Strukturelle und biochemische Analyse der Funktion des Merkelzellpolyomavirus Large Tumor Antigens

Dissertation

Zur Erlangung des akademische Doktorgrades

der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie,

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sophie Borchert

aus Wernigerode

Hamburg, Dezember 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz. Dr. N. FISCHER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. T. DOBNER
Tag der Disputation: 07. Februar 2014

Hamburg, den 21. Januar 2014

Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2009 bis Dezember 2013 unter Anleitung von PD Dr. Nicole Fischer am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Dissertationsgutachter: Frau PD Dr. Nicole Fischer

Herr Prof. Dr. Thomas Dobner

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 3

1 Zusammenfassung – Summary 5

1.1 Zusammenfassung 5

1.2 Summary 7

2 Einleitung 9

2.1 Polyomaviren 9

2.2 Interaktion zwischen pRb und viralen Onkoproteinen 26

2.3 Ziel dieser Arbeit 28

3 Material 30

3.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien 30

3.2 Plasmide und Primer 30

3.3 Bakterienstämme 33

3.4 Zelllinien 33

3.5 Medien und Zusätze 33

3.6 Proteinaufreinigung mittels chromatographischer Methoden 34

3.7 Kommerzielle Reagenzsysteme und Reagenzien 34

3.8 Antikörper 36

3.9 Geräte 36

3.10 Software und Datenbanken 37

4 Methoden 38

4.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration 38

4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration 38

4.3 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien 38

4.4 Hitzeschock-Transformation 39

4.5 Präparative Plasmidaufreinigung 39

4.6 Replikationsassay 40

4.7 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in Bakterien 46

5 Ergebnisse 59

5.1 Replikationsassay 59

5.2 Expression und Aufreinigung der MCPyV und SV40 LT N-Termini, sowie der pRb pocket Domäne für strukturelle und biochemische Analysen 70

5.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten der MCPyV und SV40 LT N-Termini mit $pRb_{382-771}$ 88

5.4 Strukturelle Analyse des MCPyV LT_{NT} 89

6 Diskussion 108

6.1 Etablierung eines MCPyV Replikationsassays 108

6.2 Biochemische Analyse von MCPyV LT_{NT} identifiziert hochaffine Bindung mit der pRb *pocket* Domäne 115

6.3 Strukturelle Analyse von MCPyV LT_{NT} 119

7 Literatur 123

8 Anhang 130

Danksagung 135

Eidesstattliche Versicherung 137

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Amp	Ampicillin
ATCC	American type culture collection
BKPyV	BK Polyomavirus, benannt nach den Initialien des Patienten, aus dem das Virus isoliert wurde
BME	Beta-Mercaptoethanol
bp	Basenpaar
cDNA	complementary DNA
cMCPyV	Konsensus MCPyV
CPE	*cytopathic effect*, zytopathischer Effekt
DF	Durchfluss
DGZ	Dichtegradientenzentrifugation
DNA/ DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
EM	Elektronenmikroskop
ECL	*enhanced chemoluminescence* - verstärkte Chemilumineszenz
FACS	*Fluorescense activated cell sorting* – Durchflusszytometrie
f.c.	finale Konzentration
FKS	fötales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
hPyV	humanes Polyomavirus
HRP	*Horseradish peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JCPyV	JC Polyomavirus, benannt nach den Initialien des Patienten, aus dem das Virus isoliert wurde
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KIPyV	Karolinska Institut Polyomavirus
LB	Luria-Bertani Medium
LT	*Large Tumor Antigen*
LT_{NT}	verkürztes LT; N-Terminus des LT Antigens
Lys	Gesamtlysat

MCC	Merkelzellkarzinom
MCPyV	Merkelzell-Polyomavirus
MPyV	Mauspolyomavirus
NiNTA	Nickel-nitrilotriacetic acid
mRNA	messenger RNA
NCCR	non-coding control region
n.I.	nach Induktion
OD	optische Dichte
P	Pellet
pH	negativ-dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen
PBST	Phosphat-gepufferte Saline mit 0,05% Tween 20
PCR	*Polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion
PDB	*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank*
pRB	Retinoblastoma-assoziiertes Protein
p.i.	*post infection*
p.t.	*post transfection*
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PyV	Polyomavirus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	*rounds per minute*
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SN	Überstand
sT	*Small Tumor Antigen*
SV40	Simian-Virus 40
Tab.	Tabelle
taq	*Thermophilus aquaticus*
Tag	engl., Markierung, in diesem Fall eine zusätzliche Aminosäuresequenz, notwendig für die Affinitätschromatographie
TFA	Thermofluor Assay
ÜE	Überexpression
v.I.	vor Induktion
VP	virales Kapsidprotein
WT	Wildtyp
WUPyV	Washington University Polyomavirus
Xa	Faktor Xa-Schnittstelle

1 Zusammenfassung – Summary

1.1 Zusammenfassung

Das Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) ist ein humanes Polyomavirus, welches mit der Onkogenese des Merkelzell-Karzinoms (MCC), eines seltenen aggressiven Hautkrebs, assoziiert ist. Das virale Genom ist monoklonal in den Karzinomzellen integriert und sowohl Primärtumor als auch Metastasen eines Patienten zeigen die gleichen Integrationsstellen auf. Im Tumor werden nur die Gene der frühen viralen Region, das small T-Antigen (sT) und das Large T-Antigen (LT) exprimiert. Tumorzelllinien sind in Ihrer Proliferation von der Expression der T-Antigene abhängig. Interessanterweise zeigen alle bislang identifizierten Genome innerhalb eines Tumors spezifische Stop-Mutationen im Bereich des LT auf, die dazu führen, dass nur der N-Terminus des LT-Antigens exprimiert wird und das Virus aufgrund des Verlustes des C-Terminus nicht mehr replikationsfähig ist. Es besteht somit ein positiver Selektionsdruck im Tumor für den N-terminalen Bereich des LT.

Das LT-Antigen ist ein multifunktionales Protein, welches nicht nur die Replikation des viralen Genoms vermittelt, sondern u.a. auch mit den Tumorsuppressorproteinen Retinoblastomaprotein (pRb) und p53 interagiert. Das Interaktionsmotiv für das Rb-Protein befindet sich im N-Terminus des LT, wohingegen die Interaktion mit p53 über den C-Terminus vermittelt wird. Der Interaktion zwischen pRb und LT wird eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese zugeschrieben, da bereits dem SV40 LT pRb-Bindemotiv transformierende Eigenschaften nachgewiesen wurden.

Das MCPyV infiziert 60-80% der Bevölkerung, vorwiegend während der Kindheit und persistiert im menschlichen Körper ohne klinische Symptome. In welchen Zellen das Virus im Körper repliziert, konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

Die vorliegende Arbeit befasste sich zum einen mit der Etablierung eines *in vitro* MCPyV-Replikationssystems mit dem der MCPyV-Lebenszyklus und dessen Rolle in der MCC-Tumorgenese studiert werden kann. Zu Beginn des Projekts waren nur MCPyV-Sequenzen aus MCC-Geweben bekannt. Diese enthielten die MCC-spezifischen Stop-Mutationen und waren folglich für ein Replikationssystem ungeeignet. Hierfür wurde ein synthetisches MCPyV-Genom generiert, welches einem MCPyV WT-Genom entsprechen sollte und mit dem Replikationsversuche in zehn verschiedenen Zelllinien und Primärzellen durchgeführt wurden. In vier Zelllinien wurde virale DNA-Replikation detektiert und in drei dieser Zelllinien die Expression des frühen Virustranskripts LT beobachtet, wovon zwei Zelllinien das späte

Transkript VP1 exprimierten. Bei keiner der getesteten Zelllinien wurde ein zytopathischer Effekt oder Zell-zu-Zell-Verbreitung beobachtet. Jedoch konnten Viruspartikel aus den zwei Zelllinien isoliert werden, die auch VP1 exprimierten. Die Größe der Viruspartikel entsprach der Größe von anderen Polyomaviren. Allerdings konnten keine Zellen damit infiziert werden. Zusammenfassend ist es gelungen Zelllinien zu identifizieren, in denen verschiedene Abschnitte des MCPyV-Lebenszyklus, wie frühe und späte Transkripton sowie DNA-Replikation, analysiert werden können. Es wurde ein semi-permissives Replikationssystem etabliert mit dem Phasen des MCPyV-Replikationszyklus untersucht, sowie zelluläre Faktoren identifiziert werden können, die mit den Virusproteinen interagieren. Des Weiteren können in diesem System Mutationsstudien durchgeführt werden, um die Rolle von MCPyV in der MCC-Tumorgenese zu verstehen.

Nachdem bereits gezeigt wurde, dass das in MCC-Geweben verkürzt exprimierte LT proliferierende und transformierende Eigenschaften in immortalisierten und primären Zellen hat, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die strukturelle und biochemische Charakterisierung dieses verkürzten LT (LT_{NT}). Hierfür wurde die zuvor beschriebene Interaktion von LT_{NT} mit dem Retinoblastomaprotein quantitativ charakterisiert. Mithilfe einer neuen Technik, der Microscale Thermophorese, wurde nicht nur die direkte Interaktion zwischen LT_{NT} und der *pocket* Domäne des pRb nachgewiesen, sondern auch die hohe Affinität zwischen beiden Proteinen quantifiziert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass das MCPyV LT_{NT} eine signifikant höhere Affinität zur pRb *pocket* Domäne hat als das homologe SV40 $LT_{NT.}$ Anhand der Tatsache, dass MCC-Zelllinien abhängig von der Expression des LT_{NT} sind und bereits beschrieben wurde, dass ein intaktes pRb-Bindemotiv essentiell ist, bietet die Interaktion zwischen LT und pRb einen vielversprechenden Angriffspunkt einer MCPyV-basierten MCC-Therapie.

Das MCPyV LT_{NT} hat im Vergleich zu LT-Antigen anderer Polyomaviren einzigartige Regionen, die das pRb-Bindemotiv flankieren und denen bisher keine Struktur und Funktion zugeordnet werden konnte. Für die Aufklärung der Funktion dieser Regionen und für die Modellierung eines möglichen Inhibitors der LT/pRb-Interaktion werden Strukturdaten von LT_{NT} benötigt. Deswegen sollte LT_{NT} während dieser Doktorarbeit strukturell analysiert und kristallisiert werden. Es konnte mithilfe der CD-Spektroskopie gezeigt werden, dass LT α-helikale Strukturen im N-Terminus besitzt, jedoch sind in initialen Kristallisationsscreens keine Proteinkristalle gewachsen. Um die Wahrscheinlichkeit einer Kristallisation zu erhöhen und aufgrund der nachgewiesenen direkten, hochaffinen Interaktion zwischen LT_{NT} und der pRb *pocket* Domäne wurde untersucht, ob sich beide Proteine als Komplex aufreinigen lassen, dabei wurde festgestellt, dass dieser Komplex erfolgreich isoliert werden kann und in Lösung stabil ist. Damit eignet sich der Komplex für zukünftige Kristallisationsexperimente und ist ein vielversprechender Ansatz für die Generierung von LT-Strukturdaten.

1.2 Summary

The Merkel cell polyomavirus (MCPyV) is a human polyomavirus that is associated with the oncogenesis of a rare and aggressive type of skin cancer, the Merkel cell carcinoma (MCC). The viral genome is monoclonally integrated into the tumor cells. The cells of the primary tumor as well as the cells of the resulting metastases of a single patient show identical integration sites. In the tumor tissue, only the early region of the virus is expressed, resulting in small T (sT) and large T (LT) antigens. It has been shown that proliferation of MCC cell lines is dependent on the expression of T antigens. Interestingly, all MCPyV genomes isolated from MCC tissue carry STOP codon or frameshift mutations in the early region resulting in the expression of truncated LT. Truncated LT proteins encompass the N-terminal part of the protein including the Retinoblastoma (pRb) binding motif, however, the C-terminal region of the protein encoding for origin binding and helicase activity is missing. Thus, truncated LT protein has lost its ability to induce viral replication and no viral progeny can be produced in the tumor cells. Statistical analysis has shown that there is positive selection on the LT N-terminus in MCC cells.

LT is a multifunctional protein that induces viral replication and interacts with cellular proteins, including pRb and p53. The pRb interaction motif lies within the LT N-terminus whereas the interaction with p53 is mediated by the C-terminus. The LT/pRb interaction is considered to be important for cell transformation as transforming properties of the SV40 LT pRb-motif have already been proved.

MCPyV infects about 60-80 % of the human population, and the primary infection occurs mostly during childhood. The virus persists lifelong in the human body without clinical symptoms, although the sites of persistence and the mechanism of persistence are elusive. Furthermore, it is unclear in which cell type MCPyV replicates.

One objective of this thesis was the implementation of an *in vitro* MCPyV replication system that enables the study of the MCPyV life cycle and its role during MCC oncogenesis. When this project began only MCPyV genome sequences from MCC tissues carrying MCPyV-specific STOP or frameshift mutations within the early region were available. Hence, a synthetic MCPyV genome was designed that represented the consensus of all MCC-derived MCPyV sequences and was considered to be close to a MCPyV wild-type genome. This genome was used to transfect ten different cell lines and primary cell types to observe viral replication. In four cell lines viral DNA-replication was observed and out of those cell lines three showed LT expression and in only two cell lines the late transcript VP1 was detected. None of the tested cell lines presented a cytopathic effect after transfection nor was cell-to-cell transmission observed in these cell lines. Nevertheless, viral particles could be isolated from the two cell lines expressing VP1 showing similar size as other polyomaviruses.

Unfortunately, infection experiments with these particles did not result in a productive infection. Taken together, a semi-permissive *in vitro* replication system was established that enables the study of the MCPyV life cycle as well as the identification of cellular proteins that interact with the virus and viral proteins. Furthermore, this provides a system where mutational studies can be performed to elucidate the role of MCPyV in MCC oncogenesis.

Previously it was shown that the LT N-Terminus (LT_{NT}) that is expressed in MCC cells has proliferating and transforming abilities in immortalised and primary cells. Therefore, another objective was the structural and biochemical characterization of the LT N-Terminus (LT_{NT}) that is expressed in MCC cells. To do so, quantitative analysis of the already described LT interaction with pRb was performed. For the first time direct interaction of LT_{NT} with the pRb pocket domain was demonstrated, by applying microscale thermophoresis (MST), a new technique to measure protein interaction and affinities in solution. By applying MST, it was shown that the LT_{NT}/pRb interaction is characterized by a high affinity of binding. Since MCC cell lines are dependent on LT expression and the presence of an intact pRb-motif, and both has been shown *in vitro* as well as in xenograft mouse experiments, this interaction provides promising strategies to identify new inhibitors in MCC therapy.

To design such a therapeutic agent, high resolution structural information of the LT_{NT} are needed. Subsequently, the crystallization of the MCC derived LT_{NT} was one goal of this thesis. Although initial crystallization screens using bacterial expressed LT_{NT} failed, significant information about the biochemical properties of the protein with regard to purification strategies and future crystallization attempts were gained during this thesis.

To enhance the chances to obtain a LT_{NT} crystal structure and due to the high interaction affinity between LT_{NT} and the pRb pocket domain, experiments were performed to investigate whether both proteins could be purified as a complex. By following this approach, the complex was successfully isolated and proved to be stable in solution. It may thus be concluded that the LT_{NT}/pRb_{PD} complex is well suited for crystallization experiments and to generate structural data of the LT-Antigen N-terminus.

2 Einleitung

2.1 Polyomaviren

2.1.1 Die Familie der *Polyomaviridae*

Polyomaviren (PyV) gehören zur Familie der *Polyomaviridae*. Der Name setzt sich aus den griechischen Wörtern *poly* („viele“) und *oma* („Tumor“) zusammen. 1953 wurde das erste Polyomavirus, das Mauspolyomavirus (MPyV), entdeckt, welches in neugeborenen Mäusen verschiedenartige Tumore induziert und somit Namensgeber für diese Familie war [1,2]. 1960 wurde das Affenvirus Simian-Virus 40 (SV40) als Kontamination im Salk-Poliovirus-Impfstoff identifiziert [3]. Seitdem wurden weltweit zahlreiche Polyomaviren in Wirbeltieren, wie Säugetieren und diversen Vogelarten gefunden [4]. MPyV und SV40 werden als Modellsysteme ihrer Familie angesehen, da sie die beiden am intensivsten studierten Vertreter dieser Familie sind und ihre Genomstruktur und Genomsequenz hohe Homogenität zu anderen Polyomaviren aufweisen. Außerdem haben Studien an und mit SV40 maßgeblich zum Verständnis von viraler Onkogenese und zellbiologischen Prozessen, wie zum Beispiel DNA-Replikation, Transkription und Transformation beigetragen [5-9].

2.1.2 Struktur und Genom von Polyomaviren

Polyomaviren sind kleine unbehüllte Viren mit einem Durchmesser von 40-45 nm. Sie haben ein ikosaedrisches Kapsid, welches aus den drei Kapsidproteinen VP1, VP2 und VP3 zusammengesetzt ist. Ihr doppelsträngiges DNA-Genom hat eine Länge von ungefähr fünf Kilobasenpaaren und liegt zirkulär mit Wirts-Histonen verpackt im Kapsid [4]. Das Genom wird in drei Teile unterteilt: die nicht-kodierende Region, die frühe Region und die späte Region (Abbildung 1). Die frühe Region besteht aus dem Tumor-Antigen-Lokus und kodiert für das *small-tumor-antigen* (sT) und das *large-tumor-antigen* (LT). Bei einigen Polyomaviren kodiert die frühe Region ein drittes *tumor-antigen*, z.B. 17 kT bei SV40, 57 kT beim Merkelzellpolyomavirus (MCPyV), middle-T bei MPyV. Für JCPyV wurden sogar mehrere zusätzliche T-Antigene, T’135, T’136 und T’165, beschrieben [4]. Erst kürzlich wurde für MCPyV ein weiteres Protein entdeckt, das ALTO-Protein, welches durch eine +1 Verschiebung vom Leserahmen der T-Antigene exprimiert wird [10]. Ein ALTO-Homolog wurde auch für die frühe Region von MPyV prognostiziert [10]. Alle Proteintranskripte werden aus einem Primärtranskript durch alternatives Spleißen beziehungsweise

Leserahmenverschiebung generiert. Desweiteren ist auf dem Gegenstrang des T-Antigenlokus bei einigen PyV, z.B. SV40, MPyV, MCPyV, eine microRNA kodiert [11].

Die späte Region kodiert für ein Transkript aus dem auch hier durch alternatives Spleißen die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 entstehen, sowie ein viertes Protein, das Agnoprotein [4]. Bei SV40 wurde ein weiteres spätes Protein, das VP4, identifiziert [12].

Die Promotoren der frühen und späten Regionen befinden sich in der nicht-kodierenden Region in entgegengesetzter Richtung. Diese Region beinhaltet auch den Replikationsursprung, wie auch die Sequenzen für DNA-Bindeproteine und Transkriptionsfaktoren [4].

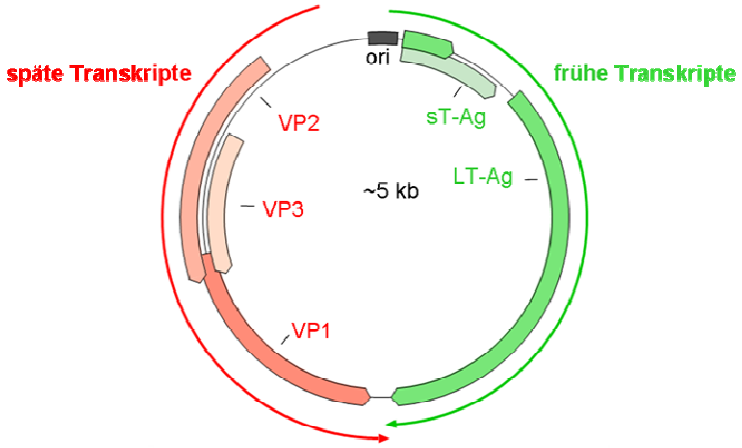


Abbildung 1 Allgemeine Genomstruktur von Polyomaviren. Ein zirkuläres DNA-Genom, eingeteilt in drei Regionen: ori – Replikationsursprung, frühe Transkripte (sT-Ag, LT-Ag) und späte Transkripte (VP1, VP2 und VP3).

2.1.3 Allgemeiner Replikationszyklus von Polyomaviren

Die einzelnen Phasen des PyV-Lebenszyklus wurden vorwiegend an den Model-Polyomaviren SV40 und MPyV studiert. Aufgrund der Tatsache, dass PyV konservierte Sequenzen und Domänen teilen, und damit auch biologische Funktionen, geht man davon aus, dass einzelne Replikationsphasen bei vielen PyV ähnlich ablaufen. Im Folgenden wird der PyV-Replikationszyklus vorwiegend anhand von SV40 erläutert. Das Merkelzellpolyomavirus (MCPyV), mit dem sich diese Arbeit beschäftigt, ist nah mit MPyV jedoch nicht mit SV40 verwandt. Bisher ist nicht viel über den Replikationszyklus von MCPyV bekannt, dennoch wurden bereits Unterschiede zur SV40-Replikation benannt und sollen hier ergänzend mit aufgeführt werden.

Eintritt in die Zelle

Infiziert ein PyV eine permissive Zelle, bindet das Virus an einen Rezeptor und wird in die Zelle aufgenommen. Für mehrere PyV, u.a. SV40, wurden Ganglioside als spezifische Rezeptoren identifiziert, wohingegen bei anderen Viren Sialinsäuren für das Binden an die Zelle ausgemacht wurden [4]. Für das MCPyV wurde kürzlich ein neuer, mehrstufiger Prozess erläutert bei dem das Virus initial an Glykosaminoglykane, wie Heparansulfat bindet und im Anschluss an sialinsäurehaltige Glykane als Ko-Faktor [13].

Die Aufnahme in die Zelle findet entweder über Clathrin-vermittelte oder Caveolin-vermittelte Endozytose statt [4]. Letztere wird für die Aufnahmen von SV40 benutzt. SV40 wird im Caveosom zum endoplasmatischen Retikulum transportiert und anschließend zum Zellkern, wobei dieser Transport bisher nicht gut verstanden ist. Das Viruskapsid wird vor dem Eintritt in den Zellkern zumindest partiell zerlegt. Der Transport der viralen DNA in den Zellkern wird mithilfe von VP3 und dessen Interaktion mit Importin vermittelt [4].

Frühe Transkription

Von der in den Zellkern geschleusten Virus-DNA, welche mit zellulären Histonen assoziiert ist, wird der T-Antigenlokus durch die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert. Es entsteht ein primäres polyadenyliertes Transkript [4]. Durch alternatives Spleißen werden die mRNAs der einzelnen T-Antigene produziert. Bei SV40 gibt es Transkripte für sT, LT sowie 17kT und bei MCPyV für sT, LT sowie 57 kT. Bei MCPyV wurde kürzlich ein weiteres frühes Protein identifiziert, das ALTO-Protein [10]. Dieses wird von den T-Transkripten im +1 Leserahmen translatiert. Die Translation der Proteine findet im Cytoplasma, durch die Wirtsribosomen, statt. Außerdem kodieren beide Viren für microRNAs [14-16], welche durch Autoregulation in der Lage sind virale Genexpression zu steuern. Die Sequenz der SV40 microRNA befindet sich hinter der poly(A)-Region der späten Transkripte und ist damit direkt komplementär zum frühen primären Transkript. Die MCPyV microRNA hingegen kodiert im frühen Transkript, komplementär zu den LT- und 57 kT-Transkripten. Die Sequenz befindet sich zwischen dem pRb-Bindemotiv und der OBD. Für die weiteren Phasen des Replikationszyklus ist es notwenig, dass LT aus dem Zytoplasma in den Zellkern gelangt [4]. Für MCPyV LT wurde eine Kernlokalisierungssequenz im N-Terminus des Proteins zwischen dem pRb-Bindemotiv und der OBD bestimmt [17].

Virale DNA-Replikation

Für die DNA-Replikation ist es notwendig, dass die infizierte Zelle sich in der S-Phase befindet [4]. Da die infizierten Zellen nicht aktiv proliferieren, induziert LT den Übergang in die S-Phase, indem es mit pRb und den verwandten Proteinen, p107 und p130 interagiert. Diese Proteine verhindern normalerweise den Übergang in die S-Phase durch die Bindung

der Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Während der G0/G1-Phase binden die Rb-Proteine im hypophosphoryliertem Zustand an E2F. Wird die Zellteilung natürlich induziert, werden die Rb-Proteine von zellulären Kinasen phosphoryliert, wodurch die Bindung mit den E2F-Proteinen aufgelöst wird. Ist LT in der Zelle, bindet es pRb über das konservierte LxCxE-Motiv und setzt folglich E2F frei, wodurch die Zelle in die S-Phase eintritt. Bei der viralen DNA-Replikation spielt LT noch eine weitere entscheidene Rolle. Das Protein bildet ein Doppel-Hexamer mit dem es an den Replikationsursprung des viralen Genoms bindet und die zelluläre DNA-Polymerase rekrutiert. Mithilfe der LT-Helikasedomäne wird die DNA entwunden und die DNA-Replikation beginnt. LT rekrutiert dafür die zellulären Proteine Replikationsprotein A, Topoisomerase I und die DNA-Polymerase. Die DNA-Replikation verläuft in beide Richtungen [4]. Sowohl bei der SV40-DNA-Replikation, wie auch bei der MCPyV-DNA-Replikation spielt sT eine unterstützende Rolle [4,18]. Für die MCPyV-DNA-Replikation wurde gezeigt, dass das zelluläre Protein Brd4 direkt mit LT interagiert und die virale DNA-Replikation unterstützt und in dessen Abwesenheit die DNA-Replikation signifikant inhibiert ist [19]. Brd4 ist im zellulären Umfeld wichtig für die Regulation der Transkription und der Zellzykluskontrolle.

Späte Transkription

Parallel zur DNA-Replikation findet die späte Transkription statt und auch hier ist LT entscheidend für die Initiierung. Hierfür interagiert LT mit verschiedenen Proteinen der zellulären Transkriptionsmaschinerie. Als Folge werden die Proteine der späten Region transkribiert und im Zytosol translatiert [4].

Zusammensetzen der Viruspartikel und deren Freisetzung

Die Zusammensetzung der Viruspartikel findet im Zellkern statt, dafür müssen die Strukturproteine aus dem Zytosol in den Zellkern gelangen [4]. Alle drei Strukturproteine, VP1, VP2 und VP3 beinhalten im N-Terminus eine Kernlokalisierungssequenz. Für die Zusammensetzung des Kapsids ist das Hauptstrukturprotein VP1 essentiell. VP2 und VP3 können in Abwesenheit von VP1 keine Kapsomere bilden, wohingegen VP1 in der Lage ist sich zu Kapsomeren zusammenzulagern. Im SV40-Replikationszyklus scheinen sich die Strukturproteine vor dem Transport in den Nukleus als Kapsomere zusammenzulagern, wobei die Kapsidformation mit dem Verpacken der *de novo* synthetisierten, Histon-assoziierten Virus-DNA im Zellkern mit Hilfe von Chaperonen geschieht [4]. Schowalter und Kollegen haben gezeigt, dass das MCPyV VP3-Protein nicht exprimiert wird, daher Viruspartikel nur aus VP1 und VP2 zusammengesetzt sind [20]. Wie die Viruspartikel die Zelle verlassen ist nicht vollständig verstanden. SV40 verursacht die Zelllyse, damit die Viruspartikel aus der Zelle freigesetzt werden. Es gibt auch Indizien dafür, dass das Virus durch Zell-zu-Zellkontakt die Zelle verlassen kann [4,21].

Polyomaviren zeichnen sich u.a. durch eine hohe Wirts- und Zellspezifität aus, d.h. sie vermehren sich effektiv nur in bestimmten Zelltypen ihres Wirtes. Trifft ein PyV auf eine nicht-permissive Zelle, so kann es entweder gar nicht in die Zelle eindringen, weil der spezifische Rezeptor fehlt, oder wenn es in die Zelle eindringt, kommt es während des Replikationszyklus zum Replikationsblock aufgrund von Wirtsfaktoren, die fehlen oder vorhanden sind und eine koordinierte Virussynthese verhindern und damit den viralen Lebenszyklus unterbinden [22,23]. Werden die multifunktionalen T-Antigene in nicht-permissiven Zellen exprimiert, treiben sie die Zelle wie oben beschrieben in die S-Phase und binden pRb, p53 sowie andere Wirtsfaktoren. Allerdings findet keine Virusproduktion und Virusfreisetzung statt und die Zelle ist dauerhaft in der S-Phase. Die T-Antigene verhindern dabei apoptotische Prozesse, indem sie in Signaltransduktionswege und Tumorsuppressor-Mechanismen der Zelle eingreifen. Bei der Zellteilung kann das virale Episom verloren gehen und der Phänotyp bleibt erhalten oder das Episom integriert in die Wirts-DNA. Letzteres kann zur Transformation der Zelle mit anschließender Tumorgenese führen [4,22]. Den T-Antigenen wird damit eine entscheidende Rolle in der Transformation der Zellen zugeordnet [22]. Abbildung 2 stellt schematisch die PyV-Replikation in permissiven und nicht-permissiven Zellen dar.

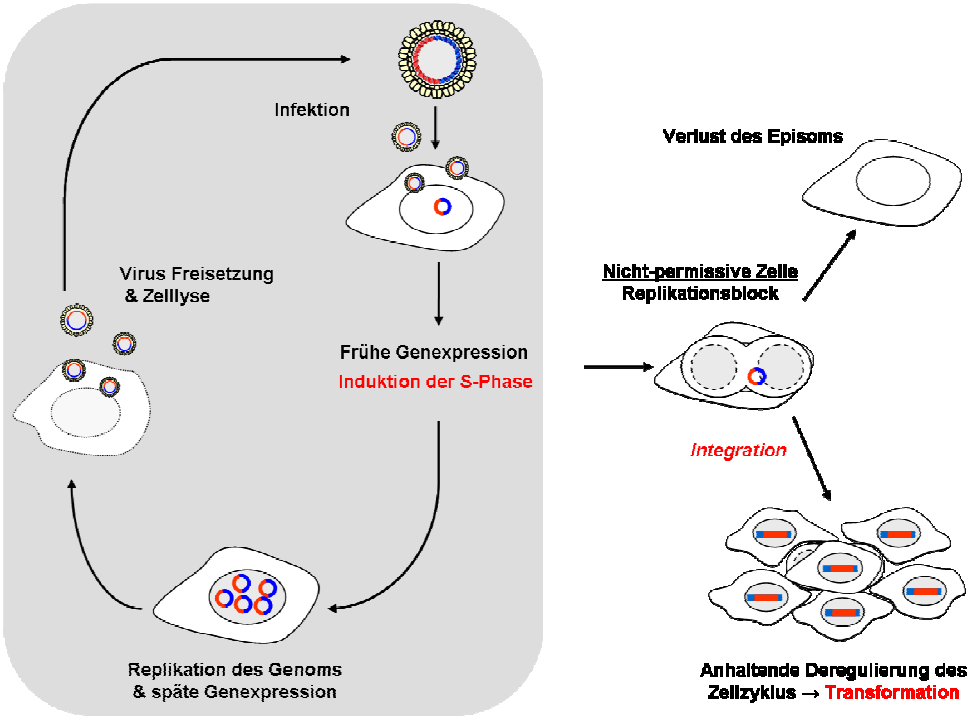


Abbildung 2 Schematischer Lebenszyklus von Polyomaviren in permissiven und nicht-permissiven Zellen (Abbildung von Prof. Adam Grundhoff). Dargestellt auf der linken Seite ist ein produktiver Replikationszyklus in einer permissiven Zelle mit Freisetzung von neu-synthetisierten Viruspartikeln. Auf der rechten Seite dargestellt ist ein Replikationsblock einer nicht-permissiven Zelle, der entweder zum Verlust des Episoms und damit zum Erhalt des Phänotyps führt oder der durch Integration der Virus-DNA zur Transformation der Zelle führt.

2.1.4 Humane Polyomaviren

1971 wurden die ersten beiden humanen Polyomaviren (hPyV) beschrieben. Beide Viren, JC- und BK-Virus wurden aus immunsupprimierten Patienten isoliert und nach den Initialen der Patienten benannt [24,25]. JCPyV verursacht die Gehirnerkrankung Progressive Multifokale Leukoenzephalopathie (PML) und BKPyV kann in nierentransplantierten Menschen eine BK-Nephropathie auslösen, die zum Verlust des Transplantats führen kann. Bei Knochenmarkstransplantierten kann BKV auch eine hämorrhagische Zystitis auslösen.

36 Jahre später, 2007, und mithilfe neuer PCR- und Sequenziertechniken wurden zwei weitere hPyV in respiratorischen Proben von Kindern mit Atemwegserkrankungen detektiert, das KI- und das WU-Virus [26,27]. Beide Viren sind nach den Institutionen in denen sie entdeckt wurden benannt, dem Karolinska-Institut in Stockholm und der Washington University. Diese beiden Viren wurden bisher nicht als etiologische Ursache einer Erkrankung identifiziert.

2008 wurde dann das Merkelzellpolyomavirus (MCPyV) in Tumorzellen des Merkelzellkarzinoms (MCC) mithilfe von Hochdurchsatz-Sequenzierungsverfahren gefunden [28]. Das MCC ist eine seltene aber aggressive Form des Hautkrebses und kann immunsupprimierte und alte Patienten betreffen. Kapitel 2.1.5 geht näher auf den Zusammenhang von MCPyV und MCC ein.

Seitdem wurden sieben weitere hPyV identifiziert, hPyV6, hPyV7, Trichodysplasia Spinulosa-assoziiertes Virus (TSV), hPyV9, Malawi Polyomavirus (MWPyV), St. Louis Polyomavirus (STLPyV) und hPyV12 [29-32]. Von diesen sieben ist TSV mit einer Krankheit assoziiert, der Trichodysplasia Spinulosa, einer seltenen Hautkrankheit bei immunsupprimierten Patienten.

Tabelle 1 fasst alle bisher bekannten hPyV, ihre Seroprävalenz in Erwachsenen und die mit ihnen assoziierten Krankheiten zusammen. Acht der 12 identifizierten hPyV wurden bisher mit keiner Krankheit in Verbindung gebracht. Die Seroprävalenz der meisten hPyV ist in Erwachsenen bei über 50% (Tabelle 1) und die Infektion findet meist im Kindesalter statt, ohne klinische Symptome und gefolgt von lebenslanger Persistenz. Das und die Tatsache, dass ausschließlich immunsupprimierte und alte Menschen von hPyV-Krankheiten betroffen sind, sprechen dafür, dass humane Polyomaviren gut an ihren Wirt angepasst sind und in ihm unauffällig replizieren. MCPyV ist bisher das einzige hPyV, dass mit einer Tumorgenese assoziiert ist.

Tabelle 1 Übersicht über bisher identifizierte humane Polyomaviren, ihre GenBank accession Nummer, Entdeckungsjahr, das Material aus dem sie identifiziert wurden und die Seropävalenz im Menschen, sowie hPyV-assoziierte Krankheiten. Modifiziert und zusammengefasst aus [29,33,34].

hPyV/ GenBank	Entdeckungs-jahr	Organ/ Material der ersten Identifizierung	Seroprävalenz in Erwachsenen [%]	hPyV-assoziierte Krankheit
JCPyV NC_001699	1971	Gehirn	39-81	Progressive Multifokale Leukoenzephalopathie
BKPyV NC_001538	1971	Urin	82-99	Nephropathie, hämorrhagische Zystitis
KIPyV NC_009238	2006	respiratorische Sekrete	55-90	-
WUPyV NC_009539	2006	respiratorische Sekrete	69-98	-
MCPyV NC_010277	2008	MCC-Tumor, Haut	60-81	Merkelzellkarzinom
hPyV6 NC_014406	2010	Haut	69	-
hPyV7 NC_014407	2010	Haut	35	-
TSV NC_014361	2010	Haut	70	Trichodysplasia Spinulosa
hPyV9 NC_015150	2011	Haut, Serum	21-53	-
hPyV 10 (MWPyV) JX262162	2012	Haut, Stuhl	42	-
STLPyV NC_020106	2013	Stuhl	nicht bestimmt	-
hPyV12 NC_020890	2013	Stuhl	33	-

In Abbildung 3 ist der phylogenetische Stammbaum der humanen Polyomaviren zusammen mit SV40 und MPyV dargestellt. Es fällt auf, dass hPyV10 (MWPyV), STLPyV und hPyV12 evolutionär weit von den anderen hPyV entfernt sind. Trotz unterschiedlicher Wirts-Spezies ist SV40 nah mit JCPyV und BKPyV verwandt. Anhand dieser Abbildung ist zu sehen, dass MCPyV nah mit MPyV verwandt ist. Es gehört zur Gruppe des Mauspolyomavirus und ist, dem hier nicht dargestellten, B-lymphotropen Polyomavirus (*African green monkey lymphotropic polyomavirus*) am ähnlichsten [28,35]. Seit der taxonomischen Neuordnung von PyV wird MCPyV der Gattung der *Orthopolyomaviridae* zugeordnet [36].

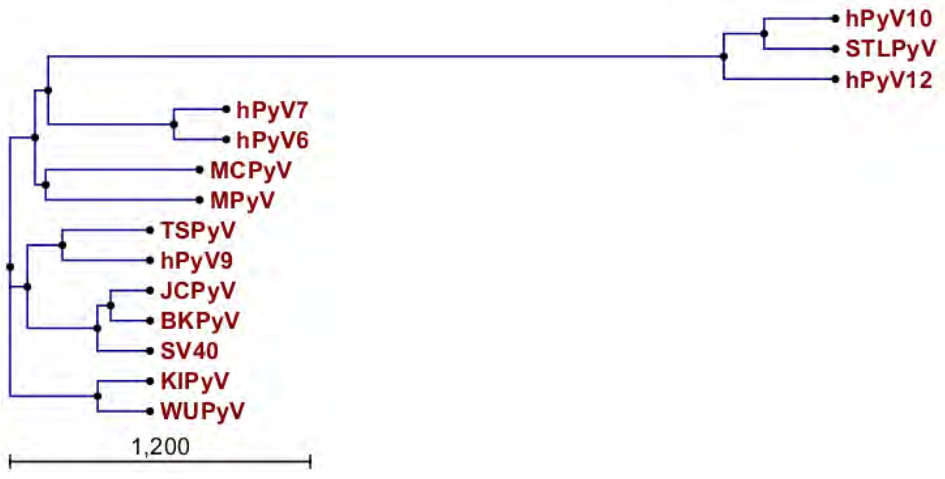


Abbildung 3 Phylogenetischer Stammbaum der humanen Polyomaviren inklusive SV40 und MPyV, basierend auf den Genomsequenzen. Der Stammbaum wurde mit CLC Main Workbench 6.6.1 erstellt. Die *Accession* Nummern der Genomsequenzen sind JCVPyV NC_001699, BKPyV NC_001538, KIPyV NC_009238, WUPyV NC_009539, MCPyV HM011555, hPyV6 HM011558, hPyV7 HM011564, TSPyV GU989205, hPyV9 HQ696595, hPyV10 JX262162, STLPyV JX463183, hPyV12 JX308829, SV40 J02400, MPyV NC_001515.

2.1.5 Das Merkelzellpolyomavirus (MCPyV)

2.1.5.1 Entdeckung des MCPyV in Merkelzellkarzinom (MCC) Proben

Das neuroendokrine MCC ist ein seltenes Karzinom der Haut mit einer Inzidenz von ca. 0,18-0,41 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr, die sich während der letzten zwei Jahrzehnte verdreifacht hat [37]. MCC betrifft vorwiegend ältere (Durchschnittsalter >70 Jahre) und immunsupprimierte Patienten; so haben HIV-Infizierte, Organ-Transplantierte oder Patienten mit Leukämie ein etwa 15-fach höheres Risiko an MCC zu erkranken. Die Zunahme der Inzidenz beruht auf dem Älterwerden der Bevölkerung, einer höheren Lebenserwartung immunsupprimierter Patienten sowie auf der verbesserten Diagnostik [37]. MCC ist ein äußerst aggressiver Tumor, ca. 50% aller Erkrankten mit Metastasen versterben in den ersten 6 Monaten nach Diagnose. Die allgemeine Fünfjahresüberlebensrate liegt bei 60% und derzeitige Therapieformen beinhalten die operative Entfernung von Primärtumor und Metastasen, Chemotherapie wie auch Strahlentherapie [37].

Die Pathogenese des MCC ist bisher weitgehend unverstanden [37]. Die Karzinome treten hauptsächlich an Licht-exponierten Körperregionen, wie Kopf, Armen und Beinen auf. Es wird daher angenommen, das UV-Licht zur Entstehung von MCC beiträgt. Dass MCC ausschließlich bei älteren und immunsupprimierten Menschen vorkommt, spricht dafür,

dass bei diesen Patienten immunologische Defizite existieren, die die Entstehung von MCC begünstigen. Damit liegt nahe, dass MCC eine infektiöse Ursache haben könnte.

Eines der wichtigsten Forschungsergebnisse hinsichtlich der MCC-Pathogenese war im Jahr 2008 die Identifizierung eines neuen humanen Polyomavirus aus MCC-Geweben mit Hilfe einer Hochdurchsatz-Transkriptom-Analyse [28]. Feng und Kollegen vermuteten, dass aufgrund der Tatsache, das MCC typischerweise bei alten und immunsupprimerten Menschen vorkommt, die Krankheit einen infektiologischen Ursprung hat. Sie haben aus Geweben von 10 MCC-Tumoren cDNA-Bibliotheken generiert mit insgesamt knapp 400.000 cDNA-Sequenzen, welche anschließend sequenziert und analysiert wurden. Von diesen 400.000 Sequenzen ähnelten zwei Sequenzen dem BKPyV und dem *African green monkey lymphotropic* Polyomavirus. Dieses neu identifizierte PyV wurde nach dem Karzinom als Merkelzellpolyomavirus benannt [28].

Außerdem konnten Feng und Kollegen zeigen, dass das MCPyV nicht als virale episomale DNA in MCC-Zellen vorliegt, sondern monoklonal integriert ist in der chromosomalen DNA des Tumorgewebes [28], d.h. bei allen Zellen des Karzinoms und den daraus resultierenden Metastasen ist die MCPyV-DNA an der gleichen Stelle in der Wirts-DNA integriert. Diese Tatsache setzt voraus, dass die Integration der Virus-DNA vor der Tumorgenese stattgefunden haben muss. Der Integrationsbereich ist von Patient zu Patient unterschiedlich. Außerdem hat die Sequenzierung viraler Genome in MCC-Zellen ergeben, dass sich im LT-Lokus immer Mutationen und/ oder Deletionen befinden, die zur Expression eines verkürzten LTs führen, wobei die Expression des sT nicht betroffen ist [28,38,39]. Die LT-Verkürzung hat zur Folge, dass das MCPyV in MCC-Zellen replikationsinkompetent ist und keine Viruspartikel produziert werden. In Kapitel 2.1.5.4 wird näher auf das verkürzte LT und dessen Rolle in der MCC-Tumorgenese eingegangen.

Verschiedene Studien haben die MCPyV-Anwesenheit in MCC-Proben untersucht und MCPyV-DNA in ~80% der Gewebe gefunden [39-43]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie hat mithilfe von verbesserten Detektionsmethoden sogar in allen in der Studie untersuchten MCC-Geweben MCPyV-DNA detektieren können und geht davon aus, dass mehr als 97% beziehungsweise alle Tumore MCPyV-DNA enthalten [44]. Weiterhin gehen die Autoren davon aus, dass das MCPyV zur Tumorgenese von allen MCC beiträgt [44].

Aufgrund der Assoziation von MCPyV mit der Entstehung von MCC hat die *International Agency for Research on Cancer* der Weltgesundheitsorganisation dieses Jahr MCPyV in die Gruppe 2A Karzinogen eingestuft, was bedeutet, dass MCPyV als „wahrscheinlich karzinogen für Menschen“ gilt, wie z.B. auch das humane Papillomavirus Typ 68. Das Merkelzellpolyomavirus ist eines von sieben humanen Onkoviren, neben dem Epstein-Barr-

Virus, den Hepatitisviren B und C, dem Kaposi-Sarkomvirus, den humanen Papillomaviren und dem humanen T-lymphotropen Virus.

2.1.5.2 Struktur und Genom von MCPyV

Das MCPyV hat den für Polyomaviren charakteristischen Genomaufbau mit der nicht-kodierenden Region, der frühen Region und der späten Region (siehe Kapitel 2.1.1, [28,38]). Das Genom ist ~5,4 kbp groß. Der Ablauf der Replikation mit früher Transkription, DNA-Replikation und später Transkription geht einher mit der oben beschriebenen Kaskade der PyV-Replikation (Kapitel 2.1.1, [45]).

Die frühe Region enthält den T-Antigenlokus, welcher ~3 kbp lang ist. Durch alternatives Spleißen des primären Transkripts werden drei T-Antigene exprimiert: das sT, das LT sowie das 57 kT (Abbildung 6, [28,46]). Unsere Arbeitsgruppe und eine weitere konnten zeigen, dass diese Proteine die ersten viralen Proteine sind, die nach Transfektion des MCPyV-Genoms [45,47] und wahrscheinlich nach einer Infektion exprimiert werden. Auf die drei MCPyV T-Antigene wird im folgenden Kapitel näher eingegangen. 2013 wurde ein weiteres Protein identifiziert, welches im 2. Exon von LT kodiert ist und einen alternativen Leserahmen benutzt, das ALTO-Protein (*Alternate frame of the Large T Open reading frame*, [10]. Dieses Protein wird während der DNA-Replikation exprimiert, ist jedoch für diese nicht essentiell [10]. Welche Funktion ALTO in der Virusreplikation spielt, ist bisher nicht geklärt. Zusätzlich befindet sich in der frühen Region die Sequenz für die MCPyV mikroRNA MCV-miR-M1 [14,15]. Diese ist auf dem Gegenstrang im 2. Exon von LT kodiert, liegt in unmittelbarer Nähe des pRB-Bindemotivs und ist vollkommen komplementär zur LT-Sequenz. Letzteres deutet darauf hin, dass die mikroRNA für die Autoregulation der LT-Expression verantwortlich ist [14,15]. In den zwei Studien, die die MCV-miR-M1 identifiziert und sequenziert haben, wurden verschiedene experimentelle Ansätze gewählt. Seo und Kollgenen haben einen *in silico* und *in vitro* Ansatz gewählt und Lee und Kollegen einen *in vivo* Ansatz, bei dem MCV-miR-M1 in MCC-Tumoren detektiert wurde [14,15]. Bei beiden Studien wurde dieselbe pre-MCV-miR-M1 identifiziert, jedoch zwei verschiedene reife mikroRNAs detektiert, deren Sequenz um zwei Nukleotide verschoben ist, was bedeuten würde, dass beide mikroRNAs unterschiedliche zelluläre Zielgene hätten.

In der späten Region sind die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 kodiert, wobei VP3 nicht exprimiert wird [20]. Unsere Arbeitsgruppe und eine weitere konnten zeigen, dass sich ungefähr 4 Tage nach Transfektion des MCPyV Episoms in transfizierten Zellen Viruspartikel mit einer Größe von ~40 nm bilden [45,47]. In diesen Viruspartikeln konnte virale DNA detektiert werden [47], so dass davon auszugehen ist, dass virale DNA während der Replikation in die Partikel verpackt wurde.

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der exprimierten Proteine sT, LT sowie VP1 und VP2 so haben sie eine höhere Homologie zu den Proteinen des MPyV als zu denen der anderen humanen Polyomaviren [28]. In Abbildung 4 ist ein phylogenetischer Vergleich der hPyV LTs mit SV40 LT und MPyV LT dargestellt.

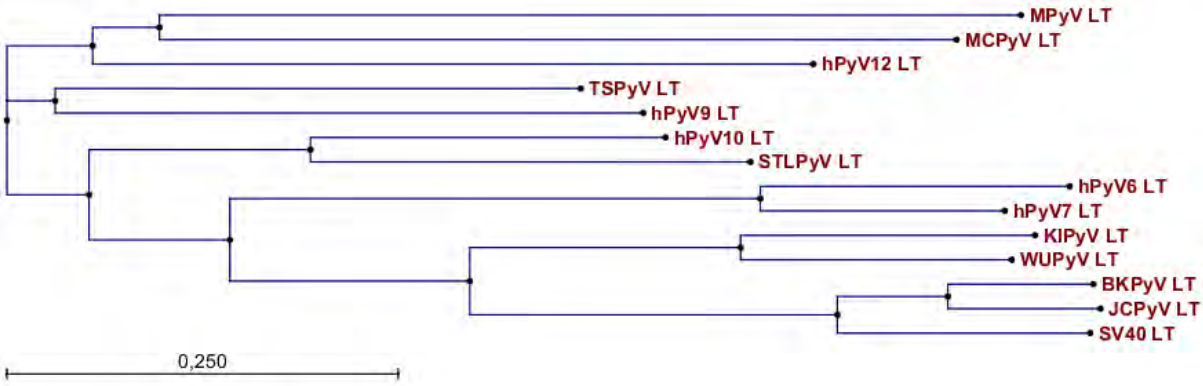


Abbildung 4 Phylogenetischer Vergleich der LT-Antigene humaner Polyomaviren inklusive SV40 und MPyV, basierend auf den Aminosäuresequenzen. MCPyV LT ist näher verwandt mit dem MPyV LT als mit anderen hPyV LTs. Der Stammbaum wurde mit CLC Main Workbench 6.6.1 erstellt. Die *Accession* Nummern der Proteinsequenzen sind JCVPyV NP_043512, BKPyV YP_717940, KIPyV YP_001111259, WUPyV YP_001285488, MCPyV ADE45412, hPyV6 ADE45425, hPyV7 ADE45455, TSPyV ADK12666, hPyV9 ADV15633, hPyV10 AFN43007, STLPyV AGC03170, hPyV12 AGH58117, SV40 AAB59924, MPyV NP_041264.

2.1.5.3 Genprodukte des MCPyV T-Antigenlokus

Der MCPyV T-Antigenlokus erstreckt sich über einen Bereich von fast 3 kb und ist damit der längste T-Antigenlokus unter den Polyomaviren. Die MCPyV T-Antigene enthalten konservierte Domänen, die bei anderen Polyomaviren bereits identifiziert und studiert wurden (Abbildung 5) [38,48], was darauf schließen lässt, dass die MCPyV T-Antigene viele Funktionen mit anderen PyV T-Antigenen teilen. Nachfolgend werden die im T-Antigenlokus kodierten Proteine und deren Domänen benannt, sowie deren Funktion, soweit bereits bekannt, erläutert (Abbildung 5). Der MCPyV T-Antigenlokus kodiert für die T-Antigene sT, LT und 57 kT, sowie für das ALTO-Protein.

