

Funktionelle Analyse des Regulatorproteins ICP0 von Herpes Simplex Virus Typ 2

Der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
Department Biologie der Universität Hamburg
zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegte Dissertation

von

Nina Albrecht

aus Erlangen

im Mai 2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. J. HAUBER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. W. SCHÄFER
Tag der Disputation: 09. Juni 2006

Hamburg, den 19. Mai 2006



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Juli 2002 bis Mai 2006 am Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie in Hamburg in der Abteilung Zellbiologie und Virologie durchgeführt.

Dissertationsgutachter:

Prof. Dr. Joachim Hauber & Prof. Dr. Wilhelm Schäfer

Disputationsgutachter:

Prof. Dr. Michael Böttger & PD Dr. Iris Bruchhaus

Publikation:

N. Albrecht, K. Milovic-Holm, B. Keyser, B. Weseloh, T.G. Hofmann, M. Eibl and J. Hauber; Crosstalk of HSV-2 ICP0 and cellular Siah-1 mediates PML degradation. Manuskript in Vorbereitung

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Joachim Hauber herzlichst für die Möglichkeit diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können bedanken. Insbesondere danke ich ihm für seine kontinuierliche Unterstützung und seine zahlreichen Ideen und Ratschläge, die für das Gelingen dieser Arbeit unentbehrlich waren.

Herrn Prof. Wilhelm Schäfer danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachter seitens des Department Biologie der Universität Hamburg zu betreuen.

Bei Frau Prof. Martha Eibl von der Biomedizinischen Forschungsgesellschaft mbH Wien möchte ich mich recht herzlich für die finanzielle Unterstützung und konstruktive Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Hofmann vom DKFZ Heidelberg für die sehr ideenreiche Kooperation.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Kristijana Milovic-Holm für ihr stets offenes Ohr, die zahlreichen Anregungen und die stetige Unterstützung. Des Weiteren ein ganz großes Dankeschön an Frau Britta Weseloh für ihre Hilfsbereitschaft und engelsgleiche Geduld.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung Zellbiologie und Virologie des Heinrich-Pette-Instituts für die permanente Hilfsbereitschaft, zahlreiche Anregungen, Ratschläge und Ideen bedanken. Danke für die schöne Zeit mit euch!

An dieser Stelle sei auch allen anderen gedankt, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Herpes Simplex Viren	3
2.2	Das Ubiquitin-Proteasomen-System	10
2.3	PML-Kerndomänen	13
2.4	Ziel der Dissertation	18
3	MATERIAL.....	19
3.1	Bakterien-Stämme.....	19
3.2	Eukaryotische Zelllinien	19
3.3	Herpes Simplex Viren	20
3.4	Medien	20
3.4.1	Medien für die Anzucht von Bakterien	20
3.4.2	Medien für Gewebekulturen.....	20
3.4.3	Sonstige Medien/Medienzusätze	21
3.5	Nukleinsäuren	21
3.5.1	Oligonukleotide.....	21
3.5.1.1	Oligonukleotide zur Klonierung von ICP0-Konstrukten	22
3.5.1.2	Oligonukleotide zur Sequenzierung von ICP0-Konstrukten.....	22
3.5.1.3	Oligonukleotide zur Klonierung von Siah-1-Konstrukten.....	23
3.5.1.4	Oligonukleotide zur Sequenzierung von Siah-1-Konstrukten	23
3.5.1.5	Oligonukleotide zur Klonierung von pSUPER Vektoren für RNAi (RNA interference)....	23
3.5.1.6	Oligonukleotide zur Amplifikation von cDNA	24
3.5.1.7	Sonstige Oligonukleotide.....	24
3.5.2	Expressionsvektoren	25
3.5.3	Sonstige Nukleinsäuren.....	25
3.6	Radioaktivität.....	26
3.7	Proteinstandards	26
3.8	Synthetische Inhibitoren	26
3.9	Enzyme	26
3.9.1	Restriktionsnukleasen/Puffer	26
3.9.2	Sonstige Enzyme	26
3.10	Antikörper.....	27
3.10.1	Primärantikörper.....	27
3.10.2	Sekundärantikörper	27
3.11	Fluoreszenz-gekoppelte Marker für Zellorganelle	28
3.12	Reagenzsysteme (Kits).....	28
3.13	Reagenzien und Laborhilfsmittel	28
3.14	Lösungen und Puffer.....	31
4	METHODEN	35
4.1	Bakterienkulturen.....	35
4.1.1	Kulturen für die Plasmidisolierung	35
4.1.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien zur Transformation	35
4.1.3	Transformation von Plasmid-DNA	36
4.2	DNA/RNA-Methoden.....	36
4.2.1	DNA-Standardmethoden.....	36
4.2.2	Hybridbildung von Oligonukleotiden	37
4.2.3	Isolierung von gesamtzellulärer-RNA.....	37
4.2.4	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)	37
4.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR).....	39
4.2.5.1	PCR zur Amplifikation von DNA für Klonierungen	39

4.2.5.2	PCR zur Amplifikation von cDNA zur Analyse der Genexpression	40
4.2.5.3	Sequenzier-PCR.....	41
4.2.6	DNA-Sequenzierung	42
4.2.7	Klonierungen.....	43
4.2.7.1	Klonierung von ICP0-Fusionskonstrukten und ICP0-Deletionsmutanten	43
4.2.7.2	Klonierung von Siah-1-Deletionsmutanten	47
4.2.7.3	Klonierung eines Siah-1 und GFP-Expressionsplasmids.....	48
4.2.7.4	Klonierung von pSUPER-Konstrukten für RNAi (RNA interference).....	49
4.2.7.5	Klonierung von lentiviralen Vektoren für RNAi	49
4.3	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	50
4.3.1	Allgemeine Zellkultur	50
4.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	50
4.4	Zellbiologische Methoden.....	50
4.4.1	Transiente Transfektion von 293T- und HeLa-Zellen.....	50
4.4.2	Transiente Transfektion von 293T-Zellen mit lentiviralen Vektoren zur Virusproduktion	51
4.4.3	p24-ELISA zur Konzentrationsbestimmung von rekombinanten Lentiviren	52
4.4.4	Transiente Transfektion von U2OS- und VERO-Zellen	53
4.4.5	Indirekte Immunfluoreszenz	53
4.5	Virale Infektion von Zellen.....	54
4.5.1	Infektion von VERO-Zellen mit HSV-2	54
4.5.2	Infektion von VERO-Zellen mit HSV-2 zur Virusproduktion.....	54
4.5.3	Titration von HSV-2 Virusüberstand mittels Plaqueassay	55
4.5.4	Transduktion von VERO-Zellen mit rekombinanten Lentiviren für RNAi.....	55
4.6	Proteinmethoden	56
4.6.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford.....	56
4.6.2	Trennung von Proteinen mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
4.6.3	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	56
4.6.4	Western Blot.....	56
4.6.5	Koimmunpräzipitation aus Gesamtzellextrakt	57
4.6.6	Bestimmung der Proteinstabilität durch [³⁵ S]-Markierung und Immun-präzipitation (<i>Pulse-Chase</i>)	58
	58
5	ERGEBNISSE	60
5.1	Abbau von PML durch HSV-2 ICP0	60
5.2	Einfluss von HSV-2 ICP0 auf HIPK-2 (<i>Homeodomain-Interacting Protein Kinase-2</i>)	63
5.3	Interaktion von HSV-2 ICP0 mit Siah-1 (<i>Drosophila Seven in absentia homologue-1</i>).....	65
5.4	Charakterisierung der Interaktion von HSV-2 ICP0 und Siah-1	67
5.5	Stabilisierung von Siah-1 durch HSV-2 ICP0.....	71
5.6	Abbau von HSV-2 ICP0 durch Siah-1	84
5.7	Einfluss von Siah-1 auf die E3-Ligasefunktion von HSV-2 ICP0	87
6	DISKUSSION	97
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	110
8	LITERATURVERZEICHNIS	113

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die humanpathogenen Herpes Simplex Viren verursachen neben den charakteristischen Hautläsionen auch schwerwiegende Krankheitsbilder wie Enzephalitiden und Meningitiden mit zum Teil tödlichem Verlauf. Auf Grund dieser klinischen Relevanz ist die Aufklärung des herpesviralen Replikationszyklus schon lange Gegenstand der medizinischen Forschung.

ICP0 ist ein multifunktionelles Regulatorprotein der Herpes Simplex Viren. Es ist essenziell für die Reaktivierung der Herpesvirusgenome aus der Latenz und spielt eine entscheidende Rolle in der viralen Genexpression. Des Weiteren ist für ICP0 eine Funktion als RING-E3-Ligase im Ubiquitin-Proteasomen-System beschrieben worden. Hierdurch ist ICP0 in der Lage, im Verlauf der Infektion diverse zelluläre Proteine zu degradieren. Zwei dieser Proteine, PML und Sp100, sind Hauptbestandteile der so genannten PML-Kerndomänen. Ihr ICP0-vermittelter Abbau könnte in Bezug auf die Virusreplikation von Vorteil sein.

Trotz intensiver Untersuchungen konnte jedoch bisher keine direkte Interaktion zwischen ICP0 und PML/Sp100 nachgewiesen werden. Außerdem konnte keine direkte Ubiquitylierung der beiden Proteine durch ICP0, welche letztendlich zum Proteasomen-vermittelten Abbau führt, beobachtet werden. Daher lag der Schluss nahe, dass weitere, bisher unidentifizierte Faktoren an der ICP0-vermittelten Degradation von PML und Sp100 beteiligt sein müssen. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung möglicher Faktoren, welche in der Lage sind, die E3-Ligasefunktion von ICP0 zu beeinflussen.

Auf Grund ihrer in der Literatur beschriebenen Eigenschaften kamen die beiden zellulären Proteine HIPK-2 und Siah-1 als Kandidaten für eine Funktion im ICP0-vermittelten Abbau von PML-Kerndomänenbestandteilen in Frage. HIPK-2 lokalisiert ebenso wie PML in PML-Kerndomänen und wird auch posttranslational SUMO-1 modifiziert. In den durchgeführten Experimenten konnte jedoch keine Wechselwirkung zwischen HIPK-2 und ICP0 festgestellt werden.

Siah-1 wurde als direkte E3-Ligase für PML beschrieben. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte mit der E3-Ligase Siah-1 in der Tat ein neuer zellulärer Interaktionspartner von ICP0 identifiziert werden. Durch Verwendung von ICP0- und Siah-1-Deletionsmutanten konnten die für die Komplexbildung entscheidenden Domänen, in ICP0 der Aminosäurebereich 182-490 und in Siah-1 der Aminosäurebereich 141-282, eingegrenzt werden.

Als Folge der Wechselwirkung von ICP0 mit Siah-1 konnte einerseits ICP0 als erstes virales Substrat der zellulären E3-Ligase Siah-1 beschrieben werden, was zu einem proteasomalen Abbau von ICP0 nach Überexpression von Siah-1 führte. Es konnte gezeigt werden, dass Siah-1 durch den Abbau von ICP0 in der Lage war, die E3-Ligasefunktion von ICP0 zu inhibieren. Andererseits resultierte diese Wechselwirkung in einer Stabilisierung von Siah-1 in Anwesenheit von ICP0. Diese Stabilisierung erfolgte auf Proteinebene und konnte auf die Interaktion der beiden Proteine zurückgeführt werden. In weiterführenden Experimenten wurde gezeigt, dass Siah-1, vermutlich durch seine E3-Ligaseaktivität und die Stabilisierung durch ICP0, eine essenzielle Rolle im ICP0-vermittelten PML-Abbau spielt. Nach Hemmung der Siah-1-Genexpression mittels RNA-Interferenz (RNAi) war ICP0 nicht mehr in der Lage, zelluläres PML zu degradieren.

Durch die Identifizierung einer neuen Wechselwirkung zwischen viralem ICP0 und zellulärem Siah-1 leistet diese Dissertation einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der vielfachen Virus-Wirtswechselwirkungen von Herpes Simplex Viren. Zusätzlich konnte mit Siah-1 ein essenzielles Bindeglied im ICP0-vermittelten Abbau von PML beschrieben werden, dessen Funktion im Verlauf der viralen Replikation trotz zahlreicher Untersuchungen noch weitgehend ungeklärt ist. Die hier vorgestellten Ergebnisse bilden deshalb die Grundlage zur zukünftigen Aufklärung der PML-Funktion im Kontext der Herpes Simplex Virus Replikation.

2 EINLEITUNG

2.1 Herpes Simplex Viren

Allgemeines

Der Name Herpes Simplex Virus (HSV) leitet sich vom griechischen Wort *herpein* (kriechen) ab, und bezeichnet damit die kriechende Ausbreitung des von der Virusinfektion verursachten Hautausschlages (Roizman und Whitley, 2001). Herpes Simplex Viren gehören zur Unterfamilie der α -Herpesviren und werden in zwei Subtypen, Herpes Simplex Virus Typ 1 und 2 eingeteilt. Auf Grund ihrer weltweiten Verbreitung und hohen Durchseuchungsrate (95% für HSV-1) sind die Herpes Simplex Viren schon lange Gegenstand der medizinischen Forschung (Roizman und Knipe, 2001).

Die lytische Primärinfektion erfolgt in den Epithelzellen der Mundschleimhäute (HSV-1) oder der Genitalschleimhäute (HSV-2), wobei 90% der Primärinfektionen inapparent verlaufen. Über Zell-Zell-Kontakte gelangen die Viren in freie Nervenendigungen der Neuronen, welche das umliegende Gewebe versorgen. Das Viruskapsid wandert anschließend entlang der Axone in die Ganglien. Ein charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist die Etablierung einer lebenslangen Latenz im Wirtsorganismus (Jones, 1998). Die Virus-DNA persistiert, unerkant vom Immunsystem des Wirtes, als zirkuläres Episom im Zellkern der Ganglien. HSV-1 etabliert seine Latenz in den sensorischen Ganglien des Trigemini, HSV-2 in den Sakralganglien des Rumpfes. Während dieser Latenzphase, kommt es zu keinerlei klinischen Symptomen. Durch hormonelle Einflüsse, UV-Licht, Fieber, Chemikalien (Adrenalin, Immunsuppressiva) oder psychische Belastungen kann eine Reaktivierung erfolgen (Whitley, 2001). Dabei wandern komplette Virionen aus den Ganglien axonal zurück in die peripheren Epithelzellen, wo die Virusproduktion symptomlos (Rekurrenz) oder mit den typischen Entzündungserscheinungen (Rekrudeszenz) einhergeht.

Sowohl bei der Primärinfektion als auch bei Rezidiven können sich an den entsprechenden Stellen die charakteristischen Herpes-Läsionen (HSV-1 *Herpes labialis*, HSV-2 *Herpes genitalis*) bilden, welche teilweise von Fieber begleitet werden. Herpes Simplex Viren können auch schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen. *Herpes neonatorum* ist eine meist tödlich verlaufende Infektionskrankheit bei Neugeborenen, wobei das Virus bei der Geburt übertragen wird. Außerdem können nach HSV-Infektionen Erkrankungen der Augenhornhaut

(*Herpes corneae*) und des zentralen Nervensystems (*Herpes enzephalitis*, *Herpes meningitis*) auftreten (Whitley und Roizman, 2001).

Morphologie und Genom

Der Aufbau der Herpes Simplex Virionen ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Virionen haben einen Durchmesser von ca. 180 nm und werden von einer Hüllmembran (*envelope*) umgeben, in die zahlreiche Glykoproteine eingelagert sind. Diese Glykoproteine erfüllen eine Funktion bei der Virusaufnahme in die Zelle und der Induktion der Immunantwort. Innerhalb der Hüllmembran schließt sich das Tegument an, welches aus einer Proteinmatrix viruskodierter Proteine besteht. Diese Proteine gelangen bei der Infektion in die Zelle und sind essenziell für den Beginn der Virusreplikation. Das doppelsträngige, lineare DNA-Genom ist assoziiert mit dem so genannten Virus-Core, welches von einem ikosaedrischen Nukleokapsid umgeben ist. Das Genom hat eine Größe von 152 kbp und kodiert für über 80 Genprodukte (McGeoch et al., 1993). Es ist aufgeteilt in ein langes und ein kurzes Segment, wobei sich in beiden Fragmenten sowohl einzigartige als auch sich wiederholende Sequenzabschnitte befinden.

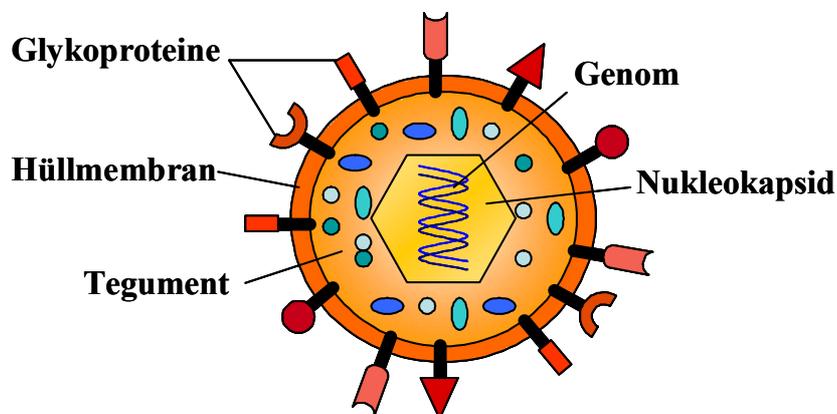


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Herpes Simplex Virus Morphologie. Die umhüllten Herpes Simplex Viren tragen ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom. Einzigartig bei diesen Viren ist das so genannte Tegument, eine Matrix aus viruskodierten Proteinen, die mit dem Viruspartikel in die Zelle eingebracht werden.

Lytischer Infektionszyklus

Als zellulärer Rezeptor für die Herpes Simplex Infektion dient das auf der Zelloberfläche exprimierte HveA (*HSV entry mediator A*). Nach Adsorption des Virus an diese Oberflächenstruktur verschmelzen die Virus- und die Zellmembran, wobei Tegument und Kapsid ins Zytoplasma gelangen. Die Kapside werden entlang der Mikrotubuli zu den Kernporen transportiert, durch welche die virale DNA in den Zellkern gelangt. Die Genexpression und Replikation finden in definierten Bereichen im Nukleoplasma statt, den so genannten Replikationskompartimenten (Everett, 2001; Everett und Murray, 2005). Nach Zirkularisierung des Genoms liegt die Virus-DNA als Episom im Kernplasma vor. Wenn keine Latenz etabliert wird, erfolgt die Expression des Virusgenoms. Die Genexpression ist kaskadenartig reguliert, wobei die Genprodukte je nach Zeitpunkt der Expression in drei Gruppen unterteilt sind (Roizman und Knipe, 2001). Zuerst werden die sehr frühen Gene (*Immediate Early*, IE) exprimiert, deren Genprodukte als Transaktivatoren für die Expression der frühen (*Delayed Early*, DE) und späten (*Late*, L) Gene essenziell sind. Die frühen Genprodukte werden für die Replikation der Virus-DNA benötigt. Die Replikation findet nach dem Mechanismus des *rolling circle* statt, währenddessen DNA-Stränge aus mehrfachen Einheiten des Virusgenoms in konkatamerer Anordnung entstehen (Severini et al., 1996). Gleichzeitig mit der DNA-Replikation findet die Expression der späten Gene statt, welche hauptsächlich für Glyko- und Strukturproteine kodieren. Der Zusammenbau der Virionen findet im Zellkern statt. Die Virushülle wird durch die innere Kernmembran gebildet, in die sich zuvor virale Glykoproteine eingelagert haben. Anschließend werden die Virionen vom Zellkern über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert, wobei die viralen Oberflächenproteine erneut modifiziert werden. Der genaue Mechanismus dieses Transportes ist noch nicht aufgeklärt. An der Zelloberfläche erfolgt durch Lyse der Zelle die Freisetzung der neu gebildeten Viren. Neben infektiösen Viren können auch nicht-infektiöse so genannte L-Partikel gebildet werden, welche nur aus Hüllmembran und Tegument bestehen.

Sehr frühe Genprodukte der Herpes Simplex Viren

Herpes Simplex Viren exprimieren fünf sehr frühe Genprodukte: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 und ICP47 (*Infected Cell Protein*). Charakteristisch für alle sehr frühen Gene ist eine Nukleotidsequenz, welche als Bindemotiv für einen Komplex aus viralen (VP16) und zellulären (Oct-1, C1) Transkriptionsfaktoren dient (apRhys et al., 1989). Alle sehr frühen Genprodukte sind multifunktionell und spielen eine regulatorische Rolle im Ablauf der lytischen Infektion.

ICP0 (Infected Cell Protein 0)

Die zitierte Literatur bezieht sich in den meisten Fällen auf HSV-1 ICP0. Auf Grund der erheblichen klinischen Relevanz von HSV-2 Infektionen wurde in der vorliegenden Arbeit das bisher sehr wenig charakterisierte ICP0-Homolog von HSV-2 untersucht. Da eine sehr ausgeprägte Homologie zwischen den beiden Proteinen besteht, wird davon ausgegangen, dass HSV-2 ICP0 ähnliche funktionelle Eigenschaften besitzt.

Das ICP0-Gen liegt doppelt vor, da es von einer Wiederholungseinheit des viralen Genoms kodiert wird. Es ist aufgeteilt in drei Exons, wodurch durch alternatives Spleißen theoretisch sechs Isoformen des Proteins entstehen können (Carter und Roizman, 1996; Perry et al., 1986; Zhu et al., 1991). Bislang konnten allerdings nur zwei Isoformen nachgewiesen werden (Everett et al., 1993b). Für die Funktion und Lokalisation von ICP0 entscheidend sind bestimmte posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung durch virale und zelluläre Kinasen (Davido et al., 2003; Davido et al., 2005; Advani et al., 2001; Ackermann et al., 1984; Advani et al., 2000; Davido et al., 2002; Isler und Schaffer, 2001; Ogle et al., 1997) oder Nukleotidylylierung durch die zelluläre Casein-Kinase II (Blaho et al., 1994). Abbildung 2 zeigt die Domänenstruktur des HSV-2 ICP0 Proteins, welches auch unter den Bezeichnungen Vmw110 und IE110 bekannt ist.

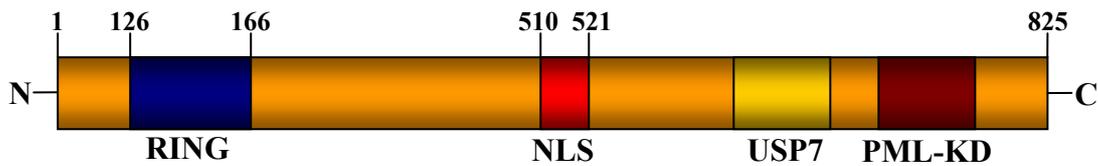


Abbildung 2: Schematische Darstellung des HSV-2 ICP0 Proteins. Die Zahlen bezeichnen die Aminosäurepositionen. Für die USP7 Bindedomäne und den Bereich, der für die Lokalisation in PML-Kerndomänen verantwortlich ist, sind keine genau definierten Positionen bekannt. RING: *Really Interesting New Gene*; NLS: *Nuclear Localization Signal*; USP7: *Ubiquitin Specific Protease 7*; PML-KD: PML-Kerndomänen

Im N-Terminus zwischen den Aminosäurepositionen 126-166 befindet sich ein so genanntes RING-Finger-Motiv (*Really Interesting New Gene*), welches essenziell für alle bisher beschriebenen biologischen Funktionen von ICP0 ist (Everett et al., 1993a). Durch eine charakteristische Anordnung von Cysteinen und Histidinen können durch die RING-Domäne zwei Zinkionen gebunden werden. Diese Sekundärstruktur spielt unter anderem häufig bei Protein/DNA- sowie Protein/Protein- Wechselwirkungen eine Rolle (Freemont, 1993; Freemont et al., 1991). Die Aminosäuren an Position 510 bis 521 enthalten ein Kernlokalisierungssignal (NLS, *Nuclear Localization Signal*), durch das der Kernimport von ICP0 vermittelt wird (Mullen et al., 1994). Im C-Terminus befinden sich eine Bindestelle für USP7 (*Ubiquitin Specific Protease 7*) und eine nicht näher charakterisierte Domäne für die Multimerisierung von ICP0 (Chen et al., 1992; Ciuffo et al., 1994; Everett et al., 1991) und die Lokalisation des Proteins in PML-Kerndomänen (PML-KD; Maul et al., 1993).

ICP0 lokalisiert während der frühen Infektion im Zellkern in subnukleären, punktartigen Strukturen. In diesem Stadium lässt sich eine Kolo-kalisation mit den PML-Kerndomänen (Maul et al., 1993; Everett und Maul, 1994; Maul und Everett, 1994) und den Zentromeren (Everett et al., 1999a; Lomonte et al., 2001) beobachten. Außerdem wurde eine Kolo-kalisation von ICP0 mit dem zellulären Chaperon Hsc70 in Nukleoli infizierter Zellen beschrieben (Burch und Weller, 2004). Im späteren Infektionsverlauf ist ICP0 auch diffus im Zellkern und im Zytoplasma verteilt (Lopez et al., 2001; Kawaguchi et al., 1997a; Van Sant et al., 2001b). Des Weiteren haben die sehr frühen viralen Genprodukte ICP4 und ICP27 und das Tegumentprotein VP22 einen Einfluss auf die Lokalisation von ICP0 (Zhu et al., 1994; Elliott et al., 2005).

Bisherige Studien haben gezeigt, dass ICP0 bei sehr hohen Infektionsdosen und in bestimmten Zelllinien für die Replikation von HSV in Zellkultur entbehrlich ist (Everett, 1989; Yao und Schaffer, 1995). Es wurde jedoch eine deutliche Verminderung der

Replikationseffizienz bei ICP0-defizienten Viren beobachtet (Sacks und Schaffer, 1987; Stow und Stow, 1986). Dagegen scheint ICP0 für die Reaktivierung der Virusgenome aus der Latenz und den anschließenden Start des lytischen Replikationszyklus essenziell zu sein (Cai et al., 1993; Clements und Stow, 1989; Harris et al., 1989; Leib et al., 1989; Stow und Stow, 1986; Zhu et al., 1990).

Eine weitere Funktion von ICP0 ist die Aktivierung der Expression zahlreicher viraler und zellulärer Gene (Everett, 1985; Melchjorsen et al., 2002; Cai und Schaffer, 1992; Chen und Silverstein, 1992; Mavromara-Nazos et al., 1986; Gius und Laimins, 1989; Gelman und Silverstein, 1985). So wurde eine starke spezifische Aktivierung von AP-1 (*Activator Protein -1*) induzierten Genen beschrieben (Diao et al., 2005), welche als Mediatoren des Zellwachstums, der Differenzierung und der Tumorgenese identifiziert worden sind (Lamph et al., 1988). Außerdem ist ICP0 in der Lage, alle Gruppen von HSV-Genen zu stimulieren (Cai und Schaffer, 1989). Die Aktivierung erfolgt teilweise synergistisch durch Interaktion mit dem sehr frühen Genprodukt ICP4 (Everett, 1984; Everett, 1986; Gelman und Silverstein, 1986; Quinlan und Knipe, 1985; Yao und Schaffer, 1994) und ist abhängig von der ICP0 RING-Domäne (Chen und Silverstein, 1992; Everett, 1987; Everett, 1988; Everett et al., 1995; Everett, 1989). Trotz vieler Hinweise über die ICP0-Funktion bei der Transaktivierung konnte der genaue Mechanismus bisher nicht aufgeklärt werden. Es sind weder spezifische Promotorsequenzen bekannt, welche eine Aktivierung durch ICP0 vermitteln (Everett et al., 1991), noch findet eine DNA Bindung von ICP0 durch die RING Domäne statt (Freemont, 1993). Außerdem ist nur eine direkte Interaktion von ICP0 mit einem zellulären Transkriptionsfaktor (BMAL1) bekannt (Kawaguchi et al., 2001). Weiterhin konnte keine Wirkung von ICP0 auf posttranskriptionale Ereignisse beobachtet werden (Jordan und Schaffer, 1997). Beim Einfluss von ICP0 auf die Genexpression handelt es sich wahrscheinlich um eine indirekte Transkriptionsaktivierung, welche weitere Funktionen von ICP0 erfordert.

Zahlreiche Beobachtungen deuteten darauf hin, dass ICP0 eine Funktion im Ubiquitin-Proteasomen-System ausübt. Es wurden eine Vielzahl viraler und zellulärer Interaktionspartner beschrieben, welche teilweise von ICP0 abgebaut werden, wie zum Beispiel p53, die Zentromerproteine CENP-A und -C und die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA Pk_c; Boutell und Everett, 2003; Everett et al., 1999a; Lees-Miller et al., 1996; Lomonte et al., 2001; Parkinson et al., 1999). Die am besten untersuchten Interaktionspartner von ICP0 sind die beiden PML-Kerndomänenproteine PML

(*Promyelocytic Leukemia*) und Sp100 (*Speckled protein 100 kDa*), welche ICP0-abhängig degradiert werden (Chelbi-Alix und de The, 1999; Everett et al., 1998a; Boutell et al., 2003; Muller und Dejean, 1999; Everett und Maul, 1994). Da diese Interaktionen von besonderer Bedeutung für die vorliegende Dissertation sind, werden sie in Abschnitt 2.3 ausführlich beschrieben.

Des Weiteren kodiert ICP0 für eine RING-Finger-Domäne, die für den proteasomalen Abbau einiger Interaktionspartner essenziell ist (O'Rourke et al., 1998; Boutell et al., 2002; Everett et al., 1998a; Everett et al., 1995; Maul und Everett, 1994). Außerdem bewirkt ICP0 eine Akkumulation von konjugiertem Ubiquitin in oder in der Nähe von PML-Kerndomänen und Zentromeren, wobei eine Kollokalisierung zwischen ICP0 und konjugiertem Ubiquitin beobachtet wurde (Everett, 2000a). Weiterhin wurde eine spezifische Bindung und Kollokalisierung von ICP0 und der Ubiquitin-spezifischen Protease 7 (USP7) in PML-Kerndomänen beschrieben (Everett et al., 1997; Meredith et al., 1994; Meredith et al., 1995). Bei USP7 handelt es sich um eine wichtige Komponente des Ubiquitin-Proteasomen-Systems, welche die Deubiquitylierung und somit die Stabilisierung von Substratproteinen vermittelt (Wilkinson, 1995). Ferner konnte gezeigt werden, dass die ICP0-abhängige Transaktivierung der Genexpression und die Reaktivierung der herpesviralen Genome aus der Latenz abhängig von funktionellen Proteasomen ist (Boutell et al., 2002). Unter Einfluss des Proteasomeninhibitors MG132 relokalisiert ICP0 im Zellkern und assoziiert mit Proteasomenuntereinheiten (Lopez et al., 2001; Van Sant et al., 2001a). Auf Grund dieser Beobachtungen wurde ICP0 schließlich als RING-Finger-E3-Ligase des Ubiquitin-Proteasomen-Systems identifiziert (Boutell et al., 2002). In weiteren Untersuchungen wurden UbcH5a und UbcH6 als korrespondierende E2-konjugierende Enzyme von ICP0 beschrieben (Gu und Roizman, 2003; Boutell et al., 2002; Hagglund et al., 2002).

Durch die Degradation von Substratproteinen kann ICP0 in diverse zelluläre Mechanismen eingreifen. So wurde durch die Interaktion mit dem Tumorsuppressor p53 ein Einfluss von ICP0 auf die Apoptose beschrieben (Boutell und Everett, 2003). Die ICP0-vermittelte proteasomale Degradation der Zentromerproteine CENP-A und CENP-C führt zu einer Zerstörung der Zentromerstrukturen, und somit zur Unterbrechung der Mitose (Everett et al., 1999a; Lomonte et al., 2001). Weiterhin induziert die Degradation von I κ B α eine Aktivierung der NF κ B-abhängigen Genexpression (Cuchet et al., 2005). Daneben wurden Interaktionspartner von ICP0 beschrieben, welche nicht degradiert werden, wie zum Beispiel der Elongationsfaktor-1 δ (Kawaguchi et al., 1997a) und Cyclin D1/D3 (Van Sant et al., 1999; Kawaguchi et al., 1997b; Van Sant et al., 2001b).

2.2 Das Ubiquitin-Proteasomen-System

Eine wichtige regulatorische Rolle im Metabolismus der Zelle spielt der Abbau von Proteinen. Extrazelluläre Proteine und Membranrezeptoren werden meist Substratunspezifisch über das Lysosomensystem abgebaut (Terrell et al., 1998; Davis et al., 1993; Hicke, 2001). Die regulierte Degradation spezifischer Substratproteine wird über das zelluläre Ubiquitin-Proteasomen-System vermittelt (Glickman und Ciechanover, 2002). Der Abbau erfolgt dabei zeitlich kontrolliert in zwei Schritten. Zuerst findet eine Markierung des Substratproteins mit dem hochkonservierten Peptid Ubiquitin statt, anschließend wird das ubiquitinylierte Protein im 26S Proteasomenkomplex abgebaut. Die Bindung von Ubiquitin an das Substrat erfolgt mit Hilfe mehrerer Enzyme (siehe Abbildung 3).

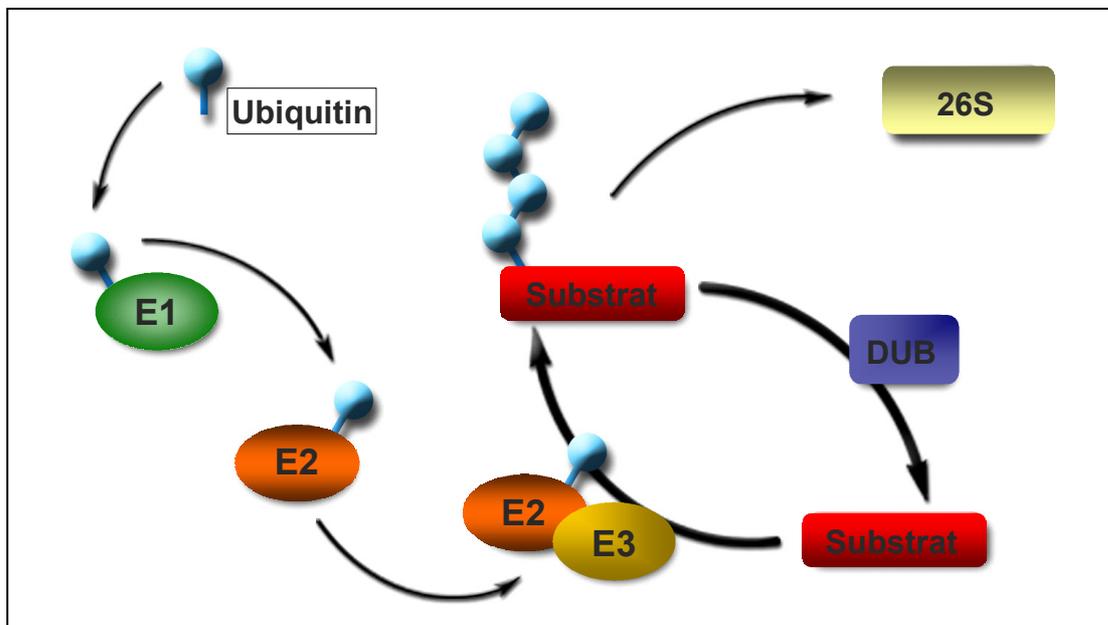


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Ubiquitinkonjugation an für den Abbau bestimmter Substrate. Freies Ubiquitin wird durch Interaktion mit einem E1-Enzym aktiviert und anschließend kovalent an ein E2-Enzym gebunden. Die Substraterkennung erfolgt durch E3-Ligasen, welche nach Bindung an den Ubiquitin-E2-Komplex die Übertragung des Ubiquitin auf das Substrat vermitteln. Nach Polyubiquitinylierung wird das Substrat im 26S-Proteasom degradiert. Durch Deubiquitinylierung mit Hilfe von DUB-Enzymen kann ein Abbau des Substrates verhindert werden. E1: E1-aktivierendes Enzym; E2: E2-konjugierendes Enzym; E3: E3-Ligase; DUB: Deubiquitinylierungsprotein; 26S: 26S Proteasom;

Im ersten Schritt der proteasomalen Degradation wird freies Ubiquitin durch Energieabhängige Bindung an das E1-aktivierende Enzym aktiviert (Hershko et al., 1983). Daraufhin erfolgt eine Übertragung des aktivierten Ubiquitin auf ein E2-konjugierendes Enzym, von dem es mit Hilfe von E3-Ligasen kovalent an die ϵ -NH₂-Gruppe eines Lysinrestes des Substrates gebunden wird. Die E3-Ligasen dienen in diesem Schritt als Adapter zwischen

dem E2-konjugierenden Enzym und dem Substrat und vermitteln die Spezifität der Ubiquitinbindung. Dabei handelt es sich nicht um einen zufälligen Vorgang, sondern um eine streng regulierte Wechselwirkung zwischen der E3-Ligase und dem für die jeweilige E3-Ligase spezifischen Substrat. Auf Grund ihrer Vielzahl lassen sich die E3-Ligasen in unterschiedliche Klassen einteilen. Zum einen gibt es die so genannten HECT-E3-Ligasen (*Homologous to the E6-AP C-Terminus*), dessen Prototyp E6-AP (*E6-Associated Protein*) zusammen mit E6 für die Degradation von p53 in Papillomvirus infizierten Zellen verantwortlich ist (Huibregtse et al., 1995; Huibregtse et al., 1993; Scheffner et al., 1993). Bei HECT-E3-Ligasen wird das aktivierte Ubiquitin zuerst von dem E2-konjugierenden Enzym auf die E3-Ligase selbst übertragen und von dort anschließend kovalent an das Substrat gekoppelt. Eine weitere Gruppe sind die RING-E3-Ligasen (*Really Interesting New Gene*). Diese haben als charakteristische Domäne ein RING-Finger Motiv, über das die Bindung an das E2-konjugierende Enzym erfolgt (Jackson et al., 2000; Joazeiro und Weissman, 2000; Tyers und Willems, 1999; Zheng et al., 2000). Das Ubiquitin wird danach direkt von dem E2-konjugierenden Enzym auf das Substrat übertragen. Die RING-E3-Ligasen werden weiter unterteilt in Einzel-RING-E3-Ligasen, wie zum Beispiel Mdm2, E3 α und Parkin (Boyd et al., 2000; Lorick et al., 1999; Kwon et al., 1998; Shimura et al., 2000) und Multiuntereinheiten E3-Ligase Komplexe wie beispielsweise APC (*Anaphase Promoting Complex*) oder SCF (Skp1-Cullin/cdc53-F-box Protein; (Page und Hieter, 1999; Deshaies, 1999). Damit das Substrat vom 26S Proteasom effektiv erkannt wird, ist eine Polyubiquitinylierung nötig. Hierbei werden an das erste Ubiquitin zum Teil mit Hilfe von E4-Enzymen (Ubiquitinketten-Elongationsfaktoren; (Koegl et al., 1999) mindestens drei weitere Ubiquitinreste kovalent gebunden (Thrower et al., 2000). Beim 26S Proteasomenkomplex handelt es sich um eine hochkonservierte multikatalytische Protease, die aus einem 20S *Core*-Partikel und einem 19S regulatorischen Partikel besteht (DeMartino et al., 1994; Glickman et al., 1998; Hershko et al., 1984). Die regulatorischen Untereinheiten sind für die Substraterkennung und -bindung, sowie für die Entfaltung und den Eintritt der Substrate in die proteolytische Kammer des *Core*-Partikels verantwortlich (Strickland et al., 2000; Braun et al., 1999). Im 26S Proteasom werden die polyubiquitinylierten Substrate zu Peptiden (7-9 Aminosäuren) prozessiert (Kisselev et al., 1999; Nussbaum et al., 1998). Diese Peptide werden entweder weiter in die einzelnen Aminosäuren gespalten oder durch MHC-I-Moleküle dem Immunsystem auf der Zelloberfläche präsentiert (Beninga et al., 1998; Osmulski und Gaczynska, 1998; Tamura et al., 1998; Yao und Cohen, 1999; Stoltze et al., 2000; Michalek et al., 1993). Durch Spaltung

der Polyubiquitinkette stehen die Ubiquitinmonomere erneut dem Stoffwechsel zur Verfügung (Hough et al., 1986; Swaminathan et al., 1999).

Folglich stellt sich die Frage, wie ein zum Abbau bestimmtes Substrat von seiner jeweiligen E3-Ligase erkannt wird. Zum einen wurden bestimmte Erkennungssequenzen, wie die so genannte PEST- oder *Destruction-Box* identifiziert (Rogers et al., 1986; Yamano et al., 1996). Eine wichtige Rolle spielen auch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung oder SUMO-1 (*Small Ubiquitin-related Modifier-1*)-Modifizierung der Substrate oder E3-Ligasen (Levkowitz et al., 1999; Kotani et al., 1998; Yamashita et al., 1996; Kornitzer und Ciechanover, 2000; Yaron et al., 1998; Buschmann et al., 2000; Desterro et al., 1998). Des Weiteren kann die Interaktion zwischen E3-Ligasen und Substraten auch durch bestimmte „Erkennungsproteine“ vermittelt werden. In diesem Zusammenhang scheinen Chaperone eine entscheidende Rolle zu spielen (Bercovich et al., 1997; Lee et al., 1996).

Die Enzyme des Ubiquitin-Proteasomen-Systems finden sich sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma, was darauf hinweist, dass der Proteinabbau in beiden Kompartimenten stattfinden kann (Brodsky und McCracken, 1999; Lord et al., 2000; Glickman und Ciechanover, 2002). Somit ergibt sich durch die Lokalisation der Substratproteine eine weitere Möglichkeit der Kontrolle des Abbaus.

Die spezifische Degradation von Proteinen spielt in der Regulierung wahrscheinlich aller zellulären Prozesse eine wichtige Rolle. Daneben ist das Ubiquitin-Proteasomen-System verantwortlich für die Erkennung und Beseitigung falsch posttranslational modifizierter oder gefalteter Proteine (Ciechanover et al., 1984; Hershko et al., 1982; Seufert und Jentsch, 1990). So können Mutationen in Komponenten des Ubiquitin-Proteasomen-Systems oder in Substratproteinen, die einen Abbau fördern oder inhibieren, gravierende Folgen haben. Die Entstehung einiger Krebsarten ist zum Beispiel mit der Stabilisierung von Onkoproteinen (c-Myc, c-Fos, c-Jun) oder Destabilisierung von Tumorsuppressorproteinen (p53, p27) assoziiert (Loda et al., 1997; Treier et al., 1994). Auch die Ursache von neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson und Chorea Huntington ist auf eine Fehlfunktion beim Proteinabbau zurückzuführen. Hier verursacht eine Akkumulation von Proteinen, die nicht mehr proteasomal degradiert werden können und somit toxisch auf die Zelle wirken, das schwerwiegende Krankheitsbild (Alves-Rodrigues et al., 1998; Bence et al., 2001).

2.3 PML-Kerndomänen

Die Zellkerne höherer Eukaryoten enthalten eine Vielzahl von subnukleären Strukturen, den so genannten Kernkörperchen (Matera, 1999). Eine dieser Substrukturen sind die PML-Kerndomänen, welche zuerst im Zusammenhang mit der akuten promyelozytischen Leukämie beschrieben (Grimwade und Solomon, 1997) und nach einer Hauptkomponente, dem promyelozytischen Leukämie Protein (PML), benannt wurden. Weitere Bezeichnungen für diese Strukturen sind POD (*PML Oncogenic Domain*), ND10 (*Nuclear Domain 10*) und Kr-Körper (Kremer Körper). Im Mikroskop lassen sich die PML-Kerndomänen als punktförmige Strukturen, welche mit der nukleären Matrix assoziiert sind, beobachten (Sahlas et al., 1993; Stuurman et al., 1992). Je nach Zelltyp enthalten die Zellkerne 10-30 PML-Kerndomänen mit einem Durchmesser von 0,2-1,0 μm (Melnick und Licht, 1999). Bei den PML-Kerndomänen handelt es sich um Multiproteinkomplexe (siehe Abbildung 4), deren Zusammensetzung, Anzahl und Morphologie abhängig vom Zellzyklus sind (Koken et al., 1995). Außerdem können sie durch bestimmte Umwelteinflüsse wie Schwermetallexposition oder virale Infektionen und zahlreiche endogene Faktoren wie zellulärer Stress beeinflusst werden (Maul et al., 1995; Topisirovic et al., 2002; Borden et al., 1998; Maul et al., 2000; Turelli et al., 2001).

