
**Identifizierung und Charakterisierung
viraler und zellulärer Faktoren, die die
Replikation des humanen Tumorvirus,
das Merkelzell Polyomavirus,
beeinflussen**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Friederike Neumann

Hamburg, 2015

Tag der Disputation: 07.08.2015

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der
Dissertation:

Prof. Dr. Nicole Fischer
Prof. Dr. Thomas Dobner

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG	4
1.1. Zusammenfassung	4
1.2. <i>Summery</i>	6
EINLEITUNG	9
2.1. Polyomaviren	9
2.1.1. Humane Polyomaviren.....	9
2.1.2. Aufbau des Virions und des Genoms von Polyomaviren	12
2.1.3. Allgemeiner Replikationszyklus von Polyomaviren	14
2.2. Das Merkelzell Polyomavirus (MCPyV)	19
2.2.1. Das Merkelzellkarzinom (MCC) und die Entdeckung des MCPyV.....	19
2.2.2. Mechanismen der Tumorgenese	21
2.2.3. Das Genom.....	22
2.2.4. Der Lebenszyklus.....	23
2.2.5. <i>In vitro</i> Replikationssystem	25
2.3. PML-NB.....	27
2.3.1. Funktionen von PML-NB	29
2.4. Ziel dieser Arbeit	32
MATERIAL	35
3.1. Labormaterial und Zellkulturmaterial	35
3.2. Bakterienstämme	35
3.3. Zelllinien	35
3.4. Medien	36
3.4.1. Medien und Zusätze für die Anzucht von Bakterien	36
3.4.2. Medien und Zusätze für Gewebekulturen	36
3.5. Nukleinsäuren	36

3.5.1. Mononucleotide.....	36
3.5.2. Plasmide	37
3.5.3. Primer / Oligonukleotide	38
3.6. Enzyme	39
3.6.1. Restriktionsnukleasen und dazugehörige Puffer	39
3.6.2. Sonstige Enzyme	40
3.7. Reagenzsysteme (Kits)	40
3.8. Reagenzien und Laborhilfsmittel	40
3.9. Spezielle Geräte	41
3.10. Lösungen und Puffer	42
3.10.1. allgemeine Lösungen und Puffer	42
3.10.2. Puffer für die Herstellung kompetenter Bakterien.....	44
3.10.3. Reagenzien für die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	44
3.10.4. Lösungen für den Southern Blot	45
3.11. Standardmarker	45
3.12. Antikörper	46
3.12.1. Primäre Antikörper:	46
3.12.2. Sekundäre Antikörper:.....	47
3.13. Computersoftware	47
METHODEN	48
4.1. Methoden zur Plasmidherstellung.....	48
4.1.1. Herstellung kompetenter Bakterien nach der Rb-Cl ₂ -Methode	48
4.1.2. Hitzeschocktransformation.....	48
4.1.3. Kultivierung von Bakterien.....	49
4.1.4. Präparative Plasmidaufarbeitung	49
4.1.5. Bestimmung der DNA-Konzentration	49
4.1.6. Herstellung von viraler DNA aus proviralen Plasmiden.....	50
4.1.7. Agarosegelelektrophorese	51
4.2. Zellkultur	51
4.2.1. Kultivierung der Zellen	51

4.2.2.	Herstellung von Zellen, in denen die Expression bestimmter Proteine verringert ist.....	52
4.2.3.	Transfektion	53
4.2.4.	MTT-Assay.....	55
4.3.	RNA-Methoden	56
4.3.1.	RNA-Isolierung aus humanen Zellen.....	56
4.3.2.	Konzentrationsbestimmung der RNA	56
4.3.3.	RT-PCR.....	56
4.3.4.	Realtime-PCR.....	57
4.4.	DNA-Methoden	58
4.4.1.	<i>in vitro</i> Replikationsassay.....	58
4.4.2.	Herstellung der DNA Sonden	60
4.4.3.	Immunfluoreszenz der replizierten DNA	61
4.5.	Protein-Methoden	61
4.5.1.	Herstellung von Proteinextrakten.....	61
4.5.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	62
4.5.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	62
4.5.4.	Western Blot – Analyse.....	63
4.5.5.	Entfernen der Antikörper von einer Membran	64
4.5.6.	Nachweis von Protein-Protein Interaktionen mittels Immunpräzipitation.....	64
4.5.7.	Indirekte Immunfluoreszenz	65
ERGEBNISSE		67
5.1.	<i>in vitro</i> Replikationsassay des MCPyV.....	67
1.1.	Untersuchung weiterer Zelllinien auf Unterstützung der viralen Replikation	70
5.2.	Einfluss viraler Proteine auf die Replikation des MCPyV	73
5.2.1.	MCPyV VP1 und SV40 LT-Antigen.....	73
5.2.2.	Kapsidproteine VP2 und VP3 des Mauspolyomavirus (MPyV).....	75
2.1.	Identifizierung von PML-NB als zelluläre Faktoren, welche die MCPyV Replikation beeinflussen	77
5.2.3.	Einfluss der Replikation des MCPyV auf PML-NB	80
5.2.4.	Einfluss der PML-NB auf die Replikation des MCPyV	86

5.2.5. PML-NB in Abhängigkeit von der Überexpression des MCPyV LT-Antigen	91
DISKUSSION	101
6.1. Können weitere Zelllinien die Replikation des MCPyV unterstützen?	101
6.2. Weist die Ursprungszelle des MCC auf mögliche permissive Zelltypen?	104
6.3. Regulation der MCPyV Replikation durch virale Proteine	105
6.4. Der Einfluss von PML-NB auf die Replikation des MCPyV	109
LITERATURVERZEICHNIS	114
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	126
TABELLENVERZEICHNIS	129
ANHANG	130
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	139
DANKSAGUNG	140

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
ALTO	<i>alternative LT-open reading frame</i>
BRD4	<i>bromodomain containing protein 4</i>
Amp	Ampicillin
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BKV	BK-Virus, benannt nach den Initialien des Patienten, aus dem das Virus das erste Mal isoliert wurde
bp	Basenpaar
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Ck20	Zytokeratin 20
cMCPyV	Konsensus MCPyV
CPE	Zytopathischer Effekt
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
EBV	Ebstein Barr Virus
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
<i>f.c.</i>	<i>final concentration</i>
FKS	fötales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
hAd5	humanes Adenovirus Typ5
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HPI	Heinrich-Pette-Institut
HPyV	humanes Polyomavirus
HSV-1	Herpes Simplex Virus-1
JCV	JC-Virus, benannt nach den Initialien des Patienten, aus dem das Virus das erste Mal isoliert wurde
kb	Kilobasen

kDa	Kilo-Dalton
KIPyV	KI-Polyomavirus (KI= Karolinska Institut)
LB	Luria-broth
LT	<i>large Tumor-antigen</i>
M	Molar (mol/l)
MCC	Merkelzellkarzinom
MCPyV	Merkelzell Polyomavirus
miRNA	<i>micro RNA</i>
MPyV	Maus Polyomavirus
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaAc	Natriumacetat
NCCR	<i>non coding control region</i>
NLS	<i>nuclear lokalisation sequenz</i> , Kernlokalisierungssequenz
NPC	<i>Nucleus-Pore-Complex</i>
OBD	<i>origin binding domain</i>
OD	Optische Dichte
ori	<i>origin</i> , Replikationsursprung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PAX5	<i>paired box (PAX) family of transcriptionfactor</i>
pRB	Retinoblastomprotein
PML-NB	<i>promyelocytic leukemia-nuclear body</i>
PP2A	Protein Phosphatase 2A
RFC	Replikationsfaktor C
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl.: <i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIM	Sumoylierungsinteragierendes Motiv
st	<i>small tumor-antigen</i>
SV40	<i>Simian vacuolating Virus 40</i>
taq	<i>thermus aquaticus</i>

TdT	terminale Deoxinukleotidyl Transferase
TS	Trichodyplasia Spinulosa
TSPyV	Trichodysplasia Spinulosa Polyomavirus
U	<i>unit</i> , Einheit
UV	Ultraviolett
VP	virales Protein
WT	Wildtyp
WUPyV	WU-Polyomavirus (WU= Waschington Universität)

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Merkel-Zell Polyomavirus (MCPyV) ist das fünfte von bisher 13 bekannten humanen Polyomaviren. Interessanterweise ist es das erste Virus dieser Familie, das mit der Tumorgenese im eigenen Wirt assoziiert ist. Dabei kann es bei immunsupprimierten und älteren Menschen zur Entstehung des Merkelzellkarzinoms (MCC), einem seltenen aber sehr aggressiven Hauttumor, entscheidend beitragen. MCPyV zählt zu den humanen Tumoviren aufgrund der folgenden Charakteristika: Das Virusgenom ist monoklonal in das Genom der Tumorzellen des MCC integriert. Primärtumor wie auch die Metastasen eines Patienten weisen identische Integrationsstellen auf. In den Tumorzellen des MCC werden die viralen Onkoproteine, sT- und LT-Antigen, exprimiert, wobei die Proliferation der Tumorzellen von der Expression dieser viralen Proteine abhängig ist. Interessanterweise zeigen alle MCPyV Sequenzen, welche aus MCC isoliert wurden, Mutationen auf, die zu einem verkürzten LT-Antigen führen. Dabeibleibt die Bindestelle für das Retinoblastomprotein (pRb) immer erhalten und die ATPase/Helikase-Domäne des Proteins, welche für die Replikation essentiell ist, wird nicht mehr exprimiert. Innerhalb der MCC Tumorzellen gibt es eine positive Selektion für den N-Terminus vom LT-Antigen und eine negative Selektion gegen den C-Terminus vom LT-Antigen. Bisher hat sich die Mehrzahl der Publikationen auf die Epidemiologie und die Mechanismen der durch MCPyV induzierten Transformation fokussiert. Information über den Zelltyp, in denen MCPyV persistiert oder permissiv repliziert, sind nicht bekannt, daher gibt es bislang nur unzureichende Informationen zum Lebenszyklus des MCPyV. Ähnlich zu anderen humanen Polyomaviren ist die Etablierung eines *in vitro* Replikationssystems aufgrund des strikten Wirts- und Gewebetropismus äußerst schwierig. Bislang wurden von drei Arbeitsgruppen *in vitro* Replikationssysteme etabliert. Alle Systeme zeigen die gleiche Einschränkung: Zwar können Replikation sowie die Expression der frühen und späten Gene untersucht werden, auch die Bildung weniger viraler Partikel ist detektierbar, jedoch ist keine serielle Transmission möglich. Mit Hilfe dieser Systeme können jedoch sowohl virale wie auch zelluläre Faktoren hinsichtlich ihres

Einflusses auf die Replikation des MCPyV untersucht werden mit dem Ziel ein vollständig permissives System zu etablieren.

In dieser Arbeit wurden zusätzlich zu den bereits in vorangegangenen Arbeiten 25 analysierten Zelllinien weitere Zelllinien mit Hilfe des *in vitro* Replikationssystems untersucht. Insbesondere wurden weitere Hautzelllinien (HFF und UISO) wie auch B-Zelllinien (BJAB und RAJI) in diese Analysen eingeschlossen. Neuere Studien legen nahe, dass möglicherweise Hautzellen das Reservoir des Virus darstellen könnten, da MCPyV DNA in Hautabstrichen nachgewiesen werden konnte bzw. auch MCPyV DNA in B-Lymphozyten detektiert werden konnte. Desweiteren werden Stammzellen der Haut wie auch prä-B-Zellen als Vorläuferzellen des Merkelzellkarzinoms diskutiert. Während die B-Zelllinien weder DNA Replikation noch frühe virale Transkription aufzeigten, konnte in den Hautzelllinien eine schwache virale DNA Replikation des MCPyV detektiert werden. Dabei ist es möglich, dass die untersuchten B-Zelllinien bereits zu differenziert waren um die MCPyV Replikation zu ermöglichen. Derzeitige Arbeiten fokussieren sich auf die Analyse von Stammzellen, CD34⁺ HSCT (hämatopoetische Stammzellentransplantation) oder Stammzellen der Haut als mögliche permissive Zellen der MCPyV Replikation. Das hier angewendete MCPyV *in vitro* Replikationssystem wurde weiterhin genutzt um in zuvor identifizierten semi-permissiven Zelllinien (PFSK-1, H1299 und 293) zelluläre wie auch virale Faktoren auf ihren Einfluss auf die virale DNA Replikation zu untersuchen. Zuvor durchgeführte Arbeiten zeigten, dass die zusätzliche Expression der frühen Gene des MCPyV die Replikation deutlich verbessert, wobei auch hier kein permissives System etabliert werden konnte. Dies lässt eventuell eine limitierte Expression oder einen Defekt in den späten Genen des MCPyV vermuten. Innerhalb dieser Arbeiten wurde insbesondere der Einfluss der Kapsidproteine auf das MCPyV Replikationssystem untersucht. Auch die Ko-Expression der Kapsidproteine VP1 des MCPyV sowie VP1 und VP2 des Mauspolyomavirus (MPyV) zeigten keine Verbesserung der viralen DNA Replikation, wie auch keine serielle Transmission. Hinsichtlich zellulärer Faktoren, die den Lebenszyklus des MCPyV negativ beeinflussen könnten, wurde innerhalb dieser Arbeit ein Schwerpunkt auf PML-Strukturen, sogenannte PML-nuclear bodies (PML-NB) gelegt. Für viele RNA- und DNA-Viren ist bekannt, dass sie mit PML-NB interagieren, wobei sowohl positive wie auch negative Effekte dieser Strukturen auf den Lebenszyklus von diesen Viren beschrieben sind. So konnte gezeigt werden, dass die Funktion von PML-NB inhibiert wird, indem die Viren eine Umstrukturierung der PML-NB induzieren oder auch den

proteasomalen Abbau wichtiger Bestandteile der PML-NB initiieren. Auch für die Polyomaviren SV40, Mauspolyomavirus, JCV und BKV konnten unterschiedlichste Interaktionen mit PML-NB gezeigt werden. Innerhalb dieser Arbeit wurde sowohl die Veränderung der Struktur der PML-NB mittels konfokaler Mikroskopie während der MCPyV Replikation wie auch der Einfluss der drei Hauptkomponenten PML, Sp100 und Daxx auf die MCPyV Replikation untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass abhängig von der Replikation des MCPyV PML-NB stark vergrößert werden, die Zahl dieser Strukturen signifikant ansteigt und insbesondere das Sp100 Protein von diesen Strukturen dissoziiert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die virale DNA Replikation in Zellen ansteigt, die kein Sp100 exprimieren. Diese Arbeiten zeigen, dass Sp100 ein negativer Faktor der MCPyV Replikation ist. Sp100 wird während der MCPyV Replikation, welche in unmittelbarer Nähe zu PML-NBs stattfindet, von diesen Strukturen weglokalisiert bzw. abgebaut.

1.2. SUMMERY

The Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) is one out of 13 known human Polyomaviruses (PyV) known to date and the only PyV associated with tumorigenesis in its own host. MCPyV is highly associated with MCC, a rare and highly aggressive skin tumor which mostly afflicts elderly and immunosuppressed patients. Because of the high association of the virus with MCC and the following characteristics MCPyV is considered to be a human tumor virus: (1) The MCPyV-Genome is monoclonally integrated into the genome of the tumor cells. (2) Within one patient viral integration sites of the primary tumor and subsequent metastases are identical. (3) The viral oncoproteins sT- and LT-Antigen are expressed in the tumor cells and the expression of these T-Antigens is essential for the proliferation of these cells. Interestingly, all MCPyV sequences isolated from MCC revealed truncating mutations within the coding region of the LT-Antigen resulting in a shortened LT-Antigen which still harbored the Retinoblastomaprotein (pRb) binding site but lacked the ATPase/Helicase domain, which is essential for viral replication. As a consequence shortened LT proteins are defective in inducing viral replication but still bind to the pRb protein and thereby induce cell proliferation. Most studies focused on the epidemiology and on transforming strategies of the virus. Information on where the virus persists in its host and which cell type is permissive for viral replication are still unknown. Subsequently only limited information on the viral life cycle are available. We and others have established a semi-permissive replication system

which allows the study of parts of the viral life cycle. Using this system viral DNA replication as well as early and late gene expression can be efficiently studied. Furthermore, viral particle formation has been detected however no serial transmission could be achieved. Although there are certainly drawbacks of this semi permissive system, it is a valuable tool to investigate viral and cellular proteins with regard to their influence on viral DNA replication and early/late gene expression.

In the first part of this study further cell lines were analyzed to find a permissive cell line. In particular, two skin cell lines (UISO and HFF) and two B-lymphocyte cell lines (BJAB and RAJI) were included. Recent studies suggest skin cells to be the reservoir of this virus because MCPyV DNA could be isolated out of skin swabs but also in B-lymphocytes MCPyV DNA could be detected. Additionally stem cells of the skin as well as pre B-cells are discussed as progenitor cells for the MCC. While the B-cell lines did not show viral DNA replication or early gene expression of the MCPyV, marginal viral DNA replication could be detected in the two skin cell lines. It is possible that the analyzed B-cell lines are too far differentiated to support viral DNA replication. Current studies focus on stem cells, CD34+ hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and stem cells of the skin as potential permissive cell line of the MCPyV. The applied semi permissive replication system for the MCPyV was further used in prior identified semi permissive cell lines (293, H1299 and PFSK-1) to analyze the influence of viral as well as cellular factors on the replication of the MCPyV. Previous studies already showed that the viral DNA replication can be increased by exogenous expression of the early genes. But this did not improve the system to be permissive which suggests a limited expression or a defect of the late genes of the MCPyV. In this work also the influence of the capsid proteins on MCPyV replication was investigated. The analyzed capsid proteins VP1 of the MCPyV and VP2 and VP3 of the Murine Polyomavirus (MPyV) showed no influence on the viral DNA replication. Also a serial transmission could not be detected in cell culture. With regard on cellular factors which could negatively influence the viral lifecycle this study focused on PML structures named PML-Nuclear Bodies (PML-NB). For many RNA and DNA Viruses is shown that they interact with PML-NB. PML-NB are known to be positive as well as negative for the viral infection depending on the particular analyzed virus. To circumvent negative effects of PML-NB some viruses inhibit their function by inducing reorganization of the structure of PML-NB or proteasomal degradation of components of PML-NB which are important for these structures Also for the polyomaviruses SV40, MPyV, BKV and JCV

different interactions with PML-NB were shown. In this study morphologic changes of the structure of PML-NB during viral DNA replication were investigated by confocal microscopy. Also the influence of the three components of PML-NB, PML, Daxx and Sp100 on the MCPyV replication was analyzed. During MCPyV replication PML-NB showed an increase in size, a significant increase in number and in particular the dissociation of Sp100 from PML-NB. Additionally knock down of Sp100 lead to increased viral DNA replication. These experiments argue for Sp100 as negative factor for MCPyV replication. During viral DNA replication which is localized near PML-NB Sp100 is degraded or relocated from PML-NB.

2. EINLEITUNG

2.1. POLYOMAVIREN

Der Name Polyomaviridae ist aus dem Griechischen abgeleitet von "*Poly*" und "*oma*", was "*viele Karzinome*" bedeutet. Dies ist zurückzuführen auf das Mauspolyomavirus (MPyV), welches 1950 als erstes Mitglied der Familie bei Untersuchungen zum Murinen Leukemia Virus (MLV) isoliert wurde. Das MPyV führt in infizierten neugeborenen Mäusen, nicht jedoch in adulten Mäusen, zu einer Vielzahl an Tumoren [2]. Seitdem wurden viele verschiedene Polyomaviren in Säugern und auch in Vögeln identifiziert, die alle durch eine enge Wirtsspezifität charakterisiert sind. Das bekannteste und bestuntersuchtete Polyomavirus ist das Simian Virus 40 (SV40), welches 1960 als Kontamination in aus Rhesusaffennierenzellen hergestelltem Polioimpfstoff entdeckt wurde [3]. Untersuchungen an SV40 waren entscheidend zur Aufklärung der Mechanismen der eukaryotischen DNA Replikation, Translation sowie Transformation von Zellen.

2.1.1. Humane Polyomaviren

Bislang wurden insgesamt 13 humane Polyomaviren (HPyV) beschrieben. Die ersten beiden wurden bereits in den 70er Jahren mit Hilfe der Elektronenmikroskopie identifiziert und wurden nach den Patienten benannt, aus denen sie isoliert wurden: Das JC Virus (JCV) und das BK Virus (BKV)[4, 5]. Beide können unter Immunsuppression Erkrankungen hervorrufen. Dabei führt das JCV zu der sogenannten progressiven multifokalen Leukoenzephalopathie (PML) [5]. Dies ist eine Erkrankung des zentralen Nervensystems, bei der es zur Demyelierung des Gehirns kommt. Ausgelöst wird dies durch die Reaktivierung des Virus aus der latenten Phase und der damit bedingten lytischen Replikation des Virus in Oligodendrozyten des ZNS. BKV dagegen steht in Zusammenhang unter Immunsuppression verschiedene Erkrankungen der Niere und Blase hervorzurufen. Dabei kann es infolge einer Nierentransplantation zu einer Polyomavirus induzierten Nephropathie mit Nierenentzündung bis hin zur Nierendysfunktion kommen, wohingegen Stammzelltransplantationen eine BKV induzierte hämorrhagische Zystitis auslösen können [6, 7]. Erst im 20. Jahrhundert wurden weitere

humane Polyomaviren identifiziert. So konnten 2007 durch PCR das KI- und das WU-Polyomavirus (KIPyV bzw. WUPyV) aus Atemwegsproben isoliert werden. Beide wurden nach dem Ort der Entdeckung benannt (KI= Karolinska Institut, WU= Washington University) [8, 9]. Ob diese Viren in Zusammenhang mit schweren Erkrankungen beim Menschen stehen ist unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei Kindern in Folge einer Stammzelltransplantation der Virustiter des KIPyV im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht ist [10]. Als fünfter Vertreter der humanen Polyomaviren wurde 2008 das Merkelzell Polyomavirus (MCPyV) aus Merkelzellkarzinomen (MCC) isoliert [11]. Die klonale Integration des Virus im Genom der Tumorzellen sowie die hohe Assoziation des Virus mit der Erkrankung (mehr als 90% aller MCC zeigen MCPyV integrierte Sequenzen auf) weisen auf die Beteiligung des Virus in der Tumorgenese hin [12-14]. Seit 2008 wurden weitere 8 humane Polyomaviren identifiziert. Untersuchungen von Hautproben führten zur Entdeckung von HPyV6 und 7 [15], die bisher in keiner Beziehung mit einer Erkrankung stehen, wie auch von HPyV9, welches aus dem Serum eines nierentransplantierten Patienten über PCR isoliert wurde [16]. Das Trichodysplasia Spinulosa Polyomavirus (TSPyV, HPyV8) dagegen wurde aus Hautfortsätzen, die sich bei der Trichodysplasia Spinulosa (TS) bilden, durch PCR amplifiziert [17]. Mittels Elektronenmikroskopie konnte in Hautbiopsien TS erkrankter Patienten in anormalen Keratinozyten Viruspartikel detektiert werden [18]. Diese Erkrankung tritt überwiegend bei immunsupprimierten Patienten auf, die zusätzlich zu den spindelartigen Hautfortsätzen auch kleine Hautverdickungen im Gesicht bilden. Eine Verbesserung der Patienten durch antivirale Therapien deutet auf den kausalen Zusammenhang zwischen TSPyV und TS [17-22]. Das zehnte humane Polyomavirus (HPyV10) wurde durch *rolling circle amplification* (RCA) und anschließende Sequenzierung in Warzen von Patienten, die nicht in der Lage sind Infektionen mit humanen Papillomaviren effektiv zu kontrollieren, gefunden [23]. HPyV10 zeigt eine 95-99% Übereinstimmung mit der Sequenz des aus Stuhlproben isolierten Malawi Polyomavirus (MWPyV) [24] und MX Polyomavirus (MXPyV) [25]. Beide konnten aus DNA von aufgereinigten Viruspartikeln sequenziert werden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zählen sie als verschiedene Stämme zum HPyV10. Auch das elfte HPyV, das STLPyV, wurde in einer Stuhlprobe aus Malawi isoliert [26]. Das zwölfte isolierte HPyV konnte aus Leberproben durch PCR mit degenerierten Primern detektiert werden [27]. Das vorerst letzte isolierte HPyV ist das NJPyV-2013, das in Endothelzellen eines immunsupprimierten Patienten durch Hochdurchsatzsequenzierung

aufgefunden werden konnte [28]. Der Verwandtschaftsgrad all dieser Polyomaviren basierend auf ihrer Sequenzhomologie im sogenannten *Large* T-Antigen (LT-Antigen) ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Die bislang aufgefundene Anzahl und Vielfalt der humanen Polyomaviren schließt nicht aus, dass insbesondere unter Verwendung von Hochdurchsatzsequenzierungsverfahren weitere humane Polyomaviren identifiziert werden.

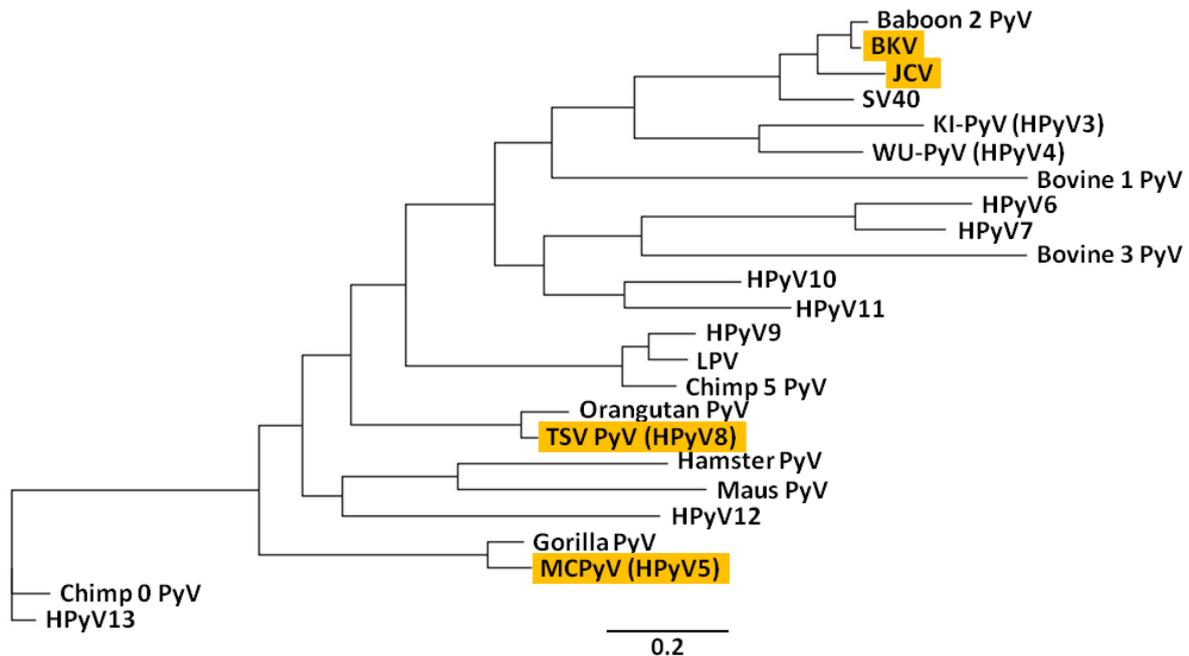


Abbildung 2.1: Phylogenetischer Baum zum Verwandtschaftsgrad der humanen Polyomaviren sowie nah verwandte Polyomaviren. Gelb markiert sind die bisher bekannten humanpathogenen Polyomaviren, die in Folge einer Immunsuppression oder Organtransplantation Erkrankungen auslösen können.

Humane Polyomaviren sind hochprävalent. So konnte gezeigt werden, dass im Kindesalter Antikörper detektiert werden können, die im Alter zunehmen (Tabelle 2.1). Bei Patienten, die am Merkelzellkarzinom (MCC) erkrankt sind, steigt dieser Anteil sogar auf bis zu 98% für das MCPyV [29]. Für das BKV und das JCV konnte bereits gezeigt werden, dass sie in der Niere persistieren und unter Immunsuppression Erkrankungen hervorrufen [30]. Für andere humane Polyomaviren bleibt dies noch zu untersuchen, wobei das MCPyV das erste humane Polyomavirus ist, für das eine eindeutige Beteiligung an der Tumorgenese des MCC gezeigt wurde. (hierauf wird detaillierter in 2.2 eingegangen). Polyomaviren sind sehr häufig in der Bevölkerung und führen nach den derzeitigen Erkenntnissen vor allem unter Immunsuppression zu Erkrankungen. Aufgrund der gestiegenen Lebenserwartung und einem Anstieg der damit zusammenhängenden medizinischen Behandlungen bei denen eine Unterdrückung des Immunsystems notwendig ist, wie z.B. rheumatische Arthritis, ist davon

auszugehen, dass humane Polyomaviren in Zukunft eine immer wichtigere Rolle spielen werden. Ihre gesteigerte Pathogenität unter Immunsuppression muss daher bei der Behandlung und Medikation von Ersterkrankungen berücksichtigt werden.

Tabelle 2.1: Seroprevalenzen der ersten neun humanen Polyomaviren. Angegeben sind Prozentzahlen der gesunden Probanden, die in den drei aufgelisteten Lebensabschnitten (<10, 10-19, >70 Jahre) Antikörper gegen das entsprechende HPyV tragen.[29, 31-33]

	<10 Jahre	10-19 Jahre	>70 Jahre
BKV	62	79	55
JCV	9,5	50	80
KIPyV	47	61	50
WUPyW	51	55	71
MCPyV	55	82	88
TSPyV	51	72	86
HPyV6	48	66	93
HPyV7	21	41	82
MWPyV	53	50	44
HPyV9	15	30	66

Wie Polyomaviren im Allgemeinen zeigen auch die humanen Vertreter ein sehr enges Wirtsspektrum und eine sehr hohe Spezifität hinsichtlich ihres permissiven Zelltyps. Dies führt dazu, dass diese Viren nicht einfach zu vervielfältigen sind und auch ein geeignetes Zellkulturmodell nur schwierig zu etablieren ist.

2.1.2. Aufbau des Virions und des Genoms von Polyomaviren

Polyomaviren sind unbehüllte DNA Viren mit einer Größe von ca. 40-50 nm. Ihr doppelsträngiges Genom ist zusammen mit zellulären Histonen im Kapsid verpackt (Abbildung 2.2 A) [34]. Das ikosaedrische Kapsid wird aus den viralen Proteinen VP1, VP2 und VP3 zusammengesetzt [35, 36].

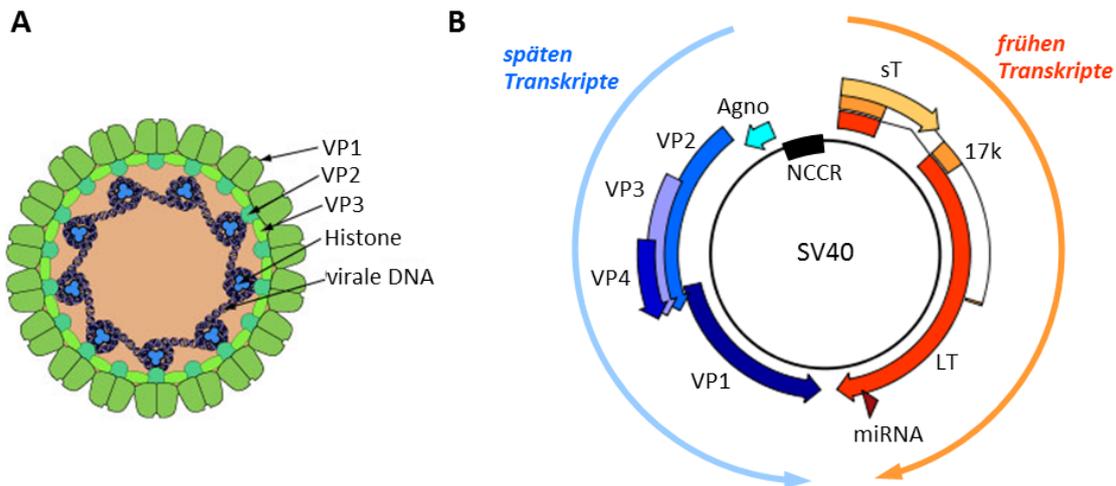


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung zum Aufbau und Genom von SV40. (A) zeigt die Zusammensetzung des Viruspartikels, der aus den Strukturproteinen VP1, 2, und 3 aufgebaut ist und die virale DNA, gebunden an zelluläre Histone, verpackt. Das Genom von Polyomaviren kann in drei Regionen eingeteilt werden: I) der nicht kodierenden regularischen Region (NCCR), II) den frühen Transkripten, dem sT- und LT- und 17K-Antigen, sowie einer miRNA, die komplementär zum LT-Antigen ist, hier dargestellt in rot und III) den späten Transkripten, die die Kapsidproteine VP1, VP2, VP3 und VP4 bilden sowie bei SV40 das Agnoprotein, hier dargestellt in blau.

Das Genom der Polyomaviren hat eine Größe von ca. 5 kbp. Dieses kann in drei Regionen eingeteilt werden: die *non coding control region* (NCCR), die frühe und die späte Region (Abbildung 2.2 B). Die NCCR oder auch regulatorische Region genannt, enthält dabei die Promotor- und Enhancerregionen, die für die Expression der viralen Transkripte essentiell sind sowie den Replikationsursprung (*ori*). Ausgehend von der NCCR werden die frühen und späten Gene in entgegengesetzte Richtung abgelesen. Die frühen Gene kodieren für die sogenannten Tumorantigene (T-Antigene), die aufgrund der Erkennung durch Antisera von Tumor-erkrankten Tieren ihre Bezeichnung haben. Durch alternatives Spleißen entstehen dabei bei SV40 das *small* T-Antigen (sT-Antigen), das *large* T-Antigen (LT-Antigen) und das 17K-Antigen [34, 37]. Für verschiedene Polyomaviren wurden aber bereits weitere T-Antigene nachgewiesen. So exprimiert JCV sogar drei weitere, das 135K, 136K und 165K T-Antigen, die zur effektiven viralen DNA Replikation beitragen [38]. Dabei spielt das LT-Antigen aufgrund seiner vielen Funktionen eine der wichtigeren Rollen im Lebenszyklus von Polyomaviren. Es besitzt verschiedene Bindedomänen, um mit Proteinen im Zellkern zu interagieren und deren Funktion zu beeinflussen, damit die S-Phase der infizierten Zellen induziert wird. Zu diesen Domänen gehört die DnaJ Domäne und das LXCXE Motiv, die beide im N-Terminus des LT-Antigens liegen [39, 40]. Über die *origin binding domain* (OBD) und die ATPase/Helikase-Domäne kann das LT-Antigen aktiv an der viralen DNA Replikation teilnehmen [41-44]. Auf die genauen Funktionen dieser Domänen wird in 2.1.3 eingegangen.

Die späten Gene kodieren die viralen Proteine 1, 2 und 3 (VP1, VP2 und VP3) sowie bei einigen Polyomaviren auch das Agnoprotein, welches, ausgehend von der NCCR, vor dem 5' Bereich der VPs codiert wird. VP1, 2 und 3 sind wichtig für den Aufbau der Kapsidstruktur von Polyomaviren. Dabei bilden 5 Moleküle des VP1 und 1 Molekül von VP2 oder VP3 ein Pentamer. 72 dieser Pentamere bilden dann das Kapsid, wobei der Zusammenhalt durch Kalziumionen stabilisiert wird und nur VP1 auf der Oberfläche exponiert ist [35, 36, 45]. Diese Proteine sind abgesehen von der Bildung des Kapsids auch wichtig für die erfolgreiche Infektion. So konnte für SV40 gezeigt werden, dass die Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization signal*, NLS) in VP3 wichtig ist, damit das virale Genom in den Zellkern transportiert wird [46]. Auf diese Funktion wird in Abschnitt 2.1.3 näher eingegangen. Das Agnoprotein, welches bislang nur bei einigen PyV, wie SV40, BKV und JCV, beschrieben ist, ist ein kleines Phosphoprotein mit einer Größe von ca. zehn kDa (zusammengefasst in [47]). Die Funktion des Agnoproteins scheint für die Partikelbildung sowie für den Austritt der Viruspartikel aus den Wirtszellen wichtig zu sein. Bei JCV inhibiert es zusätzlich Transkriptionsfaktoren, welche die Promotoren der frühen und späten Gene regulieren [48].

2.1.3. Allgemeiner Replikationszyklus von Polyomaviren

Der Replikationszyklus von Polyomaviren ist aufgrund der intensiven Untersuchungen von SV40 am besten für dieses Virus beschrieben. Daher beziehen sich die Angaben in diesem Absatz vorwiegend auf das SV40, wenn es nicht anders gekennzeichnet ist.

Wirtszell-Erkennung, Adsorption und schließlich Penetration wird durch das Viruskapsidprotein VP1 bestimmt. VP1 bindet an die Rezeptormoleküle der Zielzellen, welche bei der Mehrzahl der PyV Ganglioside sind. SV40 bindet an das Gangliosid GM1 und benötigt zusätzlich als Corezeptor das *major histocompatibility complex class I antigen* (MHC I) [49, 50]. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt dann über Caveolae und über das Caveosom wird der Viruspartikel zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. Bei dem Austritt des Virus aus dem ER wird das Kapsid geöffnet, wobei das Virus-Genom an VP2 und 3 gebunden bleibt [51]. Da Polyomaviren ruhende Zellen infizieren, muss das Genom aktiv in den Zellkern relokalisiert werden. So konnte gezeigt werden, dass die NLS des VP3 Proteins essentiell ist um die virale DNA zusammen mit VP3 in den Zellkern zu transportieren [52]. JCV dagegen, welches über Clathrin abhängige Endozytose aufgenommen wird, wird

über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert [53, 54]. Erst kurz vor Erreichen der Kernporen wird das Genom des JCV aus dem viralen Kapsid freigesetzt [55]. Ist das Virus-Genom dann im Zellkern lokalisiert, findet die Transkription der frühen Gene, der T-Antigene, statt. Dabei entstehen die verschiedenen Transkripte der T-Antigene durch alternatives Spleißen. Als nächster Schritt findet die Genomreplikation des Virus statt. Polyomaviren infizieren ruhende Zellen und kodieren keine eigene DNA Polymerase. Daher benötigen sie zur Replikation ihres Genoms die zelluläre DNA Replikationsmaschinerie, bei deren Aktivierung das LT-Antigen eine große Rolle spielt, dargestellt in Abbildung 2.3. Dazu bindet es über das LXCXE Motiv an das Retinoblastomprotein (pRB), das als Komplex mit E2F an Promotoren gebunden ist und diese inhibiert. Die Bindung von pRB am LT-Antigen führt zur Freisetzung von E2F und damit zur Aktivierung der Promotoren, wodurch die Transkription von S-Phase Genen initiiert wird [56, 57]. Gleichzeitig findet die Phosphorylierung des pRB durch die DnaJ-Domäne des LT-Antigens statt, was die Stabilisierung des pRB zur Folge hat [58]. Die unkontrollierte Induktion der S-Phase führt zur Aktivierung des Tumorsuppressors p53, welcher Signalwege aktiviert, die die Apoptose der Zellen einleiten. Jedoch konnte auch hier

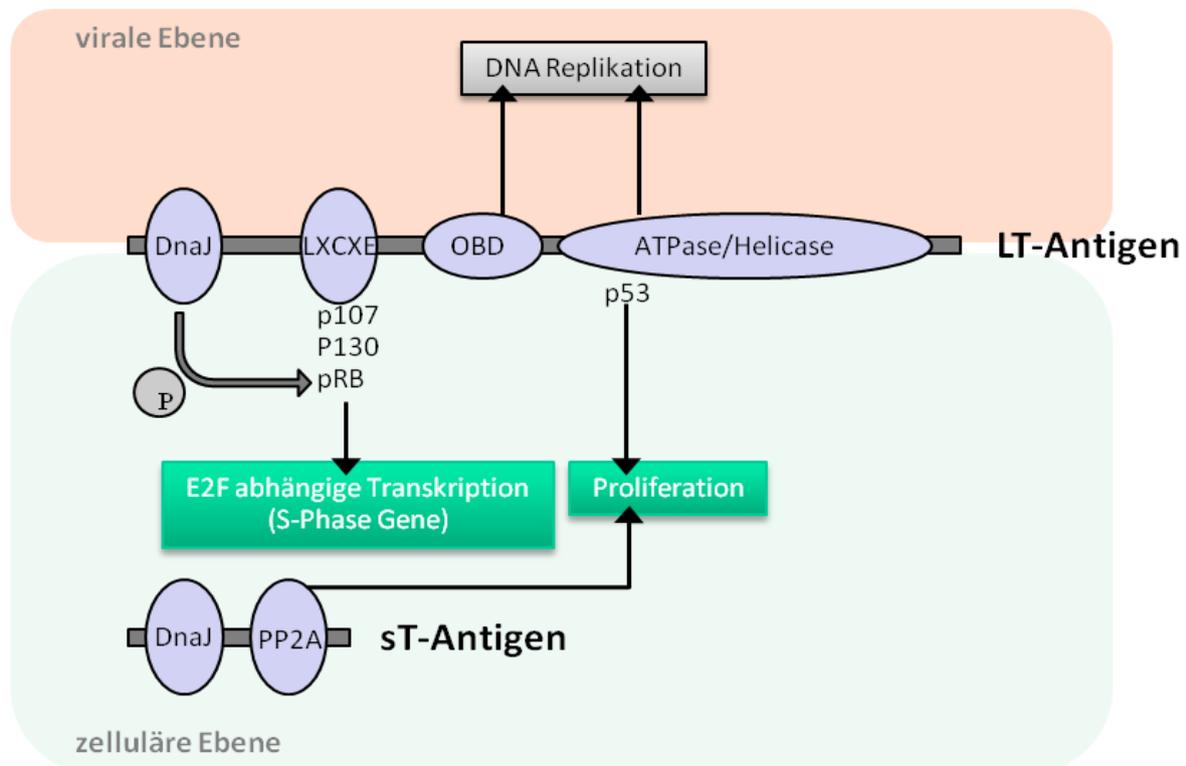


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Funktionen des LT- und sT-Antigens von SV40. Das sT- und LT-Antigen besitzen einen gemeinsamen N-Terminus mit der DnaJ-Domäne. Zusätzlich dazu besitzt das sT-Antigen eine Bindedomäne für PP2A, über die die Proliferation der Zellen induziert wird. Das LT-Antigen trägt im N-Terminus zusätzlich das LXCXE Motiv, an das Tumorsuppressoren wie pRB binden. Diese Interaktion aktiviert die Transkription von S-Phase Genen. Des Weiteren kann das LT-Antigen über die OBD sowie die ATPase/Helikase Domäne an der viralen DNA-Replikation teilnehmen. Außerdem kann das LT-Antigen des SV40 die Proliferation über die direkte Bindung und Inaktivierung von p53 initiieren.

gezeigt werden, dass das LT-Antigen p53 aktiv bindet und inhibiert [59, 60]. Aber auch die kleinen T-Antigene tragen zur Aktivierung der Proliferation von Zellen bei. Dabei ist die Hauptfunktion des sT-Antigens die Interaktion mit der Protein Phosphatase 2A (PP2A). Das sT-Antigen bindet an die katalytische Untereinheit A sowie an die strukturelle Untereinheit C von PP2A, was zur Dissoziation der regulatorischen Einheit B führt. Dies hat zur Folge dass PP2A inaktiv ist und Signalwege z.B. von NF κ B und MAPK durch die Phosphorylierung aktiv bleiben und die Zellproliferation aktivieren [61]. Das dritte T-Antigen des SV40 ist das 17k-Antigen. Es hat den gleichen N-Terminus wie sT- und LT-Antigen und damit auch die DnaJ-Domäne, über die es Funktionen des LT-Antigens komplementieren kann, wenn das LT-Antigen durch Mutationen inaktiviert ist und das 17k-Antigen unabhängig exprimiert wird [62]. In der Infektion mit SV40 sind bisher keine genauen Funktionen zum 17k-Antigen bekannt. Andere PyV exprimieren auch weitere T-Antigene, die die Proliferation aktivieren. So zeigt beispielsweise das middle T-Antigen des MPyV, nachdem es in der Plasmamembran lokalisiert und hier phosphoryliert wird, eine Bindung mit der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) und ShcA [63-67]. Dies führt zu Signalkaskaden, die die Proliferation aktivieren.

Das LT-Antigen induziert jedoch nicht nur S-Phase Gene, damit es zur viralen Replikation kommt, es nimmt auch aktiv daran teil. So wurde gezeigt, dass es als doppeltes Hexamer am Replikationsursprung des Genoms an spezifischen Sequenzen bindet. Hier rekrutiert es den DNA-Polymerase α -Primasekomplex. Über die ATPase/Helikase Domäne des LT-Antigens kann es selbst die DNA-Doppelstränge aufspalten, was den initialen Schritt der DNA Replikation darstellt und wodurch die Synthese beginnen kann. Die Funktion der Entwindung der DNA durch den LT-Hexamere Komplex ist abhängig von dem Phosphorylierungsstatus des LT Antigen. Wichtig für die Bindung der LT Hexamere am Replikationsursprung ist dabei die Phosphorylierung an Threonin 124. Serinphosphorylierungen dagegen akkumulieren während der Infektion und führen zur Inhibierung der Replikation [68, 69], was möglicherweise die Transkription der späten viralen Transkripte und damit die Viruspartikelbildung initiiert. Zeitgleich mit der Replikation findet die Transkription der späten Gene statt, wobei die aktive Replikation hierzu nicht benötigt wird. Auch dabei ist das LT-Antigen involviert. Dazu interagiert es mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie und Transkriptionsfaktoren wie TEF-1 und Sp1, um die Transkription zu aktivieren [70, 71].

Um den Replikationszyklus zu vollenden, müssen virale Partikel gebildet und aus den Zellen freigesetzt werden. So konnte gezeigt werden, dass in der frühen Region zusätzlich zu den LT-Antigenen auch eine miRNA codiert ist, die eine Komplementarität zum LT-Antigen aufweist. Die miRNA reguliert möglicherweise die LT-Transkripte herunter, damit im Lebenszyklus von der Replikation auf die Viruspartikelproduktion umgeschaltet wird. Gleichzeitig führt die Herunterregulation vom LT-Antigen dazu, dass infizierte Zellen schlechter von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden [72]. Zur Virusproduktion müssen als erstes die Kapsidproteine VP1, 2 und 3 in den Zellkern transloziert werden. Obwohl alle drei eine NLS enthalten, findet die Lokalisierung nur in Anwesenheit von VP1 statt [12, 73-75]. Die NLS von VP2 und 3 dagegen scheinen eher wichtig für die initiale Lokalisation des viralen Genoms in den Zellkern zu sein. Entscheidend für die richtige Lokalisierung von VP1 bei SV40 ist zudem das Agnoprotein [41, 76]. Im Zellkern kommt es zur Zusammensetzung der Capsomere, die wiederum mit der DNA zu Virionen zusammengestellt werden. Zur Freisetzung der Viruspartikel gibt es verschiedene Modelle. Einerseits konnte demonstriert werden, dass infizierte Zellen einen zytopathischen Effekt (CPE) zeigen, was sich in der Lyse der Zellen widerspiegelt. Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass Partikel über Vesikel zur Plasmamembran transportiert werden [77, 78]. Außerdem haben Untersuchungen ergeben, dass das Agnoprotein von JCV mit HP1 α interagiert, wodurch es zur Veränderung der nukleären Membran kommt und möglicherweise die Viruspartikel freigesetzt werden [79].