Die Proteine sT, LT und 57 kT teilen sich den gleichen N-Terminus mit der CR1 (*conserved region 1*) und der DnaJ-Domäne. Bei der Expression von sT wird über die Spleißstelle des Exon1 des Primärtranskripts hinweggelesen. Dabei entsteht ein Protein mit 186 Aminosäuren, welches als einziges der drei T-Antigene das PP2A-Bindemotiv enthält. LT (817 aa) ist ein Spleißprodukt aus Exon1 und Exon2 und enthält zusätzlich zu CR1 und der DnaJ-Domäne eine Kernlokalisierungssequenz, das pRB-Bindemotiv (LxCxE), eine *origin binding* Domäne (OBD) mit der LT an den Replikationsursprung binden kann und eine

Helikasefunktion. Außerdem wurde bei LT kürzlich das Vam6p-Bindemotiv identifiziert [49], welches sich direkt N-terminal vom pRb-Bindemotiv befindet. Das Vam6p-Bindemotiv gibt es bei anderen hPyV nicht. Das 57 kT (432 aa) enthält wie auch LT das Vam6p- und pRb-Bindemotiv sowie die Kernlokalisierungssequenz, jedoch fehlt aufgrund einer weiteren Spleißstelle die OBD, die ATPase-Domäne und ein Teil der Helikase-Domäne. LT und 57 kT teilen sich außerdem die gleichen 100 Aminosäuren im äußersten C-Terminus, welcher noch einen Teil der Helikasedomäne enthält (Abbildung 5). Weitere Funktionen wurden diesem äußersten C-Terminus bisher nicht zugeordnent. LT wie auch 57 kT haben eine 200 Aminosäuren große MCPyV spezifische Sequenz (MUR), welche das Vam6p- und das pRb-Bindemotiv flankiert (Abbildung 5), sowie die Kernlokalisierungssequenz beinhaltet, welche zwischen dem pRb-Bindemotiv und der OBD liegt. Die MUR ist spezifisch für MCPyV und bisher konnte dieser Region die Relokalisierung von Vam6p zugewiesen werden [49]. Weitere Funktionen der MUR wurden bisher nicht beschrieben.

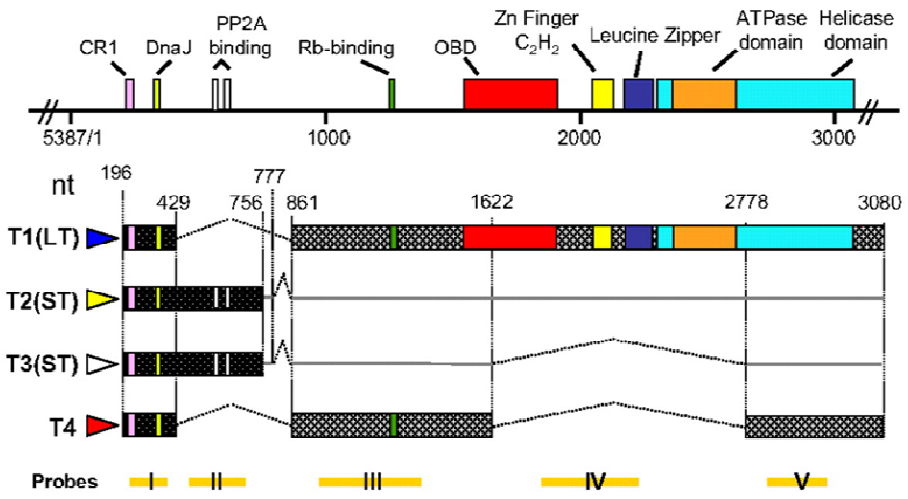


Abbildung 5 MCPyV T-Antigenlokus mit den Transkripten für drei der vier kodierten Proteine: LT (T1), sT (T2&T3) und 57 kT (T4). Dargestellt sind die identifizierten Domänen der T-Antigene. Gerade und gepunktete Linien entsprechen nicht-kodierenden und gespleißten Regionen. Hier nicht dargestellt sind die beiden ALTO-Transkripte mit den offenen Leserahmen 880-1624 und 880-1624/2778-2785, [10]. Abbildung ist modifiziert aus [38].

Die DnaJ-Domäne

Die oben genannten Domänen der T-Antigene wurden vorwiegend an SV40 studiert und den meisten Domänen werden Funktionen in der Transformation von Zellen und der Tumorgenese zugeschrieben (zusammengefasst in [6]). So bindet die DnaJ-Domäne (HPDKGG) das Hitzeschockprotein Hsc70, wodurch dessen ATP-Hydrolyseaktivität die Komplexe zwischen den Retinoblastomaproteinen (pRb, P107, p130) und dem Transkriptionsfaktor E2F aufgelöst werden. Dadurch wird die Repression von pRb auf den

Transkriptionsfaktor E2F aufgehoben, E2F-abhängige Promotoren werden aktiviert und die S-Phase des Zellzyklus wird initiiert (siehe Kapitel 2.1.1) [6]. Durch die Interaktion der DnaJ-Domäne mit Hsc70 werden auch noch weitere Signalmoleküle und damit Signalwege aktiviert (zusammengefasst in [9]).

Das pRb-Bindemotiv

Das pRb-Bindemotiv (LxCxE) hingegen interagiert direkt mit den Retinoblastomaproteinen, wodurch der pRb/E2F-Komplex aufgelöst und E2F freigesetzt wird. Zusammen mit der DnaJ Domäne trägt das pRb-Bindemotiv bei SV40 entscheidend zur Transformation bei [6]. SV40 LT-Mutanten, die keine transformierenden Eigenschaften mehr haben, sind unfähig pRb zu binden (zusammengefasst in [9]). Für MCPyV konnte gezeigt werden, dass LT mit pRb interagiert [38] und dass ein intaktes pRb-Bindemotiv notwendig ist für das Wachstum vom MCC-Zelllinien [50]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Interaktion zwischen LT und pRb eine direkte Interaktion ist und dass das verkürzte LT pRb stärker bindet als das Volllängen-LT [21]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass der LT N-Terminus die Lokalisation von pRb in der Zelle verändert und pRb im Zytoplasma detektiert wird. Volllängen MCPyV wie auch SV40 LT hingegen haben keinen Einfluss auf die zelluläre Verteilung von pRb [21].

Das Vam6p-Bindemotiv

Das Vam6p-Bindemotiv von LT sorgt dafür, dass das im Zytoplasma vorliegende Vam6p durch LT in den Zellkern befördert wird [49]. Welche Funktion das für die Replikation von MCPyV beziehungsweise dessen Transformationseigenschaften hat, ist bisher ungeklärt. Das Motiv befindet sich N-terminal in direkter Nachbarschaft zum pRb-Bindemotiv.

Das PP2A-Bindemotiv

Das PP2A-Bindemotiv ist sT spezifisch und verantwortlich für die Interaktion mit der Proteinphosphatase 2A (PP2A). Es wurde gezeigt, dass durch diese Interaktion der zelluläre Translationsfaktor 4E-BP1 dauerhaft phosphoryliert, folglich inaktiv ist [51], was zur Induzierung der cap-abhängigen Translation führen kann. Dieser Prozess kann zur Transformation der Zelle führen [51].

Die Origin Binding Domain und die Helikase

Die OBD ist essentiell für die Initiation der DNA-Replikation, genauso wie die Helikasedomäne des LT. Die Helikase besitzt bei SV40 LT u.a. die Funktion p53 zu binden, was die Tumorsuppressoreigenschaft von p53 blockiert und damit dessen proapoptotische

Funktionen [6]. Eine solche direkte Bindung zwischen MCPyV LT und p53 konnte bisher nicht nachgewiesen werden [21,52].

Der äußerste LT C-Terminus

Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Cheng und Kollegen impliziert, dass der äußerste LT C-Terminus mit den letzten 100 Aminosäuren (Exon 3) eine wachstumsinhibierende Funktion haben könnte, wodurch das Wachstum von MCPyV-infizierten Zellen gemindert wird [52]. Cheng und Kollegen haben beobachtet, dass Fibroblasten, die den LT N-Terminus exprimieren einen Wachstumsvorteil gegenüber Fibroblasten haben, die das Volllängen-LT oder 57 kT exprimieren. Anschließend wurde eine MCC-Zelllinie mit Exon 3 transduziert, welche gegenüber den Kontrollzellen vermindertes Zellwachstum zeigte. Ein ähnliches Ergebnis wurde beobachtet mit Fibroblastenzellen, die sowohl SV40 LT wie auch sT exprimieren und die mit Exon 3 transduziert wurde. Diese Zellen hatten eine deutlich geringere Wachstumsrate als die Kontrollzellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der äußerste C-Terminus mit einem oder mehreren zellulären Proteinen interagiert, welche für das Zellwachstum notwendig sind [52].

Das ALTO-Protein

Kürzlich haben Carter und Kollegen ein neues Protein identifiziert, welches im T-Antigenlokus kodiert ist [10]. Dieses Protein, ALTO (*Alternate frame of the large T open reading frame*) wird von einem Startkodon im zweiten Exon von LT im +1 Leserahmen transkribiert und während der DNA-Replikation exprimiert. Theoretisch können alle vier T-Antigen-Spleißprodukte (Abbildung 5) für ALTO kodieren. Die für ALTO kodierende Region umfasst auch die MUR des LT-Antigens. Die Autoren konnten zeigen, dass ALTO nicht für die virale DNA-Replikation notwendig ist, aber vermuten, dass das Protein eine unterstützende Rolle während des viralen Lebenszyklus spielt. Außerdem wurde anhand von bioinformatischen Analysen vorausgesagt, dass 19 von 46 ALTO-Sequenzen aus MCC-Gewebe Stopmutationen oder Leserahmenverschiebungen haben, die auch für die verkürzt exprimierten LTs in MCC verantwortlich sind [10].

Aufgrund der hier aufgeführten Eigenschaften der T-Antigene, werden diese auch als Onkoproteine bezeichnet. Welchen Einfluss die einzelnen Domänen auf die Transformation von Zellen und die Tumorgenese haben, hängt vom jeweilen Polyomavirus ab [4]. Im folgenden Kapitel werden die Besonderheiten des MCPyV T-Antigenlokus in Merkelzellkarzinomen erläutert.

2.1.5.4 MCPyV T-Antigene und ihre Rolle in der MCC-Tumorgenese

Wie bereits in Kapitel 2.1.5.1 beschrieben, haben die in MCC-Gewebe integrierten MCPyV-Genome spezifische Mutationen und Deletionen, die in einem verkürzt exprimierten LT (LT_{NT}) resultieren (Abbildung 6). Diese Mutationen und Deletionen sind im C-Terminus zu finden. Die verkürzten LT enthalten den N-Terminus und somit die CR1 und DnaJ-Domäne, wie auch die Vam6p- und pRb-Bindemotive. Die Kernlokalisierungssequenz ist meist erhalten, jedoch wird der C-Terminus mit OBD und Helikase nicht exprimiert (Abbildung 6) [28,38,39]. Es ist auffällig, dass bei allen verkürzten LTs das pRb-Bindemotiv erhalten ist und der C-Terminus mit OBD und Helikase, verantwortlich für die Replikation des Virus nicht exprimiert wird. Dies lässt vermuten, dass im MCC-Kontext mit der Tumorgenese der LT_{NT} favorisiert ist und es eine Selektion gegen den C-Terminus gibt [47,52]. Tatsächlich konnte unsere Gruppe mithilfe einer statistischen Untersuchung von 42 LT_{NT}-Aminosäuresequenzen aus MCC-Geweben eine signifikant positive Selektion für den N-Terminus inklusive des pRb-Bindemotivs bestimmen, wohingegen der Erhalt der Kernlokalisierungssequenz statistisch nicht relevant ist (Abbildung 6) [21].

sT ist von diesen MCC-spezifischen Mutationen nicht betroffen und das 57 kT wurde bisher nicht in MCC-Geweben detektiert, was auch daran liegen kann, dass ein Teil der Stopmutationen im 2. Exon die Expression eines intakten 57 kT verhindert. Durch den Verlust des LT C-Terminus findet keine Virusreplikation statt und es werden keine viralen

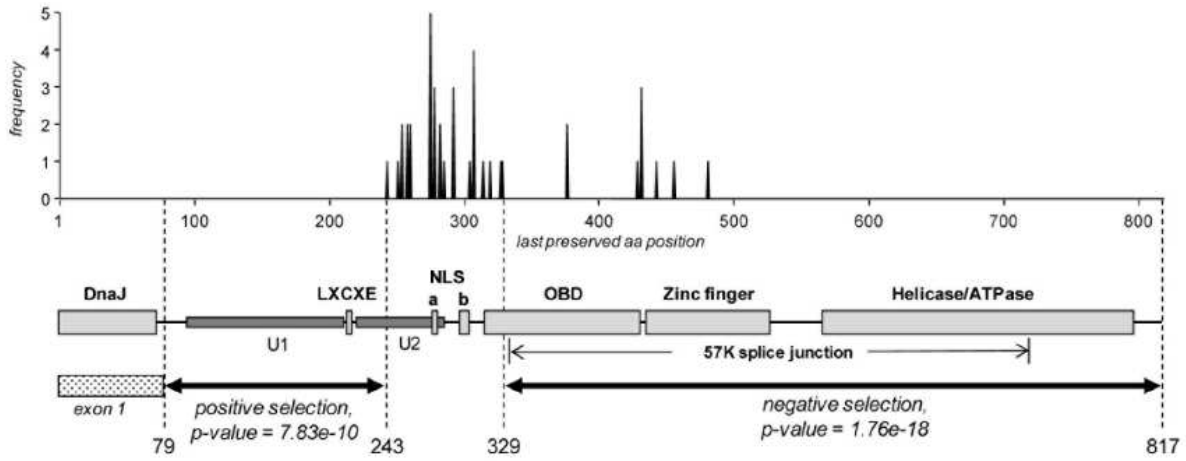


Abbildung 6 Frequenzdiagramm der letzten erhaltenen Aminosäureposition vor dem Stopkodon beziehungsweise der Leserahmenverschiebung von 42 verkürzten LT-Antigenen aus MCC-Geweben. Regionen, die einer positiven oder negativen Selektion unterliegen sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Dargestellt als graue Kasten sind die funktionellen Domänen des LT-Antigens. Angegeben sind auch die Kernlokalisierungssequenzen von MCPyV (NLS a) und von SV40 (NLS b). U1 und U2 repräsentieren die MUR. Die Abbildung ist aus [21].

Strukturproteine synthetisiert. Demnach werden in MCC-Geweben sT und LT_{NT} mit den konservierten Regionen DnaJ-Domäne, PP2A-, Vamp6- sowie pRb-Bindemotiv exprimiert.

Virus-assoziierte Tumorgenese findet statt, wenn das Virus eine Zelle infiziert und die frühen Gene exprimiert werden, aber die Virusreplikation nicht vollständig abläuft. Letzteres geschieht, wenn entweder die Zelle nicht permissiv für die Virusreplikation ist oder das Virus unfähig ist, den kompletten lytischen Replikationszyklus zu durchlaufen (Abbildung 2) [4]. Damit das Virusgenom während der Zellteilung nicht verloren geht und die Zelle wieder ihren ursprünglichen Phänotyp annimmt, muss die Virus-DNA in das Zellgenom integrieren, wie es zum Beispiel bei SV40-transformierten Zellen und MCPyV- positiven MCCs beobachtet wurde [6,28].

Für die Transformation von Zellen durch SV40 ist der T-Antigenlokus und die Interaktion von LT mit den Retinoblastomaproteinen, p53 und Hsc70 Proteinen ausreichend [4,6]. In einigen Zelltypen sind sogar die ersten 121 Aminosäuren für die Transformation ausreichend, d.h. die Interaktion mit der p53-Bindedomäne ist bei diesen Zellen nicht für die Transformation notwendig [4]. SV40 LT ist in der Lage allein Zellen zu transformieren, jedoch wird unter bestimmten Bedingungen, z.B. für die Transformation von primären humanen Zellen sT benötigt. Im Gegensatz dazu ist sT allein nicht in der Lage, Zellen zu transformieren [4,6].

Bei MPyV hingegen ist das MT das primäre Onkoprotein und in der Lage etablierte Zelllinien zu transformieren, allerdings werden die anderen beiden T-Antigene für die Transformation von primären Zellen benötigt [4].

Shuda und Kollegen haben gezeigt, dass in den meisten untersuchten MCPyV-positiven MCC-Geweben das verkürzte MCPyV LT exprimiert wird, jedoch nicht in allen, wohingegen sT auch in Tumoren die kein LT_{NT} exprimieren detektiert wurde [53]. Das ist erstaunlich aufgrund der Tatsache, dass die mRNAs für sT und LT_{NT} Spleißvarianten desselben Primärtranskripts sind und die Spleißstelle im ersten Exon intakt ist. Eine andere Arbeitsgruppe hat diese Diskrepanz untersucht und festgestellt, dass der von Shuda und Kollegen benutzte LT-Antikörper Cm2B4 LT in 80% der untersuchten MCC-Geweben detektiert, wohingegen ein anderer Antikörper (Ab3) LT in 97% der untersuchten MCC-Geweben detektiert hat [44]. Das lässt darauf schließen, dass mit Cm2B4 nicht alle exprimierten LT_{NT}-Proteine detektiert und in MCPyV-positiven MCC-Tumoren sowohl sT wie auch LT_{NT} exprimiert werden.

Den ersten Beweis, dass MCPyV T-Antigene zur MCC-Tumorgenese beitragen, lieferten Houben und Kollegen indem sie nachwiesen, dass MCPyV-positive MCC-Zellen auf die Expression von T-Antigenen angewiesen sind [54]. In verschiedenen MCC-Zelllinien wurde die Expression der T-Antigene mithilfe von shRNAs erfolgreich herunterreguliert. Die

shRNAs waren gegen Exon 1 gerichtet, dadurch waren alle T-Antigene Ziel des Knockdowns. Die Zellen, in denen die T-Antigenexpression unterdrückt wurde, haben aufgehört zu proliferieren und/ oder sind in die Apoptose eingetreten. Damit wurde gezeigt, dass MCPyV-positive MCC-Zelllinien abhängig von der T-Antigenexpression sind.

In einer anschließenden Studie wurden diese Ergebnisse in Xenograft Mausexperimenten bestätig [50]. Hierfür wurden MCC-Tumore in NOC/Scid Mäusen induziert, indem den Mäusen eine MCPyV-positive MCC-Zelllinie transplantiert wurde. In den Mäusen sind Tumore gewachsen, die den gleichen Phänotyp wie die transplantierte Zelllinie hatten. Mithilfe von shRNAs wurde die T-Antigenexpression herunterreguliert, wodurch die Tumore aufgehört haben zu wachsen und sich sogar zurückgebildet haben. Dieser Effekt wurde aufgehoben, nachdem den Tieren ein shRNA-resistenter T-Antigenlokus transduziert und folglich T-Antigene exprimiert wurden. Damit war die Wachstumsinhibition fast vollständig aufgehoben. Ähnliche Effekte wurden beobachtet mit einem spezifischen Knockdown von LT und anschließender ektopischer LT-Expression. Weiterführende Experimente, wo nach dem Knockdown der T-Antigene bzw. dem LT ektopisch LT exprimiert wurde, in dem das pRb-Bindemotiv mutiert war, haben gezeigt, dass die Wachstumsinhibition nicht aufgehoben wurde. Diese Ergebnisse bestätigen nicht nur die T-Antigen-Abhängigkeit von MCC-Zellen, sondern zeigen auch, dass LT mit einem intakten pRb-Bindemotiv für das Wachstum der MCC-Zellen essentiell ist.

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass sT in der Lage ist immortalisierte Zellen vollständig zu transformieren [51]. Dafür wurden Rattenfibroblasten und humane Fibroblasten mit sT transduziert und deren Wachstum in Soft-Agar und Serum-freien Medium beobachtet. Die Rattenfibroblasten wurden vollständig von sT transformiert, wohingegen humane Fibroblasten schwächeres Wachstum zeigten und partiell transformiert wurden. Mit LT transduzierte Zellen sind weder im Soft-Agar noch im serum-freien Medium gewachsen. Allein bei Zellen transduziert mit LT_{NT} konnten kleine zelluläre Aggregate im Soft-Agar detektiert werden, jedoch keine größeren Kolonien. Diese Ergebnisse implizieren, dass sT entscheidend für die Transformation ist. Erstaunlicherweise haben die Autoren auch gezeigt, dass die Transformation unabhängig von der Interaktion mit PP2A und Hsc70 ist [51]. Das steht im Kontrast zu den zellregulierenden Eigenschaften von sT-Antigenen anderer PyV, wie MPyV und SV40 [55]. Die beobachtete Transformationseigenschaft von sT führen die Autoren auf die durch sT verursachte anhaltende Hyperphosphorylierung von 4E-BP1 zurück, was die cap-abhängige Proteintranslation verstärkt. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein Knockdown von sT in MCC-Zelllinien wachstumsinhibierend ist, jedoch kein Zelltod beobachtet wurde, wie beim Knockdown aller T-Antigene, was auf eine synergistische Rolle beider T-Antigene schließen lässt [50,51].

Die transformierenden Eigenschaften von sT wurden durch Angermeyer und Kollegen bestätigt [56]. sT und LT wurden in Mausfibroblasten transduziert und sT konnte die Zellen vollständig transformieren, wohingegen LT keinen Effekt auf die Zellen hatte. Auch wurde in dieser Studie bestätigt, dass LT für das Überleben und Wachstum von MCC-Zelllinien essentiell ist. Jedoch konnte keine sT-Abhängigkeit von MCC-Zelllinien detektiert werden [56].

Cheng und Kollegen haben die Proliferation von immortalisierten Nagerfibroblasten untersucht, die mit verschiedenen T-Antigen-Konstrukten stabil transfiziert wurden [52]. Zellen in denen sT und verkürztes LT exprimiert wurden, zeigten eine höhere Proliferation als die Kontrollzellen und Zellen mit 57 kT oder dem Volllängen-LT. Interessanterweise wuchsen Zellen mit 57 kT und dem Volllängen-LT schneller als die Kontrollzellen. Demnach besitzen sT und das verkürzte LT wachstumsfördernde Eigenschaften.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zum ersten Mal zeigen, dass sowohl Volllängen-LT wie auch verkürzt exprimierte LTs aus MCCs in der Lage sind primäre Rattenzellen zu transformieren [21]. Quantitative Transformationsassays haben gezeigt, dass bis auf ein Konstrukt die verkürzten LT-Proteine ein ähnliches oder höheres Transformationspotential haben als das Volllängen-LT.

Während übereinstimmende Ergebnisse zur Transformationsfähigkeit von sT in primären Zellen veröffentlicht wurden und die Expression von LT in MCPyV-positiven MCC-Zellen als essentiell für den Erhalt und Wachstum angesehen wird, wird momentan die Rolle von sT in MCC-Zelllinien kontrovers diskutiert und benötigt weitere Experimente zur Aufklärung [57,58].

2.2 Interaktion zwischen pRb und viralen Onkoproteinen

Das Rb-Protein wurde als Ursache für die Entstehung des Retinoblastoms identifiziert, ein seltener, aggressiver Augentumor der bei Kindern auftritt. Bei diesen Kindern sind beide Allele von pRb mutiert. Seit der Entdeckung von pRb wurden weitere Mutationen des Proteins in verschiedenen Tumorarten identifiziert (zusammengefasst in [59]).

Das Rb-Protein gehört zur *Pocket-Protein*-Familie, welche nach der Bindedomäne (*pocket* Domäne), mit der die Proteine an Interaktionspartner binden, benannt sind. Neben pRb gibt es im Menschen noch p107 (Retinoblastoma-like protein1) und p130 (*Retinoblastoma-like protein 2*). Eine essentielle Funktion dieser Proteine ist ihre Rolle in der E2F-abhängigen Zellzyklusregulation. Durch die Repression von E2F verhindern sie den Übergang der Zelle

aus der G0/G1-Phase in die S-Phase und damit die Zellteilung bis die Zelle bereit ist. Aufgrund dieser Funktion wird pRb zu den Tumorsuppressorproteinen gezählt.

Die pRb Bindedomäne wird in Box A und Box B unterteilt, welche durch eine Peptidsequenz miteinander verbunden sind. In Abbildung 7 ist die Struktur eines ungebundenen Rb-Proteins dargestellt, mit den Bindedomänboxen A und B, der E2F- und der LxCxE-Bindungsstelle [60]. pRb kann mehrfach phosphoryliert werden und es wird zwischen einem hypophosphoryliertem, phoshoryliertem und hyperphosphoryliertem Zustand unterschieden. Innerhalb des Zellzyklus verändert sich der Phosphorylierungszustand, während der G0-Phase ist pRb hypophosphoryliert, während von der G1 zur S-Phase die Phosphorylierung zunimmt und pRb während der Mitose in einem hyperphosphoryliertem Zustand in der Zelle vorliegt. Wenn pRb phosphoryliert ist, wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt und die Mitose beginnt [59].

Virale Onkoproteine, die das LxCxE-Motiv enthalten, wie z.B. das SV40 LT, das humane Papillomavirus E7-Protein und das adenovirale E1A-Protein, binden das pRb über die LxCxE-Bindungsstelle [61-63], wodurch E2F freigesetzt wird. Der strukturelle Mechanismus dieses Vorgangs ist bisher nicht vollständig geklärt [60].

Die drei *Pocket*-Proteine sind in ihrer Funktion der Zellzykluskontrolle teilweise redundant [60]. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass nicht nur pRb sondern auch p107 und p130 an virale Onkoproteine binden können, z.B. an LT von SV40 und JCPyV [64,65,66,67]. Während eine Interaktion des MCPyV LT N-Terminus mit pRb bereits gezeigt wurde [21,38] steht der Nachweis einer Interaktion mit p107 und p130 noch aus.

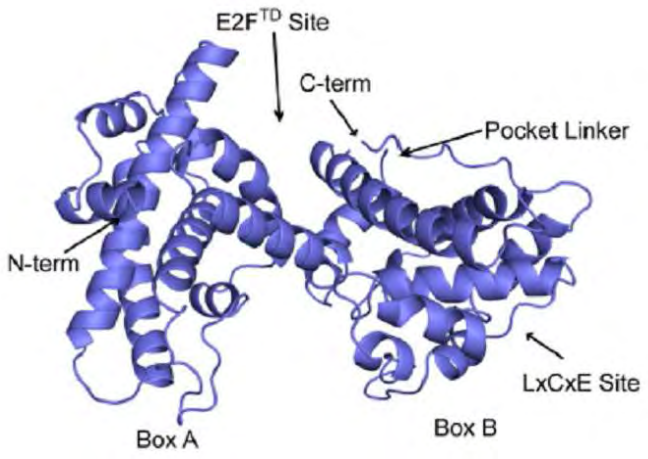


Abbildung 7: Struktur des ungebundenen pRb (aus [60]) dargestellt als Ribbondiagramm. Zu sehen sind verschiedene funktionelle pRb-Regionen, wie die Box A und Box B, die E2F-Bindungsstelle sowie die LxCxE-Stelle an die virale Onkoproteine mit dem LxCxE-Motiv binden können.

2.3 Ziel dieser Arbeit

2.3.1 Etablierung eines MCPyV-Replikationssystems

Das Merkelzell-Polyomavirus wurde 2008 im Zusammenhang mit dem Merkelzellkarzinom durch DNA-Hochdurchsatzverfahren identifiziert. Es ist ein humanes Polyomavirus, welches mit der Onkogenese des Merkelzell-Karzinoms, einem aggressiven Hautkrebs, assoziiert ist. Kurz nach der Entdeckung wurden die ersten Genomsequenzen veröffentlicht, die aus MCC-Geweben isoliert wurden. Diese Sequenzen enthielten ausschließlich Mutationen und/ oder Deletionen im codierenden Bereich des LT-Antigens, die für MCPyV-Sequenzen aus MCC-Geweben charakteristisch sind. Die Stopmutationen befinden sich im C-Terminus, wodurch die für die Replikation notwendigen Domänen OBD und Helikase nicht exprimiert werden, was zu replikations-inkompetenten Viren führt. Der exprimierte LT N-Terminus enthält die DnaJ-Domäne sowie das pRb-Bindemotiv. Zu Beginn dieser Arbeit gab es weder veröffentlichte MCPyV Wildtyp-Genomsequenzen noch ein etabliertes MCPyV-Replikationssystem. Um jedoch virale Replikation, die Biologie einer MCPyV-Infektion sowie die Transformationseigenschaften von MCPyV untersuchen zu können, wird ein Replikationssystem benötigt, in dem das Virus die zelluläre Maschinerie für die Produktion von infektiösen Viruspartikeln benutzt.

Für die Etablierung eines solchen MCPyV-Replikationssystems und dem Studium der MCPyV-Replikation wurde ein synthetisches MCPyV-Genom generiert, welches einen Konsensus aus den bis 2008 veröffentlichten Sequenzen bildet und dem MCPyV-Wildtyp entsprechen soll und keine Stopmutationen oder Deletionen enthält [47]. Da bisher der Zelltropismus für MCPyV unbekannt ist, soll das synthetisierte MCPyV-Episom benutzt werden, um humane, epitheliale und epidermale Zelllinien und Primärzellen auf ihre Permissivität für die MCPyV-Replikation zu untersuchen. Mithilfe von identifizierten permissiven Zellen soll ein infektiöses Replikationssystem etabliert werden, damit die verschiedenen Stadien der MCPyV-Infektion, frühe Transkription, DNA-Replikation und späte Transkription, sowie die Produktion von infektiösen Partikeln nachgewiesen und untersucht werden können. Ein solches System bietet auch die Möglichkeit die Transformationseigenschaften von MCPyV im Kontext der MCC-Tumorgenese zu studieren. Ferner können mit einem solchen System Substanzen identifiziert und getestet werden, die die Interaktion von MCPyV mit zellulären Proteinen unterbinden und damit eine durch MCPyV verursachte Transformation verhindern.

2.3.2 Strukturelle und biochemische Analyse des MCPyV LT N-Terminus

Das in MCC-Geweben, aufgrund MCC-spezifischer Mutationen, verkürzt exprimierte LT-Antigen ist zusammen mit sT das einzige Virusprotein, was im Tumorgewebe exprimiert wird. Das exprimierte LT_{NT} enthält sowohl die DnaJ-Domäne, wie auch die Vamp6- und pRb-Bindemotive. Unsere Arbeitsgruppe konnte mithilfe statistischer Analysen eine positive Selektion für den Erhalt des pRb-Bindemotivs in MCC belegen [21]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen pRb und LT_{NT} stärker ist als zwischen pRb und dem Volllängen-LT [21]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass der LT N-Terminus die Lokalisation von pRb in der Zelle verändert und primäre Rattenzellen transformieren kann [21]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Expression von LT_{NT} mit einem intakten pRb-Bindemotiv essentiell für die Proliferation von MCC-Zellen ist [50]. Aufgrund dieser Fähigkeiten wird der Interaktion LT_{NT}/pRb eine wichtige Rolle in der Transformation von Zellen und der daraus resultierenden MCC-Tumorgenese zugeschrieben.

Bisher gibt es keine strukturellen Informationen über den N-Terminus des MCVPyV LT-Antigens noch über dessen Struktur in Anwesenheit von Interaktionspartnern. Allein bioinformatische Modellierungen und Strukturvorhersagen auf Basis der Kristallstruktur vom SV40 LT N-Terminus, im Komplex mit der pRb *pocket* Domäne [61], waren möglich. Diese Kristallstruktur ist bis jetzt die einzige Kristallstruktur eines Polyomavirus LT N-Terminus. Ziel dieser Arbeit ist es den MCPyV LT N-Terminus, wie er in MCC-Geweben exprimiert wird, zu kristallisieren und mithilfe der Strukturdaten Informationen über den funktionellen Mechanismus dieses Proteins zu erhalten. Dabei von besonderem Interesse ist die MCPyV spezifische Region (MUR), welche das pRb-Bindemotiv flankiert und unter den humanen Polyomaviren einzigartig ist. Weiterhin soll die Interaktion zwischen LT_{NT} und pRb biochemisch charakterisiert werden, da sie einen vielversprechenden Ansatzpunkt einer MCPyV-basierten MCC-Therapie bietet.

Zusammenfassend sollen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zu neuen Erkenntnissen des MCPyV Replikationszyklus und der Funktion des LT N-Terminus führen. Zweck dieser Ergebnisse ist es, zu einem besseren Verständnis der MCC-Tumorgenese und mithilfe der identifizierten strukturellen und biochemischen Eigenschaften des LT N-Terminus zur Entwicklung einer antiviralen Therapie beitzutragen.

3 Material

3.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Sofern in dieser Arbeit nicht anders aufgeführt wurden alle Chemikalien, Reagenzien und Medien von den Firmen AppliChem, BioRad, Eppendorf, Fermentas, Hartenstein, Life Technologies, Millipore, New England Biolabs, Roche, Sarstedt, Sigma und Thermo Scientific bezogen.

3.2 Plasmide und Primer

In Tabelle 2 und Tabelle 3 sind die Primer und Plasmide aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Alle synthetisierten Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG Eurofins bestellt.

Tabelle 2 Plasmide

#	Bezeichnung	Vektor	Fremdgen	Referenz
6	XMRV-RBD-PRR-GFP	eukaryotisch	XMRV RBD-GFP	Marc Sitbon
136	pUC18	bakteriell	-	ThermoScientific
144	pSV40 (pZIPTEX)	eukaryotisch	SV40 Tumor Antigen	Wolfgang Deppert
176	psV(SV40) Provirus kloniert in pBR322	eukaryotisch	SV40 genome	Wolfgang Deppert
220	TA p197 LT-Ag ohne Intron	bakteriell	MCCL12 LT_{1-244} ohne Intron, mit Deletion	Arbeitsgruppe Fischer, [39]
245	pMCPyV (pMK-MCPyV complete, #10)	bakteriell/ eukaryotisch	Konsensus MCPyV genome	[47]
335	pRSET-A-LT_{MCCL12} (K1-1)	bakteriell	6xHis-Xpress-EK-MCPyV LT_{1-244} ohne Intron	diese Arbeit
336	pRSET-A-MCPyVLT_{cons} (K13-1)	bakteriell	6xHis-Xpress-EK-MCPyV LT_{1-313} ohne Intron	diese Arbeit
338	pGEX4T3-$Rb_{382-771}$	bakteriell	GST-Rb pocket domain (aa 382-771)	diese Arbeit
376	pREST-A-SV40LT_{7-117}	bakteriell	6xHis-Xpress-EK-SV40 LT_{7-117}	Arbeitsgruppe Fischer
428	pET302-LT_{MCCL12}	bakteriell	6xHis-MCPyV LT_{1-244} ohne Intron, mit Deletion	diese Arbeit
429	pET303-LT_{MCCL12}	bakteriell	MCPyV LT-6xHis_{1-244} ohne Intron, mit Deletion	diese Arbeit
444	pAT110-Rb_{PD}	bakteriell	GST-Rb pocket domain ohne linker (aa380-787Δ582-642)	Ping An, James Pipas Labor, Pittsburgh, persönliche Kommunikation
484	pJC40	bakteriell	-	ATCC No. 87114
485	pJC40-MCV99fw/ MCV100rv	bakteriell	MCCL12 LT_{1-244} ohne Intron, mit Deletion	diese Arbeit
486	pJC40-MCV99fw/ MCV101rv	bakteriell	MCPyVcons LT_{1-313} ohne Intron	diese Arbeit

Tabelle 3 Primer und Primersequenzen

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
Rb_378_EcoRI_F	ATGAATTCT ATCCAACAATTAATG	Klonierung des Plasmids 338
Rb_772_XhoI_R	CTCGAG ATACTGCAAAATATTTG	
MCV99fw	ATACATATGATGGATTTAGTCCTAAATAGGAAG	Klonierung des Plasmids pJC40 MCCL12 mit NdeI und EcoRI
MCV100rv	ATAGAATTCTTATGAGAATGGAGGAGGGGTC	
MCV99fw	ATACATATGATGGATTTAGTCCTAAATAGGAAG	Klinierung des PLasmids pJC40 LT cons mit NdeI und EcoRI
MCV101rf	ATAGAATTCTTAAGTAGGAACAGGAGTTTCTC	
MCV104 fw	AGCTCGAGGAGAATCTTTATTTTCAGGGCATGGATTTAGTCCTAAATAGGAAAG	Klonierung des Plasmids
MCV100 rv	ATAGAATTCTTATGAGAATGGAGGAGGGGTC	335 inkl. TEV-site mit XhoI und EcoRI
MCV104 fw	AGCTCGAGGAGAATCTTTATTTTCAGGGCATGGATTTAGTCCTAAATAGGAAAG	Klonierung des Plasmids
MCV101 rv	ATAGAATTCTTAAGTAGGAACAGGAGTTTCTC	336 inkl. TEV-site mit XhoI und EcoRI
pET302 LT fw	GTGAATTCGATGGATTTAGTCCTAAATAGGAAAG	Klonierung des Plasmids 428 mit EcoRI undXhoI
pET302 MCCL rv	ATCTCGAGTTATGAGAATGGAGGAGGGGTC	
pET303 LT fw	GGTCTAGAATGGATTTAGTCCTAAATAGGAAAG	Klonierung des Plasmids 429 mit XbaI und XhoI
pET303 MCCL rv	TGCTCGAGTGAGAATGGAGGAGGGGTC	
SV40LT-F-EcoRV fw	CCGATATCATGGATAAAGTTTTAAACAGAG	Southern Blot Sonde von SV40 LT, Shuda et al., 2009
SV40LTmut-R-XhoI	GGGCTCGAGGCAGTGCAGCTTTTTCCTTTG	
MCV196-429F	ATGGATTTAGTCCTAAATAGGAAA	Southern Blot Sonde von MCPyV LT, Shuda et al., 2009
MCV196-429R	CTCATCAAACATAGAGAAGTCAC	

3.3 Bakterienstämme

Für Klonierungen und Amplifizierungen von Plasmiden wurde der Bakterienstamm *E. coli* Top10 (life technologies™) benutzt und für die Expression heterologer Proteine der Bakterienstamm *E. coli* BL21 Star™ (life technologies™).

3.4 Zelllinien

Tabelle 4 listet die verwendeten Zelllinien und ihre Ursprünge auf. Diese Zelllinien wurden ausschließlich für die MCPyV-Replikationsassays benutzt.

Tabelle 4 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung
PFSK-1	human, Fibroblasten, neuroektodermaler Hirntumor (ATCC Nr. CRL-2060)
HDF	human, dermal, Fibroblasten (Lonza Nr. CC-2511)
HEK293	human, epithelial, aus Nierenzellen (ATCC Nr. CRL-1573)
H1299	human, epithelial, aus einem Lungenkarzinom (ATCC Nr. CRL-5803)
Makrophagen	human, primär, aus venösem Blut, zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Linder, UKE Hamburg
LAN-1	human, aus einem Neuroblastom
Keratinozyten	human, primär, aus der Haut, zur Verfügung gestellt von der AG Brandner, UKE Hamburg
HaCaT	human, Keratinozyten, aus der Haut
Vero	Primat, epithelial, aus der Niere (ATCC Nr. CCL-81)
CV1	Primat, Fibroblasten, aus der Niere (ATCC Nr. CCL-70)

3.5 Medien und Zusätze

3.5.1 Medien und Zusätze für Zellkulturen

Für die Kultivierung der Säugerzellen wurden folgenden Medien benutzt: Gibco® DMEM (Dubelco´s Modified Eagle medium, life technologies™) und Gibco® RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Nr. 1640 Medium, life technologies™). Zusätzlich wurden in der Zellkultur eingesetzt Gibco® DPBS (life technologies™), Trypsin/EDTA 0,05% (life technologies™) und als Zusätze in den Medien 10% (f.c.) FKS (Fötales Kälberserum, PAN

Biotech™), 20% humanes Serum, 1% (f.c.) L- Glutamin (2mM, Sigma-Aldrich®), sowie 1% (f.c.)100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin-Lösung (Gibco BRL).

3.5.2 Medien und Zusätze für Bakterienkulturen

Für die Flüssigkultur von Bakterien wurde das Luria-Bertani (LB) Medium für Molekularbiologie (Carl Roth®) verwendet und als Festmedium wurde der LB-Agar für Molekularbiologie (Carl Roth®) benutzt. Weiterhin wurden in der Kultivierung Ampicillin (100µg/ ml f.c.), Kanamycin (25µg/ ml f.c.) und Glukose eingesetzt (1% f.c.)

3.5.3 Zusätze für die Dichtegradientenzentrifugation

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde die OptiPrep™ Lösung von Sigma-Aldrich eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine 60%ige (w/v) Iodixanollösung. Außerdem wurde Gibco® 10xPBS (life technologies™) verwendet.

3.6 Proteinaufreinigung mittels chromatographischer Methoden

Für die Proteinaufreinigung wurden verschiedene chromatographische Methoden, wie Affinitätschromatographie, Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie angewandt. Die Affinitätschromatographien wurden sowohl im *Batch*-Verfahren, wie auch als automatisiertes Verfahren mittels ÄKTApurifier von GE Healthcare Life Sciences durchgeführt.

Für die Affinitätsaufreinigung im *Batch*-Verfahren von GST-markierten Proteinen wurde Glutathione Sepharose™ 4B (GE Healthcare Life Science) und von His-markierten Proteinen Ni-NTA Agarose (Qiagen) verwendet. Für die automatisierte Affinitätschromatographie wurde die HisTrapFF 5ml Säule (GE Healthcare Life Sciences) benutzt. Für die Gelfiltration mit dem ÄKTAPurifier System wurde mit die Superdex 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare Life Sciences) benutzt und für das SMART System die Superdex 200 PC 3.2/30 Säule (GE Healthcare). Der Ionenaustausch wurde mit der Uno™ S6, Continous Bed Ion Exchange Column (BioRad) durchgeführt.

3.7 Kommerzielle Reagenzsysteme und Reagenzien

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden wurden die Systeme DNA Gel-Extraktions-Kit (Qiagen), peqGold DNA Kit (Peqlab), DNA Plasmid Purification Kit NucleoBond® PC 100 (Marcherey-Nagel) benutzt. Die Visualisierung von Western Blotting

Analysen fand mittels ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences) statt, für Silberfärbungen wurde das Pierce SilverSNAP® stain für Massenspektrometrie Kit verwendet und für die MST-Analysen das Monolith™ NT.115 *Protein Labeling Kit-NHS Red* und hydrophile Kapillare (Nanotemper Technologies).

3.7.1 Enzyme

Für die Amplifikation, Aufreinigung, Klonierung, Ligation und Restriktionsanalyse von DNA und Plasmiden wurden die Proteine *Taq*-DNA Polymerase (5U/µl, Invitrogen), T4 DNA Ligase (New England Biolabs) Proteinase K (Roche) und die Restriktionsenzyme FastDigest Enzymes (Thermo Scientific), sowie Thrombin (Amersham Biosciences) benutzt.

Für die Proteinaufreinigung wurden Lysozym (Fluka) und Thrombin (Amersham Biosciences) eingesetzt. Subtilisin, Chymotrypsin, Papain, Trypsin für die partielle Proteolyse entstammten dem JBS Floppy-Choppy Kit von Jena Bioscience GmbH.

3.7.2 Größenstandards

Für DNA Agarosegele wurde der GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder von Fermentas verwendet und für die SDS-PAGE wurden die Marker PageRuler™ Unstained Protein Ladder und Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific benutzt. Für die Kalibrierung der Gelfiltrationssäulen wurde der *Gel Filtration Standard* von BioRad eingesetzt.

3.8 Antikörper

Tabelle 5 Antikörper

Antikörper	Eigenschaften/ Herkunft
CM2B4	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen MCPyV LT, erkennt auch das 57k-T-Antigen, Santa Cruz Biotechnology (USA)
anti-SV40-VP1	Monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen SV40 VP1, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Wolfgang Deppert, HPI, Hamburg
Pab419	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen SV40 LT, Hybridomzelllinie wurden von Wolfgang Deppert zur Verfügung gestellt [68]
HRP-anti-Maus IgG	HRP gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG aus Ziege, Santa Cruz Biotechnology (USA)
HRP-anti-Kaninchen IgG	HRP gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-IgG aus Ziege, Santa Cruz Biotechnology (USA)

Die in Tabelle 5 gelisteten Antikörper wurden für Western Blot-Analysen verwendet.

3.9 Geräte

In Tabelle 6 sind die Geräte aufgezählt, die über eine übliche Laborausstattung hinausgehen und die für die Durchführung dieser Arbeit genutzt wurden.

Tabelle 6 Geräte

Gerät	Hersteller
Branson Digital Sonifizierer M250	Branson
DLS Gerät	SpectroSIZE 300 (Nabitec)
Mikroskop	Nikon Eclipse TS100
Photospektrometer	Nanodrop 1000
FPLC	ÄKTA Purifier (GE Healthcare)
FLA7000 PhosphoImager	Fuji Film
Kristallisationsroboter	Honeybee 961 (Genomic Solutions)
CD-Spektrometer	J-815 Circular Dichroic Spectrometer (Jasco, UK)
Monolith™ NT.115	NanoTemper Technologies
FACSCantoII Durchflusszytometer	BD Biosciences
UV-Crosslinker	Stratagene

3.10 Software und Datenbanken

Es wurde hauptsächlich in den Datenbanken MEDLINE (NCBI) und RCSB Protein Data Bank (PDB) recherchiert. Primerdesign und Nukleotidsequenzanalysen wurden mit CLC Main Workbench 6 von CLC Bio durchgeführt.

Für die Auswertung der Southern Blots wurde die MultiGauge Software verwendet. Die Microscale Thermophoresedaten wurden mit der NanoTemper Control 1.1.8 Software von NanoTemper Technologies sowie GraphPad bearbeitet. GraphPad wurde auch für die graphische Darstellung und Auswertung von Chromatographiedaten verwendet.

Für Proteinanalysen und Strukturmodellierung wurden die Programme CLC Main Workbench 6.6.1 von CLC Bio, der Protein Calculator (http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html, 15.10.2013), der FoldIndex© [69] und SWISS-MODEL [70-72] benutzt.

Desweiteren wurden die Microsoft Office Programme Word, Excel und Powerpoint verwendet, sowie Adobe Photoshop für die Bildbearbeitung und EndNote X7 für die Literaturverwaltung.

4 Methoden

4.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektrometisch bei λ=260 nm mit Hilfe des NanoDrop1000 (Thermo Scientific) bestimmt. Bei der Durchführung wurde den Herstellerangaben gefolgt. Von den zu analysierenden Nukleinsäurelösungen wurde jeweils 1 µl auf die Messplattform pipettiert und eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration in Lösungen wurde spektrometrisch bei λ=280 nm mit Hilfe des NanoDrop1000 (Thermo Scientific), wie vom Hersteller beschrieben, bestimmt. Diese Methode der Konzentrationsbestimmung kann nur durchgeführt werden, wenn die Proteine aromatische Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) oder Disulfidbrücken enthalten. Es wurde dabei unterschieden, ob es sich um aufgereinigtes Protein oder Lösungen mit diversen Proteinen, z.B. Zelllysate, handelt. Bei Letzteren wurde die Proteinkonzentration mit der generellen Referenzeinstellung „1 Abs = 1 mg/ml“ gemessen.

Bei aufgereinigten Proteinen wurde die Konzentration mit der Einstellung „Other protein (E & MW)“ bestimmt. Dafür wurden der molare Extinktionskoeffizient und das Molekulargewicht des entsprechenden Proteins benötigt. Beides wurde theoretisch mithilfe der CLC Bio Workbench Software ermittelt.

Jeweils 2 µl der Proteinlösungen wurden auf die Messplattform pipettiert und für die Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

4.3 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

E. coli hat keine natürliche Kompetenz für die Aufnahme von DNA, daher werden die Bakterien einer chemischen Behandlung unterzogen, um sie kompetent für die DNA-Aufnahme zu machen. Dafür wurden 20 ml LB-Medium als Vorkultur mit dem gewünschten *E. coli* Stamm inokuliert und über Nacht bei 37°C, 180 rpm inkubiert. Sollte der *E. coli* Stamm

für ein Antibiotikum resistent sein, so wurde das Antibiotikum zum Medium hinzugegeben. Am nächsten Morgen wurden mit 2 ml der Vorkultur 200 ml LB-Medium, inklusive 4 mM $MgSO_4$ und 10 mM KCl, inokuliert. Diese Kultur wurde bei 37°C, 180 rpm bis zu einer OD_{600} 0,3-0,5 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für ca. 15 min auf Eis abgekühlt und die Bakterien für 5 min bei 4°C und 4000g pelletiert. Die Bakterien wurden in 60 ml eiskaltem TFB1-Puffer aufgenommen und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien wieder pelletiert und das Pellet in 8 ml TFB2-Puffer resuspendiert. Direkt im Anschluss wurden jeweils 200 µl der Suspension in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert, direkt in Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zu Verwendung gelagert.

Tabelle 7 TFB1 und TFB2 Pufferzusammensetzung

TFB1	TFB2
100 mM RbCl	10 mM MOPS
50 mM $MnCl_2$ x $4H_2O$	10 mM RbCl
30 mM KAc	75 mM $CaCl_2$
10 mM $CaCl_2$	15% v/v Glycerin
15% v/v Glycerin	
pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen	pH 7,0 mit 0,2 M NaOH einstellen

4.4 Hitzeschock-Transformation

Chemisch kompetente *E. coli* Top10 und Bl21 Star™ Bakterien wurden mit bakteriellen Plasmiden transformiert indem die Bakterien auf Eis aufgetaut wurden, die Plasmid-DNA mit den Bakterien gemischt und für ca. 10 min auf Eis inkubiert wurden. Danach wurden die Bakterien für 1 min auf 42°C erhitzt und danach auf Eis für ca. 3 min abgekühlt. Anschließend wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und die Bakterien bei 37°C für 1 h schüttelnd inkubiert. 50 µl der Suspension wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die LB-Platten enthielten die entsprechenden Antibiotika für die Selektion der transformierten Bakterien.

4.5 Präparative Plasmidaufreinigung

Für die präparative Plasmidaufreinigung wurden das DNA Plasmid Purifications Kit NucleoBond® PC100 (Macherey-Nagel) und das PeqGOLD Plasmid Mini Kit (Peqlab) verwendet. Dazu wurde LB-Medium inklusive entsprechendem Antibiotikum mit transformierten *E. coli* Top10 angeimpft und über Nacht bei 37°C, 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Plasmide nach Herstellerangaben präpariert.

4.6 Replikationsassay

4.6.1 Herstellung proviraler DNA

Für die Herstellung proviraler DNA für anschließende Replikationsassays wurden die Plasmide pMCPyV und pSV40 mit SacI bzw. BamHI verdaut, um das bakterielle Gerüst dieser Vektoren, welches für die bakterielle Amplifizierung notwendig ist, zu entfernen. Dafür wurden pro Plasmid jeweils drei Ansätze à 10 µg mit dem entsprechenden Restriktionsenzym für 1 h bei 37°C geschnitten Die verdaute DNA wurde mithilfe der Agarosegelelektrophorese in einem 0,8%igen Gel der Größe nach aufgetrennt und mittels SafeRed™ sichtbar gemacht. Die DNA-Bande auf Höhe der proviralen DNA (5 bzw. 5,5 kb) wurde ausgeschnitten und mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Marcherey-Nagel) aus dem Gel in 50 µl Elutionspuffer eluiet. Die lineare provirale DNA (50 µl) wurde dann über Nacht bei 16°C mit 10 µl T4 Ligase (NEB), 20 µl 10x Ligationspuffer (NEB) und 120 µl H_2O religiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit aufgereinigt und bei -20°C bis zur Transfektion gelagert.