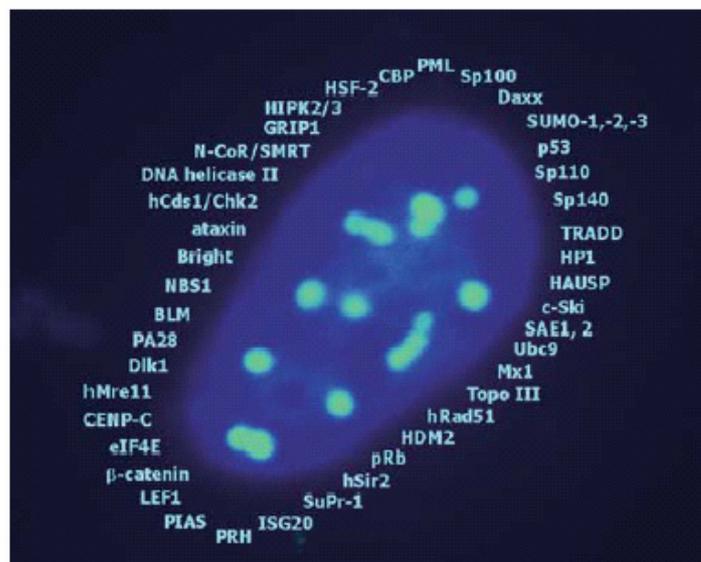


Abbildung 4: Übersicht über Lokalisation und Bestandteile der PML-Kerndomänen. Die Abbildung wurde aus einer Publikation von Hofmann und Will (2003) übernommen und zeigt die Morphologie und Lokalisation der PML-Kerndomänen innerhalb des Zellkerns (blau). Zusätzlich sind Proteine aufgelistet, für die eine permanente oder temporäre Lokalisation in PML-Kerndomänen beschrieben wurde.

Für mindestens 60 Proteine wurde eine Lokalisation in PML-Kerndomänen nachgewiesen (Negorev und Maul, 2001; Eskiw et al., 2004; Dellaire et al., 2003; Hofmann und Will, 2003). Dabei wurde für PML und Sp100 eine permanente Lokalisation beschrieben (Hofmann und Will, 2003), wohingegen andere Komponenten nur zeitweise unter bestimmten Einflüssen in den PML-Kerndomänen anwesend sind. Die Bestandteile der PML-Kerndomänen sind an den unterschiedlichsten zellulären Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel Transkription (Li et al., 2000; Zhong et al., 2000), DNA-Reparatur (Bischof et al., 2001; Carbone et al., 2002; Dellaire und Bazett-Jones, 2004), Proteindegradation (Lallemand-Breitenbach et al., 2001) und Apoptose (Wang et al., 1998b; Fogal et al., 2000; Guo et al., 2000; D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Takahashi et al., 2004). Die strikte Regulation der Zusammensetzung und die Vielzahl der Proteine in den PML-Kerndomänen lassen darauf schließen, dass es sich bei den PML-Kerndomänen um Protein-Depots handelt, welche die Verfügbarkeit bestimmter Proteine zu definierten Zeitpunkten, und damit ihre Funktion, regulieren (Ching et al., 2005; Negorev und Maul, 2001; Hodges et al., 1998; Maul, 1998). Des Weiteren wurden PML-Kerndomänen als Orte der posttranslationalen Modifikation beschrieben (Ching et al., 2005).

PML (Promyelocytic Leukemia)

Das PML-Protein wurde im Zusammenhang mit der akuten promyelozytischen Leukämie (APL) beschrieben (Melnick und Licht, 1999). In mehr als 98% der APL-Patienten lässt sich ein Fusionsprotein aus PML und dem Retinsäurerezeptor α (PML-RAR α) nachweisen, welches aus der chromosomalen Translokation t(15;17) hervorgeht (de The et al., 1991; Goddard et al., 1991; Kakizuka et al., 1991). In den Zellen dieser Patienten sind die PML-Kerndomänen zerstört und PML-RAR α lokalisiert in zahlreichen punktförmigen Mikrostrukturen (Dyck et al., 1994; Weis et al., 1994). Der Aufbau von PML ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

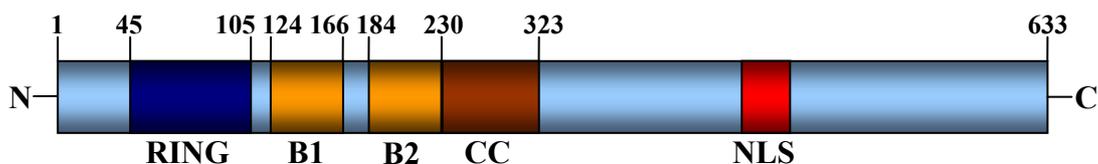


Abbildung 5: Schematische Darstellung des PML-Proteins. Die Zahlen bezeichnen die Aminosäurepositionen. Die Position des NLS ist nicht genau definiert. RING: *Really Interesting New Gene*; B1/B2: B-Boxen; CC: leuzinreiche *Coiled-Coil*-Domäne; NLS: *Nuclear Localization Signal*;

PML gehört zur Familie der RBCC- oder TRIM- Proteine (RING/B-Box/*Coiled-Coil*- oder *Tripartite-Motif*; Borden, 1998; Saurin et al., 1996; Reymond et al., 2001). Über die N-terminale RING-Domäne und die B-Boxen können Zinkionen gebunden werden, wodurch Protein/Protein-Wechselwirkungen zustande kommen (Hodges et al., 1998; Borden, 2000; Borden et al., 1995; Jensen et al., 2001). Die leuzinreiche *Coiled-Coil*-Domäne ermöglicht eine Homo- und Heterodimerisierung von PML (Borden et al., 1996; Peng et al., 2000). Im C-Terminus befindet sich ein Kernlokalisierungssignal (NLS, *Nuclear Localization Signal*), welches für die nukleäre Lokalisation verantwortlich ist. Durch alternatives Spleißen der PML-mRNA werden mindestens 7 Isoformen exprimiert, die sich im C-Terminus und der subzellulären Lokalisation unterscheiden (Fagioli et al., 1992; Kakizuka et al., 1991; Kastner et al., 1992). Der Großteil des zellulären PML lokalisiert in PML-Kerndomänen, es lässt sich aber auch zytoplasmatisches und lösliches nukleäres PML nachweisen (Maul et al., 2000; Fagioli et al., 1992; Flenghi et al., 1995; Melnick und Licht, 1999).

Das PML-Protein ist essenziell für die Formation der PML-Kerndomänen. Mutationen in den B-Boxen, der RING- oder *Coiled-Coil*-Domäne und im NLS von PML, führen zum Verlust der PML-Kerndomänen und deren Funktionen innerhalb der Zelle (Le et al., 1996; Le et al., 1998; Borden et al., 1997; Cohen et al., 2001; Ishov et al., 1999). Die posttranslationale Modifikation von PML mit SUMO-1 (*Small Ubiquitin-related Modifier-1*) ist für die Assoziation weiterer Proteine, wie Sp100 und Daxx mit den PML-Kerndomänen verantwortlich (Ishov et al., 1999).

In der Literatur sind zahlreiche zelluläre Prozesse beschrieben, an denen PML beteiligt ist. PML gilt als negativer Regulator des Zellwachstums und spielt somit eine Rolle in der Tumorsuppression und Apoptose (Mu et al., 1994; Ahn et al., 1995; Koken et al., 1995; Le et al., 1996; Wang et al., 1998a; Fogal et al., 2000; Guo et al., 2000). Durch die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren (z.B. Daxx, CBP, p53) lässt sich auf eine Funktion in der Regulation der Genexpression schließen (Fogal et al., 2000; Li und Chen, 2000; Zhong et al., 2000). Des Weiteren ist PML an der intrazellulären Virusabwehr beteiligt, was im folgenden Abschnitt genauer charakterisiert wird.

PML-Kerndomänen und Herpes Simplex Viren

In Folge der Herpes Simplex Virus Infektion gelangen die viralen Genome durch die Kernporen in den Zellkern, und bilden in unmittelbarer Nähe der PML-Kerndomänen so genannte Replikationskompartimente aus (Ishov und Maul, 1996; Maul et al., 1996). Diese Strategie scheint auch von anderen Virusarten verwendet zu werden. Die gleiche Lokalisation und Ausbildung bestimmter Replikationskompartimente wurde auch bei anderen DNA-Viren, wie dem humanen Cytomegalievirus (HCMV), Adenovirus oder *Simian Virus 40* (SV 40) beobachtet (Ishov und Maul, 1996; Ishov et al., 1997; Carvalho et al., 1995; Doucas et al., 1996; Jiang et al., 1996). Interessanterweise assoziieren die viralen Genome dabei nicht mit vorhandenen, sondern veranlassen die Entstehung neuer PML-Kerndomänen in ihrer direkten Nachbarschaft (Everett et al., 2004; Everett und Murray, 2005). Für die Lokalisation von Herpesvirusgenomen in der Nähe von PML-Kerndomänen sind nur ein intakter Replikationsursprung und die viralen Regulatorproteine ICP4 und ICP27 notwendig (Tang et al., 2003). Die Assoziation der Genome mit den PML-Kerndomänen ermöglicht anschließend die virale Transkription und Replikation.

Im weiteren Verlauf der Infektion findet eine Degradation der PML-Kerndomänenbestandteile PML und Sp100 statt, was zur Auflösung der PML-Kerndomänen führt und durch die Expression von viralem ICP0-Protein vermittelt wird (Chelbi-Alix und de The, 1999). ICP0 ist durch seine E3-Ligase Aktivität in der Lage, vor allem SUMO-1 modifiziertes PML und Sp100 proteasomal abzubauen, ohne dabei Einfluss auf die mRNA-Expression zu nehmen (Parkinson und Everett, 2001; Everett et al., 1998a; Chelbi-Alix und de The, 1999; Boutell et al., 2003; Muller und Dejean, 1999; Everett und Maul, 1994). Essenziell für den ICP0-vermittelten Abbau von PML und Sp100 ist die ICP0 RING-Domäne und ein intaktes Ubiquitin-Proteasomen-System (Parkinson und Everett, 2001; Everett et al., 1998a). Andererseits ergab die genaue Untersuchung des PML-Proteins, dass die ICP0-vermittelte Polyubiquitinylierung von PML an einem Lysin an der Aminosäureposition 160 stattfindet (Boutell et al., 2003).

Über den Einfluss der PML-Degradation und die darauf folgende Zerstörung der PML-Kerndomänen auf die Virusreplikation wurden gegensätzliche Beobachtungen beschrieben. Einerseits wurde nach Inhibition des PML-Abbaus durch Hemmung der Proteasomen eine verminderte Virusreplikation dokumentiert (Everett et al., 1998b; Burkham et al., 2001). Andererseits zeigte Überexpression von PML keinen Effekt auf die Virusreplikation (Lopez

et al., 2002), und ICP0-defiziente Viren konnten in bestimmten Zelllinien trotz Anwesenheit von PML mit Wildtypkinetik replizieren (Yao und Schaffer, 1995). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ICP0 durch den Abbau von PML die antivirale Wirkung von Interferonen (IFN) blockiert (Chee et al., 2003).

Interferone sind sekretorische Proteine, die durch Aktivierung der Genexpression spezifischer IFN-induzierter Gene, eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielen (Regad und Chelbi-Alix, 2001). Für das PML-Gen konnte eine Induktion durch Interferon α und γ gezeigt werden, woraus eine Vermehrung und Vergrößerung der PML-Kerndomänen und eine antivirale Aktivität resultierte (Taylor et al., 2000). Diese antivirale Wirkung von IFN wurde auch in HSV-infizierten Zellen beobachtet, in denen es zur Inhibition der sehr frühen Genexpression kommt (Taylor et al., 2000; Mittnacht et al., 1988; Oberman und Panet, 1989; Oberman und Panet, 1988). Daher wäre es für die Virusreplikation entscheidend, diesen Interferon-basierten Abwehrmechanismus der Zelle zu umgehen, zum Beispiel durch einen gezielten Abbau der IFN-induzierten Komponenten PML und Sp100 (Chee et al., 2003). Ein weiterer möglicher Grund für die Lokalisation von HSV-Genomen in der Nähe von PML-Kerndomänen wäre, dass es sich bei der Ausbildung von neuen PML-Kerndomänen um einen zellulären Abwehrmechanismus handelt, bei dem die viralen Genome durch Bestandteile der PML-Kerndomänen in Chromatin-ähnliche Strukturen verpackt werden (Xue et al., 2003; Ishov et al., 2004; Jiao et al., 2004). Die daraus resultierende Unterdrückung der viralen Genexpression und Replikation wird folglich durch die ICP0-vermittelte Zerstörung der PML-Kerndomänen wieder aufgehoben (Kubat et al., 2004). Weiterhin wäre es möglich, dass die Lokalisation der Virusgenome nahe den PML-Kerndomänen eine virale Strategie darstellt, um durch Zerstörung der PML-Kerndomänen eine Freisetzung der Bestandteile, die für die Virusreplikation nötig sind, zu erreichen (Everett, 2000b).

2.4 Ziel der Dissertation

Die virale Überlebensstrategie basiert auf der Ausnutzung des Wirtszellmetabolismus zur Unterstützung der Virusreplikation. Infolge dessen sind zahlreiche Wechselwirkungen von viralen Proteinen mit zellulären Bestandteilen entscheidend. Für die Replikation der Herpes Simplex Viren spielen die Interaktionen zwischen dem sehr frühen viralen Genprodukt ICP0 und Bestandteilen der zellulären PML-Kerndomänen eine entscheidende Rolle. Es wurde unter anderem ein Abbau der Hauptkomponenten der PML-Kerndomänen, PML und Sp100 durch ICP0 beschrieben (Everett und Maul, 1994; Chelbi-Alix und de The, 1999). Über den genauen Mechanismus dieser proteasomalen Degradation ist wenig bekannt und vermehrte Hinweise deuten darauf hin, dass es sich im Fall von PML um keine direkte Interaktion mit ICP0 handelt. Dieses würde bedeuten, dass der ICP0-vermittelte PML-Abbau in einem Komplex stattfindet, oder dass ICP0 eine weitere zelluläre Komponente aktiviert, die anschließend die PML-Polyubiquitylierung und Degradation einleitet.

Die Komplexität dieser Wechselwirkungen zwischen viralen und zellulären Komponenten, die anschließend zu einer sehr effizienten HSV-Replikation führt, war Fokus dieser Arbeit. In diesem Sinne sollten mehrere zelluläre Proteine untersucht werden, die sich anhand des jetzigen Forschungsstandes als mögliches Bindeglied in der ICP0-vermittelten PML-Degradation eignen. Weiterhin sollten die PML-ICP0 Wechselwirkungen durch Analyse ihrer zellulären Verteilung und der für den PML-Abbau wichtigen Domänen näher charakterisiert werden. Die Aufklärung dieses für die Virusvermehrung wichtigen Teils der Signalkette sollte einen Beitrag zum fernen Ziel der Entwicklung einer erfolgreichen Therapie von Infektionen mit Herpes Simplex Viren leisten.

3 MATERIAL

3.1 Bakterien-Stämme

E.coli XL2-Blue (Stratagene, La Jolla, CA)

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F,' proAB, lacI^qZΔM15, Tn10, (Tet^r), Amy, Cam^r]^a

E.coli XL10-Gold (Stratagene, La Jolla, CA)

Tet^r, Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, Hte [F', proAB, lacI^qZΔM15, Tn10, (Tet^r), Amy, Cam^r]^a

E.coli GM2163 (New England Biolabs, Ipswich, MA)

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
Dam und Dcm negativ

3.2 Eukaryotische Zelllinien

293T Humane, embryonale Nierenzelllinie;
exprimiert das große T-Antigen des SV40 Virus

VERO Zelllinie, aus immortalisierten Nierenzellen einer adulten grünen Meerkatze;
(ATCC Nr. CCL-81)

HeLa Humane Cervixkarzinomzelllinie;
(ATCC Nr. CCL-2)

U2OS Humane Osteosarkomzelllinie;
(ATCC Nr. HTB-96)

3.3 Herpes Simplex Viren

HSV-2 Prototypstamm US, aus der Stammsammlung des Universitätsklinikums Jena

3.4 Medien

3.4.1 Medien für die Anzucht von Bakterien

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 8 g/l NaCl, 1 g/l Glukose
pH 7,2 mit Natriumhydroxid eingestellt

Zugabe von 100 mg/l Ampicillin bzw. 30 mg/l Kanamycin vor Gebrauch

Luria-Bertani-Agarplatten (LB-Platten)

15 g Agar in 1l LB-Medium gelöst und autoklaviert
nach Abkühlen auf 55°C, Zugabe von 100 mg/l Ampicillin bzw. 30 mg/l Kanamycin

Thym-Broth-Medium (zur Herstellung kompetenter Bakterien)

2% (w/v) Bacto-Trypton, 5% (w/v) Bacto-Hefeextrakt, 0,1 M NaCl, 0,01 M MgCl₂

3.4.2 Medien für Gewebekulturen

DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*; Biochrom, Berlin)

Kultivierung von HeLa-, U2OS- und 293T- Zellen;
Zugabe von 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 0,05 mg/ml Penicillin/Streptomycin,
3,75 mg/ml Natriumbicarbonat

MEM (*Modified Eagle Medium*; Biochrom, Berlin)

Kultivierung von VERO-Zellen;
Zugabe von 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 0,05 mg/ml Penicillin/Streptomycin,
10 mM HEPES, 2,25 mg/ml Natriumbicarbonat

[³⁵S]-Markierungsmedium (293T-Zellen)

DMEM ohne Cystein, Cystin und Methionin (MP Biomedicals, Irvine, CA);
Zugabe von 10% (v/v) dialysiertem FKS

3.4.3 Sonstige Medien/Medienzusätze

FKS (Fötales Kälberserum)	Biochrom (Berlin), vor Gebrauch einmalige Inaktivierung des FKS für 30min bei 56°C
Dialysiertes FKS	PAN BIOTECH (Aidenbach)
Gelatine	Sigma (München), verwendet als 0,1% (v/v) Lösung in H ₂ O
L-Glutamin	Biochrom (Berlin)
Opti-MEM (serumreduziertes Medium)	Gibco BRL (Eggenstein)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Berlin)
Trypsin/EDTA	Biochrom (Berlin)

3.5 Nukleinsäuren

3.5.1 Oligonukleotide

Alle synthetisch hergestellten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim) bezogen.

3.5.1.1 Oligonukleotide zur Klonierung von ICP0-Konstrukten

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendung
P31	GGCCATGGCGAAC	Deletion des ICP0-Stoppcodons in ICP0-Fusionskonstrukten
P32	TCGAGTTCGCCATGGCCTGCA	Deletion des ICP0-Stoppcodons in ICP0-Fusionskonstrukten
P69	AGCTGGAATTCATGGGG	ICP0 Δ 1-181
P70	AGCTCCCATGAATTCC	ICP0 Δ 1-181
P71	GATCGGAATTCATGCCTT	ICP0 Δ 1-352
P72	CGCGAAGGCATGAATTCC	ICP0 Δ 1-352
P81	AGCTGGAATTCCC	ICP0 Δ 183-352
P82	CGCGGGGAATTCC	ICP0 Δ 183-352
P83	CGCGGGGAATTCGGG	ICP0 Δ 354-489
P84	CCGGCCCGAATTCCC	ICP0 Δ 354-489
P85	AGCTGGGAATTCG	ICP0 Δ 183-489
P86	CCGGCGAATTCCC	ICP0 Δ 183-489
P170	CGCGGAAGAATTCC	ICP0 Δ 354-825
P171	TCGAGGAATTCTTCC	ICP0 Δ 354-825
P172	CCGGCGAATTCC	ICP0 Δ 491-825
P173	TCGAGGAATTCG	ICP0 Δ 491-825
P174	AGCTGCGAATTCC	ICP0 Δ 183-825
P175	TCGAGGAATTCGC	ICP0 Δ 183-825
P176	GATCCGAATTCATGG	ICP0 Δ 1-489
P177	CCGGCCATGAATTCG	ICP0 Δ 1-489
P190	AATAGGATCCATGGAACCACGCC CAGGCACTAG	ICP0 Δ RING-Mutante
P191	AATAGAATTCCACATCGCCACCG CCGCCTGC	ICP0 Δ RING-Mutante
P192	AATAGAATTCACCCCAGTGGCCT ATCTGGATTGTGG	ICP0 Δ RING-Mutante
P193	AATAGGCGCGCCGGTGGGGTGC GGCCTTCTG	ICP0 Δ RING-Mutante

3.5.1.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung von ICP0-Konstrukten

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
P64	CGGCTCTGGTGGCCCAGGTGCAGAAGGCGG
P88	CACTGCGCAATACCTGCCCACTGTG
P89	GCGGTGGTCGCGCACAGGCCACGCC
P194	GCACGCCCTCCAGCAGAACG

3.5.1.3 Oligonukleotide zur Klonierung von Siah-1-Konstrukten

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendung
P211	TATTGAATTCGGCCCTTTGGGATCCATT CG	Siah-1Δ1-76
P212	TATTGCTAGCTCAACACATGGAAATAGT TAC	Siah-1Δ1-76 Siah-1Δ1-140
P213	TATTGAATTCAGCCGTCAGACTGCTACA GC	Siah-1Δ141-282
P214	TATTGCTAGCTCAAGAGCCTTGCCATTTA CAGG	Siah-1Δ141-282
P215	TATTGAATTCTCTCTGGATGCTGTAATGC CC	Siah-1Δ1-140
P243	AATAGTCGACTCGCGATGTACGGGCCAG ATATACG	pGFP-HA-Siah-1
P244	AATAGCGGCCGCTCCCCAGCATGCCTGC TATTGTCTTCC	pGFP-HA-Siah-1

3.5.1.4 Oligonukleotide zur Sequenzierung von Siah-1-Konstrukten

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
P222	GCTGTTTTGACCTCCATAG
P231	CGAATTCGGCGTAGTCGGGGACG
P249	ACTCACAGAGCTCTTCATGG
P250	CAAGTTGGACAACATGTGAGC

3.5.1.5 Oligonukleotide zur Klonierung von pSUPER Vektoren für RNAi (RNA interference)

Zur Herstellung von siRNAs (*short interfering RNAs*) gegen Siah-1 wurden folgende Oligonukleotide nach Hybridbildung über die Restriktionsschnittstellen BglII und HindIII in einen pSUPER-Vektor ligiert (Brummelkamp et al., 2002).

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendung
P237	GATCCCCTGTAACTATTTCCATGTGTTTCAAGAGAAC ACATGGAAATAGTTACATTTTTGGAAA	siSiah-1 sense
P238	AGCTTTTCCAAAAATGTAACTATTTCCATGTGTTCTCT TGAAACACATGGAAATAGTTACAGGG	siSiah-1 antisense

3.5.1.6 Oligonukleotide zur Amplifikation von cDNA

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	amplifizierte cDNA
GAPDHs	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT	GAPDH
GAPDHs	CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC	GAPDH
P206	TACCTCGAAGTGTCCACCATCC	Siah-1 (sense)
P207	TACAGCATCCAGAGAGCCTTGC	Siah-1 (antisense)

3.5.1.7 Sonstige Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendung
Oligo(dT)	TTTTTTTTTTTTTTTT	cDNA-Synthese
5'p3-Seq	TCTGGCTAACTAGAGAACCC	Sequenzierung von pcDNA3, bindet 5' der MCS
3'p3-Seq	CGGGGGAGGGGCAAACAACAGATG GCTG	Sequenzierung von pcDNA3, bindet 3' der MCS
HH41	GAAGATGGCTGTGAGGGACAGG	Sequenzierung von pSUPER, bindet 5' der MCS
HH49	GCAATTAACCCTCACTAAAGGG	Sequenzierung von pSUPER, bindet 5' der MCS

3.5.2 Expressionsvektoren

Vektor	cDNA	Epitop	Herkunft/Referenz
pcDNA3	-	-	Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA3	-	FLAG	J. Hauber (HPI, Hamburg)
pcDNA3	-	GFP	J. Hauber (HPI, Hamburg)
pSUPER	-	-	(Brummelkamp et al., 2002)
pUC19	HSV-2 ICP0 synthetisch	-	Genart (Regensburg)
pF143	HSV-1 ICP0	GFP	J. Hauber (HPI, Hamburg)
pcDNA3	HuR	FLAG	J. Hauber (HPI, Hamburg)
pcINL-43	HIV-Nef	HA	J. Hauber (HPI, Hamburg)
pSG5	PML Isoform IV (Jensen et al., 2001)	GFP	T. Hofmann (DKFZ, Heidelberg)
pSG5	PML Isoform IV (Jensen et al., 2001)	FLAG	T. Hofmann (DKFZ, Heidelberg)
pcDNA3	Siah-1	HA	T. Hofmann (DKFZ, Heidelberg)
pSG5	Sp100	-	H. Will (HPI, Hamburg)
pcDNA3	HIPK-2	RFP	T. Hofmann (DKFZ, Heidelberg)
pcDNA3	HIPK-2	FLAG	T. Hofmann (DKFZ, Heidelberg)
pSUPER	siSiah-1-1 (cagcataagtccattacaa)	-	T. Hofmann (DKFZ, Heidelberg)
pSUPER	siSiah-1-4 (agctcacatggtgtccaac)	-	T. Hofmann (DKFZ, Heidelberg)
pSUPER	siLuziferase (GL2) (cgtacgcggaataacttcca)	-	T. Hofmann (DKFZ, Heidelberg)
pRSV	HIV-Rev	-	C. Stocking (HPI, Hamburg)
pMDL	HIV-gpRRE	-	C. Stocking (HPI, Hamburg)
pMD2G	VSVG	-	K. Wieggers (HPI, Hamburg)
pG	Lentiviraler Leervektor	-	C. Stocking (HPI, Hamburg)

3.5.3 Sonstige Nukleinsäuren

DNA-Längenstandard

1 kb-Ladder	New England Biolabs (Ipswich, MA)
100 bp-Ladder	New England Biolabs (Ipswich, MA)
Smart-Ladder	Eurogentec (Köln)

Nukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion

dNTPs	Roche (Mannheim)
-------	------------------

3.6 Radioaktivität

TRAN³⁵S-LABEL™ MP Biomedicals (Irvine, CA)

3.7 Proteinstandards

BenchMark™Prestained Invitrogen (Karlsruhe)
Rainbow[¹⁴C]Methylated Protein Marker Amersham (Braunschweig)

3.8 Synthetische Inhibitoren

MG132 Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal
Proteasomen-Inhibitor Merck (Darmstadt)

3.9 Enzyme

3.9.1 Restriktionsnukleasen/Puffer

Restriktionsnukleasen wurden von Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Ipswich, MA) bezogen und in den vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen verwendet.

3.9.2 Sonstige Enzyme

Alkalische Kalbsphosphatase
(*Calf Intestinal Phosphatase*, CIP) New England Biolabs (Ipswich, MA)
Pwo-Polymerase/Puffer Roche (Mannheim)
M-MLV Reverse Transkriptase Promega (Madison, WI)

3.10 Antikörper

3.10.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Herkunft	Verdünnung Westernblot	Verdünnung Immunfluoreszenz
anti-FLAG M2	Maus	Sigma (München)	1:5000	1:5000
anti-HA	Kaninchen	Sigma (München)	1:1000	1:200
anti-GFP	Kaninchen	ABR Affinity BioReagents (Golden, CO)	1:2000	-
anti-Siah-1 (N15)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)	1:200	-
anti- α -Tubulin	Maus	Sigma (München)	1:5000	-
anti-gE (HSV-2)	Maus	ABR Affinity BioReagents (Golden, CO)	-	1:10
anti-PML	Maus	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)	-	1:50
anti-Sp100	Kaninchen	H. Will (HPI, Hamburg)	1:4000	-
anti-HIPK-2 (P-17)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)	1:200	1:50
IgG	Maus	Sigma (München)	-	-
IgG	Kaninchen	Sigma (München)	-	-
anti-183 (p24-ELISA)	Hybridom	NIH (Bethesda, MD)	-	-
anti-Capsid (p24-ELISA)	Kaninchen	K. Wieggers, (HPI, Hamburg)	-	-

3.10.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Konjugat	Herkunft
anti-Maus	Ziege	Peroxidase	Dianova (Hamburg)
anti-Kaninchen	Ziege	Peroxidase	Dianova (Hamburg)
anti-Ziege	Affe	Peroxidase	Dianova (Hamburg)
anti-Maus	Ziege	Alexa Fluor [®] 633	Molecular Probes (Eugene, OR)
anti-Maus	Ziege	Cy2	Rockland (Gilbertsville, PA)
anti-Kaninchen	Ziege	Cy3	Rockland (Gilbertsville, PA)
anti-Maus	Ziege	Cy3	Rockland (Gilbertsville, PA)

Für Westernblotanalysen wurden die Peroxidase-gekoppelten Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper wurden in Immunfluoreszenzanalysen in einer Verdünnung von 1:500 verwendet.

3.11 Fluoreszenz-gekoppelte Marker für Zellorganelle

Name	Funktion	Verdünnung Immunfluoreszenz	Herkunft
Hoechst 33258	DNA-Färbung (Zellkern)	1:200	Sigma (München)
DRAQ5	DNA-Färbung (Zellkern)	1:1000	Alexis (Lausen, CH)

3.12 Reagenzsysteme (Kits)

Biorad Protein Assay (Bradford-Reagenz)	Biorad (München)
DNA Minipräp-Kit	Qiagen (Hilden)
DNA Maxipräp-Kit	Qiagen (Hilden)
DNA Gel-Extraktions-Kit	Qiagen (Hilden)
Eppendorf® MasterMix (2,5x)	Eppendorf (Hamburg)
Lipofectamine™2000	Invitrogen (Karlsruhe)
PCR-Purification-Kit	Qiagen (Hilden)
Rapid DNA-Ligation-Kit	Roche (Mannheim)
Sequenzier-Kit: Big-Dye-Terminator-Kit Version 1.1	ABI (Weiterstadt)

3.13 Reagenzien und Laborhilfsmittel

Acrylamid/Bis (29:1)	Biorad (München)
Agarose	PEQLAB (Erlangen)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (München)
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Amplify	Amersham (Braunschweig)
Aprotinin	Biomol (Hamburg)
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Sigma (München)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Coomassie Blau G	Fluka (Neu-Ulm)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (München)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Serva (Heidelberg)
Dithiothreitol (DDT)	Biomol (Hamburg)

Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid (EtBr)	Biomol (Hamburg)
Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
EGTA	Merck (Darmstadt)
Filterpapier	Schleicher&Schüll (Dassel)
Formamid	Sigma (München)
Glyzerin	Roth (Karlsruhe)
Glyzin	Biomol (Hamburg)
H ₂ O, DNase und RNase frei	Gibco BRL (Eggenstein)
Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma (München)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kälberserumalbumin (BSA)	Sigma (München)
Kalium-Acetat (KAc)	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Sigma (München)
Leupeptin	Biomol (Hamburg)
Luminol	Sigma (München)
Magermilchpulver	Heirler (Radolfzell)
Magnesium-Acetat (MgAc)	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	Biomol (Hamburg)
Natrium-Acetat (NaAc)	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium</i> -, SDS)	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
NKS (Neugeborenen Kälber-Serum)	Biochrom (Berlin)
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Biorad (München)
Nonidet-P40 (Igepal)	Sigma (München)
para-Cumarinsäure	Sigma (München)
Pefabloc	Biomol (Hamburg)
PepstatinA	Biomol (Hamburg)

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma (München)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Merck (Darmstadt)
Polybren	Sigma (München)
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences (Eppelheim)
Protein-A-Sepharose	Amersham (Braunschweig)
Protein-G-Sepharose	Amersham (Braunschweig)
Protran [®] Nitrocellulosemembran	Schleicher&Schüll (Dassel)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Röntgenfilme	Kodak (Stuttgart)
Saccharose	Fluka (Neu-Ulm)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck (Darmstadt)
Sterilfilter 0,22/0,45 µm	Renner (Darmstadt)
Sulfosalicylsäure	Merck (Darmstadt)
Tetramethylbenzidin (TMB)	Merck (Darmstadt)
Trichloressigsäure	ABI (Weiterstadt)
Tris	Biomol (Hamburg)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween20	Fluka (Neu-Ulm)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck (Darmstadt)
Whatman 3MM Papier	Whatman (Maidstone)

Zentrifugen

Reaktionsgefäße	Typ	Hersteller
1,5/2 ml	5417R	Eppendorf (Hamburg)
15/50 ml	Allegra™6KR	Beckman Coulter (Krefeld)
Kulturplatten mit 6 Vertiefungen	Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau)
>50 ml	J-6M	Beckman Coulter (Krefeld)

3.14 Lösungen und Puffer

Coomassie-Färbelösung:	0,5% (w/v) Coomassie Blau G 50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Ponceau S-Färbelösung (10x)	2% (w/v) Ponceau S 30% (w/v) Trichloressigsäure 30% (w/v) Sulfosalicylsäure
Farbmarker für Agarosegele:	40% (w/v) Saccharose 1 mM EDTA III 0,25% (w/v) Bromphenolblau
TAE-Puffer:	2,0 M Tris 1,0 M NaAc 50 mM EDTA II pH 7,4 mit Essigsäure einstellen
PBS-Puffer: (<i>Phosphat Buffered Saline</i> , ohne CaCl_2 und MgCl_2)	138 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na_2HPO_4 1,5 mM KH_2PO_4
TBS-Puffer: (<i>Tris Buffered Saline</i>)	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,6 mit Salzsäure einstellen
TBS-Tween-Puffer: (TBST)	TBS-Puffer 0,02% (v/v) Tween 20

Tbfl-Puffer:	30 mM KOAc 50 mM MnCl ₂ 100 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glyzerin
TbfII-Puffer:	10 mM Na-MOPS, pH 7,0 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15% (v/v) Glyzerin
RIPA-Puffer:	1% (w/v) SDS 1% (v/v) NP40 1% (w/v) Natrium- Deoxycholate 50 mM NaCl 25 mM Tris-HCl, pH 8,2 vor Verwendung wurden jeweils frisch dazugegeben: 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml PepstatinA, 125 µg/ml Pefabloc
IP-Lysepuffer:	300 mM NaCl 50 mM HEPES, pH 7,5 5 mM EDTA 0,5% (v/v) NP40 vor Verwendung wurden jeweils frisch dazugegeben: 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml PepstatinA, 125 µg/ml Pefabloc
IP-Waschpuffer:	150 mM NaCl 50 mM HEPES, pH 7,5 5 mM EDTA 0,5% (v/v) NP40

8,5% Trenngel:	9,032 ml H ₂ O 3,6 ml 1,88 M Tris, pH 8,8 5,1 ml 30% (w/v) PAA 0,18 ml 10% (w/v) SDS 0,08 ml 10% (w/v) APS 10 µl TEMED
10% Trenngel:	8,132 ml H ₂ O 3,6 ml 1,88 M Tris, pH 8,8 6,0 ml 30% (w/v) PAA 0,18 ml 10% (w/v) SDS 0,08 ml 10% (w/v) APS 10 µl TEMED
12% Trenngel:	6,932 ml H ₂ O 3,6 ml 1,88 M Tris, pH 8,8 7,2 ml 30% (w/v) PAA 0,18 ml 10% (w/v) SDS 0,08 ml 10% (w/v) APS 10 µl TEMED
4,5% Sammelgel:	7,1 ml H ₂ O 1,25 ml 1,0 M Tris, pH 6,8 1,5 ml 30% (w/v) PAA 0,1 ml 10% (w/v) SDS 45 µl 10% (w/v) APS 10 µl TEMED
SDS-Probenpuffer (5x):	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% (w/v) SDS 20% (v/v) Glyzerin 0,5% (w/v) Bromphenolblau vor Verwendung wurde frisch dazugegeben: 5% (v/v) β-Mercaptoethanol

SDS-Laufpuffer (10x):	0,25 M Tris 1,92 M Glyzin 1% (w/v) SDS
Gel-Fixierlösung:	25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure
Transferpuffer:	25 mM Tris-Base 152 mM Glyzin 10% (v/v) Methanol
ECL-Entwicklerlösung 1:	18 ml H ₂ O 2 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,5 88 µl para-Cumarin-säure (74 mg /5 ml DMSO) 200 µl Luminol (443 mg/10 ml DMSO)
ECL-Entwicklerlösung 2:	18 ml H ₂ O 2 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,5 30 µl 30% (v/v) H ₂ O ₂
Elvanol:	20 g Polyvinylchlorid in 160 ml PBS 80 ml Glyzerin (über 80°C erhitzen)

4 METHODEN

4.1 Bakterienkulturen

4.1.1 Kulturen für die Plasmidisolierung

Zur Vermehrung der *in vitro* rekombinierten Plasmide dienten die *E.coli*-Stämme XL2-Blue, XL10-Gold und GM2163. Alle verwendeten Plasmid-Konstrukte enthielten entweder das Ampicillin- oder das Kanamycin-Resistenzgen. Dementsprechend wurden die plasmidtragenden Bakterien auf LB-Agarplatten bzw. in LB-Flüssigmedium mit 100 mg/l Ampicillin oder 30 mg/l Kanamycin kultiviert. 5 ml Übernachtskulturen in LB-Medium dienten als Vorkultur für präparative Plasmidisolierungen. Zur Extraktion größerer DNA-Mengen wurden 500 ml LB-Medium in sterilen Erlenmeyerkolben mit jeweils 5 ml Übernachtskultur beimpft und bei 37°C 12 bis 16 h im Schüttelinkubator propagiert. Für die Langzeitlagerung wurden 750 µl Bakteriensuspension mit 750 µl sterilem Glycerin versetzt und bei –80°C aufbewahrt.

4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien zur Transformation

5 ml Thym-Broth-Medium wurden mit einer Kolonie des entsprechenden *E.coli*-Stammes von einer Stammplatte (10 mM MgSO₄, ohne Antibiotikum) beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit 2,5 ml dieser Vorkultur wurden 250 ml Thym-Broth-Medium (ohne Antibiotikum) beimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600 nm}) von etwa 0,5 bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Hauptkultur wurde anschließend für 20min bei 0°C inkubiert, danach für 15min bei 4°C und 200 x g zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 75 ml eiskaltem, sterilem TbfI-Puffer resuspendiert und bei 0°C für 30min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 15min bei 4°C und 200 x g wurden die Bakterien in 10 ml TbfII-Puffer resuspendiert und in Portionen von 200 µl in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei –80°C aufbewahrt.

4.1.3 Transformation von Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden 200 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz versetzt, vorsichtig durch Rühren mit der Pipettenspitze gemischt und für 45min bei 0°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz im Wasserbad 2min auf 42°C erwärmt (Hitzeschock), 45sek in einem Eisbad abgekühlt und zu 2 ml LB-Medium ohne Antibiotika gegeben. Nach 90min Inkubation im Wasserbad bei 37°C wurden die Bakterien bei 425 x g abzentrifugiert, resuspendiert, auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Klone wurden mit Hilfe der analytischen Plasmidisolierung untersucht.

4.2 DNA/RNA-Methoden

4.2.1 DNA-Standardmethoden

- Agarose-Gelelektrophorese (Biorad, München);
- Dephosphorylierung mit Kalbsphosphatase, nach Angaben des Herstellers;
- Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem DNA-Gel-Extraktionskit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers;
- Fällung von Nukleinsäuren mit 0,1 Volumen 5 M NaCl und 2,5 Volumen Ethanol; Entfernung von Salzen mit 70% (v/v) Ethanol;
- Plasmidpräparation in großer Menge mit dem Maxipräp-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers;
- Plasmidpräparationen in kleiner Menge mit dem Minipräp-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers;
- Ligationen mit Hilfe des Rapid DNA-Ligation-Kits der Firma Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers;
- Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung in einem Spektral-photometer der Firma Beckmann Coulter (Krefeld);
- Restriktionsanalysen nach Angaben des Herstellers;

4.2.2 Hybridbildung von Oligonukleotiden

Für die Hybridbildung von Oligonukleotiden auf Grund von Basenkomplementarität wurden je 3 µg Oligonukleotid in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 2min auf 90°C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz bei ausgeschaltetem Wasserbad über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.3 Isolierung von gesamtzellulärer-RNA

Die gesamtzelluläre-RNA wurde mittels TRIzol[®] Reagent isoliert. Hierfür wurden die Zellen zum Zeitpunkt der Ernte 2x mit PBS gewaschen, in 1 ml TRIzol[®] Reagent aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde der Ansatz 5min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 200 µl Chloroform versetzt und erneut 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15min Zentrifugation bei 8.500 x g und 4°C, wurde die obere klare Phase, welche die RNA enthielt, in ein frisches Reaktionsgefäß mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) überführt, 1min invertiert und erneut 15min bei 20.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere klare Phase wurde zur Fällung in ein frisches Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol pipettiert. Nach einer Inkubation von 10min bei Raumtemperatur wurde die gefällte RNA 20min bei 8.500 x g und 4°C zentrifugiert und 1x mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen. Die isolierte RNA wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

4.2.4 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)

Zur Untersuchung der Genexpression wurde durch reverse Transkription der mRNA eine spezifische cDNA Matrize hergestellt. Durch Verwendung eines Oligo(dT)-Primers konnte sichergestellt werden, dass nur PolyA-mRNAs in cDNAs umgeschrieben wurden, welche anschließend mittels PCR amplifiziert wurden.

Zur cDNA-Synthese wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

1 µg	gesamtzelluläre-RNA
4 µl	5x M-MLV Reverse Transkriptase Puffer
1 µl	Oligo(dT)-Primer (100 pmol/µl)
2 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
0,25 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)
@20 µl	H ₂ O

Die reverse Transkription wurde in einer PCR-Maschine unter Verwendung des folgenden Programmprofils durchgeführt:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	
1	25°C	10min	Hybridisierung Primer/RNA
1	42°C	90min	RT und cDNA-Synthese
1	99°C	5min	Enzyminaktivierung
1	12°C	∞	-

Nach der reversen Transkription wurden die Proben zur Fällung mit 250 µl H₂O, 30 µl 5 M NaCl und 700 µl Ethanol versetzt und mindestens 2h bei –80°C inkubiert. Danach wurde die cDNA 30min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert.

4.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem thermoregulierbaren Heizblock mit Deckelheizung (GeneAmp® PCR System 9700, ABI Weiterstadt) durchgeführt.

4.2.5.1 PCR zur Amplifikation von DNA für Klonierungen

Zur Vervielfältigung definierter Nukleinsäureabschnitte für Klonierungen wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

100 ng	DNA-Matrize
2,5 µl	Primer 1 (100 ng/µl)
2,5 µl	Primer 2 (100 ng/µl)
10 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
10 µl	Pwo-Puffer mit MgSO ₄
1 µl	Pwo-Polymerase
@100 µl	H ₂ O

Für die Klonierung der Siah-1-Deletionsmutanten und der ICP0ΔRING-Mutante wurde zur Amplifikation der entsprechenden cDNAs folgendes PCR-Programmprofil verwendet:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	
1	95°C	2min	Initiale Denaturierung
10	94°C	15sek	Denaturierung
	60°C	30sek	Hybridisierung der Oligonukleotide
	72°C	2min	Elongation
15	94°C	15sek	Denaturierung
	60°C	30sek	Hybridisierung der Oligonukleotide
	72°C	2min+ 20sek/Zyklus	Elongation
1	72°C	10min	Finale Elongation
1	12°C	∞	

Zur Amplifikation der Siah-1 cDNA zur Konstruktion eines Expressionsplasmids, welches von getrennten Promotoren Siah-1 und das grünfluoreszierende Protein (GFP) exprimiert, wurde folgendes Programmprofil verwendet:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	
1	94°C	2min	Initiale Denaturierung
	50°C	2min	Hybridisierung der Oligonukleotide
	72°C	2min	Elongation
40	94°C	45sek	Denaturierung
	58°C	45sek	Hybridisierung der Oligonukleotide
	72°C	2min	Elongation
1	72°C	10min	Finale Elongation
1	12°C	∞	

4.2.5.2 PCR zur Amplifikation von cDNA zur Analyse der Genexpression

Zur semi-quantitativen Untersuchung der Genexpression wurde gesamtzelluläre-RNA aus Zellen isoliert (siehe 4.2.3) und mittels Reverser Transkription (siehe 4.2.4) in cDNA umgeschrieben, welche als Matrize für die anschließende PCR-Reaktion diente.

Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

25 µl	Eppendorf® MasterMix (1,25x)
x µl	cDNA (Die eingesetzten Mengen cDNA wurden aus der internen Kontrolle ermittelt.)
0,5 µl	Primer 1 (100 pmol/µl)
0,5 µl	Primer 2 (100 pmol/µl)
@50 µl	H ₂ O

Zur Amplifikation der internen Kontrolle GAPDH wurde folgendes Programmprofil verwendet:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	
1	95°C	3min	Initiale Denaturierung
25	95°C	30sek	Denaturierung
	58°C	1min	Hybridisierung der Oligonukleotide
	72°C	4min	Elongation
1	72°C	10min	Finale Elongation
1	12°C	∞	

Zur Amplifikation der spezifischen cDNAs wurde folgendes Programm-Profil verwendet:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	
1	95°C	5min	Initiale Denaturierung
	50°C	2min	Hybridisierung der Oligonukleotide
	72°C	2min	Elongation
30-35	95°C	1min	Denaturierung
	58°C	1min	Hybridisierung der Oligonukleotide
	72°C	1:30min	Elongation
1	72°C	7min	Finale Elongation
1	12°C	∞	

4.2.5.3 Sequenzier-PCR

Die Sequenzierreaktion beruht auf der Strangabbruchmethode von Sanger (Sanger et al., 1977). Es werden fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide (ddNTPs) verwendet, die im Verlauf der PCR in die neusynthetisierte DNA eingebaut werden. Sobald die Polymerase ein Didesoxy-Nukleotid einbaut, kommt es auf Grund der fehlenden Hydroxygruppe am Zuckerrest und der dadurch nicht mehr möglichen Neubildung einer Phospho-Diester-Bindung zum Strangabbruch. Da jedes der vier Dideoxy-Nukleotide mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, kann die Reaktion in einem Reaktionsgefäß ablaufen.

Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

500 ng	DNA
10 pmol	Primer
8 µl	2,5x Puffer
2 µl	<i>Big-Dye-Terminator-Mix Version 1.1</i>
@20 µl	H ₂ O

Im *Big-Dye-Terminator-Mix Version 1.1* waren fluoreszenzmarkierte ddNTPs, nichtmarkierte dNTPs und eine hitzestabile DNA-Polymerase enthalten.

Es wurde folgendes Programmprofil verwendet:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	
1	95°C	2min	Initiale Denaturierung
25	96°C	10sek	Denaturierung
	50°C	15sek	Hybridisierung der Oligonukleotide
	60°C	4min	Elongation
1	12°C	∞	

Anschließend wurden die Proben zur Fällung mit 70 µl H₂O, 10 µl 5 M NaCl und 250 µl Ethanol versetzt und mindestens 2h bei -80°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze 30min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und die DNA getrocknet. Die Auftrennung und Detektion der verschiedenen Produkte wurde extern durchgeführt.

4.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalysen wurden von der Firma Richter (Servicelabor im Institut für Pathologie der Universität Hamburg) durchgeführt. Die resultierenden Sequenzen wurden mit dem Computerprogramm „*Gene Construction Kit*“ (Textco, West Lebanon, NH) ausgewertet.

4.2.7 Klonierungen

Bei allen Klonierungen wurden DNA-Fragmente, welche durch PCR oder Restriktionsspaltung erhalten wurden über präparative Agarosegele aufgereinigt und anschließend eluiert. Die Transformation erfolgte wie unter 4.1.3 beschrieben in XL2-Blue, XL10-Gold oder GM2163. Positive Klone wurden durch Restriktionsspaltung und Sequenzierung identifiziert.

4.2.7.1 Klonierung von ICP0-Fusionskonstrukten und ICP0-Deletionsmutanten

Auf Grund des hohen GC-Gehaltes (77%) in der kodierenden Sequenz des HSV-2 ICP0-Gens war es nicht möglich die cDNA aus HSV-2 infizierten eukaryotischen Zellen zu klonieren. Die in dieser Doktorarbeit verwendete cDNA des HSV-2 ICP0-Gens wurde synthetisch von der Firma Geneart (Regensburg) hergestellt. Bei der Synthese wurde die kodierende Nukleotidsequenz gemäß des genetischen Codes dahingehend verändert, einen niedrigeren GC-Gehalt und eine optimierte *codon usage* sowohl in Prokaryoten, als auch in Eukaryoten zu erhalten. Außerdem wurden zur verbesserten Handhabung verschiedene Restriktionsschnittstellen eingeführt (siehe Abbildung 6). Die Aminosäuresequenz entsprach der veröffentlichten HSV-2 Wildtyp-Sequenz (NCBI Zugangsnummer: D10471) und wurde nicht verändert.

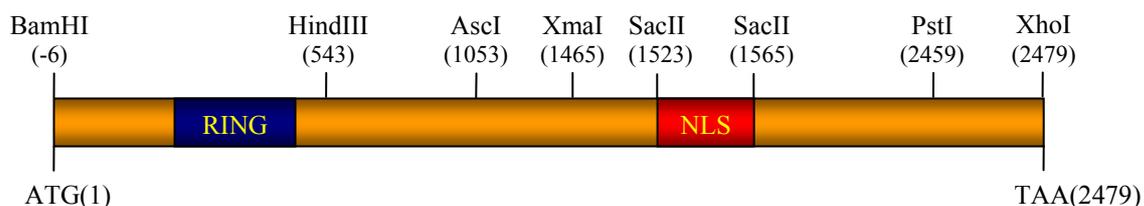


Abbildung 6: Schematische Darstellung der synthetischen HSV-2 ICP0 cDNA. Angegeben sind die neu eingeführten Restriktionsschnittstellen, sowie die RING-Domäne und das Kernlokalisierungssignal (NLS, *Nuclear Localization Signal*). Die angeführten Zahlen repräsentieren die jeweiligen Nukleotidpositionen.

Klonierung von ICP0 FLAG- und GFP-Fusionskonstrukten

Ein Antikörper gegen ICP0 stand nicht zur Verfügung, daher wurde zum Nachweis der ICP0-Expression die ICP0-kodierende Sequenz als Fusion mit dem FLAG-Epitop oder der Sequenz des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) kloniert. Diese Epitope konnten mit Hilfe kommerzieller Antikörper detektiert werden.

Zuerst wurde die für ICP0-kodierende Sequenz durch Restriktionsspaltung mit den Enzymen BamHI und XhoI aus dem Vektor pUC19-ICP0 isoliert und in die entsprechend geschnittenen Vektoren pcDNA3-GFP und pcDNA3-FLAG ligiert.

Da die Fusion von ICP0 mit dem GFP- und FLAG-Epitop am 3' Ende der ICP0-Sequenz stattfand, musste das Stoppcodon aus der ICP0-kodierenden Sequenz eliminiert werden. Dafür wurden die Basenpaare 2459-2479, welche das Stoppcodon enthielten, mittels Restriktionsspaltung mit PstI und XhoI entfernt und durch die hybridisierten synthetischen Oligonukleotide P31 + P32 (siehe 3.5.1.1) ersetzt. Diese Oligonukleotide kodierten die entsprechende Sequenz ohne Stoppcodon und erhielten den Leserahmen mit dem GFP- oder FLAG-Epitop aufrecht. Nach Hybridisierung der beiden Oligonukleotide entstanden die Restriktionsschnittstellen PstI und XhoI, über welche das Oligohybrid mit den linearisierten ICP0-Vektoren ligiert wurde. Die entstandenen Vektoren erhielten die Bezeichnungen pcDNA3-ICP0-GFP und pcDNA3-ICP0-FLAG.

Klonierung von ICP0-Deletionsmutanten

Abbildung 7 gibt eine Übersicht über sämtliche verwendete ICP0-Deletionsmutanten. Alle Mutanten wurden als GFP- und FLAG- Fusionskonstrukte konstruiert.

Klonierung einer ICP0 NLS-Deletionsmutante

Für Lokalisationstudien wurde eine zytoplasmatische ICP0-Mutante konstruiert. Auf Grund von Sequenzvergleichen zwischen HSV-1 und HSV-2 ICP0 konnten basische Aminosäuren identifiziert werden, welche ein potenzielles Kernlokalisierungssignal (NLS, *Nuclear Localization Signal*, Aminosäurepositionen 510-521) kodieren könnten (Mullen et al., 1994). Bei der Synthese der HSV-2 ICP0 cDNA wurden zwei SacII Schnittstellen so eingefügt, dass dieses potenzielle NLS durch Restriktionsspaltung unter Aufrechterhaltung des Leserahmens entfernt werden konnte.

Die Vektoren pcDNA3-ICP0-FLAG und pcDNA3-ICP0-GFP (siehe oben) wurden mit SacII behandelt, aufgereinigt und anschließend mit sich selbst religiert.

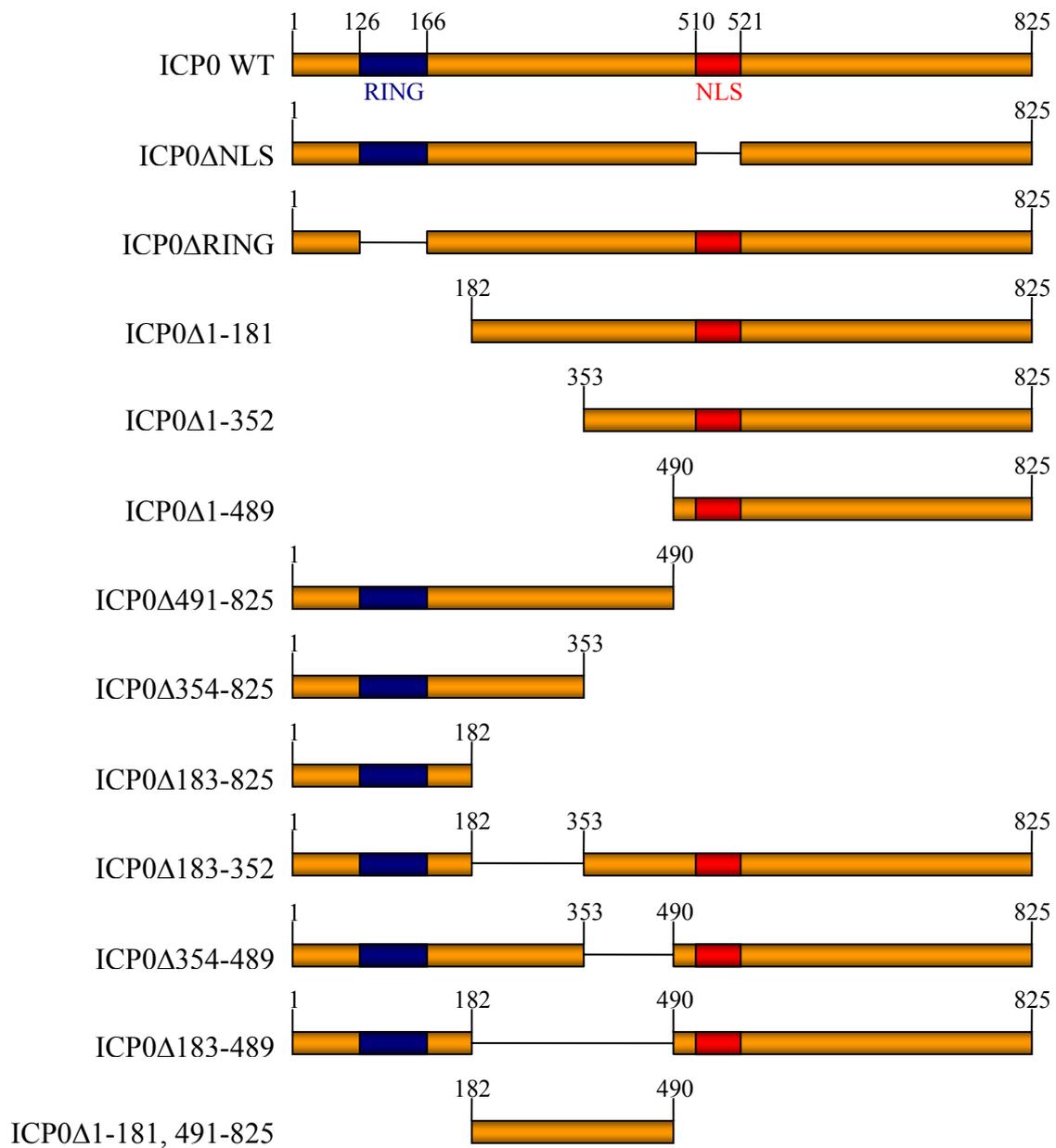


Abbildung 7: Schematische Darstellung der verwendeten ICP0-Deletionsmutanten. Die Bezeichnung der Mutanten gibt die jeweils deletierten Domänen oder Aminosäuren an. Die Zahlen zeigen die jeweilige Aminosäureposition an. Zusätzlich sind die RING-Domäne und das Kernlokalisationssignal (NLS) dargestellt.

Klonierung einer ICP0 RING-Finger-Deletionsmutante

Die ICP0 RING-Domäne (Aminosäurepositionen 126-166) ist entscheidend für die biologische Funktion von ICP0 (Everett et al., 1993a). Daher wurde eine ICP0 RING-Deletionsmutante konstruiert.

Hierzu wurden getrennt voneinander der 5' (Basenpaare 1-378)- und 3' (Basenpaare 498-1060)- Sequenzbereich der RING-Domäne von ICP0 mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide P190 + P191 (5'-Bereich, siehe 3.5.1.1) und P192 + P193 (3'-Bereich, siehe 3.5.1.1) amplifiziert. Die Oligonukleotide waren so gewählt, dass im 5'-Amplifikat eine BamHI- und eine EcoRI- und im 3'-Amplifikat eine EcoRI- und eine AscI-Restriktionsenzym-Erkennungsstelle entstanden. Die beiden PCR-Fragmente wurden über die EcoRI-Stelle ligiert, wobei der Leserahmen erhalten blieb. Anschließend wurden die ligierten PCR-Fragmente über die BamHI- und AscI- Stellen mit den Vektoren pcDNA3-ICP0-GFP und pcDNA3-ICP0-FLAG (siehe oben), aus welchen vorher das entsprechende Fragment mit denselben Enzymen entfernt worden war, ligiert (siehe Abbildung 8).

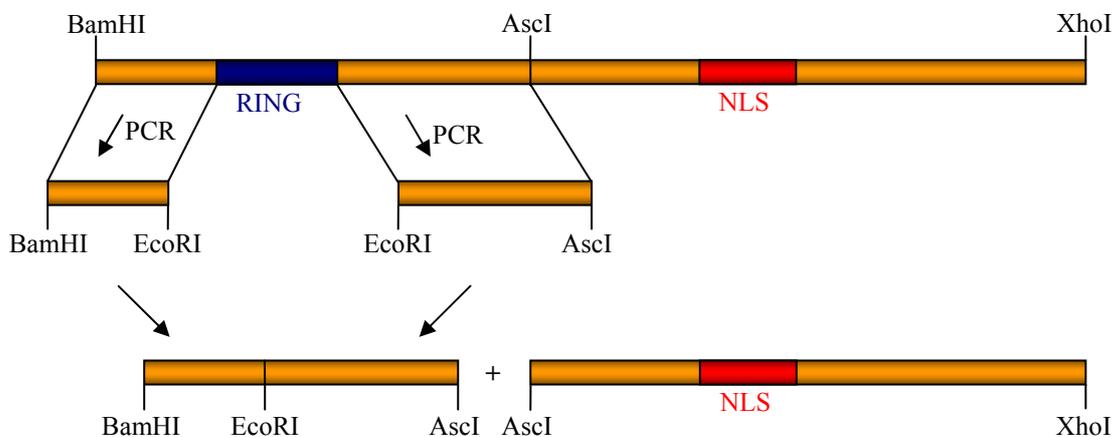


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Klonierung einer ICP0 Δ RING-Mutante. Ausführliche Beschreibung siehe Text.

Klonierung weiterer ICP0-Deletionsmutanten

Zur Charakterisierung der Interaktion zwischen ICP0 und Siah-1 wurden ICP0-Deletionsmutanten konstruiert (siehe Abbildung 7 und Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über ICP0-Deletionsmutanten und bei deren Klonierung verwendete Oligonukleotide (siehe 3.5.1.1) und Restriktionsendonukleasen.

Deletionsmutante	Aminosäuren	Oligonukleotid-Linker	Restriktions-Enzyme
ICP0Δ1-181	182-825	P69 + P70	HindIII
ICP0Δ1-352	353-825	P71 + P72	BamHI/AscI
ICP0Δ1-489	490-825	P176 + P177	BamHI/XmaI
ICP0Δ491-825	1-490	P172 + P173	XmaI/XhoI
ICP0Δ354-825	1-353	P170 + P171	AscI/XhoI
ICP0Δ183-825	1-182	P174 + P175	HindIII/XhoI
ICP0Δ183-352	1-182, 353-825	P81 + P82	HindIII/AscI
ICP0Δ354-489	1-353, 490-825	P83 + P84	AscI/XmaI
ICP0Δ183-489	1-182, 490-825	P85 + P86	HindIII/XmaI
ICP0Δ1-181, 491-825	182-490	P69 + P70	HindIII

Als Ausgangsvektoren wurden die Plasmide pcDNA3-ICP0-GFP und pcDNA3-ICP0-FLAG (siehe oben) eingesetzt, aus welchen mittels Restriktionsspaltung (siehe Tabelle 1) die entsprechenden Sequenzen entfernt wurden. Für die Mutante mit dem kodierenden Bereich der Aminosäuren 182-490 wurde die Mutante ICP0Δ491-825 als Ausgangsvektor verwendet. Die geschnittenen Vektoren wurden mit einem Oligonukleotid-Linker ligiert, welcher durch Hybridisierung der angegebenen Oligonukleotide (siehe Tabelle 1) erhalten wurde. Durch die Ligation mit dem Linker wurde der Leserahmen der Deletionsmutanten erhalten und gegebenenfalls ein Startcodon eingeführt.

4.2.7.2 Klonierung von Siah-1-Deletionsmutanten

Für eine detaillierte Untersuchung der Interaktion zwischen ICP0 und Siah-1 wurden Siah-1-Deletionsmutanten konstruiert. Alle Mutanten wurden als Fusionen mit dem Hämagglutinin (HA)-Epitop hergestellt (siehe Abbildung 9).

Als Ausgangsvektor diente der Vektor pcDNA3-HA-Siah-1, aus dem die für Siah-1-kodierende Sequenz mittels Restriktionsspaltung mit den Enzymen EcoRI und NheI entfernt wurde.

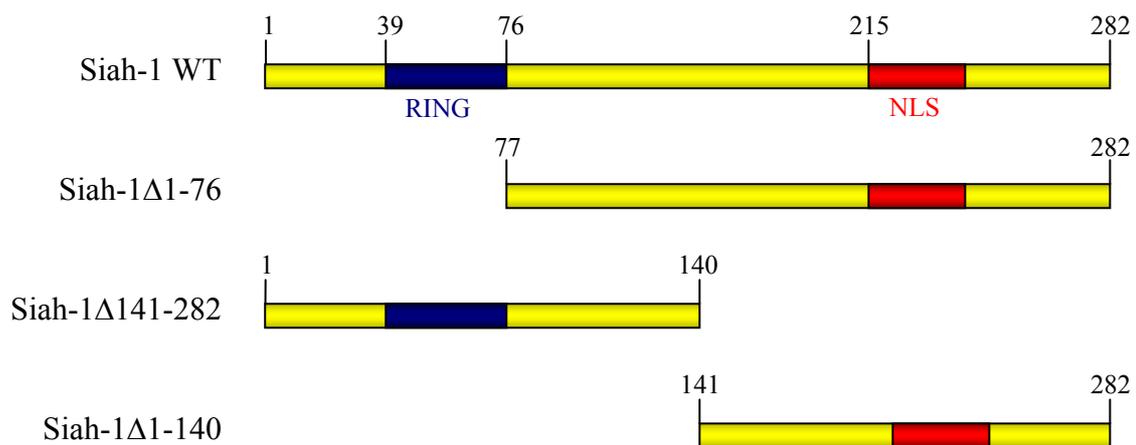


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Siah-1-Deletionsmutanten. Die Bezeichnung der Mutanten gibt die deletierten Aminosäuren an. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen. Es sind RING-Domäne und Kernlokalisierungssignal (NLS) dargestellt.

Zur Amplifikation der einzelnen Siah-1 Fragmente wurde ebenfalls der Vektor pcDNA3-HA-Siah-1 als PCR-Matrize eingesetzt. Die verwendeten Primerpaare für die PCR-Reaktion sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die synthetischen Oligonukleotide waren so gewählt, dass für die Ligation die Restriktionsschnittstellen EcoRI und NheI in die PCR-Amplifikate eingeführt wurden, und der Leserahmen mit dem N-terminalen HA-Epitop des Ausgangsvektors erhalten blieb.

Tabelle 2: Übersicht über Siah-1-Deletionsmutanten und bei deren Klonierung verwendete Oligonukleotide

Deletionsmutante	Oligonukleotide für PCR (siehe 3.5.1.3)
Siah-1Δ1-76	P211 + P212
Siah-1Δ141-282	P213 + P214
Siah-1Δ1-140	P215 + P212

4.2.7.3 Klonierung eines Siah-1 und GFP-Expressionsplasmids

Siah-1 ist ein extrem instabiles Protein mit sehr kurzer Halbwertszeit (Hu und Fearon, 1999). Daher ist es schwierig, mit den gängigen molekularbiologischen und biochemischen Methoden die Siah-1-Expression in Zellkultur nachzuweisen. Um sicher zu stellen, dass Zellen mit Siah-1-Vektoren transfiziert waren, wurde deshalb eine Transfektionskontrolle

konstruiert. Hierzu wurde ein hybrides Expressionsplasmid generiert, welches von unabhängigen CMV-Promotoren gleichzeitig Siah-1 und GFP exprimiert. Somit war sichergestellt, dass jede GFP-exprimierende Zelle auch Siah-1 exprimiert.

Für die Klonierung wurden ein CMV-Promoter, die kodierende Sequenz von Siah-1 in Fusion mit einem HA-Epitop und eine Polyadenylierungsstelle vom Expressionsplasmid pcDNA3-HA-Siah-1 mittels PCR unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide P243 + P244 (siehe 3.5.1.3) amplifiziert. Die Primer waren so gewählt, dass eine SalI und NotI Restriktionsschnittstelle am 5'- und 3'-Ende des Amplifikates eingeführt wurden. Als Ausgangsplasmid wurde pGFP-siCRM1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Hauber, HPI, Hamburg) verwendet. Dieses Plasmid exprimiert unabhängig GFP und eine siRNA-Kassette gegen CRM1. Die siRNA-Kassette wurde mittels Restriktionsspaltung durch die Restriktionsnukleasen SalI und NotI entfernt und durch das aufgereinigte CMV-Siah-1-PolyA PCR-Amplifikat ersetzt.

4.2.7.4 Klonierung von pSUPER-Konstrukten für RNAi (RNA interference)

Die Methode der RNAi ermöglicht es, die Expression spezifischer Gene zu inhibieren. Zur Expression von siRNA (*short interfering RNA*) gegen Siah-1 spezifische mRNA wurde das pSUPER Expressionsplasmid von Brummelkamp et al. (2002) verwendet. Die si-Sequenzen wurden durch Hybridbildung der synthetischen Oligonukleotide P237 + P238 (siehe 3.5.1.5) erhalten, und über die Restriktionsschnittstellen BglII und HindIII in den entsprechend geschnittenen und aufgereinigten pSUPER-Vektor inseriert.

4.2.7.5 Klonierung von lentiviralen Vektoren für RNAi

Um die Effizienz der RNAi zu erhöhen, wurden lentivirale Vektoren mit siRNA-Kassetten gegen Siah-1 spezifische mRNA verwendet. Es wurden drei Vektoren mit unterschiedlichen si-Sequenzen gegen Siah-1 (pG-siSiah-1, pG-siSiah-1-1, pG-siSiah-1-4) und als Kontrolle ein Vektor mit einer si-Sequenz gegen Luziferase (pG-siLuziferase) kloniert. Zur Konstruktion dieser Vektoren, wurde die komplette siRNA-Kassette und der H1-Promotor aus den vorhandenen pSUPER-Vektoren mittels Restriktionsspaltung mit XbaI und XhoI ausgeschnitten und in den entsprechend vorbereiteten lentiviralen Vektor pG ligiert.

4.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen

4.3.1 Allgemeine Zellkultur

Eukaryotische Zellen wurden in Zellkulturflaschen der Firma BD Falcon (Heidelberg) bei 37°C, 5% CO₂ und 80% Luftfeuchtigkeit in entsprechenden Medien kultiviert. Zur Passage wurden die adhärent wachsenden Zellen zunächst 2x mit 13 ml PBS und 1x mit 7 ml Trypsin/EDTA gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Zellen wurden in entsprechenden Verdünnungen in frischem Kulturmedium aufgenommen und auf neue Kulturflaschen verteilt.

4.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden 1×10^7 /ml Zellen in einer vorgekühlten Lösung aus 10% (v/v) DMSO und 90% (v/v) FKS aufgenommen und in Cryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Die Cryoröhrchen wurden in einer Cryobox (Stratagene, La Jolla, CA), die ein langsames Einfrieren (1°C/min) ermöglicht, 1h bei -20°C und danach 24h bei -80°C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die eingefrorenen Zellen wurden möglichst schnell aufgetaut und in kaltes Kulturmedium überführt. Zum Entfernen des DMSO wurden die Zellen abzentrifugiert, in frischem Kulturmedium aufgenommen und wie unter 4.3.1 beschrieben kultiviert.

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Transiente Transfektion von 293T- und HeLa-Zellen

293T- und HeLa-Zellen wurden mittels PEI (Polyethylenimin, 1 mg/ml) transient transfiziert. Bei PEI handelt es sich um ein kationisches Polymer, welches im Komplex mit DNA durch Endozytose in die Zellen aufgenommen wird. Anschließend findet eine Fusion mit zellulären Lysosomen statt. Auf Grund des niedrigen pH-Wertes innerhalb der Lysosomen quillt das PEI-Polymer auf, was schließlich zur Zerstörung der Lysosomen und Freisetzung der DNA in der Zelle führt.

Für die Transfektion wurden Platten mit 12 Vertiefungen oder 10 cm Zellkulturschalen mit 0,1% Gelatine für 20min behandelt und anschließend 2x mit PBS gewaschen. Am Tag vor der Transfektion wurden pro 12-Vertiefung 1×10^5 HeLa-Zellen und pro 10 cm Schale $2,5-3,0 \times 10^6$

293T-Zellen oder 1×10^6 HeLa-Zellen in Kulturmedium (DMEM ohne Antibiotika) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 50-70% konfluent. Vor der Transfektion wurde das Medium (DMEM ohne Antibiotika) erneuert.

In einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden für eine 10 cm Schale 6 μg DNA in 1158 μl Opti-MEM resuspendiert, anschließend mit 36 μl PEI versetzt und sofort durch Vortexen gemischt. Für eine 12-Vertiefung wurden 0,5 μg DNA und 3 μl PEI in einem Gesamtvolumen von 100 μl verwendet. Um in allen Ansätzen die gleiche Menge DNA sicherzustellen, wurde jeweils die entsprechende Menge des parentalen Vektors (Leervektor) zugegeben. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch vorsichtig auf die Zellen getropft und diese für 6h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Danach wurde das Kulturmedium gewechselt (DMEM mit Antibiotika) und die transfizierten Zellen nach 24-48h Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 geerntet.

4.4.2 Transiente Transfektion von 293T-Zellen mit lentiviralen Vektoren zur Virusproduktion

Zur Hemmung der Genexpression mittels siRNA wurden lentivirale Vektoren eingesetzt. Durch Verwendung einer geeigneten Verpackungszelllinie wurden die entsprechenden viralen Partikel erzeugt. Zur Virusproduktion wurden $2,8 \times 10^6$ 293T-Zellen in 10 cm Schalen am Vorabend in Kulturmedium (DMEM ohne Antibiotika) ausgesät. Die Transfektion erfolgte mittels PEI wie unter 4.4.1 beschrieben, dabei wurden folgende Plasmid-DNA Konzentrationen verwendet:

3,00 μg	lentiviraler Vektor pG
0,75 μg	pRSV-Rev
0,75 μg	pMD2G-VSVG
1,50 μg	pMDL-gpRRE

Nach 48h Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurde der Kulturüberstand, welcher die neu gebildeten Lentiviren enthielt, abgenommen und bei $350 \times g$ und Raumtemperatur für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,2 μm Einwegfilter steril filtriert und zur Aufbewahrung bei -80°C eingefroren. Zur Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines p24-ELISA (siehe 4.4.3) wurde vor dem Einfrieren ein Aliquot zellfreier Überstand abgenommen und mit 0,1 Volumen 5% (v/v) Triton X-100 inaktiviert.

4.4.3 p24-ELISA zur Konzentrationsbestimmung von rekombinanten Lentiviren

Die Konzentration von Lentiviren wurde durch Bestimmung des p24-Gehaltes im Zellkulturüberstand ermittelt. Hierfür wurde ein *Sandwich*-ELISA verwendet, bei dem zuerst ein gegen das p24-Capsidprotein gerichteter Antikörper (anti-183) in einer Konzentration von 2 µg/Vertiefung (in PBS) auf einer Flachbodenplatte mit 96 Vertiefungen (Immuno Plate, MaxiSorp Surface) immobilisiert wurde. Die Kulturplatte wurde über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend 3x mit PBS/0,05% (v/v) Tween20 gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verringern, wurde für 2h bei 37°C mit 10% (v/v) NKS/PBS inkubiert und danach 3x mit PBS/0,05% (v/v) Tween20 gewaschen. Anschließend wurden in geeigneten Verdünnungen die inaktivierten Kulturüberstände auf die beschichtete Kulturplatte aufgetragen. Als Standard wurden parallel dazu definierte Capsidmengen (0,0625-4,0 ng) in Duplikaten verwendet. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurde die Kulturplatte zum Entfernen von ungebindenem p24-Capsidprotein 3x mit PBS/0,05% (v/v) Tween20 gewaschen. Zur Detektion des gebundenen Capsids wurde zuerst mit Capsidantikörper (anti-Capsid, verdünnt in 10% (v/v) NKS/PBS/0,1% (v/v) Tween20) für 1h bei 37°C inkubiert, danach unter gleichen Bedingungen mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper (verdünnt in 10% (v/v) NKS/PBS/0,1% (v/v) Tween20). Zwischen und nach den beiden Antikörperinkubationen wurde 3x mit PBS/0,05% (v/v) Tween20 gewaschen. Außerdem wurde die Kulturplatte nach dem letzten Waschschrift 1x mit entionisiertem Wasser gewaschen, wobei das Wasser vollständig durch Ausklopfen auf Papiertüchern entfernt wurde. Zugefügtes Tetramethylbenzidin (TMB: 10 ml 0,1 M Natriumacetat pH 6,0; 100 µl TMB (Stock 10 mg/ml DMSO); 2 µl H₂O₂) wurde durch die Peroxidase in einen blauen Farbstoff umgesetzt. Nach 5min wurde diese Reaktion mit 0,5 M Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein gelber Farbumschlag entstand, dessen Extinktion bei 450 nm gegen 560 nm in einem *ELISA-Reader* gemessen wurde. Die p24-Konzentration wurde aus den gemessenen Extinktionswerten mit Hilfe einer Standarddeichgeraden, unter Berücksichtigung der Verdünnung, ermittelt.

4.4.4 Transiente Transfektion von U2OS- und VERO-Zellen

U2OS- und VERO-Zellen wurden mittels Lipofectamine™2000 (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert. Eine Übersicht über am Vorabend in antibiotikafreiem Kulturmedium ausgesäte Zellzahl, Lipofectamine™2000 Volumen, DNA-Menge und Gesamtvolumen gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Übersicht über Transfektionsansätze bei Transfektionen mit Lipofectamine™2000

Kulturgefäß	Zellzahl	Lipofectamine™2000 (µl)	DNA (µg)	Opti-MEM (µl)
12-Vertiefung	1x10 ⁵	2	1	100
6-Vertiefung	2x10 ⁵	5	2-4	250
10 cm Schale	2x10 ⁶	25	15-20	1500

Die DNA und das Lipofectamine™2000 wurden getrennt in dem jeweils angegebenen Volumen Opti-MEM verdünnt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Um in allen Ansätzen die gleiche Menge DNA sicherzustellen, wurde jeweils die entsprechende Menge des parentalen Vektors (Leervektor) zugegeben. Danach wurden beide Ansätze vereinigt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Kulturmedium (DMEM ohne Antibiotika) erneuert. Anschließend wurde der Transfektionsmix auf die Zellen gegeben und für 6h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurde das alte Medium entfernt, neues Kulturmedium mit Antibiotika zugegeben und weiter bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Ernte erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten.

4.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Für Untersuchungen auf Einzelzellebene wurden indirekte Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Hierzu wurden die verwendeten Zellen auf Deckgläsern in Kulturplatten mit 12 Vertiefungen wie unter 4.4.1 und 4.4.4 beschrieben ausgesät und mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert, oder mit Virus infiziert (siehe 4.5.1). Zur Fixierung wurden die Zellen zuerst 2x mit PBS gewaschen und anschließend für 30min in 3% (w/v) Paraformaldehyd inkubiert. Danach wurden die Zellen über einen Zeitraum von 15min 3x mit PBS gewaschen. Im zweiten Waschschrift wurde dem PBS zur Reduzierung der Eigenfluoreszenz des Paraformaldehyds Glyzin (Endkonzentration 100 mM) zugesetzt. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden die Zellen 4min mit 0,1% (v/v) TritonX-100 in PBS inkubiert und daraufhin 2x für 5min mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Zellen 30min in 1% (w/v) BSA in PBS inkubiert. Zur Bindung der

Primärantikörper wurden die entsprechend verdünnten Antikörper als Tropfen (ca. 50 μ l) auf Parafilm pipettiert, das Deckglas mit den Zellen nach unten auf den Tropfen gelegt und für 30min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x für 5min mit PBS gewaschen. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten und gegen die primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörper wurden entsprechend verdünnt und auf die gleiche Art wie die Primärantikörper für 30min mit den Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut 3x mit PBS gewaschen. Zur Färbung der zellulären DNA wurden die Farbstoffe DRAQ5 und Hoechst33258 in PBS verdünnt und in gleicher Weise wie die Antikörper für 10min mit den Zellen inkubiert. Ohne einen weiteren Waschritt wurden die Zellen mit Elvanol auf Objektträgern fixiert und über Nacht getrocknet. Die Analyse erfolgte an einem konfokalen *Laser-Scanning* Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss, Jena). Für die Bildbearbeitung wurde Adobe Photoshop 6.0 (Adobe, München) verwendet.

4.5 Virale Infektion von Zellen

4.5.1 Infektion von VERO-Zellen mit HSV-2

Zur Virusinfektion wurden 1×10^5 pro 12-Vertiefung, 2×10^5 pro 6-Vertiefung oder 1×10^6 pro 10 cm Schale VERO-Zellen in Kulturmedium am Vorabend ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Kulturmedium erneuert und die angegebene Menge Virus zupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Überstand vorsichtig entfernt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und frisches Kulturmedium zugegeben. Die Ernte der Zellen erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Zur Inaktivierung des Virus wurden Zellen, welche für Immunfluoreszenzanalysen verwendet wurden, mit 3% (w/v) Paraformaldehyd fixiert.

4.5.2 Infektion von VERO-Zellen mit HSV-2 zur Virusproduktion

Zur Virusproduktion wurden VERO-Zellen am Vorabend in einer 25 cm² Zellkulturflasche in Kulturmedium so ausgesät, dass am nächsten Tag ein konfluenten Zellrasen gewachsen war. Das Kulturmedium wurde entfernt, 200 μ l Virusüberstand zugegeben und für 1h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde 5 ml Kulturmedium zugegeben und weiter bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis alle Zellen vollständig lysiert waren (ca. 24h). Der gesamte Überstand wurde in eine 75 cm² Zellkulturflasche, mit einem konfluenten VERO-Zellrasen und weiteren

5 ml Kulturmedium überführt und so lange bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis die Zellen vollständig lysiert waren. Der gesamte Überstand wurde auf mehrere 175 cm² Zellkulturflaschen mit konfluentem VERO-Zellrasen aufgeteilt, 10 ml Kulturmedium pro 175 cm² Zellkulturflasche zugegeben und wieder so lange inkubiert, bis die Zellen lysiert waren. Der Überstand, welcher die infektiösen Viren enthielt, wurde abgenommen, bei 350 x g und Raumtemperatur für 5min zentrifugiert und anschließend, um Zellreste zu entfernen, durch einen 0,2 µm Einwegfilter steril filtriert. Zur Aufbewahrung wurde der Virusüberstand in Cryotubes zu 1 ml aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

4.5.3 Titration von HSV-2 Virusüberstand mittels Plaqueassay

Zur Titration von HSV-2 Virusüberständen wurde ein Plaqueassay verwendet. Hierzu wurden in Kulturplatten mit 12 Vertiefungen VERO-Zellen ausgesät und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Der Virusüberstand wurde in einer Verdünnungsreihe von 10⁰ bis 10⁸ verdünnt. Anschließend wurden pro Verdünnung drei 12-Vertiefungen infiziert. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ solange inkubiert, bis durch die Infektion in einer entsprechenden Verdünnung eindeutige Plaques im Zellrasen zu beobachten waren. Die Plaques wurden gezählt und aus den drei Ansätzen der Mittelwert gebildet, ein Plaque entsprach dabei einem Viruspartikel. Über die Verdünnung ließ sich die Virusmenge (*pfu: plaque forming unit*) pro Milliliter errechnen.

4.5.4 Transduktion von VERO-Zellen mit rekombinanten Lentiviren für RNAi

Zur Transduktion von VERO-Zellen mit rekombinanten Lentiviren, welche siRNAs gegen Siah-1 spezifische mRNA exprimierten, wurden am Vorabend 2x10⁵ VERO-Zellen in Kulturplatten mit 6 Vertiefungen in Kulturmedium ausgesät. Vor der Transduktion wurde das Medium entfernt und pro Vertiefung 500 ng Lentivirus in 1 ml Kulturmedium zugegeben. Zur Erhöhung der Transduktionsrate wurde 8 µg/ml Polybren zugesetzt. Um das Virus an die Zellen zu adhären, wurden die Zellen bei 800 x g für 90min bei Raumtemperatur zentrifugiert und für 2h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Virusüberstand abgenommen und durch 2 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Bis zur Durchführung weiterer Experimente wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

4.6 Proteinmethoden

4.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde mit Hilfe des Bradford-Reagenz bestimmt. Hierzu wurden 2 µl Zelllysate in 800 µl Wasser verdünnt und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubation von 5min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Nullwert wurde anstelle des Zelllysates der entsprechende Lysispuffer eingesetzt. Aus der gemessenen Absorption wurde anhand einer vorher erstellten BSA-Eichgerade die jeweilige Proteinkonzentration ermittelt.

4.6.2 Trennung von Proteinen mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Das Herstellen der Gele erfolgte in Mini-Protean Gelkammern der Firma Biorad (München) entsprechend den Angaben unter 3.14. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 20 mA pro Gel.

4.6.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Färbung der Gele erfolgte mindestens 5min unter leichtem Schütteln in der Coomassie-Färbelösung. Anschließend wurden die gefärbten Gele mehrmals mit Gel-fixierlösung behandelt und schließlich für 1h mit Wärme auf einem Gelrockner getrocknet.

4.6.4 Western Blot

Die Expression von endogenen oder überexprimierten Proteinen wurde mit Hilfe von Westernblotanalysen nachgewiesen. Zur Probenvorbereitung wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und in RIPA-Puffer lysiert. Um die Lyse zu vervollständigen, wurden die Zellen 20sek im Ultraschallgerät (Branson Sonifier B-12, Danbury, CT) sonifiziert und anschließend die Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz (siehe 4.6.1) bestimmt. Die Lysate wurden nun mit 0,2 Volumen 5x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10min bei 95°C erhitzt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden 30 µg Gesamtproteinextrakt pro Ansatz eingesetzt. Die Proteine wurden wie unter 4.6.2 beschrieben elektrophoretisch getrennt und anschließend durch Semi-Dry-Blot (Biorad, München) auf eine Protran[®] Nitrocellulosemembran

übertragen. Diese wurde zum Absättigen unspezifischer Bindungen für mindestens 1h in 5% (w/v) Milchpulver in TBST geschwenkt. Die Primärantikörper wurden in 5% (w/v) Milchpulver in TBST verdünnt und über Nacht mit der Membran bei 4°C unter leichtem Wiegen inkubiert. Die Membran wurde 3x 20min mit TBST gewaschen und anschließend mit den Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern, die vorher in 5% (w/v) Milchpulver in TBST verdünnt wurden, für 2h unter leichtem Wiegen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran 3x 20min mit TBST gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurden die beiden ECL-Entwicklerlösungen 1:1 gemischt und 1min mit der Membran inkubiert. Nach dem Trockentupfen auf Whatman-Papier wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien positioniert und ein Röntgenfilm aufgelegt. Der Film wurde nach entsprechender Exposition entwickelt.

4.6.5 Koimmunpräzipitation aus Gesamtzellextrakt

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* wurden Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Bei dieser Methode wird das zu untersuchende Protein mit dessen gebundenen Interaktionspartnern unter nativen Bedingungen mit einem entsprechenden Antikörper präzipitiert.

Hierzu wurden 293T-Zellen wie unter 4.4.1 beschrieben transfiziert und 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Zellyse wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend in 600 µl IP-Lysepuffer aufgenommen und resuspendiert. Nach 30min Inkubation auf Eis wurden die unlöslichen Bestandteile 15min bei 20.000 x g und 4°C pelletiert und der Überstand (Lysat), welcher die zu untersuchenden Proteinkomplexe enthielt, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Ein Aliquot des Überstandes und das Zellpellet wurden mit entsprechenden Mengen 5x SDS-Probenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Protein-G-Sepharose wurde zur Äquilibration 2x mit IP-Waschpuffer gewaschen und jeweils 1min bei 100 x g und 4°C sedimentiert. Um die Bindung von unspezifischen Proteinen an die Protein-G-Sepharose zu vermindern, wurde das Zelllysate mit 20 µl gewaschener Protein-G-Sepharose 1h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert (*Preclearing*). Die Protein-G-Sepharose wurde bei 100 x g und 4°C für 1min zentrifugiert und der Überstand auf zwei frische Reaktionsgefäße aufgeteilt. Es wurde entweder 5 µg spezifischer Antikörper oder zur Kontrolle 5 µg des entsprechenden Immunglobulins zugegeben. Außerdem wurden zu beiden Ansätzen jeweils 20 µl gewaschene Protein-G-Sepharose pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation von mindestens 2h bei 4°C auf dem Drehrad. Zur Entfernung

ungebundener Proteine und überschüssiger Antikörper wurde die Protein-G-Sepharose mit den gebundenen Immunkomplexen 3x mit IP-Waschpuffer gewaschen. Dazu wurde jeweils 1 ml IP-Waschpuffer auf die Protein-G-Sepharose pipettiert, vorsichtig durch Invertieren der Reaktionsgefäße gewaschen und 1min bei 100 x g und 4°C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand vollständig abgenommen und die Proteinkomplexe, die über die Antikörper an die Protein-G-Sepharose gebunden waren, mit 50 µl SDS-Probenpuffer versetzt. Die Dissoziation der Immunkomplexe erfolgte für 10min bei 95°C. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE (siehe 4.6.2) und Westernblot (siehe 4.6.4) analysiert.

