Einfluss der Ubiquitin spezifischen Protease 7 auf den Lebenszyklus des Merkel Zell Polyomavirus

Dissertation

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

vorgelegt von

Manja Czech-Sioli
aus Eckernförde

Hamburg, 2017

Gutachter der Dissertation:

1. Prof. Dr. Nicole Fischer
2. Prof. Dr. Thomas Dobner

Datum der Disputation: 21.04.2017

Vorsitzender der Disputation:

Prof. Dr. Stefan Hoth

Gutachter der Disputation:

1. Prof. Dr. Thomas Dobner
2. Prof. Dr. Adam Grundhoff

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **7**

1 Zusammenfassung **11**

2 Einleitung **14**
2.1 Polyomaviren . . . 14
2.1.1 Humane Polyomaviren . . . 14
2.1.2 Die Genomorganisation der Polyomaviren . . . 15
2.1.3 Der Lebenszyklus der Polyomaviren . . . 17
2.1.4 Die Tumorgenese durch Polyomaviren . . . 19
2.2 Das Merkel Zell Polyomavirus (MCPyV) . . . 21
2.2.1 Das Merkel Zell Karzinom (MCC) . . . 22
2.2.2 Die Replikation des MCPyV . . . 23
2.2.3 Die Tumorgenese durch das MCPyV . . . 27
2.2.4 Entdeckung neuer zellulärer Interaktionspartner der MCPyV T-Antigene . . . 30
2.3 Die Ubiquitin spezifische Protease 7 (Usp7) . . . 31
2.3.1 Zelluläre Interaktionspartner von Usp7 . . . 33
2.3.2 Virale Interaktionspartner von Usp7 . . . 34
2.4 Ziel dieser Arbeit . . . 35

3 Material **37**
3.1 Geräte . . . 37
3.2 Chemikalien . . . 38
3.3 Labormaterial und Zellkulturmaterial . . . 38
3.4 Reagenzien und Laborhilfsmittel . . . 38
3.5 Lösungen und Puffer . . . 41
3.5.1 Allgemeine Lösungen und Puffer . . . 41
3.5.2 Reagenzien für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und den Westernblot . . . 42
3.5.3 Puffersysteme für die Immunpräzipitation von Proteinen aus Zellen. . . . 44
3.5.4 Puffersysteme für die Proteinaufreinigung . . . 45
3.5.5 Puffer für die Herstellung kompetenter Bakterien . . . 49
3.5.6 Puffer für den *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) . . . 49
3.6 Reagenzsysteme . . . 50
3.7 Bakterienstämme . . . 51
3.8 Zelllinien . . . 51
3.9 Medien . . . 52

3.9.1 Medien für die Bakterienkultur . . . 52
3.9.2 Medien und Reagenzien für die Zellkultur . . . 52
3.10 Nukleinsäuren . . . 53
3.10.1 Primer und siRNAs . . . 53
3.10.2 Expressionsvektoren . . . 55
3.11 Standardmarker . . . 59
3.12 Restriktionsendonukleasen und dazugehörige Puffer . . . 59
3.13 Antikörper . . . 60
3.14 Software . . . 61

4 Methoden **62**
4.1 Kultivierung von Bakterien . . . 62
4.2 Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen . . . 62
4.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien . . . 62
4.4 Hitzeschock-Transformation . . . 63
4.5 Nukleinsäuren-Aufreinigung . . . 63
4.5.1 Analytische Plasmidaufreinigung . . . 63
4.5.2 Präparative Plasmidaufreinigung . . . 63
4.6 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration . . . 64
4.7 Agarose-Gelelektrophorese . . . 64
4.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR) . . . 65
4.9 Restriktionsverdau von DNA . . . 65
4.10 Aufreinigung von DNA aus PCR, Agarose-Gelen und anderen Reaktionen 66
4.11 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten . . . 66
4.12 Ligation von DNA-Fragmenten . . . 66
4.13 Sequenzierung von DNA . . . 67
4.14 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . 67
4.15 Coomassie Blue Färbung von SDS-Gelen . . . 68
4.16 Silberfärbung von SDS-Gelen . . . 68
4.17 Westernblot . . . 69
4.18 Kultur von Säugerzellen . . . 70
4.19 Kultur von Insektenzellen . . . 70
4.20 MTT-Assay . . . 70
4.21 Transfektion . . . 71
4.21.1 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) . . . 71
4.21.2 Transfektion mit Lipofectamine^{TM} 2000 . . . 71
4.21.3 Transfektion mit X-tremeGENE^{TM} HP . . . 71
4.21.4 Transfektion von siRNA mit Lipofectamine^{TM} RNAiMAX . . . 72
4.22 Herstellung von Baculovirus Überständen aus Insektenzellen . . . 72
4.23 Herstellung von γ-retroviralen Überständen aus HEK293 Zellen . . . 73

4.24 Transduktion von Zellen mit γ-retroviralen Vektoren 74
4.25 Proteinaufreinigung 75
4.25.1 Expression und Aufreinigung des MCPyV His_6-LT N-Terminus . 75
4.25.2 Expression und Aufreinigung des MCPyV LT C-Terminus 75
4.25.3 Expression und Aufreinigung des MCPyV MBP-sT 75
4.25.4 Expression und Aufreinigung des GST-Usp7 Aminosäuren 1 - 1102 76
4.25.5 Expression und Aufreinigung des GST-Usp7 Aminosäuren 1 - 215, 212 - 561, 561 - 916 und 913 - 1102 77
4.26 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen 77
4.27 Bestimmung der Proteinkonzentration 78
4.28 Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen in Säugerzellen 78
4.29 GST-Pulldown 79
4.29.1 GST-Pulldown von Zelllysaten 79
4.29.2 Direkter GST-Pulldown 80
4.30 Koimmunpräzipitation 80
4.31 Immunpräzipitation von ubiquitinierten Proteinen aus Zellen 81
4.31.1 Immunpräzipitation von ubiquitinierten Proteinen mittels GFP-Trap 81
4.31.2 Immunpräzipitation von ubiquitinierten Proteinen mittels FLAG-IP 81
4.32 *In vitro* Deubiquitinierungsassay 82
4.33 MCPyV Replikationsassay 83
4.34 Immunfluoreszenz 86
4.34.1 Immunfluoreszenzfärbung 86
4.34.2 Konfokale Mikroskopie und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung 87
4.35 *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) 87

5 Ergebnisse **89**
5.1 Interaktion von Usp7 mit den MCPyV T-Antigenen 89
5.1.1 Putative Usp7 Bindungsstellen in den MCPyV T-Antigenen . . . 89
5.1.2 Die MCPyV T-Antigene kopräzipitieren endogenes Usp7 89
5.1.3 Das MCPyV LT bindet die TRAF-Domäne von Usp7 92
5.1.4 Das MCPyV LT konkurriert mit p53 um die Bindung an Usp7 . . 92
5.1.5 Der MCPyV LT N- und C-Terminus interagieren direkt mit der TRAF-Domäne von Usp7 92
5.1.6 Keine nachweisbare Bindung des MCPyV sT an Usp7 95
5.2 Einfluss von Usp7 auf die Ubiquitinierung von LT 97
5.2.1 Einfluss von Usp7 auf die Stabilität und die Halbwertszeit der MCPyV T-Antigene 97

5.2.2 Einfluss von Usp7 auf die Ubiquitinierung der MCPyV T-Antigene *in vivo* . . . 100
5.2.3 Usp7 deubiquitiniert MCPyV T-Antigene *in vitro* . . . 102
5.3 Einfluss der MCPyV T-Antigene auf die Lokalisierung von Usp7 in der Zelle . . . 105
5.4 Einfluss von Usp7 auf den Lebenszyklus des MCPyV . . . 107
5.4.1 Usp7 lokalisiert in die Replikationszentren des MCPyV . . . 107
5.4.2 Usp7 ist ein positiver Faktor der MCPyV DNA-Replikation . . . 109
5.4.3 Usp7 hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Transkription der MCPyV Gene in Abhängigkeit vom zellulären Hintergrund . 111
5.5 Usp7 verstärkt die Bindung des MCPyV LT an den viralen Replikationsursprung . . . 111

6 Diskussion **113**
6.1 Das MCPyV LT interagiert direkt mit Usp7 . . . 113
6.2 Eine direkte Interaktion zwischen dem MCPyV sT und Usp7 ist unwahrscheinlich . . . 115
6.3 *In vivo* Deubiquitinierung des MCPyV LT durch Usp7? . . . 116
6.4 Einfluss der Interaktion von Usp7 und MCPyV LT auf zelluläre Interaktionspartner von Usp7 . . . 118
6.5 Usp7 ist ein positiver Faktor der MCPyV DNA-Replikation und Genexpression . . . 120
6.6 Schlussfolgerung . . . 123
6.7 Ausblick . . . 123

Literaturverzeichnis **125**

Abbildungsverzeichnis **147**

Tabellenverzeichnis **148**

A Anhang **149**
A.1 Aminosäuresequenzen der MCPyV T-Antigene mit Usp7 Bindemotiven 149
A.2 Expression und Aufreinigung von Proteinen für GST-Pulldowns . . . 149
A.2.1 Expression und Aufreinigung des MCPyV LT C-Terminus . . . 149
A.2.2 Expression und Aufreinigung des MCPyV MBP-sT . . . 149
A.2.3 Expression und Aufreinigung des GST-Usp7 Aminosäure 1 - 1102 151
A.3 Aufreinigung ubiquitinierter MCPyV T-Antigene . . . 152
A.4 MTT-Assays . . . 154

Danksagung **155**

Eidesstattliche Versicherung **156**

Abkürzungsverzeichnis

α ..... anti
4E-BP1 ..... eIF4E Bindeprotein
57kT ..... 57k T-Antigen
ori ..... *origin of replication*, Replikationsursprung
E. coli ..... *Escherichia coli*
AdV ..... Adenovirus
AdV5 ..... Adenovirus Typ 5
Ak ..... Antikörper
ALTO ..... *Alternative frame of the LT open reading frame*
Amp ..... Ampicillin
APC/C ..... *Anaphase promoting complex*
As ..... Aminosäure
BKV ..... BK Virus
Blas ..... Blasticidin
Bp ..... Basenpaare
BSA ..... *Bovine Serum Albumin*
CBP ..... Calmodulin Bindepeptid
CFP ..... *Cyan Fluorescent Protein*
CHX ..... Cycloheximid
Da ..... Dalton
DMEM ..... *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNMT1 ..... DNA-Methyltransferase 1
DOC ..... Desoxycholat
DTT ..... Dithiothreitol
EBNA1 ..... *Epstein-Barr Nuclear Antigen 1*
EBV ..... Epstein-Barr-Virus
EDTA ..... Ethylendiamintetraessigsäure
EGF ..... *Epidermal Growth Factor*
EGTA ..... Ethylenglycoltetraessigsäure
EMSA ..... *Electrophoretic Mobility Shift Assay*
ER ..... *Early Region*, frühe Region des MCPyV Genoms
ERK ..... Extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FBS ..... Fötales Kälberserum
FGF ..... *Fibroblast Growth Factor*
FITC ..... Fluorescein
Genta ..... Gentamycin
GFP ..... *Green Fluorescent Protein*
GMPS ..... Guanosin 5'-Monophosphat Synthase

HA ..... Humanes Influenza Hämagglutinin
HAUSP ..... *Herpes Virus-Associated Ubiquitin-Specific Protease*
hCMV ..... humanes Cytomegalievirus
HPyV ..... Humanes Polyomavirus
HRP ..... *Horseradish Peroxidase*
HSV-1 ..... Herpes Simplex Virus Typ 1
HUbl ..... *Usp7/HAUSP Ubiquitin like domains*
IκB ..... Inhibitor von κB
IAA ..... Iodacetamid
Ig ..... Immunglobulin
IKK ..... IκB Kinase
JCV ..... JC Virus
Kana ..... Kanamycin
kBp ..... kilo Basenpaare
kDa ..... kilo Dalton
KSHV ..... Karposi-Sarkom-Herpesvirus
LANA ..... *Latency-associated nuclear antigen 1*
LB ..... Luria-Broth
LSD ..... *LT Stabilization Domain*
LT ..... Large T-Antigen
MAPK ..... Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP ..... *Maltose Binding Protein*
MCC ..... Merkel Zell Karzinom
MCCL-12 ..... Merkel Zell Karzinom Zelllinie 12
MCM ..... *Minichromosom Maintenance*
MCM-BP ..... *MCM Binding Protein*
MCPyV ..... Merkel Zell Polyomavirus
MCS ..... *Multiple Cloning Site*
miR-M1 ..... microRNA M1
MPyV ..... Mauspolyomavirus
MUR ..... *MCPyV Unique Regions*
NCCR ..... *Non Coding Control Region*, nicht kodierende Kontrollregion
NEM ..... N-Ethylmaleimid
NEMO ..... NF-κB *Essential Modulator*
NF-κB ..... *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NP-40 ..... Nonidet P-40
OBD ..... *Origin Binding Domain*
OD_{600} ..... Optische Dichte bei 600 nm
PBS ..... *Phosphate Buffered Saline*
PCNA ..... *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PCR ..... Polymerase Kettenreaktion
PEI ..... Polyethylenimin
PKCζ ..... Protein Kinase C zeta
PML-NB ..... *Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies*
PMSF ..... Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A ..... Protein Phosphatase 2A
PP4C ..... Protein Phosphatase 4C
pRb ..... Genprodukt des Rb-Gens RB1
PRC1 ..... *Polycomb Repressive Complex 1*
PVDF ..... Polyvinylidendifluorid
PyV ..... Polyomaviren
Rb ..... Proteine der Retinoblastoma Familie
RFC ..... Replikationsfaktor C
rpm ..... Runden pro Minute
RPMI ..... *Roswell Park Memorial Institute Nr. 1640 Medium*
RRX ..... Rhodamine Red^{TM}-X
SAPK ..... Stress-aktivierte Proteinkinase
SBP ..... Streptavidin Bindepeptid
SDS ..... Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE ..... SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sT ..... small T-Antigen
Sumo ..... *Small ubiquitin-like modifier*
SV40 ..... Simian Virus 40
tER ..... *truncated Early Region*, tumorspezifische verkürzte frühe Region des MCPyV Genoms
Tetra ..... Tetracyclin
TEV ..... Tobacco Etch Virus
Tip60 ..... *Tat-Interactive Protein 60*
tLT ..... *truncated*/verkürztes LT
TSPyV ..... Trichodysplasia Spinulosa assoziiertes Polyomavirus
UHRF1 ..... *Ubiquitin-like, containing plant homeo domain and RING finger 1*
Usp7 ..... Ubiquitin spezifische Protease 7
v/v ..... Volumen pro Volumen
vIRF1 ..... *Viral Interferon Regulatory Factor 1*
VLP ..... *Virus Like Particle*
VP1, VP2 ..... Virales Protein 1, 2
w/v ..... Gewicht pro Volumen
WB ..... Westernblot
wt ..... Wildtyp
YFP ..... *Yellow Fluorescent Protein*

Zeo ..... Zeozin

1 Zusammenfassung

Das Merkel Zell Polyomavirus (MCPyV) ist eines von bislang 13 humanen Polyomaviren und wurde 2008 in Merkel Zell Karzinomen (MCC) entdeckt. Zahlreiche Studien konnten inzwischen das MCPyV als Hauptursache für die Entstehung des MCC identifizieren. Damit ist das MCPyV das bisher einzige humane Polyomavirus, welches eine Rolle bei der Tumorgenese im Menschen spielt. Das Virus persistiert asymptomatisch in einem Großteil der Bevölkerung, vermutlich in dermalen Fibroblasten. So tragen 42 - 80 % aller Menschen Antikörper gegen das Hauptkapsidprotein des Virus und die virale DNA kann in Hautabstrichen bei 40 - 94 % aller Menschen nachgewiesen werden. Während des natürlichen Lebenszyklus des Virus werden die sogenannten Tumorantigene, Large T-Antigen (LT) und small T-Antigen (sT), von der frühen Region des viralen Genoms exprimiert. Das LT spielt die zentrale Rolle der viralen DNA-Replikation durch Binden an den viralen Replikationsursprung (*ori*) sowie Regulation des Zellzyklus, unterstützt durch sT. Im Gegensatz zu einem permissiven Lebenszyklus ist im MCC das MCPyV Genom in das Wirtsgenom von 80 - 90 % aller Tumore monoklonal integriert. Der Zelltyp in dem die initiale Integration des Genoms stattgefunden hat, ist bislang jedoch nicht identifiziert, d. h. die Ursprungszelle des MCC ist unbekannt. Tumorspezifische Mutationen in der frühen Region des integrierten MCPyV Genoms führen zu einem replikationsinkompetenten Virus, welches ein verkürztes LT (tLT) und das sT exprimiert, aber keine Viruspartikel produziert. Die jedoch weiterhin vorhandene Zellzyklusregulation durch die T-Antigene, allem voran die Inaktivierung des Retinoblastomaproteins, trägt entscheidend zur Transformation der Zelle bei. Das resultierende MCC ist eine seltene jedoch hoch-aggressive Hautkrebsart, die vor allem ältere und immunsupprimierte Menschen betrifft. Es gibt zurzeit keine spezifische Behandlungsmöglichkeit, so dass die Fünf-Jahres-Überlebensrate, abhängig vom initialen Metastasierungsstatus des Tumors, unter 40 % liegt.

Die Aufklärung der Interaktionen der T-Antigene des MCPyV mit zellulären Faktoren zur Replikation des Virus wie auch Transformation von Zellen spielt eine zentrale Rolle zum Verständnis der Biologie dieses Virus. Durch die darauf beruhende Entwicklung von *in vitro* Replikations- und Transformationssystemen können mögliche therapeutische Interventionen zielgerichtet entworfen und getestet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ubiquitin spezifische Protease 7 (Usp7) als neuer zellulärer Interaktionspartner des MCPyV LT identifiziert. Usp7 ist ein Deubiquitinierungsenzym mit zahlreichen zellulären Zielproteinen wie z. B. p53, Mdm2, FoxO4 oder PTEN. Darüber hinaus beeinflusst Usp7 den Lebenszyklus von persistierenden DNA-Viren wie KSHV, EBV, HSV-1 und AdV und spielt außerdem eine Rolle bei der Transformation von Zellen durch EBV und AdV. GST-Pulldown Experimente dieser Arbeit zeigen mit Zelllysaten sowie aufgereinigten Proteinen eine direkte Interaktion der N-terminalen TRAF-Domäne von Usp7 mit dem N- als auch dem C-Terminus des

MCPyV LT. Während der Replikation des MCPyV wird Usp7 durch seine Interaktion mit LT in die DNA-Replikationszentren des Virus delokalisiert, wo es einen positiven Einfluss auf die virale Replikation ausübt. Reduzierte Usp7 Protein Mengen oder eine Abwesenheit der Usp7 Expression führt zu signifikant reduzierter viraler DNA-Replikation und darüber hinaus verminderter viraler Genexpression, in der vollständigen Abwesenheit von Usp7. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, das Usp7 die Bindungskapazität des LT an den viralen Replikationsursprung verstärkt, was durch *Electrophoretic Mobility Shift Assays* belegt wird. Die gesteigerte Bindung von LT an den Replikationsursprung unterstützt daraufhin die virale DNA-Replikation und Genexpression. Weitere Untersuchungen zur Aufklärung des molekularen Mechanismus zeigen, dass Usp7 LT *in vitro* deubiquitiniert, *in vivo* kann jedoch kein signifikanter Effekt auf die Proteinlevel und die Ubiquitinierung von LT nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit Usp7 als ein neuer zellulärer positiver Regulator der MCPyV DNA-Replikation und Genexpression identifiziert werden. Darüber hinaus liefert diese Arbeit Hinweise auf einen bislang unbekannten Mechanismus wie Usp7 die Initiierung der DNA-Replikation eines humanen Polyomavirus wahrscheinlich unabhängig von seiner Deubiquitinierungsfunktion unterstützen könnte.

Abstract

The Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) is one of 13 human Polyomaviruses known to date. The virus was originally discovered in 2008 in Merkel cell carcinomas (MCCs). Since then various studies verified the MCPyV as the major cause for the development of MCC. Thus, MCPyV represents the only human Polyomavirus known to be involved in human cancer development. The virus persists asymptomatically in the majority of the population; most likely dermal fibroblasts are the cells of a life long persistence. 42 – 80 % of the human population are seropositive for antibodies recognizing the major capsid protein of the virus. In addition, viral DNA can be isolated from skin swabs of 40 – 94 % of humans. During the natural life cycle of the virus the so called tumor antigens, Large T-antigen (LT) and small T-antigen (sT), are expressed from the early region of the viral genome. LT plays the central role in the viral DNA replication by binding to the viral origin of replication (*ori*) and regulating the cell cycle supported by sT. In contrast to the permissive lifecycle, in MCC the MCPyV genome is monoclonally integrated in the host genome in 80 – 90 % of all tumors. However, the cell type of the initial integration of the genome has not been identified so far. Thus, the cell of origin giving rise to MCC is unknown. Tumor specific mutations in the early region of the integrated MCPyV genome lead to a replication incompetent virus which expresses a truncated LT (tLT) and the sT, but does not produce viral particles. However, the continued cell cycle regulation by the T-antigens, especially the inactivation of

the retinoblastoma protein, significantly contributes to transformation of the cell. The resulting MCC is a rare but highly aggressive skin cancer that affects mostly elderly and immunosuppressed patients. Currently there is no specific treatment for MCC. The 5-year survival rate depending on the initial stage of metastasis is below 40 %.
Interaction studies of the MCPyV T-antigens with cellular factors for viral replication and transformation are of substantial interest for understanding the biology of this virus. Based on these findings the development of *in vitro* systems for replication and transformation is an important prerequisite in the design and evaluation of putative MCC specific therapeutic strategies.
In this study the Ubiquitin specific protease 7 (Usp7) was identified as a novel cellular interaction partner of the MCPyV LT. Usp7 is a deubiquitination enzyme with numerous cellular targets, e. g. p53, Mdm2, FoxO4 or PTEN. Furthermore, Usp7 influences the life cycle of persistent DNA viruses, e. g. KSHV, EBV, HSV-1 and AdV and is also involved in the transformation of cells by EBV and AdV. Within this study, GST pulldown experiments using cell lysates or purified proteins demonstrate a direct interaction between the N-terminal TRAF domain of Usp7 and the N- as well as C-terminus of MCPyV LT. During the MCPyV replication cycle Usp7 is delocalized to viral DNA replication centers through its interaction with LT where it significantly enhances the viral replication. Reduced Usp7 protein level or a complete absence of Usp7 protein expression significantly decreases viral DNA replication and additionally viral gene expression in cells devoid of Usp7 expression. The results obtained in this study suggest that Usp7 enhances the binding capacity of LT to the viral origin of replication as shown by electrophoretic mobility shift assays. Increased binding of LT to the viral origin of replication supports viral DNA replication and viral gene expression. Further investigations to elucidate the molecular mechanism show that Usp7 deubiquitinates LT *in vitro*, however significant changes of LT protein amounts and LT ubiquitination levels were not observed *in vivo*. In summary, this study identifies Usp7 as a novel positive cellular regulator of MCPyV DNA replication and gene expression. Moreover, this study indicates a hitherto unknown mechanism by which Usp7 could possibly support the initiation of viral DNA replication of a human polyomavirus independent of its deubiquitination function.

2 Einleitung

2.1 Polyomaviren

Polyomaviren (PyV) sind unbehüllte Viren mit einem ikosaedrischen Kapsid von 40 bis 45 nm Durchmesser. Ihr Genom besteht aus einer circa 5 kBp zirkulären doppelsträngigen DNA, die mit zellulären Histonen besetzt ist [1]. Polyomaviren infizieren mit hoher Wirtsspezifität vor allem Vertebratenzellen, wobei neuere Untersuchungen Polyomavirus-ähnliche Sequenzen auch in Insekten und Spinnen gefunden haben [2]. Die erfolgreiche Infektion einer Zelle durch Polyomaviren kann eine produktive Virusreplikation mit Lyse der Zelle zur Folge haben, oder aber eine Persistenz, bei der die Zelle intakt bleibt [1]. Ihr Name leitet sich aus dem Griechischen *poly* und *-oma* her, was „viele Tumore“ bedeutet. Die Namensgebung ist auf die Entdeckung des ersten Polyomavirus, des Mauspolyomavirus (MPyV), zurückzuführen, welches Tumore in neugeborenen Mäusen verursacht [3]. Als zweiter Vertreter der Polyomavirusfamilie wurde von Sweet and Hilleman [4] das Makakenvirus Simian Virus 40 (SV40) in kontaminiertem Poliovirus-Impfstoff entdeckt. Als Modellsystem hat SV40 zur Aufklärung zahlreicher eukaryotischer Zellprozesse wie Transkription, DNA Replikation, RNA Prozessierung und Transformation beigetragen [1]. Mittels der Hochdurchsatz Sequenzierung konnten inzwischen über 160 Polyomaviren identifiziert werden [5].

2.1.1 Humane Polyomaviren

Derzeit sind 13 humane Polyomaviren (HPyV) bekannt, ihre Verwandschaftsverhältnisse mit den nächsten tierischen Vertretern sind in Abbildung 1 dargestellt [6]. Untersuchungen zeigen, dass Polyomaviren hochprävalent in der Bevölkerung sind. Bei circa 25 - 92 % aller Erwachsenen können Antikörper gegen die Kapsidproteine der ersten neun entdeckten humanen Polyomaviren nachgewiesen werden (die Seroprävalenz der HPyV 10, 11, 12, 13 ist bisher nicht untersucht) [7]. Eine Pathogenität von Polyomaviren beim Menschen wurde in Zusammenhang mit Immunsuppression für das BK Virus (BKV, HPyV 1), das JC Virus (JCV, HPyV 2), das Trichodysplasia Spinulosa assoziierte Polyomavirus (TSPyV, HPyV 8), und das Merkel Zell Polyomavirus (MCPyV, HPyV 5) gezeigt. BKV löst bei circa 1 - 10 % der Nierentransplantationspatienten eine Nephropathie und bei 5 - 15 % aller Patienten mit einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation hämorrhagische Zystitis aus [8]. Ebenfalls unter Immunsuppression ist JCV für die Entstehung der progressiven multifokalen Leukoenzephalopathie verantwortlich [9], während das TSPyV die seltene Hautkrankheit Trichodysplasia Spinulosa auslösen kann [10]. Durch die wachsende Anzahl an Menschen mit Immunsuppression, z. B. durch AIDS, Organtransplantation oder unter Einwirkung immunsuppressiver Therapeutika (bei rheumatoider Arthritis oder anderen Autoimmunerkrankungen) treten diese Erkrankungen inzwischen mit vermehrter Häufigkeit auf [10–14]. Ei-

ne Ausnahme ist die abnehmende Häufigkeit der hauptsächlich bei AIDS Patienten auftretenden progressiven multifokalen Leukoenzephalopathie aufgrund der deutlich verbesserten Behandlungsmöglichkeiten von HIV [9, 15]. Das MCPyV sticht unter den humanen Polyomaviren heraus, da es bisher das einzige ist, welches mit der Tumorgenese beim Menschen in Verbindung gebracht werden konnte. Zahlreiche Studien haben das MCPyV als Hauptursache für die Entstehung des sogenannten Merkel Zell Karzinoms (MCC) eindeutig identifiziert. In Abschnitt 2.2 wird hierauf genauer eingegangen [6, 16, 17].

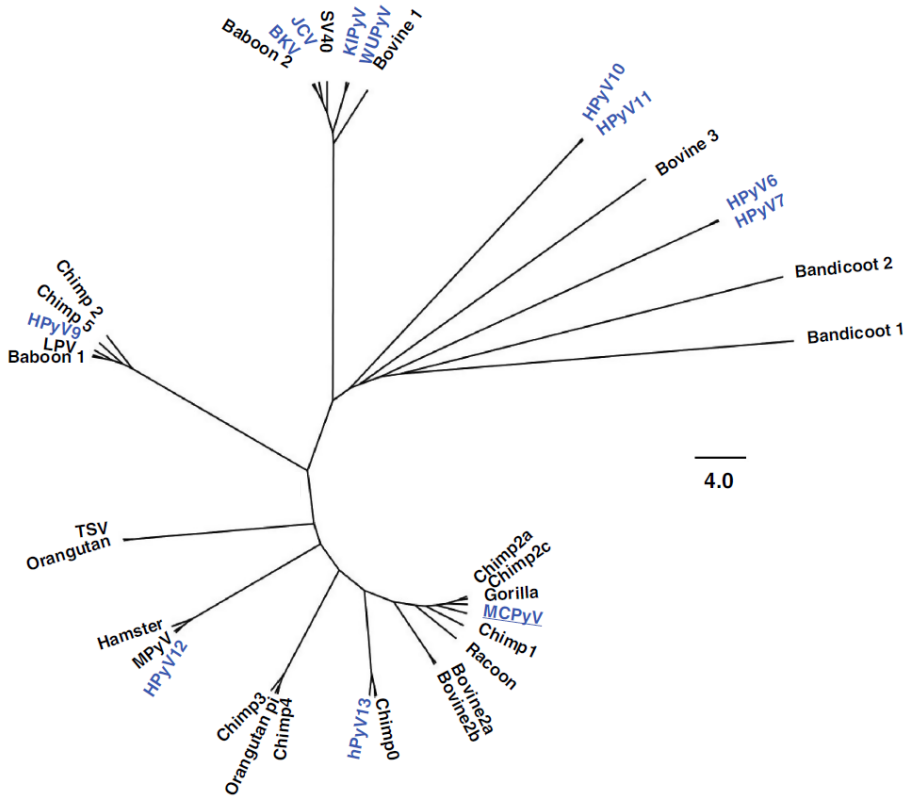

Abbildung 1: Phylogenetische Analyse der Large T-Antigen Aminosäuresequenz der humanen Polyomaviren (blau, HPyV 1-13) und ihren nächsten tierischen Verwandten. Entnommen aus Grundhoff and Fischer [6].

2.1.2 Die Genomorganisation der Polyomaviren

Das Genom der Polyomaviren besteht aus circa 5 kBp doppelsträngiger zirkulärer DNA, sein genereller Aufbau ist in Abbildung 2 A dargestellt. Es lässt sich in die nicht kodierende Kontrollregion (*Non Coding Control Region*, NCCR), sowie die beiden Transkriptionseinheiten einteilen, die für frühe und späte Genespression kodieren. In der NCCR liegen die Promotoren für die Expression der frühen und späten Gene mit ihren entsprechenden Transkriptionsstartpunkten, sowie der virale Replikationsursprung (*ori*) [1, 7, 19]. Die frühe Region wird vor allem während der initialen

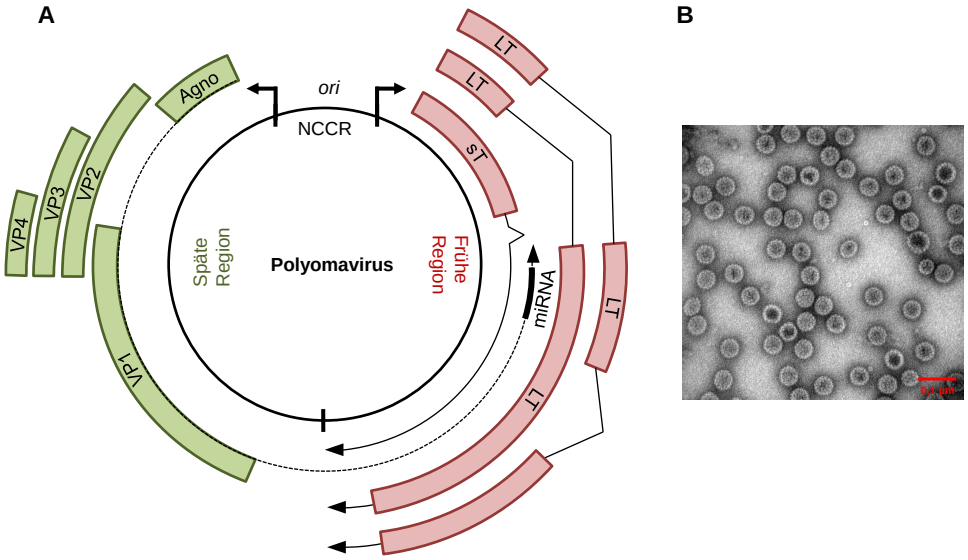

Abbildung 2: A: Genomstruktur der Polyomaviren. *Ori* = Replikationsursprung, NCCR = *Non Coding Control Region*, sT = small T-Antigen, LT = Large T-Antigen, VP1 - VP4 = Virales Protein 1 bis 4. **B: *Virus Like Particles*.** Elektronenmikroskopische Aufnahme von aufgereinigten rekombinanten *Virus Like Particles* aus VP1 des MCPyV [18].

Phase einer Infektion transkribiert und kodiert für die sogenannten T-Antigene, welche durch alternatives Spleißen entstehen. Alle Polyomaviren besitzen ein Large T-Antigen (LT) und ein small T-Antigen (sT). Weitere alternativ gespleißte Varianten des LT sind für viele Polyomaviren bekannt, ein Middle T-Antigen (mT), wie beim MPyV, wurde hingegen bisher für kein humanes Polyomavirus beschrieben [1, 7]. Das LT übernimmt grundsätzlich die Aufgabe der Replikationsinitiierung durch Binden an den Replikationsursprung in der NCCR des viralen Genoms. Darüber hinaus übt es zusammen mit den anderen T-Antigenen regulatorischen Einfluss auf den Zellzyklus aus. Diese Funktionen sind von zentraler Bedeutung für Polyomaviren, da sie für nur wenige virale Proteine kodieren und damit auf die Rekrutierung von zellulären Faktoren für ihre Reproduktion angewiesen sind. Daraus resultiert auch ihre hohe Wirtsspezifität [1, 7, 19].

In der späten Phase einer Infektion wird die späte Region des Polyomavirusgenoms transkribiert. Sie kodiert für die viralen Strukturproteine, welche das Viruskapsid bilden. Dieses besteht aus 72 Pentameren des Hauptstrukturproteins VP1, von dem jedes mit einem einzelnen Molekül VP2 oder VP3 assoziiert ist. Für SV40 und BKV ist außerdem die Existenz eines VP4 gezeigt [8], wohingegen das MCPyV kein VP3 exprimiert [7, 20, 21]. Abbildung 2 B zeigt *Virus Like Particles* aus dem VP1 des MCPyV, die in ihrer äußeren Struktur dem kompletten Virion entsprechen und daher für serologische Untersuchungen verwendet werden.

Die späte Region des BKV, JCV, SV40 und anderer Affenpolyomaviren kodiert außerdem für ein Agnoprotein, dessen Funktion noch nicht hinreichend geklärt ist. Untersuchungen an SV40 zeigen, dass es vermutlich eine Rolle bei der Assemblierung und

Freisetzung der Viruspartikel spielt [1]. Außerdem besitzen viele Polyomaviren eine microRNA, die im Bereich der frühen Gene auf dem *antisense*-Strang codiert ist. Damit ist sie vollständig komplementär zu den frühen Transkripten und führt zu deren Abbau [22–24]. Die Expression der microRNA erfolgt zum einen über einen Durchlesemechanismus („read through“) der späten Transkripte, jedoch konnte für das MCPyV die Existenz eines eigenen von der späten Transkription unabhängigen microRNA Promotors in der frühen Region nachgewiesen werden [20].

2.1.3 Der Lebenszyklus der Polyomaviren

Der Lebenszyklus von Polyomaviren wurde in erster Linie für SV40 aufgeklärt, aufgrund des Vorhandenseins eines vollständig permissiven *in vitro* Zellkultursystems. Jedoch sind die Grundprinzipien bei allen Polyomaviren ähnlich. Generell ist eine produktive Infektion nur in sogenannten permissiven Zellen möglich, die einen kompletten viralen Lebenszyklus unterstützen. Nicht-permissive Zellen können unter Umständen infiziert werden, sofern sie die richtigen Oberflächenrezeptoren für die Aufnahme der Viruspartikel besitzen, jedoch kommt es aufgrund von fehlenden zellulären Faktoren zu keiner produktiven Virusinfektion [1, 7, 19].
In Abbildung 3 sind die Schritte einer produktiven Infektion am Beispiel von SV40 gezeigt. Zur Aufnahme des Virions in die Zelle binden viele Polyomaviren über VP1 an Ganglioside, die mit einem Glykan modifiziert sind, so dass sie in einer Sialinsäure enden [7]. So binden SV40 Virionen an das Gangliosid GM1, wohingegen BKV über N-verbundene Glykoproteine mit α2, 3-verbundenen Sialinsäuren oder über die Ganglioside GD1b und GT1b aufgenommen wird [25, 26]. Für das MCPyV konnte gezeigt werden, dass wahrscheinlich initial Glykosaminoglykane als Anheftung des Virions dienen und als zweiter Schritt eine Bindung an sialysierte Glykane, wie das Gangliosid GT1b, erfolgt [27–29].
Auf die Bindung an den zellulären Rezeptor erfolgt die Aufnahme des Viruspartikels über Endozytose. Für SV40 und BKV konnte gezeigt werden, dass dies Caveolae-vermittelt ist und dass das Viruspartikel über das Zytoskeleton zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert wird [30, 31]. JCV hingegen wird über sogenannte *Clathrin-coated Pits* aufgenommen [9]. Für das MCPyV liegen bisher keine Daten über den intrazellulären Transport des Virions vor. Ebenso ist grundsätzlich noch nicht verstanden, wie der Transport vom Endoplasmatischen Retikulum in den Zellkern funktioniert und, ob eine Auflösung des Kapsids bereits dort oder erst im Nukleus stattfindet [1, 7, 19, 32].
Das virale Genom ist mit zellulären Histonen assoziiert und daher der eukaryotischen Genomstruktur sehr ähnlich. Auch die Promotoren der frühen und späten Region in der NCCR ähneln denen zellulärer Gene und werden daher von der zellulären RNA-Polymerase II erkannt [1, 7, 19]. Diese produziert zunächst die mRNA der frühen Gene,

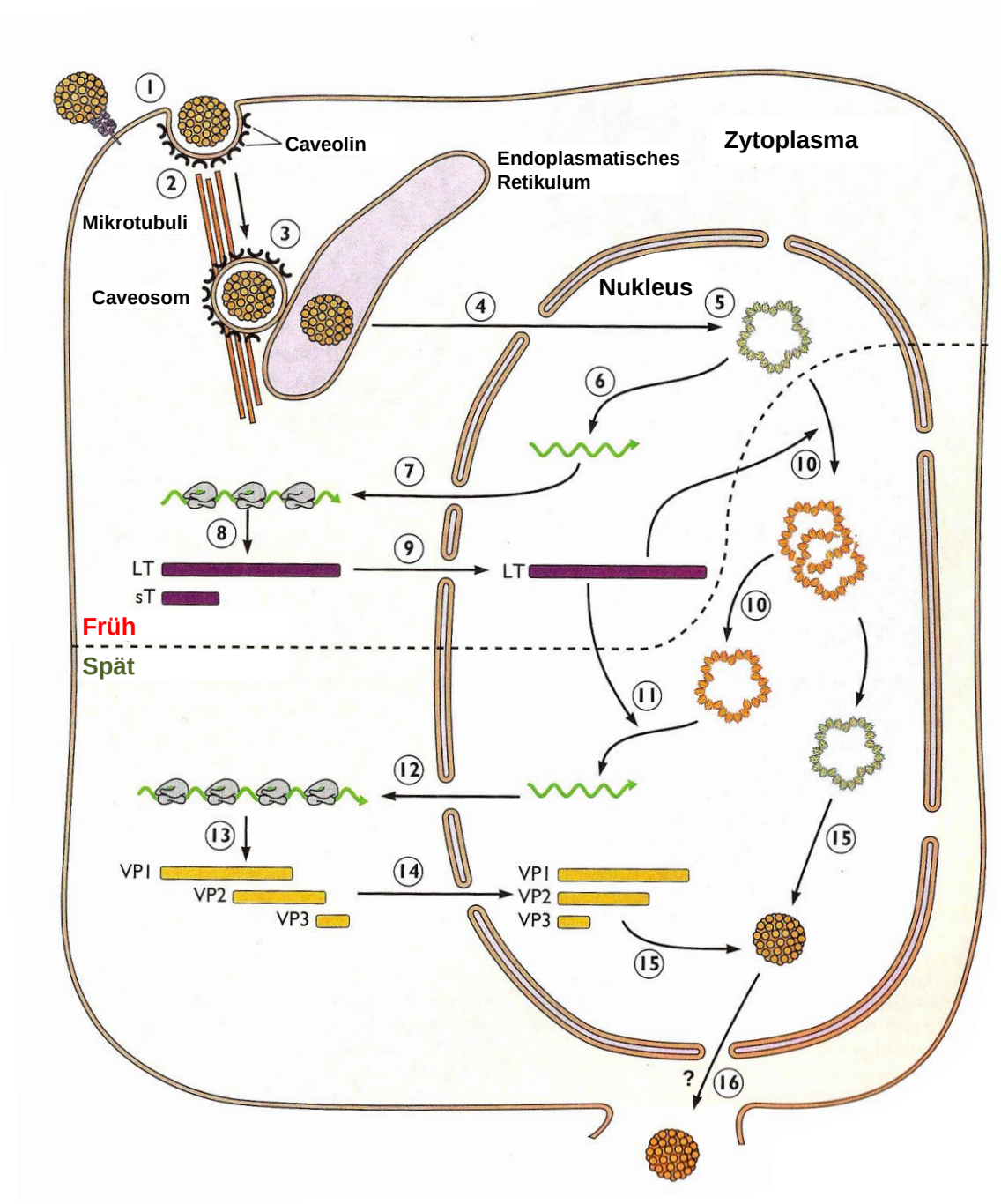

Abbildung 3: Der Lebenszyklus von SV40 als Beispiel für Polyomaviren. **(1):** Binden des Virions an Rezeptoren auf der Zelloberfläche. **(2):** Endozytose in Cavolae. **(3):** Transport über Mikrotubuli zum Endoplasmatischen Retikulum. **(4):** Transport in den Nukleus und Entfernen des Kapsids über unbekannten Mechanismus. **(5):** Virales Genom gebunden an zelluläre Nukleosomen befindet sich im Nukleus. **(6):** Die frühen Gene werden durch die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert. **(7):** Alternatives Spleißen und Transport der mRNAs ins Zytoplasma. **(8):** Die frühen mRNAs werden translatiert in sT und LT. **(9):** LT wird in den Nukleus transportiert. **(10):** LT bindet an *ori* des Polyomavirus-Genoms um die DNA-Synthese zu initiieren. **(11):** Neusynthetisierte DNA-Moleküle assoziieren mit zellulären Histonen. LT stimuliert Transkription der späten Gene. **(12):** Prozessierte späte mRNAs werden ins Zytoplasma transportiert. **(13):** Translation der mRNAs zu den Strukturproteinen VP1, 2, 3. **(14):** Transport von VP1, 2, 3 in den Nukleus. **(15):** Anordnung der Strukturproteine um virale Minichromosomen **(16):** Virionen Freisetzung über unbekannten Mechanismus. Modifiziert nach Flint et al. [19].

wodurch das LT und sT exprimiert werden. Für das Spleißen der verschiedenen T-Antigene aus der frühen mRNA bedient sich das Virus ebenfalls der zellulären Spleißmaschinerie [1, 7, 19]. Das LT ist dann in der Lage an den *ori* des viralen Genoms zu binden und die Replikation einzuleiten. Darüber hinaus wirkt es zusammen mit sT und weiteren T-Antigen Spleißvarianten durch Interaktion mit zellulären Faktoren regulierend auf den Zellzyklus. In Abschnitt 2.1.4 wird genauer auf diese Mechanismen eingegangen, da sie verantwortlich für die Transformation von Zellen sein können. Ihre Hauptfunktion ist die Zelle zum Eintritt in die S-Phase zu bringen, damit die nötigen Faktoren für die virale Replikation zur Verfügung stehen. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Bindung von Proteinen der Retinoblastoma (Rb) Familie [1, 7, 19, 32, 33].
Die Bindung des LT an den viralen Replikationsursprung ist ein zentraler Mechanismus der Polyomavirusreplikation und wurde für SV40 eingehend untersucht [32, 33]. Dabei bindet das LT als doppeltes Hexamer an den *ori* und rekrutiert die zelluläre DNA-Polymerase α (Primase). Es fungiert dann als Helikase und entwindet die DNA unter Verbrauch von ATP, woraufhin sich das Replikationsprotein A und Topoisomerase I anlagern und die Replikation initiieren. Daraufhin rekrutiert das LT die DNA-Polymerase δ, das *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) und den Replikationsfaktor C (RFC) für die Elongation der DNA-Synthese. Durch die Anlagerung von zwei LT Hexameren verläuft die Replikation bidirektional auf dem zirkulären Genom. Die beiden entstehenden zirkulären DNA-Moleküle werden durch die Topoisomerase II getrennt [1, 7, 19, 32, 33].
Während der Replikation findet außerdem die Expression der späten Gene statt. Die Transkripte werden gespleißt und im Zytosol davon die Strukturproteine VP1, VP2, und VP3 translatiert. Fünf VP1 Moleküle lagern sich mit einem VP2 oder VP3 Molekül zusammen und bilden sogenannte Kapsomere, die in den Zellkern zurücktransportiert werden. Gleichzeitig mit der Replikation findet außerdem die Besetzung des viralen Genoms mit zellulären Histonen statt. Die Kapsomere lagern sich spezifisch an das virale Minichromosom an und bilden so das fertige Viruspartikel [1, 7, 19, 32, 33].
Die Freisetzung der Viruspartikel aus dem Zellkern ist bisher nicht gut verstanden. Grundsätzlich wurde für VP2 und VP3 von SV40 gezeigt, dass diese Proteine permeabilisierend auf Membranen wirken. In der späten Phase der Infektion sammeln sich Viruspartikel an der Kernmembran an und diese wird zunehmend undichter. Die endgültige Freisetzung der Virionen geschieht dann durch Zelllyse, jedoch gibt es auch Beobachtungen der Freisetzung viraler Partikel aus intakten Zellen, vermutlich durch Exozytose [1, 19, 32].

2.1.4 Die Tumorgenese durch Polyomaviren

Eine Infektion mit Polyomaviren kann verschiedene Effekte auf die Wirtszelle haben. Ist die Zelle permissiv für das Virus, stirbt sie normalerweise nach einer produktiven

Virusreplikation, da die Zelle bei der Freisetzung der Viruspartikel lysiert [1]. Polyomaviren können jedoch auch eine Persistenz in der Zelle etablieren. In so einem Fall wird nicht der komplette virale Lebenszyklus durchlaufen, das heißt es kommt nicht zur Partikelproduktion und die Zelle bleibt intakt. Dies kann auch auftreten, wenn eine nicht permissive Zelle, die nicht alle Schritte des viralen Lebenszyklus unterstützt, infiziert wird. In beiden Fällen kann es zur Transformation der Wirtszelle kommen. Dies ist ein Nebeneffekt der Regulation des Zellzyklus durch die frühen viralen Genprodukte, welche den Eintritt der Zelle in die S-Phase induzieren, unabhängig davon, ob letztendlich Viruspartikel produziert werden. Untersuchungen zu SV40 und dem MPyV haben einen großen Beitrag zum Verständnis viraler Onkogenese aber auch grundsätzlicher Mechanismen der Transformation von Zellen geliefert [1, 34]. Generell werden von den T-Antigenen der Polyomaviren meist die gleichen Signalwege in der Zelle beeinflusst, jedoch unterscheidet sich zum Teil welche Spleißvariante der frühen Region die Funktion ausführt [1]. Bei SV40 ist eine Überexpression des LT in einigen Zelltypen für eine vollständige Transformation ausreichend, in anderen Zelltypen wird zusätzlich die Expression des sT benötigt [1, 35]. Im Folgenden werden die Grundmechanismen der Transformation von Zellen durch SV40 beschrieben, da diese am besten untersucht und auf die meisten anderen Polyomaviren anwendbar sind [1, 19, 34]. In Abschnitt 2.2.3 wird auf die bereits bekannten Mechanismen der Transformation durch das MCPyV ausführlich eingegangen.
Essentiell für die Transformation von Zellen ist die Interaktion des SV40 LT mit den Proteinen der Retinoblastoma (Rb) Familie pRb, p107 und p130. Diese werden über das LxCxE-Motiv im LT gebunden, welches in den LTs aller Polyomaviren vorhanden ist [1, 34–37]. Die Bindung der Rb-Proteine löst zusammen mit der Interaktion der DnaJ-Domäne des LT mit Hsc70 die Dissoziation von DNA-gebundenen Rb-E2F-Komplexen aus, die normalerweise den Eintritt in die S-Phase blockieren [34, 38, 39]. Die Dissoziation von Rb führt zu einer Transkriptionsaktivierung von Genen, die an der DNA-Synthese und Zellzyklus-Progression beteiligt sind, wie die Cycline A und E, DNA-Polymerase α, PCNA und Histon-Acetylasen [34]. Damit werden einerseits die nötigen Faktoren für die Replikation der viralen DNA zur Verfügung gestellt, andererseits werden ruhende Zellen zum Wiedereintritt in den Zellzyklus getrieben, was bei einer nicht-produktiven Infektion zur Transformation der Zelle führen kann.
Zusätzlich zu den Proteinen der Rb-Familie ist die Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 sehr wichtig, da es den Übergang von der G1- in die S-Phase inhibiert, sowie Apoptose auslöst, z. B. als Antwort auf DNA-Schäden oder oxidativen Stress. Die LTs von SV40, JCV und BKV binden daher p53 mit ihrem C-Terminus und verhindern so die Aktivierung von p53 abhängigen Genen, wie p21, Apaf1 und Bax [34, 36, 40–43]. Die Zelle kann somit auch bei mangelnder Integrität des zellulären Genoms nicht in die Apoptose gehen, so dass Mutationen sich anhäufen können und die Transformation begünstigt werden kann.

Neben den gut untersuchten Interaktionen des SV40 LT mit Rb, Hsc70 und p53 sind weitere Interaktionen mit zellulären Faktoren bekannt, die einen Beitrag zur Transformation leisten. Als weiteren Mechanismus der Induktion der S-Phase bindet das SV40 LT die E3-Ubiquitinligase Fbw7, was den Proteasom-vermittelten Abbau von Cyclin E verhindert [44]. Die Bindung von CBP/p300 über p53 führt zu einer verstärkten Expression des Proto-Onkogens c-Myc, was ebenfalls eine Zellzyklus-Induktion zur Folge hat [45]. Der durch LT induzierte Abbau des MRN-Komplexes (Mre11, Rad50, Nbs1), der wichtig für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der DNA ist, und die Bindung des mitotischen Spindel Prüfpunkts Bub1 tragen vermutlich zusätzlich zu genomischer Instabilität bei [43, 46, 47].
Eine weitere Rolle bei der Transformation durch SV40 spielt das sT des Virus, welches weitere Signalwege zur Zellzyklus-Induktion anschaltet. Im Zentrum steht die Bindung und Inhibition der Protein Phosphatase 2A (PP2A), wodurch diverse nachfolgende Zielproteine beeinflusst werden. ST bindet hierfür an die Aα- und C-Untereinheit von PP2A, wodurch die regulatorische B-Einheit nicht mehr binden kann und die enzymatische Aktivität der Phosphatase zerstört wird [48, 49]. Dies aktiviert unter anderem den Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Signalweg, den extrazellulär Signal-regulierten Kinase (ERK) Signalweg und den Stress-aktivierten Proteinkinase (SAPK) Signalweg [34, 50, 51]. Die Aktivierung dieser Signalwege führt z. B. zur erhöhten Transkription von Cyclin D [35, 41]. Außerdem wird durch die Interaktion von sT mit PP2A c-Myc stabilisiert, welches ein direktes Ziel von PP2A ist [52]. Weitere Proteine, die durch die Bindung von sT an PP2A beeinflusst werden, sind die Protein Kinase C zeta (PKCζ), die Serin/Threonin Protein Kinase Akt und der CdK-Inhibitor p27. Dies aktiviert unter anderem die Cyclin A Transkription, was zum Fortlaufen der S-Phase führt [34, 35, 41].

2.2 Das Merkel Zell Polyomavirus (MCPyV)

Das MCPyV ist eines von 13 humanen Polyomaviren und wurde 2008 integriert im Genom von Merkel Zell Karzinomen (MCC) entdeckt [53]. Bisher ist es das einzige humane Polyomavirus, welches Tumore im eigenen Wirt auslöst. In zahlreichen Studien konnte das MCPyV als Hauptursache für die Entstehung des MCC eindeutig identifiziert werden [6, 17, 53]. Das Genom des MCPyV ist bei 80 - 90 % aller MCC Primärtumore monoklonal integriert im Wirtsgenom aufzufinden und innerhalb eines Patienten weisen Primärtumor und davon abstammende Metastasen identische Integrationsstellen auf [53–59]. Dies bedeutet, dass die Integration des viralen Genoms der Tumorentstehung vorangegangen sein muss. Zum anderen führen Mutationen im viralen Genom zu einem replikationsinkompetenten Virus [16, 60], wobei jedoch die viralen Onkoproteine LT (in einer tumorspezifischen verkürzten Form) und sT konstitutiv im Tumor exprimiert werden [61]. Die Verminderung der Expression der vira-

len Onkoproteine in MCC abgeleiteten Zelllinien führt zum Wachstumsstopp und zur Apoptose [62, 63], sowie zur Tumorregression in Xenotransplantations-Mausmodellen [64]. Ihre Überexpression kann die Transformation von primären Nagernierenzellen auslösen [65]. Diese Erkenntnisse zeigen eindeutig den Zusammenhang des MCPyV und der Entstehung eines MCC. Im Folgenden wird auf die Besonderheiten dieses Tumors, den Lebenszyklus des Virus in gesunden Personen, sowie die bereits bekannten molekularen Mechanismen der Tumorgenese durch das MCPyV eingegangen.

2.2.1 Das Merkel Zell Karzinom (MCC)

Beim MCC (Abbildung 4) handelt es sich um ein seltenes, jedoch hoch-aggressives Karzinom der Dermis, von dem hauptsächlich ältere und immunsupprimierte Menschen betroffen sind. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei 62 %, wenn es sich um einen lokalen Tumor handelt, und sinkt auf 25 % bei Patienten mit bereits erfolgter Metastasierung [11, 66]. Wie bereits beschrieben ist das MCPyV in 80 - 90 % aller MCC aufzufinden [53–59], jedoch besteht bisher nur ein sehr eingeschränktes Verständnis von MCPyV negativen Tumoren und inwieweit sie MCPyV positiven gleichen oder eventuell eine ganz andere Art Tumor darstellen [54, 67, 68]. Aufgrund der sehr geringen Fallzahlen gab es in der Vergangenheit widersprüchliche Ergebnisse zu Einflüssen des Vorhandenseins des MCPyV auf die Expression bestimmter bekannter Tumorsignalwege oder auch dem klinischen Verlauf der Erkrankung [60, 69–71]. Gerade zum Status der Mutation und Expression von Rb und p53 gab es kontroverse Aussagen [69, 72, 73]. Neuere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Patienten zeigen, dass sich die MCPyV negativen Tumore von den Virus positiven durch eine deutlich höhere Anzahl von Mutationen im Wirtsgenom unterscheiden [74–77]. In MCPyV negativen Tumoren konnten Mutationen in Genen der Chromatin-Modifikation und in DNA-Damage Reparaturwegen gefunden werden. Mutationen in den Genen für Rb und p53 wurden häufig gefunden, jedoch nur in MCPyV negativen Tumoren [74–77]. Über die Expression und Funktionalität von p53 in sowohl MCPyV positiven als auch negativen Tumoren gibt es bisher keine neuen eindeutigen Erkenntnisse, für Rb häufen sich die Berichte über eine schwächere bis nicht vorhandene Expression in MCPyV negativen Tumoren [67, 74, 76, 78]. Dies macht vor allem vor dem Hintergrund Sinn, dass in MCPyV positiven Tumoren und Zelllinien die Inaktivierung von Rb für den Erhalt und das Wachstum der Zellen bzw. des Tumors unentbehrlich ist [64].
Da der Einfluss des MCPyV Status auf den klinischen Verlauf der Erkrankung weiterhin nicht eindeutig geklärt ist [69–71, 80, 81], spielt dies bei der Standard-Behandlung von Patienten bisher keine Rolle. Die Therapie des MCC umfasst die weiträumige chirurgische Entfernung des Primärtumors und nachfolgende Bestrahlung des umliegenden verbleibenden Gewebes, besonders wenn sich bereits Metastasen in den Lymphknoten gebildet haben. Bisher konnte kein eindeutiger therapeutischer Nutzen bei der

Abbildung 4: Merkel Zell Karzinom. Entnommen aus [79].