4.6.2 Zelllinien

Replikationsassays wurde mit humanen wie auch Affenzelllinien durchgeführt. Es wurden sowohl primäre Zellen, wie auch Zelllinien benutzt und diese mit unterschiedlichen Methoden transfiziert (Tabelle 8, siehe auch 4.6.3). Die Zelllinen waren unterschiedlichen histologischen Ursprungs, welcher in Tabelle 4 (Material) aufgelistet sind.

Tabelle 8 Zelllinien für den Replikationsassay, deren Ursprung, Kulturmedium und die angewandten Transfektionsmethode

Zellinie	Ursprung	Medium	Transfektionsmethode
PFSK-1	human	RPMI	Fugene
HDF	human	DMEM	PEI
HEK293	human	DMEM	PEI
H1299	human	DMEM	PEI
Makrophagen	human, primär	RPMI	Neontransfektion
LAN-1	human	RPMI	FuGENE
Keratinozyten	human, primär	Keratinocytes basic medium [73]	Amaxa
HaCaT	human	DMEM	Exgen
Vero	Affe	DMEM	PEI
CV1	Affe	RPMI	Fugene

4.6.3 Transfektionsmethoden

Transfektion mit FuGENE® HD Transfektionsreagenz

Für die Transfektion mit FuGENE® HD Transfektionsreagenz wurden am Vortag Zellen ausgesät. Pro Transfektionsansatz wurden 94 µl Medium ohne Zusätze und 6 µl FuGENE® HD Transfektionsreagenz für 2 s auf einem Vortex gemischt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA hinzugegeben. Nach nochmaligem Mischen und einer weiteren Inkubation von 15 min wurde die Suspension auf die Zellen gegeben.

Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Polyethylenimin Puder wurde in Wasser resuspendiert, so dass die Konzentration 1 µg/µl war. Auf die am Vortag ausgesäten, zu transfizierenden Zellen wurde Medium ohne Zusätze gegeben. Die Plasmid-DNA wurde mit Medium ohne Zusätze vermischt, so dass das Gesamtvolumen 100 µl umfasste. Anschließend wurden 15 µl PEI hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension auf Zellen gegeben und für 6 h inkubiert. Das Medium wurde im Anschluss gewechselt und es wurde Medium mit Zusätzen zu den Zellen gegeben.

Neon™ Transfektion

Für die Transfektion mit dem Neon™ Transfektionssystem 10 µl Kit (life technologies) wurden die Zellen mit einer Konzentration von $1x10^7$ Zellen in R-Puffer resuspendiert. Im Anschluss wurde die zu transfizierende DNA hinzugegeben und die Suspension 5-10 Mal mit einer Pipette aufgezogen und gemischt. Die Suspension wurde mit einer Neon™ Pipette blasenfrei in eine Neon™ Goldspitze aufgezogen. Die Neon™ Pipette mit Spitze wurde in die die Neon™ Pipette Station mit einem Neon™ Gefäß gestellt, in dem sich 3 ml E-Puffer befanden. Die Transfektion von primären Makrophagen wurde mit 2 Pulsen von je 1000 V und 40 ms durchgeführt. Nach Transfektion wurden die Zellen mit vorgewärmtem Medium gemischt und inkubiert.

Transfektion mit Amaxa® Nucleofactor® Technologie

Amaxa® Nucleofactor® Technologie wurde für die Transfektion von primären Keratinozyten verwendet. Es wurden $1x10^6$ Keratinozyten in 100 µl Nucleofactor® Lösung aufgenommen. 3 µg Plasmid-DNA wurde hinzugegeben und die Suspension wurde in eine Transfektionsküvette gegeben. Die Zellen wurde mit dem Nucleofactor® Programm T-018 transfiziert und im Anschluss mit 500 µl Medium versetzt und ausgesät.

Transfektion mit ExGen 500

Das Transfektionsreagenz ExGen 500 ist linearisiertes 22 kDa großes PEI. Für einen Transfektionsansatz wurde die DNA mit 100 µl 150 mM NaCl auf dem Vortex gemischt und anschließend kurz zentrifugiert. 3,3 µl ExGen 500 wurden in die Lösung gegeben und sofort für 10 s auf dem Vortex gemischt. Das Gemisch wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die am Vortag ausgesäten, zu transfizierenden Zellen gegeben.

4.6.4 Transfektion mit pMCPyV und pSV40

Das Replikationsassay wurde in 6-well Schalen durchgeführt. Soweit nicht anders spezifiziert wurden pro Vertiefung wurden $1x10^5$ Zellen ausgesät. Die verwendeten Zelllinen und deren Transfektionsmethoden sind in Tabelle 8 bzw. in Kapitel 4.6.3 aufgeführt. Es wurden pro Vertiefung 500 ng Gesamt-DNA transfiziert. Bei der Transfektion von pMCPyV wurde 100 ng virales Genom und 400 ng pUC18 in die Zellen eingebracht. Für pSV40 wurden 80 ng pSV40 und 420 ng pUC18 transfiziert. Für die Mock-Kontrolle wurden 500 ng pUC18 und als Transfektionskontrolle 500 ng p6 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen wurden 6 d nach Transfektion. nach der HIRT-Methode (s. 4.6.5) geerntet.

Für die Transfektion der einzelnen Zelllinien wurden verschieden Methoden getestet und die mit der höchsten Effizient für die Replikationsassays angewandt (Tabelle 8). Die Transfektionseffizienz, Anzahl der transfizierten Zellen, wurde per FACS-Analyse der Transfektionskontrolle ermittelt. Das transfizierte Plasmid p6 codiert für ein GFP-Fusionsprotein. Die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen im Verhältnis der nicht-exprimierenden Zellen ergab die Transfektionseffizienz.

Für die Polyethylenimin (PEI) Methode wurde Medium ohne Zusätze auf die Zellen gegeben und 500 ng DNA wurden mit 100 µl Medium ohne Zusätze und 15 µl PEI gemischt und 10 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 6 h inkubiert und anschließend wurde das Medium durch Medium mit Zusätzen ausgetauscht. Transfektionen mit Exgen 500, Fugene, dem Neon® Transfection System Kit (Invitrogen) und der Amaxa Methode:T018 wurden nach Hersteller-Protokoll durchgeführt. Makrophagen und Keratinozyten wurde von Jens Cornils (Arbeitsgruppe Prof. Linder, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, UKE Hamburg-Eppendorf) bzw. Pia Houdek (Arbeitsgruppe Dr. Johanna Brandner, Klinik und Polyklinik für Dermatologie, UKE Hamburg-Eppendorf) transfiziert.

4.6.5 Extraktion niedermolekularer DNA nach der HIRT-Methode

Niedermolekulare DNA, wie z.B. DNA von Polyomaviren kann nach der HIRT-Methode [74] extrahiert werden. Für die Extraktion von SV40 und MCPyV DNA nach einem Replikationsassay wurde die HIRT-Methode dem Protokoll von Ziegler [75] durchgeführt. Das DNA-Pellet wurde in 50-70µl H_2O resuspendiert und anschließend mittels Southern Blot analysiert.

4.6.6 Southern Blot Analyse

Für die Southern Blot Analyse isolierter MCPyV-DNA wurde die DNA-Konzentration bestimmt. Anschließend wurde die DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und DpnI verdaut. In der MCPyV-DNA gibt es eine Schnittstelle für EcoRI, d.h. das Genom wird bei Einfachverdau linearisiert. Dagegen gibt es 20 DpnI Schnittstellen über das gesamte Genom verteilt. DpnI ist *dam*-Methylierung-sensitiv und verdaut nur bakteriell-, jedoch nicht eukaryotisch-synthetisierte DNA, d.h. bakteriell amplifiziertes und anschließend transfiziertes pMCPyV, welches zum Zeitpunkt der Extraktion noch in den Zellen vorhanden war, wurde mit DpnI geschnitten. *De novo* synthetisierte, replizierte MCPyV-DNA wird von DpnI nicht geschnitten.

Zur Analyse der verdauten DNA wurde sie auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und bei 80 V der Größe nach aufgetrennt. Für den Transfer der DNA auf eine Membran muss das Gel für 10 min mit Depurinationspuffer, 30 min mit Denaturierungspuffer und danach für 30 min mit Neutralisierungspuffer gewaschen werden (Tabelle 3). Zwischen den einzelnen Waschschritten, wurde das Gel kurz mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde die DNA über Nacht mittels Kapillar-Transfer auf eine Hybond-N+ Membran transferiert. Als Transferpuffer wurde 20xSSC-Lösung eingesetzt. Die transferierte DNA wurde mit UV-Licht und einer Energie von 120.000 Mikrojoules/ cm^2 (Stratalinker UV crosslinker, Stratagene) mit der Membran quervernetzt.

Danach wurde die Membran mit einer radioaktiv-markierten Sonde (siehe 4.6.7) hybridisiert, indem die Sonde für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend 20 µl davon mit der Membran und 20 ml Ambion® ULTRAhyb®-Lösung (life technologies™) über Nacht bei 42°C rotierend inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal mit 2xSSC/ 0,1% Tween und einmal mit 0,2xSSC/ 0,1% Tween für je 20 min bei 42°C gewaschen. Im Anschluss wurde eine *Imaging Plate BAS-MS* (Fuji Film) auf die Membran gelegt und für mindestens 6 Tage belichtet. Die *Imaging Plate BAS-MS* wird durch die Radioaktivität belichtet/ angeregt und die daraus resultierenden Signale können mittels PhosphorImager ausgelesen und mit der MultiGauge Software (Fuji Film) bearbeitet werden.

Tabelle 9 Puffer für die Southern Blot Analyse und den semi-trocken Transfer. Alle Angaben beziehen sich auf 1 Liter finales Volumen.

Depurinationspuffer	0,125 M HCl
Denaturierungspuffer	87,66 g NaCl, 20 g NaOH
Neutralisationspuffer	87,66 g NaCl, 60,5 g Trisma base, pH 7,5
20x SSC	88,23 g Tri-Natriumcitrat, 175,32 g NaCl
2X SSC/ 0,1% SDS	8,823 g Tri-Natriumcitrat, 175,32 g NaCl, 0,1% SDS
0,2x SSC/ 0,1% SDS	0,8823 g Tri-Natriumcitrat, 175,32 g NaCl, 0,1% SDS

4.6.7 Herstellung von DNA-Sonden

Für die Herstellung radioaktiver DNA-Sonden für die Southern Blot Analyse wurden PCR-Produkte von den MCPyV und SV40 Genomen hergestellt. Dafür dienten als PCR-Primer die Paare MCV196-429F/ MCV196-429R und SV40LT-F-EcoRV fw/ SV40LTmut-R-XhoI, mit den Annealingtemperaturen 50°C bzw. 55°C. Für den PCR-Reaktionsmix wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

10x PCR-Puffer	5 µl
Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)	2,5 U
100 mM $MgCl_2$	2 µl
6,25 mM dNTPs	0,5 µl
10 pMol Fw-Primer	5 µl
10 pMol Rv-Primer	5 µl
Virus-DNA	0,5 µg
H_2O	add 50 µl

Die PCR-Zyklen wurden wie folgt durchlaufen:

Denaturieren	96°C	2 min	
Denaturieren	96°C	20 sec	35 Zyklen
Anlagerung der Primer	50°C/ 55°C	30 sec	35 Zyklen
Elongation	72°C	30 sec	35 Zyklen

5 µl des PCR-Ansatzes wurden via Elektrophorese im 1% Agarosegel aufgetrennt. Gab es nur ein PCR-Produkt und hatte es die erwartete Größe, so wurde der Rest des PCR-Ansatzes mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Marcherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

Für die Herstellung von radioaktiv-markierten DNA-Sonden wurden das Amersham Rediprime II DNA Labeling System (GE Healthcare) und α-^{32}P-dCTP benutzt. Nach Markierung der DNA-Sonden wurden diese direkt benutzt oder bei -20°C gelagert.

4.6.8 Dichtegradientenzentrifugation von Virionen mit OptiPrep™

Bei der Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) werden Partikel, z.B. Zellen, Zellorganellen und Virionen, anhand ihrer Dichte bzw. Sedimentationsgeschwindigkeit von anderen Partikeln entlang eines Dichtegradientens getrennt. Hierfür wurde die OptiPrep™ Lösung von Sigma-Aldrich eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine 60%ige (w/v) Iodixanollösung.

In dieser Arbeit wurde die DGZ eingesetzt, um SV40 und MCPyV Virionen vom Zelllysat zu separieren. Für die DGZ wurden mit pSV40 oder pMCPyV transfizierte Zellen für 4 Tage in 12-well Schalen inkubiert, anschließend trypsinisiert, um sie von der Kulturschale zu lösen und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C lysiert mit PBS inkulsive 9,5 mM $MgCl_2$, 1% Penicillin-Streptomycin-Mix (Gibco), 0,5% Triton X-100 und 0,1% RNaseA [76].

Am nächsten Tag wurde das Lysat aufgearbeitet und die DGZ nach Protokoll [76] durchgeführt: Das Lysat wurde für 10 min bei 10.000xg und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und das Pellet nochmals mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt. Es wurden für jeden DGZ-Ansatz die Überstände aus 2 wells kombiniert. Das finale Volumen lag zwischen 80-120 µl. Für den Gradienten wurde eine 46%ige OptiPrep™Lösung und eine PBS/Salz-Lösung hergestellt (Tabelle 13). Anschließend wurden die 27%, 33% und 39% OptiPrep™ Lösungen (Tabelle 11) für die Zentrifugation hergestellt. Der Gradient wurde mit je 1,2 ml 27%, 33% und 39% OptiPrep™ Lösung in ein 4 ml Ultrazentrifugationsröhrchen geschichtet und für 4 h bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit sich ein kontinuierlicher Gradient ausbilden kann. Anschließend wurde das präparierte Lysat bzw. dessen Überstand auf den Gradienten gegeben und die DGZ für 4 h bei 16°C, 52.00 rpm im SW60Ti Rotor durchgeführt. Durch Punktierung der Ultrazentrifugationsröhrchen wurde der Gradient ausgetropft. Bis auf die erste Fraktion (~500 µl) enthielten alle Fraktionen ~250 µl. Anschließend wurden die Fraktionen auf die Anwesenheit von viraler DNA, Viruspartikeln und VP1 getestet.

Tabelle 10 Zusammensetzung der OptiPrep™- und PBS-Salzlösungen

Reagenzien	46% OptiPrep™/ Salzlösung	PBS/ Salzlösung
60% OptiPrep™	19,15 ml	-
10x PBS	2,5 ml	10 ml
5 M NaCl	3,25 ml	12,5 ml
2 M $CaCl_2$	11,5 µl	45 µl
2 M $MgCl_2$	6,5 µl	25 µl
1 M KCl	50 µl	210 µl
H_2O	-	76,75 ml

Tabelle 11 Zusammensetzung der OptiPrep™ Lösungen für Dichtegradientenzentrifugation

	27% OptiPrep™	33% OptiPrep™	39% OptiPrep™
46% OptiPrep™/ Salzlösung	6,6	8,05	9,5
PBS/ Salzlösung	4,65	3,2	1,7

4.6.9 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Im Gegensatz zur Coomassie-Färbung (siehe 4.7.10) ist die Silberfärbung von aufgetrennten Proteinen sensitiver, d.h. es können geringere Mengen an Protein nachgewiesen werden. Mit der Coomassie-Färbung können Proteinbanden ab ~100-500 ng nachgewiesen werden. Für die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen wurde das Pierce SilverSNAP® stain für Massenspektrometrie Kit (Thermo Scientific) eingesetzt, welches Proteinmengen ab 25 ng nachweisen soll. Die SDS-Gele wurden nach Herstellerangaben gefärbt und entwickelt.

4.7 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in Bakterien

4.7.1 Heterologe Expression von His-MCPyV LT_{NT} und GST-$pRb_{382-771}$ in *E. coli*

Für diese Arbeit wurden His-markiertes MCPyV LT_{NT} und GST-markiertes $pRb_{382-771}$ in *E. coli* Bl21 Star™ heterolog exprimiert. Für die Expression beider Proteine wurden 50 ml LB-Medium inklusive Ampicillin mit 3-4 Kolonien transformierter Bakterien angeimpft und bei

37°C, 180 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien bei 4000xg für 20 min pelletiert und in 20 ml frischem LB-Medium aufgenommen. Für die Expressionskultur wurden 500 ml LB-Medium inklusive Antibiotikum und 1% Glukose mit 5 ml der Bakteriensuspension inokuliert und bei 37°C und 120 rpm in 2 l Schikaneglaskolben inkubiert. Das Wachstum der Kultur wurde durch die Messung der optischen Dichte bei λ=600 nM (OD_{600}) beobachtet. Hatte die Kultur eine OD_{600} von 0,5-0,7 erreicht, so wurde die Expression induziert. Dafür wurden die Kulturen und der Inkubator auf 18°C abgekühlt. Für die Induktion der Expression von His-MCPyV LT_{NT} wurden 1 mM IPTG (f.c.) und von GST-$pRb_{382-771}$ 0,5 mM IPTG (f.c.) in die abgekühlte Kultur gegeben. Die Expressionskultur wurde anschließend für 12-16 h bei 18°C und 120 rpm inkubiert. Nach Beendigung der Expression wurden die Bakterien bei 6000 rpm (Sorvall RC-5B Zentrifuge, GS-3 Rotor) und 4°C pelletiert und das Pellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Zur Überprüfung, ob die Proteine exprimiert wurden, wurde vor der Induktion und nach der Expression jeweils eine Probe genommen und die Proteinexpression mittels SDS-PAGE (siehe 4.7.9) und Coomassie-Färbung (siehe 4.7.10) überprüft.

4.7.2 Aufschluss von *E. coli* Bakterien zur Aufreinigung von heterolog exprimierten Proteinen

Das Bakterienpellet wurde auf Eis aufgetaut und in dem für das Protein entsprechenden eiskalten Bindepuffer resuspendiert (siehe 4.7.3), dafür wurden 25-50 ml Bindepuffer pro ml Expressionskultur eingesetzt. Nach der Resuspension wurden die Bakterien mit 1 mg/ ml Lysozym lysiert und die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion, wie auch die Aktivität endogener Proteasen mit dem Proteaseinhibitormix Complete EDTA free für His-MCPyV LT_{NT} und Complete (beides Roche Diagnostics) für GST-$pRb_{382-771}$ gestoppt. Um die Bakterien komplett aufzuschließen, wurden sie mit Ultraschall fünfmal 3x10 sec auf Eis beschallt, bei einer Leistung von 30% (Branson Digital Sonifier M250). Die festen Partikel wurden bei 14.000*g für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde vom Pellet getrennt und nochmals durch einen 0,45 µm Filter filtriert, um weitere unlösliche Partikel abzutrennen. Der Überstand wurde direkt in der Affinitätschromatographie weiterverarbeitet.

4.7.3 Affinitätschromatographische Methoden zur Aufreinigung von His-MCPyV LT_{NT}, 6xHis-SV40 LT_{7-117} und GST-$pRb_{382-771}$

Automatisierte NiNTA Metall-Affinitätschromatographie von His-MCPyV LT_{NT}

Nach dem in Kapitel 4.7.2 beschriebenen Bakterienaufschluss wurden die His-MCPyV LT_{NT} Proteine entweder im *Batch*- oder im automatisierten Verfahren mithilfe der NiNTA Metall-

Affinitätschromatographie aufgereinigt. Mithilfe des automatisierten Verfahrens und dem Einsatz des ÄKTAPurifier Systems (GE Healthcare) können verschiedene Parameter u.a. die OD_{280} und OD_{260}, der Systemdruck, die Leitfähigkeit, die Fließgeschwindigkeit, der Konzentrationsgradient u.a. gesteuert bzw. beobachtet werden. Das ÄKTAPurifier System wird über die Software UNICORN (GE Healthcare) gesteuert.

Für beide Verfahren wurden die gleichen Puffer eingesetzt. Für die NiNTA Affinitätschromatographie werden Bindepuffer, Waschpuffer und Elutionspuffer benötigt:

Bindepuffer: 50 mM Tris, 750 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5% Glycerol, 5 mM BME, pH 8,0

Waschpuffer: 50 mM Tris, 750 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5% Glycerol, 5 mM BME, 5 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$, pH 8,0

Elutionspuffer: 50 mM Tris, 750 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 5% Glycerol, 5 mM BME, pH 8,0

Alternativ zu 5 mM BME wurde auch 5 mM DTT eingesetzt, wobei bei beiden Detergenzien darauf geachtet wurde, dass die Lösungen nach Zugabe nur innerhalb von zwei Tagen benutzt wurden. Nach dem Bakterienaufschluss wurde der Überstand nach Angaben der Hersteller (GE Healthcare und Qiagen) in das ÄktaPurifier System gegeben und über die 5 ml HisTrapFF-Säule (Qiagen) aufgereinigt. Dafür wurde die Säule vorher mit Bindepuffer gespült. Die Proteinlösung wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/ min über die Säule laufen gelassen. Um alle unspezifisch gebundenen Proteine von der Säule zu waschen, wurde sie mit fünf Säulenvolumina Waschpuffer gespült und im Anschluss nochmals mit mindestens zwei Säulenvolumina Bindepuffer bis die OD_{280nm} einen konstanten Wert, ungefähr auf Höhe der Basislinie, erreicht hatte. Das gebundene His-MCPyV LT_{NT} wurde über einen Imidazolgradienten von der Säule eluiert. Es hat sich herausgestellt, dass eine langsame Elution zu einem saubereren Protein führt. Daher wurde die Imidazolkonzentration über einen Zeitraum von 50 bis 75 min und einem Volumen von 50 ml von 20 mM auf 250 mM gesteigert. Es wurden jeweils 1 ml Fraktionen gesammelt. Das ÄktaPurifier System wie auch alle Puffer standen im 4°C Raum.

NiNTA Metall-Affinitätschromatographie im Batch-Verfahren von His-MCPyV LT_{NT}

Im *Batch*-Verfahren erfolgt die Aufreinigung manuell, meist in kleinerem Maßstab und in einem geschlossenen Gefäß, wie z.B. einem 15 oder 50 ml Gefäß. Hierbei können die Parameter Fließgeschwindigkeit, Gradient etc. im Vergleich zum ÄktaPurifier System nicht

gesteuert werden. Der Aufschluss der Bakterien und die ersten Schritte des *Batch*-Verfahrens sind identisch mit der automatisierten ÄktaPurifier-Methode (s. Kapitel 4.7.2).

Für das *Batch*-Verfahren wurde als Chromatographiematerial NiNTA-Agarose (Qiagen) verwendet. Es wurde ca. 1 µl NiNTA-Agarose pro 1 ml Expressionsvolumen eingesetzt. Für das *Batch*-Verfahren wurde die NiNTA-Agarose dreimal mit zweifachem Agarosevolumen Bindepuffer gewaschen. Um nach jedem Wasch- und Elutionsschritt die NiNTA-Agarose zu pelletieren und vom Überstand zu trennen, wurde die Suspension bei 1000*g für mindestens 2 min zentrifugiert.

Nach Aufschluss der Bakterien und Vorbereitung der NiNTA-Agarose wurde der Bakterienüberstand mit der NiNTA-Agarose vermischt und die Suspension für mindestens zwei Stunden, meistens über Nacht, bei 4°C rotierend inkubiert, um His-MCPyV LT_{NT} an die Agarose zu binden. Anschließend wurde die NiNTA-Agarose dreimal mit zwei- bis dreifachem Agarosevolumen Waschpuffer gewaschen, jeweils für ca. 5 min bei Raumtemperatur. Für die Elution wurden Binde- und Elutionspuffer so gemischt, dass die finale Imidazolkonzentration 250 mM betrug. Gebundenes His-MCPyV LT_{NT} wurde von der NiNTA-Agarose eluiert, indem dreimal mit zweifachem Agarosevolumen Elutionspuffer (250 mM Imidazol) bei Raumtemperatur rotierend gewaschen wurde. Beim ersten Elutionsschritt wurde die Suspension für ca. 2 min inkubiert. Bei Elutionsschritt Zwei und Drei wurde die Suspension mindestens 20 min inkubiert. Es wurden mehrere Elutionsschritte durchgeführt, da sich gezeigt hatte, dass v.a. beim ersten Schritt auch unspezifisch gebundene Proteine eluiert wurden.

NiNTA Metall-Affinitätschromatographie im Batch-Verfahren von 6xHis-SV40 LT_{7-117}

Die Aufreinigung im *Batch*-Verfahren von His-MCPyV LT_{NT} wurde wie das *Batch*-Verfahren von His-MCPyV LT_{NT} durchgeführt. Es wurden jedoch andere Puffer als Binde- bzw. Waschpuffer und Elutionspuffer benutzt:

Binde-/ Waschpuffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5% Glycerol, 1 mM DTT, pH 7,4

Elutionspuffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 5% Glycerol, 1 mM DTT, pH 7,4.

Affinitätschromatographie von GST-$pRb_{382-771}$ im Batch-Verfahren

Auch die Aufreinigung von GST-$pRb_{382-771}$ wurde als Affinitätschromatographie im *Batch*-Verfahren durchgeführt. Hierfür wurde die Glutathion Sepharose™ 4B von GE Healthcare,

die spezifisch für GST-Tags ist, verwendet. Der Aufschluss des Bakterienpellets fand wie in Kapitel 4.7.2 beschrieben statt. Alle Schritte wurden wenn nicht anders erwähnt bei 4°C durchgeführt. Für die Aufreinigung von GST-$pRb_{382-771}$ wurden folgende Puffer verwendet:

Bindepuffer: 1xPBS, 200 mM NaCl, 5 mM BME, pH 7,4

Elutionspuffer: 30 mM reduziertes L-Glutathion, pH 7,4, in Bindepuffer

Die Glutathion Sepharose™ wurde vor Verwendung, nach Herstellerangaben, mit dem Bindepuffer gewaschen. Danach wurde die Sepharose zur Proteinlösung gegeben und die Suspension über Nacht rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit dem gebundenen Protein mit 500*g für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Sepharose wurde danach dreimal mit mindestens dreifachem Sepharosevolumen Bindepuffer für jeweils 20 min rotierend gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen. Für die Elution des GST-$pRb_{382-771}$ wurden jeweis eines von zwei möglichen Verfahren angewandt: 1. Die Elution von GST-$pRb_{382-771}$ mit reduziertem Glutathion oder 2. das Schneiden von GST-$pRb_{382-771}$ durch Thrombin, so dass GST weiter an die Sepharose bindet und $pRb_{382-771}$ gelöst im Überstand vorliegt.

Die Elution von GST-$pRb_{382-771}$ wurde in drei Schritten durchgeführt, so dass möglichst viel Protein von der Sepharose gelöst wurde. Dafür wurde im ersten Schritt die Sepharose mit dem doppelten Sepharosevolumen Elutionspuffer für 30-60 min bei Raumtemperatur inkubiert und der Überstand abgenommen, der Vorgang wurde zweimal wiederholt, wobei eine Inkubation über Nacht bei 4°C stattfand.

Da in dem Fusionsprotein GST-$pRb_{382-771}$ zwischen dem GST und dem $pRb_{382-771}$ eine Thrombinschnittstelle liegt, können die beiden Proteine enzymatisch voneinander getrennt werden. Dafür wurde nach den Waschschritten nochmals Bindepuffer hinzugegeben, so dass Puffer und Sepharose zu ungefähr gleichen Volumina vorlagen. Zu der Suspension wurden pro 100 µl Sepharose 7,5 U Thrombin hinzugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Prozedur wiederholt und der Ansatz bei 4°C rotierend über Nacht inkubiert. Ob das Enzym effektiv geschnitten hatte, wurde per SDS-PAGE kontrolliert und ja nach Bedarf nochmals Thrombin zur Sepharose gegeben, um verbliebenes ungeschnittenes GST-$pRb_{382-771}$ zu schneiden.

4.7.4 Ko-Aufreinigung von GST-pRb$_{PD}$ und 6xHis-LT$_{1-244}$ im Batch-Verfahren

Um zu überprüfen, ob sich beide Proteine in einem Verfahren als Komplex aufreinigen lassen, wurde eine Ko-Aufreinigung durchgeführt. Es wurden die Bakterienpellets aus 700 ml GST-pRbPD-Expressionsmedium und 1500 ml 6xHis-LT$_{1-244}$-Expressionsmedium in insgesamt 60 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und wie unter 4.7.2 beschrieben aufgeschlossen. Da es sich um eine Kombination beider Proteine handelt, wurden veränderte Puffer als bei den Einzelaufreinigungen benutzt:

Aufschlusspuffer: 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 2,5 mM BME, pH 7,5

Waschpuffer: 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$, 2,5 mM BME, pH 7,5

NiNTA-Elutionspuffer: 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 2,5 mM BME, pH 7,5

GST-Elutionspuffer: 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 2,5 mM BME, 30 mM reduziertes Glutathion, pH 7,5

Nach Aufschluss der Bakterien wurde der filtrierte Überstand geteilt. Zu der einen Hälfte wurde NiNTA-Agarose und zu der anderen Glutathion Sepharose hinzugegeben (siehe Kapitel 4.7.3). Die Proteinlösungen wurden über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Im Anschluss wurden die Agarose und Sepharose mit Waschpuffer gewaschen (siehe Kapitel 4.7.3). Die Elution der gebundenen Proteine und des eventuell geformten Proteinkomplexes fand in mehreren Schritten statt (Tabelle 12). Dafür wurden die Agarose bzw. Sepharose in Säulen gepackt, durch die Flüssigkeiten durchlaufen aber das Chromatographiematerial in der Säule bleibt.

Tabelle 12 Elution von GST-pRb$_{PD}$ und 6xHis-LT$_{1-244}$ bei der Ko-Aufreinigung

Elutionsschritt	Ni-NTA-Elutionspuffer, Elutionszeit	GST-Elutionspuffer, Elutionszeit
1. Eluat	3 ml, fließend	2 ml, fließend
2. Eluat	3 ml, 1 h bei RT	3 ml, 1 h bei RT
3. Eluat	5 ml, ÜN bei 4°C	3 ml, ÜN bei 4°C
4. Eluat	-	2 ml, fließend

Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

4.7.5 Gelfiltration von His-MCPyV LT_{NT}

Für die Gelfiltration (GF) wurde auch das ÄKTAPurifier System benutzt und die Superdex 200 10/300 GL Säule mit einem Säulenvolumen von 24 ml eingesetzt. Diese Säule trennt Proteine mit Molekulargewicht zwischen 10 und 600 kDa, gleichzeitig kann während eines Laufs über die Säule das Protein umgepuffert werden.

Die GF wurde über das ÄKTAPurifier System gesteuert und überwacht. Die Flussrate betrug 0,3-0,5 ml/min, maximal 0,75 ml/min, und es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 1-1,5 ml gesammelt. Als Standardpuffer für die His-MCPyV LT_{NT} Aufreinigung wurde 50 mM Tris, 750 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 8 verwendet oder ein Puffer, der für anschließende Anwendungen passend war. Die Sauberkeit des aufgereinigten Proteins wurde per SDS-PAGE überprüft.

4.7.6 Gelfiltration von His-SV40 LT_{NT}

Die GF wurde wie die Gelfiltration von His-MCPyV LT_{NT} durchgeführt, mit dem Puffer 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 7,4

4.7.7 Ionenaustauschchromatographie von GST-$pRb_{382-771}$

Auch die Ionenaustauschchromatographie (IEX) wurde mit dem ÄKTAPurifier-System durchgeführt und für die Aufreinigung von GST-$pRb_{382-771}$ benutzt. Hierfür wurde die UNO™ S6 Säule (6 ml, BioRad) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine Kationenaustauschsäule. Für die IEX wurde GST-$pRb_{382-771}$ gegen den salzlosen Puffer (50 mM $NaPO_4$, pH 7,3) dialysiert und für 10 min bei 4°C und 14.000*g zentrifugiert. Die Säule wurde vor dem Lauf auf 50 mM $NaPO_4$, pH 7,3 eingestellt. Pro Lauf wurden 500 µl GST-$pRb_{382-771}$ in das ÄKTAPurifier-$_{System}$ gegeben. Der NaCl-Gradient wurde mit dem hochmolaren Salzpuffer (50 mM $NaPO_4$, 1 M NaCl, pH 7,3) kontinuierlich aufgebaut. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml gesammelt. Die Sauberkeit des aufgereinigten Proteins wurde per SDS-PAGE überprüft.

4.7.8 SMART System

Analytische Gelfiltrationen wurden zum Teil mit dem SMART System (Pharmacia Biotech) durchgeführt. Dafür wurde die Superdex 200 PC 3.2/30 Säule (2,4 ml Säulenvolumen) verwendet. Das Probenvolumen betrug 50 µl und die Flussrate 40 µl/min. Es wurden jeweils 50 µl Fraktionen gesammelt. Da mit dem SMART-System verschiedene Proben und Proteine analysiert wurden, waren auch die Puffer unterschiedlich. Für die Analyse von LT_{NT}

Proteinen wurde sofern im Ergebnisteil nicht anders erwähnt 50 mM Tris, pH 8,0, 750 mM NaCl eingesetzt. In den Experimenten zur Komplexbildung (Kapitel 4.7.3) und Ko-Aufreinigung (Kapitel 4.7.4) wurde 50 mM Tris, pH 7,5, 200 mM NaCl, 2,5 mM BME als Laufpuffer benutzt.

Die Läufe mit dem SMART System wurden mit Hilfe von Claudia Trasak, Arbeitsgruppe Aepfelbacher, Institut für Medizinische Mikrobiologie, UKE, durchgeführt.

4.7.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden separiert und analysiert nach ihrer elektrophoretischen Mobilität mithilfe der denaturierenden Sodiumdodecyl-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli [77]. Bei dieser Methode werden die Proteine aufgrund ihrer Größe in einem elektrischen Feld voneinander separiert. Für die SDS-PAGE wurden jeweils ein 5%iges Sammelgel und ein 12%iges Trenngel verwendet (Tabelle 13). Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden mit 4x Protein-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 97°C erhitzt. Anschließend wurden die Proteine in einem Mini-PROTEAN®-System (BIO-RAD) nach Anleitung des Herstellers bei einer Spannung von 200 V getrennt. Im Anschluss wurde das Gel entweder mit Coomassie gefärbt (s. 4.7.10) oder in der Western Blot Analyse eingesetzt (s. 4.7.1).

Tabelle 13 Gel-Zusammensetzung für 1 Gel für SDS-PAGE

Lösungen	5% Sammelgel	12% Trenngel
destilliertes Wasser	1,4	2,6
Acrylamid/Bis (30/0,8) [ml]	0,33	1,0
1,5 M Tris (pH 6,8) [ml]	0,25	-
1,5 M Tris (pH 8,8) [ml]	-	1,3
10% SDS [ml]	0,02	0,05
10% Ammoniumpersulfat [ml]	0,02	0,05
TEMED [ml]	0,002	0,004

4.7.10 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Für das Anfärben von Proteinen wurde eine Coomassie Brilliant Blau G-250-Lösung mit 60-80 mg Coomassie Brilliant Blau G-250 und 3 ml 37%ige Salzsäure in 1 l destilliertem Wasser angesetzt.

SDS-Gele, die nach der Gelelektrophorese gefärbt werden sollten, wurden dreimal mit heißem destilliertem Wasser für 3-5 min gewaschen. Anschließend wurde die Coomassie-Lösung auf das Gel gegeben und kurzzeitig in der Mikrowelle erhitzt, so dass die Lösung nicht kochte aber heiß wurde. Das Gel wurde für mindestens 15 min geschüttelt und anschließend mit heißem destilliertem Wasser entfärbt.

4.7.11 Western Blot Analyse

Nach der SDS-PAGE wurden die separierten Proteine auf eine PVDF-Membran mittels halbtrockenem Verfahren transferiert. Der Proteintransfer erfolgt durch Anlegen einer Stromstärke von 200 bis 400 mA für 20-30 min. Anschließend wurde der Transfer überprüft indem die Membran mit Ponceaurot gefärbt wurde und transferierte Proteinbanden dadurch sichtbar gemacht wurden. Für die Antigen-Antikörperreaktion wurde die Membran mit einer 5%igen Milchpulver/ PBST-Lösung für 1 h unspezifisch mit Proteinen blockiert. Anschließend wurde der Erstantikörper in einer 5%igen Milchpulver/ PBST-Lösung auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal 10 min mit PBST bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper in einer 5%igen Milchpulver/PBST-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran nochmals gewaschen und die Antigen-Antikörper-Reaktion mittels ECL-Detektion (*ECL Western blotting detection reagents and analysis system*, Amersham) nach Herstellerangaben auf einem Röntgenfilm (FUJI Film Europe) sichtbar gemacht.

4.7.12 Microscale Thermophorese

Die Microscale Thermophorese (MST) ist eine relativ neue Technik zur quantitativen Bestimmung von Proteininteraktionen [78,79]. Die Thermophorese, die Bewegung von Molekülen entlang eines mikroskopischen Temperaturgradientens, ist abhängig von der Konformation, Größe und Ladung der Moleküle. Ändern sich diese Faktoren, z.B. durch die Anwesenheit von Interaktionspartnern, ändert sich auch die Thermophorese. Diese Änderung wird mit Hilfe von Titrationsreihen und Fluoreszenzmessungen beobachtet [78,79]. Mit dieser Methode kann die Dissertationskonstante K_D von Proteinen in Lösung, und damit nah an physiologischen Bedingungen, bestimmt werden.

Die MST wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die Dissoziationskonstante K_D zwischen 6xHis-TEV-LT_{1-244} und GST-$pRb_{382-771}$ und zwischen SV40 6xHis-LT_{7-117} und GST-$pRb_{382-771}$ zu bestimmen. Hierfür wurde der Monolith™ NT.115 von NanoTemper benutzt.

Für die Analyse wurden die Proteine aufgereinigt und als Monomere in der Messung eingesetzt. Bei der Standard-MST ist ein Interaktionspartner mit einem Fluoreszensfarbstoff markiert, in diesem Fall wurde GST-pRb$_{382-771}$ mit Alexa647, nach Anleitung des Herstellers (*Protein Labeling Kit Red*, NanoTemper Technologies), markiert. 6xHis-LT-Antigene wurden seriell, für eine Konzentrationsreihe verdünnt und mit fluoreszenzmarkiertem GST-pRb$_{382-771}$ gemischt, dessen Konzentration konstant bei 33 nM war. Die eingesetzten Konzentrationen von MCPyV 6xHis-TEV-LT$_{1-244}$ und SV40 6xHis-LT$_{7-117}$ waren 0,13-531 nM beziehungsweise 0,82-6725 nM. Die Proteine wurden für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Für die MST-Messung wurden hydrophile Kapillare (NanoTemper) benutzt. Die Protein-Protein-Interaktionen wurden außerdem unter verschiedene Salzkonzentrationen getestet und die MST-Messungen mit 20, 40 und 60% IR-Laserstärke durchgeführt. Die erhobenen Daten wurden mit der NanoTemper Analysis Software ausgewertet.

4.7.13 Kristallisationsscreens

Initiale Kristallisationsversuche zur Bestimmung von Kristallisationsbedingungen von His-MCPyV LT$_{NT}$ bzw. dessen Produkte aus der partiellen Proteolyse wurden mit den kommerziellen Kristallisationsscreens JCSG Suite (Qiagen), Classics Suite (Qiagen), comPAS Suite (Qiagen), Cryos Suite (Qiagen), PACT Premium Suite (Molecular Dimensions), Morpheus (Molecular Dimensions) und PGA Screen HT-96 (Molecular Dimensions) durchgeführt. Dafür wurden die Proteinlösungen 10 min bei 4°C und 16.000xg zentrifugiert. Die Kristallisationsansätze wurden mit dem Pipettierroboter Honeybee 961 (Genomic solutions) pipettiert. Dabei wurden 400 nl Proteinlösung mit 400 nl eines Präzipitanten in eine Vertiefung einer NeXtal QIA1-Platte (Qiagen) gemischt. Anschließend wurden die Platten luftdicht verschlossen und bei 20°C gelagert. Das Kristallwachstum wurde mikroskopisch überwacht.

4.7.14 Partielle Proteolyse

Die partielle Proteolyse ist eine Methode zur Optimierung der Proteinkristallisation [80]. Hierfür wird eine Protease *in situ* dem aufgereinigten Protein vor dem Ansetzen der Kristallisationsscreens hinzugegeben. Die Protease verdaut im Idealfall das Protein in der Weise, dass nur unstrukturierte Regionen verdaut und strukturierte/ gefaltete Regionen intakt gelassen werden, welche dann eine höhere Wahrscheinlichkeit haben zu kristallisieren.

Für diese Methode wurden unterschiedliche Proteinmengen, Puffer und Proteasekonzentrationen getestet, um ein stabiles Produkt zu erhalten. Hierfür wurden die Proteasen des JBS Floppy-Choppy Kits (Jena Bioscience) verwendet. Darin enthalten waren

die Proteasen α-Chymotrypsin, Trypsin, Subtilisin A und Papain. Die Proteolyseansätze wurden bei 20°C inkubiert.

4.7.15 Zirkulärer Dichroismus (CD) Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ist eine Standardmethode in der Strukturbiologie u.a. für die schnelle Bestimmung der Sekundärstruktur und der Faltung von Proteinen [81,82]. Dabei wird die Eigenschaft ausgenutzt, dass Peptidbindungen, aromatische Aminosäuren und Disulfidbindungen links- und rechtsgängiges polarisiertes Licht unregelmäßig absorbieren. Das führt dazu, dass verschiedene Sekundärstrukturen charakteristische CD-Spektren aufzeigen [81,82].

Die CD-Spektroskopie wurde angewandt, um zu überprüfen, ob der aufgereinigte His-MCPyV LT_{NT} Sekundärstrukturen aufweist. Die Messungen wurden unter Anleitung und mit Unterstützung von Raphael Eberle an der Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, am J-815 CD-Spektrometer (Jasco) durchgeführt und ausgewertet. Das Probenvolumen lag bei 200 µl. Das Ergebnis wurde in molarer Elliptizität ([θ]1000[deg cm^2/dmol]) angegeben.

Die Proteine hatten eine Konzentration von mind. 200 µg/ml und wurden für die Messung gegen 20-50 mM Phosphatpuffer mit maximal 25 mM NaCl dialysiert.

4.7.16 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine optische Methode bei der das Streulicht eines monochromatischen Lasers benutzt wird, um den hydrodynamischen Radius z.B. von Proteinen in Suspension zu bestimmen. Anhand des ermittelten hydrodynamischen Radius kann unterschieden werden, ob Proteine monodispers oder polydispers in Lösung vorliegen. Die DLS-Messungen wurden unter Anleitung von Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 20 µl und die Messungen wurden über 20 sec durchgeführt mit 10 bzw. 20 Wiederholungen. Die Proteinkonzentration musste mindestens 1 mg/ml betragen.

4.7.17 Thermofluorassay

Der Thermofluorassay wurde eingesetzt, um die Thermostabilität von MCPyV LT_{NT} unter verschiedenen Pufferbedingungen zu bestimmen und damit Pufferbedingungen zu erhalten, die zu einer erhöhten Stabilität von aufgereinigtem, monomerem LT_{NT} führen. Eine erhöhte

Stabilität dient sowohl der effizienteren LT_{NT}-Aufreinigung, wie auch der Kristallisation. Der Assay wurde von Stephane Boivin, EMBL Hamburg, durchgeführt und es wurden die Pufferbedingungen des Thermofluor Screen 1 und 2 getestet (siehe Anhang, Abbildung 57 und Abbildung 58).

Die Stabilität eines für die Kristallisation vorgesehenen Proteins kann mit dem *thermofluorescence shift assay* (Thermofluor Assay) untersucht werden. Die Stabilität wird anhand der Schmelztemperatur T_m des Proteins unter verschiedenen Pufferbedingungen und ansteigender Temperatur ermittelt. Der T_m-Wert ist die Temperatur, bei der die Hälfte der Proteine in Lösung sich entfaltet hat bzw. denaturiert ist. Bei der Entfaltung wird der hydrophobe Kern der Tertiärstruktur freigelegt und an diesen lagert sich ein fluoreszierender Farbstoff an. Dadurch fluoresziert der Farbstoff intensiver, wodurch die Fluoreszenz in Lösung erhöht wird. Die Entfaltung/ Denaturierung kann daher als eine Funktion von Temperatur und Fluoreszenz dargestellt werden. Als T_m-Wert wird der Mittelpunkt der Fluoreszenzkurve festgelegt. Der T_m-Wert ist nicht allein abhängig vom Protein, sondern wird auch von der chemischen Umgebung des Proteins beeinflusst. Daher werden mit dem TFA Bedingungen gesucht, die die Faltung eines Proteins möglichst stabilisieren. Je höher der T_m-Wert, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass das Protein kristallisiert. Für die Kristallisation wird ein T_m-Wert von über 45°C empfohlen [83].

Neben der Suche nach günstigen Bedingungen für die Kristallisation können die ermittelten Pufferbedingungen auch einer Optimierung der Aufreinigung oder für andere Experimente dienen. Abbildung 8 zeigt exemplarisch den Kurvenverlauf eines Beispielproteins bei unterschiedlichen Bedingungen. Charakteristisch ist der langsame, dann exponentiell verlaufende Anstieg der Fluoreszenz bis zum Scheitelpunkt mit anschließend abfallender Fluoreszenz. Anhand dieses Kurvenverlaufs kann ein T_m-Wert bestimmt werden.

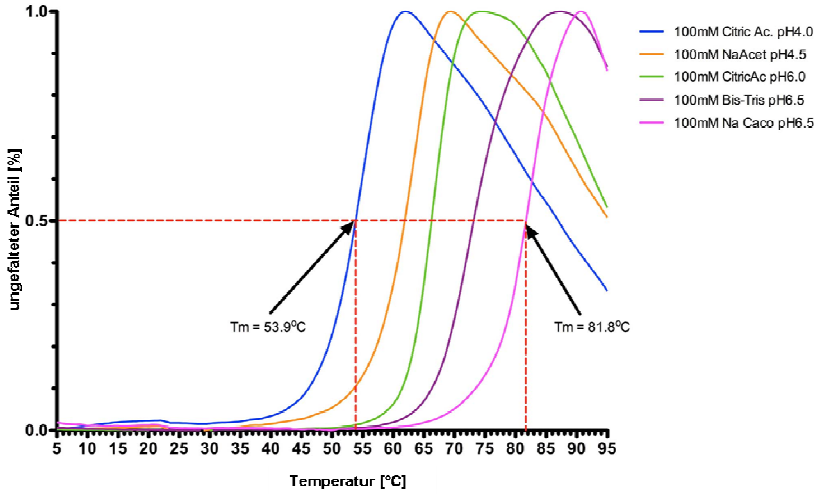


Abbildung 8 Exemplarischer Kurvenverlauf für das Thermofluor Assay (http://www.embl-hamburg.de/facilities/spc/Visitors/Service_list/index.html, 15.11.2013). Dargestellt sind die Schmelzkurven eines beliebigen Proteins in Abhängigkeit von verschiedenen Puffern.

4.7.18 Proteinstruktur-Modelling

Für die Vorhersage der Tertiärstruktur von MCPyV LT_{NT} wurde zum einen der FoldIndex© [69] bemüht, welcher die Wahrscheinlichkeit berechnet, ob ein Protein und wenn ja in welchen Regionen gefaltet ist. Zum anderen wurde die Platform SWISS-MODEL [70-72] genutzt, welche aufgrund von Homologien die Proteinstruktur modelliert.

5 Ergebnisse

5.1 Replikationsassay

5.1.1 Provirale MCPyV und SV40 Genome

Alle im Bezug auf das Replikationsassay präsentierten Daten wurden mit den Plasmiden pMCPyV (MCVSyn) und pSV40 erlangt. Die Präparation dieser Plasmide ist im Methodenkapitel 4.6.1 beschrieben. Bei beiden Plasmiden wird das bakterielle Vektorgerüst mithilfe von Restriktionsenzymen herausgeschnitten und das PyV-Genom re-ligiert. Abbildung 9 zeigt exemplarisch die MCPyV-Vektorkarten mit dem bakteriellen Vektorgerüst sowie nach Restriktionsverdau und anschließeder Ligation. Beim pMCPyV-Genom handelt es sich um das generierte synthetische MCPyV Konsensusgenom, welches in seiner Sequenz identisch mit einigen Wildtypisolaten ist [47] (siehe Abbildung 48, Diskussion).

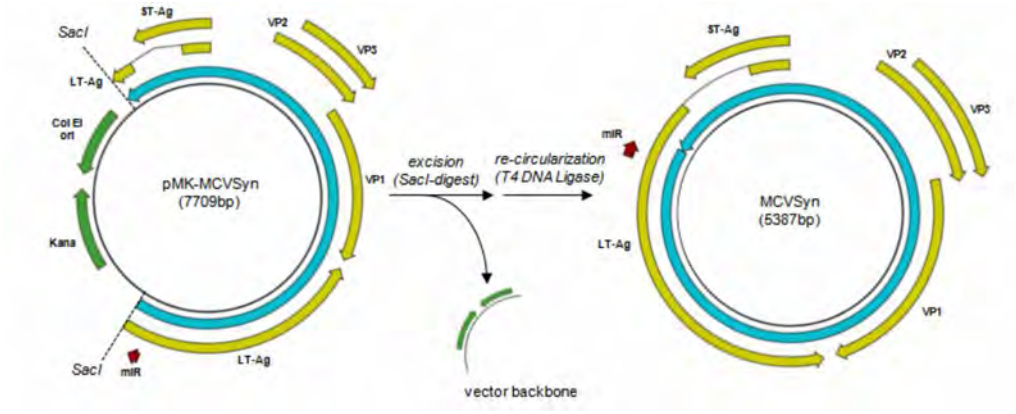


Abbildung 9 Vektorkarte des MCPyV-Konsensusgenoms (MCVSyn) mit bakteriellem Vektorgerüst im T-Antigenlokus (links) und nach Restriktionsverdau und Ligation als MCPyV-Episom (rechts). Abbildung aus [47]

5.1.2 SV40 Replikationsassay

Die humanen Polyomaviren BKPyV und JCPyV sind bekannt für ihren engen Wirts- und Zelltropismus, d.h. in nur wenigen Zelltypen können Aspekte der Virusreplikation studiert und infektiöse Partikel produziert werden [4,84]. Für andere hPyV, wie z.B. KIPyV, WuPyV und TSPyV gibt es kein *in vitro* Replikationssystem. SV40 hingegen ist in der Lage verschiedene Zelltypen unterschiedlicher Wirtsspezies zu infizieren, dort zu replizieren und infektiöse

Viruspartikel zu produzieren. Mit einem relativ kurzen Replikationszyklus von ungefähr 4 Tagen, ist SV40 ein begehrtes Studienobjekt von Virologen und Zellbiologen [6] und wird als Polyomavirus-Prototyp angesehen. Obwohl mithilfe der SV40-Forschung essentielle Erkenntnisse für das virologische Verständnis von Polyomaviren erzielt wurden, stellt das Virus doch eher die Ausnahme, als die Regel dar. Das betrifft auch die gut etablierte *in vitro* SV40-Replikation.

