER AAV-DNA-REPLIKATION

Die regulatorischen AAV-Rep-Proteine weisen eine eigene Helicaseaktivität auf. Daher stellte sich die Frage, ob die HSV-Helicase UL5 Bedeutung als enzymatisch aktives Enzym bei der AAV-Replikation hat oder als strukturgebende Komponente für die Formation der replikativen Komplexe fungiert. Um dies zu untersuchen, wurden Punktmutationen in zwei verschiedene essenzielle Helicase-Domänen des Enzyms eingeführt (Zhu *et al.*, 1992b; s. 4.3.1).

Die HSV-Helicase UL5 weist sieben hochkonservierte ATP-Bindungs- und Helicasemotive auf. Aufgrund dieser Motive wird UL5 der Helicasen-Superfamilie 1 zugeordnet, die man bei Bakterien, Viren und Eukaryonten findet (Zhu *et al.*, 1992b; Marintcheva *et al.*, 2001). Die Motive I (Walker A Box) und II (Walker B Box) des Proteins stellen Nukleotid-Bindungsdomänen dar und sind somit für die Hydrolyse von ATP oder auch GTP sowie für die Fähigkeit zur DNA-Bindung verantwortlich (Marintcheva *et al.*, 2001). Die Motive III bis VI stellen die eigentliche Helicaseaktivität. Die Subdomänen IB und IIB zwischen den Motiven Ia und II sowie zwischen den Motiven IV und V könnten Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Korolev *et al.*, 1998). Das Enzym besitzt somit eine ATPase-, GTPase- und 5'-3'-Helicaseaktivität. Seine Hauptaufgabe besteht in der Entwindung der Replikationsgabel bei der HSV-DNA-Replikation (Marintcheva *et al.*, 2001).

Alle in dieser Arbeit verwendeten Motiv I-Punktmutanten sowie die verwendete Motiv II-Punktmutante waren unfähig, HSV-DNA zu replizieren. Die Ausbildung des trimeren Helicase-Primase-Komplexes war aber erhalten (Zhu *et al.*, 1992b; s. 4.2.2, 4.2.3). In DNA-Bindungsassays wurde gezeigt, dass Motiv I-Mutationen zu einer Abschwächung der DNA-Bindungsfähigkeit der Helicase und Primase führen: Es wurde eine 1,7-fach geringere Bindungskapazität der Motiv I-Mutanten im Vergleich zur Wildtyp-Helicase sowie eine 6,5-fach reduzierte DNA-Bindung der komplexierten Wildtyp-Primase gefunden. Erklärt wird dieser Bindungsverlust durch den fehlenden allosterischen Effekt von ATP (Marintcheva *et al.*, 2001). Die Mutation in Motiv IV der Helicase hebt die Helicaseaktivität ganz auf und führt zu einer ca. 2,8-fach verstärkten DNA-Bindungskapazität der Helicase (Biswas *et al.*, 2001). Die ATPase-Aktivität ist um den Faktor 3 bis 6 reduziert (Graves-Woodward *et al.*, 1997). Überraschenderweise führen die Mutationen in der Helicase zu einer Steigerung der Primaseaktivität. Bei Motiv I-Punktmutanten beobachtet man ein 2-fach, bei Motiv IV-

Punktmutanten ein 9-fach höheres Aktivitätsniveau der Wildtyp-Primase. Mögliche Erklärungen könnten Konformationsänderungen im Komplex oder eine verminderte Konkurrenz um das DNA-Template sein, da die beiden Enzyme gegensätzliche Polaritäten aufweisen. Während die Helicase in 5'-3'-Richtung arbeitet, synthetisiert die Primase RNA-Primer in 3'-5'-Richtung (Graves-Woodward *et al.*, 1997). Diese Daten bestätigen, dass die Mutationen in der Helicase keinen hemmenden Einfluss auf die Aktivität der Primase haben. Insofern können die in den Experimenten gewonnenen Daten auf die reine Funktion der Helicase zurückgeführt werden.