Dieser komplette Lebenszyklus von Polyomaviren findet in permissiven Zellen statt, dargestellt in Abbildung 2.4. Hierbei kommt es auch zu einer effizienten Transmission der Viren. Aber auch nicht permissive Zellen können infiziert werden. Dabei kann das Virus-Genom in das Wirtsgenom integrieren oder es geht bei der nächsten Teilung verloren. Im Falle einer Integration findet meist nur die Transkription der frühen Genprodukte statt, was in einer Transformation der Zelle resultieren kann.

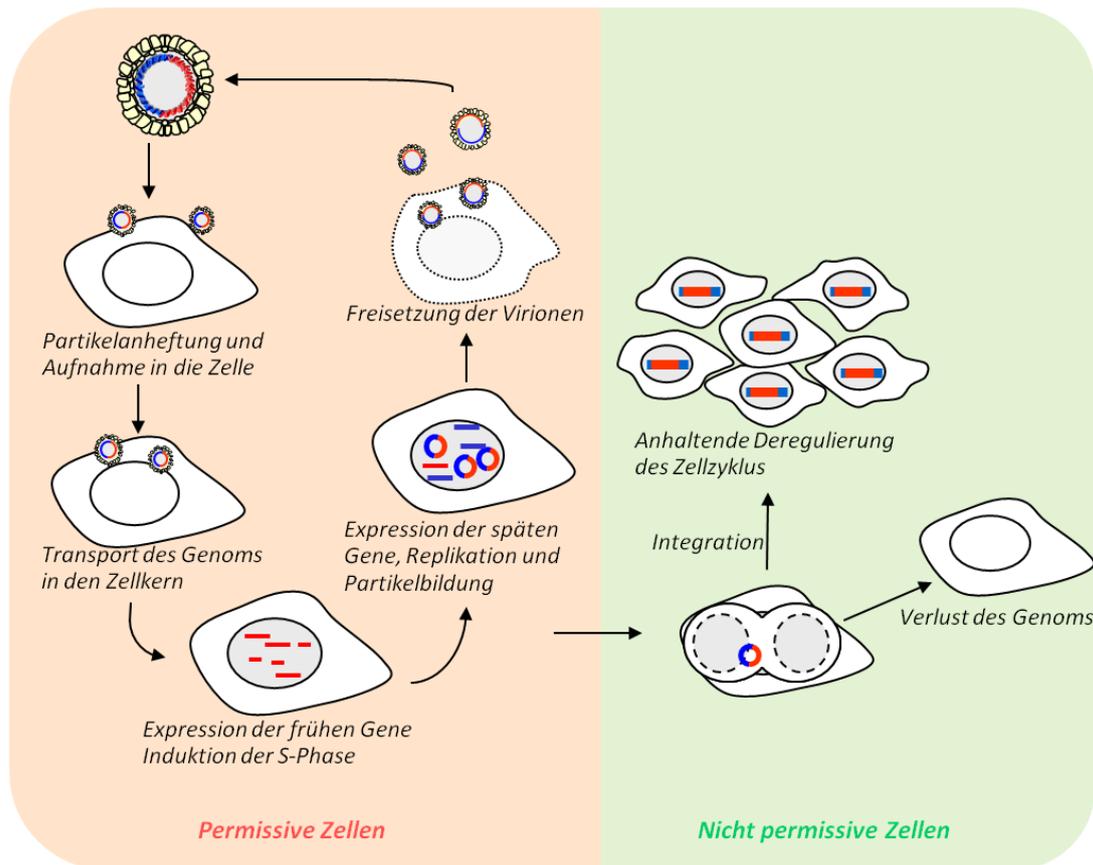


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Polyomaviren anhand von SV40. Werden permissive Zellen infiziert (hier rot hinterlegt), wird das Virus über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Das Virus wird zum ER transportiert, und nach der Freisetzung aus dem ER wird das Genom entpackt und in den Zellkern relokalisiert. Im Zellkern kommt es durch die Expression der viralen frühen Gene zur Transkription der S-Phase Gene, die die virale Replikation ermöglichen. Anschließend werden Kapsidproteine gebildet, was zur Bildung der Viruspartikel führt. Diese werden durch die Lyse der Zellen freigesetzt und können erneut Zellen infizieren. Werden dagegen nicht permissive Zellen infiziert, geht entweder das Virusgenom durch die Zellteilung verloren, wonach die Zelle wieder ihren Ursprungphänotyp annimmt oder das Virusgenom kann integrieren. Durch die Integration werden nur die T-Antigene des SV40 exprimiert, durch deren verschiedenen Funktionen die Transformation von Zellen induziert wird

2.2. DAS MERKELZELL POLYOMAVIRUS (MCPYV)

2.2.1. Das Merkelzellkarzinom (MCC) und die Entdeckung des MCPyV

Das Merkelzell Polyomavirus (MCPyV) wurde erstmalig in Geweben des Merkelzellkarzinoms (MCC) identifiziert. Hieraus leitet sich auch seine Namensgebung ab.

Das MCC ist ein sehr seltener aber aggressiver Hauttumor (Abbildung 2.5). Die Zellen des Tumorgewebes weisen eine sehr hohe Ähnlichkeit mit Merkelzellen auf. Diese sind mechanosensorische Zellen der Haut, die sich meist an unbehaarten Stellen befinden. Sie zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Vesikeln im Zytoplasma sowie der Expression von Zytokeratin 20 (Ck20) aus, was folglich auch im Tumorgewebe erkennbar ist [80]. Jedoch ist noch umstritten, ob der Tumor aus diesen Zellen entstanden ist, da kürzlich beschrieben wurde, dass Marker von primären Pre-B-Zellen, der Transkriptionsfaktor PAX5 und die terminale Deoxinukleotidyl Transferase (TdT) im Tumor exprimiert werden [81]. Das MCC zeigt sich als rot bis bläulich glänzenden Hautwucherungen (Abbildung 2.5), die ein schnelles Wachstum zeigen. Wird der Tumor erkannt solange keine Hautverdickungen oder



Abbildung 2.5: Lokalrezidiv eines Merkelzellkarzinoms. Typisch ist die rötlich bis bläuliche Verfärbung des Knötchens, das zusätzlich eine glänzende Oberfläche ausweist. Quelle: http://www.medmedia.at/media/artikel/spectrumonkologie/11031_Abb-2.JPG vom 20.09.2011

Metastasen auftreten, liegt die 5 Jahres Überlebensrate bei 64%, ansonsten sinkt sie auf 18% [82]. Das überwiegende Auftreten des Tumors bei älteren Patienten (> 70 Jahre) und Immunsupprimierten durch Organtransplantation oder infolge einer HIV Erkrankung sowie vereinzelte Berichte spontaner Regression nach Rekonstitution des Immunsystems [83-85] ließ vermuten, dass das MCC eine infektiologische Ursache hat. Neben der Immunsuppression ist eine intensive UV Bestrahlung der Haut ein weiterer Risikofaktor. So

werden MCC Tumore häufig an sonnenexponierten Körperregionen wie Gesicht, Hals und den Extremitäten beschrieben [86, 87].

Aufgrund der Vermutung eines infektiologischen Ursprungs des MCC wurde 2008 in verschiedenen Patientenproben mittels Hochdurchsatzsequenzierverfahren nach möglichen Erregersequenzen gesucht. Dabei konnte aus 400.000 cDNA Sequenzen eine virale Sequenz identifiziert werden, welche entfernte Sequenzhomologie zum T-Antigen des BKV aufzeigte [11]. Durch schrittweise Sequenzierung konnte das gesamte Genom eines neuen Polyomavirus, dem MCPyV, bestimmt werden. Weitere Analysen ergaben, dass das Genom des MCPyV in 80% der untersuchten MCC Geweben monoklonal integriert im Genom der Tumorzellen vorlag [11]. Diese hohe Assoziation des MCPyV mit dem MCC konnte von weiteren Gruppen bestätigt werden [13, 88-93]. Rodig und Kollegen konnten zeigen, dass durch die Verwendung eines sensitiveren Antikörpers gegen das LT-Antigen möglicherweise weit mehr MCC Gewebe (bis zu 97%) positiv für das MCPyV sind [94] als zunächst angenommen. Das lässt vermuten, dass das MCPyV in allen MCC integriert ist. Da die Primärtumore und entstandene Metastasen im gleichen Patienten die gleichen Integrationsmuster aufweisen [11, 13], muss die Integration des Virusgenoms vor der Tumorgenese stattfinden. Zusätzlich zu der Genomintegration konnte gezeigt werden, dass die einzigen viralen Proteine, die im Tumorgewebe exprimiert werden, das sT- und LT-Antigen sind. Deren Expression ist essentiell für das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen. Über eine shRNA vermittelte Herunterregulierung der T-Antigene konnte demonstriert werden, dass es zur Induktion der Apoptose der Tumorzellen kommt [95]. Des Weiteren konnten in MCPyV-Genomen, welche aus MCC-Geweben isoliert wurden, signifikante Mutationen in der frühen Genregion detektiert werden [13, 89, 96, 97]. Diese führen zu der Expression eines verkürzten LT-Antigens (LT_{trunc}-Antigen), das weiterhin die pRb-Bindedomäne enthält, jedoch nicht die ATPase/Helikasedomäne. Dadurch kann das im Tumor exprimierte LT_{trunc}-Antigen nicht die Replikation des Virus aktivieren.

Aufgrund dieser Daten des MCPyV in Bezug auf das MCC, zählt das MCPyV zu den humanen Tumoviren. Interessanterweise ist das MCPyV damit das erste bekannte Tumovirus in der Familie der Polyomaviren, das eine Tumorgenese im eigenen Wirt auslöst.

Der Tumorgenese durch das MCPyV muss eine aktive Infektion vorhergehen. So konnte durch serologische Untersuchungen gezeigt werden, dass 84% der Bevölkerung Antikörper

gegen das Virus tragen, der Titer in an MCC erkrankten Patienten jedoch um das 60fache erhöht ist [98]. Dies bestätigt, dass die Patienten möglicherweise nicht mehr in der Lage sind die Infektion zu kontrollieren.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in 50% aller MCPyV positiven MCC die miRNA des MCPyV nachweisbar ist [99]. Diese ist komplementär zum LT-Antigen und dient daher möglicherweise dazu die LT-Antigen Transkripte herunterzuregulieren, damit infizierte Zellen nicht vom menschlichen Immunsystem erkannt werden ähnlich zu SV40 [72]. Des Weiteren ist denkbar, dass die miRNA auch zelluläre Zielsequenzen haben könnte. Dieses wie auch die genauen Mechanismen der miRNA im Lebenszyklus bleiben noch zu untersuchen.

2.2.2. Mechanismen der Tumorgenese

Bislang konnte durch verschiedene Gruppen gezeigt werden, dass im Tumorgewebe des MCC die einzigen exprimierten viralen Proteine das sT- und LT- Antigen sind [11, 13, 93, 100, 101]. Daraus ließ sich vermuten, dass nur diese viralen Proteine wichtig für die Tumorgenese oder Proliferation der Tumorzellen sind. Bei Herunterregulierung der sT- und LT-Antigen Expression in MCC-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Proliferation gestoppt wird und sogar die Apoptose der Zellen ausgelöst werden kann [95]. Weitere Studien zu den einzelnen Proteinen zeigten, dass das MCPyV LT-Antigen wie andere LT-Antigene anderer Polyomaviren auch ein LXCXE Motiv zur Bindung von pRB hat [13]. Durch diese Bindung wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt und die Transkription von Genen initiiert, die wichtig zur DNA Replikation, Proliferation und DNA Reparatur sind. Diese Bindedomäne ist wichtig, um die Proliferation der MCC Zelllinien aufrecht zu erhalten [102]. Im MCC zeigt sich zudem eine Selektion auf den N-Terminus des LT-Antigens. Alle im Tumorgewebe integrierten MCPyV-Genome tragen Mutationen, die zu einem LT_{trunc}-Antigen führen, bei dem die pRb-Bindedomäne jedoch immer erhalten bleibt und der C-Terminus, der die Wachstumsraten in verschiedenen Zelllinien vermindert, nicht exprimiert wird [103]. Im Vergleich zum Wildtyp LT-Antigen (LT_{WT}-Antigen) scheint die Bindungsaffinität vom LT_{trunc}-Antigen zu pRb höher zu sein, wodurch das LT_{trunc}-Antigen das größere Potential besitzt primäre Ratten Nierenzellen zu transformieren [104].

Auch das sT-Antigen spielt eine Rolle in der Tumorgenese. Erste Studien, in denen gezeigt wurde, dass es MCPyV positive MCC Gewebe gibt, in denen nur das sT-Antigen exprimiert wird [100], konnten durch die Verwendung sensitiverer Antikörper gegen das LT-Antigen jedoch nicht bestätigt werden [94]. Shuda und Kollegen konnten aber zeigen, dass nur die Expression des sT-Antigens immortalisierte Zellen transformieren kann, jedoch in humanen Zelllinien keine vollständige Transformation stattfindet und hier zusätzlich das Wachstum verringert war im Vergleich zu den Nagerzelllinien. Die Transformationsaktivität ist jedoch unabhängig von der PP2A Bindung. Die Autoren machen dafür die durch sT-Antigen initiierte Hyperphosphorylierung von 4E-BP1 verantwortlich, wodurch eIF4E aktiviert und die Cap-abhängige Translation initiiert wird [100].

2.2.3. Das Genom

Bereits bei der Identifizierung des MCPyV konnte das gesamte Genom durch schrittweise Sequenzierung erfasst werden. Wie alle Polyomaviren hat es ein doppelsträngiges Genom mit einer Größe von ca. 5,4 kbp. Es enthält die drei typischen Regionen, die späten und frühen Gene, die in entgegengesetzte Richtung ausgehend von der NCCR abgelesen werden [11].

Die frühen Gene kodieren drei T-Antigene, sT-, LT- und 57K Antigen, die durch alternatives Spleißen entstehen. Kürzlich konnte ein viertes Protein in dieser Genregion identifiziert werden, das *alternate frame of LT-open reading frame* (ALTO), das auch während der Replikation exprimiert wird. Jedoch ist die genaue Funktion noch unbekannt [105]. Außerdem wird in der frühen Region auch eine miRNA kodiert, die komplementär zum LT-Antigen und ALTO ist [106]. Diese reguliert vermutlich analog zu SV40 die Expression des LT-Antigens herunter, um der Erkennung durch zytotoxischen T-Zellen zu verringern.

Bei den späten Genen konnten drei offene Leseraster identifiziert werden, die den Proteinen VP1, 2 und 3 zugeordnet sind. Diese sind wichtig für die Kapsidbildung. Sequenzanalysen zeigten jedoch, dass die Kozaksequenz um das Startkodon des VP3 nur sehr schwach ist und auch die N-terminale Konsensussequenz MALXXΦ (Φ entspricht hier einer aromatischen Aminosäure), die bisher alle bekannten VP3 Proteine haben, fehlt. Schowalter und Kollegen konnte auch die Expression des VP3 in infizierten Zellen sowie in aufgereinigten viralen

Partikeln nicht nachweisen [107]. Daher wird das VP3 vermutlich nicht exprimiert. Eine weitere Studie von Theiss und Kollegen zeigte, dass für das VP3 kein Spleiß detektiert werden konnte [108].

2.2.4. Der Lebenszyklus

Das Genom des MCPyV konnte bisher nicht nur aus den Geweben des MCC isoliert werden sondern auch in geringer Kopienzahl aus der Haut, den Atemwegen und dem Serum gesunder Patienten [15, 109-112]. Möglicherweise kann hier in einem oder auch verschiedenen Zelltypen das Virus persistieren. Der Zelltyp für die virale Persistenz sowie auch der permissive Ursprungszelltyp, in dem das Virus den kompletten Lebenszyklus (von der Infektion zur Replikation bis zur Partikelfreisetzung) durchläuft, ist bisher jedoch nicht identifiziert worden. Daher ist über den Lebenszyklus des MCPyV noch wenig bekannt.

Mit Hilfe von Virus ähnlichen Partikeln (VLP), die aus dem Kapsidprotein VP1 und VP2 bestehen, konnten erste Versuche zur Rezeptorbindung an der Zelloberfläche durchgeführt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass das MCPyV Glycosaminosulfate und möglicherweise sialylierte Ganglioside als Korezeptoren zur Zellanheftung benutzt [113, 114]. Vermutlich findet dann die Aufnahme, ähnlich zum BKV, das auch an Ganglioside bindet, über Caveolae statt. Aufgrund des fehlenden Infektionssystems für das MCPyV ist über die folgenden Schritte des Transports des Viruspartikels im Zytoplasma, das Freisetzen des Genoms wie auch über die Zusammensetzung der Viruspartikel und derer Freisetzung nichts bekannt. Mit Hilfe des *in vitro* Replikationssystems (hier wird genauer in 2.2.5 eingegangen) und Überexpressionsversuchen konnten jedoch einige Funktionen der sT- und LT-Antigene bestimmt werden.

2.2.4.1. Die Rolle des LT-Antigens

Um die zelluläre Replikationsmaschinerie zu aktivieren, besitzt auch das MCPyV LT-Antigen die für Polyomaviren typischen Bindemotive. Über das LXCXE Motiv und dessen Bindung von pRb werden S-Phase Gene aktiviert, die zur viralen Replikation benötigt werden [13]. Des Weiteren besitzt das LT-Antigen auch die OBD, um als Hexamer am viralen ori zu binden und die ATPase/Helikase Domäne, um die virale Replikation zu induzieren. Im Vergleich zu SV40

konnte für das MCPyV LT-Antigen bisher keine direkte Bindung mit p53 nachgewiesen werden [103, 104]. Jedoch scheint die Interaktion zwischen dem LT-Antigen C-Terminus und p53 indirekt zu sein, da die p53 abhängige Transkription in LT-Antigen überexprimierenden Zellen reduziert ist [104].

Um Proteine, die zur Replikation benötigt werden, zu rekrutieren, interagiert der N-Terminus des LT-Antigens mit dem *bromodomain containing protein 4* (BRD4). BRD4 kolokalisiert während der viralen Replikation mit den MCPyV Replikationszentren. Möglicherweise wird über die weitere Rekrutierung vom Replikationsfaktor C (RFC) und *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) die DNA Polymerase δ herangezogen, um die DNA-Elongation des MCPyV-Genoms zu begünstigen [115].

Als weiteren zellulären Faktor kann das MCPyV LT-Antigen hVam6p binden, das aufgrund der Bindung in den Zellkern lokalisiert [116]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Bindung von hVam6p am LT-Antigen zu einer verminderten viralen Replikation wie auch zu verringerter Partikelproduktion führt. Dies könnte ein möglicher Mechanismus zur Erhaltung der Latenz sein [117].

Um die Replikation zu beeinflussen finden nicht nur Interaktionen mit anderen Proteinen, sondern auch posttranslationale Modifikationen am LT-Antigen statt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an T299 wichtig zur Aktivierung der Replikation ist. Möglicherweise wird dadurch die Bildung der LT-Hexamere induziert. Erfolgt eine weitere Phosphorylierung an T297 wird die Replikation jedoch inhibiert. Wahrscheinlich wird dieser Mechanismus genutzt, um die nächste Phase des Replikationszyklus, die Expression der späten Gene sowie Partikelproduktion, zu starten [118].

2.2.4.2. Die Rolle des sT-Antigens

Auch das sT-Antigen trägt zum Replikationszyklus bei. Dabei interagiert es zum einen mit dem Ubiquitin Ligase Komplex SCF^{Fbw7}, um die Ubiquitinierung vom LT-Antigen zu verhindern und es damit zu stabilisieren [119]. Zum anderen induziert es die dauerhafte Phosphorylierung von dem Translationsfaktor 4E-BP1. In Folge dessen wird eIF4E frei und kann die Cap-abhängige Translation initiieren [101].

2.2.5. *In vitro* Replikationssystem

Bisher wurden für nur wenige humane Polyomaviren Replikationssysteme entwickelt. Erschwert wird dieses durch das enge Wirtsspektrum dieser Viren. So zeigt sich für die Infektion des JCV, dass bisher nur primäre Gliazellen permissiv sind [120, 121]. Auch für BKV werden primäre renale tubuläre Epithelzellen (RPTe) benötigt, um den ganzen Lebenszyklus zu untersuchen [122]. Für das MCPyV konnte kürzlich ein *in vitro* Replikationssystem etabliert werden, in dem Mechanismen der Replikation und eventuelle Virusbildung untersucht werden können jedoch keine serielle Infektion möglich ist [114, 117, 123]. Dabei wurde bei zwei Studien jeweils ein Konsensus MCPyV-Genom erstellt aus den damaligen zu Verfügung stehenden Sequenzen. Diese stammten alle aus dem MCC und hatten in Folge dessen Mutationen in der T-Antigen Region, die zu einem verkürzten LT-Antigen führen, welches die Replikation nicht initiieren kann. Diese Mutationen wurden aufgehoben und eine Konsensus Sequenz synthetisiert. In 2010 veröffentlichte Sequenzen zeigten [15], dass das Genom MCV-Syn aus der Studie von Neumann und Kollegen 2011 mit 3 Volllängengenomen aus gesunden Patienten identisch ist [123].

Für das *in vitro* Replikationssystem wurden die Genome in bakterielle Vektoren kloniert. Um jedoch nur die virale DNA zu transfizieren, muss das Genom mittels Restriktionsendonukleasen aus dem Vektor geschnitten und religiert werden, schematisch dargestellt in Abbildung 2.6. Bei der Transfektion verschiedener Zelllinien aus unterschiedlichen Spezies und Geweben (aufgelistet in Tabelle 2.2) zeigte sich, dass menschliche embryonale Nierenzellen (293), die menschliche nicht kleinzellige Lungentumorzelllinie H1299 und die neuroektodermale Tumorzelllinie PFSK-1 die Replikation des MCPyV sehr gut unterstützen [123]. Durch die Kotransfektion der frühen Region des MCPyV zum Virusgenom konnte außerdem eine Verbesserung der viralen Replikation erreicht werden. Mittels dieses Systems können auch virale Partikel detektiert und isoliert werden, jedoch ist damit keine serielle Transmission möglich [114, 123].

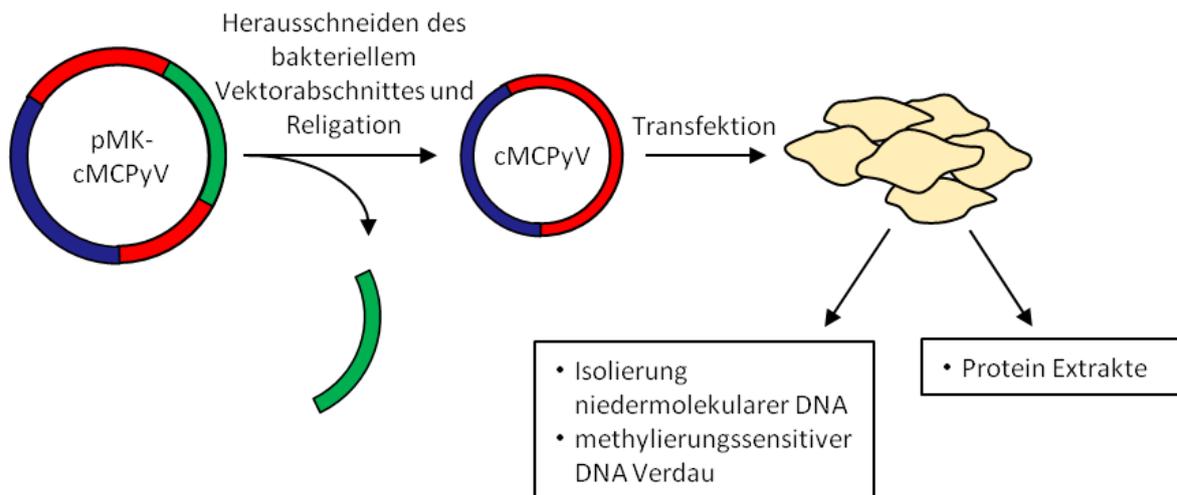


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des *in vitro* Replikationssystem. Um die Replikation des MCPyV zu untersuchen, muss aus dem proviralen Genom pMK-cMCPyV der bakterielle Abschnitt mittels Enzymen herausgeschnitten und das virale Genom rezirkularisiert werden. Das MCPyV- Genom kann dann in die Zellen transfiziert werden. Diese können mittels Western Blot nach exprimierten viralen Proteinen sowie im Southern Blot nach replizierter viraler DNA untersucht werden.

Nichtsdestotrotz kann in PFSK-1 Zellen auch die Persistenz des MCPyV untersucht werden. Hier konnte gezeigt werden, dass die MCPyV DNA bis zu 180 Tage nach Transfektion nachweisbar ist. Dabei ist die Expression der miRNA wichtig für das Fortbestehen des viralen Genoms in der Zelle [108].

Tabelle 2.2: Zelllinien, die hinsichtlich der Unterstützung der viralen Replikation des MCPyV untersucht wurden.

Zelllinie	Spezies	DNA Replikation	Referenz
CV-1	african green monkey	-	Neumann et al., 2011
Vero	african green monkey	-	Neumann et al., 2011
COS-7	african green monkey	(+)	Neumann et al., 2011
N2A	mouse	-	Neumann et al., 2011
NIH3T3	mouse	-	Neumann et al., 2011
pBRK	rat	-	Neumann et al., 2011
293	human	++	Neumann et al., 2011
293T	human	-	Neumann et al., 2011
293TT	human	+	Feng et al., 2011
293 4T	human	++++	Schowalter et al., 2010
HeLa	human	-	Neumann et al., 2011
A549	human	+	Neumann et al., 2011
Bea 2B	human	-	Neumann et al., 2011
H1299	human	++	Neumann et al., 2011
Saos-2	human	+	Neumann et al., 2011
HaCaT	human	-	Neumann et al., 2011
Primäre Keratinozyten	human	-	Neumann et al., 2011
NHDF	human	+	Neumann et al., 2011
Huvec	human	+	Neumann et al., 2011
PFSK-1	human	+++	Neumann et al., 2011
LAN-1	human	-	Neumann et al., 2011
IMR-32	human	-	Neumann et al., 2011
Sy5y	human	-	Neumann et al., 2011
UISO	human	+	Feng et al., 2011
C33-A	human	-	Neumann, Czech-Sioli unpublished

2.3. PML-NB

Im Zellkern befinden sich diverse nukleäre Strukturen, die aus verschiedenen Proteinen bestehen. Eine von diesen werden *promyelocytik leukemia (PML) nuclear bodies (NB)* oder *Nuclear Domain 10 (ND10)* oder PML onkogene Domänen (PODs) genannt. Je nach Zelllinie variieren diese in Anzahl pro Zellkern und auch in der Zusammensetzung (zusammengefasst in [124]). Sie lassen sich als kleine punktförmige Strukturen im Zellkern detektieren

(Abbildung 2.7 A), die eine Größe von etwa 0,2-1 μm haben. Im Zellkern sind sie eng verbunden mit der nukleären Matrix. Für die Ausbildung und den Zusammenhalt dieser Einheiten ist das Protein PML wichtig. Dabei spielt die Sumoylierung von PML sowie dessen SUMO-interagierenden Motive (SIMs) eine große Rolle. Durch diese Modifikationen und Domänen kann ein Netzwerk von PML Proteinen untereinander und zu anderen PML assoziierten Proteinen aufgebaut werden (Abbildung 2.7 B) [125, 126]. Das Protein PML wird in sieben verschiedenen Isoformen (I-VII) exprimiert, die sich im C-Terminus voneinander unterscheiden. Dabei enthalten alle das RBCC (Ring Motiv und B-Box, mit anschließender coiled-coil Domäne). Die Isoformen I-VI lokalisieren im Zellkern, die Isoform VII als einzige im Zytoplasma. Aufgrund der unterschiedlichen C-Termini haben sie vermutlich unterschiedliche Funktionen und Interaktionspartner [127]. Bisher konnte gezeigt werden, dass bis zu 150 weitere Proteine bekannt sind, die transient in diesen Strukturen lokalisieren [126]. Ein weiteres wichtiges Protein ist Daxx. Dieses muss selbst auch sumoyliert sein, um zu den PML-NB zu relokalisieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Relokalisierung von Daxx in PML-NB das Protein von Heterochromatin fernhält, so dass seine transkriptionelle Repression verhindert wird [125]. Es könnte zudem möglicherweise als Adpaterprotein fungieren, wie für das frühe Protein pp71 des humanen Cytomegalovirus (HCMV) gezeigt werden konnte. Dieses wird während der Infektion durch die Interaktion mit Daxx zu PML-NB rekrutiert [124]. Ein weiteres Protein, das häufig in PML-NB zu detektieren ist, ist der transkriptionelle Repressor Sp100. Auch von Sp100 wird möglicherweise die sVerfügbarkeit im Nukleoplasma durch die Relokalisierung zu PML-NB

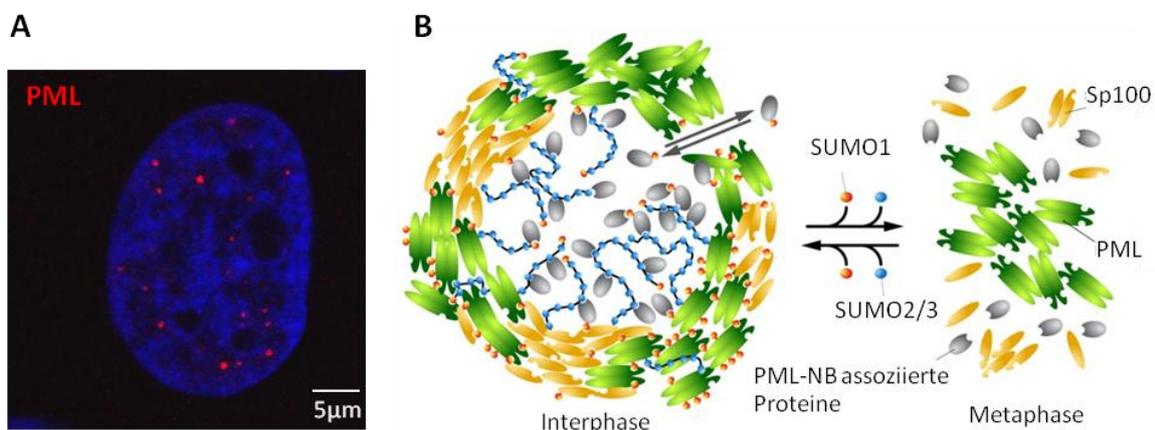


Abbildung 2.7: A) H1299 Zellen, in denen PML mittels Immunfluoreszenz detektiert wurde. B) Aufbau von PML-NB. Das Gerüst aus PML und Sp100 wird über Sumoylierungen und SIM-Motive sowie Multimere der Proteine zusammengehalten. Auch PML-NB assoziierte Proteine, die transient zu den Strukturen lokalisieren, werden häufig über eigene Sumoylierungen rekrutiert. Während der Mitose dagegen brechen diese Strukturen aufgrund von Desumoylierungen auseinander. ([1] verändert)

reguliert, wobei hier aber nicht die Sumoylierung von Sp100 als Mechanismus verantwortlich ist [124]. Bei Sp100 wird dagegen die Entlassung aus PML-NB durch Desumoylierung reguliert. Auch Sp100 wird durch alternatives Spleißen als vier verschiedene Isoformen (A, B, C und HMG) exprimiert. Diese unterscheiden sich im C-Terminus sowie durch eine zusätzliche SAND-Domäne, die von der Isoform B, C und HMG ausgebildet wird [128, 129].

2.3.1. Funktionen von PML-NB

Aufgrund der verschiedenen Proteine, die mit den PML-NB assoziiert sind, spielen sie in diversen Prozessen wie Regulierung der Transkription, Apoptose, Seneszenz, Angiogenese sowie während der DNA-Schaden Reparatur eine Rolle. Dies wird auch häufig dadurch bedingt, dass PML-NB katalytische Domänen darstellen, um Proteine posttranskriptional zu modifizieren.

Um die Apoptose zu regulieren kann p53 in PML-NB rekrutiert werden. Dabei findet die Rekrutierung spezifisch durch die PML Isoform IV statt [130], was die Acetylierung und Phosphorylierung von p53 zur Folge hat. Zusätzlich kann PML die E3 Ubiquitin Protein Ligase MDM2 binden und inaktivieren. MDM2 ubiquitiniert p53 und kann so dessen antiapoptotische Funktion inhibieren. Aber auch weitere Proteine, die p53 regulieren wie die Herpesvirus-assoziierte Ubiquitin spezifische Protease (HAUSP) und der Proteininhibitor von aktiviertem STAT (PIAS) werden in PML-NB rekrutiert und können hier p53 durch posttranskriptionale Modifikationen regulieren. Ein weiterer p53 unabhängiger Mechanismus ist die Regulierung von Daxx, wobei der zugrundeliegende Ablauf noch nicht komplett verstanden ist. Jedoch hat Daxx außerhalb von PML-NB antiapoptotische Funktionen, da antiapoptotische Gene reprimiert werden, sobald es in die PML-NB lokalisiert. (zusammengefasst in [131])

Bei DNA-Schäden konnte gezeigt werden, dass DNA-Reparatur- und Mitose-Prüfpunkt-Proteine in PML-NB lokalisieren. Diese kolokalisieren, lösen sich von PML-NB oder können sich auch wieder anlagern in diesem Prozess. Des Weiteren konnte einzelsträngige DNA in PML-NB detektiert werden und auch die Bindung von PML-NB an DNA, die repariert wird. Dabei wird vermutet, dass PML-NB DNA Abschnitte markiert, die irreparabel sind oder diese

für die homologe Rekombination kennzeichnet, da die Lokalisierung an diese Stellen meist spät im Prozess der DNA Reparatur stattfindet. (zusammengefasst in [131])

Neben Sp100 und Daxx können auch noch weitere Transkriptionsfaktoren und transkriptionelle Regulatoren zu PML-NB lokalisieren. Zusätzlich liegen PML-NB in der Nähe von acetyliertem Chromatin. Daher wird vermutet, dass die PML-NB Transkriptionsfaktoren durch die räumliche Nähe zur Verfügung stellen oder diese regulieren kann, sei es durch Freisetzung aus den PML-NB oder durch das Rekrutieren. Ein bekanntes Beispiel dafür ist der Transkriptionsfaktor Sp1. Dieser interagiert mit PML, wird sumoyliert und folglich in PML-NB festgehalten, wodurch die transkriptionelle Aktivität inhibiert wird [132]. Ein weiteres vorgeschlagenes Modell ist, dass PML-NB indirekt an Chromatin modulierenden Prozessen teilnimmt oder Abschnitte im Chromatin kennzeichnet, die permissiv für die Transkription sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch Korepressoren und das Heterochromatin Protein 1 (HP1) in PML-NB lokalisieren. (zusammengefasst in [131])

2.3.1.1. PML-NB und virale Infektionen

Die Tatsache, dass PML und Sp100 in Folge einer Interferonbehandlung in ihrer Expression hochreguliert werden, lässt vermuten, dass sie eine antivirale Funktion haben. Erste Studien dazu zeigten, dass viele Viren mit PML-NB interagieren und diese abbauen. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass PML-NB auch positive Effekte auf den Replikationszyklus von Viren haben können.

So ist bekannt, dass während der Infektion mit dem Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) in den Zellkern gelangende virale Genome mit PML-NB interagieren. Dabei ist es höchstwahrscheinlich, dass Proteine aus den vorhandenen PML-NB an die viralen Genome relokalisieren und hier PML-NB ähnliche Strukturen aufbauen [133]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Sp100 Isoform A wichtig für die Expression des viralen Proteins ICPO ist. Die Isoformen B, C und HMG dagegen haben einen reprimierenden Effekt auf die Expression der frühen Gene und verhindern so den Infektionszyklus[134]. Dabei zeigte sich, dass Sp100 A vorwiegend in PML-NB lokalisiert und HSV-1 über die Lokalisierung zu diesen Strukturen die positive Funktion ausnutzt. Sp100 B, C und HMG dagegen lokalisierten bei dieser Studie eher im Nukleoplasma. Entstandenes ICPO dagegen führt zum proteasomalen Abbau von PML und Sp100, wodurch die PML-NB zerstört werden [135]. Auch während der

Infektion mit dem HCMV werden die PML-NB aufgelöst. Jedoch findet hier keine Degradierung statt. Vielmehr interagiert PML mit dem sehr frühen viralen Protein IE1. Dieses relokalisiert PML an Chromatin und induziert so die Auflösung der Strukturen [135]. Das Epstein Barr Virus (EBV) dagegen repliziert sehr langsam und exprimiert in der latenten Phase nur sehr wenige virale Proteine. Damit es in die lytische Phase wechseln kann, müssen PML-NB zerstört sein. Dieses wird durch das virale Protein Epstein Barr nukleäres Antigen 1 (EBNA-1) sichergestellt, das mit PML IV interagiert [136], und dabei dessen proteasomalen Abbau induziert [137]. Auch in der Infektion mit humanen Adenoviren (hAdV) werden PML-NB zerstört. Jedoch findet hier eine Umstrukturierung zu sogenannten *track-like* Strukturen statt. Diese werden initiiert durch die frühen viralen Proteine E1B-55K und E4orf3 [138, 139]. Dabei enthalten diese Strukturen kein Daxx. Daxx wird in der Infektion mit hAdV Typ 5 durch E1B55K über einen Proteasom-abhängigen Signalweg abgebaut [140].

Polyomaviren und PML-NB

Zur Interaktion von Polyomaviren mit PML-NB und zu möglichen Einflüssen auf den viralen Lebenszyklus gibt es bisher wenig veröffentlichte Studien. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die DNA von Polyomaviren benachbart zu PML-NB lokalisiert [141-143]. Das MPyV repliziert in infizierten 3T3 Fibroblasten, die WT PML exprimieren, wie auch in infizierten PML^{-/-} MEFs. In beiden Zelllinien zeigt sich kein Unterschied bezüglich der Replikation, Partikelbildung und Virusfreisetzung [141]. Das lässt vermuten, dass PML-NB nicht wichtig sind für den Lebenszyklus des MPyV und möglicherweise auch nicht mit diesen Strukturen interagiert, jedoch fehlen weitere Untersuchungen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass das MPyV früh in der Infektion Funktionen der PML-NB inaktiviert, wodurch eine Herunterregulierung dieser Proteine auch keinen Einfluss auf den Lebenszyklus hätte. Bei SV40 dagegen scheint die Replikation von einem Plasmid, das den ori von SV40 enthält, mit Coexpression vom LT-Antigen PML-NB abhängig zu sein [144]. Dies konnte bestätigt werden indem in COS-7 Zellen PML über shRNA herunter reguliert wurde und sich dabei eine reduzierte Replikation von dem ori enthaltenem Plasmid im Vergleich zu WT-Zellen zeigte [145]. Etwas anders verhält es sich bei dem humanen Polyomavirus JCV. Hier kolokalisieren die Kapsidproteine des Virus im Überexpressionsversuch mit PML-NB und bilden an den PML-NB VLPs [146]. Dies konnte auch in der Infektion mit JCV bestätigt werden, wobei dort PML-NB zusätzlich eine negative Rolle hinsichtlich der viralen Transkription spielen. So wird

die Infektionsrate, gemessen an LT-Antigen positiven Zellen, durch Behandlung mit PML-NB induzierendem Interferon β drastisch inhibiert. Eine Änderung der Proteinlevel von PML während der Infektion konnte aber nicht gezeigt werden [147]. Im Gegensatz dazu wurde bei der Infektion von RPTE Zellen mit BKV ein Anstieg der Größe und gleichzeitig Verringerung der Anzahl von PML-NB detektiert. Dieses ist abhängig von der Replikation des Virus und kann nicht alleine durch das LT-Antigen ausgelöst werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Veränderung der Struktur der PML-NB eine Inhibierung ihrer Funktion darstellt. Außerdem lokalisieren während der Infektion mit BKV Sp100 und Daxx aus den PML-Strukturen, ohne dass ihre Proteinlevel verringert werden. Die zugrundeliegende Funktion muss noch weiter untersucht werden [142].

2.4. ZIEL DIESER ARBEIT

Das MCPyV ist eines von dreizehn bekannten humanen Polyomaviren. Einige dieser Viren (BKV, JCV, MCPyV und TSPyV) können unter Immunsuppression zu schweren Erkrankungen führen, beispielsweise kann die Infektion/Reaktivierung des BKV bei Nierentransplantierten bis hin zur Nierendysfunktion und Verlust des transplantierten Organs führen. Interessanterweise ist das MCPyV jedoch das erste bekannte Polyomavirus, das Tumore im eigenen Wirt induzieren kann und wird daher seit 2011 zu den humanen Tumorigenen gezählt. MCPyV wird mit einer hohen Assoziation (90-95%) im Gewebe des MCC nachgewiesen werden [11, 89-94, 96, 110, 148]. Dabei liegt das virale Genom monoklonal integriert im Genom der Tumorzellen vor, d.h. die Primärtumore und Metastasen eines einzelnen Patienten zeigen das gleiche Integrationsmuster [11, 89, 93]. Daher muss die Integration des Virusgenoms vor der Tumorgenese stattfinden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die einzigen viralen Proteine, die im Gewebe des MCC sowie in Zelllinien aus dem MCC exprimiert werden, das sT- und LT-Antigen sind [89, 100, 101]. Die Expression dieser beiden Proteine ist dabei essentiell für die Proliferation der Zellen, die Herunterregulierung beider Proteine in Zelllinien aus dem MCC führt zum Wachstumsstopp der Zellen und schließlich zur Induktion der Apoptose [149]. Zusätzlich dazu konnte gezeigt werden, dass es nur im MCC (in Normalgewebe sind diese Mutationen nicht vorhanden) innerhalb der frühen Region des MCPyV-Genoms zu Mutationen kommt. Diese betreffen die codierende Sequenz des LT-Antigens, wodurch es zu der Expression eines verkürzten LT-Antigens kommt [13]. Dieses Protein kann durch die fehlende OB- und Helikasedomäne die virale Replikation nicht mehr

induzieren. Jedoch bleibt auch bei dem verkürzten LT-Protein die pRb bindende Domäne erhalten, die wichtig ist, um die Proliferation der Tumorzellen aufrecht zu erhalten [102]. Um die Mechanismen der Tumorgenese aber auch die Biologie des Virus zu untersuchen, wird ein Replikationssystem benötigt. Polyomaviren im Allgemeinen sind sehr spezifisch hinsichtlich des Wirtsorganismus und des Zelltyps, in denen sie permissiv replizieren. Dies erschwert die Etablierung eines permissiven Systems, in dem der gesamte Lebenszyklus zu untersuchen ist. Bisher gibt es weltweit für das MCPyV nur ein semipermissives Replikationssystem, in dem die Replikation des MCPyV analysierbar ist [114, 117, 123]. Dazu wird ein synthetisch hergestelltes MCPyV-Genom, das zu 100% identisch ist mit Wildtypisolaten, in Zellen transfiziert. In wenigen Zellen (PFSK-1, 293 und H1299) kann die virale DNA Replikation und auch die Expression der viralen Proteine detektiert werden. In diesem System konnte auch die Entwicklung von Viruspartikeln nachgewiesen werden, jedoch keine serielle Transmission. Dennoch eignet sich dieses System, um Faktoren zu analysieren, welche die Replikation des MCPyV beeinflussen.

Um eine mögliche permissive Zelllinie zu finden, wurden in dieser Arbeit mit Hilfe des *in vitro* Replikationssystems auf vorangegangenen Arbeiten aufbauend [114, 117, 123] weitere Zelllinien untersucht. Als mögliches Reservoir des MCPyV werden momentan die Haut und prä-B Lymphozyten diskutiert [81]. Zusätzlich ist es auch denkbar, dass der Zellzyklus des MCPyV in der Haut möglicherweise ähnlich wie bei Papillomaviren ablaufen könnte. Hier ist der Replikationszyklus der Viren abhängig von der Differenzierung der Keratinozyten [150]. Ein derartiges Hautmodell wurde von Arbeitsgruppen, welche sich mit Papillomaviren beschäftigen auf seine Permissivität für das MCPyV ohne Erfolg untersucht (Christopher Buck, NIH, USA, persönliche Kommunikation). In dieser Arbeit wurden zwei weitere Hautzelllinien, UISO und HFF Zellen, sowie zwei B-Zelllinien, BJAB und RAJI, auf ihre Permissivität hinsichtlich der MCPyV *in vitro* Replikationssystems analysiert.

Um das bestehende *in vitro* Replikationssystem zu verbessern, wurden zudem virale Proteine hinsichtlich ihres Einflusses auf die Replikation des MCPyV untersucht.

Des Weiteren sollten Wirtsfaktoren in Bezug auf ihren Einfluss auf die virale Replikation des MCPyV untersucht werden. Dazu wurde auf Ergebnisse einer Tandemaffinitätsaufreinigung des LT-Antigens des MCPyV mit anschließender MudPit Analyse, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, aufgebaut: In der Studie konnten 73 Proteine identifiziert werden, die

mit dem MCPyV LT-Antigen interagieren [151]. Dabei war auffällig, dass 10 % der gefundenen Proteine mit PML-NB interagieren. PML-NB sind Strukturen im Zellkern, die bekannt sind virale Infektionen positiv und negativ beeinflussen zu können [131, 135]. Innerhalb dieser Arbeit wurde der Einfluss der PML-NB auf die MCPyV Replikation untersucht. Dazu wurden Zelllinien, in denen die Expression der Hauptkomponenten der PML NBs, PML, Daxx und Sp100, herunterreguliert ist, etabliert und in diesen die Replikation des MCPyV mittels verschiedener Techniken, insbesondere Immunfluoreszenzfärbungen und konfokaler Mikroskopie untersucht.

3. MATERIAL

3.1. LABORMATERIAL UND ZELLKULTURMATERIAL

Pipetten, Flaschen, Zellkulturschalen und Falcons wurden von der Firma Falcon (Becton und Dickinson Europe; Le Pont de Claix, Frankreich), Sarstedt (Nümbrecht) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

3.2. BAKTERIENSTÄMME

Für die Amplifizierung und Klonierung von Plasmiden wurde der Bakterienstamm *E.coli* Top 10 von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

3.3. ZELLINIEN

293	Humane epitheliale Nierenzellen (ATCC, CRL-1573)
PFSK-1	Humane Fibroblastenzelllinie, die aus dem Gehirn isoliert wurde (ATCC, CRL-2060)
H1299	Humane epitheliale, adhärent wachsende Zelllinie, die aus einem <i>non-small cell</i> Lungenkarzinom isoliert wurde. (ATCC, CRL- 5803)
UISO	Epitheliale Zelllinie, die aus einem Merkelzell Karzinom isoliert wurde, wurden freundlicher Weise von Roland Houben zur Verfügung gestellt.
HFF-1	Humane Fibroblastenzelllinie (ATCC, SCRC-1041)
Caki-1	Humane epitheliale Zelllinie, aus dem Klarzelligem Nierenkarzinom, wurde freundlicherweise von Adam Grundhoff (HPI Hamburg) zur Verfügung gestellt.
hepaRG	Humane epitheliale Zelllinie, die aus dem Leberzellkazinom isoliert wurde. (life Technologies, HPRGC10)

BJAB	Humane B Zelllinie aus dem Burkhit Lymphom, EBV negativ, wurde freundlicherweise von Adam Grundhoff (HPI, Hamburg) zur Verfügung gestellt.
RAJI	Humane B Zelllinie aus dem Burkhit Lymphom, EBV positiv (ATCC, CCL-86)

3.4. MEDIEN

3.4.1. Medien und Zusätze für die Anzucht von Bakterien

Für die Kultivierung von Bakterien in Flüssigkultur wurde das Luria-Broth-Medium (LB-Medium) für Molekularbiologie von Roth (Karlsruhe) verwendet und als Festmedium der LB-Agar für Molekularbiologie von Roth (Karlsruhe). Vor dem Benutzen wurde beides Autoklaviert und mit Ampicillin (100mg/mL f.c.) oder Kanamycin (5mg/L) versetzt.

