

**Charakterisierung der Interaktion der Merkelzell-Polyomavirus  
kodierten T-Antigene mit dem Wirtsfaktor Kap1**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Svenja Siebels**

Hamburg, Juli 2018

Gutachter:

Prof. Dr. Nicole Fischer

Prof. Dr. Thomas Dobner

Disputation: 19. Oktober 2018

**Für meine Familie.**

## Zusammenfassung

Das Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) ist nachweislich für ca. 80 % aller Merkelzellkarzinome (*Merkel cell carcinoma* (MCC)) verantwortlich. Das virale Genom ist dabei monoklonal in die DNA der Wirtszelle integriert und trägt zusätzlich charakteristische Mutationen im T-Lokus. Das MCPyV kodiert wie alle Polyomaviren (PyV) die Tumor-Antigene (T-Ag) Large T-Ag und small T-Ag, die transformierende Eigenschaften besitzen. Dennoch sind viele Fragen zur MCC-Entstehung weiterhin ungeklärt. Insbesondere die Ursprungszelle, aus der das MCC hervorgeht, ist ungewiss. Das unvollständige Wissen um den viralen Lebenszyklus sowie die kontroversen Modelle hinsichtlich des Reservoirs des Virus erschweren zusätzlich das Verständnis zur Tumorentstehung. Um das transformierende Potential des MCPyV LT-Ags zu beleuchten, wurden vor Beginn dieser Arbeit neue zelluläre Interaktionspartner des LT-Ags mithilfe von Tandem-Affinitäts-Aufreinigung und anschließender multidimensionaler Protein-Interaktions-Technologie (MudPIT) identifiziert (M. Czech-Sioli, Manuskript in Arbeit). Unter den Kandidaten befand sich das Chromatin-modifizierende Protein, Zellzyklusregulator und Korepressor Kap1 (KRAB-associated protein 1) als putativer Interaktionspartner des LT-Ags. Die Interaktion des LT-Ags, sT-Ags und des verkürzten tLT-Ags (tLT-Ags) mit dem Wirtsfaktor Kap1 wurde in dieser Arbeit mithilfe von Koimmunpräzipitationen in unterschiedlichen Tumorzelllinien bestätigt. Weiterhin wurde die Bindung des LT-Ags an Kap1 auf den N-Terminus des LT-Ags und die RBCC-Domäne von Kap1 eingegrenzt. Die Konsequenzen dieser Interaktion für das Virus und den Wirt wurden in funktionellen Studien charakterisiert. Durch die Verwendung von CRISPR-Cas9 Kap1 knock-out (k.o.) Zelllinien im semi-permissiven MCPyV-Replikationssystem (Neumann *et al.*, 2011) wurde Kap1 als Restriktionsfaktor für virale DNA-Replikation identifiziert. Die Wiedereinführung von Kap1 in Kap1 k.o. Zellen konnte diesen Phänotyp zum Teil umkehren. Mithilfe von unterschiedlichen Methoden wurde ein direkter Effekt von Kap1 auf die virale DNA-Replikation wie etwa die transkriptionelle Regulation viraler Gene ausgeschlossen.

Zur Charakterisierung der Auswirkungen der Kap1/LT-Interaktion für die Wirtszelle wurde das Replikationsmodell für neonatale dermale Fibroblasten, die kürzlich von Liu *et al.* (2016) identifizierte putative Wirtszelle des MCPyV, weiterentwickelt. Die Transfektion des rezirkularisierten MCPyV-Genoms in dermale Fibroblasten induzierte die Phosphorylierung von Kap1 an Serin 824 (Ser824) und Serin 473 (Ser473). Dabei wurden signifikant höhere Kap1-Phosphorylierungssignale in Fibroblasten mit viralen Replikationszentren gemessen im Vergleich zu MCPyV-positiven Zellen ohne Replikationszentren. Durch die Verwendung des

ATM-Inhibitors KU55933 wurde nachgewiesen, dass die Phosphorylierung von Kap1 an Ser824 durch die Aktivierung der DNA-Reparatur – als Folge viraler DNA-Replikation – durch die ATM-Kinase erfolgt. Interessanterweise zeigten SUMOylierungs-Assays, dass Kap1 in Anwesenheit der T-Antigene de-SUMOyliert wird. Die Phosphorylierung und De-SUMOylierung von Kap1 hat die transkriptionelle Derepression des Zellzyklusregulators *p21* zur Folge und führt in MCPyV-positiven Fibroblasten zur Zunahme der *p21*-Transkripte im Vergleich zu Virus-negativen Fibroblasten.

Interessanterweise wurde in MCPyV-positiven dermalen Fibroblasten ein seneszenten Phänotyp beobachtet, der sich durch die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase sowie die Heraufregulation von *p21* auszeichnet. Weiterhin wurde festgestellt, dass MCPyV-positive Fibroblasten eine verringerte Proliferation und einen erhöhten Anteil von Zellen in der G2-Zellzyklusphase zeigten. Mechanistisch konnte durch die Verwendung von Genommutanten (K331A und S816A) belegt werden, dass replikativer Stress infolge viraler DNA-Replikation und zweitrangig die Expression der MCPyV T-Ag für die Zunahme der *p21*-Transkripte, das verringerte Zellwachstum und den G2-Arrest verantwortlich ist. Es wurde somit ein neuartiger, Kap1-abhängiger Mechanismus in dermalen Fibroblasten identifiziert, der unabhängig von der Phosphorylierung des LT-Ags an Ser816 Seneszenz in dermalen Fibroblasten auslöst.

Zusätzlich belegen Transkriptomanalysen in HEK293 Kap1 k.o. Zellen im Vergleich zu HEK293 Kontrollzellen zum einen die zentrale Rolle von Kap1 bei der Regulation der Zellproliferation. Zum anderen zeigen sie, dass Kap1 bei der Induzierung des sogenannten Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP) von zentraler Bedeutung ist. Die transiente Expression der MCPyV T-Ag in Kap1-kompetenten HEK293 Zellen führte zur differentiellen Expression von Komponenten des SASP.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der Wirtsfaktor Kap1 einen wichtigen Beitrag zum Überleben von MCPyV-positiven Fibroblasten leistet. Dabei arretiert phosphoryliertes Kap1 bei replikativem Stress den Zellzyklus und limitiert die virale Replikation. Die Beobachtung der MCPyV-induzierten Seneszenz (MCPyV-IS) in dermalen Fibroblasten steht in Konflikt mit der derzeitigen Annahme, dass dermale Fibroblasten die Wirtszelle des MCPyV darstellen. MCPyV-IS in dermalen Fibroblasten könnte vielmehr durch die Gestaltung einer tumorigenen Mikroumgebung in der Haut bei der Transformation der Ursprungszelle des MCCs von Bedeutung sein.

## Abstract

Merkel cell polyomavirus (MCPyV) is the causative agent of about 80 % of all Merkel cell carcinomas (MCCs). In MCPyV-positive MCCs the virus genome is monoclonally integrated into the host genome and contains truncation mutations within the T-locus. As a consequence, viral replication is abrogated in tumor cells. Like other polyomaviruses (PyV) MCPyV encodes for the viral Tumor-Antigens (T-Ag) LT-Ag and sT-Ag responsible for viral DNA replication in the viral life cycle but also involved in transformation of cells. Many aspects of the viral life cycle, viral mechanisms in MCC onset and progression are unknown. Besides the controversy about the MCC cell type of origin, numerous questions remain addressing the viral life cycle. To date, there is no fully permissive cell culture system available to study the viral life cycle. Knowledge on cellular proteins necessary for restricting the viral life cycle is highly limited. A current hypothesis of dermal fibroblasts being the natural reservoir of the MCPyV remains to be confirmed.

Prior to this work, tandem affinity purification followed by multidimensional protein interaction technology identified novel interaction partners of MCPyV LT-Ag (M. Czech-Sioli, manuscript in preparation). One highly interesting interaction factor, Kap1 (KRAB-associated protein 1) was identified as a putative binding partner of LT-Ag. Kap1 is involved in chromatin remodeling, co-transcriptional repression and cell cycle regulation and has been shown to repress viral transcription of different DNA viruses like human Adenovirus, KSHV, EBV or hCMV.

The interaction of Kap1 with MCPyV LT-Ag, sT-Ag and tumor-derived tLT-Ag was confirmed by co-immunoprecipitation in different cell lines. Interacting domains were narrowed to the N-terminus of LT-Ag and the RBCC domain of Kap1. The central question of this work addresses the functional consequences of Kap1/T-Ag interaction for the viral life cycle and the host cell. Using the CRISPR-Cas9 technology Kap1 knock out (k. o.) cell lines were generated and used in an *in vitro* replication system (Neumann *et al.*, 2011). Kap1 was identified to restrict viral DNA replication which could be partially complemented by re-introducing Kap1 into the system. No direct effect of Kap1 on viral DNA replication could be identified: Kap1 did not regulate viral transcription nor constrict the binding of LT to the viral origin of replication.

To address the consequences of the Kap1/T-Ag interaction for the host cell, neonatal dermal fibroblasts were transfected with recircularized viral genomes. Upon MCPyV transfection Kap1 phosphorylation on Serine 824 and Serine 473 was induced. Fibroblasts exhibiting active replication centers showed significantly increased phosphorylation level compared to MCPyV positive cells without active replication centers. Using the ATM-inhibitor KU55933 it was shown that the phosphorylation of Kap1 on Ser824 is a consequence of the activation of the DNA damage

response upon viral DNA replication. Consistent with this finding SUMOylation assays revealed that Kap1 becomes de-SUMOylated upon expression of the MCPyV T-Ags. The switch from SUMOylated to phosphorylated Kap1 is known to result in the de-repression of *p21*, a cell cycle regulator, transcription. Consistently, MCPyV positive fibroblasts showed significant increased *p21* transcripts compared to virus negative cells. Furthermore, reduced cell proliferation, increased ratio of cells in G2 cell cycle phase and a senescent phenotype was detected in MCPyV positive fibroblasts. By introducing genome mutants (K331A und S816A) it was shown that replicative stress and secondarily the growth inhibitory functions of LT-Ag are responsible for *p21* activation, G2 arrest and growth delay. The induction of senescence in MCPyV positive fibroblasts is therefore induced by a novel Kap1 dependent pathway and independent of the previously described phosphorylation of LT-Ag on Serine 816 (Li *et al.*, 2015).

Transcriptome analysis of HEK293 Kap1 competent and Kap1 k.o. cells revealed that cell proliferation is regulated by Kap1. Furthermore, the transient expression of MCPyV T-Ag in Kap1 competent and Kap1 k.o. cells resulted in differential expression of genes that are considered as components of the senescence-associated secretory phenotype (SASP).

In summary the results show that the host factor Kap1 contributes to the survival of MCPyV positive dermal fibroblasts by being phosphorylated and thus to limit viral replication by induction of cell cycle arrest. The observation of MCPyV induced senescence in dermal fibroblasts comes into conflict with the current assumption that dermal fibroblasts are the host cell of MCPyV. Secondly, MCPyV-IS highlights a novel possible role for a tumorigenic microenvironment in the skin which is characterized by the presence of many pro-inflammatory cytokines, growth factors and proteases degrading the extracellular matrix. Secretion of SASP compounds by MCPyV infected fibroblasts might create an inflammatory environment which might be relevant with regard to transformation of the MCC cell of origin.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Merkelzell-Polyomavirus und das Merkelzellkarzinom</b>	<b>1</b>
1.1.1	Entdeckung des Merkelzell-Polyomavirus	1
1.1.2	MCPyV-Epidemiologie	2
1.1.3	MCPyV-Genomaufbau	3
1.1.4	Viraler Lebenszyklus des MCPyV	4
1.1.5	Das Merkelzellkarzinom	6
1.1.6	MCC-Entstehung: Der Beitrag des MCPyV zu der Tumorgenese	9
1.1.7	Modellsysteme für das MCPyV	11
<b>1.2</b>	<b>Wirtsfaktor und Zellzyklusregulator Kap1</b>	<b>12</b>
1.2.1	Proteinstruktur und funktionelle Regulation von Kap1	13
1.2.2	Zellzyklusregulation durch Kap1	15
1.2.3	Die Rolle von Kap1 in der DNA-Schadensantwort	15
1.2.4	Die Rolle von Kap1 für Viren	17
1.2.5	Die Rolle von Kap1 bei der Tumorentstehung	17
<b>1.3</b>	<b>Seneszenz</b>	<b>18</b>
<b>1.4</b>	<b>Ziel dieser Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>21</b>
2.1.1	Chemikalien, kommerzielle Systeme und Verbrauchsmaterialien	21
2.1.2	Geräte und Zubehör	21
2.1.3	Software und Online Ressourcen	21
2.1.4	Plasmide	22
2.1.5	Oligonukleotide	23
2.1.6	Antikörper	25
<b>2.2</b>	<b>Zellkulturtechniken</b>	<b>27</b>
2.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	28
2.2.2	Lagerung eukaryotischer Zellen	29
2.2.3	Transfektionsmethoden	29
2.2.4	Transduktion von Zellen	31
2.2.5	Herstellung von Kap1 <i>knock-out</i> (k.o.) Zelllinien	32