5.3.1 ERKLÄRUNGSMODELLE FÜR DEN EINFLUSS DER HSV-HELICASE AUF DIE AAV-DNA-REPLIKATION

In den Transfektionsversuchen, in denen Zellen mit den minimal benötigten HSV-Helferfunktionen und AAV kotransfiziert wurden, sowie im Infektionssystem, in dem mit einem Helicase-deletierten HSV überinfiziert wurde, zeigte sich, dass die Helicase-Punktmutanten trotz enzymatischer Inaktivität zu einer Steigerung der AAV-DNA-Replikation im Gegensatz zum vollständigen Fehlen des Enzyms führten. Eine weitere Erhöhung der Replikationsrate ließ sich mit der Wildtyp-Helicase erreichen. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Motiv I- und Motiv IV-Mutanten festgestellt werden, sodass die bei Motiv I-Punktmutanten erniedrigte DNA-Bindungskapazität keinen wesentlichen Einfluss gehabt haben konnte (s. 4.3.4, 4.3.5). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Helicase UL5 für die AAV-DNA-Synthese sowohl eine strukturelle als auch eine direkte enzymatisch bedeutsame Rolle einnimmt. Die Quantifizierung der AAV-DNA-Replikation bestätigte, dass die AAV-DNA-Synthese im Transfektionsassay in Gegenwart der minimal benötigten Helferfunktionen um den Faktor 200 niedriger lag als bei Anwesenheit sämtlicher HSV-Gene im Infektionssystem (s. 4.3.6). Auch hier übten weitere HSV-Faktoren einen Einfluss auf die AAV-DNA-Synthese auf (vgl. 5.2.2).

Verschiedene molekulare Mechanismen sind vorstellbar, über welche die Induktion der AAV-DNA-Replikation durch die HSV-Helicase vermittelt wird. Zu diesen gehören die Ausbildung von Replikationskompartimenten, die Förderung von Rekombinationsereignissen oder eine, die Rep-Funktion komplementierende, Helicaseaktivität.

5.3.1.1 STRUKTURELLE BEDEUTUNG DER HELICASE FÜR DIE AUSBILDUNG VON REPLIKATIONSKOMPLEXEN

Im Gegensatz zur Primase wurde im Infektionssystem, d.h. in Anwesenheit sämtlicher HSV-Gene, die Helicase als strukturelle Komponente benötigt. Während bei der Primase kein Unterschied zwischen der Anwesenheit der Punktmutanten bzw. dem vollständigen Fehlen der Primase nachzuweisen war, stieg bei der Helicase die AAV-DNA-Replikation in Anwesenheit der Punktmutanten um etwa den Faktor 2,7 im Vergleich zum vollständigen Fehlen der Helicase (s. 4.3.6). Erklärbar wäre dies beispielsweise durch enzymatisch unabhängige Protein-Protein-Interaktionen, bei denen die Helicase weitere Faktoren an den Replikationskomplex bindet.

5.3.1.2 DIE HSV-HELICASE UND IHRE BEDEUTUNG BEI REKOMBINATIONSEREIGNISSEN

Bei der HSV-DNA-Replikation spielen homologe Rekombinationsereignisse eine wichtige Rolle, die auch für das Vorhandensein hochverzweigter DNA-Strukturen bei der HSV-Replikation verantwortlich gemacht werden (Severini *et al.*, 1996). Dabei scheinen das *single-strand DNA-binding protein* ICP8 und die Helicase UL5 eine zentrale Rolle einzunehmen. ICP8 hat thermodynamisch mehr Ähnlichkeiten zu den bekannten Rekombinasen RecA und T4 UvsX als zu den ssDNA-bindenden Proteinen (Gourves *et al.*, 2000). Außerdem kann ICP8 D-Loop-Strukturen ausbilden, hat eine ATP- sowie richtungsunabhängige helixdestabilisierende Wirkung und kann DNA vor Restriktionsendonukleasen schützen (Boehmer *et al.*, 1993a; Nimonkar *et al.*, 2003), alles Eigenschaften, die für eine homologe Rekombination benötigt werden. Die benötigte Energie gewinnt ICP8 aus supergecoilter DNA. *In vitro* konnte mittels ICP8 und der UL5/UL52-Untereinheit homologe Rekombination induziert werden. Die Helicase unterstützt und fördert dabei die Rekombinationsereignisse (Nimonkar *et al.*, 2002, 2003). Man kann spekulieren, dass bei der Auflösung der hochmolekularen, multimerischen AAV-DNA-Replikationsintermediaten in verpackbare monomerische ssDNA Rekombinationsereignisse helfen und hierin die Bedeutung von UL5 liegt. Alternativ könnten durch homologe Rekombinationen auch weitere *origins* geschaffen, ähnlich wie es z.B. beim Bakteriophagen T4 stattfindet, oder DNA-

Schäden repariert werden, wodurch die Integrität der DNA bewahrt wird (Marintcheva *et al.*, 2001).

5.3.1.3 MODELLE FÜR DIE FUNKTION DER UL5-HELICASE BEI DER AAV-DNA-REPLIKATION

Alternativ oder zusätzlich könnte UL5 die Helicaseaktivität von AAV-Rep unterstützen. HSV besitzt zwei essenzielle Helicasen: das zur Helicasenfamilie SF2 gehörende *origin-binding protein* UL9 und das zur Familie der SF1-Helicasen gehörende UL5.