3.4.2. Medien und Zusätze für Gewebekulturen

Für die Kultivierung der Säugerzellen wurde DMEM (Dubelcco's Modified Eagle medium) + Glutamax und RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Nr. 1640 Medium) von Gibco BRL (Eggenstein) eingesetzt. Diese wurden zusätzlich mit 10% (f.c.) FKS (Fötales Kälberserum) von PAN Biotech (Aidenbach), 1% (f.c., 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) Penicillin/Streptomycin von Gibco BRL (Eggenstein) und 1% (f.c.) L- Glutamin (2mM) von Sigma (München) versetzt. Des Weiteren wurden in der Zellkultur Trypsin/EDTA 0,05%, von Gibco (Invitrogen, Karlsruhe) und DPBS 1x von Gibco BRL (Eggenstein) verwendet.

3.5. NUKLEINSÄUREN

3.5.1. Mononucleotide

dNTPs für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurden als Stock mit einer Konzentration von 100mM von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Zur Markierung der Sonden für den Southern Blot wurde dCTP radioaktiv markiert mit α -³²P von Hartmann Analytic (Braunschweig) eingekauft.

3.5.2. Plasmide

pcDNA3-GFP	Dieser Expressionsvektor beinhaltet das GFP-Gen unter der Kontrolle des CMV-IE-Promotors. (Invitrogen (Karlsruhe))
pCMV2-MCPyV-LT	Dieser Vektor codiert unter der Kontrolle des pCMV-Promotors die T-Region des MCPyV. Zur Selektion enthält er eine Ampicillin-Resistenz. [123]
pCMV-VSV-G	Dieses Plasmid enthält das Hüllprotein G des vesikulären des Stomatitisvirus. Es wurde freundlicherweise von C. Stocking, HPI Hamburg, zur Verfügung gestellt. [152]
ph2p	Dieses Plasmid codiert das VP2 des Mauspolyomavirus, Addgene #22518.
ph3p	Dieser Vektor codiert das VP3 des MPyV, Addgene #22521.
pMDL	Von diesem Vektor können die Proteine HIV-1 <i>Gag</i> und HIV-1 <i>Pol</i> exprimiert werden. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von C. Stocking (HPI, Hamburg) zur Verfügung gestellt. [153]
pMK-MCVSyn	Dieser Vektor enthält das synthetisch hergestellte Merkelzell-Polyomavirus-Genom, das in den pMK-Vektor kloniert wurde. Durch die enzymatische Spaltung durch <i>SacI</i> wird das Virusgenom freigesetzt. [123]
pRSV-Rev	Dieses Konstrukt kodiert für die revers Transkriptase des HIV-1. Es wurde freundlicherweise von C. Stocking (HPI Hamburg) zur Verfügung gestellt. [153]
pSUPER	Dieses Konstrukt wurde für shRNAs verwendet, um diese mit Hilfe des pSUPER in Lentiviren zu verpacken (VEC-pBS-0008 von oligoengine).

pUC18	2286bp. Der Vektor wurde bei den Transfektionen verwendet, um die Effizienz zu erhöhen. Er enthält einen lac-Promotor und eine Ampicillin-Resistenz.
pWM	Dieser Vektor hat eine Größe von 6610 bp und enthält das Codon-optimierte VP1-Gen des MCPyV unter Kontrolle des EF1a Promotors. Zusätzlich dazu codiert er auch das GFP-Protein unter Kontrolle des SV40-Promotors.[98]
pYFP-MCPyV-LT	Dieses Plasmid codiert das MCPyV LT-Antigen, kloniert aus dem cMCPyV. Durch den pYFP-N1 Vektor, in welches es kloniert wurde, enthält es N-Terminal eine YFP-Fusionierung. [104]
pYFP-MCPyV-LT _{trunc}	Dieses Plasmid codiert ein verkürztes LT-Antigen. Es wurde in den pYFP-N1 Vektor kloniert und enthält dadurch eine N-terminale YFP Fusionierung. [104]
pYFP-MCPyV-LT _{WT}	Dieser Vektor codiert nur das WT-LT-Antigen des MCPyV, nicht das sT und 57K Antigen. Es wurde aus dem pADL (Addgene #32097) kloniert und in den pYFP-N1 Vektor über die NotI Schnittstelle eingebracht, wodurch es eine N-terminale YFP Fusionierung hat. Zusätzlich musste das Stop Kodon hinter der YFP Sequenz mutiert werden.
SV40 LT	Dieses Plasmid enthält die cDNA des SV40 LT-Antigens im pZIPTEx, wurde freundlicher Weise von W. Deppert zur Verfügung gestellt. [154]
pCMV2b-MCPyV ori	Dieses Plasmid enthält 97bp des MCPyV-ori unter Kontrolle eines CMV-Promotors [104].

3.5.3. Primer / Oligonukleotide

Alle synthetisch hergestellten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen und sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Nicht angeführt sind die Random Hexamer Primer (dN6), die zur Synthese der cDNA verwendet wurden.

Tabelle 3.1: In dieser Arbeit verwendeten Primer bzw. Sequenzen mit der entsprechenden Bezeichnung und Sequenz in 5'-3' Richtung.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung	Referenz
LT1 fw	ATG GAT TTA GTC CTA AAT AGG AAA G	LT Sonde im Southern	[100]
LT1 rv	CTC ATC AAA CAT AGA GAA GTC AC	Blot	
VP1-RT fw	AAA ACA CCC AAA AGG CAA TG	<i>realtime</i> PCR (MCPyV	[123]
VP1-RT rv	GCA GAG ACA CTC TTG CCA CA	VP1 Transcript)	
LT-RT fw	CAC ACG GGA CCA ACT CAA G	<i>realtime</i> PCR (MCPyV	[123]
LT-RT rv	AGG TAT ATC GGG TCC TCT G	LT-Antigen Transkript)	
GAPDH-RT fw	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	<i>realtime</i> PCR	[155]
GAPDH-RT rv	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	(Transkripte GAPDH)	
LT-NotI fw	AAGCGGCCGCTTATTGAGAAAAAGTACCAGAATC	Klonierung für pYFP-	
LT-NotI rv	GCGGCCGCATGGATTTAGTCCTAAATAG	MCPyV-LT _{WT}	
taa_del fw	AGCGGCCGCATGGATTTA	Zur Entfernung des	
Taa_del rv	GTACAGCTCGTCCATGCC	Stop Kodons im pYFP- MCPyV-LT _{WT} mittels Q5 [®] Site- Directed Mutagenesis Kit (NEB, cat. no. E0544S)	
shRNA Sp100	GTGAGCCTGTGATCAATAA	lentivirale Transduktion	[156]
shRNA PML	AGATGCAGCTGTATCCAAG	lentivirale Transduktion	[133]
shRNA Daxx	GGAGUUGGAUCUCUCAGAAAdTdT UCUGAGAGAUCCAACUCCdTdT	lentivirale Transduktion	[157]

3.6. ENZYME

3.6.1. Restriktionsnukleasen und dazugehörige Puffer

Es wurden Fast-Digest Restriktionsendonukleasen von life Technologies mit den vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen verwendet.

3.6.2. Sonstige Enzyme

M-MuLV Reverse Transcriptase (RT))(20 U/ μ l)	life Technologies
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	Invitrogen (Karlsruhe)
NEB T4 DNA Ligase	New England BioLabs (Schwalbach, Traunstein)
DNaseI	Quiagen (Hilden)
Proteinase K	Roche (Basel, Schweiz)

3.7. REAGENZSYSTEME (KITS)

Biorad Protein Assay	Biorad (München)
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham (Freiburg)
DNA Plasmid Purification Kit NucleoBond® PC 100	Marcherey-Nagel (Düren)
GenElute™ Five-Minute Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Marcherey-Nagel (Düren)
RNAesy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Human CD34 Cell Nucleofactor® Kit	Lonza (Basel, Schweiz)
Click-iT® EdU Alexa FLuor®-594	Molecular Probes

3.8. REAGENZIEN UND LABORHILFSMITTEL

Die verwendeten Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben von Roth (Karlsruhe), Sigma (München) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

Agarose	Gibco BRL (Eggenstein)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
BSA (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)	New England Biolabs (Schwalbach, Traunstein)

Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Fluka (Neu-Ulm)
Deckgläser	Warner Instruments (Hamden, USA)
FuGENE HP transfection reagent	Roche diagnostics (Mannheim)
Hybond N+ Membran	GE Healthcare (Frankfurt am Main)
Magermilchpulver	Lasana, Humana Milchunion (Herford)
Natriumdodecylsulfat (engl. <i>Sodium-</i> , SDS)	Serva (Heidelberg)
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Fluka (Neu-Ulm)
Objektträger für Immunfluoreszenz	
Chamber Slide™ System 177429	Lab Tek®, Nunc (Rochester, NY)
Paraformaldehyd (16%)	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA)
Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche
PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran	Millipore, Bedford, USA
rediPrime	GE Healthcare (Frankfurt am Main)
Röntgenfilme	Fuji-Film Europe (Düsseldorf)
Sterilfilter Millex-GP 0,22µm	Millipore
SYBR Green mix	Fermentas Inc. (St. Leon-Rot)
Vectashieldmounty medium with DAPI	Vektor Laboratories Inc. (Burlingame, CA)
Whatman 3MM Papier	Whatman (Maidstone)

3.9. SPEZIELLE GERÄTE

FACSCanto™ Flow Cytometer	BD (Becton Dickinson Europe, Le Pont de Claix, Frankreich)
Rotor-Gene Q	Qiagen (Hilden)
Nanodrop ND-1000	PeqLab (Erlangen)
Amaxa® Nucleofector®	Lonza (Basel, Schweiz)

Phosphoimager FLA7000	Fuji
UV-Crosslinker	Stratagene

3.10. LÖSUNGEN UND PUFFER

3.10.1. allgemeine Lösungen und Puffer

Alle angegebenen Puffer und Lösungen wurden mit Millipore Wasser angesetzt.

6 x DNA-Ladepuffer	Glyzerol	60 %
	Bromphenolblau	0,3 %
	XyleneCyanol	0,3 %
4 x Protein Ladepuffer	SDS	12 %
	Glyzerol (86 %)	40 %
	Tris Cl, pH 7,0	0,2 M
	Bromphenolblau	0,4 mg
	β-Mercaptoethanol	0,5 mL
	H ₂ O bidest.	ad 10 mL
Blot-Puffer A, pH 10,4	Tris	0,3 M
	Methanol	10 %
Blot-Puffer B, pH 10,4	Tris	0,025 M
	Methanol	10 %
Blot-Puffer C, pH 9,4	Tris	0,025 M
	Aminohaxansäure	0,025 M
	Methanol	10 %
PBS-Tween (10x für 1l)	KCl	2 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	NaCl	80 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	14,34 g

MATERIAL

	Tween 20	0,5 %
	H ₂ O bidest.	ad 1L
Permeabilisierungspuffer	PBS	1 x
	Triton X-100	1 %
	NaCitrat	0,1 %
Blocklösung für Immunfluoreszenz	PBS	1 x
	Triton X-100	1 %
	Tween 20	0,5 %
	BSA Albumin Fraktion	3 %
RIPA – Puffer	NaCl	150 mM
	Tris, pH 7,2	50 mM
	EGTA	1mM
	SDS	0,1 %
	NP-40	1 %
	Na-Deoxycholate	0,5 %
	Na-orthovanadat	1mM
	Natriumfluorid	1mM
	PMSF	0,4mM
	Proteinase-Inhibitor Cocktail 1 Tablette	
TAE-Puffer	Tris/HCl (pH 7,8)	2 M
	NaAc	0,25 M
	EDTA	0,5 M
	autoklavieren	
TE	Tris, pH 7,5	10 mM
	EDTA	1mM
	autoklavieren	

3.10.2. Puffer für die Herstellung kompetenter Bakterien

Die Puffer zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden angestzt mit Millipore Wasser und anschließend steril filtriert.

TFB1-Puffer, pH 5,8	Glycerin	15 %
	CaCl ₂	10 mM
	CH ₃ COOKa	30 mM
	RbCl ₂	100 mM
	pH mit CH ₃ COOH einstellen	
TFB2-Puffer	Glycerin	15 %
	MOPS	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	RbCl ₂	10 mM

3.10.3. Reagenzien für die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgel	37,5 : 1 Acryl-Bisacrylamid	665 µL
	1 M Tris, pH 6,8	625 µL
	H ₂ O bidest.	3,7 mL
	SDS 10 %	50 µL
	TEMED	10 µL
	<u>APS 10 %</u>	<u>50 µL</u>
	Endvolumen	5,1 mL
(Ansatz ist ausreichend für 2 Gele jeglicher Dicke)		
Trenngel (10 %)	37,5 : 1 Acryl-Bisacrylamid (30 %)	5,85 mL
	1,5 M Tris, pH 8,8	4,35 mL
	H ₂ O bidest.	7 mL
	SDS 10 %	175 µL
	TEMED	50 µL
	<u>APS 10 %</u>	<u>175 µL</u>
	Endvolumen	17,6 mL
SDS-Gelelektrophorese-Puffer (1x)	Tris	0,025 M
	Glycin	0,192 M

3.12. ANTIKÖRPER

3.12.1. Primäre Antikörper:

anti-Aktin	Chemicon (Billerica, MA, USA), MAB1501, monoklonaler Maus-Antikörper IgG _{1k} , eingesetzt in der Verdünnung 1:20.000
anti-Daxx	polyklonaler Kaninchen-Antikörper von <i>Upstate/Millipore</i> (07-471), wird im Immunblot in der Verdünnung 1:5000, in der Immunfluoreszenz 1:3000 eingesetzt.
anti-GFP	polyklonaler Kaninchen-Antikörper von abcam (ab290), erkennt GFP wie auch YFP, wird im Immunblot 1:5000 eingesetzt.
anti-MCPYV LT	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), CM2B4, monoklonaler Maus-Antikörper IgG _{2b} , eingesetzt in der Verdünnung 1:1000, er erkennt das LT des MCPyV sowie das 57k-T-Antigen.
anti-MCPyV VP1	Freundlicherweise bereitgestellt durch Chris Buck, NIH; polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der in der Verdünnung 1:2000 eingesetzt wird.
anti-PML	polyklonaler Kaninchen -Antikörper von <i>Novus Biochemicals</i> (NB100-59787), wird im Immunblot in der Verdünnung 1:1000, in der Immunfluoreszenz 1:300 eingesetzt.
anti-Sp100	polyklonales Kaninchenserum, wurde freundlicher Weise von Hans Will, Hamburg bereitgestellt, wurde eingesetzt in der Verdünnung 1:2000 für den Immunblot und 1:300 für die Immunfluoreszenz
anti-SV40 LT	Pab419, monoklonaler Mausantikörper, wird eingesetzt in der Verdünnung 1:2.

3.12.2. Sekundäre Antikörper:

Für die Immundetektion wurden mit HRP konjugierte Antikörper von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), eingesetzt:

Ziege anti-Maus IgG-HRP #SC-2005, in der Verdünnung 1:3000

Ziege anti-Kaninchen IgG HRP #SC-2004, in der Verdünnung 1:3000

Für die Immunofluoreszenz wurden Farbstoff markierte Antikörper eingesetzt:

Ziege anti-Maus-TRITC Dianova(Hamburg) in einer Verdünnung von 1:1000

Ziege anti-Kaninchen-FITC Santa Cruz Biotechnology (#SC-2012) in der Verdünnung 1:1000

3.13. COMPUTERSOFTWARE

- Microsoft office Programme (Powerpoint, Photoshop, Word, Excel)
- Rotorgene Software 1.7
- MultiGauge Software
- CLC Main Workbench 6.6.1 von CLC Bio
- Volocity

4. METHODEN

4.1. METHODEN ZUR PLASMIDHERSTELLUNG

4.1.1. Herstellung kompetenter Bakterien nach der Rb-Cl₂-Methode

Damit Plasmide effizient Amplifiziert werden, wurden kompetente Bakterien benötigt. Um diese herzustellen wurde in 2 mL LB-Medium eine Vorkultur des gewünschten Bakterienstammes angesetzt und über Nacht bei 37 °C bei 200 rpm inkubiert. Diese wurde verwendet, um eine 200 mL Kultur in LB-Medium im Verhältnisse 1:100 anzuzüpfen. Bis zu einer OD_{959 nm} von 0,3 - 0,5 wurde der Ansatz bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 6000 rpm, 4 °C wurde das Bakterienpellet in 60 mL eiskaltem TbfI-Puffer resuspendiert und erneut für 60 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde wieder für 5 min bei 6000 rpm, 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 8 mL TbfII-Puffer (0,1 M) aufgenommen. Davon wurden 200 µL – Aliquots erstellt und diese bei – 80 °C gelagert.

Bei jeder Herstellung kompetenter Bakterien wurden diese auf ihre Kompetenzen hin untersucht. Dazu wurden die Bakterien mit Plasmiden transformiert, von denen bekannt ist, dass sie sich gut transformieren lassen. Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen des pUC18 Plasmids verwendet: 1 ng, 10 ng, 100 ng.

4.1.2. Hitzeschocktransformation

Um Plasmide in kompetente Bakterien zu amplifizieren, wurden diese mittels Hitzeschocktransformation in die Bakterien eingebracht. Dazu wurden die eingefrorenen kompetenten Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1 µg DNA dazu gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 2 min bei 42 °C. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde 500 µL LB-Medium ohne Antibiotika zugegeben

und die Bakterien für 1 bis 1,5h bei 37 °C und 900 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem für die Selektion erforderlichen Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht (12 bis 16 h) inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mittels analytischer Plasmidisolierung auf das Vorhandensein der gewünschten rekombinierten DNA überprüft.

4.1.3. Kultivierung von Bakterien

Um die verwendeten Plasmide zu vermehren, wurden sie durch Hitzeschocktransformation in den *E.coli* Stamm Top 10 eingebracht. Diese werden auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion enthalten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten können zur Lagerung (bei 4°C) über kurze Zeit genutzt werden oder es wurden 50-100 mL LB-Medium mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert, um große Plasmid-DNA-Mengen zur Maxi-Präparation herzustellen. Dabei ist dem Medium immer das jeweilig benötigte Antibiotikum zugesetzt zur Selektionierung.

Für die Lagerung über längere Zeit, wurden Glycerolstocks angelegt. Dazu wurden 500 µl der Bakteriensuspension mit 500 µl sterilen Glycerin (30%ig) in ein steriles Kryoröhrchen gegeben und bei – 20 °C gelagert.

4.1.4. Präparative Plasmidaufarbeitung

Zur präparativen Plasmidaufarbeitung wurde das DNA Plasmid Purification Kit NucleoBond® PC 100 verwendet. Dazu wurden Bakterienkulturen wie in 4.1.3. beschrieben verwendet, aus denen die Plasmide nach Herstellervorschrift isoliert wurde.

4.1.5. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der aufgearbeitet Plasmid-DNA wurde durch Absorptionsspektroskopie bestimmt. Dabei basiert das Prinzip darauf, dass Nukleinsäuren in Lösung ein Absorptionsmaximum bei 260 nm besitzen, Proteine hingegen bei 280 nm. Dabei ist die Absorption, auch Optische Dichte (OD) genannt, auf die aromatischen Basen

zurückzuführen. Es kann zusätzlich zwischen Einzelstrangnukleinsäuren und Doppelstrangnukleinsäuren unterschieden werden, da bei ungepaarte Basen ein höheres Absorptionsmaximum entsteht. Die optische Dichte von 1,0 gemessen bei einer Schichtdicke von 1 cm bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/mL bei Doppelstrang-Nukleinsäuren, 40 µg / ml bei Einzelstrangnukleinsäuren und 33 µg/mL bei Oligonukleotiden. Durch das Verhältnis $OD_{260nm} : OD_{280 nm}$ kann die Reinheit bestimmt werden. Eine reine DNA-Lösung hat einen Wert von ~ 1,8, bei RNA-Lösungen liegt dieser bei ca. 2,0. Niedrigere Werte sind auf Protein- und Phenol-Verunreinigungen zurückzuführen.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde 1 µL der Probe im NanoDrop eingesetzt.

4.1.6. Herstellung von viraler DNA aus proviralen Plasmiden

4.1.6.1. Restriktionsverdau der proviralen Plasmide

Für die Transfektion der verschiedenen Zelllinien mit der Virus-DNA musste diese aus proviralen Plasmiden hergestellt werden. Dazu wurden 6µg des pMK-cMCPyV eingesetzt und in einem Gesamtvolumen von 30 µL mit 3 µL SacI verdaut, welches die integrierte bakterielle Sequenz freisetzt. Nach 1h Inkubation bei 37°C wurde das Enzym bei 80 °C für 5 min inaktiviert.

4.1.6.2. Ligation der viralen DNA

Damit das Virus-Genom als Episom vorliegt, wurde das verdaute provirale Plasmid religiert. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen vom 1 mL die Proben folgendermaßen zusammengesetzt:

10 x NEB Ligase Puffer	100 µL
T4 DNA-Ligase	1 µL
DNA	30 µL
H2O	ad 1 mL

Diese wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert.

4.1.6.3. Aufreinigung der viralen DNA

Mittels Mini Präparationskit von Sigma wurde die religierte Virus DNA aus dem Religationsansatz aufgereinigt, um möglichst saubere DNA zur Transfektion zu erhalten. Dafür wurde der Religationsansatz im Verhältnis 1:1 mit Bindepuffer versetzt. Auf die mit 350 µL Säulen-Präparation-Puffer equilibrierte Säule wurden in drei aufeinanderfolgenden Durchgängen jeweils 670 µL der Probe gegeben und die DNA durch Zentrifugieren bei 10.000 rpm und 10 sec gebunden. Nachdem die Säulchen zwei Mal mit mit 350 µL Waschpuffer gewaschen wurden (10.00 rpm, 10 sec), wurde die DNA zwei Mal mit 30 µL TE-Puffer eluiert. Die Konzentration wurden wie in 0 beschrieben bestimmt.

4.1.7. Agarosegelelektrophorese

In der Agaroseelektrophorese erfolgte die Auftrennung der DNA Proben im elektrischen Feld der Größe nach. Sie wurde durchgeführt, um die Plasmid-DNA nach der Aufreinigung zu überprüfen oder um die hergestellte Virus-DNA auf Größe und Reinheit im Vergleich zur Ausgangsprobe zu kontrollieren.

Je nach erwarteter Bandengröße können konzentrierte Agarosegele hergestellt werden. Dazu wurden entsprechend der Konzentration die Menge an Agarose in TAE-Puffer unter aufkochen gelöst. Durch Zugabe von 5 µL SafeRed auf 100 mL Agaroselösung bei ca 60°C werden später Nukleinsäuren im Gel unter UV Licht sichtbar. Das noch flüssige Gel wird in eine entsprechende Kammer gegossen. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden vor der Gelbeladung mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte durch das Anlegen eines elektrischen Feldes von 80 V. Zur Dokumentation wurden die Gele bei 312 nm betrachtet und mit einer Kamera aufgenommen.

4.2. ZELLKULTUR

4.2.1. Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit (Standardbedingungen) kultiviert.

In DMEM-Medium mit den angegebenen Zusätzen wurden folgende Zellen kultiviert: 293, H1299 und HFF. Auch hepaRG wurden in DMEM gehalten jedoch zusätzlich mit 0,5 μ M Hydrocortison und 5 μ g/mL Insulin. PFSK-1, Caki-1, BJAB und RAJI wurden in RPMI mit den aufgezeichneten Zusätzen gehalten.

PFSK-1 und H1299 Zellen, die mit lentiviralen Überständen transduziert wurden, wurden zusätzlich mit Puromycin mit einer Konzentration von 1 μ g/mL bzw. 1,5 μ g/mL selektioniert.

4.2.2. Herstellung von Zellen, in denen die Expression bestimmter Proteine verringert ist

Um die Expression bestimmter Proteine in Zellen herunter zu regulieren, können shRNAs in die Zelle eingebracht werden. Dazu werden virale Vektoren genutzt, die durch die Entfernung der Genregionen der viralen Strukturproteine replikationsinkompetent sind. Diese Regionen können ersetzt werden durch die shRNAs. Wird dieser Vektor und zusätzliche Konstrukte, die Proteine, für die Verpackung, für das Kapsid und Polymerase (reverse Transkriptase, Integrase und Polymerase) kodieren, in 293 Zellen transfiziert, entstehen lentivirale Viruspartikel, die die shRNA tragen. Diese können dann zur Transduktion der Zielzellen verwendet werden, in denen die Expression bestimmter Proteine verringert werden soll. Dabei kann über die Verpackungsproteine die Zellspezifität der Lentiviren variiert werden.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auch ruhende oder nur langsam teilende Zellen infiziert werden. Zudem können auch Zellen, die mittels Transfektion keine Konstrukte aufnehmen, so zu bestimmten Expressionsanalysen herangezogen werden.

4.2.2.1. Herstellung lentiviraler Überstände

Zur Produktion von Lentiviren mit den entsprechenden shRNAs gegen PML, Daxx und Sp100 wurden 293 Zellen in 10 cm Kulturschalen ausgesät und einen Tag später transfiziert mit:

10 μ g pSUPER-shRNA

10 μ g pMDL

5 μ g pRSV-Rev

2 µg pCMV-VSVG

Die Transfektion wurde wie in 4.2.3.2 durchgeführt. Nach 6 h wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 48 h (nach dem 1. Mediumwechsel) das Medium mit den Viruspartikeln geerntet. Die restlichen Zellen wurden verworfen. Um die Viruspartikel ohne Zellrest zu erhalten, wurde der Überstand durch 0,4µm Filter filtriert und aliquotiert. Die Überstände können bei -80°C aufbewahrt werden.

4.2.2.2. Transduktion der Zellen

Um in den gewünschten Zielzellen eine Reduktion der Expression von PML, Sp100 und Daxx zu erreichen, wurden diese mit 100-500 µL der Überstände aus 4.2.2.1 behandelt. Dazu wurden 1 Tag vor der Transduktion die Zellen in der 6-well Schale ausgesät. Am Tag der Transduktion wurde das Medium gewechselt und zusätzlich 20 mM HEPES und 8 µg/mL (f.c.) Polybrene dazugegeben. Nach Zudabe der Virusüberstände wurden die Zellen 1h bei 1000 xg zentrifugiert. Ein Tag nach der Transduktion wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 2 Tagen konnte mit der Selektion mit Puromycin begonnen werden. Dazu musste zuvor bestimmt werden, bei welcher Konzentration von Puromycin die unbehandelten Zellen nach spätestens 3 Tagen sterben. Wurden die Zellen über 3 Tage selektioniert, konnte die Expression der Proteine kontrolliert werden.

4.2.3. Transfektion

Alle Transfektionen wurden im 12 well durchgeführt. Bei jeder Methode wurde die gleiche Menge an DNA verwendet, wie in Tabelle 4.1. aufgelistet. Zusätzlich zur Transfektion mit der Virus-DNA (Herstellung siehe 4.1.6) wurde eine Mockkontrolle und eine GFP-Transfektionskontrolle mitgeführt. Die Mockkontrolle besteht dabei aus der Transfektion mit dem Plasmid pUC 18, welches die Transfektionseffizienz bei der Transfektion mit der viralen DNA erhöhen soll. Bei der Transfektionskontrolle wird anstelle der viralen DNA ein Plasmid, das GFP codiert verwendet, um sicher zu gehen, dass der Ansatz erfolgreich war.

Tabelle 4.1.: Angaben zu den DNA-Menge, die zur Transfektion eingesetzt wurden. Die hier aufgelisteten Mengen sind in μg angegeben.

	Mock	cMCPyV	GFP-Transfektions- kontrolle
pUC 18	350	250	250
Virus DNA	-	100	-
GFP	-	-	100

4.2.3.1. Transfektion mit X-tremeGene HP

Ein Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Konzentration von 1 bis $1,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät, damit sie zum Zeitpunkt der Transfektion bei einer Konfluenz von ca. 80 % liegen. Je Transfektionsansatz wurden in $50 \mu\text{L}$ DMEM ohne Zusätze die o. angegebenen DNA Mengen gegeben sowie $1 \mu\text{L}$ des XtremeGene HP Transfektions Reagenz. Nach gründlichem Vermischen der Ansätze wurden diese 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das Medium der Zellen gewechselt wurde, wurde anschließend ein Ansatz auf eine Schale der 12-well Platten gegeben. Mittels X-tremeGene HP Reagenz wurden PFSK-1 und H1299 Zellen transfiziert.

4.2.3.2. Polyethylenimin (PEI) Methode

Die Transfektions mittels PEI fundiert darauf, dass der kationische DNA-PEI-Komplex durch Endozytose von den Zellen aufgenommen wird. Dazu wurden ebenfalls ein Tag vor der Transfektion die Zellen ausgesät (1 bis $1,5 \times 10^5$ Zellen je Schale). Auch hier wurde das Medium der Zellen am Tag der Transfektion ersetzt durch DMEM ohne Zusätze. Für die Transfektion in der 12-well Schale wurden $50 \mu\text{L}$ DMEM (ohne alles) mit der DNA vermischt und $2,5 \mu\text{L}$ PEI dazugegeben. Nach der anschließenden Inkubation über 30 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Nach sechs Stunden bis hin zu 16 Stunden wurde das Medium durch für die Zellen normales Medium ausgetauscht. Diese Methode wurde für 293, Caki-1, hepaGR und HFF Zellen verwendet.

4.2.3.3. Transfektion mit dem Amaxa® Nucleofector®

Bei dieser Methode werden die Zellen kurzzeitig einer elektrischen Spannungen ausgesetzt. Durch die daraus resultierende löchrige Zellmembran können die DNA-Moleküle in die Zellen eindringen.

BJAB und RAJI Zellen wurden am Tag der Transfektion mit PBS gewaschen und je Ansatz wurden 1×10^5 Zellen vorgelegt. Nach dem Zentrifugieren für 5 min bei 1000rpm und 37°C wurden die Zellen pelletiert und in 100 μ L Nucleofector Lösung inklusive Zusatz aufgenommen. Die angegebene Menge der DNA wurde dazugegeben und die Zellsuspension blasenfrei in die Küvette überführt. Beide Zelllinien wurden mit dem Program X-001 elektroporiert. Anschließend wurde die Zellsuspension sofort in vorgewärmtes Vollmedium überführt.

4.2.4. MTT-Assay

Diese Methode wird verwendet, um lebende Zellen zu bestimmen, daraus kann dann die Proliferationsrate bestimmt werden, wenn die Zellen über einen gewissen Zeitraum analysiert werden. Hier wird von den aktiven Mitochondrien lebender Zellen die zugegebene Substanz 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in dunkelblaues Formazan gespalten. Das entstandene Produkt kann mittels Absorption gemessen werden. Zur Durchführung wurden 200 bis 1000 Zellen im Dreifachansatz für jeweils fünf Tage ausgesät. An den Tagen der Messung wurden 10 μ L MTT (10 mg/mL in PBS) dazugegeben und vorsichtig geschwenkt. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurde das entstandene Formazansalz durch Zugabe von und Mischen mit 100 μ L Isopropanol/0,04M HCl gelöst. Das HCl wird benötigt, um den pH Wert zu ändern, damit im Kulturmedium enthaltenes Phenolrot zu gelb umschlägt. Anschließend konnte die Absorption bei einer Längenwelle von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen werden, ohne dass das Phenolrot die Messung stört.

4.3. RNA-METHODEN

4.3.1. RNA-Isolierung aus humanen Zellen

Um die RNA aus den verschiedenen Zelllinien wurde das RNAeasy Mini-Kit verwendet. Die transfizierten Zellen wurden nach den verschiedenen Zeitpunkten mit PBS gewaschen und durch Zentrifugieren pelletiert, wobei bei der Kultivierung zu beachten war, dass das Medium der Zellen nach 2 Tagen gewechselt wurde und diese nach 4 Tagen von den 12-Well-Platten umgesetzt wurden auf 6-Well-Platten. Die Isolierung der RNA wurde nach der Herstellervorschrift durchgeführt. Dabei wurde auch wie darin der DnaseI Verdau auf der Säule durchgeführt. Die RNA wurde mit 30µL RNase freiem Wasser eluiert, dabei wurde das Eluat zur nochmaligen Elution verwendet, um auch die restlichen RNA-Moleküle von der Säule zu lösen.

Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert, jedoch möglichst zeitnah weiterverwendet zur cDNA Synthese.

4.3.2. Konzentrationsbestimmung der RNA

s. Bestimmung der DNA-Konzentration

4.3.3. RT-PCR

Bei der RT-PCR handelt es sich um eine Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR), wobei RT für Reverse Transkription steht. Bei der RT-PCR wird von RNA ausgegangen und diese mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Über die verwendeten Primer, können spezifische oder unspezifische Sequenzen hergestellt werden.

Dazu wurden 500 ng der isolierten RNA verwendet und in einem Gesamtvolumen von 11 µL aufgenommen. Nach der Zugabe von 1 µL der Hexamer Primer wurde die Probe 5 min bei 70 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen und die Bindung der Primer zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt. Für die Erststrangsynthese wurden 4µL 5

x RT-PCR Puffer, 1 µL Ribolock, 2 µL 10mM dNTPs und 1 µL SuperScript™ II dazugegeben und 60 min bei 42 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Probe für 10 min auf 70 °C erwärmt.

Von der cDNA wurde anschließend 1 µL in der *realtime*-PCR eingesetzt.

4.3.4. Realtime-PCR

Bei dieser Methode werden bestimmte Sequenzen der zu analysierenden DNA amplifiziert. Dessen Zunahme durch den Einsatz von Farbstoffen, die in doppelsträngiger DNA interkallieren, in Echtzeit verfolgt werden. Hier wurde das Sybr-Green als Farbstoff verwendet, das Licht emittiert nach der Interkallierung. Dadurch kann die Effizienz der durchgeführten RT-PCR berechnet werden. Dazu wurden zu jedem verwendetem Primerpaar Standardkurven durch mehrere 1:10 Verdünnungen der Template DNA (Plasmid-DNA) bestimmt. Mittels der Rotorgen Software können dann die Ct-Werte ermittelt werden und gegen die Log10-Werte der eingesetzten Templatekonzentration aufgetragen werden. Die dabei erhaltene Steigung gibt die Effizienz entsprechend $(10^{-1/M})-1=1$ an. Zusätzlich kann darüber die Konzentration der Proben ermittelt werden, wenn in der Standardkurve bekannte Konzentrationen eingesetzt wurden. Über GAPDH als *house keeping gene* können die Proben untereinander verglichen werden. Ein weiterer Vorteil bei dieser Methode ist, dass durch die Aufnahme von so genannten Schmelzkurven vom Amplifikat bestimmt werden kann, ob ein spezifisches Produkt entstanden ist. Dabei beruht das Prinzip darauf, dass jedes amplifizierte Fragment bei einer bestimmten Temperatur in Einzelstränge aufgeschmolzen wird.

Die Proben setzten sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

2 x SybrGreen-Puffer	5 µL
Primer Fw (10 pmol)	1 µL
Primer Rv (10 pmol)	1 µL
cDNA	1 µL
H ₂ O	4 µL

Zur Amplifikation laufen verschiedene Phasen ab. Die erste Phase diente der Denaturierung der DNA-Doppelstränge durch Erhitzen auf 94°C. Anschließend findet die Inubation bei 60°C

statt, damit sich die Primer anlagern konnten. Bei der nachfolgenden Elongation bei 72°C wird der komplementäre Strang der Template-cDNA synthetisiert. Der dabei entstehende Doppelstrang muss für den nächsten Zyklus erneut aufgeschmolzen werden. Das Zeit-Temperatur-Profil sah folgendermaßen aus:

Denaturierung	2 min	94 °C	} 30 Zyklen
Denaturierung	30 sek	94°C	
Anlagerung der Primer	20 sek	60°C	
Kettenverlängerung	20 sek	72°C	

Zur Quantifizierung wurde dabei die Methode nach Pfaffl angewandt [158], bei der unter Einbeziehung der Primereffizienzen die Transkripte über die Ct-Werte auf GAPDH normalisiert werden. Damit kann im Anschluß die Quantifizierung im Vergleich zu Kontroll stattfinden.

4.4. DNA-METHODEN

4.4.1. *in vitro* Replikationsassay

4.4.1.1. Isolierung der DNA mit niedrigem Molekulargewicht

Um aus den transfizierten Zellen DNA für den DNA-Replikation Assay zu extrahieren, die ein niedriges Molekulargewicht haben, wurde die Methode nach Ziegler et al. 2004 [159] angewandt. Die Extraktion fand wie von Ziegler beschrieben statt. Das DNA-Pellet wurde anschließend in 30 µL TE Puffer gelöst.

Die DNA-Konzentration wurde wie in 0 beschrieben bestimmt.

4.4.1.2. DNA-Verdau mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Von der in 4.4.1.1 isolierten DNA wurden 1 - 5 µg eingesetzt für den Verdau mit EcoRI und DpnI. Dabei wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet und je 1 µL der Restriktionsendonucleasen. Der Verdau fand 1h bei 37°C statt und wurde im Anschluss für 10 min bei 60°C abgestoppt.

Dabei führt EcoRI zur Linearisierung der Virus-DNA und durch DpnI wurde bakteriell amplifizierte DNA aufgrund der nicht vorhandenen Methylierung geschnitten, so dass nur das replizierte Virusgenom als vollständige Sequenz vorliegt.

4.4.1.3. Southern Blot-Analyse

Zur Analyse der niedermolekularen DNA wurde diese nach der Behandlung mit DpnI und EcoRI in einem 0,8 %igen Agarosegel über 2 bis 3 h bei 80 V aufgetrennt. Das Gel musste vor dem Transfer der DNA auf die Membran durch folgende Inkubationsschritte vorbereitet werden:

- 10 min Depurinationspuffer
- 30 min Denaturierungspuffer
- 30 min Neutralisierungspuffer

Zwischen den einzelnen Schritten wurde das Gel jeweils kurz mit Wasser gespült. Im Anschluss wurde die DNA über Nacht im Kapillarblot von unten nach oben auf die Hybond-N+ Membran transferiert. Dazu wurde auf das in 20x SSC getränkte Filterpapier das Gel gelegt, worauf sich die Membran, drei weitere Filterpapiere und eine ca. 7 cm dicke Schicht aus Papierhandtüchern aufbauten. Mit einem Gewischt wurde das System beschwert. Als Laufpuffer diente 20 x SSC-Lösung. Am nächsten Tag erfolgte die Quervernetzung auf der Membran und die Inkubation der Proben mit der radioaktiv markierten Sonde (4.4.2) gegen das MCPyV LT-Antigen. Dazu fand die Hybridisierung mit ULTRAhyb-Lösung und der LT1 Sonde über Nacht bei 42 °C statt. Im Anschluß wurde die Membran zweimal mit 2 x SSC/ 0,1 % Tween und einmal bei 0,2 x SCC/ 0,1 % Tween bei 42 °C gewaschen. Zur Detektion wurden Filme aufgelegt und über 24 h exponiert. Dokumentiert wurden diese durch das Scannen mit dem Phosphoimager FLA7000 sowie die Quantifizierung der replizierten Banden konnte mit der Software MultiGauge durchgeführt werden und zudem mittels t-Test Signifikanzen berechnet.

4.4.2. Herstellung der DNA Sonden

4.4.2.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Herstellung der DNA-Fragmente

Um die Sonde für den Southern Blot herzustellen wurde eine PCR durchgeführt. Die PCR allgemein dient der Amplifikation der RNA oder DNA. Dazu werden spezifische Oligonukleotide, sog. Primer, eingesetzt, die an der DNA hybridisieren. Sie flankieren die Sequenz, die amplifiziert werden soll, und dienen gleichzeitig als Ausgangspunkt für die Taq-Polymerase. Die PCR wurde durchgeführt mit dem pMK-cMCPyV Plasmid und dem entsprechenden Primerpaar, beschrieben im Materialteil.

Für die LT1 Sonde wurde ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µL angesetzt. Dieser enthielt 1µg Template-DNA, 2,5 U Taq-Polymerase, PCR-Puffer (Endkonzentration 1x), 100 mM MgCl₂, 6,25 mM dNTPs und jeweils 50 pMol der Fw- und Rv-Primer. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 50 µL aufgefüllt.

Folgendes Zeit-Temperatur Profil wurde für beide Sonden genutzt, um deren Amplifikation zu gewährleisten:

Denaturierung	2 min	94 °C	} 35 Zyklen
Denaturierung	20 sek	94°C	
Anlagerung der Primer	30 sek	55°C	
Kettenverlängerung	30 sek	72°C	

4.4.2.2. Aufreinigung der Sonde

Um das Amplifikat der PCR aufzureinigen wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt und die Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* Kits nach Herstellervorschrift isoliert.

4.4.2.3. Markierung der Sonde durch α-³²P-dCTP

Um die LT1 Sonde mit α-³²P-dCTP zu markieren wurde das Amersham Rediprime™ II DNA Labeling System verwendet. Dazu wurden 30ng der aus 4.4.2.2 isolierten DNA eingesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 45 µL mit TE Puffer aufgefüllt. Die DNA wurde 10 min bei 97 °C

inkubiert, damit die Doppelstränge in Einzelstränge aufbrechen und damit das Rediprime™-Reagenz gelöst. Nach Zugabe von 5 µL α -³²P-dCTP (9,25 MBq) wurde der Ansatz 20 min bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Kalibrierdatum nicht älter als 7 Tage war, um möglichst vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Die Sonde wurde bei -20 °C gelagert und vor Verwendung 5 min zur Denaturierung bei 97 °C inkubiert.

4.4.3. Immunfluoreszenz der replizierten DNA

Um die virale DNA während der Replikation in der Immunfluoreszenz darzustellen wurde das Click-iT® EdU Alexa FLuor®-594 Kit verwendet. Dabei beruht das Prinzip darauf, dass das EdU (5-Ethynyl-2 deoxyuridin), welches ein Nukleotidanalogen zu Thymidin ist während der Replikation in die DNA eingebaut wird. Im Anschluss kann dann über eine chemische Reaktion das EdU gekoppelt werden mit dem Alexa Fluorophor. Der Vorteil gegenüber dem BRDU Anfärbung ist, dass hier keine hohen Temperaturen verwendet werden und die Zellen so möglichst unbeschädigt bleiben.

Um die replizierte DNA nachzuweisen, wurden die Zellen auf Coverslips ausgesäht und transfiziert mit dem MCPyV-Genom wie in 4.2.3 beschrieben. 4d p.t. wurde das Medium gewechselt mit dem Zusatz von EdU und 5-20 min inkubiert. Anschließend wurde das Medium erneut gewechselt und die Zellen einen weiteren Tag kultiviert. Die weiteren Schritte wurden nach Herstellervorschrift durchgeführt. Zusätzlich wurde wie nach Anleitung beschrieben die Immunfluoreszenz von dem MCPyV LT-Antigen vorgenommen.

4.5. PROTEIN-METHODEN

4.5.1. Herstellung von Proteinextrakten

Um die exprimierten Proteine der Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten zu analysieren wurden Proteinextrakte hergestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass bei der Analyse im Replikationsassay 2d p.t. das Medium der Zellen komplett gewechselt wurde und 4d p.t. die Zellen aus dem 12 well hochgesetzt wurden auf ein 6 well, wobei 1 well aus dem 12 well auf

2 wells im 6 well aufgeteilt wurden. Zur Lyse der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und abtrypsiniert. Das Zellpellet wurde mit 50-150 μ L RIPA versetzt, durch pipettieren gemischt und bei 4 °C 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Suspensionen bei 14.000 rpm und 4 °C 20 min zentrifugiert und nachfolgend der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

4.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteingesamtkonzentration in den hergestellten Zelllysaten wurde die Methode nach Bradford verwendet. Durch die Bindung des Coomassie brilliant blue G-250 an aromatische und basische Aminosäuren der Proteine verschiebt sich Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm auf 595 nm.

Um die Proteinkonzentration einer Lösung zu bestimmen, muss zunächst eine Eichgerade mit BSA (New England Biolabs, Schwalbach, Traunstein) als Standard erstellt werden. Dazu wurden verschiedene BSA-Mengen (1 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 20 μ g,) mit 1 ml Bioradlösung vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595nm bestimmt. Um die Konzentration der Proben zu bestimmen wurde ein Aliquot von 1 bis 5 μ L verwendet und ebenfalls in 1ml Bioradlösung gemischt und die Absorption bestimmt. Anhand der BSA Eichgerade ließ sich die Konzentration der Lösung über die Funktionsgleichung errechnen.

4.5.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die hier verwendete Methode beruht auf den Ergebnissen von Laemmli (1970).

Dabei werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das SDS im Proteinladepuffer und den Gelen führt zu einer Denaturierung der Proteine wie auch einer stark-negativen Gesamtladung durch die Anlagerung von SDS an die Proteine. Durch die Ladung werden die Moleküle in Richtung der Anode gezogen werden. Die Auftrennung erfolgt letztendlich durch die Masse des Moleküls, da diese negativ-proportional zur Laufgeschwindigkeit ist.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde ein Bio-Rad System verwendet. Dazu wurden die Gele wie in Materialien beschrieben zusammengesetzt, wobei zuerst das Trenngel gegossen wird und nach dessen Polymerisierung das Sammelgel.

Von den Proteinlysaten wurden 25 µg Protein bis zu 100 µg Protein für den Nachweis von PML, Sp100 und Daxx eingesetzt. Diese wurden mit vierfach Protein-Ladepuffer versetzt, vor der Auftrennung 10 min bei 97°C inkubiert wurden. Als Größenstandard diente der PageRuler (15 – 200 kDa) von Fermentas. Für die Auftrennung wurde der Gellauf bei 35 mA je Gel durchgeführt.

4.5.4. Western Blot – Analyse

Im Anschluss an die SDS-Page fand der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran für 30 min bei 400mA in einem Elektrobloetter statt. Dabei kommt es wieder durch die Ladung der Protein, dass sie zur Anode gezogen werden und über Wechselwirkung mit der hydrophoben Membran auf diese übertragen werden.

Bei dem verwendeten Elektrobloetter findet eine halbtrockene Übertragung statt. Dazu wurden zwei Lagen in Puffer A getränktes Filterpapier (Whatman), eine Lage Filterpapier mit Puffer B, die mit Methanol angefeuchtete Membran, das Gel und drei weitere Lagen Filterpapier mit Puffer C verwendet. Über den vorgefärbten Größen Marker konnte die Übertragung kontrolliert werden. Die Membran wurde in einer 5 %igen Milchpulver-PBS-Lösung für 30 min inkubiert, um ungesättigter Bindungsstellen zu blockieren und anschließend mit dem ersten Antikörper, der in 3mL Blockierlösung gelöst wurde, über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten zunächst drei Waschschrte für jeweils 5 min in 0,1 %igen PBS-Tween. Danach wurde die Membran 1 h mit dem Zweitantikörper, gelöst in 3 mL Blockierlösung, bei 4°C inkubiert. Daraufhin erfolgten wieder drei Waschschrte für je 10 min mit 0,1 %iger PBS-Tween-Lösung.

Zur Detektion wurde eine Röntgenfilm (FUJI Film Europe, Düsseldorf)aufgelegt, nachdem die spezifisch gebundenen Antikörper durch eine ECL Reaktion ermittelt wurden. Hierbei wird Wasserstoffperoxid durch die Peroxidase enzymatisch reduziert. Dadurch wird Luminol zu 3-Aminophthalat oxidiert. Die daraus resultierende Lichtemission (428 nm) kann mit einem für

blaues Licht sensitiven Film erfasst werden. Die Filmentwicklung erfolgte in dem Entwickler Agfa Curix 60.