Behandlung mit den bekannten Chemotherapeutika festgestellt werden [82]. Neuere Therapieansätze gegen Virus positive MCC zielen daher direkt auf die von den viralen Onkoproteinen beeinflussten Signalwege ab. Beispiele hierfür sind der Survivin Inhibitor YM155 und der Hsp70 Inhibitor MAL3-101. Diese Ansätze wurden jedoch bisher nur im Tiermodel oder in Zelllinien getestet [83–85]. Alternativ wird an immunologischen Therapieformen geforscht, da MCC Patienten z. B. eine beeinträchtigte Immunantwort durch MCPyV LT spezifische $CD8^+$ T-Zellen zeigen [86, 87]. So konnte ein MCC Patient mit *ex vivo* expandierten polyklonalen MCPyV LT spezifischen $CD8^+$ T-Zellen und Stimulation der HLA-I Expression im Tumor erfolgreich behandelt werden [88]. Die Verstärkung der Immunantwort auf den Tumor ist ein vielversprechender Ansatz, da einerseits die viralen Onkoproteine der MCPyV positiven Tumore eine hohe Immunogenität besitzen [87, 89, 90] und andererseits die MCPyV negativen Tumore in hohem Maße sogenannte Neoantigene exprimieren [74]. Die neuesten Studien zur Verabreichung von PD-1 Inhibitoren, welche eine Immunresistenz des Tumors durch die Expression von PD-1 Liganden verhindern sollen, zeigen große Erfolge bei der Behandlung vom MCC unabhängig von dessen MCPyV Status [91, 92].

2.2.2 Die Replikation des MCPyV

Obwohl ein Zusammenhang zwischen dem MCPyV und der Entstehung des MCC eindeutig gezeigt wurde, sind die Biologie des Virus und die Mechanismen der Tumorentstehung bisher wenig verstanden, zumal bis vor kurzem nicht geklärt war, in welchem Zelltyp des menschlichen Körpers das Virus repliziert. Untersuchungen zeigten lediglich, dass bei 40 - 94 % aller Erwachsenen MCPyV DNA in Hautabstrichen nachgewiesen werden kann [93, 94] und, dass 42 - 80 % aller Personen Antikörper gegen das Kapsid Protein VP1 besitzen [95, 96]. Da außerdem kein vollständig permissives Zellkultursystem für das Virus existiert, konnten bisher nur in einem semi-permissiven *in vitro* System, in welchem das virale Genom durch Transfektion in Zellen eingebracht wird, die virale DNA-Replikation und Genexpression in einer Reihe von etablierten Tumorzelllinien untersucht werden [94, 97–99]. Mithilfe dieses Systems konnten die

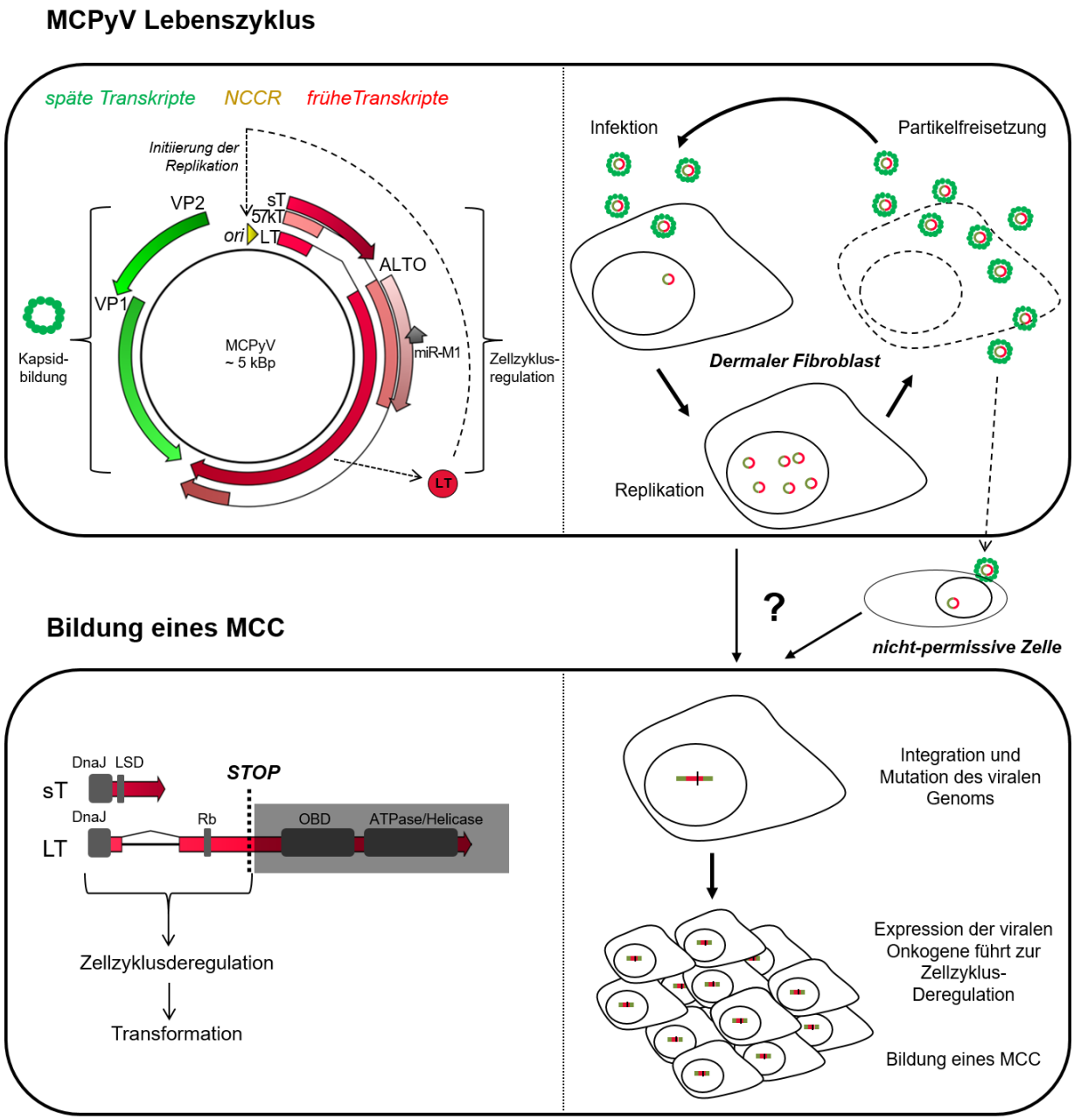

Abbildung 5: Derzeitiges Modell des MCPyV Lebenszyklus (oberer Kasten) und der Bildung eines MCC (unterer Kasten) auf genomischer und zellulärer Ebene. Das Virus persistiert in circa 80 % der gesunden Bevölkerung wahrscheinlich in dermalen Fibroblasten der Haut. Unter Immunsuppression kommt es zur vermehrten Virusproduktion. Dies führt unter bestimmten Umständen zur Integration des viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle oder in das einer anderen versehentlich infizierten nicht-permissiven Zelle. Zusätzliche Mutationen im viralen Genom führen zur alleinigen Expression einer verkürzten frühen Genregion. Die konstante Expression der viralen Onkogene sT und des verkürzten LTs induzieren die Transformation der Zelle und Entwicklung eines MCC. *ori* = *origin of replication*, Replikationsursprung, NCCR = *Non Coding Control Region*, sT = small T-Antigen, LT = Large T-Antigen, 57kT = 57k T-Antigen, ALTO = *Alternative frame of the LT open reading frame*, miR-M1 = microRNA M1, VP1, VP2 = Virales Protein 1 und 2, DnaJ = Hsc70 Bindedomäne, LSD = *LT Stabilization Domain*, Rb = Rb Bindedomäne, OBD = *Origin Binding Domain*.

Grundzüge der Replikation des Virus in Anlehnung an andere Polyomaviren aufgeklärt werden (siehe Abbildung 5).
Die frühe Region des viralen Genoms wird in der frühen Phase der Infektion exprimiert. Dazu gehören LT, sT, die Spleißvariante 57kT und das *Alternative frame of the LT open reading frame* (ALTO), welches durch die Benutzung eines alternativen Startcodons entsteht [16, 53, 61, 98, 100]. Die Domänenstruktur und die bekannten Interaktionspartner des MCPyV LT und sT und ihre Rolle bei der Replikation und/oder Transformation des Virus sind in Abbildung 6 graphisch dargestellt. Die zentrale Rolle bei der Initiierung der Replikation des MCPyV kommt wie bei anderen Polyomaviren der Bindung des Replikationsursprungs des viralen Genoms (*ori*) durch die *Origin Binding Domain* (OBD) des LTs zu [20, 98, 101, 102]. Untersuchungen zeigen, dass der Phosphorylierungsstatus von LT hierbei entscheidend ist. Eine Phosphorylierung an dem Aminosäurerest T297 hat negative Effekte, während eine Phosphorylierung an T299 essentiell für eine funktionierende Replikation ist. Dies ist auf eine verminderte, beziehungsweise verstärkte Affinität des LT für den viralen *ori* zurückzuführen [103].
Wie die LTs aller Polyomaviren (siehe Abschnitte 2.1.3 und 2.1.4) besitzt das MCPyV LT ein LxCxE-Motiv mit dem es Proteine der Rb-Familie bindet und inaktiviert [16, 65]. Dies löst den Eintritt der Zelle in die S-Phase aus, wodurch die zur Replikation notwendigen zellulären Faktoren bereitgestellt werden. Auf die sich daraus ergebenen Einflüsse auf die Zelle hinsichtlich Transformation wird speziell für das MCPyV in Abschnitt 2.2.3 eingegangen. Wie das SV40 LT bindet auch das MCPyV LT für eine effiziente Replikation zusätzlich das Chaperon Hsc70 über seine DnaJ-Domäne und ist darüber signifikant an der Induktion von E2F-abhängigen Genen beteiligt [101, 104].
Ein weiterer wichtiger Faktor für eine effiziente virale Replikation ist die Rekrutierung von DNA-Schäden assoziierten Faktoren der ATM- und ATR-Signalwege zu den Replikationszentren des Virus, wobei der zugrundeliegende Mechanismus bisher nicht aufgeklärt ist [105]. Die Interaktion von LT mit dem zellulären Faktor Brd4 hat außerdem einen positiven Effekt auf die virale Replikation. Brd4 lokalisiert in die Replikationszentren des Virus im Nukleus und rekrutiert dort den Replikationsfaktor C [106].
Eine Besonderheit des MCPyV LT im Vergleich zu anderen Polyomaviren sind die sogenannten *MCPyV Unique Regions* (MUR) vor und nach der Rb-Bindedomäne, deren genaue Funktion bisher unbekannt ist. Der einzige bekannte Interaktionspartner der MUR1 ist das lysosomale Protein Vam6p, welches ein negativer Faktor für die MCPyV Replikation ist und von LT in den Nukleus delokalisiert wird [98, 107].
Die Rolle des sT bei der Replikation des MCPyV besteht vor allem darin das LT zu stabilisieren. ST bindet hierfür mit seiner LT stabilisierenden Domäne (*LT Stabilization Domain*, LSD) an die E3-Ubiquitin Ligase Fbw7, wodurch eine Poly-Ubiquitinierung und proteasomaler Abbau des LT verhindert wird [108]. Untersuchungen von Tsang et al. [109] legen jedoch nahe, dass sT auch eine direkte Rolle bei der Replikation einnimmt. So lokalisiert sT zu MCPyV Replikationszentren und stimuliert die Replikation

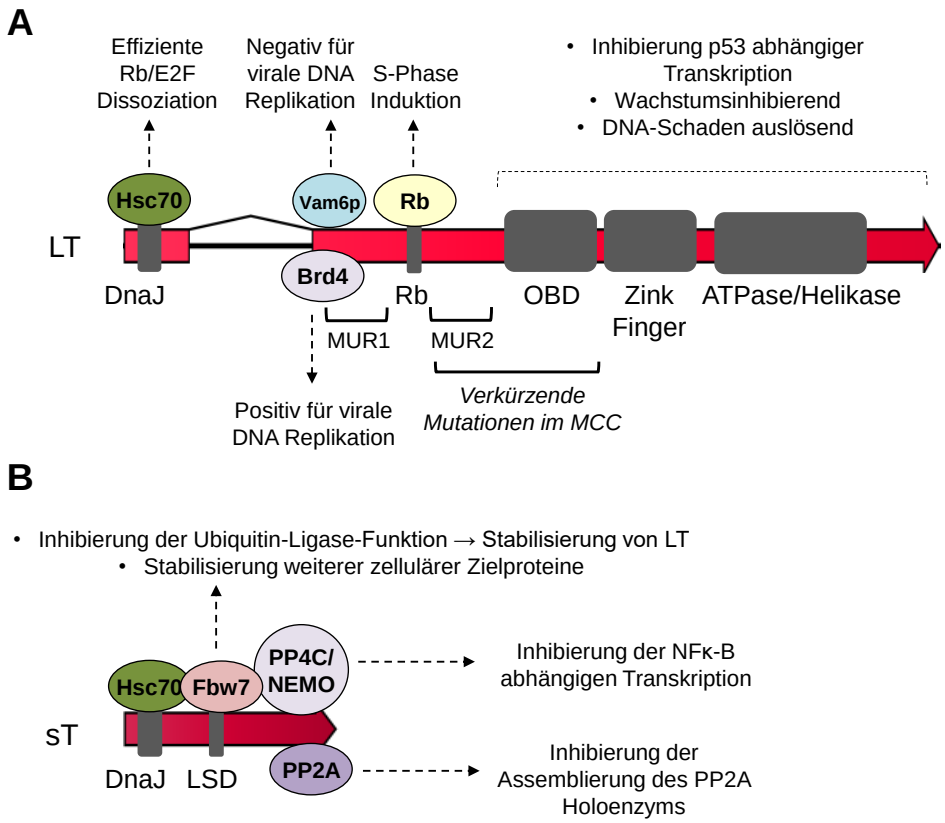

Abbildung 6: Funktionelle Domänen und bekannte Interaktionspartner des MCPyV LT (A) und sT (B). A: DnaJ = Hsc70 Bindedomäne (Aminosäure (As) 15 - 60, Motif: HPDKGG); MUR = *MCPyV Unique Regions*; Rb = Rb Bindedomäne (As 212 - 216, Motif: LxCxE); OBD = *Origin Binding Domain* (As 316 - 428); Zink Finger (As 437 - 528); ATPase/ Helikase Domäne (As 567 - 727). Die verkürzenden Mutationen im MCC liegen immer im Bereich nach der Rb-Bindedomäne bis Anfang der OBD. Interaktionspartner: Hsc70 (As 42 - 47, DnaJ), Brd4 (As 1 - 404), Vam6p (As 209), Rb (As 212 - 216). Der LT C-Terminus inhibiert p53 abhängige Transkription und Zellwachstum und löst DNA-Schäden über unbekannten Mechanismus aus. **B:** As 1 - 79 ist identisch zu LT, sT ist von Mutationen im MCC nicht betroffen. LSD = *LT Stabilization Domain* (As 91 - 95). Interaktionspartner: Hsc70 (As 42 - 47, DnaJ), Fbw7 (As 91 - 95, LSD), PP4C/ NEMO (As 95 -111), PP2A (As 119 - 124 + 147 - 152).

unabhängig von einem Einfluss auf das LT Proteinlevel.

Die Funktionen der anderen frühen Genprodukte 57kT und ALTO sind bisher nicht aufgeklärt.

In der späten Phase des viralen Lebenszyklus kommt es zur Expression der späten Gene VP1 und VP2, welche das Viruskapsid bilden [94, 97]. Im Gegensatz zu anderen Polyomaviren konnte bisher keine Expression eines VP3 nachgewiesen werden [20, 21]. Die virale DNA wird in die Kapside verpackt und die fertigen Viruspartikel werden vermutlich durch Zelllyse in die Umgebung entlassen. Besonders die späte Phase der Infektion ist schlecht verstanden, da in den bisherigen Zellkultursystemen wenig Expression der späten Gene und nur sehr eingeschränkte Partikelproduktion zu beobachten ist [94, 97].

Die Mechanismen der Persistenz des MCPyV im Menschen sind aufgrund der bis vor

kurzem unbekannten Wirtszelle des Virus nicht verstanden, aber auch für andere humane Polyomaviren existiert kein *in vitro* Modell zu deren Untersuchung. Unserer Arbeitsgruppe ist es erstmalig gelungen eine Persistenz des MCPyV im semi-permissiven *in vitro* Zellkultursystem über mehrere Monate zu beobachten [20]. Ob diese Persistenz durch einen Erhalt des viralen Episoms ähnlich einer Latenz oder eine andauernde Reinfektion von Zellen zustande kommt, ist bisher nicht geklärt. Gezeigt werden konnte jedoch, dass die vom Virus codierte miRNA-M1, die sich *antisense* zu den frühen Genen im LT-Leserahmen befindet, entscheidend für die Persistenz des Virus in der Zellkultur ist. Sie wird zum einen über einen eigenen Promotor, wie auch über einen Durchlesemechanismus der späten Transkription exprimiert. Da sie zu 100 % komplementär zur LT mRNA ist, reguliert sie dessen Expression herunter. Diese beschränkte Expression des LT unterstützt wahrscheinlich die Persistenz des Virus, da z. B. immunogene und wachstumsinhibierende Einflüsse des LT herunterreguliert werden [20].
Liu et al. [110] ist es kürzlich gelungen Fibroblasten der Dermis als vermutliche Wirtszellen des MCPyV zu identifizieren, wobei der *in vivo* Nachweis, dass diese Zellen die natürlichen Zielzellen des Virus darstellen, noch aussteht. Durch eine Induktion von Matrix-Metalloproteinasen über den WNT/β-Catenin Signalweg wird die Infektion dieser Zellen mit MCPyV entscheidend stimuliert. Liu et al. [110] konnten damit das bestehende Zellkulturmodell deutlich verbessern, so dass in dermalen Fibroblasten in Zellkultur in bis zu 50 % der Zellen (im Vergleich zu 5 % in bisherigen *in vitro* Systemen) virale Replikation und Genexpression zu beobachten ist. Mit den gebildeten viralen Partikeln ist eine Reinfektion der Zellen möglich, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der komplette virale Lebenszyklus in diesen Zellen in Kultur durchlaufen wird. Jedoch konnte bisher keine Vervielfältigung von infektiösen Viruspartikeln oder ein zytopathischer Effekt auf die Zellen gezeigt werden, wie es bei einem vollständig permissiven System zu erwarten wäre.

2.2.3 Die Tumorgenese durch das MCPyV

Trotz der Entdeckung von Liu et al. [110], dass dermale Fibroblasten die Wirtszelle für das MCPyV sein könnten, ist weiterhin nicht klar aus welcher Zelle das MCC entsteht. Die am meisten verbreitete Annahme das MCC entstamme Merkelzellen, was zur Namensgebung des Karzinoms führte, erfolgte aufgrund der den Merkelzellen ähnlichen Expression von neuroendokrinen Markern und punktförmiger perinukleärer Ansammlung von Cytokeratin 20 in MCC Zellen [111]. Neuere Untersuchungen, die außerdem eine Expression von frühen B-Zell Markern im MCC beobachten, vertreten jedoch die Hypothese, dass der Ursprung des Karzinoms eher in diesem Zelltyp zu finden sei [112]. Als weitere Kandidaten werden außerdem epidermale wie auch dermale Stammzellen der Haut als Ursprung des MCC diskutiert, wobei es mehr Hinweise für eine epidermale Abstammung gibt [113, 114]. Keine der genannten Theorien

kann jedoch einen eindeutigen experimentellen Nachweis erbringen. Die Entdeckung der natürlichen Wirtszelle des MCPyV bringt insofern keine Klarheit, dass weiterhin sowohl die Transformation einer permissiven Zelle durch die Integration des replikationsinkompetenten viralen Genoms denkbar ist, wie auch die abortive Infektion eines nicht-permissiven Zelltyps mit darauffolgender Integration und Mutation des Virusgenoms (siehe Abbildung 5) [110].
Nichtsdestotrotz sind bereits die Grundprinzipien der Tumorgenese durch das MCPyV soweit verstanden, dass initial von einer deutlich gesteigerten Virusreplikation, ausgelöst durch die Immunsuppression des Patienten, ausgegangen wird. Dies zeigt sich in vergleichsweise hohen IgG Titern gegen VP1 bei MCC Patienten [96, 115]. Hiernach folgt die Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom, sowie eine Mutation im Bereich der frühen Gene, wobei die Reihenfolge dieser Ereignisse oder, ob es präferierte Integrationsstellen gibt, bisher nicht bekannt ist [116]. Dies führt zur Expression eines verkürzten/*truncated* LT (tLT), welches nicht mehr an den *ori* des viralen Genoms binden kann, wodurch das Virus replikationsinkompetent wird [16, 17, 53, 60]. Die darauf folgende konstitutive Expression des tLT und des sT, sowie die fehlende Expression der späten Gene, führt zur Transformation der Wirtszelle, und ist sowohl im Tumor als auch in MCC Zelllinien unentbehrlich für die Aufrechterhaltung des transformierten Zustandes der Zellen [62–64]. MCC Patienten zeigen neben erhöhten Titern gegen das VP1 Protein, wogegen auch ein Großteil von gesunden Personen Antikörper besitzen, Antikörper gegen die MCPyV T-Antigene. An den T-Antigen Titern lässt sich außerdem der Verlauf der Erkrankung ablesen. So steigen die T-Antigen Titer bei fortschreitender Erkrankung und fallen bei erfolgreicher Behandlung [87, 89, 90]. Außerdem lassen sie sich bereits vor dem Wiederauftreten des Tumors nachweisen und könnten daher auch prognostisch genutzt werden [89, 90].
Die Bindung von Rb (siehe Abbildung 6) durch das tLT spielt auch in der Tumorgenese durch das MCPyV eine zentrale Rolle, da sie zur Aktivierung der E2F-abhängigen Transkription führt [65]. Wie für das SV40 LT (siehe Abschnitt 2.1.4) konnte gezeigt werden, dass dies eine Deregulation des Zellzyklus zur Folge hat, z. B. durch die Expression von Cyclin E und des Onkoproteins Survivin [85, 117]. Die Inaktivierung von Rb wird auch analog zum SV40 LT über die Bindung von Hsc70 durch die DnaJ-Domäne des LT vermittelt [104]. Schrama et al. [118] konnten außerdem beobachten, dass eine Phosphorylierung von tLT an S220 entscheidend für eine effiziente Rb-Inaktivierung ist. Im Unterschied zum SV40 LT wird vom MCPyV tLT nur pRb und nicht die anderen Mitglieder der Familie, p107 und p130, gebunden und inaktiviert [119].
Die Wichtigkeit der Rb-Inaktivierung für die Tumorgenese durch das MCPyV wird vor allem darin deutlich, dass in allen bisher analysierten MCC die verkürzenden Mutationen im LT immer zu einem Erhalt der Rb-Bindedomäne führen [65]. Houben et al. [64] konnten zeigen, dass in MCC Zelllinien, wie auch im Xenotransplantations-

Mausmodell, eine intakte Rb-Bindedomäne essentiell für den Erhalt und das Wachstum der Zellen bzw. des Tumors ist. Zusätzlich besitzen die tLTs aus den Tumoren aber auch eine deutlich stärkere Bindungsaffinität zu Rb und ein höheres Transformationspotential in primären Rattenfibroblasten im Vergleich zur Volllängen Form [65]. Es könnte daher sein, dass die Verkürzung des LT im MCC zu einem Gewinn an Funktionen für den N-Terminus führt und dies neben dem reinen Erhalt der Rb-Bindedomäne ein Faktor für die positive Selektion auf diesen Bereich ist.
Gleichzeitig besteht eine negative Selektion gegen den Erhalt des C-Terminus von LT. Durch den Verlust der OBD und der Helikase-Domäne geht die Fähigkeit der Bindung an das virale Genom verloren, wodurch die Virusreplikation nicht mehr initiiert werden kann. Dies ist entscheidend, da ein replizierendes Virus den Zelltod durch Zelllyse auslösen könnte oder im Kontext des integrierten Virusgenoms die Integrität des zellulären Genoms durch Aufwinden der DNA-Stränge zerstört würde [6]. Jedoch führt die Expression des LT C-Terminus auch unabhängig vom Vorhandensein des viralen Genoms zu DNA-Schäden im Wirtsgenom und zur Hemmung der Zellproliferation [120, 121]. Die Phosphorylierung von LT an S816 durch die ATM-Kinase scheint zum Teil eine Rolle bei diesem Prozess zu spielen [122], weitere Anhaltspunkte zum zugrundeliegenden Mechanismus sind jedoch nicht bekannt. Dem entgegengesetzt ist die Beobachtung, dass die Volllängen Form des LT, im Gegensatz zur verkürzten, p53-abhängige Transkription inhibieren kann, obwohl sie nicht direkt an p53 bindet [65]. Dies unterscheidet das LT des MCPyV von den LTs der meisten anderen Polyomaviren. Warum jedoch in MCC Zelllinien und Tumoren, die zum Großteil eine Wildtyp-Variante des p53-Gens besitzen [54, 78], nur eine geringe Expression von p53 und keine Aktivierung des p53-Signalweges zu beobachten ist, ist nicht geklärt. Dies ist auch nicht mit einer indirekten Wirkung des N-Terminus von LT zu erklären, da eine Herunterregulation der T-Antigene keinen Einfluss auf die p53-Expression hat [73].
Das MCPyV sT wird von den verkürzenden Mutationen in der frühen Region im integrierten viralen Genom nicht getroffen (siehe Abbildung 5 und 6), jedoch ist seine genaue Rolle bei der Tumorgenese noch teilweise umstritten. Studien zeigen, dass sT alleine *in vitro* immortalisierte Rattenfibroblasten transformieren kann [123] und außerdem onkogen in transgenen Mäusen ist [124, 125]. Es ist jedoch nicht eindeutig geklärt, ob sT notwendig ist, um den transformierten Zustand von bereits etablierten MCC Zelllinien aufrecht zu erhalten [63, 126]. Das sT des MCPyV interagiert, wie auch das SV40 sT (siehe Abschnitt 2.1.4), mit PP2A, jedoch zusätzlich zur Aα- und C-Untereinheit auch mit der Aβ-Untereinheit [127]. Ein weiterer Unterschied ist, dass das MCPyV sT nur die Assemblierung der B-Untereinheit B56α und nicht wie das SV40 sT auch der Untereinheiten B55α und B56ϵ inhibiert. Im Gegensatz zu SV40 scheint die Interaktion des MCPyV sT mit PP2A außerdem nicht für die Transformation *in vitro* und *in vivo* entscheidend zu sein [123, 125, 127]. Dafür ist eine intakte LSD essentiell, wobei nicht geklärt ist, ob die Stabilisierung des LT durch Inhibierung von Fbw7

auch im Kontext des Tumors stattfindet [108]. Das tLT zeigt unabhängig von sT im Gegensatz zur Volllängenform eine deutlich höhere Stabilität und geringere Ubiquitinierung [diese Arbeit]. Entscheidend ist hier eher, dass die Bindung von sT an Fbw7 auch zur Stabilisierung anderer Zielproteine der Ubiquitin-Ligase führt, z. B der Zellzyklusregulatoren c-Myc und Cyclin E [108]. Außerdem inhibiert sT mit seiner LSD die Substraterkennungseinheit Cdc20 des *Anaphase promoting complex* (APC/C). Die Substraterkennungseinheit Cdh1, die ebenfalls im APC/C zu finden ist, wird ebenfalls von sT inhibiert, jedoch unabhängig von seiner LSD. Durch diese Interaktionen werden Zielproteine des APC/C durch sT stabilisiert, so z. B. das Cyclin B1. Dadurch hyperphosphoryliert der Cdk1/CycB1 Komplex das eIF4E Bindeprotein 4E-BP1 was zur Deregulierung der Cap-abhängigen Translation führt und wichtig bei der LSD abhängigen Transformation durch das sT zu sein scheint [123, 128].
Untersuchungen von Griffiths et al. [129] zeigen, dass sT außerdem NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) abhängige Transkription inhibiert. Die Familie der NF-κB Transkriptionsfaktoren spielt eine wichtige Rolle in diversen Signalwegen wie der Zellproliferation, Apoptose und Immunantwort. ST bindet hierfür die Protein Phosphatase 4C (PP4C) und den NF-κB *essential modulator* (NEMO). Dies inhibiert die IKKα/IKKβ (IκB Kinase α, β) vermittelte IκB (Inhibitor von κB) Phosphorylierung, wodurch die NF-κB Aktivierung verhindert wird [129]. ST könnte dadurch zusätzlich zur Transformation beitragen.
Weitere Untersuchungen legen nahe, dass sT außerdem eine Rolle bei der hohen Metastasierungsrate von MCCs spielen könnte. ST destabilisiert das Mikrotubuli-Netzwerk der Zelle, was zu einer verstärkten Migration und Motilität führt. Dies wird wahrscheinlich über eine vermehrte Dephosphorylierung des Mikrotubuli assoziierten Proteins Stathmin durch PP4C Rekrutierung über sT ausgelöst [130]. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen außerdem, dass es bei der Implantation von MCC Zelllinien in Scid-Mäuse neben der Entstehung eines Primärtumors zur ausgeprägten Metastasenbildung kommt, die mit einer Hochregulation des sT im Tumor im Vergleich zu den Zelllinien korreliert. Außerdem sind in den Tumoren mit erhöhter sT Expression Gene hochreguliert, die z. B. an Angiogenese und Extrazellulärmatrix Deassemblierung beteiligt sind [131].

2.2.4 Entdeckung neuer zellulärer Interaktionspartner der MCPyV T-Antigene

Abbildung 6 zeigt schematisch die Domänenstruktur des MCPyV LT und sT sowie die bereits bekannten Interaktionspartner. Ihre Funktionen sind, soweit bekannt, in den jeweiligen Abschnitten zur Replikation und zur Transformation des MCPyV beschrieben. Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit waren viele dieser Interaktionen noch nicht aufgeklärt und auch heute herrscht noch ein sehr eingeschränktes Verständnis für die Biologie des MCPyV. Die bereits bekannten Fakten zu diesem Virus zeigen,

dass es viele Besonderheiten im Vergleich zu anderen gut untersuchten Polyomaviren, wie SV40, aufweist. Beispiele für das LT sind, wie bereits beschrieben, die nicht vorhandene Interaktion mit p53, die Inhibition von nur einem Typ der Rb Proteine und die MUR mit Interaktionspartnern wie Vam6p. Das sT zeichnet sich durch die Unabhängigkeit seiner transformierenden Eigenschaften von der Interaktion mit PP2A, und die besondere Interaktion mit Fbw7 aus, die zur Stabilisierung des LT und anderer zellulärer Faktoren führt. Vor allem die Tatsache, dass das MCPyV das bisher einzige humane Polyomavirus ist, das Tumore im eigenen Wirt auslöst, zeigt seine Einzigartigkeit. Die Mechanismen der Tumorgenese und auch der normale Lebenszyklus des Virus sind daher nur unzureichend verstanden, was sich auch im Fehlen eines vollständig permissiven *in vitro* Replikationssystems widerspiegelt.
Um ein besseres Verständnis für die Mechanismen der Replikation und Transformation des MCPyV zu erhalten wurden in meiner Masterarbeit Tandem-Affinitäts-Aufreinigungen mit den frühen Genprodukten des MCPyV durchgeführt [132]. Dadurch konnten 73 potentielle neue zelluläre Interaktionspartner der T-Antigene identifiziert werden. Interessanterweise ließen sich vor allem Bindungspartner im Bereich der Chromatin modellierenden Faktoren, DNA-Reparatur Proteine, Ubiquitin modifizierenden und Proliferations/ Transformations assoziierten Faktoren nachweisen, unter anderem die Proteine Kap1, Set, XRCC5, XRCC6, HIST2H2AC, NPM, Ncl, Abl1 und Usp7. Der Faktor Usp7 (*Ubiquitin specific protease 7*) war dabei von besonderem Interesse, was im nachfolgenden Abschnitt genauer erläutert wird.

2.3 Die Ubiquitin spezifische Protease 7 (Usp7)

Die Ubiquitin spezifische Protease 7 (Usp7) oder auch HAUSP (*Herpes Virus-Associated Ubiquitin-Specific Protease*) ist eine thiolabhängige Ubiquitin-Protease, die zahlreiche zelluläre Funktionen vor allem durch die Entfernung von Ubiquitin von Zielproteinen ausübt. Abbildung 7 zeigt seine Domänenstruktur (A), sowie bekannte zelluläre und virale Interaktionspartner (B). Usp7 hat eine N-terminale TRAF-Domäne, die vor allem für die Substratbindung zuständig ist. Durch die Untersuchung zahlreicher zellulärer und viraler Interaktionspartner der TRAF-Domäne von Usp7 konnte das Konsensusmotiv auf den Zielproteinen als P/A-x-x-S identifiziert werden [134–136]. Der Serin-Rest an Postion 4 spielt dabei die zentrale Rolle, seine Phosphorylierung kann die Interaktion komplett aufheben [137]. Darauf folgt die katalytische Domäne mit einem Cystein-Rest im Aktiven Zentrum [138]. Diese hydrolysiert Isopeptidbindungen zwischen einem Lysin des Zielproteins oder Ubiquitins und dem C-terminalen Glycin eines weiteren Ubiquitins [134, 138–140]. Untersuchungen zeigen, dass verstärkt Mono- anstelle von Poly-ubiquitinierten Proteinen von Usp7 deubiquitiniert werden und dass bevorzugt die komplette Kette vom Zielprotein entfernt wird und nicht jedes Ubiquitin einzeln [140]. Dabei gibt es widersprüchliche Daten, welche Art von Iso-

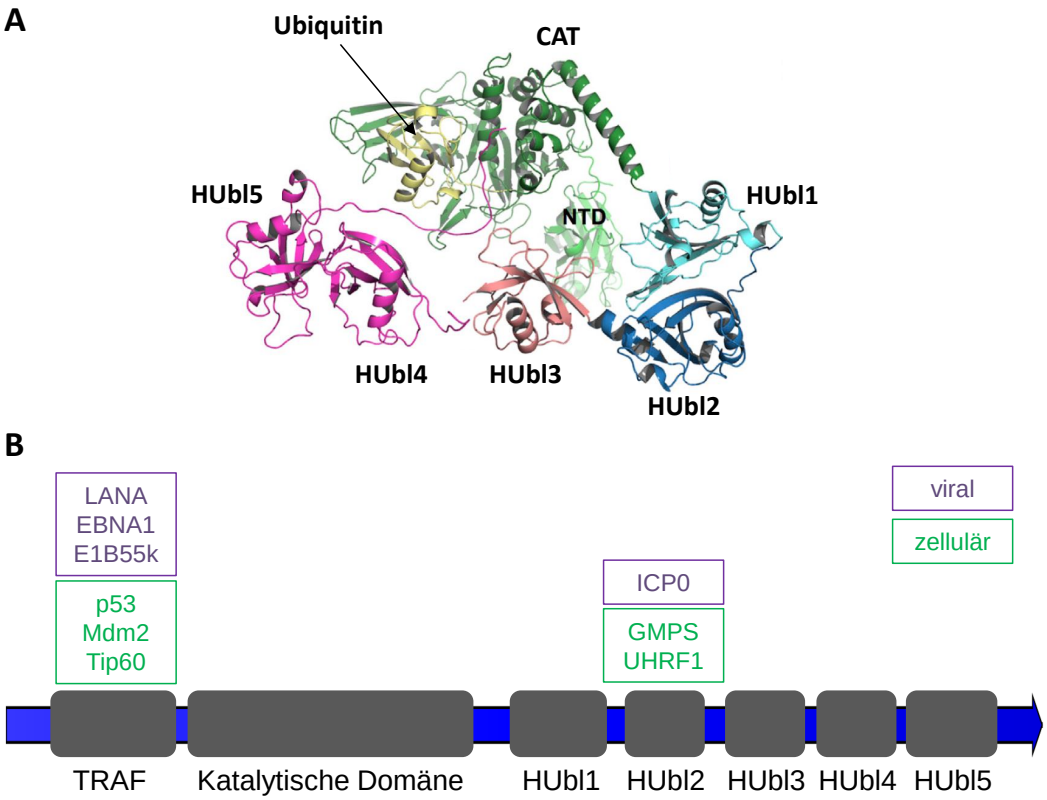

Abbildung 7: Funktionelle Domänen und bekannte Interaktionspartner der Ubiquitin spezifischen Protease 7 (Usp7). A: Zusammengesetzte Kristallstruktur des Volllängen Usp7 in der aktivierten Konformation bei Bindung eines Ubiquitins (gelb) und den letzten 19 Aminosäuren (As) des C-Terminus durch die katalytische Domäne (CAT). NTD = TRAF-Domäne (As 67 - 202), CAT = Katalytische Domäne (As 212 - 523), HUbl1 = *Usp7/HAUSP Ubiquitin like domain* 1 (As 564 - 664), HUbl2 (As 684 - 770), HUbl3 (As 793 - 880), HUbl4 (As 894 - 974), HUbl5 (As 987 - 1080). Entnommen aus Rougé et al. [133]. **B:** Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von Usp7 mit den Bindestellen ausgewählter zellulärer und viraler Interaktionspartner.

peptidbindung bevorzugt hydrolysiert wird. Schaefer and Morgan [141] beschreiben eine Präferenz für K48 verknüpfte Ubiquitin-Ketten, während Ritorto et al. [142] eine verstärkte Spezifität gegenüber K11 und K63 feststellen konnten. Der C-Terminus von Usp7 besteht aus fünf sogenannten *Usp7/HAUSP Ubiquitin like domains* (HUbl). Diese haben regulatorische Funktion und verstärken die katalytische Aktivität des Proteins um das bis zu 100fache [143, 144]. Neueste Untersuchungen von Rougé et al. [133] zeigen, dass die letzten 19 Aminosäuren des C-Terminus von Usp7 im Aktivierungsspalt der katalytischen Domäne binden und damit die katalytisch aktive Konformation stabilisieren (siehe Abbildung 7 A). Ein allosterischer positiver Regulator der Usp7 Aktivität ist die Guanosin 5′-Monophosphat Synthase (GMPS), welche an HUbl123 bindet und damit eine Konformationsänderung von HUbl45 auslöst. HUbl45 bindet die katalytische Domäne, was die katalytische Triade im Aktiven Zentrum des Enzyms in eine aktive Konformation bringt [143]. Neueste Untersuchungen von Pfoh et al. [145] haben

nun gezeigt, dass über eine Bindung an die C-terminale Domäne aber auch Substratproteine deubiquitiniert werden können. Nach bisherigen Erkenntnissen binden diese Proteine an die HUbl2 über ein K-x-x-x-K Motif, das auch in GMPS vorliegt [145].

2.3.1 Zelluläre Interaktionspartner von Usp7

Die Entfernung von Ubiquitin durch Usp7 kann verschiedene Einflüsse auf das Zielprotein haben. Poly-Ubiquitinierung mit K48 verknüpften Ubiquitinen kennzeichnet Proteine in erster Linie für den Abbau im Proteasom, wodurch ihre Entfernung eine Stabilisierung des Substrates zur Folge hat [146]. Dies trifft zum Beispiel für p53 und Mdm2 zu, die beide durch Usp7 stabilisiert werden [134, 147]. Beide Proteine binden dafür mit einem ihrer P/A-x-x-S Motive an die gleiche Oberfläche in der N-terminalen TRAF-Domäne von Usp7, wobei Mdm2 eine ausgeprägtere Interaktion zeigt [136, 148]. Auch die Tatsache, dass Mdm2 vier bestätigte Bindestellen für Usp7 besitzt und p53 nur zwei, ist vermutlich für die bevorzugte Deubiquitinierung von Mdm2 verantwortlich [137]. Da Mdm2 die E3-Ubiquitin-Ligase von p53 ist, führt dessen Stabilisierung zum vermehrten Abbau von p53 und verhindert damit, dass Apoptose-Signalwege angeschaltet werden [149–151]. Unter genotoxischem Stress kann jedoch GMPS in den Zellkern lokalisieren, bindet an den C-Terminus von Usp7 und verstärkt die Bindung von p53 anstelle von Mdm2 an Usp7. Dies stabilisiert p53 und trägt zur Induktion der Apoptose bei [152].
Neben der Stabilisierung von Zielproteinen kann Usp7 auch die Lokalisierung eines Proteins durch die Beseitigung von Mono-Ubiquitinierung verändern. Dies wurde für die Proteine FoxO4 und PTEN gezeigt [153, 154]. Darüber hinaus kann Usp7 aber auch unabhängig von seiner Deubiquitinierungsaktivität zelluläre Signalwege beeinflussen. So ist z. B. die Verstärkung der Affinität von p53 für seine spezifischen Promotoren durch Bindung von Usp7 und auch die Dissoziation von *Promyelocytic leukemia nuclear bodies* (PML-NB) unabhängig von der katalytischen Aktivität von Usp7 [155–158].
Grundsätzlich spielt Usp7 bei zahlreichen zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle und scheint ein globaler Regulator der Genomintegrität und Genexpression zu sein. Diverse neuere Studien belegen z. B. eine Beteiligung an DNA-Schaden Reparatur Signalwegen [159–166]. Auch eine Funktion als epigenetischer Repressor in Drosophila konnte für Usp7 gezeigt werden. So deubiquitiniert Usp7 dort das Histon H2B in Abhängigkeit von GMPS und trägt damit zur Transkriptionsrepression bei [167, 168]. Außerdem ist Usp7 an der Regulation des Ubiquitinierungsstatus des Histons H2A beteiligt. Usp7 reguliert hierbei über Deubiquitinierung sowohl die Stabilität als auch die Aktivität der einzelnen Komponenten des *Polycomb repressive complex 1* (PRC1), der für die Ubiquitinierung von H2A verantwortlich ist. Die meisten Publikationen zeigen einen davon abhängigen positiven Effekt von Usp7 auf die H2A Ubiquitinierung und damit Repression der abhängigen Gene [169–174]. Eine weitere sehr wichtige Rol-

le spielt Usp7 bei der grundsätzlichen Erhaltung des Methylierungsmusters der DNA während der Replikation durch die zelluläre DNA-Methyltransferase DNMT1. In diesen Prozess sind viele weitere Faktoren involviert, unter anderem die Ubiquitin-Ligase UHRF1 (*Ubiquitin-like, containing plant homeo domain and RING finger 1*) und die Acetyltransferase Tip60 (*Tat-interactive protein 60*), die alle von Usp7 deubiquitiniert werden [175–182]. UHRF1 wird hierfür über sein K-x-x-x-K Motif von der HUbl2 Domäne gebunden, während Tip60 mit der TRAF-Domäne von Usp7 interagiert [145, 183]. Dies führt in Abhängigkeit vom Zellzyklus zur Stabilisierung und Aktivierung der jeweiligen Komponenten, wodurch Usp7 entscheidend zur Erhaltung der Genomintegrität beiträgt [175–182].
Auch an der DNA-Replikation an sich ist Usp7 beteiligt. Es unterstützt am Ende der S-Phase durch Binden des MCM-BP (*MCM-binding protein*) die Dissoziation von MCM (*Minichromosom maintenance*) Komplexen von der DNA [184]. Weitere Untersuchungen belegen, dass Usp7 außerdem an Replisomen angereichert und essentiell für das Fortlaufen der Replikationsgabel und der Replikationsinitiierung von neuen Replikationsursprüngen ist. Dies wird auf eine Bindung des Sumo-Proteins (*Small ubiquitin-like modifier*) auf sumoylierten Proteinen und ihre Deubiquitinierung durch Usp7 an Replikationsgabeln zurückgeführt, aber der genaue Mechanismus ist unklar [185, 186].

2.3.2 Virale Interaktionspartner von Usp7

Usp7 wurde ursprünglich als ein neuer zellulärer Interaktionspartner von ICP0 des Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) entdeckt [187]. Usp7 bindet mit seiner HUbl2 Domäne an ein K-x-x-x-K Motiv in ICP0 und deubiquitiniert es [145, 188]. Dies stabilisiert ICP0 und unterstützt damit die durch ICP0 ausgelöste Reaktivierung und Replikation von HSV-1 [140, 189, 190]. Im Laufe der Zeit wurden immer mehr Interaktionen von Usp7 mit viralen Faktoren beschrieben. Auch das Protein E1B-55k des Adenovirus Typ 5 (AdV5) bindet an die TRAF-Domäne von Usp7, was einen stabilisierenden Effekt auf E1B-55k hat [191]. Usp7 lokalisiert während der Infektion mit AdV5 zu den viralen Replikationszentren und in Abwesenheit oder unter Inhibition von Usp7 ist die Replikation signifikant reduziert. Außerdem konnten Ching et al. [191] zeigen, dass die Transformation von primären Nierenzellen aus neugeborenen Ratten von der Anwesenheit und Funktionalität von Usp7 abhängt [191]. Untersuchungen am Karposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV) zeigen hingegen einen negativen Einfluss von Usp7 auf die latente Replikation des Virus vermittelt durch die Bindung des *Latency-associated nuclear antigen 1* (LANA) an die TRAF-Domäne von Usp7 [192]. Auf die gleiche Weise interagiert Usp7 außerdem mit dem *Epstein-Barr nuclear antigen 1* (EBNA1) des Epstein-Barr-Virus (EBV) [139, 193]. Dies führt zu einer verstärkten Bindung von EBNA1 an die DNA des latenten Replikationsursprungs (*oriP*), wo EBNA1 dann als Komplex mit Usp7 und GMPS vorliegt. Usp7 deubiquitiniert dort das

Histon H2B wodurch die EBNA1 abhängige Transkription aktiviert wird [194]. Dies ist dabei gegensätzlich zur beobachteten Inaktivierung der Genexpression durch Usp7 abhängige H2B Deubiquitinierung in Drosophila [167, 168]. Gleichzeitig hat dieser Mechanismus jedoch einen negativen Effekt auf die latente Replikation von EBV, wobei der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht geklärt ist [139]. Darüber hinaus spielt die EBNA1-Usp7-Interaktion eine Rolle in der Transformation durch EBV, da zelluläre Substrate wie p53 verdrängt und nicht mehr stabilisiert werden können [135, 193]. Ein solcher Mechanismus wird auch beim p53 Abbau durch den *Viral interferon regulatory factor 1* (vIRF1) von KSHV vermutet [195].

2.4 Ziel dieser Arbeit

Das 2008 entdeckte MCPyV konnte als Hauptursache für die Entstehung von MCC eindeutig identifiziert werden, jedoch fehlen bisher viele Erkenntnisse zur Tumorgenese und zum natürlichen Lebenszyklus des Virus [6, 17, 53, 196]. Gründe hierfür sind zum einen die unbekannte Ursprungszelle des MCC und zum anderen das Fehlen eines vollständig permissiven *in vitro* Replikationssystems. Die T-Antigene des Virus, vor allem das LT und sT, sind die entscheidenden Faktoren für die virale Replikation wie auch die Transformation von Zellen [197]. Besonders, weil im Tumor nur das sT und eine spezifische verkürzte Variante des LT exprimiert werden und diese für den Erhalt des transformierten Zustands der Zellen verantwortlich sind, stehen diese viralen Faktoren im Focus des Interesses [6, 17, 62, 197]. Die Untersuchung der Interaktionen der T-Antigene mit zellulären Faktoren und deren Einfluss auf zelluläre Signalwege wie auch den Lebenszyklus des MCPyV hat daher zentrale Bedeutung für das Verständnis der Biologie dieses Virus. Gerade im Hinblick auf Transformation können solche Erkenntnisse die Entwicklung von Therapeutika ermöglichen, die z. B. Interaktionen zwischen zellulären Faktoren und den T-Antigenen inhibieren und so bestimmte Signalwege, die zur Transformation führen, blockieren. Auch die Inhibierung der Replikation des Virus könnte in Hochrisiko-Patienten ein Weg sein, eine starke Replikation und die damit verbundene Möglichkeit der Integration des viralen Genoms mit Entstehung eines MCC zu verhindern.
Um neue zelluläre Interaktionspartner der MCPyV T-Antigene zu entdecken wurden in meiner Masterarbeit Tandem-Affinitätsaufreinigungen durchgeführt [132]. Die dabei als potentieller Interaktionspartner identifizierte Ubiquitin spezifische Protease 7 (Usp7) war von besonderem Interesse, da sie bisher für kein anderes Polyomavirus beschrieben wurde. Außerdem spielt dieser Faktor in diversen zellulären Prozessen, wie der Tumorsuppression und der DNA-Replikation, aber auch im Lebenszyklus vieler anderer DNA-Viren eine Rolle (siehe Abschnitte 2.3.1 und 2.3.2). In Anbetracht der Tumorgenese aber auch der Replikation des MCPyV stellte daher die Untersuchung der Interaktion zwischen den MCPyV T-Antigenen und Usp7 einen vielversprechenden

Ansatz zum besseren Verständnis dieses Virus dar. Auf die genaue Charakterisierung der Interaktion von Usp7 mit den T-Antigenen des MCPyV folgte eine Analyse der Rolle von Usp7 im viralen Lebenszyklus. Die hier präsentierten Daten belegen die direkte Interaktion des MCPyV LT und Usp7, sowie den positiven Einfluss von Usp7 auf die DNA-Replikation des MCPyV. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Verstärkung der Bindung des LT an den viralen Replikationsursprung durch seine Interaktion mit Usp7 zurückzuführen. Damit liefert diese Arbeit weitreichende neue Erkenntnisse zum Verständnis der Replikation des MCPyV und zahlreiche Ansatzpunkte für nachfolgende Untersuchungen und mögliche Therapien.

3 Material

3.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Name	Hersteller
Accujetpro®	Brand (Wertheim)
Agarose Elektrophoresekammer	PeqLab (Erlangen)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Curix 60 Röntgenfilmentwickler	Agfa (Köln)
Digital Sonifier	Branson Ultrasonics (Danbury, CT, USA)
Eclipse TS100	Nikon GmbH (Düsseldorf)
Elektrophoresekammern Mini Protean® Tetra System	Biorad (München)
Elektroblotter CTI	A. Hartenstein (Würzburg)
Eppendorf Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg), Rotor A-4-81
Eppendorf Zentrifuge 5424R	Eppendorf (Hamburg); Rotor F 45-24-11
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg); Rotor F 45-30-11
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss (Jena)
Gelcam Phase 312nm für die Gelbild-detektion	Polaroid (Dreieich-Sprendlingen)
Gel Dryer Model 543	Biorad (München)
Gelschneidetisch	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Gradientenmischer	Sigma (München)
Hera freeze -80°C	Heraeus (Hanau)
Hera Safe Zellkulturbank Class II	Heraeus (Hanau)
Infinite M2000	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Intensilight C-HGFI	Nikon GmbH (Düsseldorf)
Kühlschränke, Gefrierer -20°C	Liebherr (Hamburg)
Leica DMI 6000 TCS SP5 Tandem Scanner	Leica (Wetzlar)
Megafuge 3.0 R	Heraeus (Hanau); Rotor #8074
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Jena)
Multitron pro	Infors HT (Einsbach)
Nanodrop ND-1000	PeqLab (Erlangen)
PCR-Bank	LTF Labortechnik (Wasserburg)
PCR-Cycler ep gradients	Eppendorf (Hamburg)
Photometer Untrospec® 3100 Pro	Amersham Biosciences (Freiburg)

Pipetman P2G, P10G, P100G, P200G, P1000G	Gilson (Middleton, USA)
Powersupply Power Pac Universal	Biorad (München)
Powersupply Power Pac 1000	Biorad (München)
Qubit® 2.0 Fluorometer	Invitrogen (Darmstadt)
Rotilabo-Block-Heater H250	Roth (Karlsruhe)
Rotor-Gene Q	Qiagen (Hilden)
Schüttelinkubator Certomat® BS-1	Sartorius (Göttingen)
Sigma 3-18K	Sigma (Osterode am Harz); Rotor 19776-H
Sorvall® RC26 Plus	DuPont (Neu-Isenburg); Rotor SLA-3000
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zellkulturbrutschrank	Binder (Tuttlingen)

3.2 Chemikalien

Standard Chemikalien wurden von Roth (Karlsruhe), Sigma (München), Fluka (Neu-Ulm) oder Merk (Darmstadt) bezogen.

3.3 Labormaterial und Zellkulturmaterial

Pipettenspitzen, serologische Pipetten, Zellkulturschalen und -flaschen, Reagenzgefäße sowie Falcons wurden von der Firma Falcon (Becton and Dickinson Europe; Le Pont de Claix, Frankreich), Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Kremsmünster, Österreich) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

3.4 Reagenzien und Laborhilfsmittel

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Laborhilfsmittel.

Name	**Hersteller**
3xFLAG® Peptide	Sigma (München)
Amicon® Ultra Centrifugal Filter Units 50k, 30k, 10k, 3k	Merk Millipore (Darmstadt)
AMP-PNP	Sigma (München)
Ampicillin Sodium Salt	Sigma (München)
Amylose Resin	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel	Sigma (München)

Aqua	B. Braun (Melsungen)
γ^{32}P-ATP (9, 25 MBq, 250 μCi)	Hartmann Analytic (Braunschweig)
dATP (100mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
dCTP (100mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
dGTP (100mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
dTTP (100mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Benzonase Nuclease	Sigma (München)
Biotin	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
BSA (*Bovine Serum Albumin*)	GE Healthcare (Freiburg)
cOmplete^{TM} Protease Inhibitor Cocktail/ Mini	Roche Diagnostics (Mannheim)
Cycloheximide Solution 100 mg/ ml	Sigma (München)
Deckgläser	A. Hartenstein (Würzburg)
Distilled Water DNase/ RNase free	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (München)
Gentamycinsulfat	Serva (Heidelberg)
GFP-Trap® _A	Chromotek (München)
Glutathione, reduziert	Sigma (München)
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare (Freiburg)
HBX 41, 108	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
His_6-Usp7, human rekombinant	#E-519 Boston Biochem (Cambridge, MA, USA)
illustra MicroSpin G-25 Columns	GE Healthcare (Freiburg)
IPTG	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Kanamycinsulfat	Roth (Karlsruhe)
Laboratory film	Parafilm (Neenah, WI, USA)
Lipofectamine^{TM} 2000	Invitrogen (Darmstadt)
Lipofectamine^{TM} RNAiMAX	Invitrogen (Darmstadt)
Lysozyme from chicken egg white	Sigma (München)
Magermilchpulver Sucofin®	Tsi GmbH & Co. KG (Zeven)
Maltose	Sigma (München)
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-al)	Sigma (München)
Novex TBE gels, 4 - 12 %	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht (Sondheim)
Paraformaldehyd (16 %)	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA)
PEI (Polyethylenimin)	Polyscience Inc. (Washington, USA)

Phosphatase, alkaline (AP)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Phusion® High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Poly d(I-C)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Polybrene®	Sigma (München)
Puromycin	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Ribolock	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
RNase H	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Röntgenfilme	Fuji-Film Europe (Düsseldorf)
Roti®-GelStain	Roth (Karlsruhe)
Roti®-PVDF-Membran Porengröße 0, 45 µm	Roth (Karlsruhe)
Rotor-Gene Multiplex PCR Kit	Qiagen (Hilden)
Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette G2/ MINI Dialysis Unit	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Sonicated Sperm DNA	Invitrogen (Karlsruhe)
Sterilfilter Millex-GP 0, 22 µm	Merk Millipore (Darmstadt)
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare (Freiburg)
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml	Qiagen (Hilden)
SuperScript® III Reverse Transcriptase	Invitrogen (Darmstadt)
T4 PNK	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
T4-DNA-Ligase (400 U/ ml)	Invitrogen (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase (2 000 000 U/ml)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Taq DNA Polymerase, recombinant	Invitrogen (Karlsruhe)
Tetracyclin Hydrochlorid	Roth (Karlsruhe)
Thrombin	Sigma (München)
Ultra Pure^{TM} Agarose	Invitrogen Darmstadt)
Vectashield mounty medium with Dapi	Vektor Laboratories Inc. (Burlingame, CA)
Whatman 3MM Papier	A. Hartenstein (Würzburg)
Whatman GD/X 25 Syringe Filter 0, 45 µm	GE Healthcare (Freiburg)
X-Gal	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
X-tremeGENE^{TM} HP DNA Transfection Reagent	Roche Diagnostics (Mannheim)

Zeozin	InvivoGen (San Diego, USA)

3.5 Lösungen und Puffer

3.5.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

Alle Puffer wurden in Millipore dH_2O angesetzt.

Tabelle 3: Allgemein verwendete Lösungen und Puffer.

Name	Zusammensetzung
6 x DNA-Ladepuffer	60 % (v/v) Glycerol
	0, 3 % (w/v) Bromphenolblau
	0, 3 % (v/v) Xylenecyanol
PBS, pH 7, 5	10 mM Na_2HPO_4
(*Phosphate Buffered Saline*)	140 mM NaCl
	25 mM KCl
	1 mM $CaCl_2$
	0, 5 mM $MgCl_2$
Permeabilisierungspuffer für	1 x PBS
Immunfluoreszenz	1 % (v/v) Triton X-100
	0, 1 % (w/v) Natriumcitrat
Blocklösung für	1 x PBS
Immunfluoreszenz	1 % (v/v) Triton X-100
	0, 5 % (v/v) Tween 20
	3 % (w/v) BSA Albumin Fraktion
TAE-Puffer, pH 7, 8	40 mM Tris HCl
	20 mM Essigsäure (100 %ig)
	1 mM EDTA
TE-Puffer, pH 7, 5	50 mM Tris HCl
	1 mM EDTA
Ripa-Puffer	50 mM Tris HCl pH 7, 5
	150 mM NaCl
	1 mM EGTA
	1 % (v/v) NP-40
	0, 5 % (w/v) DOC
	0, 1 % (w/v) SDS
	1 mM NaF
	2 mM β-Glycerophosphat
	1 mM Na_3VO_4

	0, 4 mM PMSF 1 Tablette cOmplete^{TM} Protease Inhibitor Cocktail auf 50 ml
GST-Pulldown-Puffer	20 mM HEPES NaOH pH 7, 9 250 mM NaCl 0, 5 mM EDTA 10 % (v/v) Glycerol 0, 1 % (v/v) Triton X-100 1 mM DTT

3.5.2 Reagenzien für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und den Westernblot

Alle Puffer wurden in Millipore dH_2O angesetzt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Reagenzien für die SDS-PAGE.