2.2.6	MCPyV-Replikationsassay.....	34
2.2.7	Zellzyklusanalysen in MCPyV-positiven nHDFs.....	35
2.2.8	Proliferationsassays.....	36
<b>2.3</b>	<b>Protein-Techniken.....</b>	<b>36</b>
2.3.1	Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen.....	36
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz.....	37
2.3.3	SDS-PAGE und Westernblot.....	37
2.3.4	Koimmunpräzipitation (Ko-IP).....	39
2.3.5	Immunfluoreszenz.....	41
<b>2.4</b>	<b>DNA-Techniken.....</b>	<b>43</b>
2.4.1	Hitzeschocktransformation und Plasmidisolation.....	43
2.4.2	Quikchange Mutagenese.....	43
2.4.3	Isolierung genomischer DNA (gDNA).....	44
2.4.4	Semi-permissiver Replikationsassay.....	44
2.4.5	Quantitative Echtzeit-PCR.....	45
<b>2.5</b>	<b>RNA-Techniken.....</b>	<b>49</b>
2.5.1	RNA-Isolation mit RNA-Bee.....	49
2.5.2	RNA-Hochdurchsatzsequenzierung (RNA-Seq).....	49
2.5.3	cDNA Synthese.....	50
<b>2.6</b>	<b>Techniken zum Nachweis einer DNA-Protein-Interaktion.....</b>	<b>51</b>
2.6.1	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA).....	51
2.6.2	Chromatin-Immunpräzipitation (Chip).....	53
2.6.3	DNA-Protein-Interaktions ELISA (DPI-ELISA).....	54
<b>2.7</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Identifikation von Kap1 als potenzieller Interaktionspartner des MCPyV LT-Antigens.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2</b>	<b>Bestätigung und Eingrenzung der Interaktion der MCPyV T-Antigene mit Kap1.....</b>	<b>57</b>
<b>3.3</b>	<b>Konsequenzen der Interaktion im viralen Lebenszyklus.....</b>	<b>61</b>
3.3.1	Herstellung von Kap1 k.o. Zelllinien.....	61
3.3.2	Proliferation von Kap1 k.o. Zellen.....	62
3.3.3	Kap1 ist ein Restriktionsfaktor für die MCPyV DNA-Replikation.....	63
3.3.4	Wiedereinführung von Kap1 in Kap1 k.o. Zellen.....	64

3.3.5	Potentielle Mechanismen der Kap1-vermittelten Restriktion der MCPyV DNA-Replikation .....	65
<b>3.4</b>	<b>Differentielle Expression von Wirtsgenen in Abhängigkeit von Kap1 und MCPyV T-Ag .....</b>	<b>71</b>
3.4.1	Regulation Kap1-abhängiger Gene.....	74
3.4.2	Regulation von Genen durch die MCPyV T-Antigene.....	75
3.4.3	Regulation von Genen durch Kap1 und die MCPyV T-Antigene.....	75
<b>3.5</b>	<b>MCPyV-Replikation in primären Fibroblasten und die Konsequenzen für Kap1.....</b>	<b>77</b>
3.5.1	MCPyV-Replikation in der potenziellen Wirtszelle.....	77
3.5.2	Phosphorylierung von Kap1 an Ser824 u. Ser473 in MCPyV-positiven primären Fibroblasten..	79
3.5.3	Keine Phosphorylierung von Kap1 Ser824 und Ser473 durch die Expression der T-Antigene ...	81
3.5.4	Kap1-Phosphorylierung durch MCPyV-Genommutanten.....	84
3.5.5	Phosphorylierung von Kap1 Ser824 erfolgt über ATM.....	84
3.5.6	Hochregulation der p21-Transkripte in MCPyV-positiven Fibroblasten.....	88
3.5.7	Keine signifikante Erhöhung der p21-Transkripte durch die Expression der T-Antigene .....	89
3.5.8	Verringerte Proliferation von MCPyV-positiven primären Fibroblasten .....	89
3.5.9	G2-Arrest in MCPyV-positiven Zellen .....	91
3.5.10	MCPyV-positive primäre Fibroblasten und Seneszenz.....	93
3.5.11	MCPyV T-Antigene und Kap1 regulieren Komponenten des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps.....	94
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>96</b>
<b>4.1</b>	<b>Bestätigung der Interaktion von Kap1 mit den MCPyV-kodierten T-Ag .....</b>	<b>97</b>
<b>4.2</b>	<b>Kap1 limitiert MCPyV-Replikation. ....</b>	<b>98</b>
4.2.1	MCPyV-Zielzelle .....	98
4.2.2	Semi-permissives MCPyV-Replikationssystem .....	98
4.2.3	Proliferationsverhalten von Kap1 k.o. Zellen .....	99
4.2.4	Virale DNA-Replikation ist in Kap1 k.o. Zellen erhöht.....	99
<b>4.3</b>	<b>Phosphorylierung von Kap1 an Ser824 und Ser473 in MCPyV-positiven primären Fibroblasten erfolgt über replikativen Stress, unabhängig von der Expression der T-Ag.....</b>	<b>100</b>
4.3.1	Das MCPyV-Replikationssystem in dermalen Fibroblasten.....	100
4.3.2	Funktionen von Kap1 im normalen Zellzyklus .....	101
4.3.3	DNA-Schadensantwort in MCPyV-positiven Zellen .....	102
4.3.4	Die MCPyV T-Ag induzieren keine Phosphorylierung von Kap1. ....	102
4.3.5	Replikativer Stress induziert die Phosphorylierung von Kap1. ....	103
4.3.6	Konsequenzen der Phosphorylierung für MCPyV-positive Fibroblasten .....	103
4.3.7	Kap1-Phosphorylierung durch andere Viren .....	104

<b>4.4</b>	<b>MCPyV-induzierte Wachstumsinhibition und G2-Arrest .....</b>	<b>104</b>
4.4.1	Wachstumsinhibierende Eigenschaften des LT C-Terminus.....	104
4.4.2	Wachstumsinhibition und Zellzyklusarrest in MCPyV-positiven Fibroblasten .....	105
4.4.3	Die Rolle von Kap1 beim MCPyV-induzierten Zellzyklusarrest .....	105
4.4.4	Additiver Effekt der T-Ag und replikativer Stress.....	106
<b>4.5</b>	<b>G2/M-Zellzyklusarrest im viralen Lebenszyklus von Polyomaviren .....</b>	<b>107</b>
<b>4.6</b>	<b>Modell für die Restriktion der MCPyV DNA-Replikation durch Kap1 .....</b>	<b>108</b>
<b>4.7</b>	<b>Kap1-abhängige und Kap1-unabhängige MCPyV-induzierte Seneszenz.....</b>	<b>111</b>
4.7.1	p21 ist der Initiator der Seneszenz .....	111
4.7.2	Bedeutung von Kap1 bei der MCPyV-induzierten Seneszenz .....	112
<b>4.8</b>	<b>Modell zu der Beteiligung MCPyV-induzierter Seneszenz bei der MCC-Entstehung .....</b>	<b>113</b>
4.8.1	Charakteristiken des Merkelzellkarzinoms.....	113
4.8.2	Die bivalente Rolle zellulärer Seneszenz generell bei Tumorentstehung.....	114
4.8.3	Bedeutung der MCPyV-induzierten Seneszenz bei der MCC-Entstehung.....	115
<b>5</b>	<b>Schlussbetrachtung und Ausblick.....</b>	<b>118</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>144</b>
<b>8</b>	<b>Indices .....</b>	<b>163</b>
8.1	Abbildungen.....	163
8.2	Tabellen.....	164
8.3	Abkürzungen.....	166
<b>9</b>	<b>Publikationen und Präsentationen.....</b>	<b>172</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>173</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>174</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Merkelzell-Polyomavirus und das Merkelzellkarzinom

### 1.1.1 Entdeckung des Merkelzell-Polyomavirus

Das Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) ist eines von 13 humanen Polyomaviren (PyV) (Abbildung 1) und wurde 2008 mithilfe von DTS (*digital transcriptome subtraction*) in Merkelzellkarzinomen gefunden (Feng *et al.*, 2008). Das Merkelzellkarzinom (*Merkel cell carcinoma* (MCC)) ist ein seltener, sehr aggressiver Hauttumor im Menschen, der hauptsächlich in immunsupprimierten und älteren Patienten auftritt (Feng *et al.*, 2008; Ma und Brewer, 2014). Die Sequenz des neu entdeckten Polyomavirus-Genoms zeigte eine hohe Ähnlichkeit mit dem Tumor-Antigen Transkript des Simian B-lymphotropen Polyomavirus (LPV) (*african green monkey polyomavirus*) und des humanen BK-Polyomavirus (BKV) (Feng *et al.*, 2008). Aktuelle phylogenetische Untersuchungen basierend auf der LT-Ag Aminosäuresequenz zeigen (Grundhoff und Fischer, 2015), dass das MCPyV am nächsten mit dem Gorilla, Schimpansen (1, 2a und 2c) und dem Waschbären Polyomavirus verwandt ist (Abbildung 1). Der Name der Familie der *Polyomaviridae* setzt sich aus dem griechischen *poly* (= mehrere) und *-oma* (= Tumor) zusammen. Das transformierende Potential der Polyomaviren wurde erstmals 1953 bei dem murinen Polyomavirus (MPyV) beschrieben, welches in neugeborenen Mäusen viele kleine Tumore auslöste (Gross, 1953). Viele der bisherigen Erkenntnisse zum viralen Lebenszyklus, der DNA-Replikation und Tumorgenese sowie zu weiteren fundamentalen Prozessen von Polyomaviren wurden mittels MPyV oder *simian vacuolating virus 40* (SV40), welches als Verunreinigung des Polioimpfstoffes gefunden wurde (Eddy *et al.*, 1962), erlangt (Fanning, Zhao und Jiang, 2009).

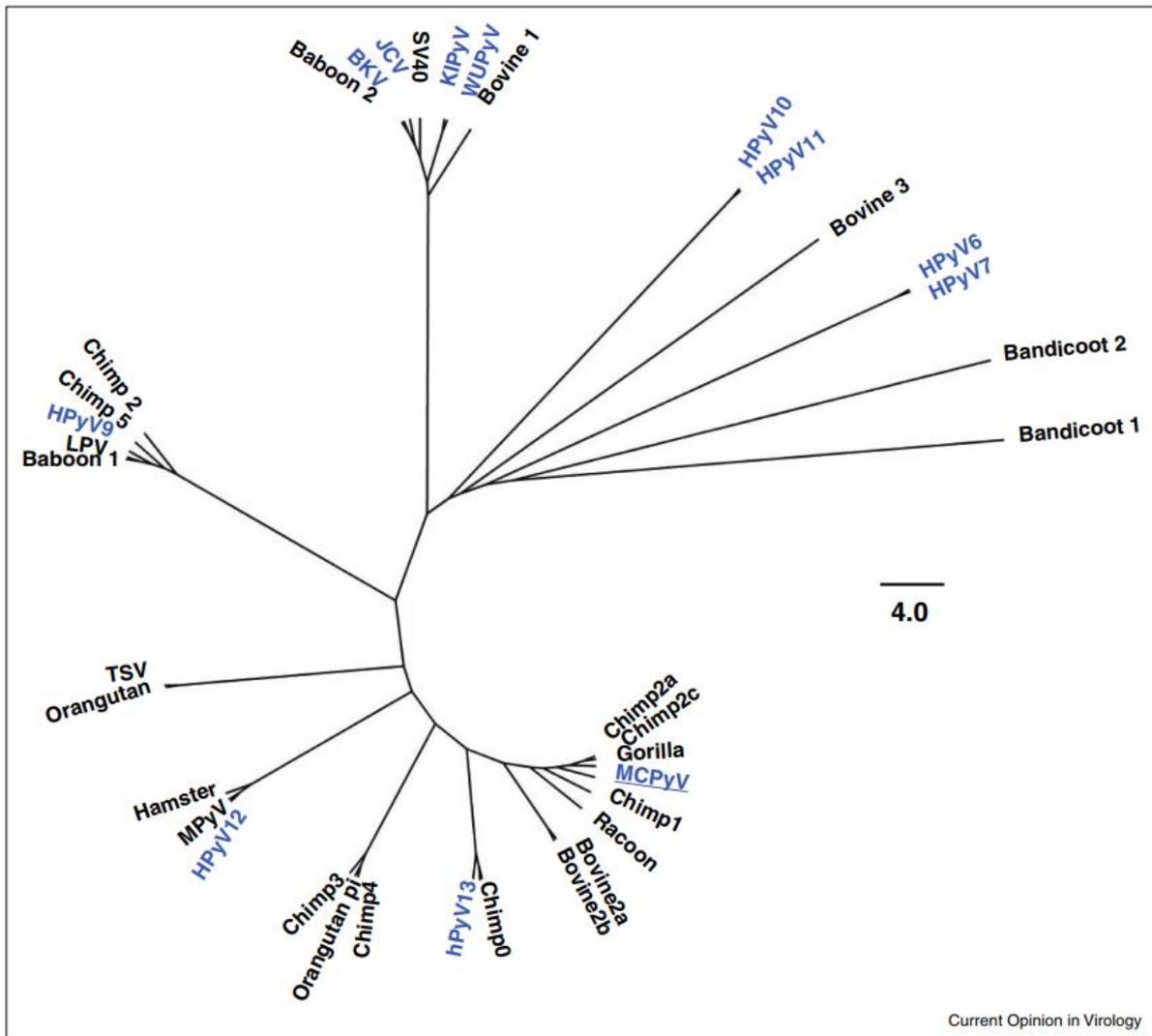


Abbildung 1: **Phylogenetischer Stammbaum humaner und nicht-humaner Polyomaviren.** Stammbaum basiert auf der LT-Ag Aminosäuresequenz und wurde entnommen aus Grundhoff und Fischer (2015). Humane Polyomaviren sind blau hervorgehoben.