4.5.5. Entfernen der Antikörper von einer Membran

Um eine Membran mit weiteren Antikörpern inkubieren zu können, müssen zuvor gebundene Antikörper entfernt werden. Dazu wurde die Membran zunächst 30 min mit 0,1 M HCl-Lösung inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift folgte eine weitere Inkubation für 30 min in 0,1 M NaOH-Lösung. Zur erneuten Detektion mussten unspezifische Bindungsstellen erneut mit 5%igen Milchpulver in PBS blockiert werden.

4.5.6. Nachweis von Protein-Protein Interaktionen mittels Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation beruht das Prinzip auf der spezifischen Erkennung eines Zielproteins durch Antikörper, die an eine Matrix gekoppelt sind. Dabei erfolgt die Kopplung der Antikörper an die Matrix über eine spezifische Bindung des F_c-Teil der Antikörper an die Matrix. Im Anschluss können an der Matrix gebundene Protein-Antikörper-Komplexe aufgrund des hohen Molekulargewichts der Matrix aus der Suspension durch Zentrifugation sedimentiert werden. Dadurch wird ermöglicht, dass diese Zielproteine allein oder im Komplex mit anderen Proteinen isoliert werden können. Gebundene Proteine können daraufhin durch Erhitzen des Präzipitats in Protein Ladepuffer bei 96°C für 10 min wieder in Lösung gebracht und anschließend mittels SDS-Page(4.5.3) und Immunblot (4.5.4) analysiert werden.

Zur Präzipitation von Komplexen aus dem MCPyV LT-Antigen und Komponenten der PML-NB wurde der RIPA-Puffer zusätzlich mit 25 mM Natriumiodid und 25 mM N-ethylmaleimid versetzt. Dieser wurde zur Lyse der Zellen wie auch bei der folgenden Immunpräzipitation eingesetzt. Dazu wurde Protein G-Sepharose (Biovision; 40µL je Ansatz) für die Präzipitation mittels Mausantikörpern dreifach mit dem RIPA bei 4°C gewaschen und bei 200 rpm, 4°C, 5 min abzentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Sepharose, 20 µL je Ansatz, mit 0,5 µL GFP Antikörper oder 9 µL CM2B4 in 500 µL Lysepuffer bei 4°C im Überkopfschüttler. Daraufhin wurde die Sepharose erneut bei 4°C, 5 min und 200 rpm abzentrifugiert und

dreifach mit Lysepuffer gewaschen. Die gewaschene Sepharose wurde mit Zelllysat, das 800-1000 µg Gesamtprotein enthielt und zuvor auch mit 40µL gewaschener Sepharose inkubiert wurde, um unspezifische Bindungen zu eliminieren, versetzt. Dabei wurden 2 Ansätze je Probe hergestellt: einmal Sepharose ohne gekoppeltem Antikörper als negativ-Kontrolle und einmal Sepharose mit Antikörper. Die Präzipitation erfolgte über zwei Stunden bei 4°C im Überkopfschüttler. Anschließend wurde die Suspension abzentrifugiert (200 rpm, 4°C, 5 min) und dreimal mit 500 µL Lysepuffer gewaschen. Nach Zugabe von 20µL zweifach Protein-Ladepuffer zum Präzipitat, wurden die Proteine durch Erhitzen auf 96°C für 10 min in Lösung gebracht. Die Proben wurden nun mittels SDS-Page aufgetrennt und im Immunblot analysiert.

Diese Methode wurde weiter variiert durch den Einsatz von M2-Agarose (Sigma), welches zur Präzipitation von flag-fusionierter Proteine eingesetzt wurde. Durch die Veränderung der letzten drei Waschschriffe sollten weiter unspezifische Bindung an der eingesetzten Matrix verhindert werden. Dazu wurde der NaCl-gehalt des RIPA-Puffers auf bis zu 500 mM erhöht.

4.5.7. Indirekte Immunfluoreszenz

Mittels der Immunfluoreszenz können Lokalisationsstudien durchgeführt werden oder auch Veränderungen einzelner Strukturen in der Zelle detektiert werden.

Dazu wurden die 24-Well-Platten mit sterilen Deckgläschen bestückt und diese mit auf 37°C erwärmter Gelatine beschichtet. Nach der Trocknung der Gelatine, wurden 0,2 bis 0,5 x 10⁵ Zellen pro Schale in 1 mL Medium ausgesät. Diese wurden transfiziert mit der Hälfte der beschriebenen DNA Menge, um sie anschließend durch die Immunfluoreszenz zu analysieren. Nach 2 oder 4 Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 400µL 4% Paraformaldehydlösung, verdünnt in PBS, 20 min fixiert. Nach zwei Waschschriffe mit PBS für jeweils 5 min wurden die Zellen 10 min inkubiert mit Permeabilisierungspuffer, der die Zellmembran durchlässig gemacht. Nach zwei weiteren Waschschriffen zu je 10 min mit PBS wurde mit 500µL Blockierlösung unspezifische Bindungsstellen gesättigt. Daraufhin fand die Inkubation mit dem ersten Antikörper, gelöst in Blockierlösung, für 2h statt. Nach dreimaligen Waschen für 5 min mit PBS konnte die Zweitantikörperinkubation für 2h im Dunkeln erfolgen. Nun wurden die angefärbten Zellen erneut gewaschen, um diese dann mit

einem Tropfen DAPI (*Vectashield mounty medium* mit DAPI) pro Deckgläschen anzufärben. Das Medium bewirkt, dass die Fluoreszenz länger erhalten wird und gleichzeitig die Zellkerne durch Interkalieren des DAPIs mit den Nukleinsäuren angefärbt wird. Diese emittieren dadurch blaues Licht (460nm), wenn sie bei 360nm angeregt werden. Die mit FITC angefärbten Proteine konnten bei einer Wellenlänge von 495nm und die mit TRITC angefärbten bei 540nm ausgewertet werden.

Um die Strukturen von PML und Sp100 auszuwerten, wurde die Software Volocity verwendet. Dazu wurden die Zellen mit dem 63x Ölobjektiv des konfokalen Mikroskops, mit zusätzlichem 2x Zoom und in z-Schichten mit einem Abstand von 0,5 μm aufgenommen. Die Zellkerne wie auch die PML- und Sp100-Strukturen wurden als Objekte bearbeitet, dabei wurde die Größe der Zellkerne auf 1250 μm^3 eingestellt und Objekte kleiner als 600 μm^3 ausgeschlossen. Die PML- und Sp100-Strukturen wurden auf 0,5 μm^3 eingestellt und alle Objekte kleiner als 0,1 μm^3 vernachlässigt. Mit diesen Einstellungen wurde automatisch die Anzahl der Objekte sowie die Volumen bestimmt. Da das Programm unter bestimmten Umständen Objekte, die zu nah aneinander liegen nicht differenzieren kann, musste rein optisch jedes Bild, das ausgewertet wurde, begutachtet werden und mögliche Zellhaufen wie auch Zellen, die in der Mitose sind, ausgeschlossen werden.

Statistiken wurden mittels t-Test berechnet.

5. ERGEBNISSE

Bisher sind dreizehn HPyV bekannt. Davon wurden allein in den letzten sieben Jahren neun Viren durch PCR und Hochdurchsatzsequenzierung identifiziert. PyV sind weit verbreitet und zählen zu den opportunistischen Pathogenen, d.h. in immunkompetenten Personen ist die Infektion inapparent, jedoch können unter Immunsuppression auch schwere Krankheiten auftreten, wie bei bislang vier bekannten humanpathogenen PyV, BKV, JCV, TSV und MCPyV. Dabei ist jedoch das MCPyV das erste bekannte HPyV und Polyomavirus überhaupt, welches Tumore im eigenen Wirt induzieren kann. Das derzeitige Wissen zum Lebenszyklus dieses Virus ist aufgrund der nur eingeschränkten verfügbaren *in vitro* Replikationssysteme relativ begrenzt. PyV sind sehr Zelltyp spezifisch, was die Etablierung solcher *in vitro* Zellkultursysteme äußerst erschwert. Im Fall des MCPyV wurden bereits verschiedene Zelllinien unterschiedlicher Spezies und Gewebeart analysiert inwieweit sie die Expression viraler Proteine und die Replikation des MCPyV-Genoms ermöglichen. Dazu musste aufgrund fehlender Wildtypisolate, die keine Mutationen in der frühen Region enthalten, replikationskompetente MCPyV-Genome synthetisiert werden [117, 123]. Auch durch später isolierte Wildtyp Genome lässt sich kein vollständig permissives *in vitro* Replikationssystem aufbauen [114]. In allen bislang verfügbaren *in vitro* Replikationssystemen können die DNA-Replikation des Virus, die frühe und auch späte Genexpression sowie einige Viruspartikel nachgewiesen werden. Alle Systeme zeigen jedoch keine serielle Übertragung des Virus. Die Etablierung vollständig permissiver Systeme wird besonders dadurch erschwert, dass die Zellen im Körper, in welchen sich das Virus effektiv vermehren kann, bislang nicht beschrieben sind. Ein vollständig permissives Replikationssystem wird dringend benötigt um Mechanismen der Transformation und die Biologie des MCPyV zu verstehen sowie letztendlich neue Therapiemöglichkeiten für Patienten zu etablieren.

5.1. IN VITRO REPLIKATIONSASSAY DES MCPYV

Bisher wurden mit den *in vitro* Replikationsassays 25 Zelllinien aus verschiedenen Spezies und Geweben untersucht [114, 117, 123]. Davon konnte in zehn Zelllinien eine effektive virale DNA Replikation detektiert werden. Um später virale und zelluläre Proteine hinsichtlich ihres Einflusses auf die Replikation des MCPyV zu untersuchen, wurde das

bestehende System in PFSK-1, H1299 und 293 Zellen nochmals überprüft. Dazu wurde das religierte cMCPyV-Genom in diese drei Zelllinien transfiziert. Niedermolekulare DNA wurde isoliert und mit den Restriktionsenzymen DpnI, das nicht methylierte DNA und damit die transfizierte Plasmid-DNA mehrfach schneidet, und EcoRI, welches das MCPyV-Genoms linearisiert, inkubiert. Die replizierte virale DNA wurde mittels einer spezifischen Sonde gegen die LT-Antigen-Sequenz im Southern Blot detektiert (Abbildung 5.1). Das MCPyV-Genom repliziert in allen drei Zelllinien (schwarzer Pfeil in Abbildung 5.1), wobei das Signal in PFSK-1 und H1299 Zellen vier Tage nach der Transfektion (4d p.t.) am stärksten ist. Bei den nachfolgenden Versuchen wurden diese Zelllinien verwendet, um weiterführende Analysen hinsichtlich der viralen Replikation durchzuführen.

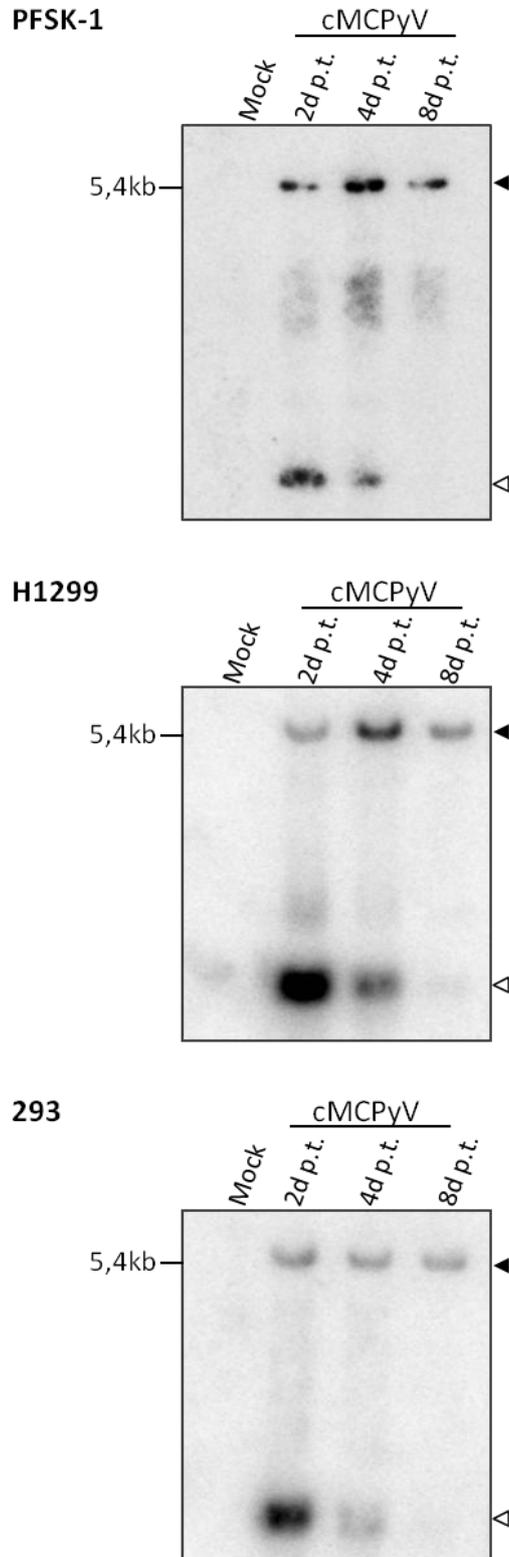


Abbildung 5.1: Replikation des MCPyV-Genoms in PFSK-1, H1299 und 293 Zellen. Die Zellen wurden mit dem religierten cMCPyV-Genom transfiziert und im Southern Blot hinsichtlich viraler Replikation untersucht. Aufgetragen wurden 1,5 µg niedermolekulare DNA von PFSK-1 Zellen und 4,5 µg von H1299 und 293 Zellen. Der ausgefüllte Pfeil zeigt die Höhe der neu replizierten viralen DNA und der unausgefüllte die DpnI-verdaute transkribierte DNA.

1.1. UNTERSUCHUNG WEITERER ZELLINIEN AUF UNTERSTÜTZUNG DER VIRALEN REPLIKATION

Um mögliche permissive Zellen für das MCPyV zu identifizieren, wurden über die ursprünglich untersuchten Zellen hinaus [114, 117, 123] weitere Zelllinien mittels des *in vitro* Replikationssystems nach Neumann et al. untersucht. Dazu wurden u.a. zwei Hautzelllinien, UIISO- und HFF-Zellen herangezogen, wobei die Zelllinie UIISO aus einem MCPyV negativen Merkelzellkarzinom stammt. Diese Zelllinien wurden gewählt, da es möglich ist von der Haut Viruspartikel zu isolieren [15]. Des Weiteren wurden zwei B-Zelllinien, RAJIs und BJABs, untersucht, da verschiedene Publikationen darauf hinweisen, dass die Ursprungszellen des MCC prä-B-Zellen sein könnten [81]. Zusätzlich wurden noch eine Nierenzelllinie (Caki.1) und eine Leberzelllinie (hepaRG) untersucht (Tabelle 5.1). Um die Zellen hinsichtlich der viralen DNA Replikation zu untersuchen, wurden diese mit dem religiertem cMCPyV-Genom transfiziert. Zusätzlich wurde die Transfektionseffizienz in den unterschiedlichen Zelllinien bestimmt. Dazu wurde hier wie auch in den folgenden Versuchen eine Kontrolltransfektion mit einem GFP-exprimierenden Plasmid durchgeführt und die Probe zwei Tage nach der Transfektion mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) analysiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten von ein bis maximal acht Tage nach der Transfektion wurde die niedermolekulare DNA aus den Zellen isoliert und im Southern Blot analysiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich zu den Proben 100ng des SacI verdauten proviralen Plasmids aufgetragen. Von den sechs untersuchten Zelllinien konnte nur in HFF- und UIISO-Zellen die Replikation vom cMCPyV detektiert werden. Diese sind in Abbildung 5.2 dargestellt sowie RAJI Zellen als Beispiel, welche die virale Replikation nicht unterstützen.

Im Falle der RAJI Zellen kann dies auch nicht auf die niedrige Transfektionseffizienz zurückgeführt werden, da im Southern Blot eindeutig DpnI-verdaute transfizierte DNA zu erkennen ist. Zusätzlich ist auffällig, dass die beiden B-Zelllinien im Vergleich zu den anderen Zelllinien die transfizierte DNA schnell abbauen, da bereits nach 4d p.t. kaum noch ein Signal auf Höhe der transfizierten DNA detektierbar ist.

Tabelle 5.1: Übersicht der in dieser Arbeit neu untersuchten Zelllinien. Angegeben ist jeweils die Spezies, aus welcher Erkrankung und welchem Organ sie etabliert sind sowie die mittels FACS gemessene Transfektionseffizienz.

Zelllinien	Spezies	Gewebe/Organ	Erkrankung	Transfektionseffizienz
hepaRG	Mensch	Leber	Leberzellkarzinom	17 %
HFF	Mensch	Haut	-	37 %
UIISO	Mensch	Haut	Merkelzell Karzinom	23 %
BJAB	Mensch	B-Lymphozyt	Burkitt Lymphom	13 %
RAJI	Mensch	B-Lymphozyt	Burkitt Lymphom	1 %
Caki-1	Mensch	Niere	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	16 %

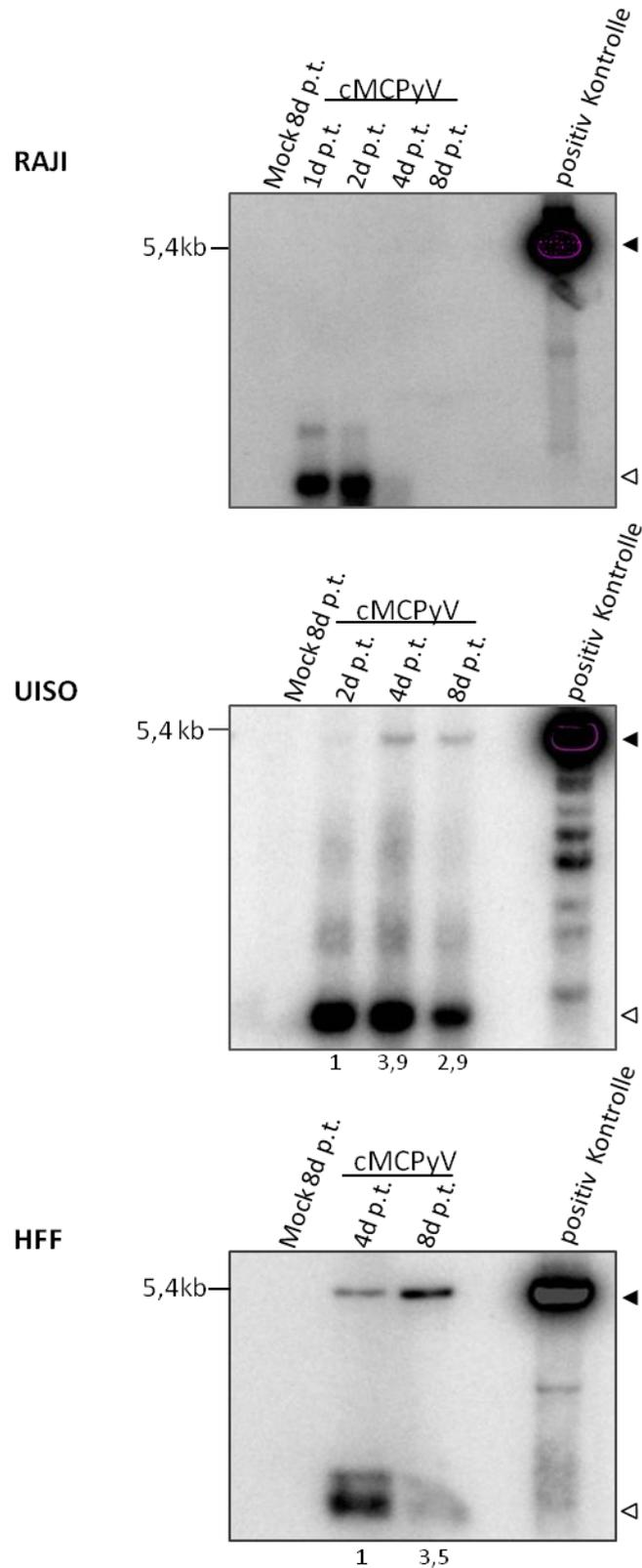


Abbildung 5.2: Replikation des MCPyV in verschiedenen Zelllinien. Niedermolekulare DNA wurde nach verschiedenen Zeitpunkten isoliert, EcoRI und DpnI verdaut, in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und mittels Southern Blot analysiert. Pro Geltasche wurden 1µg DNA aufgetragen. Der Blot wurde drei Tage exponiert. Der ausgefüllte Pfeil zeigt die Höhe der neu replizierten viralen DNA, der unausgefüllte Pfeil die durch DpnI verdaute transfizierte DNA. Die Zahlen unter dem Blot der UIISO- und HFF- Zellen geben die Quantifizierung der replizierten DNA (schwarzer Pfeil) an, die mittels des Programmes MultiGauge durchgeführt wurde.

5.2. EINFLUSS VIRALER PROTEINE AUF DIE REPLIKATION DES MCPyV

5.2.1. MCPyV VP1 und SV40 LT-Antigen

Für die Replikation des MCPyV konnte bereits gezeigt werden, dass es bei der Ko-Expression des sT- und LT-Antigens zum cMCPyV-Genom zu einem Anstieg in der viralen Replikation kommt [123]. Aber auch das LT-Antigen des SV40 scheint einen Einfluss zu haben. Die Replikation der humanen Polyomaviren JCV und BKV kann neben ihren eigenen T-Antigenen ebenfalls durch das SV40 LT-Antigen initiiert werden [160]. Eine vorangegangene Studie in 293T Zellen, welche konstitutiv das SV40 LT-Antigen exprimieren, zeigte jedoch, dass im Replikationsassay mit cMCPyV keine virale DNA Replikation detektierbar ist. Dieses Ergebnis weist auf einen negativen Einfluss des SV40 LT-Antigens auf die Replikation des MCPyV hin. Um dies zu überprüfen wurden H1299 und 293 Zellen zusätzlich zu dem cMCPyV-Genom mit einem Plasmid transfiziert, das für das SV40 LT-Antigen kodiert. Zur Überprüfung der Expression der viralen Proteine wurden diese im Immunblot detektiert. Dieser zeigt zwei und vier Tage nach Transfektion eine deutliche Bande für das SV40 LT-Antigen, während überraschenderweise keine MCPyV LT-Antigen detektierbar ist (Abbildung 5.3 A). Um die Replikation zu analysieren wurde der *in vitro* Replikationsassay angewendet und die replizierte virale DNA mittels Southern Blot detektiert. Hier ist zu erkennen, dass zu keinem Zeitpunkt replizierte virale DNA vorhanden ist trotz erfolgreicher Transfektion (Abbildung 5.3 B). Damit kann der negative Einfluss des SV40 LT-Antigens auf die Replikation des MCPyV bestätigt werden. Das gleiche Ergebnis wurde in 293 Zellen detektiert (Abbildung 10.1 im Anhang)

Bei der Infektion von Polyomaviren bindet das Kapsid an spezifische zelluläre Membranproteine, um in die Zelle zu gelangen. Dabei kommt es vermutlich zur Induktion wichtiger Signalwege für den Lebenszyklus des Virus. Innerhalb der Zelle, im Zytoplasma, findet die Entpackung des Genoms statt. Die dabei frei werdenden Kapsidproteine sind wichtig für das Fortschreiten der Infektion. So wurde bereits gezeigt, dass bei der Infektion des JC-Virus die Kernlokalisierungssequenz im VP1 wichtig für die Aufnahme des Virusgenoms in den Zellkern ist [55]. Das MCPyV besitzt drei kodierende Sequenzen für die

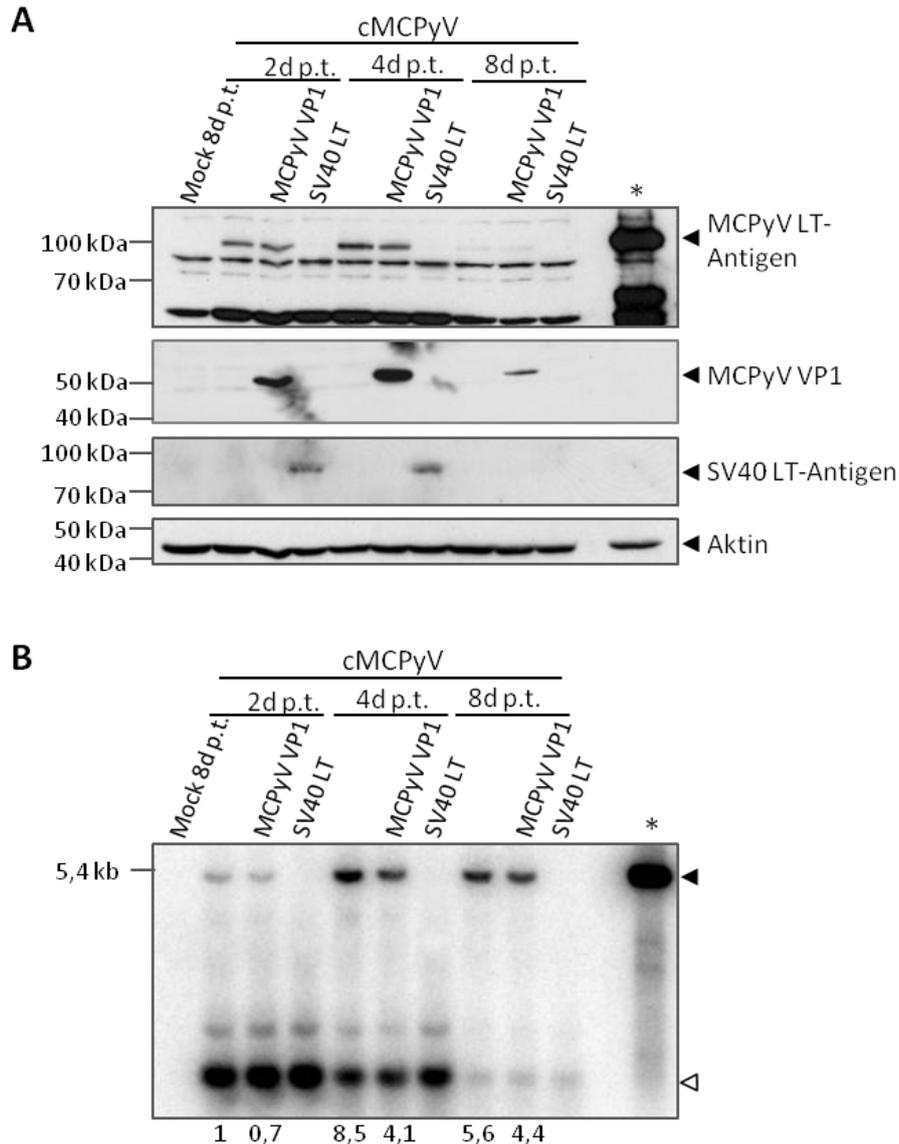


Abbildung 5.3: Einfluss des MCPyV VP1 und SV40 LT auf die Replikation des MCPyV. H1299 Zellen wurden mit dem MCPyV-Genom und Expressionsplasmiden für das MCPyV VP1 bzw. SV40 LT transfiziert. Nach 2, 4 und 8 Tagen nach der Transfektion (d p.t.) wurden Proteinextrakte hergestellt und auf LT und VP1 Expression untersucht sowie isolierte DNA auf MCPyV DNA Replikation analysiert. Im Immunblot (A) wurden 25µg der Proteine aufgetragen und eine Positivkontrolle für das MCPyV LT-Antigen (*). Für den Southern Blot (B) wurden 4,5µg der zu untersuchenden niedermolekularen DNA eingesetzt sowie als Positivkontrolle 100ng pMK-MCPyV SacI verdaut (*). Gezeigt ist der Film nach vierstündiger Expositionszeit. Der gefüllte Pfeil im Southern Blot markiert die Höhe der neu replizierten viralen DNA deren Quantifizierung unter dem Blot notiert ist. Der unausgefüllten Pfeile weist auf die dieDpnI-verdaute transfizierte DNA hin.

Kapsidproteine VP1, 2 und 3, wobei VP1 das wichtigste ist, da es die Bindung zur Zelloberfläche herstellt, während VP2 die Bindung der VP1 Pentamere innerhalb des Kapsids stabilisiert. Die Expression des VP3 ist umstritten [107, 108]. Anhand von Untersuchungen zu SV40 wurde gezeigt, dass bis kurz vor dem Freisetzen des Genoms und dessen Transport in den Zellkern, kein VP2 in der Zelle detektierbar ist, daher wurde sich hier auf das VP1 fokussiert. Um den Einfluss auf die virale DNA Replikation zu untersuchen, wurden zusätzlich

zum cMCPyV-Genomäquivalente Mengen des MCPyV VP1 ko-transfiziert. Im Immunblot ist eindeutig eine Expression von VP1 bei Ko-Transfektion zu erkennen. (Abbildung 5.3 A). Auch bei dieser Analyse zur viralen Replikation wurde der *in vitro* Replikationsassay angewendet. Mittels Southern Blot konnte detektiert werden, dass die Replikation des MCPyV in H1299 Zellen durch die Ko-Expression von MCPyV VP1 eher vermindert ist im Vergleich zum Kontrollansatz (Abbildung 5.3 B). Gleiche Ergebnisse wurden in 293 Zellen detektiert (Abbildung 10.1 im Anhang).

5.2.2. Kapsidproteine VP2 und VP3 des Mauspolyomavirus (MPyV)

Vorangegangene Experimente mit dem cMCPyV im *in vitro* Replikationsassay zeigten, dass in geringem Maße Viruspartikel entstehen. Diese sind jedoch im Vergleich zu SV40 Partikeln etwas kleiner und unregelmäßig geformt [123], woraus sich schlussfolgern lässt, dass die entstehenden MCPyV-Partikel nicht ausgereift sein könnten. Dies könnte dazu führen, dass die Partikel nicht aus den Zellen freigesetzt und/oder weitere Zellen nicht effizient infizieren werden. Um die Herstellung der Viruspartikel möglichst zu verbessern, wurden die Kapsidproteine VP2 und VP3 des Mauspolyomavirus gewählt, um sie zusätzlich im *in vitro* Replikationssystem zu exprimieren. Diese sind zu 29% bzw. 49% identisch mit den Kapsidproteinen VP2 und 3 des MCPyV. Die Kapsidproteine VP2 und VP3 von SV40, KIPyV, WUPyV, BKV sowie JCV zeigen geringere Identitäten. Für die Analyse wurden H1299-Zellen zusätzlich zum cMCPyV-Genom mit Plasmiden transfiziert, die für VP2 bzw. VP3 des MPyV kodieren. Der Nachweis der Maus-Kapsidproteine mittels Immunblot war nicht möglich, da keine Antikörper für diese Proteine erhältlich waren. Somit wurde nur die LT-Antigen-Expression nachgewiesen (Abbildung 5.4 A). Im Southern Blot ist zu erkennen, dass es nicht zu einer Erhöhung der Replikation des MCPyV kam. Dieses lässt sich zusätzlich durch die Quantifizierung der detektierten Banden der replizierten DNA (Abbildung 5.4 B) bestätigen. Die Kultivierung der Zellen bis zu 40 Tage nach der Transfektion zeigte auch, dass es in diesem System nicht zu einem Zytopathischen Effekt (CPE) kommt, wie er von SV40 in CV-1 Zellen ausgelöst wird, wenn es zu einer starken Replikation und Viruspartikelentstehung kommt. Jedoch ist von BKV bekannt, dass humane PyV keinen ausgeprägten CPE verursachen und dennoch eine serielle Transmission stattfindet. Bei BKV lassen sich

abgerundete Zellen 10 Tage nach Transfektion erkennen, wenn eine serielle Infektion in der Zellkultur abläuft. Jedoch war auch diese für das MCPyV nicht erkennbar.

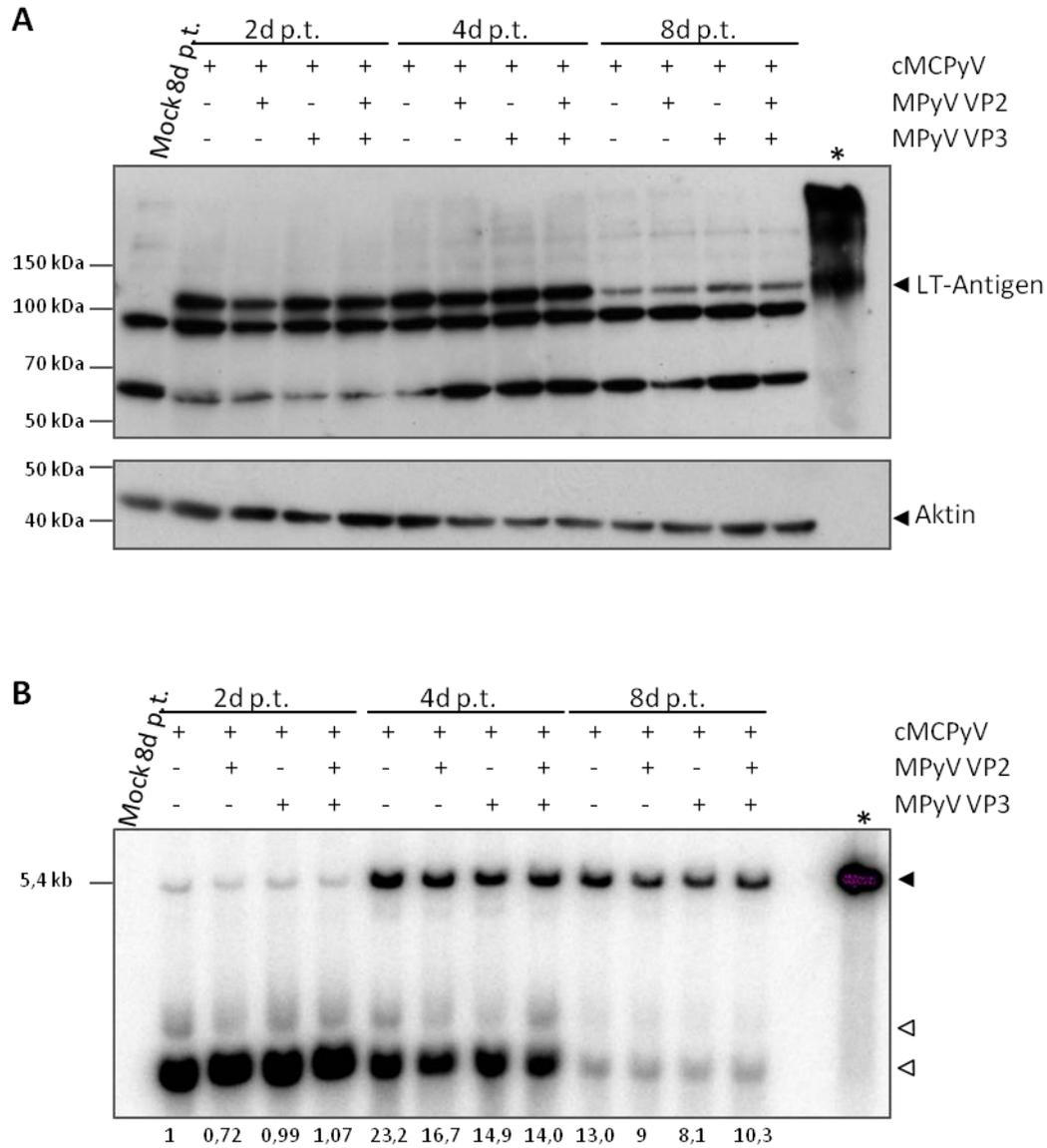


Abbildung 5.4: Einfluss des MPyV Kapsidproteine VP2 und VP3 auf die Replikation des MCPyV. A) Western Blot Analyse zur Expression des LT-ANTIGEN Proteins. 25 µg Gesamtzelllysat wurden aufgetragen. Aufgrund fehlender Antikörper gegen VP2 und VP3 des MPyV konnten diese nicht nachgewiesen werden. * markiert die Positivkontrolle, bei der das MCPyV LT-Antigen überexprimiert wurde. B) Southern Blot nach vierstündiger Expositionszeit. Aufgetragen wurden 5µg der isolierten niedermolekularen DNA, EcoRI und DpnI verdaut. Als Positivkontrolle (*) wurden 100ng des pMK-MCPyV, SacI verdaut, aufgetragen.

2.1. IDENTIFIZIERUNG VON PML-NB ALS ZELLULÄRE FAKTOREN, WELCHE DIE MCPYV REPLIKATION BEEINFLUSSEN

Das MCPyV LT-Antigen kann während des viralen Lebenszyklus verschiedene Funktionen übernehmen. So induziert das LT_{WT}-Antigen die S-Phase von ruhenden Zellen und die virale DNA Replikation. Im MCC dagegen wird ein verkürztes LT-Antigen exprimiert (LT_{trunc}-Antigen), das nicht in der Lage ist die Replikation zu aktivieren aber zusammen mit dem sT-Antigen wichtig für die Transformation der Tumorzellen ist. Um zelluläre Faktoren zu isolieren, die in diesen Prozessen eine Rolle spielen, wurde nach Interaktionspartnern von dem LT_{WT}⁻, LT_{trunc}⁻ und sT-Antigen gesucht. Dazu wurde eine Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP) der Proteine durchgeführt und anschließend die interagierenden Proteine massenspektrometrisch identifiziert. Dabei konnten verschiedenste Proteine isoliert werden, die eine Rolle in der Transkription oder Translation spielen sowie Proteine, die wichtig für das Zytoskelett, das Endoplasmatische Retikulum und Prozesse in den Mitochondrien sind [151]. Von den insgesamt 73 Proteinen, die mit den MCPyV Tumorantigenen isoliert wurden, war auffällig, dass sieben zumindest zeitweise in sogenannten PML-NB lokalisieren (

Wie für andere DNA-Viren so spielen PML-NB auch eine Rolle im Lebenszyklus von PyV. Jedoch scheint diese je nach PyV verschieden zu sein. So konnte gezeigt werden, dass die Replikation von SV40 vermutlich abhängig von PML-NB ist. Durch die Herunterregulierung von PML wird die Replikation eines Plasmids, das den Replikationsursprung des SV40 enthält, in Anwesenheit vom LT-Antigen verringert im Vergleich zu Zellen, die PML exprimieren [144, 145]. Die Infektion des MPyV dagegen scheint unabhängig von PML zu sein, da, gemessen an entstehenden Viruspartikeln, der Lebenszyklus in PML^{-/-} MEFs und WT MEFs keinen Unterschied zeigt [141]. Bei den humanen PyV JCV und BKV haben PML-NB einen negativen Einfluss auf die Infektion [122, 147]. Für das JCV konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Kapsidproteine mit PML-NB ko-lokalisieren. Vermutlich sind diese Regionen zur Zusammensetzung der Viruspartikel wichtig [146]. Für das BKV konnte außerdem gezeigt werden, dass es die Funktionen der PML-NB inhibiert. Dieses äußert sich durch eine Umstrukturierung sowie durch eine Verringerung der Anzahl der PML-NB. Des Weiteren lassen sich während der Infektion mit BKV Daxx und Sp100 nicht mehr in den PML-NB

detektieren [142]. Aufgrund dieser widersprüchlichen Daten für PyV ist es interessant zu wissen, wie das MCPyV mit PML-NB interagiert. Um dieses zu untersuchen wurde in den folgenden Versuchen mit PFSK-1 und H1299 Zellen gearbeitet. 293 Zellen sind transformiert mit einem Teil des hAdV Typ 5 (hAdV5). Dieses Virus ist bekannt mit PML-NB zu interagieren. Es strukturiert diese zu *track like* Strukturen um und kann den proteasomalen Abbau von Daxx induzieren [135, 140]. Daher wurde auf diese Zellen verzichtet.

Tabelle 5.2: PML-NB sind Strukturen, die im Zellkern vorkommen und eine Vielzahl von Proteinen beinhalten, wobei die drei Hauptkomponenten PML, Daxx und Sp100 sind.

Protein	Funktion	Referenz
USP7	Deubiquitinierungsenzym von 53 und MDM2	[161]
ATP5O	Untereinheit der ATP-Synthase, Regulation des Protonendurchflusses	[162]
NPM1	Transport ribosomaler Proteine durch die Zellkernmembran, Histonchaperon	[163-165]
UQCRB	Regulierung der Angiogenese	[166]
ABI1	negative Regulierung von Zellwachstum und Transformation	[167]
TRAP1	Regulierung der Proliferation und Apoptose	[168]
TRIM28	Regulierung der Differenzierung, Proliferation und Transkription	[169]

Aufgrund der diversen Proteine, die in diesen Strukturen lokalisieren, sind sie auch in verschiedene Funktionen involviert, z.B. Apoptose, Transkription, Signalkaskaden aufgrund von DNA-Schäden und Änderungen in der Chromatinstruktur (zusammengefasst in [131]). Vorläufige Versuche in Zusammenarbeit mit Sabrina Schreiner aus dem Thomas Dobner Labor des Heinrich Pette Instituts (HPI) zeigten auch, dass das LT_{wt} des MCPyV jedoch nicht das LT_{trunc}, wie es in den MCC Tumoren vorkommt, mit den Hauptkomponenten der PML-NB, PML, Sp100 und Daxx, interagiert.

Wie für andere DNA-Viren so spielen PML-NB auch eine Rolle im Lebenszyklus von PyV. Jedoch scheint diese je nach PyV verschieden zu sein. So konnte gezeigt werden, dass die Replikation von SV40 vermutlich abhängig von PML-NB ist. Durch die Herunterregulierung von PML wird die Replikation eines Plasmids, das den Replikationsursprung des SV40

enthält, in Anwesenheit vom LT-Antigen verringert im Vergleich zu Zellen, die PML exprimieren [144, 145]. Die Infektion des MPyV dagegen scheint unabhängig von PML zu sein, da, gemessen an entstehenden Viruspartikeln, der Lebenszyklus in PML^{-/-} MEFs und WT MEFs keinen Unterschied zeigt [141]. Bei den humanen PyV JCV und BKV haben PML-NB einen negativen Einfluss auf die Infektion [122, 147]. Für das JCV konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Kapsidproteine mit PML-NB ko-lokalisieren. Vermutlich sind diese Regionen zur Zusammensetzung der Viruspartikel wichtig [146]. Für das BKV konnte außerdem gezeigt werden, dass es die Funktionen der PML-NB inhibiert. Dieses äußert sich durch eine Umstrukturierung sowie durch eine Verringerung der Anzahl der PML-NB. Des Weiteren lassen sich während der Infektion mit BKV Daxx und Sp100 nicht mehr in den PML-NB detektieren [142]. Aufgrund dieser widersprüchlichen Daten für PyV ist es interessant zu wissen, wie das MCPyV mit PML-NB interagiert. Um dieses zu untersuchen wurde in den folgenden Versuchen mit PFSK-1 und H1299 Zellen gearbeitet. 293 Zellen sind transformiert mit einem Teil des hAdV Typ 5 (hAdV5). Dieses Virus ist bekannt mit PML-NB zu interagieren. Es strukturiert diese zu *track like* Strukturen um und kann den proteasomalen Abbau von Daxx induzieren [135, 140]. Daher wurde auf diese Zellen verzichtet.

Tabelle 5.2 Übersicht der in PML-NB lokalisierenden Proteine. Die aufgelisteten Proteine wurden mit Hilfe einer Tandemaffinitätsaufreinigung des MCPyV LT-Antigens und anschließender massenspektrometrischer Analyse kopräzipitierter Proteine identifiziert.

Protein	Funktion	Referenz
USP7	Deubiquitinierungsenzym von 53 und MDM2	[161]
ATP5O	Untereinheit der ATP-Synthase, Regulation des Protonendurchflusses	[162]
NPM1	Transport ribosomaler Proteine durch die Zellkernmembran, Histonchaperon	[163-165]
UQCRB	Regulierung der Angiogenese	[166]
ABI1	negative Regulierung von Zellwachstum und Transformation	[167]
TRAP1	Regulierung der Proliferation und Apoptose	[168]
TRIM28	Regulierung der Differenzierung, Proliferation und Transkription	[169]

5.2.3. Einfluss der Replikation des MCPyV auf PML-NB

5.2.3.1. Die Anzahl und Größe der PML-NB ist signifikant verändert in Zellen, in denen MCPyV Replikation stattfindet

Für Polyomaviren SV40, BKV und MPyV konnte bereits gezeigt, dass die Replikation benachbart zu PML-NB stattfindet [122, 141, 143]. In der Infektion von BKV werden PML-NB abhängig von der Replikation des Virus sogar umstrukturiert und so funktionell inhibiert [142]. Daher war es auch von Interesse während der Replikation des MCPyV die Struktur und Anordnung der PML-NB zu analysieren. Dazu wurde erneut ein *in vitro* Replikationsversuch in H1299 wie auch in PFSK-1 Zellen durchgeführt und mittels Immunfluoreszenztest analysiert. Vorherige Versuche zeigten, dass die Replikation des MCPyV vier Tage nach der Transfektion mittels Southern Blot sehr gut detektierbar ist (Abbildung 5.1), daher wurde dieser Zeitpunkt für die Analyse gewählt. Die Zellen wurden auf Coverslips ausgesät und mit dem cMCPyV transfiziert. Vier Tage nach Transfektion wurde das MCPyV LT-Antigen und PML, Sp100 bzw. Daxx über spezifische Antikörper angefärbt. Während der Replikation ist zu beobachten, dass das MCPyV LT-Antigen in dichteren kleineren Regionen lokalisiert. Diese liegen benachbart zu PML-NB (Abbildung 5.5). Außerdem ist zu erkennen, dass die Strukturen der PML-NB verändert sind, wenn das Virus repliziert. Die PML-NB sind leicht vergrößert und zeigen Ringstrukturen. Die gleichen Veränderungen sind auch für Sp100 und Daxx zu detektieren (Abbildung 10.2 und Abbildung 10.3 im Anhang). Betrachtet man jedoch die durch einen PML-NB aufgenommenen z-Ebenen, ist zu erkennen, dass es sich dabei nicht um Ringe sondern um Hohlkugeln der PML-NB handelt (Abbildung 5.6).