Name	**Zusammensetzung**
4 x Protein Ladepuffer	12 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerol (86 %) 200 mM Tris HCl, pH 7, 0 0, 004 % (w/v) Bromphenolblau 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
6 x Protein Ladepuffer	18 % (w/v) SDS 60 % (v/v) Glycerol (86 %) 0, 3 M Tris HCl, pH 7, 0 0, 006 % (w/v) Bromphenolblau 7, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Sammelgel	5 % (v/v) Acryl-Bisacrylamid 125 mM Tris HCl, pH 6, 8 0, 1 % (w/v) SDS 0, 1 % (w/v) Ammonium Persulfat 0, 1 % (v/v) TEMED
Trenngel	6 - 15 % (v/v) Acryl-Bisacrylamid 375 mM Tris HCl, pH 8, 8 0, 1 % (w/v) SDS 0, 1 % (w/v) Ammonium Persulfat 0, 04 % (v/v) TEMED

SDS-Gelelektrophorese-Puffer (1x)	25 mM Tris 192 mM Glycin 3, 5 mM SDS

Tabelle 5: Zusammensetzung der Reagenzien für den Westernblot.

Name	**Zusammensetzung**
PBS-Tween	1x PBS 0, 05 % (v/v) Tween 20
Blot-Puffer A, pH 10, 4	300 mM Tris 10 % (v/v) Methanol
Blot-Puffer B, pH 10, 4	25 mM Tris 10 % (v/v) Methanol
Blot-Puffer C, pH 9, 4	25 mM Tris 25 mM Aminohexansäure 10 % (v/v) Methanol

Tabelle 6: Für die Coomassiefärbung von SDS-Gelen verwendete Puffer.

Name	**Zusammensetzung**
Färber	50 % (v/v) H_2O 40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure (96 %ig) 0, 25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
Entfärber	50 % (v/v) H_2O 40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure (96 %ig)

Tabelle 7: Für die Silberfärbung von SDS-Gelen verwendete Puffer.

Name	**Zusammensetzung**
Fixierer	50 % (v/v) H_2O 40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure (96 %ig)
Waschlösung	70 % (v/v) H_2O 30 % (v/v) Ethanol

Sensitizer	0, 02 % (w/v) $Na_2S_2O_3$ in H_2O
Silberlösung	0, 1 % (w/v) $AgNO_3$ in H_2O 0, 02 % (v/v) Formaldehyd
Entwickler	2 % (w/v) Na_2CO_3 in H_2O 0, 04 % (v/v) Formaldehyd

3.5.3 Puffersysteme für die Immunpräzipitation von Proteinen aus Zellen.

Alle Puffer wurden in Millipore dH_2O angesetzt.

Tabelle 8: Puffer für die Immunpräzipitation mittels ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel.

Name	**Zusammensetzung**
Lysispuffer	50 mM Tris HCl pH 7, 4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % (v/v) Triton X-100 5 mM NaF 5 mM β-Glycerophosphat 0, 4 mM Na_3VO_4 1 Tablette cOmplete^{TM} Protease Inhibitor Cocktail auf 50 ml
Waschpuffer	50 mM Tris HCl pH 7, 4 500 mM NaCl 2 % (v/v) Triton X-100 1 mM EDTA 5 mM NaF 5 mM β-Glycerophosphat 0, 4 mM Na_3VO_4 1 Tablette cOmplete^{TM} Protease Inhibitor Cocktail auf 50 ml
TBS	50 mM Tris HCl pH 7, 5 150 mM NaCl
Elutionspuffer	160 ng/ µl 3xFLAG®-Peptide in TBS

Tabelle 9: Puffer für die Immunpräzipitation mittels GFP-Trap® _A.

Name	Zusammensetzung
10x Ripa	10 mM Tris HCl pH 7, 5 150 mM NaCl 5 mM EDTA 0, 1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Triton X-100 1 % (w/v) DOC 5 mM NaF 5 mM β-Glycerophosphat 0, 4 mM Na_3VO_4 0, 2 mM PMSF 1 Tablette cOmplete^{TM} Protease Inhibitor Cocktail auf 50 ml
Verdünnungspuffer	10 mM Tris HCl pH 7, 5 150 mM NaCl 0, 5 mM EDTA
Waschpuffer	10 mM Tris HCl pH 7, 5 150 mM NaCl 0, 5 mM EDTA
Hoch-Salz Waschpuffer	10 mM Tris HCl pH 7, 5 500 mM NaCl 0, 5 mM EDTA

3.5.4 Puffersysteme für die Proteinaufreinigung

Tabelle 10: Puffer für die Aufreinigung des MCPyV LT C-Terminus (Aminosäuren 259 - 818).

Name	Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM Tris HCl pH 9, 5 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0, 5 % (v/v) Triton X-100 1 mM PMSF 1 mg/ ml Lysozym 1 Tablette cOmplete^{TM} Protease Inhibitor Cocktail auf 50 ml

Waschpuffer	50 mM Tris HCl pH 9, 5 500 mM NaCl 2 mM EDTA 0, 5 % (v/v) Triton X-100
Cleavage-Puffer	50 mM Tris HCl pH 9, 5 500 mM NaCl 2 mM EDTA 20 U Thrombin
Dialysepuffer	25 mM Tris HCl pH 9, 5 500 mM NaCl 2 mM EDTA 0, 5 mM DTT

Tabelle 11: Puffer für die Aufreinigung des MCPyV MBP-sT.

Name	**Zusammensetzung**
Lysepuffer	20 mM Tris HCl pH 7, 5 200 mM NaCl 1 mM DTT 10 mM $MgCl_2$ 10 % (v/v) Glycerol 1 mg/ ml Lysozym 20 µg/ ml Benzonase 1 Tablette cOmplete^{TM} Protease Inhibitor Cocktail auf 50 ml
Waschpuffer	20 mM Tris HCl pH 7, 5 200 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 1 % (v/v) Glycerol
Elutionspuffer	20 mM Tris HCl pH 7, 5 200 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 1 % (v/v) Glycerol 10 mM Maltose

Tabelle 12: Puffer für die Aufreinigung des GST-Usp7 (Aminosäuren 1 - 1102).

Name	Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM NaH_2PO_4 pH 7, 4
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTT
	1 % (v/v) NP-40
	1 Tablette cOmplete^{TM} Protease Inhibitor Cocktail auf 50 ml
Waschpuffer	50 mM NaH_2PO_4 pH 7, 2
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTT
Elutionspuffer	50 mM Tris HCl pH 8, 0
	400 mM NaCl
	1 mM DTT
	0, 1 % (v/v) Triton X-100
	50 mM Glutathion
Dialysepuffer	25 mM Tris HCl pH 7, 5
	200 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTT
	1 % (v/v) Glycerol

Tabelle 13: Puffer für die Aufreinigung des GST-Usp7 Aminosäuren 1 - 215, 212 - 561, 561 - 916 und 913 - 1102.

Name	Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM Tris HCl pH 7, 5
	100 mM NaCl
	2 mM EDTA
	0, 25 % (v/v) Triton X-100
	1 mM PMSF
	1 mg/ ml Lysozym
Waschpuffer	50 mM Tris HCl pH 7, 5
	500 mM NaCl
	2 mM EDTA
	1 mM PMSF
Elutionspuffer	50 mM Tris HCl pH 8, 0

	50 mM Glutathion
	250 mM NaCl
Dialysepuffer	25 mM Tris HCl pH 7, 5
	200 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTT
	1 % (v/v) Glycerol

Tabelle 14: Puffer für die Aufreinigung von ubiquitinierten Proteinen aus HEK293 Zellen und den *in vitro* Deubiquitinierungsassay.

Name	**Zusammensetzung**
Lysepuffer	50 mM Tris HCl pH 7, 5
	150 mM NaCl
	1 % (v/v) Triton X-100
	1 % (w/v) DOC
	0, 1 % (w/v) SDS
	10 mM NaF
	20 mM β-Glycerophosphat
	10 mM Na_3VO_4
	10 mM PMSF
	250 mM Iodacetamid (IAA)
	25 mM N-Ethylmaleimid (NEM)
	10 µM MG-132
	1 Tablette cOmplete^{TM} Protease Inhibitor Cocktail Mini auf 5 ml
Verdünnungspuffer	50 mM Tris pH 7, 5
	150 mM NaCl
Waschpuffer	50 mM Tris pH 7, 5
	150 mM NaCl
	1 % (v/v) Triton X-100
Hoch-Salz Waschpuffer	50 mM Tris pH 7, 5
	500 mM NaCl
	1 % (v/v) Triton X-100
Elutionspuffer	20 mM Tris pH 8, 5
	150 mM NaCl
	4 mM Biotin
Dialysepuffer	50 mM Tris pH 8, 5
	500 mM NaCl

	1 mM EDTA
Reaktionspuffer	50 mM Tris pH 8, 0
	50 mM NaCl
	1 mM EDTA
	10 mM DTT
	5 % (v/v) Glycerol

3.5.5 Puffer für die Herstellung kompetenter Bakterien

Die Puffer wurden in Millipore H_2O angesetzt und steril filtriert.

Tabelle 15: Verwendete Puffer für die Herstellung kompetenter Bakterien.

Puffer	**Zusammensetzung**
TFB1-Puffer, pH 5, 8	15 % (v/v) Glycerol
(CH_3COOH)	10 mM $CaCl_2$
	30 mM Kaliumacetat
	100 mM $RbCl_2$
	50 mM $MnCl_2$
TFB2-Puffer	15 % (v/v) Glycerol
	10 mM MOPS
	75 mM $CaCl_2$
	10 mM $RbCl_2$

3.5.6 Puffer für den *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)

Die Puffer wurden in Aqua (B. Braun) angesetzt.

Tabelle 16: Puffer für den *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA).

Puffer	**Zusammensetzung**
Hypotonischer Puffer	10 mM HEPES NaOH pH 7, 9
	10 mM KCl
	0, 1 mM EDTA
	2, 5 mM DTT
	1 mM PMSF
Kernextraktspuffer	20 mM HEPES NaOH pH 7, 9
	400 mM NaCl
	25 % (v/v) Glycerol

	1 mM EDTA
	2, 5 mM DTT
	1 mM PMSF
Annealing Puffer	10 mM Tris HCl pH 8, 0
	1 mM EDTA
	50 mM NaCl
Geltrocknungspuffer	20 % (v/v) Ethanol
	10 % (v/v) Glycerol

3.6 Reagenzsysteme

Tabelle 17: Verwendete Reagenzsysteme.

Name	**Hersteller**
Biorad Protein Assay	Biorad (München)
DNA Plasmid Purification Kit NucleoBond® PC 100	Macherey-Nagel (Düren)
PeqGold Plasmid Miniprep Kit	Peqlab (Erlangen)
MTT Cell Growth Kit	Millipore (Billerica , USA)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel (Düren)
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Qubit® dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen (Darmstadt)
Qubit® RNA HS Assay Kit	Invitrogen (Darmstadt)
Qubit® Protein Assay Kit	Invitrogen (Darmstadt)
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
femto LUCENT^{TM} PLUS-HRP	G-Biosciences (St. Louis, USA)

3.7 Bakterienstämme

Escherichia coli (*E. coli*) Top 10 (Invitrogen, Karlsruhe); *E. coli* BL21 Star (Invitrogen, Karlsruhe); *E. coli* T7 Express *lysY/I^q* (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main); MAX Efficiency® DH10Bac^{TM} Competent Cells (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main).

3.8 Zelllinien

Tabelle 18: Verwendete Zelllinien.

Name	Beschreibung
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen, transformiert durch Integration der ersten 4344 Bp des AdV5 Genoms (ATCC Nr. CRL-1573).
H1299	Humane epitheliale Lungenzellen, isoliert aus einem non-small cell Lungenkarzinom, p53 negativ (ATCC Nr. CRL-5803).
H1299 sT	H1299 Zellen, die stabil MCPyV sT exprimieren durch Transduktion mit γ-retroviralem Vektor MSCV-N MCV sT und Selektion mit Puromycin [Diese Arbeit].
H1299 Kontrolle	H1299 Zellen mit stabiler Integration von pSUPER-retro-puro (HC2) [191].
H1299 shUsp7	H1299 transduziert mit pSUPER-shUsp7 und selektioniert mit Puromycin [191].
Pfsk-1	Fibroblastenzelllinie, isoliert aus einem supratentorialen primitiven neuroektodermalen Tumor (ATCC Nr. CRL-2060).
HCT116 wt	Humane Kolonzelllinie, isoliert aus einem kolorektalen Karzinom, Mutation im *ras* Proto-Onkogen (ATCC Nr. CCL-247).
HCT116 k/o Usp7	HCT116 Zellen mit homozygotem k/o des Usp7 Gens [147].
HCT116 LT	HCT116 wt Zellen, die stabil das MCPyV LT exprimieren durch Transduktion mit γ-retroviralem Vektor MSCV-N MCV LT FL und Selektion mit Puromycin [Diese Arbeit].
HCT116 sT	HCT116 wt Zellen, die stabil das MCPyV sT exprimieren durch Transduktion mit γ-retroviralem Vektor MSCV-N MCV sT und Selektion mit Puromycin [Diese Arbeit].
Sf9	Immortalisierte Insekten-Zelllinie aus Ovar-Zellen des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* (ATCC Nr. CRL-1711).

3.9 Medien

3.9.1 Medien für die Bakterienkultur

Luria-Broth-Medium (LB-Medium) Luria/ Miller (Roth, Karlsruhe):
Einwaage von 25 g/ l, Autoklavieren 15 Minuten, 121°C, 1, 1 kg/ cm^2.

2xYT-Medium (Roth, Karlsruhe):
Einwaage von 31 g/ l, Autoklavieren 15 Minuten, 121°C, 1, 1 kg/ cm^2.

Für LB/ 2xYT-Amp: Zugabe von 100 mg/ l Ampicillin.
Für LB/ 2xYT-Kana: Zugabe von 50 mg/ l Kanamycin.
Für LB/ 2xYT-Zeo: Zugabe von 50 mg/ l Zeozin.
Für LB/ 2xYT-Tetra-Kana-Genta: Zugabe von 10 mg/ l Tetrazyclin, 50 mg/ l Kanamycin und 7 mg/ ml Gentamycin.

Blasticidin-Medium Fast-Media® Blas TB (InvivoGen, San Diego, USA):
Ansetzen nach Herstelleranweisung.

Luria-Broth-Agarplatten (LB-Platten) (Roth, Karlsruhe):
Einwaage von 40 g/ l, Autoklavieren 15 Minuten, 121°C, 1, 1 kg/ cm^2.

Für LB-Amp-Platten: Nach Abkühlen auf 55°C Zugabe von 100 mg/ l Ampicillin.
Für LB-Kana-Platten: Nach Abkühlen auf 55°C Zugabe von 50 mg/ l Kanamycin.
Für LB-Zeo-Platten: Nach Abkühlen auf 55°C Zugabe von 50 mg/ l Zeozin.
Für LB-Tetra-Kana-Genta-Platten: Nach Abkühlen auf 55°C Zugabe von 10 mg/ l Tetrazyclin, 50 mg/ l Kanamycin und 7 mg/ ml Gentamycin.

Blasticidin-Agarplatten Fast-Media® Blas Agar (InvivoGen, San Diego, USA):
Ansetzen nach Herstelleranweisung.

3.9.2 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Tabelle 19: Medien und Reagenzien für die Zellkultur.

Name	Hersteller
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + Glutamax	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Nr. 1640 Medium)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

Opti-MEM® (Minimal Essential Medium) I Reduced Serum Medium	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Insect-XPRESS^{TM} Protein-free Insect Cell Medium with L-glutamine	Lonza (Basel, Schweiz)
Trypan Blue solution 0, 4 %	Sigma (München)
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) - calcium, - magnesium	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
FBS (Fetal Bovine Serum)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
L-Glutamin 200 mM (100x)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
PenStrep (10 U/ µl Penicillin/ 10 µg/ µl Streptomycin)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Trypsin/EDTA 0, 05 % (1x)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Gelatin solution Type b 2 % in H_2O	Sigma (München)
HEPES (1 M)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

3.10 Nukleinsäuren

3.10.1 Primer und siRNAs

Primer und siRNAs wurden von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert und sind im Folgenden aufgelistet.

Tabelle 20: Verwendete Primer.

Primer	Sequenz	Verwendungszweck
MCPyV-ori1	5′-AATTCAAGTTGGCAGAGGCTT GGGGCTCCTAGCCTCCGAGGCCT CTGGAAAAAAAAGAGAGAGGC CTCTGAGGCTTAAGAGGCTTAAT TAG-3′	Generierung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gegen den MCPyV *ori* zur Verwendung im EMSA.
MCPyV-ori2	5′-AATTCTAATTAAGCCTCTTAAG CCTCAGAGGCCTCTCTCTTTTTT TCCAGAGGCCTCGGAGGCTAGG AGCCCCAAGCCTCTGCCAACTT G-3′	
Random Hexamer	5′-NNNNNN-3′ N = A, T, G, oder C	Synthese von cDNA aus RNA
MCV-YFP-N-F-BsrGI	5′-CTGTACAAGGGAGCAGGTGCA GGAGCAATGGATTTAGTCCTAAA TAGG-3′	Klonierung MCPyV tLT in pEYFP-N1.
M11-YFP-	5′-CGCGGCCGCTTCATCTGGGCT	

N-R-Not	GCCGGG-3′	
SBP-Tag-Fw	5′-CGATATCATGGACGAGAAGAC CACCGGC-3′	Klonierung eines SBP-Tags in pMTBS.
SBP-Tag-Rev	5′-GGGATCCGCCCGGGC-3′	
YFP-NdeI-Fw	5′-CATATGATGGTGAGCAAGGGC GAGG-3′	Klonierung eines C-terminalen YFP-Tags an MCPyV sT in pMTBS.
YFP-SalI-Rev	5′-GTCGACCTACAGCTCGTCCAT GCCGAG-3′	
sT-NcoI-Fw	5′-CCATGGGAAGAATATGGAACC TTTAAAGGATTATAT-3′	
sT-NdeI-Rev	5′-CATATGTCCGAAAAGGTGCAG ATGCAGTAAG-3′	
MCV LT 1206 - 26 Fw	5′-GGATATCATGGAGGAATACAG ATCCTCCTC-3′	Klonierung des MCPyV LT C-Terminus in pGEX-4T.
MCV LT 2857 - 85 Rev	5′-CCTCGAGTTATTGAGAAAAAG TACCAGAATCTTGGG-3′	
M13-Fw	5′-GTTTTCCCAGTCACGAC-3′	Überprüfung der Insertion des GST-Usp7-Fragments aus pFastbac1-GST-hUSP7 in Bacmid zur Baculovirus Herstellung.
M13-Rev	5′-CAGGAAACAGCTATGAC-3′	

Tabelle 21: Verwendete siRNAs. Alle wurden mit einem 3′-UU Überhang am *Sense*- und *Antisense*-Strang der Zielsequenz bestellt.

siRNA	**Zielsequenz**	**Verwendungszweck**
siUsp7 Tang	5‘-CCCAAATTATTCCGCGGCA AA-3′	Herunterregulation der Usp7 Expression, Zielsequenz entnommen aus Tang et al. [198].
siUsp7 Horst1	5‘-AGTCGTTCAGTCGTCGTA T-3′	Herunterregulation der Usp7 Expression, Zielsequenz entnommen aus van der Horst et al. [154].
siUsp7 Horst2	5‘-ACCCTTGGACAATATTCC T-3′	Herunterregulation der Usp7 Expression, Zielsequenz entnommen aus van der Horst et al. [154].
siControl1	5‘-AGGUAGUGUAAUCGCCU UG-3′	Unspezifische Kontrolle. [Eurofins Genomics].
siControl2	5‘-UAAUGUAUUGGAACGCA UA-3′	Unspezifische Kontrolle. [Eurofins Genomics].

3.10.2 Expressionsvektoren

Tabelle 22: Prokaryotische Expressionsvektoren.

Vektor	Beschreibung
pGEX-Usp7-1	Enthält cDNA kodierend für die Aminosäuren 1 - 215 des Usp7 Proteins kloniert in pGEX-4T1. Exprimiert N-terminal GST fusionierte TRAF-Domäne von Usp7. Amp^R. [#].
pGEX-Usp7-2	Enthält cDNA kodierend für die Aminosäuren 212 - 561 des Usp7 Proteins kloniert in pGEX-4T1. Exprimiert N-terminal GST fusionierte katalytische Domäne von Usp7. Amp^R. [#].
pGEX-Usp7-3	Enthält cDNA kodierend für die Aminosäuren 561 - 916 des Usp7 Proteins kloniert in pGEX-4T1. Exprimiert N-terminal GST fusioniert HUbl1, 2 und 3 von Usp7. Amp^R. [#].
pGEX-Usp7-4	Enthält cDNA kodierend für die Aminosäuren 913 - 1102 des Usp7 Proteins kloniert in pGEX-4T1. Exprimiert N-terminal GST fusioniert HUbl4 und 5 von Usp7. Amp^R. [#].
pMMt	Enthält MCPyV sT im Vektor pMAL. Exprimiert MCPyV sT mit einem N-terminalen MBP-Tag und einer TEV-Protease Schnittstelle zwischen MBP und sT. Amp^R. Zur Verfügung gestellt von Christopher Buck (NIH, MD, USA).
pGEX-LT-C	Enthält kodierende Sequenz für die Aminosäuren 259 - 818 des MCPyV LT. Kloniert in pGEX-4T über Amplifikation der Basen 1206 - 2885 des LT aus pCMV2B-ER mittels der Primer MCV LT 1206 - 26 Fw und MCV LT 2857 - 85 Rev und über anschließenden Restriktionsverdau mit *EcoRV* und *XhoI*. Amp^R. [Diese Arbeit].
pUC18	Expressionsvektor für exogene Gene in Prokaryoten. Enthält *lacZ* Gen als Marker für erfolgreiche Insertion eines Gens. Verwendet als Träger-DNA und Mock Kontrolle im MCPyV Replikationsassay. Amp^R. [199].

Amp^R: Ampicillin-Resistenz; [#]: Zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Dobner, Heinrich-Pette-Insitut, Hamburg.

Tabelle 23: Eukaryotische Expressionsvektoren.

Vektor	Beschreibung
pMK-MCPyV*syn*	Enthält in einem pMK-Vektor ein replikationskompetentes MCPyV Genom, hergestellt aus einer Konsensussequenz von 13 MCPyV Sequenzen aus MCC. Über einen *SacI* Verdau lässt sich das bakterielle Rückgrat entfernen. Amp^R. [97].
pCMV-Tag-2B	Leervektor, enthält einen FLAG®-Tag N-terminal von der *Multiple Cloning Site* (MCS). Kan^R.
pCMV2B-tER	Enthält die verkürzte frühe Region des MCPyV aus der MCC Zelllinie MCCL-12 kloniert über *EcoRV* und *XhoI*. Exprimiert FLAG®-tLT (Aminosäuren 1 - 244 des LT) und schwach FLAG®-sT. Kan^R. [65].
pCMV2B-tLT	Enthält die frühe Region des MCPyV aus der MCC Zelllinie MCCL-12 ohne Intron hergestellt aus cDNA und kloniert über *EcoRV* und *XhoI*. Exprimiert FLAG®-tLT (Aminosäuren 1 - 244 des LT). Kan^R. [§].
pCMV2B-ER	Enthält die frühe Region aus dem MCPyV Genom in pMK-MCPyV*syn*. Exprimiert FLAG®-LT, FLAG®-57kT und schwach FLAG®-sT. Kan^R. [65].
pADL*	Enthält MCPyV LT ohne das erste Intron und mit stiller Mutation der 57kT Spleißstelle. Exprimiert MCPyV LT. Zeo^R. Zur Verfügung gestellt von Christopher Buck (NIH, MD, USA) (Addgene Plasmid # 32097).
pMTBS	Enthält MCPyV sT mit stiller Mutation der ersten Spleißstelle und still eingefügter *NcoI* Schnittstelle. Exprimiert nur sT. Blas^R. Zur Verfügung gestellt von Christopher Buck (NIH, MD, USA) (Addgene Plasmid # 32226).
pMSCV-N MCV LT FL	γ-retroviraler Vektor, enthält MCPyV LT ohne erstes Intron aus MCPyV Genom R17a. Exprimiert MCPyV LT mit N-terminalen FLAG®-HA-Tag. Amp^R, Puro^R. Zur Verfügung gestellt von Karl Munger (Addgene Plasmid # 37862).
pMSCV-N MCV sT	γ-retroviraler Vektor, enthält MCPyV sT aus MCPyV Genom R17a. Exprimiert MCPyV sT mit N-terminalen FLAG®-HA-Tag. Amp^R, Puro^R. Zur Verfügung gestellt von Karl Munger (Addgene Plasmid # 37861).

pNTAP B	Leervektor, enthält N-terminal von der MCS ein Streptavidin Bindepeptid (SBP) und ein Calmodulin Bindepeptid (CBP), die zusammen einen s. g. TAP-Tag ergeben. Kan^R. Agilent Technologies Stratagene Products Division (CA, USA.)
pNTAP-tER	Frühe Region des MCPyV aus pCMV2B-tER wurde in pNTAP B kloniert über *EcoRV* und *XhoI*. Exprimiert CBP-SBP-tLT und schwach CBP-SBP-sT. Kan^R. [132].
pNTAP-tLT	Frühe Region des MCPyV aus pCMV2B-tLT wurde in pNTAP B kloniert über *EcoRV* und *XhoI*. Exprimiert CBP-SBP-tLT. Kan^R. [Diese Arbeit].
pNTAP-ER	Frühe Region des MCPyV aus pCMV2B-ER wurde in pNTAP B kloniert über *EcoRV* und *XhoI*. Exprimiert CBP-SBP-LT, CBP-SBP-57kT und schwach CBP-SBP-sT. Kan^R. [132].
pNTAP-LT	Frühe Region des MCPyV aus pADL* wurde in pNTAP B kloniert über *EcoRV* und *XhoI*. Exprimiert CBP-SBP-LT. Kan^R. [Diese Arbeit].
pMTBS-SBP	Ein SBP-Tag wurde durch PCR mittels der Primer SBP-Tag-Fw und SBP-Tag-Rev aus pNTAP B amplifiziert und über *EcoRV* und *BamHI* in pMTBS kloniert. Exprimiert N-terminal SBP-Tag fusioniertes MCPyV sT. Blas^R. [Diese Arbeit].
pEYFP-N1	Kodiert für das *Enhanced Yellow Fluorescent Protein* (eYFP), einer Variante von GFP. Die MCS des Vektors liegt N-terminal vor der YFP codierenden Sequenz. Zusätzlich liegen C-terminal zum YFP Gen mehrere Restriktionsschnittstellen, die auch zur Klonierung genutzt werden können. Kan^R. [#].
pEYFP-C1	Kodiert für YFP, siehe pEYFP-N1. Die MCS des Vektors liegt C-terminal zum YFP-Gen vor dem Stop-Codon. Zusätzlich sind auch N-terminal zwischen dem Promotor und der YFP codierenden Sequenz mehrere Restriktionsschnittstellen vorhanden. Kan^R. [#].
pEYFP-p53-N	p53 in pEYFP-C1 kloniert über *XhoI* und *EcoRI*. YFP-Tag am N-Terminus von p53. Kan^R. [#].
pEYFP-p53-C	p53 in pEYFP-C1 kloniert über *NheI* und *AgeI*. YFP-Tag am C-Terminus von p53. Kan^R. [#].
pEYFP-ER-N	Frühe Region des MCPyV aus pCMV2B-ER kloniert in pEYFP-N1 über *BsrGI* und *NotI*. Exprimiert N-terminal YFP fusioniertes LT, 57kT und sT. Kan^R. [65].

pEYFP-ER-C	Frühe Region des MCPyV aus pCMV2B-ER kloniert in pEYFP-N1 über *NheI* und *AgeI*. Exprimiert C-terminal YFP fusioniertes LT und 57kT und schwach sT ohne Tag. Kan^R. [65].
pEYFP-tER-N	Frühe Region des MCPyV aus pCMV2B-tER kloniert in pEYFP-N1 über *BsrGI* und *NotI*. Exprimiert N-terminal YFP fusioniertes tLT und sT. Kan^R. [65].
pEYFP-tER-C	Frühe Region des MCPyV aus pCMV2B-tER kloniert in pEYFP-N1 über *NheI* und *AgeI*. Exprimiert C-terminal YFP fusioniertes tLT und schwach sT ohne Tag. Kan^R. [65].
pEYFP-tLT-N	MCPyV tLT ohne Intron kloniert in pEYFP-N1 über Amplifikation des tLT aus pCMV2B-tLT mittels der Primer MCV-YFP-N-F-BsrGI und M11-YFP-N-R-NotI und über anschließenden Restriktionsverdau mit *BsrGI* und *NotI*. Exprimiert N-terminal YFP fusioniertes tLT. Kan^R. [Diese Arbeit].
pEYFP-LT-N	MCPyV LT ohne das erste Intron und mit stiller Mutation der 57kT Spleißstelle aus pADL* kloniert in peYFP-N1 über *NotI*. Exprimiert N-terminal YFP fusioniertes LT. Kan^R. [200].
pEYFP-sT-N	MCPyV st über *BamHI* und *XbaI* aus pMTBS rausgeschnitten und in pEYFP-C1 ligiert. Exprimiert N-terminal YFP fusioniertes MCPyV sT. Kan^R. [Diese Arbeit].
pMTBS-YFP	Exprimiert C-terminal YFP fusioniertes MCPyV sT. C-Terminus von sT (Bp 251 - 561) wurde mit den Primern sT-NcoI-Fw und sT-NdeI-Rev amplifiziert und in pCR2.1 zwischenkloniert. YFP wurde aus pEYFP-N1 mit den Primern YFP-NdeI-Fw und YFP-SalI-Rev amplifiziert und zwischenkloniert in pCR2.1. Beide wurden mit *NdeI* und *EcoRI* aus pCR2.1. ausgeschnitten und zusammen in pCR2.1 kloniert. Das Fragment wurde dann über *NcoI* und *SalI* in ebenfalls damit verdauten pMTBS ligiert. $Blas^R$. [Diese Arbeit].
pCMV-HA-Ubi	Drei Kopien des humanen Ubiquitin-C-Gens kloniert in pCMV-HA. Exprimiert Fusionsprotein aus drei Ubiquitin-C Proteinen jeweils mit N-terminalem HA-Tag. Amp^R. Zur Verfügung gestellt von Klaus Ruckdeschel, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg.
pSUPER-shUsp7	Exprimiert shRNA gegen Usp7 mRNA kloniert in pSUPER-retro-puro. Amp^R, $Puro^R$. [#], [191].

pcDMX3b-Flag-AdV5-E4orf3/4	Exprimiert adenovirales Protein E4orf3/4 mit FLAG®-Tag. Amp^R. [#].
pCDNA p53	Exprimiert p53. Amp^R. [65].
R690-Mo-gagpol	Exprimiert γ-retrovirale *gag-pol* Gene. Amp^R. [+].
phCMV-VSV-G env	Exprimiert VSV-G Envelope Protein des Vesicular Stomatitis Virus. Amp^R. [+].
pFastbac1-GST-hUSP7	Donorvektor zur Herstellung baculoviraler Überstände, enthält synthetische cDNA Sequenz des humanen Usp7 Gens, für Expression von N-terminal GST fusioniertem Usp7 in Insektenzellen. Amp^R, Gen^R. Zur Verfügung gestellt von Titia Sixma (Addgene Plasmid # 63573).
pCDNA-Usp7	Enthält cDNA von Usp7. Exprimiert Myc-Tag fusioniertes Usp7. Amp^R. [#].
pCR2.1.	TA-Vektor zur Zwischenklonierung über stumpfe Enden. Amp^R, Kan^R. Thermo Scientific (Waltham, MA, USA).

Resistenzgene: Kan^R: Kanamycin; Amp^R: Ampicillin; Gen^R: Gentamycin; $Blas^R$: Balsticidin; Zeo^R: Zeozin. [§]: Hergestellt von Claudia Schmidt, Arbeitsgruppe Fischer, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg. [#]: Zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Dobner, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg. [+]: Zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Stocking, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg.

3.11 Standardmarker

Protein-Größenstandard: PageRuler^{TM} Unstained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot); Roti-Mark Prestained (Roth, Karlsruhe); Color Protein Standard, Broad Range (New England Biolabs, Schwalbach, Traunstein).
DNA-Größenstandard: GeneRuler^{TM} 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot).

3.12 Restriktionsendonukleasen und dazugehörige Puffer

Es wurden Fast-Digest Restriktionsendonukleasen von Fermentas (St. Leon-Rot) mit dem vom Hersteller gelieferten Puffersystem verwendet.

3.13 Antikörper

Tabelle 24: Verwendete primäre Antikörper. Sofern nicht anders angegeben wurden Antikörper für den Westernblot in PBS-Tween mit 5 % (w/v) Milchpulver und für die Immunfluoreszenz in Blocklösung angesetzt.

Name	Beschreibung
α-LT CM2B4	Erkennt das MCPyV LT, das 57kT sowie das tLT Protein [61]. Monoklonaler Maus-Antikörper IgG_{2b}, eingesetzt in der Verdünnung 1:1000 im Westernblot und 1:500 in der Immunfluoreszenzfärbung. Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg).
α-sT 2T2	Erkennt alle MCPyV T-Antigene, am stärksten das sT Protein [106]. Monoklonaler Maus-Antikörper IgG_1, eingesetzt in der Verdünnung 1:3 im Westernblot. Selbst hergestellt aus dem Überstand der 2T2-Hybridomzelllinie, die von Christopher Buck (NIH, MD, USA) zur Verfügung gestellt wurde.
α-Usp7 3D8	Erkennt humanes und Ratten-Usp7 Protein. Monoklonaler Ratten-Antikörper IgG_{2a}, eingesetzt in der Verdünnung 1:10 im Westernblot und in der Immunfluoreszenzfärbung. Hergestellt aus dem Überstand der 3D8-Hybridomzelllinie und zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Dobner (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg).
α-p53 DO-1	Erkennt humanes p53 Protein. Monoklonaler Maus-Antikörper IgG_{2b}, eingesetzt in der Verdünnung 1:1000 im Westernblot. Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg).
α-Aktin C4	Erkennt alle Formen von Aktin in Vertebraten. Monoklonaler Maus-Antikörper $IgG_{2b\kappa}$, eingesetzt in der Verdünnung 1:10 000 im Westernblot, Chemicon (Billerica, MA, USA).
α-HA 3F10	Anti-HA-Peroxidase, High Affinity, erkennt HA-Tag. HRP konjugierter monoklonaler Ratten-Antikörper IgG_1, eingesetzt in der Verdünnung 1:8000 in PBS-Tween mit 0, 4 % (w/v) Milchpulver im Westernblot. Roche Diagnostics (Mannheim).
α-GFP 3H9	Erkennt GFP, YFP, CFP. Monoklonaler Ratten-Antikörper IgG_{2a}, eingesetzt in der Verdünnung 1:1000 im Westernblot. Chromotek (München).

α-FLAG® M2	Erkennt FLAG®-Tag. Monoklonaler Maus-Antikörper IgG_1, eingesetzt in der Verdünnung 1:2000 im Westernblot und 1:1000 in der Immunfluoreszenzfärbung. Sigma (München).
α-Ubiquitin P4D1	Erkennt Ubiquitin, Polyubiquitin and ubiquitinierte Proteine aller Arten. Monoklonaler Maus-Antikörper IgG_1, eingesetzt in der Verdünnung 1:1000 im Westernblot, Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA).
Phalloidin	Alexa Fluor® 633 konjugiertes Phalloidin, bindet Aktin, eingesetzt in der Verdünnung 1:200 in der Immunfluoreszenzfärbung. Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

Tabelle 25: Verwendete sekundäre Antikörper. Sofern nicht anders angegeben wurden Antikörper für den Westernblot in PBS-Tween mit 5 % (w/v) Milchpulver und für die Immunfluoreszenz in Blocklösung angesetzt.

Name	**Beschreibung**
α-Mouse IgG-HRP	HRP konjugierter anti-Maus Antikörper aus der Ziege, eingesetzt in der Verdünnung 1:3000 im Westernblot. Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg).
α-Rat IgG-HRP	HRP konjugierter anti-Ratte Antikörper aus der Ziege, eingesetzt in der Verdünnung 1:3000 im Westernblot. Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg).
α-Mouse IgG -FITC	FITC konjugierter anti-Maus Antikörper aus der Ziege, eingesetzt in der Verdünnung 1:1000 in der Immunfluoreszenzfärbung. Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg).
α-Rat IgG-RRX	Rhodamine Red^{TM}-X (RRX) konjugierter anti-Ratte Antikörper aus der Ziege, eingesetzt in der Verdünnung 1:2000 in der Immunfluoreszenzfärbung. Jackson Immuno Research (West Grove, PA, USA).

3.14 Software

Microsoft Office Programme (Powerpoint, Word, Excel), CLC DNA Workbench, Leica Confocal Software, Adobe Photoshop CS5, GraphPad Prism 5, ImageJ, Rotorgene Q Series Software.

4 Methoden

4.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien auf LB-Agar-Platten erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Flüssigkulturen für die Plasmidvervielfältigung wurden in LB-Medium oder bei Low-Copy Plasmiden in 2xYT-Medium mit einer Bakterien-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator mit einer Schüttel-Frequenz von 250 rpm inkubiert. Der Antibiotika-Zusatz richtete sich nach den vorhandenen Resistenz-Genen des transformierten Vektors. Bei Bakterien, die mit γ-retroviralen Vektoren transformiert waren, wurde die Inkubation grundsätzlich bei 30°C durchgeführt. Die Kultivierung von Bakterien für die Proteinexpression ist für das jeweilige Protein separat beschrieben.

4.2 Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen

Durch die Bestimmung der optischen Dichte einer Bakteriensuspension lässt sich eine Aussage über die Zelldichte der Lösung treffen. Die optische Dichte wurde am Photometer bei 600 nm bestimmt und wird im Folgenden mit OD_{600} bezeichnet. Gemessen wurde in Halb-Mikro-Küvetten. Als Nullwert wurde das jeweils verwendete Medium gemessen.

4.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Damit Bakterien effizient DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen können, müssen sie mit verschiedenen Puffern behandelt werden, um die Permeabilität der Zellmembran zu erhöhen. Diese Methode zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurde bei *E. coli* Top Ten, *E. coli* BL21 Star und *E.coli* T7 Express *lysY/I*^{q} angewendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 15 zu finden.
20 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie des jeweiligen *E. coli* Stammes angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 2 ml zu 200 ml LB-Medium mit 4 mM $MgSO_4$ und 10 mM KCl gegeben und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD_{600} zwischen 0, 3 und 0, 5 inkubiert. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Bakterien fünf Minuten bei 4°C und 6000xg abzentrifugiert. Das Pellet wurde in insgesamt 60 ml TFB1-Puffer resuspendiert und für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in insgesamt 8 ml TFB2-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden sofort in 200 µl Aliquots in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C zur späteren Verwendung gelagert.

4.4 Hitzeschock-Transformation

Bei dieser Methode werden chemisch kompetente Bakterien (Abschnitt 4.3) einem Hitzeschock ausgesetzt, um die Aufnahme von DNA zu ermöglichen. Durch den Hitzeschock kommt es in den kompetenten Bakterien zur Fusion der äußeren und inneren Zellmembran der Bakterien. Dadurch bilden sich Poren in der bakteriellen Zellwand durch die DNA aufgenommen werden kann.
Zur chemischen Transformation eines Ligationsansatzes (Abschnitt 4.12) wurde der gesamte Ansatz zu 100 µl kompetenten *E. coli* Top10 (-80°C) gegeben. Bei der Transformation von reinen Plasmiden wurden circa 10 bis 100 ng Plasmid zu dem gewählten kompetenten Bakterienstamm gegeben. Die Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1 Minute. Danach wurden die Zellen für weitere fünf Minuten auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Zellen für 90 Minuten bei 37°C schüttelnd inkubiert.
Bei der Transformation eines Ligationsansatzes wurden 100 µl auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch den Antibiotika-Zusatz können nur die Zellen wachsen, die ein Plasmid mit einer entsprechenden Antibiotikaresistenz aufgenommen haben. Die Kontrolle der rekombinanten Klone erfolgte nach Plasmidisolation (Abschnitt 4.5.1) durch Restriktionsverdau (Abschnitt 4.9). Bei der Transformation von reinen Plasmiden zum Erhalt größerer Mengen DNA wurden nach der Inkubation im Schüttelinkubator circa 50 µl Transformationsansatz auf eine LB-Agar-Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum gegeben. Daraufhin wurde ein Drei-Ösen-Ausstrich der Suspension gemacht und die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.5 Nukleinsäuren-Aufreinigung

4.5.1 Analytische Plasmidaufreinigung

Zur analytischen Isolation von Plasmiden aus Klonierungen wurden 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmidisolation mit dem PeqGold Plasmid Miniprep Kit nach Herstelleranweisung. Die Isolation beruht auf alkalischer Lyse der Zellen und reversibler Bindung der Plasmide an eine Silikamembran unter hoher Salzkonzentration. Die Elution erfolgt unter niedriger Salzkonzentration.

4.5.2 Präparative Plasmidaufreinigung

Zum Erhalt größerer Mengen und qualitativ hochwertiger DNA, die für Transfektionen geeignet ist, wurden präparative Plasmidaufreinigungen durchgeführt. Dafür wurden 50 bis 300 ml LB-Medium oder 2xYT-Medium bei Low-Copy-Plasmiden mit

entsprechendem Selektionsantibiotikum mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C bzw. 30°C bei γ-retroviralen Plasmiden schüttelnd über Nacht inkubiert. Die Plasmidisolation erfolgte am nächsten Tag mittels des DNA Plasmid Purification Kits NucleoBond® PC 100 nach Herstelleranweisung. Die Isolation beruht auf alkalischer Lyse der Zellen und der Isolation der Plasmide über eine Ionenaustauschchromatographie. Die Elution erfolgt unter hoher Salzkonzentration. Anschließend wird eine Isopropanol/Ethanol-Fällung zur weiteren Reinigung der DNA und Entfernung der Salze durchgeführt. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und die DNA-Konzentration bestimmt (Abschnitt 4.6).

4.6 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA in Lösung lässt sich photometrisch bestimmen, da die aromatischen Basen der DNA ein Absorptionsmaximum bei 260 nm besitzen. Eine Absorption von 1, 0 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA. So kann aus der gemessenen Absorption die DNA-Konzentration errechnet werden. Proteine besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm, so dass sich aus dem Quotienten der OD bei 260 und 280 nm eine Aussage über die Reinheit einer DNA-Lösung treffen lässt. Der Quotient sollte bei 1, 8 oder höher liegen. Zur Ermittlung der DNA-Konzentration von Plasmidpräparationen wurde 1 µl Probe eingesetzt und am NanoDrop (PeqLab) gemessen. DNA-Konzentrationen von Proben, die zur weiteren Analyse in der Realtime-PCR verwendet wurden, wurden mit dem Qubit® 2.0 Fluorometer unter Verwendung des Qubit® dsDNA HS Assay Kits nach Herstellerprotokoll bestimmt.
Die RNA-Konzentration in Lösungen wurde ebenfalls mit dem Qubit® 2.0 Fluorometer unter Verwendung des Qubit® RNA HS Assay Kits nach Herstellerangaben bestimmt.

4.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierbei wird die negativ geladene DNA einem elektrischen Feld ausgesetzt, wodurch sie größenspezifisch aufgetrennt wird, da große DNA-Fragmente langsamer durch die Poren des Gels wandern, als kleinere. Durch Verwendung eines Größenstandards können Rückschlüsse auf die Größe von DNA-Fragmenten gezogen werden.
Die verwendeten Agarosegele wurden 0, 8 bis 1, 2 %ig (w/v) mit 0, 005 % (v/v) Roti®-GelStain in 1x TAE-Puffer angesetzt. Der verwendete Farbstoff ist ein Fluorophor, der bei Bindung von DNA sein Absorptionsspektrum ändert. Bei der Anregung mit UV-Licht kann so die Position von DNA-Fragmenten im Gel nach der Elektrophorese

sichtbar gemacht werden. Die Proben wurden vor Auftrag in die Taschen des Agarosegels mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in 1x TAE-Puffer bei circa 80 V. Die Detektion der DNA-Fragmente geschah für Fotoaufnahmen mit der Gelcam. Für die Präparation von DNA aus dem Gel wurde der Gelschneidetisch verwendet.

4.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden DNA-Fragmente amplifiziert und mittels entsprechender Primer mit Restriktionsschnittstellen versehen. Die hier beschriebene Methode bezieht sich auf die Klonierung von Plasmiden, die quantitative Realtime-PCR ist in Abschnitt 4.33 beschrieben. Grundsätzlich wurde in der PCR für Klonierungen eine Proofreading-Polymerase (Phusion® High-Fidelity PCR Kit, New England Biolabs) verwendet, um möglichst wenig Fehler zu generieren. Folgender PCR-Ansatz wurde standardmäßig verwendet: Template-DNA (Plasmid) < 250 ng, 5x Phusion HF Buffer 10 µl, 10 mM dNTPs 1 µl, 10 pmol/ µl Primer Forward 1 µl, 10 pmol/ µl Primer Reverse 1 µl, Phusion Polymerase 0, 5 µl, H_2O ad 50 µl. Als Puffer und dNTPs wurden die mit der Phusion Polymerase mitgelieferten Reagenzien verwendet. Als H_2O wurde immer DNase/ RNase freies Wasser verwendet. Die PCR-Bedingungen richteten sich nach den gewählten Primern und der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Die Annealing-Temperatur wurde zunächst 1 bis 2°C unter der Primer-Schmelztemperatur gewählt und bei Bedarf angepasst. Für die Elongationszeit wurden 30 Sekunden pro 1 kBp zu amplifizierenden DNA-Fragments verwendet. Die Bedingungen waren daher wie folgt: Initiale Denaturierung: 30 Sekunden 98°C; für 30 Zyklen: 10 Sekunden 98°C, 15 Sekunden Primer Annealing (45 bis 72°C), 72°C Elongation (30 Sekunden pro 1 kBp); finale Extension: 5 Minuten 72°C. Die Analyse der PCR erfolgte im Agarose-Gel (Abschnitt 4.7). Für die Klonierung in einen Vektor wurde das PCR-Fragment einem Restriktionsverdau (Abschnitt 4.9) unterzogen, gefolgt von einer Aufreinigung aus dem Agarosegel (Abschnitt 4.10). Die nach der Ligation (Abschnitt 4.12) erstellten Plasmide wurden grundsätzlich sequenziert, um ihre Korrektheit sicherzustellen (Abschnitt 4.13).

4.9 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme schneiden DNA an für das jeweilige Enzym spezifischen Sequenzen. Die Enzyme hinterlassen dabei entweder Schnittstellen mit einem einzelsträngigen Überhang, so genannte klebrige (*sticky*) Enden, oder ohne Überhang, sogenannte stumpfe (*blunt*) Enden. Durch die klebrigen Enden können zwei DNA-Stränge spezifisch wieder zusammengefügt werden, sofern die Überhänge komplementär zueinander sind. Bei der Entstehung von stumpfen Enden können alle DNA-Fragmente ohne

Überhang miteinander ligiert werden. Beide Arten von Restriktionsenzymen wurden in dieser Arbeit für verschiedene Anwendungen benutzt. Hier wird die grundsätzliche Methode zum Verdau von Plasmiden und PCR-Produkten beschrieben. Weitere Anwendungen werden in der jeweiligen Methode beschrieben. Es wurden die Fast Digest Restriktionsenzyme von Fermentas mit dem mitgelieferten 10x Puffersystem verwendet. Der Standardansatz umfasste: 0, 5 bis 1 µg DNA, 4 µl 10x FD (Fast Digest) Puffer, 1 µl Restriktionsenzym, dH_2O ad 40 µl. Je nach Bedarf wurden auch mehrere verschiedene Restriktionsenzyme gleichzeitig eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 10 bis 60 Minuten bei 37°C. Der komplette Verdauansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und die korrekte Größe überprüft (Abschnitt 4.7). Für die Weiterverwendung der DNA wurde das gewünschte Fragment ausgeschnitten und die DNA herauspräpariert (Abschnitt 4.10).

4.10 Aufreinigung von DNA aus PCR, Agarose-Gelen und anderen Reaktionen

Um DNA in enzymatischen Reaktionen, wie einer Ligation, verwenden zu können, müssen oft Reste von vorherigen Reaktionen, wie Dephosphorylierung oder Restriktionsverdau, entfernt werden. Der Puffer der vorherigen Reaktion oder Reste von anderen Enzymen können sonst die nächste Reaktion inhibieren. Auch die Isolation von DNA aus einem Agarosegel erfolgte nach der gleichen Methode. Verwendet wurde das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel. Die Aufreinigung wurde nach Hersteller-Anweisung durchgeführt und durch erneute Auftrennung eines kleinen Probenvolumens in einem Agarosegel überprüft.

4.11 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation eines durch Restriktionsendonukleasen linearisierten Vektors zu verhindern, wurden Plasmide, in die ein DNA-Fragment inseriert werden sollte, mittels einer Phosphatase dephosphoryliert. Hierzu wurde der aus dem Gel aufgereinigte geschnittene Vektor (Abschnitt 4.9 und 4.10) mit 1 bis 3 µl alkalischer Phosphatase (Roche) in dem mitgelieferten Puffersystem für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Darauf erfolgte eine weitere Aufreinigung wie in Abschnitt 4.10 beschrieben.

4.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Das Enzym T4-DNA-Ligase bildet eine Phosphodiester-Bindung zwischen der 3'-Hydroxyl-Gruppe einer DNA-Kette und der 5'-Phosphat-Gruppe einer anderen DNA-Kette in einem doppelsträngigen DNA-Molekül. So lassen sich gezielt DNA-Fragmente miteinander verbinden, die durch einen Restriktionsverdau zueinander komple-

mentäre einzelsträngige Überhänge oder stumpfe Enden besitzen. Für eine Klonierung wurden in dieser Arbeit standardmäßig 1 bis 100 ng geschnittener, dephosphorylierter Vektor, 10 bis 500 ng geschnittenes Insert, 1 µl 10x Ligase Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U/ ml, Invitrogen) und dH_2O ad 10 µl eingesetzt. Zur Kontrolle der Religation des Vektors wurde zusätzlich ein Ligationsansatz ohne Insert-DNA angesetzt. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert. Danach erfolgte eine Hitzeschock-Transformation in *E. coli* Top 10 (Abschnitt 4.4) und ausplattieren auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum. Sofern der Ligationsansatz mit Insert-DNA mehr Kolonien aufwies, als die Religationskontrolle, wurden am nächsten Tag Flüssigkulturen mit Material einer Kolonie für die analytische Plasmidaufreinigung angeimpft (Abschnitt 4.5.1). Die isolierte Plasmid-DNA wurde dann mittels eines analytischen Restriktionsverdaus (Abschnitt 4.9) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 4.7) auf eine erfolgreiche Insertion der gewünschten DNA-Fragmente in den Vektor überprüft.

4.13 Sequenzierung von DNA

Zur Überprüfung der Korrektheit von klonierten Vektoren wurde grundsätzlich das Insert mit den angrenzenden Bereichen im Vektor sequenziert. Dies wurde von der Firma Microsynth (Seqlab, Göttingen) mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt [201].

4.14 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel durch ein elektrisches Feld aufgetrennt [202]. Durch die Zugabe von SDS werden die Proteine einerseits denaturiert, so dass ihre Quartärstruktur zerstört wird, und andererseits proportional zu ihrer Masse mit einer Nettoladung versehen. Bei der Wanderung der Proteine durch die Poren des Gels im elektrischen Feld entsteht so über einen bestimmten Bereich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekülmasse und den Wanderungsstrecken der Proteine. So kann durch Verwendung eines Größenstandards eine Aussage über das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine getroffen werden.
Für die Herstellung von Polyacrylamidgelen wurden das Trenngel in der gewünschten Acrylamid-Konzentration und das Sammelgel nach der in Tabelle 4 beschriebenen Zusammensetzung angesetzt und das Sammelgel über das bereits erhärtete Trenngel gegossen. Für die Herstellung von Gradientengelen wurden Trenngellösungen von 6 % und 15 % Acrylamid angesetzt und mittels eines Gradientenmischers ein Gefälle der Acrylamid Konzentration von oben 6 % bis unten 15 % im Gel erzeugt. Darauf wurde wie gewohnt ein Sammelgel gegossen.

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden mit entsprechender Menge 4x oder 6x Protein Ladepuffer versetzt und für 10 Minuten bei 96°C aufgekocht. Das SDS-Gel wurde in einer Gelelektrophoresekammer in 1x Gelelektrophoresepuffer gestellt und mit den Proteinproben beladen. Bei kleinen Gelen (6 x 9 cm) wurden die Proteine im Sammelgel bei 20 mA und im Trenngel bei 30 mA getrennt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreichte. Große Gele (13 x 15 cm) wurden zunächst bei 40 mA für zwei Stunden leer vorlaufen gelassen und die Proteinproben dann bei 30 mA getrennt. Darauf folgte entweder eine Färbung des Gels mit Coomassie Blue (Abschnitt 4.15) oder Silber (Abschnitt 4.16) oder ein Westernblot (Abschnitt 4.17).

4.15 Coomassie Blue Färbung von SDS-Gelen

Mittels der Coomassie Blue Färbung von SDS-Gelen können die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine sichtbar gemacht werden [203]. Das Prinzip der Färbung ist das gleiche, wie im Bradford-Assay (Abschnitt 4.27).
Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 6 aufgelistet. Für die Färbung wurde das Gel für eine Stunde bis über Nacht in Färber bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Darauf folgte die Entfärbung in Entfärber bis zur gewünschten Farbintensität des Gels. Dabei wurde die Entfärber Lösung mehrfach erneuert. Das Gel wurde dann in dH_2O gelagert.

4.16 Silberfärbung von SDS-Gelen

Durch die Silberfärbung eines SDS-Gels können die darin aufgetrennten Proteine mit einer sehr hohen Sensitivität bis zu einer Proteinmenge von 0, 1 ng sichtbar gemacht werden. Die Färbung beruht auf der Anlagerung von positiv geladenen Silberionen an die negativ geladenen Seitenketten der Proteine. Durch eine Reduktionsreaktion mittels Formaldehyd fallen die Silberionen zu elementarem Silber aus und färben so das Protein an.
Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist unter Tabelle 7 einzusehen. Das fertige Gel wurde für mindestens 30 Minuten in Fixierer geschwenkt, wobei nach 20 Minuten die Lösung gewechselt wurde. Dann wurde zweimal mindestens 20 Minuten in Waschlösung geschwenkt und für mindestens 30 Minuten in Wasser gewaschen. Das Gel wurde daraufhin für eine Minute in Sensitizer geschwenkt und zweimal für 30 Sekunden in Wasser gewaschen. Die Inkubation in Silberlösung erfolgte für 30 Minuten. Darauf wurde dreimal 15 Sekunden mit Wasser gewaschen. Das Entwickeln mit Entwickler erfolgte bis zur gewünschten Farbintensität des Gels bei mehrmaligem Wechsel der Lösung. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 96 %iger Essigsäure zum Entwickler. Das Gel wurde dann in dH_2O gelagert.