Es ist bekannt, dass SV40 unter anderem in der Affenzelllinie CV-1 repliziert, infektiöse Partikel bildet, welche durch Lyse aus der Zelle freigesetzt werden. Für unser Vorhaben ein MCPyV-Replikationssystem zu etablieren, haben wir als Kontrolle und zum Vergleich das SV40-Replikationssystem in CV-1 Zellen in unserem Labor etabliert und einzelne Phasen der Virusreplikation, wie frühe Transkription, DNA-Replikation, späte Transkription und Virusfreisetzung nachvollzogen.

Als erstes wurde die DNA-Replikation von SV40 untersucht. Da nicht mit infektiösem Virus gearbeitet wurde, sondern mit viraler DNA musste diese für das Experiment präpariert werden. pSV40 wird in Bakterien mithilfe eines bakteriellen Vektorgerüsts amplifiziert und anschließend aus den Bakterien isoliert. Für das Replikationssystem muss das bakterielle Vektorgerüst durch Restriktionsverdau entfernt und anschließend die Virus-DNA zum Plasmid ligiert werden. Bei der Ligation entstanden neben dem einfachen Plasmid auch Konkatamere.

Mit dem religierten Plasmid pSV40 wurden CV-1 Zellen transfiziert. Nach 6 Tagen wurden die Zellen geerntet und niedermolekulare DNA mithilfe der HIRT-Extraktionsmethode [75] isoliert. Mit der Southern Blot Analyse und einer radioaktiven Sonde gegen SV40 LT konnte neu replizierte SV40 DNA nachgewiesen werden (Abbildung 10A). Zusätzlich wurde die Expression des Strukturproteins VP1, einem späten Protein, überprüft. Hierfür wurden die transfizierten Zellen nach 4 Tagen mit 10% Triton lysiert und ein Teil des Lysats per Western Blot Analyse auf die Anwesenheit von VP1 getestet. Das SV40-Strukturprotein VP1 konnte im Lysat transfizierter Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 10B.)

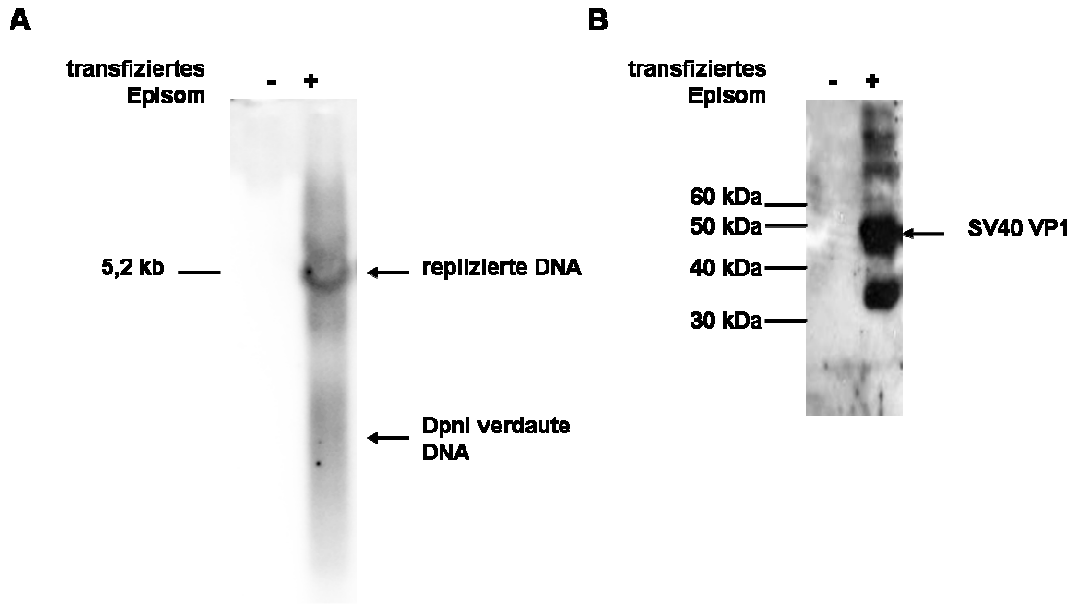


Abbildung 10 SV40 Replikationsassay. CV-1 Zellen wurden mit pSV40 transfiziert A) *De novo* synthetisierte SV40-DNA wird 6d p.t. durch Southern Blot Analyse detektiert. 8 µg niedermolekulare DNA, isoliert nach der HIRT-Methode und DpnI und EcoRI verdaut, wurden in einem Agarosegel separiert. Der Southern Blot wurde mit einer radioaktiven SV40 LT-Ag Sonde hybridisiert und für 24 h belichtet. B) Zelllysate wurden 6d p.t. im Western Blot auf VP1-Expression getestet. VP1 wird zwischen 40 und 50 kDa detektiert, die untere Bande ist ein Abbauprodukt.

Bei transfizierten CV-1-Zellen konnte 11 Tage nach Transfektion ein zytopatischer Effekt beobachtet (CPE) werden (Abbildung 11A), d.h. der Zellrasen wies im Gegensatz zur Kontrolle Löcher auf, die Zellen haben sich von der Kulturschale gelöst und sind lysiert. Dies ließ darauf schließen, dass SV40 Virionen produziert und diese durch Lyse freigesetzt wurden. Um zu überprüfen ob infektiöse Vironen freigesetzt wurden, wurde der Überstand abgenommen, durch einen 0,2 µM Filter gegeben und von dem Filtrat 20 µl auf frisch ausgesäte CV-1 Zellen pipettiert. Parallel dazu wurden CV-1 Zellen nochmals mit pSV40 transfiziert. Nach 5 Tagen zeigte der Ansatz mit dem Filtrat einen eindeutigen CPE, wobei der Transfektionsansatz im Vergleich zur Kontrolle noch keine Auffälligkeiten aufwies (Abbildung 11B).

Die oben genannten Ergebnisse zeigen, dass wir unter den beschriebenen Bedingungen in CV-1-Zellen replizierte SV40 DNA und VP1 nachweisen können und dass infektiöser Überstand mit dieser Methode gewonnen werden kann.

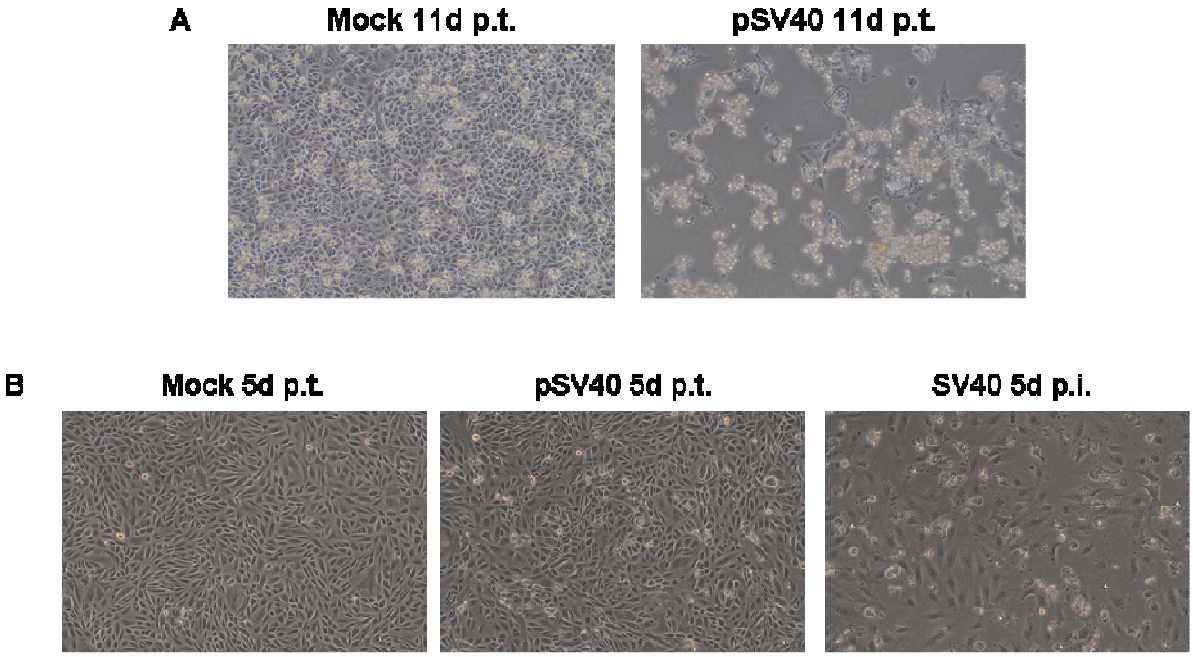


Abbildung 11 CV-1 Zellen transfiziert mit pSV40 bzw. infiziert mit SV40-Viruspartikeln zeigen zytopathischen Effekt nach 11 bzw. 5 d. (A) CV-1 Zellen 11 d nach Transfektion von Kontroll-DNA bzw. pSV40, 20fache Vergrößerung (B) CV-1 Zellen 5 d p.t. mit Kontroll-DNA und pSV40 bzw. 5 d p.i. mit Zellüberstand, 10fache Vergrößerung (Axiovert 25 Mikroskop, Zeiss)

5.1.3 MCPyV Replikationsassay

Bis heute sind der Zelltyp beziehungsweise die Zelltypen in dem MCPyV im Menschen repliziert unbekannt. Das MCC als Hauttumor sowie die Tatsache das Virus-DNA in Stirnabstrichen von gesunden Probanden gefunden wurde [85,86], sind Indizien dafür, dass MCPyV in der menschlichen Haut replizieren könnte. Allerdings wurde MCPyV DNA zum Beispiel in HIV- und MCC-Patienten auch in Monozyten, im Serum und Schleimhautproben gefunden [87-89].

Für das MCPyV Replikationsassay wurde nach einer Zelllinie gesucht, die permissiv für die MCPyV-Replikation ist. Hierfür wurden zehn Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs (Tabelle 4, Materialien) verwendet, hauptsächlich handelt es sich um Zellen dermalen oder epithelialen Ursprungs, aber es wurden auch Monozyten und Affenzelllinien untersucht. Die angewandten Transfektionsmethoden und -effizienzen sind in Tabelle 14 gelistet. Es wurden an jeder Zelllinie mehrere Transfektionsmethoden getestet, um dann die Methode zu bestimmen die die meisten Zellen transfiziert und mit der in den anschließenden Experimenten weitergearbeitet wurde. Die Transfektionseffizienzen wurden mittels FACS-Analyse ermittelt. Hierfür wurden die Zellen mit dem GFP-Fusionsprotein exprimierenden

Plasmid transfiziert, worauf ein GFP-Fusionsprotein exprimiert wurde. Nach zwei Tagen Inkubation wurde der Anteil GFP-positiver Zellen im Durchflusszytometer ermittelt.

Tabelle 14 Verwendete Zelllinien, deren Transfektionsmethode und die Transfektionseffizienz

Zellinie	Transfektionsmethode	Transfektionseffizienz
PFSK-1	Fugene	~30%
HDF	PEI	~50%
HEK293	PEI	~38%
H1299	PEI	~40%
Makrophagen	Neontransfektion	~30%
LAN-1	Fugene	~15%
Keratinozyten	Amaxa	~25%
HaCaT	Exgen	~24%
Vero	PEI	~35%
CV-1	Fugene	~12%

Nach Ermittlung der Transfektionsmethode für jede der zehn Zelllinien wurde, wie bei SV40, als erstes auf *de novo* replizierte MCPyV-DNA getestet. Hierfür wurden alle Zelllinien mit pMCPyV transfiziert und für 6 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und niedermolekulare DNA mithilfe der HIRT-Extraktionsmethode [75] isoliert und mittels Southern Blot analysiert. In vier der zehn getesteten Zelllinien, HEK293, PFSK-1, H1299 und HDF, konnte neu replizierte MCPyV DNA detektiert werden (Abbildung 12, [47]). Nur diese zeigten sich permissiv für die *de novo* DNA-Replikation von MCPyV.

Nach Ermittlung der vier permissiven Zelllinien wurden diese von Mitgliedern des Labors auf die Expression eines frühen Transkripts, dem LT-Antigen getestet. Hierfür wurden die Zellen wieder mit pMCPyV transfiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten, zwischen 2 und 44 Tagen, auf die LT-Expression durch Western Blot Analyse getestet. Drei der vier Zelllinien, HEK293, PFSK-1 und H1299 exprimierten das LT-Antigen [47]. Diese Ergebnisse werden in der Diskussion in Abbildung 49 präsentiert und diskutiert. Da in HDF-Zellen keine LT-Expression detektiert wurde, was aber essentiell für die Virusproduktion ist, sind weitere Experimente nur mit HEK293, PFSK-1 und H1299 durchgeführt worden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in HDF-Zellen LT exprimiert wird, wobei die Mengen so gering sind, dass sie unter der Nachweisgrenze der Western Blot Analyse liegen.

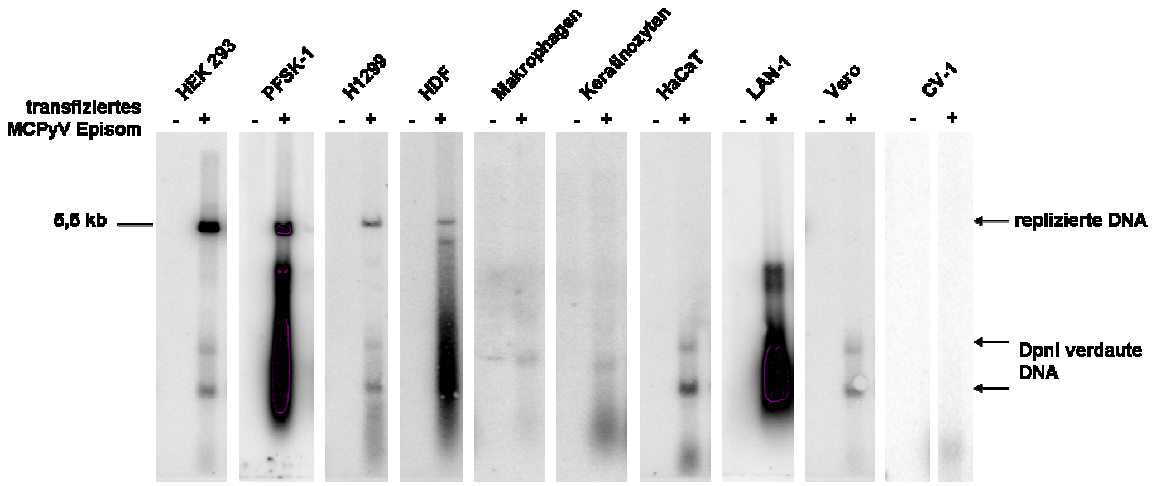


Abbildung 12 MCPyV Replikationsassay. Zellen wurden mit pMCPyV transfiziert. 6 d p.t. wurde *de novo* synthetisierte MCPyV DNA durch Southern Blot Analyse detektiert: niedermolekulare DNA wurde nach der HIRT-Methode isoliert und DpnI und EcoRI verdaut und in einem Agarosegel separiert. Der Southern Blot wurde mit einer radioaktiven MCPyV LT-Ag Sonde hybridisiert. Es wurden jeweils 8 µg niedermoleklare DNA aus HEK293, PFSK-1-, H1299-, Keratinozyten-, LAN-1- und Vero-Extrakten aufgetragen, 3,8 µg aus HDF-, 5,5 g aus Makrophagen-, 4,2 µg aus HaCaT- und 1 µg aus CV-1- Extrakten. Die Southern Blots wurden für 6 d belichtet, bis auf den Southern Blot für CV-1, der wurde 12 d belichtet.

Nach Detektion von neu-replizierter DNA und LT wurden die Zelllinien HEK293, PFSK-1, und H1299 auf infektiöse Viruspartikel untersucht. Dafür wurden zum einen Zellen mit pMCPyV transfiziert und über einen längeren Zeitraum inkubiert, um zu beobachten, ob sich bei diesen Zelllinen CPE einstellt, wie er bei pSV40 transfizierten Zellen zu beobachten war. Ein solcher Effekt konnte jedoch bei keiner der drei Zelllinien beobachtet werden. Zum anderen wurde, um zu testen, ob trotzdem Viruspartikel produziert wurden, wie bei den SV40-Versuchen, der Kulturüberstand nach 11 Inkubationstagen durch einen 0,2 µm Filter filtriert und auf frisch ausgesäte Zellen gegeben, um sie mit eventuell freigesetzten Viruspartikeln zu infizieren. Die „infizierten“ Zellen zeigten keinen visuellen Unterschied zu den „nicht-infizierten“ Kontrollzellen. Anschließend wurde unter der Annahme, dass Viruspartikel produziert werden, jedoch nicht aus den Zellen herausgelangen, mittels der Frieren-Tauen Methode transfizierte Zellen nach 11 Tagen aufgeschlossen, das Lysat ebenfalls filtriert und auf frisch ausgesäte Zellen gegeben. Diese wurden über einen längeren Zeitraum, bis zu 20 Tage, inkubiert, doch auch hier war kein CPE und damit keine Infektion visuell zu erkennen. Allerdings kann bei diesen Experimenten keine Aussage darüber gemacht werden, ob Viruspartikel von Zelle zu Zelle migrieren oder kontinuierlich, ohne CPE, aus der Zelle heraustransportiert werden.

Die Expression des Strukturproteins VP1 in den Zelllinien H1299, PFSK-1 und 293 wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe mithilfe der Immunfluoreszenz analysiert. In H1299 und PFSK-1 konnte VP1 detektiert werden, jedoch nicht in HEK293-Zellen (siehe Diskussion, Abbildung 50) [47]. Deswegen wurden nachfolgende Experimente mit H1299 und PFSK-1-Zellen durchgeführt.

5.1.4 Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von SV40 und MCPyV Partikeln

Da wie unter 5.1.3 beschrieben, kein CPE in den getesteten Zelllinien beobachtet wurde und eine CPE-freie Virusfreisetzung bzw. die Virus-Migration von Zelle zu Zelle nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde alternativ direkt nach MCPyV Viruspartikeln aus Zelllysaten via Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) gesucht. Hierfür wurden die Zelllinien H1299 und PFSK-1 mit pMCPyV transfiziert und für 4 Tage inkubiert. Zeitgleich dazu wurden als Kontrolle und Referenz für das Experiment CV-1 Zellen mit pSV40 transfiziert und alle darauffolgenden Experimente parallel durchgeführt.

Wie im Methodenteil beschrieben (Kapitel 4.6.8), wurden transfizierte Zellen lysiert und das Lysat auf einen OptiPrep™ Gradienten gegeben und zentrifugiert. Damit wurden alle im Lysat enthaltenen Partikel ihrer Masse nach im Gradienten aufgetrennt. Für die Fraktionierung wurde der Gradient nach der Zentrifugation ausgetropft, es wurden 15 Fraktionen gesammelt, jede enthielt ca. 250 µl. Die ersten Fraktionen enthielten die leichten und die letzten Fraktionen die schweren Partikel.

Von den CV-1-Lysaten wurden 20 µl der Fraktionen von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe nach einer Nukleasebehandlung, mit der freie DNA verdaut wird, auf ihren SV40 DNA-Gehalt via Real-Time PCR getestet [47]. In den Fraktionen F6 bis F12 des CV-1-Lysats konnte SV40-DNA detektiert werden, die Fraktionen mit dem höchsten SV40-DNA-Gehalt waren F8 und F9 (Abbildung 13). Außerdem wurden die Fraktionen im Western Blot auf die Anwesenheit von SV40 VP1 getestet. In den Fraktionen F6 bis F12 wurde VP1 detektiert. Um zu überprüfen, ob in diesen Fraktionen intakte SV40 Viruspartikel vorhanden waren, wurden sie elektronenmikroskopisch untersucht. Es konnten Viruspartikel, mit einer Größe von ~40 nm im Elektronenmikroskop (EM) dargestellt werden. (Abbildung 13, [47]). Das entspricht der Größe von SV40 Virionen. Die EM-Analyse fand in Kollaboration mit der Forschungsgruppe Elektronenmikroskopie am Heinrich-Pette-Institut statt.

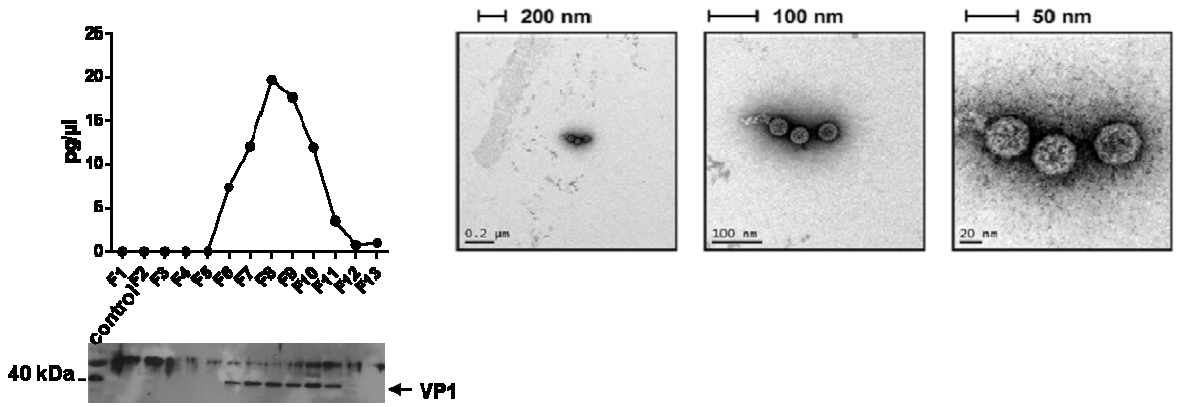


Abbildung 13 Dichtegradientenzentrifugation von SV40 Partikeln (nach [47]). OptiPrep™-DGZ wurden durchgeführt mit CV-1-Lysaten 4 d p.t. mit pSV40. Es wurden 15 Fraktionen à 250 µl gesammelt, die auf den SV40-DNA Gehalt und das SV40 Protein VP1 getestet wurden (linke Abbildungen). Zusätzlich wurden die Fraktionen elektronenmikroskopisch nach Viruspartikel untersucht. Exemplarisch dargestellt ist die Fraktion 9.

Zeitgleich wurden 25 µl der Fraktionen F4-F15 auf je $1{,}5 \times 10^5$ CV-1 Zellen gegeben, die am Vortag ausgesät wurden, um zu testen, ob die Fraktionen infektiöse Virionen enthalten und diese erneut Virusreplikation initiieren können. Die Zellen wurden 36 h nach Infektion fixiert und mit dem SV40 LT Antikörper Pab419 gefärbt. Es wurde in einigen Zellen SV40 LT anhand der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dargestellt in Abbildung 14 sind exemplarisch die Immunfärbungen der CV-1 Zellen, die mit den Fraktionen 8, 9, 10 infiziert wurden. Neben der Kernfärbung in Blau ist in einigen Zellen SV40 LT in Rot angefärbt. Ungefähr 15% der Zellen aus den Fraktionen 8 und 9 und ~13% der Zellen aus Fraktion F10 waren mit SV40 infiziert. Das SV40 LT wurde im Zellkern detektiert.

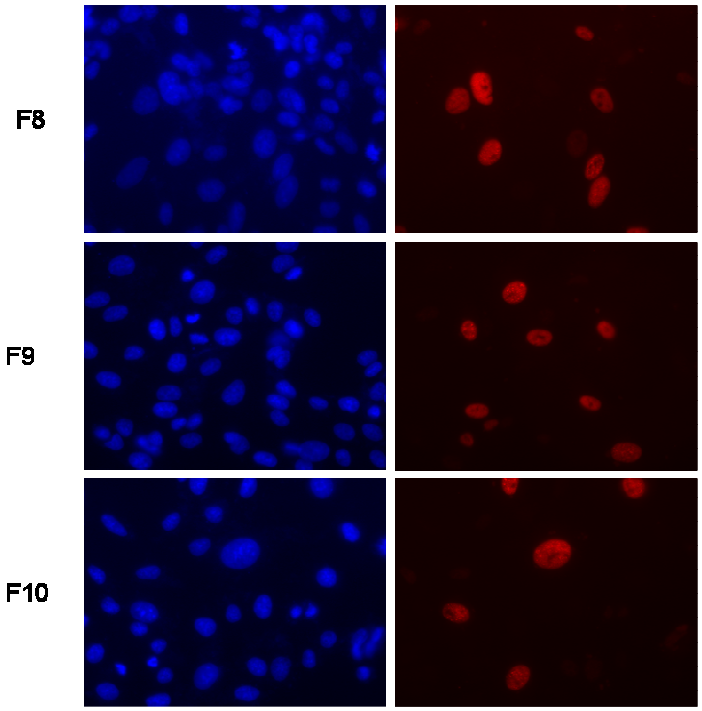


Abbildung 14 Immunfluoreszensfärbung von CV-1 Zellen, die mit den DGZ-Fraktionen F8, F9 und F10 infiziert wurden. Gefärbt wurde mit Vectashield-Medium inkl. Dapi (blau) für die Kernfärbung und dem anti-SV40 LT-Antikörper Pab419 (rot).

Die mit pMCPyV transfizierten H1299 und PFSK-1 Zellen wurden genau wie transfizierte CV-1 Zellen nach 4 Tagen lysiert und das Lysat der DGZ unterzogen. Auch hier wurden die Fraktionen auf den Gehalt von MCPyV-DNA mittels Real-Time PCR getestet. Sowohl bei den Fraktionen von H1299- wie auch PFSK-1-Lysaten konnte MCPyV-DNA detektiert werden, jedoch war die Konzentration 10^3-10^5fach geringer als bei den SV40-Ansätzen und es gab mehr Fraktionen, die MCPyV-DNA positiv als SV40-DNA positiv waren, wenn auch zu wesentlich geringeren Konzentrationen (Abbildung 15). Was daran liegen kann, dass die MCPyV-DNA nicht nur in Virionen verpackt, sondern mit anderen Proteinen assoziiert ist oder frei vorliegt. Von den Fraktionen mit den höchsten MCPyV-DNA Konzentrationen; für H1299 F6, F10, F11, F12, F13 und für PFSK-1 F6, F7, F11, F12, F13; wurden wieder 25 µl auf $1{,}5 \times 10^5$ Zellen der entsprechenden Zelllinie gegeben. Diese Zellen wurden nach 36 h in der Immunfluoreszenz auf die Expression von MCPyV LT getestet. In keinem der Ansätze wurde MCPyV LT mittels Antikörper detektiert. Wenn man davon ausgeht, dass sich in den Fraktionen 10^3-10^5fach weniger Viruspartikel als in den SV40-Fraktionen befunden haben und bei letzteren die Infektionsrate der virusstärksten Fraktion bei ~15% lag, kann es sein, dass die Viruszahl beziehungsweise die Anzahl untersuchter Zellen zu gering war, um eine Infektion festzustellen. Daher kann an dieser Stelle keine Aussage darüber getroffen werden, ob infektiöses MCPyV isoliert wurde.

Ein weiterer Teil der MCPyV-DNA enthaltenden Fraktionen wurde elektronenmikroskopisch untersucht. In Abbildung 15 sind Bilder der H1299 Fraktionen F6 und F10 zu sehen [47]. In diesen sind vereinzelt Virionen zu erkennen, die kleiner als 40 nm und unregelmäßiger als die SV40-Partikel geformt sind.

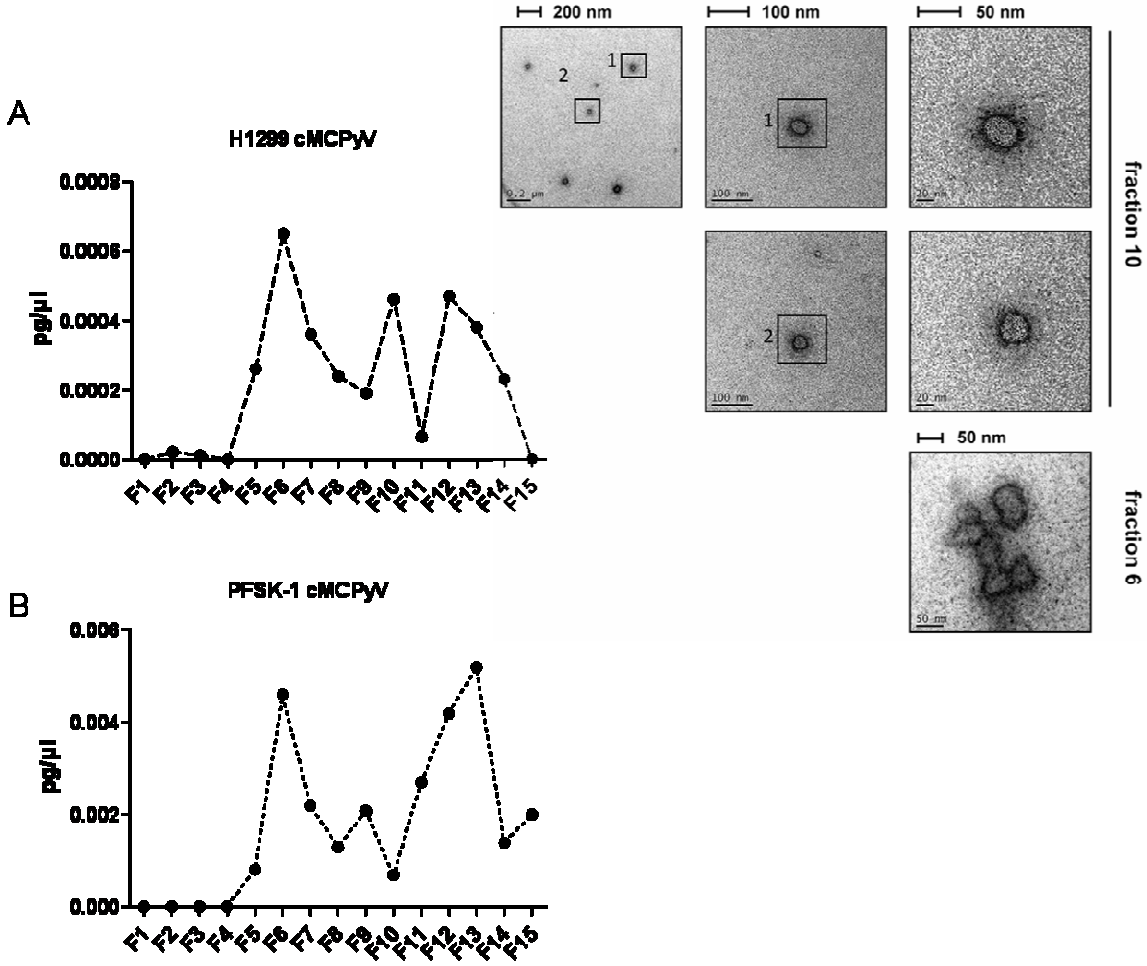


Abbildung 15 MCPyV Gradient in H1299 und PFSK-1 Zellen Dichtegradientenzentrifugation von MCPyV-Partikeln (modifiziert nach [47]). OptiPrep™-DGZ wurden durchgeführt mit H1299- (A) und PFSK-1-Lysaten (B) 4 d p.t. mit pMCPyV. Es wurden 15 Fraktionen à 250 µl gesammelt, die auf den MCPyV-DNA Gehalt getestet wurden (linke Abbildungen). Zusätzlich wurden die Fraktionen elektronenmikroskopisch nach Viruspartikel untersucht. Exemplarisch dargestellt sind die Fraktionen 6 und 10 des H1299-Lysats.

Weiterhin wurde untersucht, ob in den DGZ-Fraktionen mit dem höchsten MCPyV-DNA Gehalt das Strukturprotein VP1 vorhanden ist. VP1 macht ca. 70% des gesamten Proteingehalts eines Polyomaviruspartikels aus und ist damit das häufigste Protein. Da zum Zeitpunkt der Experimente kein MCPyV VP1 Antikörper zur Verfügung stand, der in der Western Blot Analyse funktionierte und die Fraktionen trotzdem auf VP1 getestet werden

sollten, wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Dafür wurden je 45 µl der Fraktionen F8 und F10 vom CV-1-Lysat als Kontrolle, F6, F12 und F12 vom H1299-Lysat und F6, F9 und F13 vom PFSK-1-Lysat in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde mit dem Pierce SilverSnap® Kit gefärbt. Das SV40 VP1 hat eine molekulare Masse von ca. 40 kDa und das MCPyV VP1 eine theoretische Masse von ca. 43 kDa. Nach der Silberfärbung konnte man in den SV40 Fraktionen eine Bande auf Höhe der 40 kDa-Markerbande sehen. In den anderen Fraktionen wurde keine Bande zwischen 40 und 50 kDa detektiert, die man MCPyV VP1 hätte zuordnen können (Abbildung 16). Die Fraktionen F12 und F13 der H1299- bzw. PFSK-1 Lysate enthalten Proteine jeglicher Größe, jedoch kann keine Aussage gemacht werden, ob darin VP1 enthalten ist. Auch in den anderen Fraktionen kann VP1 vorhanden gewesen sein, allerdings unterhalb der Nachweisgrenze.

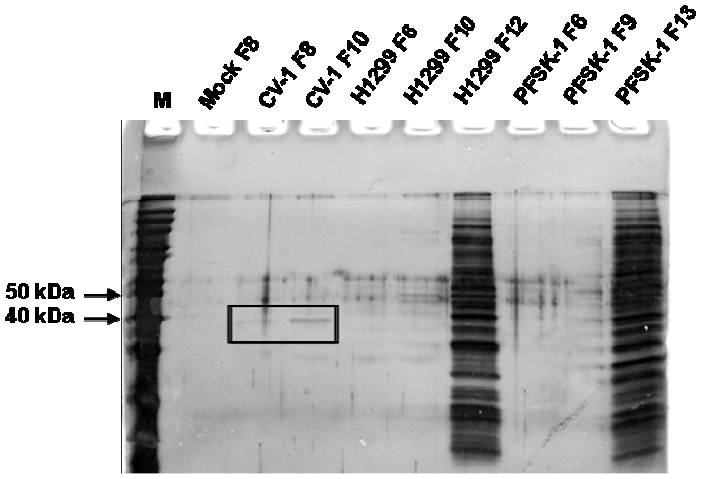


Abbildung 16 VP1-Nachweis via Silberfärbung eines SDS-Gels in dem 45 µl verschiedener DGZ-Fraktionen aufgetragen wurden. Es wurden Fraktionen der Lysate von CV-1, H1299 und PFSK-1 aufgetrennt. In den CV-1 Fraktionen ist VP1 auf Höhe von 40 kDa zu sehen. Der Kasten umrahmt detektiertes SV40 VP1.

5.1.5 Zusammenfassung

Die Etablierung des SV40-Replikationssytems in unserem Labor wurde erfolgreich durchgeführt. Es konnten verschiedene Stufen einer PyV-Replikationskasade nachgewiesen werden: frühe Transkription durch exprimiertes SV40 LT-Antigen, DNA-Replikation durch *de novo* synthetisierte SV40-DNA, späte Transkription durch das Strukturprotein VP1, Viruszusammensetzung in der Zelle und anschließende Lyse und Virusfreisetzung. Diese Stufen wurden i*n vitro* nach Transfektion von pSV40 und wie auch nach Infektion mit isolierten SV40-Partikeln beobachtet. Folglich konnte das SV40-Replikationssystem als interne Kontrolle für die Etablierung eines MCPyV-Replikationssystems eingesetzt werden.

Für die MCPyV-Replikation wurden zehn Zelllinien getestet. Von diesen Zelllinien wurde in HDF, HEK293, PFSK-1 sowie H1299 *de novo* replizierte MCPyV-DNA nachgewiesen. Alle vier Zelllinien sind humanen Ursprungs. Anschließend wurde in HEK293, PFSK-1 und H1299 das frühe Transkript LT detektiert und in PFSK-1 sowie H1299 das späte Transkript und Strukturprotein VP1 [47]. Mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation von Lysaten aus pMCPyV transfizierten PFSK-1- und H1299-Zellen und anschließender EM wurden Viruspartikel gefunden, die jedoch verglichen mit SV40 unregelmäßig geformt sind.

Im Vergleich zu SV40 konnte keine Neuinfektion beobachtet werden. Es konnte nicht geklärt werden, ob die isolierten MCPyV-Partikel an sich infektiös beziehungsweise nicht-infektiös sind oder ob, falls sie infektiös sind, bei den Infektionsexperimenten auf Zellen gegeben wurden, die nicht die entsprechenden Rezeptoren für die Virusaufnahme haben, oder ob die Anzahl der isolierten MCPyV-Partikel zu gering für eine Infektion war.

Abschließend kann festgehalten werden, dass wahrscheinlich keine der getesteten Primärzellen und Zelllinien vollständig permissiv für die MCPyV-Replikation ist. Es wurden vier Zelllinien identifiziert in denen verschiedene Phasen der Replikation beobachtet werden können. Folglich lassen sich mit diesen Zelllinien zukünftig Teile des Replikationszyklus näher analysieren. Des Weiteren sind diese Zelllinien ein notwendiges Werkzeug zum Studium der MCPyV-verursachten Transformation und der MCC-Tumorgenese, solange kein vollständig permissives Replikationssystem entdeckt wird.

5.2 Expression und Aufreinigung der MCPyV und SV40 LT N-Termini, sowie der pRb *pocket* Domäne für strukturelle und biochemische Analysen

5.2.1 Bakterielle Expression von MCPyV LT_{NT}, SV40 LT_{NT} und der pRb *pocket* Domäne

Das verkürzt exprimierte MCPyV LT ist neben sT das einzige MCPyV Protein, das in MCC-Gewebe exprimiert wird. Dabei befinden sich die tumorspezifischen Stopmutationen stets hinter dem pRb-Bindemotiv LxCxE. Aufgrund der positiven Selektion und damit dem Erhalt des LxCxE-Motivs, wird dieser Interaktion zwischen LT N-Terminus (LT_{NT}) und pRb eine wichtige Rolle in der Transformation und der daraus resultierenden MCC-Tumorgenese zugeschrieben. Ein Ziel dieser Doktorarbeit war es den MCPyV LT_{NT} zu kristallisieren. Mithilfe der Kristallstruktur des MCPyV LT_{NT} sollen Informationen generiert werden, die zur Aufklärung des funktionellen Mechanismus dieses verkürzten Proteins beitragen.

Des Weiteren sollte die Interaktion zwischen MCPyV LT_{NT} und der pRb *pocket* Domäne (pRb_{PD}) biochemisch analysiert werden. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante wurden die Experimente zum Vergleich mit SV40 LT_{NT} durchgeführt.

Für die strukturelle wie auch biochemische Analyse eines Proteins muss dieses in einem bakteriellen oder eukaryotischen System exprimiert werden. Für die Expression der drei Proteine MCPyV LT_{NT}, SV40 LT_{NT} und der pRb *pocket* Domäne wurde sich für ein bakterielles Expressionssystem entschieden. Hierfür wurde der Bakterienstamm *E. coli* BL21 Star verwendet, welcher für die Überexpression von Proteinen und hohe Proteinausbeute optimiert ist. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Proteinaufreinigungen präsentiert.

5.2.2 Aufreinigung des MCPyV LT N-Terminus

Für die Expression vom MCPyV LT_{NT} wurden die kodierenden Sequenzen für die Aminösäuren 1-244 bzw. 1-313 aus den cDNAs der MCPyV Sequenz der Merkelzellkarzinom-Zelllinie 12 (MCCL12) bzw. dem MCPyV Konsensus amplifiziert und in verschiedene bakterielle Expressionsvektoren mit His-*Tags* kloniert. Der His-*Tag* war jeweils N-terminal an LT fusioniert und alle Fusionsproteine wurden erfolgreich überexprimiert. Je nach Expressionskonstrukt bestand die Möglichkeit den His-*Tag* enzymatisch zu entfernen. Die hier präsentierten Ergebnisse wurden vorwiegend mit den His-LT_{1-244}-Konstrukten erzielt. Die Konstrukte wurden aufgrund ihrer *Tag*s, der *Tag*-Länge und der enzymatischen Schnittstellen ausgesucht und in den Experimenten nach Bedarf austauschbar eingesetzt. Tabelle 15 fasst die hergestellten His-LT_{NT}-Konstrukte zusammen. Soweit keine Unterscheidung zu anderen Polyomaviren bzw. ihrer LT-Antigene notwenig ist, werden die MCPyV LT N-Terminus-Konstrukte/-Proteine zur Vereinfachung wie in Tabelle 15 aufgeführt benannt. Um eine maximale Expression und lösliches Protein zu erzielen, fand die Expression standardmäßig in LB-Medium versetzt mit Glukose bei 16 und 18°C über Nacht statt (Kapitel 4.7, Methoden). In Tabelle 15 sind zusätzlich das theoretische, wie auch das in der Gelfiltration oder auf SDS-Gelen beobachtete Molekulargewicht aufgelistet. Bei allen Fusionsproteinen wurde ein höheres Molekulargewicht beobachtet, als das Theoretische.

Tabelle 15 LT_{NT} Konstrukte mit ihren His-*Tags* und den entsprechenden Expressionsvektoren, sowie den errechneten, wie auch beobachteten Molekulargewichten.

Protein-bezeichnung	N-terminal fusionierter *Tag* inklusive Enzymschnittstelle und Peptidlänge	bakterieller Expressions-vektor	theoretisches Molekular-gewicht [kDa]	beobachtetes Molekular-gewicht [kDa]
10xHis-LT_{1-244}	10xHis-Xa (22aa)	pJC40	~29	~38
10xHis-LT_{1-313}	10xHis-Xa (22aa)	pJC40	~37	~48
6xHis-TEV-LT_{1-244}	6xHis-Xpress-TEV (46aa)	pRSET-A	~32	~40
6xHis-TEV-LT_{1-313}	6xHis-Xpress-TEV (46aa)	pRSET-A	~39	~50
6xHis-LT_{1-244}	6xHis (9aa)	pET302	~28	~35

Aufreinigung und Gelfiltration resultieren in LT_{NT} Mono- und Multimeren

Durch den fusionierten His-*Tag* wurde exprimiertes His-LT_{NT} mittels NiNTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt: Nach Expression wurden die Bakterien enzymatisch und mechanisch aufgeschlossen und das exprimierte His-LT_{NT} affinitätschromatographisch im ÄKTAPurifier System oder im *Batch*-Verfahren von den bakteriellen Proteinen isoliert. Für weitere Aufreinigungsschritte wurde die Gelfiltration mit der Superdex 200 10/300 GL Säule durchgeführt Für analytische Gelfiltrationen wurde das SMART-System mit der Superdex 200 PC 3.2/30 Säule eingesetzt. Die Kalibrierungen der beiden Säulen mit dem *Gel Filtration Standard* und den entsprechenden Retentionsvolumina sind im Anhang (Abbildung 55 und Abbildung 56) zu finden.

Abbildung 17 und Abbildung 18 zeigen exemplarisch die NiNTA-*Batch*-Aufreinigung und Gelfiltration eines LT_{NT}-Konstrukts. Die NiNTA-Reinigung wurde in HEPES-Puffer mit 50 mM HEPES (pH 8,0) und 300 mM NaCl durchgeführt und für die Gelfiltration wurde 50 mM Tris (pH 8,0) und 150 mM NaCl, 2 mM EDTA verwendet. LT_{NT} konnte erfolgreich aus den Bakterien isoliert werden, jedoch gab es nach beiden Reinigungsschritten Verunreinigungen durch andere Proteine, die nicht von LT_{NT} getrennt werden konnten. Hervorzuheben sind hierbei die Banden bei 60 und 70 kDa, die nicht durch GF entfernt wurden.

Auffällig bei der GF ist, dass LT_{NT} in zwei Maxima von der Superdex-Säule eluiert wird. Das späte Maximum bei einem Retentionsvolumen (RV) von 1,47 ml entspricht einer Masse von ca. 50 kDa. Das frühe Maximum bei einem Retentionsvolumen (RV) von 0,92 spricht dafür, dass das eluierte Protein eine Masse größer als 670 kDa hat. Die Fraktionen der GF wurden in einer SDS-PAGE untersucht und das prominenteste Protein beider Maxima und der dazwischen liegenden Fraktionen ist jeweils His-LT_{NT}. Bei der GF werden Proteine anhand ihres sphäroidischen Durchmessers eluiert. Da es sich anhand der SDS-PAGE um das gleiche Protein in allen Fraktionen handelt, ist davon auszugehen, dass His-LT_{NT} in

unterschiedlichen Konformationen von der Säule eluiert wird, d.h. nicht nur als Monomer bei ca. 1,47 ml, sondern auch als Multimere unterschiedlicher Größen.

Von 10xHis-LT_{1-244} wurde der sphäroidische Radius nach NiNTA-Aufreinigung mithilfe einer weiteren Methode, der *Dynamic light scattering* (DLS)-Analyse, bestimmt (Abbildung 19). Mit dieser Methode werden die sphäroidischen Radien von Partikeln in Lösung bestimmt. Damit wird unterschieden, ob die Partikel monodispers oder polydispers vorliegen, d.h. als Monomere oder als Aggregate. Bei den hier gezeigten Messungen wurden Radien von 20-100 nm gemessen, was eindeutig auf eine polydisperse Lösung schließen lässt. Bei einer monodispersen Proteinlösung, würde man einen Radius im unteren bis mittleren einstelligen nm-Bereich erwarten.

Die Elution von His-LT_{NT} in verschiedenen Konformationen, wie auch die Verunreinigungen durch andere Proteine traten wiederholt in den Experimenten auf. Für Kristallisationsscreens ist es jedoch essentiell, dass das zu kristallisierende Protein als Monomer und von hoher Reinheit ist. Für die Optimierung der Aufreinigung, sowie der Ausbeute an Monomeren wurden Optimierungsscreens mit dem Thermofluor Assay durchgeführt.

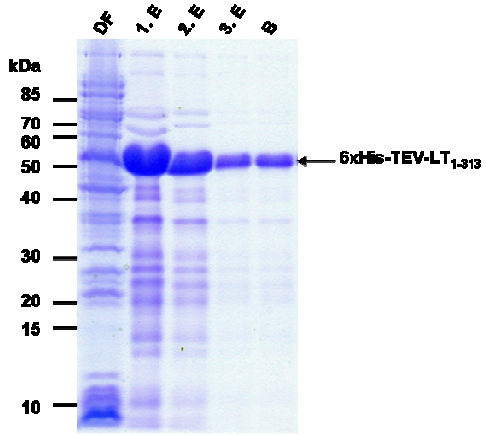


Abbildung 17 NiNTA-*Batch*-Aufreinigung von 6xHis-TEV-LT_{1-313}. Die Bakterien wurde mit 50 mM HEPES, pH 8,0, 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol aufgeschlossen. Für die Elution wurde 50 mM HEPES, pH 8,0, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol verwendet. DF – Durchfluss, E – Eluat, B – Beads

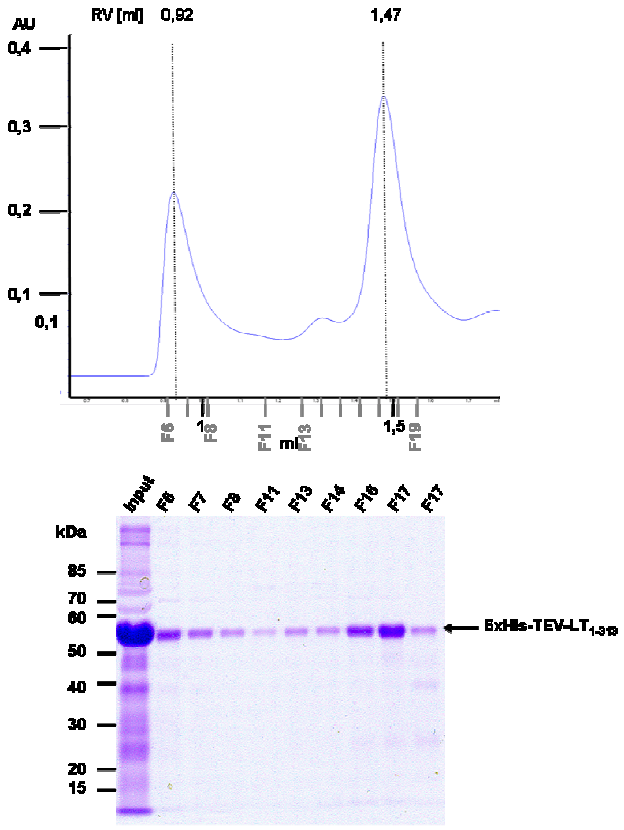


Abbildung 18 Chromatogramm und SDS-Gel einer Gelfiltrationvon 6xHis-TEV-LT_{1-313} mit der Superdex 200 PC 3.2/30 Säule. Das Protein eluiert in zwei Maxima bei 0,92 ml und bei 1,47 ml. Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA verwendet.

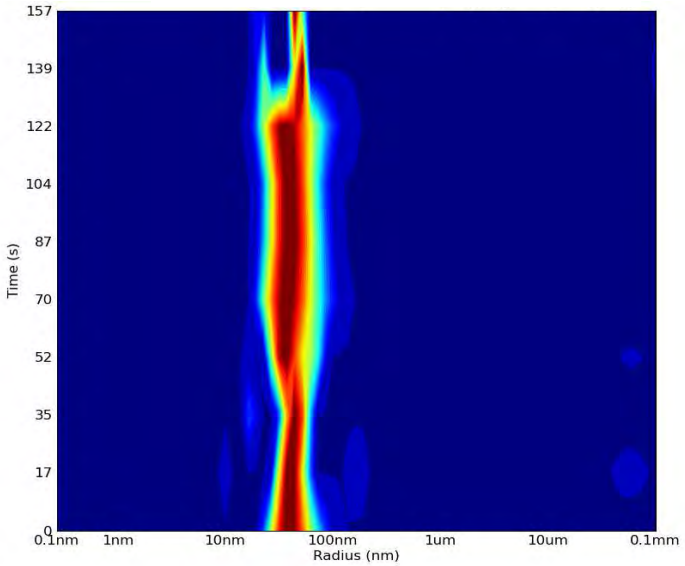


Abbildung 19 DLS-Hitzekarte von 10xHis-LT_{1-244} in 50 mM Tris, pH 8,0, 100 mM NaCl. Dargestellt ist die Radiusverteilung der Proteine, gemessen über einen Zeitraum von 157s. Die Farben der Hitzekarte deuten auf die Partikelkonzentration in einem bestimmen nm-Bereich. Blau zeigt die Bereiche ohne Protein, Rot die Bereiche mit der maximalen Proteinkonzentration.