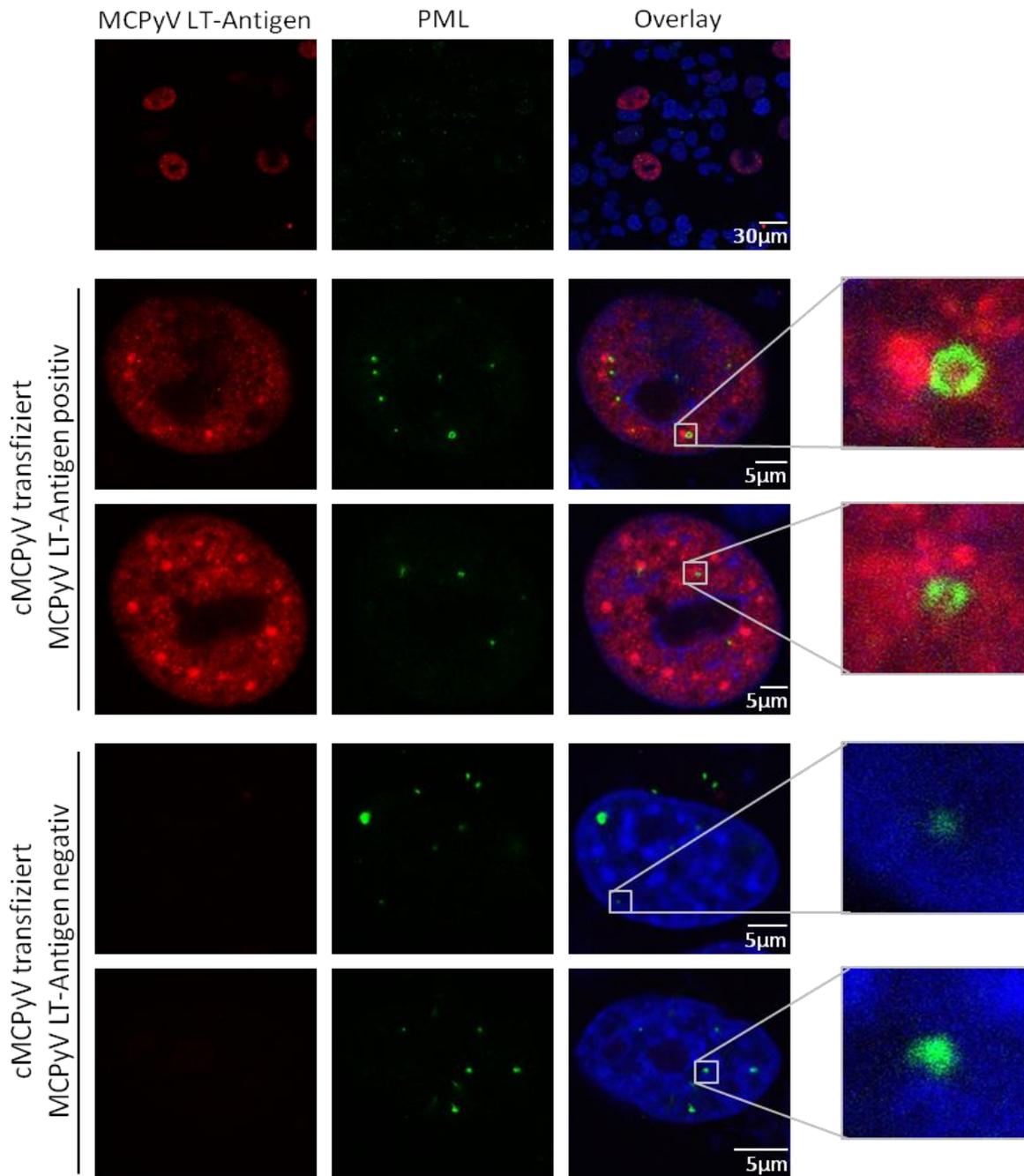


Abbildung 5.5: Die Replikation des cMCPyV induziert eine Strukturänderung der PML-NB. Der Replikationsversuch wurde in H1299 mit cMCPyV durchgeführt. 4d p.t. wurde mittels Immunfluoreszenztest die Lokalisierung von MCPyV LT-Antigen sowie PML analysiert, dazu wurden Aufnahmen mit einem konfokalen Laser Scan Mikroskop gemacht.

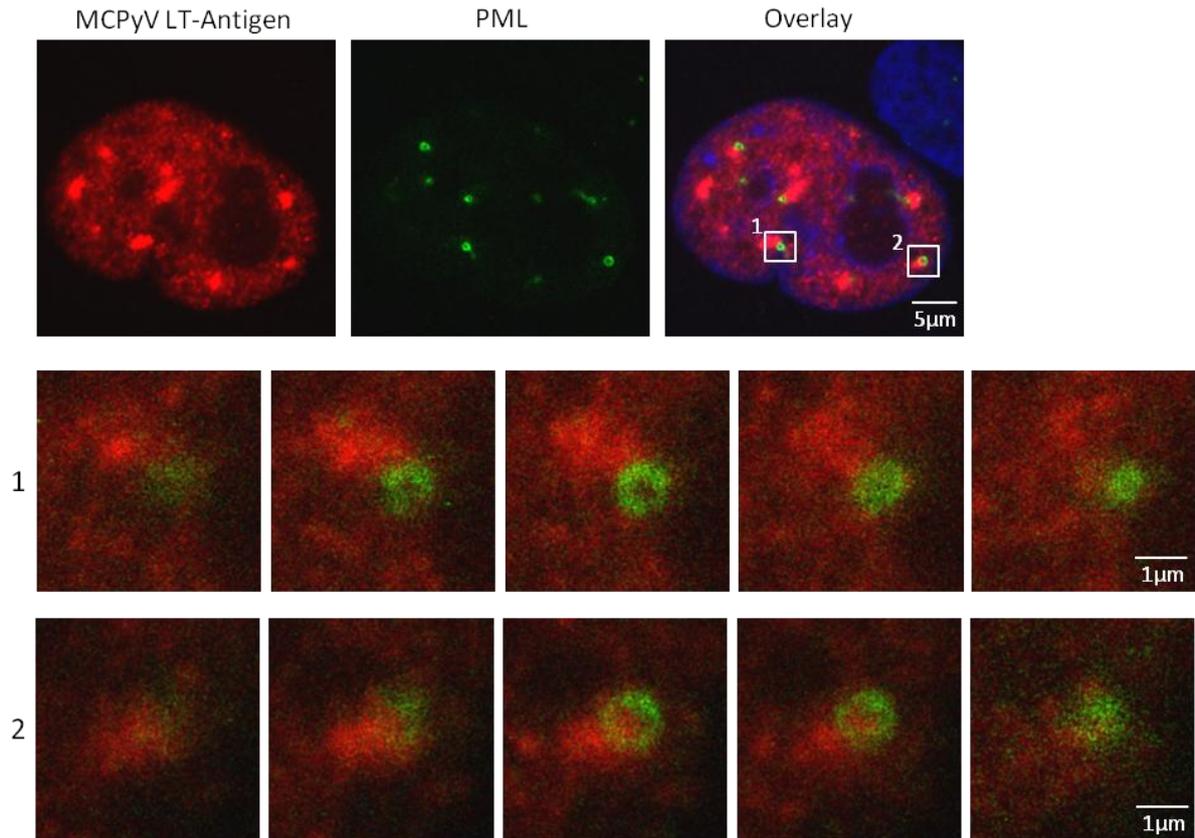


Abbildung 5.6: Struktur der PML-NB während der MCPyV Replikation. H1299 Zellen wurden transfiziert mit cMCPyV und 4d p.t. mittels Immunfluoreszenz analysiert. Dazu wurden PML und das MCPyV LT-Antigen über Antikörper angefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Mikroskop gemacht und dabei z-Ebenen im Abstand von 0,5µm aufgezeichnet (1 und 2).

Um die Veränderung der PML-NB statistisch zu belegen, wurden die Anzahl sowie die Volumina der Strukturen mittels der Software Volocity ausgewertet. Dabei wurden Zellen, die sich in der Mitose befanden nicht mit in die Quantifizierung einbezogen, da diese keine PML-NB zeigen. Die Berechnungen ergaben, dass in H1299 die Anzahl und das Volumen der PML-NB signifikant erhöht ist, wenn das Virus repliziert (Abbildung 5.7 A und C). Dabei wurden die Signifikanzen mittels t-Test ermittelt. Zusätzlich konnte detektiert werden, dass bei der Anfärbung von Sp100 in H1299 Zellen in 24% der MCPyV LT-Antigen positiven Zellen keine Sp100 Strukturen mehr sichtbar waren (Abbildung 5.7 B). Wertet man die Anzahl und Volumina in den Sp100 positiven Zellen aus, so zeigt sich eine signifikante Erhöhung, wenn die Replikation stattfindet (Abbildung 5.7 C). Auch in PFSK-1 Zellen ist diese strukturelle Veränderung für PML und Sp100 in der Immunfluoreszenz zu erkennen (Abbildung 10.4 und Abbildung 10.5 im Anhang). Hier wurden ebenfalls die Anzahl und Volumina mittels Volocity bestimmt. In PFSK-1 Zellen konnte für PML Strukturen keine Veränderung in der Anzahl und im Volumen detektiert werden (Abbildung 5.8 A). Bei der Quantifizierung der Sp100

Strukturen zeigt sich jedoch, dass 43% der MCPyV LT-Antigen positiven Zellen kein Sp100 Signal zeigen (Abbildung 5.8 B). Wertet man hingegen nur die Sp100 positiven Zellen aus, ist eine signifikante Erhöhung der Anzahl und der Volumina in MCPyV LT-Antigen positiven Zellen im Vergleich zu den negativen Zellen zu beobachten (Abbildung 5.8 C). Da bei der PML-Detektion mittels Immunfluoreszenz nicht zu beobachten ist, dass in den MCPyV LT-Antigen positiven Zellen das PML Signal verschwindet, muss folglich Sp100 während der Replikation des MCPyV aus den PML-NB relokalisiert werden.

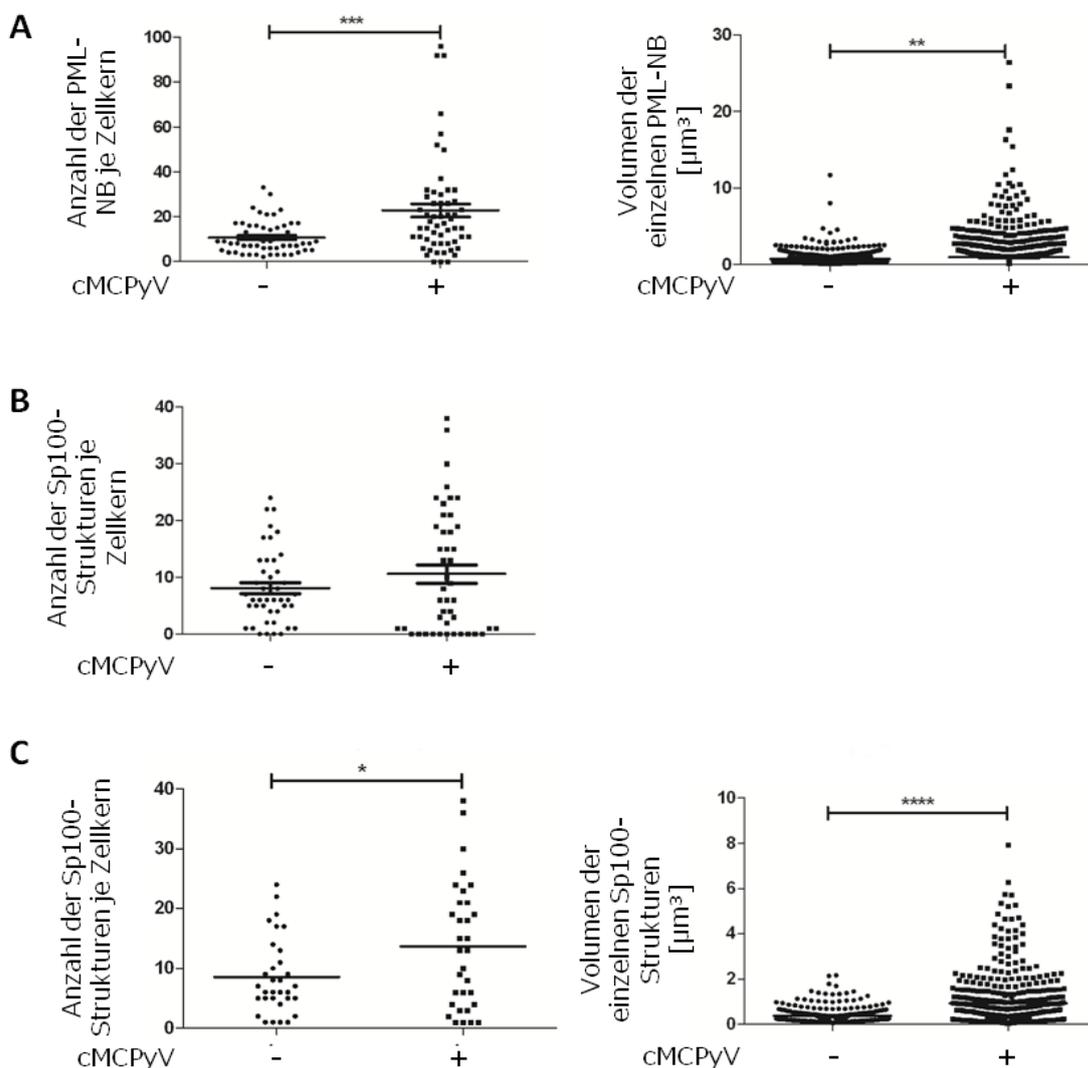


Abbildung 5.7: Veränderung der Anzahl und Volumina der PML- und Sp100 Strukturen während der Replikation des MCPyV. H1299 Zellen wurden transfiziert mit cMCPyV und 4d p.t. im Immunfluoreszenztest analysiert. Das MCPyV LT-Antigen sowie PML bzw. Sp100 wurde angefärbt und mittels Volocity ausgewertet. A zeigt die gemessene Anzahl und Volumina der PML Strukturen in insgesamt 56 Zellkernen. B ist die Auswertung der gezählten Anzahl der Sp100 Strukturen in 45 Zellkernen, wobei C nur die Auswertung der Zellkerne zeigt, die positiv für Sp100 sind.

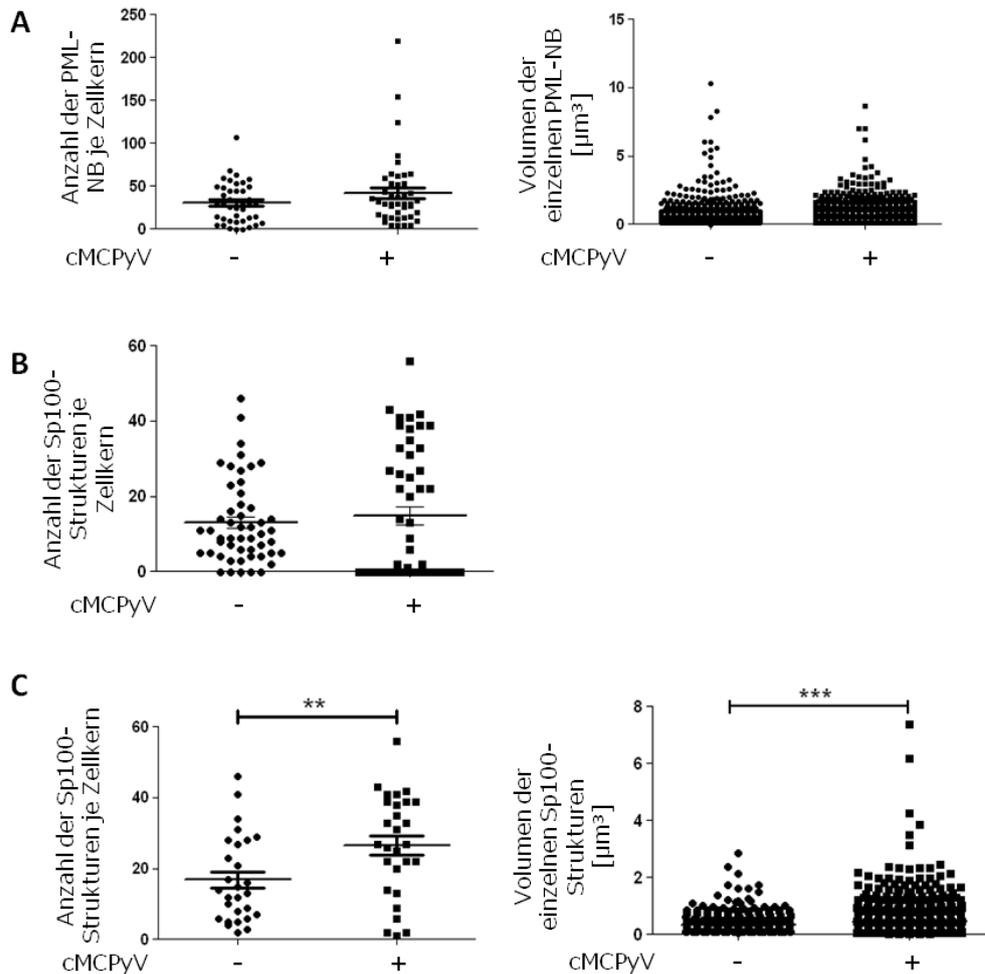


Abbildung 5.8: Veränderung der Anzahl und Volumina der PML- und Sp100- Strukturen in PFSK-1 Zellen während der MCPyV Replikation. PFSK-1 Zellen wurden mit cMCPyV transfiziert und 4d p.t. mittels Immunfluoreszenztest und konfokaler Mikroskopie ausgewertet. Die Zellen wurden angefärbt für PML und MCPyV LT-Antigen und die Größe sowie Volumina mit der Software Volocity von insgesamt 43 Zellen berechnet (A). Des Weiteren wurden die Zellen für Sp100 und dem MCPyV LT-Antigen gefärbt und die Anzahl der Sp100-Strukturen in 50 Zellen gezählt (B). C zeigt die Anzahl und Volumina der Sp100-Strukturen in Sp100 positiven Zellen. Dazu wurden 28 Zellkerne ausgewertet.

5.2.3.2. Die Replikation des MCPyV lokalisiert benachbart zu PML-NB

Da in den Immunfluoreszenztests während der Replikation des cMCPyV zu beobachten war, dass das MCPyV LT-Antigen in dichteren Regionen lokalisiert, wurde vermutet dass diese Regionen die Replikationszentren des MCPyV sind. Für andere Polyomaviren wurde bereits beschrieben, dass sie Zentren im Zellkern zur Replikation bilden und diese über die Lokalisierung des LT-Antigens sichtbar gemacht werden können [170]. Um dies auch für das MCPyV zu bestätigen, wurde erneut ein Replikationsversuch in H1299 Zellen durchgeführt.

Hier wurden H1299 Zellen vor dem Immunfluoreszenztest 20 Minuten mit dem Nukleotidanalogen EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridin) inkubiert. Dieses wird in neu replizierte DNA eingebaut und kann zur Anfärbung über eine chemische Reaktion mit dem Alexa Fluorophor 594 gekoppelt werden. Zusätzlich wurde das MCPyV LT-Antigen über Antikörper angefärbt. In Zellen, die positiv für das MCPyV LT-Antigen sind, konnte beobachtet werden, dass neu replizierte DNA in den gleichen Regionen wie das MCPyV LT-Antigen lokalisiert (Abbildung 5.9). Dagegen werden Zellen, in denen das MCPyV nicht repliziert, die jedoch die Mitose durchlaufen haben, komplett angefärbt über EDU.

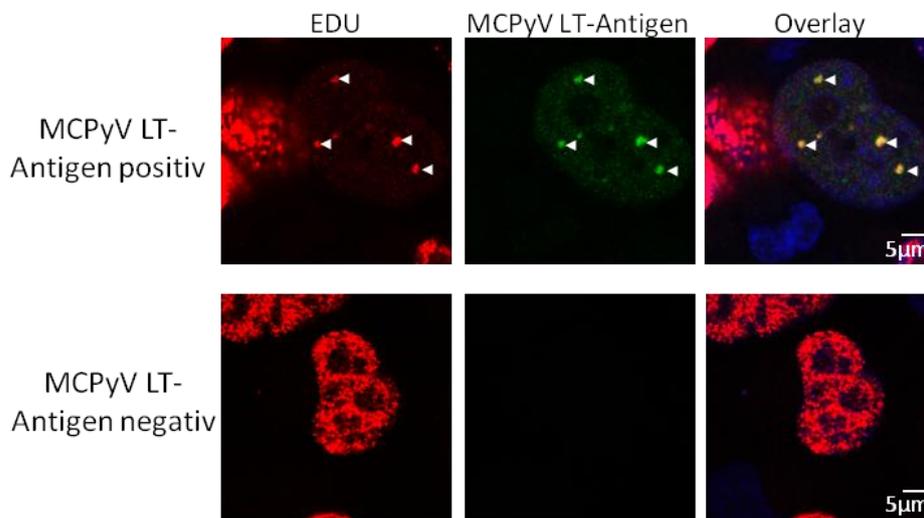


Abbildung 5.9: MCPyV LT-Antigen lokalisiert in Replikationszentren des MCPyV. H1299 Zellen wurden mit cMCPyV transfiziert und 4 Tage nach Transfektion für 20 min mit EDU inkubiert. Mittels Immunfluoreszenztest wurden das MCPyV LT-Antigen und EDU angefärbt und mit Hilfe konfokaler Laserscan Mikroskopie aufgenommen. Die weißen Pfeile zeigen die Replikationszentren.

5.2.4. Einfluss der PML-NB auf die Replikation des MCPyV

Aufgrund der Veränderung der Struktur von PML-NB, die alle drei Hauptbestandteile PML, Sp100 und Daxx beinhaltet, sollte auch der Einfluss dieser Proteine auf die virale DNA Replikation von MCPyV untersucht werden. Dazu wurden PFSK-1 und H1299 Zellen mit Lentiviren infiziert, welche shRNAs codieren, die gegen PML, Daxx und Sp100 gerichtet sind sowie einer shRNA gegen GFP als Kontrolle. Vor der Untersuchung wurden diese Zellen auf die Integration der lentiviralen DNA ins Wirtsgenom mit Puromycin selektioniert. In H1299 und PFSK-1 Zellen ließ sich die Expression von PML, Daxx und Sp100 durch die shRNAs verringern, was im Immunblot (Abbildung 5.10) und auch per Immunfluoreszenz in H1299 Zellen (Abbildung 10.6 im Anhang) bestätigt werden konnte. Dabei ist auch zu erkennen, dass im Immunblot für PML und auch Daxx aufgrund ihrer Isoformen verschiedene Banden detektierbar sind und bei der Herunterregulierung der einzelnen Hauptkomponenten der PML-NB jeweils die anderen Proteine in ihrer Expression in beiden Zelllinien nicht beeinflusst werden. Des Weiteren wurde für alle generierten Zelllinien ein Proliferationsversuch durchgeführt. Polyomaviren sind auf die Replikationskomponenten der Wirtszellen

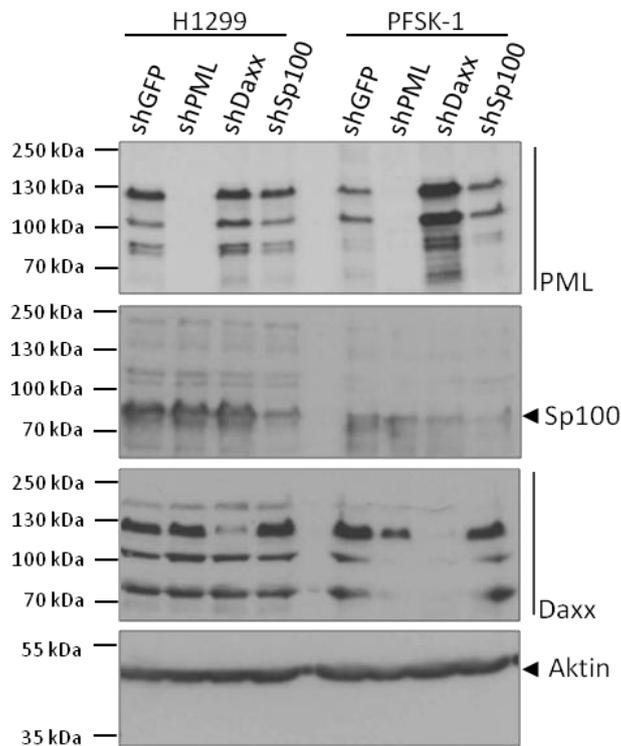


Abbildung 5.10: Expression von PML, Sp100 und Daxx in H1299 und PFSK-1 Zellen nach Behandlung der Zellen mit shRNAs gegen PML, Sp100 und Daxx sowie GFP als Kontrolle. Die Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche die entsprechenden shRNAs codieren. Nach Selektion in ihrer Gesamtheit wurden die Zellen auf die Expression der Proteine überprüft.

angewiesen, um sich selbst zu vermehren, d.h. Zellen, die schneller proliferieren würden auch die Vermehrung der Polyomaviren steigern. Um dieses auszuschließen wurde mit den Zellen ein MTT-Assay durchgeführt (Abbildung 5.11). Hier ist zu erkennen, dass bis zu 98h nach dem Aussähen der Zellen keine starken Unterschiede im Wachstumsverhalten im Vergleich der Zellen untereinander bestehen.

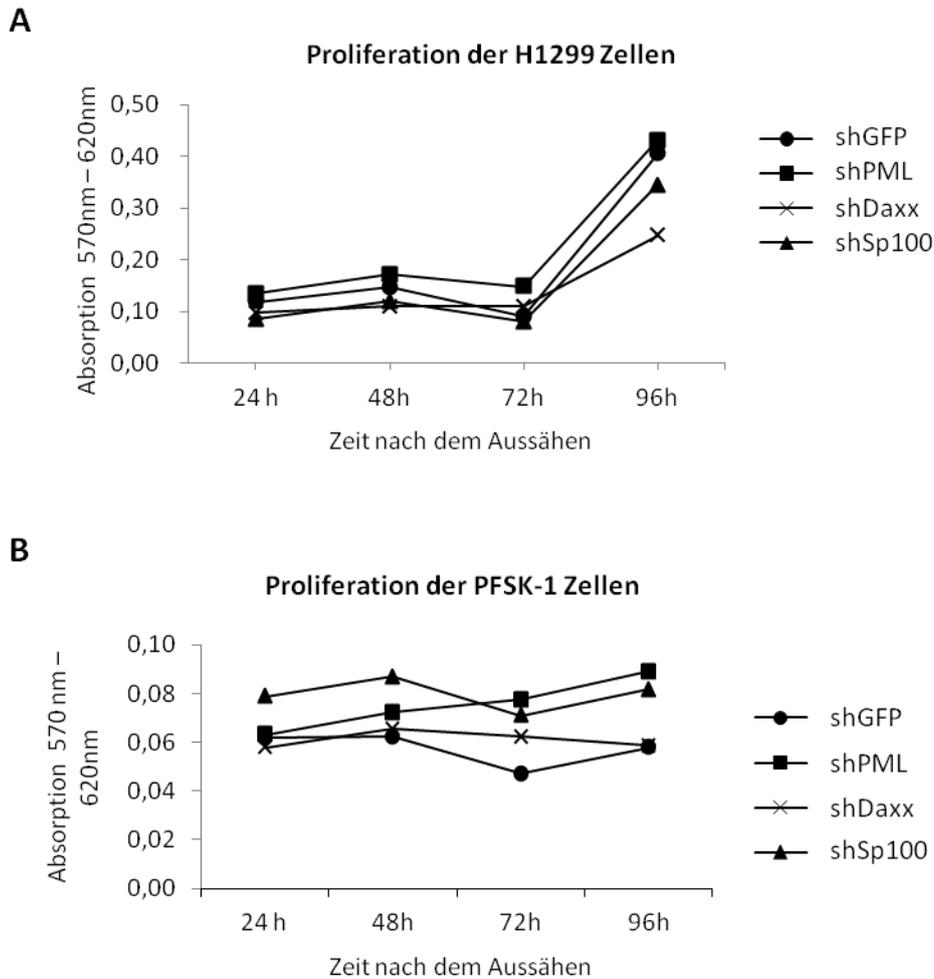


Abbildung 5.11: Proliferation der PFSK-1 und H1299 Zellen, in denen PML, Sp100 und Daxx herunterreguliert wurden. Die Zellen wurden mit Lentiviren behandelt, die shRNAs gegen GFP, PML, Sp100 und Daxx kodieren. Es wurden 200 Zellen ausgesät und nach 24, 48, 72 und 96 h im MTT Assay untersucht. Dabei wurde je Zeitpunkt ein Triplikat gemessen.

In allen generierten Zelllinien wurde erneut der Replikationsversuch durchgeführt, um die Abhängigkeit der Virusreplikation von PML, Daxx und Sp100 zu untersuchen. Die Zellen wurden mit cMCPyV transfiziert und 2, 4 und 6 Tage (für die PFSK-1 Zellen) bzw. 8 Tage nach der Transfektion (für die H1299 Zellen) wurde niedermolekulare DNA isoliert. Anhand des Southern Blots und auch nach Quantifizierung der replizierten Banden ist zu erkennen, dass bei der Verringerung der Sp100 Expression die Replikation in H1299 Zellen erhöht ist

(Abbildung 5.12). Dies bestätigt sich weiter, wenn die replizierten Banden drei unabhängiger Experimente quantifiziert und auf die transfizierte DNA normalisiert werden (Abbildung 5.12 B). Im Vergleich zur Kontrollzelllinie shGFP kommt es in H1299 Zellen bei der Herunterregulierung von Sp100 8 Tage nach der Transfektion zu einer signifikanten Erhöhung der Replikation, nicht jedoch bei PML und Daxx. In PFSK-1 Zellen dagegen ist anhand des Southern Blots (Abbildung 5.13 A) nicht eindeutig zu erkennen, dass bei der

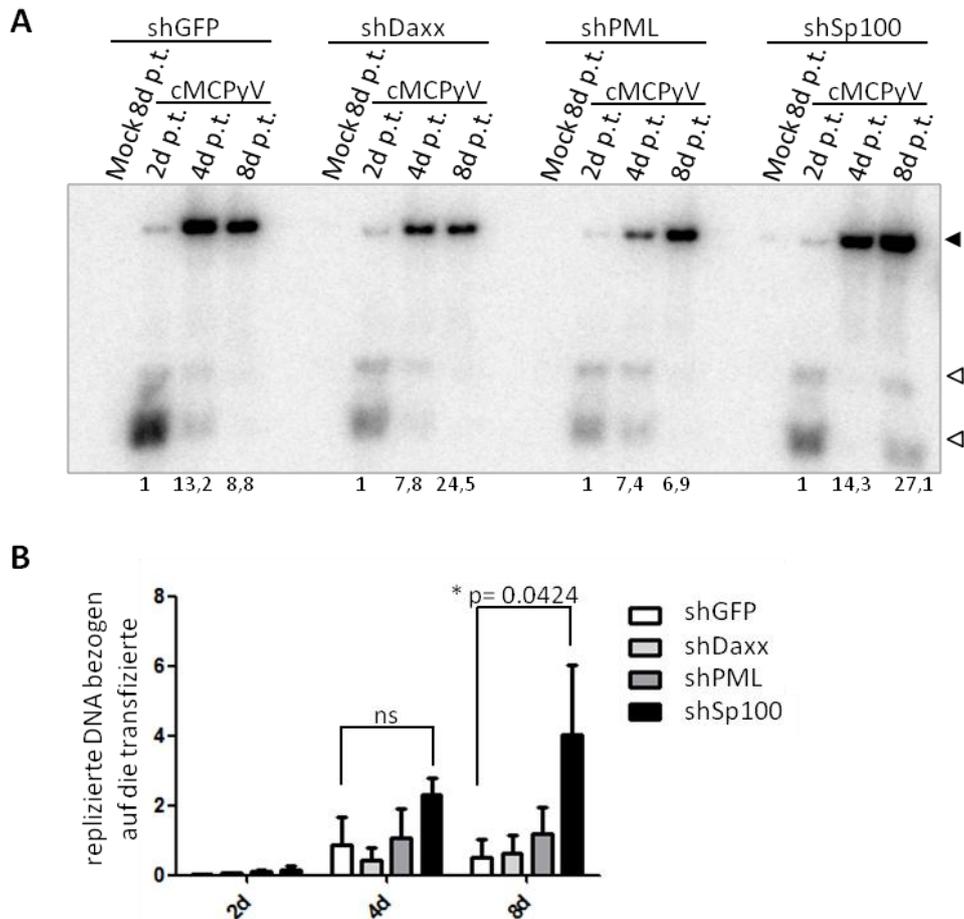


Abbildung 5.12: Replikation des cMCPyV in H1299 Zellen, die shRNAs gegen PML, Sp100, Daxx und GFP als Kontrolle synthetisieren. In H1299 Zellen wurde über Lentiviren die Expression von PML, Sp100 und Daxx herunterreguliert. Diese wurden transfiziert mit dem cMCPyV und nach 2, 4 und 8d p.t. hinsichtlich der replizierten DNA im Southern Blot analysiert. Dazu wurden 1µg niedermolekulare DNA eingesetzt und der Blot 5h exponiert (A). Die Zahlen unter dem Blot entsprechen der Quantifizierung der replizierten Banden (schwarzer Pfeil) normalisiert auf die transfizierte DNA (unausgefüllter Pfeil). Die Quantifizierung von 4 unabhängigen Experimenten ist in B dargestellt.

verringerten Expression von Sp100 die Replikation des Virus erhöht ist. Normalisiert man diese auf die transfizierte DNA, da nicht alle Zellen gleich gut transzfizierbar sind, ist zu detektieren, dass die Replikation im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht erhöht ist (Abbildung 5.13 B). Vergleicht man jedoch die Entwicklung der Replikation innerhalb des Zeitverlaufs von zwei bis acht Tagen nach Transfektion ist zu erkennen, dass der Anstieg von

Tag zwei auf acht am höchsten in den PFSK-1 Zellen ist, die in der Expression von Sp100 reduziert wurden.

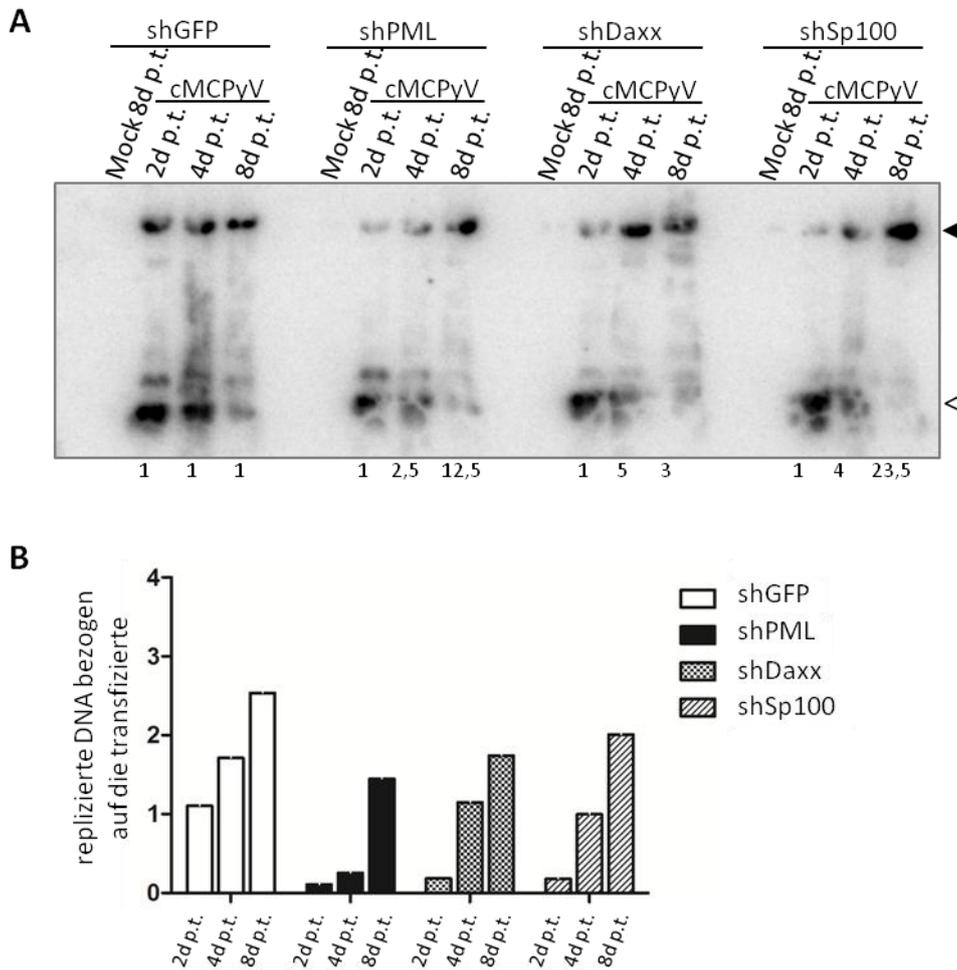


Abbildung 5.13: Replikation des cMCPyV in PFSK-1 Zellen, die shRNAs gegen PML, Daxx und Sp100 synthetisieren. In PFSK-1 Zellen wurde die Expression von PML, Sp100 und Daxx herunterreguliert durch Behandlung mit Lentiviren, die shRNAs gegen diese trugen. Diese Zellen wurden mit cMCPyV transfiziert und 2,4 und 8 d p.t. wurde niedermolekulare DNA isoliert, EcoRI und DpnI verdaut. 1µg der DNA wurde im Southern Blot analysiert hinsichtlich der Replikation des MCPyV (A). Der ausgefüllte Pfeil zeigt die Höhe der neu replizierten Virus-DNA, wobei der unausgefüllte Pfeil die Höhe der transfizierten DNA kennzeichnet. Quantifiziert man die gegeneinander erhält man die Erhöhung der Replikation im Zeitverlauf (B), dabei wurden hier unabhängige Duplikate ausgewertet.

Der PML-NB assoziierte Faktor Daxx ist sowohl als transkriptioneller Korepressor [171, 172] als auch als transkriptioneller Koaktivator in B-Zellen [173] beschrieben. Diese Funktion ist auch für die verschiedenen Sp100 Isoformen bekannt, besonders hinsichtlich der Expression von ICP0 während der HSV-1 Infektion [134]. Die erhöhte Replikation des cMCPyV in H1299 Zellen, die weniger Sp100 exprimieren, könnte daher auch auf eine erhöhte Expression des MCPyV LT-Antigens zurückzuführen sein. Um den Einfluss der PML-NB Komponenten auf die

MCPyV LT-Antigen-Transkripte sowie MCPyV VP1-Transkripte zu untersuchen, wurden aus dem Replikationsversuch zusätzlich Proben zur RNA-Isolierung entnommen. Diese wurde umgeschrieben in cDNA und auf die Veränderung im Zeitverlauf des Assays wie auch auf Unterschiede im Vergleich zur GFP Kontrolle untersucht. Dabei wurde zur Auswertung die Methode nach Pfaffl angewandt und für die eingesetzten Primerpaare die entsprechende Effizienz (VP1: 0,95568; LT: 1,0116 und GAPDH: 0,93663) eingerechnet, die über Kallibriergeraden bestimmt wurde. Damit wurde die Erhöhung der MCPyV VP1- und LT-Transkripte im Vergleich zu den Kontrollzellen bestimmt (Abbildung 5.14), normalisiert auf GAPDH. Zu erkennen ist, dass es in H1299 Zellen bei der Herunterregulation der Expression von PML, Daxx oder Sp100 zu keiner starken Veränderung der MCPyV LT- und VP1-Transkripte kommt.

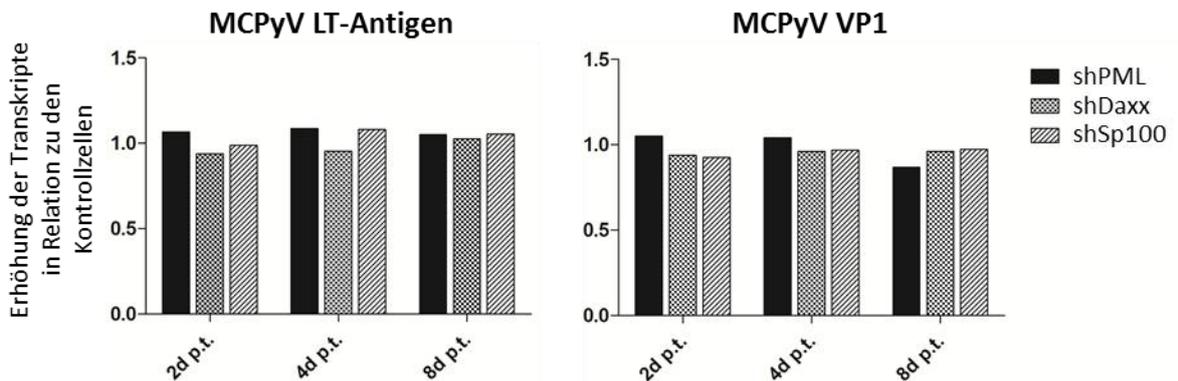


Abbildung 5.14: MCPyV VP1 und LT-Antigen Transkripte im *in vitro* Replikationsversuch. H1299 Zellen, behandelt mit Lentiviren, die shRNAs gegen GFP, Sp100, Daxx und PML kodieren, wurden mit dem cMCPyV-Genom transfiziert. 2, 4 und 8d p.t. wurden Proben genommen und RNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels realtime PCR quantifiziert. Dabei wurden die Transkripte per $\Delta\Delta C_t$ Methode ausgewertet und die Effizienzen der Primer mit einbezogen.

5.2.5. PML-NB in Abhängigkeit von der Überexpression des MCPyV LT-Antigens

5.2.5.1. Keine Interaktion von Komponenten der PML-NB und dem MCPyV LT-Antigen

Bisher konnte gezeigt werden, dass es während der Replikation des MCPyV zu einer Umstrukturierung der PML-NB sowie den darin enthaltenen Proteinen Sp100 und Daxx kommt. Dabei hat vermutlich Sp100 einen größeren Einfluss auf die virale DNA Replikation. Da das MCPyV LT-Antigen eine wichtige Rolle in der Replikation des MCPyV spielt, wurde untersucht, ob dieses virale Protein einen Einfluss auf die PML-NB hat oder sogar mit den einzelnen Bestandteilen interagiert. Dazu konnten vorläufige Versuche von Sabrina Schreiner (Heinrich Pette Institut (HPI)) zeigen, dass eine Interaktion zwischen PML, Daxx, Sp100 und dem MCPyV LT-Antigen stattfindet. Hier wurden Ko-Immunpräzipitationen mit einem N-Terminal YFP fusioniertem MCPyV LT-Antigen (YFP-MCPyV LT-Antigen) durchgeführt. Dafür wurde das LT-Antigen in H1299 Zellen überexprimiert und anschließend mit einem Antikörper gegen YFP präzipitiert, wodurch es zur Ko-Präzipitation des endogenen PML, Sp100 und Daxx kam. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden H1299 Zellen mit dem YFP-MCPyV LT-Antigen transfiziert und das LT-Antigen mittels Antikörper aus dem Lysat gezogen. In Abbildung 5.15_B ist zu erkennen, dass PML weder mit dem LT_{trunc.}- noch dem LT_{WT}-Antigen stärker ko-präzipitiert als mit der Kontrollpräzipitation. Dagegen ist eine schwache Bande bei der Überexpression der T-Region auf der Höhe von ca. 110 kDa erkennen. Eine Bande auf dieser Höhe wird jedoch auch mit dem anti-LT-Antikörper CM2B4 erkannt. Dieser Versuch wurde mehrfach durchgeführt, konnte die Copräzipitation von PML jedoch nicht bestätigen. Zusätzlich wurde das LT-Antigen auch mit einem Antikörper gegen das YFP präzipitiert, was dazu führte, dass das LT-Antigen unspezifisch an der Sepharose band. Diese unspezifischen Bindungen ließen sich durch Variation der Pufferbedingungen nicht vermindern. Auch bei Versuchen zur Ko-Präzipitation von Sp100 und Daxx ließ sich keine Interaktion mit dem LT_{WT}-Antigen detektieren. Zusätzlich wurde versucht das LT-Antigen über Sp100 und PML zu ko-präzipitieren. Dazu wurden Flag-fusionierte Proteine eingesetzt und diese mit einem anti-Flag Antikörper aus dem Lysat gebunden. Hier war jedoch problematisch, dass die Flag-fusionierten Proteine allein auch mit der Agarose präzipitiert wurden. Dieses Problem ließ sich nicht durch verschiedene Pufferbedingungen minimieren.

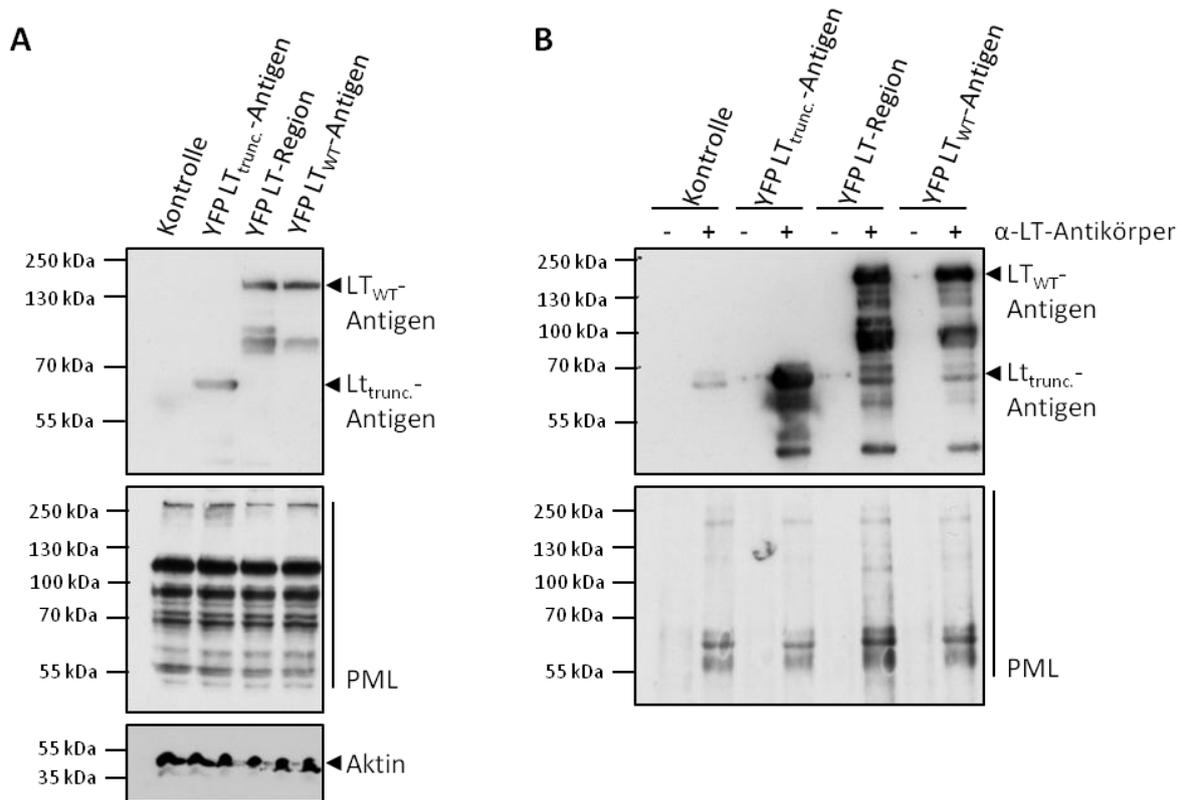


Abbildung 5.15: PML ko-präzipitiert nicht mit dem MCPyV LT_{WT} -Antigen. H1299 Zellen wurden mit verschiedenen LT-Konstrukten transfiziert: das verkürzte ($LT_{trunc.}$), wie es im MCC vorkommt; dem Wildtyp LT (LT_{WT}) und einem Konstrukt, das die komplette frühe Region des MCPyV (LT-Region) enthält (A). Diese wurden mit dem CM2B4 Antikörper aus dem Lysat gezogen und untersucht, ob PML co-präzipitiert wurde (B).

5.2.5.2. Die Überexpression des MCPyV LT-Antigens führt nicht zu veränderten Expressionslevel von PML, Sp100 und Daxx

Über die Ko-Immünpräzipitation konnte keine Interaktion der PML-NB Komponenten PML, Sp100 und Daxx mit dem MCPyV LT_{WT} -Antigen nachgewiesen werden. Jedoch wurde für HSV-1 beispielsweise beschrieben, dass das virale Protein ICPO den proteasomalen Abbau von PML und Sp100 induziert [135]. Außerdem kann das adenovirale Protein E1B55K den proteasomalen Abbau von Daxx aktivieren [140]. Daher wurde als nächstes der Einfluss des MCPyV LT-Antigens auf die Expression von endogenem PML, Sp100 und Daxx untersucht. Dazu wurde das YFP-MCPyV LT-Antigen in H1299 und PFSK-1 Zellen überexprimiert und die endogene Expression von PML, Sp100 und Daxx in Abhängigkeit vom LT-Antigen analysiert. Hierbei wurden 48 Stunden nach Transfektion Lysate der löslichen Ripa-Fraktion (Abbildung 5.16) im Immunblot untersucht. Dabei ist zu erkennen, dass die Überexpression des MCPyV LT-Antigens keinen Einfluss auf die Expression von PML, Sp100 und Daxx im löslichen RIPA-Lysat hat. Da alle drei der hier untersuchten Komponenten der PML-NB in verschiedenen

Isoformen exprimiert werden, ist im Immunblot auch für jedes der Proteine ein bestimmtes Bandenmuster zu erkennen.