Boehmer *et al.* (1993b, 1998) konnten zeigen, dass sich *in vitro* die Proteinkonzentration von UL9 linear zur Helicaseaktivität verhält. Dies führte u.a. zu dem Modell, dass UL9 an den HSV-*ori(s)* bindet und diese in 3'-5'-Richtung entwindet. Um ein *reannealing* zu verhindern, muss UL9 gebunden bleiben, sodass entsprechend hohe Konzentrationen von UL9 benötigt werden (s. Abb. 5.3, A) (Trego *et al.*, 2003). In Anwesenheit des *single-strand DNA-binding protein* bindet ICP8 an der entwundenen ssDNA und hält diese in dieser Form stabil. UL9, das jetzt nicht mehr zur Verhinderung eines *reannealing* an der DNA gebunden bleiben muss, wird freigesetzt und kann nun den weiteren Strang entwinden (s. Abb. 5.3, B). Ohne ICP8 kann UL9 ca. 200 bp, mit ICP8 ca. 3 kbp entwinden (Boehmer *et al.*, 1993b). Alternativ könnte ICP8 auch durch andere Mechanismen, beispielsweise durch Konformationsänderung von UL9 oder Protein-Protein-Interaktionen, die Helicaseaktivität von UL9 steigern (Trego *et al.*, 2003).

Für die Elongation reicht UL9 nicht aus (Blumel *et al.*, 1995), hier übernimmt die 5'-3'-Helicase UL5. Im Gegensatz zu UL9 weist UL5 die für Enzyme typische sigmoidale Kinetik auf (Sivaraja *et al.*, 1998). Das *in vitro* gemessene Aktivitätsoptimum von UL5 ist bei einem pH-Wert von 7 bis 7,5 und einer MgCl₂-Konzentration von 1,5 mM erreicht (Gac *et al.*, 1996).

Die Rep-Proteine gehören zur Helicasensuperfamilie SF3, die charakteristisch für kleine RNA- und DNA-Viren ist (Gorbalenya *et al.*, 1990). Dabei liegen die Helicasemotive meistens innerhalb eines *origin-binding*- oder Initiatorproteins. Das Protein startet die DNA-Replikation, indem es an einem doppelsträngigen *ori* bindet und diesen ATP-abhängig in 3'-5'-Richtung entwindet. Rep68 ist bei einem pH-Wert von 7 und einer MgCl₂-Konzentration von 0,5 bis 1,5 mM aktiv (Zhou *et al.*, 1999), weist also ähnlich benötigte

Umgebungsbedingungen auf wie UL5. Im Gegensatz zu den anderen bekannten biologischen Systemen können die SF3-Helicasen nach der initialen Entwindung des *origins* umschalten und als replikative Helicasen dienen (Hickman *et al.*, 2005). Dabei fällt bei Rep68 eine lineare Beziehung zwischen der Helicaseaktivität und der Proteinkonzentration auf, wie sie auch bei UL9 zu beobachten ist (Zhou *et al.*, 1999; Wonderling *et al.*, 1995).

Sowohl UL9 als auch AAV-Rep weisen viele Gemeinsamkeiten auf: eine lineare Beziehung zwischen der Proteinkonzentration und der Helicaseaktivität, die 3'-5'-Polarität und beide binden sequenzspezifisch auf ihrem jeweiligen Template. Dies führt zu der These, dass Rep für die AAV-DNA-Replikation als *ori*-bindendes Protein eine ähnliche Kinetik und Funktion ausübt wie UL9 für HSV. Dabei entwindet Rep den AAV-ITR analog zur Entwindung des HSV-*ori* durch UL9 und muss gebunden bleiben, um ein *reannealing* der DNA-Stränge zu verhindern. Damit werden größere Rep-Mengen gebunden, sodass weniger Rep für die AAV-DNA-Replikation zur Verfügung steht. Dies könnte einerseits die essenzielle Bedeutung von ICP8 für die AAV-DNA-Replikation erklären (s. Abb. 5.3, C), und andererseits könnte die zusätzliche Helicase UL5, welche im gleichen Zellmilieu wie AAV-Rep aktiv ist, gebundenes Rep ersetzen.

Im Rahmen einer HSV-Infektion beeinflussen sich die an der Komplexbildung beteiligten Proteine UL9 und ICP8 gegenseitig. So fördert beispielsweise ICP8 die Helicaseaktivität des *origin-binding protein* UL9 (Boehmer *et al.*, 1993b, 1998). Eine UL9-analoge Funktion von Rep am AAV-ITR würde weiter untermauert, wenn der Nachweis gelänge, dass ICP8 auch die ATPase und Helicaseaktivität von Rep fördern würde.