4.6.6 Bestimmung der Proteinstabilität durch [³⁵S]-Markierung und Immunpräzipitation (*Pulse-Chase*)

Die Stabilität von Proteinen wurde durch Markierung mit radioaktiven Aminosäuren und anschließender Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antikörper untersucht. Hierzu wurden 293T-Zellen wie unter 4.4.1 beschrieben in 10 cm Schalen transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen 1x mit Markierungsmedium gewaschen und anschließend mit 4 ml Markierungsmedium für 1h bei 37°C und 5% CO₂ ausgehungert, um den intrazellulären Cystein- und Methioninvorrat zu depletieren. Dann wurde für 30min 200 µCi TRAN³⁵S-LABEL™ (Mischung aus [³⁵S]-markiertem Cystein und Methionin) pro Ansatz zugesetzt und bei 37°C und 5% CO₂ weiter inkubiert. Daraufhin wurde das radioaktive Medium von den Kulturen entfernt, 1x mit Kulturmedium gewaschen und 5 ml frisches Kulturmedium zugegeben. Die metabolisch markierten Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten 2x mit PBS gewaschen und für die Immunpräzipitation in 400 µl IP-Lysepuffer aufgenommen und resuspendiert. Die Lyse und das *Preclearing* erfolgt wie unter 4.6.5 angegeben. Bevor die Inkubation der markierten Proteine mit den spezifischen Antikörpern erfolgte, wurde die Gesamtproteinkonzentration bestimmt (siehe 4.6.1). Gleiche Mengen Gesamtprotein wurden anschließend mit 10 µg spezifischen Antikörpers versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Zur Präzipitation der an die Antikörper gebundenen markierten Proteine wurden 20 µl gewaschene Protein-G-Sepharose zugegeben. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde 10% (v/v) IgG-freies Serum (PGS-depletiert) zupipettiert. Es folgte eine weitere Inkubation von 2h bei 4°C auf dem Drehrad. Die über Antikörper an die Protein-G-Sepharose gebundenen markierten Proteine wurden wie unter 4.6.5 beschrieben gewaschen und für SDS-PAGE vorbereitet. Nach der Gelelektrophorese wurden die SDS-Gele in Coomassielösung für 30min gefärbt und anschließend mit Gelfixierlösung entfärbt. Zur

Verstärkung des radioaktiven Signals wurde das SDS-Gel für 30min bei Raumtemperatur in Szintillationslösung (Amplify) gehalten, danach 1x mit Wasser gespült und für 30min auf einem Gelrockner getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte bei -80°C . Die Auswertung der Autoradiographie wurde in einem Fujifilm BAS-2500 Phosphoimager (Raytest, Straubenhardt) mit anschließender Analyse mit Hilfe der AIDA Software (Raytest, Straubenhardt) durchgeführt.

5 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurden FLAG- und Hämagglutinin (HA)- Fusionskonstrukte verwendet. Bei FLAG und HA handelt es sich um Epitope, welche aus kurzen Aminosäuresequenzen bestehen (FLAG: GGDYKDDDDK, HA: YPYDVPDYA), die unter Aufrechterhaltung des Leserahmens zusammen mit den entsprechenden Proteinen exprimiert wurden. Diese Epitope konnten in den durchgeführten Experimenten unter Verwendung geeigneter Antikörper detektiert werden, wodurch der Nachweis der Fusionskonstrukte ermöglicht wurde.

5.1 Abbau von PML durch HSV-2 ICP0

Die bisherigen Untersuchungen zum Abbau von PML durch ICP0 wurden hauptsächlich für das Herpes Simplex Virus Typ 1 ICP0-Protein durchgeführt (Muller und Dejean, 1999; Maul und Everett, 1994; Everett et al., 1998a). Eine weitere Publikation identifizierte ICP0-Homologe anderer α -Herpesviren, welche die Fähigkeit besitzen, PML zu degradieren, wobei das ICP0-Homolog von HSV-2 in dieser Studie nicht mit untersucht wurde (Parkinson und Everett, 2001).

Demzufolge sollte in dieser Arbeit zunächst untersucht werden, ob auch Herpes Simplex Virus Typ 2 ICP0 in der Lage ist, zelluläres PML abzubauen. Hierzu wurde HSV-2 ICP0 in HeLa-Zellen überexprimiert, und der Einfluss auf endogenes PML mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse unter Verwendung eines α -PML Antikörpers untersucht (siehe Abbildung 10 A-C). Transfiziertes ICP0 lokalisierte ebenso wie PML in punktförmigen Zellkerndomänen, welche als PML-Kerndomänen bekannt sind. In Zellen, welche ICP0 exprimierten, konnte im Gegensatz zu untransfizierten Zellen kein endogenes PML nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass auch HSV-2 ICP0 in der Lage ist, PML zu degradieren.

Als nächstes wurde untersucht, ob der PML-Abbau abhängig von der Lokalisation von ICP0 im Zellkern war. Dazu wurde eine Mutante von ICP0 verwendet (ICP0 Δ NLS), bei der das Kernlokalisierungssignal (NLS, Aminosäuren an Position 510-521) deletiert wurde, und die somit ausschließlich im Zytoplasma lokalisierte (siehe Abbildung 10D). Diese Mutante wurde in HeLa-Zellen überexprimiert, und der Einfluss auf endogenes PML mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse bestimmt (siehe Abbildung D-F). Trotz Lokalisation in

unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle war in ICP0 Δ NLS transfizierten Zellen keine PML-Expression zu detektieren.

Der Abbau von PML durch HSV-1 ICP0 ist abhängig von der RING-Domäne des viralen Proteins (Everett und Maul, 1994; Everett et al., 1998a; Everett et al., 1995; Maul und Everett, 1994). Um zu testen, ob auch die HSV-2 ICP0 RING-Domäne eine Rolle beim Abbau von PML spielt, wurde eine ICP0 Δ RING-Mutante verwendet, aus der die RING-Domäne (Aminosäurepositionen 126-166) entfernt worden war. ICP0 Δ RING wurde in HeLa-Zellen überexprimiert und erneut der Einfluss auf die endogene PML-Expression in der indirekten Immunfluoreszenz analysiert (siehe Abbildung 10 G-I). ICP0 Δ RING lokalisierte wie der ICP0-Wildtyp in PML-Kerndomänen. In ICP0 Δ RING transfizierten Zellen konnte die Expression von endogenem PML nachgewiesen werden. Außerdem ließ sich eine Kolokalisation zwischen PML und ICP0 Δ RING in diesen Kerndomänen beobachten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass auch bei HSV-2 ICP0 die RING-Domäne für den PML-Abbau verantwortlich ist.

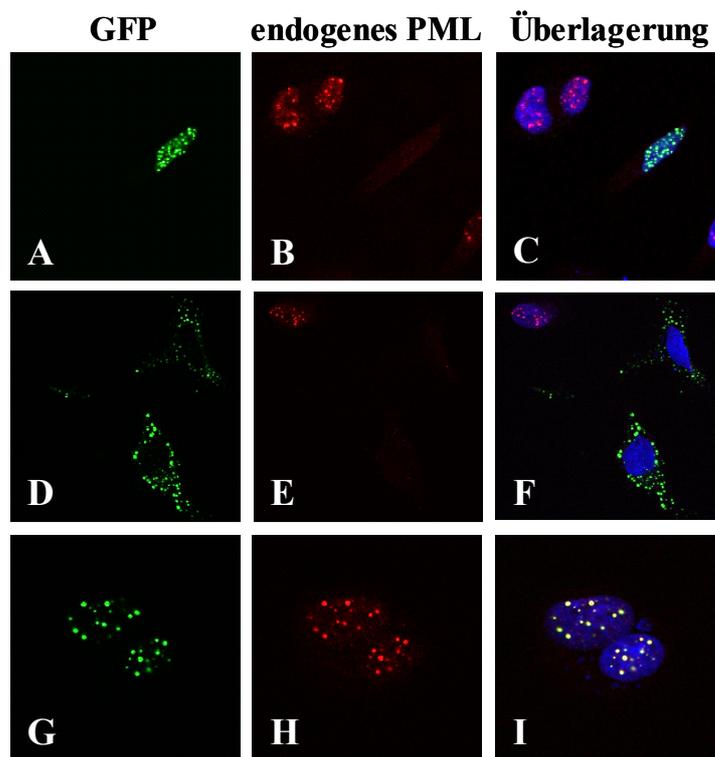


Abbildung 10: Einfluss von HSV-2 ICP0 und ICP0-Mutanten auf die Expression von endogenem PML. HSV-2 ICP0 Wildtyp (A-C), ICP0 Δ NLS (D-F) und ICP0 Δ RING (G-I) wurden in HeLa-Zellen als GFP-Fusionskonstrukte überexprimiert. Nach 24h wurde endogenes PML mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzanalyse unter Verwendung eines α -PML Antikörpers und eines Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpers nachgewiesen (rot). Die Expression von ICP0 und ICP0-Mutanten konnte durch die Autofluoreszenz des GFP sichtbar gemacht werden (grün). Die Zellkerne wurden in der Überlagerung durch die Färbung der nukleären DNA mit dem Farbstoff DRAQ5 (blau) nachgewiesen.

Da die Eigenschaften von ICP0 Zelltyp-abhängig sind (Yao und Schaffer, 1995), wurde der Abbau von PML durch HSV-2 ICP0 in unterschiedlichen Zelllinien mittels Westernblotanalysen verifiziert. Hierzu wurde PML allein oder zusammen mit ICP0 in VERO-, 293T- und HeLa-Zellen überexprimiert und die PML-Expression verglichen. Ebenso wurden die ICP0 Δ NLS- und ICP0 Δ RING-Mutanten auf die Fähigkeit, PML zu degradieren, getestet (siehe Abbildung 11). In allen Zelllinien war eine deutliche Abnahme der PML-Expression in Anwesenheit von ICP0 und ICP0 Δ NLS zu beobachten. Wie in den indirekten Immunfluoreszenzanalysen war ICP0 Δ RING nicht mehr in der Lage, die PML-Expression zu beeinflussen.

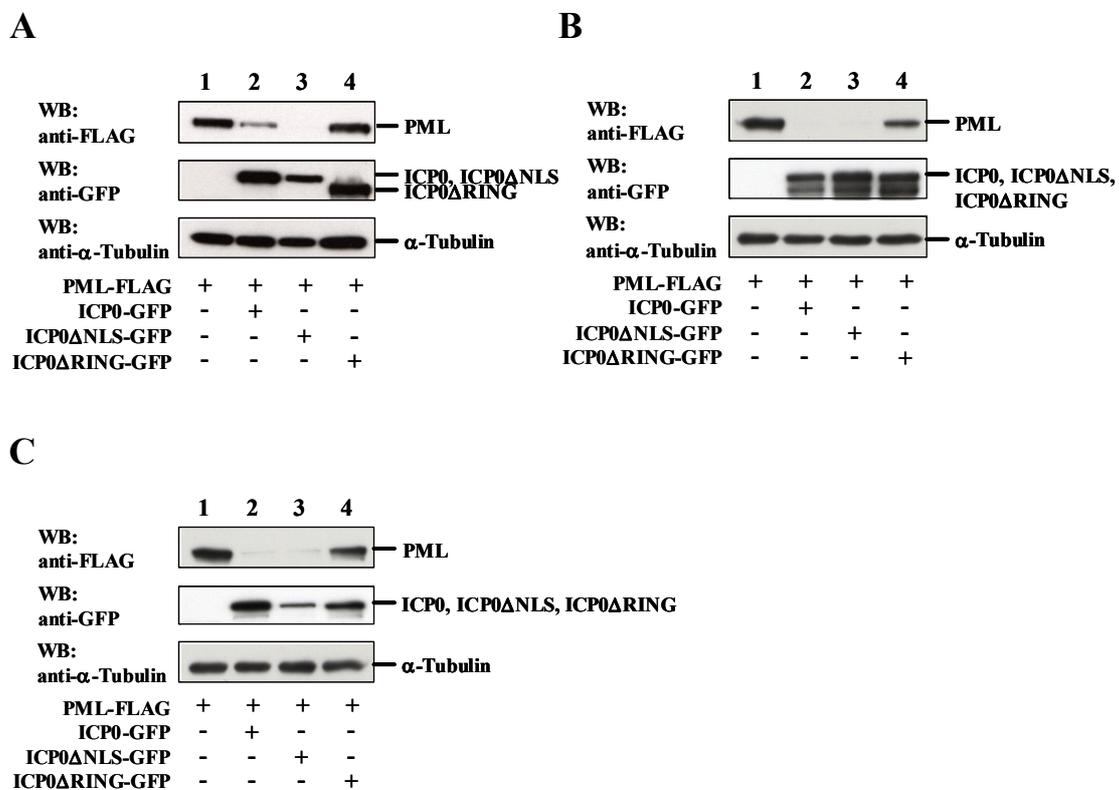
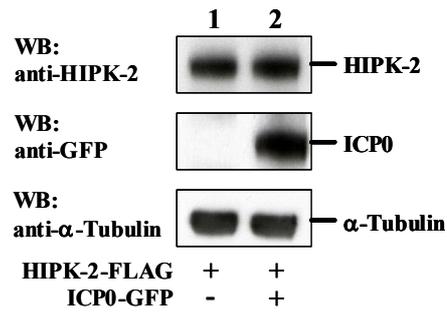


Abbildung 11: Einfluss von HSV-2 ICP0 und ICP0-Mutanten auf die Expression von PML in unterschiedlichen Zelllinien. In VERO- (A), 293T- (B) und HeLa-Zellen (C) wurde PML-FLAG allein (Spur 1), oder zusammen mit GFP-Fusionskonstrukten für ICP0-Wildtyp (Spur 2), ICP0 Δ NLS (Spur 3) oder ICP0 Δ RING (Spur 4) überexprimiert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und die Expression der jeweiligen Proteine in Westernblotanalysen mit den angegebenen Antikörpern untersucht. Der Nachweis von α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

5.2 Einfluss von HSV-2 ICP0 auf HIPK-2 (*Homeodomain-Interacting Protein Kinase-2*)

Bei HIPK-2 handelt es sich um eine zelluläre Kinase, welche unter anderem p53 während der UV-induzierten Apoptose phosphoryliert, und somit die p53-abhängige Genexpression aktiviert (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002). Wie PML wird HIPK-2 SUMO-1-modifiziert (Kim et al., 1999) und lokalisiert in punktförmigen Strukturen im Zellkern, welche teilweise mit PML-Kerndomänen überlappen (Trost et al., 2000; Engelhardt et al., 2001). Dort hat HIPK-2 Einfluss auf die Verteilung des PML-Proteins, in dem es die posttranslationalen SUMO-1 Modifikationen von PML verändert (Engelhardt et al., 2003). Da ICP0 während der frühen Infektion mit PML-Kerndomänen kolokalisiert und daraufhin den Abbau von SUMO-1 modifizierten Komponenten der PML-Kerndomänen wie PML und Sp100 vermittelt (Muller und Dejean, 1999; Chelbi-Alix und de The, 1999; Everett und Maul, 1994), war von Interesse zu untersuchen, ob ICP0 einen Einfluss auf einen weiteren SUMO-1 modifizierte Bestandteil der PML-Kerndomänen, dem HIPK-2-Protein, hat. Zur Beantwortung dieser Frage wurden HIPK-2 allein oder zusammen mit ICP0 in HeLa- oder U2OS-Zellen überexprimiert, und die Expression von HIPK-2 in Westernblotanalysen (siehe Abbildung 12A) und auf Einzelzellebene mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie (siehe Abbildung 12B) analysiert. Wie aus den Abbildungen ersichtlich ist, ließ sich in beiden Experimenten kein Unterschied in der HIPK-2-Expression oder Lokalisation durch Koexpression von ICP0 beobachten. HIPK-2 lokalisierte diffus im Zytoplasma und ebenso wie ICP0 in punktierten Strukturen im Zellkern, wobei keine Kolokalisation nachweisbar war.

A



B

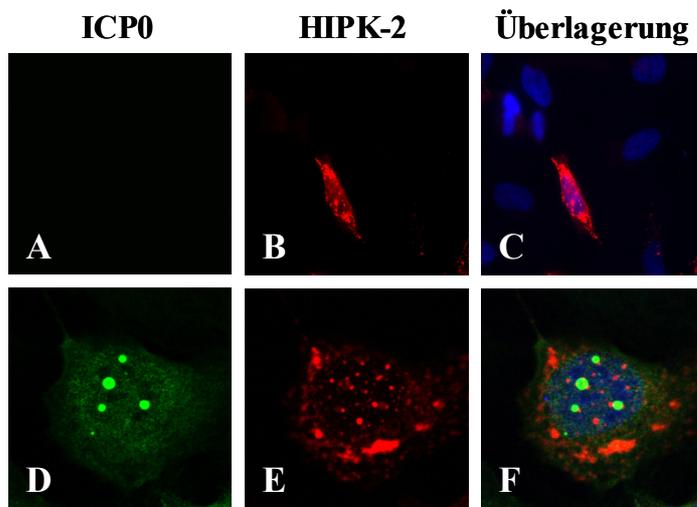


Abbildung 12: Einfluss von HSV-2 ICP0 auf das zelluläre HIPK-2-Protein. (A) HIPK-2 wurde als FLAG-Fusionskonstrukt allein (Spur 1) oder zusammen mit HSV-2 ICP0-GFP (Spur 2) in U2OS-Zellen überexprimiert. Nach 48h wurden die Zellysate durch SDS-PAGE und Westernblotexperimente unter Verwendung der angegebenen Antikörper analysiert. Der Nachweis von α -Tubulin diene als Ladekontrolle. (B) HeLa-Zellen wurden mit HIPK-2-RFP allein (A-C) oder zusammen mit HSV-2 ICP0-GFP (D-F) transient transfiziert. Nach 24h wurde die Expression und Lokalisation der Proteine durch Detektion der Autofluoreszenz (ICP0 grün, HIPK-2 rot) mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie analysiert. Die nukleäre DNA wurde durch DRAQ5-Färbung (blau) sichtbar gemacht.

5.3 Interaktion von HSV-2 ICP0 mit Siah-1 (*Drosophila Seven in absentia homologue-1*)

Das zelluläre Protein Siah-1 gehört zur Familie der RING-Finger-E3-Ligasen (Hu und Fearon, 1999). Durch die Ubiquitin-Proteasomen-vermittelte Degradation zahlreicher verschiedener Substrate, nimmt Siah-1 entscheidenden Einfluss auf vielfältige zelluläre Prozesse (Liu et al., 2001; Susini et al., 2001; Hu et al., 1997b; Germani et al., 2003; Wheeler et al., 2002; Venables et al., 2004; Nagano et al., 2003; Germani et al., 2000; Kim et al., 2004; Tiedt et al., 2001).

In einer Veröffentlichung von Fanelli et al. (2004) wurde eine Interaktion von PML und der E3-Ligase Siah-1 beschrieben, wobei PML als direktes Substrat von Siah-1 abgebaut wurde. Obwohl ICP0 auch E3-Ligasefunktion besitzt, konnte bis heute keine direkte Interaktion mit PML und auch keine direkte Ubiquitinylierung von PML durch ICP0 gezeigt werden (Boutell et al., 2003). Es erscheint deshalb sehr wahrscheinlich, dass weitere Faktoren an der ICP0-vermittelten Degradation von PML beteiligt sind. Auf Grund dieser Veröffentlichung wurde die These aufgestellt, dass Siah-1 als spezifische E3-Ligase von PML eine Rolle beim ICP0-vermittelten Abbau von PML spielen kann.

Um diesen möglichen Zusammenhang zwischen Siah-1 und dem ICP0-vermittelten PML-Abbau näher zu charakterisieren, wurde zunächst mittels Koimmunpräzipitationsstudien untersucht, ob eine Interaktion von Siah-1 und HSV-2 ICP0 stattfindet. HA-Siah-1 und ICP0-FLAG wurden hierzu in 293T-Zellen überexprimiert, und ICP0 anschließend mit einem α -FLAG Antikörper aus den Zelllysaten präzipitiert. In der nachfolgenden Analyse der Präzipitate im Immunblot konnte eine deutliche Expression von kopräzipitiertem Siah-1 detektiert werden (siehe Abbildung 13A). Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde in umgekehrter Weise HA-Siah-1 aus HA-Siah-1 und ICP0-FLAG transfizierten 293T-Zellen mit einem α -HA Antikörper präzipitiert. Siah-1 ist ein sehr instabiles Protein, welches Proteasomen-abhängig autodegradiert wird (Hu und Fearon, 1999). Um eine für die Kopräzipitation ausreichende Expression von Siah-1 zu gewährleisten, war es nötig diese Ansätze 12h vor der Ernte mit 20 μ M Proteasomeninhibitor MG132 zu behandeln. Mit dieser Versuchsanordnung konnte ICP0 mit Siah-1 kopräzipitiert werden (siehe Abbildung 13B). In einem weiteren Experiment wurde endogenes Siah-1 mit transfiziertem ICP0-FLAG kopräzipitiert (siehe Abbildung 13C). Zur Stabilisierung des endogenen Siah-1 wurden die Ansätze in gleicher Weise, wie oben beschrieben, mit MG132 behandelt. In den jeweiligen Kontrollexperimenten, in denen statt des spezifischen Antikörpers IgG eingesetzt wurde,

konnten kein ICP0 oder Siah-1 präzipitiert werden, was auf eine spezifische Interaktion zwischen Siah-1 und ICP0 hindeutete.

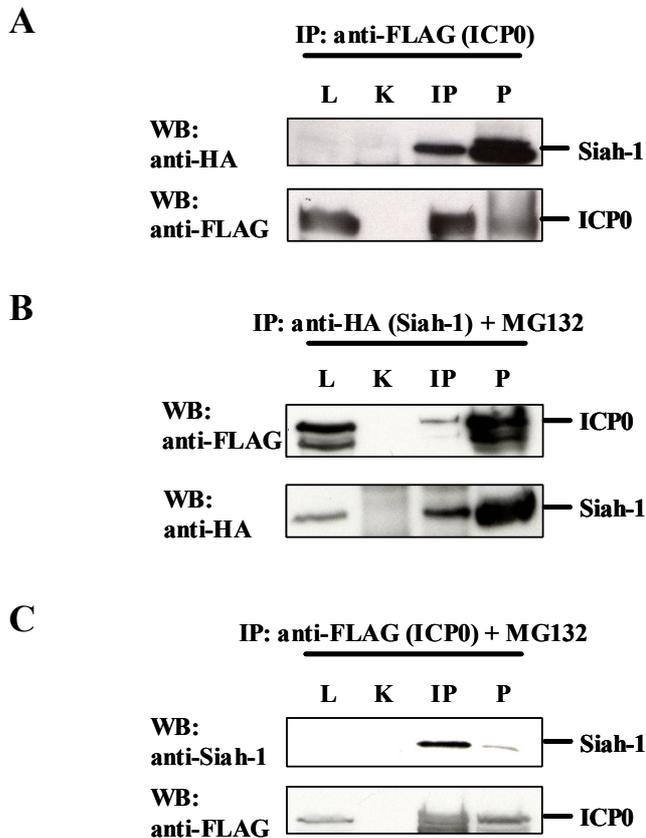


Abbildung 13: Interaktion zwischen HSV-2 ICP0 und zellulärem Siah-1. (A) 293T-Zellen wurden mit Fusionskonstrukten für ICP0-FLAG und HA-Siah-1 transient transfiziert. Nach 24h wurde ICP0-FLAG aus den Zelllysaten mittels α -FLAG Antikörper präzipitiert (IP). Um die Spezifität des Antikörpers zu gewährleisten wurde als Kontrolle das Zelllysate in gleicher Weise mit IgG behandelt (K). Präzipitiertes ICP0 wurde mittels Westernblotanalysen mit einem α -FLAG Antikörper detektiert. Die Analyse von kopräzipitiertem Siah-1 erfolgte im Immunblot unter Verwendung eines α -HA Antikörpers. Als Kontrolle der Effizienz der Immunpräzipitation wurden 10% des Zelllysates (L) und 10% der pelletierten unlöslichen Bestandteile des Zelllysates (P) in gleicher Weise im Westernblot analysiert. (B) In 293T-Zellen wurden Fusionskonstrukte für ICP0-FLAG und HA-Siah-1 überexprimiert. Um eine ausreichend starke Expression des instabilen Siah-1 zu gewährleisten, wurden die Ansätze 12h vor der Ernte mit 20 μ M des Proteasomen-inhibitors MG132 behandelt. HA-Siah-1 wurde mit einem α -HA Antikörper präzipitiert (IP), als Kontrolle diente wie unter A beschrieben IgG (K). Die Westernblotanalysen und Kontrollen erfolgten ebenso wie unter A beschrieben. (C) Das Fusionskonstrukt ICP0-FLAG wurde in 293T-Zellen überexprimiert und die Zellen in gleicher Weise wie unter B beschrieben mit MG132 behandelt. ICP0-FLAG wurde mit einem α -FLAG Antikörper aus den Zelllysaten präzipitiert (IP) und im Westernblot nachgewiesen. Kopräzipitiertes endogenes Siah-1 wurde mit einem α -Siah-1 Antikörper detektiert. Es wurden die gleichen Kontrollen wie unter A beschrieben eingesetzt.

5.4 Charakterisierung der Interaktion von HSV-2 ICP0 und Siah-1

Identifizierung der Siah-1-Interaktionsdomäne von ICP0

Für die Charakterisierung der ICP0-Domäne, welche verantwortlich für die Interaktion mit Siah-1 ist, wurden ICP0-Deletionsmutanten konstruiert (siehe Abbildung 7), wobei alle Mutanten ein FLAG-Epitop enthielten. Diese ICP0-Mutanten wurden in Koimmunpräzitationsstudien auf ihre Fähigkeit, mit Siah-1 zu interagieren, getestet. Hierzu wurden in 293T-Zellen die jeweiligen ICP0-Mutanten und HA-Siah-1 überexprimiert und die ICP0-Mutanten mit einem α -FLAG Antikörper aus den Zelllysaten präzipitiert. Komplexiertes Siah-1 wurde in anschließenden Westernblotanalysen detektiert (siehe Abbildung 14A). Wie aus den Abbildungen zu entnehmen ist, fand nur eine Interaktion von Siah-1 mit ICP0-Mutanten statt, welche den Aminosäurebereich 182-490 enthielten (Übersicht siehe Abbildung 19). Dieser Bereich scheint für die Komplexbildung mit Siah-1 verantwortlich und auch ausreichend zu sein. Eine Ausnahme machten die ICP0-Mutanten ICP0 Δ 183-352 und ICP0 Δ 354-489, welche eine Bindung mit Siah-1 vermitteln konnten, obwohl sie jeweils nur einen Teil der Aminosäuren an Position 182-490 exprimierten. Um auszuschließen, dass Siah-1 mit dem FLAG-Epitop von ICP0 oder der ICP0-Mutanten interagiert, wurde als zusätzliche Kontrolle ein unabhängiges FLAG-Konstrukt (Aufp37-FLAG) in der Koimmunpräzitation mit ICP0 getestet (siehe Abbildung 14B). Bei Aufp37 handelt es sich um ein regulatorisches Protein, welches durch RNA-Bindung die Destabilisierung dieser vermittelt (Lal et al., 2004). Für diese Experimente wurde Aufp37 als Fusionskonstrukt mit dem FLAG-Epitop verwendet. Es konnte keine Kopräzitation von ICP0 und Aufp37-FLAG beobachtet werden. Dieses Resultat bestätigte die Spezifität der Interaktion zwischen ICP0 und Siah-1. Als Interaktionsdomäne von ICP0 mit Siah-1 konnten der Aminosäurebereich 182-490 identifiziert werden.

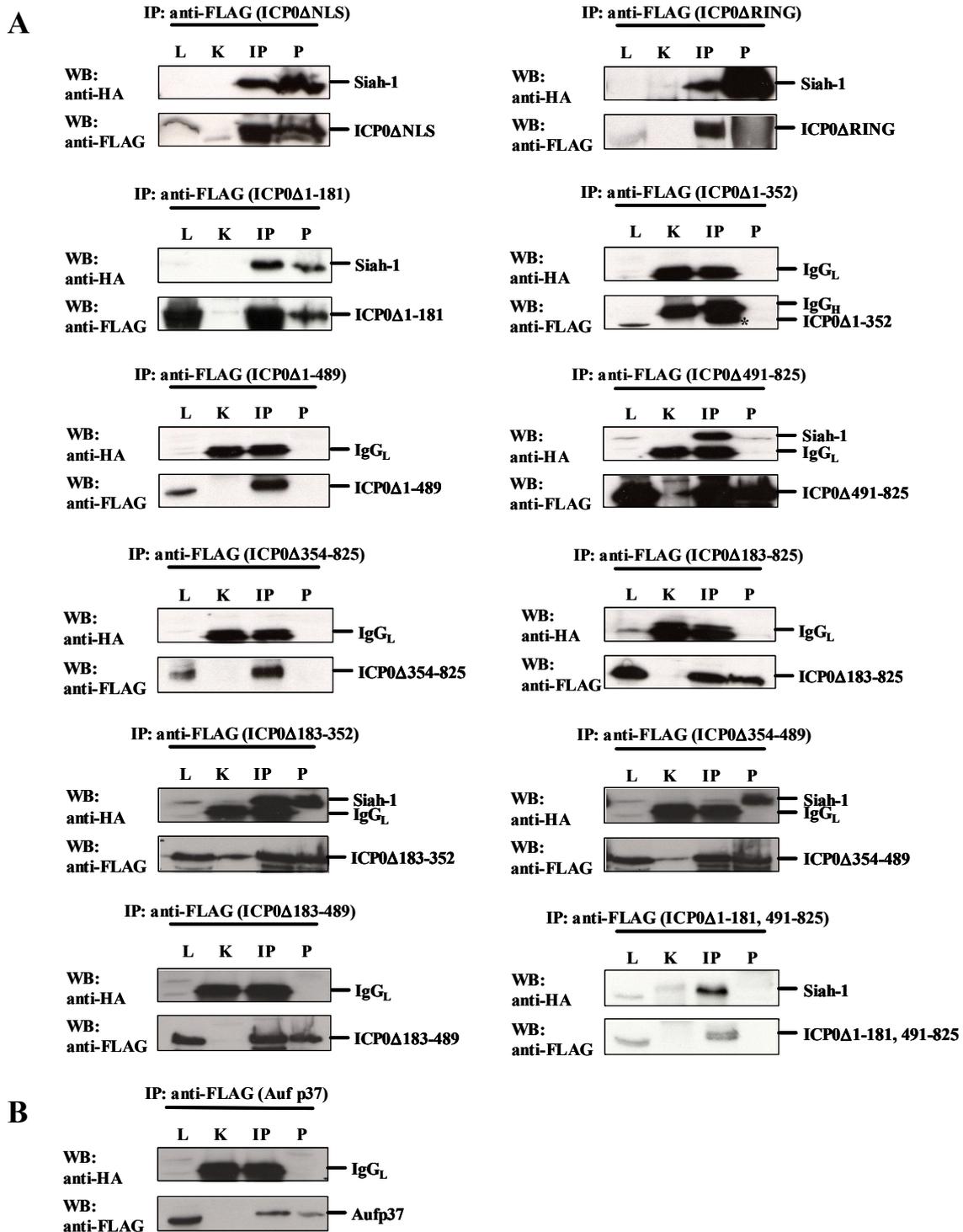


Abbildung 14: Die Aminosäuren an Position 182-490 des HSV-2 ICP0 sind essenziell für die Interaktion mit Siah-1. (A) Die angegebenen HSV-2 ICP0-Mutanten wurden als FLAG-Fusionskonstrukte mit HA-Siah-1 in 293T-Zellen überexprimiert. 24h danach wurden die ICP0-Mutanten aus dem Zelllysate mittels α -FLAG Antikörper präzipitiert (IP). Als Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers wurde das Zelllysate in gleicher Weise mit IgG behandelt (K). Präzipitierte ICP0-Mutanten wurden wie jeweils angegeben mit einem α -FLAG Antikörper, kopräzipitiertes Siah-1 mit einem α -HA Antikörper im Immunblot detektiert. Als Kontrolle der Effizienz der Immunpräzipitation wurden 10% des Zelllysates (L) und 10% der pelletierten unlöslichen Bestandteile des Zelllysates (P) in gleicher Weise im Westernblot analysiert. (B) Um unspezifische Wechselwirkungen des FLAG-Epitops auszuschließen, wurde statt der ICP0-Mutante ein unabhängiges Aufp37-FLAG Fusionskonstrukt in gleicher Weise wie oben beschrieben eingesetzt.

Identifizierung der ICP0-Interaktionsdomäne von Siah-1

Im Gegenzug sollte die Domäne von Siah-1 bestimmt werden, welche die Interaktion mit ICP0 vermittelt. Hierfür wurden drei Siah-1-Deletionsmutanten konstruiert, welche definierte Bereiche des Siah-1-Proteins in Fusion mit einem HA-Epitop exprimierten (siehe Abbildung 9). Die Mutanten wurden in Kopräzipitationsexperimenten auf ihre Fähigkeit mit ICP0 zu interagieren getestet. Hierzu wurde ICP0-FLAG zusammen mit den einzelnen Siah-1-Mutanten in 293T-Zellen überexprimiert und ICP0 mit einem α -FLAG Antikörper aus den Zelllysaten präzipitiert. Die anschließenden Immunblots (siehe Abbildung 15 A-C) zeigten, dass die beiden Siah-1-Mutanten, welche den C-Terminus des Siah-1-Proteins exprimierten, einen Komplex mit ICP0 bilden konnten. Die Siah-1-Mutante, die nur den N-terminalen Bereich von Siah-1 enthielt, konnte nicht mit ICP0 kopräzipitiert werden (Übersicht siehe Abbildung 15D). Die Ergebnisse identifizierten den C-terminalen Bereich (Aminosäuren an Position 141-282) von Siah-1 als Interaktionsdomäne mit ICP0.

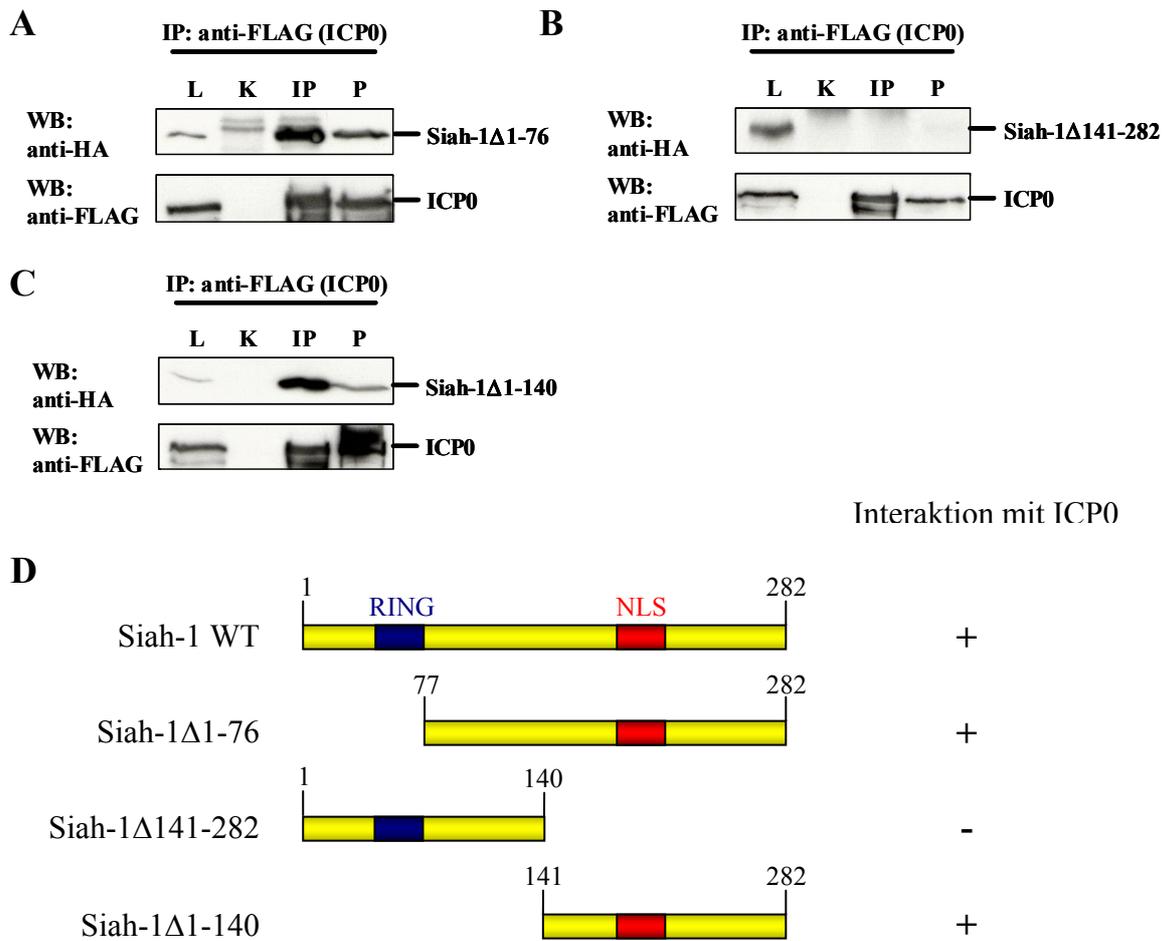


Abbildung 15: Identifizierung des Siah-1 C-Terminus als essenziell für die Interaktion mit HSV-2 ICP0. (A-C) 293T-Zellen wurden mit Fusionskonstrukten für ICP0-FLAG und HA-Siah-1-Mutanten wie angezeigt transient transfiziert. Nach 24h wurde ICP0 aus den Zelllysaten mit Hilfe eines α -FLAG Antikörpers präzipitiert (IP). Als Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers wurde ein Teil des Zelllysates in gleicher Weise mit IgG behandelt (K). Präzipitiertes ICP0 wurde im Westernblot mittels α -FLAG Antikörper detektiert. Kopräzipitierte Siah-1-Mutanten wurden unter Verwendung eines α -HA Antikörpers sichtbar gemacht. Die Effizienz der Koimmunpräzipitation wurde durch Analyse der Zelllysate (L) und der unlöslichen Bestandteile der Zelllysate (P) im jeweiligen Westernblot überprüft. (D) Schematische Darstellung der verwendeten Siah-1-Mutanten und ihre Fähigkeit, mit HSV-2 ICP0 zu interagieren. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen im jeweiligen Protein. Außerdem sind das Kernlokalisierungssignal (NLS) und die RING-Domäne angezeigt.

5.5 Stabilisierung von Siah-1 durch HSV-2 ICP0

Dosisabhängige Stabilisierung von Siah-1 durch HSV-2 ICP0

Durch die E3-Ligasefunktion von ICP0 werden verschiedene Interaktionspartner von ICP0 Proteasomen-abhängig degradiert (Everett et al., 1999a; Boutell et al., 2005). Nachdem Siah-1 hier als neuer Interaktionspartner von ICP0 identifiziert wurde, sollte der Einfluss von ICP0 auf die Siah-1-Expression untersucht werden. Hierzu wurde zunächst das Expressionsmuster von Siah-1 nach Koexpression mit ICP0 in 293T-Zellen im Westernblot analysiert (siehe Abbildung 16A). Trotz Überexpression von Siah-1 war in Abwesenheit von ICP0 kein Siah-1-Protein nachweisbar (Spur 1). Eine Erklärung für diese Tatsache könnte die starke Autodegradation von Siah-1 sein (Hu und Fearon, 1999). In Anwesenheit von ICP0 konnte kein Abbau, sondern eine deutliche Expressionssteigerung von Siah-1 beobachtet werden (vgl. Spur 1 und Spur 3). Um auszuschließen, dass eine Wirkung von ICP0 auf das HA-Epitop des Siah-1-Expressionskonstruktes die Steigerung der Siah-1-Expression veranlasste, wurde der Versuch mit einem unabhängigen HA-Konstrukt (HIV-Nef-HA) wiederholt (siehe Abbildung 16B). Das entsprechende Konstrukt exprimiert ein Fusionsprotein, das aus dem HIV-1 Nef Regulatorprotein und dem HA-Epitop besteht. Die Anwesenheit von ICP0 zeigte keinen Einfluss auf die Expression von Nef-HA. Somit konnte eine unspezifische Wechselwirkung zwischen dem Siah-1 HA-Epitop und ICP0 ausgeschlossen werden. Zur weiteren Spezifizierung wurde diese Siah-1-Stabilisierung durch ICP0 in einer anderen Zelllinie untersucht. Hierzu wurden VERO-Zellen, welche permissiv für Herpes Simplex Viren sind, mit konstanten Mengen Siah-1 und steigenden Mengen ICP0 transient kotransfiziert und die Zelllysate mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert (siehe Abbildung 16C). Es war eine konzentrationsabhängige Steigerung der Siah-1-Expression durch ICP0 zu beobachten.

ICP0 ist ein Aktivator der Genexpression (Cai und Schaffer, 1992; Chen und Silverstein, 1992; Everett, 1985). Daher galt es auszuschließen, dass ICP0 eine transaktivierende Wirkung auf den CMV Promoter, von dem Siah-1 transkribiert wurde, ausübte, und damit die Expression des Siah-1-Proteins steigerte. Für diese Kontrolle wurde das unabhängige HuR-FLAG Konstrukt verwendet, welches ebenfalls von einem CMV Promotor exprimiert wird. HuR wurde als RNA-bindendes Protein beschrieben, welches eine Funktion bei der RNA-Stabilisierung und beim RNA-Transport hat (Peng et al., 1998; Prechtel et al., 2006). Dieses Expressionsplasmid wurde mit steigenden Konzentrationen ICP0 in 293T-Zellen überexprimiert und die HuR-Expression im Westernblot analysiert (siehe Abbildung 16D). Es

ließ sich trotz steigender Mengen ICP0 kein Einfluss von ICP0 auf die Expression von HuR beobachten. Somit kam die Stabilisierung von Siah-1 durch ICP0 nicht durch Aktivierung des CMV Promotors des Siah-1-Expressionskonstruktes durch ICP0 zustande.

Auffällig im Vergleich der beiden Blots in Abbildung 16C und 16D war die unterschiedliche ICP0-Expression. Im Kontrollblot mit HuR (Abbildung 16D) zeigte ICP0 gemäß der steigenden Mengen an transfiziertem ICP0 eine steigende Expression des ICP0-Proteins. Bei Kotretransfektion mit Siah-1 konnte diese Steigerung nicht detektiert werden (Abbildung 16C). Diese Beobachtung wird in Kapitel 5.6 der vorliegenden Dissertation detailliert untersucht.