Hohe Salzkonzentrationen und Glycerin stabilisieren LT_{NT} im Thermofluor Assay

Der Thermofluorassay (TFA) wurde eingesetzt, um die Thermostabilität von MCPyV LT_{NT} unter verschiedenen Pufferbedingungen zu analysieren und damit Pufferbedingungen zu bestimmen, die zu einer erhöhten Stabilität von aufgereinigtem, monomerem LT_{NT} führen. Eine erhöhte Stabilität dient sowohl der effizienteren LT_{NT}-Aufreinigung, als auch der Kristallisation.

Die Stabilität wird anhand der Schmelztemperatur T_m ermittelt. Der T_m-Wert ist die Temperatur, bei der die Hälfte der Proteine entfaltet bzw. denaturiert ist und wird anhand des Kurvenverlaufs bei ansteigender Temperatur ermittelt (Kapitel 4.7.17, Methoden). Für Kristallisationsexperimente wird ein T_m-Wert von über 45°C empfohlen [83].

Der Thermofluor Screen 1 wurde mit Stephane Boivin von der SPC Facility am EMBL Hamburg durchgeführt. Hierbei wurden 96 verschiedene Bedingungen getestet, wie pH-Werte, verschiedene Puffer, Puffer- wie auch Salzkonzentrationen (siehe Anhang, Abbildung 57). Die Proteine 6xHis-TEV-LT_{1-244} und 6xHis-TEV-LT_{1-313} wurden für den TFA in 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA umgepuffert. 66 µM möglichst reines Protein wurden

für den Assay eingesetzt. Bei den meisten Bedingungen im TFA gab es keine auswertbaren Ergebnisse, da der Kurvenverlauf eine Berechnung des T_m-Wertes nicht zuließ.

Auswertbare Ergebnisse gab es für beide LT-Konstrukte im TFA nur bei verschiedenen Salzkonzentrationen in den Puffern 50 mM Tris, pH 8 und 50 mM HEPES, pH 7,5. Hier konnte erst bei höheren Konzentrationen, d.h. ab 500 mM NaCl, einen T_m-Wert bestimmt werden. Exemplarisch sind hier die Ergebnisse für 6xHis-TEV-LT_{1-244} präsentiert (Abbildung 20, Abbildung 21). Die Kurvenverläufe für 6xHis-TEV-LT_{1-313} sind im Anhang (Abbildung 59 und Abbildung 60) aufgeführt.

Bei Salzkonzentrationen zwischen 500 mM und 1000 mM NaCl wurden für 6xHis-TEV-LT_{1-244} T_m-Werte zwischen 30°C und 36°C im Tris-Puffer und zwischen 28°C und 30°C im HEPES-Puffer bestimmt. (Abbildung 20, Abbildung 21). Für Salzkonzentrationen unter 500 mM konnte anhand der Kurvenverläufe bei keinem der beiden Pufferssyteme ein T_m-Wert ermittelt werden.

Für 6xHis-TEV-LT_{1-313} hingegen konnten T_m-Werte zwischen 44°C und 52°C für alle Salzkonzentrationen im Tris- sowie im HEPES-Puffer detektiert werden (siehe Anhang, Abbildung 60). Die höchsten T_m-Werte wurden mit NaCl-Konzentrationen von 750 bzw. 1000 mM erzielt. Die Stabilität von 6xHis-TEV-LT_{1-313} scheint unter diesen Bedingungen besser zu sein, als die von 6xHis-TEV-LT_{1-244}. Jedoch ist auch hier der Kurvenverlauf atypisch, da bei Temperaturen unter 30°C die Fluoreszenz teilweise erst abnimmt, bevor sie wieder ansteigt.

Auffällig bei allen Kurven ist der Anstieg der Fluoreszenz bereits bei niedrigen Temperaturen, d.h. die Proteine entfalten sich schon bei niedriger Temperatur (<15°C) und verlieren dann mit zunehmender Temperatur an Stabilität, so dass ein Teil der Proteine bereits bei Raumtemperatur entfaltet ist.

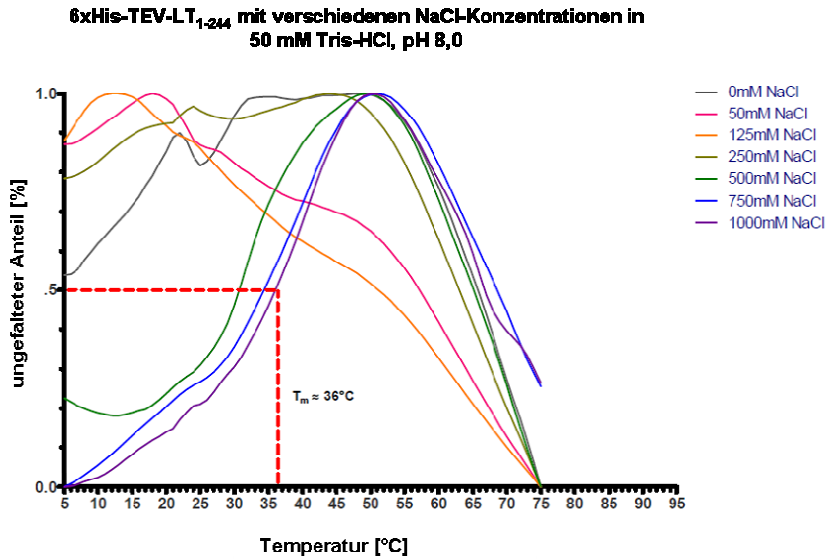


Abbildung 20 TFA-Schmelzkurven von 6xHis-TEV-LT_{1-244} in 50 mM Tris, pH 8,0 mit verschiedenen Salzkonzentrationen von 0 mM bis 1000 mM NaCl.

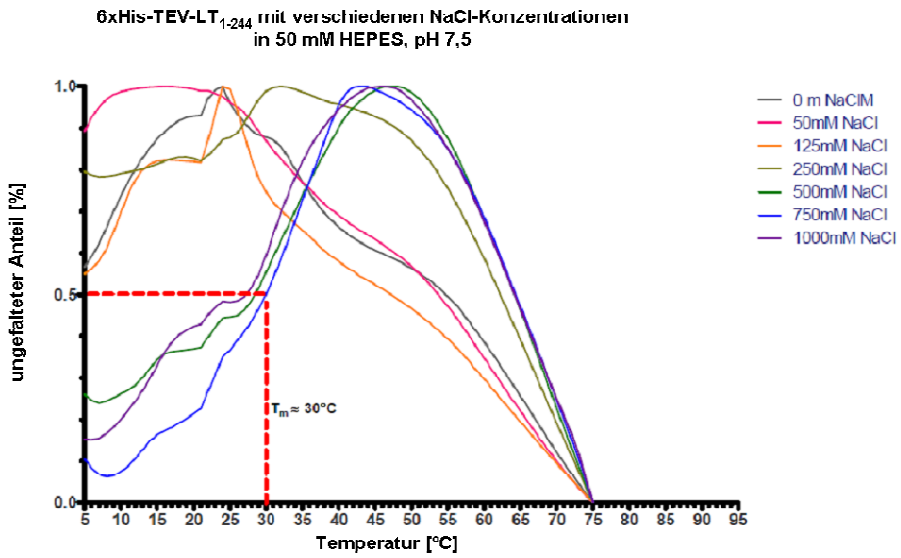


Abbildung 21 TFA-Schmelzkurven von 6xHis-TEV-LT_{1-244} in 50 mM HEPES, pH 7,5 mit verschiedenen Salzkonzentrationen von 0 mM bis 1000 mM NaCl.

In den oben genannten Experimenten wurde mit gereinigtem His-LT_{NT} gearbeitet, in dem sich sowohl Mono- wie auch Multimere befanden. Um zu untersuchen, ob sich Monomere im TFA anders verhalten als die Mischung aus Mono- und Multimeren, wurde 6xHis-TEV-LT_{1-244} nach NiNTA-Aufreinigung in der Gelfiltration in Mono- und Multimere aufgetrennt. Die Monomerfraktionen wurden vereint und im TFA Screen 1 untersucht. Auch hier wurde beobachtet, dass Salzkonzentrationen über 500 mM NaCl das Protein stabilisieren (siehe Anhang, Abbildung 61und Abbildung 62). Allerdings war die Fluoreszenz bereits bei 5°C so hoch und der Kurvenanstieg zu kurz, als dass ein T_m-Wert berechnet werden konnte.

Die TFA-Ergebnisse zusammengefasst kann gesagt werden, dass LT_{NT} generell bei Salzkonzentrationen über 500 mM stabiler ist und teilweise T_m-Werte über 45°C erreicht werden. Allerdings ist bei allen Assays die Fluoreszenz bei Temperaturen unter 15°C bereits angestiegen, d.h. die Proteine haben sich teilweise entfaltet, was zu einer Einschränkung der Stabilität der gesamten Proteinlösung bei Raumtemperatur führt. Mit 6xHis-TEV-LT_{1-244} wurden auch der Thermofluor Screen 2 (siehe Anhang, Abbildung 58) durchgeführt. In diesem Screen wurde u.a. der Einfluss von Polyolen auf die Stabilität des Proteins getestet und Glycerinkonzentrationen zwischen 5-20% scheinen sich positiv auf die Stabilität auszuwirken (siehe Anhang, Abbildung 63). Deswegen wurde bei Folgeexperimenten die Aufreinigung ausschließlich im Kühlraum bzw. auf Eis durchgeführt und Puffer mit 50 mM Tris, pH 8, 750 mM NaCl und 5% Glycerin verwendet, um größtmögliche Stabilität während der Aufreinigung zu gewährleisten.

Optimierte Aufreinigungsbedingungen führen weiterhin zu Multimeren sowie Verunreinigungen, die nicht entfernt werden

Mit den aus dem Thermofluor Assay gewonnenen Erkenntnissen zur Stabilität der His-LT_{NT}-Konstrukte wurde die Aufreinigung der Proteine fortgeführt, d.h. alle Puffer enthielten, soweit nicht anders erwähnt, 50 mM Tris, pH 8, 750 mM NaCl und 5% Glycerin. Eine höhere Glycerinkonzentration konnte aufgrund der daraus resultierenden erhöhten Viskosität nicht eingesetzt werden.

Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen die Ergebnisse einer Aufreinigung von His-LT_{NT} mit dem ÄKTAPurifier System mit anschließender Gelfiltration. Dargestellt ist der typische Verlauf der automatisierten NiNTA-Affinitätschromatographie mit den Phasen Beladen der HisTrapFF-Säule, dem ATP-Waschschritt und der Elution mittels des Imidazolgradientens. Der ATP-Waschschritt wurde eingeführt, um mögliche Chaperone, die während der Aufreinigung an His-LT_{NT} binden, durch ATP von His-LT_{NT} zu lösen und eine höhere Reinheit zu erlangen. Abbildung 22C zeigt, dass in den frühen Fraktionen der Elution weiterhin viele Verunreinigungen vorhanden sind. In den späten Fraktionen der Elution reduzieren sich die Verunreinigungen v.a. im Bereich über 50 kDa. Jedoch wurde weiterhin ein Großteil von His-LT_{NT} mit anderen Proteinen eluiert. Um zu überprüfen, ob sich His-LT_{NT} weiter aufreinigen

lässt und in welcher Form das Protein eluiert wird, wurde eine Gelfiltration durchgeführt (Abbildung 23). Hier ist zu erkennen, dass His-LT_{NT} weiterhin als Monomer und Multimer eluiert wurde und sich die Verunreinigungen nur geringfügig entfernen ließen. Eine Aufreinigung im *Batch*-Verfahren hat zu einer vergleichbaren Reinheit geführt.

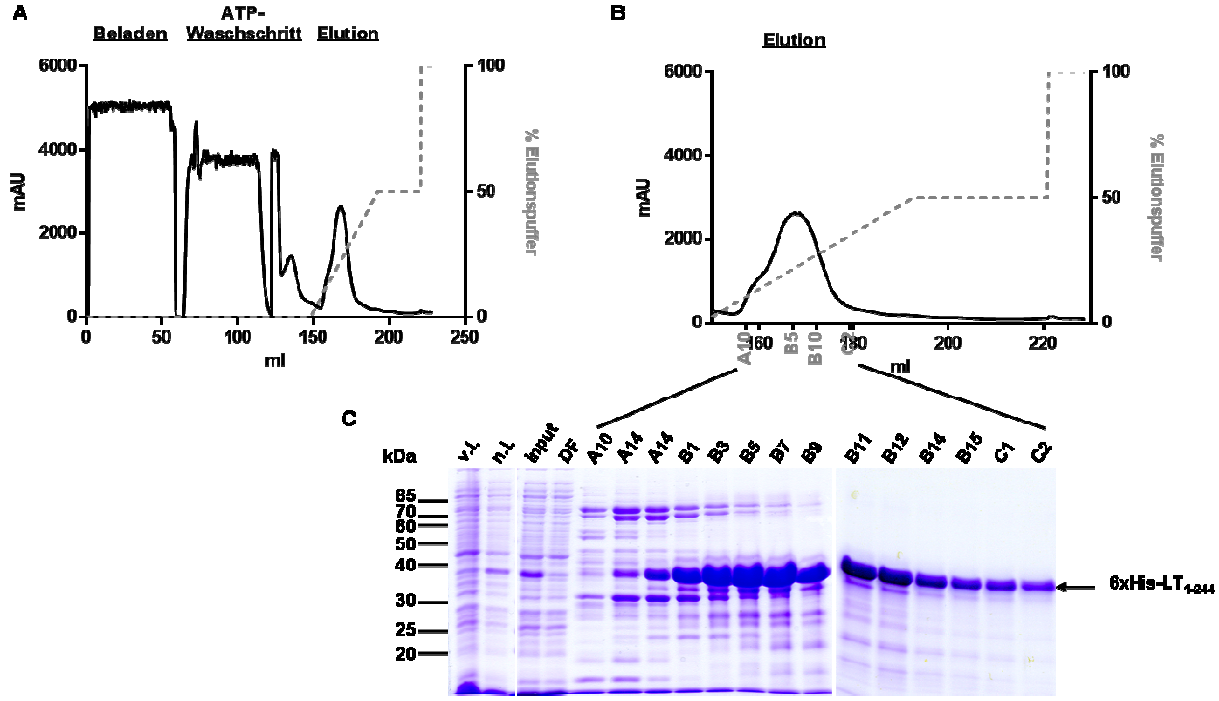


Abbildung 22 6xHis-LT_{1-244}-Aufreinigung im ÄKTAPurifier System. (A) Phasen der Aufreinigung: Beladen der HisTrapFF-Säule, Waschschritt mit ATP, gefolgt von der Elution mit ansteigender Konzentration des Elutionspuffers, (B) Elutionsphase, 6xHis-LT_{1-244} eluiert bei ~15-30% Elutionspuffer, (C) im SDS-Gel aufgetrennte, eluierte Fraktionen, Coomassie-gefärbt.

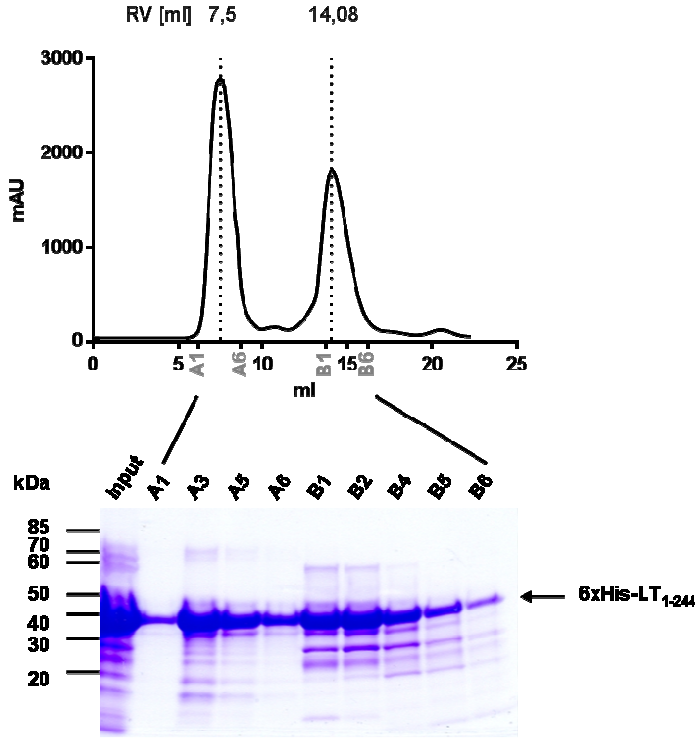


Abbildung 23 Chromatogramm und SDS-Gel einer Gelfitration von NiNTA-gereinigtem 6xHis-LT_{1-244} mit der Supderdex 200 10/300 GL Säule. 6xHis-LT_{1-244} wurde vor der Gelfiltration im ÄKTAPurifier System gereinigt und eluiert mit zwei Maxima bei 7,5 und 14,08 ml.

Als nächstes wurde die Ionenaustauschchromatographie (IEX-Chromatographie) als Aufreinigungsmethode eingesetzt. Hierfür wurde mit NiNTA-Affinitätschromatographie aufgereinigtes 6xHis-TEV-LT_{1-313} in salzarmen Puffer dialysiert (20 mM Tris, pH 8,0, 50 mM NaCl). Für die IEX-Chromatographie wurde als Elutionspuffer 20 mM Tris, pH 8,0, 1 M NaCl und die UNO™ S6 Säule eingesetzt. Die Salzkonzentration wurde graduell erhöht und 6xHis-TEV-LT_{1-313} wurde von Fraktion A12 bis Fraktion B10 eluiert, d.h. bei Salzkonzentrationen zwischen ~450 mM NaCl und 1 M NaCl. Auch hier wurden die Fraktionen in einer SDS-PAGE analysiert (Abbildung 24). Auf dem Gel ist zu sehen, dass auch mit der IEX-Chromatographie das 6xHis-TEV-LT_{1-313} nicht sauberer geworden ist. Es gibt Fraktionen mit niedriger Salzkonzentration, die sehr rein sind (Fraktionen A12-A14) jedoch enthält der Großteil der Fraktionen sowohl 6xHis-TEV-LT_{1-313} wie auch andere Proteine (Fraktionen A15-B10).

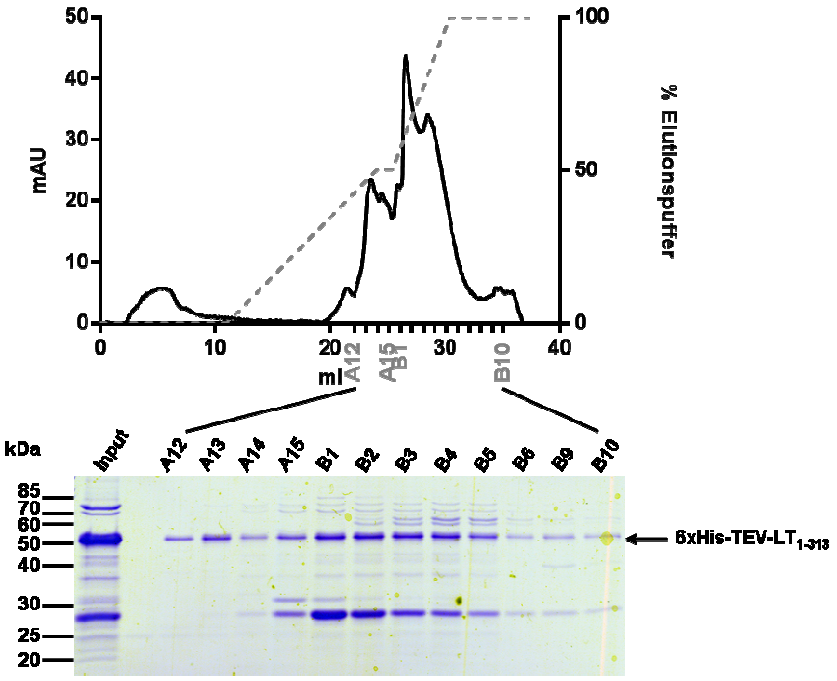


Abbildung 24 Chromatogramm und das entsprechende SDS-Gel einer IEX-Chromatographie zur Aufreinigung von 6xHis-TEV-LT_{1-313}. Es wurde die Saule UNO™ S6 eingesetzt und das Protein mit einem Salzgradienten (grau-gestrichelt) von 50 mM bis 1 M NaCl eluiert. Die Proteine einzelner Fraktionen wurden im SDS-Gel aufgetrennt.

Trotz der Optimierung der Aufreinigungsbedingungen durch TFA und Anwendung verschiedener chromatographischer Methoden konnte kein signifikanter Erfolg bei der Reinheit von His-LT_{NT} erzielt werden. Deswegen wurden prominente Proteinbanden, die in einem SDS-Gel nicht His-LT_{NT} zuzuordnen waren, massenspektrometrisch untersucht. Es gab bei fast allen Aufreinigungen zwei Proteinbanden bei 60 und 70k Da (z.B. in Abbildung 22C, Fraktionen A10-B9) die nicht His-LT_{NT} zugeordnet werden konnten. In der massenspektrometrischen Analyse wurden in der 60 kDa Bande Glucosamine-Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferase und in der 70 kDa Bande das bakterielle Chaperon DnaK von *E. coli* detektiert. Weitere Proteinbanden mit den Größen von ungefähr 20, 28, 32, 38 kDa enthielten vorwiegend LT-Sequenzen. Dies wurde in der Western Blot Analyse einer Fraktion aus einer His-LT_{NT}-Gelfiltration bestätigt (Abbildung 25). Es waren mehrere Banden zu erkennen, die mit einem LT spezifischen Antikörper markiert wurden. Im Kontrolllysat wurden keine Banden detektiert. Folglich handelt es sich bei einem Teil der Verunreinigungen um LT-Abbauprodukte.

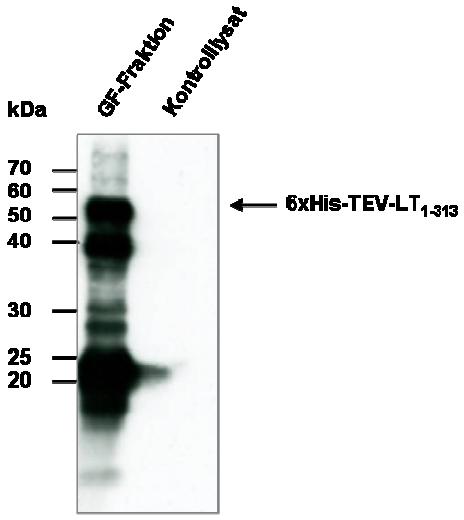


Abbildung 25 Western Blot Analyse einer GF-Fraktion mit 6xHis-TEV-LT und einem *E. coli*-Kontrolllysat ohne His-$LT_{NT.}$ Gefärbt wurde mit dem anti-MCPyV LT-Antikörper CM2B4 (1:1000) und einem HRP-anti-Maus IgG (1:3000).

LT_{NT} Monomere und Multimere befinden sich im konzentrationsabhängigen Gleichgewicht

Um den Anteil an Monomeren zu erhöhen und damit die Wahrscheinlich der Kristallisation von His-LT_{NT}, wurde getestet, ob die Bildung von Multimeren konzentrationsabhängig ist und damit ein konzentrationsabhängiges Gleichgewicht zwischen Monomeren und Multimeren in Lösung besteht.

Hierfür wurde NiNTA-aufgereinigtes 6xHis-LT_{1-244} schrittweise von 1 mg/ml auf 3 mg/ml und 9 mg/ml konzentriert. Alle Proteinlösungen wurden über Nacht bei 4°C stehen gelassen und am nächsten Tag im SMART-System analysiert (Abbildung 26). In allen Analysen befanden sich zwei Maxima mit Monomeren (RV ~,61 ml) wie auch Multimeren (RV ~0,9 ml). Bei 1 mg/ml und 3 mg/ml war der Anteil der Monomere geringfügig höher, bei 9 mg/ml hingegegen ist das Verhältnis ausgewogen und der Anteil an Multimeren hat sich erhöht (Abbildung 26A-C). Demnach verringert sich die Konzentration von Monomeren bzw. steigt die Konzentration von Multimeren mit der Gesamtproteinkonzentration in Lösung.

Weiterhin wurde untersucht, ob sich Monomere konzentrieren lassen und anschließend noch als Monomere vorliegen. Hierfür wurden Monomerfraktionen vereint und mit dem SMART-System oder im DLS analysiert. In Abbildung 26D ist das GF-Chromatogramm von 6xHis-LT_{1-244} zu sehen, nachdem GF-Fraktionen, die Monomere enthielten vereint und auf 3 mg/ml konzentriert wurden. Der Großteil der Proteine wurde als Monomer eluiert, allerdings kam ein Teil vor einem Retentionsvolumen von 1,5 ml von der Säule und damit als Mulitmere.

Ähnliche Daten wurden im DLS erhoben (Abbildung 27). Hier wurden jeweils 10xHis-LT_{1-244} Monomer- bzw. Multimerfraktionen aus Gelfiltrationen vereint und auf 1,8 bzw. 2 mg/ml konzentriert und anschließend im DLS analysiert. Im DLS wurde bei den vereinten Monomeren Partikelradien von 6 und 40 nm gemessen und bei den Multimeren Partikelradien um 35 nm. Ein Radius von 6 nm könnte auf eine monodisperse Verteilung deuten, d.h. das Protein würde als Monomer vorliegen. Die Radien um 35 und 40 nm lassen eindeutig auf eine polydisperse Verteilung und damit auf Multimere schließen. Wie hoch der Anteil von Mono- bzw. Multimeren ist, kann nicht bestimmt werden, da mit dieser DLS-Analyse keine quantitativen Aussagen getroffen werden können.

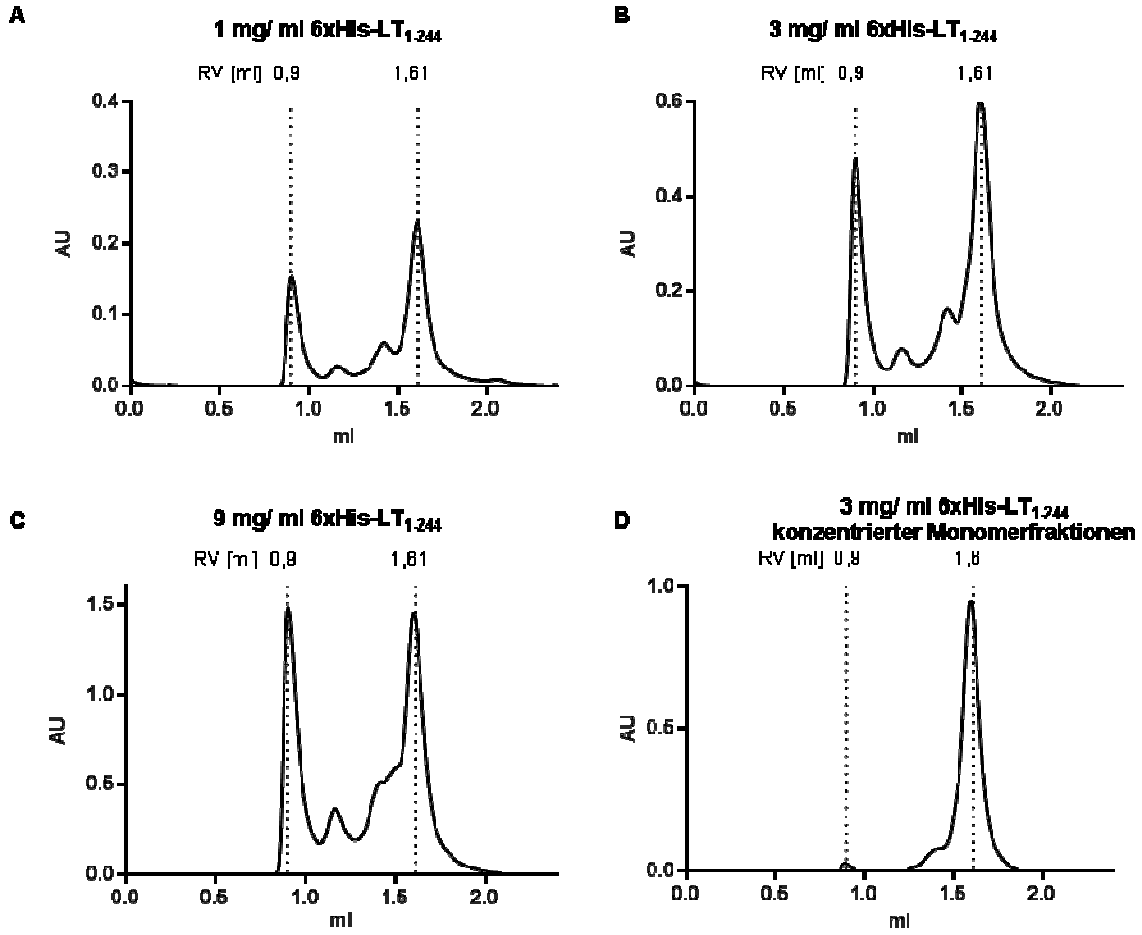


Abbildung 26 Analytische Gelfiltration von verschiedenen 6xHis-LT_{1-244}-Konzentrationen. 6xHis-LT_{1-244} eluiert als Mono- und Mulitmer (A-C). Aufkonzentrierte Monomere eluieren bei einer Konzentration von 3 mg/ml hauptsächlich als Monomere, mit einem geringen Anteil an Multimeren.

Aus den oben beschriebenen Versuchen lässt sich schließen, dass je höher die Konzentration an His-LT_{NT}-Proteinen ist, desto größer wird der Anteil an Multimeren. Außerdem lassen sich Monomere nicht beliebig konzentrieren und verbleiben in dieser

Konformation, sondern der Anteil an Multimeren nimmt zu. Daraus wurde gefolgert, dass es ein konzentrationsabhängiges Verhältnis von Mono- und Multimeren in Lösung gibt.

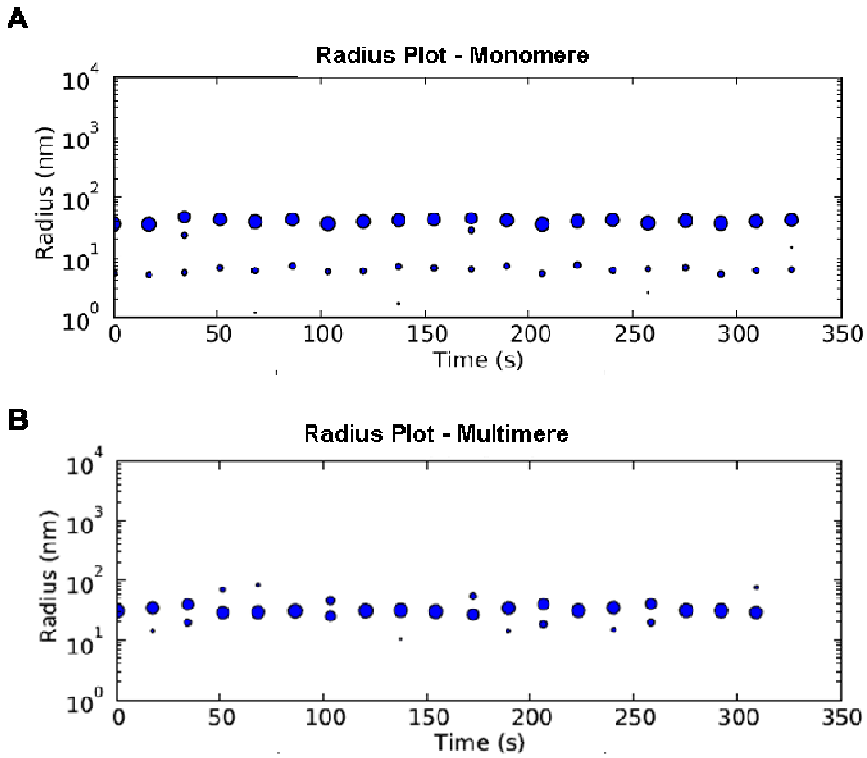


Abbildung 27 DLS als Radius Plot. Aufgereinigte K1 Mono- und Multimerfraktionen wurden vereint und konzentriert. Die Konzentration der Monomerfraktionen war ~1,8 mg/ml und die der Multimerfranktionen ~2 mg/ml. Keine der beiden Proteinlösungen war monodispers. Die Proteine waren in 50 mM Tris, 750 mM NaCl, pH 8,0.

5.2.3 Aufreinigung des SV40 LT N-Terminus

Die Expression und anschließende Aufreinigung von 6xHis-SV40 LT_{1-117} wurde erfolgreich durchgeführt. 6xHis-SV40 LT_{1-117} konnte mit der NiNTA-Affinitätschromatographie im *Batch*-Verfahren vom bakteriellen Lysat getrennt (Abbildung 28 links) und in der anschließenden Gelfiltration konnte ein Teil der verbliebenen bakteriellen Proteine entfernt werden. Wie auch bei MCPyV His-LT_{NT} gab es Verunreinigungen, die nicht komplett entfernt werden konnten (Abbildung 28 rechts). Für die Verwendung von 6xHis-SV40 LT_{1-117} für die Bestimmung der Dissoziationskonstante (Kapitel 5.3) wurde das Protein gegen 50 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl dialysiert. Dabei ist ein Teil der Proteine, v.a. bakterielle Proteine präzipitiert und 6xHis-SV40 LT_{1-117} hatte eine Reinheit erlangt, die für die Durchführung der *Microscale Thermophorese* (Kapitel 5.3) ausreichend war (Abbildung 29). Für das verwendete 6xHis-SV40 LT_{1-117}-Konstrukt wurde ein theoretisches Molekulargewicht von ~18 kDa berechnet.

Dieses Molekulargewicht wurde auch in den SDS-Gelen und GF-Analysen beobachtet. Im Gegensatz zu MCPyV LT_{NT} wurde das Protein als Monomer von der GF-Säule eluiert.

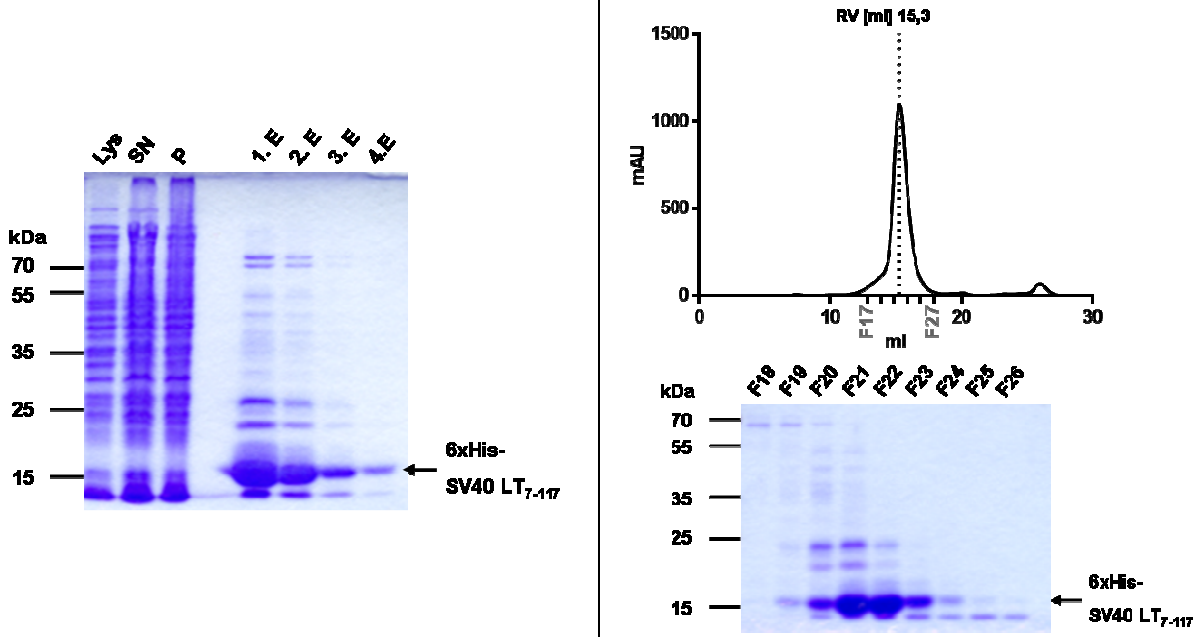


Abbildung 28 *Batch*-Aufreinigung von SV40 LT_{7-117} mit NiNTA-Agarose (links) und anschließender GF und Elution bei 15,3 ml (rechts). Die gewonnenen GF-Fraktionen, die Protein enthielten wurden in der SDS-PAGE analysiert.

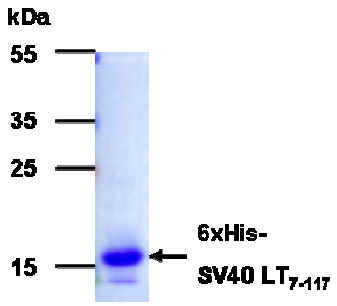


Abbildung 29 Aufgereinigtes SV40 LT_{7-117} nach GF und anschließender Dialyse für die *Microscale Thermophorese*.

5.2.4 Aufreinigung der pRb *pocket* Domäne

Für die Interaktionsstudien der MCVPyV und SV40 LT N-Termini mit der *Pocket* Domäne des Retinoblastom-Proteins (pRb_{PD}) wurden zwei pRb_{PD}-Konstrukte verwendet. Beide

Konstrukte haben einen N-terminalen GST-*tag* und können daher affinitätschromatographisch mit Glutathion Sepharose aufgereinigt werden. Das Konstrukt GST-pRb$_{382-771}$ enthält die gesamte *pocket* Domäne mit der Box A und Box B, inklusive des Linkers (Abbildung 7, Einleitung). GST-pRb$_{382-771}$ wurde für die *Microscale Thermophorese* (Kapitel 5.3) und Komplexbildungsexperimente mit MCPyV LT$_{NT}$ (Kapitel 5.4.5) verwendet. Die Aufreinigung von GST-pRb$_{382-771}$ ist in diesem Kapitel aufgeführt. Das andere Konstrukt GST-pRb$_{PD}$ enthält nur die Box A und die Box B der *pocket* Domäne (aa380-787Δ582-642), der Linker ist in diese Konstrukt deletiert. GST-pRB$_{PD}$ wurde nur für die Ko-Aufreinigung mit 6xHis-LT$_{1-244}$ verwendet und dieser Versuch ist in Kapitel 4.7.4 beschrieben.

GST-pRb$_{382-771}$ wurde im Batch-Verfahren mit Glutathion Sepharose vom bakteriellen Lysat isoliert und mit 30 mM reduziertem Glutathion von der Matrix eluiert (Kapitel 4.7.3, Methoden). Abbildung 30 stellt die typischen Ergebnisse einer solchen Aufreinigung dar. Ein Teil des gebundenen Proteins wurde trotz zweifacher Elution nicht von der Glutathion Sepharose gewaschen. Wahrscheinlich war ein Teil des Proteins während der Wasch- und Elutionsschritte an der Sepharose präzipitiert. Im SDS-Gel ist zu erkennen, dass neben GST-pRb$_{382-771}$ auch andere Proteine eluiert wurden.

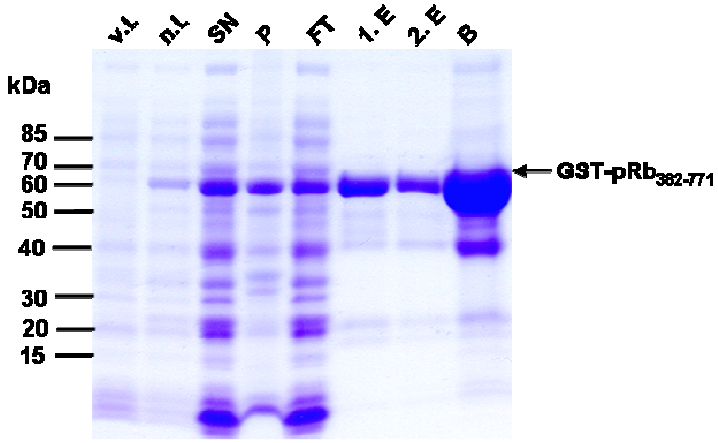


Abbildung 30 Aufreinigung von GST-pRb$_{382-771}$ mit Glutathion Sepharose. GST-pRb$_{382-771}$ wurde zweimal (1.E und 2.E) mit 30 mM reduziertem Glutathion eluiert. Ein Teil des Proteins konnte nicht von der Sepharose (B) eluiert werden. SN – Überstand, P – Pellet, FT – Durchfluss, E – Eluat, B – Sepharose-Beads

In Abbildung 31 (linker Teil) ist eine Aufreinigung dargestellt bei der, das gebundene GST-pRb$_{382-771}$ nicht eluiert, sondern nach Binden des Fusionsproteins an die Sepharose GST und pRb$_{382-771}$ durch den Verdau mit Thrombin voneinander getrennt wurden. Dadurch bindet GST weiter an die Sepharose und pRb$_{382-771}$ kann eluiert werden. Auch bei diesem Verfahren, wurden unspezifische Proteine im SDS-Gel detektiert. Für die weitere Aufreinigung von pRb$_{382-771}$ wurde die IEX-Chromatographie (Abbildung 31, rechter Teil)

angewandt. Hierfür wurde ein Kationenaustausch vorgenommen und GST-$pRb_{382-771}$ wurde gegen den salzlosen Puffer 50 mM $NaPO_4$, pH 7,3 dialysiert und anschließend auf die Uno™ S6 Säule geladen. Die Elution fand gegen einen ansteigenden Salzgradienten statt. GST-$pRb_{382-771}$ wurde bei einer Salzkonzentration von ~250 mM NaCl von der Säule eluiert. Die IEX-Chromatographie hat zu einer Verbesserung der Reinheit in den meisten Fraktionen in denen $pRb_{382-771}$ vorkommt geführt (Abbildung 31, rechter Teil). Das saubere $pRb_{382-771}$ wurde im Anschluss für die MST-Analyse und Komplexbildungsexperimente benutzt (Kapitel 5.3 und 5.4.5).

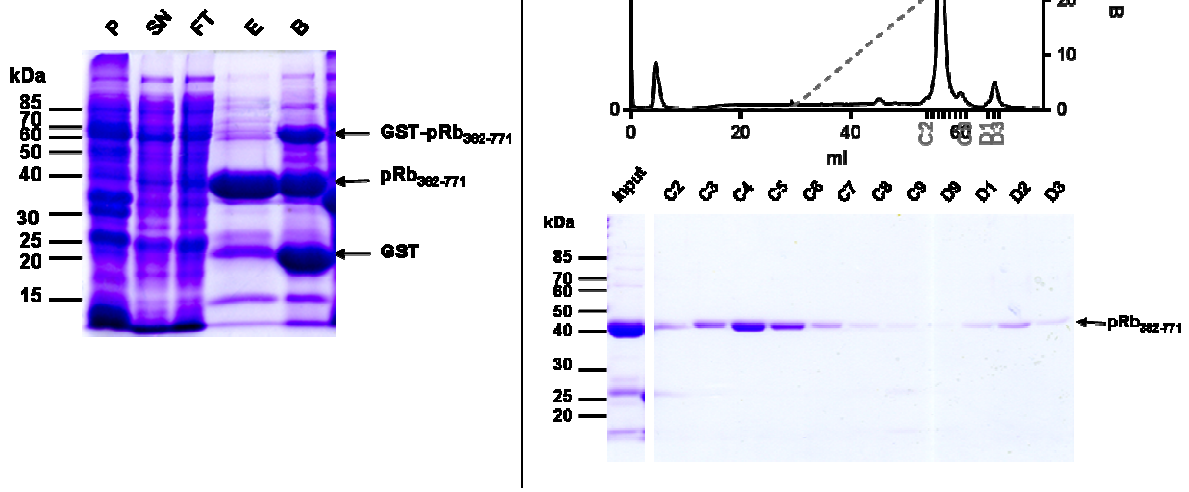


Abbildung 31 Aufreinigung von GST-$pRb_{382-771}$ mit Glutathion Sepharose und IEX-Chromatographie. GST-$pRb_{382-771}$ wurde an die Sepharose gebunden und vom bakteriellen Lysat isoliert. Anschließend wurde $pRb_{382-771}$ mit einem Thrombinverdau von GST getrennt und eluiert (linke Abbildung). Das eluierte $pRb_{382-771}$ wurde mit der IEX-Chromatographie weiter aufgereinigt (rechte Abbildung). SN – Überstand, P – Pellet, FT – Durchfluss, E – Eluat, B – Sepharose-Beads

5.3 Bestimmung der Dissoziationskonstante der MCPyV und SV40 LT N-Termini mit $pRb_{382-771}$

Shuda und Kollegen haben bereits in Ko-Präzipitationsexperimenten mit Zelllysaten gezeigt, dass sowohl MCPyV LT_{NT} wie auch das Volllängen MCPyV LT und das SV40 LT mit dem Rb-Protein interagieren [38]. Auch in unserem Labor wurden diese Interaktionen in Ko-Präzipitationsexperimenten nachgewiesen [21]. Allerdings ist die Affinität dieser Interaktion bisher nicht charakterisiert worden. Um zu überprüfen, ob es sich um eine direkte Interaktion zwischen dem MCPyV LT_{NT} und pRb handelt und wie hoch dessen Affinität ist, wurde die Microscale Thermophorese (MST) eingesetzt. Die MST ist eine neue Technik zur quantitativen Analyse von Proteininteraktionen in Lösung (Kapitel 4.7.12, Methoden). Zum Vergleich wurde auch die Affinität zwischen SV40 LT_{NT} und $pRb_{382-771}$ bestimmt.

Für die Messungen wurden die gereinigten Proteine $pRb_{382-771,}$ MCPyV 6xHis-TEV-LT_{1-244} und SV40 6xHis-LT_{1-117} eingesetzt. $pRb_{382-771}$ wurde für die Messung mit Alexa647 markiert und die titrierten LT-Proteine wurden 1:1 mit $pRb_{382-771}$ gemischt. Die MST-Messungen wurden in Lösung mit zwei verschiedenen Salzkonzentrationen, 150 und 250 mM, und in dreifacher Bestimmung durchgeführt.

In Abbildung 32 sind die Affinitätskurven und Dissoziationskonstanten für eine von drei durchgeführten Messungen mit 150 mM NaCl dargestellt. Die Interaktion von MCPyV 6xHis-TEV-LT_{1-244}/$Rb_{382-771}$ ist wesentlich intensiver mit einer K_D von 46,7 nM als die Intensität zwischen SV40 6xHis-LT_{1-117}/$pRb_{382-771}$ mit 1092 nM.

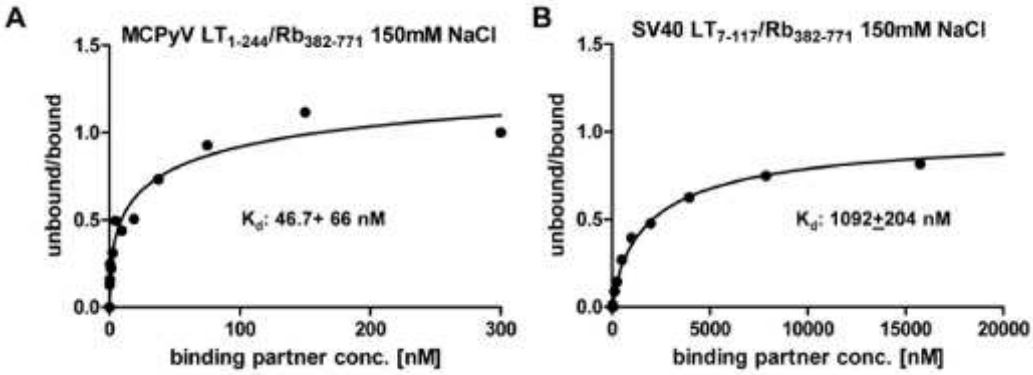


Abbildung 32 Affinitätskurven zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D zwischen $pRb_{382-771}$ und MCPyV 6xHis-TEV-LT_{1-244} (A) bzw. SV40 6xHis-LT_{1-117} (B) in 150 mM NaCl.

Die gemittelten K_D-Werte und ihre Standardabeichungen der jeweils drei MST-Messungen mit den jeweiligen Salzkonzentrationen sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Bei einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl wurde eine durchschnittliche Affinität von 51,3 nM zwischen MCPyV 6xHis-TEV-LT_{1-244} und $pRb_{382-771}$ sowie von 1950 nM zwischen SV40 6xHis-LT_{1-117} und $pRb_{382-771}$ gemessen. Bei einer Salzkonzentration von 250 mM NaCl lag der K_D-Wert bei 121 nM zwischen MCPyV 6xHis-TEV-LT_{1-244}/$Rb_{382-771}$. Für die Interaktion SV40 6xHis-LT_{1-117}/$pRb_{382-771}$ konnte bei dieser Salzkonzentration keine Dissoziationskonstante ermittelt werden.

Anhand der hier dargestellten Werte ist die Affinität bei 150 mM NaCl zwischen MCPyV 6xHis-TEV-LT_{1-244}/$pRb_{382-771}$ um das 40fache stärker als die Affinität zwischen SV40 6xHis-LT_{1-117}/$pRb_{382-771}$.

Tabelle 16 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D zwischen $pRb_{382-771}$ und MCPyV 6xHis-TEV-LT_{1-244} bzw. SV40 6xHis-LT_{1-117} bei zwei verschiedenen Salzkonzentrationen. Angegeben sind die durchschnittlichen K_D-Werte von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind in Klammern angegeben. Daten aus [21].

	$pRb_{382-771}$	
	150 mM NaCl	250 mM NaCl
MCPyV 6xHis-TEV-LT_{1-244}	51,3 nM (38,1)	121 nM (35.2)
SV40 6xHis-LT_{1-117}	1950 nM (367,5)	keine Bindung

5.4 Strukturelle Analyse des MCPyV LT_{NT}

5.4.1 Vorhersage einer MCPyV LT_{NT}-Sekundärstruktur

Das verkürzt exprimierte MCPyV LT ist neben sT das einzige MCPyV Protein, das in MCC-Gewebe exprimiert wird. Dabei befinden sich die tumorspezifischen Stopmutationen stets hinter dem pRb-Bindemotiv LxCxE. Aufgrund der positiven Selektion und damit dem Erhalt des LxCxE-Motivs, wird dieser Interaktion zwischen LT_{NT} und pRb eine wichtige Rolle in der Transformation und der daraus resultierenden MCC-Tumorgenese zugeschrieben. Ein Ziel dieser Doktorarbeit war es den MCPyV LT_{NT} zu kristallisieren. Mithilfe der Kristallstruktur von MCPyV LT_{NT} sollen Informationen generiert werden, die zur Aufklärung des funktionellen Mechanismus dieses verkürzten Proteins beitragen.