Alternativ und/oder zusätzlich könnte die HSV-Helicase UL5 die Funktion von Rep komplementieren. Die Helicase-Aktivität von Rep hat eine 3'-5'-Polarität und die von UL5 weist eine komplementäre 5'-3'-Orientierung auf (Marintcheva *et al.*, 2001). Dabei zeigt UL5 eine Präferenz für DNA mit Replikationsgabel (Graves-Woodward *et al.*, 1997). Für Rep ist nur bekannt, dass es ssDNA ohne Sequenzpräferenz bindet (Zhou *et al.*, 1999). Vielleicht ergänzen sich die Helicasen gegenseitig, wie es auch bei HSV mit UL9 und UL5 vorzufinden ist. Dabei könnte Rep die Synthese des *leading strand* und UL5 die des *lagging strand* übernehmen (Sherman *et al.*, 1992). Es wäre vorstellbar, dass dadurch eine bessere Auflösung der großen multimerischen DNA-Replikationsintermediate gewährleistet werden kann. Für diese Theorie könnte auch sprechen, dass ICP8 als essenzielles Helferprotein bei der AAV-Replikation anwesend und Rep somit nicht vollständig zur Stabilisierung ssDNA gebunden

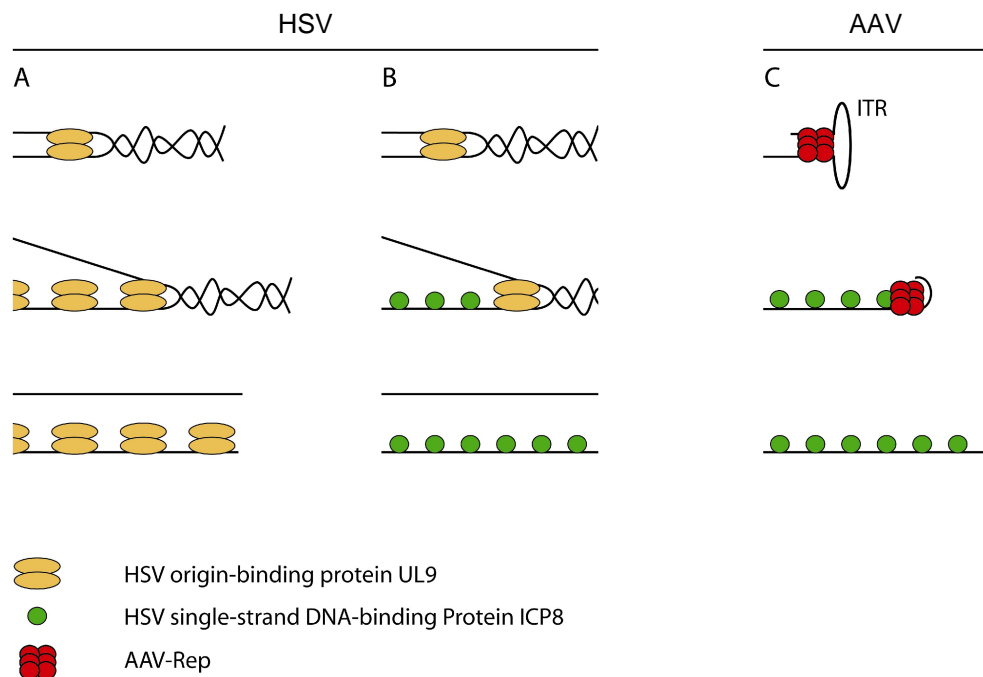


Abb. 5.3: Modell der DNA-Entwindung in Anwesenheit von (A) UL9, (B) UL9 und ICP8 sowie (C) AAV-Rep und ICP8.

(A) Fehlt ICP8, bleiben große Mengen UL9 an der DNA gebunden, um ein *reannealing* zu verhindern.

(B) In Anwesenheit von ICP8 wird weniger UL9 benötigt, da ICP8 die Konformation der ssDNA stabilisiert.

(C) Bei Doppelinfektion mit HSV und AAV bindet Rep an den *rep-binding elements* im Bereich der doppelsträngigen ITR(s) und entwindet diese. ICP8 bindet an der ss-AAV-DNA und stabilisiert diese Konfiguration. Eine direkte, schwache Interaktion von Rep mit ICP8 wurde von Heilbronn *et al.* (2003) beschrieben (frei nach Trego *et al.*, 2003).

sein muss. Dass Rep auch als replikative Helicase dienen kann, erklärt, warum die AAV-DNA auch bei den defekten Helicasemutanten in geringem Umfang repliziert wird (s. 4.3.4., 4.3.5). Inwieweit zelluläre Helicasen bei diesem Prozess mitwirken, ist noch ungeklärt.