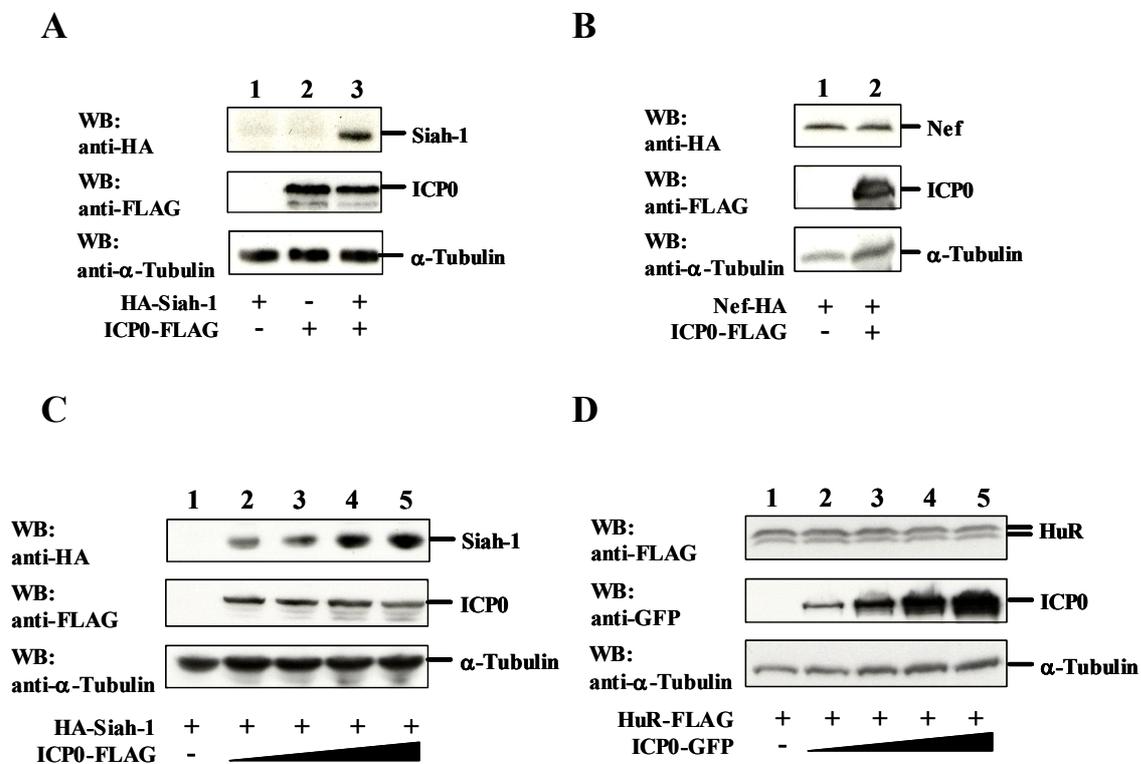


Abbildung 16: Stabilisierung von Siah-1 durch HSV-2 ICP0. (A) Fusionskonstrukte für HA-Siah-1 und ICP0-FLAG wurden allein (Spur 1 und 2) oder gemeinsam (Spur 3) in 293T-Zellen überexprimiert. 48h später wurden die Zelllysate auf die Expression von Siah-1 und ICP0 im Immunblot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. (B) Zur Kontrolle wurde das unabhängige Fusionskonstrukt Nef-HA allein (Spur 1) oder zusammen mit ICP0-FLAG (Spur 2) in 293T-Zellen überexprimiert und die Expression 48h später im Westernblot mit den angegebenen Antikörpern untersucht. (C) VERO-Zellen wurden mit konstanten Mengen des Fusionskonstruktes HA-Siah-1 und steigenden Konzentrationen ICP0-FLAG transient transfiziert (Spur 1-5). 48h später wurde die Expression in Westernblotanalysen mit den angezeigten Antikörpern detektiert. (D) Zur Kontrolle wurde das unabhängige Fusionskonstrukt HuR-FLAG mit steigenden Mengen ICP0-GFP in 293T-Zellen überexprimiert und die Expression mit den angegebenen Antikörpern im Westernblot analysiert (Spur 1-5). (A-D) Der Nachweis von α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Die Stabilisierung von Siah-1 durch ICP0 sollte auf Einzelzellebene durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen bestätigt werden. Hierzu wurden VERO-Zellen mit Siah-1 allein oder gemeinsam mit ICP0 überexprimiert, Siah-1 mit einem α -HA Antikörper nachgewiesen und die Expression mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Trotz Überexpression von Siah-1, konnte in den Ansätzen, in denen Siah-1 allein transfiziert worden war, keine spezifischen Fluoreszenzsignale für Siah-1 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17 A-C). Erst durch Inhibition der Siah-1 Autodegradation durch Behandlung der Zellen mit Proteasomeninhibitor MG132 für 12h vor der Fixierung, konnte das Protein sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 17 D-F). Siah-1 lokalisierte unter MG132 Einfluss teilweise diffus im Zellkern, hauptsächlich aber in undefinierten punktierten Strukturen im Zytoplasma, was in Übereinstimmung mit der Literatur war (Boehm et al., 2001). Nach Koexpression mit ICP0 konnte Siah-1 auch ohne Behandlung mit MG132 detektiert werden, was auf eine stabilisierende Wirkung von ICP0 auf Siah-1 schließen ließ (siehe Abbildung 17 G-I). Des Weiteren war eine Veränderung der Siah-1-Lokalisation durch den Einfluss von ICP0 zu beobachten. Die beiden Proteine kolokalisierten in punktierten subnukleären Strukturen im Zellkern, welche der ICP0 Wildtyp-Lokalisation entsprachen. Die Ergebnisse aus den Westernblotanalysen und der indirekten Immunfluoreszenz wiesen darauf hin, dass die Expression des instabilen Siah-1-Proteins durch Anwesenheit von ICP0 gesteigert werden konnte.

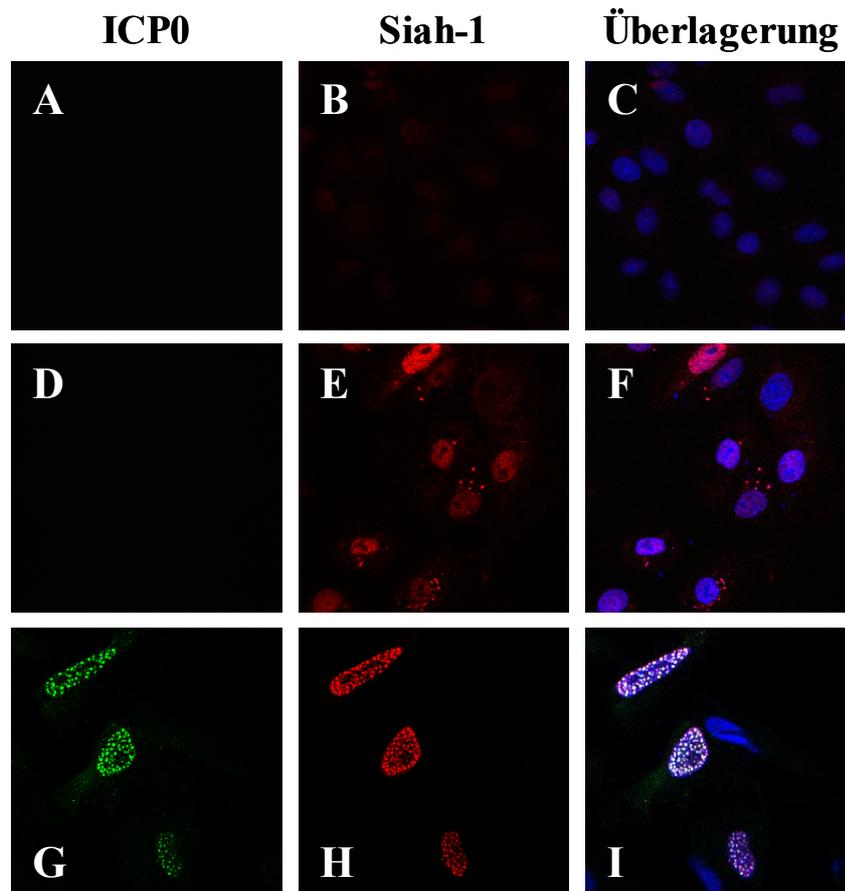


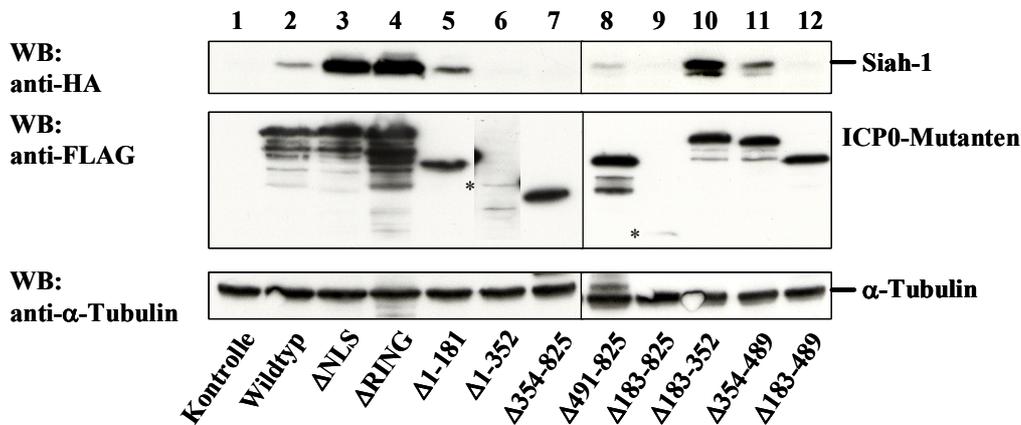
Abbildung 17: Stabilisierung und Lokalisation von Siah-1 unter dem Einfluss von MG132 oder HSV-2 ICP0. (A-C) VERO-Zellen wurden mit einem Fusionskonstrukt für HA-Siah-1 transient transfiziert. Nach 24h wurde die Expression mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse unter Verwendung eines α -HA Antikörpers sichtbar gemacht (rot). (D-F) Es wurde der gleiche Ansatz wie unter A-C beschrieben verwendet. Zusätzlich wurden die Zellen zur Stabilisierung von Siah-1, 12h vor der Fixierung mit 20 μ M des Proteasomeninhibitors MG132 behandelt. (G-I) Koexpression von HA-Siah-1 und ICP0-GFP in VERO-Zellen. HA-Siah-1 wurde 24h danach mittels α -HA Antikörper gefärbt (rot), ICP0 konnte durch die Autofluoreszenz des GFP-Epitops detektiert werden (grün). In allen Ansätzen wurde nukleäre DNA in der Überlagerung durch Färbung mit DRAQ5 (blau) sichtbar gemacht.

Charakterisierung der Stabilisierungsdomäne in ICP0

Als nächstes sollte untersucht werden, welche Domäne von ICP0 für die Stabilisierung von Siah-1 verantwortlich ist, und ob diese Stabilisierung von der Interaktion zwischen Siah-1 und ICP0 abhängig ist. Hierzu wurden ICP0-Deletionsmutanten (siehe Abbildung 7) zusammen mit Siah-1 in 293T-Zellen überexprimiert, und die Fähigkeit der ICP0-Mutanten, Siah-1 zu stabilisieren, im Westernblot analysiert (siehe Abbildung 18A). Siah-1 wurde nur von ICP0-Mutanten stabilisiert, welche vollständig die Aminosäuren an Position 182-490 exprimierten. Eine Ausnahme machten, wie bei den Interaktionsstudien (siehe 5.3), die Mutanten ICP0 Δ 183-352 und ICP0 Δ 354-489. Auch diese waren in der Lage, Siah-1 zu stabilisieren, obwohl sie nur Teile der ICP0-Region zwischen den Aminosäurepositionen 182-490 enthielten.

Zusätzlich wurde dieses Ergebnis in der indirekten Immunfluoreszenz überprüft. Hierbei wurde die ICP0 Δ 183-489-Mutante, welche in der Westernblotanalyse keine Stabilisierung von Siah-1 zeigte, getestet. Nach Kotransfektion der Mutante mit Siah-1 konnte auch auf Einzelzellebene keine Stabilisierung von Siah-1 beobachtet werden (siehe Abbildung 18B). Des Weiteren wurde in der indirekten Immunfluoreszenzanalyse die ICP0 Δ NLS-Mutante, welche ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, auf die Fähigkeit Siah-1 zu stabilisieren, getestet (siehe Abbildung 18B). Es konnte eine starke Expression von Siah-1 in punktförmigen zytoplasmatischen Strukturen, die größtenteils mit der ICP0 Δ NLS-Mutante kolokalisierten, beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuteten auf eine Korrelation zwischen Bindung und Stabilisierung von ICP0 und Siah-1 hin. Eine Übersicht über die ICP0-Mutanten und ihre Fähigkeiten mit Siah-1 zu interagieren und dieses zu stabilisieren, ist in Abbildung 19 dargestellt.

A



B

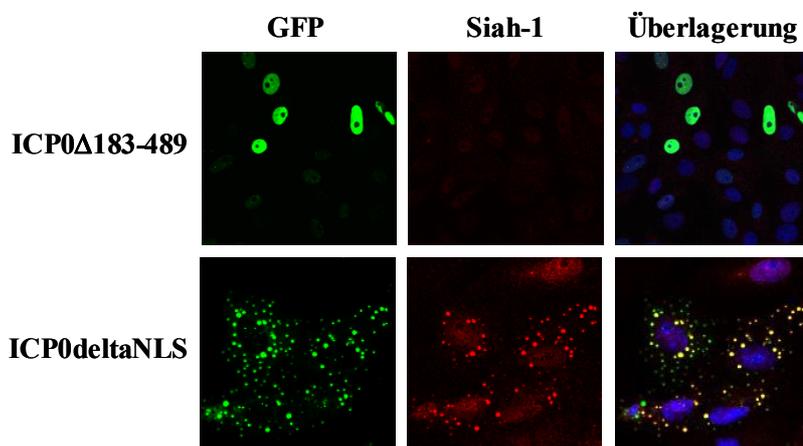


Abbildung 18: Identifizierung des HSV-2 ICP0 Aminosäurebereiches 182-490 als essenziell für die Stabilisierung von Siah-1. (A) ICP0 und die angegebenen ICP0-Mutanten wurden als FLAG-Fusionskonstrukte zusammen mit HA-Siah-1 in 293T-Zellen überexprimiert. Als Kontrolle diente der parentale Vektor pcDNA3. Nach 48h wurde die Expression von Siah-1 und den ICP0-Konstrukten im Westernblot, unter Verwendung von α -HA und α -FLAG Antikörpern, analysiert. Der Nachweis von α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Schwach exprimierte ICP0-spezifische Banden sind mit einem Stern markiert. Um eine Expression der Mutante ICP0 Δ 1-352 sichtbar zu machen, wurde in Spur 6 derselbe Blot nach längerer Expositionszeit in das Bild eingefügt. Neben den spezifischen ICP0-Banden wurden auch zahlreiche Abbauprodukte von ICP0 detektiert. (B) VERO-Zellen wurden mit HA-Siah-1 und den Mutanten ICP0 Δ 183-489-GFP und ICP0 Δ NLS-GFP kotransfiziert. Die Expression und Lokalisation von HA-Siah-1 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse unter Verwendung eines α -HA Antikörpers sichtbar gemacht (rot). Die ICP0-Mutanten konnten durch die Autofluoreszenz des GFP-Epitops detektiert werden (grün). In der Überlagerung ist die nukleäre DNA durch DRAQ5 gefärbt (blau).

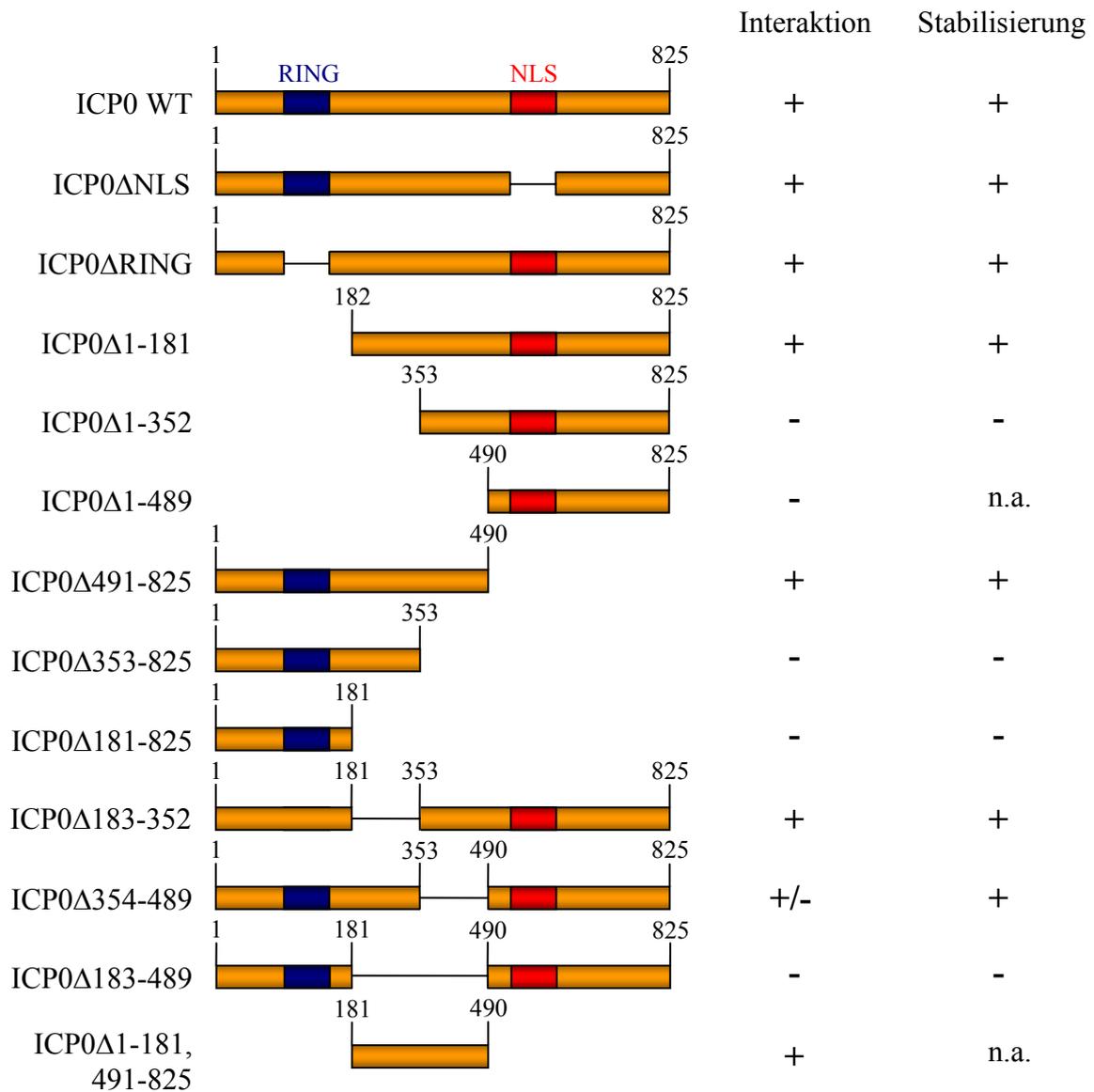


Abbildung 19: Schematische Übersicht über ICP0-Deletionsmutanten und ihre Fähigkeit mit Siah-1 zu interagieren und Siah-1 zu stabilisieren. Die Übersicht zeigt eine Zusammenfassung der Feinkartierung der Siah-1 Interaktionsdomäne (siehe 5.4) und der Siah-1 Stabilisierungsdomäne (siehe 5.5) von ICP0. + steht für Interaktion/Stabilisierung, - zeigt keine Interaktion bzw. Stabilisierung an, +/- steht für eine schwache Interaktion der Mutante mit Siah-1, n.a. steht für nicht analysiert. Die Bezeichnungen der Mutanten beziehen sich auf die jeweilig deletierten Domänen bzw. Aminosäuren. Die Zahlen zeigen die entsprechenden Aminosäurepositionen an. Gekennzeichnet sind auch die RING-Domäne und das Kernlokalisationsignal (NLS) von ICP0.

Stabilisierung von Siah-1 nach HSV-2 Infektion

Die bisher gezeigten Ergebnisse wurden ausschließlich durch Verwendung von ICP0 erhalten, das von einem CMV Promotor in Abwesenheit anderer viraler Genprodukte überexprimiert wurde. Zum einen galt es den Einfluss anderer herpesviraler Proteine auf die ICP0-vermittelte Stabilisierung von Siah-1 auszuschließen, zum anderen einen Effekt durch die Überexpression von ICP0. Deswegen war zu untersuchen, ob Siah-1 auch nach Infektion mit Herpes Simplex Virus Typ 2, welches ICP0 im natürlichen viralen Kontext exprimiert, stabilisiert wird. Da in Westernblotanalysen keine ausreichende Menge Siah-1 detektiert werden konnten, wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz gewählt. Ein Antikörper gegen endogenes Siah-1 für die indirekte Immunfluorezenzanalyse war jedoch nicht verfügbar, daher wurde mit überexprimiertem HA-Siah-1 gearbeitet. Da transfiziertes Siah-1 allein nicht stark genug exprimiert wurde (siehe Abbildung 17B), um es in der Zelle sichtbar zu machen, war es nötig eine Transfektionskontrolle zu verwenden. Diese Transfektionskontrolle ermöglichte es, mit Siah-1 transfizierte Zellen zu markieren, obwohl keine Siah-1-Expression optisch detektierbar war. Dazu wurde ein hybrides Expressionsplasmid kloniert (pGFP-HA-Siah-1, siehe 4.2.7.3), welches von unabhängigen CMV Promotoren gleichzeitig sowohl GFP als auch HA-Siah-1 exprimiert (siehe Abbildung 20).



Abbildung 20: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pGFP-HA-Siah-1. Von zwei unabhängigen CMV Promotoren wird gleichzeitig GFP und HA-Siah-1 exprimiert. Am 3'-Ende der kodierenden Sequenzen befindet sich jeweils eine Polyadenylierungsstelle (PolyA).

Somit war sichergestellt, dass jede GFP-exprimierende Zelle auch HA-Siah-1 exprimiert. Mit diesem Expressionsvektor pGFP-HA-Siah-1 wurden VERO-Zellen transient transfiziert und nach 24h mit HSV-2 infiziert. Die Fixierung der Zellen für die sich anschließende indirekte Immunfluoreszenz erfolgte nach weiteren 24h. HA-Siah-1 wurde mit einem α -HA Antikörper, infizierte Zellen wurden mit einem Antikörper gegen das virale Glykoprotein gE sichtbar gemacht.

Nach HSV-2 Infektion konnte eine starke Expression von Siah-1 in infizierten Zellen nachgewiesen werden, welches hauptsächlich in punktierten Strukturen im Zellkern akkumulierte (siehe Abbildung 21 E-P). Als Kontrolle dienten nicht infizierte, transfizierte (= GFP-fluoreszierende) Zellen (siehe Abbildung A-D). Wie erwartet war in diesen Zellen keine Expression von Siah-1 nachweisbar. Dieses Resultat zeigte gleichzeitig, dass GFP allein keinen Einfluss auf die Siah-1-Expression hatte.

Die nukleäre Lokalisation von Siah-1 in HSV-2 infizierten Zellen ähnelte sehr der in vorherigen Experimenten festgestellten Lokalisation von Siah-1 in ICP0-überexprimierenden Zellen (siehe Abbildung 17H). Im Gegensatz dazu lokalisierte Siah-1 in Abwesenheit von ICP0 hauptsächlich im Zytoplasma (siehe Abbildung 17E). Da kein Antikörper gegen ICP0 zur Verfügung stand, konnte Virus-exprimiertes ICP0 nicht direkt in der Zelle sichtbar gemacht werden. Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass nach HSV-2 Infektion eine Stabilisierung von Siah-1 stattfindet, und es wurden wiederholt Hinweise darauf erhalten, dass Siah-1 in die ICP0-Kernkompartimente rekrutiert wird.

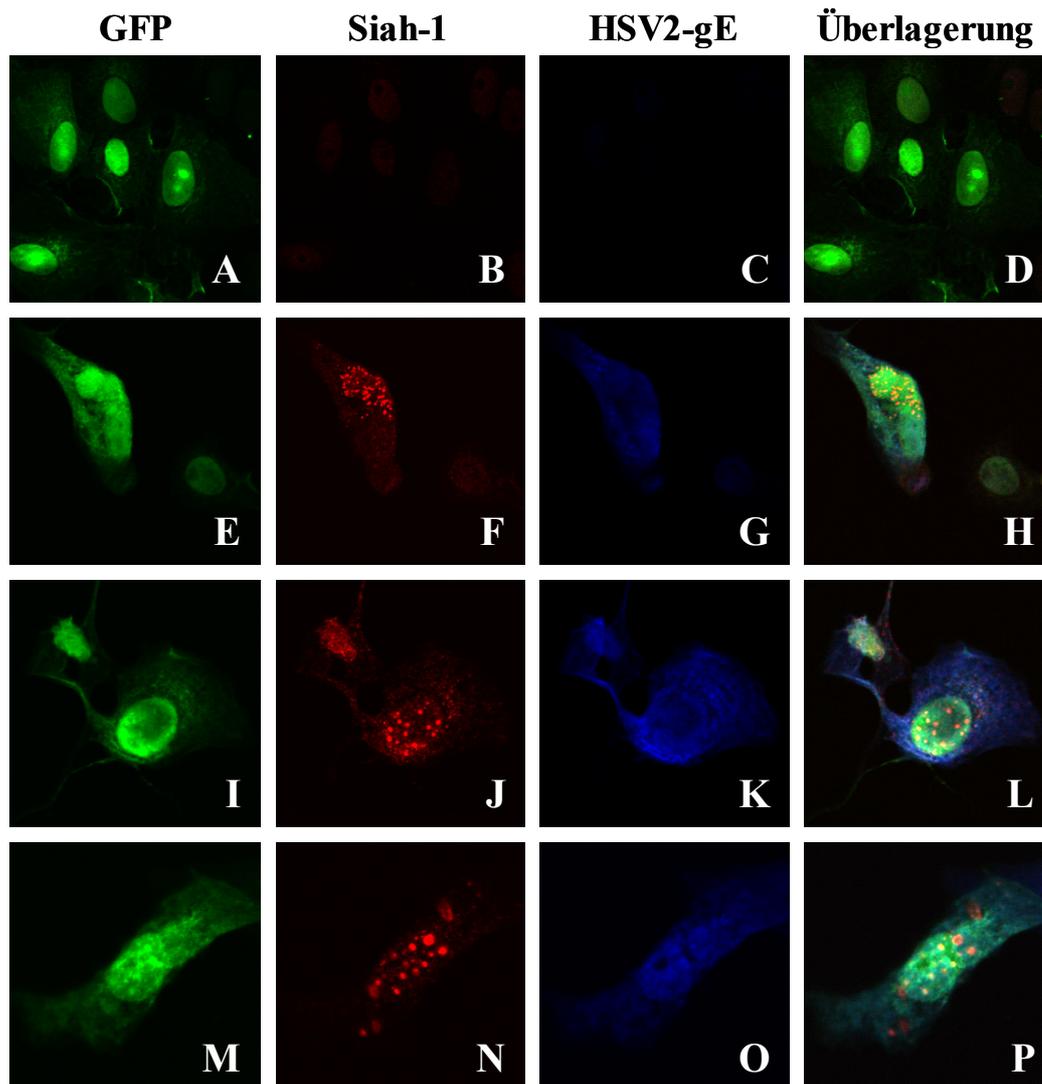


Abbildung 21: Stabilisierung von Siah-1 nach HSV-2 Infektion. Das Expressionskonstrukt pGFP-HA-Siah-1 wurde in VERO-Zellen überexprimiert. 24h danach wurden die Zellen schein- (*MOCK*-) infiziert (A-D) oder mit HSV-2 mit einer $MOI=1$ infiziert (E-P). Nach weiteren 24h wurden die Zellen fixiert und die Expression von HA-Siah-1 mit einem α -HA Antikörper detektiert (rot). Infizierte Zellen wurden durch Färbung des viralen Glykoproteins gE sichtbar gemacht (blau). Des Weiteren diente als Transfektionskontrolle die Autofluoreszenz von GFP (grün).

Einfluss von HSV-2 ICP0 auf die Siah-1-Genexpression

Die bisher gezeigten Ergebnisse weisen auf eine starke Stabilisierung des zellulären Siah-1-Proteins durch HSV-2 ICP0 in Abhängigkeit von der Interaktion der beiden Proteine hin. Eine vermehrte Proteinexpression kann durch Beeinflussung verschiedener zellulärer Prozesse erfolgen. Da ICP0 als Transaktivator der Genexpression beschrieben wurde (Cai und Schaffer, 1992; Chen und Silverstein, 1992; Everett, 1985), könnte die vermehrte Siah-1-Proteinexpression theoretisch auch aus der Erhöhung der Transkriptionsrate des Siah-1-Gens durch ICP0 resultieren. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die endogene Siah-1-Genexpression nach ICP0-Expression untersucht. Hierzu wurden ICP0 (HSV-1 und HSV-2) und die Deletionsmutanten ICP0 Δ NLS und ICP0 Δ RING in 293T- oder HeLa-Zellen überexprimiert. Nach 24 oder 48h wurde gesamtzelluläre-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Als interne Kontrolle für die anschließende PCR diente die Amplifikation der cDNA der konstitutiv exprimierten Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die eingesetzten Mengen der jeweiligen cDNAs wurden auf eine einheitliche GAPDH-Expression bezogen (siehe Abbildung 22). Für die Amplifikation von Siah-1 mit den spezifischen Primern P206/P207 (siehe 3.5.1.6) wurden schließlich die aus der GAPDH-PCR ermittelten cDNA-Mengen eingesetzt. Die amplifizierten Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht (siehe Abbildung 22). Es konnte in beiden Zelllinien keine Steigerung der Siah-1-Genexpression durch die Expression von ICP0 (Spur 3 und 4) gegenüber untransfizierten (Spur 1) oder mit Leervektor transfizierten (Spur 2) Zellen nachgewiesen werden. Auch die zur Kontrolle mitgeführten Mutanten ICP0 Δ NLS und ICP0 Δ RING zeigten keinen Einfluss auf die Siah-1-Genexpression (Spur 5 und 6). Daraus ließ sich schlussfolgern, dass ICP0 keinen direkten oder indirekten Einfluss auf den Siah-1 Promotor ausübte, und damit die Stabilisierung von Siah-1 nicht auf seine verstärkte Transkription zurückzuführen war.

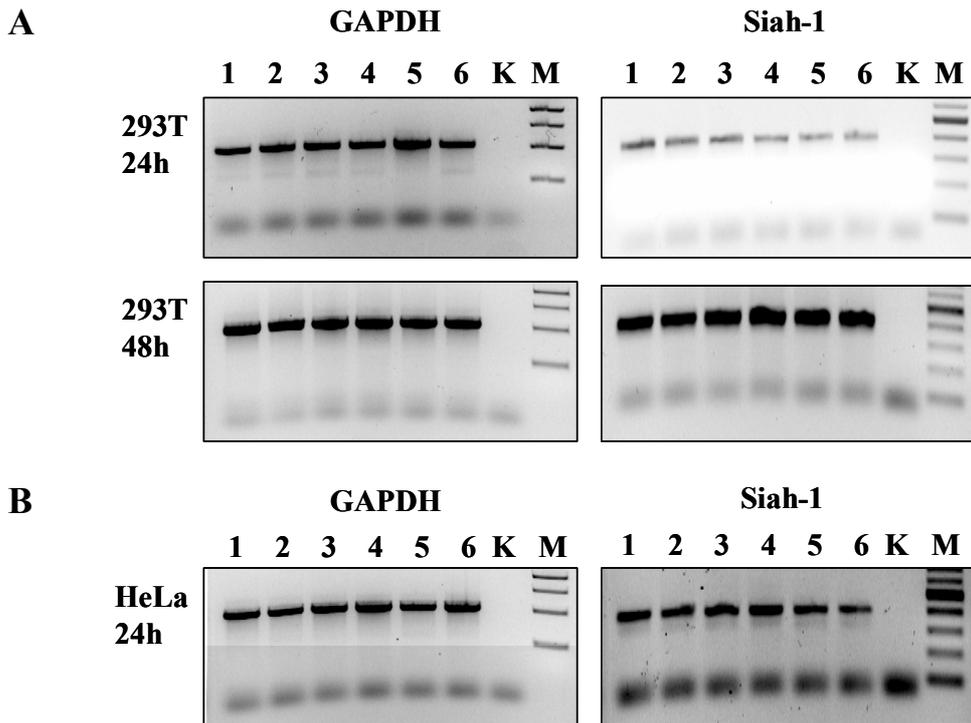


Abbildung 22: Einfluss von HSV-2 ICP0 auf die Siah-1-Genexpression. 293T- (A) oder HeLa- (B) Zellen wurden mit HSV-1 ICP0 (Spur 3), HSV-2 ICP0 (Spur 4), HSV-2 ICP0 Δ NLS (Spur 5) und HSV-2 ICP0 Δ RING (Spur 6) transient transfiziert. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen (Spur 1) und mit dem parentalen Leervektor pcDNA3 transfizierte Zellen (Spur 2). Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, die gesamtzelluläre-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Genexpression von Siah-1 wurde durch Amplifikation der Siah-1 spezifischen cDNA mittels PCR (Primer P206/P207, siehe 3.5.1.6) analysiert und die Produkte durch Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Als interne Kontrolle der PCR diente die Amplifikation der cDNA der konstitutiv exprimierten Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). K: PCR-Negativkontrolle; M: Marker;

Stabilisierung des Siah-1-Proteins nach de novo Synthese

Da die Stabilisierung von Siah-1 durch ICP0 nicht durch eine erhöhte Expression des Siah-1-Gens zu erklären ist und die Bindedomäne von ICP0 essenziell ist, war es wahrscheinlich, dass das Protein selbst posttranslational stabilisiert wird. Die Halbwertszeit von Proteinen kann mit Hilfe von *Pulse-Chase* Experimenten bestimmt werden. Hierbei werden Proteine durch den Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren gekennzeichnet (*Pulse*). Zu bestimmten Zeitpunkten nach Entfernen der Radioaktivität wird die Expression der markierten Proteine analysiert (*Chase*). Ab dem Zeitpunkt der Abnahme des radioaktiven Mediums sollte keine Radioaktivität mehr in die Proteine eingebaut werden. Das bedeutet, dass die bis zu diesem Zeitpunkt markierten Proteine nun gemäß ihrer Halbwertszeit abgebaut werden. Daher repräsentiert das radioaktive Signal in den zu den jeweiligen Zeitpunkten

entnommenen Proben die verbleibenden, nicht degradierten Proteine. Daraus lässt sich folglich auf ihre Halbwertszeit schließen.

Um eine Stabilisierung des Siah-1-Proteins zu zeigen, wurden *Pulse-Chase* Experimente mit [³⁵S]-markierten Proteinen und anschließender Immunpräzipitation durchgeführt. Hierfür wurde Siah-1 allein oder mit ICP0 in 293T-Zellen überexprimiert und nach 24h eine Markierung der gesamtzellulären Proteine mit radioaktivem Schwefel durchgeführt (*Pulse*). Nach 30min wurde die Markierung durch Entfernen des radioaktiven Mediums und Zugabe von nicht radioaktivem Medium (Standard-Kulturmedium) gestoppt, und die Zellen zu definierten Zeitpunkten (0-60min, *Chase*) lysiert. Das radioaktiv markierte Siah-1 wurde aus den Zellysaten präzipitiert, durch SDS-Gelelektrophorese separiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht (siehe Abbildung 23A). Die Autoradiographie wurde zusätzlich mittels Phosphoimaging quantifiziert. Die spezifischen Siah-1-Banden wurden mit Hilfe unspezifischer Autoradiographiebanden normiert und das Ergebnis graphisch dargestellt (siehe Abbildung 23B).

Wie aus den Abbildungen zu entnehmen ist, betrug die Halbwertszeit von Siah-1 weniger als 5min. Nach Koexpression mit ICP0 war eine Verlängerung der Siah-1 Halbwertszeit um ungefähr das Dreifache zu beobachten. Bis 10min nach Ende der Markierung war die Siah-1-Expression unter dem Einfluss von ICP0 nahezu unverändert. Erst ab dem 10min Wert konnte eine Abnahme der Siah-1-Expression beobachtet werden. Auf Grund dieser Ergebnisse kann gefolgert werden, dass eine Stabilisierung von Siah-1 durch ICP0 vermutlich auf die Verlängerung der Siah-1 Halbwertszeit zurückzuführen ist.

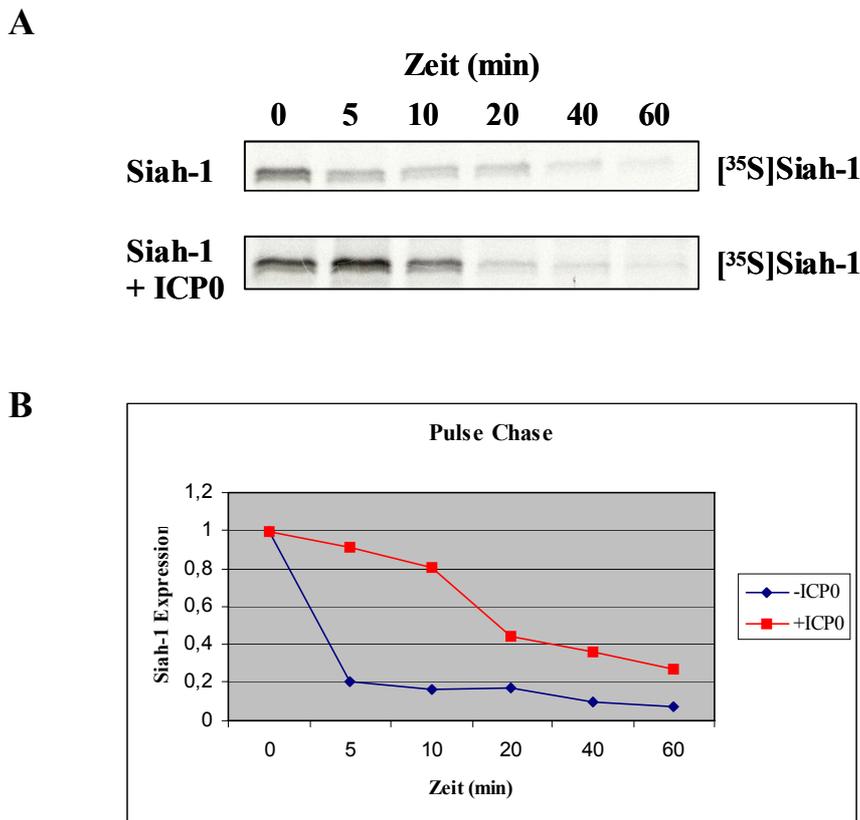


Abbildung 23: Stabilisierung von Siah-1 durch HSV-2 ICP0 nach *de novo* Synthese. (A) 293T-Zellen wurden mit HA-Siah-1 allein oder gemeinsam mit ICP0-FLAG transfiziert. Nach 24h erfolgte für 30min eine radioaktive Markierung der Proteine mit [³⁵S]. Nach dem Waschen wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und HA-Siah-1 unter Verwendung eines α -HA Antikörpers immunpräzipitiert. Die Proben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. (B) Die Graphik zeigt die Quantifizierung der Autoradiographiebanden aus (A) mit Hilfe eines Phosphoimagers. Dabei wurde die spezifische Siah-1 Bande durch Vergleich mit einer unspezifischen Hintergrundbande normiert. Somit konnten Ungenauigkeiten bei der Probenverarbeitung und Gelbeladung relativiert werden.

5.6 Abbau von HSV-2 ICP0 durch Siah-1

Dosisabhängiger Abbau von ICP0 durch Siah-1

In Abbildung 16C wurde die auffällige Beobachtung gemacht, dass die ICP0-Proteinexpression in den ICP0 und Siah-1 überexprimierenden Zellen, trotz steigenden Mengen des transfizierten ICP0-Plasmids, nicht zunahm. Die Erklärung für dieses Phänomen könnte die Tatsache sein, dass es sich bei Siah-1 um eine E3-Ligase handelt (Hu und Fearon, 1999). Mit dieser Funktion ist Siah-1 in der Lage, den proteasomalen Abbau von Substratproteinen zu vermitteln (Liu et al., 2001; Susini et al., 2001). Die Tatsache, dass es sich bei Siah-1 Interaktionspartnern meistens auch um E3-Ligase Substrate für die

proteasomale Degradation handelt, eröffnet die Möglichkeit, dass ICP0 ein weiteres bisher unbekanntes Siah-1 Substrat sein könnte.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden konstante Mengen ICP0 und steigende Mengen Siah-1 in VERO-Zellen überexprimiert, und die ICP0-Expression in Westernblotanalysen untersucht (siehe Abbildung 24A). Es konnte eine deutliche Abnahme der ICP0-Expression mit steigenden Mengen Siah-1 festgestellt werden. Bei der höchsten Konzentration von Siah-1 konnte kein weiterer Abbau von ICP0 beobachtet werden. Das Ergebnis deutete darauf hin, dass mit ICP0 ein neues Substrat der E3-Ligase Siah-1 entdeckt worden sein könnte. Bei ICP0 würde es sich demnach um das erste virale Substrat von Siah-1 handeln.

Inhibition des Siah-1-vermittelten Abbaus von ICP0 durch den Proteasomeninhibitor MG132

Als E3-Ligase ist Siah-1 Bestandteil des zellulären Ubiquitin-Proteasomen-Systems. Der proteasomale Abbau von Substratproteinen kann durch verschiedene Wirkstoffe, zum Beispiel MG132, inhibiert werden. Um zu analysieren, ob der Abbau von ICP0 durch Siah-1 über die Proteasomen vermittelt wird, wurden Siah-1 und ICP0 in 293T-Zellen überexprimiert und 12h vor der Ernte mit steigenden Konzentrationen MG132 (10, 15, 20 μ M) behandelt. Die Expression von ICP0 wurde im Westernblot analysiert (siehe Abbildung 24B). Durch Hemmung der Proteasomen war eine Inhibition des ICP0-Abbaus durch Siah-1 zu beobachten. Dies deutete darauf hin, dass die ICP0-Degradation Proteasomen-vermittelt stattfand. Auffällig war im Gegensatz zu den anderen Experimenten die sehr starke Expression von Siah-1. Dies lässt sich dadurch erklären, dass auch die Autodegradation von Siah-1 durch den Proteasomeninhibitor MG132 gehemmt wurde (siehe Abbildung 24B).

Der Siah-1-vermittelte ICP0-Abbau ist abhängig von der Siah-1-RING-Domäne

RING-Finger-E3-Ligasen vermitteln ihre Aktivität über das RING-Motiv. Auch Siah-1 kodiert an den Aminosäurepositionen 39-76 für eine RING-Domäne, welche für die Degradation von Proteinsubstraten essenziell ist (Hu und Fearon, 1999). Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob diese RING-Domäne von Siah-1 notwendig für den Abbau von ICP0 ist. Hierzu wurde ICP0 mit einer Siah-1 RING-Deletionsmutante (Siah-1 Δ 1-76) oder Siah-1 Wildtyp in 293T-Zellen überexprimiert, und die ICP0-Expression im Westernblot

detektiert (siehe Abbildung 24C). Der Abbau von ICP0 durch Siah-1 konnte in diesem Experiment reproduziert werden (vgl. Spur 1 und 2). Im Vergleich hierzu zeigte die Überexpression der RING-Finger deletierten Siah-1-Mutante (Spur 3) keinen Einfluss auf die ICP0-Expression. Die geringere Expressionstärke von ICP0 in Spur 3 im Vergleich zu Spur 1 ließ sich durch die Ladekontrolle α -Tubulin erklären, welche auch eine schwächere Expression zeigte. Somit wurde bestätigt, dass auch für den Abbau des viralen ICP0-Proteins die RING-Domäne von Siah-1 essenziell war.