### 1.1.2 MCPyV-Epidemiologie

Das Merkelzell-Polyomavirus ist unter den 13 humanen Polyomaviren das einzige, das bisher mit der Tumorgenese im eigenen Wirt assoziiert werden konnte. Wobei aktuellere Studien darauf hinweisen, dass das humane BK-Polyomavirus eine karzinogene Rolle bei einigen Nierenblastomen spielen könnte (Levican *et al.*, 2018; Nিকেleit *et al.*, 2018)

Das vollständige Genom des MCPyV wurde bei ca. 80 % der gesunden Individuen in Hautabstrichen isoliert (Schowalter *et al.*, 2010; Pastrana *et al.*, 2012) und ist somit ein Bestandteil der normalen Hautflora. Die Infektion mit dem MCPyV im immunkompetenten Wirt verläuft asymptomatisch ohne klinische Symptome (Tolstov *et al.*, 2011). Das MCPyV wurde

zusätzlich in etlichen Körpergeweben (zusammengefasst in Spurgeon und Lambert, 2013), im Abwasser und in der Umwelt gefunden (Bofill-Mas *et al.*, 2010; Foulongne *et al.*, 2011), weshalb eine Verbreitung über Schmierinfektionen vermutet wird. In der gesunden Bevölkerung ist das MCPyV ubiquitär, 42-80 % der Erwachsenen haben spezifische Antikörper gegen das virale Kapsidprotein VP1 (Carter *et al.*, 2009; Kean *et al.*, 2009; Pastrana *et al.*, 2009; Tolstov *et al.*, 2009). LT-spezifische Antikörpertiter hingegen wurden nur im geringen Maß in gesunden Individuen detektiert (Paulson *et al.*, 2010, 2017). Die Seropositivität nimmt bei Kleinkindern mit zunehmendem Alter dramatisch zu, was darauf schließen lässt, dass das Virus eine lebenslange Persistenz etabliert (Schowalter *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011).

### 1.1.3 MCPyV-Genomaufbau

Das zirkuläre DNA-Genom des MCPyV hat eine Größe von 5,4 kB und ist in drei Abschnitte unterteilt (Abbildung 2): die frühe Genregion, die für die Tumorantigene kodiert, die späte Genregion, die für die Viruskapside kodiert, und die nicht-kodierende Kontrollregion (NCCR), die den Replikationsursprung und die Promotorelemente enthält. Das doppelsträngige Virusgenom wird von einem unbehüllten, ikosaedrischen Viruskapsid umschlossen.

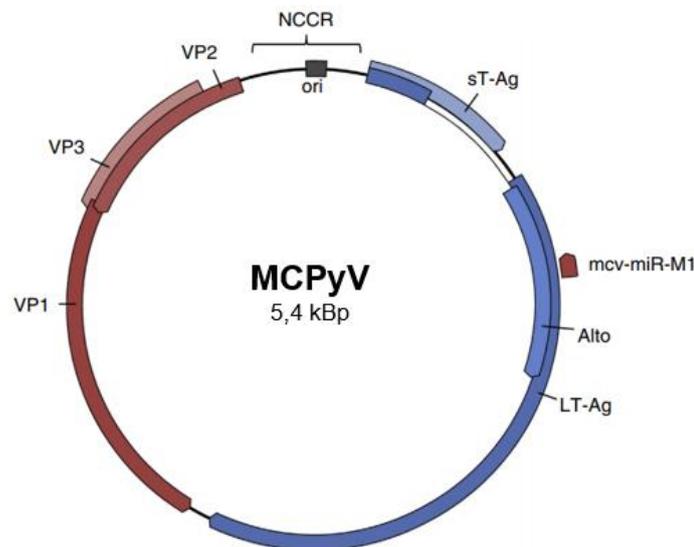


Abbildung 2: **MCPyV Genom.** Die frühe Genregion kodiert für die Tumor-Antigene (blau), während die späte Genregion für die Strukturproteine VP1 und VP2 (rot) kodiert. Die nicht-kodierende Kontrollregion (NCCR) enthält den Replikationsursprung (ori) sowie die Promotorelemente. Antisense zu der frühen Genregion und komplett komplementär zur DNA-Sequenz wird die virale micro-RNA mcv-miR-M1 kodiert. Entnommen und modifiziert aus Grundhoff und Fischer (2015).

Die frühe Genregion kodiert für den T-Ag Lokus, von dem unterschiedliche T-Antigene (T-Ag) exprimiert werden: LT-Ag, sT-Ag, 57kT-Ag und ALTO (*alternate frame of the large T open reading frame*) (Feng *et al.*, 2008; Shuda *et al.*, 2008, 2009; Carter *et al.*, 2013; Theiss *et al.*, 2015). LT-Ag, sT-Ag und das 57kT-Ag entstehen dabei durch alternatives Spleißen (Abbildung 3), während ALTO einen alternativen Leserahmen nutzt. In entgegengesetzter Richtung zu der frühen Genregion und komplett komplementär zur DNA-Sequenz wird die virale micro-RNA mcv-miR-M1 kodiert, welche die frühe virale Genexpression inhibiert (Seo, Chen und Sullivan, 2009; Lee *et al.*, 2011; Theiss *et al.*, 2015).

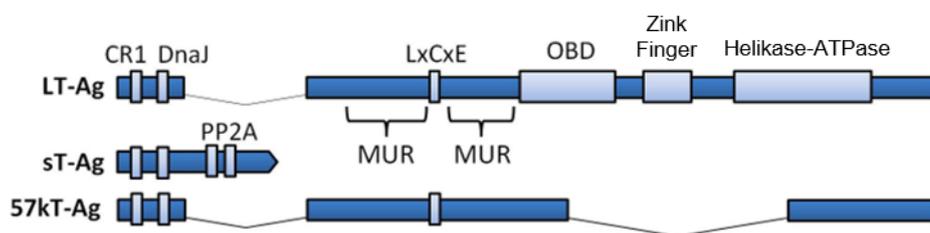


Abbildung 3: **MCPyV T-Ag Lokus.** Die T-Ag Transkripte, LT-Ag, sT-Ag und 57kT-Ag entstehen durch alternatives Spleißen. Alle Spleißprodukte teilen die N-terminale CR1- und DnaJ-Domäne. Das sT-Ag enthält ein PP2A-Bindemotiv, während LT-Ag und 57kT-Ag das Retinoblastombindemotiv (Rb-Bindemotiv) (LxCxE) teilen. Die "*MCPyV unique regions*" (MUR), die das MCPyV LT-Ag von anderen Polyomaviren unterscheidet, umschließt das LxCxE-Motiv. Das LT-Ag besitzt außerdem eine *origin binding domain* (OBD), ein Zinkfingermotiv und eine Helikase-ATPase-Domäne, um virale DNA-Replikation zu initiieren. Entnommen aus J. Theiss, Doktorarbeit, 2015.

#### 1.1.4 Viraler Lebenszyklus des MCPyV

Aufgrund des fehlenden Wissens des natürlichen Reservoirs des MCPyV sowie aufgrund eines nicht vollständig permissiven Zellkultursystems sind viele Aspekte des viralen Lebenszyklus des MCPyV nicht vollständig geklärt. Obwohl 2016 die putative Wirtszelle des MCPyV identifiziert wurde, wird nach wie vor das Reservoir des Virus sowie die initiale Ursprungszelle des Merkelzellkarzinoms diskutiert. In Abschnitt 1.1.5.1 und 1.1.6 werden diese Fragen genauer adressiert.

MCPyV-Partikel werden von der Haut geteilt (Schowalter *et al.*, 2010; Pastrana *et al.*, 2012). Das Virus etabliert vermutlich eine lebenslange Persistenz im immunkompetenten Wirt. Der Eintritt des MCPyV in die Wirtszelle ist größtenteils unverstanden. Derzeit (Stand 2018) wird angenommen, dass neonatale dermale Fibroblasten die Zielzelle des MCPyV in der Haut darstellen (Liu *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu anderen Polyomaviren sind vermutlich Glykosaminoglykane wie Heparan- und Chondroitinsulfat an der Zelloberfläche für die initiale Anheftung des MCPyV an die Wirtszelle verantwortlich (Schowalter, Pastrana und Buck, 2011; Schowalter, Reinhold und

Buck, 2012; Bhattacharjee und Chattaraj, 2017). Für die Aufnahme der Viruspartikel sind außerdem vermutlich die extrazelluläre Matrix und der Gewebekontext entscheidend. So zeigten Liu et al., dass die Infektion von dermalen Fibroblasten durch die Zugabe von Kollagenase I sowie durch die Induzierung von Matrixmetalloproteasen deutlich gesteigert werden konnte (Liu et al., 2016). Mithilfe von Endozytose erfolgt nach der Anheftung der Viruspartikel an die Zelloberfläche zunächst die Umlagerung der Strukturproteine des Viruskapsids im endoplasmatischen Retikulum und die endgültige Kapsidfreisetzung des Genoms ins Zytosol. Das virale Genom wird zum Zweck der DNA-Replikation mithilfe von Importinen in den Zellkern transportiert. Dieser Prozess ist für andere Polyomaviren teilweise beschrieben, jedoch noch nicht für das MCPyV (zusammengefasst in Bhattacharjee und Chattaraj, 2017).

In der frühen Phase der Infektion wird zunächst die frühe Genregion exprimiert. Direkt nach der Entlassung des Genoms aus dem Viruskapsid startet die Genexpression vom chromatisierten Episom (Fields, Knipe und Howley, 2007). Die Expression und Translation des LT-Ags und sT-Ags spielen eine entscheidende Rolle bei der Zellzyklussteuerung und induzieren den S-Phaseneintritt, um virale Replikation zu ermöglichen. Die Bindung des LT-Ags an das Retinoblastom Protein (Rb) über das LxCxE-Motiv führt zur Dysregulation der E2F-abhängigen Transkription und zum Übergang in die S-Phase (Shuda et al., 2008; Sihto et al., 2011; An, Sáenz Robles und Pipas, 2012; Borchert et al., 2014). Das MCPyV sT-Ag induziert die Expression unterschiedlicher, Zellzyklus-regulierender Gene wie *c-myc* und *cyclin E* und verstärkt zum anderen virale DNA-Replikation, indem es das LT-Ag stabilisiert und vor dem proteasomalen Abbau durch den zellulären SCF<sup>Fbw7</sup>-Ligasekomplex schützt (Kwun et al., 2013). Die Polyomavirusreplikation wurde ausführlich für SV40 untersucht (Fanning und Zhao, 2009; Sowd und Fanning, 2012), sodass der virale Lebenszyklus des MCPyV zu großen Teilen abgeleitet werden kann. Das MCPyV LT-Ag bindet mit seiner OBD als doppeltes Hexamer das virale Episom an den 71 Bp großen Replikationsursprung (Ori), um mithilfe der Helikase-ATPase-Domäne die doppelsträngige DNA aufzuwickeln, und die virale DNA-Replikation zu initiieren. Der MCPyV-Ori beinhaltet insgesamt zehn GRGGC-Pentanukleotidsequenzmotive (PS) in unterschiedlicher Orientierung, von denen vier essentiell für die virale Replikation sind (Kwun et al., 2009). Das Lysin (K331) der Aminosäuresequenz des MCPyV LT-Ag ist dabei für die Bindung an diese PS notwendig (Harrison et al., 2011). Für SV40 wurde gezeigt, dass die zwei LT-Hexamere die zelluläre DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase an den Ori rekrutieren, von wo aus durch die Anlagerung des Replikationsprotein A und der Topoisomerase I die Replikation des Episoms bidirektional initiiert wird. Die Elongation der DNA-Synthese erfolgt durch die Rekrutierung der Polymerase  $\delta$ , des PCNAs (Proliferating Cell Nuclear Antigens) und des Replikationsfaktors C. Die

Topoisomerase II trennt nach vollständiger Amplifizierung die beiden zirkulären Tochtermoleküle voneinander (Fanning, Zhao und Jiang, 2009).