Zu Beginn dieser Doktorarbeit gab es weder strukturelle Informationen über MCPyV LT_{NT} noch über dessen Struktur in Anwesenheit von Interaktionspartnern. Allein bioinformatische Strukturvorhersagen und Modellierungen auf Basis der veröffentlichten Kristallstruktur des

LT N-Terminus von SV40 im Komplex mit der pRb pocket Domäne [61] waren möglich. Diese Kristallstruktur ist bis jetzt die einzige Kristallstruktur eines Polyomavirus LT_{NT}. Abbildung 33 zeigt den Aminosäurevergleich der N-Termini von SV40 und MCPyV. Beide Proteine enthalten die DnaJ-Domäne wie auch das LxCxE-Motiv. Außerdem sind die das LxCxE-Motiv flankierenden MCPyV-spezifischen Regionen (MUR) zu sehen. Vergleicht man die beiden Aminosäuresequenzen, ohne Berücksichtigung der MUR, so sind sie zu ~42% identisch.

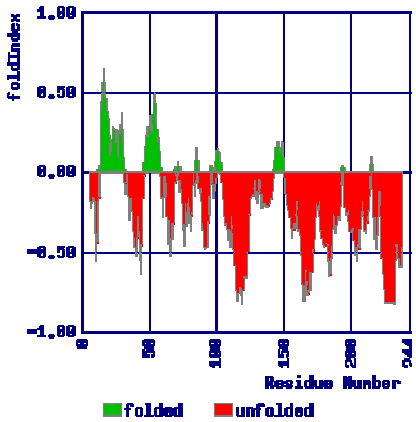
```
                                                  DnaJ
MCPyV LT_NT   MDLVLNRKEREALCKLLEIAPNCYGNIPLMKAAFKRSCLKHHPDKGGNPVIMMELNTLWS  60
              :: :::::.:   :  :: .  . .:::::::. :. ..: . :::::::.   : ..:::..
SV40 LT_NT    MDKVLNREESLQLMDLLGLERSAWGNIPLMRKAYLKKCKEFHPDKGGDEEKMKKMNTLYK  60

MCPyV LT_NT   KFQQNI---HKLRSDFSMFDEVDEAPIYGTTKFKEWWRSGGFSFGKAYEYGPNPHGTNSR  117
              :.....   :.   ::. : .. : : ::: ....::
SV40 LT_NT    KMEDGVKYAHQ--PDFGGFWDATEIPTYGTDEWEQWW----------------------  95

MCPyV LT_NT   SRKPSSNASRGAPSGSSPPHSQSSSSGYGSFSASQASDSQSRGPDIPPEHHEEPTSSSGS  177
                    ::                      :.
SV40 LT_NT    ------NA---------------------FNE---------------------------  100
                                                LxCxE
MCPyV LT_NT   SSREETTNSGRESSTPNGTSVPRNSSRTDGTWEDLFCDESLSSPEPPSSSEEPEEPPSSR  237
                                              :.:::.: .
SV40 LT_NT    -------------------------------ENLFCSEEM------------------  109

MCPyV LT_NT   SSPRQPPSSSAEEA   251
                    :::. : .
SV40 LT_NT    ------PSSDDEAT   117
```

Abbildung 33 Sequenzvergleich der LT N-Termini von MCPyV und SV40. Identische Aminosäuren sind durch Doppelpunkte und konservierte Aminosäuren mit Punkt markiert. Hervorgehoben sind die konservierten Domänen DnaJ und das LxCxE-Motiv. Das Alignment wurde durchgeführt von LALIGN [90].

Mit dem Programm FoldIndex© [69] ist es möglich die lokale und generelle Wahrscheinlichkeit anzugeben, ob ein Protein oder Proteinfragment sich faltet. Für die Berechnung wurde ein Fenster von 10 Aminosäuren angegeben, d.h. die Wahrscheinlichkeit der Faltung wurde für jeweils 10 Aminosäuren berechnet.

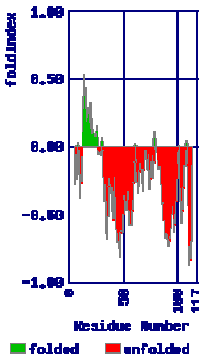
Die Wahrscheinlichkeit von Sekundärstrukturen im MCPyV LT_{NT} wurde für die ersten 244 Aminosäuren berechnet und für den SV40 LT_{NT} für die ersten 117 Aminosäuren. Beide Sequenzen enthalten u.a. das LxCxE-Motiv. Abbildung 34 zeigt die Wahrscheinlichkeiten von gefalteten (in Grün) und ungefalteten Regionen (in Rot) für beide Proteine als graphische Darstellung wie auch als Aminosäuresequenz. Das MCPyV LT_{1-244} wäre v.a. innerhalb der ersten 60 Aminosäuren gefaltet, in dieser Region befindet sich die DnaJ-Domäne. Außerdem würden sich auch Sekundärstrukturen in den Regionen um Aminosäure

100 und Aminosäure 145 befinden. SV40 LT_{1-117} würde nach dieser Berechnung wahrscheinlich zwischen den Aminosäuren 8 bis 30 gefaltete Regionen aufweisen. Der Großteil beider Proteine wäre wahrscheinlich ungefaltet. Anhand dieser Berechnungen würde sich bei beiden Proteinen nur der äußerste N-Terminus falten und wäre für eine Kristallisation geeignet. Der SV40 LT_{NT} wurde bisher nicht als Einzelprotein kristallisiert. Jedoch ist die Struktur im Komplex mit der pRb pocket Domäne (pRb_{PD}) erfolgreich aufgelöst. Mit dieser Strukturauflösung wurden innerhalb der ersten 100 Aminosäuren vier α-helikale Regionen bestimmt [61]. Das ist mehr gefaltete Struktur als mit dem FoldIndex© vorhergesagt wurde, wobei zu beachten ist, dass die Struktur im Komplex gelöst wurde und pRb_{PD} eine stabilisierende Wirkung auf SV40 LT_{NT} haben könnte.



MCPyV LT_{1-244}

1 MDLVLNRKER EALCKLLEIA PNCYGNIPLM KAAFKRSCLK HHPDKGGNPV
51 IMMELNTLWS KFQQNIHKLR SDFSMFDEVD EAPIYGTTKF KEWWRSGGFS
101 FGKAYEYGPN PHGTNSRSRK PSSNASRGAP SGSSPPHSQS SSSGYGSFSA
151 SQASDSQSRG PDIPPEHHEE PTSSSGSSSR EETTNSGRES STPNGTSVPR
201 NSSRTDGTWE DLFCDESLSS PEPPSSSEEP EEPPSSRSSP RQPP



SV40 LT_{1-117}

1 MDKVLNREES LQLMDLLGLE RSAWGNIPLM RKAYLKKCKE FHPDKGGDEE
51 KMKKMNTLYK KMEDGVKYAH QPDFGGFWDA TEIPTYGTDE WEQWWNAFNE
101 ENLFCSEEMP SSDDEAT

Abbildung 34 Vorhersage wahrscheinlich in sich gefalteter Regionen von SV40 LT_{7-117} und MCPyV LT_{1-244} mithilfe des FoldIndex© (Window 10, Step1). Grün markierte Aminosäuren sind wahrscheinlich Teil einer gefalteten Sekundärstruktur des Proteins und rot markierte Aminosäuren haben wahrscheinlich eine ungefaltete Sekundärstruktur.

5.4.2 Modellierung einer MCPyV LT_{NT}-Sekundärstruktur

Eine weitere Möglichkeit die Struktur eines Proteins vorherzusagen ist die Modellierung anhand von homologen Proteinen. Mithilfe von SWISS-MODEL wurde anhand der Kristallstruktur von SV40 LT_{7-117} für MCPyV LT_{1-244} ein Model erstellt (Abbildung 35).

Allerdings konnte mit diesem Programm nur die Struktur für die Aminosäuren 7-123 modelliert werden. Für die zweite Hälfte des N-Terminus wurde keine Vorhersage getroffen. Vergleicht man das modellierte MCPyV LT_{1-244} mit der SV40 LT_{7-117}-Kristallstruktur fällt auf, dass für MCPyV LT_{1-244} ähnliche α-helikale Strukturen wie bei SV40 LT_{7-117} modelliert wurden. Bei SV40 LT_{7-117} befindet sich das LxCxE-Motiv bei Aminosäure 103-107 (in Gelb) und ist Teil einer α-Helix. Über die Struktur von MCPyV LT_{1-244} nach Aminosäure 123 kann mithilfe dieses Modells keine Vorhersage getroffen werden, in dieser Region liegt jedoch die MUR mit dem LxCxE-Motiv. Da es bisher keine weitere Struktur eines PyV LT_{NT} gibt, kann auch keine weitere Modellierung durchgeführt werden.

Vergleicht man die FoldIndex©-Wahrscheinlichkeiten mit der SWISS-Modellierung, so wurde beides Mal gefaltete Strukturen für den äußersten MCPyV LT_{NT} bis ungefähr Aminosäure 100 als wahrscheinlich berechnet. Da jedoch der gesamte MCPyV LT_{NT} kristallisiert werden soll, inklusive der MUR und dem LxCxE-Motiv, um eine Struktur von der wahrscheinlich transformierenden LT-Region zu erhalten, wurde in den Experimenten zur Kristallisation von MCPyV LT_{NT} mit den LT-Sequenzen 1-244 (LT_{1-244}) und 1-313 (LT_{1-313}) gearbeitet.

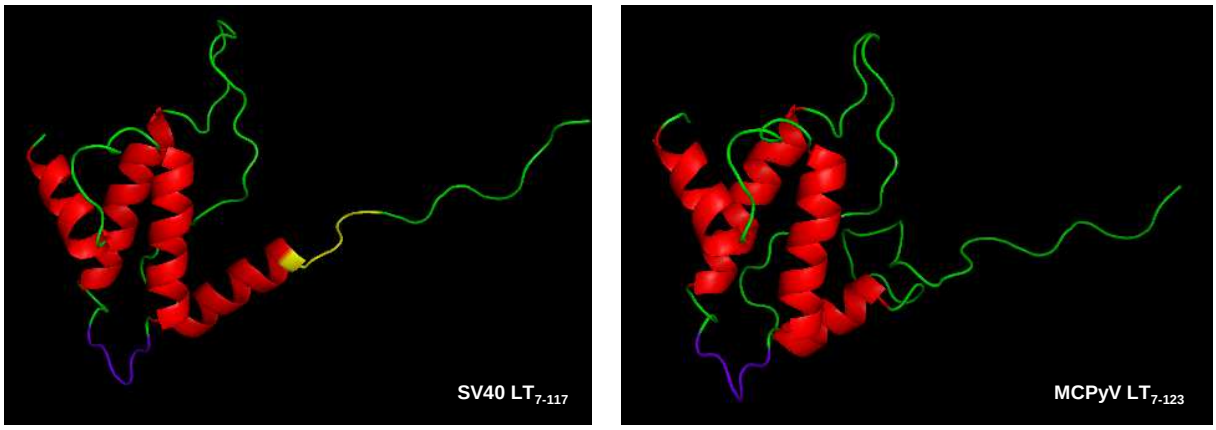


Abbildung 35 Bioinformatische Strukturmodellierung des MCPyV LT N-Terminus anhand der Kristallstruktur von SV40 LT_{7-117}(PDB Datei 1GH6, [61]). Für MCPyV LT N-Terminus war eine Modellierung bis Aminosäure 123 möglich. In Lila dargestellt ist die DnaJ-Domäne, in Gelb das pRb-Bindemotiv. α-Helices sind Rot markiert und ungefaltete Regionen Grün. Die Modellierung wurde mit SWISS-MODEL durchgeführt.

5.4.3 *Circular Dichroism (CD)* Analyse identifiziert α-helikale Strukturen in His-LT_{NT}

Die CD-Spektroskopie ist eine optische Methode u.a. für die schnelle Bestimmung der Sekundärstruktur und der Faltung von Proteinen. Sie wird standardmäßig in der Strukturbiologie eingesetzt. Die verschiedenen Sekundärstrukturen von Proteinen

absorbieren polarisiertes Licht auf unterschiedliche Art und Weise, wodurch unterschiedliche Spektren gemessen werden, die charakteristisch für die jeweiligen Sekundärstrukturen sind. Abbildung 36 gibt eine Übersicht über die Spektren verschiedener Sekundärstrukturen.

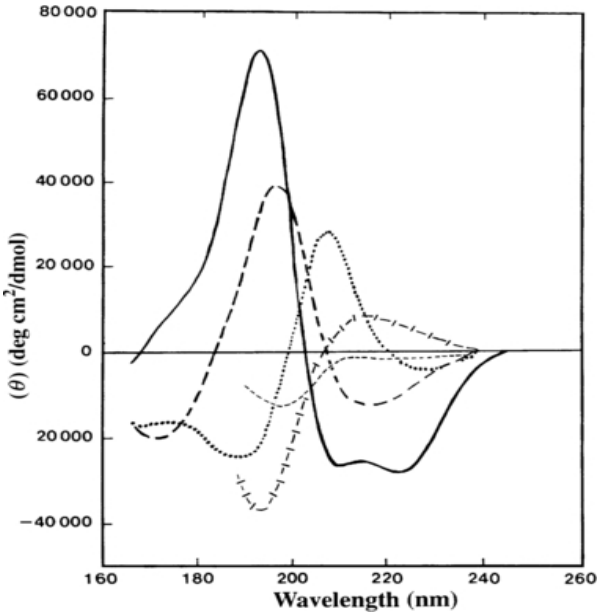


Abbildung 36 Die Illustration der Graphen zeigt die CD-Spektren verschiedener Sekundärstrukturen. Die Graphik wurde aus Ranjbar et al. entnommen [82]. Die durchgehende Linie stellt das CD-Spektrum von α-Helices dar, die gestrichelte Linie von antiparallelen β-Faltblättern, die gepunktete Linie von β-Schleifen, die lang-quer gestrichelte Linie von π- oder 3_{10}-Helices und die kurz gestrichelte Linie von gefalteten Strukturen.

His-LT_{NT} wurde für die CD-Messungen in Phosphatpuffer mit maximal 25 mM NaCl dialysiert und die Konzentration war mindestens 200 µg/ml. Die CD-Messungen wurden am J-815 CD Spektrometer in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 280 nm durchgeführt. Für die Experimente wurden 200 µl der Proteinlösungen in eine 1 mm Quarzküvette gegeben und die Spektren mit 15 Wiederholungen gemessen. Spektren des Phosphatpuffers wurden mit 5 Wiederholungen gemessen und vom gemessenen Signal der Proteinlösung abgezogen. Die getesteten Proteinlösungen enthielten sowohl Monomere wie auch Multimere. Die Ergebnisse der CD-Analyse werden in molarer Elliptizität angegeben.

In der CD-Analyse wurden die Konstrukte 6xHis-TEV-LT_{1-244} und 6xHis-TEV-LT_{1-313} analysiert. Bei beiden Konstrukten wurden sehr ähnliche Spektren gemessen (Abbildung 37), was bedeutet, dass sie eine sehr ähnliche Sekundärstruktur haben. Ab ~190 nm ist ein Abfall der Elliptizität zu beobachten bis zu einem Minimum bei ~205 nm. Danach folgt ein leichter Anstieg bis zu einem Sattelpunkt bei ~220 nm und einem weiteren Anstieg bis ~240 nm mit folgender gleichbleibender Elliptizität bis 280 nm.

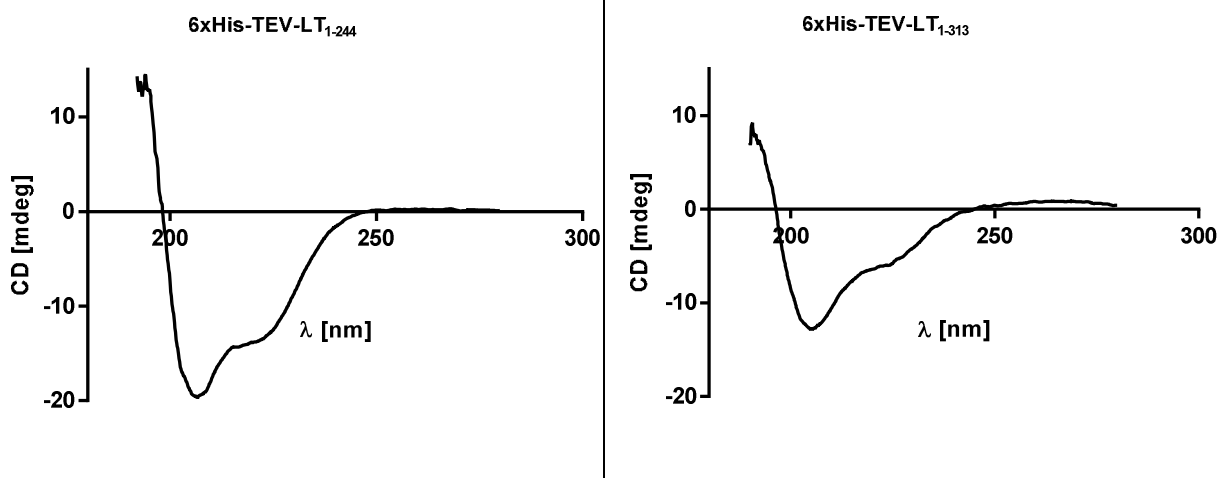


Abbildung 37 CD-Messungen von 6xHis-TEV-LT_{1-244} (links) und 6xTEV-LT_{1-313} (rechts). Aufgetragen sind die Wellenlänge [nm] gegen die molare Elliptizität [mdeg]. Beide Spektren zeigen ein breites Minimum mit einem Peaks bei ~205 nm und einem Sattelpunkt bei ~220 nm.

Vergleicht man die Spektren mit den charakteristischen Spektren einzelner Sekundärstrukturen (Abbildung 36) dann ähneln sie dem Spektrum der α-Helices am meisten. Der Verlauf der Elliptizität ab 190 nm und das Minimum bei ~210 nm sind gleich. Bei den α-Helices entspricht der Sattelpunkt einem ausgeprägten zweiten Minimum, d.h. bei His-LT_{NT} wird das α-Helix-Spektrum durch ein oder mehrere Spektren anderer Sekundärstrukturen überlagert, so dass sich das Minimum abschwächt. Diese Spektren wurden nicht näher bestimmt, so dass keine definitive Aussage über eine zusätzliche Sekundärstruktur gemacht werden kann. Aufgrund der Abschwächung des Minimums zum Sattelpunkt kann nur vermutet werden, dass es sich dabei um unstrukturierte Regionen und/ oder Regionen mit π- oder 3_{10}-Helices handelt.

Folglich kann festgehalten werden, dass His-LT_{NT} nach der Aufreinigung ausgeprägte α-helikale Sekundärstrukturen besitzt. Über weitere Sekundärstrukturen kann jedoch keine eindeutige Aussage gemacht werden.

5.4.4 Initiale Kristallisationsscreens mit 10xHis-LT_{1-244} ohne Proteinkristalle

Trotz des Wissens, dass aufgereinigtes His-LT_{NT} in Lösung als Mix aus Monomeren und Multimeren vorliegt, wurden initiale Kristallisationsscreens durchgeführt, mit der Hoffnung, das in der Lösung vorhandene Monomere kristallisieren würden. Dafür wurden Fraktionen aus der NiNTA-Affinitätschromatographie, die besonders reines 10xHis-LT_{1-244} enthielten vereint, gegen 50 mM Tris, pH 7,5 dialysiert und auf 2 mg/ml Protein konzentriert. Für die Kristallisationsscreens wurden folgende Kits eingesetzt: JCSG Suite (Qiagen), Classics Suite

(Qiagen), comPAS Suite (Qiagen), Cryos Suite (Qiagen), PACT Premium Suite (Molecular Dimensions) und PGA Screen HT-96 (Molecular Dimensions). Die Kristallisationsansätze wurden bei 20°C gelagert und die Entstehung von Kristallen über einen Zeitraum von zwei Monaten visuell-mikroskopisch überprüft. In keinem der Kristallisationsansätze sind Proteinkristalle gewachsen. Wahrscheinlich war neben der nicht-monodispersen Lösung die Gesamtproteinkonzentration zu gering, als dass es zu einer Sättigung der Lösung mit Monomeren und anschließender Kristallisation hätte kommen können.

5.4.5 Erfolgreiche Komplexbildung mit aufgereinigtem $pRb_{382-771}$ und 6xHis-LT_{1-244}

Da es sich schwierig gestaltete LT_{NT} so aufzureinigen und zu konzentrieren, dass das Protein monodispers vorliegt und hoch genug konzentriert für Kristallisationsscreens ist, wurden alternative Ansätze für eine Kristallisation in Betracht gezogen. Ein Ansatz ist die Stabilisierung von LT_{NT} durch einen Interaktionspartner. Die MST-Analysen (Kapitel 5.3) haben gezeigt, dass der His-LT_{NT} und pRb_{PD} eine hochaffine Bindung eingehen, die stärker als die Interaktion zwischen dem SV40 LT_{NT} und pRb_{PD} ist. Die Kristallstruktur dieses Komplex wurde bereits erfolgreich gelöst. Deswegen und weil die Aufreinigung von pRb_{PD} bereits etabliert war, wurde es als Interaktionspartner für eine Ko-Kristallisation ausgesucht.

Für eine Ko-Kristallisation von pRb_{PD} und LT_{NT} war es notwendig herauszufinden, ob 6xHis-LT_{1-244} und $pRb_{381-722}$ überhaupt einen stabilen Komplex bilden, der sich aufreinigen lässt und über einen längeren Zeitraum stabil ist. Hierfür wurden beide Proteine separat wie oben beschrieben aufgereinigt (Kapitel 5.2.2 und 5.2.4). Nach der Aufreinigung wurden beide Proteine separat gegen 50 mM Tris, pH 7,5, 200 mM NaCl, 2,5 mM BME dialysiert und einzeln im SMART-System analysiert. In Abbildung 38 sind die Chromatogramme für die Einzelläufe von $pRb_{382-771}$ und 6xHis-LT_{1-244} dargestellt. 6xHis-LT_{1-244} eluiert wie auch schon vorher beobachtet in zwei Maxima, bei 0,89 als Multimere und bei 1,57 ml als Monomere. $pRb_{382-771}$ hingegen eluiert mit nur einem Maximum bei 1,57 ml als Monomer. Obwohl beide Proteine deutlich unterschiedliche theoretische Molekulargewichte haben, $pRb_{382-771}$ ~45 kDa und 6xHis-LT_{1-244} ~28 kDa, zeigen sie in der GF das gleiche Laufverhalten. Die in der SDS-PAGE oder auch Gelfiltration bereits beobachteten Molekulargewichte unterscheiden sich von den berechneten: in der SDS-PAGE läuft $pRb_{382-771}$ bei ~40 kDa und 6xHis-LT_{1-244} bei ~35 kDa. Diesen geringen Unterschied im Laufverhalten beider Proteine kann die Superdex 200 PC 3.2/30 Säule nicht auftrennen.

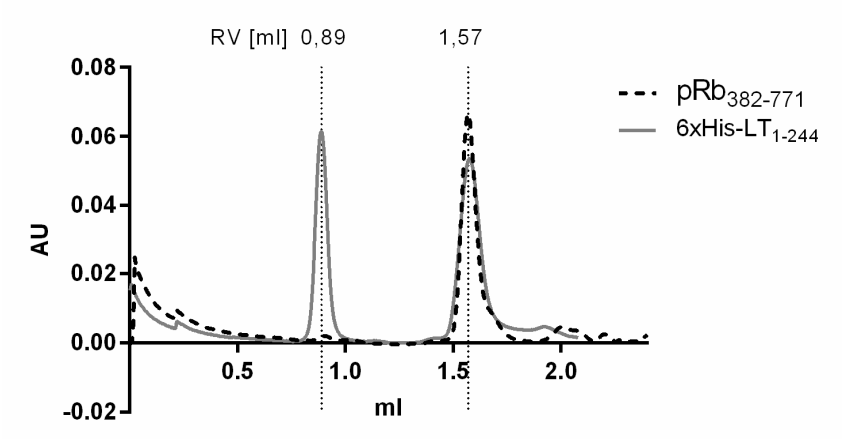


Abbildung 38 Chromatogramm der Proteine $pRb_{382-771}$ und 6xHis-LT_{1-244}, es wurden 14 µg bzw. 17 µg Protein einzeln auf die Superdex 200 PC 3.2/30 Säule aufgetragen. $pRb_{382-771}$ (gestrichelte Linie) eluiert mit einem Maximum bei 1,57 ml und 6xHis-LT_{1-244} (graue Linie) eluiert mit zwei Maxima als Multimer und als Monomer bei 0,89 ml bzw. 1,57 ml.

Für die Komplexbildung wurden verschiedene molare Verhältnisse von $pRb_{382-771}$/6xHis-LT_{1-244} (1:1,5 bzw. 1:5) getestet und in der GF auf die Stabilität des möglichen Komplexes analysiert. Nach Vermischen der Proteine wurden die Proben für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in der GF mit der Superdex 200 PC 3.2/30 Säule analysiert. Die Chromatogramme der einzelnen Komplexe sind in Abbildung 39 - Abbildung 41 dargestellt.

Für das Verhältnis 1:1,5 von $pRb_{382-771}$/6xHis-LT_{1-244} wurden 27 µg Gesamtprotein in der GF eingesetzt, das entspricht einer Proteinkonzentration von 0,5 µg/µl. Im Chromatogramm ist neben den Maxima der beiden einzelnen Proteine bei 0,88 ml und 1,57 ml ein drittes Maximum bei 1,45 ml zu sehen (Abbildung 40). Dieses Retentionsvolumen entspricht einem Molekulargewicht von ~75 kDa. Dies wäre die Summe der Einzelmolekulargewichte von $pRb_{382-771}$ und 6xHis-LT_{1-244}. Das Maximum bei 1,45 ml hat im Vergleich zu den anderen Maxima den höchsten Ausschlag, enthält dementsprechend das meiste Protein.

Auch bei einem Verhältnis von 1:5 von $pRb_{382-771}$/6xHis-LT_{1-244} und einer Proteinkonzentration von 0,76 µg/µl und 38 µg Gesamtprotein sind drei Maxima bei gleichen Retentionszeiten zu sehen (Abbildung 40). In den Fraktionen des Maximums bei 1,45 ml konnte sowohl 6xHis-LT_{1-244} wie auch $pRb_{382-771}$ im SDS-Gel detektiert werden. Damit wurde bestätigt, dass beide Proteine hier als Komplex und nicht als Einzelproteine eluieren. Allerdings haben sich im Vergleich zum Verhältnis 1:1,5 die Ausschlaghöhen verändert. So sind die Maxima bei 0,88 ml und 1,57 ml im Vergleich zum Maximum bei 1,44 ml deutlich höher. Da nur 6xHis-LT_{1-244} bei 0,88 ml als Multimer eluiert und im SDS-Gel zu sehen ist, hat sich der Gesamtanteil von LT-Multimeren bei diesem Verhältnis erhöht hat. Bei 1,57 ml wurde nur 6xHis-LT_{1-244} und kein $pRb_{382-771}$ eluiert, d.h auch hier hat sich der Anteil an 6xHis-

LT_{1-244} relativ zum Komplex erhöht. Daher ist davon auszugehen, dass das gesamte $pRb_{382-771}$ im Komplex gebunden und der Anteil an ungebundenem 6xHis-LT_{1-244} höher ist als beim Verhältnis 1:1,5. Deswegen wurde im folgenden Experiment mit dem Verhältnis 1:1,5 gearbeitet.

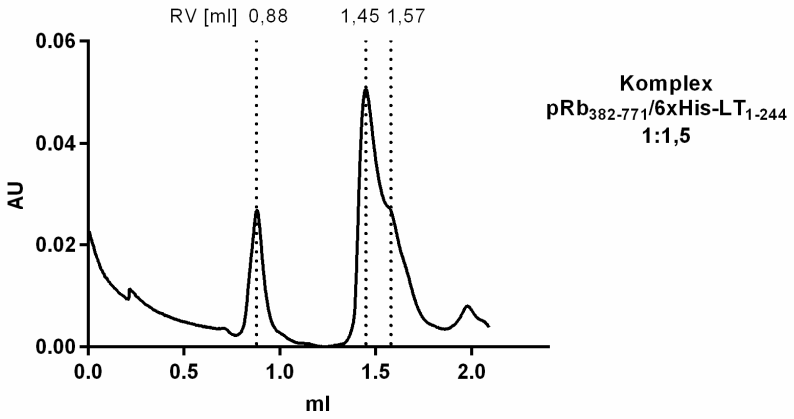


Abbildung 39 Chromatogramm des Proteinkomplexes $pRb_{382-771}$/6xHis-LT_{1-244} mit einem molaren Verhältnis von 1:1,5. Die Proteine wurden vor der GF für 30 min zusammen bei RT inkubiert. Die aufgetragene Gesamtproteinmenge betrug ~27 µg und die Proteinkonzentration 0,5 µg/µl. Es gibt zwei Maxima (0,88 ml und 1,45 ml) und ein Schultermaximum bei 1,57 ml. Es wurde die Superdex 200 PC 3.2/30 Säule benutzt.

Beim nächsten Komplexversuch wurde untersucht, ob der 1:1,5 Komplex über einen längeren Zeitraum stabil ist und sich auch aufkonzentrieren lässt. Wie zuvor wurden die Proteine zu einer Proteinkonzentration von ~0,5 µg/µl vermischt, jedoch war die Gesamtproteinmenge mit ~240 µg größer. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend auf 3,5 µg/µl konzentriert. Das Ergebnis der GF ist in Abbildung 41 zu sehen. Es wurden wie zuvor Maxima bei 0,88 ml, 1,39 ml und 1,58 ml gemessen. Das Maximum mit dem höchsten Ausschlag ist bei 1,39 ml. Im SDS-Gel ist zu sehen, dass dort der Hauptteil des Proteinkomplexes eluiert wurde. Jedoch wurden beide Proteine auch in den anderen untersuchten Fraktionen detektiert, wenn auch in geringeren Mengen. Die Fraktionen F15, F16 und F17 enthielten insgesamt ~1,1 µg/µl Protein, was ungefähr einem Drittel der eingesetzten Proteinmenge entspricht. Der Verlauf des Chromatogramms, respektive der Maximums ähnelt dem von Abbildung 39 nur sind die Absorptionswerte um ungefähr Faktor 10 höher. Man kann daran sehen, dass sich trotz höherer Proteinkonzentration das Verhältnis nicht grundlegend verändert hat, was auch bedeutet, dass im Vergleich zum Proteinkomplex nicht mehr 6xHis-LT_{1-244} Multimere durch die Konzentrierung entstanden sind und $pRb_{382-771}$ 6xHis-LT_{1-244} im Komplex stabilisiert. Abschließend kann gesagt, werden, dass sich unter den hier angewandten Bedingungen bei einem molaren Verhältnis von 1:1,5 ein stabiler Komplex aus $pRb_{382-771}$ und 6xHis-LT_{1-244} bildete, der sich in der Gelfiltration aufreinigen ließ und sich für inititale Kristallisationsscreens eignet.

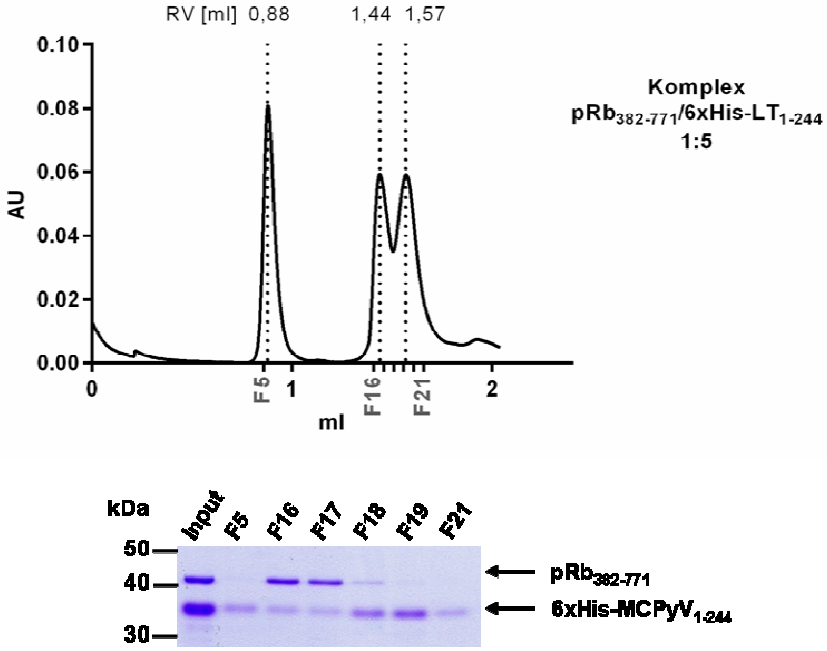


Abbildung 40 Chromatogramm des Proteinkomplexes $pRb_{382-771}$/6xHis-LT_{1-244} mit einem molaren Verhältnis von 1:5. Die aufgetragene Gesamtproteinmenge betrug 38 µg. Es gibt drei Maxima bei 0,88 ml, 1,44 ml und 1,57 ml. Es wurde die Superdex 200 PC 3.2/30 Säule benutzt.

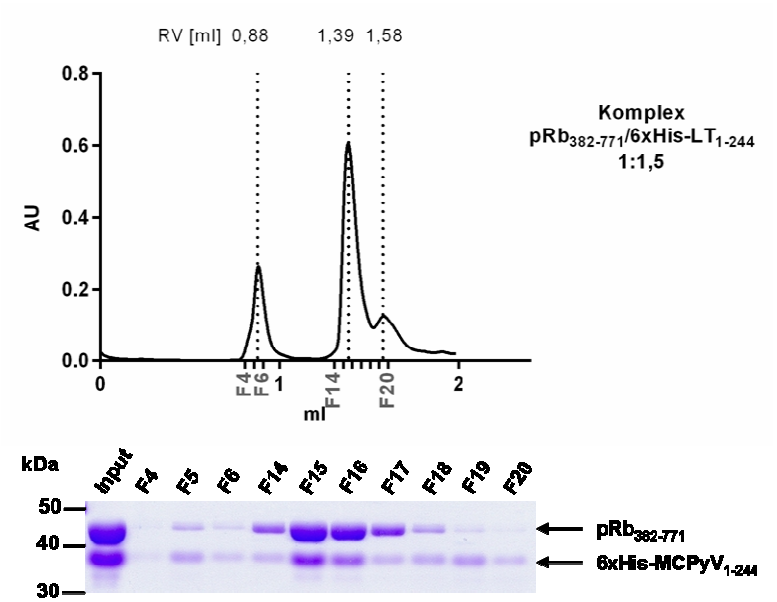


Abbildung 41 Chromatogramm des Proteinkomplexes $pRb_{382-771}$/6xHis-LT_{1-244} mit einem molaren Verhältnis von 1:1,5. Die aufgetragene Gesamtproteinmenge betrug 240 µg und die Proteinkonzentration 3,5 µg/µl. Es gibt zwei Maxima (0,88 ml und 1,39 ml) und einen weiteren Höchstwert bei 1,58 ml. Es wurde die Superdex 200 PC 3.2/30 Säule benutzt.

5.4.6 Ko-Aufreinigung von GST-pRb$_{PD}$ und 6xHis-LT$_{1-244}$

Eine weitere Möglichkeit für die Initiierung der Komplexbildung ist die gemeinsame Aufreinigung von getrennt exprimierten Proteinen. Hierfür wurden pRb$_{382-771}$ und 6xHis-LT$_{1-244}$ wie im Methodenteil exprimiert, aber die Pellets zusammen im *Batch*-Verfahren aufgearbeitet (Kapitel 4.7.4, Methoden). Die eine Hälfte wurde mit Glutathion Sepharose aufgereinigt, die andere mit NiNTA-Agarose.

Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse der beiden Verfahren. Betrachtet man das Gesamtlysat (Spur Lys), dann enthält es deutlich mehr exprimiertes 6xHis-LT$_{1-244}$ als pRb$_{382-771}$. In den Eluaten ist zu sehen, dass mit beiden Verfahren sowohl pRb$_{382-771}$ wie auch 6xHis-LT$_{1-244}$ isoliert wurde, wobei in der Aufreinigung mit Glutathion Sepharose weniger Verunreinigungen enthalten sind. Bei beiden Verfahren war die zweite Elution über Nacht am effektivsten und enthält die höchste Konzentration an beiden Proteinen. In allen Eluaten der Glutathion Sepharose Aufreinigung sieht es so aus, als wenn die Proteine in einem Verhältnis von ungefähr 1:1 vorliegen würden. Dies ist bei der Aufreinigung über die NiNTA-Agarose nicht der Fall. Es wurde deutlich mehr 6xHis-LT$_{1-244}$ als pRb$_{382-771}$ eluiert und es sieht so aus, als wenn ein beträchtlicher Teil der Proteine nach der 3. Elution noch an der Agarose haften würde. Folglich ist die Aufreinigung beider Proteine mit der Glutathion Sepharose effektiver als mit NiNTA-Agarose.

Um zu überprüfen, ob beide Proteine auch als Komplex vorliegen und nicht nur zufällig eluiert wurden, d.h. eines der beiden Proteine jeweils unspezifisch an die Matrix gebunden hätte, wurde eine analytische GF durchgeführt. Dafür wurden die Eluate aus der Glutathion Sepharose Aufreinigung vereint und aufkonzentriert von 10 ml auf 2 ml mit einer finalen Proteinkonzentration von ~6 mg/ml. Während der anschließenden Lagerung über Nacht bei 4°C ist Protein ausgefallen, ein Hinweis, dass der Puffer die Proteine nicht optimal stabilisiert hat. Von der verbliebenen Proteinlösung wurden 50 µl auf die Superdex 200 PC 3.2/30 Säule gegeben. Abbildung 43 zeigt das Chromatogramm mit dem entsprechenden SDS-Gel. Im Chromatogramm sind drei Maxima bei 0,88 ml, 1,41 ml und 1,57 ml zu sehen. Im SDS-Gel ist zu erkennen, dass beide Proteine im ersten Maximum (F4-F6) eluiert wurden, im zweiten Maximum (F14, F16) nur GST-pRb$_{PD}$ und im dritten Maximum (F19) nur 6xHis-LT$_{1-244}$. Damit würde der Proteinkomplex mit einem anderen Retentionsvolumen eluieren als der Komplex aus Kapitel 5.4.3. Dabei ist zu beachten, dass in diesem Experiment der GST-*Tag* nicht entfernt wurde. Eine Aufreinigung und anschließende Gelfiltration, wo der GST-*Tag* entfernt wird, wurde bisher nicht durchgeführt. Daher kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich um den zuvor beobachteten stabilen Komplex beider Proteine handelt, oder ob der GST-*Tag* die Komplexbildung negativ beeinflusst. Es ist außerdem zu beachten, das GST Dimere bildet und damit das Laufverhalten von GST-pRb$_{PD}$ beeinflusst sein könnte, d.h. die Elution der Dimere und der Dimere im Komplex würde bei einem geringern Retentionsvolumen stattfinden, als bei den Monomeren.

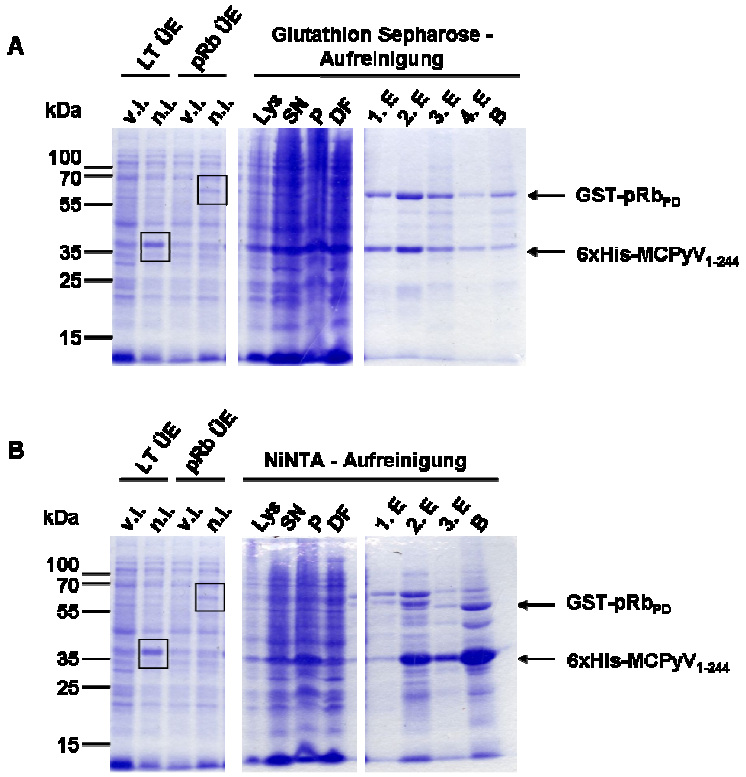


Abbildung 42 Ko-Aufreinigung von GST-pRb$_{PD}$ und 6xHis-MCPyV$_{1-244}$. Pellets aus beiden Überexpressionen wurden zusammen in Tris-Puffer aufgenommen und aufgeschlossen. Das Lysat wurde zentrifugiert und anschließend der Überstand gleichmäßig aufgeteilt für die (A) Aufreinigung beider Proteine mit Glutathion Sepharose und (B) Aufreinigung beider Proteine mit NiNTA-Agarose. Die Aufreinigungen fanden im *Batch*-Verfahren statt. Die Proteine wurden mit 30mM Glutathion (A) bzw. 250 mM Imidazol (B) eluiert. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurden Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte im SDS-Gel aufgetrennt. ÜE – Überexpression, v.I. – vor Induktion, n.I. – nach Induktion, Lys – Gesamtlysat, SN – Überstand, P – Pellet, DF – Durchfluss, E – Eluat, B - Beads

In weiterführenden Experimenten ist zu prüfen, ob nach der Ko-Aufreinigung mit Glutathion Sepharose der Komplex von der Matrix durch einen Trombinverdau eluiert und somit der GST-*Tag* entfernt werden kann. Die Methode der Ko-Aufreinigung wäre damit die effektivste zur Herstellung des pRb$_{382-771}$/6xHis-LT$_{1-244}$-Komplexes und mit den wenigsten Verlusten durch zusätzliche Reinigungsprozesse verbunden.

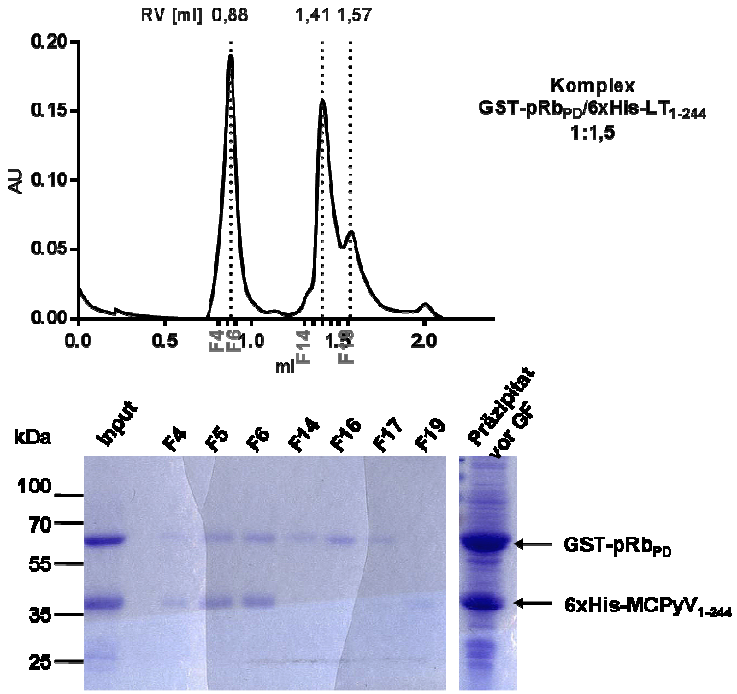


Abbildung 43 Chromatogramm und SDS-Gel des Proteinkomplexes GST-pRb$_{PD}$/6xHis-LT$_{1-244}$ aus der Aufreinigung mit Glutathion Sepharose. Es wurde die Superdex 200 PC 3.2/30 Säule benutzt.

5.4.7 Generierung von stabilen His-LT$_{NT}$ Fragmenten durch partielle Proteolyse für die Kristallisation

Neben der Stabilisierung des zu kristallisierenden Proteins durch einen Interaktionspartner kann versucht werden, einzelne, stabil gefaltete Domänen des Proteins durch partielle Proteolyse zu erhalten. Bei dieser Methode wird davon ausgegangen, dass Proteasen *in situ* nur die ungefalteten, leicht zugänglichen Peptide verdauen und gefaltete Domänen intakt bleiben, welche dann leichter kristallisieren [80]. Diese Methode wurde auch für die Kristallisation von His-LT$_{NT}$-Domänen angewandt.

Für die Versuche wurde mit den Proteasen des JBS Floppy-Choppy Kits (Jena Biosciences) gearbeitet. Es ist essentiell die Bedingungen herauszufinden, bei denen während der *in situ* Proteolyse ein stabiles Produkt entsteht und nicht das gesamte Protein verdaut wird. Deswegen wurden proteolytische Verdaue mit verschiedenen Konzentrationen der Proteasen Subtilisin A, α-Chymotrypsin, Papain und Trypsin mit unterschiedlichen His-LT$_{NT}$-Proteinen angesetzt. Für die Etablierung der Proteolysekonditionen wurde per NiNTA-Affinitätschromatographie und GF aufgereinigtes Protein genommen, welches nicht die

höchste Reinheit hatte. Daher sind Verunreinigungen durch andere Proteine auf den SDS-Gelen zu sehen.

Abbildung 44 zeigt die Proteolyse von je 60 µg 10xHis-LT_{1-244} mit unterschiedlichen Proteasen, Proteasemengen und Inkubationszeiträumen. Bei allen Proteasen war die Konzentration von 0,1 ng/60 µg Protein zu gering, um einen Abbau sehen zu können. Die Proteolyse mit Papain in unterschiedlichen Konzentrationen führte entweder zum kompletten Abbau des Proteins oder zu keiner erkennbaren Proteolyse. Bei den anderen drei Proteasen waren nach 4 Tagen partiell verdaute Peptide zu sehen, die bis dahin stabile Produkte bildeten. Die Produkte waren zwischen ~14 und 20 kDa groß.

Bei Subtilisin und α-Chymotrypsin sind jeweils zwei Produkte entstanden von ähnlicher Größe (~14 und ~18 kDa). Bei Trypsin ist ein Produkt mit der Größe von ca. 17 kDa entstanden. Für den Verdau mit Subtilisin wäre eine Proteasekonzentration von 1-10 ng/ 60 µg 10xHis-LT_{1-244} nötig, damit das Ausgangsprotein vollständig in stabile Produkte übergeht. Beim Verdau mit α-Chymotrypsin und Trypsin baut 10 ng/60 µg Protein das Protein soweit ab, dass nichts mehr vom Ausgangsprodukt vorhanden ist, jedoch die Produkte stabil erscheinen.

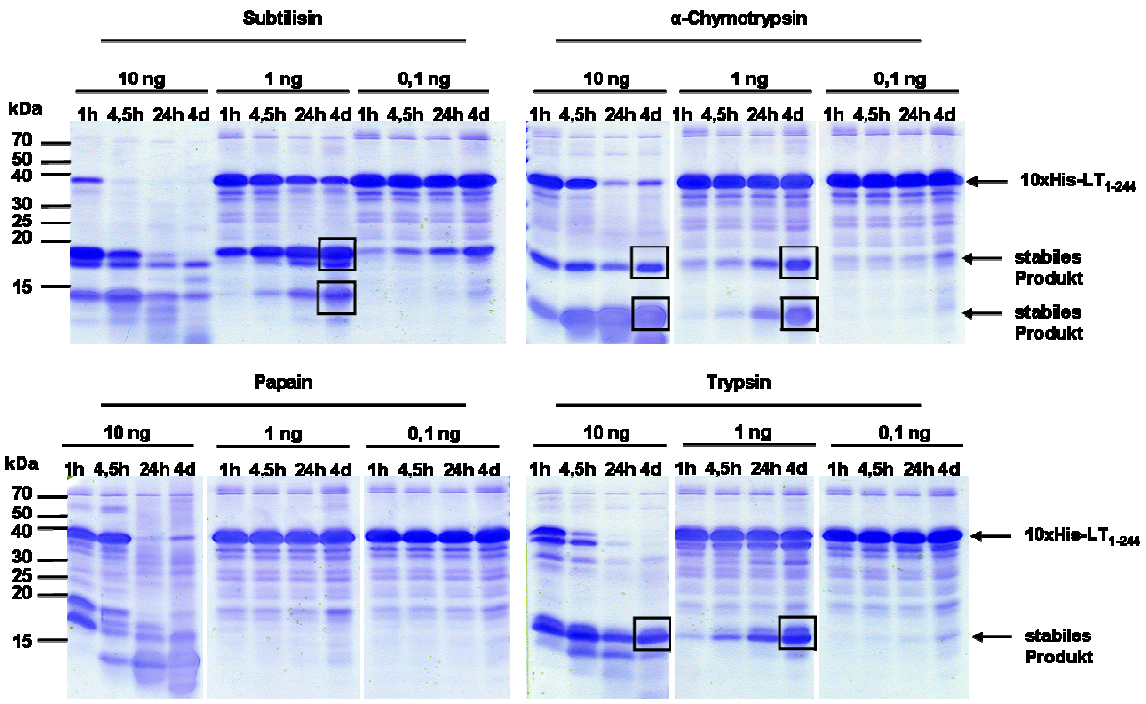


Abbildung 44 Partielle Proteolyse von jeweils 60 µg 10xHis-LT_{1-244} in 100µl 10 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 7,5. Es wurden 10, 1 und 0,1 ng der Proteasen Subtilisin A, α-Chymotrypsin, Papain und Trypsin eingesetzt. Die Ansätze wurden bis zu 4d bei 20°C inkubiert.

5.4.8 Partielle Proteolyse von 6xHis LT_{1-244}

Es wurde eine weitere Proteolyse durchgeführt. Dafür wurde 6xHis-LT_{1-244} mit allen vier Proteasen verdaut. Dieses Mal wurde ein Tris- anstatt des im Floppy Choppy Kit empfohlenen HEPES-Puffer eingesetzt. Die Proteolyse fand in 25 mM Tris, pH 7,6, 500 mM NaCl statt.

Die Ergebnisse der Proteolyse sind in Abbildung 45 dargestellt. Es wurden pro Protease fünf verschiedene Konzentrationen eingesetzt und der Verdau bis zu drei Tage inkubiert. Das benutzte Protein enthielt Verunreinigungen, vor allem im Bereich über 50 kDa, trotzdem konnten stabile Produkte der Proteolyse identifiziert werden. Vor allem bei den Proteolyseansätzen mit 1 ng Subtilisin pro 100 µg Protein und 10 ng α-Chymotrypsin pro 100 µg Protein entstanden stabile Produkte von 18-20 kDa. Mit Papain und Trypsin wurde mit den eingesetzten Proteasekonzentrationen keine stabilen Fragmente erhalten, zumindest sind in den SDS-Gelen keine erkennbar. Die Lauffront des Gels war ungefähr auf der Höhe der 15 kDa-Bande, daher wären mögliche Fragmente kleiner als 15 kDa Bestandteil der Lauffront und somit nicht identifizierbar.