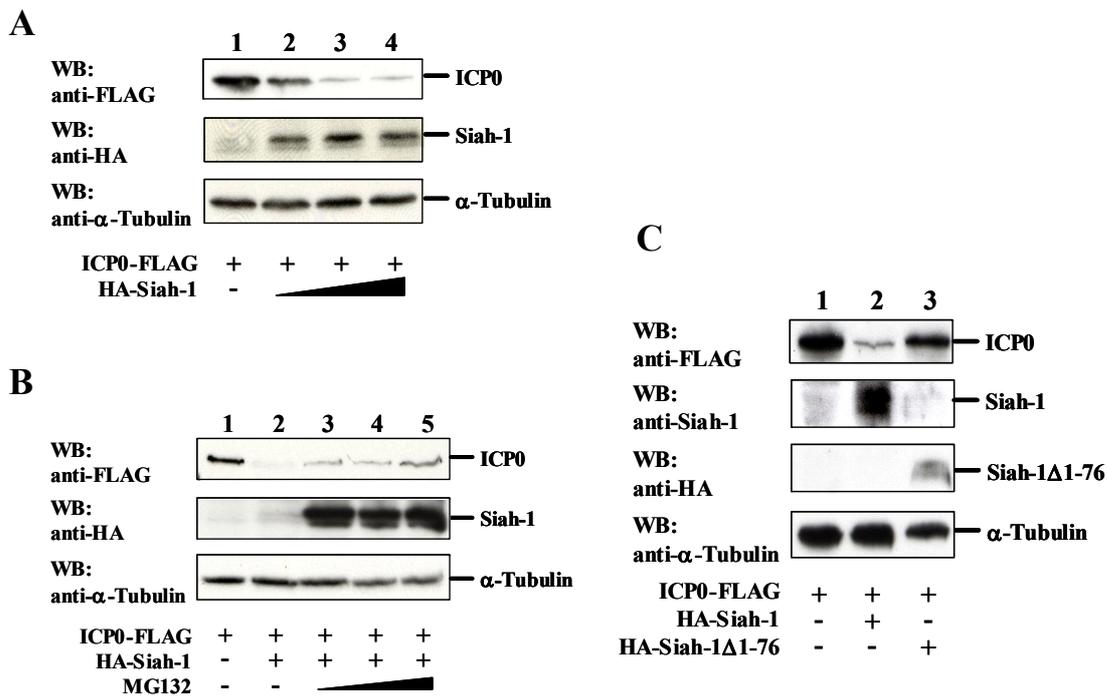


Abbildung 24: Abbau von HSV-2 ICP0 durch die E3-Ligase Siah-1. (A) Konstante Konzentrationen von ICP0-FLAG wurden mit steigenden Mengen HA-Siah-1 (Spur 2-4) in VERO-Zellen überexprimiert. Nach 48h wurde die Expression der beiden Proteine in Westernblotanalysen mit den angegebenen Antikörpern untersucht. (B) 293T-Zellen wurden mit ICP0-FLAG allein (Spur 1) oder zusammen mit HA-Siah-1 (Spur 2-5) transient transfiziert. Zur Hemmung des Proteasomensystems wurden 12h vor Ernte steigende Menge MG132 zu den Ansätzen gegeben (Spur 3 10 μ M, Spur 4 15 μ M, Spur 5 20 μ M). Nach 48h wurden die Zellen lysiert und die Expression der Proteine im Immunblot unter Verwendung der angegebenen Antikörper sichtbar gemacht. (C) Fusionskonstrukte von ICP0-FLAG wurden allein (Spur 1), mit HA-Siah-1 Wildtyp (Spur 2) oder der Siah-1 RING-Deletionsmutante HA-Siah-1 Δ 1-76 (Spur 3) in 293T-Zellen überexprimiert. Nach 48h wurde die Expression der Proteine mit den angegebenen Antikörpern untersucht. In allen Ansätzen diente der Nachweis von α -Tubulin als Ladekontrolle.

5.7 Einfluss von Siah-1 auf die E3-Ligasefunktion von HSV-2 ICP0

Um herauszufinden, welche Funktion die Interaktion und gegenseitige Beeinflussung der beiden Proteine Siah-1 und ICP0 innerhalb der Zelle hat, wurde der Einfluss von Siah-1 Überexpression auf die ICP0 E3-Ligase Aktivität getestet. Für die E3-Ligase ICP0 sind eine Reihe verschiedener zellulärer Substrate beschrieben worden (siehe Einleitung). Von besonderer Bedeutung für diese Dissertation sind die PML-Kerndomänen Proteine Sp100 und PML, welche beide nach HSV-Infektion ICP0-abhängig abgebaut werden. Für den Abbau beider Proteine ist ein intaktes Ubiquitin-Proteasomen-System und die ICP0 RING Domäne essenziell (Everett und Maul, 1994; Chelbi-Alix und de The, 1999). Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss von Siah-1 auf den ICP0-vermittelten Abbau dieser beiden Proteine näher untersucht.

Einfluss von Siah-1 auf den ICP0-vermittelten Sp100-Abbau

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei Sp100 um ein weiteres Protein, welches in PML-Kerndomänen lokalisiert (Szostecki et al., 1990; Szostecki et al., 1987). Durch Wechselwirkungen mit anderen zellulären Proteinen spielt Sp100 vermutlich eine Rolle bei der transkriptionalen Regulation. Es wurde sowohl ein reprimierender (Seeler et al., 1998; Lehming et al., 1998), als auch ein aktivierender (Zong et al., 2000; Wasylyk et al., 2002; Moller et al., 2003) Einfluss auf die Genexpression beschrieben. Wie das PML-Protein wird Sp100 SUMO-1 modifiziert, wobei diese Modifizierung nicht essenziell für die Lokalisation von Sp100 in den PML-Kerndomänen ist (Sternsdorf et al., 1999; Muller et al., 1998).

Es sollte untersucht werden, ob der Siah-1-vermittelte Abbau von ICP0 einen Einfluss auf den Abbau von Sp100 hat. Zunächst musste geklärt werden, ob Sp100 möglicherweise ein Substrat der E3-Ligase Siah-1 ist, und Siah-1 somit allein die Expression von Sp100 beeinflusst. Hierzu wurde Sp100 allein oder zusammen mit Siah-1 in 293T-Zellen überexprimiert. Um den beschriebenen Abbau von Sp100 durch ICP0 zu reproduzieren, wurden in einem weiteren Ansatz Sp100 und ICP0 koexprimiert. Die Zelllysate wurden mittels Westernblot analysiert (siehe Abbildung 25A). Es war eine deutliche Abnahme des Sp100-Signals in Anwesenheit von ICP0 zu beobachten (vgl. Spur 1 und 2), womit der ICP0-abhängige Sp100-Abbau verifiziert werden konnte. Es wurde sowohl SUMO-1-modifiziertes, als auch unmodifiziertes Sp100 abgebaut, was in Übereinstimmung mit der Literatur ist (Chelbi-Alix und de The, 1999). Dagegen konnte keine degradierende Wirkung von Siah-1 auf Sp100 gezeigt werden (Spur 3). Es war eher eine Steigerung der Sp100-Expression durch

Siah-1 zu beobachten. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei Sp100 um ein Substrat von Siah-1 handelte. Auf diesem Blot konnte aus technischen Gründen bei Verwendung eines α -HA oder α -Siah-1 Antikörpers keine Expression von Siah-1 nachgewiesen werden. Bei Wiederholung dieser Ansätze im folgenden Experiment war es möglich, Siah-1 zu detektieren (siehe Abbildung 25B Spur 1-3).

Theoretisch müsste der Abbau von ICP0 durch Siah-1 dazu führen, dass der Abbau von Sp100 durch ICP0 inhibiert wird, da weniger ICP0 in der Zelle vorhanden ist. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden Sp100, ICP0 und steigende Mengen Siah-1 in 293T-Zellen überexprimiert, und die Expression der einzelnen Proteine im Westernblot sichtbar gemacht (siehe Abbildung 25B). Dieser Theorie entsprechend nahm die Sp100-Expression mit steigenden Konzentrationen von Siah-1 zu, während die ICP0-Expression wie erwartet abnahm (Spur 4-8). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass Siah-1 über die Interaktion mit ICP0 und darauf folgender ICP0-Degradation die E3-Ligasefunktion von ICP0 beeinflussen kann.

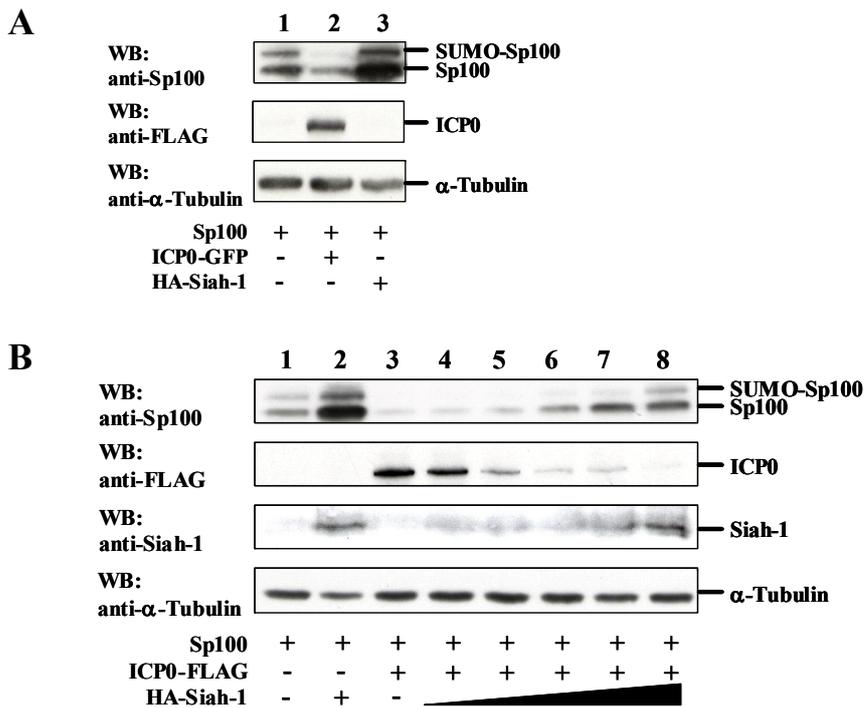


Abbildung 25: Einfluss von Siah-1 auf Sp100 und Einfluss von Siah-1 auf den HSV-2 ICP0-vermittelten Abbau von Sp100. (A) 293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Sp100 allein (Spur 1) oder zusammen mit ICP0-GFP (Spur 2) oder HA-Siah-1 (Spur 3) transient transfiziert. 48h später wurden die Zellen lysiert und die Expression der jeweiligen Proteine mit den angegebenen Antikörpern im Westernblot analysiert. (B) Konstante Mengen Sp100 wurden allein (Spur 1) oder in den angegebenen Kombinationen mit ICP0-FLAG und steigenden Mengen HA-Siah-1 in 293T-Zellen überexprimiert. Nach 48h erfolgte eine Analyse der Zelllysate im Immunblot mit den angegebenen Antikörpern. Der Nachweis von α -Tubulin diente in beiden Blots als Ladekontrolle.

Einfluss von Siah-1 auf den ICP0-vermittelten PML-Abbau

Von allen ICP0-Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen ist der Abbau von PML durch ICP0 bisher am detailliertesten untersucht worden. Dennoch wurde in *in vitro* Studien keine direkte Interaktion zwischen PML und ICP0 nachgewiesen (Boutell et al., 2003). Man geht davon aus, dass es sich bei dem ICP0-vermittelten PML-Abbau um einen indirekten Mechanismus handelt, bei dem andere zelluläre Faktoren eine Rolle spielen könnten. Bei der zellulären E3-Ligase Siah-1 könnte es sich, auf Grund der Fähigkeit PML zu degradieren (Fanelli et al., 2004) und mit ICP0 zu interagieren (siehe 5.3), um ein solches Bindeglied handeln. Da eine Interaktion zwischen PML und Siah-1 in der Literatur beschrieben wurde (Fanelli et al., 2004) und in Kapitel 5.3 der vorliegenden Dissertation eine Interaktion zwischen ICP0 und Siah-1 gezeigt werden konnte, stellte sich zunächst die Frage, ob ICP0, PML und Siah-1 in einem Komplex vorliegen und zusammen koimmunpräzipitiert werden können. Hierzu wurden PML, ICP0 und Siah-1 in 293T-Zellen überexprimiert. Dabei war zu beachten, dass ICP0 einerseits in der Lage ist, PML zu degradieren und andererseits ICP0 von Siah-1 proteasomal abgebaut wird. Um diese proteasomale Degradation zu verhindern, wurden die Ansätze 12h vor der Lyse mit 20 μ M Proteasomeninhibitor MG132 behandelt. Anschließend erfolgte eine Präzipitation von ICP0 aus den Zelllysaten, und die kopräzipitierten Proteine Siah-1 und PML wurden mittels Westernblot detektiert (siehe Abbildung 26A). Aus diesem Ergebnis ließ sich schließen, dass Siah-1, PML und ICP0 als Komplex in der Zelle vorliegen. Um zu testen, ob die Überexpression von Siah-1 für die Komplexbildung von ICP0 und PML verantwortlich ist, wurde dasselbe Experiment ohne Überexpression von Siah-1 durchgeführt (siehe Abbildung 26B). Es ist eine deutliche Expression von PML in der spezifischen Immunpräzipitation (IP) sichtbar. Dies wies darauf hin, dass auch in diesem Ansatz PML und ICP0 als Komplex kopräzipitiert werden konnten. Scheinbar war eine Überexpression von Siah-1 für diese Komplexbildung nicht notwendig. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Stabilisierung von endogenem Siah-1 durch MG132 ausreichend war, um PML mit ICP0 zu präzipitieren. Beim Nachweis für endogenes Siah-1 mit einem α -Siah-1 Antikörper war ein schwaches Signal für endogenes Siah-1 sichtbar. Andererseits könnte die Interaktion zwischen ICP0 und PML auch unabhängig von Siah-1, unter Beteiligung anderer zellulärer Faktoren, stattfinden. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Proteine mit diesem Komplex assoziiert sind.

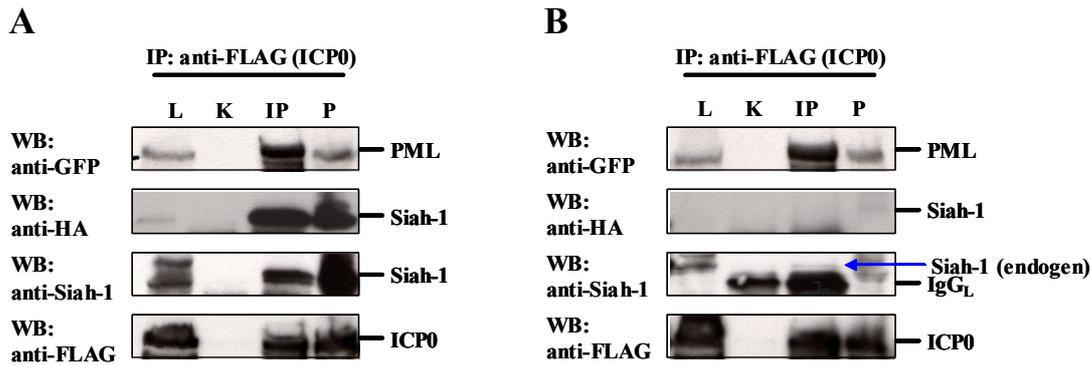


Abbildung 26: Interaktion zwischen HSV-2 ICP0, Siah-1 und PML. (A) Fusionskonstrukte für PML-GFP, ICP0-FLAG und HA-Siah-1 wurden in 293T-Zellen überexprimiert. Um detektierbare Expression der beteiligten Komponenten zu erhalten, wurden die Ansätze 12h vor Zellyse mit 20 μ M des Proteasomeninhibitors MG132 behandelt. Nach 24h wurden die Zellen lysiert, und ICP0-FLAG mit einem α -FLAG Antikörper immunpräzipitiert (IP). Um die Spezifität des α -FLAG Antikörpers zu gewährleisten wurde ein Teil des Zelllysates anstelle des α -FLAG Antikörpers mit IgG behandelt (K). ICP0 und die kopräzipitierten Proteine PML und Siah-1 wurden in Westernblotanalysen unter Verwendung der angegebenen Antikörper sichtbar gemacht. Als Kontrolle der Effizienz der Immunpräzipitation wurden 10% des Zelllysates (L) und 10% der pelletierten unlöslichen Bestandteile des Zelllysates (P) in gleicher Weise im Westernblot analysiert. (B) Es wurde die gleiche Versuchsanordnung wie in A verwendet, mit dem Unterschied, dass keine Überexpression von HA-Siah-1 erfolgte.

Einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung von Siah-1 am ICP0-vermittelten PML-Abbau könnte die Untersuchung einer Siah-1 bindungs- und stabilisierungsdefizienten ICP0-Mutante geben (siehe Abbildung 27A). Hierzu wurde PML allein, mit ICP0 Wildtyp oder der Siah-1 bindungsdefizienten Mutante ICP0 Δ 183-489 in 293T-Zellen überexprimiert und die PML-Expression in Westernblotanalysen verglichen (siehe Abbildung 27B). Es konnte kein Abbau von PML durch den Einfluss der ICP0 Δ 183-489-Mutante im Gegensatz zum ICP0 Wildtyp beobachtet werden. Dieses Ergebnis verstärkt die Vermutung, dass Siah-1 eine Funktion im ICP0-vermittelten PML-Abbau besitzt.

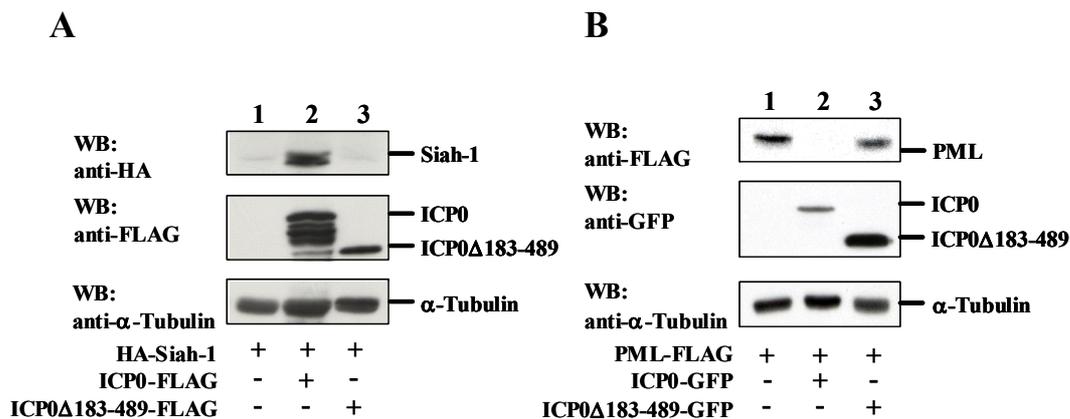


Abbildung 27: Eine Siah-1 bindungs- und stabilisierungsdefiziente HSV-2 ICP0-Mutante ist unfähig PML zu degradieren. (A) HA-Siah-1 wurde allein (Spur 1) oder zusammen mit ICP0-FLAG Wildtyp (Spur 2) oder der Deletionsmutante ICP0Δ183-489-FLAG (Spur 3) in 293T-Zellen überexprimiert. Die Zelllysate wurden mit den angegebenen Antikörpern in Westernblotanalysen untersucht. Bei den zusätzlichen Banden im α-FLAG Blot handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte von ICP0. (B) 293T-Zellen wurden mit PML-FLAG allein (Spur 1) oder zusammen mit ICP0-GFP Wildtyp (Spur 2) oder der Deletionsmutante ICP0Δ183-489-GFP (Spur 3) transient transfiziert. Die Expression der Proteine wurde im Immunblot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. In allen Ansätzen diente der Nachweis von α-Tubulin als Ladekontrolle.

Auf Grund der Tatsache, dass PML durch Siah-1 degradiert wird (Fanelli et al., 2004), dass die drei Proteine ICP0, PML und Siah-1 in einem Komplex vorliegen und eine Siah-1 bindungs- und stabilisierungsdefiziente Mutante von ICP0 nicht mehr in der Lage ist, PML zu degradieren, stellte sich die Frage, ob Siah-1 essenziell für den ICP0-vermittelten PML-Abbau ist. Eine effiziente Möglichkeit diese Frage zu beantworten besteht darin, die Expression von endogenem Siah-1 zu inhibieren und anschließend zu überprüfen, ob ICP0 unter diesen Bedingungen in der Lage ist PML zu degradieren. Als Zelllinie für diese Versuche wurden VERO-Zellen ausgewählt, da sie permissiv für Herpes Simplex Viren sind, und somit ein realitätsnaher Versuchsaufbau gewährleistet werden konnte. Da Wechselwirkungen zwischen Proteinen oft Zelllinien-abhängig sind, sollte als Vorversuch der Abbau von PML durch Siah-1 in VERO-Zellen verifiziert werden. Hierfür wurden PML, ICP0 und Siah-1 in den angezeigten Kombinationen (siehe Abbildung 28) überexprimiert und die Zelllysate mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert (siehe Abbildung 28). Es war ein deutlicher Abbau von PML durch ICP0 zu beobachten (vgl. Spur 1 und 2). Auch nach Überexpression von Siah-1 nahm das PML-Signal stark ab (vgl. Spur 1 und 3), was auf einen Abbau von PML durch Siah-1 hindeutete. Da Siah-1 ein sehr labiles Protein ist, war es unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht möglich, die Expression von Siah-1 im Westernblot mittels spezifischer Antikörper sichtbar zu machen. Scheinbar sind schon sehr

geringe, im Westernblot nicht detektierbare Mengen von Siah-1 ausreichend, um einen nahezu vollständigen PML-Abbau zu verursachen. Dennoch konnten mit diesem Versuch die Ergebnisse von Fanelli et al. (2004) als Grundlage für die weiteren Experimente auch in VERO-Zellen bestätigt werden.

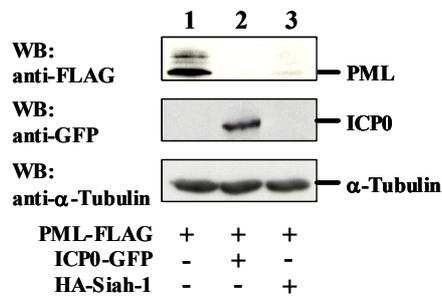


Abbildung 28: Abbau von PML durch Siah-1 und HSV-2 ICP0. VERO-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für PML-FLAG allein (Spur 1) oder zusammen mit ICP0-GFP (Spur 2) oder HA-Siah-1 (Spur 3) transient transfiziert. Nach 48h wurde die Expression der Proteine mittels Westernblotanalysen unter Verwendung der angegebenen Antikörper detektiert. Der Nachweis von α -Tubulin diente der Ladekontrolle.

Die Expression von endogenem Siah-1 sollte in der folgenden Versuchsserie mit Hilfe von siRNAs (*short interfering RNAs*) inhibiert werden. Da anscheinend geringste Mengen Siah-1 in der Zelle ausreichend sind, um dessen Funktion zu gewährleisten (vgl. Abbau von PML durch Siah-1 Abbildung 28, oder Interaktion von Siah-1, PML und ICP0 Abbildung 26B), war es nötig, eine möglichst hohe Effizienz der siRNAs gegen Siah-1 spezifische mRNA zu erreichen. Hierfür wurden die siRNAs mit Hilfe viraler Vektoren zellulär exprimiert. Bei diesen Konstrukten handelt es sich um replikationsinkompetente und selbst-inaktivierende lentivirale Vektoren. Ein Vorteil dieser Vektoren ist, dass sie stabil ins Wirtszellgenom integrieren und Promotoren-abhängig die eingebrachten Transgene (z.B. GFP, siRNAs) exprimieren. Ein weiterer Vorteil der Lentiviren ist ihre hohe Transduktionseffizienz. Nach geeigneter Pseudotypisierung kann nahezu jeder Zelltyp mit hoher Rate infiziert werden. Für die Konstruktion der lentiviralen Vektoren wurden zunächst die entsprechenden siRNA-Sequenzen ausgewählt und 3' des Histon Polymerase III Promotor (H1) in den Plasmidvektor pSUPER ligiert. Von diesen pSUPER Transfervektoren wurde die komplette siRNA-Kassette (H1-Promotor und siRNA-Sequenz) isoliert und in den lentiviralen Vektor pG inseriert. Der schematische Aufbau eines solchen lentiviralen Vektors ist in Abbildung 29 dargestellt.



Abbildung 29: Schematische Darstellung des lentiviralen Vektors pG. Über die beiden flankierenden LTRs wird die dazwischenliegende Sequenz ins Wirtszellgenom integriert. Die siRNAs werden durch einen Polymerase III H1-Promotor exprimiert. Als Kontrolle für die Integration wird eGFP von einem unabhängigen SFFV LTR exprimiert. Weitere Beschreibung siehe Text. CMV: *Cytomegalievirus Immediate Early* Promotor; LTR: *Long Terminal Repeat*; Ψ: HIV-Verpackungssignal; RRE: *HIV Rev Response Element*; cPPT: *central Polypurin Tract*; H1: *Histon Polymerase III Promotor*; siRNA: *short interfering RNA*; SFFV: *Spleen Focus Forming Virus LTR*; eGFP: *enhanced Green Fluorescent Protein*; PRE: *Woodchuck hepatitisvirus Posttranscriptional Regulatory Element*;

Unabhängig vom siRNA-Transgen kodiert der lentivirale Vektor auch für das grünfluoreszierende Protein (GFP), mit dessen Expression eine erfolgreiche Transduktion der Wirtszelle und Integration des viralen Genoms sichtbar gemacht werden kann.

Für die beschriebenen Experimente wurden ausgehend von pSUPER drei verschiedene Siah-1 spezifische siRNAs (pG-siSiah-1, pG-siSiah-1-1, pG-siSiah-1-4) und zur Kontrolle eine siRNA, welche gegen Luziferasesequenzen gerichtet ist (pG-siLuziferase), in lentivirale Vektoren inseriert. Die Verpackung und Transduktion wurden detailliert im Methodenteil beschrieben (siehe 4.4.2 und 4.5.4). Bei der Verpackung wurden die Lentiviren mit dem Glykoprotein des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV-G) pseudotypisiert. Das bedeutet, dass bei der Genese der Virionen das VSV-G in die Membranhülle der Lentiviren eingebaut wird. VSV-G vermittelt die Adsorption der Viren an die Zellmembran und somit die Aufnahme der viralen Partikel in nahezu jeden bekannten Zelltyp. Die Pseudotypisierung war notwendig, da VERO-Zellen auf Grund eines fehlenden Rezeptors natürlicherweise nicht mit Lentiviren infiziert werden können.

Zunächst wurde untersucht, welche siRNA-Sequenz am besten die Siah-1-Expression inhibiert. Dazu wurden VERO-Zellen mit den spezifischen siRNA-kodierenden Lentiviren pG-Siah-1, pG-Siah-1-1, pG-Siah-1-4, und mit dem Kontrollvirus pG-siLuziferase transduziert. Außerdem wurden unbehandelte VERO-Zellen mit untersucht. Da erfolgreich transduzierte Zellen GFP exprimieren, wurde die Effizienz der Transduktion durch Analyse der Zellen im Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Die Transduktionsrate lag bei > 90% (siehe Abbildung 31 C, D). Nach 4 Tagen wurde gesamtzelluläre-RNA aus den Zellen isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Die Siah-1-Genexpression wurde mittels PCR unter Verwendung der spezifischer Primer P206/P207 (siehe 3.5.1.6) analysiert. Als interne Kontrolle diente, wie unter 5.5 (Einfluss von HSV-2 ICP0 auf die Siah-1-Genexpression)

beschrieben, Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht (siehe Abbildung 30). Es war eine deutliche Verringerung der Siah-1-Genexpression im Falle der lentiviralen Vektoren pG-siSiah-1-1 und pG-siSiah-1-4 (vgl. Spur 5/6 mit Spur 2/3) zu beobachten. Die si-Sequenz im Vektor pG-siSiah-1 dagegen inhibierte die Siah-1-Genexpression nur sehr schwach (Spur 1).

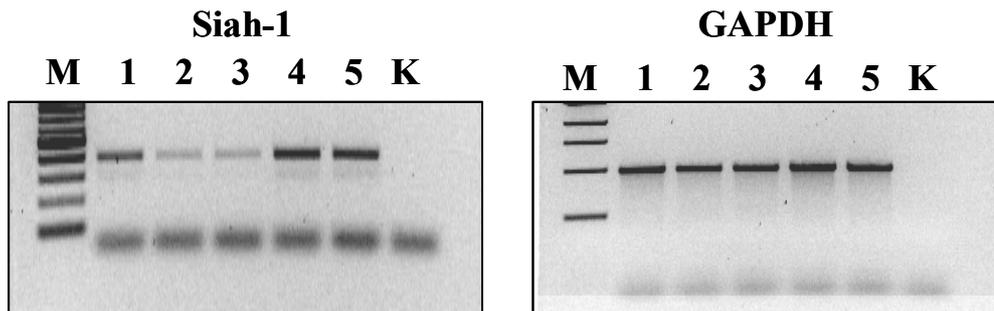


Abbildung 30: Inhibition der Siah-1-Genexpression durch RNAi. VERO-Zellen wurden mit unterschiedlichen Lentiviren, welche Siah-1 spezifische siRNA-Kassetten enthielten, transduziert (Spur 1: pG-siSiah-1, Spur 2: pG-siSiah-1-1, Spur 3: pG-siSiah-1-4). Als Kontrolle wurden zum einen Zellen, die mit einem Lentivirus, welches eine Luziferase-spezifische siRNA-Kassette enthielt (Spur 4: pG-siLuziferase), transduziert. Zum anderen wurden untransduzierte Zellen analysiert (Spur 5). Nach 4 Tagen wurde aus den Ansätzen gesamtzelluläre-RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Siah-1 spezifische cDNA wurde mittels PCR (Primer P206/P207, siehe 3.5.1.6) amplifiziert und durch Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Als interne Kontrolle diente die Amplifikation der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) cDNA. K: PCR-Negativkontrolle; M: Marker;

Für die weiteren Experimente wurde der lentivirale Vektor pG-siSiah-1-4 ausgewählt, da er scheinbar am effizientesten die Siah-1-Genexpression blockierte. Da es nicht möglich war, endogenes Siah-1 mit proteinchemischen Methoden in der Zelle sichtbar zu machen, konnte auch die Verminderung der Siah-1-Expression durch siRNAs auf Proteinebene nicht untersucht werden. Die erfolgreiche Blockierung der Siah-1-Genexpression konnte aber anhand der Zellmorphologie sehr deutlich beobachtet werden. 4 Tage nach Transduktion mit den entsprechenden lentiviralen Vektoren war eine deutliche Wachstumsinhibition und Veränderung der Zellmorphologie zu sehen (siehe Abbildung 31 A, B). Es konnten sehr langgestreckte Zellkörper beobachtet werden, die den Kontakt zu ihren Nachbarzellen behielten. Dies könnte bedeuten, dass die Inhibition der Siah-1-Expression einen Einfluss auf den Zellzyklus oder andere zelluläre Proliferations-mechanismen ausübte.

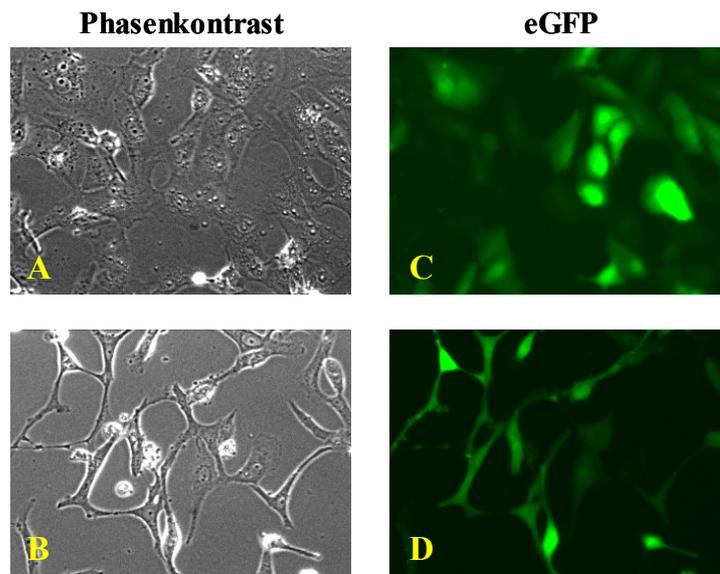


Abbildung 31: Inhibition des Zellwachstums durch Behandlung der Zellen mit siRNA gegen Siah-1 spezifische mRNA. VERO-Zellen wurden mit Lentiviren, welche spezifische siRNA gegen Siah-1 (B und D) und Kontroll-siRNA gegen Luziferase (A und C) exprimierten, transduziert. Die Inhibition des Wachstums ist durch Phasenkontrastaufnahme an Tag 4 nach der Transduktion dargestellt (A und B). Die Transduktionseffizienz ist durch Aufnahme der eGFP Autofluoreszenz der Zellen zum gleichen Zeitpunkt im Fluoreszenzmikroskop gezeigt (C und D).

Aus den Vorversuchen ergaben sich nun folgender Versuchsaufbau, um den Einfluss von Siah-1 auf den ICP0-vermittelten PML-Abbau zu untersuchen: Die Siah-1-Genexpression in VERO-Zellen wurde durch Transduktion des lentiviralen Vektors pG-siSiah-1-4 wie oben beschrieben inhibiert. Als Kontrolle wurden VERO-Zellen mit dem Vektor pG-Luziferase in gleicher Weise transduziert. Nach 4 Tagen wurde in den transduzierten Zellen PML allein und zusammen mit ICP0 überexprimiert. Nach weiteren 24h wurden die Zellen geerntet und aufgeteilt. Um die Inhibition von Siah-1 zu kontrollieren, wurde eine Hälfte der Zellen zur Analyse der Genexpression verwendet. Von diesem Teil wurde wie oben angegeben gesamtzelluläre-RNA isoliert, die RNA in cDNA umgeschrieben und die Genexpression mittels PCR mit den spezifischen Primern P206/P207 (siehe 3.5.1.6) und anschließender Agarosegelelektrophorese analysiert (siehe Abbildung 32A). Die unterschiedlich starken Expressionsbanden in den vergleichbaren Ansätzen 1 und 2, beziehungsweise 3 und 4, resultieren wahrscheinlich aus Ungenauigkeiten in der Versuchsdurchführung. Insgesamt konnte aber mit Hilfe von Siah-1 spezifischer siRNA die Siah-1 mRNA-Menge größtenteils reduziert werden (vgl. Spur 1/2 mit Spur 3/4). Die andere Hälfte der Zellen wurde zu Untersuchung der Proteinexpression von PML und ICP0 in entsprechendem Puffer lysiert und die Zelllysate mit den angegebenen Antikörpern im Immunblot analysiert (siehe Abbildung

32B). Es ist eine deutliche Abnahme der PML-Expression in siLuziferase transduzierten Zellen unter Einfluss von ICP0 zu beobachten. (Spur 3 und 4). Nach Inhibition der Siah-1-Genexpression durch die lentiviral eingebrachte siRNA ist ein deutlich schwächerer Abbau von PML durch ICP0 zu detektieren (Spur 1 und 2). Diese Ergebnisse zeigten relativ eindeutig, dass Siah-1 an der ICP0-vermittelten Degradation von PML beteiligt ist.

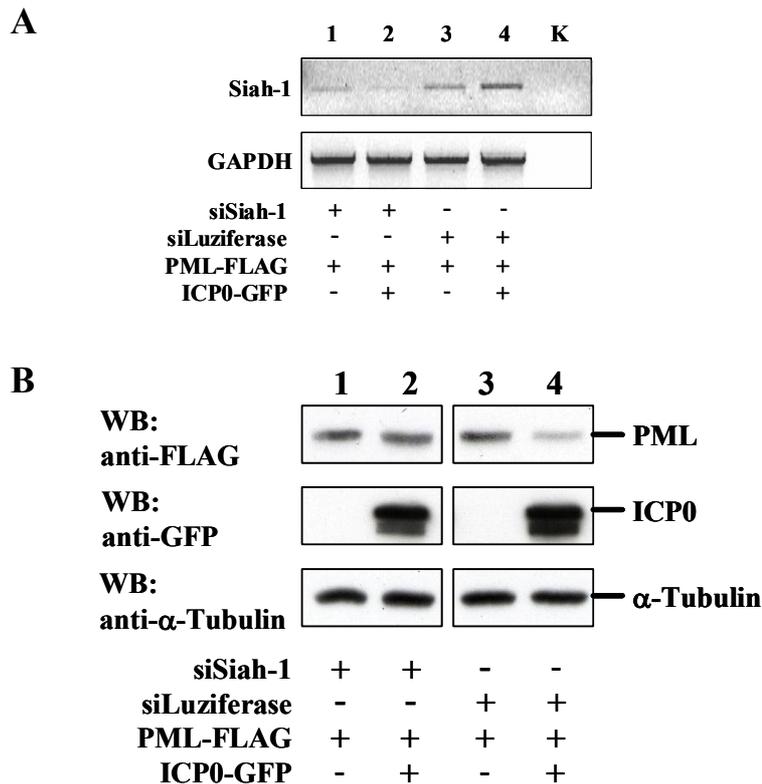


Abbildung 32: Einfluss von Siah-1 auf den HSV-2 ICP0-vermittelten PML-Abbau. VERO-Zellen wurden mit Lentiviren, welche eine siKassette gegen Siah-1 (Spur 1 und 2) oder Luziferase (Spur 3 und 4) exprimieren transduziert. Nach 4 Tagen wurden die Ansätze mit PML-FLAG und ICP0-GFP in den angegebenen Kombinationen transient transfiziert und nach weiteren 24h lysiert. Die Ansätze wurden zur Analyse der Genexpression (A) und Proteinexpression (B) aufgeteilt. (A) Für die Untersuchung der Genexpression wurde gesamtzelluläre-RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Die Siah-1 spezifische cDNA wurde mit den Primern P206/P207 mittels PCR amplifiziert und durch Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Als interne Kontrolle diente die Amplifikation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) spezifischer cDNA. K: PCR-Negativkontrolle; (B) Die Proteinexpression von PML und ICP0 wurde unter Verwendung der angegebenen Antikörper im Immunblot sichtbar gemacht. Der Nachweis von α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

6 DISKUSSION

Herpes Simplex Viren (HSV) sind weltweit stark verbreitet und verursachen neben den meist relativ harmlosen Hautläsionen auch schwerwiegende Erkrankungen wie Enzephalitiden und Meningitiden. Ein charakteristisches Merkmal der Viren ist die Fähigkeit, lebenslang latent im Wirtsorganismus zu persistieren (Jones, 1998). Die Genexpression von Herpes Simplex Viren ist kaskadenartig reguliert (Roizman und Knipe, 2001), wobei zuerst die sehr frühen Genprodukte exprimiert werden. Im zeitlichen Verlauf erfolgt daraufhin die Expression der frühen und späten Genprodukte.

Für eine erfolgreiche Virusreplikation und Ausbildung der Latenz ist es für Herpesviren unerlässlich, den zellulären Stoffwechsel für die eigene Replikation umzuprogrammieren und die antivirale Immunantwort zu unterdrücken. Hierfür hat das Herpes Simplex Virus mehrere unterschiedliche Strategien entwickelt. Zum einen ist das Tegumentprotein Vhs (*Virus host shutoff*) unmittelbar nach der Infektion in der Lage, unspezifisch mRNA zu degradieren (Smiley, 2004). Dabei werden hauptsächlich zelluläre mRNAs abgebaut, es kommt aber auch zur Destabilisierung viraler mRNAs, was vermutlich als Regulationsmechanismus dem Übergang von der frühen in die späte Replikationsphase dient. Ein weiterer Mechanismus wird durch das sehr frühe Genprodukt ICP47 vermittelt, welches durch die Bindung an die zellulären Proteine TAP1/TAP2 eine Präsentation von viralen Antigenen an der Zelloberfläche unterdrückt (Fruh et al., 1995; Hill et al., 1995; York et al., 1994). Weiterhin sind für die effiziente Virusreplikation zahlreiche Interaktionen zwischen viralen und zellulären Faktoren nötig. Hierbei spielt das in dieser Dissertation untersuchte multifunktionelle Regulatorprotein ICP0 eine wichtige Rolle.

Durch seine E3-Ligase-Funktion ist ICP0 in der Lage, eine Vielzahl von zellulären Proteinen proteasomal abzubauen (Boutell et al., 2002). Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit ist der Abbau von PML und Sp100, zwei Hauptbestandteilen der so genannten PML-Kerndomänen (Everett et al., 1998a; Muller und Dejean, 1999; Everett und Maul, 1994). Die Expression von ICP0 allein ist ausreichend, um eine proteasomale Degradation der beiden Proteine zu vermitteln, welche im Fall von PML in einer Auflösung der PML-Kerndomänen resultiert (Everett und Maul, 1994). Da PML und Sp100 Bestandteile der IFN-basierten zellulären antiviralen Abwehr sind (Taylor et al., 2000), ist anzunehmen, dass es sich hierbei um einen weiteren Mechanismus handelt, durch den das Virus der zellulären Immunantwort entgeht. Scheinbar hat das Virus durch die Auflösung dieser Komponenten einen erheblichen Replikationsvorteil. Essenziell für den Abbau von PML und Sp100 sind die ICP0 RING-

Domäne und ein intaktes Ubiquitin-Proteasomen-System (Everett, 1989; Everett et al., 1995; Boutell et al., 2002). Der genaue Mechanismus der Degradation des PML- und Sp100-Proteins durch die E3-Ligase ICP0 konnte jedoch bisher noch nicht aufgeklärt werden. PML-spezifische *in vitro* Studien zeigten weder eine direkte Interaktion mit ICP0, noch eine für den proteasomalen Abbau wichtige direkte Polyubiquitylierung von PML durch dieses virale Regulatorprotein (Boutell et al., 2003). Der Schluss liegt deshalb nahe, dass an der ICP0-abhängigen Degradation von PML, und vermutlich auch von Sp100 weitere Faktoren beteiligt sind, oder dass der Abbau indirekt aus einer anderen ICP0-Funktion resultiert. In der vorliegenden Dissertation sollten Wechselwirkungen zwischen dem herpesviralen ICP0 und Bestandteilen der PML-Kerndomänen näher untersucht werden. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Identifizierung neuer zellulärer Faktoren, die eine Funktion im ICP0-vermittelten Abbau der PML-Kerndomänenkomponenten PML und Sp100 ausüben könnten.

In den gezeigten Experimenten wurde mit dem ICP0-Homolog des Herpes Simplex Virus Typ 2 gearbeitet. Auf Grund der Tatsache, dass in der Literatur hauptsächlich HSV-1 ICP0 untersucht wurde, musste als Grundlage für die vorliegende Arbeit überprüft werden, ob auch HSV-2 ICP0 in der Lage ist, zelluläres PML abzubauen. Mittels indirekter Immunfluoreszenz und biochemischer Analysen konnte dies bestätigt werden. Die Kolo-kalisation von ICP0 in PML-Kerndomänen und der Abbau von PML durch ICP0 waren in allen getesteten Zelllinien zu beobachten. Interessanterweise konnte auch bei einer Mutante von ICP0, in der das Kernlokalisationssignal deletiert worden war, und die eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation zeigte, eine Degradation von nukleärem PML beobachtet werden. Dies gibt einen starken Hinweis darauf, dass der Abbau von PML unabhängig von der Lokalisation von ICP0 ist, und wahrscheinlich die Beteiligung zusätzlicher löslicher Faktoren erfordert. Eine weitere Erklärung könnte auch in der Tatsache liegen, dass PML selbst als *Shuttle*-Protein beschrieben wurde (Everett und Maul, 1994; Stuurman et al., 1997), und somit in der Lage ist, sich zwischen Zellkern und Zytoplasma zu bewegen. Hierbei könnte PML von zytoplasmatischem ICP0 ins Zytoplasma rekrutiert und dort degradiert werden.