Zum späteren Zeitpunkt der Infektion findet die Expression und Translation der späten Strukturproteine (VP1 und VP2) statt. Die Zusammenlagerung der Polyomaviruspartikel erfolgt in der Regel im Zellkern und involviert die Polymerisierung der Kapsidproteine um das replizierte Episom. Die reifen Viruspartikel sammeln sich an der Kernmembran, ihre endgültige Freisetzung ist nicht vollständig verstanden. Für die beiden verwandten humanen Polyomaviren BK und JC sowie für SV40 kommt es zur Virusfreisetzung durch Lyse der Wirtszelle (Fanning, Zhao und Jiang, 2009). Für das MCPyV wurde allerdings noch keine lytische Replikation in dermalen Fibroblasten beobachtet, weshalb weiterhin nicht gesichert ist, dass dieser Zelltyp das natürliche Reservoir des Virus darstellt.

### 1.1.5 Das Merkelzellkarzinom

Das Merkelzellkarzinom (*Merkel cell carcinoma* (MCC)) ist ein seltener aber höchst aggressiver neuroendokriner Hauttumor, der ältere und immunsupprimierte Personen betrifft und sich durch seine hohe Sterblichkeit und hohes Metastasierungspotenzial auszeichnet (Hughes *et al.*, 2014). Das Karzinom ist meist an Körperregionen zu finden, die der Sonnenstrahlung ausgesetzt sind, und hebt sich als rötliche, kuppelartige Auswucherung hervor (Harms *et al.*, 2016) (Abbildung 4). Die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei Patienten, die örtlich begrenzte MCC aufweisen, liegt bei 64%. Die Überlebensrate sinkt jedoch drastisch mit zunehmender Metastasierung auf 39 % bis hin zu 18 % bei globaler Metastasierung (Sarnaik *et al.*, 2010). Die gesamte Mortalitätsrate liegt bei ~ 30 %, was das MCC doppelt so letal macht wie andere bösartige Hautmelanome (Miller und Rabkin, 1999). Der Name des MCCs wurde gewählt, da diese Tumore strukturelle und immunhistochemische Charakteristiken von Merkelzellen aufweisen (zusammengefasst in Tilling und Moll 2012). Aufgrund der Heterogenität von MCC und des postmitotischen Charakters von Merkelzellen, wird inzwischen allerdings ein anderer Ursprung des MCCs vermutet (Abschnitt 1.1.5.1).



Abbildung 4: **Merkelzellkarzinom** (aus Chang and Moore, 2012). Merkelzellkarzinome sind überwiegend an Körperregionen zu finden, die der Sonnenstrahlung ausgesetzt sind. Sie heben sich als rötliche, kuppelartige Auswucherungen hervor (Harms *et al.*, 2016).

In 80 % der MCC liegt das MCPyV monoklonal integriert im Wirtsgenom vor (Feng *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 2009; Duncavage, Zehnbauer und Pfeifer, 2009; Garneski *et al.*, 2009; Bhatia *et al.*, 2010). Primärtumor wie auch die Metastasen zeigen gleiche Integrationsstellen (Feng *et al.*, 2008; Foulongne *et al.*, 2008; Kassem *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 2009; Busam *et al.*, 2009; Garneski *et al.*, Rodig 2009; *et al.*, 2012). In allen MCPyV-Sequenzen, die aus Tumoren isoliert wurden, wurden außerdem Mutationen im LT-Ag Locus gefunden, die das Virus replikationsdefizient zurücklassen und Viruspartikelproduktion verhindern (Kassem *et al.*, 2008; Shuda *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2011). Obwohl sich die Mutationen in den unterschiedlichen Isolaten unterscheiden, erhalten alle die Retinoblastombindestelle, sodass die Zellproliferation durch die Expression des N-Terminus weiterhin stimuliert wird, während der LT-Ag C-Terminus verloren geht (Feng *et al.*, 2008; Borchert *et al.*, 2013). Untersuchungen zeigten, dass MCPyV positive Tumore im Mausmodell sowie davon abgeleitete Zelllinien für ihre weitere Proliferation abhängig von einer kontinuierlichen Expression des verkürzten T-Antigenlokus sind (Shuda *et al.*, 2009; Houben *et al.*, 2010; Rodig *et al.*, 2012). Diese Tatsache, wie auch die monoklonale Integration des Virus in Primärtumor und Metastasen zeigen, dass das MCPyV nachweislich an der Tumorgenese des MCCs beteiligt ist. Auf die bisher verstandenen genaueren Mechanismen der Tumorgenese durch das MCPyV wird in Abschnitt 1.1.6 eingegangen.

Die verbliebenen 20 % der MCC sind MCPyV-negativ (Feng *et al.*, 2008). Exom-Sequenzierung von MCPyV-positiven und MCPyV-negativen MCC zeigte eine hohe Mutationsbelastung in MCPyV-negativen MCC (40 Mutationen/Mb), während MCPyV-positive Karzinome eine 100-fach geringere Mutationsrate zeigten (0,4 -0,75 Mutationen/Mb) (Harms *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2015; Goh *et al.*, 2016). Interessanterweise zeigen die Mutationen der MCPyV-positiven Karzinome eine Signatur, wie sie typischerweise in alternden Organismen auftritt. Im Gegensatz dazu haben MCPyV-negative Karzinome eine starke UV-Signatur (González-Vela *et al.*, 2017). Dies zeigt die unterschiedlichen Entstehungsmechanismen der MCPyV-negativen und positiven Tumore und unterstreicht die Rolle der Expression der MCPyV T-Ag in der Tumorgenese der Virus-positiven Tumore.

Die MCC-Inzidenz in den Vereinigten Staaten von Amerika ist in den letzten Jahren aufgrund verbesserter Diagnostik und dem Bewusstsein für Hauttumore stark angestiegen. Dabei korreliert die Inzidenzrate (0,7 Fälle/100.000 Personen-Jahr) mit dem Alter (Paulson *et al.*, 2018). In Australien ist die Inzidenzrate von MCC aufgrund der hohen UV-Belastung am höchsten (Youlden *et al.*, 2014), der Großteil der Karzinome (~ 70 %) ist MCPyV-negativ und zeigt UV-bedingte Mutationen (Garneski *et al.*, 2009).

Die Standardtherapie für das MCPyV umfasst die chirurgische Entfernung des Primärtumors mit anschließender Bestrahlung des umliegenden Gewebes. Aufgrund der geringen Inzidenz des MCC sind neue Therapieansätze und klinische Studien schwierig umzusetzen. In fortgeschrittenen Stadien des MCCs mit hoher Metastasierung werden zurzeit (Stand 2018) unterschiedliche neuartige Chemotherapien wie zB. der Einsatz von PD-1 Inhibitoren getestet. Dabei wird aktuell in der Behandlung nicht zwischen Virus-positiven und negativen Tumoren unterschieden, da diese gleichartiges Ansprechen auf jegliche Therapien zeigten (Colunga, Pulliam und Nghiem, 2017; Becker *et al.*, 2018; Tello *et al.*, 2018).

#### **1.1.5.1 Ursprung des MCC**

Der Ursprung des MCCs wird kontrovers diskutiert. Die ursprüngliche Annahme, dass Merkelzellen die Ursprungszelle des MCCs darstellen, ist weitestgehend widerlegt (Tilling und Moll, 2012; Sunshine *et al.*, 2018). Stattdessen werden epidermale Stammzellen, dermale Stammzellen oder Vorläufer B-Zellen als Ursprungszelle diskutiert (Visscher *et al.*, 1989; Lemasson *et al.*, 2012; zur Hausen *et al.*, 2013; Sauer *et al.*, 2017). Aktuell wird sogar debattiert, dass MCPyV-positive und MCPyV-negative MCC unterschiedliche Ursprünge in der Haut haben (Sunshine *et al.*, 2018). Angestoßen wurde diese Theorie auf Grundlage von Exom-Sequenzierungen von einer Großzahl von MCC, die feststellten, dass Virus-negative Karzinome vermehrt Mutationen mit einer UV-Signatur aufwiesen im Vergleich zu MCPyV-positiven Karzinomen (Harms *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2015; Goh *et al.*, 2016).

Im Jahr 2016 identifizierten Liu und Kollegen erstmals neonatale dermale Fibroblasten als die putative Wirtszelle des MCPyV, die *in vitro* den Viruseintritt, virale Transkription und Replikation unterstützte. Liu und Kollegen isolierten hierfür humane Haut, in denen sich viele unterschiedliche Hautzelltypen wie epidermale Keratinozyten, dermale Fibroblasten und Merkelzellen befanden. Anschließend infizierten sie diese Zellen mit MCPyV-Partikeln, wobei sie die Aufnahme der Viruspartikel durch die Induktion von Matrixmetalloproteasen über den WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg stimulierten. Mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und zelltypspezifischen Oberflächenmarkern identifizierten sie neonatale dermale Fibroblasten als den Zelltyp, der vom MCPyV infiziert wurde (Liu *et al.*, 2016). Studien unserer Arbeitsgruppe sowie Studien von Denise Galloway, Fred Hutchinson Cancer Research Center, deuten darauf hin, dass neonatale dermale *in vitro* durch die Expression des sT-Ags transformiert werden. Aus diesem Grund ist es vorstellbar, dass neonatale dermale Fibroblasten ebenso die Ursprungszelle der MCPyV-induzierten MCC Pathogenese darstellen könnten. In Zukunft müssen neue Herangehensweisen zeigen, welcher Zelltyp durch das MCPyV tatsächlich transformiert wird.

### 1.1.6 MCC-Entstehung: Der Beitrag des MCPyV zu der Tumorgenes

Immunsupprimierte Patienten mit MCC weisen im Vergleich zur gesunden Bevölkerung erhöhte VP1 und LT-Ag Titer im Blut auf, weshalb angenommen wird, dass eine Reaktivierung des Virus und eine akute Virämie dem Beginn des MCCs vorangeht (Carter *et al.*, 2009). In allen MCPyV-positiven MCC-Isolaten findet man die monoklonale Integration des Virusgenoms in unterschiedlichen Stellen im Wirtsgenom (Feng *et al.*, 2008; Laude *et al.*, 2010). Gleichzeitig findet man immer Mutationen im LT-Ag, was zur Expression eines verkürzten (*truncated*) tLT-Ag führt, das den C-terminalen Bereich verloren hat und somit replikationsdefizient vorliegt (Feng *et al.*, 2008; Shuda *et al.*, 2008, 2009; Fischer *et al.*, 2010; Laude *et al.*, 2010). Die Integration des Genoms und die Mutation im T-Lokus gehen der Tumorgenes somit ebenfalls voran (Abbildung 5). Dabei ist nicht klar, in welcher Reihenfolge diese beiden Ereignisse ablaufen (Chang und Moore, 2012; Grundhoff und Fischer, 2015). Da der Primärtumor wie auch die Metastasen eines Individuums gleiche Integrationsstellen zeigen (Feng *et al.*, 2008; Foulongne *et al.*, 2008; Kassem *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 2009; Busam *et al.*, 2009; Garneski *et al.*, 2009; Rodig *et al.*, 2012), wird angenommen, dass die Integration des Virusgenoms der Tumorentwicklung vorangeht und selektiver Druck den Verlust des LT-Ag C-Terminus und Erhalt des Rb-Bindemotivs herbeiführt.

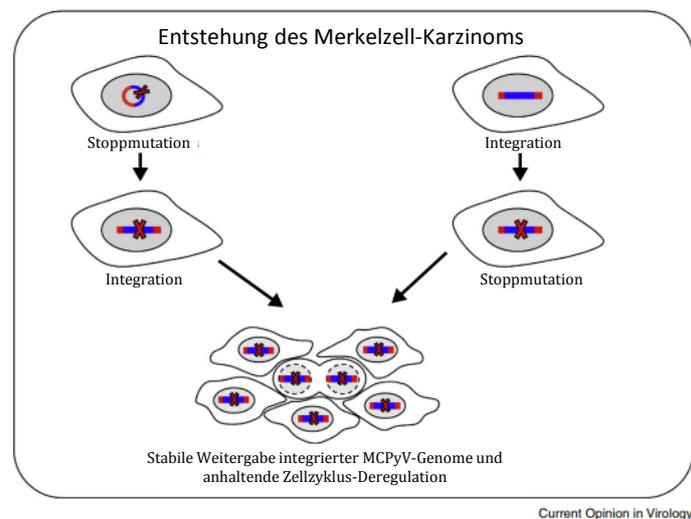


Abbildung 5: **Modelle zur MCC-Entstehung.** Die monoklonale Integration des Virusgenoms ins Wirtsgenom sowie die Mutation im T-Lokus die zum Verlust der Replikation führt, gehen der MCC-Entstehung voran. Die Reihenfolge dieser beiden Ereignisse ist noch nicht genügend aufgeklärt. Entnommen und modifiziert aus Grundhoff und Fischer (2015).