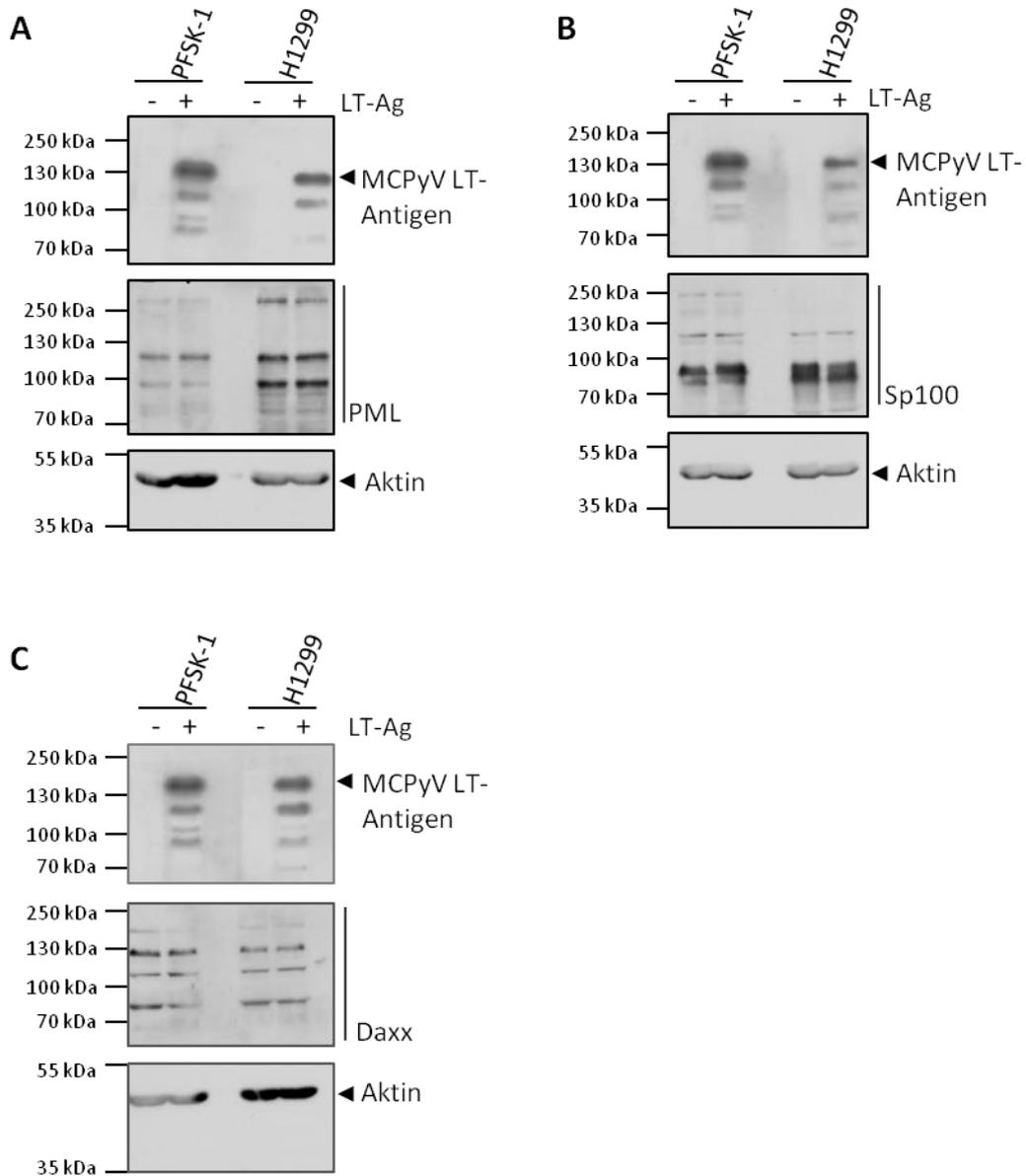


Abbildung 5.16: Expression von endogenem PML, Sp100 und Daxx in Abhängigkeit vom YFP-MCPyV LT-Antigen (LT-Ag). H1299 und PFSK-1 Zellen wurden mit dem YFP-MCPyV LT-Antigen transfiziert und im Immunblot auf die endogene Expression von PML (A), Sp100 (B) und Daxx (C) analysiert. Dabei wurden in jedem Blot 50µg Protein von der löslichen RIPA-Fraktion aufgetragen.

5.2.5.3. Das MCPyV LT-Antigen verursacht keine Strukturänderung der PML-NB

Bisher konnte für Polyomaviren nicht gezeigt werden, dass virale Proteine allein für die Umstrukturierung oder den Abbau von Komponenten der PML-NB verantwortlich sind[142]. Jedoch konnte für anderen DNA-Viren dargelegt werden, dass einzelne virale Proteine PML-NB beeinflussen. So induziert ICPO des HSV-1 die Proteasom abhängigen Abbau von PML. Auch HCMV exprimiert ein virales Protein, IE2, welches anscheinend die Desumoylierung von PML aktiviert, was zur Auflösung der PML-NB führt [135]. Auch für das hAdV5 konnten verschiedene Mechanismen gezeigt werden. PML-NB werden durch die viralen Proteine E1A und E4orf3 umstrukturiert zu *track like* Strukturen während das Protein E1B55K den Proteasom abhängigen Abbau von Daxx induziert [138-140]. Um weiter einen möglichen Einfluss von dem MCPyV LT-Antigen zu analysieren, wurde mittels Immunfluoreszenztest überprüft, ob es bei der Überexpression des viralen Proteins zu Auffälligkeiten in der Struktur von den PML-NB kommt. Dazu wurde das YFP-MCPyV LT-Antigen in H1299 und PFSK-1 Zellen überexprimiert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen für PML und Sp100 mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Das MCPyV LT-Antigen konnte über die YFP-Fusionierung sichtbar gemacht werden. Die Zellen wurden mittels konfokaler Laserscan Mikroskopie analysiert. Exemplarisch ist hier die Immunfluoreszenz für MCPyV LT-Antigen und PML in H1299 abgebildet (Abbildung 5.17). In der Immunfluoreszenz ist zu erkennen, dass es im Vergleich zu MCPyV LT-Antigen negativen Zellen nicht zur Veränderung der Morphologie der PML-NB kommt, wenn das MCPyV LT- Antigen überexprimiert wird. Auch die Sp100-Strukturen zeigen keine Veränderung, wenn das YFP-MCPyV LT-Antigen überexprimiert wird, Bilder sind im Anhang angeführt (Abbildung 10.7). Auffällig ist auch, dass das MCPyV LT-Antigen im Zellkern lokalisiert und dort gleichmäßig verteilt ist, während PML, Sp100 und Daxx in den Strukturen der PML-NB verbleiben, die sich punktförmig im Zellkern verteilen. Dies konnte gleichermaßen in PFSK-1 Zellen beobachtet werden (Abbildung 10.8 und Abbildung 10.9 im Anhang). Um dies statistisch zu belegen, wurden die Zellkerne der verschiedenen Zellen in Schichten aufgenommen, so dass die Anzahl der verschiedenen Strukturen im gesamten Zellkern gezählt sowie die Größe der Strukturen mittels der Software Volocity gezählt und gemessen werden konnte. Dabei zeigte sich, dass sich in H1299 Zellen je Zellkern ca. 2-30 PML-NB sowie Sp100-Strukturen befinden und die Anzahl beider Strukturen wie auch die Größe der einzelnen nicht variiert, wenn das MCPyV LT Antigen exprimiert wird im Vergleich zur Mock-Kontrolle (Abbildung 5.18). Die

Auswertung der Immunfluoreszenz in PFSK-1 bestätigt, dass die Überexpression des MCPyV LT-Antigen allein keinen Einfluss auf die Anzahl und Größe von PML und Sp100 (Abbildung 5.19) hat. Bei der Auswertung wurden Zellen die sich offensichtlich in der Mitose befinden nicht mit einbezogen, da beschrieben ist, dass sich währenddessen die PML-NB auflösen und somit die Lokalisierung von PML und Sp100 eine andere ist als in ruhenden Zellen.

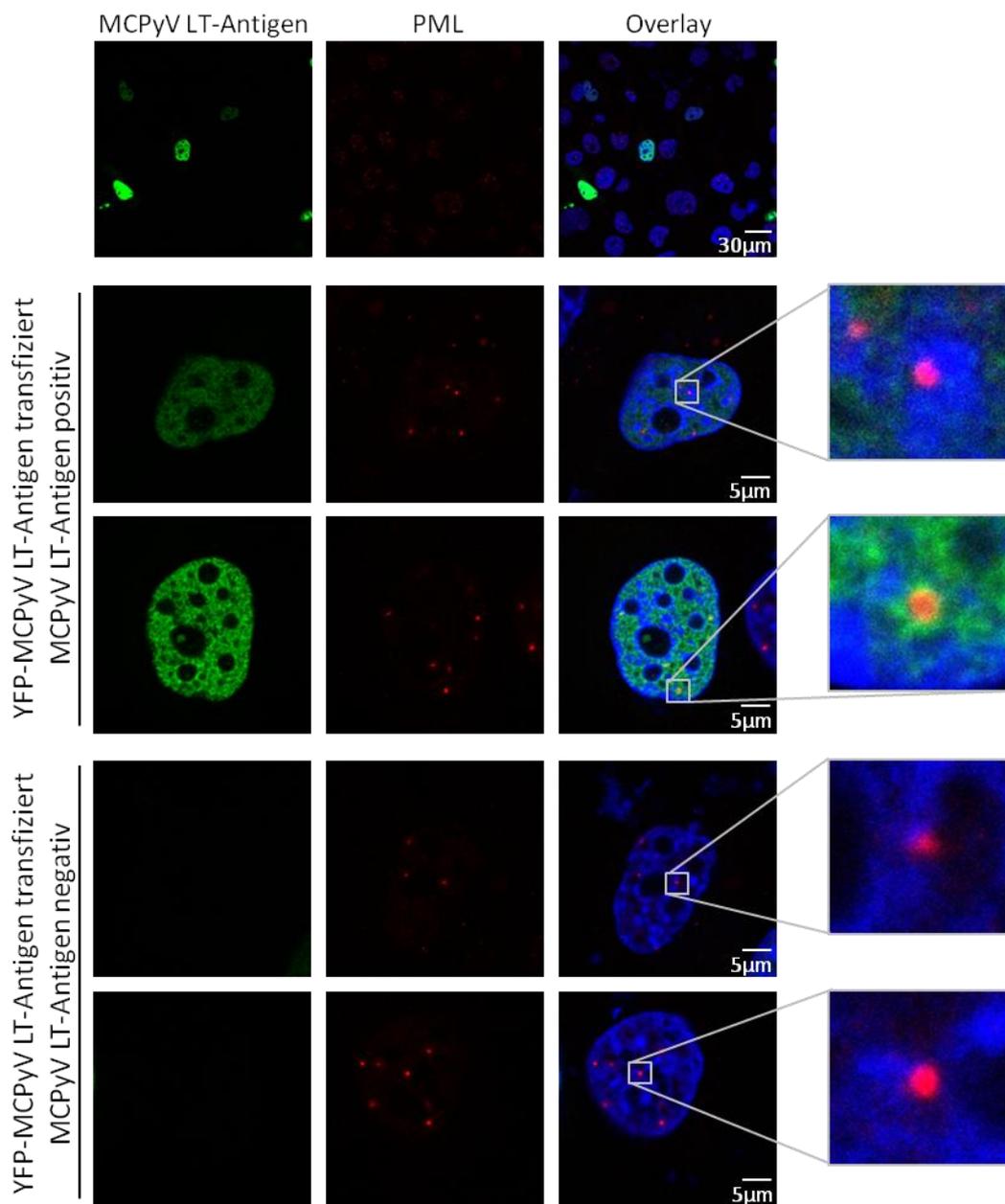


Abbildung 5.17: PML-NB zeigen keine morphologische Veränderung bei Überexpression des MCPyV LT-Antigen. H1299 Zellen wurden mit dem YFP-MCPyV LT-Antigen transfiziert und 2 Tage nach Transfektion im Immunfluoreszenztest analysiert. Dazu wurde PML über spezifische Antikörper und das MCPyV LT-Antigen über die YFP Fusionierung detektiert und mittels konfokaler Laserscan Mikroskopie aufgenommen.

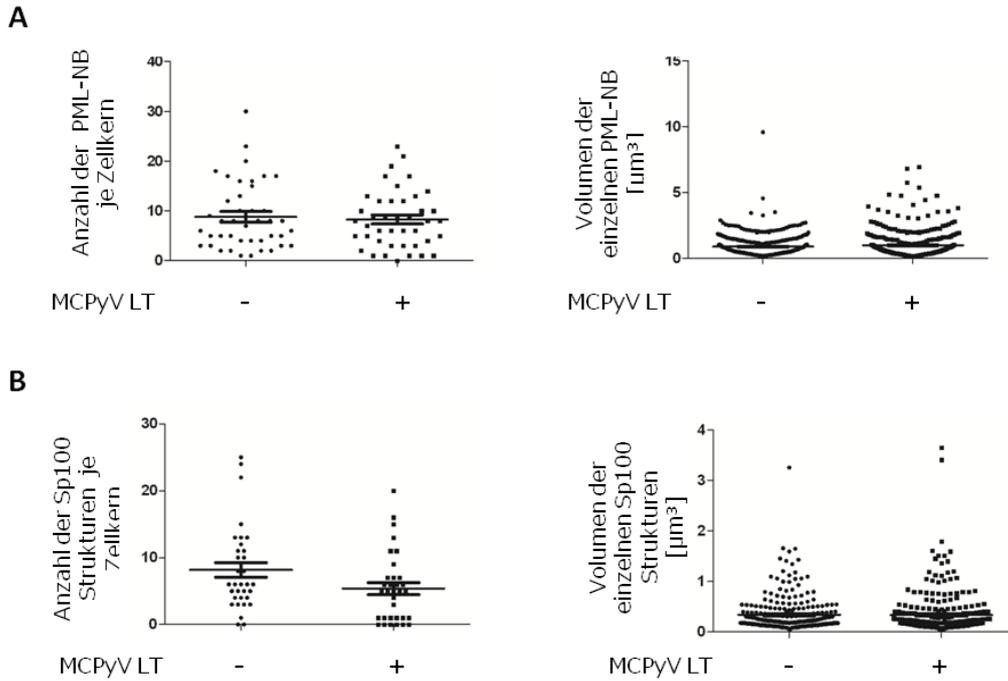


Abbildung 5.19: Anzahl und Größe der PML-NB bleibt unverändert bei der Überexpression von MCPyV LT-Antigenen in PFSK-1 Zellen. PFSK-1 Zellen wurden mit dem YFP-MCPyV LT-Antigen transfiziert und im Immunfluoreszenztest angefärbt für PML und Sp100. Mittels konfokaler Laser Scan Mikroskopie und der Software Volocity wurde die Anzahl und Größe der PML-NB (A) und der Sp100 Strukturen (B) ausgewertet. Dabei wurden für die PML-Strukturen 38 Zellkerne ausgewertet und für die Sp100-Strukturen 28.

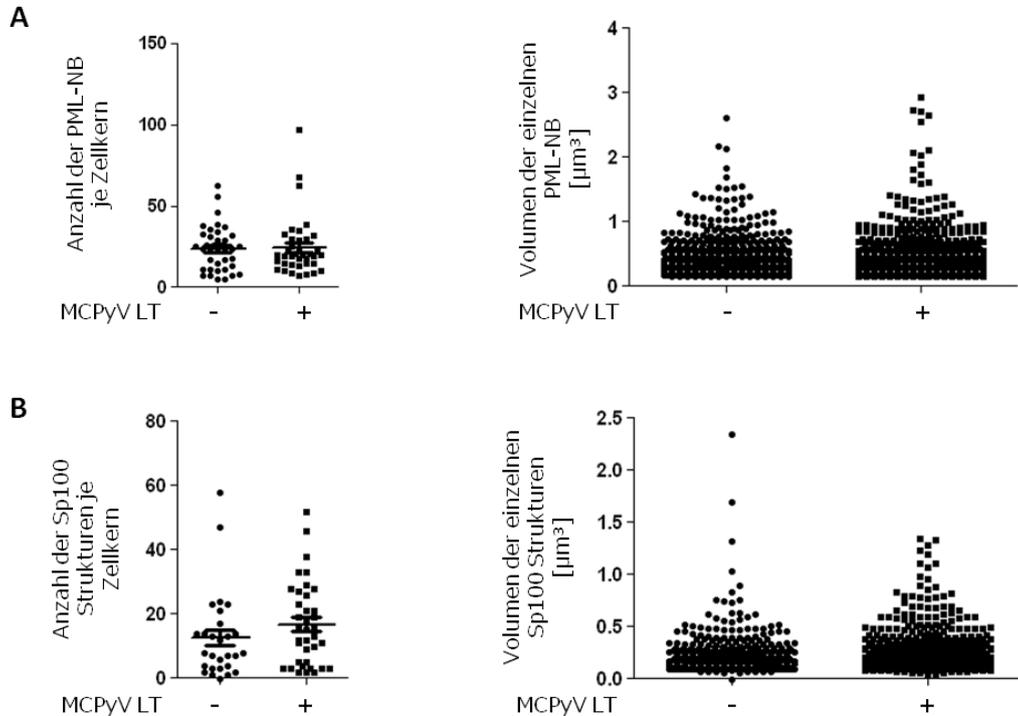


Abbildung 5.18: Die Anzahl und Volumen der PML-NB verändern sich nicht bei der Überexpression von MCPyV LT-Antigenen in H1299 Zellen. H1299 wurden transfiziert mit dem N-terminal YFP fusionierten MCPyV LT-Antigen und im Immunfluoreszenztest mit spezifischen Antikörpern angefärbt für PML und Sp100. Mittels konfokaler Laser Scan Mikroskopie und der Software Volocity wurde die Anzahl und Volumen der PML-NB (A) und der Sp100-Strukturen (B) ausgewertet. Dabei wurden zur Auswertung von PML-Strukturen 42 Zellkerne herangezogen und für Sp100-Strukturen 33.

5.2.5.4. Das YFP-MCPyV LT-Antigen ist funktionell aktiv

Die Überexpression YFP-MCPyV LT-Antigens zeigte im Immunblot keine Veränderung der Expression der Komponenten der PML-NB. Auch in der Immunfluoreszenz konnte keine strukturelle Veränderung der PML-NB detektiert werden, wenn das YFP-MCPyV LT-Antigen

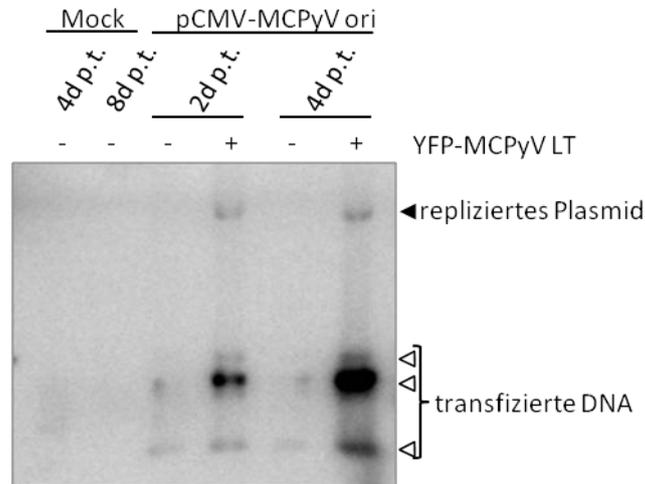


Abbildung 5.20: Induktion der viralen Replikation durch das YFP-MCPyVLT-Antigen. H1299 Zellen wurden mit einem Plasmid, das den MCPyV ori enthält, sowie dem YFP-MCPyV LT-Antigen transfiziert und 2 bzw. 4d p.t. im Southern Blot analysiert. Dazu wurde niedermolekulare DNA isoliert und davon 1µg DpnI und EcoRI verdaut um transfizierte und replizierte DNA voneinander zu unterscheiden.

exprimiert wurde. Um auszuschließen, dass das virale Protein durch seine YFP-Fusionierung noch funktionell aktiv ist, wurde dieses hinsichtlich seiner Replikationsinduktion überprüft. Dazu wurde ein artifizierender Replikationsassay durchgeführt. H1299 Zellen wurden transfiziert mit einem Plasmid, das 97bp des Replikationsursprungs des MCPyV-Genoms (MCPyV ori) nach einem CMV Promotor codiert, sowie dem YFP-MCPyV LT-Antigen im Verhältnis 1:1. Zwei und vier Tage nach Transfektion wurde niedermolekulare DNA isoliert und mittels Southern Blot die Induktion der Replikation untersucht (Abbildung 5.20). Dabei ist zu erkennen, dass wie im Replikationsassay mit cMCPyV bereits 2 Tage nach Transfektion repliziertes Plasmid vorhanden ist. Somit kann das YFP-MCPyV LT-Antigen die Replikation erfolgreich induzieren. Es ist aber auch zu beobachten, dass die Intensität der detektierten Banden in diesem Zeitverlauf nicht stark ansteigt, wie es in H1299 Zellen transfiziert mit dem cMCPyV-Genom zu beobachten ist (Abbildung 5.1).

5.2.5.5. Das MCPyV LT-Antigen lokalisiert in Anwesenheit des MCPyV
Replikationsursprung nicht in Replikationszentren

Während der Replikation des MCPyV lokalisieren die Replikationszentren, die wie vorher gezeigt über das MCPyV LT-Antigen angefärbt werden können, benachbart zu den veränderten Strukturen der PML-NB. Das MCPyV LT-Antigen lokalisiert auch in derartige Zentren, wenn ein artifizieller Replikationsversuch in C33A Zellen mit dem MCPyV LT Antigen sowie einem Plasmid, das den MCPyV ori codiert, durchgeführt wird [118]. Auch in H1299 Zellen konnten wir zeigen, dass das YFP-MCPyV LT-Antigen die Replikation induziert, wenn ein Plasmid, das den MCPyV ori enthält, anwesend ist (Abbildung 5.20). Um die Rolle des MCPyV LT-Antigens im Zusammenhang mit den Strukturen der PML-NB während der Replikation weiter zu verifizieren, wurde ein Replikationsassay mit dem YFP-MCPyV LT-Antigen und einem Plasmid, das den MCPyV ori codiert, in H1299 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden im Immunfluoreszenztest für PML angefärbt und das MCPyV LT-Antigen über das YFP sichtbar gemacht. Aufgrund der Beobachtung, dass die Replikation in diesem artifiziellen Replikationsassay von zwei auf vier Tagen nach Transfektion nicht stark ansteigt, wurde der Versuch 2d p.t. durchgeführt. Hier konnte nicht bestätigt werden, dass das MCPyV LT-Antigen in den getesteten H1299 Zellen in dichteren Regionen lokalisiert (Abbildung 5.21). Wie auch bei der einfachen Überexpression ist das MCPyV LT-Antigen im gesamten Zellkern verbreitet. Da die Aufnahmen während der Replikation des gesamten MCPyV-Genoms vier Tage nach Transfektion gemacht wurden, wurde auch der artifizielle Replikationsversuch wiederholt und 4 Tage nach Transfektion die Immundetektion von PML vorgenommen. Jedoch war auch hier keine Veränderung zu erkennen (Abbildung 5.21). Dies lässt vermuten, dass die Replikation zu schwach ist, um die gleiche Lokalisierung wie im Replikationsversuch mit cMCPyV zu erreichen. Spätere Zeitpunkte mittels Immunfluoreszenz zu untersuchen ist schwierig, da die Zellen zu dicht werden und so nicht mehr auswertbar sind. Eine weitere Möglichkeit wäre die Zellen vor der Anfärbung zu teilen, jedoch gehen die MCPyV LT-Antigen positiven Zellen dabei zum größten Teil verloren, da sie sich nur schwer wieder absetzen.

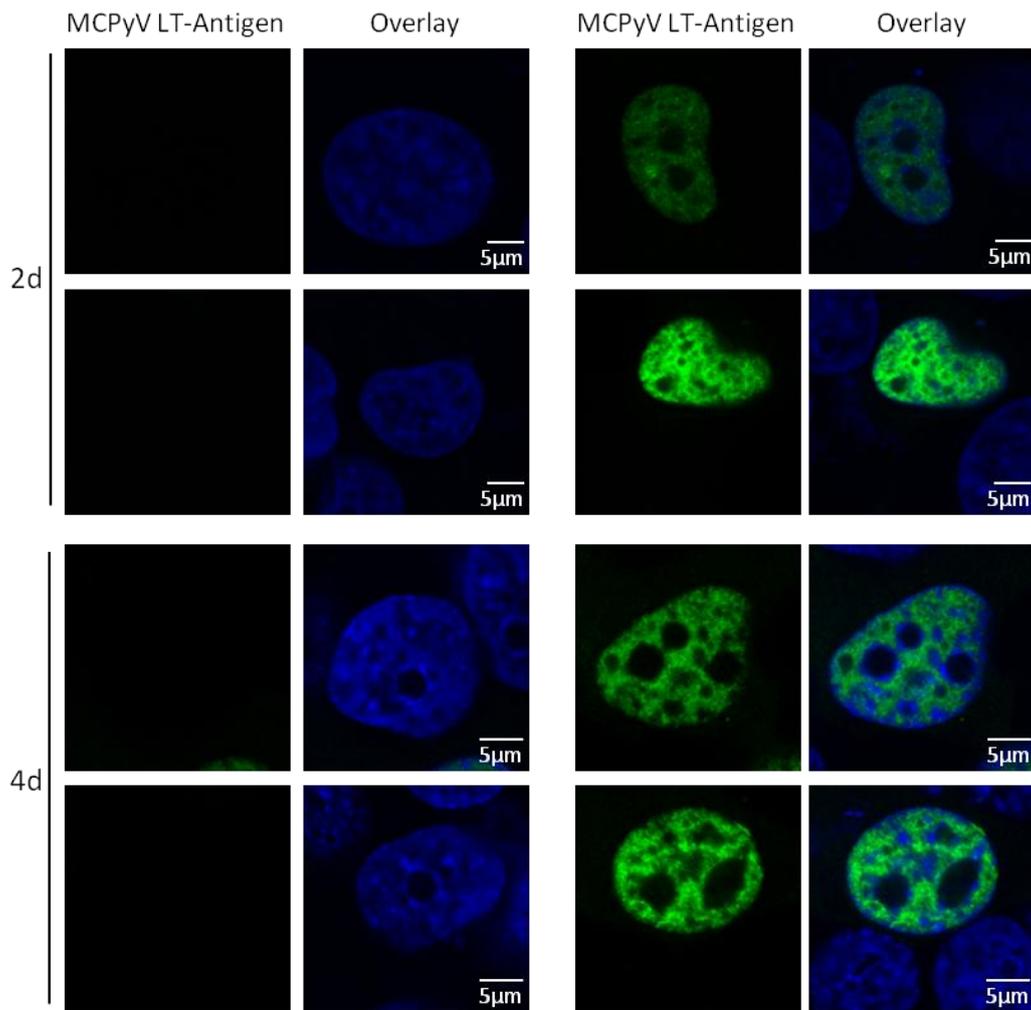


Abbildung 5.21: Das YFP-MCPyV LT-Antigen lokalisiert nicht in Replikationszentren in Anwesenheit des MCPyV oris. H1299 Zellen wurden mit YFP-MCPyV LT-Antigen und einem Plasmid, das den MCPyV ori codiert, transfiziert. 2d und 4d nach der Transfektion wurde die Lokalisierung des MCPyV LT-Antigens mittels konfokaler Mikroskopie analysiert.

Um zu bestätigen, dass das YFP-MCPyV LT-Antigen nicht nur in der Lage ist die Replikation des MCPyV ori zu aktivieren, sondern auch in den Replikationszentren zu lokalisieren, wurde ein weiterer Immunfluoreszenztest gemacht. Dazu wurde das YFP-MCPyV LT-Antigen zusätzlich zum cMCPyV in H1299 Zellen transfiziert. Drei bzw. vier Tage nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und das MCPyV LT-Antigen über das YFP detektiert, so dass nicht das vom Genom exprimierte MCPyV LT-Antigen sichtbar ist. Es war zu beobachten, dass drei Tage nach Transfektion das YFP-MCPyV LT-Antigen noch nicht in den Replikationszentren lokalisierte. Jedoch ab dem viertem Tag nach der Transfektion waren die ersten dichteren Regionen zu erkennen, obgleich das YFP-MCPyV LT-Antigen auch weiterhin diffus im Zellkern zu detektieren war (Abbildung 5.22).

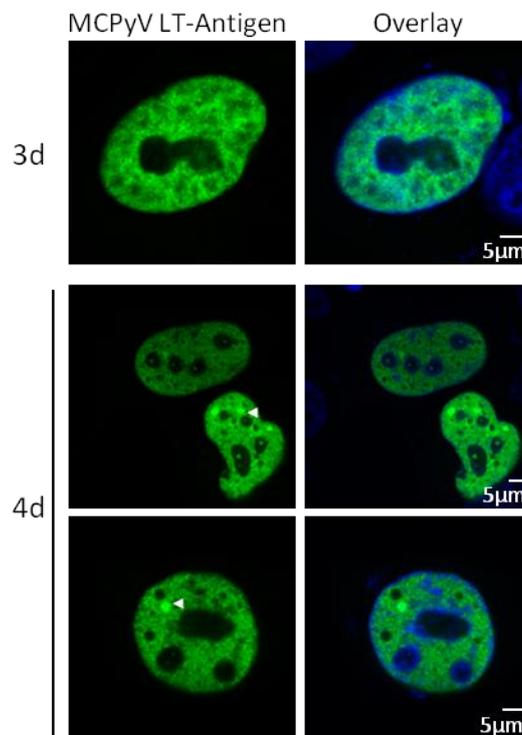


Abbildung 5.22: Lokalisierung des YFP-MCPyV LT-Antigens während der Replikation des cMCPyV. H1299 Zellen wurden mit dem cMCPyV sowie dem YFP-MCPyV LT-Antigen transfiziert und mittels Fluoreszenz des YFPs auf die Lokalisierung des MCPyV LT-Antigens untersucht. Die weißen Pfeile deuten auf dichtere Regionen des MCPyV LT-Antigens.

6. DISKUSSION

Seit der Identifizierung der ersten humanen Polyomaviren im Jahr 1971 konnten in den letzten Jahren elf weitere Vertreter dieser Familie isoliert werden. Diese Viren sind sehr wirts- und zellspezifisch, daher stellt die Etablierung eines Replikationssystems eine große Herausforderung dar. Bisher konnte nur für das BKV und JCV ein derartiges System entwickelt werden. Dabei werden in beiden Fällen primäre Zellen benötigt, um den kompletten Lebenszyklus dieser Viren zu untersuchen [120-122].

Das MCPyV ist das bisher einzige bekannte Polyomavirus, das Tumore im eigenen Wirt induziert. Um den zu Grunde liegenden Mechanismus der Tumorgenese und die Biologie des Virus zu verstehen, ist die Etablierung eines permissiven Replikationssystems unabdinglich. Zurzeit steht für dieses Virus ein *in vitro* Replikationssystem zur Verfügung mit Hilfe dessen Teile des viralen Replikationszyklus, die Expression viraler Proteine und die virale DNA Replikation abgebildet werden können [114, 117, 123]. Auch virale Partikel können mit diesem System isoliert werden, jedoch konnte keine serielle Transmission detektiert werden. Nichtsdestotrotz kann dieses System dafür genutzt werden virale und auch zelluläre Proteine hinsichtlich ihres Einflusses auf die Replikation des MCPyV zu untersuchen. Außerdem können weitere Zelllinien mit Hilfe dieser Methode analysiert werden, um zum einen ein permissives System zu etablieren und zum anderen als Konsequenz Informationen zu dem Zelltyp zu erlangen, in welchem das Virus im Wirt einerseits persistiert und andererseits sich effizient vermehrt.

6.1. KÖNNEN WEITERE ZELLINIEN DIE REPLIKATION DES MCPYV UNTERSTÜTZEN?

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits mehrere Zelllinien aus verschiedenen Spezies, darunter Nager-, Primaten- und humane Zelllinien, sowie Zelllinien aus verschiedenen Geweben mit Hilfe des *in vitro* Replikationssystems untersucht [114, 117, 123]. Dabei konnte von 25 untersuchten Zelllinien bei zehn Zelllinien eine virale DNA Replikation detektiert werden. Jedoch ist keine der Zelllinien vollständig permissiv, d.h. eine serielle Übertragung des Virus über mehrere Passagen ist nicht möglich. Bisher konnte aus verschiedenen

humanen Geweben DNA des MCPyV isoliert werden, was für die mögliche Verbreitung des MCPyV über das Blut sprechen würde. Hier könnte das Virus persistieren oder den lytischen Replikationszyklus durchlaufen. So konnte von Mertz und Kollegen [174] gezeigt werden, dass in inflammatorischen Monozyten DNA des MCPyV detektierbar ist. Über diese könnte MCPyV verbreitet und in entzündetes Gewebe immunsupprimierter oder Patienten mit Hauterkrankungen transportiert werden, wo die Entstehung des MCC folglich möglich wäre [174]. In dieser Arbeit wurden zwei weitere Hautzelllinien, HFF und UISO Zellen, eine Nieren- und eine Leberzelllinie, Caki-1 bzw. hepaRG Zellen, sowie die B-Zelllinien BJAB und RAJI hinsichtlich MCPyV viraler DNA Replikation untersucht. Von den sechs untersuchten Zelllinien konnte nur in HFF und UISO Zellen die Replikation mittels Southern Blot detektiert werden (Abbildung 5.2). Bei den zwei getesteten B-Zelllinien, der Nieren- sowie der Leberzelllinie konnte keine virale Replikation detektiert werden. Da nicht alle Zellen gleichermaßen transfizierbar sind, wurden in diesem Versuch auch die Transfektionseffizienzen der Zellen, die parallel mit einem GFP kodierendem Konstrukt transfiziert wurden, gemessen (Tabelle 2.1). Außerdem wird im Southern Blot die transfizierte DNA detektiert, dies dient zusätzlich als Kontrolle der erfolgreichen Transfektion. In allen vier für die virale DNA Replikation negativen Zelllinien konnte im Southern Blot die transfizierte DNA detektiert werden. So auch bei den RAJI Zellen, bei denen das Signal der transfizierten DNA ähnlich hoch ist wie bei den UISO Zellen. Die RAJI Zellen zeigten bei der FACS Analyse jedoch eine Transfektionsrate von nur 1%, wohingegen bei den UISO Zellen eine Transfektionsrate von 23% messbar war. Möglicherweise hat der Transfektionsansatz mit dem GFP-Konstrukt nicht funktioniert oder der CMV Promotor, der vor dem GFP kodiert wird, wird in diesen Zellen nur gering abgelesen. Aufgrund des deutlichen Signals der transfizierten DNA im Southern Blot, kann davon ausgegangen werden, dass die Transfektion des cMCPyV-Genoms erfolgreich war. Da in diesen Zellen die virale DNA Replikation nicht detektierbar ist, könnte auf verschiedensten Ebenen die MCPyV Replikation oder die Expression der viralen Proteine inhibiert sein. So könnten Proteine exprimiert werden, die die Replikation negativ beeinflussen. Dies konnte bereits für das Vakuolen-sortierende Protein hVam6p hinsichtlich der Replikation des MCPyV gezeigt werden [117]. Aber auch die fehlende Expression von Proteinen, die sich positiv auf die Replikation auswirken ist denkbar. So konnte gezeigt werden, dass in Zellen, die kein transkriptionsregulierendes Protein BRD4 exprimieren, die Replikation des MCPyV verringert

ist [115]. BRD4 wird in diesen Proben jedoch wahrscheinlich keinen Einfluss haben, da es ubiquitär exprimiert wird und gerade auch für immortalisierte B-Zellen gezeigt wurde, dass diese Transkripte für BRD4 aufweisen [175].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hautzelllinien die virale DNA Replikation unterstützen. Zudem konnten bereits verschiedene Studien zeigen, dass aus Hautgewebe wie auch Hautabstrichen DNA des MCPyV isolierbar ist [15, 110, 176]. Da die untersuchten Hautzelllinien in vitro kein Transmission zeigen, wäre es denkbar, dass hier Faktoren fehlen, um diese zu induzieren. Auf Grund dessen wäre es möglich, dass der Lebenszyklus von der Differenzierung der Hautzellen abhängig ist ähnlich wie bei Papillomaviren. Papillomaviren benötigen für ihren Lebenszyklus die Differenzierung der Keratinozyten. Sie infizieren die Stammzellen der Keratinozyten, jedoch findet die Replikation erst in der Stachelzellschicht statt und die Verpackung und Freisetzung der Viruspartikel im oberflächlichen Epithel [150, 177]. Hierfür gäbe es beispielsweise ein Hautmodell, bei dem in Zellkultur primäre Keratinozyten differenziert werden und letztendlich hautähnliche Strukturen gebildet werden [178]. Bei Papillomaviren entstehen dabei in der Basalschicht des Epitheliums 10-200 Genomkopien pro Zelle, um das Fortbestehen des Virus zu sichern. Während der epithelialen Differenzierung kommt es dann zu einem Anstieg der amplifizierten viralen Genome auf bis zu 1000 bis 10000 Kopien pro Zelle, die nach Expression der Kapsidproteine in Viruspartikel verpackt werden [177, 179, 180]. Für das MCPyV konnte jedoch gezeigt werden, dass das Genom in Hautabstrichen bzw. Biopsien gesunder Patienten nur sehr schwach nachweisbar ist [15, 110, 176]. Foulongne und Kollegen [176] konnten auch zeigen, dass die Kopienzahl des MCPyV in Hautabstrichen MCC erkrankter Patienten mit 861 MCPyV Kopien je 1 ng DNA vergleichsweise gering, jedoch um das 20-fache erhöht ist im Vergleich zu gesunden Personen mit 43 MCPyV Kopien je 1 ng DNA. Daher wäre die Haut als Reservoir für das MCPyV denkbar. Hier könnte es in Folge von Immunsuppression zur Aktivierung der viralen DNA Replikation und letztendlich zur erhöhten Virusproduktion kommen.

6.2. WEIST DIE URSPRUNGSZELLE DES MCC AUF MÖGLICHE PERMISSIVE ZELLTYPEN?

Um Marker für bestimmte Tumorarten zu etablieren, sind diese meist gut untersucht und gut charakterisiert hinsichtlich exprimierter Proteine. So kann aufgrund der Marker des MCC auch auf mögliche nicht permissive Zellen des MCPyV zurückgeschlossen werden. Dabei wurden als Ursprung für das MCC anfänglich Merkelzellen diskutiert, da sie eine ähnliche Morphologie und u.a. die Expression von Ck20 und Synaptophysin zeigen [80, 181-183]. Neuere Studien lassen jedoch vermuten, dass sie nicht der Ursprung des MCC sind: 1) In MCC Geweben werden Proteine exprimiert, die sonst nicht in Merkelzellen detektierbar sind wie das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 oder der Tyrosinrezeptor c-kit [184, 185]. 2) Merkelzellen sind in der Basalschicht der Epidermis lokalisiert wohingegen das MCC in der Dermis oder Subkutis auftritt [186]. 3) Merkelzellen sind postmitotisch. Die Heterogenität im MCC Gewebe lässt jedoch eher auf weniger differenzierte Zellen als Ursprungszelle zurückschließen [187, 188]. 4) Merkelzellen, die benachbart zu dem MCC lokalisiert sind kein MCPyV aufweisen[189].

Als Tumorursprung fungieren meist Zellen, die Mutationen infolge einer verlängerten Lebensdauer anhäufen und die in der Lage sind sich selbst zu erneuern [190]. Dies ist ein Charakteristikum von Stammzellen und Vorläuferzellen. Das unterstützt die Vermutung von zur Hausen und Kollegen, dass Prä B-Zellen die Ursprungszelle des MCC sein könnten [81]. Sie detektierten die Expression von PAX5 sowie eine Reorganisation in den Genbereichen der IgH und IgK in allen untersuchten MCC Geweben und in 76,2% die Expression von TdT. Diese Ergebnisse der Detektion von Proteinen, welche charakteristisch für frühe B-Zellstadien sind, weisen darauf hin, dass möglicherweise Pro/Prä B-Zellen die Ursprungszelle des MCC sein könnten. Dabei widerspräche die Expression von Proteinen, die nicht Prä B-Zellen zugeordnet werden können, in den MCC Geweben dieser Theorie nicht. Für SV40 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch die induzierte Transformation von B-Zellen die Kontrolle über die Expression von endokrinen Markern und Zytokeratin in den Zellen verloren geht [191]. Ähnlich könnte es für Zellen sein, die durch das MCPyV transformiert werden. Andere Arbeiten jedoch diskutieren Stammzellen der Haut als mögliche Ursprungszellen des MCC [189]. So konnte bereits gezeigt werden, dass in Mäusen die Merkelzellen aus epidermalen Stammzellen hervorgehen [192-194]. Mögliche

Hautstammzellen wären daher folgende: Epidermale Stammzellen, dermale Stammzellen aus der Neuralleiste und Vorläuferzellen der Haut [189]. Tumorursprungszellen sind meist nicht permissive Zellen. Daher wird in diesen Zellen nicht der gesamte Lebenszyklus des MCPyV ablaufen. Sie geben jedoch Hinweise auf mögliche permissive Zellen. Dass DNA des MCPyV in verschiedenen Organen und in inflammatorischen Monozyten entdeckt wurde und dass MCC Gewebe Marker von Prä B-Zellen zeigt, lässt vermuten, dass Zellen des hämatopoetischen Systems permissiv sein könnten. Auch wenn die hier untersuchten B-Zelllinien die Replikation des MCPyV nicht unterstützen, ist es weiterhin von Interesse zusätzlich primäre B-Zellen zu untersuchen. Bisher konnte für die beiden humanen Polyomaviren BKV und JCV ein permissives Replikationssystem nur in primären Zellen etabliert werden [120-122]. Auch Stammzellen, wie beispielsweise CD34⁺ Zellen, die aus Nabelschnurblut isoliert werden können, könnten bei den Untersuchungen berücksichtigt werden.

6.3. REGULATION DER MCPYV REPLIKATION DURCH VIRALE PROTEINE

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Replikation des MCPyV erhöht wird, wenn das MCPyV LT- und sT-Antigen *in trans* zu dem MCPyV-Genom ko-exprimiert werden. Dabei zeigten 293 Zellen, die mit der frühen viralen Region stabil transfiziert sind, an Tag vier nach Transfektion eine 24-fache Erhöhung der Replikation [123] und 293 Zellen, die dazu zusätzlich das LT- und sT-Antigen des SV40 exprimieren, eine 70-fache Erhöhung der Replikation des MCPyV [114]. Dabei ist die Erhöhung der viralen DNA Replikation nicht nur auf die Expression der verschiedenen T-Antigene zurückzuführen. Die DNA Replikation von Polyomaviren ist auch abhängig von der Induktion der Proliferation der Zellen, da es die Replikationsmaschinerie der Zelle für die eigene Replikation nutzen muss. Das SV40 LT-Antigen führt zu einer Steigerung der Proliferation, wodurch die unterschiedlichen Steigerungen der viralen DNA Replikation, gemessen von Neumann und Kollegen [123] sowie von Schowalter und Kollegen [114], erklärbar ist. Wird jedoch die Replikation des MCPyV in 293T Zellen, die nur das SV40 LT-Antigen exprimieren, untersucht, kann keine neu replizierte DNA detektiert werden [123]. Hier scheint das SV40 LT-Antigen trotz der Proliferationssteigerung der Zellen einen direkten negativen Einfluss auf die MCPyV

Replikation zu haben. Dieser setzte sich in den Experimenten von Schowalter und Kollegen [114] möglicherweise aufgrund der zusätzlichen Expression der MCPyV T-Antigene nicht durch. Um zu bestätigen, dass das SV40 LT-Antigen einen negativen Einfluss auf die Replikation des MCPyV hat, wurden H1299 und 293 Zellen mit dem cMCPyV und zusätzlich mit dem SV40 LT-Antigen transfiziert. Zu den analysierten Zeitpunkten konnte keine replizierte DNA im Southern Blot detektiert werden (Abbildung 5.6). Dies ist gegensätzlich zu den beiden humanen Polyomaviren BKV und JCV, bei denen die Replikation durch das SV40 LT-Antigen erhöht wird. Vergleicht man die Aminosäuresequenz der LT-Antigene, ist zu erkennen, dass JCV und BKV LT-Antigen mit 83% bzw. 85% eine höhere Ähnlichkeit zum SV40 LT-Antigen haben als das MCPyV LT-Antigen mit 65%, (Abbildung 2.1). In Abbildung 5.3 ist jedoch auch zu erkennen, dass keine Expression des MCPyV LT-Antigens nachzuweisen ist. Da der verwendete Antikörper (CM2B4) nicht sehr sensitiv ist, ist nicht auszuschließen, dass geringe Mengen des LT-Antigens exprimiert werden. Die nicht vorhandene virale Replikation würde gegen die Expression vom MCPyV LT-Antigen sprechen. Jedoch wäre es denkbar, dass das SV40-LT-Antigen mit dem MCPyV LT-Antigen um wichtige Faktoren, die zur Initiierung der MCPyV Replikation notwendig sind, konkurriert, so dass diese nicht über das MCPyV LT-Antigen rekrutiert werden könnten, um die virale Replikation zu aktivieren. Auch wäre es möglich, dass das SV40 LT-Antigen zelluläre Proteine, die zur Initiierung der Expression vom LT- und sT-Antigen wichtig sind, bindet. Auch das MCPyV sT-Antigen könnte hier eine Rolle spielen, da es wichtig ist um den proteasomalen Abbau vom MCPyV LT-Antigen zu verhindern [119]. Um diesen Einfluss auf die Transkription der MCPyV T-Antigene weiter zu untersuchen, könnten Luziferaseassays durchgeführt werden. Dabei wird die Wirkung des SV40 LT-Antigens auf die Promotoren der MCPyV T-Antigene untersucht. Auch denkbar wäre, dass das SV40 LT-Antigen im Bereich der NCCR des MCPyV bindet und Faktoren an deren Bindung an den Promotor für das MCPyV LT-Antigen hindert. Dies ließe sich beispielsweise über ein Gelshift Assay (engl.: *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) nachweisen.

Weitere Proteine, welche von Polyomaviren exprimiert werden, sind die Kapsidproteine. Diese könnten bei einer normalen Infektion bereits bei Eintritt des viralen Partikels in die Zelle Signalwege induzieren, die möglicherweise für die lytische Infektion benötigt werden, die bisher für MCPyV im *in vitro* Replikationsassay nicht beobachtet werden konnte. Für das MCPyV sind drei offene Leserahmen als Kapsidproteine beschrieben, VP1, VP2 und VP3 [11].