Da ICP0 mit diversen anderen Bestandteilen der PML-Kerndomänen interagiert und diese teilweise abgebaut, wurde darauf aufbauend der Einfluss von ICP0 auf HIPK-2 untersucht. HIPK-2 ist eine zelluläre Serin/Threonin-Kinase, für die eine Rolle in der Regulation der Transkription und Apoptose beschrieben wurde (Kim et al., 1998; Hofmann et al., 2002). Nach UV-Bestrahlung wird HIPK-2 in die PML-Kerndomänen rekrutiert (Trost et al., 2000;

Engelhardt et al., 2001) und ist durch Interaktion mit p53 an der Induktion der UV-induzierten Apoptose beteiligt (Hofmann et al., 2002; D'Orazi et al., 2002). Wie PML wird auch HIPK-2 posttranslational SUMO-1 modifiziert. Auf Grund der Gemeinsamkeiten mit PML erschien auch ein Einfluss von ICP0 auf HIPK-2 möglich. Die Koexpression von ICP0 und HIPK-2 zeigten allerdings weder in indirekten Immunfluoreszenzanalysen, noch in biochemischen Untersuchungen eine Wechselwirkung der beiden Proteine. Es ließ sich weder eine Veränderung der Lokalisation von HIPK-2 nach ICP0 Exposition beobachten, noch ein Abbau von HIPK-2 durch die ICP0 E3-Ligasefunktion. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei HIPK-2 um ein weiteres Substrat der E3-Ligase ICP0 handelt. Folglich scheint ICP0 keinen universellen Einfluss auf PML-Kerndomänenbestandteile zu haben, was die Spezifität der Interaktion zwischen ICP0 und PML bestätigt.

Eine Veröffentlichung von Fanelli et al. (2004) gab Hinweise auf einen zellulären Faktor, welcher an der PML-Degradation beteiligt sein könnte. Das Siah-1-Protein wurde in dieser Publikation als Interaktionspartner und E3-Ligase von PML beschrieben, da es nach Überexpression in der Lage war, PML abzubauen und damit die Anzahl der PML Kerndomänen erheblich zu reduzieren (Fanelli et al., 2004). Durch die Tatsache, dass Siah-1 einen direkten Einfluss auf PML ausübte, stellte sich in der vorliegenden Arbeit die Frage, ob virales ICP0 die PML-Degradation mit Hilfe von Siah-1 vermitteln kann. Daraufhin sollte zunächst eine potenzielle Interaktion zwischen viralem ICP0 und zellulärem Siah-1 näher charakterisiert werden.

Bei Siah-1 handelt es sich um ein Säugetierhomolog des *seven in absentia (sina)* Gens aus *Drosophila melanogaster* (Hu et al., 1997a). Sina ist entscheidend für die Augen-entwicklung der Fliege, in dem es, zusammen mit dem Protein Phyllopod, die proteasomale Degradation des transkriptionalen Repressors Tramtrack induziert (Carthew und Rubin, 1990; Li et al., 1997; Tang et al., 1997). Siah-1 wird in sehr vielen Geweben exprimiert, unter anderem im Gehirn und im zentralen Nervensystem, in dem auch Herpes Simplex Viren persistieren (Hu et al., 1997a; Nagano et al., 2003; Wheeler et al., 2002). Nach Überexpression zeigt Siah-1 meist eine zytoplasmatische Lokalisation (Hu et al., 1997a; Wheeler et al., 2002), es wurde aber auch eine gesamtzelluläre Verteilung in punktförmigen Substrukturen beschrieben (Boehm et al., 2001). Wie ICP0 spielt Siah-1 durch seine E3-Ligaseaktivität, die in beiden Proteinen über die N-terminale RING-Domäne vermittelt wird, eine wichtige Rolle im Ubiquitin-Proteasomen-abhängigen Abbau von Proteinen (Hu et al., 1997b). Siah-1 wurde als

Einzel-E3-Ligase oder als Bestandteil eines Multikomplexes aus Siah-1, SIP (*Siah Interacting Protein*), Skp1, Ebi und APC (*Adenomatosis Polyposis Colon*) beschrieben (Matsuzawa und Reed, 2001; Santelli et al., 2005). Über die RING-Domäne interagiert Siah-1 mit dem E2-konjugierenden Enzym, die Substratbindung erfolgt über den C-Terminus, welcher als Substrat-Binde-Domäne definiert wurde (Hu und Fearon, 1999). Auf Grund der p53-abhängigen Regulation von Siah-1 und dem daraus resultierenden Abbau zahlreicher Faktoren, scheint Siah-1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose auszuüben (Matsuzawa und Reed, 2001; Nemani et al., 1996; Fiucci et al., 2004; Maeda et al., 2002; Roperch et al., 1999; Amson et al., 1996). Des Weiteren wurde kürzlich berichtet, dass das latente Membranprotein-1 (LMP-1) des Epstein-Barr-Virus (EBV) durch Einfluss auf zelluläre Signalwege, in der Lage ist, die Siah-1-Genexpression zu verringern (Jang et al., 2005).

In Koimmunpräzipitationsstudien zwischen Siah-1 und ICP0 konnte hier gezeigt werden, dass nach Überexpression eine spezifische Interaktion der beiden Proteine *in vivo* erfolgte. Auch endogenes Siah-1 konnte mit ICP0 kopräzipitiert werden. Auf Grund der starken Autodegradation von Siah-1 (Hu und Fearon, 1999) wurde, um eine ausreichende Siah-1-Expression in diesen Experimenten zu gewährleisten, der niedermolekulare Proteasomeninhibitor MG132 eingesetzt. Ferner konnten durch Verwendung von Siah-1 und ICP0-Deletionsmutanten die jeweiligen Domänen, die für diese Wechselwirkung verantwortlich sind, identifiziert werden. In ICP0 wurden die Aminosäuren an Position 182-490 als essenziell für die Interaktion mit Siah-1 ermittelt. Eine Ausnahme bildeten zwei ICP0-Mutanten, die diesen Bereich nur teilweise enthielten. ICP0 Δ 183-352 und ICP0 Δ 354-489 waren in der Lage mit Siah-1 zu interagieren. Scheinbar ist die Expression einer Teildomäne des Aminosäurebereiches 182-490 ausreichend, um die für die Interaktion entscheidende Struktur aufrecht zu erhalten. Erst die komplette Deletion des Aminosäurebereiches 183-489 von ICP0 verhinderte die Interaktion mit Siah-1. Dieser Bereich enthält unter anderem mit nur einer Abweichung ein Aminosäure-Sequenzmotiv, das in der Literatur als Konsensus-Bindesequenz in vielen Siah-1 Interaktionspartnern beschrieben wurde (siehe Abbildung 33; House et al., 2003).

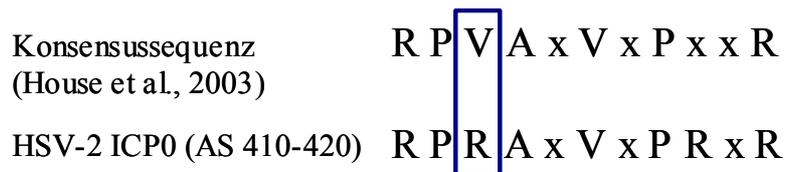


Abbildung 33: Bindemotiv des HSV-2 ICP0 für Siah-1 Interaktion. Dargestellt ist ein Vergleich einer Konsensussequenz, welche in einigen Interaktionspartnern als entscheidend für die Bindung von Siah-1 beschrieben wurde, und der ICP0-Sequenz in der identifizierten Bindedomäne. x steht für eine beliebige Aminosäure.

Des Weiteren wurde in der Literatur dieselbe ICP0-Domäne als essenziell für die Bindung eines weiteren Interaktionspartners, CIN85 beschrieben (Liang et al., 2005). Die Interaktion von ICP0 mit CIN85 resultiert in einer Inhibition der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen assoziierten Signalwege und repräsentiert somit durch die Unterdrückung der antiviralen Zellantwort einen weiteren wichtigen Einfluss von ICP0 in der Virusreplikation (Liang et al., 2005; Narita et al., 2005).

Diese Übereinstimmungen sind ein weiteres Indiz für eine spezifische Interaktion zwischen ICP0 und Siah-1. Auch die Identifizierung der Domäne von Siah-1, die essenziell für die Komplexbildung ist, steht in der Übereinstimmung mit der Literatur. Der vollständige C-Terminus (Aminosäuren an Position 141-282), welcher als Substrat-Binde-Domäne beschrieben wurde (Hu und Fearon, 1999), ist notwendig für die Kopräzipitation von Siah-1 und ICP0. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals ein viraler Interaktionspartner von Siah-1 beschrieben werden. Die gezeigten Kopräzipitationsstudien wurden *in vivo* aus Zelllysaten durchgeführt. Daher kann aus den Ergebnissen nicht auf eine direkte Interaktion zwischen ICP0 und Siah-1 geschlossen werden. Es könnten weitere zelluläre Faktoren, welche im Zelllysate vorhanden sind, an der Komplexbildung beteiligt gewesen sein. Hinweise auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine könnte die zukünftige Untersuchung rekombinant hergestellter Proteine in einem zellfreien System liefern.

Auf Grund der Tatsache, dass es sich sowohl bei ICP0, als auch bei Siah-1 um RING-E3-Ligasen handelt, wurde als nächstes der wechselseitige Einfluss auf die Expression der beiden Proteine untersucht. Durch Überexpression der zwei Proteine in Transfektionsstudien und biochemischen Analysen konnte eine dosisabhängige Stabilisierung von Siah-1 durch ICP0 gezeigt werden. Mit Hilfe eines unabhängigen Kontrollkonstruktes konnte ferner ausgeschlossen werden, dass die Stabilisierung von Siah-1 durch die Wirkung von ICP0 auf den CMV Promotor des zur Siah-1-Überexpression genutzten Konstruktes zustande kam. Des

Weiteren wurde auch ein stabilisierender Einfluss von ICP0 auf das HA-Epitop des Siah-1-Expressionskonstruktes nicht bestätigt. Durch Verwendung von ICP0-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die Stabilisierung von Siah-1 abhängig von den ICP0 Aminosäuren an Position 182-490 war. Dieser Aminosäurebereich ist ebenso für die Interaktion von ICP0 und Siah-1 essenziell. Scheinbar resultiert die Interaktion zwischen Siah-1 und ICP0 in einer stabilen Expression von Siah-1. Die Siah-1-Stabilisierung konnte auch in indirekten Immunfluoreszenzanalysen bestätigt werden, die außerdem eine Kolo-kalisation zwischen ICP0 und Siah-1 zeigten. Die beiden Proteine akkumulierten in den charakteristischen punktartigen ICP0-Strukturen und waren stets in dem jeweiligen zellulären Kompartiment zu beobachten, in dem auch ICP0 exprimiert wurde. Anscheinend war ICP0 in der Lage, durch seine Interaktion auch die Lokalisation von Siah-1 zu beeinflussen. Eine ähnliche Rekrutierung durch ICP0 wurde auch für den viralen Interaktionspartner ICP4 beschrieben (Mullen et al., 1995). Nach Koexpression von ICP4 und ICP0 beziehungsweise zytoplasmatischen Mutanten von ICP0 korrelierte die subzelluläre Lokalisation von ICP4 stets mit der von ICP0 in dessen charakteristischen punktförmigen Anhäufungen. Um Artefakte durch Überexpression von ICP0 auszuschließen, sollte die Stabilisierung von Siah-1 durch ICP0, welches unter natürlichen Bedingungen vom herpesviralen Genom exprimiert wurde, verifiziert werden. Hierzu wurden Infektionsexperimente mit Herpes Simplex Virus Typ 2 in Siah-1-transfizierten VERO-Zellen durchgeführt. Auch im viralen Kontext konnte durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen eine Steigerung der Siah-1-Expression in infizierten Zellen sichtbar gemacht werden. Ebenso wie nach ICP0-Transfektion konnte auch nach HSV-2 Infektion eine nukleäre, punktförmige Siah-1-Akkumulierung beobachtet werden. Dieses Muster ähnelte deutlich dem von ICP0, welches mangels verfügbaren Antikörpers in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden konnte. Dieser Befund gibt einen weiteren Hinweis auf die subzelluläre Kolo-kalisation der beiden Proteine. Die HSV-2 Infektionsexperimente zeigten außerdem, dass es sich bei der Stabilisierung von Siah-1 um einen natürlich bei der Virusinfektion vorkommenden Effekt handelt, welcher nicht durch andere virale Proteine unterdrückt wird.

ICP0 wurde als Aktivator der Genexpression beschrieben. Deshalb wäre es möglich, dass die vermehrte Expression von Siah-1 durch eine Wirkung von ICP0 auf den Siah-1 Promotor zustande kommt. Zur Klärung dieser Frage wurde der Einfluss von ICP0 auf die endogene Siah-1-Genexpression überprüft. Nach Überexpression von sowohl ICP0, als auch einer RING- und NLS-defizienten Mutante von ICP0 in HeLa- und 293T-Zellen, konnte keine

Veränderung der Siah-1-Genexpression beobachtet werden. Weitere hypothetische posttranskriptionale Einflüsse von ICP0, die zu einer Stabilisierung von Siah-1 führen könnten, wurden hier nicht untersucht.

Da eine positive transaktivierende Wirkung von ICP0 auf die Siah-1-Genexpression ausgeschlossen werden konnte, wurde die Stabilisierung des Siah-1-Proteins durch ICP0-Expression nach *de novo* Synthese mittels *Pulse-Chase* Experimenten untersucht. Es konnte eine deutliche Stabilisierung des neu synthetisierten Siah-1-Proteins gezeigt werden. Tatsächlich verursachte die Überexpression von ICP0 eine Verlängerung der Siah-1 Halbwertszeit um das etwa Dreifache.

Diese Ergebnisse sprechen für eine spezifische Stabilisierung von Siah-1 durch ICP0 auf Proteinebene, welche aus einer Interaktion der beiden Proteine resultiert. Der zu Grunde liegende Mechanismus dieser Stabilisierung wurde nicht näher analysiert. Eine Erklärung für den Stabilisierungseffekt könnte darin liegen, dass ICP0 durch Bindung die Autodegradation von Siah-1 inhibiert, und es somit zu einer erhöhten Anhäufung von Siah-1 innerhalb der Zelle kommt. Für zwei weitere Siah-1 Interaktionspartner, Disabled-1 und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) wurde nach deren Überexpression ebenfalls ein stabilisierender Effekt auf Siah-1 nachgewiesen (Park et al., 2003; Hara et al., 2005). Dabei bewirkt die Stabilisierung von Siah-1 durch GAPDH interessanterweise eine ähnliche Verlängerung der Halbwertszeit, wie in den hier beschriebenen Experimenten. Außerdem kam es durch Anwesenheit von GAPDH zu einem erhöhten Abbau der untersuchten Siah-1-Substrate (Hara et al., 2005).

Bei der Durchführung der Experimente zur Stabilisierung von Siah-1 wurde die auffällige Beobachtung gemacht, dass die detektierbare Menge an ICP0-Protein nach Koexpression mit Siah-1 abnimmt. Da für Siah-1 E3-Ligaseaktivität beschrieben wurde (Hu et al., 1997b), könnte es sich bei ICP0 um ein neues Substrat von Siah-1 handeln. Diese Annahme wurde mit Hilfe biochemischer Methoden untersucht. Es konnte dabei tatsächlich ein dosisabhängiger Abbau von ICP0 durch Siah-1 gezeigt werden, wofür die Siah-1 RING-Domäne entscheidend war. Des Weiteren wurde durch Verwendung des Proteasomeninhibitors MG132 bestätigt, dass der Abbau durch ein intaktes Ubiquitin-Proteasomen-System vermittelt wird. Die Auswertung dieser Experimente führte zur Identifizierung von ICP0 als neues Substrat der

E3-Ligase Siah-1. Mit ICP0 handelt es sich hiermit um das erste bekannte virale Siah-1-Zielprotein, was die Existenz eines neuen antiviralen Wirtszellmechanismus andeuten könnte.

Es stellte sich somit die Frage, ob Siah-1 durch den Abbau von ICP0 Einfluss auf die E3-Ligasefunktion von ICP0 nehmen kann. Um dies zu beantworten, wurde das ICP0 Substrat Sp100 ausgewählt. Sp100 lokalisiert ebenso wie PML permanent in den PML-Kerndomänen (Szostecki et al., 1990) und wurde sowohl als positiver, als auch als negativer Regulator der Genexpression charakterisiert (Seeler et al., 1998; Zong et al., 2000). Eine weitere Gemeinsamkeit mit PML ist die posttranslationale Modifikation mit SUMO-1 (Sternsdorf et al., 1999). Der ICP0-vermittelte Abbau von Sp100 findet in den Proteasomen statt und ist abhängig von der ICP0 RING-Domäne (Everett und Maul, 1994; Chelbi-Alix und de The, 1999). Auch für Sp100 wurde wie für PML weder eine direkte Interaktion mit ICP0 noch eine direkte Ubiquitylierung durch ICP0 beschrieben. Den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen zufolge ist Sp100 kein Substrat für Siah-1, und damit geeignet, den Einfluss von Siah-1 auf die ICP0 E3-Ligasefunktion zu testen. Es konnte in den entsprechenden Versuchen eindeutig eine dosisabhängige Korrelation zwischen einer Abnahme der ICP0-Expression und einer Zunahme der Sp100-Expression gezeigt werden. Je mehr Siah-1 in Zellen vorhanden war, desto mehr ICP0 wurde abgebaut. Folglich war der ICP0-vermittelte Sp100-Abbau inhibiert, was sich in der steigenden Expression von Sp100 widerspiegelte. Aus diesem Ergebnis lässt sich deshalb schlussfolgern, dass Siah-1 in der Lage ist, die E3-Ligasefunktion von ICP0 zu kontrollieren.

Basierend auf der Interaktion von Siah-1 mit ICP0 konnten zwei gegensätzliche Beobachtungen gemacht werden. Einerseits findet eine starke Stabilisierung von Siah-1 in Anwesenheit von ICP0 statt. Andererseits wird ICP0 durch die E3-Ligaseaktivität von Siah-1 abgebaut, was wie am Beispiel von Sp100 gezeigt, eine Inhibition der ICP0-E3-Funktion bewirkt. Da diese Beobachtungen in überexprimierenden Systemen gemacht wurden, stellt sich die Frage, welche Relevanz diese Wechselwirkungen *in vivo* besitzen.

Ein ähnliches Phänomen wurde für den ICP0 Interaktionspartner USP7 (*Ubiquitin Specific Protease 7*) beschrieben (Boutell et al., 2005). USP7 ist in der Lage, konjugiertes Ubiquitin von Zielproteinen abzuspalten und somit den proteasomalen Abbau zu inhibieren (Wilkinson, 1995). Für ICP0 und USP7 ist eine direkte Bindung beschrieben worden, die einerseits zur proteasomalen Degradation von USP7 durch ICP0 führt. Auf der anderen Seite verhindert USP7 durch Deubiquitylierung die Autodegradation von ICP0, was zu einer stabilen

Expression von ICP0 in der Zelle führt. Boutell et al. (2005) haben diese gegensätzlichen Eigenschaften durch Verwendung von HSV-Mutanten, welche USP7 bindungsdefizientes ICP0 exprimierten, im Verlauf der herpesviralen Infektion untersucht. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Regulation der ICP0-Expression durch USP7 während der Infektion über den Abbau von USP7 durch ICP0 dominiert. Diese Beobachtung erscheint sinnvoll, besonders in Betracht der ICP0-Funktion während der Reaktivierung der latenten Virusgenome. Hier führt die stabile Expression von ICP0 in Abhängigkeit von der USP7-Bindung zu einer effizienten Reaktivierung und Replikation (Everett et al., 1999b). Der Abbau von USP7 durch ICP0 scheint während des Infektionsverlaufes einen Nebeneffekt darzustellen.

Ein ähnliches Szenario wäre auch für die Interaktion zwischen Siah-1 und ICP0 denkbar. Erst durch Stabilisierung und im Zusammenspiel mit Siah-1 wird eine effiziente E3-Ligasefunktion von ICP0 ermöglicht. Dabei könnte durch die Bindung von ICP0 an USP7 auch zusätzlich an ICP0 gebundenes Siah-1 durch USP7 deubiquitinyliert werden. Als Folge käme es zu einer Blockierung der Siah-1 Destabilisierung, was eine verstärkte Siah-1-Expression erklären könnte.

Um die Bedeutung der Stabilisierung von Siah-1 durch ICP0 weiter aufzuklären, wurde der Einfluss von Siah-1 auf den ICP0-vermittelten PML-Abbau untersucht. Diverse Hinweise sprechen für eine mögliche Funktion von Siah-1 im Abbau von PML. Die Tatsache, dass die Degradation von PML im Zellkern, wie zuvor beschrieben, unabhängig von der subzellulären Lokalisation von ICP0 ist, lässt vermuten, dass weitere Faktoren am Abbau von PML durch ICP0 beteiligt sind. Wie bereits erwähnt, bestärken die Beobachtungen, dass keine direkte Interaktion und keine direkte Ubiquitinylierung von PML durch ICP0 stattfindet, diese Vermutung. Des Weiteren konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass eine Siah-1 bindungsdefiziente Mutante von ICP0 nicht mehr in der Lage ist PML zu degradieren, und dass ICP0, PML und Siah-1 in einem Komplex kopräzipitiert werden können. Dies stimmt mit dem Befund überein, dass Siah-1 als E3-Ligase für PML beschrieben wurde, welche einen Proteasomen-abhängigen Abbau von PML vermittelt (Fanelli et al., 2004).

Eine Möglichkeit, die Beteiligung von Siah-1 am ICP0-vermittelten PML-Abbau zu untersuchen, besteht darin, die endogene Siah-1-Expression mittels RNAi zu inhibieren und zu überprüfen, ob unter diesen Bedingungen ICP0 weiterhin in der Lage ist, PML zu

degradieren. Entsprechende Experimente mit lentiviralen Vektoren, welche Siah-1-spezifische siRNAs exprimierten, zeigten, dass der ICP0-vermittelte PML-Abbau stark gehemmt ist. Dieses Ergebnis spricht deutlich für eine essenzielle Beteiligung von Siah-1 am ICP0-vermittelten PML-Abbau. Dabei bleibt offen, ob es sich mit Siah-1 um ein einzelnes Bindeglied zwischen ICP0 und PML handelt, oder ob zusätzliche Faktoren an der Wechselwirkung zwischen ICP0 und PML beteiligt sind. Da Siah-1 unter anderem als Untereinheit eines Multienzymkomplexes beschrieben wurde (Matsuzawa und Reed, 2001), wäre es von Interesse, die Wirkung weiterer Komponenten dieses Komplexes auf den ICP0-vermittelten PML-Abbau zu testen. Des Weiteren würde eine Untersuchung des Einfluss von Siah-1 auf andere Substrate von ICP0 Aufschluss über die Spezifität dieses Mechanismus der PML-Degradation geben. Außerdem stellt sich die wichtige Frage, ob die Siah-1-Hemmung auch im viralen Kontext zu einer Blockade des ICP0-abhängigen PML-Abbaus führt.

Die zuvor diskutierten Ergebnisse sind in folgendem Modell zusammengefasst (Abbildung 34).

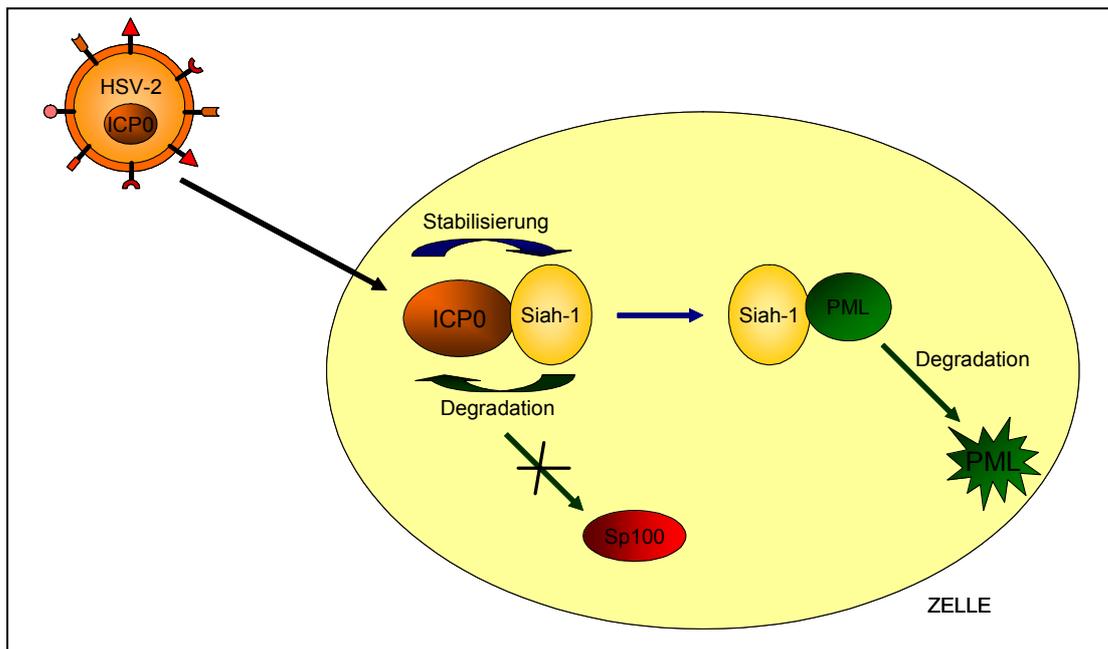


Abbildung 34: Modell zur Funktion der Interaktion zwischen dem viralen ICP0-Protein und zellulärem Siah-1. Nach HSV-2 Infektion findet eine Interaktion zwischen viralem ICP0 und zellulärem Siah-1 statt, welche auf der einen Seite in einer Stabilisierung von Siah-1, auf der anderen Seite in einem Abbau von ICP0 resultiert. Durch den Abbau von ICP0 kann Siah-1 direkten Einfluss auf die E3-Ligasefunktion von ICP0 nehmen, was sich in einer Hemmung des ICP0-vermittelten Abbaus von Sp100 äußert. Durch die Stabilisierung von Siah-1 wird andererseits ein Siah-1-vermittelter Abbau des zellulären PML ermöglicht, was zu einer Auflösung der PML-Kerndomänen führt.

Es ist nun zu klären, welche Bedeutung diese Wechselwirkungen von Viruskomponenten und Wirtszellfaktoren haben. Finden beispielsweise die Stabilisierung von Siah-1 durch ICP0 und der Abbau von ICP0 durch Siah-1 gleichzeitig statt oder handelt es sich um ein zeitlich reguliertes Wechselspiel im Verlauf der Infektion? Welche Vorteile bringt diese Interaktion für das Virus oder die Zelle? Aus Sicht des Virus scheint die Zerstörung der PML-Kerndomänen die Blockierung antiviraler Mechanismen der Zelle zu bewirken und auf diese Weise vorteilhaft im Bezug auf die virale Replikation zu sein. Dabei könnte eine Stabilisierung von Siah-1 essenziell für den Abbau von PML und folglich für die Auflösung der PML-Kerndomänen sein. Es wäre denkbar, dass PML-Kerndomänen als Depot für Proteine fungieren, welche zur herpesviralen Replikation benötigt werden. Durch die Zerstörung der PML-Kerndomänen wäre eine Freisetzung dieser Faktoren sichergestellt. Des Weiteren könnten Faktoren, die in PML-Kerndomänen lokalisiert sind, auch einen reprimierenden Einfluss auf die virale Genexpression oder Replikation ausüben. Dabei wäre eine Chromatin-ähnliche Verpackung der in räumlicher Nähe lokalisierenden Virusgenome möglich. Durch die Auflösung der PML-Kerndomänen könnten diese Proteine unschädlich gemacht werden.

Umgekehrt könnte es sich bei der Siah-1 induzierten Degradation von ICP0 um eine antivirale Strategie der infizierten Zelle handeln. Diese könnte auf diese Weise das multifunktionelle ICP0 inaktivieren. Angesichts der erfolgreichen HSV-2 Evolution und Verbreitung ist es allerdings fraglich, ob der Abbau von ICP0 wirklich dem Zweck der Eliminierung des Virus dient. Vielmehr wäre denkbar, dass während des Infektionszyklus zu einem bestimmten Zeitpunkt gezielt der Siah-1-vermittelte Abbau von ICP0 induziert wird, und dies möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Regulation der Viruslatenz spielt. Dies ist vorstellbar, da Herpes Simplex Viren ihre Latenz in Zellen des zentralen Nervensystems, den Ganglien, etablieren, und Siah-1 auch in Geweben des zentralen Nervensystems exprimiert wird (Nagano et al., 2003). Ähnlich wie für das *Drosophila* Homolog Sina, für das eine Funktion in der Entwicklung der Augenphotorezeptoren beschrieben wurde, wäre es möglich, dass außer PML noch andere Zielstrukturen von Siah-1 in Nervenzellen entscheidend für die HSV-Replikation sind.

Trotz zahlreicher Untersuchungen konnte bisher noch nicht geklärt werden, welche spezifischen Funktionen PML und der ICP0-vermittelte PML-Abbau in der Herpes Simplex Virus Replikation besitzen. Durch den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Kofaktor Siah-1 wurde diesbezüglich eine neue Grundlage für zukünftige Untersuchungen geschaffen.

Bisher wurde die PML-Funktion hauptsächlich unter Verwendung von ICP0-defizienten Viren analysiert, wobei durch die Deletion von ICP0 dessen sämtliche Funktionen in der viralen Replikation ausfallen. Durch konstitutive Hemmung der zellulären Siah-1-Expression, wäre es möglich, die multiplen Funktionen von ICP0 im Viruskontext zu gewährleisten und trotzdem einen PML-Abbau zu verhindern. Dadurch könnte ein weitreichender Einblick in die PML-Funktion während der Virusreplikation erhalten werden.

Ein weiterer Aspekt ist die Frage nach der potenziellen therapeutischen Relevanz dieser neu aufgeklärten Wechselwirkung zwischen Siah-1 und viralem ICP0. Bisher besteht die Haupttherapie bei Herpes Simplex Virus Infektionen in der Gabe von Nukleosidanaloga. Das bekannteste Beispiel hierfür ist Acyclovir, bei dem es sich um ein Guanosin analog handelt. Die Nukleosidanaloga werden im ersten Schritt von der viralen Thymidinkinase monophosphoryliert. Nach zusätzlicher Phosphorylierung durch zelluläre Kinasen werden die triphosphorylierten Nukleosidanaloga durch die virale DNA-Polymerase in die neu synthetisierten Virusgenome eingebaut. Auf Grund einer fehlenden Hydroxygruppe der Nukleosidanaloga findet ein Kettenabbruch in der DNA-Synthese statt, der zum Erliegen der viralen DNA-Replikation führt. Bei dieser Therapie handelt es sich um eine sehr spezifische Inhibition der viralen Replikation, da triphosphorylierte Nukleosidanaloga bevorzugt als Substrat von der viralen DNA-Polymerase genutzt werden. Außerdem haben die Nukleosidanaloga keinen Einfluss auf uninfizierte Zellen, da ausschließlich die virale Thymidinkinase in der Lage ist, die initiale Phosphorylierung auszuführen. Wie bei nahezu allen antiviralen Therapien ist auch für die Behandlung mit Nukleosidanaloga die Bildung resistenter Viren beschrieben worden. Ein neuer therapeutischer Ansatz könnte möglicherweise durch die Überexpression von Siah-1 in HSV-infizierten Zellen bereitgestellt werden. Durch die Überexpression von Siah-1 mit gentherapeutischen Methoden sollte es möglich sein, dass sich das Gleichgewicht der Wechselwirkungen der beiden Proteine zugunsten des Abbaus von ICP0 durch Siah-1 verschiebt. Sollte dies gelingen, wären weitere ICP0-Funktionen blockiert und die virale Replikation käme zum Erliegen. In diesem Zusammenhang müssten zuerst die Folgen einer Siah-1-Überexpression auf weitere Siah-1 Substrate und auf den Zellmetabolismus geklärt werden. Außerdem darf dabei nicht außer Acht gelassen werden, dass ICP0-defiziente Viren in Zellkultur in bestimmten Zelllinien und nach Einsatz sehr hoher Infektionsdosen replizieren können (Everett, 1989; Yao und Schaffer, 1995). ICP0 scheint erst bei niedrigen Infektionsdosen eine entscheidende Funktion in der Virusreplikation auszuüben. Daher ist es fraglich, ob eine therapeutisch ausreichende

Inhibition der Herpes Simplex Virus Replikation durch Überexpression von Siah-1 gewährleistet werden kann, wenn dadurch ausschließlich die ICP0-Funktion gehemmt würde. Dafür wäre eine weitere Aufklärung der ICP0-Funktion *in vivo* erforderlich. Von Interesse für diesen Gesichtspunkt wäre auch die Frage, ob ICP0 während der HSV-Infektion tatsächlich das einzige virale Protein ist, welches die Stabilisierung von Siah-1 vermitteln kann, oder ob diese Stabilisierung auch in Abwesenheit von ICP0 stattfinden kann.

Insgesamt konnte diese Dissertation durch die Identifizierung einer neuen Wechselwirkung zwischen zellulärem Siah-1 und viralem ICP0 einen weiteren Beitrag zum Verständnis der multiplen Virus-Wirtswechselwirkung bei Infektionen mit Herpes Simplex Viren liefern. Dabei konnten hauptsächlich molekulare Mechanismen aufgeklärt werden, denen nun weitere Untersuchungen bezüglich der Relevanz während der HSV-Infektion folgen müssen.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[³⁵ S]	Schwefelisotop der relativen Masse 35
°C	Grad Celsius
A	Ampère
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	<i>copy</i> DNA
Ci	Curie
CMV	Cytomegalievirus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ddNTP	Didesoxy-Nukleosidtriphosphat
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HIPK-2	<i>Homeodomain-Interacting Protein Kinase-2</i>
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
HveA	<i>HSV entry mediator A</i>
ICP	<i>Infected Cell Protein</i>
IE	<i>Immediate Early</i>
IFN	Interferon
IP	Immunpräzipitation

k	Kilo
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
M	Molar (mol/l)
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger Ribonucleicacid</i>
n	nano (10^{-9})
Nef	<i>Negativ factor</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
p	piko (10^{-12})
PAA	Polyacrylamid
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PML	<i>Promyelocytic Leukemia</i>
PolyA	Polyadenylierungsstelle
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RNA	<i>Ribonucleicacid</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
Sp100	<i>Speckled protein 100 kDa</i>

SUMO-1	<i>Small Ubiquitin-related Modifier-1</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
USP7	<i>Ubiquitin Specific Protease 7</i>
vgl.	vergleiche
Vhs	<i>Virus host shutoff</i>
VP16	<i>Virion Protein 16</i>
VSV-G	Vesicular Stomatitis Virus Glykoprotein
(v/v)	<i>Volume per volume</i>
wt	Wildtyp
(w/v)	<i>Weight per volume</i>

8 LITERATURVERZEICHNIS

Ackermann,M., Braun,D.K., Pereira,L., and Roizman,B. (1984). Characterization of herpes simplex virus 1 alpha proteins 0, 4, and 27 with monoclonal antibodies. *J Virol.* *52*, 108-118.

Advani,S.J., Hagglund,R., Weichselbaum,R.R., and Roizman,B. (2001). Posttranslational processing of infected cell proteins 0 and 4 of herpes simplex virus 1 is sequential and reflects the subcellular compartment in which the proteins localize. *J Virol.* *75*, 7904-7912.

Advani,S.J., Weichselbaum,R.R., and Roizman,B. (2000). The role of cdc2 in the expression of herpes simplex virus genes. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* *97*, 10996-11001.

Ahn,M.J., Langenfeld,J., Moasser,M.M., Rusch,V., and Dmitrovsky,E. (1995). Growth suppression of transformed human bronchial epithelial cells by all-trans-retinoic acid occurs through specific retinoid receptors. *Oncogene* *11*, 2357-2364.

Alves-Rodrigues,A., Gregori,L., and Figueiredo-Pereira,M.E. (1998). Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends Neurosci.* *21*, 516-520.

Amson,R.B., Nemani,M., Roperch,J.P., Israeli,D., Bougueleret,L., Le,G., I, Medhioub,M., Linares-Cruz,G., Lethrosne,F., Pasturaud,P., Piouffre,L., Prieur,S., Susini,L., Alvaro,V., Millasseau,P., Guidicelli,C., Bui,H., Massart,C., Cazes,L., Dufour,F., Bruzzoni-Giovanelli,H., Owadi,H., Hennion,C., Charpak,G., Telerman,A., and . (1996). Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* *93*, 3953-3957.

apRhys,C.M., Ciufu,D.M., O'Neill,E.A., Kelly,T.J., and Hayward,G.S. (1989). Overlapping octamer and TAATGARAT motifs in the VF65-response elements in herpes simplex virus immediate-early promoters represent independent binding sites for cellular nuclear factor III. *J. Virol.* *63*, 2798-2812.

Bence,N.F., Sampat,R.M., and Kopito,R.R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science (Wash. DC)* *292*, 1552-1555.

Beninga,J., Rock,K.L., and Goldberg,A.L. (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* *273*, 18734-18742.

Bercovich,B., Stancovski,I., Mayer,A., Blumenfeld,N., Laszlo,A., Schwartz,A.L., and Ciechanover,A. (1997). Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70. *J. Biol. Chem.* *272*, 9002-9010.

Bischof,O., Kim,S.H., Irving,J., Beresten,S., Ellis,N.A., and Campisi,J. (2001). Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J Cell Biol.* *153*, 367-380.

Blaho,J.A., Mitchell,C., and Roizman,B. (1994). An amino acid sequence shared by the herpes simplex virus 1 alpha regulatory proteins 0, 4, 22, and 27 predicts the nucleotidylation of the UL21, UL31, UL47, and UL49 gene products. *J Biol. Chem* *269*, 17401-17410.

- Boehm, J., He, Y., Greiner, A., Staudt, L., and Wirth, T. (2001). Regulation of BOB.1/OBF.1 stability by SIAH. *EMBO J* 20, 4153-4162.
- Borden, K.L. (1998). RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. *Biochem Cell Biol.* 76, 351-358.
- Borden, K.L. (2000). RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J. Mol. Biol.* 295, 1103-1112.
- Borden, K.L., Boddy, M.N., Lally, J., O'Reilly, N.J., Martin, S., Howe, K., Solomon, E., and Freemont, P.S. (1995). The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML. *EMBO J* 14, 1532-1541.
- Borden, K.L., Campbell Dwyer, E.J., and Salvato, M.S. (1998). An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J Virol.* 72, 758-766.
- Borden, K.L., Campbelldwyer, E.J., and Salvato, M.S. (1997). The promyelocytic leukemia protein PML has a pro-apoptotic activity mediated through its RING domain. *FEBS Lett.* 418, 30-34.
- Borden, K.L., Lally, J.M., Martin, S.R., O'Reilly, N.J., Solomon, E., and Freemont, P.S. (1996). In vivo and in vitro characterization of the B1 and B2 zinc-binding domains from the acute promyelocytic leukemia protooncoprotein PML. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 93, 1601-1606.
- Boutell, C., Canning, M., Orr, A., and Everett, R.D. (2005). Reciprocal activities between herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0, a ubiquitin E3 ligase, and ubiquitin-specific protease USP7. *J Virol.* 79, 12342-12354.
- Boutell, C. and Everett, R.D. (2003). The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) regulatory protein ICP0 interacts with and Ubiquitinates p53. *J Biol. Chem* 278, 36596-36602.
- Boutell, C., Orr, A., and Everett, R.D. (2003). PML residue lysine 160 is required for the degradation of PML induced by herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0. *J Virol.* 77, 8686-8694.
- Boutell, C., Sadis, S., and Everett, R.D. (2002). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. *J. Virol.* 76, 841-850.
- Boyd, S.D., Tsai, K.Y., and Jacks, T. (2000). An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat. Cell Biol.* 2, 563-568.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D., and Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol.* 1, 221-226.
- Brodsky, J.L. and McCracken, A.A. (1999). ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10, 507-513.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science (Wash. DC)* 296, 550-553.

- Burch,A.D. and Weller,S.K. (2004). Nuclear sequestration of cellular chaperone and proteasomal machinery during herpes simplex virus type 1 infection. *J. Virol.* 78, 7175-7185.
- Burkham,J., Coen,D.M., Hwang,C.B., and Weller,S.K. (2001). Interactions of herpes simplex virus type 1 with ND10 and recruitment of PML to replication compartments. *J Virol.* 75, 2353-2367.
- Buschmann,T., Fuchs,S.Y., Lee,C.G., Pan,Z.Q., and Ronai,Z. (2000). SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* 101, 753-762.
- Cai,W., Astor,T.L., Liptak,L.M., Cho,C., Coen,D.M., and Schaffer,P.A. (1993). The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 enhances virus replication during acute infection and reactivation from latency. *J Virol.* 67, 7501-7512.
- Cai,W. and Schaffer,P.A. (1992). Herpes simplex virus type 1 ICP0 regulates expression of immediate-early, early, and late genes in productively infected cells. *J Virol.* 66, 2904-2915.
- Cai,W.Z. and Schaffer,P.A. (1989). Herpes simplex virus type 1 ICP0 plays a critical role in the de novo synthesis of infectious virus following transfection of viral DNA. *J Virol.* 63, 4579-4589.
- Carbone,R., Pearson,M., Minucci,S., and Pelicci,P.G. (2002). PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene* 21, 1633-1640.
- Carter,K.L. and Roizman,B. (1996). Alternatively spliced mRNAs predicted to yield frame-shift proteins and stable intron 1 RNAs of the herpes simplex virus 1 regulatory gene alpha 0 accumulate in the cytoplasm of infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 12535-12540.
- Carthew,R.W. and Rubin,G.M. (1990). seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the *Drosophila* eye. *Cell* 63, 561-577.
- Carvalho,T., Seeler,J.S., Ohman,K., Jordan,P., Pettersson,U., Akusjarvi,G., Carmo-Fonseca,M., and Dejean,A. (1995). Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Biol.* 131, 45-56.
- Chee,A.V., Lopez,P., Pandolfi,P.P., and Roizman,B. (2003). Promyelocytic leukemia protein mediates interferon-based anti-herpes simplex virus 1 effects. *J Virol.* 77, 7101-7105.
- Chelbi-Alix,M.K. and de The,H. (1999). Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* 18, 935-941.
- Chen,J., Panagiotidis,C., and Silverstein,S. (1992). Multimerization of ICP0, a herpes simplex virus immediate-early protein. *J. Virol.* 66, 5598-5602.
- Chen,J. and Silverstein,S. (1992). Herpes simplex viruses with mutations in the gene encoding ICP0 are defective in gene expression. *J Virol.* 66, 2916-2927.
- Ching,R.W., Dellaire,G., Eskiw,C.H., and Bazett-Jones,D.P. (2005). PML bodies: a meeting place for genomic loci? *J Cell Sci* 118, 847-854.

- Ciechanover,A., Finley,D., and Varshavsky,A. (1984). Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* 37, 57-66.
- Ciufo,D.M., Mullen,M.A., and Hayward,G.S. (1994). Identification of a dimerization domain in the C-terminal segment of the IE110 transactivator protein from herpes simplex virus. *J. Virol.* 68, 3267-3282.
- Clements,G.B. and Stow,N.D. (1989). A herpes simplex virus type 1 mutant containing a deletion within immediate early gene 1 is latency-competent in mice. *J Gen. Virol.* 70 (Pt 9), 2501-2506.
- Cohen,N., Sharma,M., Kentsis,A., Perez,J.M., Strudwick,S., and Borden,K.L. (2001). PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *EMBO J* 20, 4547-4559.
- Cuchet,D., Ferrera,R., Lomonte,P., and Epstein,A.L. (2005). Characterization of antiproliferative and cytotoxic properties of the HSV-1 immediate-early ICPO protein. *J Gene Med.* 7, 1187-1199.
- D'Orazi,G., Cecchinelli,B., Bruno,T., Manni,I., Higashimoto,Y., Saito,S., Gostissa,M., Coen,S., Marchetti,A., Del Sal,G., Piaggio,G., Fanciulli,M., Appella,E., and Soddu,S. (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol.* 4, 11-19.
- Davido,D.J., Leib,D.A., and Schaffer,P.A. (2002). The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits the transactivating activity and alters the posttranslational modification of herpes simplex virus type 1 ICP0. *J Virol.* 76, 1077-1088.
- Davido,D.J., Von Zagorski,W.F., Lane,W.S., and Schaffer,P.A. (2005). Phosphorylation site mutations affect herpes simplex virus type 1 ICP0 function. *J Virol.* 79, 1232-1243.
- Davido,D.J., Von Zagorski,W.F., Maul,G.G., and Schaffer,P.A. (2003). The differential requirement for cyclin-dependent kinase activities distinguishes two functions of herpes simplex virus type 1 ICP0. *J Virol.* 77, 12603-12616.
- Davis,N.G., Horecka,J.L., and Sprague,G.F., Jr. (1993). Cis- and trans-acting functions required for endocytosis of the yeast pheromone receptors. *J. Cell Biol.* 122, 53-65.
- de The,H., Lavau,C., Marchio,A., Chomienne,C., Degos,L., and Dejean,A. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675-684.
- Dellaire,G. and Bazett-Jones,D.P. (2004). PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 26, 963-977.
- Dellaire,G., Farrall,R., and Bickmore,W.A. (2003). The Nuclear Protein Database (NPD): sub-nuclear localisation and functional annotation of the nuclear proteome. *Nucleic Acids Res.* 31, 328-330.
- DeMartino,G.N., Moomaw,C.R., Zagnitko,O.P., Proske,R.J., Chu-Ping,M., Afendis,S.J., Swaffield,J.C., and Slaughter,C.A. (1994). PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J. Biol. Chem.* 269, 20878-20884.