Das transformierende Potenzial der PyV T-Antigene wurde insbesondere für SV40 und MPyV gut untersucht (zusammengefasst in Cheng *et al.*, 2009). Das Rb-Bindemotiv LxCxE im LT-Ag ist in allen PyV-Spezies konserviert (An, Sáenz Robles und Pipas, 2012). Im Vergleich zu seinen verwandten PyV interagiert das volllängen MCPyV LT-Ag nicht direkt mit dem Tumorsuppressor

p53, vielmehr trägt der C-Terminus durch die Aktivierung der DNA-Schadensantwort indirekt zur p53-abhängigen Transkription bei (Li *et al.*, 2013; Borchert *et al.*, 2014). Li *et al.* zeigten, dass die transiente Expression des LT-Ags in U2OS Zellen zu einer Aktivierung der ATR-Kinase (ataxia telangiectasia and rad3 related kinase) und deren Effektor Kinase Chk1 (*checkpoint kinase 1*) führt, was die Phosphorylierung von p53 zur Folge hat. Virale Replikation im semi-permissiven Replikationssystem in U2OS Zellen wiederum führt zusätzlich zur Aktivierung der ATM-Kinase (*ataxia telangiectasia mutated kinase*) und deren Effektor Chk2 (*checkpoint kinase 2*).

Der Volllängen T-Lokus (LT-Ag und sT-Ag) weist kaum Transformationsaktivität in primären Rattenzellen auf, wohingegen das im Tumor verkürzte LT-Ag zusammen mit sT-Ag (tLT-Lokus) in der Lage ist, primäre Baby-Rattenzellen *in vitro* zu transformieren (Borchert *et al.*, 2014). Die Beteiligung des verkürzten LT-Ags zur MCC-Entstehung ist nicht vollständig geklärt. Dass die Expression des verkürzten LT-Ags allerdings essentiell für das Überleben und das Tumorstadium von MCC-Zelllinien *in vitro* und *in vivo* ist, zeigten Houben und Kollegen (2010, 2012). Da alle im Tumor vorkommenden tLT-Varianten die Rb-Bindestelle bewahren und somit das Überleben der MCC sichern, ist das verkürzte LT-Ag wahrscheinlich ebenso bei der Tumorentstehung von Bedeutung (Grundhoff und Fischer, 2015).

In den letzten Jahren zeichnete sich ab, dass das sT-Ag die treibende Kraft bei der Transformation von rat-1 Zellen darstellt (Shuda *et al.*, 2011; Kwun *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu sT-Ag anderer PyV benötigt das MCPyV sT-Ag zur Förderung der Tumorgenese nicht die Interaktion mit der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) (Shuda *et al.*, 2011). sT-Ag interagiert auf zellulärer Ebene mit unterschiedlichen Wirtsfaktoren und trägt somit über unterschiedliche Mechanismen zur Transformation von Zellen bei. MCPyV sT-Ag besitzt eine LT-stabilisierende Domäne (LSD), die durch Bindung die zelluläre Fbw7 Ubiquitinligase und deren Targets c-Myc und Cyclin E inhibiert (Kwun *et al.*, 2013). Fbw7 ist ein entscheidender Bestandteil des Ubiquitinproteasomsystems und reguliert eine Vielzahl von Signalwegen zellulärer Onkoproteine wie z.B. MYC, cyclin E, Notch and JUN (Welcker und Clurman, 2008; Davis, Welcker und Clurman, 2014). Ebenfalls über die Interaktion mit den E3-Ligasen des SCF-Komplexes (Fbw7 und  $\beta$ -TrCP) induziert sT-Ag vermutlich zusätzlich Genominstabilität in Form von Chromosomenbrüchen, überzähligen Zentrosomen und numerischen Chromosomenaberrationen (Aneuploidie) (Kwun *et al.*, 2017). sT-Ag inhibiert außerdem über den mTOR Signalweg den Translationsregulator 4E-BP1. Die daraus resultierende Induktion von Cap-abhängiger Translation trägt vermutlich zur Tumorgenese und Transformation von Zellen bei (Shuda *et al.*, 2011). In Fibroblasten führt die Expression des sT-Ags zu erhöhten Levels von glycolytischen Genen wie MCT1 und induziert einen sogenannten Warburg-Effekt (Berrios *et al.*, 2016). Interessanterweise wird das sT-Ag durch die Interaktion mit dem MYC Homolog MYCL (L-MYC) zum Chromatin-modifizierenden

Komplex EP400 rekrutiert und führt damit zur Aktivierung zellulärer Promotoren (Cheng *et al.*, 2016). Zu guter Letzt zeigen unterschiedliche *in vitro* und *in vivo* Studien in Mausmodellen, dass das MCPyV sT-Ag die treibende Kraft bei der Metastasierung und Zellmotilität von MCC darstellt (Knight *et al.*, 2004; Stakaitytė *et al.*, 2014, 2017, Verhaegen *et al.*, 2014, 2017; Shuda *et al.*, 2015; Knips *et al.*, 2017).

Obwohl die transformierenden Eigenschaften der MCPyV T-Ag *in vitro* gut untersucht sind, bleiben viele Fragen zur Tumorentstehung offen. Im Speziellen müssen zukünftige Untersuchungen beleuchten, welche Wirtszelle tatsächlich ein Reservoir für das MCPyV darstellt und inwieweit persistent infizierte Zellen als Ursprungszelle des MCCs dienen. Ein anderes mögliches Modell geht von der MCC-Entstehung in nicht-permissiven Zellen aus (Grundhoff und Fischer, 2015).

### **1.1.7 Modellsysteme für das MCPyV**

Untersuchungen des viralen Lebenszyklus des MCPyV sind aufgrund eines fehlenden vollständig permissiven Zellsystems und des strengen Wirtstropismus äußerst schwierig. Zu Beginn dieser Arbeit (2015) standen ausschließlich semi-permissive Replikationssysteme in unterschiedlichen Krebszelllinien zur Verfügung (Neumann *et al.*, 2011; Schowalter, Pastrana und Buck, 2011). Ein virales Konsensusgenom (Neumann *et al.*, 2011) wurde dazu in den bakteriellen pMK Vektor über die Restriktionsschnittstelle SacI kloniert und in Bakterien amplifiziert. Das bakterielle Rückgrat wurde durch einen Restriktionsverdau entfernt und das Konsensusgenom religiert. Das MCPyV-Genom wurde mithilfe von DNA-Transfektion in semi-permissive Zellen eingebracht. Von insgesamt 20 getesteten Zelllinien unterstützten lediglich drei Zelllinien (HEK293, H1299 und PFSK-1) virale Genexpression und virale DNA-Replikation. Virale Transmission von viralen Partikeln ließ sich jedoch nicht beobachten.

Für ein umfassendes Verständnis des viralen Lebenszyklus sowie Hinweise auf die Mechanismen MCPyV-abhängiger Transformation und MCC-Entstehung ist ein vollständig permissives System unbedingt erforderlich. Die Entdeckung der putativen Wirtszelle des MCPyV kann in Zukunft zu einem deutlich verbesserten Verständnis beitragen.

Aufgrund des engen Wirtstropismus von humanen Polyomaviren, ist die Etablierung von geeigneten Tiermodellen kompliziert. Dennoch wurde zum einen ein Xenograft-Mausmodell und zum anderen ein transgenes Mausmodell etabliert, in denen vor allem Tumorgenese und MCC-Metastasierung untersucht werden können (Jansen *et al.*, 1999; Schlagbauer-Wadl *et al.*, 2000; Houben *et al.*, 2012; Guastafierro *et al.*, 2013; Spurgeon und Lambert, 2013; Verhaegen *et al.*, 2014; Knips *et al.*, 2017).

## 1.2 Wirtsfaktor und Zellzyklusregulator Kap1

Kap1 (TRIM28 oder auch Tif1- $\beta$  genannt) ist ein 110 kDa großes Protein, welches im Zellkern zu finden und mit Chromatin assoziiert ist. Dieses Protein hat vielfältige Funktionen in der Zelle, weshalb es auch als "*Master Regulator of the Genome*" oder "*KAPtain in charge of multiple missions*" bezeichnet wird (Iyengar und Farnham, 2011; Cheng, Kuo und Ann, 2014).

In Abbildung 6 sind die wichtigsten Funktionen zusammengefasst: Mithilfe seiner Ubiquitinligaseaktivität ist Kap1 an der Inhibierung und dem Abbau des Tumorsuppressors p53 beteiligt, indem es zusammen mit dem p53-Zentralregulator MDM2 zur Destabilisierung und zum proteasomalen Abbau von p53 beiträgt (Wang *et al.*, 2005; Okamoto, Kitabayashi und Taya, 2006). Kap1 ist zudem ein wichtiger Faktor für die epigenetische Stilllegung von endogenen Retroviren und Transposons und trägt somit einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Genomstabilität bei (Wolf und Goff, 2007). Durch die Interaktion mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren und Chromatin-verändernden Proteinen und Komplexen fungiert Kap1 zum einen als kotranskriptioneller Regulator der Genexpression und ist zum anderen an der Abschaltung von weitreichenderen Genregionen beteiligt (Groner *et al.*, 2010). Die Rolle von Kap1 während der DNA-Schadensantwort, während der Regulation des normalen Zellzyklus und der Einfluss auf andere Viren wird in den Abschnitten 1.2.2 bis 1.2.4 genauer erläutert. Aufgrund der zahlreichen Funktionen von Kap1 bei überlebenswichtigen Prozessen in der Zelle wird vermutet, dass Kap1 bei der Entstehung von Krebserkrankungen involviert ist (Abschnitt 1.2.5). So wurde z.B. gezeigt, dass Kap1 zusammen mit anderen Faktoren beim Epithel-zu-Mesenchymal-Übergang beteiligt ist, der mit der Entstehung und Metastasierung von Karzinomen in Verbindung gebracht wird (zusammengefasst in Czerwińska, Mazurek und Wiznerowicz, 2017). Zusätzlich wurde beschrieben, dass Kap1 während der Onkogen-induzierten Seneszenz (OIS) eine Rolle spielt und die Sekretion und Zusammensetzung des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP) reguliert (Santos und Gil, 2014).

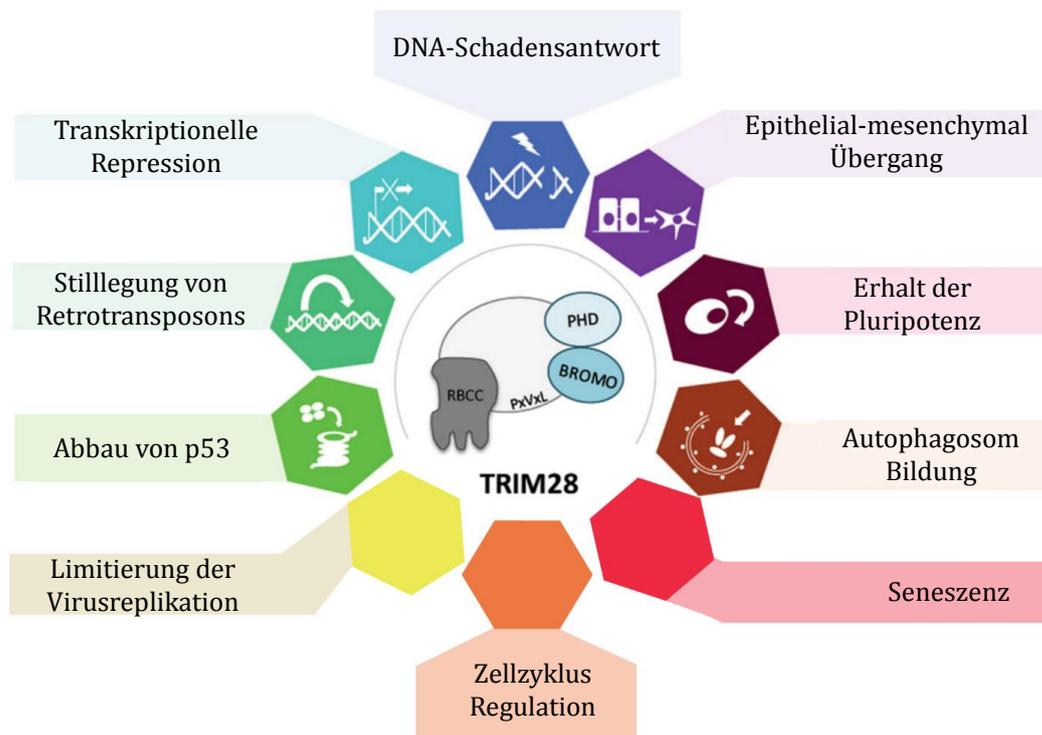


Abbildung 6: **Funktionen von Kap1 (Trim28)**. Die Abbildung wurde aus Czerwińska, Mazurek und Wiznerowicz, 2017 übersetzt und durch weitere für diese Arbeit relevanten Funktionen von Kap1 ergänzt.