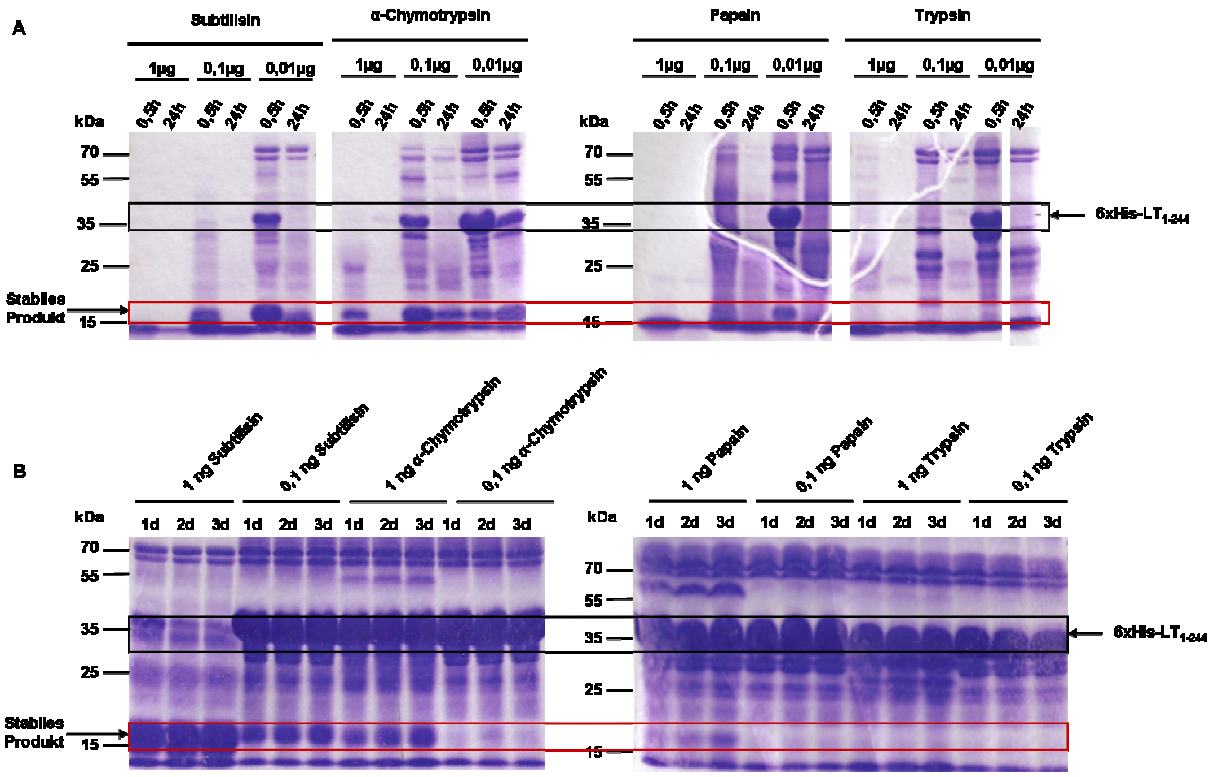


Abbildung 45 Partielle Proteolyse von jeweils 100 µg 6xHis-LT_{1-244} in 100µl 10 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 7,5. Es wurden 10, 1 und 0,1 ng der Proteasen Subtilisin A, α-Chymotrypsin, Papain und Trypsin eingesetzt.

Bei beiden Experimenten zur partiellen Proteolyse wurden Konditionen gefunden, die zu stabilen Fragmenten geführt haben und die reproduzierbar waren. Diese Konditionen sollen bei Kristallisationsscreens eingesetzt werden, um Teile des LT_{NT} zu kristallisieren und deren Struktur aufzuklären.

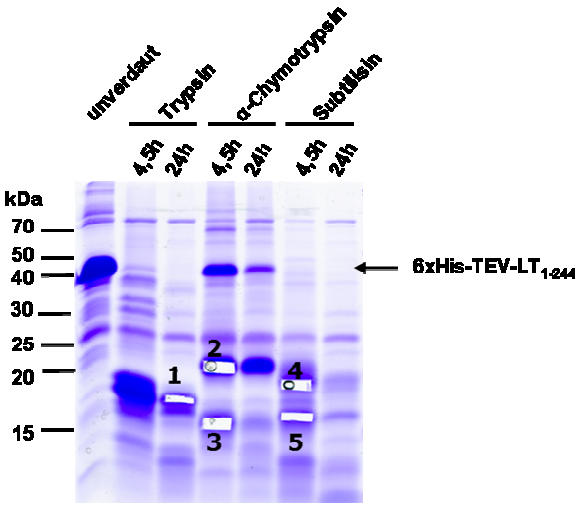
5.4.9 Massenspektrometrische Analyse von 6xHis-TEV-LT_{1-244}-Abbauprodukten

Ein ähnlicher proteolytischer Versuch wie in Kapitel 5.4.7 und 5.4.8 wurde mit 6xHis-TEV-LT_{1-244} und den Proteasen Trypsin, α-Chymotrypsin und Subtilisin durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 46A gezeigt. Die markierten Proteinbanden 1-5 wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und im Massenspektrometer analysiert. Die Analyse wurde in der *Core Facility* für Massenspektrometrische Proteomanalytik des UKE Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Zusätzlich wurde auch unverdautes 6xHis-TEV-LT_{1-244} als Kontrolle im Massenspektrometer untersucht. Abbildung 46B-D zeigt die Zusammenfassung dieser Analyse. Vom unverdauten 6xHis-TEV-LT_{1-244} wurden Peptidsequenzen vom Großteil des Proteins detektiert. Nur die ersten und letzten 40 Aminosäuren wurden nicht detektiert (Abbildung 46B). Bei den Proben aus der Proteolyse waren die identifizierten Peptidsequenzen der Banden 1, 3 und 4 identisch (Abbildung 46C). Bei Bande 5 wurden die gleichen Peptide wie bei 1, 3 und 4 detektiert, sowie weitere Peptide (Abbildung 46D). Bande 2 ging in der Analyse verloren. Trotz der unterschiedlichen Größen der analysierten Proteinbanden waren die Resultate sehr ähnlich und bei Bande 5 wurden trotz des kleinen Fragments Peptide über den größten Proteinbereich detektiert.

Bei allen analysierten proteolytischen Produkten wurden Peptide unter anderem innerhalb und um die DnaJ-Domäne detektiert aber es wurde kein Peptid nach Aminosäure 127 gefunden, was auch den Bereich mit der MUR und dem LxCxE-Motiv einschließt.

Diesen Ergebnissen zufolge besitzt vor allem der Bereich vor Aminsäure 127 stabil gefaltete Sekundärstrukturen.

A



B

```
                                   DnaJ
MCPyV LT  MDLVLNRKEREALCKLLEIAPNCYGNIPLMKAAFKRSCLKHHPDKGGNPVIMMELNTLWSKFQQNIHKLRSDFSMFDEVDEAPIYGTTKFKEWWRSGGFS 100
MCPyV LT  FGKAYEYGPNPHGTNSRSRKPSSNASRGAPSGSSPPHSQSSSSGYGSFSASQASDSQSRGPDIPPEHHEEPTSSSGSSSREETTNSGRESSTPNGTSVPR 200
                        Rb
MCPyV LT  NSSRTDGTWEDLFCDESLSSPEPPSSSEEPEEPPSSRSSPRQPP 244
```

C

```
                                   DnaJ
MCPyV LT MDLVLNRKEREALCKLLEIAPNCYGNIPLMKAAFKRSCLKHHPDKGGNPVIMMELNTLWSKFQQNIHKLRSDFSMFDEVDEAPIYGTTKFKEWWRSGGFS 100
MCPyV LT FGKAYEYGPNPHGTNSRSRKPSSNASRGAPSGSSPPHSQSSSSGYGSFSASQASDSQSRGPDIPPEHHEEPTSSSGSSSREETTNSGRESSTPNGTSVPR 200
                        Rb
MCPyV LT NSSRTDGTWEDLFCDESLSSPEPPSSSEEPEEPPSSRSSPRQPP 244
```

D

```
                                   DnaJ
MCPyV LT MDLVLNRKEREALCKLLEIAPNCYGNIPLMKAAFKRSCLKHHPDKGGNPVIMMELNTLWSKFQQNIHKLRSDFSMFDEVDEAPIYGTTKFKEWWRSGGFS 100
MCPyV LT FGKAYEYGPNPHGTNSRSRKPSSNASRGAPSGSSPPHSQSSSSGYGSFSASQASDSQSRGPDIPPEHHEEPTSSSGSSSREETTNSGRESSTPNGTSVPR 200
                        Rb
MCPyV LT NSSRTDGTWEDLFCDESLSSPEPPSSSEEPEEPPSSRSSPRQPP 244
```

Abbildung 46 Partielle Proteolyse für Massenspektrometrische (MassSpec) Analyse von 90 ng 6xHis-TEV-LT$_{1-244}$-Abbauprodukten. Das Protein war in 10 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 7,5. Die Proteasen wurden mit 10 ng/ 100 µg Protein eingesetzt. (A) Das SDS-Gel zeigt die Zusammenfassung der Proteolyse mit Trypsin, α-Chymotrypsin und Subtilisin, wie auch die Proteinbanden, die in die MassSpec Analyse gegeben wurden. (B) zeigt die Peptide (in rot), die für unverdautes 6xHis-TEV-LT$_{1-244}$ detektiert wurden. (C) zeigt zusammenfassend die detektierten Peptide der Proteinbanden 1, 3 und 4 und (D) die der Bande 5 (in rot).

5.4.10 Kristallisationsscreen mit partieller Proteolyse von 6xHis LT_{1-244}

Nachdem vor allem mit den Proteasen Subtilisin und α-Chymotrypsin stabile Fragmente in der partiellen Proteolyse produziert werden konnten (Kapitel 5.4.7, 5.4.8), wurde ein Kristallisationsscreen mit diesen beiden Proteasen angesetzt. Es wurde gereinigtes 6xHis-LT_{1-244} gegen 25 mM Tris, pH 7,6, 500 mM NaCl dialysiert und auf 8,2 mg/ml konzentriert. Subtilisin wurde mit einer Konzentration von 1 ng/100 µg Protein eingesetzt und Chymotrypsin mit 10 ng/100 µg Protein. Die Kristallisationsscreens mit Subtilisin wurden mit den Kits JCSG Suite, TACT Premium Suite und Morpheus Screen angesetzt und die Screens mit α-Chymotrypsin mit den Kits JCSG Suite und Morpheus Screen. Die Kristallisationsansätze wurden bei 20°C gelagert und die Entstehung von Kristallen über einen Zeitraum von 2 Monaten visuell-mikroskopisch überprüft.

In keinem der Kristallisationsansätze sind Proteinkristalle gewachsen. Da dieser experimentelle Ansatz vielversprechend für die Kristallisation von LT_{NT}-Teilfragmenten ist, sollte in zukünftigen Experimenten der Verdau über einen längeren Zeitraum als 4 Tagen überwacht und die im Kristallisationsscreen eingesetzten Proteinkonzentrationen variiert werden, um eine Sättigung zu erreichen, damit das Protein kristallisieren kann. Außerdem sollte die Temperatur bei denen die Kristallisationsansätze inkubiert werden auf 4°C reduziert werden, da in den TFA-Experimenten gezeigt wurde, dass sich LT_{NT} schon bei niedrigen Temperaturen entfaltet.

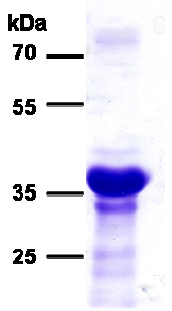


Abbildung 47 Aufgereinigtes 6xHis-LT_{1-244} eingesetzt für Kristallisationsscreens mit partieller Proteolyse

5.4.11 Zusammenfassung

Für die strukturelle und biochemische Analyse des MCPyV LT_{NT} wurde das Protein bakteriell exprimiert und erfolgreich aufgereinigt, genauso wie sein Interaktionspartner pRb und sein SV40 LT_{NT} Analogon.

Während der Aufreinigung von MCPyV LT_{NT} wurde wiederholt festgestellt, dass sich das Protein in Lösung in einem konzentrationsabhängigen Gleichgewicht von Mono- und Multimeren befindet. Aufgrund der Schwierigkeit eine hochkonzentrierte, monodisperse MCPyV LT_{NT} Proteinlösung herzustellen, die für Kristallisationsansätze notwendig ist, sind

die Bedingungen für die Kristallisation dieses Proteins ohne weitere Optimierung ungünstig. Deswegen wurden alternative Ansätze, wie die Komplexbildung mit pRb und die partielle Proteolyse verfolgt. Mit diesen Methoden soll das MCPyV LT_{NT} als vollständiges Protein stabilisiert beziehungsweise stabile MCPyV LT_{NT} Fragmente generiert werden, die sich kristallisieren lassen. Da Strukturdaten von MCPyV LT_{NT} inklusive der MUR und dem LxCxE-Motiv gewonnen werden sollen, ist der Ansatz zur Komplexbildung mit pRb der derzeitig favorisierte. Bei der partiellen Proteolyse konnten keine stabilen Fragmente identifiziert werden, die die MUR enthielten, inklusive LxCxE-Motiv. Letzteres bestätigt die Strukturmodellierungen, in denen Sekundärstrukturen innerhalb der ersten 120 Aminosäuren vorhergesagt wurden. Dass das MCPyV LT_{NT} Protein überhaupt Sekundärstrukturen und in diesem Fall α-Helices enthält, konnte mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen werden.

Die biochemische Analyse hat ergeben, dass MCPyV LT_{NT} eine hochaffine Interaktion mit der pRb *pocket* Domäne eingeht. Diese Interaktion ist ungefähr 40fach stärker als die Interaktion zwischen pRb_{PD} und SV40 LT_{NT}. Der Nachweis dieser direkten, hochaffinen Interaktion, sowie weitere Ergebnisse, die in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Nicole Fischer generiert wurden, tragen maßgeblich zum Verständnis der MCPyV LT_{NT} assoziierten Zelltransformation bei und werden in der Diskussion näher erläutert.

6 Diskussion

6.1 Etablierung eines MCPyV Replikationsassays

MCPyV ist eines von 12 humanen Polyomaviren, vier davon (JCPyV, BKPyV, MCPyV und TSPyV) werden als ätiologisch für verschiedene Krankheiten benannt oder mit deren Entstehung assoziiert. Die ersten beiden identifizierten humanen Polyomaviren, JCPyV und BKPyV, wurden 1971 beschrieben. Erst ab 2007 wurden die anderen Polyomaviren entdeckt, nicht zuletzt aufgrund neuer technischer Möglichkeiten wie Hochdurchsatzverfahren in der Sequenzierung. JCPyV, BKPyV, MCPyV und TSPyV verursachen Krankheiten ausschließlich in immunsupprimierten und immungeschwächten Patienten. Das MCPyV ist bislang das einzige humane Polyomavirus, welches Tumore im eigenen Wirt induzieren kann.

Außer für JCPyV und BKPyV gibt es für keines der anderen humanen PyV ein *in vitro* Replikationssystem, mit dem der Lebenszyklus und die Virus-Wirts-Interakion studiert werden kann. Und selbst bei diesen beiden Viren findet *in vitro* Replikation in optimierten Zellkultursystemen statt [84]. In den etablierten Systemen können infektiöse Viren produziert werden, allerdings dauert die Virusproduktion zwischen 7 und bis zu 32 Tagen und die Virustiter sind niedrig [84,91]. Das ist, verglichen mit der SV40-Replikation und massiver SV40-Partikelproduktion nach 4 Tagen [6], eine deutlich längere Zeitspanne.

Das Replikationssystem und die Vermehrung von SV40 lassen sich im Labor innerhalb kurzer Zeit durchführen. SV40 repliziert, im Gegensatz zu anderen PyV, unter anderem in mehreren Zelllinien der Affengattung Grüne Meerkatzen und produziert infektiöse Virionen [6]. SV40 wird gerne als der Polyomavirus-Prototyp bezeichnet, da es das am besten studierte PyV ist. Jedoch stellt es in vielerlei Hinsicht eher die Ausnahme dar, nicht zuletzt auch wegen seiner einfachen Vermehrung *in vitro* verglichen mit anderen PyV.

Für die Erforschung, wie MCPyV an der MCC-Tumorgenese beteiligt ist, sowie um den Lebenszyklus und die Replikation des Virus zu verstehen, wird ein *in vitro* Replikationssystem benötigt. Zu Beginn dieser Arbeit gab es kein Zellkultursystem, in dem die Biologie von MCPyV hätte studiert werden können.

Für die Etablierung eines solchen Replikationssystems wurden die Experimente mit dem MCPyV-Konsensusplasmid pMCPyV durchgeführt, welches aus den bis Juni 2008 publizierten MCPyV-Sequenzen aus Merkelzellkarzinomen generiert wurde [47]. Diese

Sequenzen enthielten alle Mutationen, die unter anderem zur Expression eines verkürzten LT führten. Die Idee des Konsensus war, ein Genom zu generieren, welches die größtmögliche Übereinstimmung mit den veröffentlichten MCPyV-Sequenzen hat und bei dem alle Mutationen entfernt wurden, die die Expression der viralen Proteine beeinträchtigen. Somit sollte ein Konsensus-Genom geschaffen werden, welches möglichst einem MCPyV-WT entsprechen sollte. Eine während dieser Arbeit erschienene Publikation [85] hat gezeigt, dass pMCPyV identisch ist mit 3 von 20 Wildtypisolaten (17b, 18b, 20b) aus gesunden Individuen. Die anderen Isolate unterscheiden sich teilweise in einzelnen bzw. mehreren Nukleotiden bis hin zu Deletionen und Insertionen (Abbildung 48, [47]). Damit repräsentiert der Konsensus pMCPyV eine Wildtypversion.

Da in den *in vitro* Replikationssystemen für die hPyV JCPyV und BKPyV die Virusreplikation aufwendig und langwierig ist [84,92-94] wurde parallel zu den MCPyV-Experimenten das etablierte *in vitro* Replikationsassay für SV40 in CV-1 Zellen als Kontrolle und Referenz für die angewandten Methoden verwendet. Dies ist möglich, da sich Polyomaviren in ihrer Genomstruktur und -größe sehr ähnlich sind und unter der Annahme, dass die Expression homologer Proteine in der gleichen Reihenfolge abläuft. Zumindest SV40, JCPyV und BKPyV durchlaufen die frühe Transkription, DNA-Replikation und späte Transkription in dieser Abfolge [4].

In unserem Labor wurde das SV40-Replikationassay erfolgreich etabliert. Es wurden verschiedene Phasen der Replikation nachgewiesen, wie *de novo* synthetisierte SV40 DNA, sowie exprimiertes LT und VP1. Des Weiteren konnten ein CPE, serielle Transmission und Viruspartikel innerhalb von 5 Tagen nach Infektion und bis zu 11 Tagen nach Transfektion detektiert werden.

Bei MCC handelt es sich um einen Hautkrebs und eine Hypothese ist, dass MCPyV in Hautzellen repliziert. Deswegen wurden verschiedene Zelllinien benutzt, um ein möglichst breites Spektrum an dermalen und epithelialen Zellen abzudecken. Für das Replikationssystem wurden zehn Zelllinien darauf getestet, ob sie permissiv für die virale DNA-Replikation sind, sowie virale Gene exprimieren und Viruspartikel sich in ihnen bilden können. Das pMCPyV konnte in alle Zelllinien transfiziert werden, jedoch mit unterschiedlichen Transfektionseffizienzen (12-50%). Von diesen elf Zelllinien waren vier, HDF, PFSK-1, HEK293 und H1299, permissiv für die virale DNA-Replikation. Der Großteil der getesteten Zelllinien war für die DNA-Replikation unter den verwendeten Bedingungen nicht permissiv.

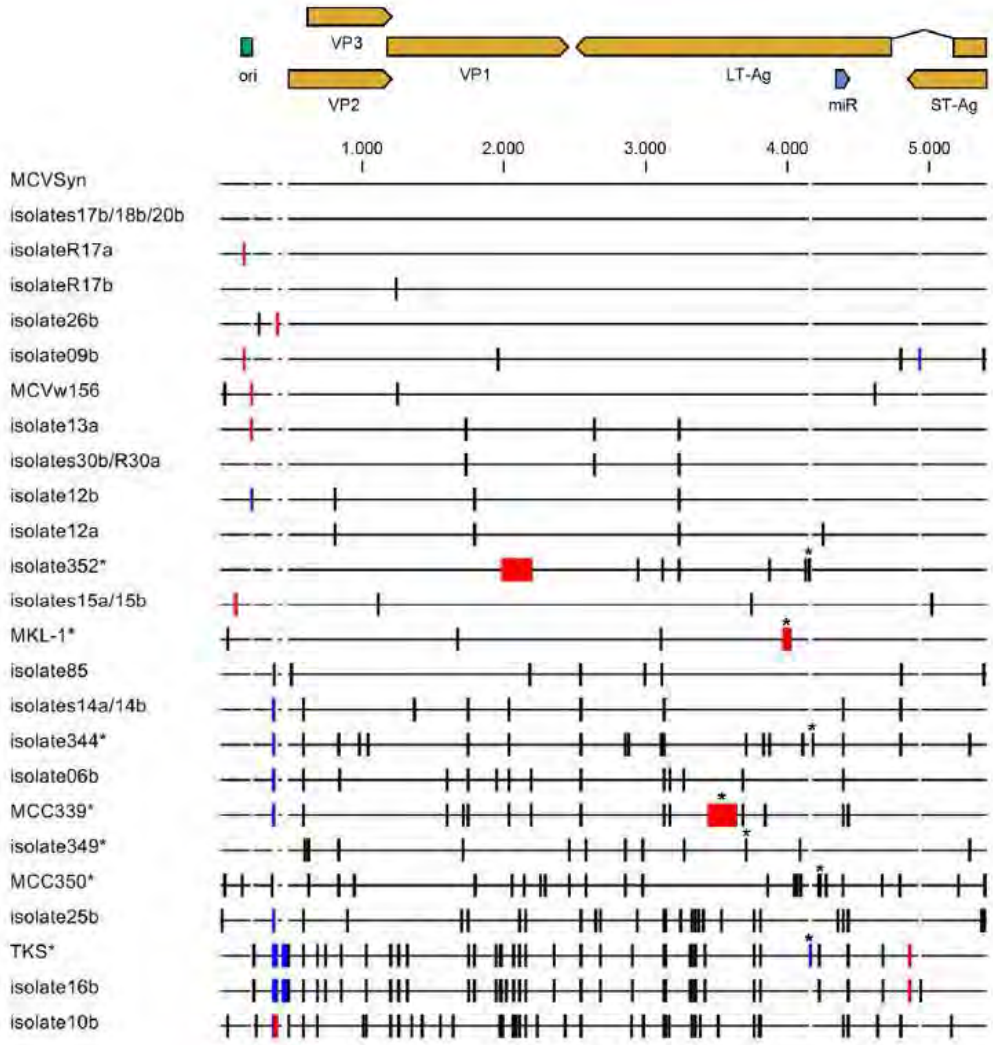


Abbildung 48 Alignment von pMCPyV (MCVSyn) und kompletten Wildtyp MCPyV-Sequenzen. Es wurden alle bis Juni 2008 verfügbaren Volllängensequenzen herangezogen. pMCPyV (MCVSyn) ist identisch mit den Isolaten 17b, 18b und 20b. Nukleotidaustausche sind mit schwarzen Balken, Deletionen mit roten Balken und Insertionen mit blauen Balken markiert. Sternchen (*) weisen auf Stopmutationen hin. Abbildung aus [47].

In drei dieser Zelllinien, PFSK-1, HEK293 und H1299, konnte exprimiertes LT-Antigen nachgewiesen werden [47]. Abbildung 49 präsentiert die detektierte LT-Expression und die dazugehörige DNA-Replikation. Offensichtlich ist, dass die LT-Expression über den beobachteten Zeitraum abnimmt, was sich dadurch erklären lässt, dass LT in den ersten Tagen nach Transfektion von dem transfizierten pMCPyV transkribiert wurde. In der Southern Blot Analyse wurde transfizierte DNA noch bis mindestens Tag 4 nach Transfektion detektiert.

Dass LT nicht in HDF Zellen nachgewiesen werden konnte, könnte an der limitierten Sensitivität der Western Blot Analyse liegen, denn LT ist essentiell für die Induktion der viralen DNA-Replikation, welche in HDF-Zellen detektiert wurde. Aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen ist ein Vergleich der Mengen replizierter DNA, wie auch exprimierten LTs nur bedingt zulässig und es kann kein Vergleich über die Effektivität der Replikation in den verschiedenen Zelllinien gezogen werden.

Der Großteil der getesteten Zelllinien war für die DNA-Replikation nicht permissiv. Ob das an Zellfaktoren lag, die entweder auf die frühe Transkription oder auf die Replikation inhibierend wirken, konnte nicht geklärt werden.

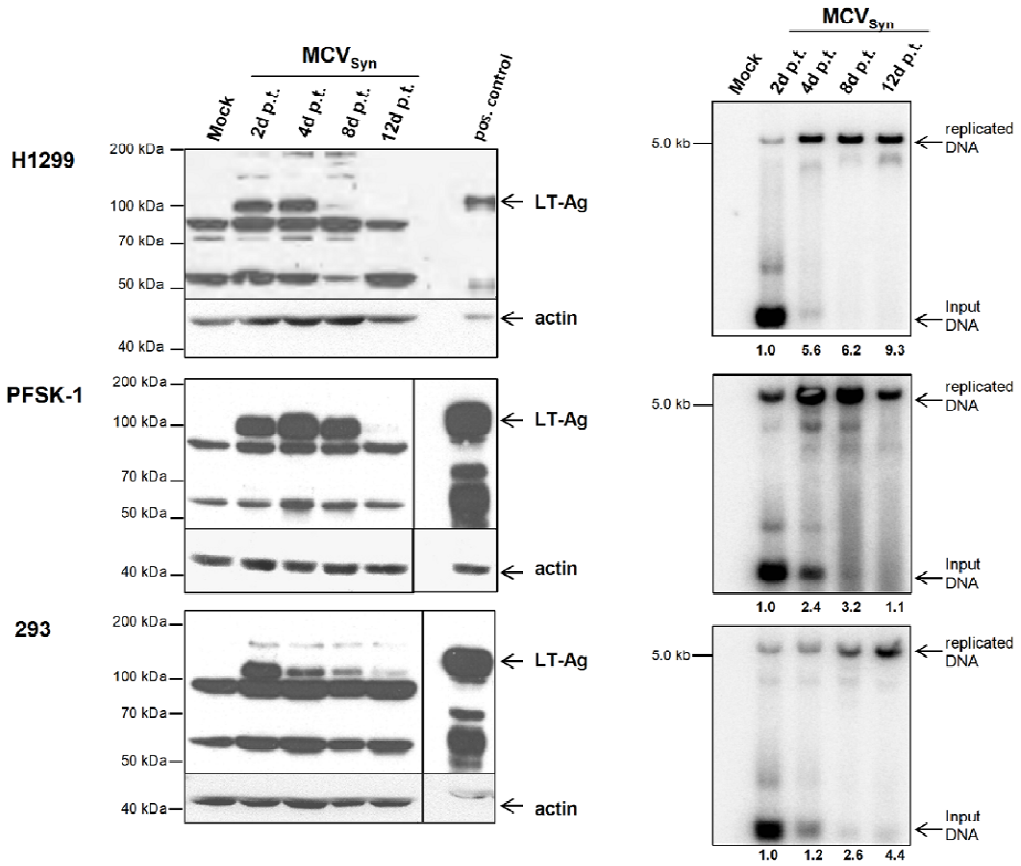


Abbildung 49 LT-Expression und DNA-Replikation in den humanen Zelllinien H1299, PFSK-1 und HEK293. Die Zellen wurden mit pMCPyV transfiziert, zu den genannten Zeitpunkten lysiert und das Lysat auf die Expression von LT analysiert (rechts). Aktin wurde als Ladekontrolle für gleiche Proteinmengen detektiert. Zusätzlich wurde niedermolekulare DNA aufgearbeitet und im Southern Blot analysiert (rechts). Abbildung aus [47].

Um zu überprüfen, ob in transfizierten PFSK-1-, HEK293-, und H1299-Zellen auch die späte Transkription stattfindet, wurde die VP1-Expression per Immunfluoreszenz untersucht. Das Strukturprotein VP1 wurde in PFSK-1 und H1299 Zellen detektiert (Abbildung 50B+C) [47].

Auch hier wurde das SV40-Replikationssystem in Parallelversuchen durchgeführt und VP1 nachgewiesen (Abbildung 50A). In allen drei Zellen lokalisierte VP1 im Zellkern, dem Ort der Kapsidzusammensetzung, in SV40 an der Kernmembran und bei PFSK-1 und H1299 im gesamten Nukleoplasma.

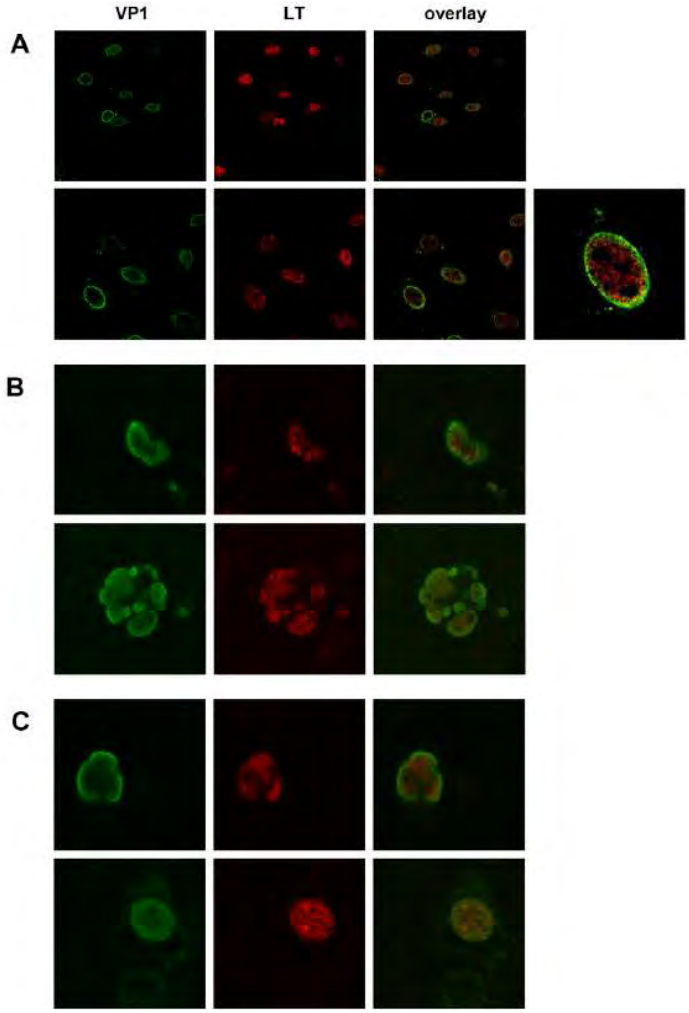


Abbildung 50 VP1 und LT Expression in Zellen transfiziert mit PlasmidDNA. (A) CV1-Zellen 4 d p.t. mit pSV40, (B) H1299-Zellen und (C) PFSK-1-Zellen 4 d p.t. mit pMCPyV. VP1 und LT sind im Zellkern detektiert. Abbildung aus [47].

Nachdem in den mit pMCPyV transfizierten PFSK-1- und H1299-Zellen sowohl LT, VP1 wie auch DNA-Replikation nachgewiesen werden konnte, aber kein CPE zu sehen war, ganz im Gegensatz zu pSV40, wurde vermutet, dass Viruspartikel produziert, jedoch nicht durch Lyse freigesetzt wurden. Mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation und anschließender EM von Lysaten pMCPyV transfizierter PFSK-1- und H1299-Zellen wurden, im Vergleich zu SV40, geringe Mengen an Viruspartikel detektiert (Abbildung 13, Ergebnisse).

Weiterhin konnte mithilfe der Elektronenmikroskopie von transfizierten Zellen gezeigt werden, dass im Vergleich zum SV40 Replikationssystem wesentlich weniger MCPyV Partikel in Zellen vorlagen, sowie wenige Zellen überhaupt Partikel enthielten [47]. Da es nicht gelungen ist, mit den aus der Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Partikeln Zellen zu infizieren, bleibt die Frage nach der Qualität der Partikel offen, d.h. ob die isolierten Viruspartikel reif waren und die MCPyV-DNA korrekt in die Partikel verpackt war. Außerdem kann es sein, dass die verwendeten Zelllinien nicht die für eine MCPyV-Infektion benötigten Rezeptoren exprimieren.

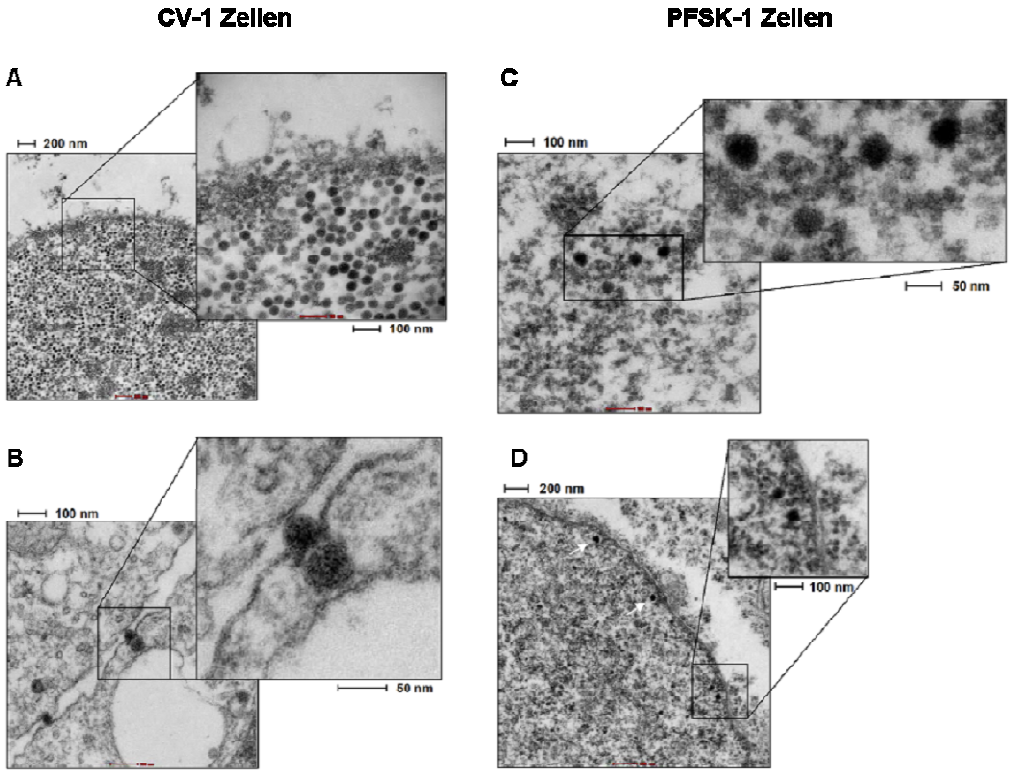


Abbildung 51 Elektronenmikroskopische Aufnahme von SV40-Virionen in CV-1 Zellen (A, B) und MCPyV-Virionen in PFSK-1 Zellen (C, D). Die Zellen wurden mit pSV40 bzw. pMCPyV transfiziert und 4 d p.t. bzw. 8 d p.t. fixiert und im EM analysiert. (A) Dicht gepackte SV40-Viruspartikel im Zellkern und (B) im interzellularen Raum. (C, D) MCPyV-Viruspartikel wurden in 1 von ~50 Zellkernen beobachtet. Abbildung modifiziert aus [47]

Wie bereits oben erwähnt, sind die Replikationssysteme für JCPyV und BKPyV optimierte Systeme. In einer der permissiven Zelllinien (HEK293TT) werden die T-Antigene von SV40 ko-exprimiert, was zu einer höheren Ausbeute an Viruspartikeln führt [84]. Es wurde bereits gezeigt, dass SV40 LT nicht die DNA-Replikation von MCPyV initiieren kann [38], daher wären SV40 T-Antigene keine MCPyV-Replikationsverstärker. Wir konnten in unseren Experimenten DNA-Replikation in HEK293-Zellen jedoch nicht in HEK293T-Zellen detektieren [47]. Daher ist zu vermuten, dass SV40 LT eher einen inhibierenden Effekt auf

die Replikation hat. Während der Etablierung und Optimierung des Replikationssystems wurde versucht die DNA-Replikation zu verstärken indem der gesamte MCPyV T-Antigenlokus stabil in HEK293-Zellen ko-exprimiert wurde. Das führte zu einer deutlichen Erhöhung der replizierten DNA, jedoch wurden weder ein CPE oder Zell-zu-Zell-Transmission beobachtet noch infektiöser Überstand produziert [47]. Wie sich eine solche konstitutive Überexpression in anderen Zelllinien auswirkt bleibt noch zu überprüfen. Die Überexpression von LT oder sT wurde bereits von anderen Gruppen untersucht und es wurde gezeigt, dass sT eine unterstützende, förderliche Rolle in der DNA-Replikation spielt [18,45].

Auch bleibt zu klären, ob die spezifische Lokalisation von VP1 im Zellkern (an der Kernmembran oder diffus im Kern) entscheidend für die Partikelzusammensetzung ist oder ob das wahrscheinlich nicht exprimierte VP3 [20] für eine funktionelle Kapsidzusammensetzung fehlt.

Während in unserem Labor die beschriebenen Experimente zur Etablierung eines MCPyV-Replikationssystems durchgeführt wurden, sind zwei wissenschaftliche Studien veröffentlicht worden, die sich auch mit der Etablierung eines solchen Systems beschäftigen [13,45]. Feng und Kollegen haben einen ähnlichen experimentellen Ansatz wie wir gewählt und haben ein synthetisches MCPyV-Genom generiert, dessen Sequenz Wildtyp-Isolaten (WT-Isolate 17b, 18b, 20b aus [85]) entspricht und mit dem hier verwendeten pMCPyV identisch ist. Sie konnten in ihrem System auch die frühe Transkription, die DNA-Replikation und die späte Transkription von MCPyV detektieren und Partikel isolieren. Jedoch war es auch ihnen nicht möglich, mit den isolierten Partikeln Zellen zu infizieren [45]. Schowalter und Kollegen hingegen haben versucht mit selbst generierten, stabil transfizierten Zelllinien, der 293TT- und der 293-4T-Zelllinie [13,76], ein optimiertes Replikationssystem zu etablieren. Diese Zelllinien kodieren neben dem SV40 LT-Gen noch für eine weitere Kopie von SV40 LT und im Fall von 293-4T zusätzlich noch für MCPyV sT und LT. Die Wissenschaftler haben MCPyV-Partikel in 293TT-Zellen ähnlich wie wir produziert, anschließend aufgereinigt und aufkonzentriert. Mit den Viruspartikeln wurden 293-4T-Zellen infiziert und eine Anreicherung von MCPyV-DNA mithilfe quantitativer PCR in diesen Zellen detektiert, was auf eine erfolgreiche Infektion schließen lässt [13]. Die infizierten Zellen wurden über einen Zeitraum von 25 Tagen 5mal passagiert, wobei bei jeder Passage ungefähr gleich viele virale Genomkopien detektiert wurden, was nicht für eine effiziente aber kontinuierliche Virusvermehrung spricht. Während unsere Arbeitsgruppe sowie Feng und Kollegen mit identischen Klonen, die den WT-Isolaten 17b, 18b, 20b entsprechen gearbeitet haben [45,47], wurde von Schowalter und Kollegen das WT-Isolat R17a benutzt. R17a hat im Vergleich zu 17b, 18b und 20b eine einzige Nukleotiddeletion in der nicht-kodierenden Region. Aus Experimenten mit JCPyV weiß man, dass Klone, die sich in der nicht-kodierenden Region unterscheiden, unterschiedliche Replikationseigenschaften haben

können. Daher wäre es interessant zu sehen, wie sich das hier verwendete MCPyV Genom (pMCPyV) in 293-4T Zellen verhält.

Mit den hier präsentierten, sowie weiteren in der Arbeitsgruppe erlangten Ergebnissen [47] konnten Zelllinien identifiziert werden, in denen die initialen Abschnitte des MCPyV-Replikationszyklus analysiert werden können. Damit wurde ein semi-permissives Replikationssystem etabliert, welches erlaubt die DNA-Replikation zu untersuchen, sowie zelluläre Faktoren zu identifizieren, die mit den exprimierten Virusproteinen LT, sT und VP1 interagieren und wie diese sich gegenseitig beeinflussen. Des Weiteren können in diesem System Mutationsstudien mit den T-Antigenen durchgeführt werden. Damit besteht die Möglichkeit, die Merkelzellpolyomavirus-Replikation weitergehend zu untersuchen, Replikationsblockaden in den Zellen zu identifizieren sowie Studien durchzuführen, die die Rolle von MCPyV in der MCC-Tumorgenese aufklären können. Ein vollständig permissives Zellkultursystem inklusive serieller Transmission wurde bisher noch nicht veröffentlicht.

6.2 Biochemische Analyse von MCPyV LT_{NT} identifiziert hochaffine Bindung mit der pRb *pocket* Domäne

In MCC-Tumoren befinden sich MCC-spezifische Stopmutationen im MCPyV-Genom, die zur Expression eines verkürzten LT-Antigens führen [21,38]. Bei allen verkürzten LT-Antigenen ist das LxCxE-Motiv erhalten und die Stopmutation befindet sich C-terminal davon (siehe Abbildung 6, Einleitung). Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass es eine statistisch signifikante positive Selektion für den LT N-Terminus mit dem LxCxE-Motiv in der MCC-Tumorgenese gibt, wohingegen das Vorhandensein der Kernlokalisierungssequenz C-terminal vom LxCxE-Motiv statistisch nicht relevant für die MCC-Tumorgenese ist [21]. Weiterhin haben wir gezeigt, dass sowohl das Volllängen-LT wie auch der LT N-Terminus in der Lage sind, die Transformation von primären Babyrattenzellen zu induzieren, wobei die Transformation mit dem LT N-Terminus effizienter ist [21].

Die statistische Relevanz zum Erhalt des LxCxE-Motivs und die Fähigkeit von LT_{NT} Transformation zu induzieren, impliziert, dass die Interaktion mit pRb wichtig für die Transformation und Tumorgenese des Merkelzellkarzinoms ist.

Unsere Arbeitsgruppe sowie Shuda und Kollegen haben in Ko-Präzipitationsexperimenten gezeigt, dass MCPyV LT_{NT} und die pRb miteinander präzipitiert werden [21,38]. Wir konnten außerdem zeigen, dass die in MCC-Geweben exprimierten LT N-Termini mehr pRb präzipitieren als das Volllängenprotein [21]. Aufgrund des konservierten LxCxE-Bindemotivs war anzunehmen, dass es sich um eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen handelt. In dieser Arbeit sollte die Affinität zwischen MCPyV LT_{NT} und der pRb *pocket*

Domäne quantifiziert werden. Die hier präsentierten MST-Daten bestätigen nicht nur eine direkte Interaktion. Sie zeigen auch, dass es sich um eine hochaffine Interaktion mit einem K_D-Wert im unteren nanomolaren Bereich handelt. Parallel wurde auch die Affinität zwischen SV40 LT_{1-117} und pRb_{PD} bestimmt. Die K_D-Werte beider Interaktionen unterscheiden sich ungefähr um Faktor 40 und verdeutlichen, dass MCPyV LT_{NT} stärker mit pRb_{PD} interagiert. SV40 LT wird natürlicherweise nicht als N-terminales Fragment in Zellen exprimiert, sondern als komplettes Protein. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der C-Terminus einen Einfluss auf die Affinität zu pRb hat. In dieser Studie konnten die Affinitäten der Volllängen-LTs mit pRb_{PD} nicht quantifiziert werden, da beide Proteine nicht ausreichend in Bakterien exprimiert werden.

Allerdings konnten wir in Experimenten, wo die Rb-abhängige E2F-Transkription in Anwesenheit von LT-Konstrukten untersucht wurde, zeigen, dass durch die Interaktion von MCPyV LT_{NT} mit Rb eine höhere E2F-abhängige Transkriptionsaktivität gemessen wurde, als in Anwesenheit von SV40 LT [21]. Das bedeutet, dass durch die Anwesenheit von MCPyV LT_{NT} mehr Rb gebunden wird und folglich mehr E2F-abhängige Transkription stattfindet, als im Vergleich mit SV40 LT. Dieses Ergebnis impliziert, dass auch das Volllängen SV40 LT eine niedrigere Affinität zu Rb hat als MCPyV LT_{NT}. Eine Quantifizierung steht aus oben genannten Gründen noch aus.

Vergleicht man die LxCxE-Motive von MCPyV und Sv40 LT, so unterscheiden sie sich in einer Aminosäure an Position 4, die MCPyV Asparaginsäure (D) ist an der Stelle bei SV40 ein Serin (S) (Abbildung 52A). Aufgrund der negativen Ladung der Asparaginsäure gegenüber dem polarisierten Serin lässt sich der gravierende Affinitätsunterschied noch nicht erklären. Aus der Strukturauflösung des Komplexes SV40/pRb_{PD} ist bekannt, dass noch weitere Aminosäuren des SV40 LT mit der *pocket* Domäne des pRb interagieren [61] (Abbildung 53). Zwei dieser Aminosäuren befinden sich im Bereich der zweiten α-Helix sowie weitere Aminosäuren die das LxCxE-Bindemotiv flankieren, welches direkt C-terminal an die vierte α-Helix anschließt. Das LxCxE-Bindemotiv legt sich an die pRb-Box B in dessen LxCxE-Interaktionsstelle (Abbildung 53, Abbildung 7 Einleitung), wobei die α-Helices eher von pRb wegzeigen und der C-terminale Part an der B-Box liegt und partiell an sie bindet [61] (Abbildung 53). Singh und Kollegen haben eine detaillierte Studie über die LxCxE-Bindemotive verschiedener zellulärer wie auch viraler Proteine durchgeführt, indem sie die entsprechenden Peptidsequenzen synthetisiert und

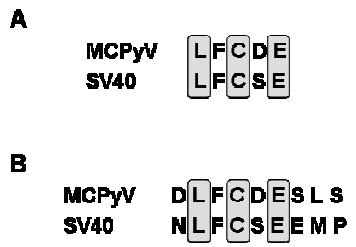


Abbildung 52 Vergleich der MCPyV und SV40 LxCxE-Bindemotive und der flankierenden Aminosäuren.

deren Affinität zu pRb mithilfe der isothermen Titrationskalorimetrie bestimmt haben [95]. Dabei haben sie für das SV40 LT LxCxE-Peptid einen K_D-Wert von 440 nM ± 6 nM bestimmt, was ungefähr der doppelten bis dreifachen Affinität entspricht, die wir gemessen haben, allerdings sind die Werte aufgrund der unterschiedlichen Methoden nur bedingt vergleichbar. Anhand der Ergebnisse dieser Studie wurde außerdem postuliert, dass die das LxCxE-Motiv flankierenden Aminosäuren direkten Einfluss auf die Affinität zu pRb haben. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei einer Sequenz von „xLxCxExxx“, wo „x“ keine positiv geladene Seitenkette und „x“ bevorzugt eine hydrophobe Seitenkette haben sollte, es eine starke Affinität mit pRb ergibt. Sowohl die Sequenz des MCPyV LT, wie auch die des SV40 LT entsprechen dieser Hypothese (Abbildung 52B).

Betrachtet man die beiden Peptidsequenzen, so befindet sich jeweils an erster und fünfter Position des MCPyV Peptids eine negativ geladene Asparaginsäure (D) gegenüber ungeladenem polarem Asparagin (N) beziehungsweise Serin (S) bei SV40. Die LxCxE-Interaktionsstelle von pRb ist umgeben von mehreren positiv geladenen Lysinen, daher könnte das die Bindung zum MCPyV LxCxE-Peptid verstärken und die höhere Affinität erklären. Allerdings hat das MCPyV Peptid an Position sieben und neun zwei Serine mit kurzen Seitenketten, die für eine größere Flexibilität sprechen als die Glutaminsäure (E) und das Prolin (P) an den entsprechenden Positionen bei SV40.

Außerdem haben Singh und Kollegen postuliert, dass ein LxCxE-Motiv, das Teil einer Sekundärstruktur ist, in einer strukturellen Konformation vorliegt, die nicht optimal für die Interaktion mit pRb ist [95]. Bei SV40 ist das LxCxE-Motiv in unmittelbarer Nachbarschaft zur vierten α-Helix und könnte dadurch an einer intensiveren Bindung gehindert werden.

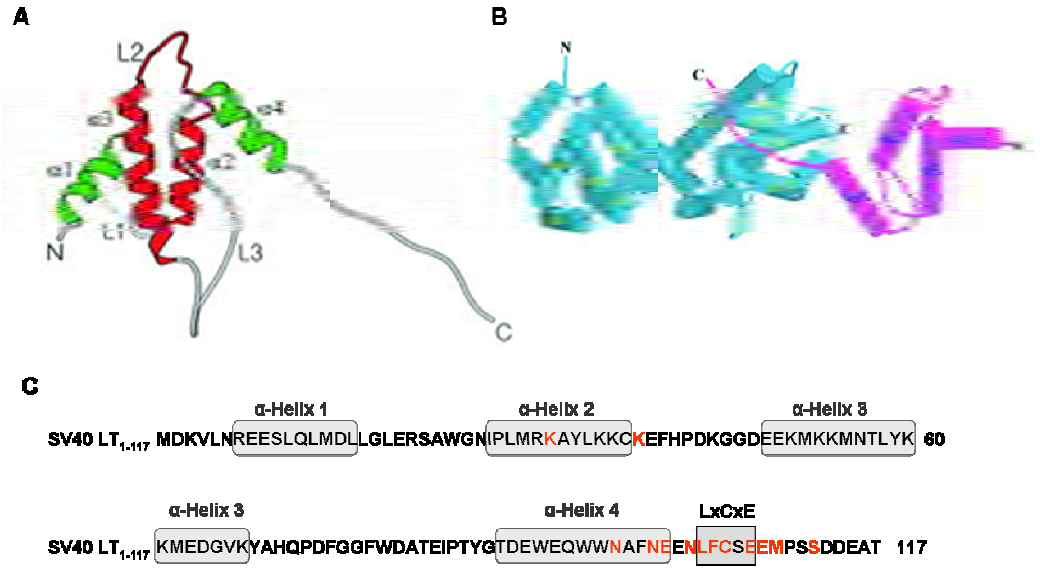


Abbildung 53 Schematische Struktur von SV40 LT_{1-117} allein (A) und im Komplex mit pRb_{PD} (B). SV40 LT_{1-117} bindet an pRb_{PD} über das LxCxE-Motiv C-terminal der vierten α-Helix. (C) SV40 LT_{1-117} Aminosäuresequenz. Es sind die vier α-Helices und das LxCxE-Bindemotiv in Kästen hervorgehoben. Die rot-markierten Aminosäuren wurden in der Kristallstruktur als mit pRb_{PD} interagierende Aminosäuren identifiziert. Abbildungen modifiziert nach [61].