- Deshaies,R.J. (1999). SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *15*, 435-467.
- Desterro,J.M., Rodriguez,M.S., and Hay,R.T. (1998). SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* *2*, 233-239.
- Diao,L., Zhang,B., Xuan,C., Sun,S., Yang,K., Tang,Y., Qiao,W., Chen,Q., Geng,Y., and Wang,C. (2005). Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by HSV-1 immediate early protein ICP0. *Exp. Cell Res.*
- Doucas,V., Ishov,A.M., Romo,A., Juguilon,H., Weitzman,M.D., Evans,R.M., and Maul,G.G. (1996). Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev.* *10*, 196-207.
- Dyck,J.A., Maul,G.G., Miller,W.H., Jr., Chen,J.D., Kakizuka,A., and Evans,R.M. (1994). A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* *76*, 333-343.
- Elliott,G., Hafezi,W., Whiteley,A., and Bernard,E. (2005). Deletion of the herpes simplex virus VP22-encoding gene (UL49) alters the expression, localization, and virion incorporation of ICP0. *J Virol.* *79*, 9735-9745.
- Engelhardt,O.G., Boutell,C., Orr,A., Ullrich,E., Haller,O., and Everett,R.D. (2003). The homeodomain-interacting kinase PKM (HIPK-2) modifies ND10 through both its kinase domain and a SUMO-1 interaction motif and alters the posttranslational modification of PML. *Exp. Cell Res.* *283*, 36-50.
- Engelhardt,O.G., Ullrich,E., Kochs,G., and Haller,O. (2001). Interferon-induced antiviral Mx1 GTPase is associated with components of the SUMO-1 system and promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Exp Cell Res.* *271*, 286-295.
- Eskiw,C.H., Dellaire,G., and Bazett-Jones,D.P. (2004). Chromatin contributes to structural integrity of promyelocytic leukemia bodies through a SUMO-1-independent mechanism. *J Biol. Chem.* *279*, 9577-9585.
- Everett,R., O'Hare,P., O'Rourke,D., Barlow,P., and Orr,A. (1995). Point mutations in the herpes simplex virus type 1 Vmw110 RING finger helix affect activation of gene expression, viral growth, and interaction with PML-containing nuclear structures. *J Virol.* *69*, 7339-7344.
- Everett,R.D. (1984). Trans activation of transcription by herpes virus products: requirement for two HSV-1 immediate-early polypeptides for maximum activity. *EMBO J* *3*, 3135-3141.
- Everett,R.D. (1985). Activation of cellular promoters during herpes virus infection of biochemically transformed cells. *EMBO J* *4*, 1973-1980.
- Everett,R.D. (1986). The products of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) immediate early genes 1, 2 and 3 can activate HSV-1 gene expression in trans. *J Gen. Virol.* *67 (Pt 11)*, 2507-2513.
- Everett,R.D. (1987). A detailed mutational analysis of Vmw110, a trans-acting transcriptional activator encoded by herpes simplex virus type 1. *EMBO J* *6*, 2069-2076.

- Everett,R.D. (1988). Analysis of the functional domains of herpes simplex virus type 1 immediate-early polypeptide Vmw110. *J Mol Biol.* 202, 87-96.
- Everett,R.D. (1989). Construction and characterization of herpes simplex virus type 1 mutants with defined lesions in immediate early gene 1. *J Gen. Virol.* 70 (Pt 5), 1185-1202.
- Everett,R.D. (2000a). ICP0 induces the accumulation of colocalizing conjugated ubiquitin. *J. Virol.* 74, 9994-10005.
- Everett,R.D. (2000b). ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays* 22, 761-770.
- Everett,R.D. (2001). DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene* 20, 7266-7273.
- Everett,R.D., Barlow,P., Milner,A., Luisi,B., Orr,A., Hope,G., and Lyon,D. (1993a). A novel arrangement of zinc-binding residues and secondary structure in the C3HC4 motif of an alpha herpes virus protein family. *J Mol Biol.* 234, 1038-1047.
- Everett,R.D., Cross,A., and Orr,A. (1993b). A truncated form of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 is expressed in a cell type dependent manner. *Virology* 197, 751-756.
- Everett,R.D., Earnshaw,W.C., Findlay,J., and Lomonte,P. (1999a). Specific destruction of kinetochore protein CENP-C and disruption of cell division by herpes simplex virus immediate-early protein Vmw110. *EMBO J* 18, 1526-1538.
- Everett,R.D., Freemont,P., Saitoh,H., Dasso,M., Orr,A., Kathoria,M., and Parkinson,J. (1998a). The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J Virol.* 72, 6581-6591.
- Everett,R.D. and Maul,G.G. (1994). HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. *EMBO J* 13, 5062-5069.
- Everett,R.D., Meredith,M., and Orr,A. (1999b). The ability of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 to bind to a ubiquitin-specific protease contributes to its roles in the activation of gene expression and stimulation of virus replication. *J Virol.* 73, 417-426.
- Everett,R.D., Meredith,M., Orr,A., Cross,A., Kathoria,M., and Parkinson,J. (1997). A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO J* 16, 1519-1530.
- Everett,R.D. and Murray,J. (2005). ND10 Components Relocate to Sites Associated with Herpes Simplex Virus Type 1 Nucleoprotein Complexes during Virus Infection. *J Virol.* 79, 5078-5089.
- Everett,R.D., Orr,A., and Elliott,M. (1991). High level expression and purification of herpes simplex virus type 1 immediate early polypeptide Vmw110. *Nucleic Acids Res.* 19, 6155-6161.
- Everett,R.D., Orr,A., and Preston,C.M. (1998b). A viral activator of gene expression functions via the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 17, 7161-7169.

- Everett,R.D., Sourvinos,G., Leiper,C., Clements,J.B., and Orr,A. (2004). Formation of nuclear foci of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP4 at early times of infection: localization, dynamics, recruitment of ICP27, and evidence for the de novo induction of ND10-like complexes. *J. Virol.* 78, 1903-1917.
- Fagioli,M., Alcalay,M., Pandolfi,P.P., Venturini,L., Mencarelli,A., Simeone,A., Acampora,D., Grignani,F., and Pelicci,P.G. (1992). Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms. *Oncogene* 7, 1083-1091.
- Fanelli,M., Fantozzi,A., De Luca,P., Caprodossi,S., Matsuzawa,S., Lazar,M.A., Pelicci,P.G., and Minucci,S. (2004). The coiled-coil domain is the structural determinant for mammalian homologues of Drosophila Sina-mediated degradation of promyelocytic leukemia protein and other tripartite motif proteins by the proteasome. *J Biol. Chem* 279, 5374-5379.
- Fiucci,G., Beaucourt,S., Duflaut,D., Lespagnol,A., Stumptner-Cuvelette,P., Geant,A., Buchwalter,G., Tuynder,M., Susini,L., Lassalle,J.M., Wasylyk,C., Wasylyk,B., Oren,M., Amson,R., and Telerman,A. (2004). Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: identification of the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 101, 3510-3515.
- Flenghi,L., Fagioli,M., Tomassoni,L., Pileri,S., Gambacorta,M., Pacini,R., Grignani,F., Casini,T., Ferrucci,P.F., Martelli,M.F., and . (1995). Characterization of a new monoclonal antibody (PG-M3) directed against the aminoterminal portion of the PML gene product: immunocytochemical evidence for high expression of PML proteins on activated macrophages, endothelial cells, and epithelia. *Blood* 85, 1871-1880.
- Fogal,V., Gostissa,M., Sandy,P., Zacchi,P., Sternsdorf,T., Jensen,K., Pandolfi,P.P., Will,H., Schneider,C., and Del Sal,G. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J* 19, 6185-6195.
- Freemont,P.S. (1993). The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 684, 174-192.
- Freemont,P.S., Hanson,I.M., and Trowsdale,J. (1991). A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* 64, 483-484.
- Fruh,K., Ahn,K., Djaballah,H., Sempe,P., van Endert,P.M., Tampe,R., Peterson,P.A., and Yang,Y. (1995). A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature (Lond.)* 375, 415-418.
- Gelman,I.H. and Silverstein,S. (1985). Identification of immediate early genes from herpes simplex virus that transactivate the virus thymidine kinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 82, 5265-5269.
- Gelman,I.H. and Silverstein,S. (1986). Co-ordinate regulation of herpes simplex virus gene expression is mediated by the functional interaction of two immediate early gene products. *J Mol Biol.* 191, 395-409.
- Germani,A., Bruzzoni-Giovanelli,H., Fellous,A., Gisselbrecht,S., Varin-Blank,N., and Calvo,F. (2000). SIAH-1 interacts with alpha-tubulin and degrades the kinesin Kid by the proteasome pathway during mitosis. *Oncogene* 19, 5997-6006.

Germani,A., Prabel,A., Mourah,S., Podgorniak,M.P., Di Carlo,A., Ehrlich,R., Gisselbrecht,S., Varin-Blank,N., Calvo,F., and Bruzzoni-Giovanelli,H. (2003). SIAH-1 interacts with CtIP and promotes its degradation by the proteasome pathway. *Oncogene* 22, 8845-8851.

Gius,D. and Laimins,L.A. (1989). Activation of human papillomavirus type 18 gene expression by herpes simplex virus type 1 viral transactivators and a phorbol ester. *J Virol.* 63, 555-563.

Glickman,M.H. and Ciechanover,A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.

Glickman,M.H., Rubin,D.M., Fried,V.A., and Finley,D. (1998). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell Biol.* 18, 3149-3162.

Goddard,A.D., Borrow,J., Freemont,P.S., and Solomon,E. (1991). Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science (Wash. DC)* 254, 1371-1374.

Grimwade,D. and Solomon,E. (1997). Characterisation of the PML/RAR alpha rearrangement associated with t(15;17) acute promyelocytic leukaemia. *Curr Top. Microbiol. Immunol.* 220, 81-112.

Gu,H. and Roizman,B. (2003). The degradation of promyelocytic leukemia and Sp100 proteins by herpes simplex virus 1 is mediated by the ubiquitin-conjugating enzyme UbcH5a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Guo,A., Salomoni,P., Luo,J., Shih,A., Zhong,S., Gu,W., and Pandolfi,P.P. (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2, 730-736.

Hagglund,R., Van Sant,C., Lopez,P., and Roizman,B. (2002). Herpes simplex virus 1-infected cell protein 0 contains two E3 ubiquitin ligase sites specific for different E2 ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 631-636.

Hara,M.R., Agrawal,N., Kim,S.F., Cascio,M.B., Fujimuro,M., Ozeki,Y., Takahashi,M., Cheah,J.H., Tankou,S.K., Hester,L.D., Ferris,C.D., Hayward,S.D., Snyder,S.H., and Sawa,A. (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.* 7, 665-674.

Harris,R.A., Everett,R.D., Zhu,X.X., Silverstein,S., and Preston,C.M. (1989). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 reactivates latent herpes simplex virus type 2 in an in vitro latency system. *J Virol.* 63, 3513-3515.

Hershko,A., Eytan,E., Ciechanover,A., and Haas,A.L. (1982). Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. Relationship to the breakdown of abnormal proteins. *J. Biol. Chem.* 257, 13964-13970.

Hershko,A., Heller,H., Elias,S., and Ciechanover,A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* 258, 8206-8214.

Hershko,A., Leshinsky,E., Ganoth,D., and Heller,H. (1984). ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81, 1619-1623.

- Hicke,L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 195-201.
- Hill,A., Jugovic,P., York,I., Russ,G., Bennink,J., Yewdell,J., Ploegh,H., and Johnson,D. (1995). Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature (Lond.)* 375, 411-415.
- Hodges,M., Tissot,C., Howe,K., Grimwade,D., and Freemont,P.S. (1998). Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am. J Hum. Genet.* 63, 297-304.
- Hofmann,T.G., Moller,A., Sirma,H., Zentgraf,H., Taya,Y., Droge,W., Will,H., and Schmitz,M.L. (2002). Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat. Cell Biol.* 4, 1-10.
- Hofmann,T.G. and Will,H. (2003). Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. *Cell Death. Differ.* 10, 1290-1299.
- Hough,R., Pratt,G., and Rechsteiner,M. (1986). Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* 261, 2400-2408.
- House,C.M., Frew,I.J., Huang,H.L., Wiche,G., Traficante,N., Nice,E., Catimel,B., and Bowtell,D.D. (2003). A binding motif for Siah ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 100, 3101-3106.
- Hu,G., Chung,Y.L., Glover,T., Valentine,V., Look,A.T., and Fearon,E.R. (1997a). Characterization of human homologs of the *Drosophila* seven in absentia (*sina*) gene. *Genomics* 46, 103-111.
- Hu,G. and Fearon,E.R. (1999). Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins. *Mol Cell Biol.* 19, 724-732.
- Hu,G., Zhang,S., Vidal,M., Baer,J.L., Xu,T., and Fearon,E.R. (1997b). Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11, 2701-2714.
- Huibregtse,J.M., Scheffner,M., Beaudenon,S., and Howley,P.M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5249.
- Huibregtse,J.M., Scheffner,M., and Howley,P.M. (1993). Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell Biol.* 13, 775-784.
- Ishov,A.M. and Maul,G.G. (1996). The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol.* 134, 815-826.
- Ishov,A.M., Sotnikov,A.G., Negorev,D., Vladimirova,O.V., Neff,N., Kamitani,T., Yeh,E.T., Strauss,J.F., III, and Maul,G.G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol.* 147, 221-234.

- Ishov,A.M., Stenberg,R.M., and Maul,G.G. (1997). Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *J Cell Biol.* *138*, 5-16.
- Ishov,A.M., Vladimirova,O.V., and Maul,G.G. (2004). Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX. *J Cell Sci* *117*, 3807-3820.
- Isler,J.A. and Schaffer,P.A. (2001). Phosphorylation of the herpes simplex virus type 1 origin binding protein. *J Virol.* *75*, 628-637.
- Jackson,P.K., Eldridge,A.G., Freed,E., Furstenthal,L., Hsu,J.Y., Kaiser,B.K., and Reimann,J.D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* *10*, 429-439.
- Jang,K.L., Shackelford,J., Seo,S.Y., and Pagano,J.S. (2005). Up-regulation of beta-catenin by a viral oncogene correlates with inhibition of the seven in absentia homolog 1 in B lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* *102*, 18431-18436.
- Jensen,K., Shiels,C., and Freemont,P.S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* *20*, 7223-7233.
- Jiang,W.Q., Szekely,L., Klein,G., and Ringertz,N. (1996). Intranuclear redistribution of SV40T, p53, and PML in a conditionally SV40T-immortalized cell line. *Exp Cell Res.* *229*, 289-300.
- Jiao,R., Bachrati,C.Z., Pedrazzi,G., Kuster,P., Petkovic,M., Li,J.L., Egli,D., Hickson,I.D., and Stajlar,I. (2004). Physical and functional interaction between the Bloom's syndrome gene product and the largest subunit of chromatin assembly factor 1. *Mol Cell Biol.* *24*, 4710-4719.
- Joazeiro,C.A. and Weissman,A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* *102*, 549-552.
- Jones,C. (1998). Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. *Adv. Virus Res.* *51*, 81-133.
- Jordan,R. and Schaffer,P.A. (1997). Activation of gene expression by herpes simplex virus type 1 ICP0 occurs at the level of mRNA synthesis. *J Virol.* *71*, 6850-6862.
- Kakizuka,A., Miller,W.H., Jr., Umesono,K., Warrell,R.P., Jr., Frankel,S.R., Murty,V.V., Dmitrovsky,E., and Evans,R.M. (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* *66*, 663-674.
- Kastner,P., Perez,A., Lutz,Y., Rochette-Egly,C., Gaub,M.P., Durand,B., Lanotte,M., Berger,R., and Chambon,P. (1992). Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *EMBO J* *11*, 629-642.
- Kawaguchi,Y., Bruni,R., and Roizman,B. (1997a). Interaction of herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 with elongation factor 1delta: ICP0 affects translational machinery. *J Virol.* *71*, 1019-1024.

- Kawaguchi, Y., Tanaka, M., Yokoyama, A., Matsuda, G., Kato, K., Kagawa, H., Hirai, K., and Roizman, B. (2001). Herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 functionally interacts with cellular transcription factor BMAL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 1877-1882.
- Kawaguchi, Y., Van Sant, C., and Roizman, B. (1997b). Herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 interacts with and stabilizes the cell cycle regulator cyclin D3. *J Virol.* *71*, 7328-7336.
- Kim, H., Jeong, W., Ahn, K., Ahn, C., and Kang, S. (2004). Siah-1 interacts with the intracellular region of polycystin-1 and affects its stability via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Am. Soc. Nephrol.* *15*, 2042-2049.
- Kim, Y.H., Choi, C.Y., and Kim, Y. (1999). Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 12350-12355.
- Kim, Y.H., Choi, C.Y., Lee, S.J., Conti, M.A., and Kim, Y. (1998). Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. *J Biol. Chem* *273*, 25875-25879.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M., and Goldberg, A.L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.* *274*, 3363-3371.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., and Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* *96*, 635-644.
- Koken, M.H., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M.K., Sobczak-Thepot, J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F., and de The, H. (1995). The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* *10*, 1315-1324.
- Kornitzer, D. and Ciechanover, A. (2000). Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Cell Physiol* *182*, 1-11.
- Kotani, S., Tugendreich, S., Fujii, M., Jorgensen, P.M., Watanabe, N., Hoog, C., Hieter, P., and Todokoro, K. (1998). PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol. Cell* *1*, 371-380.
- Kubat, N.J., Tran, R.K., McAnany, P., and Bloom, D.C. (2004). Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression. *J Virol.* *78*, 1139-1149.
- Kwon, Y.T., Reiss, Y., Fried, V.A., Hershko, A., Yoon, J.K., Gonda, D.K., Sangan, P., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Varshavsky, A. (1998). The mouse and human genes encoding the recognition component of the N-end rule pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 7898-7903.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2004). Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J* *23*, 3092-3102.

- Lallemand-Breitenbach,V., Zhu,J., Puvion,F., Koken,M., Honore,N., Doubeikovsky,A., Duprez,E., Pandolfi,P.P., Puvion,E., Freemont,P., and de The,H. (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med.* *193*, 1361-1371.
- Lamph,W.W., Wamsley,P., Sassone-Corsi,P., and Verma,I.M. (1988). Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature (Lond.)* *334*, 629-631.
- Le,X.F., Vallian,S., Mu,Z.M., Hung,M.C., and Chang,K.S. (1998). Recombinant PML adenovirus suppresses growth and tumorigenicity of human breast cancer cells by inducing G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Oncogene* *16*, 1839-1849.
- Le,X.F., Yang,P., and Chang,K.S. (1996). Analysis of the growth and transformation suppressor domains of promyelocytic leukemia gene, PML. *J Biol. Chem* *271*, 130-135.
- Lee,D.H., Sherman,M.Y., and Goldberg,A.L. (1996). Involvement of the molecular chaperone Ydj1 in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived and abnormal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *16*, 4773-4781.
- Lees-Miller,S.P., Long,M.C., Kilvert,M.A., Lam,V., Rice,S.A., and Spencer,C.A. (1996). Attenuation of DNA-dependent protein kinase activity and its catalytic subunit by the herpes simplex virus type 1 transactivator ICP0. *J Virol.* *70*, 7471-7477.
- Lehming,N., Le Saux,A., Schuller,J., and Ptashne,M. (1998). Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* *95*, 7322-7326.
- Leib,D.A., Coen,D.M., Bogard,C.L., Hicks,K.A., Yager,D.R., Knipe,D.M., Tyler,K.L., and Schaffer,P.A. (1989). Immediate-early regulatory gene mutants define different stages in the establishment and reactivation of herpes simplex virus latency. *J Virol.* *63*, 759-768.
- Levkowitz,G., Waterman,H., Ettenberg,S.A., Katz,M., Tsygankov,A.Y., Alroy,I., Lavi,S., Iwai,K., Reiss,Y., Ciechanover,A., Lipkowitz,S., and Yarden,Y. (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell* *4*, 1029-1040.
- Li,H. and Chen,J.D. (2000). PML and the oncogenic nuclear domains in regulating transcriptional repression. *Curr Opin Cell Biol* *12*, 641-644.
- Li,H., Leo,C., Zhu,J., Wu,X., O'Neil,J., Park,E.J., and Chen,J.D. (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol.* *20*, 1784-1796.
- Li,S., Li,Y., Carthew,R.W., and Lai,Z.C. (1997). Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack. *Cell* *90*, 469-478.
- Liang,Y., Kurakin,A., and Roizman,B. (2005). Herpes simplex virus 1 infected cell protein 0 forms a complex with CIN85 and Cbl and mediates the degradation of EGF receptor from cell surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* *102*, 5838-5843.
- Liu,J., Stevens,J., Rote,C.A., Yost,H.J., Hu,Y., Neufeld,K.L., White,R.L., and Matsunami,N. (2001). Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell* *7*, 927-936.

- Loda, M., Cukor, B., Tam, S.W., Lavin, P., Fiorentino, M., Draetta, G.F., Jessup, J.M., and Pagano, M. (1997). Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med.* 3, 231-234.
- Lomonte, P., Sullivan, K.F., and Everett, R.D. (2001). Degradation of nucleosome-associated centromeric histone H3-like protein CENP-A induced by herpes simplex virus type 1 protein ICP0. *J Biol. Chem* 276, 5829-5835.
- Lopez, P., Jacob, R.J., and Roizman, B. (2002). Overexpression of promyelocytic leukemia protein precludes the dispersal of ND10 structures and has no effect on accumulation of infectious herpes simplex virus 1 or its proteins. *J. Virol.* 76, 9355-9367.
- Lopez, P., Van Sant, C., and Roizman, B. (2001). Requirements for the nuclear-cytoplasmic translocation of infected-cell protein 0 of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 75, 3832-3840.
- Lord, J.M., Davey, J., Frigerio, L., and Roberts, L.M. (2000). Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 159-164.
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S., and Weissman, A.M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 11364-11369.
- Maeda, A., Yoshida, T., Kusuzaki, K., and Sakai, T. (2002). The characterization of the human Siah-1 promoter(1). *FEBS Lett.* 512, 223-226.
- Matera, A.G. (1999). Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.* 9, 302-309.
- Matsuzawa, S.I. and Reed, J.C. (2001). Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* 7, 915-926.
- Maul, G.G. (1998). Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays* 20, 660-667.
- Maul, G.G. and Everett, R.D. (1994). The nuclear location of PML, a cellular member of the C3HC4 zinc-binding domain protein family, is rearranged during herpes simplex virus infection by the C3HC4 viral protein ICP0. *J Gen. Virol.* 75 (Pt 6), 1223-1233.
- Maul, G.G., Guldner, H.H., and Spivack, J.G. (1993). Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J Gen. Virol.* 74 (Pt 12), 2679-2690.
- Maul, G.G., Ishov, A.M., and Everett, R.D. (1996). Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology* 217, 67-75.
- Maul, G.G., Negorev, D., Bell, P., and Ishov, A.M. (2000). Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct. Biol.* 129, 278-287.
- Maul, G.G., Yu, E., Ishov, A.M., and Epstein, A.L. (1995). Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *J Cell Biochem* 59, 498-513.

- Mavromara-Nazos,P., Silver,S., Hubenthal-Voss,J., McKnight,J.L., and Roizman,B. (1986). Regulation of herpes simplex virus 1 genes: alpha gene sequence requirements for transient induction of indicator genes regulated by beta or late (gamma 2) promoters. *Virology* 149, 152-164.
- McGeoch,D.J., Barnett,B.C., and MacLean,C.A. (1993). Emerging functions of alphaherpesvirus genes. *seminars in VIROLOGY* 4, 125-134.
- Melchjorsen,J., Pedersen,F.S., Mogensen,S.C., and Paludan,S.R. (2002). Herpes simplex virus selectively induces expression of the CC chemokine RANTES/CCL5 in macrophages through a mechanism dependent on PKR and ICP0. *J. Virol.* 76, 2780-2788.
- Melnick,A. and Licht,J.D. (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93, 3167-3215.
- Meredith,M., Orr,A., Elliott,M., and Everett,R. (1995). Separation of sequence requirements for HSV-1 Vmw110 multimerisation and interaction with a 135-kDa cellular protein. *Virology* 209, 174-187.
- Meredith,M., Orr,A., and Everett,R. (1994). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 binds strongly and specifically to a 135-kDa cellular protein. *Virology* 200, 457-469.
- Michalek,M.T., Grant,E.P., Gramm,C., Goldberg,A.L., and Rock,K.L. (1993). A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature (Lond.)* 363, 552-554.
- Mittnacht,S., Straub,P., Kirchner,H., and Jacobsen,H. (1988). Interferon treatment inhibits onset of herpes simplex virus immediate-early transcription. *Virology* 164, 201-210.
- Moller,A., Sirma,H., Hofmann,T.G., Rueffer,S., Klimczak,E., Droge,W., Will,H., and Schmitz,M.L. (2003). PML is required for homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2)-mediated p53 phosphorylation and cell cycle arrest but is dispensable for the formation of HIPK domains. *Cancer Res.* 63, 4310-4314.
- Mu,Z.M., Chin,K.V., Liu,J.H., Lozano,G., and Chang,K.S. (1994). PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia. *Mol Cell Biol.* 14, 6858-6867.
- Mullen,M.A., Ciufu,D.M., and Hayward,G.S. (1994). Mapping of intracellular localization domains and evidence for colocalization interactions between the IE110 and IE175 nuclear transactivator proteins of herpes simplex virus. *J. Virol.* 68, 3250-3266.
- Mullen,M.A., Gerstberger,S., Ciufu,D.M., Mosca,J.D., and Hayward,G.S. (1995). Evaluation of colocalization interactions between the IE110, IE175, and IE63 transactivator proteins of herpes simplex virus within subcellular punctate structures. *J. Virol.* 69, 476-491.
- Muller,S. and Dejean,A. (1999). Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol.* 73, 5137-5143.
- Muller,S., Matunis,M.J., and Dejean,A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 17, 61-70.

- Nagano,Y., Yamashita,H., Takahashi,T., Kishida,S., Nakamura,T., Iseki,E., Hattori,N., Mizuno,Y., Kikuchi,A., and Matsumoto,M. (2003). Siah-1 facilitates ubiquitination and degradation of synphilin-1. *J Biol. Chem* 278, 51504-51514.
- Narita,T., Ando,A., Mikami,Y., and Taniyama,T. (2005). Overexpression of CIN85 suppresses the growth of herpes simplex virus in HeLa cells. *Exp Cell Res.* 311, 265-271.
- Negorev,D. and Maul,G.G. (2001). Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* 20, 7234-7242.
- Nemani,M., Linares-Cruz,G., Bruzzoni-Giovanelli,H., Roperch,J.P., Tuynder,M., Bougueleret,L., Cherif,D., Medhioub,M., Pasturaud,P., Alvaro,V., der,S.H., Cazes,L., Le Paslier,D., Le,G., I, Israeli,D., Dausset,J., Sigaux,F., Chumakov,I., Oren,M., Calvo,F., Amson,R.B., Cohen,D., and Telerman,A. (1996). Activation of the human homologue of the *Drosophila sina* gene in apoptosis and tumor suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 93, 9039-9042.
- Nussbaum,A.K., Dick,T.P., Keilholz,W., Schirle,M., Stevanovic,S., Dietz,K., Heinemeyer,W., Groll,M., Wolf,D.H., Huber,R., Rammensee,H.G., and Schild,H. (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 12504-12509.
- O'Rourke,D., Elliott,G., Papworth,M., Everett,R., and O'Hare,P. (1998). Examination of determinants for intranuclear localization and transactivation within the RING finger of herpes simplex virus type 1 IE110k protein. *J. Gen. Virol.* 79, 537-548.
- Oberman,F. and Panet,A. (1988). Inhibition of transcription of herpes simplex virus immediate early genes in interferon-treated human cells. *J Gen. Virol.* 69 (Pt 6), 1167-1177.
- Oberman,F. and Panet,A. (1989). Characterization of the early steps of herpes simplex virus replication in interferon-treated human cells. *J Interferon Res.* 9, 563-571.
- Ogle,W.O., Ng,T.I., Carter,K.L., and Roizman,B. (1997). The UL13 protein kinase and the infected cell type are determinants of posttranslational modification of ICP0. *Virology* 235, 406-413.
- Osmulski,P.A. and Gaczynska,M. (1998). A new large proteolytic complex distinct from the proteasome is present in the cytosol of fission yeast. *Curr. Biol.* 8, 1023-1026.
- Page,A.M. and Hieter,P. (1999). The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 583-609.
- Park,T.J., Hamanaka,H., Ohshima,T., Watanabe,N., Mikoshiba,K., and Nukina,N. (2003). Inhibition of ubiquitin ligase Siah-1A by disabled-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 671-678.
- Parkinson,J. and Everett,R.D. (2001). Alpha herpesvirus proteins related to herpes simplex virus type 1 ICP0 induce the formation of colocalizing, conjugated ubiquitin. *J. Virol.* 75, 5357-5362.

- Parkinson, J., Lees-Miller, S.P., and Everett, R.D. (1999). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein vmw110 induces the proteasome-dependent degradation of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *J Virol.* *73*, 650-657.
- Peng, H., Begg, G.E., Schultz, D.C., Friedman, J.R., Jensen, D.E., Speicher, D.W., and Rauscher, F.J., III (2000). Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *J Mol Biol.* *295*, 1139-1162.
- Peng, S.S., Chen, C.Y., Xu, N., and Shyu, A.B. (1998). RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J* *17*, 3461-3470.
- Perry, L.J., Rixon, F.J., Everett, R.D., Frame, M.C., and McGeoch, D.J. (1986). Characterization of the IE110 gene of herpes simplex virus type 1. *J Gen. Virol.* *67 (Pt 11)*, 2365-2380.
- Prechtel, A.T., Chemnitz, J., Schirmer, S., Ehlers, C., Langbein-Detsch, I., Stulke, J., Dabauvalle, M.C., Kehlenbach, R.H., and Hauber, J. (2006). Expression of CD83 Is Regulated by HuR via a Novel cis-Active Coding Region RNA Element. *J Biol Chem.* *281*, 10912-10925.
- Quinlan, M.P. and Knipe, D.M. (1985). Stimulation of expression of a herpes simplex virus DNA-binding protein by two viral functions. *Mol Cell Biol.* *5*, 957-963.
- Regad, T. and Chelbi-Alix, M.K. (2001). Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* *20*, 7274-7286.
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P.G., and Ballabio, A. (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* *20*, 2140-2151.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science (Wash. DC)* *234*, 364-368.
- Roizman, B. and Knipe, D.M. (2001). Herpes Simplex Virus and their replication. *Fields Virology*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia *4th Edition*.
- Roizman, B. and Whitley, R.J. (2001). The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes.* *8*, 23-27.
- Roperch, J.P., Lethrone, F., Prieur, S., Piouffre, L., Israeli, D., Tuynder, M., Nemani, M., Pasturaud, P., Gendron, M.C., Dausset, J., Oren, M., Amson, R.B., and Telerman, A. (1999). SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: identification of common effectors with p53 and p21(Waf1). *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* *96*, 8070-8073.
- Sacks, W.R. and Schaffer, P.A. (1987). Deletion mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 exhibit impaired growth in cell culture. *J. Virol.* *61*, 829-839.
- Sahlas, D.J., Milankov, K., Park, P.C., and De Boni, U. (1993). Distribution of snRNPs, splicing factor SC-35 and actin in interphase nuclei: immunocytochemical evidence for differential distribution during changes in functional states. *J. Cell Sci.* *105 (Pt 2)*, 347-357.

- Sanger,F., Nickler,S., and Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Santelli,E., Leone,M., Li,C., Fukushima,T., Preece,N.E., Olson,A.J., Ely,K.R., Reed,J.C., Pellicchia,M., Liddington,R.C., and Matsuzawa,S. (2005). Structural analysis of Siah1-Siah-interacting protein interactions and insights into the assembly of an E3 ligase multiprotein complex. *J Biol. Chem* 280, 34278-34287.
- Saurin,A.J., Borden,K.L., Boddy,M.N., and Freemont,P.S. (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci* 21, 208-214.
- Scheffner,M., Huibregtse,J.M., Vierstra,R.D., and Howley,P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
- Seeler,J.S., Marchio,A., Sitterlin,D., Transy,C., and Dejean,A. (1998). Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 95, 7316-7321.
- Seufert,W. and Jentsch,S. (1990). Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* 9, 543-550.
- Severini,A., Scraba,D.G., and Tyrrell,D.L. (1996). Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 70, 3169-3175.
- Shimura,H., Hattori,N., Kubo,S., Mizuno,Y., Asakawa,S., Minoshima,S., Shimizu,N., Iwai,K., Chiba,T., Tanaka,K., and Suzuki,T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25, 302-305.
- Smiley,J.R. (2004). Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase? *J. Virol.* 78, 1063-1068.
- Sternsdorf,T., Jensen,K., Reich,B., and Will,H. (1999). The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J Biol Chem.* 274, 12555-12566.
- Stoltze,L., Nussbaum,A.K., Sijts,A., Emmerich,N.P., Kloetzel,P.M., and Schild,H. (2000). The function of the proteasome system in MHC class I antigen processing. *Immunol. Today* 21, 317-319.
- Stow,N.D. and Stow,E.C. (1986). Isolation and characterization of a herpes simplex virus type 1 mutant containing a deletion within the gene encoding the immediate early polypeptide Vmw110. *J. Gen. Virol.* 67 (Pt 12), 2571-2585.
- Strickland,E., Hakala,K., Thomas,P.J., and DeMartino,G.N. (2000). Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* 275, 5565-5572.
- Stuurman,N., de Graaf,A., Floore,A., Josso,A., Humbel,B., de Jong,L., and van Driel,R. (1992). A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. *J Cell Sci* 101 (Pt 4), 773-784.

- Stuurman,N., Floore,A., Middelkoop,E., van Driel,R., and de Jong,L. (1997). PML shuttles between nuclear bodies and the cytoplasm. *Cell Mol Biol Lett* 2, 137-150.
- Susini,L., Passer,B.J., Amzallag-Elbaz,N., Juven-Gershon,T., Prieur,S., Privat,N., Tuynder,M., Gendron,M.C., Israel,A., Amson,R., Oren,M., and Telerman,A. (2001). Siah-1 binds and regulates the function of Numb. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 98, 15067-15072.
- Swaminathan,S., Amerik,A.Y., and Hochstrasser,M. (1999). The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol. Biol. Cell* 10, 2583-2594.
- Szostecki,C., Guldner,H.H., Netter,H.J., and Will,H. (1990). Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. *J Immunol.* 145, 4338-4347.
- Szostecki,C., Krippner,H., Penner,E., and Bautz,F.A. (1987). Autoimmune sera recognize a 100 kD nuclear protein antigen (sp-100). *Clin. Exp Immunol.* 68, 108-116.
- Takahashi,Y., Lallemand-Breitenbach,V., Zhu,J., and de The,H. (2004). PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene* 23, 2819-2824.
- Tamura,N., Lottspeich,F., Baumeister,W., and Tamura,T. (1998). The role of tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation. *Cell* 95, 637-648.
- Tang,A.H., Neufeld,T.P., Kwan,E., and Rubin,G.M. (1997). PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism. *Cell* 90, 459-467.
- Tang,Q., Li,L., Ishov,A.M., Revol,V., Epstein,A.L., and Maul,G.G. (2003). Determination of Minimum Herpes Simplex Virus Type 1 Components Necessary To Localize Transcriptionally Active DNA to ND10. *J. Virol.* 77, 5821-5828.
- Taylor,J.L., Unverrich,D., O'Brien,W.J., and Wilcox,K.W. (2000). Interferon coordinately inhibits the disruption of PML-positive ND10 and immediate-early gene expression by herpes simplex virus. *J. Interferon Cytokine Res.* 20, 805-815.
- Terrell,J., Shih,S., Dunn,R., and Hicke,L. (1998). A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell* 1, 193-202.
- Thrower,J.S., Hoffman,L., Rechsteiner,M., and Pickart,C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19, 94-102.
- Tiedt,R., Bartholdy,B.A., Matthias,G., Newell,J.W., and Matthias,P. (2001). The RING finger protein Siah-1 regulates the level of the transcriptional coactivator OBF-1. *EMBO J* 20, 4143-4152.
- Topisirovic,I., Capili,A.D., and Borden,K.L. (2002). Gamma interferon and cadmium treatments modulate eukaryotic initiation factor 4E-dependent mRNA transport of cyclin D1 in a PML-dependent manner. *Mol Cell Biol.* 22, 6183-6198.
- Treier,M., Staszewski,L.M., and Bohmann,D. (1994). Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* 78, 787-798.

- Trost,M., Kochs,G., and Haller,O. (2000). Characterization of a novel serine/threonine kinase associated with nuclear bodies. *J Biol. Chem.* 275, 7373-7377.
- Turelli,P., Doucas,V., Craig,E., Mangeat,B., Klages,N., Evans,R., Kalpana,G., and Trono,D. (2001). Cytoplasmic recruitment of IN1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication. *Mol Cell* 7, 1245-1254.
- Tyers,M. and Willems,A.R. (1999). One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligases. *Science (Wash. DC)* 284, 601, 603-601, 604.
- Van Sant,C., Hagglund,R., Lopez,P., and Roizman,B. (2001a). The infected cell protein 0 of herpes simplex virus 1 dynamically interacts with proteasomes, binds and activates the cdc34 E2 ubiquitin-conjugating enzyme, and possesses in vitro E3 ubiquitin ligase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8815-8820.
- Van Sant,C., Kawaguchi,Y., and Roizman,B. (1999). A single amino acid substitution in the cyclin D binding domain of the infected cell protein no. 0 abrogates the neuroinvasiveness of herpes simplex virus without affecting its ability to replicate. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 96, 8184-8189.
- Van Sant,C., Lopez,P., Advani,S.J., and Roizman,B. (2001b). Role of cyclin D3 in the biology of herpes simplex virus 1 ICPO. *J Virol.* 75, 1888-1898.
- Venables,J.P., Dalgliesh,C., Paronetto,M.P., Skitt,L., Thornton,J.K., Saunders,P.T., Sette,C., Jones,K.T., and Elliott,D.J. (2004). SIAH1 targets the alternative splicing factor T-STAR for degradation by the proteasome. *Hum. Mol Genet.* 13, 1525-1534.
- Wang,Z.G., Delva,L., Gaboli,M., Rivi,R., Giorgio,M., Cordon-Cardo,C., Grosveld,F., and Pandolfi,P.P. (1998a). Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science (Wash. DC)* 279, 1547-1551.
- Wang,Z.G., Ruggero,D., Ronchetti,S., Zhong,S., Gaboli,M., Rivi,R., and Pandolfi,P.P. (1998b). PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet.* 20, 266-272.
- Wasylyk,C., Schlumberger,S.E., Criqui-Filipe,P., and Wasylyk,B. (2002). Sp100 interacts with ETS-1 and stimulates its transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 22, 2687-2702.
- Weis,K., Rambaud,S., Lavau,C., Jansen,J., Carvalho,T., Carmo-Fonseca,M., Lamond,A., and Dejean,A. (1994). Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* 76, 345-356.
- Wheeler,T.C., Chin,L.S., Li,Y., Roudabush,F.L., and Li,L. (2002). Regulation of synaptophysin degradation by mammalian homologues of seven in absentia. *J Biol. Chem* 277, 10273-10282.
- Whitley,R.J. (2001). Herpes simplex viruses. In *Fields Virology*, D.M.Knipe and P.M.Howley, eds. Lippincott Williams&Wilkins), pp. 2461-2509.
- Whitley,R.J. and Roizman,B. (2001). Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357, 1513-1518.
- Wilkinson,K.D. (1995). Roles of ubiquitylation in proteolysis and cellular regulation. *Annu. Rev. Nutr.* 15, 161-189.

- Xue,Y., Gibbons,R., Yan,Z., Yang,D., McDowell,T.L., Sechi,S., Qin,J., Zhou,S., Higgs,D., and Wang,W. (2003). The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* *100*, 10635-10640.
- Yamano,H., Gannon,J., and Hunt,T. (1996). The role of proteolysis in cell cycle progression in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* *15*, 5268-5279.
- Yamashita,Y.M., Nakaseko,Y., Samejima,I., Kumada,K., Yamada,H., Michaelson,D., and Yanagida,M. (1996). 20S cyclosome complex formation and proteolytic activity inhibited by the cAMP/PKA pathway. *Nature (Lond.)* *384*, 276-279.
- Yao,F. and Schaffer,P.A. (1994). Physical interaction between the herpes simplex virus type 1 immediate-early regulatory proteins ICP0 and ICP4. *J Virol.* *68*, 8158-8168.
- Yao,F. and Schaffer,P.A. (1995). An activity specified by the osteosarcoma line U2OS can substitute functionally for ICP0, a major regulatory protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* *69*, 6249-6258.
- Yao,T. and Cohen,R.E. (1999). Giant proteases: beyond the proteasome. *Curr. Biol.* *9*, R551-R553.
- Yaron,A., Hatzubai,A., Davis,M., Lavon,I., Amit,S., Manning,A.M., Andersen,J.S., Mann,M., Mercurio,F., and Ben Neriah,Y. (1998). Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature (Lond.)* *396*, 590-594.
- York,I.A., Roop,C., Andrews,D.W., Riddell,S.R., Graham,F.L., and Johnson,D.C. (1994). A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell* *77*, 525-535.
- Zheng,N., Wang,P., Jeffrey,P.D., and Pavletich,N.P. (2000). Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* *102*, 533-539.
- Zhong,S., Salomoni,P., and Pandolfi,P.P. (2000). The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol.* *2*, E85-E90.
- Zhu,X.X., Chen,J.X., and Silverstein,S. (1991). Isolation and characterization of a functional cDNA encoding ICP0 from herpes simplex virus type 1. *J Virol.* *65*, 957-960.
- Zhu,X.X., Chen,J.X., Young,C.S., and Silverstein,S. (1990). Reactivation of latent herpes simplex virus by adenovirus recombinants encoding mutant IE-0 gene products. *J Virol.* *64*, 4489-4498.
- Zhu,Z., Cai,W., and Schaffer,P.A. (1994). Cooperativity among herpes simplex virus type 1 immediate-early regulatory proteins: ICP4 and ICP27 affect the intracellular localization of ICP0. *J Virol.* *68*, 3027-3040.
- Zong,R.T., Das,C., and Tucker,P.W. (2000). Regulation of matrix attachment region-dependent, lymphocyte-restricted transcription through differential localization within promyelocytic leukemia nuclear bodies. *EMBO J* *19*, 4123-4133.