### 1.2.1 Proteinstruktur und funktionelle Regulation von Kap1

Kap1 ist ein Protein bestehend aus insgesamt 835 Aminosäuren, welches zur humanen *tripartite motif-containing* (TRIM) Familie gehört (Friedman *et al.*, 1996). Der Name Kap1 ist die Abkürzung für *KRAB-associated protein-1*, weil Kap1 durch die Interaktion mit der KRAB-Repressordomäne identifiziert wurde. Die *Krüppel-associated-box* (KRAB)-Domäne ist in vielen Transkriptionsfaktoren zu finden und ist verantwortlich für transkriptionelle Repression. Die Proteine der TRIM-Familie zeichnen sich durch die sogenannte RBCC-Domäne aus, die sich aus einer RING-Finger Domäne (*Really Interesting New Gene*), zwei B-Boxen und einem Leucizipper mit einer Doppelwendelregion (*leucine zipper coiled-coil region (CC)*) besteht (Abbildung 7). Die RBCC-Domäne ist verantwortlich für die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der KRAB-Zinkfinger (KRAB-ZNFs) Familie. Des Weiteren weist Kap1 eine TRIM spezifische Sequenz (TSS), eine Heterochromatin-Protein 1 Bindedomäne (HP1BD) und eine *Plant Homeo/Bromodomäne* (PHD/BROMO) auf. Während die Interaktion von Kap1 mit dem Heterochromatin-Protein 1 von entscheidender Bedeutung für die transkriptionelle Inhibierung von Genen ist sowie für die Aufrechthaltung des heterochromatischen Zustandes, ist die PHD/BROMO-Domäne für die Rekrutierung diverser Chromatin-verändernder Komplexe entscheidend (Iyengar und Farnham, 2011; Cheng, Kuo und Ann, 2014; Czerwińska, Mazurek und Wiznerowicz, 2017).

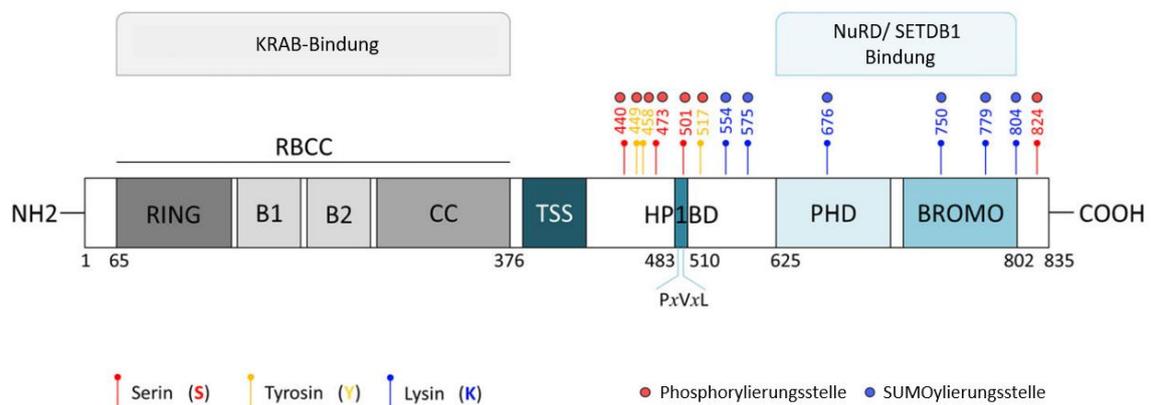


Abbildung 7: **Proteinstruktur und posttranslationale Modifikationen von Kap1.** Kap1 besteht aus einer RING-Domäne, zwei B-Boxen und einem CC Leucin-Zipper mit einer Doppelwendel-Region (RBCC-Domäne), einer TRIM spezifischen Sequenz (TSS), einer Heterochromatin-Protein 1 Bindedomäne (HP1BD) mit dem PxVxL Konsensusmotiv und einer Plant Homeo Domäne/Bromodomäne (PHD/BROMO). Die RING-Finger-Domäne enthält ein C3HC4 Zinkfinger-Motiv, welches wiederholt Zielmoleküle bindet, und gleichzeitig eine intrinsische E3 Ubiquitinligase-Aktivität besitzt. Die B-Boxen vom Typ 1 und Typ 2 stellen ebenfalls Cystein-reiche Zinkfinger-Domänen dar. Die CC-Struktur besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices, die sich gegenseitig umwinden. Die RBCC-Domäne bindet KRAB-Transkriptionsfaktoren. Die PHD-Domäne enthält ein C3HC4 Zinkfinger-Motiv und besitzt eine intrinsische E3-SUMOligase-Aktivität. Die PHD/BROMO-Domäne bindet u.a. den NuRD/SETDB1 Komplex. Die Abbildung wurde von Czerwińska, Mazurek und Wiznerowicz, 2017 übernommen und übersetzt.

Kap1 ist ein multifunktionales Protein, dessen Funktion streng über posttranslationale Modifikationen wie SUMOylierung und Phosphorylierung gesteuert wird. In seiner SUMOylierten Form fungiert Kap1 als kotranskriptioneller Repressor von unterschiedlichen Genen wie *p21*, *gadd45 $\alpha$* , *cyclin A2*, *cdc2* oder *cdc25A* (Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008), wobei Kap1 unterschiedliche Transkriptionsfaktoren (u.a. ZBRK1, E2F1, p53) zur Regulation der Genexpression heranzieht (zusammengefasst in Cheng, Kuo und Ann, 2014). SUMOyliertes Kap1 erhält heterochromatische Strukturen wie z.B. die Besetzung mit H3K9me3 Histonmodifikationen durch die Interaktion und Rekrutierung von Chromatin-verändernden Komplexen (wie HP1, SETDB1, CHD3/ NuRD, N-CoR, HDAC1 oder SMARCAD1) aufrecht (Ivanov *et al.*, 2007; Goodarzi, Kurka und Jeggo, 2011; Garvin *et al.*, 2013; Cheng, Kuo und Ann, 2014).

Im Zuge des Zellzyklus oder bei DNA-Schäden können durch Phosphorylierung von Kap1 (Serin 473 und Serin 824) Promotoren relaxiert werden und heterochromatische Bereiche zum Zweck der DNA-Reparatur vorübergehend geöffnet werden. In seiner phosphorylierten Form wird unter anderem die SUMO-abhängige Interaktion von Kap1 mit CHD3 aufgehoben, was zur Relaxation des Chromatins führt (Goodarzi, Kurka und Jeggo, 2011). Des Weiteren wird die Interaktion mit dem Heterochromatin-Protein 1 (HP1) geschwächt, was die Derepression und Transkription reprimierter Gene zur Folge hat (Chang *et al.*, 2008; Bolderson *et al.*, 2012). Unterschiedliche Phosphorylierungsstellen wurden für Kap1 beschrieben, darunter neben Kubota *et al.*

beschriebenen Phosphorylierungsstellen an Tyrosin 449, 458 und 517 (Kubota *et al.*, 2013), die sehr gut charakterisierten Phosphorylierungsstellen an Serin 824 und Serin 473 (White *et al.*, 2006, 2012; Ziv *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Bolderson *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012).

### **1.2.2 Zellzyklusregulation durch Kap1**

Kap1 wird während des normalen Zellzyklus durch die Protein Kinase C delta an S473 phosphoryliert und aktiviert dadurch zellzyklusregulierende Gene wie *Cdc2*, *Cdc25A* und *CyclinA* (Chang *et al.*, 2008). Kap1 leistet somit einen wichtigen Beitrag bei der normalen Zellproliferation, insbesondere während des G1/S-Zellzyklusübergangs. Die Regulation Kap1-abhängiger Gene erfolgt dabei entweder durch posttranslationale Veränderungen verschiedener globaler Transkriptionsfaktoren wie z.B. p53 oder E2F1 oder durch direkte kotranskriptionelle Repression von Kap1-abhängigen Promotoren. *P21* und *Gadd45α* gehören zu den Genen, für die eine kotranskriptionelle Repression durch Kap1 beschrieben wurde. So wurde gezeigt, dass Kap1 über das KRAB-Zinkfinger Protein ZBRK1 permanent an den Promotor des Zellzyklusregulators *p21* gebunden ist und über den Wechsel von SUMOylierung und Phosphorylierung *p21*-Transkription entweder reprimiert oder aktiviert (Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Einen ganz entscheidenden Einfluss hat Kap1 während der DNA-Schadensantwort und der Wiederaufnahme des Zellzyklus.

### **1.2.3 Die Rolle von Kap1 in der DNA-Schadensantwort**

Während der DNA-Schadensantwort spielt Kap1 hinsichtlich unterschiedlicher Prozesse eine große Rolle. Kap1 ermöglicht die Relaxation von Chromatin, um die Reparatur von DNA-Schäden zu ermöglichen. Kap1 sichert das Überleben der Zelle, indem es DNA-Reparaturmechanismen dem Apoptoseprozess präferiert. Des Weiteren ist Kap1 an der Regulation der Zellzykluskontrollpunkte insofern beteiligt, als dass Kap1 den CDK-Inhibitor *p21* transkriptionell reguliert (Lee *et al.*, 2007).

Studien zeigen, dass Kap1 durch den Wechsel von SUMOylierung und Phosphorylierung während der DNA-Reparatur zur Relaxation von Heterochromatin und zur Behebung von Doppelstrangbrüchen (DSB) beiträgt (Ziv *et al.*, 2006; Goodarzi *et al.*, 2008; Goodarzi, Kurka und Jeggo, 2011). Zum anderen wird vermutet, dass Chromatin-assoziiertes Kap1 einen wichtigen Bestandteil des DNA-Reparaturgerüsts-Aufbaus darstellt, kontextabhängig Bestandteile der DNA-Reparaturmaschinerie rekrutiert und dabei über die Wahl des Reparaturmechanismus entscheidet (Cheng, Kuo und Ann, 2014). Generell wird bei der DNA-Reparatur von DSB zwischen der fehleranfälligeren, nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) und der fehlerfreien, homologen Rekombination (HR) unterschieden. Der genaue Mechanismus wie Kap1 die HR oder

die fehleranfälligeren NHEJ DNA-Reparatur vermittelt ist nicht genau bekannt. Es wird allerdings vermutet, dass die Frequenz und der Phosphorylierungsstatus von Kap1 darüber entscheidet, welcher Reparaturmechanismus bei der Behebung von DSB angewendet wird (Cheng, Kuo und Ann, 2014). Die Assoziation von Kap1 mit Chromatin wird Zellzyklus-abhängig reguliert, wobei es zur Reduktion von Chromatin-assoziiertem Kap1 in der G2-Zellzyklusphase kommt (Beucher *et al.*, 2009; Goodarzi, Noon und Jeggo, 2009). Während phosphoryliertes Kap1 (Ser824) die NHEJ-Reparatur in offenem Euchromatin ermöglicht, erlaubt die dephosphorylierte Form von Kap1 die Reparatur durch HR in kondensiertem Heterochromatin (Noon *et al.*, 2010; Goodarzi, Kurka und Jeggo, 2011; Geuting, Reul und Löbrich, 2013).

Die DNA-Schadensantwort beinhaltet nicht nur die Erkennung und Eliminierung von DNA-Schäden wie Doppelstrangbrüchen (DSB), sondern aktiviert Kontrollpunkte des Zellzyklus, die verhindern, dass der Zellzyklus voranschreitet und geschädigtes Material an die Tochtergenerationen weitergegeben wird. Ein Versagen dieses Prozesses führt zu Mutationen, Genominstabilität und im schlimmsten Fall zur Transformation der Zelle und Tumorgenese (Jackson und Bartek, 2009). Im Fall von DNA-Schäden durch UV-Strahlung oder schädigenden Reagenzien stellt Kap1 einen wichtigen Beitrag zum Überleben der Zelle dar. Die Arretierung des Zellzyklus verhindert, dass die Zelle das Apoptoseprogramm einleitet und verschafft Zeit, um DNA-Schäden zu beheben. Die Inhibierung von Apoptose wird durch Kap1 auf unterschiedliche Weise beeinflusst. Durch die Interaktion von Kap1 mit dem p53-Negativregulator MDM2 trägt Kap1 zu einer p53-Inaktivierung und Inhibition von Apoptose bei (Wang *et al.*, 2005). Zusätzlich erfolgt bei DNA-Schäden die Phosphorylierung von Kap1 an S473 über Chk2, wodurch E2F1-abhängige Aktivierung von Apoptose reduziert wird (Hu *et al.*, 2012).