Ob die hier aufgezählten Unterschiede dafür verantwortlich und wenn ja allein verantwortlich sind, dass MCPyV LT_{NT} stärker an pRb_{PD} bindet als SV40, wäre ein Ziel zukünftiger Interaktionsstudien. Da für SV40 gezeigt wurde, dass auch andere Aminsäuren als die das LxCxE-Bindemotiv flankierenden mit pRb interagieren, könnte es bei MCPyV LT_{NT} ähnlich sein. Gerade die das LxCxE-Bindemotiv flankierende MUR mit ungefähr 200 Aminosäuren könnte dabei eine entscheidende Rolle spielen. Aber auch das ließe sich nur durch weiterführende Experimente wie Deletionsstudien und der Aufklärung der Komplexstruktur klären.

Da, wie in der Einleitung erwähnt, auch die anderen Proteine der *pocket* Familie, p107 und p130, an die LT-Antigene von SV40 und JCPyV binden können, sollte dies auch für MCPyV LT getestet werden. Eine solche Interaktion könnte eine wichtige und ergänzende Rolle während der Transformation spielen.

Zusammenfassend wurde mit den hier präsentierten Ergebnisse gezeigt, dass die in Merkelzelltumoren exprimierten verkürzten MCPyV LT-Antigen transformierende Eigenschaften besitzen, die auf die hochaffine Interaktion des Proteins mit dem Retinoblastomaprotein zurückzuführen sind. Damit ist die Interaktion zwischen MCPyV LT_{NT}

und dem Retinoblastomaprotein ein vielversprechender Angriffspunkt einer MCPyV-orientierten MCC-Therapie.

6.3 Strukturelle Analyse von MCPyV LT_{NT}

Die Ergebnisse zur Interaktion von MCPyV LT_{NT} mit der pRb_{PD} bieten eine Erklärung für die hohe Transformationseffizienz der verkürzten LT-Proteine, obwohl sie nicht mehr in der Lage sind p53 direkt oder indirekt zu binden. Damit wird die Hypothese unterstützt, dass MCPyV LT_{NT} eine wichtige Rolle in der Tumorgenese von MCC spielt. Da LT_{NT} in den meisten MCC-Tumoren exprimiert wird, eignet es sich als Zielobjekt einer möglichen MCC-Therapie. Hierfür würden sich Moleküle anbieten, die LT_{NT} „inaktivieren“ bzw. die Interaktion mit zellulären Proteinen inhibieren. Solche Moleküle werden häufig entweder in Hochdurchsatzverfahren mit Wirkstoff- und Molekülbibliotheken ermittelt oder anhand von molekularen Strukturen des Zielproteins bioinformatisch modelliert und anschließend synthetisiert. Ein Ziel dieser Doktorarbeit war es, LT_{NT} zu kristallisieren und Strukturdaten zu generieren, die für die Modellierung von Inhibitoren benötigt werden.

In den durchgeführten Experimenten konnte LT_{NT} erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden. Jedoch wurden häufig 60 kDa und 70 kDa große bakterielle Proteine ko-aufgereinigt, die für eine Verunreinigung der Proteinlösung sorgten. Diese Proteine wurden massenspektrometrisch untersucht. Eines der identifizierten Proteine ist das *E. coli* Protein Dnak, ein Mitglied der Hsp70-Proteinfamilie. Es ist bekannt, dass die DnaJ-Domäne humanes Hsp70 bindet. Aufgrund der hohen Strukturhomologie innerhalb der Hsp70-Familie, wird vermutet, dass die DnaJ-Domäne auch bakterielles Hsp70 bindet und es deshalb in der Aufreinigung nicht von LT_{NT} getrennt wurde. Hsp70, wenn es nicht mit Substratpeptiden interagiert, ist es mit ATP assoziiert. Deswegen wurde versucht Hsp70 während der Proteinaufreinigung durch einen Waschschritt mit ATP zu entfernen und dadurch von LT_{NT} zu lösen. Dadurch konnte der Anteil von Hsp70 reduziert, aber nicht vollständig entfernt werden. Das zweite in der Massenspektrometrie identifizierte Protein war Glucosamine-Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferase. Dieses Enzym ist Teil der Glukosaminsynthese. Warum es bei der Aufreinigung mit eluiert wurde und ob es direkt mit LT_{NT} interagiert, darüber kann hier keine Aussage gemacht werden.

Neben den Verunreinigungen durch die genannten Proteine, wurde ein konzentrationsabhängiges Gleichgewicht zwischen LT_{NT} Mono- und Multimeren beobachtet. Je höher die LT_{NT}-Proteinkonzentration, desto mehr Multimere entstehen. Multidisperse Proteinlösungen sind an sich nicht für die Kristallisation geeignet. Da jedoch mithilfe der CD-Spektroskopie gezeigt wurde, dass in der Proteinlösung α-helikale Sekundärstrukturen vorhanden und demnach die Proteine weiterhin gefaltet waren, unabhängig von der

Konzentration, wurden initiale Kristallisationsscreens bei Raumtemperatur durchgeführt. Da sich bei einer Kristallisation aufgrund von Diffusionsprozessen die Gleichgewichte zwischen der Proteinlösung und dem Pufferreservoir verschieben, hätte es sein können, dass die Monomere die Kristallkeimbildung anstoßen und sich das Gleichgewicht in Richtung Monomere verlagert. In den angesetzten Screens haben sich jedoch keine Proteinkristalle gebildet und es ist wahrscheinlich, dass zum einen die Gesamtproteinmenge zu gering war und die Multimere nicht förderlich für die Keimbildung und damit die Kristallbildung sind.

Mit Ausnahme von wenigen Molekülen formen Proteine keine Kristalle in ihrer natürlichen Umgebung. Die Voraussetzung für eine Kristallisation ist ein in Lösung vorliegendes gefaltetes Protein. Das Protein muss in der übersättigten Phase vorliegen, d.h. so hoch konzentriert sein, dass es nicht ausfällt, aber zur Keimbildung eines Kristalls kommt (Abbildung 54 links). Um eine Keimbildung zu erreichen, werden mit dem konzentrierten Protein initiale Kristallisationsscreens durchführt, bei denen Bedingungen identifiziert werden, die zu einer Keimbildung eines Proteinkristalls führen. Von diesen Bedingungen ausgehend, werden einzelne Variablen, wie Puffer, pH, Temperatur etc. optimiert (Abbildung 54 rechts), um einen Proteinkristall zu erhalten, der groß genug und von einer solchen Qualität ist, dass dessen Struktur aufgelöst werden kann.

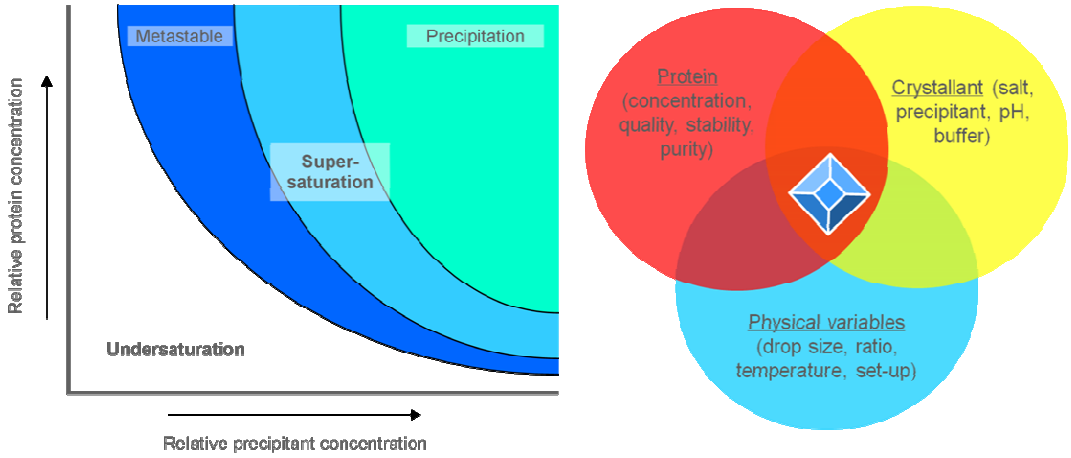


Abbildung 54 Schematische Darstellung eines Proteinkristallisation-Phasendiagramms (links) und der Variablen, die Einfluss auf die Kristallisation haben (rechts). Für die Kristallisation sollten sich die Proteine in der übersättigten Phase (*super saturation*) befinden, damit es zur Keimbildung kommt. Sind die Proteine nicht konzentriert genug, dann bleiben sie in Lösung, sind sie zu hoch konzentriert, präzipitieren sie. Für die Optimierung von Kristallisationsbedingungen können die rechts dargestellten Variablen angepasst werden (Abbildung aus www.crystal.csiro.au, 6.12.2013).

Über 60% der aufgereinigten Proteine, die für Kristallisationsversuche vorgesehen sind, formen keine Proteinkristalle, 30% bilden Proteinkristalle und von diesen bildet nur die Hälfte Proteinkristalle, mit denen auswertbare Strukturdaten gewonnen werden [80,96]. Aufgrund dieser niedrigen Erfolgsrate versuchen Wissenschaftler einzelne Domänen zu kristallisieren, Kristallisationsansätze zu optimieren bzw. die Proteine durch Interaktionspartner zu stabilisieren.

Mit den bis dahin gewonnenen Erkenntnissen zur Aufreinigung und Kristallisation von LT_{NT} ließ sich folgern, dass das Protein in der aufgereinigten Form sowohl als Multimer, wie auch als Monomer vorliegt und sich nicht ohne weiteres auf dem konventionellen Weg kristallisieren lässt, obwohl stabil gefaltete Regionen im Protein vorhanden sind. Folglich musste der Ansatz optimiert oder die Methode verändert werden. In diesem Fall wurde letzteres versucht.

Zum einen sollte durch *in situ* Proteolyse und partiellem Verdau von LT_{NT} stabil gefaltete Domänen des Proteins produziert werden, die sich leichter kristallisieren lassen. Zum anderen wurde versucht LT_{NT} durch den Interaktionspartner pRb_{PD} zu stabilisieren.

In den Experimenten mit der partiellen Proteolyse wurden verschiedene Proteasen und Pufferbedingungen getestet. Dabei konnten Reaktionsbedingungen etabliert werden, bei denen die proteolytischen Ansätze in stabilen Proteinfragmenten mit Molekulargrößen von ungefähr 15 und 20 kDa resultierten. Diese stabil gefalteten Fragmente enthielten ausschließlich Peptidsequenzen bis Aminosäure 127 des LT_{NT} und damit auch die DnaJ-Domäne. Peptide, die Sequenzen der MUR und des LxCxE-Motivs enthielten wurden nicht gemessen. Mit den etablierten Bedingungen wurden initiale Kristallisationsscreens angesetzt, jedoch sind keine Proteinkristalle gewachsen. Wahrscheinlich war die Proteinkonzentration vor Zugabe der Proteasen zu gering, als dass die Fragmente konzentriert genug waren, um die Keimbildung zu initiieren. In zukünftigen Experimenten muss geprüft werden, ob sich die Fragmente möglicherweise in einer Gelfiltration aufreinigen lassen, um anschließend in Kristallisationsscreens eingesetzt zu werden. Außerdem sollten verschiedene Proteinkonzentrationen getestet werden, damit optimale Bedingungen für die Keimbildung eines Kristalls geschaffen werden (siehe Abbildung 54). Mit dieser Methode könnten Kristallstrukturen des äußersten LT N-Terminus inklusive der DnaJ-Domäne gezüchtet werden.

Die andere Methode, Strukturdaten über den LT_{NT} zu erhalten ist, die Stabilisierung des Proteins durch pRb. Das hätte den entscheidenden Vorteil, dass die MUR inklusive des LxCxE-Motivs erhalten bliebe und Strukturinformationen für den gesamten LT_{NT} generiert würden. Die Experimente zur Komplexbildung haben gezeigt, dass pRb_{PD} den LT N-Terminus stabilisiert und der Komplex auch über einen längeren Zeitraum stabil ist. Zukünftig

müssten Pufferbedingungen etabliert werden, bei denen sich der Komplex auch aufkonzentrieren lässt, ohne dass Protein ausfällt. Die MST-Experimente haben gezeigt, dass die Affinität bei niedrigen Salzkonzentrationen höher ist, was sicherlich auch für eine erfolgreiche Kristallisation spricht. Ob diese Bedingungen auch günstig für hohe Proteinkonzentrationen sind, muss getestet werden.

Zusätzlich zu den Komplexbildungsexperimenten wurde die Ko-Aufreinigung beider Proteine mithilfe der Glutathion Sepharose erfolgreich durchgeführt. Beide Proteine konnten als Komplex von der Matrix eluiert werden. Hier ist zu betonen, dass die Proteinlösung im Vergleich zu Experimenten, wo LT_{NT} separat aufgereinigt wurde, eine deutlich verbesserte Reinheit hatte. In zukünftigen Experimenten sollte der GST-*Tag* von GST-pRb_{PD} entfernt und anschließend die Stabilität des Komplexes geprüft werden. Aufgrund der Ergebnisse der Komplexbildungsexperimente ist jedoch davon auszugehen, dass sich an der Stabilität des Komplexes grundlegend nichts ändern wird.

Für zukünftige Kristallisationsexperimente ist zu beachten, dass anhand der Ergebnisse aus den TFA Experimenten, bei denen eine Entfaltung von MCPyV LT_{NT} bereits bei Temperaturen unter 15°C beobachtet wurde, Kristallisationsexperimente eher bei 4°C durchgeführt werden sollten, als bei Raumtemperatur.

Abschließend lässt sich festhalten, dass von den hier erwähnten experimentellen Ansätzen die erfolgsversprechenste Methode für die Generierung von LT_{NT}-Strukturdaten die Ko-Kristallisation mit pRb_{PD} ist. Es konnte gezeigt werden, dass der Komplex stabil und die Interaktion, laut der MST-Daten, zwischen beiden Proteinen hochaffin ist. Im Vergleich mit SV40 LT_{NT}, welches bereits mit pRb_{PD} kristallisiert wurde [61], hat MCPyV LT_{NT} eine deutlich höhere Affinität zu $pRb_{PD.}$ Das bedeutet nicht zwangsläufig, dass der Komplex deswegen erfolgreich kristallisiert, aber es ist ein starkes Indiz dafür.

7 Literatur

1. Gross L (1953) A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. Proc Soc Exp Biol Med 83: 414-421.

2. Stewart SE, Eddy BE, Borgese N (1958) Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. J Natl Cancer Inst 20: 1223-1243.

3. Sweet BH, Hilleman MR (1960) The vacuolating virus, S.V. 40. Proc Soc Exp Biol Med 105: 420-427.

4. Imperiale M, Major EO (2007) Polyomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Virology. 5 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins. pp. 2263-2298.

5. Ahuja D, Saenz-Robles MT, Pipas JM (2005) SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. Oncogene 24: 7729-7745.

6. Pipas JM (2009) SV40: Cell transformation and tumorigenesis. Virology 384: 294-303.

7. Pipas JM (1998) Molecular chaperone function of the SV40 large T antigen. Dev Biol Stand 94: 313-319.

8. Pipas JM, Levine AJ (2001) Role of T antigen interactions with p53 in tumorigenesis. Semin Cancer Biol 11: 23-30.

9. Sullivan CS, Pipas JM (2002) T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. Microbiol Mol Biol Rev 66: 179-202.

10. Carter JJ, Daugherty MD, Qi X, Bheda-Malge A, Wipf GC, et al. (2013) Identification of an overprinting gene in Merkel cell polyomavirus provides evolutionary insight into the birth of viral genes. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 12744-12749.

11. Grundhoff A, Sullivan CS (2011) Virus-encoded microRNAs. Virology 411: 325-343.

12. Daniels R, Sadowicz D, Hebert DN (2007) A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. PLoS Pathog 3: e98.

13. Schowalter RM, Pastrana DV, Buck CB (2011) Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry. PLoS Pathog 7: e1002161.

14. Lee S, Paulson KG, Murchison EP, Afanasiev OK, Alkan C, et al. (2011) Identification and validation of a novel mature microRNA encoded by the Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas. J Clin Virol 52: 272-275.

15. Seo GJ, Chen CJ, Sullivan CS (2009) Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression. Virology 383: 183-187.

16. Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D (2005) SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. Nature 435: 682-686.

17. Nakamura T, Sato Y, Watanabe D, Ito H, Shimonohara N, et al. (2010) Nuclear localization of Merkel cell polyomavirus large T antigen in Merkel cell carcinoma. Virology 398: 273-279.

18. Kwun HJ, Guastafierro A, Shuda M, Meinke G, Bohm A, et al. (2009) The minimum replication origin of merkel cell polyomavirus has a unique large T-antigen loading architecture and requires small T-antigen expression for optimal replication. J Virol 83: 12118-12128.

19. Wang X, Li J, Schowalter RM, Jiao J, Buck CB, et al. (2012) Bromodomain protein Brd4 plays a key role in Merkel cell polyomavirus DNA replication. PLoS Pathog 8: e1003021.

20. Schowalter RM, Buck CB (2013) The Merkel cell polyomavirus minor capsid protein. PLoS Pathog 9: e1003558.

21. Borchert S, Czech-Sioli M, Neumann F, Schmidt C, Wimmer P, et al. (in Revision) High-affinity Rb-binding, p53 inhibition, subcellular localization and transformation by wild type or tumor-derived shortened Merkel Cell Polyomavirus Large T-Antigens.

22. Cheng J, DeCaprio JA, Fluck MM, Schaffhausen BS (2009) Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. Semin Cancer Biol 19: 218-228.

23. Atkin SJ, Griffin BE, Dilworth SM (2009) Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: history and perspectives. Semin Cancer Biol 19: 211-217.

24. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B (1971) New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. Lancet 1: 1253-1257.

25. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH (1971) Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. Lancet 1: 1257-1260.

26. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, et al. (2007) Identification of a third human polyomavirus. J Virol 81: 4130-4136.

27. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, et al. (2007) Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. PLoS Pathog 3: e64.

28. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS (2008) Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. Science 319: 1096-1100.

29. Dalianis T, Hirsch HH (2013) Human polyomaviruses in disease and cancer. Virology 437: 63-72.

30. Korup S, Rietscher J, Calvignac-Spencer S, Trusch F, Hofmann J, et al. (2013) Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. PLoS One 8: e58021.

31. Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, et al. (2013) Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. Virology 436: 295-303.

32. van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, et al. (2010) Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. PLoS Pathog 6: e1001024.

33. Ehlers B, Wieland U (2013) The novel human polyomaviruses HPyV6, 7, 9 and beyond. APMIS 121: 783-795.

34. Nicol JT, Leblond V, Arnold F, Guerra G, Mazzoni E, et al. (2013) Seroprevalence of human Malawi Polyomavirus. J Clin Microbiol.

35. Dalianis T, Ramqvist T, Andreasson K, Kean JM, Garcea RL (2009) KI, WU and Merkel cell polyomaviruses: a new era for human polyomavirus research. Semin Cancer Biol 19: 270-275.

36. Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, et al. (2011) Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. Arch Virol 156: 1627-1634.

37. Schrama D, Ugurel S, Becker JC (2012) Merkel cell carcinoma: recent insights and new treatment options. Curr Opin Oncol 24: 141-149.

38. Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, et al. (2008) T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 16272-16277.

39. Fischer N, Brandner J, Fuchs F, Moll I, Grundhoff A (2010) Detection of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in Merkel cell carcinoma cell lines: cell morphology and growth phenotype do not reflect presence of the virus. Int J Cancer 126: 2133-2142.

40. Kassem A, Schopflin A, Diaz C, Weyers W, Stickeler E, et al. (2008) Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. Cancer Res 68: 5009-5013.

41. Becker JC, Houben R, Ugurel S, Trefzer U, Pfohler C, et al. (2009) MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. J Invest Dermatol 129: 248-250.

42. Sastre-Garau X, Peter M, Avril MF, Laude H, Couturier J, et al. (2009) Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. J Pathol 218: 48-56.

43. Paik JY, Hall G, Clarkson A, Lee L, Toon C, et al. (2011) Immunohistochemistry for Merkel cell polyomavirus is highly specific but not sensitive for the diagnosis of Merkel cell carcinoma in the Australian population. Hum Pathol 42: 1385-1390.

44. Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, DoRosario A, Scanlon JJ, et al. (2012) Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. J Clin Invest 122: 4645-4653.

45. Feng H, Kwun HJ, Liu X, Gjoerup O, Stolz DB, et al. (2011) Cellular and viral factors regulating Merkel cell polyomavirus replication. PLoS One 6: e22468.

46. Spurgeon ME, Lambert PF (2013) Merkel cell polyomavirus: a newly discovered human virus with oncogenic potential. Virology 435: 118-130.

47. Neumann F, Borchert S, Schmidt C, Reimer R, Hohenberg H, et al. (2011) Replication, gene expression and particle production by a consensus Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) genome. PLoS One 6: e29112.

48. Pipas JM (1992) Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. J Virol 66: 3979-3985.

49. Liu X, Hein J, Richardson SC, Basse PH, Toptan T, et al. (2011) Merkel cell polyomavirus large T antigen disrupts lysosome clustering by translocating human Vam6p from the cytoplasm to the nucleus. J Biol Chem 286: 17079-17090.

50. Houben R, Adam C, Baeurle A, Hesbacher S, Grimm J, et al. (2012) An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells. Int J Cancer 130: 847-856.

51. Shuda M, Kwun HJ, Feng H, Chang Y, Moore PS (2011) Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. J Clin Invest 121: 3623-3634.

52. Cheng J, Rozenblatt-Rosen O, Paulson KG, Nghiem P, DeCaprio JA (2013) Merkel cell polyomavirus large T antigen has growth-promoting and inhibitory activities. J Virol 87: 6118-6126.

53. Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, et al. (2009) Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. Int J Cancer 125: 1243-1249.

54. Houben R, Shuda M, Weinkam R, Schrama D, Feng H, et al. (2010) Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. J Virol 84: 7064-7072.

55. Khalili K, Sariyer IK, Safak M (2008) Small tumor antigen of polyomaviruses: role in viral life cycle and cell transformation. J Cell Physiol 215: 309-319.

56. Angermeyer S, Hesbacher S, Becker JC, Schrama D, Houben R (2013) Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma cells do not require expression of the viral small T antigen. J Invest Dermatol 133: 2059-2064.

57. Shuda M, Chang Y, Moore PS (2013) Merkel Cell Polyomavirus Positive Merkel Cell Carcinoma Requires Viral Small T Antigen For Cell Proliferation. J Invest Dermatol.

58. Angermeyer S, Hesbacher S, Becker JC, Schrama D, Houben R (2013) Do Merkel Cell Polyomavirus Positive Merkel Cell Carcinoma Cells Require Expression of the Viral Small T Antigen? J Invest Dermatol.

59. Cobrinik D (2005) Pocket proteins and cell cycle control. Oncogene 24: 2796-2809.

60. Balog ER, Burke JR, Hura GL, Rubin SM (2011) Crystal structure of the unliganded retinoblastoma protein pocket domain. Proteins 79: 2010-2014.

61. Kim HY, Ahn BY, Cho Y (2001) Structural basis for the inactivation of retinoblastoma tumor suppressor by SV40 large T antigen. EMBO J 20: 295-304.

62. Lee JO, Russo AA, Pavletich NP (1998) Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. Nature 391: 859-865.

63. Liu X, Marmorstein R (2007) Structure of the retinoblastoma protein bound to adenovirus E1A reveals the molecular basis for viral oncoprotein inactivation of a tumor suppressor. Genes Dev 21: 2711-2716.

64. Bellacchio E, Paggi MG (2013) Understanding the targeting of the RB family proteins by viral oncoproteins to defeat their oncogenic machinery. J Cell Physiol 228: 285-291.

65. DeCaprio JA (2009) How the Rb tumor suppressor structure and function was revealed by the study of Adenovirus and SV40. Virology 384: 274-284.

66. Saenz Robles MT, Pipas JM (2009) T antigen transgenic mouse models. Semin Cancer Biol 19: 229-235.

67. Bollag B, Kilpatrick LH, Tyagarajan SK, Tevethia MJ, Frisque RJ (2006) JC virus T'135, T'136 and T'165 proteins interact with cellular p107 and p130 in vivo and influence viral transformation potential. J Neurovirol 12: 428-442.

68. Cotsiki M, Lock RL, Cheng Y, Williams GL, Zhao J, et al. (2004) Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 947-952.

69. Prilusky J, Felder CE, Zeev-Ben-Mordehai T, Rydberg EH, Man O, et al. (2005) FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. Bioinformatics 21: 3435-3438.

70. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics 22: 195-201.

71. Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J, et al. (2009) Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. Nat Protoc 4: 1-13.

72. Bordoli L, Schwede T (2012) Automated protein structure modeling with SWISS-MODEL Workspace and the Protein Model Portal. Methods Mol Biol 857: 107-136.

73. Brandner JM, Houdek P, Husing B, Kaiser C, Moll I (2004) Connexins 26, 30, and 43: differences among spontaneous, chronic, and accelerated human wound healing. J Invest Dermatol 122: 1310-1320.

74. Hirt B (1967) Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. J Mol Biol 26: 365-369.

75. Ziegler K, Bui T, Frisque RJ, Grandinetti A, Nerurkar VR (2004) A rapid in vitro polyomavirus DNA replication assay. J Virol Methods 122: 123-127.

76. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT (2004) Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. J Virol 78: 751-757.

77. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

78. Jerabek-Willemsen M, Wienken CJ, Braun D, Baaske P, Duhr S (2011) Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. Assay Drug Dev Technol 9: 342-353.

79. Seidel SA, Dijkman PM, Lea WA, van den Bogaart G, Jerabek-Willemsen M, et al. (2013) Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. Methods 59: 301-315.

80. Wernimont A, Edwards A (2009) In situ proteolysis to generate crystals for structure determination: an update. PLoS One 4: e5094.

81. Greenfield NJ (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. Nat Protoc 1: 2876-2890.

82. Ranjbar B, Gill P (2009) Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. Chem Biol Drug Des 74: 101-120.

83. Dupeux F, Rower M, Seroul G, Blot D, Marquez JA (2011) A thermal stability assay can help to estimate the crystallization likelihood of biological samples. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 67: 915-919.

84. Broekema NM, Imperiale MJ (2012) Efficient propagation of archetype BK and JC polyomaviruses. Virology 422: 235-241.

85. Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB (2010) Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. Cell Host Microbe 7: 509-515.

86. Wieland U, Mauch C, Kreuter A, Krieg T, Pfister H (2009) Merkel cell polyomavirus DNA in persons without merkel cell carcinoma. Emerg Infect Dis 15: 1496-1498.

87. Mertz KD, Junt T, Schmid M, Pfaltz M, Kempf W (2010) Inflammatory monocytes are a reservoir for Merkel cell polyomavirus. J Invest Dermatol 130: 1146-1151.

88. Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Katano H (2013) Frequent detection of Merkel cell polyomavirus DNA in sera of HIV-1-positive patients. Virol J 10: 84.

89. Dona MG, Paolini F, Benevolo M, Vocaturo A, Latini A, et al. (2013) Identification of episomal human papillomavirus and other DNA viruses in cytological anal samples of HIV-uninfected men who have sex with men. PLoS One 8: e72228.

90. Huang X, Miller W (1991) Adv Appl Math: 373-381.

91. Hanssen Rinaldo C, Hansen H, Traavik T (2005) Human endothelial cells allow passage of an archetypal BK virus (BKV) strain--a tool for cultivation and functional studies of natural BKV strains. Arch Virol 150: 1449-1458.

92. Padgett BL, Rogers CM, Walker DL (1977) JC virus, a human polyomavirus associated with progressive multifocal leukoencephalopathy: additional biological characteristics and antigenic relationships. Infect Immun 15: 656-662.

93. Low J, Humes HD, Szczypka M, Imperiale M (2004) BKV and SV40 infection of human kidney tubular epithelial cells in vitro. Virology 323: 182-188.

94. Sariyer IK, Safak M, Gordon J, Khalili K (2009) Generation and characterization of JCV permissive hybrid cell lines. J Virol Methods 159: 122-126.

95. Singh M, Krajewski M, Mikolajka A, Holak TA (2005) Molecular determinants for the complex formation between the retinoblastoma protein and LXCXE sequences. J Biol Chem 280: 37868-37876.

96. Dong A, Xu X, Edwards AM, Midwest Center for Structural G, Structural Genomics C, et al. (2007) In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination. Nat Methods 4: 1019-1021.

8 Anhang

Kalibrierung der Gelfiltrationssäulen

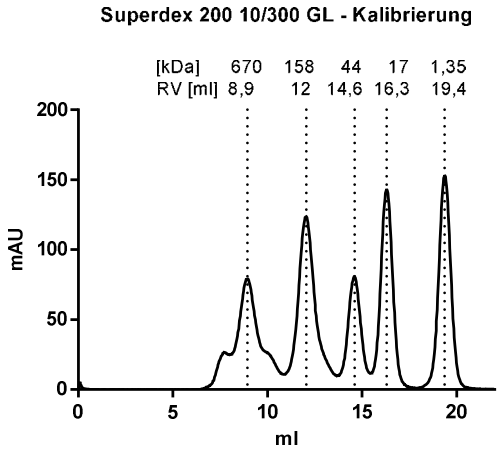


Abbildung 55 Kalibrierung der Superdex 200 10/300 GL Säule mit dem Gel Filtration Standard (BioRad). Dargestellt ist der Kurvenverlauf des Standards mit den Retentionsvolumina und den Molekulargewichten der Maxima.

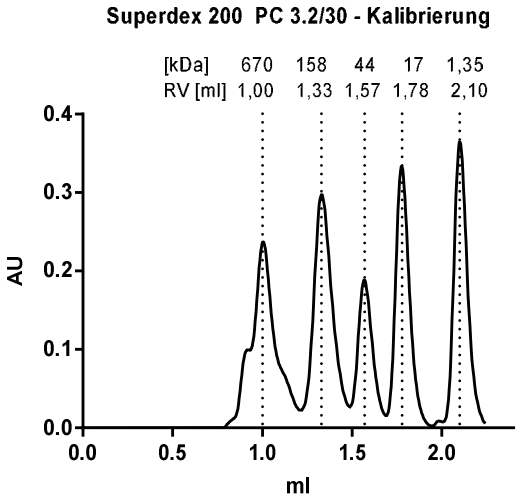


Abbildung 56 Kalibrierung der Superdex 200 PC 3.2/30 Säule im SMART System mit dem Gel Filtration Standard (BioRad). Dargestellt ist der Kurvenverlauf des Standards mit den Retentionsvolumina und den Molekulargewichten der Maxima.

Pufferbedingungen und Ergebnisse der Thermofluoar Assay Screens 1 und 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Water	Citric Acid pH 4.0	Na Acetate pH 4.5	Citric Acid pH 5.0	MES pH 6.0	K Phosphate pH 6.0	Citric Acid pH 6.0	Bis-Tris pH 6.5	Na Cacodylate pH 6.5	Na Phosphate pH 7.0	K Phosphate pH 7.0	HEPES pH 7.0
B	MOPS pH 7.0	Am Acetate pH 7.3	Tris-HCl pH 7.5	Na Phosphate 7,5	Imidazol pH 8.0	HEPES ph 8.0	Tris-HCl pH 8.0	Tricine pH 8.0	Bicine pH 8.0	Bicine pH 8.5	Tris-HCl pH 8.5	Bicine pH 9.0
C	Water 250mM NaCl	Citric Acid 250mM NaCl pH 4.0	Na Acetate 250mM NaCl pH 4.5	Citric Acid 250mM NaCl pH 5.0	MES 250mM NaCl pH 6.0	K Phosphate 250mM NaCl pH 6.0	Citric Acid 250mM NaCl pH 6.0	Bis-Tris 250mM NaCl pH 6.5	Na Cacodylate 250mM NaCl pH 6.5	Na Phosphate 250mM NaCl pH 7.0	K Phosphate 250mM NaCl pH 7.0	HEPES 250mM NaCl pH 7.0
D	MOPS 250mM NaCl pH 7.0	Am Acetate 250mM NaCl pH 7.3	Tris-HCl 250mM NaCl pH 7.5	Na Phosphate 250mM NaCl 7,6	Imidazol 250mM NaCl pH 8.0	HEPES 250mM NaCl ph 8.0	Tris-HCl 250mM NaCl pH 8.0	Tricine 250mM NaCl pH 8.0	Bicine 250mM NaCl pH 8.0	Bicine 250mM NaCl pH 8.5	Tris-HCl 250mM NaCl pH 8.5	Bicine 250mM NaCl pH 9.0
E	Buffer Screen "A" pH 4.0	Buffer Screen "A" pH 4.78	Buffer Screen "A" pH 5.21	Buffer Screen "A" pH 5.62	Buffer Screen "A" pH 5.95	Buffer Screen "A" pH 6.23	Buffer Screen "A" pH 6.53	Buffer Screen "A" pH 6.81	Buffer Screen "A" pH 7.16	Buffer Screen "A" pH 7.80	Buffer Screen "A" pH 9.0	Buffer Screen "A" pH 10
F	Buffer Screen "B" pH 4.0	Buffer Screen "B" pH 4.22	Buffer Screen "B" pH 4.62	Buffer Screen "B" pH 5.06	Buffer Screen "B" pH 5.62	Buffer Screen "B" pH 6.49	Buffer Screen "B" pH 7.25	Buffer Screen "B" pH 7.76	Buffer Screen "B" pH 8.20	Buffer Screen "B" pH 8.75	Buffer Screen "B" pH 9.0	Buffer Screen "B" pH 10
G	10mM HEPES pH 7.5	50mM HEPES pH 7.5	100mM HEPES pH 7.5	250mM HEPES pH 7.5	10mM NaPO4 pH 7.5	50mM NaPO4 pH 7.5	100mM NaPO4 pH 7.5	200mM NaPO4 pH 7.5	10mM Tris-HCl pH 8.0	50mM Tris-HCl pH 8.0	100mM Tris-HCl pH 8.0	250mM Tris-HCl pH 8.0
H	50mM HEPES 50mM NaCl pH 7.5	50mM HEPES 125mM NaCl pH 7.5	50mM HEPES 250mM NaCl pH 7.5	50mM HEPES 500mM NaCl pH 7.5	50mM HEPES 750mM NaCl pH 7.5	50mM HEPES 1000mM NaCl pH 7.5	50mM Tris-HCl 50mM NaCl pH 8.0	50mM Tris-HCl 125mM NaCl pH 8.0	50mM Tris-HCl 250mM NaCL pH 8.0	50mM Tris-HCl 500mM NaCl pH 8.0	50mM Tris-HCl 750mM NaCl pH 8.0	50mM Tris-HCl 1000mM NaCl pH 8.0

Buffers from lane A, B, C, D, E, F are at 100mM

Buffer screens: A) Succinic Acid / Na PO4 / Glycine [2:7:7], B) Citric acid / CHES / HEPES [2:4:3]

wide conditions screen (16 buffers, 11 pH, 2 salt concentration)

pH optimization (from 4 - 10)

buffer concentration optimization (from 10 - 200/250 mM)

NaCl concentration optimization (50 - 1000mM)

Abbildung 57 Beschreibung des EMBL Hamburg Thermofluor Screens 1. Dargestellt sind 96 verschiedene Puffer- und Salzbedingungen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.1 M Urea	0.5 M Urea	1 M Urea	2 M Urea	4 M Urea	6 M Urea	150 mM GdnHCl	500 mM GdnHCl	3% (v/v) DMSO	100 mM $NaHCO_3$	100 mM $KHCO_3$	100 mM $NH4HCO_3$
B	100 mM $NaC_2H_3O_2$	100 mM $Ca(C_2H_3O_2)_2$	100 mM CH_3CO_2K	100 mM CH_3COONH	100 mM Na_2SO_4	100 mM Mg_2SO_4	100 mM K_2SO_4	100 mM $(NH_4)_2SO_4$	100 mM Na_2HPO_4	100 mM NaH_2PO_4	100 mM K_2HPO_4	100 mM KH_2PO_4
C	100 mM $Na_3C_6H_5O$	100 mM $Na_3C_6H_5O_7$	100 mM $Na_3C_6H_5O_7$	100 mM $NaNO_3$	10 mM DTT	1 mM TCEP	5 mM TCEP	20 mM TCEP	100 mM Trimethyl-amineHCl	1 mM Spermidine	1 mM Spermine-HCl	5 mM EDTA
D	10 mM Betaine	50 mM Imidazole	100 mM Imidazole	250 mM Imidazole	500 mM Imidazole	10 mM $MgCl_2$	10 mM $CaCl_2$	1 mM $MnCl_2$	1 mM $NiCl_2$	1 mM $FeCl_2$	1 mM $ZnCl_2$	1 mM $CoCl_2$
E	100 mM NaF	100 mM KF	100 mM NH4F	100 mM LiCl	100 mM NaCl	100 mM KCl	100 mM NH4Cl	100 mM NaI	100 mM KI	100 mM NaBr	2 mM CHAPS	1 mM Octyl-β-D-Glucoside
F	3% (v/v) Ethylene glycol	1% (v/v) Glycerol	5% (v/v) Glycerol	10% (v/v) Glycerol	20% (v/v) Glycerol	5%(v/v) PEG 400	5% (w/v) PEG 1000	5% (w/v) PEG 4000	10 mM L-Proline	50 mM Taurine	50mM L-Gly	25 mM L-His
G	50 mM L-Arg	50 mM (each) L-Arg + L-Glu	500 mM (each) L-Arg + L-Glu	50 mM L-Glu	25 mM L-Gln	50 mM L-Lys	100 mM D-Glucose	100 mM Sucrose	100 mM Maltose	100 mM D-Sorbitol	2 mM NADH (5mM $MgCl_2$)	2mM ATP (5mM $MgCl_2$)
H	2 mM ADP (5mM $MgCl_2$)	2 mM cAMP (5mM $MgCl_2$)	2 mM GTP (5mM $MgCl_2$)	2 mM GDP (5mM $MgCl_2$)	2 mM cGMP (5mM $MgCl_2$)	Buffer	Free	Free	Free	Free	Free	Free

	Chaotropic / dissociation reagents		Linker		Polyol
	Salts		Imidazole		Amino acid
	Reducing reagent		Multivalent ion		Carbohydrate
	Polyamine		Monovalent ion		Co-factor
	Chelating agent		Detergents		Buffer control

Abbildung 58 Beschreibung des EMBL Hamburg Thermofluor Screens 2. Dargestellt sind 90 verschiedene Puffer- und Salzbedingungen.

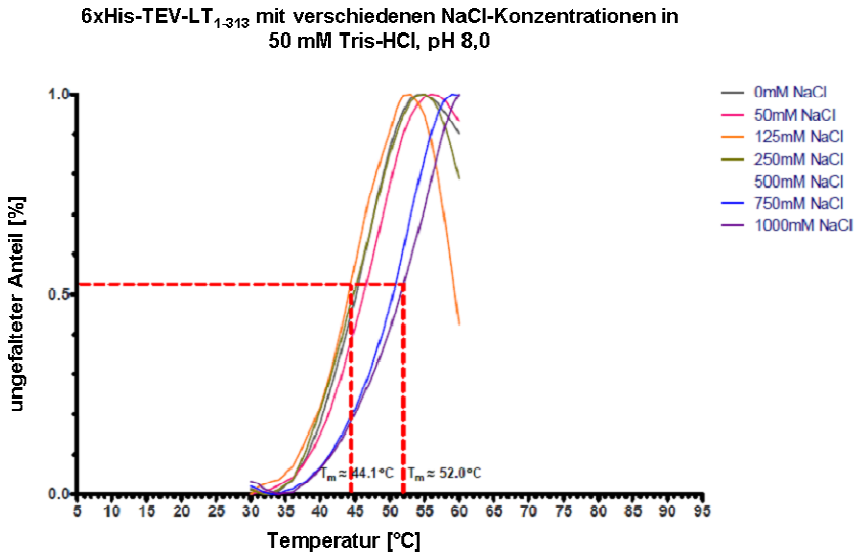


Abbildung 59 TFA-Schmelzkurven von 6xHis-TEV-LT_{1-313} in 50 mM Tris, pH 8,0 mit verschiedenen Salzkonzentrationen von 0 mM bis 1000 mM NaCl.

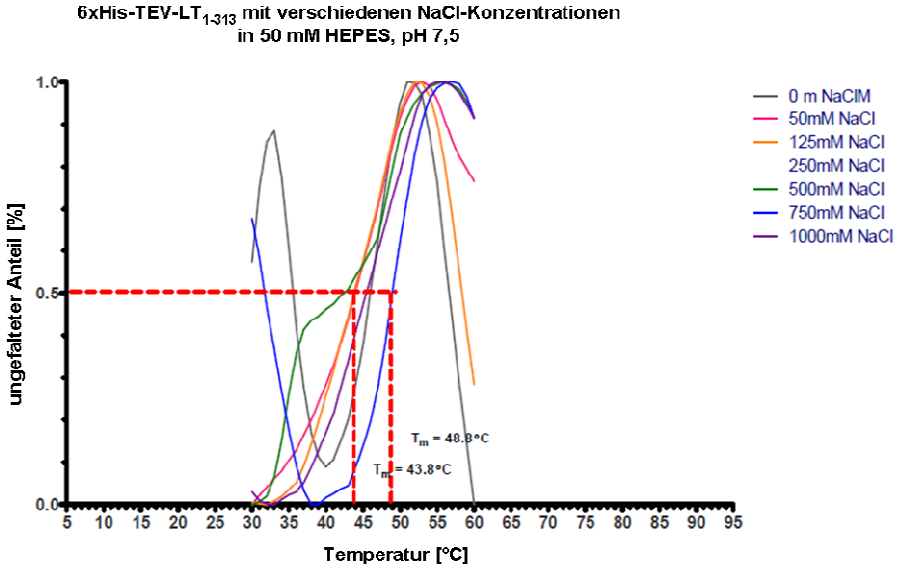


Abbildung 60 TFA-Schmelzkurven von 6xHis-TEV-LT_{1-313} in 50 mM HEPES, pH 7,5 mit verschiedenen Salzkonzentrationen von 0 mM bis 1000 mM NaCl.

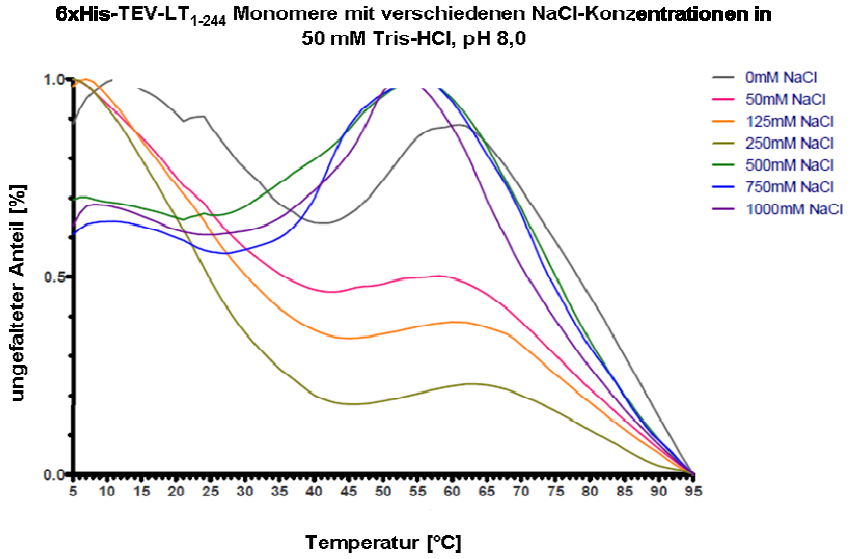


Abbildung 61 TFA-Schmelzkurven von 6xHis-TEV-LT_{1-244} Monomeren in 50 mM Tris, pH 8,0 mit verschiedenen Salzkonzentrationen von 0 mM bis 1000 mM NaCl.

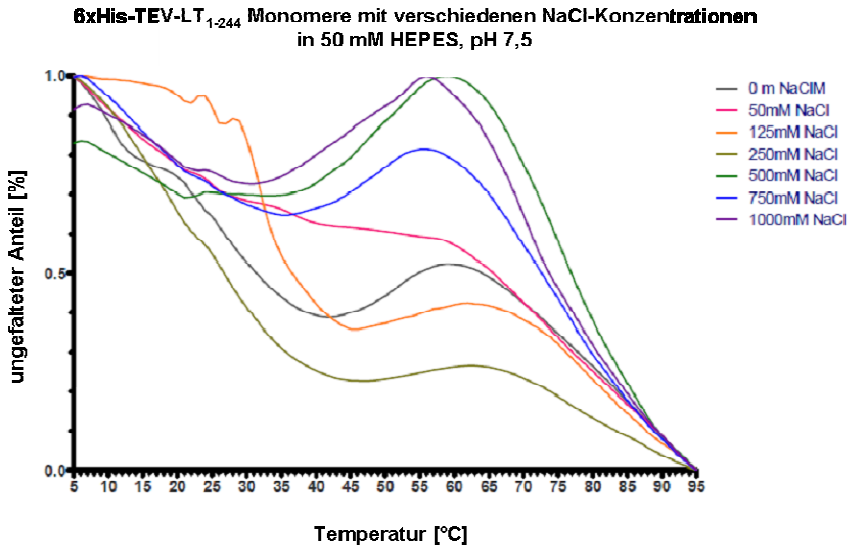


Abbildung 62 TFA-Schmelzkurven von 6xHis-TEV-LT_{1-244} Monomeren in 50 mM HEPES, pH 7,5 mit verschiedenen Salzkonzentrationen von 0 mM bis 1000 mM NaCl.

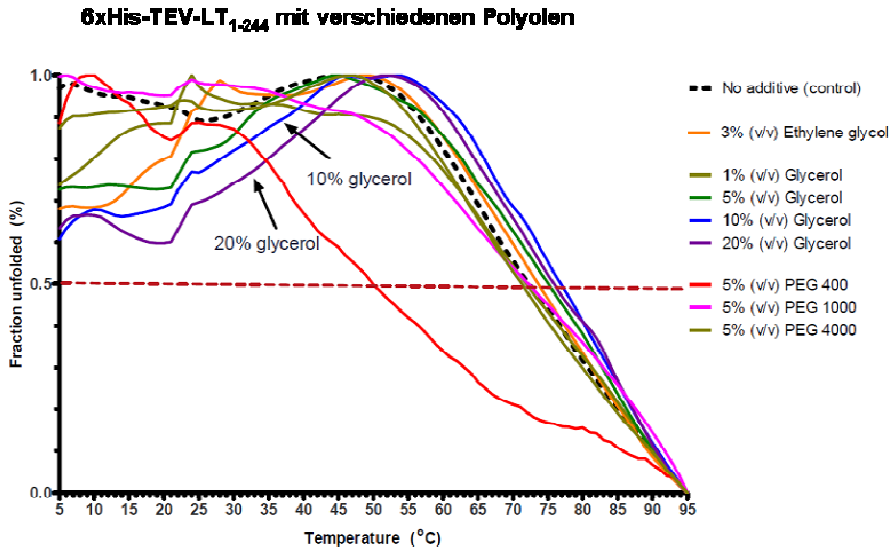


Abbildung 63 TFA-Schmelzkurven von 6xHis-TEV-LT_{1-244} mit verschiedenen Polyolen.

Danksagung

Mein erster und spezieller Dank geht an PD Dr. Nicole Fischer für die Bereitstellung dieses Themas und die Gelegenheit, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen. Ich danke ihr für die sehr gute Betreuung und fachliche Unterstützung, die mein wissenschaftliches Arbeiten und Denken sehr geprägt haben, sowie ihre Hilfsbereitschaft und ihr Verständnis in allen möglichen Lebenslagen.

Prof. Dr. Adam Grundhoff danke ich herzlich für die Ko-Betreuung dieser Arbeit, sowie für *fruitful discussions* und die sehr hilfreichen Ratschläge.

Bei Prof. Dr. Thomas Dobner bedanke ich mich, dass er die Aufgabe des Zweitgutachters übernommen hat.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Markus Perbandt und Dr. Stefan Veltel, für die große Hilfe, wenn es um Fragen zur Proteinaufreinigung und zum Verständnis zur Kristallisation ging.

Hiermit möchte ich mich bei der Hamburger Landesexzellenzinitiative und der Joachim Herz Stiftung für die Finanzierung der Graduiertenschule „*Hamburg School for Structure and Dynamics in Infection*“ und damit für mein Stipendium bedanken.

Ich bedanke mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Fischer, Grundhoff und Ruckdeschel für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor, besonders bei Christine Dahlke, Juliane Theiß, Claudia Schmidt, Uwe Tessmer, Friederike Neumann und Manja Czech-Sioli. Christine, ich danke Dir für die Freundschaft und die tolle Zusammenarbeit seit unserem Masterstudium.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Marta Kotasinska und Claudia Trasak für die Einweisung in die Geheimnisse der Proteinaufreinigung und das ÄKTA-System, sowie für die Durchführung zahlloser SMART-Läufe.

Ein dickes Dankeschön geht an die Kollegen aus dem Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene für die gute Arbeitsatmosphäre. Allen voran danke ich Kerstin Rehm, Linda Panzer, Marie Schnapp, Andreas Rumm und Stefan Veltel für die vielen tollen und unterhaltsamen Stunden innerhalb und außerhalb des Instituts. Es ist immer wieder eine Freude mit Euch.

Meinen Mit-Doktoranden der Hamburger Graduiertenschule *„Structure and Dynamics in Infection“* danke ich für die tolle Stimmung und Unterstützung sowie für das ein oder andere erheiternde Getränk.

Ich danke meinen Korrekturlesern Juliane Theiß, Kerstin Rehm und Corey Laverty und für die großartige Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit meinem Mann Damian Senn.

Meiner Familie danke ich für die immerwährende Unterstützung und den Glauben an mich. Ich möchte allen voran meiner Mutter danken, die mich meinen Weg hat gehen lassen und mir dafür vieles ermöglicht hat. Ich danke ihr für den unglaublichen Oma-Dienst, den sie in den letzten Wochen vor Abgabe dieser Arbeit geleistet hat. Ich möchte mich bei meinen Großeltern für jegliche Ermunterungen und Beihilfe bedanken, u.a. bei meiner Oma Annemarie für den immer aktuellen Wetterbericht aus Wernigerode. Bei meinem Bruder bedanke ich mich für das positive Karma. Damian, Dir danke ich für die unglaubliche Ruhe und Geduld sowie für jegliche Anfeuerungen in den letzten vier Jahren und natürlich für unseren Sohn. Mattis, Dir danke ich einfach dafür, dass Du da bist und nachts wunderbar schläfst.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 13.12.2013

Unterschrift