Wobei bisher angenommen wird, dass VP3 nicht exprimiert wird. Dies wird durch verschiedene Ergebnisse begründet: Bei Sequenzanalysen wurde festgestellt, dass die Kozaksequenz um das Startkodon des MCPyV VP1 sehr schwach ist. Zudem fehlt dem MCPyV eine in bisher allen bekannten VP3 Proteinen isolierte N-terminale Konsensussequenz MALXXΦ (Φ entspricht hier einer aromatischen Aminosäure). Auch konnte die Expression von VP3 in MCPyV infizierten Zellen sowie in aufgereinigten Viruspartikeln nicht nachgewiesen werden [107]. Analysen zu den Transkripten zeigten außerdem, dass kein Spleiß zum Start des VP3 detektiert werden konnte [108]. Aus VP1 und VP2 dagegen können Kapside zusammengesetzt werden, was durch die Herstellung von VLP von Schowalter und Kollegen gezeigt werden konnte [114]. Dabei wird VP1 auf der Oberfläche von Viruspartikel exponiert und kann mit zellulären Proteinen interagieren, um Signalwege auszulösen. Daher wurde in dieser Arbeit zusätzlich zum cMCPyV-Genom auch MCPyV VP1 *in trans* ko-exprimiert. Dabei wurde auf ein codonoptimiertes Konstrukt zurückgegriffen, welches in Zellen exprimiert wird und über Antikörper nachweisbar ist. Die Funktionalität dieses VP1 Proteins wurde bereits gezeigt: VP1 wird aktiv in sogenannte VLP eingebaut [114]. Im Vergleich zu der Transfektion mit dem MCPyV-Genom in Abwesenheit des *in trans* exprimierten VP1 Proteins, ist die Replikation minimal schwächer. Obwohl genomäquivalente DNA Mengen des VP1 Plasmides rechnerisch eingesetzt wurden, kommt es durch den vorgeschalteten CMV Promotor möglicherweise zu einer erhöhten Expression im Vergleich zu den Kontrollen, in denen nur das cMCPyV-Genom transfiziert wurde. Die Expression des VP1 bereits zu diesen frühen Zeitpunkten könnte die Replikation inhibieren oder zelluläre Faktoren aktivieren, die wiederum die Replikation negativ beeinflussen.

In dem bestehenden *in vitro* Replikationssystem konnte in einigen Zelllinien die Produktion von Viruspartikeln gezeigt werden [123]. Aufgrund der unregelmäßigen Form dieser Partikel wurde vermutet, dass die Reifung der Viruspartikel beeinträchtigt sein könnte und damit die Transmission und Infektion stark beeinträchtigt sind. Um die Partikelreifung zu verbessern wurden 293 Zellen, welche eine robuste virale DNA Replikation zeigen, zusätzlich zum cMCPyV-Genom mit den Kapsidproteinen VP2 und VP3 des MPyV transfiziert. Das Mauspolyomavirus ist das am nächsten verwandte Polyomavirus, von dem die Kapsidproteine als Plasmid zur Verfügung standen. Nach 2, 4 und 8 Tagen nach Transfektion wurden Proben genommen und für die Analyse im Southern Blot vorbereitet. Hier ist zu erkennen, dass die Replikation des MCPyV durch die Expression der einzelnen Proteine

sowie deren Kombination nicht beeinflusst wird (Abbildung 5.4). Des Weiteren konnte bei der Kultivierung der transfizierten Zellen über einen Zeitraum von bis zu 44 Tagen keine morphologische Veränderung der Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden. Möglicherweise können die Kapsidproteine des MPyV nicht in das Kapsid des MCPyV eingebaut werden, eventuell ist der Verwandtschaftsgrad dafür nicht hoch genug (Abbildung 2.1). Die Identität der Kapsidproteine VP1, 2 und 3 zwischen dem MCPyV und dem Gorilla Polyomavirus auf Proteinlevel ist mit 86%, 85% bzw. 83% sehr viel höher als mit den hier getesteten Kapsidproteinen des Mauspolyomavirus, die eine Identität zum MCPyV von 55%, 29% bzw. 49% besitzen. Diese wären bessere Kandidaten, um eine bessere Partikelproduktion auszutesten, jedoch wurde das Gorilla Polyomavirus erst kürzlich isoliert [195], wodurch es nicht möglich war, die Proteine in dieser Arbeit zu testen. Des Weiteren ist es nach längeren Zeiträumen schwierig zu erkennen, ob Zellen morphologische Veränderungen zeigen, die auf eine Transmission hinweisen. Für das BKV ist beschrieben, dass es keinen CPE wie das SV40 auslöst, daher ist nicht unbedingt davon auszugehen, dass das MCPyV diesen hervorruft. Dabei wird bei BKV das Freisetzen der Viruspartikel möglicherweise durch das Agnoprotein und seine Interaktion mit α -SNAP reguliert. α -SNAP reguliert die Dissoziation von den sogenannten SNARE Proteinen, die die Fusion von Membranen vermitteln [196, 197]. Hier vermuten die Autoren, dass es durch diese Regulierung vom BKV Agnoprotein nur eine begrenzte Anzahl der Viruspartikel aus der Zelle entlassen werden, wodurch es nicht zur Lyse der Zelle kommt [197]. Für das MCPyV ist bisher kein Agnoprotein beschrieben und da auch kein permissives System etabliert ist, ist bisher unklar wie die Freisetzung der Viruspartikel abläuft. Mögliche entstandene Viruspartikel, die aus Zellen nicht freigesetzt werden, können jedoch durch mehrfaches Frieren und Tauen der Zellen herausgelöst werden. Um die Entstehung infektiöser Partikel nicht auszuschließen sollte daher die Koexpression von Kapsidproteinen zum cMCPyV-Genom wiederholt werden, um mögliche Viruspartikel durch Frieren und Tauen freizusetzen und damit einen Infektionsversuch durchzuführen.

Als weiteren viralen Faktor könnte man zudem das Agnoprotein untersuchen. Dieses wird nur von einigen Polyomaviren wie beispielsweise von SV40, BKV und JCV exprimiert [47]. So konnte gezeigt werden, dass es im späteren Abschnitt des Lebenszyklus wichtig ist. Das Agnoprotein von SV40 wird benötigt, damit VP1 richtig lokalisiert und das SV40 Genom in entstehende Viruspartikel verpackt wird [76, 198]. Auch für JCV kommt es ohne das

Agnoprotein nicht zu Viruspartikeln mit eingeschlossenem Virusgenom [199, 200]. Zusätzlich interagiert das JCV Agnoprotein mit HP1 α wodurch die Kernmembran strukturell verändert wird, was in der Freisetzung der Viruspartikel resultiert [79]. Auch BKV reguliert möglicherweise mit Hilfe des Agnoproteins und dessen Interaktion mit α -SNAP die Freisetzung der Viruspartikel [197]. Für das MCPyV ist kein Leserahmen für ein Agnoprotein beschrieben. Jedoch ist eine Koinfektion von verschiedenen humanen Polyomaviren höchstwahrscheinlich, da die Bevölkerung je nach untersuchtem HPyV 50-90% seropositiv ist (Tabelle 2.1). Zudem wurde bereits beschrieben, dass BKV aus Hautgewebe amplifiziert werden konnte [201]. Daher ist es möglich, dass beispielsweise BKV und das MCPyV, das auch aus Hautgeweben isoliert werden konnte, gleiche Zellen in der Haut infizieren. Auf Grund dessen ist es denkbar, dass die Expression des Agnoproteins von BKV auch einen Einfluss auf die Freisetzung von MCPyV Viruspartikeln hat. In der Zukunft bleibt dies mit dem *in vitro* Replikationssystem für das MCPyV zu untersuchen, um möglichst ein permissives System zu etablieren.

6.4. DER EINFLUSS VON PML-NB AUF DIE REPLIKATION DES MCPYV

PML-NB sind Strukturen des Zellkerns, welche zahlreiche Funktionen haben, wie z.B. den Verlauf der Infektion vieler RNA- und DNA-Viren sowohl positiv wie auch negativ zu beeinflussen [135, 202]. Um der antiviralen Wirkung von PML-NB entgegen zu wirken, exprimieren einige Viren Proteine, die den proteasomalen Abbau von PML-NB oder Bestandteile dieser initiieren [135, 137, 140]. Aber auch Mechanismen wie die Aktivierung der Umstrukturierung der PML-NB, um die Funktion von PML-NB zu inhibieren, sind bekannt [203]. Im Gegensatz dazu ist beschrieben, dass einige Viren wie unter anderem das Polyomavirus SV40 PML-NB benötigt um zu replizieren [144, 145]. Besonders in der Familie der Polyomaviren sind gegensätzliche Effekte der PML-NB auf den Verlauf der viralen Replikation beschrieben. Aus diesem Grund und der zusätzlichen Detektion vieler zellulärer Proteine, die mit dem MCPyV LT-Antigen interagieren und in PML-NB lokalisieren (Tabelle 5.2) [151], wurde in dieser Arbeit die gegenseitige Wechselwirkung von PML-NB und der MCPyV Replikation untersucht werden.

Die hier beschriebenen Arbeiten zeigen, dass es während der viralen DNA Replikation des MCPyV zur Umstrukturierung der PML-NB kommt, wobei die Größe und Anzahl der PML Strukturen in H1299 Zellen signifikant zunimmt. Wie in H1299 Zellen konnte auch in PFSK-1 Zellen mittels konfokaler Mikroskopie die Strukturveränderung zu Hohlkugeln gezeigt werden, jedoch kommt es in PFSK-1 Zellen nicht zu einer statistisch signifikanten Veränderung der Anzahl und Volumina der PML-Strukturen. Interessanterweise kann jedoch in beiden Zelllinien während der MCPyV Replikation eine Reduktion von Sp100 positiven Zellen detektiert werden. Mittels konfokaler Laserscan Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass 24% der H1299 Zellen und 43% der PFSK-1 Zellen kein detektierbares Sp100 Signal mehr aufzeigen (Abbildung 5.7 und Abbildung 5.8), wohingegen im restliche Anteil der Zellen Sp100 in den vergrößerten PML-NB Strukturen lokalisiert. In den Sp100 positiven Zellen zeigt sich zudem ein signifikanter Anstieg der Anzahl und Volumina der Sp100 positiven Strukturen. Ob es in den Sp100 negativen Zellen zur proteasomalen Degradierung, wie es in der Infektion von HSV-1 oder Herpes Virus Saimiri (HVS) beschrieben ist [135, 204] oder zu einer Relokalisierung aus den PML-NB kommt, ist bislang unklar und muss in weiteren Untersuchungen, wie zum Beispiel in Anwesenheit des Proteasominhibitors MG132 geklärt werden. Die durch shRNA induzierte Reduktion der Sp100 Expression in H1299 und PFSK-1 Zellen zeigte einen positiven Einfluss auf die virale DNA Replikation (Abbildung 5.12 und Abbildung 5.13). Anhand des Immunblotts (Abbildung 5.10) ist zu erkennen, dass in beiden Zelllinien die Sp100 Expression über die stabile shRNA Synthetisierung nicht zu 100% reduziert werden konnte. Vermutlich repliziert das MCPyV besser in Zellen ohne Sp100 worauf die Erhöhung der detektierten viralen DNA Replikation zurückzuführen ist. Dies ist jedoch ein Hinweis darauf, dass Sp100 schon zu frühen Zeitpunkten einen negativen Einfluss auf die Replikation oder die Expression der viralen Gene haben könnte. Durch die stabil synthetisierte shRNA gegen Sp100 wird von Beginn an die Sp100 Expression verringert, wo hingegen es während der Replikation erst zu einer Umstrukturierung und Abnahme des Sp100 positiven Zellen kommt. In Zellen mit verringerter Sp100 Expression konnte jedoch keine veränderte Transkription des MCPyV LT-Antigens und des VP1 (Abbildung 5.14) nachgewiesen werden, daher hat Sp100 vermutlich eher einen Einfluss auf die Replikation durch die Unterdrückung zellulärer Faktoren, die benötigt werden für die MCPyV Replikation, oder Hochregulation zellulärer Faktoren, die die virale DNA Replikation inhibieren.

Mit Hilfe des *in vitro* Replikationssystems kann nur ein kleiner Bereich des Lebenszyklus des MCPyV abgebildet werden. Daher ist die Abnahme der Sp100 positiven Zellen vermutlich nur ein Zwischenschritt in der Infektion. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in einem permissiven System im Verlauf der Infektion kein Sp100 mehr detektierbar ist. Die Umstrukturierung von PML-NB zu Mikrostrukturen mit oder ohne Sp100 wurde bereits beschrieben: Strukturen ohne Sp100 entstehen in Folge zellulären Stresses [205, 206] und mit Sp100 auf Grund von DNA-Schäden [205]. Die detektierte Umstrukturierung der PML-NB sowie der Sp100 Strukturen könnte jedoch auch eine Inhibierung der Funktion dieser Strukturen sein, wie sie bereits während der Infektion mit BKV und HSV-1 gezeigt werden konnte [122, 207].

Um PML-NB umzustrukturieren oder den proteasomalen Abbau zu initiieren, interagieren virale Proteine mit Bestandteilen der PML-NB. In dieser Arbeit wurde versucht die Interaktion des LT-Antigens mit PML, Sp100 und Daxx mittels Koimmunpräzipitation zu detektieren. Dabei konnte keine Bindung nachgewiesen oder bestätigt werden, da das MCPyV LT-Antigen sehr basisch ist, wodurch es unspezifische an Sepharose wie auch Agarose bindet. Auch die Variation der Pufferzusammensetzung konnten die unspezifischen Bindungen des LT-Antigens nicht vermindern. Um eine mögliche Interaktion weiterhin zu untersuchen, könnte dies mittels FACS-FRET (Förster-Resonanz-Energietransfer) erfolgen. Diese Methode beruht auf den Energieübertrag von einem Donor-Fluorophor auf einen Akzeptor-Fluorophor. Dazu muss die emittierte Wellenbereich des Donors im Anregungsbereich des Akzeptors und der Abstand beider Fluorophore unter 10nm liegen, da die Effizienz mit steigendem Abstand abnimmt. Bei zu großen Proteinen könnte dies problematisch werden, da je nach Bindung der zu untersuchenden Interaktionspartner die N- oder C-Termini, an denen die Fluorophore gekoppelt sind, schon durch die Größe der Proteine an sich einen zu großen Abstand besitzen können. Dadurch käme es bei dieser Methode trotz Bindung beider Proteine zu einem negativen Ergebnis. Dies bleibt bei dem MCPyV LT-Antigen und PML, Daxx bzw. Sp100 zu untersuchen. Interessant wäre dabei jedoch die Interaktion von dem MCPyV LT-Antigen mit spezifischen Isoformen des PML. Bisher konnte für das MCPyV LT-Antigen gezeigt werden, dass es indirekt die Funktion von p53 reguliert [104]. Dies könnte über PML IV stattfinden. Es wurde bereits gezeigt, dass p53 über PML IV in PML-NB rekrutiert wird, was zu Folge hat, dass p53 aktiviert und Apoptose induziert wird [130].

Auch eine Umstrukturierung der PML-NB allein durch die exogene Expression von dem YFP-MCPyV LT-Antigen konnte nicht detektiert werden. Wobei in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Funktionalität des LT-Antigens durch die N-terminale Fusionierung mit YFP nicht beeinträchtigt wird. Auch die geringe Replikation eines Plasmids, das den ori des MCPyV enthält, induziert durch das MCPyV LT-Antigen, kann die Umstrukturierung der PML-NB nicht aktivieren. Das lässt vermuten, dass ein bestimmtes stöchiometrisches Verhältnis zwischen dem ori und dem MCPyV LT-Antigen benötigt wird oder eher *in trans* wirkende Faktoren des kompletten MCPyV-Genoms wie die Expression der späten Gene nötig sind, damit eine Strukturänderung der PML-NB induziert wird.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PML-NB in Zellen, welche aktiv MCPyV DNA replizieren, umstrukturiert werden. Während PML und Daxx keinen Effekt auf die MCPyV Replikation zeigen, ist Sp100 ein negativer Faktor der MCPyV DNA Replikation. Für den Zusammenhalt der PML-NB wie auch die Rekrutierung bestimmter Proteine in die PML-NB ist die Sumoylierung eine wichtige Proteinmodifikation [1]. Um den molekularen Mechanismus, welcher der Umstrukturierung der PML-NB während der MCPyV DNA Replikation zu Grunde liegt, weiter zu untersuchen, sollte die Sumoylierung der PML-NB-Bestandteile analysiert werden. So konnte auch gezeigt werden, dass während der Infektion mit EBV die PML-NB zerstört werden. Dies beruht darauf, dass das sehr frühe virale Protein BZLF1 mit PML um die Modifizierung durch SUMO-1 konkurriert, PML nicht sumoyliert wird und folglich abgebaut wird, wodurch die Strukturen der PML-NB aufgelöst werden [208]. Gleiches gilt für das HCMV und HSV-1, hier inhibieren die viralen Proteine IE1 bzw. ICPO die SUMO-1 Modifizierung von PML und Sp100 wodurch die PML-NB zerstört werden [209]. Aber auch die Sumoylierung der viralen Proteine ist von Interesse, durch die es möglich wäre in die PML-NB zu lokalisieren.

Um den Einfluss von Sp100 weiter zu analysieren, sollten dabei die verschiedenen Isoformen untersucht werden. Für HSV-1 wurde bereits beschrieben, dass die Isoformen Sp100 B, C und HMG die Expression der frühen viralen Proteine ICPO und ICP4 verringern, wobei diese Sp100 Isoformen den Promoter von ICPO reprimieren. Sp100 A dagegen stimuliert den Promoter von ICPO [134]. Auch für hAd5 konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Sp100 A die adenoviralen Promotoren verstärkt und durch Sp100 B vermindert abgelesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass nur die Isoform A in den *track like* Strukturen

bleibt, wohingegen Sp100 B, C und HMG als negative Regulatoren aus den veränderten PML-NB Strukturen lokalisiert werden [210]. Um die einzelnen Isoformen weiterhin auf ihren Einfluss auf die virale DNA Replikation des MCPyV und die virale Genexpression zu untersuchen, könnte hier einerseits auf Luziferaseassays zurückgegriffen werden, in denen die Aktivität von Promotoren untersucht werden. Dabei ist es aufgrund der hohen Sequenzhomologien höchstwahrscheinlich nicht möglich für jede Isoform eine stabile Herunterregulierung mittels shRNAs zu erreichen. Andererseits sind Lokalisationsstudien der einzelnen Isoformen während der viralen DNA Replikation denkbar. Hier konnte bereits gezeigt werden, dass HA- und auch FLAG-fusionierte Sp100 Isoformen genutzt werden können, ohne dass ihre Lokalisation durch die Fusionierung beeinträchtigt wird [128, 210].

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Lang, M., et al., *Three-dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies*. Journal of cell science, 2010. **123**: p. 392-400.
2. Stewart, S.E., B.E. Eddy, and N. Borgese, *Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture*. J Natl Cancer Inst, 1958. **20**(6): p. 1223-43.
3. Sweet, B. and M. Hilleman, *The vacuolating virus, SV40*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1960. **105**: p. 420-427.
4. Gardner, S.D., et al., *New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation*. Lancet, 1971. **1**: p. 1253-1257.
5. Padgett, B.L., et al., *Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy*. Lancet, 1971. **1**: p. 1257-1260.
6. Hirsch, H.H., et al., *Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations*. Transplantation, 2005. **79**: p. 1277-1286.
7. Replog, M.D., G.A. Storch, and D.B. Clifford, *Bk virus: a clinical review*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2001. **33**: p. 191-202.
8. Allander, T., et al., *Identification of a third human polyomavirus*. Journal of virology, 2007. **81**: p. 4130-4136.
9. Gaynor, A.M., et al., *Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections*. PLoS pathogens, 2007. **3**: p. e64.
10. Rao, S., et al., *WU and KI polyomavirus infections in pediatric hematology/oncology patients with acute respiratory tract illness*. J Clin Virol, 2011. **52**(1): p. 28-32.
11. Feng, H., et al., *Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma*. Science (New York, N.Y.), 2008. **319**: p. 1096-1100.
12. Chang, Y. and P.S. Moore, *Merkel cell carcinoma: a virus-induced human cancer*. Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 123-44.
13. Shuda, M., et al., *T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(42): p. 16272-7.
14. Spurgeon, M.E. and P.F. Lambert, *Merkel cell polyomavirus: a newly discovered human virus with oncogenic potential*. Virology, 2013. **435**(1): p. 118-30.
15. Schowalter, R.M., et al., *Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin*. Cell Host and Microbe, 2010. **7**: p. 509-515.
16. Scuda, N., et al., *A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus*. Journal of virology, 2011. **85**: p. 4586-4590.
17. van der Meijden, E., et al., *Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient*. PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1001024.
18. Wanat, K.A., et al., *Viral-Associated Trichodysplasia*. Archives of dermatology, 2012. **148**: p. 219-223.
19. Benoit, T., et al., *Viral-associated trichodysplasia of immunosuppression: report of a pediatric patient with response to oral valganciclovir*. Archives of dermatology, 2010. **146**: p. 871-874.

20. Holzer, A.M. and L.C. Hughey, *Trichodysplasia of immunosuppression treated with oral valganciclovir*. J Am Acad Dermatol, 2009. **60**(1): p. 169-72.
21. Osswald, S.S., et al., *Viral-associated trichodysplasia in a patient with lymphoma: A case report and review*, in *Journal of Cutaneous Pathology*. 2007. p. 721-725.
22. Sperling, L.C., M.M. Tomaszewski, and D.A. Thomas, *Viral-associated trichodysplasia in patients who are immunocompromised*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2004. **50**: p. 318-322.
23. Buck, C.B., et al., *Complete Genome Sequence of a Tenth Human Polyomavirus*, in *Journal of Virology*. 2012. p. 10887-10887.
24. Siebrasse, E.A., et al., *Identification of MW Polyomavirus, a Novel Polyomavirus in Human Stool*, in *Journal of Virology*. 2012. p. 10321-10326.
25. Yu, G., et al., *Discovery of a novel polyomavirus in acute diarrheal samples from children*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49449.
26. Lim, E.S., et al., *Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing*. Virology, 2013. **436**: p. 295-303.
27. Korup, S., et al., *Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58021.
28. Mishra, N., et al., *Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy*. The Journal of infectious diseases, 2014.
29. Nicol, J.T.J., et al., *Age-specific seroprevalences of merkel cell polyomavirus, human polyomaviruses 6, 7, and 9, and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus*. Clinical and Vaccine Immunology, 2013. **20**: p. 363-368.
30. Chesters, P.M., J. Heritage, and D.J. McCance, *Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues*. J Infect Dis, 1983. **147**(4): p. 676-84.
31. Kean, J.M., et al., *Seroepidemiology of human polyomaviruses*. PLoS Pathog, 2009. **5**(3): p. e1000363.
32. Nicol, J.T.J., et al., *Seroprevalence of human malawi polyomavirus*. Journal of Clinical Microbiology, 2014. **52**: p. 321-323.
33. Viscidi, R.P., et al., *Age-specific seroprevalence of merkel cell polyomavirus, BK virus, and JC virus*. Clinical and Vaccine Immunology, 2011. **18**: p. 1737-1743.
34. Tooze, J., *DNA tumor viruses*. . 2nd ed. 1981, NY: Cold Spring Harbor Laboratories Press: Cold Spring Harbor. 958.
35. Liddington, R.C., et al., *Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution*. Nature, 1991. **354**: p. 278-284.
36. Stehle, T., et al., *The structure of simian virus 40 refined at 3.1 A resolution*. Structure (London, England : 1993), 1996. **4**: p. 165-182.
37. Zerrahn, J., et al., *Independent expression of the transforming amino-terminal domain of SV40 large T antigen from an alternatively spliced third SV40 early mRNA*. EMBO J, 1993. **12**(12): p. 4739-46.
38. Trowbridge, P.W. and R.J. Frisque, *Identification of three new JC virus proteins generated by alternative splicing of the early viral mRNA*. Journal of neurovirology, 1995. **1**: p. 195-206.
39. Kim, H.Y., B.Y. Ahn, and Y. Cho, *Structural basis for the inactivation of retinoblastoma tumor suppressor by SV40 large T antigen*. The EMBO journal, 2001. **20**: p. 295-304.

40. Luo, X., et al., *Solution structure of the origin DNA-binding domain of SV40 T-antigen*. Nature structural biology, 1996. **3**: p. 1034-9.
41. Cole, C.N., et al., *Properties of the simian virus 40 (SV40) large T antigens encoded by SV40 mutants with deletions in gene A*. Journal of virology, 1986. **57**: p. 539-546.
42. Li, D., et al., *Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen*. Nature, 2003. **423**: p. 512-8.
43. Paucha, E., et al., *Simian virus 40 origin DNA-binding domain on large T antigen*. Journal of virology, 1986. **57**: p. 50-64.
44. Simmons, D.T., *DNA-binding region of the simian virus 40 tumor antigen*. Journal of virology, 1986. **57**: p. 776-785.
45. Li, P.P., et al., *Importance of Vp1 Calcium-Binding Residues in Assembly, Cell Entry, and Nuclear Entry of Simian Virus 40*. Journal of Virology, 2003. **77**(13): p. 7527-7538.
46. Nakanishi, A., et al., *Interaction of the Vp3 Nuclear Localization Signal with the Importin 2/ Heterodimer Directs Nuclear Entry of Infecting Simian Virus 40*. Journal of Virology, 2002. **76**(18): p. 9368-9377.
47. Gerits, N. and U. Moens, *Agnoprotein of mammalian polyomaviruses*. Virology, 2012. **432**(2): p. 316-26.
48. Khalili, K., et al., *The agnoprotein of polyomaviruses: A multifunctional auxiliary protein*, in *Journal of Cellular Physiology*. 2005. p. 1-7.
49. Breau, W.C., W.J. Atwood, and L.C. Norkin, *Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor*. Journal of virology, 1992. **66**: p. 2037-2045.
50. Tsai, B., et al., *Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40*. EMBO Journal, 2003. **22**: p. 4346-4355.
51. Kuksin, D. and L.C. Norkin, *Disassembly of Simian Virus 40 during Passage through the Endoplasmic Reticulum and in the Cytoplasm*, in *Journal of Virology*. 2012. p. 1555-1562.
52. Nakanishi, A., et al., *Identification of amino acid residues within simian virus 40 capsid proteins Vp1, Vp2, and Vp3 that are required for their interaction and for viral infection*. Journal of virology, 2006. **80**: p. 8891-8898.
53. Ashok, A. and W.J. Atwood, *Contrasting Roles of Endosomal pH and the Cytoskeleton in Infection of Human Glial Cells by JC Virus and Simian Virus 40*. Journal of Virology, 2003. **77**(2): p. 1347-1356.
54. Pho, M.T., A. Ashok, and W.J. Atwood, *JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis*. Journal of virology, 2000. **74**: p. 2288-2292.
55. Qu, Q., et al., *Nuclear entry mechanism of the human polyomavirus JC virus-like particle: Role of importins and the nuclear pore complex*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**: p. 27735-27742.
56. Chellappan, S., et al., *Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**: p. 4549-4553.
57. Wolf, D.A., et al., *A complex between E2F and the pRb-related protein p130 is specifically targeted by the simian virus 40 large T antigen during cell transformation*. Oncogene, 1995. **10**: p. 2067-78.

58. Zalvide, J., H. Stubdal, and J.A. DeCaprio, *The J domain of simian virus 40 large T antigen is required to functionally inactivate RB family proteins*. Molecular and cellular biology, 1998. **18**: p. 1408-1415.
59. Bargonetti, J., et al., *Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53*. Genes and Development, 1992. **6**: p. 1886-1898.
60. Jiang, D., et al., *SV40 T antigen abrogates p53-mediated transcriptional activity*. Oncogene, 1993. **8**: p. 2805-2812.
61. Skoczylas, C., K.K.M. Fahrbach, and K. Rundell, *Cellular targets of the SV40 small-t antigen in human cell transformation*. Cell Cycle, 2004. **3**: p. 606-610.
62. Boyapati, A., et al., *SV40 17KT antigen complements dnaj mutations in large T antigen to restore transformation of primary human fibroblasts*. Virology, 2003. **315**(1): p. 148-158.
63. Courtneidge, S.A. and A. Heber, *An 81 kd protein complexed with middle T antigen and pp60c-src: a possible phosphatidylinositol kinase*. Cell, 1987. **50**: p. 1031-7.
64. Courtneidge, S.A. and A.E. Smith, *Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene*. Nature, 1983. **303**: p. 435-9.
65. Dilworth, S.M., et al., *Transformation by polyoma virus middle T-antigen involves the binding and tyrosine phosphorylation of Shc*. Nature, 1994. **367**: p. 87-90.
66. Kaplan, D.R., et al., *Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 kd phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity*. Cell, 1987. **50**: p. 1021-9.
67. Whitman, M., et al., *Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation*. Nature, 1985. **315**: p. 239-42.
68. Cegielska, A., et al., *T-antigen kinase inhibits simian virus 40 DNA replication by phosphorylation of intact T antigen on serines 120 and 123*. J Virol, 1994. **68**(1): p. 269-75.
69. Simmons, D.T., *Stepwise phosphorylation of the NH2-terminal region of the simian virus 40 large T antigen*. The Journal of biological chemistry, 1984. **259**: p. 8633-40.
70. Chen, L. and M.M. Fluck, *Role of Middle T-Small T in the Lytic Cycle of Polyomavirus: Control of the Early-to-Late Transcriptional Switch and Viral DNA Replication*. Journal of Virology, 2001. **75**(18): p. 8380-8389.
71. Gruda, M.C. and J.C. Alwine, *Simian virus 40 (SV40) T-antigen transcriptional activation mediated through the Oct/SPH region of the SV40 late promoter*. J Virol, 1991. **65**(7): p. 3553-8.
72. Sullivan, C.S., et al., *SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 682-6.
73. Chang, D., et al., *The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1*. Virology, 1992. **189**: p. 821-7.
74. Delos, S.E., et al., *Expression of the polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization*. Virology, 1993. **194**: p. 393-8.
75. Forstova, J., et al., *Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus*. J Virol, 1993. **67**(3): p. 1405-13.
76. Resnick, J. and T. Shenk, *Simian virus 40 agnoprotein facilitates normal nuclear location of the major capsid polypeptide and cell-to-cell spread of virus*. J Virol, 1986. **60**(3): p. 1098-106.

77. Clayson, E.T., L.V. Brando, and R.W. Compans, *Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis*. J Virol, 1989. **63**(5): p. 2278-88.
78. Norkin, L.C. and J. Ouellette, *Cell killing by simian virus 40: variation in the pattern of lysosomal enzyme release, cellular enzyme release, and cell death during productive infection of normal and simian virus 40-transformed simian cell lines*. J Virol, 1976. **18**(1): p. 48-57.
79. Okada, Y., et al., *Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles*. EMBO Rep, 2005. **6**(5): p. 452-7.
80. Moll, I., U. Bladt, and E.G. Jung, *Distribution of Merkel cells in acute UVB erythema*. Archives of dermatological research, 1992. **284**: p. 271-4.
81. Zur Hausen, A., et al., *Early B-cell differentiation in Merkel cell carcinomas: clues to cellular ancestry*. Cancer Res, 2013. **73**(16): p. 4982-7.
82. Hughes, M.P., et al., *Merkel Cell Carcinoma: Epidemiology, Target, and Therapy*. Curr Dermatol Rep, 2014. **3**: p. 46-53.
83. Engels, E.A., et al., *Merkel cell carcinoma and HIV infection*. Lancet, 2002. **359**: p. 497-8.
84. Junquera, L., et al., *Complete spontaneous regression of Merkel cell carcinoma*. The Annals of otology, rhinology, and laryngology, 2005. **114**: p. 376-80.
85. Wooff, J.C., et al., *Complete spontaneous regression of metastatic merkel cell carcinoma: a case report and review of the literature*. The American Journal of dermatopathology, 2010. **32**: p. 614-7.
86. Agelli, M. and L.X. Clegg, *Epidemiology of primary Merkel cell carcinoma in the United States*. J Am Acad Dermatol, 2003. **49**(5): p. 832-41.
87. Albores-Saavedra, J., et al., *Merkel cell carcinoma demographics, morphology, and survival based on 3870 cases: a population based study*. Journal of cutaneous pathology, 2010. **37**: p. 20-7.
88. Becker, J.C., et al., *MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients*. The Journal of investigative dermatology, 2009. **129**: p. 248-50.
89. Fischer, N., et al., *Detection of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in Merkel cell carcinoma cell lines: cell morphology and growth phenotype do not reflect presence of the virus*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2010. **126**: p. 2133-42.
90. Foulongne, V., et al., *Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma, France*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(9): p. 1491-3.
91. Garneski, K.M., et al., *Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(1): p. 246-8.
92. Kassem, A., et al., *Frequent detection of merkel cell polyomavirus in human merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene*. Cancer Research, 2008. **68**: p. 5009-5013.
93. Sastre-Garau, X., et al., *Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis*. The Journal of pathology, 2009. **218**: p. 48-56.
94. Rodig, S.J., et al., *Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus*. Journal of Clinical Investigation, 2012. **122**: p. 4645-4653.

95. Houben, R., et al., *Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens*. Journal of virology, 2010. **84**: p. 7064-7072.
96. Katano, H., et al., *Detection of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma and Kaposi's sarcoma*. Journal of medical virology, 2009. **81**: p. 1951-8.
97. Laude, H.C., et al., *Distinct merkel cell polyomavirus molecular features in tumour and non tumour specimens from patients with merkel cell carcinoma*. PLoS Pathog, 2010. **6**(8): p. e1001076.
98. Pastrana, D.V., et al., *Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus*. PLoS Pathog, 2009. **5**(9): p. e1000578.
99. Lee, S., et al., *Identification and validation of a novel mature microRNA encoded by the Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas*. J Clin Virol, 2011. **52**(3): p. 272-5.
100. Shuda, M., et al., *Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2009. **125**: p. 1243-9.
101. Shuda, M., et al., *Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator*. Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**: p. 3623-3634.
102. Houben, R., et al., *An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2012. **130**: p. 847-56.
103. Cheng, J., et al., *Merkel cell polyomavirus large T antigen has growth-promoting and inhibitory activities*. J Virol, 2013. **87**(11): p. 6118-26.
104. Borchert, S., et al., *High-affinity Rb binding, p53 inhibition, subcellular localization, and transformation by wild-type or tumor-derived shortened Merkel cell polyomavirus large T antigens*. J Virol, 2014. **88**(6): p. 3144-60.
105. Carter, J.J., et al., *Identification of an overprinting gene in Merkel cell polyomavirus provides evolutionary insight into the birth of viral genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**: p. 12744-9.
106. Seo, G.J., C.J. Chen, and C.S. Sullivan, *Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression*. Virology, 2009. **383**: p. 183-187.
107. Schowalter, R.M. and C.B. Buck, *The Merkel cell polyomavirus minor capsid protein*. PLoS Pathog, 2013. **9**(8): p. e1003558.
108. Theiss, J., et al., *A comprehensive analysis of replicating Merkel Cell Polyomavirus genomes delineates*

the viral transcription program and suggests a role for mcv-miR-M1 in episomal

persistence. PLoS Pathog, 2015. **submitted**.

109. Babakir-Mina, M., et al., *Identification of Merkel cell polyomavirus in the lower respiratory tract of Italian patients*. Journal of medical virology, 2010. **82**: p. 505-9.
110. Foulongne, V., et al., *Merkel cell polyomavirus DNA detection in lesional and nonlesional skin from patients with Merkel cell carcinoma or other skin diseases*. The British journal of dermatology, 2010. **162**: p. 59-63.
111. Kantola, K., et al., *Merkel cell polyomavirus DNA in tumor-free tonsillar tissues and upper respiratory tract samples: implications for respiratory transmission and latency*. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2009. **45**: p. 292-5.

112. Wieland, U., et al., *Merkel cell polyomavirus DNA in persons without merkel cell carcinoma*. *Emerg Infect Dis*, 2009. **15**(9): p. 1496-8.
113. Erickson, K.D., R.L. Garcea, and B. Tsai, *Ganglioside GT1b is a putative host cell receptor for the Merkel cell polyomavirus*. *J Virol*, 2009. **83**(19): p. 10275-9.
114. Schowalter, R.M., D.V. Pastrana, and C.B. Buck, *Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry*. *PLoS Pathog*, 2011. **7**(7): p. e1002161.
115. Wang, X., et al., *Bromodomain protein Brd4 plays a key role in Merkel cell polyomavirus DNA replication*. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(11): p. e1003021.
116. Liu, X., et al., *Merkel cell polyomavirus large T antigen disrupts lysosome clustering by translocating human Vam6p from the cytoplasm to the nucleus*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. **286**: p. 17079-17090.
117. Feng, H., et al., *Cellular and viral factors regulating Merkel cell polyomavirus replication*. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e22468.
118. Diaz, J., et al., *Phosphorylation of large T antigen regulates merkel cell polyomavirus replication*. *Cancers (Basel)*, 2014. **6**(3): p. 1464-86.
119. Kwun, H.J., et al., *Merkel cell polyomavirus small T antigen controls viral replication and oncoprotein expression by targeting the cellular ubiquitin ligase SCF Fbw7*. *Cell Host and Microbe*, 2013. **14**: p. 125-135.
120. Radhakrishnan, S., et al., *JC Virus-Induced Changes in Cellular Gene Expression in Primary Human Astrocytes*. *Journal of Virology*, 2003. **77**(19): p. 10638-10644.
121. White, M.K. and K. Khalili, *Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis*. *Virology*, 2004. **324**: p. 1-16.
122. Jiang, M., et al., *Early events during BK virus entry and disassembly*. *J Virol*, 2009. **83**(3): p. 1350-8.
123. Neumann, F., et al., *Replication, gene expression and particle production by a consensus Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) genome*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e29112.
124. Negorev, D. and G.G. Maul, *Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot*. *Oncogene*, 2001. **20**: p. 7234-42.
125. Ishov, A.M., et al., *PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1*. *J Cell Biol*, 1999. **147**(2): p. 221-34.
126. Van Damme, E., et al., *A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics*. *Int J Biol Sci*, 2010. **6**(1): p. 51-67.
127. Jensen, K., C. Shiels, and P.S. Freemont, *PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif*. *Oncogene*, 2001. **20**: p. 7223-33.
128. Seeler, J.S., et al., *Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1alpha chromatin factor: role of SUMO modification*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(10): p. 3314-24.
129. Weichenhan, D., et al., *Evolution by fusion and amplification: the murine Sp100-rs gene cluster*. *Cytogenetics and cell genetics*, 1998. **80**: p. 226-31.
130. Fogal, V., et al., *Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform*. *EMBO J*, 2000. **19**(22): p. 6185-95.
131. Bernardi, R. and P.P. Pandolfi, *Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies*. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2007. **8**: p. 1006-16.

132. Li, J., W.X. Zou, and K.S. Chang, *Inhibition of Sp1 functions by its sequestration into PML nuclear bodies*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94450.
133. Everett, R.D., et al., *PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICPO*. J Virol, 2006. **80**(16): p. 7995-8005.
134. Negorev, D.G., et al., *Differential role of Sp100 isoforms in interferon-mediated repression of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein expression*. J Virol, 2006. **80**(16): p. 8019-29.
135. Everett, R.D., *DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies*. Oncogene, 2001. **20**: p. 7266-73.
136. Sivachandran, N., X. Wang, and L. Frappier, *Functions of the Epstein-Barr virus EBNA1 protein in viral reactivation and lytic infection*. J Virol, 2012. **86**(11): p. 6146-58.
137. Sivachandran, N., F. Sarkari, and L. Frappier, *Epstein-Barr nuclear antigen 1 contributes to nasopharyngeal carcinoma through disruption of PML nuclear bodies*. PLoS Pathog, 2008. **4**(10): p. e1000170.
138. Doucas, V., et al., *Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure*. Genes & development, 1996. **10**: p. 196-207.
139. Puvion-Dutilleul, F., et al., *Adenovirus infection induces rearrangements in the intranuclear distribution of the nuclear body-associated PML protein*. Experimental cell research, 1995. **218**: p. 9-16.
140. Schreiner, S., et al., *Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human adenovirus-infected cells*. J Virol, 2010. **84**(14): p. 7029-38.
141. Erickson, K.D., et al., *Virion assembly factories in the nucleus of polyomavirus-infected cells*. PLoS Pathog, 2012. **8**(4): p. e1002630.
142. Jiang, M., et al., *Functional reorganization of promyelocytic leukemia nuclear bodies during BK virus infection*. MBio, 2011. **2**(1): p. e00281-10.
143. Maul, G.G., *Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication*. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 1998. **20**: p. 660-7.
144. Tang, Q., et al., *Replication but not transcription of simian virus 40 DNA is dependent on nuclear domain 10*. J Virol, 2000. **74**(20): p. 9694-700.
145. Boichuk, S., et al., *Functional connection between Rad51 and PML in homology-directed repair*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25814.
146. Shishido-Hara, Y., et al., *Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions*. J Virol, 2004. **78**(18): p. 9890-903.
147. Gasparovic, M.L., et al., *Modulation of PML protein expression regulates JCV infection*. Virology, 2009. **390**(2): p. 279-88.
148. Kassem, A., et al., *Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene*. Cancer research, 2008. **68**: p. 5009-13.
149. Houben, R., et al., *Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens*. J Virol, 2010. **84**(14): p. 7064-72.
150. Doorbar, J., *The papillomavirus life cycle*. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2005. **32 Suppl 1**: p. S7-15.

151. Czech-Sioli, M., *Identifizierung und Charakterisierung von Merkel Zell Polyomavirus (MCPyV) Large T-Antigen interagierenden Proteinen*. 2012, University of Lübeck, Germany.
152. Beyer, W.R., et al., *Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range*. J Virol, 2002. **76**(3): p. 1488-95.
153. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
154. Brown, M., et al., *A recombinant murine retrovirus for simian virus 40 large T cDNA transforms mouse fibroblasts to anchorage-independent growth*. J Virol, 1986. **60**(1): p. 290-3.
155. Urisman, A., et al., *Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant*. PLoS pathogens, 2006. **2**: p. e25.
156. Everett, R.D., et al., *Replication of ICPO-null mutant herpes simplex virus type 1 is restricted by both PML and Sp100*. J Virol, 2008. **82**(6): p. 2661-72.
157. Michaelson, J.S. and P. Leder, *RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 345-52.
158. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
159. Ziegler, K., et al., *A rapid in vitro polyomavirus DNA replication assay*. Journal of virological methods, 2004. **122**: p. 123-7.
160. Nesper, J., et al., *A cell-free replication system for human polyomavirus JC DNA*. J Virol, 1997. **71**(10): p. 7421-8.
161. Meulmeester, E., et al., *Loss of HAUSP-mediated deubiquitination contributes to DNA damage-induced destabilization of Hdmx and Hdm2*. Mol Cell, 2005. **18**(5): p. 565-76.
162. Devenish, R.J., et al., *Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1458**(2-3): p. 428-42.
163. Borer, R.A., et al., *Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm*. Cell, 1989. **56**(3): p. 379-90.
164. Dumber, T.S., G.A. Gentry, and M.O. Olson, *Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids*. Biochemistry, 1989. **28**(24): p. 9495-501.
165. Swaminathan, V., et al., *Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(17): p. 7534-45.
166. Jung, H.J., et al., *Identification of a novel small molecule targeting UQCRB of mitochondrial complex III and its anti-angiogenic activity*. Bioorg Med Chem Lett, 2011. **21**(3): p. 1052-6.
167. Fan, P.D. and S.P. Goff, *Abl interactor 1 binds to sos and inhibits epidermal growth factor- and v-Abl-induced activation of extracellular signal-regulated kinases*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(20): p. 7591-601.
168. Tian, X., et al., *Suppression of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 expression induces inhibition of cell proliferation and tumor growth in human esophageal cancer cells*. FEBS J, 2014. **281**(12): p. 2805-19.
169. Iyengar, S. and P.J. Farnham, *KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome*. J Biol Chem, 2011. **286**(30): p. 26267-76.
170. Sowd, G.A., N.Y. Li, and E. Fanning, *ATM and ATR activities maintain replication fork integrity during SV40 chromatin replication*. PLoS Pathog, 2013. **9**(4): p. e1003283.

171. Li, C., et al., *Induction of myelogenous leukemia cells with histone deacetylase inhibitors through down-regulating the Daxx protein expression*. Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban, 2009. **29**: p. 546-50.
172. Zhao, L.Y., et al., *Adenovirus E1B 55-Kilodalton Oncoprotein Binds to Daxx and Eliminates Enhancement of p53-Dependent Transcription by Daxx*. Journal of Virology, 2003. **77**(21): p. 11809-11821.
173. Emelyanov, A.V., et al., *The interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx can result in transcriptional activation in B cells*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**: p. 11156-64.
174. Mertz, K.D., et al., *Inflammatory monocytes are a reservoir for Merkel cell polyomavirus*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(4): p. 1146-51.
175. Toung, J.M., et al., *RNA-sequence analysis of human B-cells*. Genome Res, 2011. **21**(6): p. 991-8.
176. Foulongne, V., et al., *Merkel cell polyomavirus in cutaneous swabs*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(4): p. 685-7.
177. Stanley, M.A., et al., *Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 1989. **43**: p. 672-6.
178. Meyers, C., *Organotypic (raft) epithelial tissue culture system for the differentiation-dependent replication of papillomavirus*. Methods in Cell Science, 1996. **18**: p. 201-210.
179. Bedell, M.A., et al., *Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation*. J Virol, 1991. **65**(5): p. 2254-60.
180. De Geest, K., et al., *Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines*. Gynecologic oncology, 1993. **49**: p. 303-10.
181. Acebo, E., et al., *Merkel cell carcinoma: a clinicopathological study of 11 cases*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV, 2005. **19**: p. 546-51.
182. Eispert, A.-C., et al., *Evidence for distinct populations of human Merkel cells*. Histochemistry and cell biology, 2009. **132**: p. 83-93.
183. Llombart, B., et al., *Clinicopathological and immunohistochemical analysis of 20 cases of Merkel cell carcinoma in search of prognostic markers*. Histopathology, 2005. **46**: p. 622-34.
184. Deichmann, M., et al., *Adhesion molecules CD171 (L1CAM) and CD24 are expressed by primary neuroendocrine carcinomas of the skin (Merkel cell carcinomas)*. Journal of cutaneous pathology, 2003. **30**: p. 363-8.
185. Su, L.D., et al., *CD117 (KIT receptor) expression in Merkel cell carcinoma*. The American Journal of dermatopathology, 2002. **24**: p. 289-93.
186. Hoefler, H., et al., *New immunocytochemical observations with diagnostic significance in cutaneous neuroendocrine carcinoma*. The American Journal of dermatopathology, 1984. **6**: p. 525-30.
187. Calder, K.B. and B.R. Smoller, *New insights into merkel cell carcinoma*. Advances in anatomic pathology, 2010. **17**: p. 155-61.
188. Moll, I., et al., *Differences of bcl-2 protein expression between Merkel cells and Merkel cell carcinomas*. J Cutan Pathol, 1996. **23**(2): p. 109-17.