Durch die Induktion von DNA-Schäden mittels UV-Strahlung oder DNA-Schäden induzierenden Substanzen wie Doxorubicin und Ectoposide kommt es zur Phosphorylierung von Kap1 durch die PI3-Kinasen (ATM, ATR und DNA-PK) (White *et al.*, 2006). Die ATM-abhängige Phosphorylierung von Kap1 an Ser824 führt zur Derepression und Aktivierung der Zellzyklus-abhängigen Gene p21, Gadd45 $\alpha$ , Bax, Puma, und Noxa, was entweder einen temporären Zellzyklusarrest zur Folge hat oder bei sehr starker Schädigung Apoptose induziert (Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007, 2010). Es wurde zudem von Jaiswal *et al.* (2017) gezeigt, dass die Phosphorylierung von Kap1 an Ser824 über die Dauer der DNA-Schadensantwort und des G2-Arrests bestimmt und die Wiederaufnahme des Zellzyklus und der Eintritt in die Mitose über die Dephosphorylierung von Kap1 reguliert wird.

#### 1.2.4 Die Rolle von Kap1 für Viren

Für viele unterschiedliche Viren wurde gezeigt, dass Kap1 virale Expression reprimiert. Für das Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV) und das humane Cytomegalievirus (hCMV) wurde gezeigt, dass Kap1 virale Promotoren bindet und reprimiert (Chang *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014; Rauwel *et al.*, 2015). Zudem wurde für das murine Leukämievirus (MLV), das humane T-lymphotrope Virus (HTLV-1) und das Adeno-assoziierte Virus (AAV) gezeigt, dass Kap1 pro-virale Genaktivierung stilllegt (Wolf und Goff, 2007, 2009; Wolf *et al.*, 2008; Wolf, Hug und Goff, 2008; Smith-Moore *et al.*, 2018). Bei Herpesviren oder dem Adeno-assoziierten Virus, die Latenz etablieren, wurde gezeigt, dass der Wechsel von SUMOyliertem zu phosphoryliertem Kap1 zur Reaktivierung des Virus führt (Chang *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014; Bentz *et al.*, 2015; Rauwel *et al.*, 2015; Li, Burton und Bhaduri-McIntosh, 2017; Smith-Moore *et al.*, 2018).

Es wurde außerdem gezeigt, dass Virusinfektionen zu einer Veränderung des Proteinstatus von Kap1 führen. Im Fall von KSHV bildet die virale Protein Kinase (vPK) einen Komplex mit Kap1, in dessen Folge Kap1 an Serin 824 phosphoryliert und SUMOylierung gehemmt wird (Chang *et al.*, 2009). Weiterhin wird die Phosphorylierung von Kap1 in KSHV-infizierten Endothelzellen an Ser473 durch die zelluläre Kinase MK2 induziert (King, 2013). Im Fall des Epstein-Barr Virus führt die Interaktion mit dem viralen LMP1-Protein zur SUMOylierung von Kap1 (Bentz *et al.*, 2015). Im Laufe einer HAdV-Infektion wird Kap1 deSUMOyliert und gleichzeitig die Phosphorylierung an Ser824 induziert (Bürck *et al.*, 2016).

Zu guter Letzt wurde für das humane Immundefizienz-Virus (HIV) beschrieben, dass Kap1 einen antiviralen Wirtsfaktor darstellt, der die Virus-Infektiosität und Integration ins Wirtsgenom limitiert. Kap1 inhibiert die virale Integrase-Aktivität, indem es zur Deacetylierung der Integrase beiträgt (Allouch *et al.*, 2011).

#### 1.2.5 Die Rolle von Kap1 bei der Tumorentstehung

Die Rolle von Kap1 bei der Tumorentstehung ist komplex und hängt stark vom zellulären Kontext ab (Czerwińska, Mazurek und Wiznerowicz, 2017). Czerwińska *et al.* gehen in ihrem Review detailliert auf unterschiedliche Studien und den tumorfördernden Charakter von Kap1 ein und beleuchten zusätzlich die protektive Rolle von Kap1. Kap1 wird aufgrund seiner diversen Eigenschaften, die zur Zellzyklusregulation, Genomstabilität, Reparatur und Überleben der Zellen beitragen, auch als "*Guardian of the Genome*" oder "*KAPtain in charge of multiple missions*" bezeichnet (Iyengar und Farnham, 2011; Cheng, Kuo und Ann, 2014). Weiterhin spricht die strenge Repression von Retroelementen und hochrepetitiven Regionen durch Kap1 dafür, dass Kap1 einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Genomstabilität liefert (Iyengar und

Farnham, 2011; Mita *et al.*, 2016; Czerwińska, Mazurek und Wiznerowicz, 2017). Ebenso die Tatsache, dass tausende Kap1-Bindestellen im Genom identifiziert wurden, aber nur sehr wenige zelluläre Gene auf einen Kap1 *knock-down* reagierten (Iyengar *et al.*, 2011), unterstreicht die Annahme, dass Kap1 einen großen Beitrag zur Integrität und Reliabilität des Genoms leistet und zweitrangig transkriptionelle Prozesse steuert. Eine Störung oder Missregulation dieses globalen Spielers kann dementsprechend einen Beitrag zu Tumorentstehung leisten, muss experimentell aber genauer belegt werden.

### 1.3 Seneszenz

Als zelluläre Seneszenz wird ein irreversibler Zellzyklusarrest bezeichnet, der mit dem Verlust des Proliferationspotentials von Zellen einhergeht. Zelluläre Seneszenz wurde erstmals in Zusammenhang mit Zellalterung und der limitierten Zellteilungsfähigkeit von humanen Fibroblasten unter Zellkulturbedingungen beschrieben (Hayflick und Moorhead, 1961). Aber auch andere interne und externe Stimuli wie DNA-Schäden, onkogener Stress oder zytotoxische Substanzen können einen seneszenten Phänotyp auslösen (Shay und Roninson, 2004; Carnero *et al.*, 2015). Diverse Charakteristiken wurden für seneszente Zellen beschrieben u.a. abgeflachte Morphologie, Mehrkernbildung, Anhäufung von Zellzyklusinhibitoren wie z.B. *p21* und *p16*, Veränderung des Methyloms, Anhäufung von Seneszenz-assoziierten heterochromatischen Foci (SAHF) sowie Anzeichen von DNA-Schäden (zusammengefasst in Carnero *et al.* 2015). Des Weiteren wurde ein Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp (SASP) beschrieben, der sich durch die Sekretion hauptsächlich entzündlicher Komponenten wie Wachstumsfaktoren, Chemokinen, Zytokinen, Matrixmetalloproteasen und anderen Proteasen auszeichnet (Coppé *et al.*, 2008; Noren Hooten und Evans, 2017; Liu, Ding und Meng, 2018). *P21* und *p16* gelten als die beiden wichtigsten Biomarker für Seneszenz. *p21* ist dabei der Mediator der Seneszenz, während *p16* den seneszenten Phänotyp aufrecht hält (guardian of senescence) (Dimri, 2005). Ein weiterer Biomarker für Seneszenz ist die sogenannte Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidasefärbung (SA- $\beta$ -gal) (Dimri *et al.*, 1995; Itahana, Campisi und Dimri, 2007). Dieser Assay galt als meist verwendeter Marker für Zellalterung, obwohl inzwischen umstritten ist, ob das lysosomale  $\beta$ -Galaktosidase Protein tatsächlich als zuverlässiger Marker für Zellalterung dient (Yang und Hu, 2005; Lee *et al.*, 2011). Vielmehr können auch andere Faktoren zu erhöhter  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität führen, wie z.B. Hungern von Zellen oder Konfluenz. Dennoch gilt die Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidasefärbung als zuverlässige Methode seneszente Zellen zu visualisieren (Nacarelli, Liu und Zhang, 2017). Im Vergleich zu der altersabhängigen Seneszenz wird die Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) durch die Aktivierung von Onkogenen oder die

Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ausgelöst, wobei die beiden wichtigsten intrinsischen Regulatoren dabei p53 und Rb sind (zusammengefasst in X. Liu, Ding, und Meng 2018).

Seneszenz wird gerne als zweischneidiges Schwert beschrieben. Zum einen stellt Seneszenz einen Schutzmechanismus der Zelle dar, die Vermehrung geschädigter Zellen zu verhindern, und von Immunzellen eliminiert zu werden. Zum anderen gibt es inzwischen mehr Evidenz, dass seneszente Zellen Tumorentstehung fördern oder begünstigen (Campisi, 1997; Kang *et al.*, 2011; Lecot *et al.*, 2016). Autokrine und parakrine Effekte tragen zu einem Seneszenz-assoziierten Phänotyp (SASP) bei, die in einem entzündlichen Milieu resultieren (van Deursen, 2014; Lecot *et al.*, 2016; Liu, Ding und Meng, 2018). In der klassischen Tumorbilogie ist schon länger bekannt, dass die Mikroumgebung von wichtiger Bedeutung bei der Entstehung von Tumoren ist (zusammengefasst in M. Wang *et al.* 2017). Die Tumormikroumgebung, die sich u.a. aus der extrazellulärer Matrix, Fibroblasten, Myofibroblasten, neuroendokrinen Zellen, Fettzellen, Immunzellen und Blut- und Lymphgefäßnetzwerken zusammensetzt, schafft ein Milieu aus Wachstumsfaktoren, Chemokinen, Zytokinen und anderen Proteasen, das Tumorwachstum und Entstehung unterstützt (Hanahan und Weinberg, 2011). Die SASP-Komponenten spiegeln die Zusammensetzung der Tumormikroumgebung in großen Teilen wieder. Die Sekretion der SASP-Komponenten kann abhängig vom Kontext unterschiedliche Konsequenzen haben. Seneszenz kann Gewebemöostase und Geweberegeneration stören, zur Zerstörung der extrazellulären Matrix und zu chronischer Gewebsentzündung führen. Schließlich können diese Bestandteile Seneszenz in Nachbarzellen auslösen (zusammengefasst in van Deursen 2014).

## 1.4 Ziel dieser Arbeit

Das MCPyV ist nachweislich an der Entstehung des MCCs beteiligt. Aufgrund eines fehlenden, vollständig permissiven *in vitro* Systems, ist der Lebenszyklus sowie die Tumorgenese durch das MCPyV allerdings weitestgehend unverstanden. Weitere Gründe für das lückenhafte Wissen über die MCC-Entstehung liegt an den kontroversen Modellen hinsichtlich der Ursprungszelle des MCCs. Eine neue Möglichkeit, den viralen Lebenszyklus in physiologischeren Bedingungen zu untersuchen, bot 2016 die Identifikation dermalen Fibroblasten als putative Wirtszelle des MCPyV.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden neue zelluläre Interaktionspartner des MCPyV-kodierten LT-Ags mithilfe eines massenspektrometrischen Ansatzes in PFSK-1 Zellen identifiziert. Der Chromatinmodifizierer und Zellzyklusregulator Kap1 (*KRAB-associated protein 1*) wurde dabei als potenzieller Interaktionspartner des MCPyV LT-Ags identifiziert. Da Kap1 aufgrund seiner vielfältigen Funktionen auch als "*Master Regulator of the Genome*" betitelt wird (Iyengar und Farnham, 2011), können Manipulationen dieses Faktors dramatische Konsequenzen hinsichtlich Tumorgenese für den Wirt haben. Weiterhin wurde für andere DNA-Viren bereits ein Einfluss von Kap1 auf die virale Replikation und der Aufrechterhaltung von Latenz nachgewiesen.

Das Verständnis des viralen Lebenszyklus und des Einflusses der MCPyV-kodierten T-Antigene ist von entscheidender Bedeutung hinsichtlich viraler Transformationsmechanismen und MCC-Entstehung. Ziel der Arbeit war es deshalb, die Interaktion des MCPyV LT-Ag mit dem Wirtsfaktor Kap1 zu bestätigen und diese Interaktion weiter hinsichtlich ihrer Funktion zu charakterisieren. Dabei sollten insbesondere die Konsequenzen dieser Interaktion für das MCPyV, aber auch die Konsequenzen für den Wirt analysiert werden. Darüber hinaus sollte ermittelt werden, inwieweit Kap1 einen Beitrag zur MCC-Entstehung leisten könnte. In diesem Zusammenhang sollte das kürzlich verbesserte *in vitro* Replikationssystem in dermalen Fibroblasten genutzt werden, um essentielle Schritte des viralen Lebenszyklus zu verstehen.