4.17 Westernblot

Ein Westernblot dient dazu ein bestimmtes Protein in einem Proteingemisch zu detektieren. Dafür nutzt man die hohe Spezifität von Antikörpern kombiniert mit der Größenauftrennung durch die SDS-PAGE. Dazu werden die Proteine in einem Proteingemisch nach ihrer Masse mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abschnitt 4.14) und dann auf eine Membran transferiert. In dieser Arbeit wurde eine PVDF-Membran gewählt, an welche die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen haften. Der Transfer erfolgte über das halb-trocken Verfahren. Hierbei wird das Gel auf die Membran gelegt, mit puffergetränkten Filterpapieren umgeben und die Proteine durch das Anlegen eines elektrischen Feldes auf die Membran transferiert. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 5 ausgewiesen, die verwendete Reihenfolge von unten nach oben lautete: 2x A, 1x B, PVDF-Membran, SDS-Gel, 3x C. Der Transfer der Proteine erfolgte je nach Geldicke und Größe bei 200 bis 600 mA für 30 bis 60 Minuten. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, wurde die Membran nach dem Transfer für 30 Minuten in PBS-Tween mit 5 % (w/v) Milchpulver inkubiert. Der Primärantikörper wurde in PBS-Tween mit 5 % (w/v) Milchpulver in der ausgewiesenen Verdünnung (Tabelle 24) angesetzt und die Membran darin über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert. Darauf wurde die Membran dreimal 5 Minuten in PBS-Tween gewaschen. Der Sekundärantikörper, welcher spezifisch an den F_c-Teil des Primärantikörpers bindet, wurde in der ausgewiesenen Verdünnung (Tabelle 25) in PBS-Tween mit 5 % (w/v) Milchpulver angesetzt und eine Stunde bei 4°C schüttelnd auf der Membran inkubiert. Nach dreimal 10 Minuten Waschen der Membran in PBS-Tween wurde mittels des Western Blotting Luminol Reagenz oder bei einem schwachen Signal mit dem femto LUCENT^{TM} PLUS-HRP Reagenz nach Herstelleranweisung entwickelt. Das Prinzip beruht darauf, dass der an den Primärantikörper gebundene Sekundärantikörper mit einer Peroxidase gekoppelt ist, die das in der Entwicklerlösung enthaltene Luminol oxidert. Das führt zu Lumineszenz, die beim Auflegen eines Röntgenfilms diesen an dem Ort färbt, wo der Primärantikörper an das zu detektierende Protein gebunden hat. Darüber lässt sich das Vorhandensein eines bestimmten Proteins und die Molekülmasse über den Marker bestimmen.
Um verschiedene Proteine auf einer Membran detektieren zu können, müssen die nach der Detektion eines Proteins gebundenen Antikörper von der Membran entfernt werden. Dazu wurde die getrocknete PVDF-Membran kurz in Methanol reaktiviert und für 30 Minuten in 0, 1 M HCl geschwenkt. Nach kurzem Spülen mit dH_2O wurde 30 Minuten mit 0, 1 M NaOH inkubiert. Die Membran wurde erneut kurz mit dH_2O gespült und für 30 Minuten in PBS-Tween mit 5 % (w/v) Milchpulver geblockt. Dann wurde der Primärantikörper zugegeben und verfahren wie oben beschrieben.

4.18 Kultur von Säugerzellen

Die Kultivierung von Säugerzellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchte. HEK293, HCT116, HCT116 st, HCT116 LT, H1299 und H1299 sT Zellen wurden in DMEM mit 10 % (v/v) FBS und 1 % (v/v) PenStrep gehalten. HCT116 k/o Usp7 Zellen wurden in DMEM mit 15 % (v/v) FBS und 1 % (v/v) PenStrep kultiviert. H1299 Kontrolle und H1299 shUSp7 Zellen wurden in DMEM mit 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) PenStrep und 6 µg/ml Puromycin gehalten. Für Pfsk-1, WaGa und MKL-1 Zellen wurde RPMI-Medium mit Zugabe von 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) PenStrep und 1 % (v/v) L-Glutamine verwendet. Das Passagieren von adherenten Zellen erfolgte durch Waschen mit DPBS und Ablösen der Zellen mittels Trypsin. Die Bestimmung der Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved, Tiefe 0, 1 mm) durchgeführt und ein dementsprechendes Volumen an Zellsuspension wieder ausgesät, um die gewünschte Zellzahl zu erhalten. Suspensionszellen wurden für 3 min bei 200xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in neuem Medium aufgenommen. Zum Zählen wurden die Zellen durch intensives Hoch- und Herunterpipettieren getrennt, mit 50 % (v/v) Trypanblau-Lösung versetzt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

4.19 Kultur von Insektenzellen

*Sf*9 Insektenzellen wurden in Insect-XPRESS^{TM} Insektenzellmedium mit 1 % (v/v) PenStrep im Brutschrank bei 27°C und 95 % Luftfeuchte kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte durch Abschaben der Zellen mittels Zellschaber, Aufnehmen in Medium und Zentrifugation für 5 Minuten bei 500xg. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in neuem Medium aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit 50 % (v/v) Trypanblau-Lösung versetzt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

4.20 MTT-Assay

MTT-Assays wurden durchgeführt um das Wachstumsverhalten von verschiedenen Zelllinien miteinander zu vergleichen. Dafür wurde das MTT Cell Growth Kit von Millipore (Billerica , USA) verwendet. Die Reaktion beruht auf der Umsetzung des gelben MTT Substrats durch die Mitochondrien von lebenden Zellen in ein dunkelblaues Produkt. Die Farbintensität ist proportional zur Anzahl der Zellen.
$1{\cdot}10^3$ der zu untersuchenden Zellen wurden pro 96-*well* in Triplikaten ausgesät. Nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen wurden jeweils 10 µl des MTT Reagenz zu den Zellen gegeben und vier Stunden später die Zellen durch resuspendieren in 40 mM HCl in 2-Propanol lysiert. Die Quantifizierung des umgesetzten MTT Substrats erfolgte am Infinite M2000

(Tecan). Dafür wurde die Absorption bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm von der Testwellenlänge bei 570 nm abgezogen.

4.21 Transfektion

Als Transfektion wird die nicht-virale Einbringung von DNA oder RNA in eukaryotische Zellen, oft mittels chemischer Reagenzien, bezeichnet. Der Mechanismus beruht auf einer Komplexbildung der Transfektionsreagenzien mit der negativ geladenen DNA oder RNA und Aufnahme in die Zelle wahrscheinlich durch Endozytose. Für alle verwendeten Transfektionsmethoden wurden die Zellen einen Tag vorher ausgesät, sofern nicht anders angegeben. Im Folgenden sind die standardmäßig verwendeten Transfektionsmethoden beschrieben. Spezielle Modifikationen, wie eingesetzte DNA-Mengen, sind bei den Methoden der weiterführenden Versuche beschrieben.

4.21.1 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Diese Methode der Transfektion wurde bei HEK293, HCT116 und H1299 Zellen eingesetzt. Im Transfektionsansatz wurde für die gewünschte Menge DNA (µg), die zehnfache Menge Polyethylenimin (PEI) (µl) und die 100 fache Menge DMEM ohne Zusätze (µl) verwendet. Standardmengen für ein 6-*well* (8, $5{\cdot}10^5$ Zellen) waren 1, 5 µg DNA, 15 µl PEI und 100 µl DMEM. Die DNA wurde dafür zunächst zum DMEM gegeben und gemischt. Hinzu wurde das PEI gegeben und wieder kurz gemischt. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium auf den Zellen wurde gegen DMEM ohne Zusätze ausgetauscht, der Transfektionsansatz hinzugetropft und kurz geschwenkt. Nach vier bis 12 Stunden wurde das Medium von den Zellen abgenommen und gegen DMEM mit allen jeweiligen Zusätzen ausgetauscht.

4.21.2 Transfektion mit Lipofectamine^{TM} 2000

Diese Methode der Transfektion wurde bei H1299 Zellen eingesetzt, die unter anderem für die Immunfluoreszenz oder einen MCPyV Replikationsassay transfiziert wurden. Für den Transfektionsansatz wurde ein Verhältnis von DNA (µg) zu Lipofectamine^{TM} 2000 (µl) von circa 1:4 zugrunde gelegt. Im 24-*well* ($2{\cdot}10^5$ Zellen) wurden standardmäßig 0, 5 µg DNA und 2 µl Lipofectamine^{TM} 2000 in jeweils 50 µl DMEM verdünnt. Beide Ansätze wurden kombiniert und für 10 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium auf den Zellen wurde gegen DMEM + 10 % (v/v) FBS ausgetauscht, der Transfektionsansatz hinzugetropft und kurz geschwenkt.

4.21.3 Transfektion mit X-tremeGENE^{TM} HP

Diese Methode der Transfektion wurde bei Pfsk-1 Zellen und *Sf*9 Insektenzellen eingesetzt. Für den Transfektionsansatz wurde grundsätzlich ein Verhältnis von DNA (µg)

zu X-tremeGENE^{TM} HP DNA Transfektionsreagenz von 1:3 verwendet. Bei Pfsk-1 Zellen wurden für ein 24-*well* ($2{\cdot}10^5$ Zellen) 0, 5 µg DNA und 1, 5 µl X-tremeGENE zu 25 µl RPMI gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium auf den Zellen wurde gegen RPMI mit allen Zusätzen ausgetauscht, der Transfektionsansatz hinzugetropft und kurz geschwenkt.

4.21.4 Transfektion von siRNA mit Lipofectamine^{TM} RNAiMAX

Für die Transfektion von siRNAs (Tabelle 21) in H1299 und HCT116 Zellen wurde Lipofectamine^{TM} RNAiMAX verwendet. Hierbei wurde eine so genannte reverse Transfektion durchgeführt, bei der zuerst in der Zellkulturplatte der Transfektionsansatz erstellt wird und dann die Zellen darauf ausgesät werden. Grundsätzlich wurden in einem 24-*well* 100 µl Opti-MEM, 15 pmol siRNA und 1 µl Lipofectamine^{TM} RNAiMAX zusammen gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 1, $3{\cdot}10^5$ Zellen in DMEM + 10 % (v/v) FBS auf den Ansatz ausgesät und kurz geschwenkt.

4.22 Herstellung von Baculovirus Überständen aus Insektenzellen

Zur Herstellung von Baculovirus Überständen für die Infektion von Insektenzellen mit nachfolgender Proteinexpression wurde das Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System von Invitrogen verwendet. Bei diesem System wird zunächst die Expressionskassette des zu exprimierenden Gens, in diesem Fall GST-Usp7, spezifisch aus einem Donor-Vektor in einen Baculovirus Shuttel-Vektor (Bacmid) transponiert. Durch die Transfektion dieses Bacmides in *Sf*9 Insektenzellen wird dann rekombinanter Baculovirus produziert, mit dem effektiv erneut *Sf*9 Zellen infiziert und zur Expression des gewünschten Gens gebracht werden können. Als Donor-Vektor wurde das Plasmid pFastbac1-GST-hUSP7 verwendet und für die Transposition in kompetente *E. coli* DH10Bac^{TM} transformiert. Dafür wurden 1 ng pFastbac1-GST-hUSP7 zu 100 µl kompetenten Bakterien gegeben, 30 Minuten auf Eis inkubiert, 45 Sekunden bei 42°C erhitzt, 2 Minuten auf Eis abgekühlt, 900 µl S.O.C. Medium (bei *E. coli* DH10Bac^{TM} enthalten) hinzugegeben und dann für 4 Stunden bei 37°C schüttelnd bei 225 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden dann auf LB-Agarplatten mit Tetracyclin-, Kanamycin- und Gentamycin-Resistenz ausplattiert, die zuvor zusätzlich mit je 50 µl X-Gal- (40 µg/µl) und IPTG-Lösung (0, 1 M) bestrichen wurden. Die Platten wurden für zwei Tage bei 37°C inkubiert und 10 weiße Bacmid-Kolonien gepickt und neu ausgestrichen, sowie Medium für eine analytische Plasmidaufreinigung angeimpft.
Für die analytische Plasmidaufreinigung wurde das Kit wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben verwendet mit folgenden Abwandlungen. Die Bakterienpellets wurden in 300 µl S1-Puffer resuspendiert, dazu wurden 300 µl S2-Puffer gegeben, invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte Zugabe von 300 µl S3-Puffer und

Inkubation für 5 Min auf Eis. Die ausgefallenen Bestandteile wurden bei 20 000xg und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Zugabe von 800 µl Isopropanol, Schütteln und Inkubation für 15 Minuten auf Eis gefällt. Dann wurde die DNA für 30 Minuten bei 20 000xg und 4°C abzentrifugiert und das Pellet zweimal in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde nach der Trocknung in TE-Puffer resuspendiert.
Zur Überprüfung der erfolgreichen Transposition wurde eine Test-PCR mit Taq-Polymerase (Invitrogen) und Primern, welche die Insertionsstelle flankieren (M13-Fw, M13-Rev), durchgeführt. Als Puffer wurde der zur Polymerase mitgelieferte 10x Taq-Puffer und die 50 mM $MgCl_2$-Lösung verwendet. Die 10 mM dNTP Stocklösung wurde aus gleichen Anteilen 100 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Invitrogen) angesetzt. Folgender PCR-Ansatz wurde verwendet: 1 µl Bacmid-DNA, 5 µl 10x Taq-Puffer, 1, 5 µl $MgCl_2$ (50 mM), 1 µl dNTPs (10 mM), 1, 25 µl Primer M13-Fw, 1, 25 µl Primer M13-Rev, 0, 5 µl Taq-Polymerase, 38, 5 µl H_2O. Folgende PCR-Bedingungen wurden verwendet: Initiale Denaturierung: 3 Minuten, 93°C; 30 Zyklen: 1 Minute 94°C, 55 Sekunden 55°C, 5 Minuten 72°C; Finale Extension: 7 Minuten 72°C. Die Analyse der PCR erfolgte im Agarosegel (Abschnitt 4.7). Bei einer nicht erfolgten Transposition ist eine Bande von circa 300 Bp zu erwarten. Bei einer erfolgreichen Transposition ist eine Bande bestehend aus dem Insert und dem Teil des pFastBac^{TM}1 Vektors, welcher mit transponiert wurde, zu erwarten. In diesem Fall sind dies circa 6, 3 kBp. Eines der erfolgreich transponierten rekombinanten Bacmide wurde weiter für die Transfektion von *Sf*9 Zellen eingesetzt. Hierfür wurden $5{\cdot}10^5$ *Sf*9 Zellen in einem 12-*well* ausgesät und 1 Stunde später mit 1, 5 µg Bacmid-DNA und 8 µl X-treme-Gene Transfektionsreagenz (Abschnitt 4.21.3) in 100 µl Optimem transfiziert. Nach drei Tagen wurde der Überstand von den Zellen genommen und steril filtriert. Mit 200 µl dieses sogenannten P1-Überstandes wurden $1{\cdot}10^6$ am Vortag ausgesäte *Sf*9 Zellen infiziert. Nach sechs Tagen waren fast alle Zellen lysiert, so dass der sogenannte P2-Überstand von den Zellen abgenommen wurde. Dieser wurde steril filtriert, mit 2 % (v/v) FBS versetzt und bis zur weiteren Verwendung für die Proteinexpression (Abschnitt 4.25.4) dunkel bei 4°C gelagert.

4.23 Herstellung von γ-retroviralen Überständen aus HEK293 Zellen

Für die Herstellung von γ-retroviralen Überständen wurden $5{\cdot}10^5$ HEK293 Zellen in einer 10-cm-Schale ausgesät und einen Tag später mittels PEI (Abschnitt 4.21.1) transfiziert. Dafür wurden 10 µg des Plasmids R690-Mo-gagpol, 2 µg phCMV-VSV-G env und 10 µg des jeweiligen γ-retroviralen Plasmids (pSUPER-shUsp7, pMSCV-N MCV LT FL oder pMSCV-N MCV sT) eingesetzt und vor Zugabe des Transfektionsansatzes das Medium auf den Zellen gegen DMEM ohne Zusätze ausgetauscht. Acht Stunden später wurde das Medium gegen DMEM + 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) PenStrep und

20 mM HEPES ausgetauscht. Weitere 24 Stunden später wurde das erste Mal der Virus enthaltende Überstand von den Zellen abgenommen, steril filtriert und zur weiteren Transduktion (Abschnitt 4.24) eingesetzt oder bei -80°C gelagert. Auf die Zellen wurde neues Medium gegeben und noch zwei weitere Male jeweils nach 24 Stunden der Überstand geerntet.

4.24 Transduktion von Zellen mit γ-retroviralen Vektoren

Die Transduktion von Zellen mit γ-retroviralen Vektoren wurde verwendet um Zelllinien herzustellen, die stabil ein bestimmtes Gen für ein Protein oder eine shRNA exprimieren. Dabei wird sich zunutze gemacht, dass die Genome von γ-Retroviren in das Wirtsgenom einer Zelle integrieren können. Durch die zusätzliche Kodierung von Resistenzgenen auf dem integrierbaren DNA-Abschnitt können die Zellen nach der Transduktion auf die erfolgreiche Integration selektioniert werden. Die Herstellung von γ-retroviralen Überständen ist in Abschnitt 4.23 beschrieben. Für die Herstellung der stabilen Zelllinien H1299 shUsp7, H1299 sT und HCT116 sT, sowie HCT116 LT wurden Überstände, die von den Vektoren pSUPER-shUsp7, pMSCV-N MCV sT, sowie pMSCV-N MCV LT produziert wurden, wie nachfolgend beschrieben verwendet. Die Zellen wurden einen Tag vorher mit einer Konfluenz von circa 80 % ausgesät. Zur Transduktion wurde das Medium auf den Zellen gegen frisches ausgetauscht und eine bestimmte Menge viraler Überstand hinzugegeben. Da die verwendeten Konstrukte keine Fluoreszenzproteine als Marker enthielten und daher keine Titerbestimmung des viralen Überstands möglich war, wurden verschiedene Mengen getestet, z. B. für ein 6-*well* zwischen 50 µl und 2 ml. Hinzugegeben wurde außerdem Polybrene® in einer Endkonzentration von 8 µg/ml. Die Zellen wurden dann für eine Stunde bei 37°C und 1000xg zentrifugiert, weil dies zu einer Erhöhung des Stresses auf die Zellmembran führt und so die Transduktionseffizienz verbessert wird. Nach 24 Stunden wurde das Medium auf den Zellen gegen frisches Medium ausgetauscht. Nach 48 bis 72 Stunden wurden die Zellen abtrypsiniert und in Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum aufgenommen. Die Konzentration des Selektionsantibiotikums, in diesen Fällen immer Puromycin, die zum Absterben aller nicht transduzierten Zellen führt, wurde vorher für jede Zelllinie experimentell ermittelt. Die überlebenden Zellen der Transduktion wurden für mindestens acht Wochen, im Falle der Zelllinie H1299 shUsp7 dauerhaft, in Medium mit Selektionsantibiotikum gehalten und weiter expandiert.

4.25 Proteinaufreinigung

4.25.1 Expression und Aufreinigung des MCPyV His_6-LT N-Terminus

Die bakterielle Expression und Aufreinigung des His_6-Tag fusionierten MCPyV LT N-Terminus Proteins (Aminosäuren 1 - 244) wurde von Sophie Borchert durchgeführt, wie in Borchert et al. [65] beschrieben.

4.25.2 Expression und Aufreinigung des MCPyV LT C-Terminus

Zur bakteriellen Expression und Aufreinigung des GST fusionierten MCPyV LT C-Terminus (Aminosäuren 259 - 818) wurde das Plasmid pGEX-LT-C-Term in *E. coli* BL21 Star transformiert und mit einer Bakterienkolonie 100 ml 2xYT-Amp angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 Liter 2xYT-Amp mit 100 ml Vorkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0, 52 schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde mit 0, 5 mM IPTG induziert und weitere vier Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurde die Bakterienkultur abzentrifugiert und das Zellpellet in 70 ml Lysepuffer aufgenommen. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 10 zu finden. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Bakterienpellet dreimal für 10 Sekunden bei einer Amplitude von 40 % sonifiziert und weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 4°C und 20 000xg. Der Überstand wurde abgenommen und mit 600 µl zuvor dreimal in Lysepuffer gewaschener Glutathion Sepharose 4B über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Die Sepharose Beads wurden dann für 5 Minuten bei 4°C und 500xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Darauf folgten vier Waschschritte mit Waschpuffer, wobei einmal für 1 Stunde bei 4°C rotierend inkubiert wurde. Zum Abschneiden des GST fusionierten LT C-Terminus von den Beads wurden die 600 µl Beads in 8 ml Cleavage-Puffer aufgenommen und für 72 Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Um Reste der Beads zu entfernen wurde das Eluat durch einen GD/X 25 0, 45 µm Filter gedrückt. Das Eluat wurde mittels 50k Amicon® Ultra Centrifugal Filter Units auf circa 500 µl aufkonzentriert und über Nacht im 10k Slide-A-Lyzer®MINI Dialysis Unit in Dialysepuffer bei 4°C dialysiert. Die korrekte Expression und Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blue Färbung, sowie massenspektrometrischer Analyse kontrolliert.

4.25.3 Expression und Aufreinigung des MCPyV MBP-sT

Die Expression und Aufreinigung des MCPyV MBP-sT erfolgte nach der Beschreibung von Tsang et al. [109] und beruht auf der Bindung des N-terminal fusionierten *Maltose Binding Proteins* (MBP) an Amylose-Beads. Dafür wurde das Plasmid pMMT in *E. coli* T7 Express *lysY/I^q* transformiert. 160 ml 2xYT-Amp Medium wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am darauffolgenden Tag

wurden 2, 4 Liter 2xYT-Amp mit 160 ml Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0, 55 schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde dann mit 0, 4 mM IPTG induziert und weitere vier Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurde die Bakterienkultur abzentrifugiert und das Zellpellet in 150 ml Lysepuffer aufgenommen. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 11 zu finden. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Bakterienpellet dreimal für 10 Sekunden bei einer Amplitude von 40 % sonifiziert und weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 4°C und 20 000xg. Der Überstand wurde abgenommen und mit 3 ml zuvor dreimal in Lysepuffer gewaschener Amylose Beads über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Dann wurden die Beads für 5 Minuten bei 4°C und 500xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Darauf folgten drei Waschschritte mit Waschpuffer, wobei einmal für 30 Minuten bei 4°C rotierend inkubiert wurde. Die gebundenen Proteine wurden daraufhin zweimal mit je 15 ml Elutionspuffer für 90 Minuten bei 4°C rotierend eluiert. Um Reste der Beads zu entfernen wurde das Eluat durch einen GD/X 25 0, 45 µm Filter gedrückt. Anschließend wurde es mittels 30k Amicon® Ultra Centrifugal Filter Units auf circa 500 µl aufkonzentriert. Die korrekte Expression und Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blue Färbung sowie Westernblot mit dem MCPyV sT spezifischen Antikörper 2T2 kontrolliert.

4.25.4 Expression und Aufreinigung des GST-Usp7 Aminosäuren 1 - 1102

Die Expression von GST fusioniertem Volllängen Usp7 Protein (Aminosäuren 1 - 1102) erfolgte in *Sf*9 Insektenzellen. Hierzu wurden acht T175 Flaschen mit je 1, $5{\cdot}10^7$ Zellen ausgesät und mit je 210 µl eines P2 Baculovirusstocks (Abschnitt 4.22) zur Expression des GST-Usp7 Volllängen Proteins infiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen in ihrem Medium abgeschabt und für 5 Minuten bei 4°C und 500xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 32 ml Lysispuffer (Puffer in Tabelle 12) resuspendiert. Die Zellen wurden für 20 Minuten auf Eis inkubiert und dabei zweimal durch eine Spritze (0, 5 mm Kanülen-Durchmesser) gezogen. Darauf folgte 30 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 20 000xg. Der Überstand wurde mit 500 µl zuvor in Lysispuffer gewaschenen Glutathione Sepharose Beads für zwei Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Nach der Bindung des Proteins wurden die Beads für 5 Minuten bei 4°C und 500xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und dreimal in Waschpuffer gewaschen. Die Elution des GST-Usp7 erfolgte mit zweimal 5 ml Elutionspuffer rotierend für 20 Minuten bei 4°C. Das Eluat wurde mittels 50k Amicon® Ultra Centrifugal Filter Units auf circa 500 µl aufkonzentriert und über Nacht im 10k Slide-A-Lyzer®MINI Dialysis Unit in Dialysepuffer bei 4°C dialysiert. Die korrekte Expression und Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blue Färbung sowie Westernblot mit dem Usp7 spezifischen Antikörper 3D8 kontrolliert.

4.25.5 Expression und Aufreinigung des GST-Usp7 Aminosäuren 1 - 215, 212 - 561, 561 - 916 und 913 - 1102

Die GST fusionierten vier Abschnitte von Usp7 (Aminosäuren 1 - 215, 212 - 561, 561 - 916 und 913 - 1102) wurden nach Ching et al. [191] exprimiert und aufgereinigt. Dafür wurden die Plasmide pGEX-Usp7-1, pGEX-Usp7-2, pGEX-Usp7-3 und pGEX-Usp7-4 jeweils in *E. coli* BL21 Star transformiert, mit einer Bakterienkolonie 80 ml 2xYT-Amp angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden 800 ml 2xYT-Amp mit 80 ml Vorkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0, 8 schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde dann auf 18°C abgekühlt, mit 0, 5 mM IPTG induziert und für 18 Stunden bei 18°C inkubiert. Daraufhin wurde die Bakterienkultur abzentrifugiert und das Zellpellet in 80 ml Lysepuffer aufgenommen. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 13 zu finden. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Bakterienpellet dreimal für 10 Sekunden bei einer Amplitude von 40 % sonifiziert und dann weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 4°C und 20 000xg. Der Überstand wurde abgenommen und mit 500 µl zuvor dreimal in Lysepuffer gewaschener Glutathion Sepharose 4B für 2 Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Die Sepharose Beads wurden dann für 5 Minuten bei 4°C und 500xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Darauf folgten drei Waschschritte mit Waschpuffer. Die gebundenen Proteine wurden zweimal mit je 5 ml Elutionspuffer für 20 Minuten bei 4°C rotierend eluiert. Das Eluat wurde mittels 30k Amicon® Ultra Centrifugal Filter Units auf circa 500 µl aufkonzentriert und über Nacht im 10k Slide-A-Lyzer®MINI Dialysis Unit in Dialysepuffer bei 4°C dialysiert. Die korrekte Expression und Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blue Färbung kontrolliert.

4.26 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen für deren Analyse in der SDS-PAGE und im Westernblot wurden die zu untersuchenden Zellen in PBS abgeschabt, fünf Minuten bei 4°C und 500xg abzentrifugiert und in einer entsprechenden Menge Ripa-Puffer (Tabelle 3) aufgenommen. Als Richtwert wurden für die Lyse von $5{\cdot}10^6$ Zellen 700 µl Puffer eingesetzt. Die Inkubation der Zellen mit Ripa-Puffer erfolgte für 30 Minuten auf Eis, wobei das Lysat mehrfach durch eine Spritze (0, 5 mm Kanülen-Durchmesser) gezogen wurde. Daraufhin wurde das Lysat für 20 Minuten bei 4°C und 23 000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und die Proteinkonzentration des Überstands mittels Bradford-Assay (Abschnitt 4.27) bestimmt. Je nachdem welches Protein analysiert werden sollte, wurden 10 bis 100 µg Proteinlysat für die Analyse in der SDS-PAGE verwendet.

4.27 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde nach dem Bradford-Assay durchgeführt [204]. Das im Bradford-Reagenz enthaltene Coomassie blue G250 bindet unspezifisch kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm. Aus der Absorption bei 595 nm kann unter Verwendung einer Eichkurve, die mittels BSA erstellt wurde, die Proteinkonzentration errechnet werden.
Zur Herstellung des Bradford-Reagenz wurde die Lösung des Biorad Protein Assays 1:5 in dH_2O verdünnt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden 1, 5, 10 und 25 µg gelöstes BSA zu jeweils 1 ml Bradford-Reagenz in Küvetten gegeben, gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Absorption bei 595 nm am Photometer bestimmt. Als Nullwert wurde reines Bradford-Reagenz gemessen und abgezogen. Aus den erhaltenen Werten der BSA-Proben wurde mittels linearer Regression eine Eichkurve erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration der Protein-Proben errechnet wurde.
Die Berechnung der Proteinkonzentration mittels des Bradfordassays wurde standardmäßig bei Zelllysaten verwendet. Die Konzentrationsbestimmung von Lösungen aufgereinigter Proteine erfolgte mittels des Qubit 2.0 Fluorometers unter Verwendung des Qubit® Protein Assay Kits nach Herstellerangaben.

4.28 Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen in Säugerzellen

Die Methode zur Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen in der Zelle beruht auf der Inhibierung der Proteinbiosynthese in den Zellen durch Zugabe des Antibiotikums Cycloheximid (CHX). Ist diese gehemmt, lässt sich der Abbau der vorhandenen Proteine durch Ernten und Lyse der Zellen nach bestimmten Zeitpunkten im Westernblot analysieren. Durch die Bestimmung des Zeitpunktes, an dem nur noch die Hälfte des Ausgangsproteins vorhanden ist, lässt sich eine Aussage über seine Stabilität treffen.
Zur Untersuchung der Halbwertszeit der MCPyV T-Antigene in den stabil exprimierenden Zelllinien HCT116 sT, HCT116 LT und H1299 sT wurden diese wie in Abschnitt 4.21.4 beschrieben mit siRNAs transfiziert. Die Behandlung mit Cycloheximid erfolgte nach der angegebenen Zeit. Als Positiv-Kontrolle wurde das adenovirale Protein E4orf3/4 mitgeführt, welches eine Halbwertszeit von circa 20 Minuten besitzt. Für dessen transiente Transfektion wurden $1{\cdot}10^7$ HCT116 wt Zellen in einer 15-cm-Schale ausgesät und einen Tag später mit 15 µg des Plasmids pcDMX3b-Flag-AdV5-E4orf3/4 mittels PEI transfiziert (Abschnitt 4.21.1). Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen abtrypsiniert und auf neun 6-wells aufgeteilt. Nach einem weiteren Tag wurde die Behandlung mit Cycloheximid durchgeführt. Hierfür wurde Cycloheximid grundsätzlich in einer Endkonzentration von 100 µg/ ml zum Medium gegeben. Die Zellen wurden nach den jeweils angegebenen Zeitpunkten in PBS abgeschabt, 5 Minuten bei

4°C und 500xg abzentrifugiert und das Zellpellet in Flüssigstickstoff schockgefroren. Danach wurde eine Lyse der Zellen (Abschnitt 4.26) und Analyse der Proteine mittels SDS-PAGE (Abschnitt 4.14) und Westernblot (Abschnitt 4.17) durchgeführt.

4.29 GST-Pulldown

GST-Pulldowns dienen dazu Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen zu charakterisieren. Hierzu werden über einen GST-Tag aufgereinigte Proteine an Glutathion-Sepharose gebunden und mit anderen Proteinen auf unterschiedliche Arten inkubiert. Darauf folgt eine Analyse der Bindung an die GST fusionierten Proteine durch SDS-PAGE und Westernblot. In dieser Arbeit wurde so die Interaktion zwischen den MCPyV T-Antigenen und Usp7 untersucht. Das komplette Usp7 Protein oder verschiedene Untereinheiten wurden hierfür aufgereinigt (Abschnitt 4.25.4 und 4.25.5), an Glutathion Sepharose gebunden und mit Zelllysaten oder anderen aufgereinigten Proteinen inkubiert.

4.29.1 GST-Pulldown von Zelllysaten

$3{\cdot}10^7$ H1299 Zellen wurden mit 54 µg pCMV2B-ER, pCMV2B-tER, pMTBS oder Leervektor als Kontrolle mittels PEI transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in PBS abgeschabt und für 5 Minuten bei 500xg bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Ripa-Puffer für 30 Minuten auf Eis lysiert und dabei mehrfach durch einen Spritze gezogen (0, 5 mm Kanülen-Durchmesser). Die Zusammensetzung aller verwendeten Puffer ist in Tabelle 3 zu finden. Die unlöslichen Bestandteile wurden für 30 Minuten bei 4°C und 20 000xg abzentrifugiert und verworfen. Die Protein-Konzentration des Zelllysats wurde mittels Bradford-Assay (Abschnitt 4.27) bestimmt. Pro Ansatz wurden 15 µg der GST-fusionierten Einheiten von Usp7 (Aminosäuren 1-215, 212-561, 561-916 und 913-1102, Aufreinigung siehe Abschnitt 4.25.5) an jeweils 25 µl zuvor gewaschene Glutathione Sepharose für eine Stunde bei 4°C rotierend in TE-Puffer gebunden. In einem Ansatz wurden als Kontrolle keine Proteine an die Beads gebunden. Danach wurden die Beads für 5 Minuten bei 4°C und 500xg abzentrifugiert, dreimal in TE-Puffer gewaschen und dann in 500 µl GST-Pulldown-Puffer aufgenommen. Dazu wurden pro Usp7-Einheit oder Beads ohne gebundenes Protein 1 mg des hergestellten Zelllysats gegeben und zwei Stunden rotierend bei 4°C inkubiert. Die Beads wurden daraufhin dreimal in GST-Pulldown-Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 95°C in 60 µl 2x Protein Ladepuffer aufgekocht. 30 µl des Überstands wurden in der SDS-PAGE einmal in einer Coomassie Blue Färbung (Abschnitt 4.15) und einmal in einem Westernblot (Abschnitt 4.17) analysiert.

4.29.2 Direkter GST-Pulldown

Im direkten GST-Pulldown Experiment wurden die GST-fusionierten Usp7 Proteine mit aufgereinigten Proteinen inkubiert, um eine direkte Interaktion nachweisen zu können. Hierfür wurden die im Ergebnisteil jeweils angegebenen Mengen an GST fusionierten Usp7 Domänen (Aminosäuren 1-215, 212-561, 561-916 und 913-1102, Aufreinigung siehe Abschnitt 4.25.5) oder des vollen Usp7 Proteins (Aminosäuren 1- 1102, Aufreinigung siehe Abschnitt 4.25.4) an die Glutathion Sepharose gebunden, wie in Abschnitt 4.29.1 beschrieben. Zu den Beads wurden dann die jeweils angegebenen Mengen MCPyV LT N-Terminus, LT C-Terminus oder MBP-sT in einem finalen Volumen von 500 µl gegeben (Aufreinigungen siehe Abschnitt 4.25.1, 4.25.2 und 4.25.3). Als Bindepuffer diente 50 mM Tris HCl pH 7, 9 (für LT N-Terminus und MBP-sT) oder pH 7, 2 (für LT C-Terminus), 1 mM EDTA, 250 mM NaCl und 0, 05 % (v/v) Triton X-100. Die Bindung erfolgte für drei Stunden rotierend bei 4°C. Nach dreimal Waschen der Beads in dem jeweiligen Bindepuffer wurden diese in 30 µl 2x Protein Ladepuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 95°C aufgekocht. Der Überstand wurde dann in der SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung (Abschnitt 4.16) analysiert.

4.30 Koimmunpräzipitation

Koimmunpräzipitationen werden durchgeführt, um eine Interaktion von Proteinen in der Zelle nachzuweisen. Das Prinzip beruht auf der Aufreinigung eines Zielproteins über einen dafür spezifischen Antikörper, der auf einer Matrix immobilisiert ist. Lassen sich im Westernblot zusätzliche kopräzipitierte Proteine durch ihren spezifischen Antikörper nachweisen, zeigt dies ihr Vorliegen in einem Komplex mit dem Zielprotein.
In dieser Arbeit wurde durch Verwendung des GFP-Trap® _A Systems die Interaktion zwischen Usp7 und den MCPyV T-Antigenen untersucht. Hierfür wurden $1 \cdot 10^7$ H1299 Zellen mit 20 µg der N-terminal oder C-terminal YFP-fusionierten MCPyV frühen Region, der tumorspezifischen verkürzten frühen Region oder dem sT transfiziert. Als Kontrolle diente der YFP exprimierende Leervektor. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Präzipitation der YFP-fusionierten T-Antigene mittels der GFP-Trap Beads nach Herstellerprotokoll. Alle Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer befindet sich in Tabelle 9. Als Lyse-Puffer wurde 10x Ripa verwendet, mit Verdünnungspuffer nach Herstellerangaben verdünnt, und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay (Abschnitt 4.27) bestimmt. Für jeden Ansatz wurde die gleiche Menge Protein eingesetzt und mit 20 µl GFP-Trap Beads für zwei Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Nach der Präzipitation und Waschen der Beads wurden die Proteinkomplexe durch zehn Minuten Aufkochen der Beads in 2x Protein Ladepuffer eluiert und per SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

4.31 Immunpräzipitation von ubiquitinierten Proteinen aus Zellen

Um die Ubiquitinierung von bestimmten Proteinen in der Zelle zu untersuchen, wurden diese durch eine Immunpräzipitation angereichert und mittels Westernblot ihre Ubiquitinierung analysiert. Dabei wurden verschiedene Methoden zur Anreicherung der zu untersuchenden Proteine verwendet.

4.31.1 Immunpräzipitation von ubiquitinierten Proteinen mittels GFP-Trap

YFP fusionierte Konstrukte der MCPyV T-Antigene oder von p53 wurden in HEK293, HCT116 wt oder HCT116 k/o Usp7 Zellen überexprimiert und mittels GFP-Trap® _A aufgereinigt. Dies wurde wie unter Abschnitt 4.30 beschrieben durchgeführt, nur mit Kotransfektion der gleichen Menge HA-fusioniertem Ubiquitins und Behandlung der Zellen acht Stunden vor der Lyse mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 in einer Endkonzentration von 10 µM. Zur Analyse der Abhängigkeit der Ubiquitinierung der MCPyV T-Antigene von Usp7 wurden zum einen Überexpressionen in HCT116 wt mit HCT116 k/o Usp7 Zellen verglichen. Zum anderen wurde die Ubiquitinierung von p53 und den T-Antigenen in HCT116 k/o Usp7 Zellen mit der in HCT116 k/o Usp7 plus Überexpression von Usp7 (gleiche DNA-Menge wie HA-Ubiquitin und YFP-Konstrukt) gegenübergestellt. Bei der Analyse der Ubiquitinierung der Proteine in Anwesenheit des Usp7-Inhibitors HBX 41, 108 wurde dieser für vier bis 16 Stunden in einer Endkonzentration von 10, 20, 30, 50, und 60 µM zu den Zellen gegeben. Als Kontrolle wurde anstelle des Inhibitors die gleiche Menge DMSO zu den Zellen gegeben. Im Westernblot wurde die Ubiquitinierung der Proteine mittels α-HA Antikörper und ihre Anreicherung mit α-GFP Antikörper oder für das Protein spezifischem Antikörper (CM2B4, 2T2 oder DO-1) analysiert.

4.31.2 Immunpräzipitation von ubiquitinierten Proteinen mittels FLAG-IP

FLAG®-Tag fusioniertes MCPyV LT und sT exprimiert durch die stabilen Zelllinien HCT116 LT, HCT116 sT und H1299 sT wurde über ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel angereichert. Als Kontrolle dienten die jeweiligen naiven Zelllinien. Zur Transfektion mit siRNAs wurden 1, 32 nmol siRNA in 2, 5 ml DMEM verdünnt und mit 2, 5 ml DMEM plus 90 µl Lipofectamine^{TM} RNAiMAX vermischt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit $1{\cdot}10^7$ Zellen in 12 ml DMEM + 15 % (v/v) FBS vermischt und in einer 15-cm-Schale ausgesät. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen für acht Stunden mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 in einer Endkonzentration von 10 µM behandelt. Daraufhin wurden sie in PBS abgeschabt, fünf Minuten bei 500xg abzentrifugiert und das PBS abgenommen. Alle weiteren verwendeten Puffer sind in Tabelle 8 aufgelistet. Pro Ansatz wurden die Zellen in 2 ml Lysis-Puffer 30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei mehrfach durch eine Spritze gezogen (0, 5

mm Kanülen-Durchmesser). Daraufhin wurde das Lysat für 30 Minuten bei 23 000xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und die Proteinkonzentration des Überstands mittels Bradford-Assay (Abschnitt 4.27) bestimmt. Für alle Ansätze wurde die gleiche Proteinmenge mit 10 µl ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Zum Reduzieren des Hintergrundes wurden die Beads zuvor dreimal in TBS, einmal in 0, 1 M Glycin pH 3, 5 und wieder dreimal in TBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte jeweils 5 Minuten bei 4°C und 1500xg. Nach der Bindung an die FLAG®-Beads wurden diese dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurden die Beads in 100 µl Elutionspuffer aufgenommen und für 30 Minuten bei 4°C rotierend inkubiert. Der Überstand wurde daraufhin im Westernblot mittels α-Ubiquitin Antikörper und für das jeweilige Protein spezifischem Antikörper (CM2B4 oder 2T2) analysiert.

4.32 *In vitro* Deubiquitinierungsassay

Zur Untersuchung der Deubiquitinierung der MCPyV T-Antigene durch Usp7 *in vitro* wurden die ubiquitinierten T-Antigene aus HEK293 Zellen aufgereinigt, mit aufgereinigtem Usp7 inkubiert und dann per Westernblot die Deubiquitinierung analysiert. Die hier verwendete Methode wurde anhand der von Holowaty et al. [135], Li et al. [134] und Canning et al. [140] publizierten *in vitro* Deubiquitinierungsassays etabliert. Zur Aufreinigung der ubiquitinierten MCPyV T-Antigene wurden HEK293 Zellen mit einem SBP fusionierten T-Antigen Expressionskonstrukt und einem mit einem HA-Tag fusionierten Ubiquitin Expressionskonstrukt transfiziert. Aufgrund unterschiedlicher Expressions- und Ubiquitinierungslevel wurden für jeweils $8{\cdot}10^7$ HEK293 Zellen folgende DNA-Mengen für die Transfektion mit PEI (Abschnitt 4.21.1) eingesetzt. MCPyV LT: 112, 5 µg pNTAP-ER oder pNTAP-LT, 112, 5 µg pCMV-HA-Ubi; MCPyV tLT: 60 µg pNTAP-tER oder pNTAP-tLT, 240 µg pCMV-HA-Ubi; MCPyV sT: 75 µg pMtBS-SBP, 150 µg pCMV-HA-Ubi. 36 Stunden nach Transfektion wurde der Proteasominhibitor MG-132 in einer Endkonzentration von 10 µM zum Medium gegeben. Nach 12 Stunden wurden die Zellen in PBS abgeschabt, 5 Minuten bei 500xg und 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet in 1, 6 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Die Zusammensetzung aller verwendeten Puffer befindet sich in Tabelle 14. Die Lyse der Zellen erfolgte für 30 Minuten auf Eis, wobei das Lysat mehrfach durch eine Spritze gezogen wurde (0, 6 mm Kanülen-Durchmesser). Das Lysat wurde 30 Minuten bei 4°C und 20 000xg zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand mit Verdünnungspuffer auf 50 ml Endvolumen aufgefüllt. 1 ml zuvor in Verdünnungspuffer gewaschene Streptavidin Sepharose High Performance Beads wurden hinzugegeben und für 14 Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Die Beads wurden dann einmal in Waschpuffer und zweimal in Hochsalz-Waschpuffer gewaschen, zentrifugiert wurde jeweils für 5 Minuten bei 4°C und 1500xg. Die gebundenen Proteine wurden zweimal für 30 Minuten bei 4°C rotie-

rend mit 7 ml Elutionspuffer eluiert. Um Reste der Beads zu entfernen wurde das Eluat durch einen GD/X 25 0, 45 µm Filter gedrückt. Darauf folgte eine Dialyse über Nacht mittels Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette G2 in Dialyse-Puffer bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die aufgereinigten Proteine mittels Amicon® Ultra Centrifugal Filter Units auf circa 500 µl aufkonzentriert. Die erfolgreiche Aufreinigung wurde per Westernblot (Abschnitt 4.17) und Silberfärbung (Abschnitt 4.16) in der SDS-PAGE (Abschnitt 4.14) überprüft.
Für den *in vitro* Deubiquitinierungsassay wurden zu 20 bis 50 µg aufgereinigten ubiquitinierten MCPyV T-Antigenen 10 pg bis 1 µg aufgereinigtes His_6-Usp7 Protein (BostonBiochem #E-519) in einem Endvolumen von 100 µl Reaktionspuffer (Tabelle 14) gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 0 bis 120 Minuten und wurde durch Zugabe von 30 µl 6x Proteinladepuffer und Aufkochen für 10 Minuten bei 95°C abgestoppt. Die Proben wurden durch eine SDS-PAGE mit Westernblot analysiert.

4.33 MCPyV Replikationsassay

Zur Untersuchung des Lebenszyklus des MCPyV wurde ein semi-permissiver *in vitro* Replikationsassay verwendet, welcher es erlaubt die virale DNA-Replikation und Genexpression mittels Realtime-PCR und Immunfluoreszenz zu analysieren, aber keine serielle Transmission des Virus zeigt [94, 97, 99]. Die Methode wurde wie in Neumann et al. [99] beschrieben durchgeführt und wird hier nur in ihren Grundprinzipien und Ergänzungen erklärt. Da in diesem semi-permissiven System keine effiziente Viruspartikelproduktion stattfindet, wird das virale Genom durch Herausschneiden des bakteriellen Teils aus dem Plasmid pMK-MCPyV*syn* erhalten (beschrieben in Neumann et al. [99]). Dieses religierte Konstrukt, genannt MCPyV*syn*, besteht aus einem Konsensus mehrerer MCPyV Genome isoliert aus Tumoren und kann außerdem mit identischer Sequenz in Hautabstrichen bei gesunden Personen gefunden werden [97]. Damit entspricht es dem Wildtyp MCPyV Genom. Dieses Genom kann in Zellen transfiziert werden und zeigt in diversen etablierten Zelllinien eine DNA-Replikation und virale Genexpression [94, 97, 99].
Zur Untersuchung des Einflusses von Usp7 auf den Lebenszyklus des MCPyV wurden die Zelllinien H1299 Kontrolle und H1299 shUsp7, sowie HCT116 wt und HCT116 k/o Usp7 in diesem Assay verwendet und miteinander verglichen. Für die H1299 Zelllinien wurden $9{\cdot}10^4$ Zellen in einem 12-*well* einen Tag vor Transfektion ausgesät. Pro Ansatz wurden 100 ng religiertes MCPyV*syn* und 250 ng Träger-DNA (pUC18) oder 350 ng Träger-DNA als Negativ-Kontrolle (Mock) in 100 µl DMEM gegeben. Dazu wurden 4 µl Lipofectamine^{TM} 2000 verdünnt in 100 µl DMEM gegeben und gemischt. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz zu den Zellen gegeben, deren Medium zuvor zu DMEM + 10 % (v/v) FBS getauscht wurde. Für die HCT116 Zelllinien wurden 1, $2{\cdot}10^5$ HCT116 Zellen in einem 12-*well* einen Tag

vor Transfektion ausgesät. Pro Ansatz wurden 100 ng religiertes MCPyV*syn* und 250 ng Träger-DNA (pUC18) oder 350 ng Träger-DNA als Negativ-Kontrolle (Mock) in 50 µl DMEM gegeben. Dazu wurden 5 µl PEI gegeben, gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium auf den Zellen wurde gegen DMEM ausgetauscht und der Transfektionsansatz hinzugegeben. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde bei allen Zelllinien das Medium gegen Medium mit allen jeweiligen Zusätzen getauscht (Abschnitt 4.18) und die ersten Zellen für den 6 Stunden Input Wert durch Abtrypsinieren geerntet. Das Zellpellet wurde zur späteren Analyse bei -80°C gelagert. Ebenso wurde zu späteren Zeitpunkten verfahren, wo jeweils ein Zellpellet zur Analyse der viralen DNA-Replikation, sowie eines zur Analyse der viralen Genexpression geerntet wurde. Die DNA-Isolation und der *DpnI* Verdau, ebenso wie die Quantifizierung per Realtime-PCR wurde durchgeführt wie in Neumann et al. [99] beschrieben. Die Primer und Taqman-Sonden und die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 26 zu finden. Die Quantifizierung der viralen Genome erfolgte über das VP1-Gen ($VP1_{3914}$-Fw, $VP1_{4108}$-Rev, VP1_6-FAM_Sonde) und wurde auf das zelluläre GAPDH-Gen (GAPDH_Fw, GAPDH_Rev, GAPDH_VIC_Sonde) und den nicht *DpnI* verdauten 6 Stunden Input Wert normalisiert.
Zur Analyse der frühen und späten MCPyV Genexpression wurde Gesamt-RNA mittels des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstelleranweisung isoliert. Zum Umschreiben in cDNA wurden 2 µg RNA, 10 mM dNTPs, 250 ng Random Hexamer Primer gemischt und mit RNase/DNase freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 Minuten auf 65°C erhitzt und dann 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Hinzugegeben wurden 4 µl 5x First Strand Buffer (Invitrogen), 1 µl 0, 1 M DTT, 0, 7 µl Ribolock (NEB) und 0, 3 µl SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Zusätzlich wurde immer eine Probe mitgeführt, wo keine Reverse Transkriptase zugegeben wurde (-RT Kontrolle), um falsch positive Signale durch genomische DNA ausschließen zu können. Die Inkubation der Ansätze erfolgte für 5 Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 50°C und 15 Minuten bei 70°C gefolgt von einer Zugabe von 0, 5 µl RNase H (NEB) und Inkubation für 20 Minuten bei 37°C um die verbliebene RNA zu entfernen. Die Quantifizierung der LT Transkripte in der cDNA erfolgte in einem 10 µl Volumen bestehend aus 5 µl Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2x (Thermo Scientific), 1 µl cDNA, 1 µl jedes 10 µM Primers (LT-RT-Fw und LT-RT-Rev) und 2 µl H_2O. Für die VP1 Transkripte wurden 0, 3 µl jedes 10 µM Primers (VP1-RT-Fw and VP1-RT-Rev) benutzt. Die GAPDH Transkripte wurden ebenfalls in einem 10 µl Volumen analysiert, das aus 5 µl 2x Rotor-Gene Multiplex PCR Kit (Qiagen), 1 µl cDNA, 3, 5 µl H_2O und 0, 5 µl eines 20x Taqman-Sonde/ Primer-Mixes (4 µM GAPDH-RT-Fw, 4 µM GAPDH_Rev, 2 µM GAPDH_VIC_Sonde) bestand. Die LT und VP1 Transkripte wurden auf die GAPDH Transkripte sowie auf die virale DNA-Replikation normalisiert. Die Realtime-PCRs wurden grundsätzlich am Rotor-Gene Q (Qiagen) durchgeführt und mit der mitgelieferten Software analysiert.

Tabelle 26: Primer/Taqman-Sonden und PCR-Bedingungen für die Realtime-PCR.

Name	Sequenz 5′ nach 3′	Bedingungen	Effizienz*	Referenz
GAPDH_Fw	5′-TGTGTCCCTCAAT	5 min, 95°C	0, 95478	[99]
	ATGGTCCTGTC-3′	40 Zyklen:		
GAPDH_Rev	5′-ATGGTGGTGAAGA	5 Sek, 95°C		
	CGCCAGTG-3′	15 Sek, 60°C.		
GAPDH_VIC	VIC-5′-GTGGCGCTGA			
_Sonde	GTACGTCGTGGAGT			
	C-3′-BHQ1			
$VP1_{3914}$-Fw	5′-CATTTAGCATTGG	5 min, 95°C	0, 88379	[99]
	CAGAGA-3′	40 Zyklen:		
$VP1_{4108}$-Rev	5′-TAAAGGAGGAGT	5 Sek, 95°C		
	GGAAGT-3′	15 Sek, 60°C.		
VP1_6-FAM	FAM-5′-GATCTGGA			
_Sonde	GATGATCCCTTTG			
	GCTG-3′-BHQ1			
GAPDH-RT	5′-GACCTCAACTACA	5 min, 95°C	0, 92671	Diese
-Fw	TGGTTTACATGTTC	40 Zyklen:		Arbeit
	C-3′	5 Sek, 95°C		
		15 Sek, 60°C.		
LT-RT-Fw	5′-TATGTTTGATGAG	10 min, 95°C	1, 07101	Diese
	GTTGACG-3′	50 Zyklen:		Arbeit
LT-RT-Rev	5′-AGGTATATCGGGT	30 Sek, 95°C		
	CCTCTGGACTGGG-3′	30 Sek, 53°C		
		30 Sek, 72°C.		
		Schmelzkurve		
VP1-RT-Fw	5′-CATTAAAAGAGCT	10 min, 95°C	0, 9773	Diese
	GC-3′	50 Zyklen:		Arbeit
VP1-RT-Rev	5′-AGGCCTAGTACCA	30 Sek, 95°C		
	GAGGAAGA-3′	30 Sek, 52°C		
		40 Sek, 72°C.		
		Schmelzkurve		

* Die Ct Werte (bestimmt mit der Rotorgene Software Version 2.3.1) wurden gegen den log10 Wert der DNA-Template-Konzentration aufgetragen. Die Steigung der Kurve (M) ist dann die Effizienz der Reaktion nach der Formel: (10 - 1/M) - 1 = 1.

4.34 Immunfluoreszenz

Die Methode der Immunfluoreszenz dient dazu Proteine und ihre Lokalisation direkt in der Zelle sichtbar zu machen. Hierzu verwendet man, ähnlich zum Westernblot, Primärantikörper, die an das gewünschte Protein binden. Über Sekundärantikörper, die mit einen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind, wird der Primärantikörper sichtbar gemacht. Die Zellen können dann mittels Mikroskopie betrachtet und die Lokalisation des zu untersuchenden Proteins in der Zelle bestimmt werden. Durch Verwendung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist es außerdem möglich mehrere Proteine gleichzeitig in einer Zelle zu markieren.

4.34.1 Immunfluoreszenzfärbung

Sterile Deckgläser wurden in 24-*well* Zellkulturplatten gelegt und 5 Minuten mit Gelatine inkubiert. Die Gelatine wurde abgenommen und die Deckgläser 30 Minuten trocknen gelassen. Zur Immunfluoreszenzfärbung eines MCPyV Replikationsassays wurden pro 24-*well* $2{\cdot}10^4$ Pfsk-1 Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit XtremGene transfiziert (Abschnitt 4.21.3). Nach 4 Tagen wurde die Färbung der Zellen durchgeführt. Für die Immunfluoreszenz der MCC Zelllinien WaGa und MKL-1 wurden $8{\cdot}10^4$ Zellen in PBS aufgenommen, auf nicht beschichtete sterile Deckgläser gegeben und zur Anheftung der Zellen für 3 Stunden im Zellkulturbrutschrank bei 37°C inkubiert.
Die Zusammensetzung der Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbung ist in Tabelle 3 ausgewiesen. Grundsätzlich wurde für die Färbung das Medium oder das PBS von den Zellen abgenommen und einmal mit PBS gewaschen. Dann wurde 30 Minuten in PBS mit 4 % (v/v) Paraformaldehyd fixiert und zweimal 2 Minuten in PBS gewaschen. Um die Zellen zugänglich für Antikörper zu machen, wurde 10 Minuten in Permeabilisierungspuffer inkubiert und zweimal 2 Minuten in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurde 30 Minuten in Blocklösung inkubiert. Die Inkubation mit Primärantikörper verdünnt in Blocklösung erfolgte für 1, 5 Stunden bei Raumtemperatur. Pfsk-1 Zellen aus dem MCPyV Replikationsassay, wie auch WaGa und MKL-1 Zellen, wurden mit α-LT Antikörper CM2B4 (Verdünnung 1:500) und α-Usp7 Antikörper 3D8 (Verdünnung 1:10) behandelt. Danach wurde dreimal 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden ebenfalls in Blocklösung verdünnt und eine Stunde unter Lichtausschluss inkubiert. Für Pfsk-1 Zellen aus dem MCPyV Replikationsassay wurden Fluorescein (FITC) gekoppelter Ziege α-Maus Antikörper (Verdünnung 1:1000) und Rhodamine Red-X (RRX) gekoppelter Ziege α-Ratte Antikörper (Verdünnung 1:2000) verwendet. Für die Färbung der WaGa und MKL-1 Zellen wurden die gleichen Sekundärantikörper verwendet und zusätzlich Alexa Fluor® 633 gekoppeltes Phalloidin (Verdünnung 1:200) zur Anfärbung von Aktin. Nach der Färbung wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Fixierung der Deckgläser auf Objektträgern erfolgte mit *Vectashield mounty medium with Dapi*, um die

Zellkerne sichtbar zu machen.

4.34.2 Konfokale Mikroskopie und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Digitale Bilder der Immunfluoreszenzfärbungen wurden mittels eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Leica DMI 6000 mit einem Leica TCS SP5 Tandem Scanner) ausgestattet mit einem planen Öl-Immersionsobjektiv (63x HCX PL APO CS) aufgenommen. Die Adaption der Belichtung, die Überlagerung von Kanälen und das Einfügen der Maßstabsskala wurde mit der ImageJ Software durchgeführt. Die Zusammenstellung der Bilder erfolgte mittels Microsoft PowerPoint. Zur Messung der Kolokalisation des MCPyV LT und Usp7 im MCPyV Replikationsassay wurden Z-Schichten von zufällig ausgewählten LT positiven Zellen aufgenommen. Mithilfe der ImageJ Software und dem Plugin JACoP wurde der Pearson's Korrelationskoeffizient berechnet. Für den Abzug des Hintergrundes wurde als Grenzwert der durch JACoP berechnete *Costes' automatic threshold* angesetzt und die Signifikanz der Berechnung des Pearson's Korrelationskoeffizienten durch 100 Runden der Costes' Randomisierung verifiziert. In die weitere Analyse flossen nur Berechnungen mit einen p-Wert über 99, 99 % ein. Die Darstellung des Ergebnisses erfolgte mittels GraphPad Prism 5.