189. Tilling, T. and I. Moll, *Which are the cells of origin in merkel cell carcinoma?* J Skin Cancer, 2012. **2012**: p. 680410.
190. Visvader, J.E., *Cells of origin in cancer.* Nature, 2011. **469**: p. 314-22.
191. Knapp, A.C. and W.W. Franke, *Spontaneous losses of control of cytokeratin gene expression in transformed, non-epithelial human cells occurring at different levels of regulation.* Cell, 1989. **59**: p. 67-79.
192. Morrison, K.M., et al., *Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage.* Dev Biol, 2009. **336**(1): p. 76-83.
193. Van Keymeulen, A., et al., *Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis.* J Cell Biol, 2009. **187**(1): p. 91-100.
194. Woo, S.-H., et al., *Identification of epidermal progenitors for the Merkel cell lineage.* Development (Cambridge, England), 2010. **137**: p. 3965-71.
195. Leendertz, F.H., et al., *African great apes are naturally infected with polyomaviruses closely related to Merkel cell polyomavirus.* J Virol, 2011. **85**(2): p. 916-24.
196. Jahn, R. and R.H. Scheller, *SNAREs--engines for membrane fusion.* Nature reviews. Molecular cell biology, 2006. **7**: p. 631-43.
197. Johannessen, M., et al., *BKV agnoprotein interacts with alpha-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein, and negatively influences transport of VSVG-EGFP.* PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24489.
198. Carswell, S. and J.C. Alwine, *Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localization of VP1, the major capsid protein.* J Virol, 1986. **60**(3): p. 1055-61.
199. Sariyer, I.K., et al., *Phosphorylation mutants of JC virus agnoprotein are unable to sustain the viral infection cycle.* J Virol, 2006. **80**(8): p. 3893-903.
200. Suzuki, T., et al., *The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin.* PLoS Pathog, 2010. **6**(3): p. e1000801.
201. Moens, U., M. Ludvigsen, and M. Van Ghelue, *Human polyomaviruses in skin diseases.* Patholog Res Int, 2011. **2011**: p. 123491.
202. Everett, R.D. and M.K. Chelbi-Alix, *PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence.* Biochimie, 2007. **89**(6-7): p. 819-30.
203. Geoffroy, M.-C. and M.K. Chelbi-Alix, *Role of promyelocytic leukemia protein in host antiviral defense.* Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 2011. **31**: p. 145-58.
204. Full, F., et al., *Herpesvirus saimiri antagonizes nuclear domain 10-instituted intrinsic immunity via an ORF3-mediated selective degradation of cellular protein Sp100.* J Virol, 2012. **86**(7): p. 3541-53.
205. Dellaire, G. and D.P. Bazett-Jones, *PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress.* Bioessays, 2004. **26**(9): p. 963-77.
206. Eskiw, C.H., et al., *Size, position and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly.* J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 21): p. 4455-66.
207. Everett, R.D., et al., *Herpes simplex virus type 1 genomes are associated with ND10 nuclear substructures in quiescently infected human fibroblasts.* J Virol, 2007. **81**(20): p. 10991-1004.
208. Adamson, A.L. and S. Kenney, *Epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies.* J Virol, 2001. **75**(5): p. 2388-99.

209. Muller, S. and A. Dejean, *Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption*. J Virol, 1999. **73**(6): p. 5137-43.
210. Berscheminski, J., et al., *Sp100 isoform-specific regulation of human adenovirus 5 gene expression*. J Virol, 2014. **88**(11): p. 6076-92.

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1: Phylogenetischer Baum zum Verwandtschaftsgrad der humanen Polyomaviren sowie nah verwandte Polyomaviren.....	11
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung zum Aufbau und Genom von SV40.	13
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Funktionen des LT- und sT-Antigens von SV40..	15
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Polyomaviren anhand von SV40.....	18
Abbildung 2.5: Lokalrezidiv eines Merkelzellkzinoms.....	19
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des <i>in vitro</i> Replikationssystem.	26
Abbildung 2.7: A) H1299 Zellen, in denen PML mittels Immunfluoreszenz detektiert wurde. B) Aufbau von PML-NB. Das Gerüst aus PML und Sp100 wird über Sumoylierungen und SIM-Motive sowie Multimere der Proteine zusammengehalten.	28
Abbildung 5.1: Replikation des MCPyV-Genoms in PFSK-1, H1299 und 293 Zellen.....	69
Abbildung 5.2: Replikation des MCPyV in verschiedenen Zelllinien.....	72
Abbildung 5.3: Einfluss des MCPyV VP1 und SV40 LT auf die Replikation des MCPyV.	74
Abbildung 5.4: Einfluss des MPyV Kapsidproteine VP2 und VP3 auf die Replikation des MCPyV.	76
Abbildung 5.5: Die Replikation des cMCPyV induziert eine Strukturänderung der PML-NB. .	81
Abbildung 5.6: Struktur der PML-NB während der MCPyV Replikation.....	82
Abbildung 5.7: Veränderung der Anzahl und Volumina der PML- und Sp100 Strukturen während der Replikation des MCPyV.....	83
Abbildung 5.8: Veränderung der Anzahl und Volumina der PML- und Sp100- Strukturen in PFSK-1 Zellen während der MCPyV Replikation.....	84
Abbildung 5.9: MCPyV LT-Antigen lokalisiert in Replikationszentren des MCPyV.	85
Abbildung 5.10: Expression von PML, Sp100 und Daxx in H1299 und PFSK-1 Zellen nach Behandlung der Zellen mit shRNAs gegen PML, Sp100 und Daxx sowie GFP als Kontrolle.....	86
Abbildung 5.11: Proliferation der PFSK-1 und H1299 Zellen, in denen PML, Sp100 und Daxx herunterreguliert wurden.	87

Abbildung 5.12: Replikation des cMCPyV in H1299 Zellen, die shRNAs gegen PML, Sp100, Daxx und GFP als Kontrolle synthetisieren.	88
Abbildung 5.13: Replikation des cMCPyV in PFSK-1 Zellen, die shRNAs gegen PML, Daxx und Sp100 synthetisieren.	89
Abbildung 5.14: MCPyV VP1 und LT-Antigen Transkripte im <i>in vitro</i> Replikationsversuch.	90
Abbildung 5.15: PML ko-präzipitiert nicht mit dem MCPyV LT _{WT} -Antigen.	92
Abbildung 5.16: Expression von endogenem PML, Sp100 und Daxx in Abhängigkeit vom YFP-MCPyV LT-Antigen (LT-Ag).	93
Abbildung 5.17: PML-NB zeigen keine morphologische Veränderung bei Überexpression des MCPyV LT-Antigens.	95
Abbildung 5.18: Die Anzahl und Volumen der PML-NB verändern sich nicht bei der Überexpression von MCPyV LT-Antigen in H1299 Zellen.	96
Abbildung 5.19: Anzahl und Größe der PML-NB bleibt unverändert bei der Überexpression von MCPyV LT-Antigen in PFSK-1 Zellen.	96
Abbildung 5.20: Induktion der viralen Replikation durch das YFP-MCPyVLT-Antigen.	97
Abbildung 5.21: Das YFP-MCPyV LT-Antigen lokalisiert nicht in Replikationszentren in Anwesenheit des MCPyV oris.	99
Abbildung 5.22: Lokalisierung des YFP-MCPyV LT-Antigens während der Replikation des cMCPyV.	100
Abbildung 10.1: Einfluss des MCPyV VP1 und SV40 LT auf die Replikation des MCPyV.	130
Abbildung 10.2: Die virale DNA Replikation des cMCPyV induziert eine Veränderung der Sp100-Strukturen.	131
Abbildung 10.3: Veränderung der Daxx-Strukturen durch die cMCPyV Replikation.	132
Abbildung 10.4: Strukturveränderung der PML-NB in PFSK-1 Zellen induziert durch die cMCPyV Replikation.	133
Abbildung 10.5: Die virale DNA Replikation induziert eine Veränderung der Sp100-Strukturen in PFSK-1 Zellen.	134
Abbildung 10.6: Expression von PML, Sp100 bzw. Daxx ist verringert in H1299 Zellen, die infiziert wurden mit Lentiviren, die eine shRNA gegen die entsprechenden Protein synthetisieren.	135
Abbildung 10.7: YFP-MCPyV LT-Antigen induziert keine Veränderung der Sp100-Strukturen.	136

Abbildung 10.8: PML-NB zeigen keine Strukturveränderungen durch die Expression des YFP-MCPyV LT-Antigens in PFSK-1 Zellen..... 137

Abbildung 10.9: Durch YFP-MCPyV LT-Antigen werden Sp100-Strukturen in PFSK-1 Zellen strukturell nicht verändert. 138

9. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Seroprevalenzen der ersten neun humanen Polyomaviren.	12
Tabelle 2.2: Zelllinien, die hinsichtlich der Unterstützung der viralen Replikation des MCPyV untersucht wurden.	27
Tabelle 3.1: In dieser Arbeit verwendeten Primer mit der entsprechenden Bezeichnung und Sequenz in 5'-3' Richtung.	39
Tabelle 4.1: Angaben zu den DNA-Menge, die zur Transfektion eingesetzt wurden.	54
Tabelle 5.1: Übersicht der in dieser Arbeit neu untersuchten Zelllinien.	71
Tabelle 5.3: Übersicht der in PML-NB lokalisierenden Proteine.	79

10. ANHANG

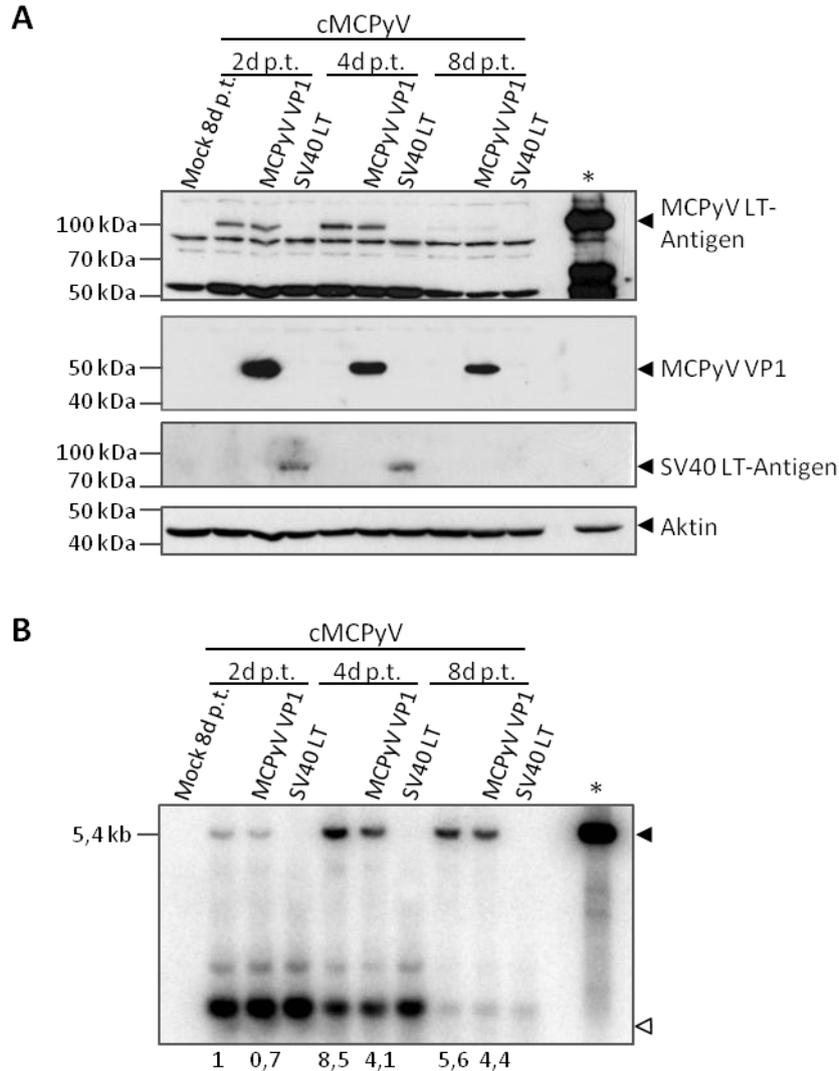


Abbildung 10.1: Einfluss des MCPyV VP1 und SV40 LT auf die Replikation des MCPyV. 293 Zellen wurden mit dem cMCPyV-Genom und Expressionsplasmiden für das MCPyV VP1 bzw. SV40 LT transfiziert. A) Im Zeitverlauf von 2, 4 und 8 Tagen nach Transfektion (d p.t.) wurden Proteinextrakte hergestellt und auf LT und VP1 Expression untersucht. Dazu wurden im Immunblot 25µg der Proteine aufgetragen und eine Positivkontrolle für das MCPyV LT-Antigen (*). B) Zu den gleichen Zeitpunkten wurde niedermolekulare DNA isoliert und davon 4,5 µg mittels Southern Blot analysiert. Als Positivkontrolle wurden 100 ng SacI verdautes pMK-MCVSyn eingesetzt. Gezeigt ist der Film nach vierstündiger Expositionszeit. Der gefüllte Pfeil im Southern Blot markiert die Höhe der neu replizierten viralen DNA, die unausgefüllten Pfeile die DpnI- verdaute transfizierte DNA.

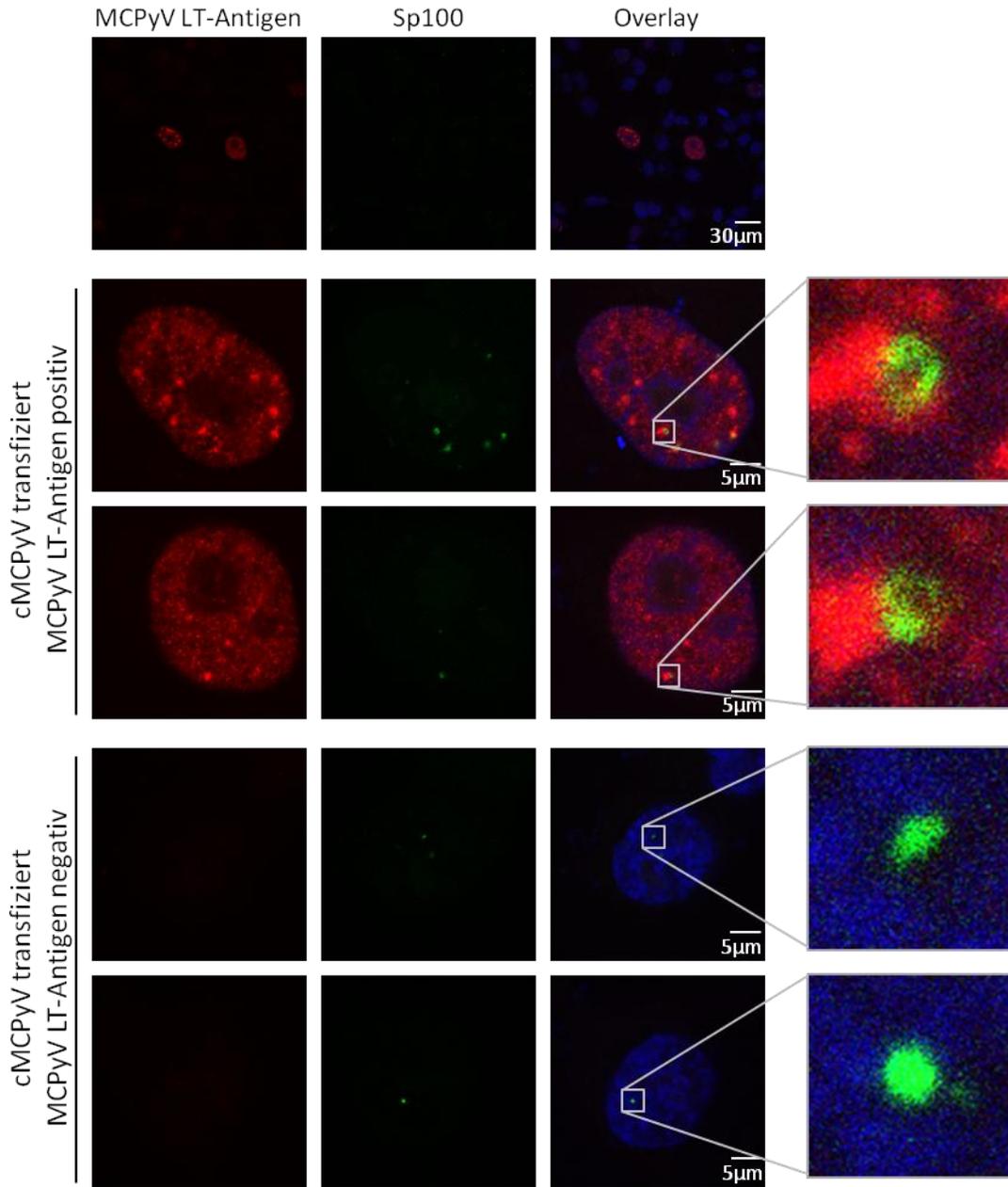


Abbildung 10.2: Die virale DNA Replikation des cMCPyV induziert eine Veränderung der Sp100-Strukturen. In H1299 wurden mit cMCPyV transfiziert und 4d p.t. mittels Immunfluoreszenztest hinsichtlich der Lokalisierung von MCPyV LT-Antigen und Sp100 analysiert. Dazu wurden Aufnahmen mit einem konfokalen Laserscan Mikroskop gemacht.

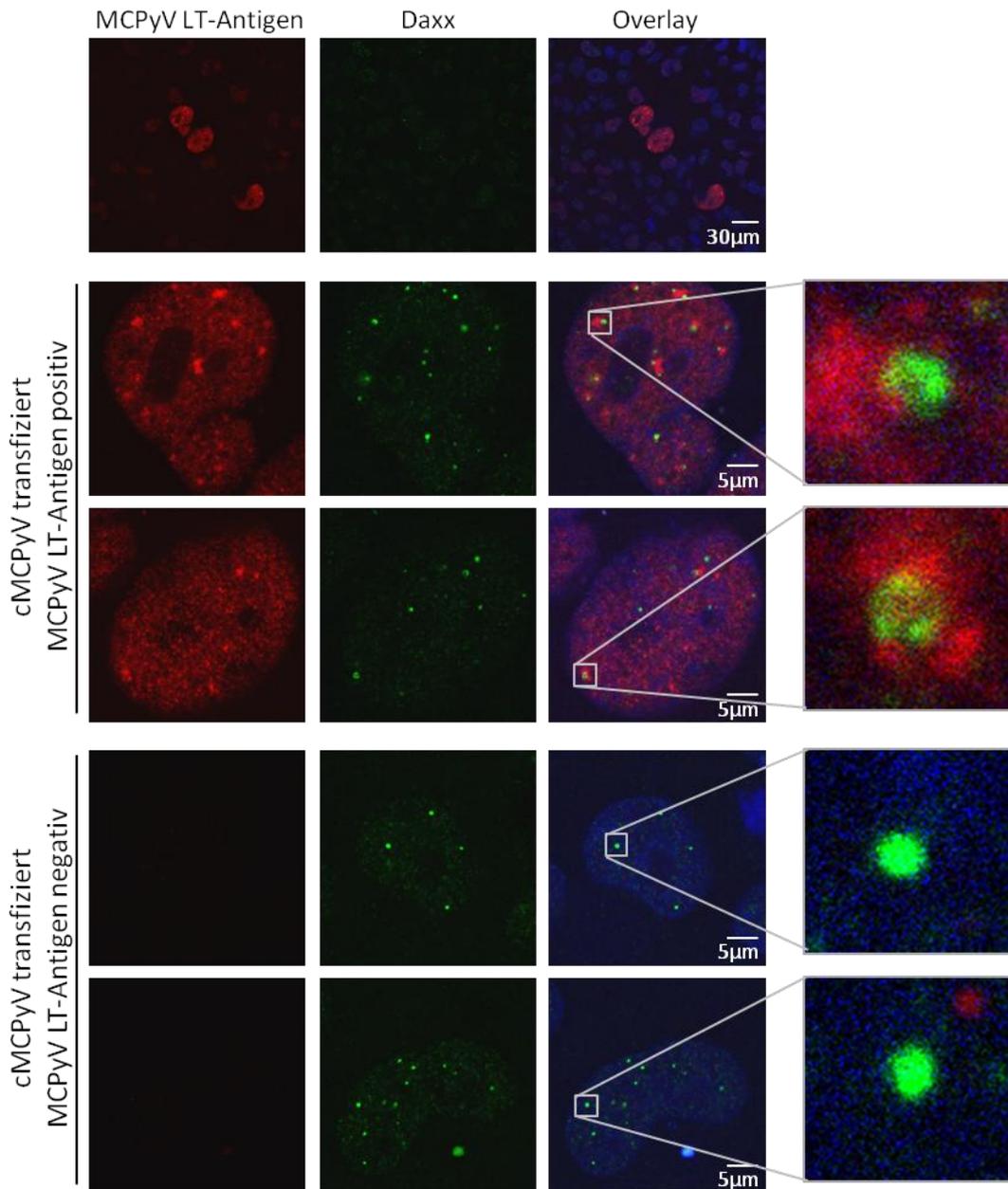


Abbildung 10.3: Veränderung der Daxx-Strukturen durch die cMCPyV Replikation. Der Replikationsversuch wurde in H1299 mit cMCPyV durchgeführt. 4d p.t. wurde mittels Immunfluoreszenztest die Lokalisierung von MCPyV LT-Antigen sowie Daxx analysiert, dazu wurden Aufnahmen mit einem konfokalen Laserscan Mikroskop gemacht.

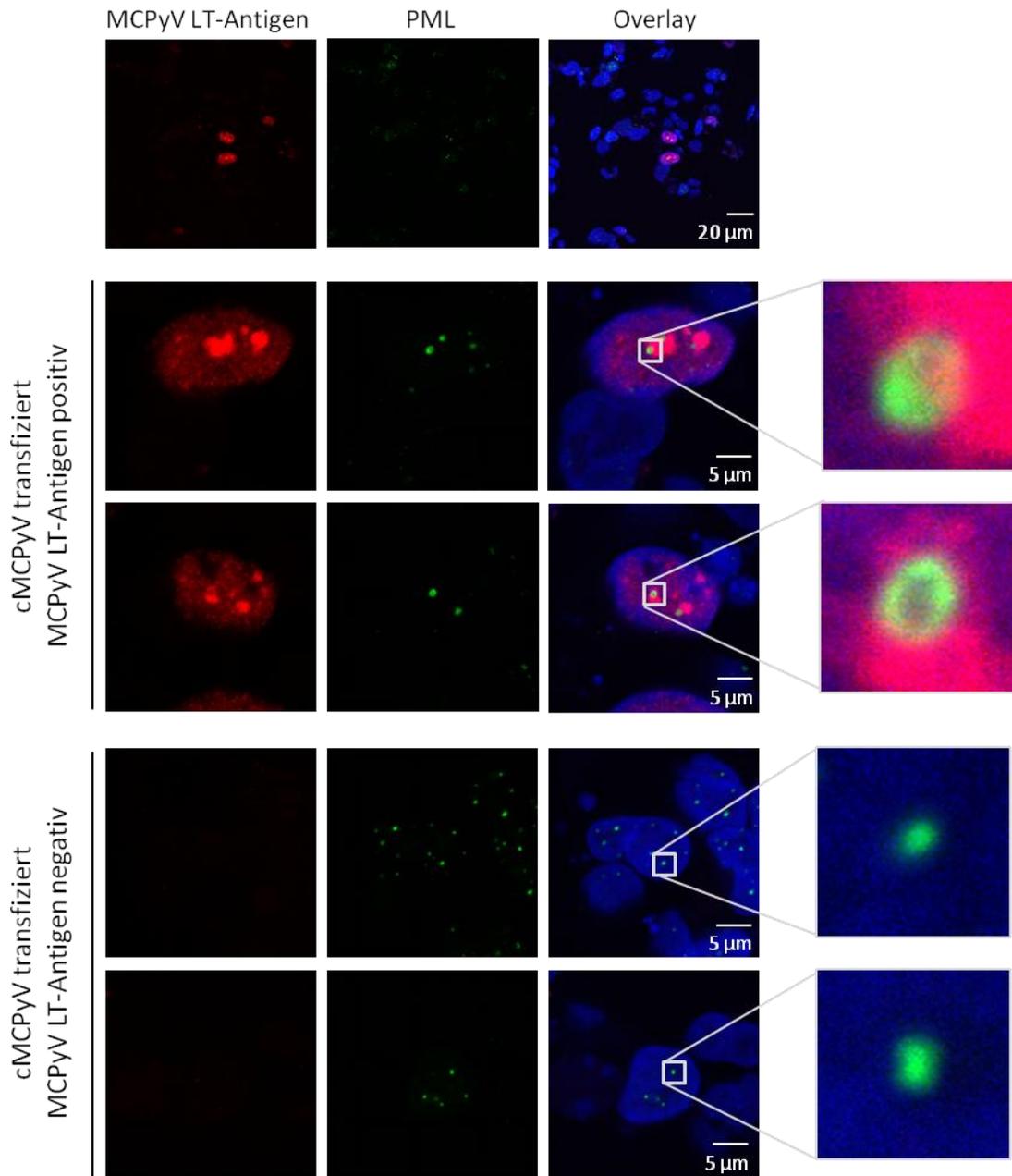


Abbildung 10.4: Strukturveränderung der PML-NB in PFSK-1 Zellen induziert durch die cMCPyV Replikation. PFSK-1 Zellen wurden mit cMCPyV transfiziert und 4d p.t. mittels Immunfluoreszenztest analysiert. Dazu wurden MCPyV LT-Antigen sowie PML angefärbt und Bilder mit einem konfokalen Laserscan Mikroskop aufgenommen.

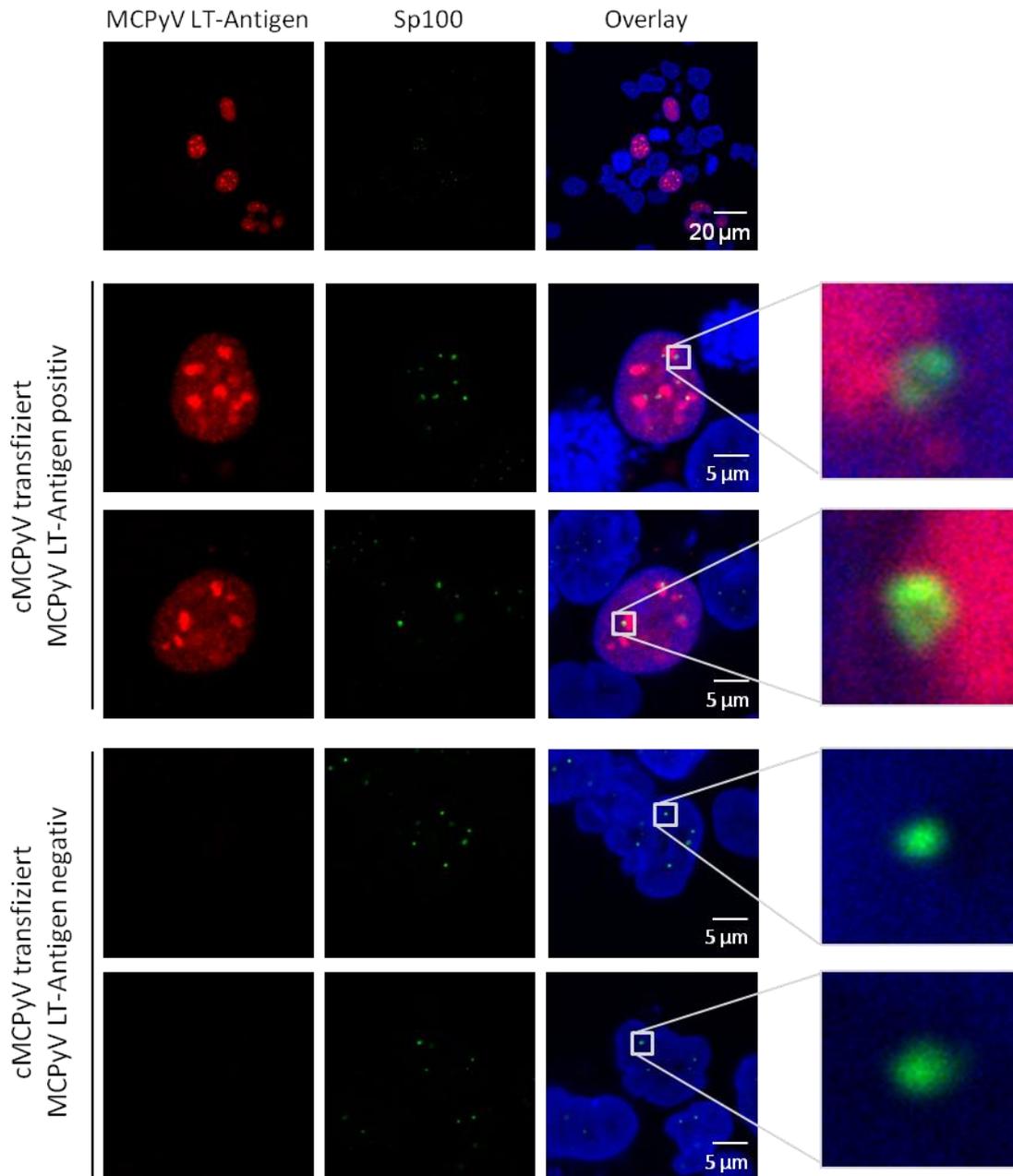


Abbildung 10.5: Die virale DNA Replikation induziert eine Veränderung der Sp100-Strukturen in PFSK-1 Zellen. Der Replikationsversuch wurde in PFSK-1 Zellen mit cMCPyV durchgeführt. 4d p.t. wurde mittels Immunfluoreszenztest die Lokalisierung von MCPyV LT-Antigen sowie Sp100 analysiert. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscan Mikroskop aufgenommen.

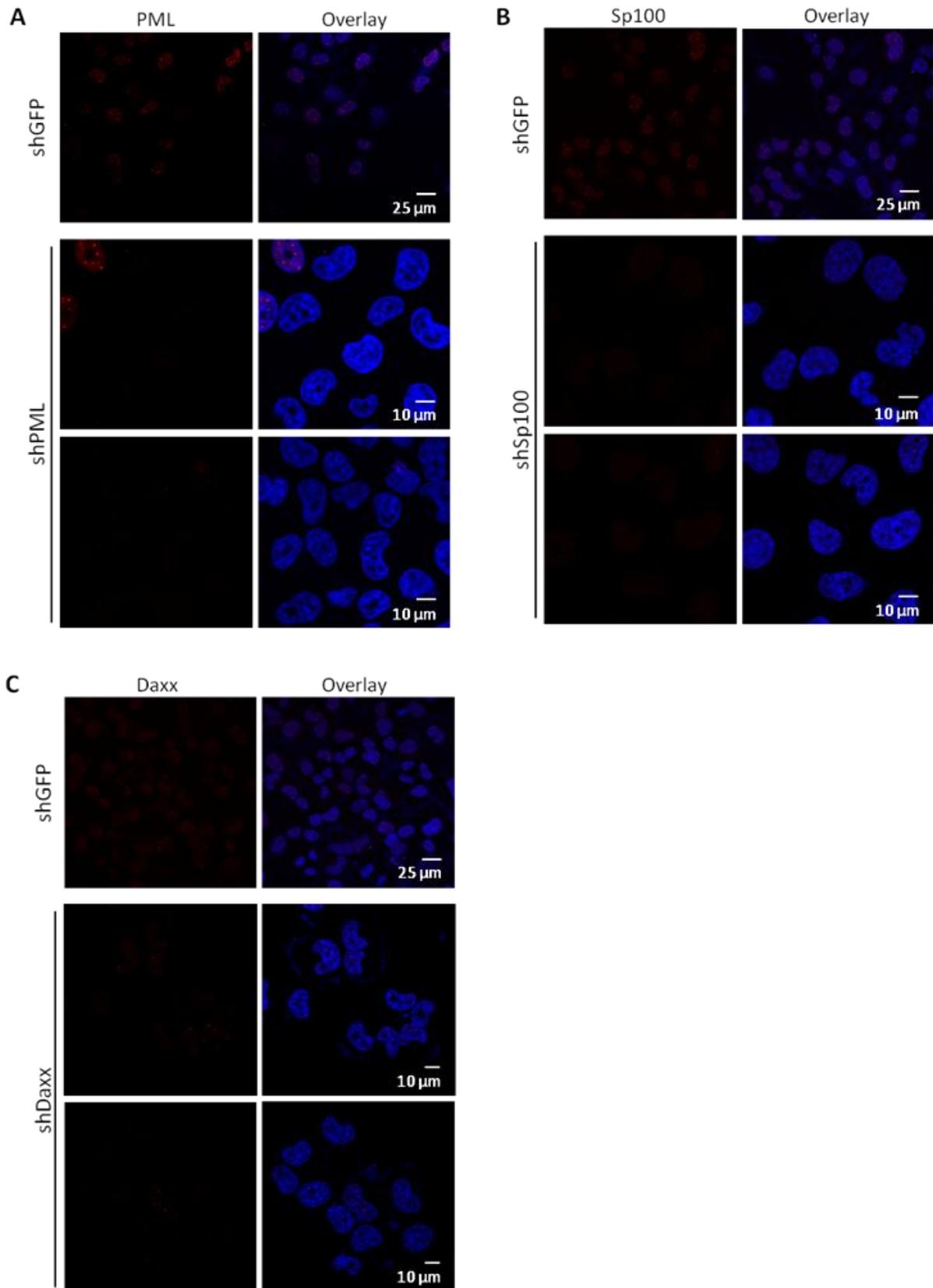


Abbildung 10.6: Expression von PML, Sp100 bzw. Daxx ist verringert in H1299 Zellen, die infiziert wurden mit Lentiviren, die eine shRNA gegen die entsprechenden Protein synthetisieren. Die H1299 Zellen wurden auf Coverslips ausgesät und einen Tag später mittels Immunfluoreszenztest hinsichtlich der Expression von PML (A), Sp100 (B) und Daxx (C) analysiert.

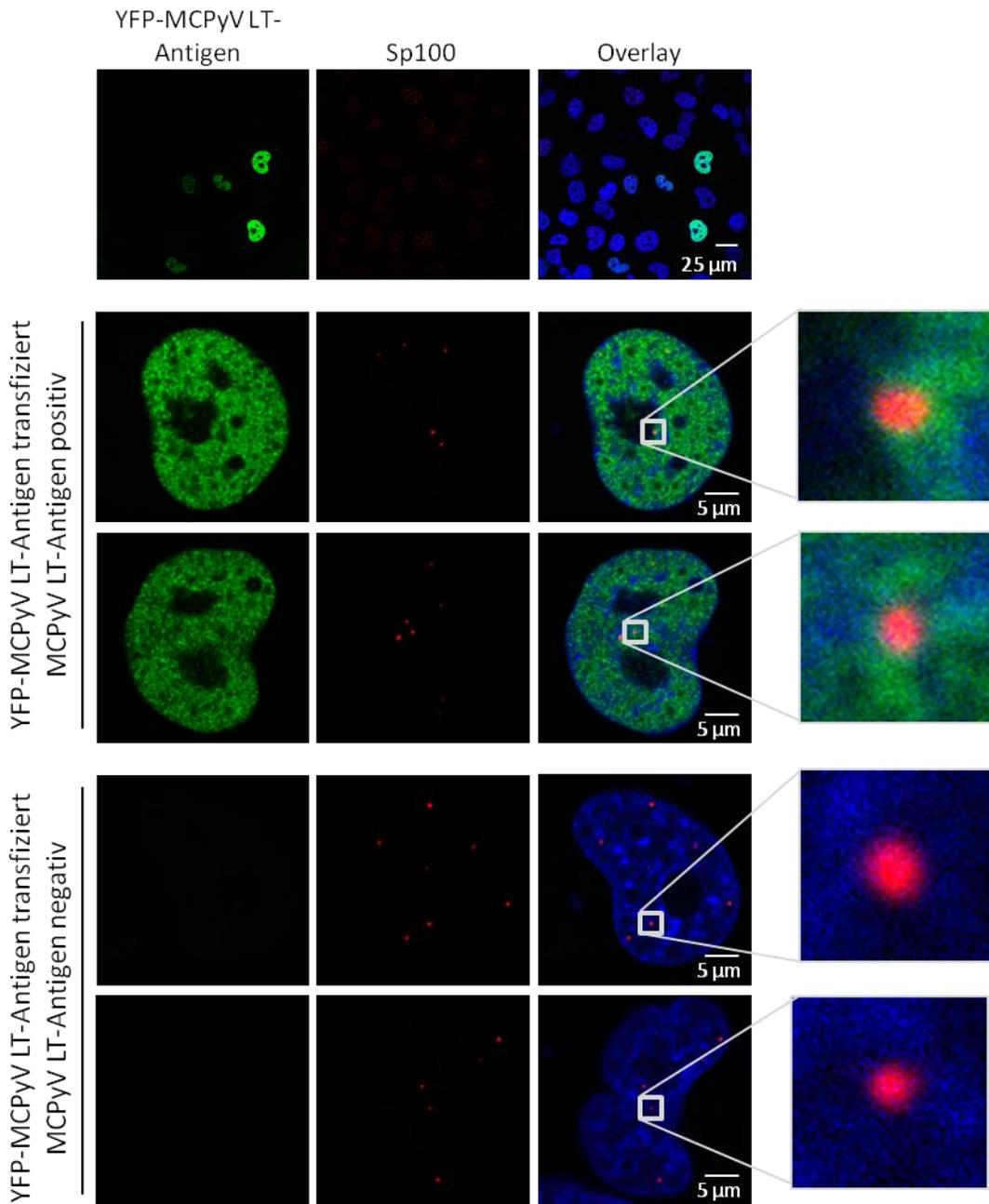


Abbildung 10.7: YFP-MCPyV LT-Antigen induziert keine Veränderung der Sp100-Strukturen. H1299 Zellen wurden mit dem YFP-MCPyV LT-Antigen transfiziert und 2 Tage nach Transfektion im Immunfluoreszenztest analysiert. Dazu wurde PML über spezifische Antikörper und das MCPyV LT-Antigen über die YFP Fusionierung detektiert und mittels konfokaler Laserscan Mikroskopie aufgenommen.

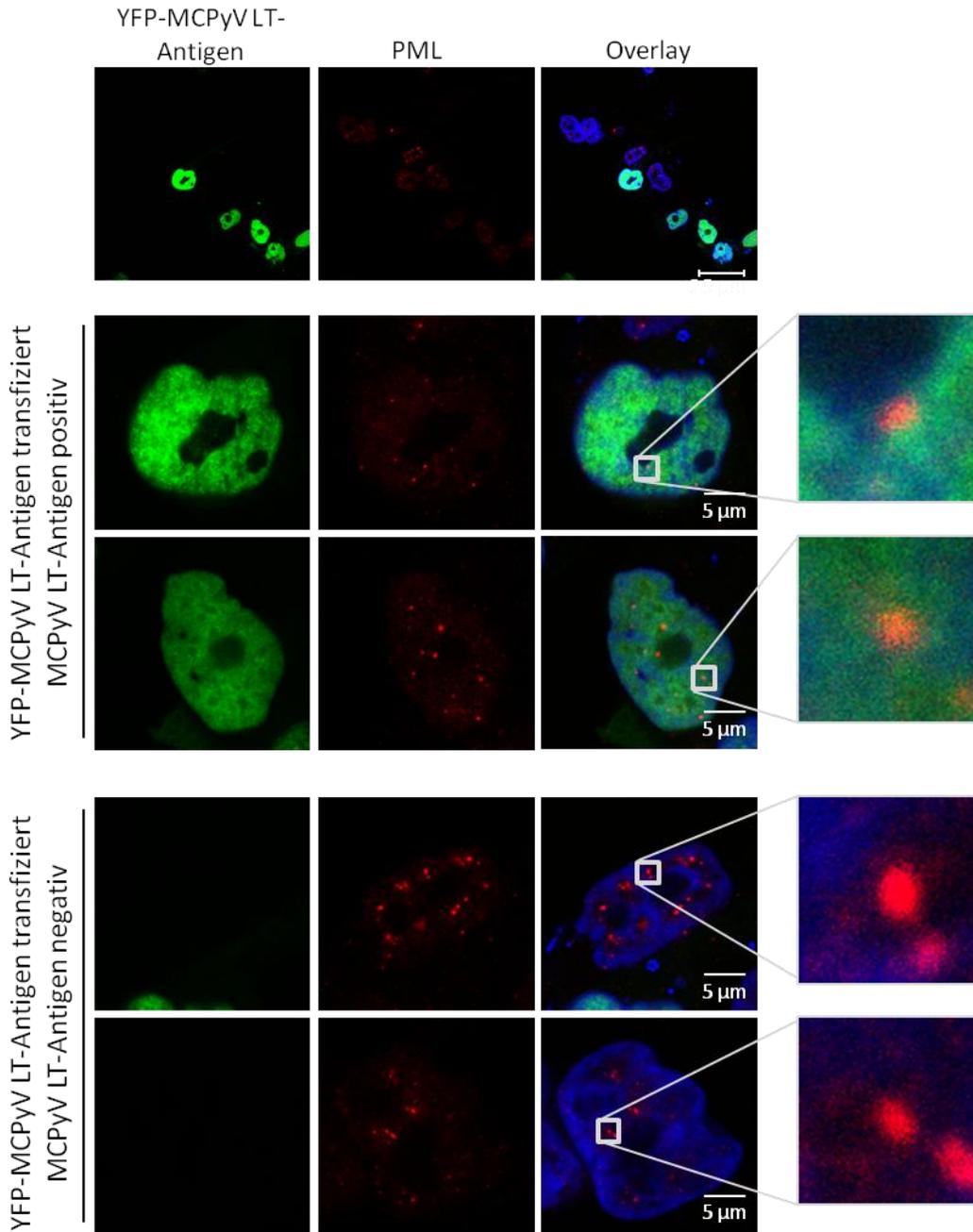


Abbildung 10.8: PML-NB zeigen keine Strukturveränderungen durch die Expression des YFP-MCPyV LT-Antigens in PFSK-1 Zellen. PFSK-1 Zellen wurden mit dem YFP-MCPyV LT-Antigen transfiziert. 2 Tage nach Transfektion wurden sie hinsichtlich der Lokalisation von dem LT-Antigen und PML, welches über spezifische Antikörper detektiert wurde, analysiert. Die Bilder wurden konfokaler Laserscan Mikroskopie aufgenommen.

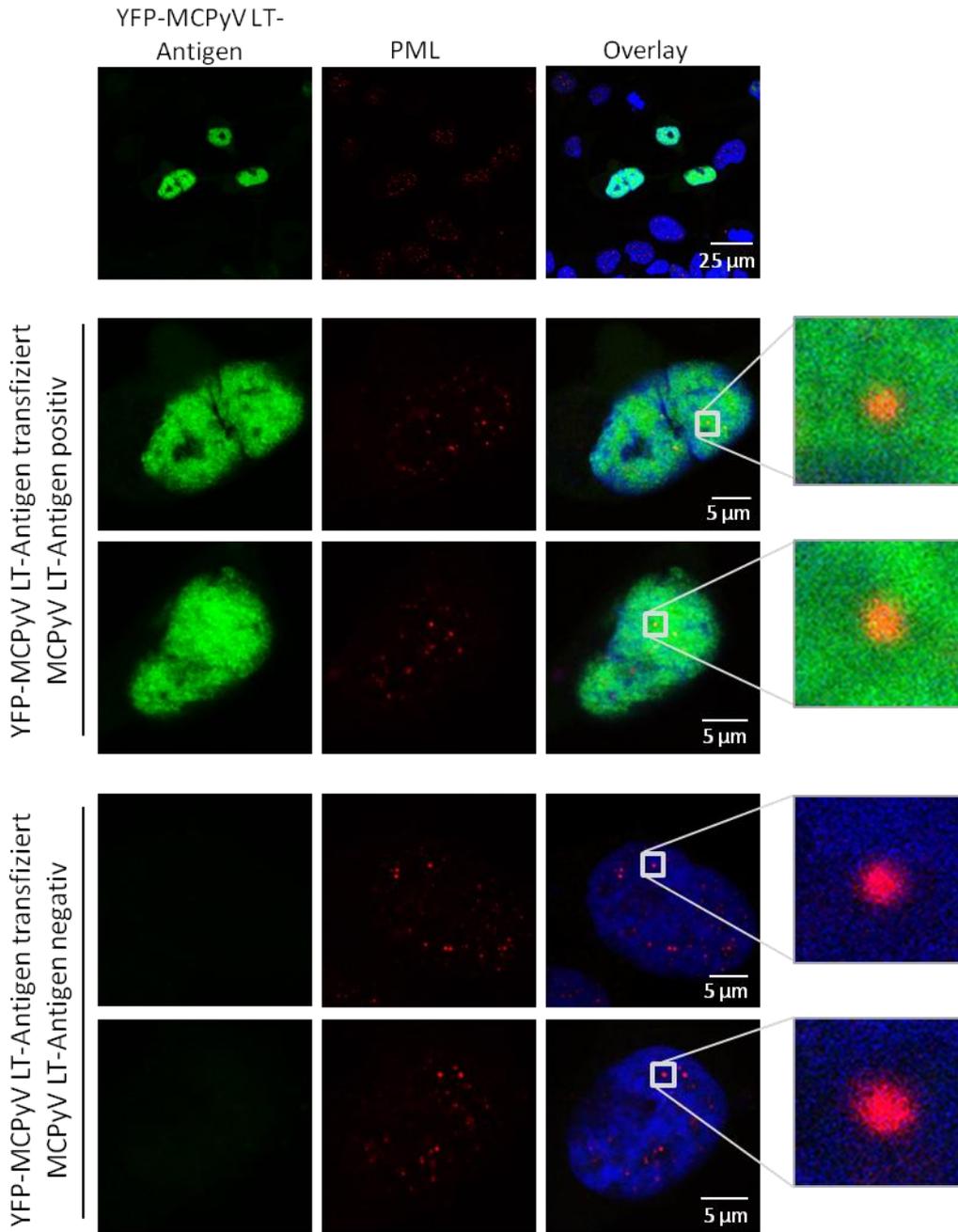


Abbildung 10.9: Durch YFP-MCPyV LT-Antigen werden Sp100-Strukturen in PFSK-1 Zellen strukturell nicht verändert. PFSK-1 Zellen wurden mit dem YFP-MCPyV LT-Antigen transfiziert und 2 Tage nach Transfektion im Immunfluoreszenztest analysiert. Die Lokalisierung von SP100 wurde über eine spezifische Antikörperfärbung detektiert und das LT-Antigen über die YFP- Fusionierung. Die Bilder wurden mittels konfokaler Laserscan Mikroskopie aufgenommen.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internet-Quellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde.

Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Hamburg, den 05.06.2015

Friederike Neumann

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Nicole Fischer für die Bereitstellung dieses Themas und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Eppendorf durchführen zu können. Ich danke Ihr besonders für die intensive Betreuung und fachliche Unterstützung, die sehr zum Gelingen beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner bedanke ich mich vielmals für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen sowie für die Übernahme des Disputationsgutachtens.

Ich bedanke mich auch bei Frau Prof. Dr. Julia Kehr für den Vorsitz der Prüfungskommission und bei allen Fragestellern.

Ferner gilt mein Dank auch der gesamten Arbeitsgruppen Fischer, Ruckdeschel und Grundhoff für die Hilfe und Unterstützung bei allen praktischen und theoretischen Fragen, sowie bei den gegebenen Denkanstößen, die in unseren Teammeetings entstanden sind. Besonders erwähnen möchte ich Manja Czech-Sioli, Juliane Theiss, Claudia Schmidt, Svenja Siebels und Thomas Günther.

Vielmals bedanken möchte ich mich dabei auch bei Manja und Svenja für das Korrekturlesen.

Großer Dank gebührt auch meinen Eltern, meiner Oma und Freunden, die mich während des gesamten Studiums in allen Lebenslagen unterstütz und auch für die nötige Ablenkung neben der Doktorarbeit gesorgt haben. Vor allem bedanken möchte ich mich auch bei meinem Bruder Max und Kathrin, die mir besonders im letzten Jahr beiseite standen. Und auch hier gilt mein Dank nochmal Marc Wilth, ohne den ich letztendlich gar nicht soweit gekommen wäre.