4.35 *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)

In einem sogenannten *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) lassen sich Interaktionen von DNA und Proteinen untersuchen. Hierzu wird das zu untersuchende DNA-Fragment radioaktiv markiert und mit Proteinen oder einem Zelllysat inkubiert. Die Reaktion wird dann mittels Elektrophorese in einem nativen Polyacrylamid-Gel analysiert. Die radioaktive DNA wird hierbei durch Auflegen eines Röntgenfilms auf das getrocknete Gel sichtbar gemacht. Das ungebundene DNA-Fragment wandert am schnellsten im Gel, im Vergleich zur DNA, an die Proteine gebunden haben, wodurch ein sogenannter *shift* entsteht. Die Stärke der Bindung lässt sich durch das Verhältnis von ungebundener zu gebundener DNA beurteilen. Durch die Zugabe eines für ein bestimmtes Protein spezifischen Antikörpers lässt sich außerdem bei der Inkubation von Zelllysaten und DNA der Interaktionspartner identifizieren, da der DNA-Protein-Antikörper Komplex noch langsamer im Gel wandert und daher einen sogenannten *super shift* verursacht.
Die EMSAs in dieser Arbeit wurden von Svenja Siebels aus der Arbeitsgruppe durchgeführt und die Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
$5{\cdot}10^6$ HEK293 Zellen wurden mit 10 µg pCMV2B-ER oder Leervektor als Kontrolle mittels PEI transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Kernextrakte nach der Methode von Schreiber et al. [205] und Bethge et al. [206] hergestellt. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 16 aufgelistet. Die Zellen wurden durch Abschaben mittels Zellschaber und Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 500xg geerntet. Das Zellpellet

wurde in 400 µl hypotonischem Puffer resuspendiert und nach 15 Minuten Inkubation auf Eis durch Zugabe von NP-40 in einer Endkonzentration von 0, 5 % (v/v) lysiert. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation für 30 Sekunden bei 4°C und 20 000xg gesammelt und in 200 µl Kernextraktspuffer resuspendiert. Nach 15 Minuten Rotation bei 4°C wurde für 5 Minuten bei 4°C und 20 000xg zentrifugiert. Der Überstand, welcher den Kernextrakt enthält, wurde abgenommen, die Proteinkonzentration mittels des Bradford Assays bestimmt (Abschnitt 4.27) und mit Kernextraktspuffer auf 1 µg/µl eingestellt.
Die radioaktiv markierte DNA des MCPyV *ori* wurde durch die Anlagerung von jeweils 10 pmol der Primer MCPyV-ori-1 and MCPyV-ori-2 (Tabelle 20) in 10 µl Annealing-Puffer hergestellt. Dafür wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und auf 25°C in Schritten von 5°C pro Minute abgekühlt. 100 ng der doppelsträngigen *ori*-Sonde wurden jeweils am 5'-Ende mit 1 µl γ^{32}P-ATP (9, 25 MBq, 250 µCi, Hartmann Analytic; SRP-501) durch Verwendung von 10 Einheiten T4 PNK Enzym (New England Biolabs) nach Herstelleranweisung markiert. Die Aufreinigung wurde mit den illustra MicroSpin G-25 Columns nach Herstelleranweisung durchgeführt und mit dH_2O auf ein Endvolumen von 200 µl aufgefüllt. Für die Bindungsreaktion (modifiziert nach Diaz et al. [103]) wurden 2 µg des Kernextrakts mit verschiedenen Mengen von BSA oder His_6-Usp7 (#E-519, Boston Biochem) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit Puffer auf 20 µl aufgefüllt, so dass sich eine Endkonzentration von 30 mM Tris HCl pH 8, 0, 10 % (v/v) Glycerol, 5 mM AMP-PNP, 25 ng/ µl BSA, 3 ng/ µl Sonicated Sperm DNA, 0, 5 ng/ µl Poly d(I-C), 1 mM PMSF und 25 pg/ µl markierte MCPyV *ori*-Sonde ergab. Die Reaktion wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, für den Nachweis eines *super shifts* wurden 0, 5 µg LT spezifischer CM2B4 Antikörper hinzugegeben und weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Trennung der Reaktion in einem nativen Polyacrylamid-Gel (Novex TBE gels, 4 - 12 %) bei 180 V für 40 Minuten. Das Gel wurde für 10 Minuten in Geltrocknungspuffer inkubiert und über Nacht getrocknet. Die Autoradiographie wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

5 Ergebnisse

5.1 Interaktion von Usp7 mit den MCPyV T-Antigenen

Zur Untersuchung des Einflusses von Usp7 auf den Lebenszyklus des MCPyV wurden die Interaktionen zwischen Usp7 und den MCPyV T-Antigenen genauer charakterisiert. Dazu wurden zunächst die Aminosäure-Sequenzen der T-Antigene hinsichtlich potentieller Usp7-Bindemotive analysiert. Darauf folgte die genaue Untersuchung der Interaktion über Koimmunpräzipitationen und GST-Pulldowns.

5.1.1 Putative Usp7 Bindungsstellen in den MCPyV T-Antigenen

In der Literatur sind bisher drei Konsensusmotive in Zielproteinen von Usp7 beschrieben, die für die Interaktion verantwortlich sind. Das P/A-x-x-S Motiv wurde in diversen Proteinen als entscheidendes Motiv für die Bindung der N-terminalen TRAF-Domäne von Usp7 beschrieben (siehe Abbilung 7 in der Einleitung) [134–136]. EBNA1 von EBV, sowie das vIRF1 Protein von KSHV binden jedoch mit einem E-G-P-S Motiv [136, 195], weswegen davon ausgegangen wird, dass auch ein E-x-x-S Motiv die Bindung vermitteln könnte [136]. Als Motiv für die Bindung an die HUbl2 von Usp7 wurde K-x-x-x-K identifiziert [145]. Abbildung 8 zeigt schematisch das Vorhandensein dieser Motive in den MCPyV T-Antigenen. In Anhang A.1 in Abbildung 23 befindet sich eine genaue Markierung der Motive in den Sequenzen. In der LT Proteinsequenz ist auffällig, dass das P/A-x-x-S und das E-x-x-S Motiv vor allem in den sogenannten *MCPyV Unique Regions* (MUR) vor und nach der Rb-Bindedomäne liegen. Beim E-x-x-S Motiv findet sich jedoch keine Übereinstimmung mit dem Original-Motiv E-G-P-S. Das K-x-x-x-K Motiv hingegen kommt nicht in den MUR vor. Insgesamt besitzt das MCPyV LT 16 P/A-x-x-S, neun E-x-x-S und sieben K-x-x-x-K Motive. Da die meisten P/A-x-x-S und E-x-x-S Motive im MCPyV LT vor und nach der Rb-Bindedomäne liegen, sind alle bis auf die letzten vier P/A-x-x-S und die letzten zwei E-x-x-S Motive auch in der verkürzten Form, dem tLT, welches in MCC Tumoren exprimiert wird, zu finden. Im MCPyV sT ist nur ein K-x-x-x-K Motiv durch den gemeinsamen N-Terminus mit LT enthalten und auch nur ein P/A-x-x-S Motiv. Dieses überlappt mit einer der Interaktionsstellen von PP2A [127].

5.1.2 Die MCPyV T-Antigene kopräzipitieren endogenes Usp7

In Koimmunpräzipitationen wurde die Bindung von Usp7 an die MCPyV T-Antigene weiter untersucht. Hierzu wurden die komplette frühe Region (*Early Region*, ER) des MCPyV und die verkürzte Variante aus den Tumoren (tER) N- oder C-terminal YFP-fusioniert und in H1299 Zellen überexprimiert (Abbildung 9 A). Bei der Präzipitation mittels YFP-bindender Beads (GFP-Trap® _A) aus Zelllysaten wurden somit beim N-

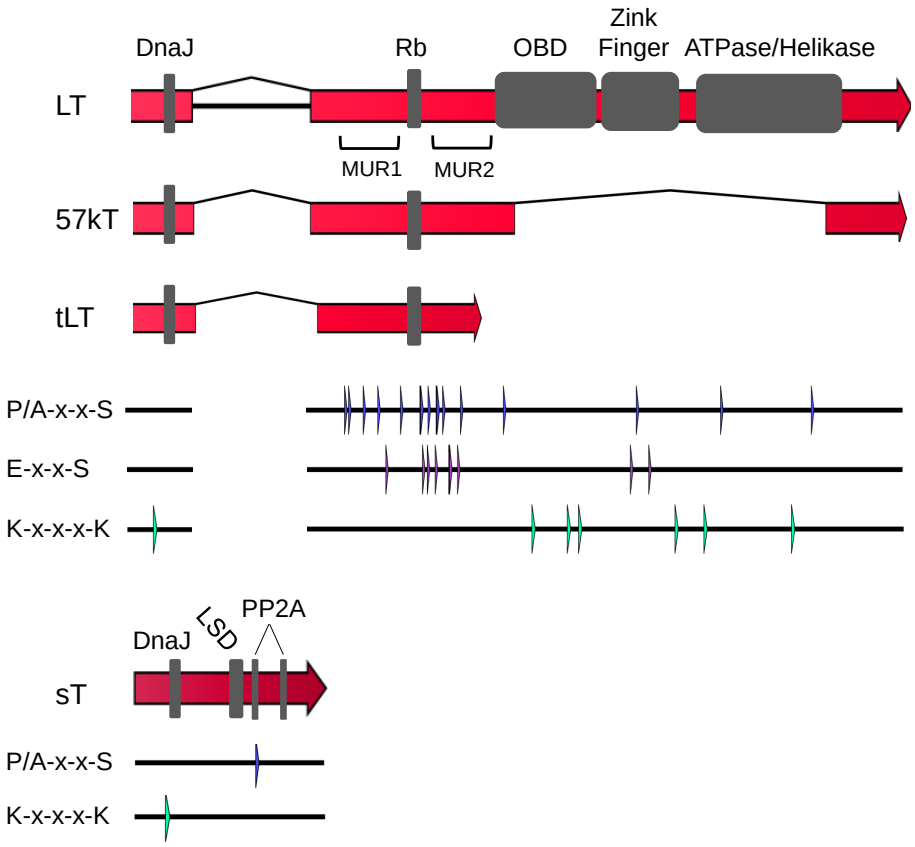

Abbildung 8: Usp7-Bindemotive in MCPyV T-Antigenen. P/A-x-x-S Konsensusmotiv für die Bindung der N-terminalen TRAF-Domäne von Usp7, auch zu finden in p53 und Mdm2; E-x-x-S, Bindung der TRAF-Domäne, zu finden in EBNA1; K-x-x-x-K Konsensusmotiv für die Bindung der HUbl2-Domäne von Usp7, zu finden in GMPS, UHRF1 und ICP0. LT besitzt 16 P/A-x-x-S Motive (teilweise überlappend), hauptsächlich in den MURs, neun E-x-x-S Motive (teilweise überlappend) und sieben K-x-x-x-K Motive. Bis auf die letzten drei sind im 57kT die gleichen P/A-x-x-S Motive wie in LT vorhanden, ebenso fehlen die letzten zwei E-x-x-S Motive und alle bis auf das erste K-x-x-x-K Motiv. Im tLT fehlen die letzten vier P/A-x-x-S Motive, sowie E-x-x-S und K-x-x-x-K wie bei 57kT. ST besitzt ein K-x-x-x-K Motiv, kein E-x-x-S, sowie ein P/A-x-x-S, welches jedoch mit der PP2A Bindestelle überlappt. Eine genaue Auflistung der Bindungsstellen befindet sich im Anhang A.1 in Abbildung 23.

terminalen YFP-Tag LT , 57kT und sT gebunden, während beim C-terminalen Tag nur LT und 57kT angereichert wurden. Abbildung 9 A zeigt, dass alle T-Antigen Konstrukte endogenes Usp7 kopräzipitierten. Das tER-Konstrukt wies eine schwächere Kopräzipitation trotz stärkerer Expression als das Volllängen-Konstrukt auf. Die C-terminal fusionierten Konstrukte zeigten ebenfalls eine deutlich geringere Kopräzipitation von Usp7, wurden jedoch auch schwächer exprimiert als die N-terminal fusionierten Proteine. Um den Einfluss von sT zu untersuchen, wurde nicht mit einem Tag fusioniertes sT zu den C-terminal YFP fusionierten Konstrukten dazu transfiziert. Dies führte im Falle des Volllängen-Konstruktes zu einer schwächeren Bindung von Usp7, was auf eine Konkurrenz der Bindung von sT und LT an Usp7 hinwies. Um dies weiter zu analysieren, wurde daher eine Koimmunpräzipitation mit N- und C-terminal YFP fusioniertem sT durchgeführt (Abbildung 9 B). Diese ergab, dass auch das sT endogenes

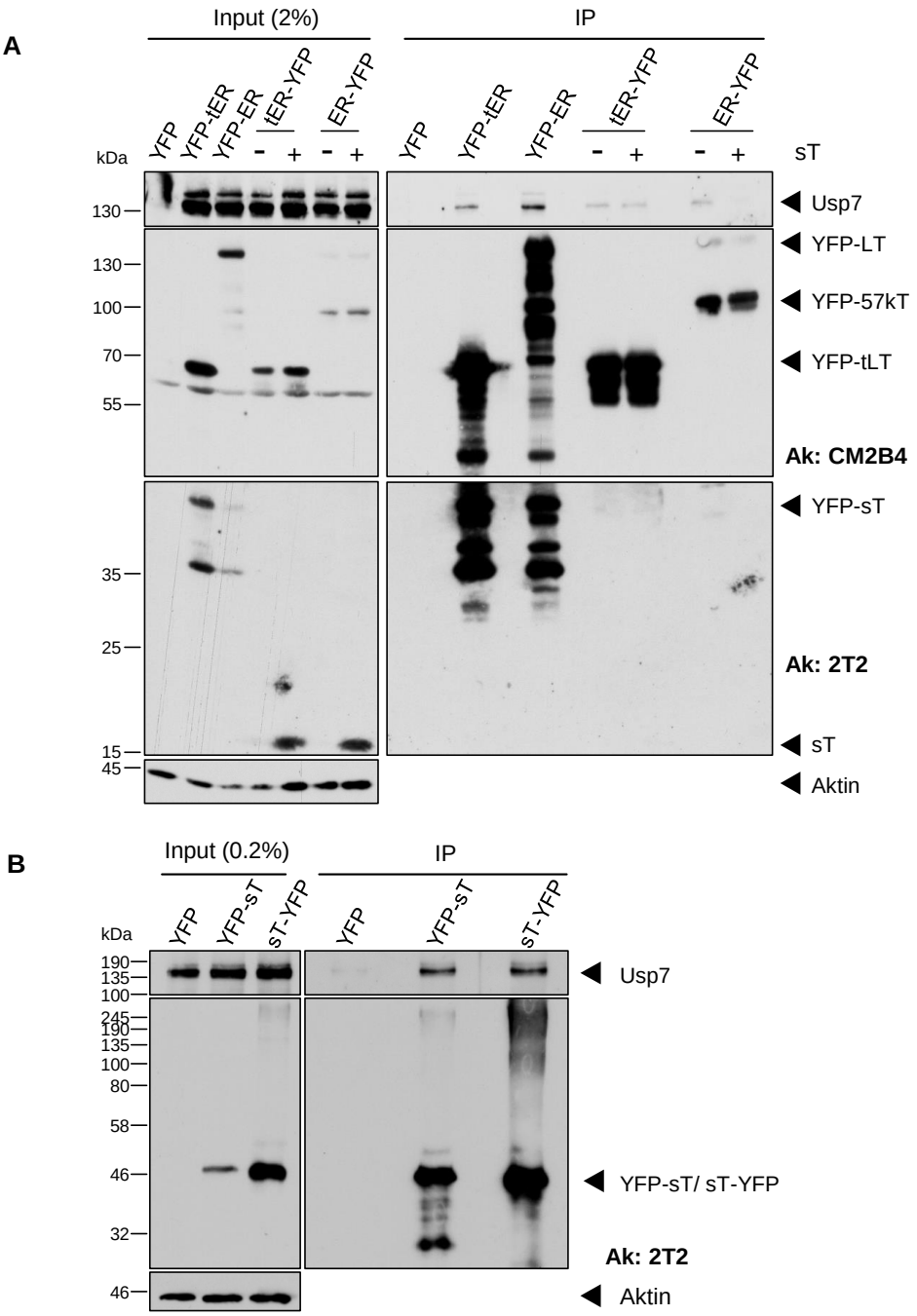

Abbildung 9: Koimmunpräzipitation der MCPyV T-Antigene und Usp7. A: H1299 Zellen wurden mit der N- oder C-terminal YFP fusionierten frühen Region (ER) oder der tumorspezifischen verkürzten Variante (tER) des MCPyV bzw. dem Leervektor (YFP) transfiziert. N-terminal fusionierte Konstrukte exprimieren YFP-LT, YFP-57kT und YFP-sT bzw. YFP-tLT und YFP-sT. Die C-terminal fusionierten Konstrukte exprimieren schwach LT-YFP und 57kT-YFP bzw. tLT-YFP und kein detektierbares sT, wenn nicht mit pMTBS (sT) kotransfiziert. Der obere Blot zeigt kopräzipitiertes endogenes Usp7, die unteren die Immunpräzipitation der YFP-Proteine mittels GFP-Trap® _A, sowie Aktin im Input zur Überprüfung gleicher Auftragsmengen. Auftrag: 2 % eingesetztes Lysat (Input), 100 % präzipitiertes Protein (IP). **B:** H1299 Zellen wurden mit dem N- oder C-terminal YFP fusionierten MCPyV sT oder dem Leervektor (YFP) transfiziert. C-terminal fusioniertes sT zeigt ein höheres Expressionslevel als das N-terminal fusionierte Protein. Der obere Blot zeigt kopräzipitiertes endogenes Usp7, die unteren die Immunpräzipitation der YFP-Proteine mittels GFP-Trap® _A, sowie Aktin als Ladekontrolle. Auftrag: 0, 2 % eingesetztes Lysat (Input), 100 % präzipitiertes Protein (IP). Ak = Antikörper.

Usp7 präzipitiert.

5.1.3 Das MCPyV LT bindet die TRAF-Domäne von Usp7

Zur Untersuchung, welche Domäne von Usp7 für die Interaktion mit den MCPyV T-Antigenen verantwortlich ist, wurden GST-Pulldowns mit GST fusionierten Domänen von Usp7 durchgeführt. Hierfür wurden die N-terminale TRAF-Domäne, die katalytische Domäne, HUbl123 und HUbl45 als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Die aufgereinigten Domänen wurden mit Lysaten aus der Überexpression der MCPyV T-Antigene in H1299 Zellen inkubiert und dann auf eine Bindung der T-Antigene mittels Westernblot analysiert. Abbildung 10 A zeigt eine eindeutige Bindung des LT, 57kT und tLT an die N-terminale TRAF-Domäne von Usp7 (Spur 7 - 9). Das LT wies dabei trotz geringerer Expression eine deutlich stärkere Bindung als das tLT auf, besonders hochmolekulare LT Oligomere wurden verstärkt gebunden (Spur 9). Dieses Experiment wurde ebenfalls mit Lysaten aus der Überexpression von sT sowohl in H1299 als auch in Pfsk-1 Zellen durchgeführt, hierbei konnte jedoch keine Bindung festgestellt werden (nicht gezeigt).

5.1.4 Das MCPyV LT konkurriert mit p53 um die Bindung an Usp7

EBV kodiertes EBNA1, sowie vIRF1 von KSHV konkurrieren mit p53 um eine Bindung an Usp7 mit der Folge, dass p53 verdrängt und destabilisiert wird [135, 193, 195]. Auf Basis dieser Theorie wurden die GST-Pulldowns mit der N-terminalen TRAF-Domäne von Usp7 und der MCPyV ER und tER unter Kotransfektion von p53 in p53 negativen H1299 Zellen wiederholt. Abbildung 10 B zeigt, dass p53 an Usp7 bindet und damit die Bindung des LT (Spur 12) und vor allem des tLT (Spur 10) an Usp7 verringert. Im Gegensatz zum erwarteten Ergebnis war sogar eine verstärkte Bindung von p53 an Usp7 bei gleichzeitiger Expression der T-Antigene zu beobachten. Dies zeigt, dass im Gegensatz zu EBNA1 und vIRF1 die Bindeaffinität der MCPyV T-Antigene zu Usp7 im Vergleich zu p53 geringer ist und dieses nicht durch die T-Antigene verdrängt und destabilisiert wird.

5.1.5 Der MCPyV LT N- und C-Terminus interagieren direkt mit der TRAF-Domäne von Usp7

Um eine direkte Interaktion der MCPyV T-Antigene und Usp7 nachzuweisen und die Bindungsstelle im LT einzugrenzen, wurde ein GST-Pulldown der Usp7 Proteine mit aus *E. coli* aufgereinigten LT N- und C-Terminus Proteinen durchgeführt. Der LT N-Terminus wurde von Sophie Borchert in der Arbeitsgruppe aufgereinigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt [65]. Die Aufreinigung des LT C-Terminus wurde neu etabliert und ist in Anhang A.2 in Abbildung 24 A dargestellt. Der N-Terminus

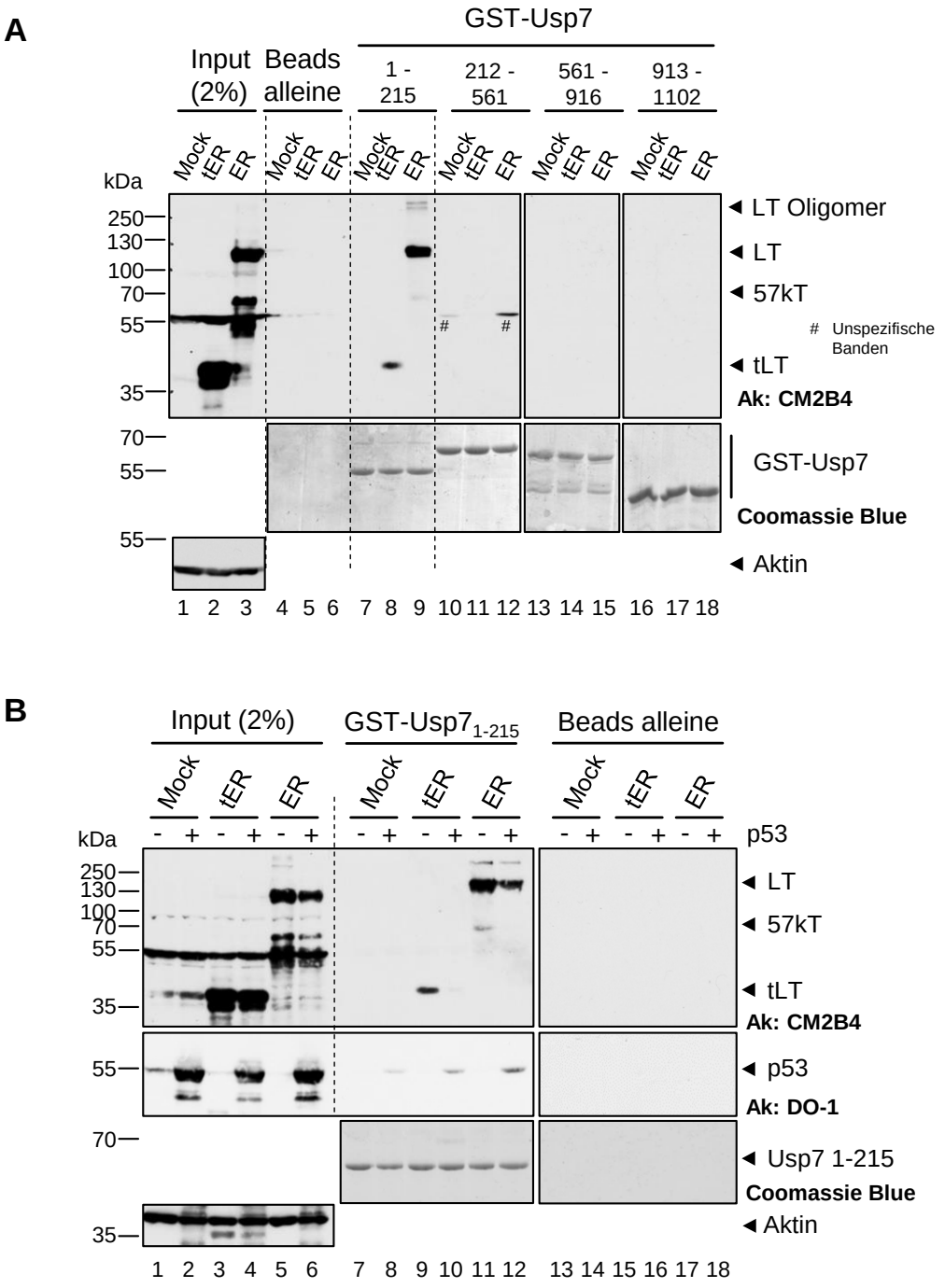

Abbildung 10: GST-Pulldown der MCPyV T-Antigene mit GST-Usp7 Domänen. A: 15 µg GST-Usp7 Protein (Aminosäure (As) 1 - 215 = TRAF-Domäne, As 212 - 561 = katalytische Domäne, As 561 - 916 = HUbl123, As 913 - 1102 = HUbl45) aufgereinigt aus *E. coli* (Coomassie Blue) wurden mit Zelllysaten aus H1299 Zellen inkubiert. In den Zellen wurde die MCPyV frühe Region (ER, Expression von LT, 57kT, sT) (Spur 3), die tumorspezifische verkürzte Variante (tER, Expression von tLT, sT) (Spur 2) oder der Leervektor (Mock) (Spur1) überexprimiert. 2 % des eingesetzten Zelllysats (Input) sind in Spur 1 - 3 aufgetragen. Spur 4 - 6 zeigt als Kontrolle die Inkubation mit den Beads alleine, Spuren 7 - 17 zeigen die Proteine, die mit den jeweiligen GST-Usp7 Domänen interagieren, visualisiert durch den Antikörper (Ak) CM2B4 im Westernblot. Pro Spur jeweils 50 % Auftrag für Coomassie Färbung und 50 % für Westernblot. Aktin-Färbung im Input zur Überprüfung gleicher Auftragsmengen. **B:** Experiment wie in A, H1299 Zellen wurden zusätzlich mit Leervektor (- p53) oder p53 Expressionsvektor (+ p53) transfiziert.

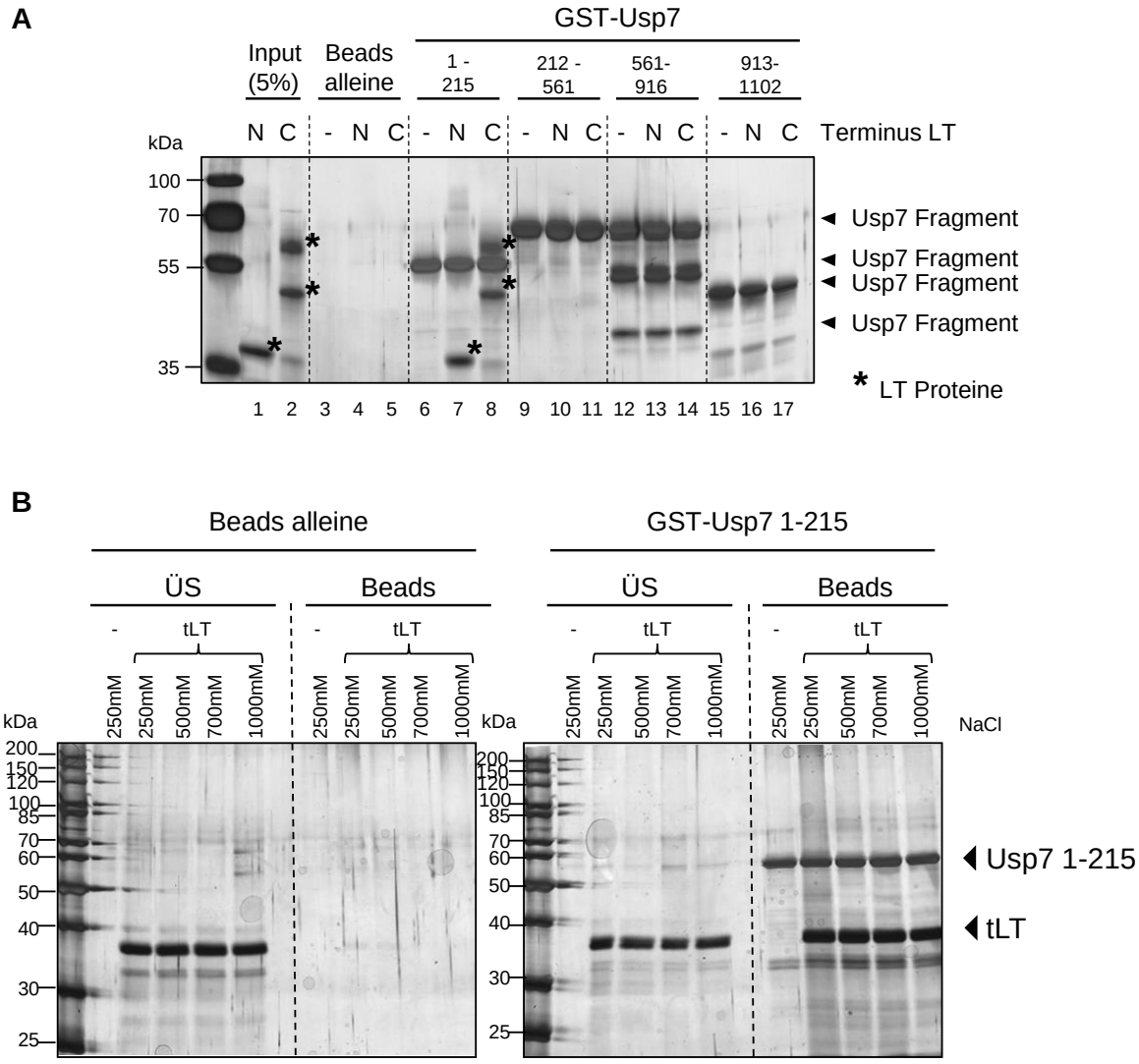

Abbildung 11: Direkter GST-Pulldown der MCPyV LT N- und C-Terminus Proteine mit GST-Usp7 Domänen. A: GST-Usp7 Proteine (Aminosäure (As) 1 - 215 = TRAF-Domäne, As 212 - 561 = katalytische Domäne, As 561 - 916 = HUbl123, As 913 - 1102 = HUbl45) und MCPyV LT N- und C-Terminus wurden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Jeweils 12 µg der GST-Usp7 Proteine wurden an Glutathion Sepharose Beads gebunden, mit 27 µg LT N-Terminus oder 90 µg LT C-Terminus Protein inkubiert und interagierende Proteine mittels Silberfärbung visualisiert. In Spur 1 und 2 (Input) sind 5 % der eingesetzten LT Proteine aufgetragen, in Spur 3 - 5 (Inkubation mit den Beads alleine) und Spuren 6 - 17 (Inkubation mit verschiedenen Einheiten von Usp7) 100 %. **B:** Experiment wie in A mit LT N-Terminus und GST-Usp7 1 - 215 unter steigender NaCl Konzentration (250 - 1000 mM). ÜS = Überstand.

von LT (Aminosäuren 1 - 244) entspricht dem tLT und enthält damit 12 P/A-x-x-S, sieben E-x-x-S und ein K-x-x-x-K Motiv. Der C-Terminus von LT (Aminosäuren 259 - 818) enthält vier P/A-x-x-S, zwei E-x-x-S und sechs K-x-x-K Motive (siehe Abbildung 8 und im Anhang A.1 in Abbildung 23). Abbildung 11 zeigt eine Bindung sowohl des LT N-Terminus als auch des C-Terminus an die N-terminale TRAF-Domäne von Usp7. Damit lässt sich die Bindungsstelle von Usp7 nicht auf bestimmte Motive eingrenzen. In Abbildung 11 B ist zu erkennen, dass die Interaktion des N-Terminus von LT auch bei sehr hohen Salzkonzentrationen (1M NaCl) stabil bleibt. Diese Ergebnisse weisen damit eindeutig die direkte Interaktion zwischen Usp7 und dem MCPyV LT N- und C-Terminus nach.

5.1.6 Keine nachweisbare Bindung des MCPyV sT an Usp7

In Koimmunpräzipitationen (Abschnitt 5.1.2) konnte eine Präzipitation von endogenem Usp7 durch sT detektiert werden. Dagegen konnte in GST-Pulldowns von Zelllysaten aus Überexpressionen keine Bindung von sT an eine der vier individuellen Domänen von Usp7 nachgewiesen werden (Abschnitt 5.1.3). Um weiter zu untersuchen, ob sT direkt mit Usp7 interagiert oder indirekt über einen weiteren unbekannten zellulären Faktor, wurde sT in *E. coli* exprimiert und über einen MBP-Tag aufgereinigt. Die Aufreinigung des MCPyV sT wurde neu etabliert und ist in Anhang A.2 in Abbildung 24 B dargestellt. Aufgrund von mangelnder Stabilität des sT Proteins konnte der MBP-Tag nicht abgespalten werden, so dass alle Experimente mit dem MBP-sT Fusionsprotein durchgeführt wurden. Um außerdem die Möglichkeit zu adressieren, dass sT mehr als eine Domäne von Usp7 für die Interaktion benötigt, wurde zusätzlich das komplette Usp7 Protein über einen GST-Tag aus Insektenzellen aufgereinigt, da eine Expression des Volllängenproteins in Bakterien nicht möglich ist. Die Aufreinigung des Volllängen Usp7 Proteins wurde ebenfalls neu etabliert und ist in Anhang A.2 in Abbildung 24 C dargestellt. Abbildung 12 A zeigt einen direkten GST-Pulldown des MBP-sT mit dem kompletten GST-Usp7 Protein, sowie den vier individuellen Domänen. Als Kontrollen wurden der LT N- und C-Terminus in diesem Experiment mitgeführt. Der LT N- und C-Terminus banden wie erwartet die TRAF-Domäne von Usp7 (Spur 13 und 14), jedoch nur der N-Terminus band schwach an das komplette Protein (Spur 9). Für das sT war keine Bindung an das komplette Usp7, wie auch die vier Abschnitte des Proteins zu erkennen, jedoch befand sich die sT-Bande auf Höhe der TRAF-Domäne. Deshalb wurde zusätzlich ein Westernblot durchgeführt (Abbildung 12 B). Hier kann keine Aussage getroffen werden, da das sT unspezifisch mit der Sepharose interagierte (Spur 3).

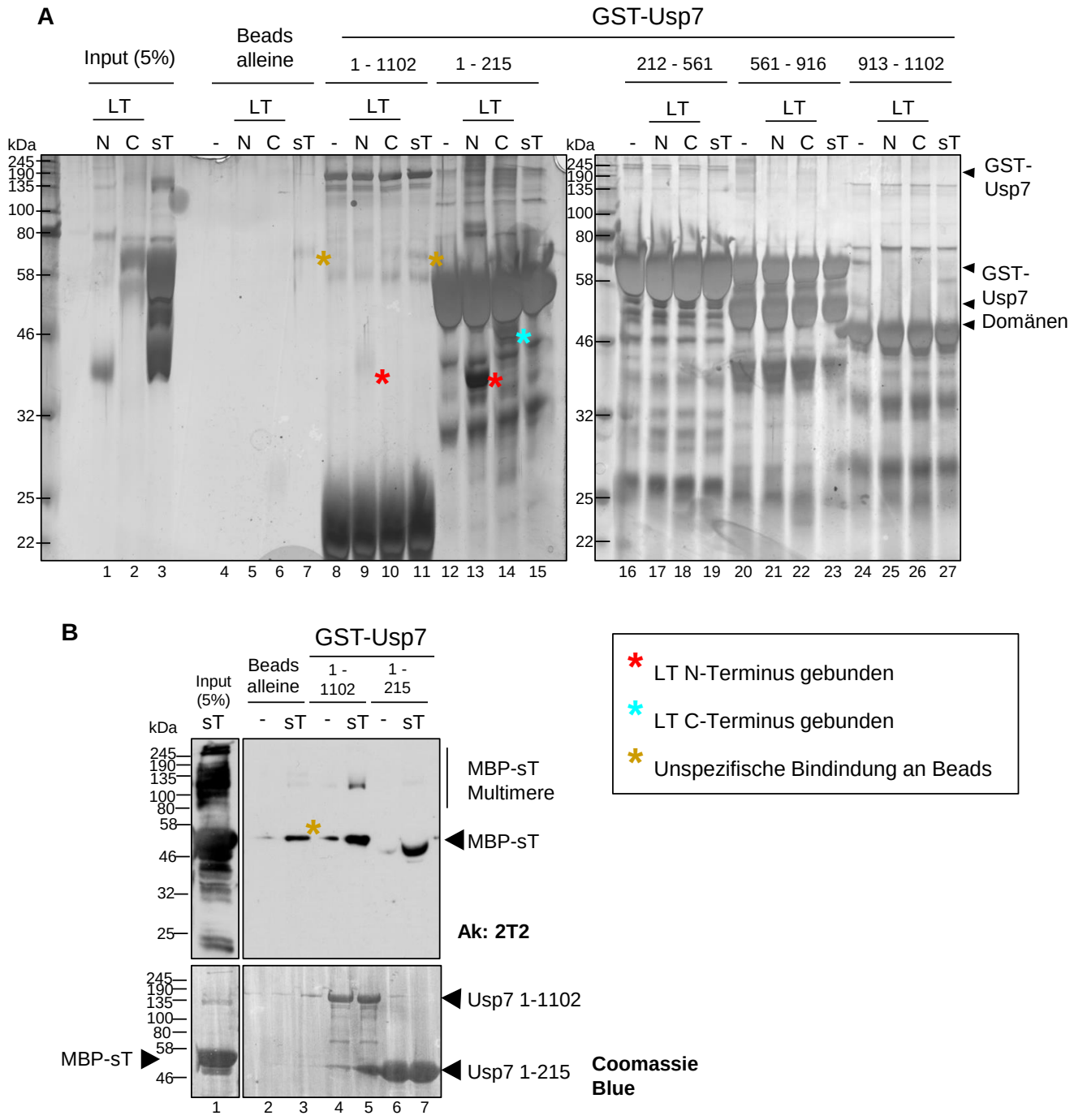

Abbildung 12: Direkter GST-Pulldown des MCPyV sT mit GST-Usp7. A: GST-Usp7 Proteine (Aminosäure (As) 1 - 215 = TRAF-Domäne, As 212 - 561 = katalytische Domäne, As 561 - 916 = HUbl123, As 913 - 1102 = HUbl45), MCPyV LT N- und C-Terminus und MCPyV MBP-sT wurden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. GST-Usp7 As 1 - 1102 wurde in *Sf*9 Zellen exprimiert und aufgereinigt. 90 µg GST-Usp7 1 - 1102 oder 15 µg der GST-Usp7 Domänen wurden an Glutathion Sepharose gebunden, mit 27 µg LT N-Terminus, 45 µg LT C-Terminus oder 90 µg MBP-sT Protein inkubiert und interagierende Proteine mittels Silberfärbung visualisiert. In Spur 1 - 3 (Input) sind 5 % der eingesetzten LT bzw. sT Proteine aufgetragen, in Spur 5 - 7 (Inkubation mit Beads alleine) und Spuren 8 - 27 (Inkubation mit Usp7 1 - 1102 und Usp7 Einheiten) 100 %. **B:** Experiment wie in A mit 130 µg GST-Usp7 1 - 1102 und 10 µg GST-Usp7 1 - 215 inkubiert mit 90 µg MBP-sT. In Spur 1 (Input) ist 5 % des eingesetzten MBP-sT Protein aufgetragen, in Spuren 2 und 3 (Inkubation mit Beads alleine) und Spuren 4 - 7 (Inkubation mit GST-Usp7 1 - 1102 und GST-Usp7 1 - 215) 100 %. Visualisierung von sT im Westernblot mittels 2T2 Antikörper.

5.2 Einfluss von Usp7 auf die Ubiquitinierung von LT

Usp7 ist ein Deubiquitinierungsenzym mit diversen zellulären wie auch viralen Substratproteinen (siehe Einleitung Abschnitt 2.3.1 und 2.3.2). Das MCPyV LT konnte in dieser Arbeit als neuer direkter Interaktionspartner der N-terminalen TRAF-Domäne von Usp7 identifiziert werden. Da diese Domäne für die Bindung zahlreicher Proteine verantwortlich ist, die von Usp7 deubiquitiniert werden, wurde im Folgenden der Einfluss von Usp7 auf die Ubiquitinierung der MCPyV T-Antigene untersucht.

5.2.1 Einfluss von Usp7 auf die Stabilität und die Halbwertszeit der MCPyV T-Antigene

Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, hat die Ubiquitinierung und Deubiquitinierung von Proteinen diverse Funktionen. Eine Hauptfunktion der über K48-verknüpften Poly-Ubiquitinierung ist die Markierung von Proteinen für den Abbau im Proteasom [146]. Davor schützt Usp7 viele seine Interaktionspartner durch seine Deubiquitinierungsfunktion [134, 138–140]. Zur Untersuchung, ob Usp7 auch an der Stabilisierung der T-Antigene des MCPyV beteiligt ist, wurden zunächst die T-Antigen Expressionslevel in Zelllinien, welche einen Usp7 knockdown (k/d) (H1299 shUsp7) oder Usp7 knockout (k/o) (HCT116 k/o Usp7) besitzen, mit den entsprechenden Kontrollzelllinien verglichen. Die Usp7 k/d Zellen wurden durch eine Transduktion von H1299 Zellen mit einem shRNA exprimierenden γ-retroviralen Konstrukt hergestellt. Als Kontrollzellen dienten H1299, die mit dem Leervektor transduziert wurden. Beide Zelllinien wurden freundlicherweise von Wilhelm Ching zur Verfügung gestellt [191]. Die HCT116 k/o Usp7 Zelllinie wurde zusammen mit der Wildtyp Kontrollzelllinie freundlicherweise von Bert Vogelstein zur Verfügung gestellt [147].
In allen Zelllinien wurden die MCPyV T-Antigene ektopisch überexprimiert. Die Usp7 k/d und k/o Zelllinien zeigten grundsätzlich eine geringere Transfektionseffizienz als die Kontrollzelllinien, daher wurde ein Expressionskonstrukt für YFP als Kontrolle kotransfiziert (Abbildung 13). Die Untersuchung der T-Antigen Proteinlevel in Abhängigkeit zur YFP-Expression stellte sich jedoch als zu ungenau und zu stark variabel zwischen den verschiedenen Zelllinien heraus (siehe Spur 2, 7 und 16), um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Außerdem waren die Ergebnisse nicht reproduzierbar. Um die unterschiedlichen Transfektionseffizienzen zu umgehen, wurden Zelllinien hergestellt, die stabil LT bzw. sT exprimieren (HCT116 LT, HCT116 sT, H1299 sT). Diese wurden mit siRNAs gegen Usp7 transfiziert, da eine stabile Transfektion der HCT116 Usp7 k/o Zelllinie nicht erfolgreich war. Drei verschiedene siRNAs gegen die Usp7 mRNA (Tabelle 21), wurden getestet und jeweils mit der Transfektion einer unspezifischen siRNA (siControl1 oder siControl2) verglichen. Die siRNA „siUsp7 Tang“, deren Sequenz aus der Publikation von Tang et al. [198] entnommen wurde, zeigte die effektivste Herunterregulation der Usp7 Expression und wurde daher in allen nachfol-

genden Experimenten verwendet. Abbildung 14 zeigt, dass trotz einer erfolgreichen Reduktion der Usp7 Proteinexpression von geschätzt 50 bis 80 % keine veränderten LT und sT Proteinlevel oder Halbwertszeiten zu beobachten waren. Wie zu erkennen ist, lag die Halbwertszeit des MCPyV sT unabhängig von Usp7 ungefähr bei acht Stunden. Bei LT war keine Reduktion der Proteinmenge im gewählten Zeitraum erkennbar, da es eine Halbwertszeit von circa 24 Stunden besitzt (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe) und Usp7 keinen Einfluss darauf zu haben scheint. Die Funktionalität des Experiments wurde durch die Untersuchung des adenoviralen Proteins E4orf3/4 sichergestellt, welches eine Halbwerstzeit von circa 20 Minuten besitzt (Abbildung 14 unterste Reihe rechts). Eine Herunterregulation von Usp7 durch siRNA Transfektion in den MCC Zelllinien WaGa und MKL-1 war aufgrund mangelnder Transfektionseffizienz nicht erfolgreich. Auch eine Transduktion mit einem shRNA exprimierenden γ-retroviralen Konstrukt ließ keine Analyse zu, da es nicht möglich war nach der Selektion mit Puromycin erfolgreich transduzierte Zellen zu expandieren. Somit ließ sich keine Aussage zur Stabilität des tLT in Abhängigkeit von Usp7 treffen.

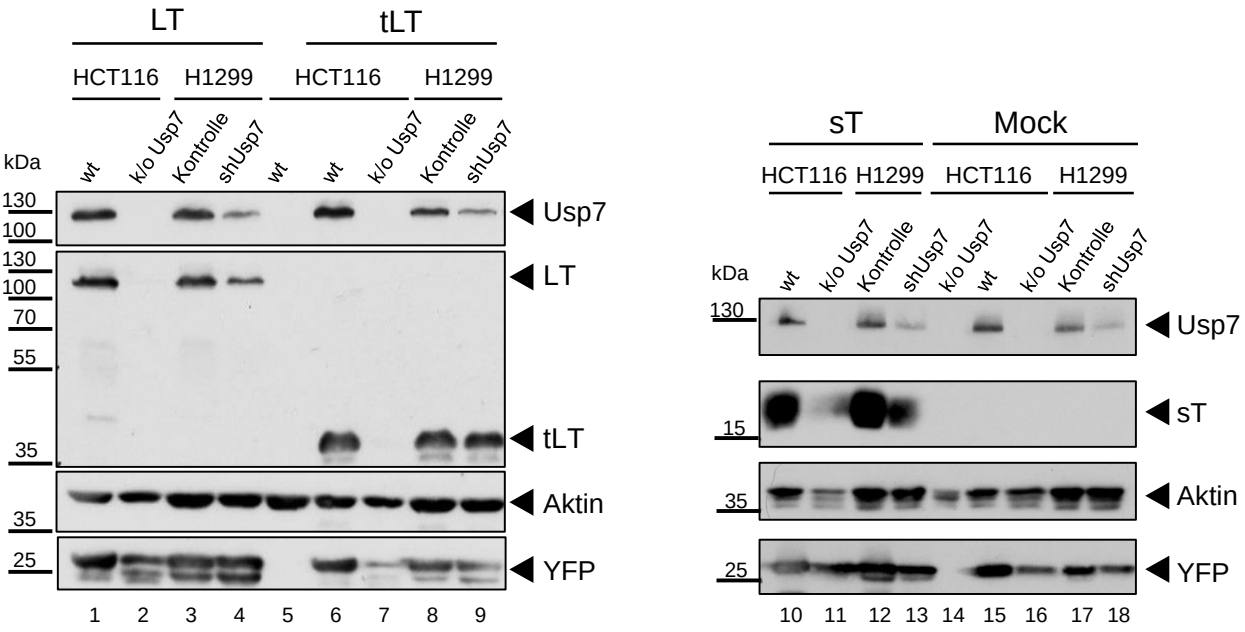

Abbildung 13: Proteinlevel transient exprimierter MCPyV T-Antigene in Abhängigkeit von Usp7. MCPyV LT, tLT, sT und Leervektor wurden in die jeweils angegebenen Zelllinien zusammen mit einem YFP exprimierenden Plasmid transfiziert, nach 48 Stunden Zelllysate hergestellt und im Westernblot analysiert. MCPyV LT wurde durch den Antikörper CM2B4, sT durch 2T2, Usp7 durch 3D8, YFP durch α-GFP 3H9 und Aktin durch α-Aktin C4 detektiert.

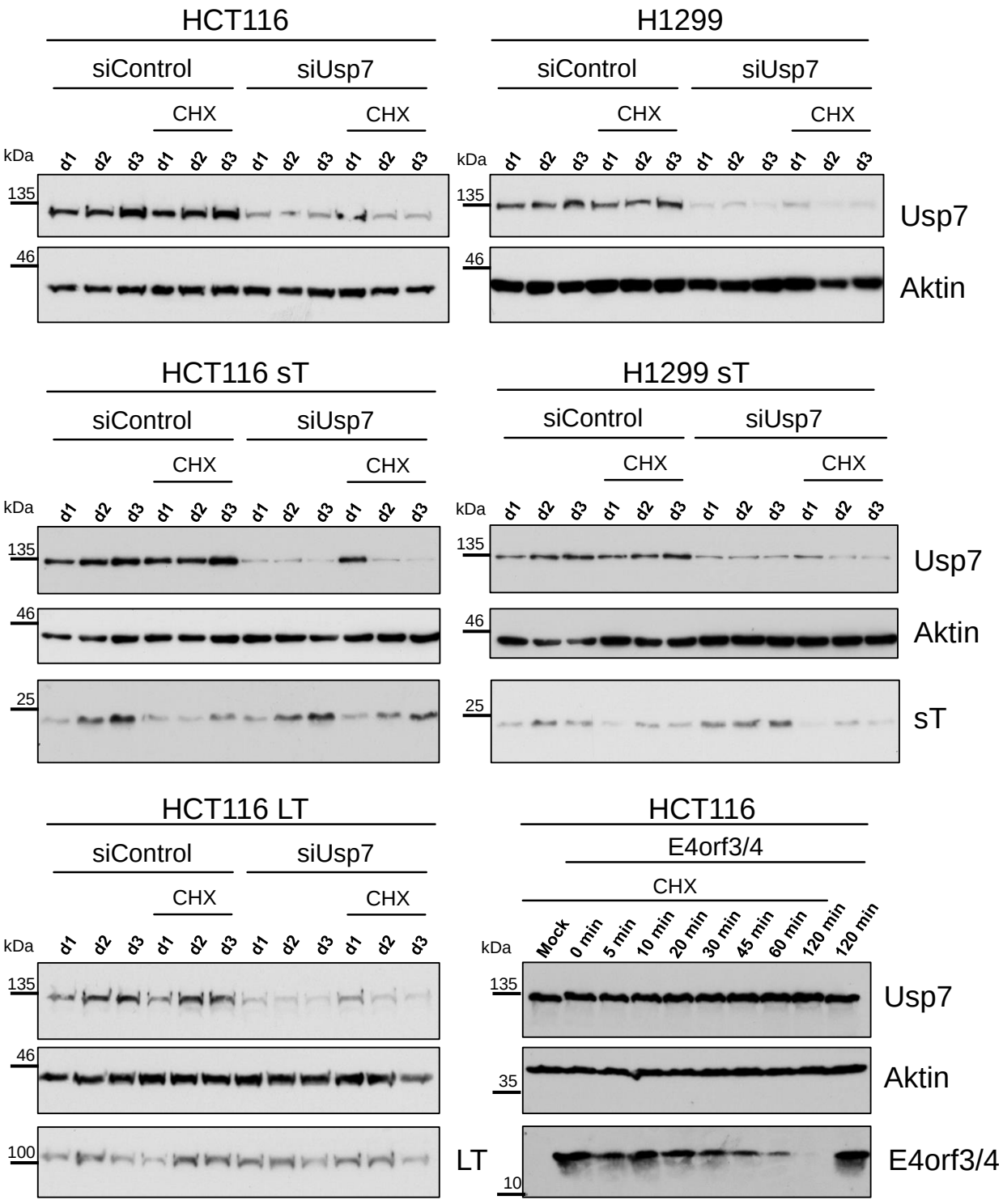

Abbildung 14: Proteinlevel stabil exprimierter MCPyV T-Antigene in Abhängigkeit von Usp7. HCT116, H1299, HCT116 sT, H1299 sT und HCT116 LT wurden mit siRNA gegen Usp7 (siUsp7 Tang) oder unspezifischer siRNA (siControl1) transfiziert und nach 1, 2 und 3 Tagen (d1, d2, d3) analysiert. Ein zweiter Ansatz wurde außerdem 8 Stunden vor Ernte der Zellen mit Cycloheximid (CHX) zur Untersuchung der Halbwertszeiten behandelt. Der Blot in der untersten Reihe rechts zeigt als Kontrolle für CHX das adenovirale Protein E4orf3/4, welches transient in HCT116 wt Zellen überexprimiert wurde. Die Zellen wurden für die angegebene Zeit mit CHX behandelt. MCPyV LT wurde durch den Antikörper CM2B4, sT durch 2T2, Usp7 durch 3D8, E4orf3/4 durch α-Flag® M2 und Aktin durch α-Aktin C4 detektiert.

5.2.2 Einfluss von Usp7 auf die Ubiquitinierung der MCPyV T-Antigene *in vivo*

Neben der Regulierung von Proteinstabilität kann die Ubiquitinierung und Deubiquitinierung diverse andere Funktionen erfüllen, so z. B. die Steuerung der Lokalisation oder Aktivität von Proteinen [146]. Daher wurde in weiteren Experimenten die Ubiquitinierung der MCPyV T-Antigene direkt analysiert. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimente stand kein vollständig permissives *in vitro* Replikationssystem für das MCPyV zur Verfügung und auch das jüngst von Liu et al. [110] publizierte System in humanen dermalen Fibroblasten stellt lediglich eine Verbesserung des vorhandenen Systems da. Dennoch ist auch in diesem System keine effektive serielle Transmission und Vermehrung des Virus möglich oder ein zytopathischer Effekt zu beobachten, wie es bei einem vollständig permissiven System zu erwarten wäre. Des Weiteren sind die Proteinmengen der T-Antigene in diesen semi-permissiven Replikationssystemen für eine Analyse der Ubiquitinierung zu gering. Daher wurden diverse Konstrukte von MCPyV T-Antigenen in verschiedenen Zelllinien überexprimiert, mittels Immunpräzipitation angereichert und anschließend im Westernblot auf ihre Ubiquitinierung in Abhängigkeit von Usp7 untersucht. Dabei wurde, sofern möglich, p53 als bekanntes Zielprotein von Usp7 zur Kontrolle mitgeführt. Tabelle 27 listet die verschiedenen Experimente mit ihren Problematiken und Ergebnissen auf. N- oder C-terminal YFP fusionierte T-Antigen und p53 Konstrukte wurden mittels Transfektion überexprimiert. FLAG® fusionierte T-Antigene wurden stabil durch die Zelllinien HCT116 LT, HCT116 sT und H1299 sT exprimiert. Als Methode der Immunpräzipitation wurde bei YFP fusionierten Konstrukten GFP-Trap®_A verwendet und bei den stabil exprimierenden Zelllinien FLAG®-IP. Verglichen wurde die Ubiquitinierung der T-Antigene in HCT116 wt Zellen mit der in HCT116 k/o Usp7 Zellen, HCT116 k/o Usp7 mit HCT116 k/o Usp7 plus Usp7 Überexpression oder HEK293/ HCT116 wt mit und ohne Behandlung durch den Usp7 Inhibitor HBX 41, 108. Bei den stabilen Zelllinien HCT116 LT, HCT116 sT und H1299 sT wurden die Zellen mit siRNAs gegen Usp7 transfiziert und die Ubiquitinierung der T-Antigene mit der in der Transfektion von Kontroll-siRNAs verglichen. Wie in Tabelle 27 dargestellt, führten die durchgeführten Experimente entweder zu keinem auswertbaren Ergebnis oder es konnte kein Einfluss auf die Ubiquitinierung der MCPyV T-Antigene durch Usp7 festgestellt werden. Da dies jedoch auch an den Unzulänglichkeiten der Methode liegen kann, wie z. B. einer zu geringen Herunterregulation der Usp7 Expression, lässt sich eine Deubiquitinierung der MCPyV T-Antigene durch Usp7 *in vivo* im Rahmen dieser Arbeit weder ausschließen noch bestätigen.

Tabelle 27: Experimentelle Ansätze zur Analyse der Ubiquitinierung der MCPyV T-Antigene in Abhängigkeit von Usp7 *in vivo*. Nachweis von Ubiquitin im Westernblot jeweils mittels α-HA-Antikörper außer bei HCT116 LT, HCT116 sT und H1299 sT mittels α-Ubiquitin. Nachweis der T-Antigene und p53 mittels α-GFP oder 2T2, CM2B4 bzw. DO-1. ER = Frühe Region, exprimiert LT, 57kT und sT. tER = Tumorspezifische verkürzte frühe Region, exprimiert tLT und sT. HA-Ubi = HA fusioniertes Ubiquitin.

Vergleich	**Transfektion**	**Präzipitation**	**Ergebnis**
• HCT116 wt • HCT116 k/o Usp7	HA-Ubi + • YFP • YFP-ER • ER-YFP • YFP-tER • tER-YFP • YFP-LT • YFP-tLT • YFP-sT • sT-YFP • YFP-p53 • p53-YFP	GFP-Trap®	Sehr viel geringere (circa 20 fach) Transfektionseffizienz der HCT116 k/o Usp7 Zellen im Vergleich zu HCT116 wt Zellen bei allen Konstrukten. Daher keine Aussage zu Ubiquitinierungslevel möglich. Angleichung durch Verwendung unterschiedlicher DNA-Mengen war nicht erfolgreich.
HCT116 k/o Usp7 transfiziert mit • Usp7 • Leervektor	HA-Ubi + • YFP • YFP-ER • ER-YFP • YFP-tER • tER-YFP • YFP-LT • YFP-tLT • YFP-sT • sT-YFP • YFP-p53 • p53-YFP	GFP-Trap®	Kein Unterschied in der Ubiquitinierung der T-Antigene oder p53 zwischen Leervektor oder Usp7 rekonstituierten Zellen detektierbar, jedoch sehr schwache Expression von Usp7.
HEK293, HCT116 + • 10 - 60 μM HBX 41, 108 oder • DMSO	HA-Ubi + • YFP • YFP-ER • ER-YFP • YFP-tER • tER-YFP • YFP-LT • YFP-tLT • YFP-sT	GFP-Trap®	Kein Einfluss auf Ubiquitinierung der T-Antigene oder p53 durch Usp7 Inhibitor HBX 41, 108 [207] detektierbar, jedoch verstärktes Absterben der Zellen bereits bei 10 μM HBX 41, 108.

	• sT-YFP • YFP-p53 • p53-YFP		
HCT116 LT, HCT116 sT, H1299 sT transfiziert mit • siUsp7 oder • siControl	• - • HA-Ubi	FLAG®-IP	Kein Einfluss auf Ubiquitinierung von LT detektierbar, jedoch maximal 50 % Herunterregulation von Usp7 bei siUsp7. Bei sT trotz Überexpression von HA-Ubiquitin keine spezifischen Ubiquitin-Banden erkennbar, daher keine Aussage möglich.

5.2.3 Usp7 deubiquitiniert MCPyV T-Antigene *in vitro*

Da es nicht möglich war eine Deubiquitinierung der MCPyV T-Antigene oder der Kontrolle p53 durch Usp7 in Überexpressionsexperimenten in Zellen zu zeigen und eine Analyse im natürlichen Lebenszyklus des MCPyV nicht möglich ist, wurden *in vitro* Deubiquitinierungsassays mit aufgereinigten Proteinen durchgeführt. Hierfür wurden die frühe Region des MCPyV (ER), welche für LT, sT und 57kT kodiert und die tumorspezifische verkürzte Variante (tER), welche für das tLT und sT kodiert, bzw. das LT und das tLT ohne Vorhandensein des Introns, in HEK293 Zellen zusammen mit HA fusioniertem Ubiquitin überexprimiert, mit Proteasominhibitor behandelt und über einen N-terminalen Streptavidin Bindepeptid (SBP)-Tag aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde in der SDS-PAGE mittels LT spezifischem Antikörper und α-HA-Antikörper zur Detektion des Ubiquitins analysiert. Durch eine Silberfärbung wurde die Reinheit der aufgereinigten Proteine überprüft. Abbildung 25 A und C in Anhang A.3 zeigt die Ergebnisse der Aufreinigung der ER und tER. Die Proteine der Konstrukte ohne Intron, LT und tLT, zeigten ein ähnliches Ergebnis wie die der ER und tER, nur ohne Anreicherung des 57kT beim LT, und sind daher nicht gezeigt. Die Aufreinigung wurde ferner mit dem MCPyV sT durchgeführt (Anhang A.3 Abbildung 25 B). ST sollte als Kontrollprotein im Assay dienen, weil es höchstwahrscheinlich nicht direkt mit Usp7 interagiert. Bei allen MCPyV T-Antigenen war ein charakteristisches Bandenmuster der Ubiquitinierung zu erkennen, wobei das tLT im Verhältnis zur angereicherten Proteinmenge die geringste Ubiquitinierung zeigte.
Die ubiquitinierten MCPyV T-Antigene wurden nach Aufreinigung mit 1 µg Usp7 Protein (kommerziell erhältlich) inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten auf ihren

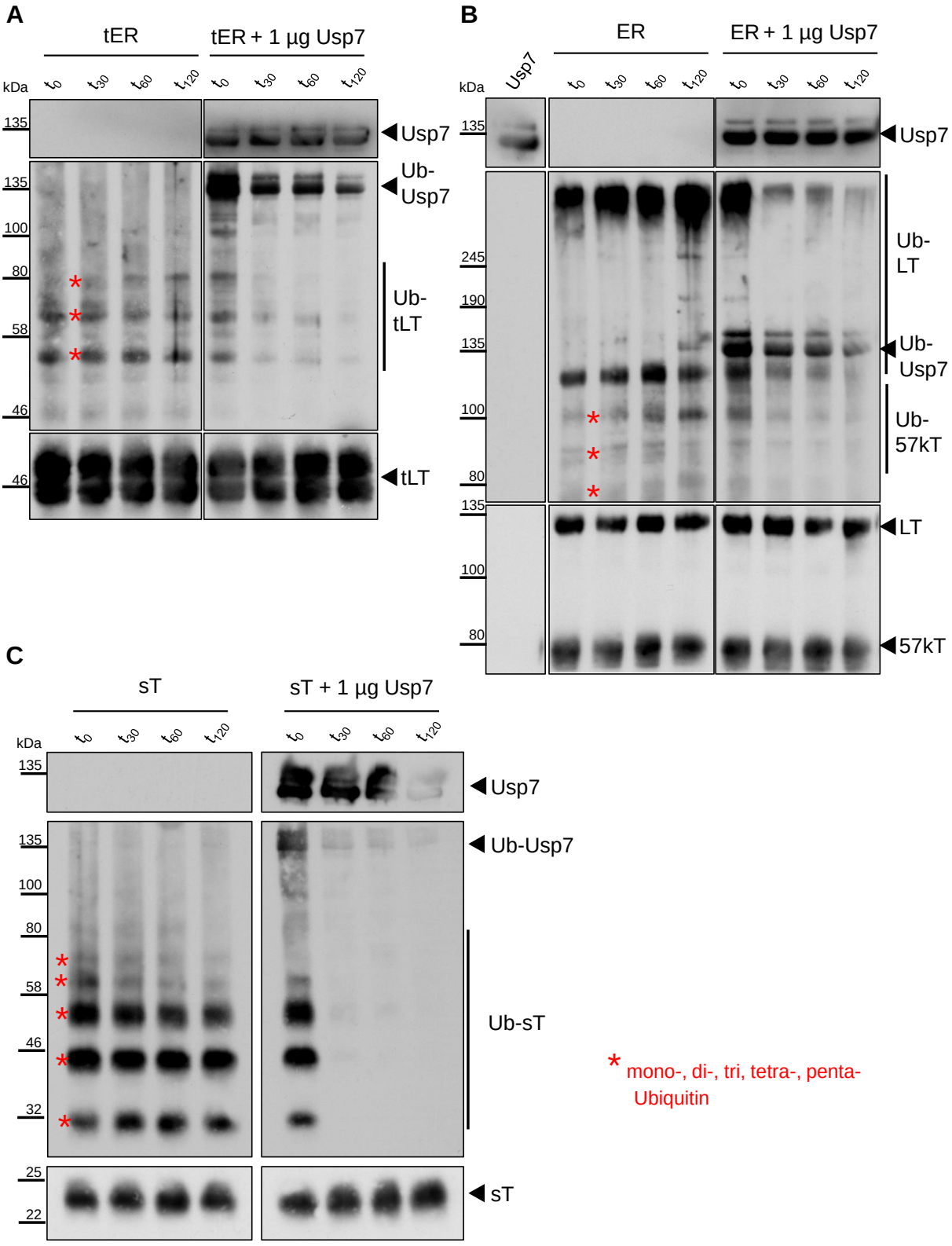

Abbildung 15: *In vitro* Deubiquitinierung von MCPyV T-Antigenen durch Usp7. Aufgereinigte, ubiquitinierte MCPyV T-Antigene wurden mit 1 µg Usp7 inkubiert und ihre Ubiquitinierung mittels α-HA Antikörper im Westernblot analysiert. **A:** Tumorspezifische verkürzte frühe Region (tER), 40 µg eingesetzt; **B:** Frühe Region (ER), 40 µg eingesetzt; **C:** Small T-Antigen (sT), 50 µg eingesetzt. Obere Westernblots zeigen Detektion mit Usp7 spezifischem Antikörper (Ak) 3D8, mittlerer Westernblot Detektion von HA-Ubiquitin mit Ak 3F10, unterer Westernblot LT/sT Detektion mit Ak CM2B4/ 2T2. Ub = Ubiquitin; t = Inkubationszeit in Minuten.

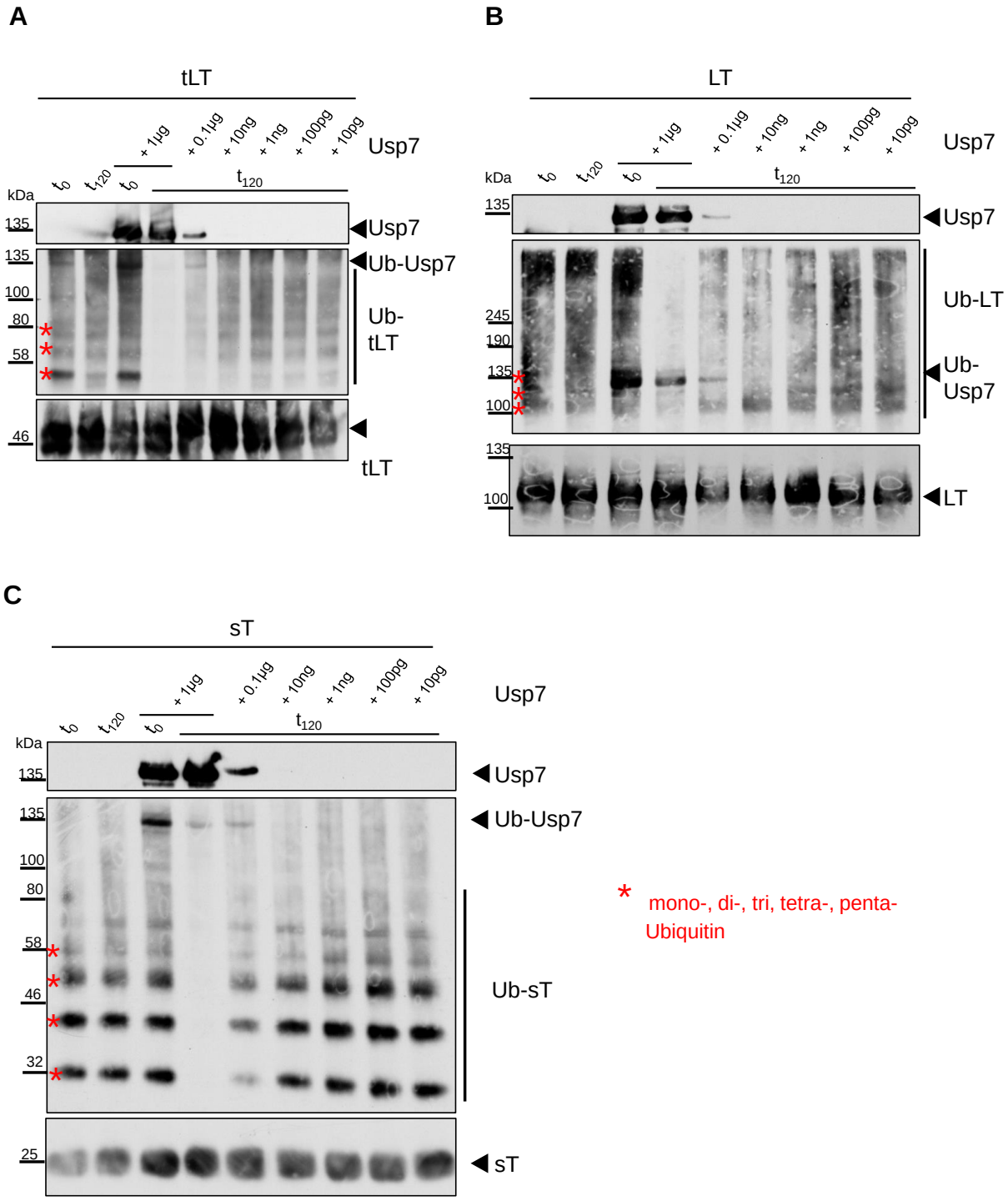

Abbildung 16: Titration der Usp7 Mengen für die Deubiquitinierung der MCPyV T-Antigene. Aufgereinigte, ubiquitinierte MCPyV T-Antigene wurden mit 1 µg bis 10 pg Usp7 inkubiert und ihre Ubiquitinierung mittels α-HA Antikörper in der SDS-PAGE analysiert. **A:** Tumorspezifisches verkürztes Large T-Antigen (tLT), 22, 5 µg eingesetzt; **B:** Large T-Antigen (LT), 50 µg eingesetzt; **C:** Small T-Antigen (sT), 50 µg eingesetzt. Obere Westernblots zeigen Detektion mit Usp7 spezifischem Antikörper (Ak) 3D8, mittlerer Westernblot Detektion von HA-Ubiquitin mit Ak 3F10, unterer Westernblot LT/sT Detektion mit Ak CM2B4/ 2T2. Ub = Ubiquitin; t = Inkubationszeit in Minuten.

Ubiquitinierungsstatus mittels Westernblot analysiert. Abbildung 15 zeigt, dass das LT, 57kT, tLT, aber auch sT von Usp7 deubiquitiniert wurden. Dabei war ebenfalls eine Detektion von Usp7 durch den α-HA Antikörper zu erkennen. Dies ist höchstwahrscheinlich auf eine SDS-PAGE resistente Bindung des HA-Ubiquitins an Usp7 bei der Deubiquitinierungsreaktion zurückzuführen. Da in diesem Assay auch das MCPyV sT, dessen direkte Interaktion mit Usp7 fraglich ist, deubiquitiniert wurde, stellte sich die Frage, ob die beobachtete Reaktion spezifischer Natur ist. Daher wurde in weiteren Experimenten die eingesetzte Menge Usp7 titriert. Abbildung 16 zeigt, dass alle MCPyV T-Antigene noch von 0, 1 µg Usp7 deubiquitiniert werden. Beim LT ist allerdings zu erkennen, dass die ubiquitinierten Oligomere auch durch geringere Mengen Usp7 (10 ng) deubiquitiniert werden. Dies könnte auf eine spezifische Deubiquitinierung des LT durch Usp7 hinweisen. Aufgrund der unterschiedlichen Menge Ubiquitin an den Proteinen im Vergleich zum Gesamtprotein ist es jedoch nicht möglich durch dieses Experiment eine eindeutige Aussage darüber zu treffen, ob und welche der MCPyV T-Antigene ein spezifisches Deubiquitinierungsziel von Usp7 *in vivo* darstellen.

5.3 Einfluss der MCPyV T-Antigene auf die Lokalisierung von Usp7 in der Zelle

Aufgrund der direkten Interaktion des LT und des tLT des MCPyV mit Usp7 war es von Interesse zu untersuchen, ob die zelluläre Lokalisation von Usp7 durch die Expression der viralen Proteine eventuell beeinflusst werden könnte. Usp7 lokalisiert in etablierten Zelllinien im Nukleus, teilweise in punktförmigen Strukturen [187]. Es konnte nachweisen werden, dass die N-terminale TRAF-Domäne entscheidend für diese Lokalisation ist [208]. Publikationen zu HSV-1 und hCMV zeigen, dass virale Proteine die Lokalisation von Usp7 in der Zelle verändern können [209, 210]. So kann ICP0, welches selbst sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert, durch seine Interaktion mit Usp7 dieses ins Zytoplasma delokalisieren [209]. Ul35 von hCMV führt über einen unbekannten Mechanismus zum Auflösen der punktförmigen Usp7-Strukturen im Nukleus [210]. Unsere Gruppe konnte außerdem zeigen, dass das MCPyV tLT aus den Tumoren im Gegensatz zur Volllängenform nicht nur im Nukleus, sondern auch im Zytoplasma lokalisiert und Bindungspartner wie Rb dorthin delokalisiert werden [65]. In Abbildung 17 ist daher in Immunfluoreszenzen die Lokalisation von Usp7 in den MCC Zelllinien WaGa und MKL-1 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass, wie bereits von unserer Arbeitsgruppe publiziert [65], das tLT der WaGa Zellen stärker im Zytoplasma lokalisierte, als das der MKL-1 Zellen. Bei beiden Zelllinien war jedoch keine Delokalisation von Usp7 ins Zytoplasma zu beobachten (Abbildung 17 B). Das in MCC Tumorzellen exprimierte tLT zeigte damit keinen Einfluss auf die Lokalisation von Usp7 in der Zelle. Der Einfluss des Volllängen LT wurde im Kontext des replizierenden Virus in Abschnitt 5.4.1 untersucht.

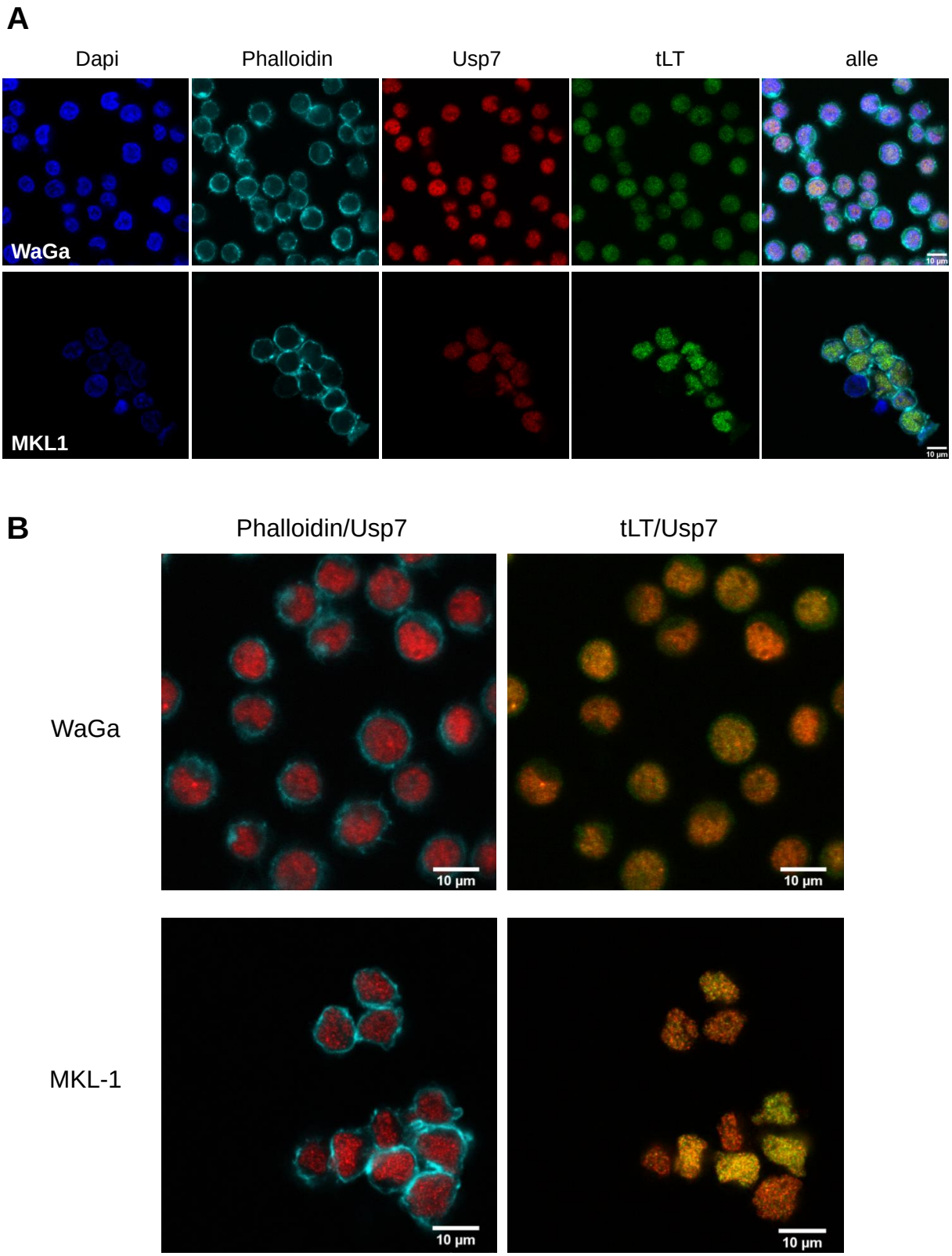

Abbildung 17: Lokalisation von Usp7 in den MCC Zelllinien WaGa und MKL-1. Die MCC Zelllinien WaGa und MKL-1 wurden für die Immunfluoreszenzanalyse für Usp7 (3D8) und tLT (CM2B4) sowie den Zellkern (Dapi) und das Zytoplasma (Phalloidin) gefärbt. **A** zeigt die einzelnen Kanäle, sowie deren Überlagerung, in **B** sind eine Überlagerung von Usp7 mit der Zytoplasmafärbung (Phalloidin, erstes Bild) und dem tLT (zweites Bild) für beide Zelllinien in höherer Vergrößerung gezeigt.

5.4 Einfluss von Usp7 auf den Lebenszyklus des MCPyV

In den vorangegangen Abschnitten dieser Arbeit wurde die direkte Interaktion von Usp7 mit dem LT des MCPyV nachgewiesen. Es war nun von besonderem Interesse zu untersuchen, welche Auswirkungen diese Interaktion auf den Lebenszyklus des MCPyV hat. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimente gab es nur ein semipermissives *in vitro* Replikationssystem, welches die Untersuchung der viralen DNA-Replikation und Genexpression in einigen wenigen etablierten Zelllinien ermöglicht [97, 99]. Jedoch lässt sich keine effiziente Viruspartikelproduktion und Reinfektion in diesem System beobachten. Das kürzlich von Liu et al. [110] beschriebene Replikationssystem stellt eine Verbesserung dieses Systems dar. In der putativen natürlichen Wirtszelle des Virus, den dermalen Fibroblasten, lässt sich durch Behandlung der Zellen mit EGF (*Epidermal Growth Factor*) und FGF (*Fibroblast Growth Factor*) und Entzug von FBS eine deutlich höhere Infektionsrate erreichen. Jedoch stellt auch dieser Assay kein vollständig permissives System dar, weil keine effiziente Vermehrung von infektiösen Viruspartikeln oder ein zytopathischer Effekt zu beobachten ist.

5.4.1 Usp7 lokalisiert in die Replikationszentren des MCPyV

Um die Rolle von Usp7 im Lebenszyklus des MCPyV zu untersuchen, wurden Replikationsassays nach Neumann et al. [99] durchgeführt und in Immunfluoreszenzfärbungen auf eine Kolokalisierung von Usp7 und LT untersucht. LT zeigte in diesem Replikationsassay grundsätzlich drei verschiedene Lokalisierungen. Erstens eine diffuse Verteilung im Zellkern, zweitens punktförmige nukleäre Strukturen und drittens einen intermediären Zustand. Die punktförmigen Strukturen repräsentieren die viralen DNA-Replikationszentren, die diffusen und intermediären Verteilungen unterschiedliche Zeitpunkte im viralen Lebenszyklus, vermutlich vor Bildung der Replikationszentren [200]. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass die Zellen nicht in ihrem Zellzyklus synchronisiert wurden und sich daher in verschiedenen Phasen befinden. Zum anderen ist das System nicht vollständig permissiv, so dass es auch denkbar ist, dass nur in einigen Zellen die Ausbildung von Replikationszentren unterstützt wird. Auch dass die Zellen transfiziert und nicht infiziert wurden, kann verschiedenste Auswirkungen haben.
Abbildung 18 zeigt, dass Usp7 mit LT im Zellkern kolokalisierte. In den Zellen, die virale Replikationszentren durch die punktförmige Färbung von LT zeigten (Abbildung 18 obere drei MCPyV positive Reihen), war eine Relokalisation von Usp7 zu diesen Zentren sichtbar. Aber auch im intermediären Zustand (Abbildung 18 vorletzte Reihe) und einer diffusen Verteilung von LT (Abbildung 18 letzte Reihe) war eine Kolokalisation von LT und Usp7 erkennbar. Mittels der Software ImageJ wurde die Kolokalisation von Usp7 und LT über die Berechnung der Pearson Korrelation quantifiziert (Abbildung 19). Der Pearson Korrelations Koeffizient lag für fast alle untersuchten Zel-

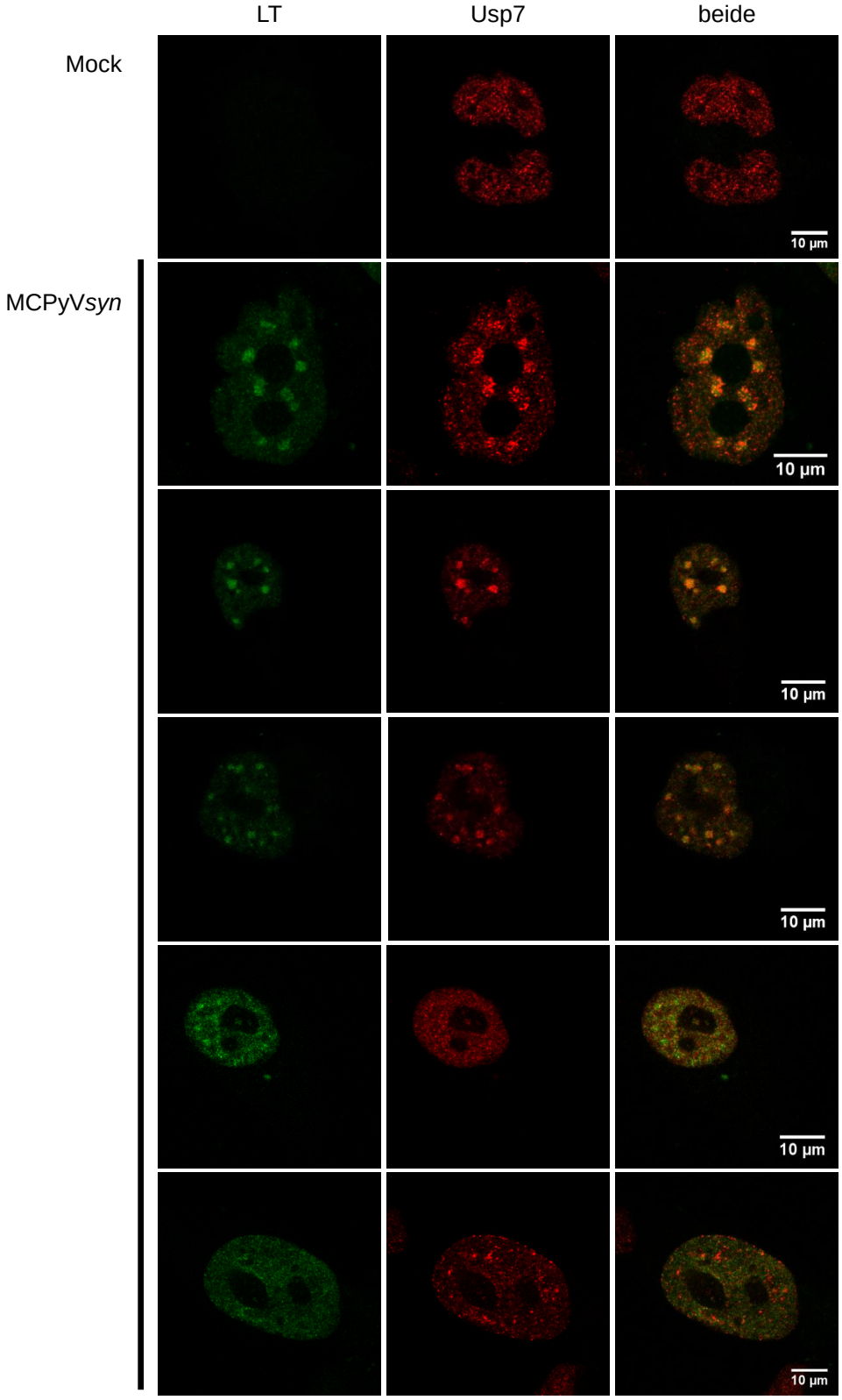

Abbildung 18: Kolokalisation von Usp7 und LT in MCPyV replizierenden Zellen. In Pfsk-1 Zellen wurde ein Replikationsassay durchgeführt und vier Tage nach Transfektion des religierten MCPyV Genoms (MCPyV*syn*) mittels Immunfluoreszenz LT und Usp7 angefärbt. Mock = Leervektor. LT zeigt diffuse (unterste Reihe), intermediäre (vorletzte Reihe) und punktförmige Färbung (obere drei Reihen). In den punktförmigen Strukturen liegen die viralen Replikationszentren [200]. In allen Zuständen kolokalisieren LT und Usp7.

len über 0, 5, was das hohe Maß der Kolokalisation von LT und Usp7 widerspiegelt. Die Höhe des Koeffizienten war dabei nicht abhängig von der Verteilung des LT im Zellkern oder der Ausbildung von Replikationszentren.

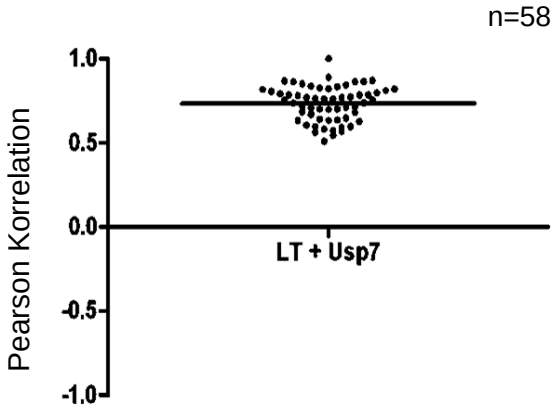

Abbildung 19: Quantifizierung der Kolokalisation von Usp7 und LT in MCPyV replizierenden Zellen. Bestimmung der Pearson Korrelation des LT und Usp7 Signals der Immunfluoreszenzfärbung von 58 MCPyV LT positiven Pfsk-1 Zellen im MCPyV Replikationsassay stammend aus drei unabhängigen Experimenten. Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ Software.

5.4.2 Usp7 ist ein positiver Faktor der MCPyV DNA-Replikation

Um den Einfluss einer Abwesenheit von Usp7 auf die DNA-Replikation des MCPyV zu untersuchen, wurden Replikationsassays in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Zum einen wurden H1299 Zellen verwendet, die mittels Transduktion eines shRNA exprimierenden γ-retroviralen Konstrukts einen stabilen k/d von Usp7 besitzen. Als Kontrollzellen dienten H1299 Zellen, die mit dem Leervektor transduziert wurden [191]. Desweiteren wurden HCT116 Wildtyp (wt) und HCT116 k/o Usp7 Zellen verwendet [147]. Abbildung 20 A zeigt einen Westernblot der vier verschiedenen Zelllinien mit Detektion von Usp7. Da die Replikation von Polyomaviren von der Proliferation der Zellen abhängig ist, wurden die Zelllinien zunächst in MTT-Assays auf ihre Proliferationsfähigkeiten untersucht. Gerade für die p53 positiven HCT116 Zellen ist bekannt, dass ein Usp7 k/o durch Hochregulierung von p53 über Mdm2 Destabilisierung zu stark verlangsamtem Wachstum der Zellen führt [147]. Die MTT-Assays der vier Zelllinien sind im Anhang A.4 in Abbildung 26 gezeigt. Es bestand keine signifikant reduzierte Proliferation der Usp7 k/d bzw. k/o Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen im untersuchten Zeitraum von fünf Tagen. Jedoch war vor allem bei den HCT116 Zellen zu erkennen, dass es in einem größeren Zeitraum wahrscheinlich zu einem deutlichen Unterschied kommen würde. Da jedoch die Replikationsassays für das MCPyV nicht länger als acht Tage durchgeführt wurden, war dies zu vernachlässigen.
Abbildung 20 B zeigt die Quantifizierung der MCPyV DNA-Replikation mittels Realtime-PCR in H1299 shUsp7 und HCT116 k/o Usp7 Zellen im Vergleich zu den jewei-

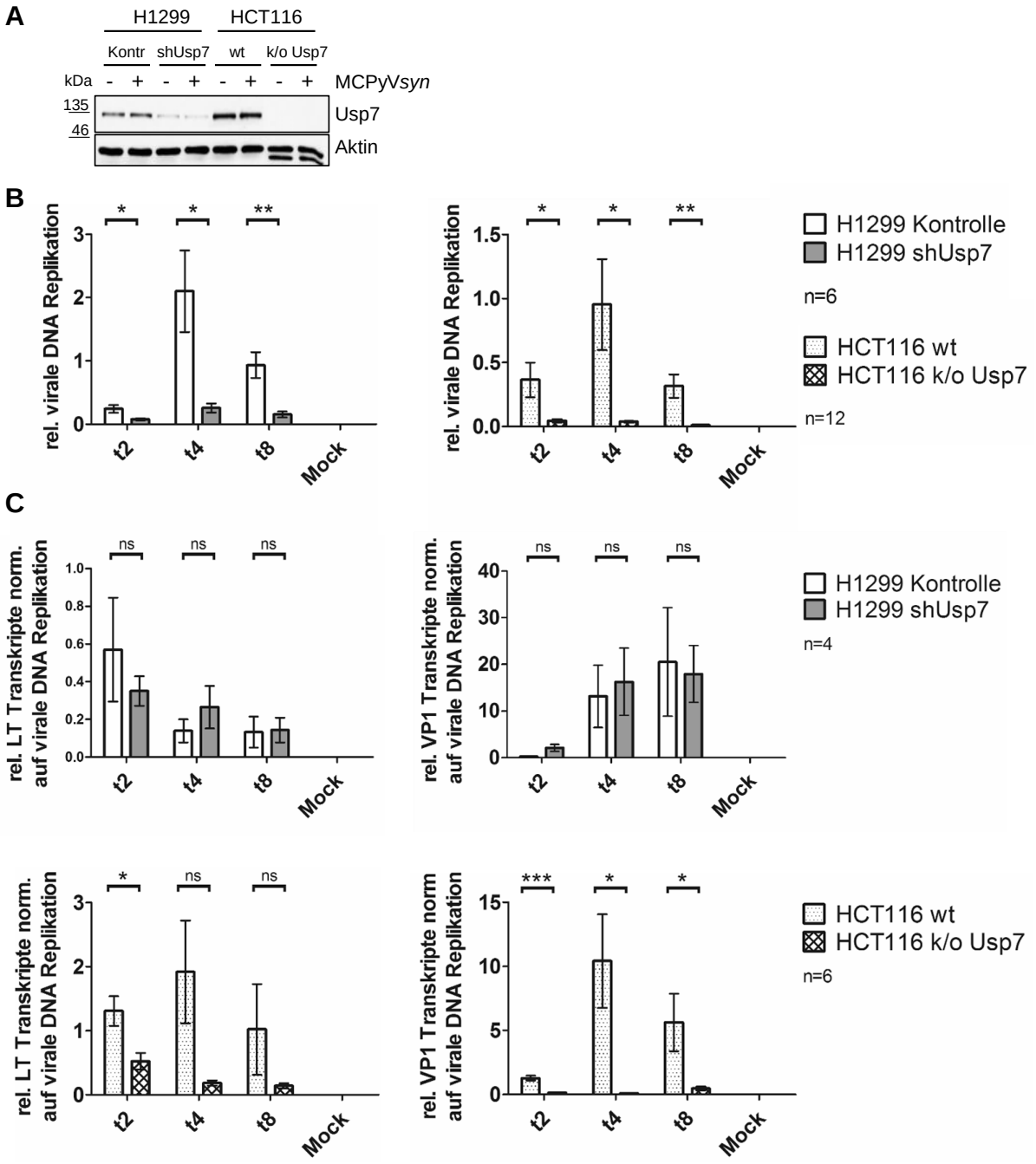

Abbildung 20: Einfluss von Usp7 auf die DNA-Replikation und die Genexpression des MCPyV. A: Detektion von Usp7 mittels Westernblot in den verwendeten Zelllinien. H1299 Kontrolle = pSUPER-retro-puro transduziert; H1299 shUsp7 = pSUPER-shUsp7 transduziert [191]. HCT116 wt = Wildtyp Zellen; HCT116 k/o Usp7 [147]. Usp7 zeigt in H1299 shUsp7 eine um circa 50 % verminderte Expression, unabhängig von der Anwesenheit des MCPyV, und keine Expression in HCT116 k/o Usp7 Zellen. **B:** DNA-Replikation des MCPyV in verschiedenen Zelllinien im Replikationsassay. Nach 2, 4 und 8 Tagen (t) wurde DNA isoliert, *DpnI* verdaut, per Realtime-PCR quantifiziert und auf die zelluläre GAPDH-DNA und auf den Input-Wert sechs Stunden nach Transfektion des MCPyV Genoms normalisiert. Mock = Transfektion Leervektor. **C:** Genexpression des MCPyV in verschiedenen Zelllinien im Replikationsassay. Nach 2, 4 und 8 t wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, LT und VP1 Transkripte per Realtime-PCR quantifiziert und auf die zelluläre GAPDH-Expression und die virale DNA-Replikation normalisiert. n = Anzahl unabhängiger Experimente. Fehlerbalken geben Standardabweichung des Mittelwertes an, Signifikanz wurde durch GraphPad Prism 5 berechnet unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen T-Tests mit 95 % Konfidenzinterval.

ligen Kontrollzelllinien. Diese Werte wurden auf die zelluläre GAPDH-DNA und den Input-Wert sechs Stunden nach Transfektion des viralen religierten Genoms normalisiert. Dadurch wurden die unterschiedlichen Transfektionseffizienzen herausgerechnet. In den Usp7 k/d, sowie den k/o Zellen konnte eine signifikant geringere virale DNA-Replikation im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden. Dies bedeutet, dass Usp7 ein positiver Faktor für die MCPyV DNA-Replikation ist.

5.4.3 Usp7 hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Transkription der MCPyV Gene in Abhängigkeit vom zellulären Hintergrund

Im Zuge der Untersuchung der DNA-Replikation des MCPyV in Abwesenheit von Usp7 wurde darüber hinaus die frühe und späte virale Genexpression im Replikationsassay analysiert. Es ist bekannt, dass Usp7 epigenetische Modifikationen verändern kann, wodurch abhängige Genexpression beeinflusst wird [167, 168, 171–174]. Ein Einfluss von Usp7, z. B. auf die frühe Genexpression, könnte die stark reduzierte virale Replikation des MCPyV in Abwesenheit von Usp7 erklären. Daher wurde in Replikationsassays Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels Realtime-PCR die LT und VP1 Transkripte quantifiziert. Die Werte wurden auf die zelluläre GAPDH-Expression und die virale DNA-Replikation normalisiert. In Abbildung 20 C ist zu erkennen, dass bei einem k/d von Usp7 in H1299 Zellen kein signifikanter Unterschied in der LT und VP1 Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen bestand. Die HCT116 k/o Usp7 Zellen zeigten hingegen eine signifikant reduzierte Expression der VP1 Transkripte. Die LT Transkripte waren zwei Tage nach Transfektion des MCPyV*syn* ebenfalls signifikant reduziert und im weiteren Verlauf ließ sich nach vier bzw. acht Tagen dieselbe Tendenz beobachten. Für das unterschiedliche Ergebnis der H1299 und HCT116 Zellen gibt es verschiedene Erklärungen, auf die im Diskussionsteil weiter eingegangen wird.

5.5 Usp7 verstärkt die Bindung des MCPyV LT an den viralen Replikationsursprung

Für den positiven Einfluss von Usp7 auf die DNA-Replikation des MCPyV könnte ein weiterer Mechanismus ausschlaggebend sein. Für EBNA1 von EBV ist aus der Literatur bekannt, dass die Interaktion von Usp7 und EBNA1 dessen Bindung an den latenten Replikationsursprung des Virus verstärkt [139, 193, 194]. Im Falle von EBNA1 hat dies jedoch einen negativen Effekt auf die latente Replikation von EBV. Aufgrund der Tatsache, dass LT an den Ursprung des MCPyV Genoms (*ori*) zur Initiation der Replikation bindet, wurde untersucht, welchen Einfluss Usp7 auf diese Bindung hat. Das nachfolgend beschriebene Experiment zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde von Svenja Siebels aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Hierfür wurde eine 80 Bp

große ^{32}P markierte DNA-Sonde (*ori*-Sonde) des MCPyV Replikationsursprungs mit Kernextrakten der Überexpression der frühen Genregion des MCPyV inkubiert und in *Elektrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) die Spezifität und das Ausmaß der Bindung des LT an den *ori* analysiert. Abbildung 21 zeigt eine geringere Mobilität der gebundenen *ori*-Sonde bei Inkubation mit LT Kernextrakten (Spur 4 bis 6) im Vergleich zur Inkubation mit Mock Kernextrakten (Spur 2). Diese Bindung verstärkte sich deutlich durch Zugabe von aufgereinigtem Usp7 Protein (Spur 7 bis 9), was vor allem an der Reduktion der ungebundenen/freien *ori*-Sonde zu erkennen ist. Dieses war proportional zur zugegebenen Menge Usp7 und nicht bei Zugabe gleicher Mengen BSA zu beobachten (Spur 7 bis 9). Die Identität der gebildeten Usp7-LT-*ori*-Komplexe wurde durch Zugabe des LT spezifischen Antikörpers CM2B4 nachgewiesen, der an LT im Komplex bindet, wodurch ein sogenannter *Supershift* entsteht (Spur 10). Der Vergleich von Mock Kernextrakt mit Zugabe von Usp7 (Spur 3) und LT Kernextrakt mit Zugabe gleicher Menge Usp7 (Spur 9) zeigte zusätzlich, dass der entstandene *Shift* und die Bindung der *ori*-Probe ursächlich vom LT abhängen. Damit konnte gezeigt werden, dass Usp7 die Bindung des LT an den Replikationsursprung des MCPyV positiv beeinflusst.

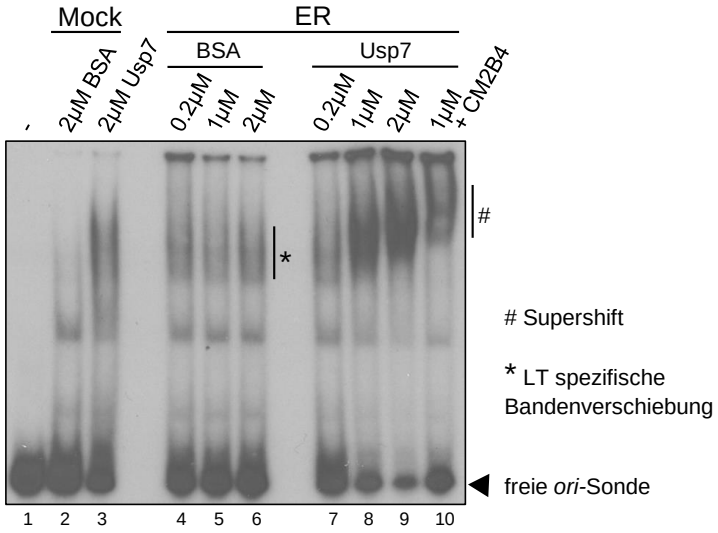

Abbildung 21: Bindung von LT an den MCPyV *ori* unter Einfluss von Usp7. Ein *Elektrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) wurde mit dem ^{32}P markierten minimalen *ori* des MCPyV (80 Bp, *ori*-Sonde) und Kernextrakten der Überexpression der frühen Region des MCPyV (ER) oder dem Leervektor (Mock) in HEK293 Zellen durchgeführt. * zeigt die LT spezifische Verschiebung an, der durch die Bindung der *ori*-Sonde durch LT entsteht. # zeigt die weitere Verschiebung (*Supershift*) des Komplexes zu höherem Molekulargewicht durch Bindung des LT spezifischen Antikörpers CM2B4, was die Identität des Komplexes bestätigt (Spur 10). Das Experiment wurde von Svenja Siebels aus der Arbeitsgruppe durchgeführt.

6 Diskussion

Das 2008 entdeckte Merkel Zell Polyomavirus (MCPyV) konnte in diversen Studien als Hauptursache für die Entstehung des Merkel Zell Karzinoms (MCC) identifiziert werden [6, 16, 17]. Obwohl einige Mechanismen der Transformation und Replikation dieses Virus aufgeklärt sind, gibt es weiterhin viele offene Fragen. Die zentrale Frage, welches die Ursprungszelle des MCC ist, wird auch durch die Entdeckung der vermutlichen Wirtszellen dieses Virus, den dermalen Fibroblasten, nicht beantwortet [110]. Weder gibt es ein *in vitro* oder *in vivo* Transformationsmodell für die Entstehung des MCC noch ist ein vollständig permissives *in vitro* Replikationssystem für das MCPyV vorhanden. Das MCPyV ist bisher das einzige humane Polyomavirus, für das eine Beteiligung an der Tumorentstehung beim Menschen nachgewiesen werden konnte [6, 17, 53]. Auch die bereits beschriebenen Unterschiede zu anderen humanen Polyomaviren, wie die fehlende direkte Interaktion des LT mit p53, die *MCPyV Unique Regions* (MUR) im LT, die Stabilisierung von LT über sT und die Rolle der microRNA in der Persistenz [17, 20, 65, 107], zeigen die Besonderheit dieses Virus. Die Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom und die tumorspezifischen Mutationen, die zur Expression eines verkürzten LT und letztendlich zur Entstehung des MCC führen, sind ebenfalls einzigartig für dieses Virus [6, 16, 17]. Das Verständnis der Interaktionen der viralen Proteine mit zellulären Faktoren ist daher von zentraler Bedeutung, um gezielte Ansätze zur Behandlung oder Prävention des MCC zu entwickeln. Eine Kenntnis dieser ist unabdingbar zur Entwicklung eines vollständig permissiven Replikationssystems sowie eines Transformationsmodells.

6.1 Das MCPyV LT interagiert direkt mit Usp7

In Tandem-Affinitäts-Aufreinigungen der verkürzten frühen Genregion des MCPyV konnte Usp7 als potentieller neuer Interaktionspartner der MCPyV T-Antigene identifiziert werden [132]. Usp7 ist bisher für Interaktionen mit Proteinen anderer DNA-Viren bekannt, nicht jedoch im Zusammenhang mit Polyomaviren [139, 140, 145, 187–195]. Koimmunpräzipitationen aus Zellen, welche ektopisch die frühe Genregion des MCPyV exprimieren, zeigten, dass Usp7 mit dem MCPyV LT wie auch dem tLT kopräzipitiert (Abbildung 9). Weitere Untersuchungen in GST-Pulldown Experimenten mit bakteriell aufgereinigten Usp7 Proteindomänen und Zellextrakten wiesen nach, dass das MCPyV LT, 57kT und das tLT mit der N-terminalen TRAF-Domäne von Usp7 interagieren (Abbildung 10). In GST-Pulldowns von bakteriell exprimierten und aufgereinigten Proteinen konnte belegt werden, dass der LT N-Terminus, aber auch der LT C-Terminus direkt mit der TRAF-Domäne von Usp7 interagieren (Abbildung 11). Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass zelluläre Interaktionspartnern von Usp7, wie p53 und Mdm2, über mehrere Motive mit der gleichen Domäne von Usp7 inter-

agieren können. So besitzt Mdm2 vier und p53 zwei P/A-x-x-S Motive, die beide mit der TRAF-Domäne interagieren [137]. Anhaltspunkte für eine spezifische Regulation der Interaktion der Motive mit Usp7 liefert bisher nur die Erkenntnis, dass eine Phosphorylierung des Serin-Rests in P/A-x-x-S die Interaktion mit Usp7 inhibiert [137]. Da es 16 P/A-x-x-S und neun E-x-x-S Motive in LT gibt und beide Konsensusmotive die Bindung an die TRAF-Domäne von Usp7 vermitteln können, ist eine eindeutige Eingrenzung der Bindungsstellen nicht möglich. Die bisher beschriebenen Phosphorylierungen des MCPyV LT betreffen keines der vielen Usp7 Bindemotive [103, 118, 122]. Es ist jedoch auffällig, dass diese Motive gehäuft in den MUR vor und nach der Rb-Bindedomäne zu finden sind (Abbildung 8). So befinden sich 12 der 16 P/A-x-x-S Motive und sieben der neun E-x-x-S Motive in diesem Bereich des Proteins. Jedoch war in den GST-Pulldowns mit Lysaten aus Überexpressionen der T-Antigene zu beobachten, dass das LT deutlich stärker an Usp7 bindet als das tLT oder das 57kT (Abbildung 10). Das tLT und das 57kT besitzen beide die MURs, es fehlen lediglich die drei P/A-x-x-S und zwei E-x-x-S Motive im C-Terminus von LT. Da der C-Terminus des LT ebenfalls direkt mit Usp7 interagierte, liegt der Schluss nahe, dass diese C-terminalen potentiellen Usp7 Bindungsstellen, die nur im Volllängen LT vorkommen, nicht nur eine zusätzliche Bindung vermitteln, sondern auch eine proportional höhere Affinität für Usp7 besitzen. Andererseits könnten auch die Bindungsstellen in den MURs im LT in einer zugänglicheren oder stabileren Konformation vorliegen als im tLT oder im 57kT. In den GST-Pulldowns war des Weiteren zu erkennen, dass vor allem LT-Oligomere von der TRAF-Domäne von Usp7 gebunden werden. Dies könnte auch auf eine strukturell günstigere Konformation des Volllängen-Proteins als Oligomer für die Bindung von Usp7 zurückzuführen sein. Dafür spricht, dass in den *in vitro* Deubiquitinierungsassays hochmolekulare Formen von LT im Vergleich durch eine geringere Menge Usp7 (10 ng im Vergleich zu 100 ng) deubiquitiniert werden, als die Monomer-Form (siehe Abbildung 16). Ohne strukturelle Daten ist jedoch keine Aussage darüber möglich, welche Usp7 Bindemotive auf der Oberfläche des Proteins liegen und somit zugänglich für eine Interaktion wären. Für das MCPyV LT ist bisher nur eine Kristallstruktur der OBD gebunden an den viralen *ori* beschrieben [102]. In diesem Protein-Abschnitt (Aminosäuren 308 - 433) ist nur ein P/A-x-x-S Motiv (Aminosäure 326 - 329, siehe Abbildung 23) enthalten, welches auch im 57kT vorhanden ist. Eine Analyse der Oberflächenstruktur dieser Kristallstruktur ergab, dass das Motiv in dieser Konformation innerhalb des Proteins liegt und daher nicht für eine Bindung von Usp7 zugänglich wäre. Durch Mutationen der einzelnen Bindemotive im Kontext des viralen Genoms und Analyse des viralen Lebenszyklus könnten eventuell weitere Hinweise erlangt werden, welches der vielen Motive vor allem funktionell entscheidend ist. Dabei ist jedoch ebenfalls in Betracht zu ziehen, dass benachbarte Motive eventuell ein fehlendes Motiv substituieren könnten. Da eine Mutation von mehreren Motiven wahrscheinlich grundlegend die Proteinstruktur verändern würde, wurde dieser An-

satz nicht weiter verfolgt.

6.2 Eine direkte Interaktion zwischen dem MCPyV sT und Usp7 ist unwahrscheinlich

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob das MCPyV sT direkt an Usp7 bindet. In Koimmunpräzipitationen aus Zelllysaten konnte Usp7 durch das sT kopräzipitiert werden und eine Überexpression von sT führte zu einer Verringerung der Menge an Usp7, die mit LT kopräzipitiert wurde. Dieser Effekt von sT konnte jedoch nicht für das tLT gezeigt werden (Abbildung 9). In GST-Pulldowns war keine Bindung von sT aus Zelllysaten an die einzelnen Domänen von Usp7 feststellbar. Auch die Inkubation des GST fusionierten Volllängen Usp7 Proteins sowie der einzelnen Domänen von Usp7 mit einem bakteriell aufgereinigten sT zeigte keine Bindung (Abbildung 12). Jedoch war es aufgrund mangelnder Stabilität nicht möglich den MBP-Tag vom sT zu entfernen. Es ist in Betracht zu ziehen, dass dieser im Verhältnis zu sT (circa 22 kDa) 43 kDa große Tag, entscheidend die Struktur des Proteins verändern und somit die Interaktion verhindern könnte. Gegen eine direkte Bindung von sT an Usp7 spricht jedoch, dass sT lediglich ein P/A-x-x-S, kein E-x-x-S und ein K-x-x-x-K Motiv besitzt. Das K-x-x-x-K Motiv, welches eine Bindung an die HUbl2 von Usp7 vermitteln könnte, befindet sich im gemeinsamen N-Terminus von LT und sT. Aber auch für LT konnte keine Bindung an die HUbl2 von Usp7 festgestellt werden. Das P/A-x-x-S Motiv in sT überlappt mit der beschriebenen Bindungsstelle von PP2A [127]. Dies zeigt einerseits, dass dieses Motiv an der Oberfläche des Proteins liegen muss, die für eine Interaktion zugänglich ist, andererseits würde eine Bindung von PP2A an sT die Bindung von Usp7 verhindern. In *in vitro* Deubiquitinierungsassays wurde sT genauso effizient von Usp7 deubiquitiniert wie das tLT. Da die Spezifität dieses Assays allerdings nicht sichergestellt ist und sT außerdem mit einem Interaktionspartner, der die Bindung von Usp7 vermittelt, aus den Zellen aufgereinigt worden sein könnte, unterstützt diese Tatsache nicht die Theorie einer direkten Bindung von sT an Usp7.
Es ist jedoch hervorzuheben, dass sowohl im Kontext des Wildtyp MCPyV wie auch im MCC immer sowohl LT bzw. tLT gemeinsam mit sT exprimiert werden. sT inhibiert über seine Interaktion mit Fbw7 die Poly-Ubiquitinierung von LT und eventuell tLT [108], wobei die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das tLT auch in Abwesenheit von sT grundsätzlich weniger stark ubiquitiniert vorliegt, als LT. Sollte Usp7 an der Deubiquitinierung von LT in der Zelle beteiligt sein, wäre eine mögliche Hypothese, dass sT nicht nur die Ubiquitinierung von LT reguliert, sondern auch dessen Deubiquitinierung. Usp7 bindet während der Hydrolyse der Ubiquitin-Bindung nicht nur das Substratprotein durch die TRAF-Domäne oder die HUbl2, sondern auch das Ubiquitin durch die katalytische Domäne und die HUbl45 (siehe Abbildung 7). Diese Bindung ist essentiell, um die katalytische Domäne in die aktive Konformation zu

bringen [133, 137, 143, 211, 212]. Möglich wäre, dass nicht oder weniger ubiquitiniertes LT, aufgrund der Inhibition von Fbw7 durch sT, schlechter an Usp7 bindet. Wenn sT die Ubiquitinierung durch einen anderen Regulationsmechanismus jedoch nicht mehr inhibiert, oder wenn es zu schwach exprimiert wird, bindet LT wieder stärker an Usp7, wird deubiquitiniert und die Menge des in der Zelle vorliegenden LT Proteins bleibt unverändert. Dies würde erklären, warum in Koimmunpräzipitationen LT im Gegensatz zum tLT in Anwesenheit von sT eine geringere Menge Usp7 präzipitiert (Abbildung 9). Hierbei würde es sich um einen indirekten Effekt von sT handeln, der nicht auf eine Bindung (direkt oder über andere Brückenproteine) an Usp7 zurückzuführen ist.
Abschließend lässt sich aus den Untersuchungen dieser Arbeit schlussfolgern, dass eine direkte Interaktion zwischen dem MCPyV sT und Usp7 eher unwahrscheinlich ist, aber nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

6.3 *In vivo* Deubiquitinierung des MCPyV LT durch Usp7?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in mehreren experimentellen Strategien der Einfluss von Usp7 auf die Ubiquitinierung der MCPyV T-Antigene untersucht. Da K48 verknüpfte Poly-Ubiquitinierung Proteine für den Abbau im Proteasom markiert [146], wurde zunächst der Einfluss von Usp7 auf die Stabilität der MCPyV T-Antigene analysiert. Bei siRNA vermittelter Reduktion der Usp7 Expression konnte kein Einfluss auf die Proteinstabilität der T-Antigene festgestellt werden (Abbildung 14). Es wäre allerdings möglich, dass bereits eine geringe Menge Usp7 für die Stabilisierung der MCPyV T-Antigene ausreicht. Eine Untersuchung in vollständiger Abwesenheit von Usp7 in HCT116 k/o Usp7 Zellen ließ keine Aussage zu, da diese Zellen eine deutlich reduzierte und variable Transfektionseffizienz zeigten. Eine Normalisierung der Proteinlevel der T-Antigene auf die ektopische Expression von YFP war daher nicht möglich (Abbildung 13). Eine stabile Expression der T-Antigene in den HCT116 k/o Usp7 Zellen war außerdem nicht durchführbar, weil sich diese Zellen, vermutlich aufgrund ihrer geringen Zellteilungsrate, nicht mit γ-retroviralen Konstrukten erfolgreich transduzieren ließen. Dadurch kann keine Aussage getroffen werden, ob Usp7 an der Stabilisierung der MCPyV T-Antigene beteiligt ist.
Eine direkte Untersuchung der Ubiquitinierung der T-Antigene *in vivo* führte ebenfalls zu keinem eindeutigen Ergebnis (siehe Tabelle 27). Dieses ist zum einen auf die mangelnde Funktionalität einiger durchgeführter Experimente zurückzuführen. So ließen sich die publizierten Daten zum Einfluss des Usp7 Inhibitors HBX 41, 108 auf p53 in Zellen nicht reproduzieren. Colland et al. [207] hatten eine verstärkte Ubiquitinierung von p53 bei Zugabe von 50 μM HBX 41, 108 zu HEK293 Zellen beschrieben. Neuere Untersuchungen stellen dieses Ergebnis ebenfalls in Frage, da sie zeigen, dass dieser Inhibitor nicht spezifisch für Usp7 ist. So werden 25 von 31 getesteten anderen Deubi-

quitinierungsenzymen, wie z. B. Usp1, Usp2, Usp4 und Usp6, deutlich stärker durch HBX 41, 108 inhibiert als Usp7 [142, 213]. Dieser Inhibitor ist daher gerade im *in vivo* Kontext, wo diverse andere Enzyme in der Zelle beeinflusst werden könnten, zur Untersuchung von potentiellen Substraten von Usp7 ungeeignet. Zum anderen bestand bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten das Problem, dass wiederum keine Analysen mit gleichen Transfektionseffizienzen in der Usp7 positiven und der Usp7 negativen Zelllinie möglich war. Des Weiteren war eine Untersuchung von stabil exprimierten T-Antigenen bei kompletter Abwesenheit von Usp7 nicht möglich, sondern nur bei siRNA vermittelter Reduktion der Usp7 Expression (zusammengefasst in Tabelle 27).
Um diese Problematik zu umgehen, wurden *in vitro* Deubiquitinierungsassays mit aufgereinigtem Usp7 und aus Zellen aufgereinigten ubiquitinierten T-Antigenen durchgeführt. In diesem Assay wurden das MCPyV LT, tLT aber auch das sT effektiv von Usp7 deubiquitiniert (Abbildung 15). Ob diese Deubiquitinierung durch Usp7 spezifisch ist und auch *in vivo* erfolgt, ist fraglich. Diverse *in vitro* Studien mit synthetischen Ubiquitin-Konstrukten, z. B. Di-Ubiquitin oder fluoreszenzgekoppeltem Ubiquitin (Ub-AMC) [214], zeigen eine Hydrolyse der Ubiquitin-Bindung durch Usp7, ohne dass es sich dabei um einen spezifischen Interaktionspartner handelt [135, 140, 142, 143, 208, 215]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Usp7 nicht nur eine Affinität für das Substrat besitzt, sondern auch für Ubiquitin alleine [143]. Die Bindung von Ubiquitin durch die katalytische Domäne und die HUbl45 ist für eine Konformationsänderung essentiell, die das Enzym in seinen aktiven Zustand bringt [133, 137, 143, 211, 212]. Dieses führt zu der Annahme, dass auch Proteine, die keine *in vivo* Zielproteine von Usp7 sind, *in vitro* durch große Mengen Usp7 deubiquitiniert werden könnten [140]. Bislang gibt es jedoch keine genauen Daten darüber, bei welcher Konzentration Usp7 Proteine unspezifisch deubiquitiniert. Genauso gibt es widersprüchliche Angaben zur präferierten Verknüpfung der Ubiquitin-Ketten für die Hydrolyse durch Usp7 (K48 oder K11 und K63) [141, 142]. Daraus lässt sich schließen, dass diese Eigenschaften von Usp7 vermutlich stark von den experimentellen Bedingungen abhängig sind und aus *in vitro* Experimenten mit synthetischen Ubiquitin-Konstrukten gewonnene Ergebnisse nicht zwangsläufig die *in vivo* Situation mit poly-ubiquitinierten Substratproteinen widerspiegeln. Für die unspezifische Deubiquitinierung der MCPyV T-Antigene in dem in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Assay spricht, dass auch eine effiziente Deubiquitinierung von sT beobachtet werden konnte (Abbildung 15), obwohl eine direkte Interaktion mit Usp7 eher unwahrscheinlich ist (Abschnitt 6.2). Die Titration der eingesetzten Usp7 Mengen zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen sT und dem LT und tLT (Abbildung 16), nur die LT Oligomere wurden effizienter deubiquitiniert (Verwendung von 10 ng Usp7 im Vergleich zu 100 ng). Dies könnte darauf hinweisen, dass vor allem LT Oligomere ein Ziel von Usp7 darstellen. Jedoch sind das LT, tLT und sT in dem gewählten Assay nicht direkt vergleichbar.

Eine Quantifizierung der Anteile an ubiquitiniertem gegenüber nicht ubiquitiniertem Protein war nicht möglich. Es war lediglich festzustellen, dass die Stärke der Ubiquitinierung im Vergleich zur Gesamtproteinmenge in der Reihenfolge LT, sT und dann tLT abnimmt. Die nicht ubiquitinierten Proteine könnten jedoch trotzdem Usp7 binden, so dass es als Enzym für die Deubiquitinierung seiner Substrate nicht mehr zur Verfügung steht. Genauso könnte sT zusammen mit einem Interaktionspartner aufgereinigt worden sein, der die Bindung und Deubiquitinierung durch Usp7 vermittelt. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für die Deubiquitinierung von β-Catenin durch den Usp7/ RNF220 Komplex vermutet [216]. Basierend auf diesem Experiment lässt sich daher, selbst wenn eine Interaktion zwischen Usp7 und sT mit Sicherheit ausgeschlossen werden könnte, keine Aussage dazu treffen, ob und welche MCPyV T-Antigene ein Deubiquitinierungsziel von Usp7 in der Zelle während des viralen Lebenszyklus oder im Tumor darstellen.

6.4 Einfluss der Interaktion von Usp7 und MCPyV LT auf zelluläre Interaktionspartner von Usp7

Die Interaktion des MCPyV LT mit Usp7 könnte einerseits einen Einflusses auf den viralen Lebenszyklus haben, andererseits wäre auch ein Einfluss auf zelluläre Faktoren und Signalwege denkbar. So wurde für EBNA1 von EBV bereits gezeigt, dass die Bindung von Usp7 durch EBNA1 p53 verdrängt und die daraus folgende Destabilisierung von p53 die Zellen vor Apoptose schützt und damit anfälliger für eine Transformation macht [135, 193]. Eine Destabilisierung von p53 wurde auch für die Bindung des vIRF von KSHV an Usp7 beschrieben [195]. Die GST-Pulldowns dieser Arbeit zeigten in p53 negativen H1299 Zellen, dass eine ektopische Überexpression von p53 zu einer verminderten Bindung des MCPyV tLT und LT an Usp7 führt. Usp7 hat daher unter den gewählten Bedingungen eine höhere Affinität für p53 als für die T-Antigene. Darüber hinaus führte die Expression der T-Antigene, besonders des Volllängen LT, zu einer verstärkten Bindung von p53 an Usp7 im Vergleich zur Kontrolle. Dies ist eventuell auf die Aktivierung von DNA-Damage Signalwegen durch die Expression von LT zurückzuführen [120]. Li et al. [120] haben gezeigt, dass LT über diese Signalwege die p53 Phosphorylierung, Stabilisierung und Aktivierung von p53-abhängigen Zielgenen induziert. Diese Ergebnisse stehen zwar im Gegensatz zu der von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesenen Inhibierung p53 abhängiger Transkription durch die frühe Region des MCPyV [65], jedoch ist es möglich, dass in den von uns durchgeführten Experimenten die Inhibierung durch die gleichzeitige Expression des sT verursacht wurde. Da gezeigt wurde, dass genotoxischer Stress zu einer vermehrten Bindung von p53 durch Usp7 führt, wodurch p53 stabilisiert und die Apoptose ausgelöst wird [152], könnte es sich bei der vermehrten Bindung von p53 an Usp7 bei Anwesenheit des LT um einen zusätzlichen Mechanismus handeln, der zur Stabilisierung von p53 führt. Im Kontext

des replizierenden Virus würde die gleichzeitige Expression von sT die Aktivierung p53 abhängiger Signalwege wieder herunterregulieren, so dass es nicht zur Apoptose kommt. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen damit abermals darauf hin, dass die Wechselwirkung des MCPyV mit p53 von anderen Mechanismen geprägt ist, als für andere DNA-Tumorviren gezeigt.
Außerdem ist ein Einfluss auf weitere zelluläre Interaktionspartner von Usp7 durch die Bindung des LT und tLT denkbar. Die Lokalisierung von Usp7 war in MCC Zelllinien nicht verändert (Abbildung 17), während der Replikation des MCPyV lokalisierte Usp7 hingegen in die Replikationszentren des Virus (Abbildung 18). Für EBV wurde gezeigt, dass der Abbau von PML-NB von der Interaktion von EBNA1 mit Usp7 und dessen Delokalisierung zu diesen Strukturen abhängig ist [155–158]. Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Replikation des MCPyV eine Reorganisation von PML-NB zu vergrößerten Hohlkugeln auslöst und die viralen Replikationszentren benachbart zu diesen zu finden sind [200]. Eine Komponente der PML-NB, das Protein Sp100, ist ein negativer Faktor für die MCPyV Replikation und in Folge der viralen Replikation enthält ein Anteil der PML-NB kein Sp100 mehr. Da keine direkte Interaktion zwischen den Komponenten Sp100, PML und Daxx mit dem MCPyV LT nachgewiesen werden konnte, könnte die Reorganisation der PML-NB durch das MCPyV über die Interaktion mit Usp7 erklärbar sein. Besonders durch die Delokalisierung von Usp7 zu den Replikationszentren des Virus, könnte Usp7 Einfluss auf diese sich in der Nachbarschaft befindlichen Strukturen nehmen.
Für das Usp7 Zielprotein PTEN wurde ein direkter Zusammenhang mit der Onkogenese gezeigt. Untersuchungen zeigen, dass die zytoplasmatische Lokalisierung von PTEN mit verschiedenen Krebsarten assoziiert ist und eine Lokalisation im Nukleus essentiell zur Erhaltung der chromosomalen Integrität ist [217, 218]. Die Lokalisierung in den Zellkern wird über PML und DAXX durch eine Mono-Ubiquitinierung ausgelöst, während eine Usp7 Überexpression in Prostatakrebs zur Deubiquitinierung und Ausschluss von PTEN aus dem Nukleus führt [153]. Das bedeutet, dass Usp7 in diesem Fall proto-onkogen wirkt und eine Verstärkung dieser Aktivität über die Interaktion mit LT eher unwahrscheinlich ist. Jedoch wäre ein Einfluss auf die Lokalisierung von PTEN über die PML-DAXX-Achse möglich, so dass weitere Analysen von PTEN in Abhängigkeit des MCPyV durchgeführt werden sollten.
Daneben spielt Usp7 eine entscheidende Rolle bei diversen DNA-Reparatur-Signalwegen. So hängt die Funktionalität der Faktoren Rad18, PCNA, Chk1 und Bub3 wesentlich von der Deubiquitinierungsfunktion von Usp7 ab [159–161, 166]. Eine Besetzung von Usp7 mit LT oder tLT könnte diese Prozesse stören und damit eventuell die Transformation fördern, wenn sich DNA-Schäden in der Zelle ansammeln.
Darüber hinaus ist Usp7 durch die Deubiquitinierung des Histons H2B und Mitwirkung bei der Ubiquitinierung von H2A an der Regulation der Genexpression beteiligt [167, 168, 171–174]. Da diese epigenetischen Modifikationen jedoch Einfluss auf die Ex-

pression einer Vielzahl von zellulären Genen haben und die Rolle von Usp7 in diesem Zusammenhang noch nicht widerspruchsfrei aufgeklärt ist, kann nur spekuliert werden, welche Auswirkung eine mögliche Inhibierung von Usp7 darauf haben könnte. Daneben ist Usp7 in der zellulären DNA-Replikation involviert. So ist die Dissoziation von nicht genutzten MCM Komplexen durch die Interaktion mit dem MCM-BP ein wichtiger Mechanismus, ohne den das Fortschreiten der S- in die G2-Phase deutlich verlangsamt ist [184, 219]. Die Interaktion von LT mit Usp7 und dessen Rekrutierung zu den viralen Replikationszentren könnte daher ein weiterer Mechanismus sein, wie das Virus die Zelle in der S-Phase arretiert, um die eigene Replikation weiter zu fördern.
In Zukunft müssen globale Analysen auf transkriptioneller Ebene, wie auch auf Proteinebene, erfolgen, um diese vielschichtigen Möglichkeiten der Einflussnahme des LT auf zelluläre Zielproteine von Usp7 im viralen Lebenszyklus wie auch im MCC weiter aufzuklären.

6.5 Usp7 ist ein positiver Faktor der MCPyV DNA-Replikation und Genexpression

Für mehrere DNA-Viren wurde bereits ein Einfluss von Usp7 auf die virale Replikation, Genexpression und Proteinstabilität gezeigt, was unterschiedliche Auswirkungen auf den Lebenszyklus dieser Viren hat (siehe Einleitung Abschnitt 2.3.2) [139, 140, 189–192, 194]. Die Untersuchung der funktionellen Konsequenzen der direkten Interaktion von Usp7 mit LT für den Lebenszyklus des MCPyV war daher von besonderem Interesse. In *in vitro* Replikationsversuchen des MCPyV konnte ein positiver Einfluss von Usp7 auf die virale DNA-Replikation festgestellt werden. Eine Reduktion der Usp7 Proteinmenge in H1299 Zellen oder eine Abwesenheit von Usp7 in HCT116 Zellen führte zu signifikant reduzierter viraler DNA-Replikation im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (Abbildung 20 B). Da Usp7 grundsätzlich ein wichtiger Faktor für die Zellproliferation ist [184], stellte sich jedoch die Frage, ob dieser Einfluss von Usp7 auf die Interaktion mit LT zurückzuführen ist. Zahlreiche Fakten weisen hingegen eindeutig auf die direkte Beteiligung von Usp7 an der viralen DNA-Replikation hin. Zum einen waren die Proliferationsraten der Zellen mit Herunterregulation oder Abwesenheit der Usp7 Expression für den untersuchten Zeitraum nicht signifikant verringert (Abbildung 26). Auch der bereits erwähnte Einfluss der Usp7 Expression auf die Transfektionseffizienz der Zellen wurde durch die Normalisierung der DNA-Replikation auf die Input-DNA ausgeglichen, so dass die reduzierte MCPyV Replikation nicht darauf zurückzuführen ist. Zum anderen lokalisierte Usp7 in die viralen Replikationszentren in MCPyV positiven Zellen (Abbildung 18 und 19) und verstärkte die Bindung des LT an den MCPyV Replikationsursprung (Abbildung 21). Die Bindung des LT an die virale DNA ist der erste Schritt zur Initiierung der Replikation des Genoms von

Polyomaviren und ist für SV40 bereits im Detail beschrieben [32, 33]. Der minimale SV40 *ori* enthält eine zentrale Palindrom-Sequenz mit vier GAGGC Pentameren, die auf beiden Seiten von AT-reichen Sequenzen flankiert ist [33]. Man geht davon aus, dass initial jeweils ein LT-Dimer an die beiden GAGGC Pentamere, welche an die AT-reichen Sequenzen angrenzen, mit einer seiner beiden OBDs bindet [220, 221]. Daraufhin kommt es zur weiteren Anlagerung von LT-Proteinen, wodurch die AT-reichen Elemente als doppelsträngige DNA jeweils von einem Hexamer aus LT Proteinen umgeben werden [220, 221]. Diese bewirken einen Scherstress, der zum Aufwinden der DNA unter ATP-Verbrauch führt [221, 222]. Beide Hexamere translokieren weiter auf ihrem Leitstrang in entgegengesetzte Richtungen von 3' nach 5' [223], während durch die zelluläre Replikationsmaschinerie die Elongation der neuen viralen DNA vollzogen wird [1, 7, 19, 32, 33]. Im Vergleich zu SV40 besitzt das MCPyV sechs GA/GGGC Pentamere im zentralen *ori*, wobei das zweite und das dritte sowie das fünfte und das sechste überlappen. Ein weiteres siebtes Motiv außerhalb der zentralen Sequenz wird zusätzlich für die Replikation benötigt [102]. Kristallstrukturen mit der OBD des MCPyV zeigen, dass das erste, zweite und vierte GAGGC Motiv durch die OBD gebunden werden [102]. Untersuchungen zu SV40 zeigen jedoch, dass Analysen mit der OBD alleine keine Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten inklusive der Helikase-Domäne erlauben und somit daraus nicht auf die Verhältnisse *in vivo* geschlossen werden kann [33, 220, 221]. Die unterschiedliche Anzahl der Motive und das insgesamt größere MCPyV LT Protein lässt vermuten, dass es Unterschiede in der Replikationsinitiation im Vergleich zu SV40 gibt, auch wenn, wie Untersuchungen von Diaz et al. [103] nahe legen, die grundsätzlichen Mechanismen wie die Helikasefunktion wahrscheinlich ähnlich sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Usp7 die Bindung des LT an den Replikationsursprung des MCPyV deutlich verstärkt. Die Bandenverschiebung im EMSA unter Zugabe von Usp7 legt außerdem nahe, dass Usp7 zusammen mit LT und der viralen DNA einen Komplex bildet (Abbildung 21). Außerdem zeigten die GST-Pulldowns, dass LT Oligomere im Vergleich zu Monomeren stärker von Usp7 gebunden werden (Abbildung 10). Zusammen mit dem positiven Effekt von Usp7 auf die virale DNA-Replikation könnte dieses darauf hinweisen, dass Usp7 an der Replikationsinitiation beteiligt ist. Bei dem zugrundeliegenden Mechanismus könnte es sich um die Stabilisierung einer bestimmten Konformation von LT durch Usp7 handeln, die verstärkt oligomerisiert und/oder an die virale DNA bindet. Ob dies auf eine Deubiquitinierung von LT durch Usp7 zurückzuführen ist, kann durch die durchgeführten Experimente weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Theoretisch könnte Usp7 im EMSA während der Inkubation mit den Kernextrakten LT deubiquitinieren. Untersuchungen zur zellulären DNA-Replikation haben gezeigt, dass Usp7 sumoylierte Proteine an Replikationsgabeln deubiquitiniert und darüber die Replikation fördert [185, 186]. Da der genaue Mechanismus indes nicht verstanden ist, lässt sich darüber im Falle des MCPyV allerdings nur spekulieren. Besonders, weil eine Deubiquitinie-

rung von LT durch Usp7 *in vivo* bislang nicht nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 6.3), ist dies aber eher unwahrscheinlich. Gegen eine Beteiligung der Deubiquitinierungsfunktion von Usp7 spricht auch, dass in GST-Pulldowns die TRAF-Domäne von Usp7 auch bei Abwesenheit der katalytischen Domäne verstärkt LT Oligomere bindet. Für EBNA1 von EBV konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Usp7 durch eine Komplexbildung von EBNA1, GMPS und viraler DNA die Bindung von EBNA1 an die DNA verstärkt, ohne dass dieses auf eine Deubiquitinierung von EBNA1 durch Usp7 zurückgeführt werden konnte [194]. Im Rahmen der zellulären DNA-Replikation spielt Usp7 eine wichtige Rolle bei der Dissoziation von MCM Komplexen vom Chromatin am Ende der S-Phase durch die Interaktion mit dem MCM-BP [184, 219]. Bei MCM Komplexen handelt es sich um die zellulären Helikasen für die DNA-Replikation und sie besitzen zahlreiche Gemeinsamkeiten mit den LTs von Polyomaviren [224, 225]. Die Rekrutierung von Usp7 an den viralen Replikationsursprung durch das MCPyV LT spiegelt damit die grundsätzliche Eigenschaft von Polyomaviren wider, die zelluläre Replikationsmaschinerie zu imitieren und gleichzeitig deren Faktoren für die eigenen Zwecke zu nutzen. In Zukunft müssen weitere Untersuchungen zum zugrundeliegenden Mechanismus erfolgen, die aufklären inwieweit eine Deubiquitinierung von LT durch Usp7 vor allem bei der viralen DNA-Replikation eine Rolle spielt.
Bei der weiteren Untersuchung des Einflusses von Usp7 auf den Lebenszyklus des MCPyV konnte außerdem festgestellt werden, dass bei der vollständigen Abwesenheit von Usp7 in HCT116 Zellen auch die Genexpression des MCPyV signifikant reduziert war. Bei einer Herunterregulation der Usp7 Expression in H1299 Zellen von 50 bis 80 % ließ sich hingegen trotz des signifikanten Einflusses auf die DNA-Replikation keine Veränderung der viralen Genexpression feststellen. Einerseits kann es sich dabei um einen Zelltyp spezifischen Effekt handeln, der auf dem Vorhandensein eines bestimmten Faktors in H1299 Zellen beruht, der Usp7 in einigen Funktionen ersetzen kann. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die verbliebene Usp7 Expression in den H1299 Zellen ausreichend für die Unterstützung der Genexpression des MCPyV ist. Die Expression von eukaryotischen Genen kann auf verschiedenen Ebenen, z. B. durch Chromatinmodifikationen, DNA-Methylierung oder die Initiation der Transkription durch das Binden von Transkriptionsfaktoren an den Promotor reguliert werden. Usp7 spielt unter anderem bei der DNA-Methylierung durch DNMT1 eine wichtige Rolle [175–182]. Außerdem gibt es diverse Studien zum Einfluss von Usp7 auf Histonmodifikationen. Die Interaktion von Usp7 mit EBNA1 führt zur Deubiquitinierung des Histons H2B an EBNA1 abhängigen Promotoren und aktiviert deren Genexpression [139, 194]. Für Drosophila konnte jedoch ein reprimierender Effekt auf die Transkriptionsaktivierung durch die H2B Deubiquitinierung durch Usp7 gezeigt werden [167, 168]. Letztere Theorie scheint für humane Zellen wahrscheinlicher, da aus weiteren Analysen bekannt ist, dass die Ubiquitinierung von H2B zur Etablierung aktivierender H3K4-me3 Modifikationen notwendig ist [226–228]. Auch der Einfluss von Usp7 auf den

Ubiquitinierungsstatus des Histons H2A wird kontrovers diskutiert. Die Mehrheit der Publikationen beschreibt jedoch einen positiven Effekt von Usp7 auf die Ubiquitinierung von H2A über den PRC1-Komplex mit letztendlicher Repression der Expression von betroffenen Genen [169–174]. Für das MCPyV Genom gibt es bisher nur Daten im Kontext des Replikationsassays zur aktivierenden H3K4-me3 Histonmodifikation, die im Promotorbereich der frühen und späten Gene, sowie am microRNA-Promotor zu finden ist [20]. Untersuchungen zu SV40 zeigen, dass LT selbst die virale Genexpression reguliert [229–233]. Unveröffentlichte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten für das MCPyV bislang hingegen keinen Einfluss des LT auf die Expression der frühen und späten Gene feststellen. Weitere Analysen in diesen Bereichen zur Ubiquitin-Modifikation des H2A und H2B, wie auch H3K4-me3 in Abhängigkeit von Usp7, könnten Erkenntnisse liefern, inwieweit Usp7 an der Genexpression des MCPyV beteiligt ist, und ob dies auf die Interaktion mit LT zurückzuführen ist. Da Usp7 allerdings auf zellulärer Ebene weitgehend als Repressor der Transkription beschrieben wurde, liegt vermutlich ein indirekter Effekt oder ein unkonventioneller Mechanismus, wie für EBNA1 beschrieben, zugrunde.

6.6 Schlussfolgerung

Diese Arbeit konnte Usp7 als einen neuen zellulären Faktor identifizieren, der maßgeblich den Lebenszyklus des MCPyV beeinflusst. Die präsentierten Daten belegen, dass Usp7 direkt mit dem N- und dem C-Terminus des LT interagiert. Usp7 verstärkt außerdem die Bindung des LT an den viralen Replikationsursprung und ist ein positiver Regulator der DNA-Replikation des MCPyV. Der zugrundeliegende Mechanismus ist vermutlich eine Unterstützung der Oligomerisierung des LT durch die Interaktion mit Usp7, was zu einer verstärkten Bindung an die virale DNA und Förderung der Replikationsinitiation führt. Abbildung 22 stellt dieses hypothetische Modell graphisch dar. Der darüber hinaus gezeigte positive Einfluss von Usp7 auf die virale Genexpression, sowie die Hypothese, dass das MCPyV LT *in vivo* ein Ziel der Deubiquitinierung durch Usp7 darstellt, bedarf weiterer Untersuchungen. Auch der Einfluss der Interaktion des LT und Usp7 auf andere zelluläre Interaktionspartner von Usp7 im Kontext des replizierenden Virus, wie auch im Tumor, ist von besonderem Interesse für weitere Experimente.

6.7 Ausblick

Zukünftige Untersuchungen werden in erster Linie die Frage adressieren, ob das MCPyV LT *in vivo* von Usp7 deubiquitiniert wird und ob dieser Mechanismus während des MCPyV Lebenszyklus eine relevante Rolle spielt. Hierfür sollen weitere Usp7 k/o Zelllinien hergestellt werden, die mit katalytisch inaktivem Usp7 rekonstituiert wer-

den können. Damit ließe sich die Deubiquitinierungsaktivität von anderen Funktionen von Usp7 trennen. Replikationsassays und Deubiquitinierungsassays in diesen Zelllinien sollten dann weitere Aufschlüsse darüber geben, über welchen genauen Mechanismus Usp7 die DNA-Replikation und eventuell auch die Genexpression des MCPyV positiv reguliert. Das kürzlich von Liu et al. [110] beschriebene Replikationssystem für das MCPyV in dermalen Fibroblasten ermöglicht es nun auch die Infektion in der hier angenommenen Wirtszelle des MCPyV zu untersuchen. Eine Untersuchung in diesem System könnte die vorhandenen Ergebnisse untermauern und eventuell neue Erkenntnisse zum Einfluss von Usp7 auf die Infektion in der natürlichen Wirtszelle liefern. Weitere Untersuchungen zum Einfluss auf zelluläre Interaktionspartner von Usp7 müssen aufklären, inwieweit die Interaktion von LT und Usp7 eine Rolle in der initialen Transformation von Zellen während der Replikation des MCPyV oder im bereits etablierten Tumor spielt.

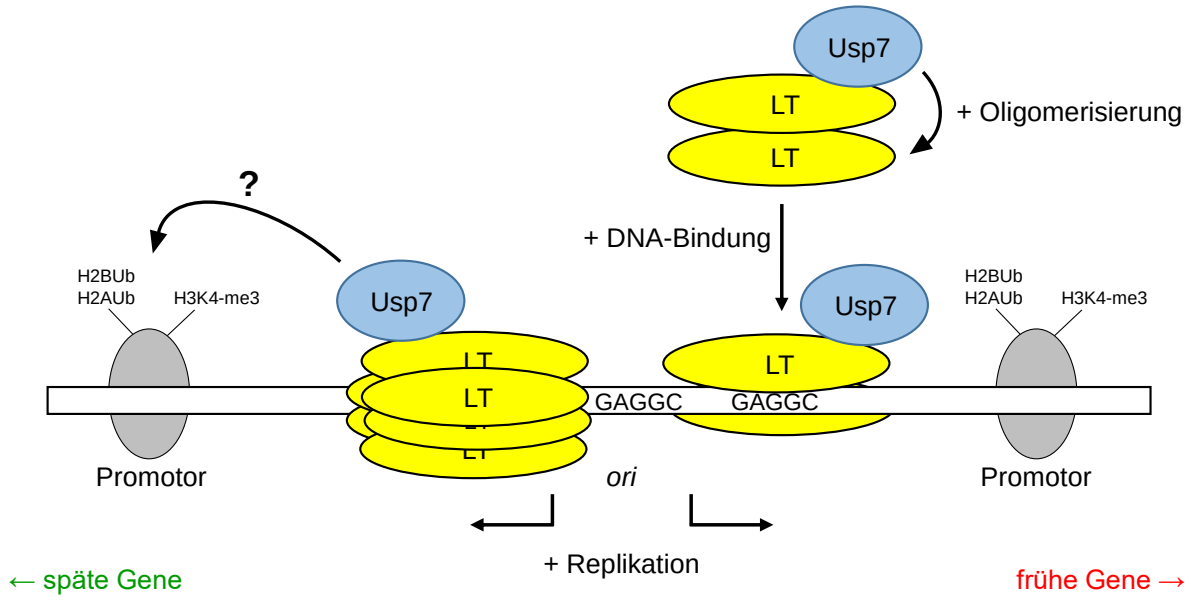

Abbildung 22: Hypothetisches Modell zum Mechanismus der positiven Regulation der DNA-Replikation des MCPyV durch Usp7. Schematische Darstellung der NCCR des MCPyV mit den Promotoren für die frühe und späte Genexpression, dargestellt durch ein stellvertretendes Nukleosom, und dem Replikationsursprung (*ori*, GAGGC). Die Oligomerisierung des MCPyV LT und dessen Bindung an den *ori* wird durch die Interaktion mit Usp7 positiv beeinflusst. Dieses führt zu einem positiven Effekt auf die bidirektionale DNA-Replikation vom *ori* des MCPyV aus. Eventuell werden epigenetische Modifikationen wie die Ubiquitinierung von H2A und H2B (H2AUb bzw. H2BUb) sowie H3K4-me3 an den Promotoren der frühen und späten Gene von Usp7 beeinflusst, was einen positiven Effekt auf die virale Genexpression hat und dadurch zusätzlich die DNA-Replikation fördert.

Literaturverzeichnis

[1] M. J. Imperiale and E. D. Major. *Fields Virology, 5th Edition*, chapter 61 Polyomaviruses. Lippincott Willinams et Wilkins, 2007.

[2] C. B. Buck, K. Van Doorslaer, A. Peretti, E. M. Geoghegan, M. J. Tisza, P. An, J. P. Katz, J. M. Pipas, A. A. McBride, A. C. Camus, A. J. McDermott, J. A. Dill, E. Delwart, T. F. F. Ng, K. Farkas, C. Austin, S. Kraberger, W. Davison, D. V. Pastrana, and A. Varsani. The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLoS Pathog*, 12(4):e1005574, 2016.

[3] S. E. Stewart, B. E. Eddy, and N. Borgese. Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J Natl Cancer Inst*, 20(6):1223–1243, 1958.

[4] B. H. Sweet and M. R. Hilleman. The vacuolating virus, SV40. *Exp Biol Med (Maywood)*, 105(2):420–427, 1960.

[5] National Center for Biotechnology Information. NCBI Taxonomy browser, 2016. URL `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi ?name=polyomavirus`.

[6] A. Grundhoff and N. Fischer. Merkel cell polyomavirus, a highly prevalent virus with tumorigenic potential. *Curr Opin Virol*, 14:129–137, 2015.

[7] J. A. DeCaprio and R. L. Garcea. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat Rev Microbiol*, 11(4):264–276, 2013.

[8] C. H. Rinaldo, G. D. Tylden, and B. N. Sharma. The human polyomavirus BK (BKPyV): virological background and clinical implications. *Apmis*, 121(8):728–745, 2013.

[9] H. H. Hirsch, P. Kardas, D. Kranz, and C. Leboeuf. The human JC polyomavirus (JCPyV): virological background and clinical implications. *Apmis*, 121(8):685–727, 2013.

[10] S. Kazem, E. Meijden, and M. C. Feltkamp. The trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus: virological background and clinical implications. *Apmis*, 121(8):770–782, 2013.

[11] M. Agelli, L. X. Clegg, J. C. Becker, and D. E. Rollison. The etiology and epidemiology of merkel cell carcinoma. *Curr Probl Cancer*, 34(1):14–37, 2010.

[12] N. C. Hodgson. Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J Surg Oncol*, 89:1–4, 2005.

[13] T. Dalianis and H. H. Hirsch. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology*, 437:63–72, 2013.

[14] S. M. Bennett, N. M. Broekema, and M. J. Imperiale. BK polyomavirus: emerging pathogen. *Microbes Infect*, 14:672–683, 2012.

[15] M. Pinto and S. Dobson. BK and JC virus: a review. *J Infect*, 68 Suppl 1:S2–S8, 2014.

[16] M. Shuda, H. Feng, H. J. Kwun, S. T. Rosen, O. Gjoerup, P. S. Moore, and Y. Chang. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(42):16272–7, 2008.

[17] Y. Chang and P. S. Moore. Merkel cell carcinoma: a virus-induced human cancer. *Annu Rev Pathol*, 7:123–144, 2012.

[18] N. Fischer and C. Schmidt. Production of MCPyV virus like particles in HEK 293 4T cells. Electron microscopy performed at the Heinrich-Pette-Institut, Hamburg. *Unpubliziert.*, 2015.

[19] S. J. Flint, L. W. Enquist, V. R. Racaniello, and A. M. Skalka. Volume I: Molecular Biology. In *Principles of Virology*. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 2009.

[20] J. M. Theiss, T. Günther, M. Alawi, F. Neumann, U. Tessmer, N. Fischer, and A. Grundhoff. 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*, 11(7):e1004974, 2015.

[21] R. M. Schowalter and C. B. Buck. The Merkel cell polyomavirus minor capsid protein. *PLoS Pathog*, 9(8):e1003558, 2013.

[22] G. Seo, L. Fink, B. O'Hara, W. Atwood, and C. Sullivan. Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *J Virol*, 82(20):9823–9828, 2008.

[23] S. Lee, K. G. Paulson, E. P. Murchison, O. K. Afanasiev, C. Alkan, J. H. Leonard, D. R. Byrd, G. J. Hannon, and P. Nghiem. Identification and validation of a novel mature microRNA encoded by the Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas. *J Clin Virol*, 52(3):272–275, 2011.

[24] C. S. Sullivan, A. T. Grundhoff, S. Tevethia, J. M. Pipas, and D. Ganem. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*, 435(7042):682–686, 2005.

[25] B. Tsai, J. M. Gilbert, T. Stehle, W. Lencer, T. L. Benjamin, and T. A. Rapoport. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J*, 22(17): 4346–4355, 2003.

[26] J. A. Low, B. Magnuson, B. Tsai, and M. J. Imperiale. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol*, 80(3):1361–1366, 2006.

[27] K. D. Erickson, R. L. Garcea, and B. Tsai. Ganglioside GT1b is a putative host cell receptor for the Merkel cell polyomavirus. *J Virol*, 83(19):10275–10279, 2009.

[28] U. Neu, H. Hengel, B. S. Blaum, R. M. Schowalter, D. Macejak, M. Gilbert, W. W. Wakarchuk, A. Imamura, H. Ando, M. Kiso, et al. Structures of Merkel cell polyomavirus VP1 complexes define a sialic acid binding site required for infection. *PLoS Pathog*, 8(7):e1002738, 2012.

[29] R. M. Schowalter, D. V. Pastrana, and C. B. Buck. Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry. *PLoS Pathog.*, 7(7):e1002161, 2011.

[30] H. Anderson, Y. Chen, and L. Norkin. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell*, 7(11):1825–1834, 1996.

[31] S. Eash, W. Querbes, and W. J. Atwood. Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J Virol*, 78(21):11583–11590, 2004.

[32] E. Fanning, X. Zhao, and X. Jiang. Polyomavirus life cycle. In *DNA Tumor Viruses*, pages 1–24. Springer Science + Business Media, 2009.

[33] G. A. Sowd and E. Fanning. A Wolf in Sheep's Clothing: SV40 Co-opts Host Genome Maintenance Proteins to Replicate Viral DNA. *PLoS Pathog*, 8(11):e1002994, 2012.

[34] D. Das and M. J. Imperiale. Transformation by Polyomaviruses. In *DNA Tumor Viruses*. Springer Science + Business Media, 2009.

[35] C. Skoczylas, K. M. Fahrbach, and K. Rundell. Cellular targets of the SV40 small-t antigen in human cell transformation. *Cell Cycle*, 3(5):606–610, 2004.

[36] D. Ahuja, M. T. Saenz-Robles, and J. M. Pipas. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene*, 24(52):7729–7745, 2005.

[37] H. Y. Kim, B. Y. Ahn, and Y. Cho. Structural basis for the inactivation of retinoblastoma tumor suppressor by SV40 large T antigen. *EMBO J*, 20(1-2):295–304, 2001.

[38] J. R. Nevins. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*, 258(5081):424–429, 1992.

[39] S. Chellappan, V. B. Kraus, B. Kroger, K. Munger, P. M. Howley, W. C. Phelps, and J. R. Nevins. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(10):4549–4553, 1992.

[40] W. Lilyestrom, G. Klein, M, R. Zhang, A. Joachimiak, and X. S. Chen. Crystal structure of SV40 large T-antigen bound to p53: Interplay between a viral oncoprotein and a cellular tumor suppressor. *Genes Dev*, 20((17)):2373–82, 2006.

[41] C. S. Sullivan and J. M. Pipas. T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(2):179–202, 2002.

[42] J. M. Pipas. SV40: Cell transformation and tumorigenesis. *Virology*, 384(2):294–303, 2009.

[43] J. Cheng, J. A. DeCaprio, M. M. Fluck, and B. S. Schaffhausen. Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Semin Cancer Biol*, 19(4):218–228, 2009.

[44] M. Welcker and B. E. Clurman. The SV40 large T antigen contains a decoy phosphodegron that mediates its interactions with Fbw7/hCdc4. *J Biol Chem*, 280(9): 7654–7658, 2005.

[45] G. Singhal, R. K. Kadeppagari, N. Sankar, and B. Thimmapaya. Simian virus 40 large T overcomes p300 repression of c-Myc. *Virology*, 377(2):227–232, 2008.

[46] X. Zhao, R. J. Madden-Fuentes, B. X. Lou, J. M. Pipas, J. Gerhardt, C. J. Rigell, and E. Fanning. Ataxia telangiectasia-mutated damage-signaling kinase- and proteasome-dependent destruction of Mre11-Rad50-Nbs1 subunits in Simian virus 40-infected primate cells. *J Virol*, 82(11):5316–5328, 2008.

[47] J. Hein, S. Boichuk, J. Wu, Y. Cheng, R. Freire, P. S. Jat, T. M. Roberts, and O. V. Gjoerup. Simian virus 40 large T antigen disrupts genome integrity and activates a DNA damage response via Bub1 binding. *J Virol*, 83(1):117–127, 2009.

[48] Y. Chen, Y. Xu, Q. Bao, Y. Xing, Z. Li, Z. Lin, J. B. Stock, P. D. Jeffrey, and Y. Shi. Structural and biochemical insights into the regulation of protein phosphatase 2A by small t antigen of SV40. *Nat Struct Mol Biol*, 14(6):527–534, 2007.

[49] U. S. Cho, S. Morrone, A. A. Sablina, J. D. Arroyo, W. C. Hahn, and W. Xu. Structural basis of PP2A inhibition by small t antigen. *PLoS Biol*, 5(8):e202, 2007.

[50] G. Watanabe, A. Howe, R. J. Lee, C. Albanese, I. W. Shu, A. N. Karnezis, L. Zon, J. Kyriakis, K. Rundell, and R. G. Pestell. Induction of cyclin D1 by simian virus 40 small tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23):12861–12866, 1996.

[51] E. Sontag, S. Fedorov, C. Kamibayashi, D. Robbins, M. Cobb, and M. Mumby. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell*, 75(5):887–897, 1993.

[52] E. Yeh, M. Cunningham, H. Arnold, D. Chasse, T. Monteith, G. Ivaldi, W. C. Hahn, P. T. Stukenberg, S. Shenolikar, T. Uchida, C. M. Counter, J. R. Nevins, A. R. Means, and R. Sears. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol*, 6(4):308–318, 2004.

[53] H. Feng, M. Shuda, Y. Chang, and P. S. Moore. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*, 319(5866):1096–1100, 2008.

[54] S. J. Rodig, J. Cheng, J. Wardzala, A. DoRosario, J. J. Scanlon, A. C. Laga, A. Martinez-Fernandez, J. A. Barletta, A. M. Bellizzi, S. Sadasivam, D. T. Holloway, D. J. Cooper, T. S. Kupper, L. C. Wang, and J. A. DeCaprio. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest*, 122(12):4645–4653, 2012.

[55] J. C. Becker, R. Houben, S. Ugurel, U. Trefzer, C. Pföhler, and D. Schrama. MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol*, 129(1):248–250, 2009.

[56] K. M. Garneski, A. H. Warcola, Q. Feng, N. B. Kiviat, J. H. Leonard, and P. Nghiem. Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J Invest Dermatol*, 129(1):246–248, 2009.

[57] A. Kassem, A. Schopflin, C. Diaz, W. Weyers, E. Stickeler, M. Werner, and A. Zur Hausen. Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. *Cancer Res*, 68(13):5009–5013, 2008.

[58] K. J. Busam, A. A. Jungbluth, N. Rekthman, D. Coit, M. Pulitzer, J. Bini, R. Arora, N. C. Hanson, J. A. Tassello, D. Frosina, P. Moore, and Y. Chang. Merkel cell polyomavirus expression in merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Surg Pathol*, 33(9): 1378–1385, 2009.

[59] V. Foulongne, N. Kluger, O. Dereure, N. Brieu, B. Guillot, and M. Segondy. Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma, France. *Emerg Infect Dis*, 14(9): 1491–1493, 2008.

[60] N. Fischer, J. Brandner, F. Fuchs, I. Moll, and A. Grundhoff. Detection of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in Merkel cell carcinoma cell lines: cell morphology and growth phenotype do not reflect presence of the virus. *Int J Cancer*, 126(9): 2133–2142, 2010.

[61] M. Shuda, R. Arora, H. J. Kwun, H. Feng, R. Sarid, M.-T. Fernández-Figueras, Y. Tolstov, O. Gjoerup, M. M. Mansukhani, S. H. Swerdlow, et al. Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int J Cancer*, 125(6):1243–1249, 2009.

[62] R. Houben, M. Shuda, R. Weinkam, D. Schrama, H. Feng, Y. Chang, P. S. Moore, and J. C. Becker. Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *J Virol*, 84(14):7064–7072, 2010.

[63] M. Shuda, Y. Chang, and P. S. Moore. Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma requires viral small T-antigen for cell proliferation. *J Invest Dermatol*, 134(5):1479–1481, 2014.

[64] R. Houben, C. Adam, A. Baeurle, S. Hesbacher, J. Grimm, S. Angermeyer, K. Henzel, S. Hauser, R. Elling, E.-B. Bröcker, 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. *Int J Cancer*, 130(4):847–856, 2012.

[65] S. Borchert, M. Czech-Sioli, F. Neumann, C. Schmidt, P. Wimmer, T. Dobner, A. Grundhoff, and N. Fischer. 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*, 88(6):3144–3160, 2014.

[66] J. Albores-Saavedra, K. Batich, F. Chable-Montero, N. Sagy, A. M. Schwartz, and D. E. Henson. Merkel cell carcinoma demographics, morphology, and survival based on 3870 cases: a population based study. *J Cutan Pathol*, 37(1):20–27, 2010.

[67] K. Bhatia, J. J. Goedert, R. Modali, L. Preiss, and L. W. Ayers. Merkel cell carcinoma subgroups by Merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression. *Int J Cancer*, 126:2240–2246, 2010.

[68] T. Iwasaki, M. Matsushita, S. Kuwamoto, M. Kato, I. Murakami, H. Higaki-Mori, H. Nakajima, S. Sano, and K. Hayashi. Usefulness of significant morphologic characteristics in distinguishing between Merkel cell polyomavirus-positive and Merkel cell polyomavirus-negative Merkel cell carcinomas. *Hum pathol*, 44:1912–1917, 2013.

[69] D. Schrama, W. K. Peitsch, M. Zapatka, H. Kneitz, R. Houben, S. Eib, S. Haferkamp, P. S. Moore, M. Shuda, J. F. Thompson, et al. Merkel cell polyomavirus status is not associated with clinical course of Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol*, 131(8):1631–1638, 2011.

[70] K. Bhatia, J. J. Goedert, R. Modali, L. Preiss, and L. W. Ayers. Immunological detection of viral large T antigen identifies a subset of Merkel cell carcinoma tumors with higher viral abundance and better clinical outcome. *Int J Cancer*, 127(6):1493–1496, 2010.

[71] J. Handschel, D. Muller, R. A. Depprich, M. A. Ommerborn, N. R. Kabler, C. Naujoks, J. Reifenberger, K.-L. Schafer, and S. Braunstein. The new polyomavirus (MCPyV) does not affect the clinical course in MCCs. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 39:1086–1090, 2010.

[72] R. Houben, D. Schrama, M. Alb, C. Pföhler, U. Trefzer, S. Ugurel, and J. C. Becker. Comparable expression and phosphorylation of the Retinoblastoma protein in Merkel cell polyoma virus positive and negative Merkel cell carcinoma. *Int J Cancer*, 126(3):796–798, 2010.

[73] R. Houben, C. Dreher, S. Angermeyer, A. Borst, J. Utikal, S. Haferkamp, W. K. Peitsch, D. Schrama, and S. Hesbacher. Mechanisms of p53 restriction in Merkel cell carcinoma cells are independent of the Merkel cell polyoma virus T antigens. *J Invest Dermatol*, 133(10):2453–2460, 2013.

[74] G. Goh, T. Walradt, V. Markarov, A. Blom, N. Riaz, R. Doumani, K. Stafstrom, A. Moshiri, L. Yelistratova, J. Levinsohn, T. A. Chan, P. Nghiem, R. P. Lifton, and J. Choi. Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy. *Oncotarget*, 7:3403–3415, 2016.

[75] T. Veija, V. K. Sarhadi, V. Koljonen, T. Bohling, and S. Knuutila. Hotspot mutations in polyomavirus positive and negative Merkel cell carcinomas. *Cancer genet*, 209:30–35, 2016.

[76] H. Sahi, S. Savola, H. Sihto, V. Koljonen, T. Bohling, and S. Knuutila. RB1 gene in Merkel cell carcinoma: hypermethylation in all tumors and concurrent heterozygous deletions in the polyomavirus-negative subgroup. *Apmis*, 122:1157–1166, 2014.

[77] P. W. Harms, P. Vats, M. E. Verhaegen, D. R. Robinson, Y.-M. Wu, S. M. Dhanasekaran, N. Palanisamy, J. Siddiqui, X. Cao, F. Su, R. Wang, H. Xiao, L. P. Kunju, R. Mehra, S. A. Tomlins, D. R. Fullen, C. K. Bichakjian, T. M. Johnson,

A. A. Dlugosz, and A. M. Chinnaiyan. The Distinctive Mutational Spectra of Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma. *Cancer Res*, 75:3720–3727, 2015.

[78] H. Sihto, H. Kukko, V. Koljonen, R. Sankila, T. Böhling, and H. Joensuu. Merkel cell polyomavirus infection, large T antigen, retinoblastoma protein and outcome in Merkel cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 17(14):4806–4813, 2011.

[79] Website der Primary Care Dermatology Society, 2016. URL `http://www.pcds.org.uk`.

[80] H. Husein-ElAhmed, F. Ramos-Pleguezuelos, I. Ruiz-Molina, V. Civico-Amat, E. Solis-Garcia, M. Galan-Gutierrez, and R. Ruiz-Villaverde. Histological Features, p53, c-Kit, and Poliomavirus Status and Impact on Survival in Merkel Cell Carcinoma Patients. *Am J Dermatopathol*, 38:571–579, 2016.

[81] T. Iwasaki, M. Matsushita, D. Nonaka, K. Nagata, M. Kato, S. Kuwamoto, I. Murakami, and K. Hayashi. Lower expression of CADM1 and higher expression of MAL in Merkel cell carcinomas are associated with Merkel cell polyomavirus infection and better prognosis. *Hum pathol*, 48:1–8, 2016.

[82] B. A. Miles, D. Goldenberg, and Education Committee of the American Head and Neck Society (AHNS). Merkel cell carcinoma: Do you know your guidelines? *Head Neck*, 38(5):647–652, 2016.

[83] C. Adam, A. Baeurle, J. L. Brodsky, P. Wipf, D. Schrama, J. C. Becker, and R. Houben. The HSP70 modulator MAL3-101 inhibits Merkel cell carcinoma. *PLoS One*, 9(4):e92041, 2014.

[84] L. R. Dresang, A. Guastafierro, R. Arora, D. Normolle, Y. Chang, and P. S. Moore. Response of Merkel cell polyomavirus-positive merkel cell carcinoma xenografts to a survivin inhibitor. *PLoS One*, 8(11):e80543, 2013.

[85] R. Arora, M. Shuda, A. Guastafierro, H. Feng, T. Toptan, Y. Tolstov, D. Normolle, L. L. Vollmer, A. Vogt, A. Dömling, J. L. Brodsky, Y. Chang, and P. S. Moore. Survivin is a therapeutic target in Merkel cell carcinoma. *Sci Transl Med*, 4(133): 133ra56, 2012.

[86] M. Dowlatshahi, V. Huang, A. E. Gehad, Y. Jiang, A. Calarese, J. E. Teague, A. A. Dorosario, J. Cheng, P. Nghiem, C. F. Schanbacher, M. Thakuria, C. D. Schmults, L. C. Wang, and R. A. Clark. Tumor-specific T cells in human Merkel cell carcinomas: a possible role for Tregs and T-cell exhaustion in reducing T-cell responses. *J Invest Dermatol*, 133(7):1879–1889, 2013.

[87] O. K. Afanasiev, L. Yelistratova, N. Miller, K. Nagase, K. Paulson, J. G. Iyer, D. Ibrani, D. M. Koelle, and P. Nghiem. Merkel polyomavirus-specific T cells

fluctuate with merkel cell carcinoma burden and express therapeutically targetable PD-1 and Tim-3 exhaustion markers. *Clin Cancer Res*, 19(19):5351–5360, 2013.

[88] A. G. Chapuis, O. K. Afanasiev, J. G. Iyer, K. G. Paulson, U. Parvathaneni, J. H. Hwang, I. Lai, I. M. Roberts, H. L. Sloan, S. Bhatia, K. C. Shibuya, T. Gooley, C. Desmarais, D. M. Koelle, C. Yee, and P. Nghiem. Regression of metastatic Merkel cell carcinoma following transfer of polyomavirus-specific T cells and therapies capable of re-inducing HLA class-I. *Cancer Immunol Res*, 2(1):27–36, 2014.

[89] K. G. Paulson, J. J. Carter, L. G. Johnson, K. W. Cahill, J. G. Iyer, D. Schrama, J. C. Becker, M. M. Madeleine, P. Nghiem, and D. A. Galloway. Antibodies to merkel cell polyomavirus T antigen oncoproteins reflect tumor burden in merkel cell carcinoma patients. *Cancer Res*, 70(21):8388–8397, 2010.

[90] M. Samimi, L. Molet, M. Fleury, H. Laude, A. Carlotti, C. Gardair, M. Baudin, L. Gouguet, E. Maubec, M. Avenel-Audran, E. Esteve, E. Wierzbicka-Hainaut, N. Beneton, F. Aubin, F. Rozenberg, N. Dupin, M. F. Avril, G. Lorette, S. Guyetant, P. Coursaget, and A. Touze. Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP1 protein in patients with Merkel cell carcinoma. *Br J Dermatol*, 174:813–822, 2016.

[91] K. Mantripragada and A. Birnbaum. Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Merkel Cell Carcinoma Metastatic to the Heart and Pancreas. *Cureus*, 7(12): e403, 2015.

[92] P. T. Nghiem, S. Bhatia, E. J. Lipson, R. R. Kudchadkar, N. J. Miller, L. Annamalai, S. Berry, E. K. Chartash, A. Daud, S. P. Fling, P. A. Friedlander, H. M. Kluger, H. E. Kohrt, L. Lundgren, K. Margolin, A. Mitchell, T. Olencki, D. M. Pardoll, S. A. Reddy, E. M. Shantha, W. H. Sharfman, E. Sharon, L. R. Shemanski, M. M. Shinohara, J. C. Sunshine, J. M. Taube, J. A. Thompson, S. M. Townson, J. H. Yearley, S. L. Topalian, and M. A. Cheever. PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 374(26):2542–2552, 2016.

[93] D. V. Pastrana, U. Wieland, S. Silling, C. B. Buck, and H. Pfister. Positive correlation between Merkel cell polyomavirus viral load and capsid-specific antibody titer. *Med Microbiol Immunol*, 201(1):17–23, 2012.

[94] R. M. Schowalter, D. V. Pastrana, K. A. Pumphrey, A. L. Moyer, and C. B. Buck. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe*, 7(6):509–515, 2010.

[95] J. M. Kean, S. Rao, M. Wang, and R. L. Garcea. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog*, 5(3):e1000363, 2009.

[96] Y. L. Tolstov, D. V. Pastrana, H. Feng, J. C. Becker, F. J. Jenkins, S. Moschos, Y. Chang, C. B. Buck, and P. S. Moore. Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int J Cancer*, 125(6):1250–1256, 2009.

[97] F. Neumann, S. Borchert, C. Schmidt, R. Reimer, H. Hohenberg, N. Fischer, and A. Grundhoff. Replication, gene expression and particle production by a consensus Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) genome. *PLoS One*, 6(12):e29112, 2011.

[98] H. Feng, H. J. Kwun, X. Liu, O. Gjoerup, D. B. Stolz, Y. Chang, and P. S. Moore. Cellular and viral factors regulating Merkel cell polyomavirus replication. *PLoS One*, 6(7):e22468, 2011.

[99] F. Neumann, M. Czech-Sioli, A. Grundhoff, and N. Fischer. In Vitro Replication Assay for Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV). *Curr Protoc Microbiol*, pages 14F.2.1–19, 2014.

[100] J. J. Carter, M. D. Daugherty, X. Qi, A. Bheda-Malge, G. C. Wipf, K. Robinson, A. Roman, H. S. Malik, and D. A. Galloway. Identification of an overprinting gene in Merkel cell polyomavirus provides evolutionary insight into the birth of viral genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(31):12744–12749, 2013.

[101] H. J. Kwun, A. Guastafierro, M. Shuda, G. Meinke, A. Bohm, P. S. Moore, and Y. Chang. The minimum replication origin of merkel cell polyomavirus has a unique large T-antigen loading architecture and requires small T-antigen expression for optimal replication. *J Virol*, 83(23):12118–12128, 2009.

[102] C. J. Harrison, G. Meinke, H. J. Kwun, H. Rogalin, P. J. Phelan, P. A. Bullock, Y. Chang, P. S. Moore, and A. Bohm. Asymmetric assembly of Merkel cell polyomavirus large T-antigen origin binding domains at the viral origin. *J Mol Biol*, 409(4):529–542, 2011.

[103] J. Diaz, X. Wang, S. H. Tsang, J. Jiao, and J. You. Phosphorylation of large T antigen regulates merkel cell polyomavirus replication. *Cancers (Basel)*, 6(3):1464–1486, 2014.

[104] R. Houben, S. Angermeyer, S. Haferkamp, A. Aue, M. Goebeler, D. Schrama, and S. Hesbacher. Characterization of functional domains in the Merkel cell polyoma virus Large T antigen. *Int J Cancer*, 136(5):E290–E300, 2015.

[105] S. H. Tsang, X. Wang, J. Li, C. B. Buck, and J. You. Host DNA damage response factors localize to merkel cell polyomavirus DNA replication sites to support efficient viral DNA replication. *J Virol*, 88(6):3285–3297, 2014.

[106] X. Wang, J. Li, R. M. Schowalter, J. Jiao, C. B. Buck, and J. You. Bromodomain protein Brd4 plays a key role in Merkel cell polyomavirus DNA replication. *PLoS Pathog*, 8(11):e1003021, 2012.

[107] X. Liu, J. Hein, S. C. Richardson, P. H. Basse, T. Toptan, P. S. Moore, O. V. Gjoerup, and Y. Chang. Merkel cell polyomavirus large T antigen disrupts lysosome clustering by translocating human Vam6p from the cytoplasm to the nucleus. *J Biol Chem*, 286(19):17079–17090, 2011.

[108] H. J. Kwun, M. Shuda, H. Feng, C. J. Camacho, P. S. Moore, and Y. Chang. Merkel cell polyomavirus small T antigen controls viral replication and oncoprotein expression by targeting the cellular ubiquitin ligase SCFFbw7. *Cell Host Microbe*, 14(2):125–135, 2013.

[109] S. H. Tsang, R. Wang, E. Nakamaru-Ogiso, S. A. B. Knight, C. B. Buck, and J. You. The Oncogenic Small Tumor Antigen of Merkel Cell Polyomavirus Is an Iron-Sulfur Cluster Protein That Enhances Viral DNA Replication. *J Virol*, 90(3):1544–1556, 2016.

[110] W. Liu, R. Yang, A. S. Payne, R. M. Schowalter, M. E. Spurgeon, P. F. Lambert, X. Xu, C. B. Buck, and J. You. Identifying the Target Cells and Mechanisms of Merkel Cell Polyomavirus Infection. *Cell Host Microbe*, 2016.

[111] M. H. Swann and J. Yoon. Merkel cell carcinoma. *Semin Oncol*, 34(1):51–56, 2007.

[112] A. Zur Hausen, D. Rennspiess, V. Winnepenninckx, E.-J. Speel, and A. K. Kurz. Early B-cell differentiation in Merkel cell carcinomas: clues to cellular ancestry. *Cancer Res*, 73(16):4982–4987, 2013.

[113] T. Tilling, E. Wladykowski, A. V. Failla, P. Houdek, J. M. Brandner, and I. Moll. Immunohistochemical analyses point to epidermal origin of human Merkel cells. *Histochem Cell Biol*, 141:407–421, 2014.

[114] T. Tilling and I. Moll. Which are the cells of origin in merkel cell carcinoma? *J Skin Cancer*, 2012:680410, 2012.

[115] D. V. Pastrana, Y. L. Tolstov, J. C. Becker, P. S. Moore, Y. Chang, and C. B. Buck. Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus. *PLoS Pathog*, 5(9):e1000578, 2009.

[116] A. Guastafierro, H. Feng, M. Thant, J. M. Kirkwood, Y. Chang, P. S. Moore, and M. Shuda. Characterization of an early passage Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma cell line, MS-1, and its growth in NOD scid gamma mice. *J Virol Methods*, 187(1):6–14, 2013.

[117] K. F. Richards, A. Guastafierro, M. Shuda, T. Toptan, P. S. Moore, and Y. Chang. Merkel cell polyomavirus T antigens promote cell proliferation and inflammatory cytokine gene expression. *J Gen Virol*, 96(12):3532–3544, 2015.

[118] D. Schrama, S. Hesbacher, S. Angermeyer, A. Schlosser, S. Haferkamp, A. Aue, C. Adam, A. Weber, M. Schmidt, and R. Houben. Serine 220 phosphorylation of the Merkel cell polyomavirus large T antigen crucially supports growth of Merkel cell carcinoma cells. *Int J Cancer*, 138(5):1153–1162, 2016.

[119] S. Hesbacher, L. Pfitzer, K. Wiedorfer, S. Angermeyer, A. Borst, S. Haferkamp, C.-J. Scholz, M. Wobser, D. Schrama, and R. Houben. RB1 is the crucial target of the Merkel cell polyomavirus Large T antigen in Merkel cell carcinoma cells. *Oncotarget*, 2016.

[120] J. Li, X. Wang, J. Diaz, S. H. Tsang, C. B. Buck, and J. You. Merkel cell polyomavirus large T antigen disrupts host genomic integrity and inhibits cellular proliferation. *J Virol*, 87(16):9173–9188, 2013.

[121] J. Cheng, O. Rozenblatt-Rosen, K. G. Paulson, P. Nghiem, and J. A. DeCaprio. Merkel cell polyomavirus large T antigen has growth-promoting and inhibitory activities. *J Virol*, 87(11):6118–6126, 2013.

[122] J. Li, J. Diaz, X. Wang, S. H. Tsang, and J. You. Phosphorylation of Merkel cell polyomavirus large tumor antigen at serine 816 by ATM kinase induces apoptosis in host cells. *J Biol Chem*, 290(3):1874–1884, 2015.

[123] M. Shuda, H. J. Kwun, H. Feng, Y. Chang, and P. S. Moore. Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. *J Clin Invest*, 121(9):3623–3634, 2011.

[124] M. Shuda, A. Guastafierro, X. Geng, Y. Shuda, S. M. Ostrowski, S. Lukianov, F. J. Jenkins, K. Honda, S. M. Maricich, P. S. Moore, and Y. Chang. Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Induces Cancer and Embryonic Merkel Cell Proliferation in a Transgenic Mouse Model. *PLoS One*, 10(11):e0142329, 2015.

[125] M. E. Verhaegen, D. Mangelberger, P. W. Harms, T. D. Vozheiko, J. W. Weick, D. M. Wilbert, T. L. Saunders, A. N. Ermilov, C. K. Bichakjian, T. M. Johnson, M. J. Imperiale, and A. A. Dlugosz. Merkel cell polyomavirus small T antigen is oncogenic in transgenic mice. *J Invest Dermatol*, 135(5):1415–1424, 2015.

[126] S. Angermeyer, S. Hesbacher, J. C. Becker, D. Schrama, and R. Houben. Merkel cell polyomavirus–positive merkel cell carcinoma cells do not require expression of the viral small T antigen. *J Invest Dermatol*, 133(8):2059–2064, 2013.

[127] H. J. Kwun, M. Shuda, C. J. Camacho, A. M. Gamper, M. Thant, Y. Chang, and P. S. Moore. Restricted protein phosphatase 2A targeting by Merkel cell polyomavirus small T antigen. *J Virol*, 89(8):4191–4200, 2015.

[128] M. Shuda, C. Velásquez, E. Cheng, D. G. Cordek, H. J. Kwun, Y. Chang, and P. S. Moore. CDK1 substitutes for mTOR kinase to activate mitotic cap-dependent protein translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(19):5875–5882, 2015.

[129] D. A. Griffiths, H. Abdul-Sada, L. M. Knight, B. R. Jackson, K. Richards, E. L. Prescott, A. H. S. Peach, G. E. Blair, A. Macdonald, and A. Whitehouse. Merkel cell polyomavirus small T antigen targets the NEMO adaptor protein to disrupt inflammatory signaling. *J Virol*, 87(24):13853–13867, 2013.

[130] L. M. Knight, G. Stakaityte, J. J. Wood, H. Abdul-Sada, D. A. Griffiths, G. J. Howell, R. Wheat, G. E. Blair, N. M. Steven, A. Macdonald, D. J. Blackbourn, and A. Whitehouse. Merkel cell polyomavirus small T antigen mediates microtubule destabilization to promote cell motility and migration. *J Virol*, 89(1):35–47, 2015.

[131] J. Knips, M. Czech-Sioli, M. Heiland, M. Spohn, I. Moll, U. Schumacher, and N. Fischer. Spontaneous lung metastasis formation of human Merkel cell carcinoma cell lines transplanted into scid mice. *Int J Cancer*, 2016. Submitted.

[132] M. Czech-Sioli. Identifizierung und Charakterisierung von Merkel Zell Polyomavirus (MCPyV) Large T-Antigen interagierenden Proteinen. Master's thesis, Universität zu Lübeck, 2012.

[133] L. Rougé, T. W. Bainbridge, M. Kwok, R. Tong, P. Di Lello, I. E. Wertz, T. Maurer, J. A. Ernst, and J. Murray. Molecular Understanding of USP7 Substrate Recognition and C-Terminal Activation. *Structure*, 24(8):1335–1345, 2016.

[134] M. Li, D. Chen, A. Shiloh, J. Luo, A. Y. Nikolaev, J. Qin, and W. Gu. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*, 416(6881):648–653, 2002.

[135] M. N. Holowaty, Y. Sheng, T. Nguyen, C. Arrowsmith, and L. Frappier. Protein interaction domains of the ubiquitin-specific protease, USP7/HAUSP. *J Biol Chem*, 278(48):47753–47761, 2003.

[136] Y. Sheng, V. Saridakis, F. Sarkari, S. Duan, T. Wu, C. H. Arrowsmith, and L. Frappier. Molecular recognition of p53 and MDM2 by USP7/HAUSP. *Nat Struct Mol Biol*, 13(3):285–291, 2006.

[137] F. Sarkari, A. La Delfa, C. H. Arrowsmith, L. Frappier, Y. Sheng, and V. Saridakis. Further insight into substrate recognition by USP7: structural and biochemical analysis of the HdmX and Hdm2 interactions with USP7. *J Mol Biol*, 402(5):825–837, 2010.

[138] M. Hu, P. Li, M. Li, W. Li, T. Yao, J.-W. Wu, W. Gu, R. E. Cohen, and Y. Shi. Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell*, 111(7):1041–1054, 2002.

[139] M. N. Holowaty, M. Zeghouf, H. Wu, J. Tellam, V. Athanasopoulos, J. Greenblatt, and L. Frappier. Protein profiling with Epstein-Barr nuclear antigen-1 reveals an interaction with the herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease HAUSP/USP7. *J Biol Chem*, 278(32):29987–29994, 2003.

[140] M. Canning, C. Boutell, J. Parkinson, and R. D. Everett. A RING finger ubiquitin ligase is protected from autocatalyzed ubiquitination and degradation by binding to ubiquitin-specific protease USP7. *J Biol Chem*, 279(37):38160–38168, 2004.

[141] J. B. Schaefer and D. O. Morgan. Protein-linked ubiquitin chain structure restricts activity of deubiquitinating enzymes. *J Biol Chem*, 286(52):45186–45196, 2011.

[142] M. S. Ritorto, R. Ewan, A. B. Perez-Oliva, A. Knebel, S. J. Buhrlage, M. Wightman, S. M. Kelly, N. T. Wood, S. Virdee, N. S. Gray, N. A. Morrice, D. R. Alessi, and M. Trost. Screening of DUB activity and specificity by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Commun*, 5:4763, 2014.

[143] A. C. Faesen, A. M. G. Dirac, A. Shanmugham, H. Ovaa, A. Perrakis, and T. K. Sixma. Mechanism of USP7/HAUSP activation by its C-terminal ubiquitin-like domain and allosteric regulation by GMP-synthetase. *Mol Cell*, 44(1):147–159, 2011.

[144] J. Ma, J. D. Martin, Y. Xue, L. A. Lor, K. M. Kennedy-Wilson, R. H. Sinnamon, T. F. Ho, G. Zhang, B. Schwartz, P. J. Tummino, and Z. Lai. C-terminal region of USP7/HAUSP is critical for deubiquitination activity and contains a second mdm2/p53 binding site. *Arch Biochem Biophys*, 503(2):207–212, 2010.

[145] R. Pfoh, I. K. Lacdao, A. A. Georges, A. Capar, H. Zheng, L. Frappier, and V. Saridakis. Crystal Structure of USP7 Ubiquitin-like Domains with an ICP0 Peptide Reveals a Novel Mechanism Used by Viral and Cellular Proteins to Target USP7. *PLoS Pathog*, 11(6):e1004950, 2015.

[146] G. L. Grice and J. A. Nathan. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cell Mol Life Sci*, pages 1–10, 2016.

[147] J. M. Cummins, C. Rago, M. Kohli, K. W. Kinzler, C. Lengauer, and B. Vogelstein. Tumour suppression: disruption of HAUSP gene stabilizes p53. *Nature*, 428(6982):1 p following 486, 2004.

[148] M. Hu, L. Gu, M. Li, P. D. Jeffrey, W. Gu, and Y. Shi. Structural basis of competitive recognition of p53 and MDM2 by HAUSP/USP7: implications for the regulation of the p53-MDM2 pathway. *PLoS Biol*, 4(2):e27, 2006.

[149] M. S. Rodriguez, J. M. Desterro, S. Lain, D. P. Lane, and R. T. Hay. Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, 20(22):8458–8467, 2000.

[150] J. M. Cummins and B. Vogelstein. HAUSP is required for p53 destabilization. *Cell Cycle*, 3(6):689–692, 2004.

[151] M. Li, C. L. Brooks, N. Kon, and W. Gu. A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol Cell*, 13(6):879–886, 2004.

[152] B. A. Reddy, J. A. van der Knaap, A. G. M. Bot, A. Mohd-Sarip, D. H. W. Dekkers, M. A. Timmermans, J. W. M. Martens, J. A. A. Demmers, and C. P. Verrijzer. Nucleotide biosynthetic enzyme GMP synthase is a TRIM21-controlled relay of p53 stabilization. *Mol Cell*, 53(3):458–470, 2014.

[153] M. S. Song, L. Salmena, A. Carracedo, A. Egia, F. Lo-Coco, J. Teruya-Feldstein, and P. P. Pandolfi. The deubiquitinylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network. *Nature*, 455(7214):813–817, 2008.

[154] A. van der Horst, A. M. M. de Vries-Smits, A. B. Brenkman, M. H. van Triest, N. van den Broek, F. Colland, M. M. Maurice, and B. M. T. Burgering. FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat Cell Biol*, 8(10):1064–1073, 2006.

[155] F. Sarkari, Y. Sheng, and L. Frappier. USP7/HAUSP promotes the sequence-specific DNA binding activity of p53. *PLoS One*, 5(9):e13040, 2010.

[156] F. Sarkari, X. Wang, T. Nguyen, and L. Frappier. The herpesvirus associated ubiquitin specific protease, USP7, is a negative regulator of PML proteins and PML nuclear bodies. *PLoS One*, 6(1):e16598, 2011.

[157] L. Frappier. Viral disruption of promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies by hijacking host PML regulators. *Virulence*, 2(1):58–62, 2011.

[158] N. Sivachandran, C. W. Dawson, L. S. Young, F.-F. Liu, J. Middeldorp, and L. Frappier. Contributions of the epstein-barr virus ebna1 protein to gastric carcinoma. *J Virol*, 86(1):60–68, 2012.

[159] I. Alonso-de Vega, Y. Martín, and V. A. J. Smits. Usp7 controls Chk1 protein stability by direct deubiquitination. *Cell Cycle*, 13(24):3921–3926, 2014.

[160] S.-i. Kashiwaba, R. Kanao, Y. Masuda, R. Kusumoto-Matsuo, F. Hanaoka, and C. Masutani. USP7 Is a Suppressor of PCNA Ubiquitination and Oxidative-Stress-Induced Mutagenesis in Human Cells. *Cell Rep*, 13(10):2072–2080, 2015.

[161] A. Zlatanou, S. Sabbioneda, E. S. Miller, A. Greenwalt, A. Aggathanggelou, M. M. Maurice, A. R. Lehmann, T. Stankovic, C. Reverdy, F. Colland, C. Vaziri, and G. S. Stewart. USP7 is essential for maintaining Rad18 stability and DNA damage tolerance. *Oncogene*, 35(8):965–976, 2016.

[162] A. Zlatanou and G. S. Stewart. Damaged replication forks tolerate USP7 to maintain genome stability. *Mol Cell Oncol*, 3:e1063571, 2016.

[163] S. V. Khoronenkova and G. L. Dianov. Regulation of USP7/HAUSP in response to DNA damage: yet another role for ATM. *Cell Cycle*, 11(13):2409–2410, 2012.

[164] S. V. Khoronenkova, I. I. Dianova, N. Ternette, B. M. Kessler, J. L. Parsons, and G. L. Dianov. ATM-dependent downregulation of USP7/HAUSP by PPM1G activates p53 response to DNA damage. *Mol Cell*, 45(6):801–813, 2012.

[165] S. V. Khoronenkova, I. I. Dianova, J. L. Parsons, and G. L. Dianov. USP7/HAUSP stimulates repair of oxidative DNA lesions. *Nucleic Acids Res*, 39(7):2604–2609, 2011.

[166] S. Giovinazzi, P. Sirleto, V. Aksenova, V. M. Morozov, R. Zori, W. C. Reinhold, and A. M. Ishov. Usp7 protects genomic stability by regulating Bub3. *Oncotarget*, 5(11):3728–3742, 2014.

[167] J. A. van der Knaap, B. R. P. Kumar, Y. M. Moshkin, K. Langenberg, J. Krijgsveld, A. J. R. Heck, F. Karch, and C. P. Verrijzer. GMP synthetase stimulates histone H2B deubiquitylation by the epigenetic silencer USP7. *Mol Cell*, 17(5):695–707, 2005.

[168] J. A. van der Knaap, E. Kozhevnikova, K. Langenberg, Y. M. Moshkin, and C. P. Verrijzer. Biosynthetic enzyme GMP synthetase cooperates with ubiquitin-specific protease 7 in transcriptional regulation of ecdysteroid target genes. *Mol Cell Biol*, 30(3):736–744, 2010.

[169] V. M. Weake and J. L. Workman. Histone Ubiquitination: Triggering Gene Activity. *Mol Cell*, 29(6):653–663, 2008.

[170] J. M. Espinosa. Histone H2B ubiquitination: the cancer connection. *Genes Dev*, 22(20):2743–2749, 2008.

[171] P. de Bie, D. Zaaroor-Regev, and A. Ciechanover. Regulation of the Polycomb protein RING1B ubiquitination by USP7. *Biochem Biophys Res Commun*, 400(3): 389–395, 2010.

[172] G. N. Maertens, S. El Messaoudi-Aubert, S. Elderkin, K. Hiom, and G. Peters. Ubiquitin-specific proteases 7 and 11 modulate Polycomb regulation of the INK4a tumour suppressor. *EMBO J*, 29(15):2553–2565, 2010.

[173] B. Hu, S. Li, X. Zhang, and X. Zheng. HSCARG, a novel regulator of H2A ubiquitination by downregulating PRC1 ubiquitin E3 ligase activity, is essential for cell proliferation. *Nucleic Acids Res*, 42(9):5582–5593, 2014.

[174] E. Lecona, V. Narendra, and D. Reinberg. USP7 cooperates with SCML2 to regulate the activity of PRC1. *Mol Cell Biol*, 35(7):1157–1168, 2015.

[175] Z. Du, J. Song, Y. Wang, Y. Zhao, K. Guda, S. Yang, H.-Y. Kao, Y. Xu, J. Willis, S. D. Markowitz, D. Sedwick, R. M. Ewing, and Z. Wang. DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination. *Sci Signal*, 3(146):ra80, 2010.

[176] M. Felle, S. Joppien, A. Németh, S. Diermeier, V. Thalhammer, T. Dobner, E. Kremmer, R. Kappler, and G. Längst. The USP7/Dnmt1 complex stimulates the DNA methylation activity of Dnmt1 and regulates the stability of UHRF1. *Nucleic Acids Res*, 39(19):8355–8365, 2011.

[177] W. Qin, H. Leonhardt, and F. Spada. Usp7 and Uhrf1 control ubiquitination and stability of the maintenance DNA methyltransferase Dnmt1. *J Cell Biochem*, 112 (2):439–444, 2011.

[178] C. Bronner. Control of DNMT1 abundance in epigenetic inheritance by acetylation, ubiquitylation, and the histone code. *Sci Signal*, 4(157):pe3, 2011.

[179] H. Ma, H. Chen, X. Guo, Z. Wang, M. E. Sowa, L. Zheng, S. Hu, P. Zeng, R. Guo, J. Diao, F. Lan, J. W. Harper, Y. G. Shi, Y. Xu, and Y. Shi. M phase phosphorylation of the epigenetic regulator UHRF1 regulates its physical association with the deubiquitylase USP7 and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(13):4828–4833, 2012.

[180] H. Chen, H. Ma, H. Inuzuka, J. Diao, F. Lan, Y. G. Shi, W. Wei, and Y. Shi. DNA damage regulates UHRF1 stability via the SCF(β-TrCP) E3 ligase. *Mol Cell Biol*, 33(6):1139–1148, 2013.

[181] J. Cheng, H. Yang, J. Fang, L. Ma, R. Gong, P. Wang, Z. Li, and Y. Xu. Molecular mechanism for USP7-mediated DNMT1 stabilization by acetylation. *Nat Commun*, 6:7023, 2015.

[182] Z.-M. Zhang, S. B. Rothbart, D. F. Allison, Q. Cai, J. S. Harrison, L. Li, Y. Wang, B. D. Strahl, G. G. Wang, and J. Song. An Allosteric Interaction Links USP7 to Deubiquitination and Chromatin Targeting of UHRF1. *Cell Rep*, 12(9):1400–1406, 2015.

[183] A. Dar, E. Shibata, and A. Dutta. Deubiquitination of Tip60 by USP7 determines the activity of the p53-dependent apoptotic pathway. *Mol Cell Biol*, 33(16):3309–3320, 2013.

[184] M. Jagannathan, T. Nguyen, D. Gallo, N. Luthra, G. W. Brown, V. Saridakis, and L. Frappier. A role for USP7 in DNA replication. *Mol Cell Biol*, 34(1):132–145, 2014.

[185] E. Lecona, S. Rodriguez-Acebes, J. Specks, A. J. Lopez-Contreras, I. Ruppen, M. Murga, J. Muñoz, J. Mendez, and O. Fernandez-Capetillo. USP7 is a SUMO deubiquitinase essential for DNA replication. *Nat Struct Mol Biol*, 23(4):270–277, 2016.

[186] V. A. J. Smits and R. Freire. USP7/HAUSP: A SUMO deubiquitinase at the heart of DNA replication. *Bioessays*, 38(9):863–868, 2016.

[187] R. D. Everett, M. Meredith, A. Orr, A. Cross, M. Kathoria, and J. Parkinson. A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO J*, 16(7):1519–1530, 1997.

[188] A. K. Pozhidaeva, K. N. Mohni, S. Dhe-Paganon, C. H. Arrowsmith, S. K. Weller, D. M. Korzhnev, and I. Bezsonova. Structural Characterization of Interaction between Human Ubiquitin-specific Protease 7 and Immediate-Early Protein ICP0 of Herpes Simplex Virus-1. *J Biol Chem*, 290(38):22907–22918, 2015.

[189] R. D. Everett, M. Meredith, and A. Orr. The ability of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 to bind to a ubiquitin-specific protease contributes to its roles in the activation of gene expression and stimulation of virus replication. *J Virol*, 73(1):417–426, 1999.

[190] C. Boutell, M. Canning, A. Orr, and R. D. Everett. Reciprocal activities between herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0, a ubiquitin E3 ligase, and ubiquitin-specific protease USP7. *J Virol*, 79(19):12342–12354, 2005.

[191] W. Ching, E. Koyuncu, S. Singh, C. Arbelo-Roman, B. Hartl, E. Kremmer, T. Speiseder, C. Meier, and T. Dobner. A ubiquitin-specific protease possesses a decisive role for adenovirus replication and oncogene-mediated transformation. *PLoS Pathog*, 9(3):e1003273, 2013.

[192] W. Jäger, S. Santag, M. Weidner-Glunde, E. Gellermann, S. Kati, M. Pietrek, A. Viejo-Borbolla, and T. F. Schulz. The ubiquitin-specific protease USP7 modulates the replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent episomal DNA. *J Virol*, 86(12):6745–6757, 2012.

[193] V. Saridakis, Y. Sheng, F. Sarkari, M. N. Holowaty, K. Shire, T. Nguyen, R. G. Zhang, J. Liao, W. Lee, A. M. Edwards, C. H. Arrowsmith, and L. Frappier. Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1 implications for EBV-mediated immortalization. *Mol Cell*, 18(1):25–36, 2005.

[194] F. Sarkari, T. Sanchez-Alcaraz, S. Wang, M. N. Holowaty, Y. Sheng, and L. Frappier. EBNA1-mediated recruitment of a histone H2B deubiquitylating complex to the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *PLoS Pathog*, 5(10): e1000624, 2009.

[195] S. Chavoshi, O. Egorova, I. K. Lacdao, S. Farhadi, Y. Sheng, and V. Saridakis. Identification of Kaposi Sarcoma Herpesvirus (KSHV) vIRF1 Protein as a Novel Interaction Partner of Human Deubiquitinase USP7. *J Biol Chem*, 291(12):6281–6291, 2016.

[196] N. Fischer and A. Grundhoff. Merkel cell polyomavirus. In *Cancers in People with HIV and AIDS*, pages 113–122. Springer, 2014.

[197] J. A. Wendzicki, P. S. Moore, and Y. Chang. Large T and small T antigens of Merkel cell polyomavirus. *Curr Opin Virol*, 11:38–43, 2015.

[198] J. Tang, L. Qu, M. Pang, and X. Yang. Daxx is reciprocally regulated by Mdm2 and Hausp. *Biochem Biophys Res Commun*, 393(3):542–545, 2010.

[199] G. Schumacher, M. Jarsch, and W. Boos. Expression vector for adjustable expression of exogenous genes in prokaryotes, 1988. WO Patent App. PCT/EP1988/000,446.

[200] F. Neumann, M. Czech-Sioli, C. Schmidt, T. Dobner, A. Grundhoff, S. Schreiner, and N. Fischer. Replication of merkel cell polyomavirus induces reorganization of promyelocytic leukemia nuclear bodies. *J Gen Virol*, 2016.

[201] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–5467, 1977.

[202] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.

[203] T. Meyer and B. Lamberts. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim Biophys Acta*, 107(1):144–145, 1965.

[204] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, 1976.

[205] E. Schreiber, P. Matthias, M. M. Müller, and W. Schaffner. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res*, 17(15):6419–6419, 1989.

[206] T. Bethge, H. A. Hachemi, J. Manzetti, R. Gosert, W. Schaffner, and H. H. Hirsch. Sp1 sites in the noncoding control region of BK polyomavirus are key regulators of bidirectional viral early and late gene expression. *J Virol*, 89(6):3396–3411, 2015.

[207] F. Colland, E. Formstecher, X. Jacq, C. Reverdy, C. Planquette, S. Conrath, V. Trouplin, J. Bianchi, V. N. Aushev, J. Camonis, A. Calabrese, C. Borg-Capra, W. Sippl, V. Collura, G. Boissy, J.-C. Rain, P. Guedat, R. Delansorne, and L. Daviet. Small-molecule inhibitor of USP7/HAUSP ubiquitin protease stabilizes and activates p53 in cells. *Mol Cancer Ther*, 8(8):2286–2295, 2009.

[208] A. Fernández-Montalván, T. Bouwmeester, G. Joberty, R. Mader, M. Mahnke, B. Pierrat, J.-M. Schlaeppi, S. Worpenberg, and B. Gerhartz. Biochemical characterization of USP7 reveals post-translational modification sites and structural requirements for substrate processing and subcellular localization. *FEBS J*, 274 (16):4256–4270, 2007.

[209] S. Daubeuf, D. Singh, Y. Tan, H. Liu, H. J. Federoff, W. J. Bowers, and K. Tolba. HSV ICP0 recruits USP7 to modulate TLR-mediated innate response. *Blood*, 113 (14):3264–3275, 2009.

[210] J. Salsman, M. Jagannathan, P. Paladino, P.-K. Chan, G. Dellaire, B. Raught, and L. Frappier. Proteomic profiling of the human cytomegalovirus UL35 gene products reveals a role for UL35 in the DNA repair response. *J Virol*, 86(2):806–820, 2012.

[211] K. Molland, Q. Zhou, and A. D. Mesecar. A 2.2 Å resolution structure of the USP7 catalytic domain in a new space group elaborates upon structural rearrangements resulting from ubiquitin binding. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 70(Pt 3):283–287, 2014.

[212] A. C. Faesen, M. P. A. Luna-Vargas, and T. K. Sixma. The role of UBL domains in ubiquitin-specific proteases. *Biochem Soc Trans*, 40(3):539–545, 2012.

[213] C. Reverdy, S. Conrath, R. Lopez, C. Planquette, C. Atmanene, V. Collura, J. Harpon, V. Battaglia, V. Vivat, W. Sippl, and F. Colland. Discovery of specific inhibitors of human USP7/HAUSP deubiquitinating enzyme. *Chem Biol*, 19(4): 467–477, 2012.

[214] L. C. Dang, F. D. Melandri, and R. L. Stein. Kinetic and Mechanistic Studies on the Hydrolysis of Ubiquitin C-Terminal 7-Amido-4-Methylcoumarin by Deubiquitinating Enzymes. *Biochemistry*, 37(7):1868–1879, 1998.

[215] J. D. Wrigley, K. Eckersley, I. M. Hardern, L. Millard, M. Walters, S. W. Peters, R. Mott, T. Nowak, R. A. Ward, P. B. Simpson, and K. Hudson. Enzymatic characterisation of USP7 deubiquitinating activity and inhibition. *Cell Biochem Biophys*, 60(1-2):99–111, 2011.

[216] P. Ma, X. Yang, Q. Kong, C. Li, S. Yang, Y. Li, and B. Mao. The ubiquitin ligase RNF220 enhances canonical Wnt signaling through USP7-mediated deubiquitination of β-catenin. *Mol Cell Biol*, 34(23):4355–4366, 2014.

[217] L. C. Trotman, X. Wang, A. Alimonti, Z. Chen, J. Teruya-Feldstein, H. Yang, N. P. Pavletich, B. S. Carver, C. Cordon-Cardo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S.-G. Chi, H.-J. Kim, T. Misteli, X. Jiang, and P. P. Pandolfi. Ubiquitination Regulates PTEN Nuclear Import and Tumor Suppression. *Cell*, 128(1):141–156, 2007.

[218] W. H. Shen, A. S. Balajee, J. Wang, H. Wu, C. Eng, P. P. Pandolfi, and Y. Yin. Essential Role for Nuclear PTEN in Maintaining Chromosomal Integrity. *Cell*, 128(1):157–170, 2007.

[219] A. Nishiyama, L. Frappier, and M. Mechali. MCM-BP regulates unloading of the MCM2-7 helicase in late S phase. *Genes Dev*, 25(2):165–175, 2010.

[220] Y. P. Chang, M. Xu, A. C. D. Machado, X. J. Yu, R. Rohs, and X. S. Chen. Mechanism of Origin DNA Recognition and Assembly of an Initiator-Helicase Complex by SV40 Large Tumor Antigen. *Cell Rep*, 3(4):1117–1127, 2013.

[221] D. Gai, D. Wang, S.-X. Li, and X. S. Chen. The structure of SV40 large T hexameric helicase in complex with AT-rich origin DNA. *eLife*, 5, 2016.

[222] D. Gai, R. Zhao, D. Li, C. V. Finkielstein, and X. S. Chen. Mechanisms of Conformational Change for a Replicative Hexameric Helicase of SV40 Large Tumor Antigen. *Cell*, 119(1):47–60, 2004.

[223] H. Yardimci, X. Wang, A. B. Loveland, I. Tappin, D. Z. Rudner, J. Hurwitz, A. M. van Oijen, and J. C. Walter. Bypass of a protein barrier by a replicative DNA helicase. *Nature*, 492(7428):205–209, 2012.

[224] D. Gai, Y. P. Chang, and X. S. Chen. Origin DNA melting and unwinding in DNA replication. *Curr Opin in Struct Biol*, 20(6):756–762, 2010.

[225] S. L. Forsburg. Eukaryotic MCM Proteins: Beyond Replication Initiation. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(1):109–131, 2004.

[226] M. A. Osley. Regulation of histone H2A and H2B ubiquitylation. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 5(3):179–189, 2006.

[227] J. Kim, S. B. Hake, and R. G. Roeder. The Human Homolog of Yeast BRE1 Functions as a Transcriptional Coactivator through Direct Activator Interactions. *Mol Cell*, 20(5):759–770, 2005.

[228] Z.-W. Sun and C. D. Allis. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, 418(6893):104–108, 2002.

[229] P. Tegtmeyer, M. Schwartz, J. Collins, and K. Rundell. Regulation of tumor antigen synthesis by simian virus 40 gene A. *J Virol*, 16(1):168–178, 1975.

[230] G. Khoury and E. May. Regulation of early and late simian virus 40 transcription: overproduction of early viral RNA in the absence of a functional T-antigen. *J Virol*, 23(1):167–176, 1977.

[231] S. I. Reed, G. R. Stark, and J. C. Alwine. Autoregulation of simian virus 40 gene A by T antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(9):3083–3087, 1976.

[232] J. M. Keller and J. C. Alwine. Activation of the SV40 late promoter: direct effects of T antigen in the absence of viral DNA replication. *Cell*, 36(2):381–389, 1984.

[233] J. Brady, J. B. Bolen, M. Radonovich, N. Salzman, and G. Khoury. Stimulation of simian virus 40 late gene expression by simian virus 40 tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(7):2040–2044, 1984.

Abbildungsverzeichnis

1 Phylogenetische Analyse der humanen Polyomaviren 15
2 Genomstruktur der Polyomaviren 16
3 Der Lebenszyklus von Polyomaviren 18
4 Merkel Zell Karzinom 23
5 Lebenszyklus des MCPyV und Entwicklung eines MCC 24
6 Funktionelle Domänen und Interaktionspartner des MCPyV LT und sT . 26
7 Domänstruktur von Usp7 32
8 Usp7-Bindemotive in MCPyV T-Antigenen 90
9 Koimmunpräzipitation der MCPyV T-Antigene und Usp7 91
10 GST-Pulldown der MCPyV T-Antigene mit Usp7 93
11 Direkter GST-Pulldown der MCPyV LT N- und C-Terminus Proteine mit Usp7 94
12 Direkter GST-Pulldown des MCPyV sT mit GST-Usp7 96
13 Proteinlevel transient exprimierter MCPyV T-Antigene in Abhängigkeit von Usp7 98
14 Proteinlevel stabil exprimierter MCPyV T-Antigene in Abhängigkeit von Usp7 99
15 *In vitro* Deubiquitinierung von MCPyV T-Antigenen durch Usp7 103
16 Titration der Usp7 Mengen für die Deubiquitinierung der MCPyV T-Antigene 104
17 Lokalisation von Usp7 in den MCC Zelllinien WaGa und MKL-1 106
18 Kolokalisation von Usp7 und LT in MCPyV replizierenden Zellen 108
19 Quantifizierung der Kolokalisation von Usp7 und LT in MCPyV replizierenden Zellen 109
20 Einfluss von Usp7 auf DNA-Replikation und Genexpression des MCPyV 110
21 Bindung von LT an den MCPyV *ori* unter Einfluss von Usp7 112
22 Hypothetisches Modell zum Mechanismus der positiven Regulation der DNA-Replikation des MCPyV durch Usp7 124
23 Aminosäure-Sequenz der MCPyV T-Antigene mit Usp7-Bindemotiven . 150
24 Expression und Aufreinigung des MCPyV LT C-Terminus, sT und Usp7 151
25 Aufreinigung ubiquitinierter MCPyV T-Antigene aus HEK293 Zellen . . 153
26 MTT Assay von H1299 und HCT116 Zelllinien 154

Tabellenverzeichnis

1 Geräte . . . 37
2 Reagenzien und Laborhilfsmittel . . . 38
3 Allgemeine Lösungen und Puffer . . . 41
4 Puffer für die SDS-PAGE . . . 42
5 Puffer für den Westernblot . . . 43
6 Puffer für die Coomassiefärbung . . . 43
7 Puffer für die Silberfärbung . . . 43
8 Puffer für die FLAG®-Immunpräzipitation . . . 44
9 Puffer für den GFP-Trap®_A . . . 45
10 Puffer für die Aufreinigung des MCPyV LT C-Terminus . . . 45
11 Puffer für die Aufreinigung des MCPyV MBP-sT . . . 46
12 Puffer für die Aufreinigung des GST-Usp7 1-1102 . . . 47
13 Puffer für die Aufreinigung des GST-Usp7 1 - 215, 212 - 561, 561 - 916 und 913 - 1102 . . . 47
14 Puffer für die Aufreinigung von ubiquitinierten Proteinen aus HEK293 Zellen und den *in vitro* Deubiquitinierungsassay . . . 48
15 Puffer für die Herstellung kompetenter Bakterien . . . 49
16 Puffer für den EMSA . . . 49
17 Reagenzsysteme . . . 50
18 Zelllinien . . . 51
19 Medien und Reagenzien für die Zellkultur . . . 52
20 Primer . . . 53
21 siRNAs . . . 54
22 Prokaryotische Expressionsvektoren . . . 55
23 Eukaryotische Expressionsvektoren . . . 56
24 Primäre Antikörper . . . 60
25 Sekundäre Antikörper . . . 61
26 Primer/Taqman-Sonden und PCR-Bedingungen für die Realtime-PCR . 85
27 Experimentelle Ansätze zur Analyse der Ubiquitinierung der MCPyV T-Antigene in Abhängigkeit von Usp7 *in vivo* . . . 101

A Anhang

A.1 Aminosäuresequenzen der MCPyV T-Antigene mit Usp7 Bindemotiven

Abbildung 23 zeigt die Aminosäuresequenzen der MCPyV T-Antigene mit Markierung potentieller Usp7-Bindemotive.

A.2 Expression und Aufreinigung von Proteinen für GST-Pulldowns

Für GST-Pulldowns zur Untersuchung der Interaktion der MCPyV T-Antigene mit Usp7 wurden die Proteine in ihrer kompletten Form oder in Teilen in verschiedenen Systemen exprimiert und aufgereinigt. Die Expression und Aufreinigung des His_6-fusionierten LT N-Terminus (Aminosäure 1 - 244) wurde von Sophie Borchert durchgeführt, wie bereits publiziert [65], und das Protein freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die vier GST-fusionierten Usp7 Abschnitte (Aminosäure (As) 1 - 215 = TRAF-Domäne, As 212 - 561 = katalytische Domäne, As 561 - 916 = HUbl123, As 913 - 1102 = HUbl45) wurden wie in Ching et al. [191] beschrieben exprimiert und aufgereinigt und sind hier daher nicht weiter beschrieben. Die Expression und Aufreinigung weiterer verwendeter Proteine wurden neu etabliert und sind im Nachfolgenden kurz dargestellt.

A.2.1 Expression und Aufreinigung des MCPyV LT C-Terminus

Abbildung 24 A zeigt die Expression und Aufreinigung des MCPyV LT C-Terminus (Aminosäure 259 - 818). Dieser wurde N-terminal GST fusioniert in *E. coli* BL21 Star exprimiert und über Glutathion Sepharose aufgereinigt. Um den GST-Tag zu entfernen wurde ein Thrombin-Verdau des an die Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteins durchgeführt. Das im Überstand enthaltene Protein wurde aufkonzentriert und über Massenspektrometrie die Identität des Proteins bestätigt.

A.2.2 Expression und Aufreinigung des MCPyV MBP-sT

Abbildung 24 B zeigt die Expression und Aufreinigung des MCPyV sT. Das Protein wurde hierfür N-terminal MBP fusioniert in *E. coli* T7 Express *lysY/I^q* exprimiert, über Amylose-Beads aufgereinigt und mit Maltose eluiert. Eine Entfernung des MBP-Tags durch TEV-Verdau war aufgrund mangelnder Stabilität des sT Proteins nicht möglich. Die Identität des aufgereinigten Proteins wurde mittels sT spezifischem 2T2 Antikörper bestätigt.

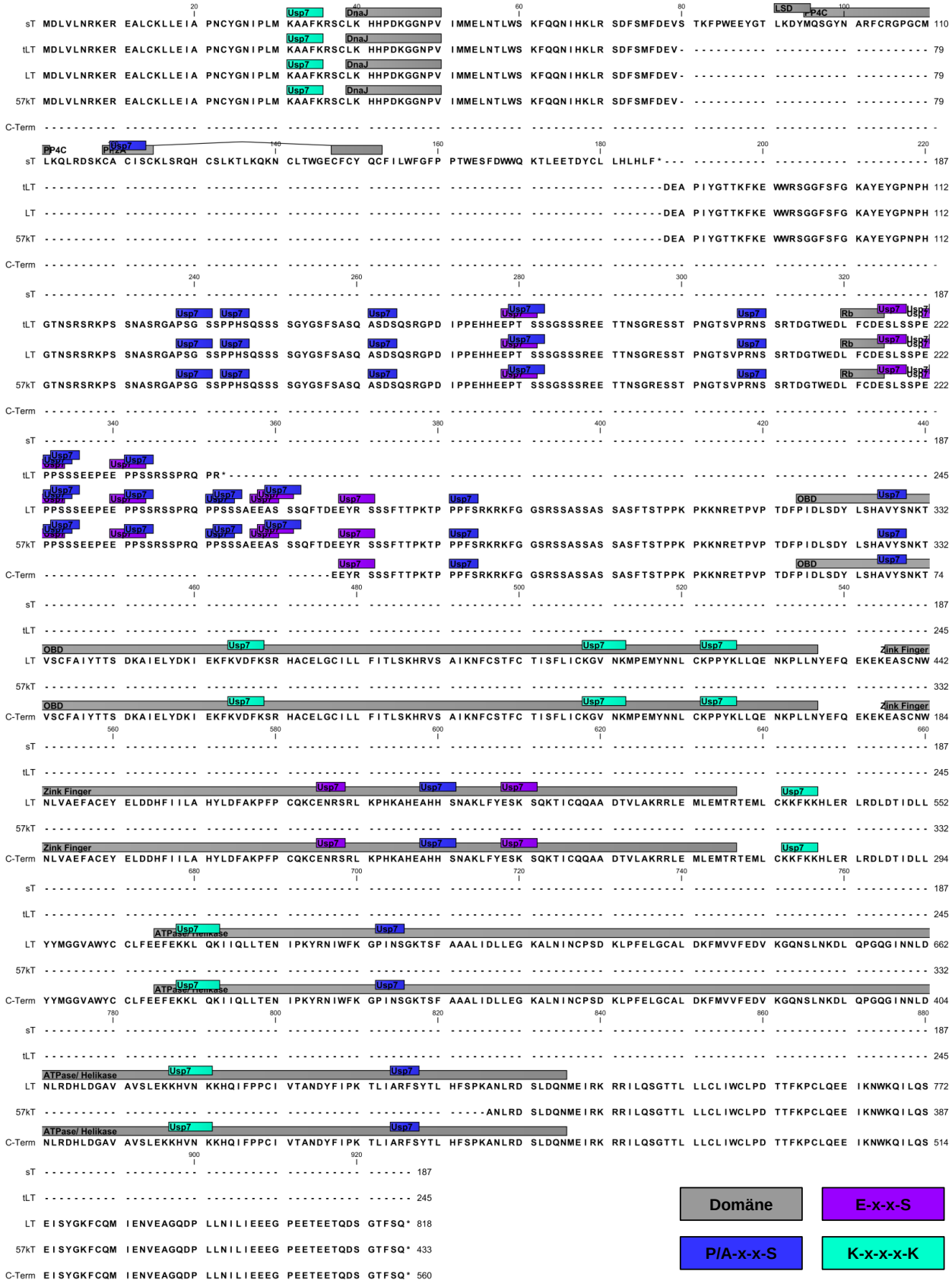

Abbildung 23: Aminosäuresequenz der MCPyV T-Antigene mit potentiellen Usp7-Bindemotiven. P/A-x-x-S und E-x-x-S sind Bindemotive der TRAF-Domäne von Usp7 [134–136]. K-x-x-x-K ist Bindemotiv der HUBl2 Domäne von Usp7 [145]. C-Term = C-Terminus von LT (Aminosäure 259 - 818), der in GST-Pulldowns verwendet wurde. LSD = LT *Stabilization Domain*, OBD = *Origin Binding Domain*.

A.2.3 Expression und Aufreinigung des GST-Usp7 Aminosäure 1 - 1102

Abbildung 24 C zeigt die Expression und Aufreinigung des Volllängen Usp7 Proteins aus *Sf9* Insektenzellen. Usp7 wurde N-terminal GST fusioniert exprimiert und über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Die Identität des aufgereinigten Proteins wurde mittels Usp7 spezifischem 3D8 Antikörper bestätigt.

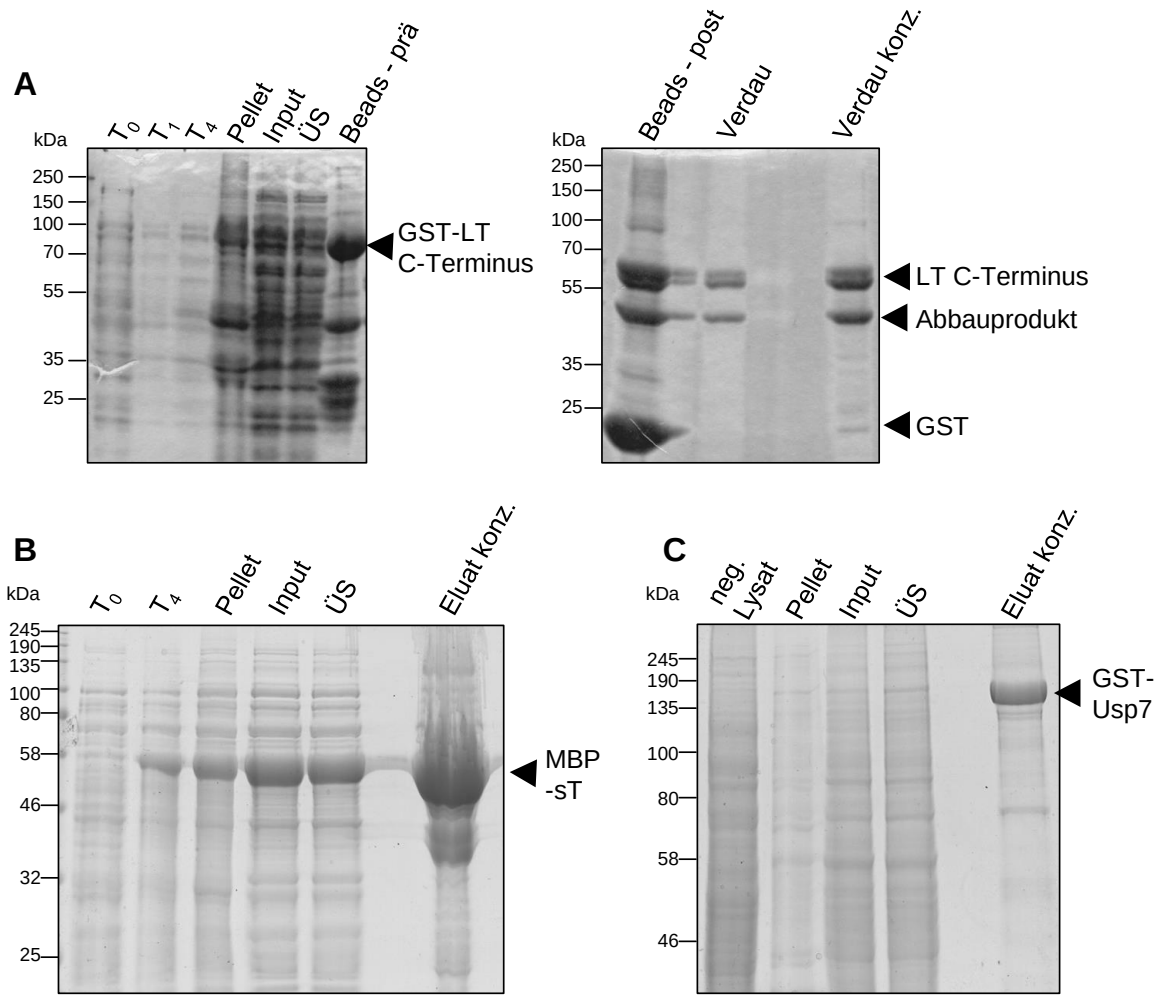

Abbildung 24: Expression und Aufreinigung des MCPyV LT C-Terminus (A), sT (B) und von Usp7 (C). T_0, T_1, T_4 = 0, 1, 4 Stunden nach Induktion; Pellet = unlösliche Fraktion nach Lyse; Input = für Aufreinigung eingesetztes Lysat, ÜS = Überstand nach Bindung an Beads; Beads-prä = vor Thrombin-Verdau; Beads-post = nach Thrombin-Verdau. Verdau = Überstand über den Beads nach TEV-Verdau. T = Induktionszeit in Stunden.

A.3 Aufreinigung ubiquitinierter MCPyV T-Antigene

Abbildung 25 zeigt aufgereinigte ubiquitinierte MCPyV T-Antigene. Diese wurden dafür in HEK293 Zellen exprimiert, HA fusioniertes Ubiquitin kotransfiziert, und die Zellen mit Proteasom-Inhibitor behandelt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Streptavidin-Sepharose über einen N-terminalen SBP-Tag an den T-Antigenen. Die Analyse der Aufreinigung erfolgte mittels SDS-PAGE und nachfolgender Silberfärbung, sowie Westernblot mit Detektion über LT/sT-spezifischen Antikörper und HA-Antikörper für Ubiquitin.

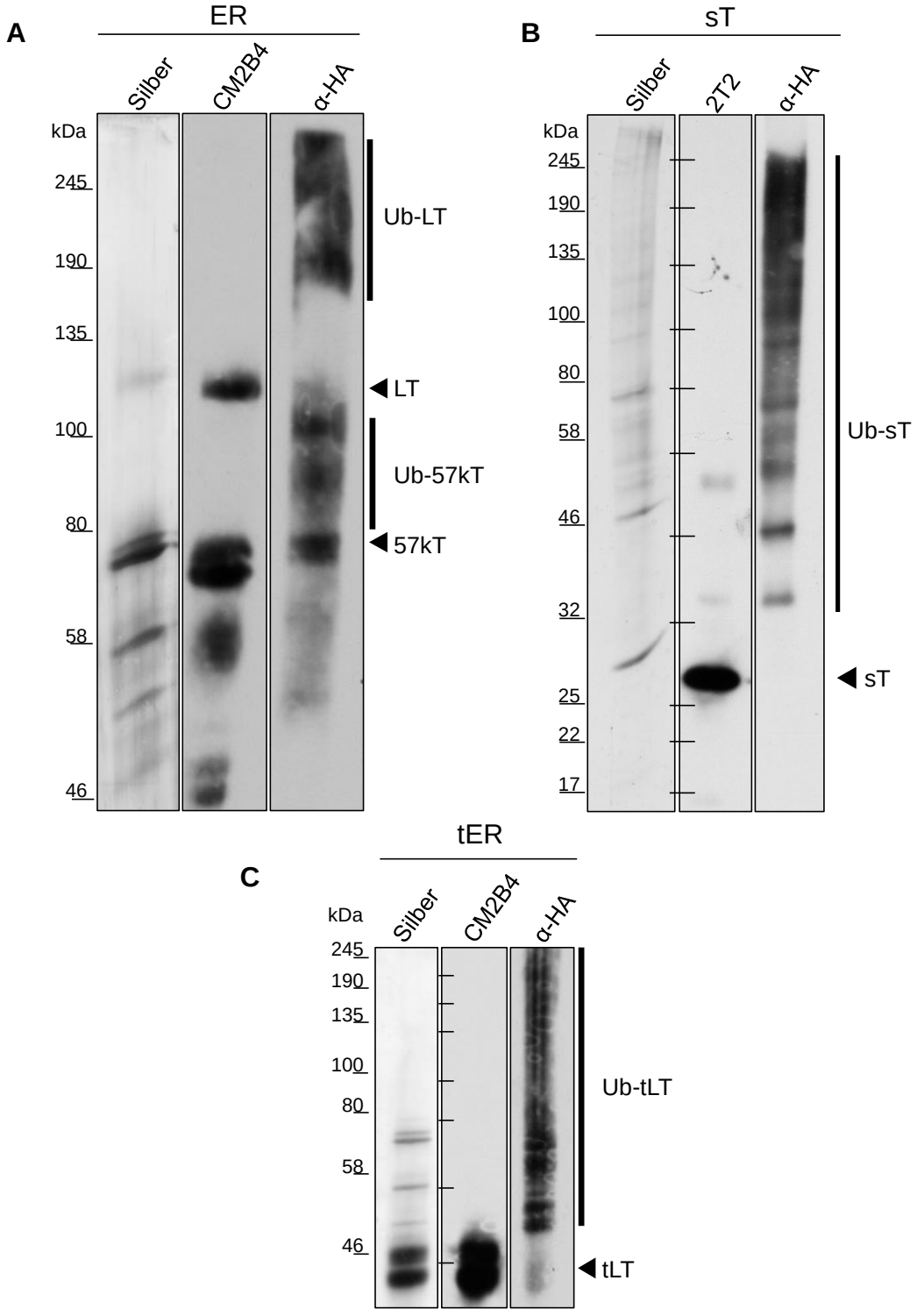

Abbildung 25: Aufreinigung ubiquitinierter MCPyV T-Antigene aus HEK293 Zellen. Die komplette frühe Region (ER, in **A**), die tumorspezifische verkürzte frühe Region (tER, in **C**) und das sT (in **B**) des MCPyV wurden mit einem SBP-Tag in HEK293 Zellen zusammen mit HA-Ubiquitin exprimiert und über Streptavidin-Sepharose aufgereinigt. Gezeigt sind eine Silberfärbung der Proteine, sowie Westernblots (WB) mit Färbung gegen LT/sT (Ak: CM2B4/ 2T2) und HA-Ubiquitin (α-HA) (Ak: 3F10). Auftragsmengen: ER: Silber 90 µg, WB 30 µg; sT: Silber 90 µg, WB 30 µg; tER: Silber 40 µg, WB 40 µg. Die Aufreinigung der LT Konstrukte mit Intron unterscheidet sich von derer der Konstrukte ohne Intron nur beim kompletten LT durch die zusätzliche Anreicherung von 57kT und Ub-57kT. ST und Ub-sT wird beim ER und tER sehr schwach exprimiert und ist nicht detektierbar. Ub = Ubiquitin.

A.4 MTT-Assays

Abbildung 26 zeigt MTT-Assays zum Vergleich der Proliferation von verschiedenen Zelllinien.

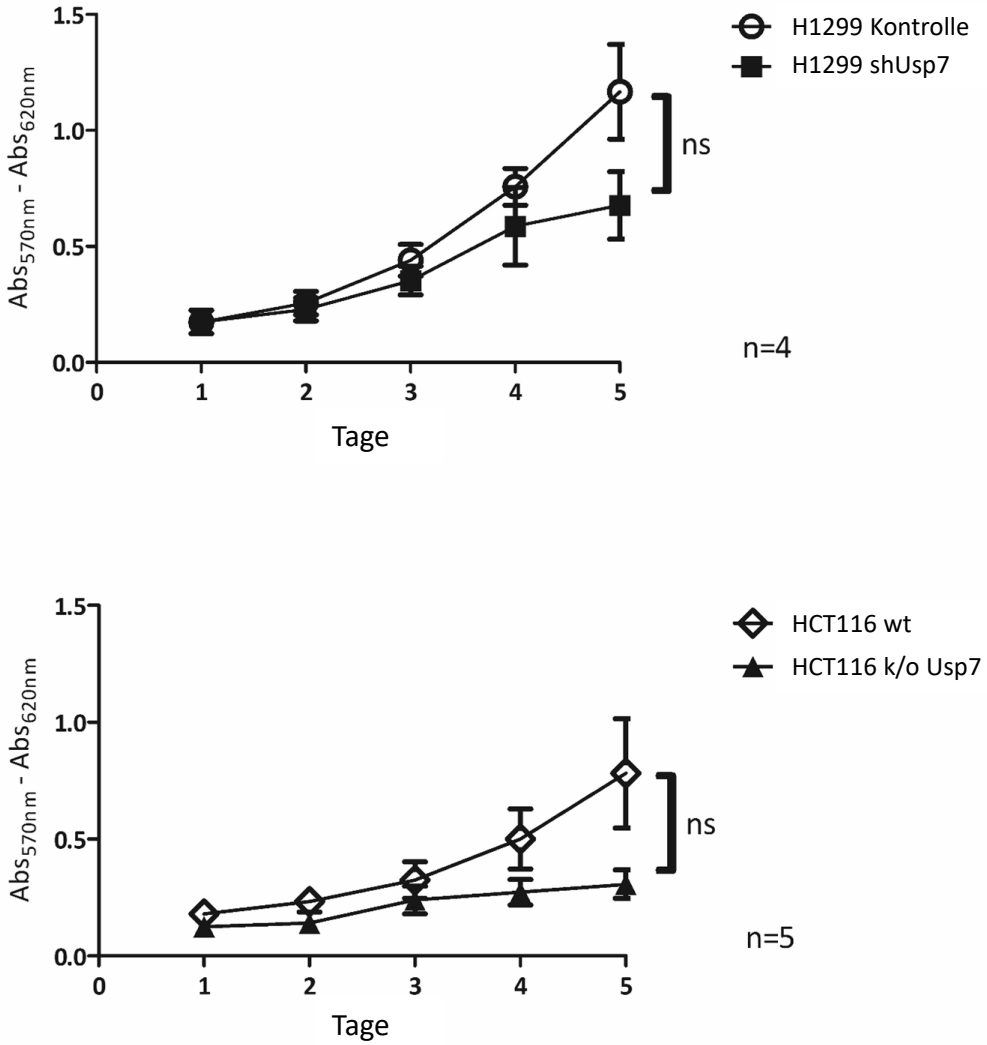

Abbildung 26: MTT Assay von H1299 und HCT116 Zelllinien. H1299 Kontrolle = pSUPER-retro-puro transduziert; H1299 shUsp7 = pSUPER-shUsp7 transduziert [191]. HCT116 wt = Wildtyp Zellen; HCT116 k/o Usp7 [147]. Werte wurden immer in Triplikaten gemessen, n = Anzahl der unabhängigen Experimente. Fehlerbalken geben Standardabweichung des Mittelwertes an, Signifikanz wurde durch GraphPad Prism 5 berechnet unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen T-Tests mit 95 % Konfidenzinterval.

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Nicole Fischer für die Ausgabe der Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bedanken. Ein großer Dank geht an ihre sehr gute Betreuung und Unterstützung sowie das richtige Maß an Anleitung und Freiheit eigene Ideen zu verfolgen.

Bei Prof. Thomas Dobner bedanke ich mich für die Bereitschaft das Zweitgutachten der Dissertation zu erstellen und als Disputationsgutachter zur Verfügung zu stehen. Darüber hinaus möchte ich mich bei ihm und seiner Arbeitsgruppe, vor allem Wilhelm Ching, für die Bereitstellung zahlreicher Reagenzien und Konstrukte zur Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Stefan Hoth für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission, Prof. Adam Grundhoff für die Bereitschaft als Disputationsgutachter zur Verfügung zu stehen und allen weiteren Fragestellern.

Großer Dank geht an alle aktuellen und früheren Mitglieder der Arbeitsgruppen Fischer, Grundhoff und Ruckdeschel für ihre große Unterstützung, kritischen Anmerkungen und vor allem die gute Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanken möchte ich mich bei Svenja Siebels, Claudia Schmidt, Juliane Theiß, Thomas Günther, Friederike Neumann, Julia Gropengießer und Lena Novikova.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Großvater „Opa Plön“, der mir durch seine finanzielle Unterstützung mein Studium ermöglicht hat.

Ich bedanke mich vor allem bei meinen wunderbaren Freunden, die mich in jeder Lebenslage unterstützt und immer zu mir gehalten haben. Ohne Euch wäre ich nicht so weit gekommen! Besonderer Dank geht an Madeleine und Sigi. Unbedingt erwähnen möchte ich hier auch Yalah und Maxi.

Eidesstattliche Versicherung

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

Hamburg, den 16.01.2017

_____

Manja Czech-Sioli