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Chemikalien, kommerzielle Systeme und Verbrauchsmaterialien**

Alle Chemikalien, kommerzielle Systeme und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Herstellern genutzt: 5 Prime, Applied Biosystems, BD Biosciences, Bio Rad, Biozym, Eppendorf, GE Healthcare, Gibco, Gilson, Greiner Bio One, Kimberly Clark, Millipore, NEB, Nunc, Hartenstein, Heraeus, Invitrogen, Kodak, Lonza, LTF Labortechnik GmbH, Merck, Mettler, New Brunswick, New England Biolabs, PAA, PeqLab, Promega, Qiagen, Roche, Roth, Santa Cruz, Sarstedt, Schleicher & Schuell, Schott, Sigma, Stratagene, Thermo Scientific, Whatman und Zymo.

#### **2.1.2 Geräte und Zubehör**

Gerätschaften und Zubehör wurden von folgenden Herstellern verwendet: Agilent, BD Biosciences, BioTek, Eppendorf, Fujifilm, Hartenstein, Heraeus, IKA, Illumina, Kendro, Kodak, Leica, Nikon, Raytest, Sarstedt, Sorvall, Stratagene and Qiagen.

#### **2.1.3 Software und Online Ressourcen**

Für die Datenauswertung und Datenvisualisierung wurden folgende Programme verwendet: Adobe Photoshop CS5.1 (Adobe Systems Inc.), CLC Main Workbench 7 (Qiagen), DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (Huang, Brad T Sherman und Lempicki, 2009; Huang, Brad T. Sherman und Lempicki, 2009), FACSDiva™ (BD), FlowJo™, IGV (Thorvaldsdottir, Robinson und Mesirov, 2013), Ingenuity®-Pathway-Analysis (IPA) Qiagen, Gel Doc XR (Bio Rad), Multigauge (fujifilm), Prism 5 (GraphPad Software), Rotor Gene Q Software (Qiagen).

## 2.1.4 Plasmide

Tabelle 1: Plasmide

Plasmid Name	Vektor	Insert
pSpCas9-GFP-CON	pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) aus dem Zhang Labor (Addgene #48138)	Kontroll sgRNA
pSpCas9-GFP-Kap1-A	pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)	sgRNA gegen Kap1 Exon2
pSpCas9-GFP-Kap1-B	pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)	sgRNA gegen Kap1 Exon2
pMK-MCPyVsyn	pMK (GeneART)	MCPyV Konsensus-Sequenz (Neumann <i>et al.</i> , 2011)
pMK-MCVSyn_Stopp	pMK (GeneART)	MCPyV Konsensus-Sequenz mit einer Stopp-Mutation hinter dem ATG-Codon des T-Lokus
pMK-MCPyVsyn-K331A	pMK (GeneART)	OBD-Bindemutante, replikationsdefizient, (Harrison <i>et al.</i> , 2011), hergestellt von Juliane Theiss
pMK-MCPyVsyn-S816A	pMK (GeneART)	LT-Ag Phosphomutante aus (Li <i>et al.</i> , 2015), hergestellt in dieser Arbeit
pUC18	pUC18 (LifeTechnologies)	Leervektor
pHCMV VSV env R861	phCMV	VSV env
Lenti gag-pol	phCMV	gag-pol
Lenti rev	phCMV	rev
MSCV-N-MCV-LT	MSCV-N	MCPyV LT-Ag ohne Intron, Addgene #32862
MSCV-N-MCV-sT	MSCV-N	MCPyV sT-Ag, Addgene #37861
pCMV-Tag-2B	pCMV-tag2B (Stratagene)	Leervektor
pCMV2B-ER	pCMV-tag2B (Stratagene)	MCPyV frühe T-Region aus MCVSyn
pCMV2B-trunc.ER	pCMV-tag2B (Stratagene)	MCPyV trunkeerte frühe T-Region aus MCCL-12
peYFP-N1	peYFP-N1	Leervektor
YFP-LT-Zn-Stopp	peYFP-N1	YFP-LT-Zn-Stopp; Y529-Stopp
YFP-LT-OBD-Stopp	peYFP-N1	YFP-LT-OBD-Stopp; Y429-Stopp
YFP-trunk-LT	peYFP-N1	YFP-trunk-LT aus MCCL12

P6	XMRV-RBD-PRR	GFP
pcDNA3.1-Kap1	pcDNA3.1	Kap1 ohne N-Terminus; N-terminaler Flag-Tag (Iyengar <i>et al.</i> , 2011)
pcDNA3.1-Kap1 $\Delta$ RBCC	pcDNA3.1	Kap1 ohne N-Terminus und RBCC Domäne; N-terminaler Flag-Tag (Iyengar <i>et al.</i> , 2011)
pcDNA3.1-Kap1 $\Delta$ PB	pcDNA3.1	Kap1 ohne N-Terminus und PB Domäne; N-terminaler Flag-Tag (Iyengar <i>et al.</i> , 2011)
pcDNA3.1-Kap1 $\Delta$ RBCC/PB	pcDNA3.1	Kap1 ohne N-Terminus und RBCC/PB Domäne; N-terminaler Flag-Tag (Iyengar <i>et al.</i> , 2011)
LeGo-iG	LeGo iG	Leervektor mit U6 promoter, SFFV promoter, IRES-eGFP, (Weber <i>et al.</i> , 2008)
LeGo-iC2	LeGo iC2	Leervektor mit SFFV promoter, IHRES-mCherry, (Weber <i>et al.</i> , 2008)
LeGo-iC2-Kap1	LeGo iC2	Kap1 aus pcDNA3.1_Kap1 über EcoRI/NotI
LeGo-iG-LT	LeGo iG	LT-Ag aus pADL MCPyV LT ohne Intron, mutierter Spleiß über NotI, hergestellt von Christina Hartig
LeGo-iC2-sT	LeGo iC2	sT-Ag aus MSCV-N-MCV-sT über EcoRI/NotI; hergestellt von Christina Hartig
pCR2.1-ori	pCR2.1	Minimal Ori 96 Bp (Kwun <i>et al.</i> , 2009) über EcoRI kloniert
pNTAP-MCPyV-ER-SBP	pNTAPB	LT-Ag mit SBP-Tag, frühe Region des MCPyV aus pCMV2B-ER wurde in pNTAPB kloniert über EcoRV und XhoI, hergestellt von Manja Czech-Sioli

### 2.1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Eurofins bezogen. Die Sequenzen der Oligonukleotide und ihre jeweiligen Anwendungen befinden sich in Tabelle 2 bis Tabelle 4.

Tabelle 2: **Primer für qPCR und RT-qPCR**

Name	Sequenz 5'→ 3'	Anwendung
MCPyV_VP1_DNA_fw	AAAACACCCAAAAGGCAATG	Replikationsassay DNA
MCPyV_VP1_DNA_rev	GCAGAGACACTCTTGCCACA	Replikationsassay DNA

GAPDH_fw	TGTGTCCCTCAATATGGTCCTGTC	Replikationsassay DNA
GAPDH_RT_rev	ATGGTGGTGAAGACGCCAGT	Replikationsassay DNA; Transkripte
MCPyV_VP1_fw	AAAACACCCAAAAGGCAATG	Replikationsassay Transkripte
MCPyV_VP1_rev	GCAGAGACACTCTTGCCACA	Replikationsassay Transkripte
MCPyV_LT_BSP_fw	TGATGAGGTTGACGAGGCCCTA	Replikationsassay Transkripte
MCPyV_LT_Dpn_R	AGGTATATCGGGTCCTCTG	Replikationsassay Transkripte
GAPDH_BSP_fw	GGTCGGAGTCAACGGATTTG	Replikationsassay Transkripte
p21_fw	CTTGTACCCTTGTGCCTCGCT	Transkripte
p21_rev	CGGATTAGGGCTTCCTCTTGG	Transkripte
HPRT1_fw	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	Transkripte
HPRT1_rev	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	Transkripte
YWHAZ_fw	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	Transkripte
YWHAZ_rev	CCGCCAGGACAAACCAGTAT	Transkripte
TG_pCR2.1_153fw	AAGTCGTGCTTACCGGGTT	Sanger-Sequenzierung
Random Hexamer	NNNNNN N = A, T, G, oder C RNA	cDNA-Synthese

Tabelle 3: Primer für Quikchange-Mutagenese

Name	Sequenz 5'→ 3'	Anwendung
MCPyV_S816A_fw	CCAAGATTCTGGTACTTTTgCTCAATAA AGGCATCTGCT	Quikchange in pMCVSyn
MCPyV_S816A_fw	AGCAGATGCCTTTATTGAGcAAAAGTA CCAGAATCTTGG	Quikchange in pMCVSyn
LT_S816A_fw	CCAAGATTCTGGTACTTTTgCTCAATAA GACCCAGC	Quikchange in MSCV-N MCV LT
LT_S816A_fw	GCTGGGTCTTATTGAGcAAAAGTACCA GAATCTTGG	Quikchange in MSCV-N MCV LT

Tabelle 4: Oligonukleotide für EMSA und DPI-ELISA

Name	Sequenz 5'→ 3'	Anwendung
ori_1	AATTCAAGTTGGCAGAGGCTTGGGGCT CCTAGCCTCCGAGGCCTCTGAAAAAA AAGAGAGAGGCCTCTGAGGCTTAAGAG GCTTAATTAG	EMSA
ori_2	AATTCTAATTAAGCCTCTTAAGCCTCA GAGGCCTCTCTTTTTTTTCCAGAGGC	EMSA

	CTCGGAGGCTAGGAGCCCCAAGCCTCTG CCAACCTTG	
MCPyV_ori_bio	TAATTAAGCCTCTTAAGCCTCAGAGGC CTCTCTCTTTTTTTTCCAGAGGCCTCGG AGGCTAGGAGCCCCAAGCCTCTGCC	Sonde für DPI-ELISA; 3' BIOTEG
MCPyV_ori_unbio	GGCAGAGGCTTGGGGCTCCTAGCCTCCG AGGCCTCTGGAAAAAAGAGAGAGGC CTCTGAGGCTTAAGAGGCTTAATTA	Sonde für DPI-ELISA
MCPyV_ori_unbio2	TAATTAAGCCTCTTAAGCCTCAGAGGC CTCTCTCTTTTTTTTCCAGAGGCCTCGG AGGCTAGGAGCCCCAAGCCTCTGCC	Sonde für DPI-ELISA, zusammen mit MCPyV_ori_unbio spezifischer Kompetitor
MCPyV_VP1_bio	TGCATAGAGGGCCCACTCCATTCTCATC TAAAAGGACAGTAGTTAGAGTATTACT AAATTGAAGAAGTGTAGGAGTCTGA	Sonde für DPI-ELISA; 3' BIOTEG
MCPyV_VP1_unbio	TCAGACTCCTACAGTTCTTCAATTTAG TAATACTCTAACTACTGTCCTTTTAGA TGAGAATGGAGTGGGCCCTCTATGCA	Sonde für DPI-ELISA
MCPyV_ori_scr_bio	GCTCTCTCGTCACACCTGCATCACCAGG AGACGTGACTGCTCACACCTTGGTATT CTCACACGTCGTATGGTCGTCTATG	Sonde für DPI-ELISA; 3' BIOTEG
MCPyV_ori_scr_unbio	CATAGACGACCATACGACGTGTGAGAA TACCAAGGTGTGAGCAGTCACGTCTCC TGGTGATGCAGGTGTGACGAGAGAGC	Sonde für DPI-ELISA

### 2.1.6 Antikörper

Die Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden, befinden sich in Tabelle 5 und Tabelle 6.

Tabelle 5: Primäre Antikörper

Name	Beschreibung	Anwendung	Hersteller
$\alpha$ -LT	Mouse, monoklonaler $\alpha$ -MCPyV large T-antigen Antikörper (CM2B4): sc-136172	WB, IF, ChIP, EMSA, DPI-ELISA	Santa Cruz
$\alpha$ -sT	Monoklonaler Hybridomüberstand (2T2) von Chris Buck, National Cancer Institute, Bethesda	WB	selbstgemacht
$\alpha$ -Kap1	Rabbit, $\alpha$ -TIF1 $\beta$ Antikörper (H-300): sc-33186	WB	Santa Cruz
$\alpha$ -Kap1	Rabbit, $\alpha$ -KAP1 Antikörper ChIP Grade (ab10483)	ChIP, IF	Abcam

$\alpha$ -Kap1	Mouse, $\alpha$ -KAP1 Antikörper [20C1] - CHIP Grade (ab22553)	WB	Abcam
$\alpha$ -pKap1 Ser824	Rabbit, $\alpha$ -KAP1 (phospho Ser824) Antikörper (ab70369)	WB, IF	Abcam
$\alpha$ -pKap1 Ser473	Rabbit, $\alpha$ -KAP1 (phospho S473) Antikörper (ab133225)	WB, IF	Abcam
$\alpha$ -Aktin	Mouse, anti $\beta$ -Actin Antikörper (C4): sc-47778	WB	Santa Cruz
$\alpha$ -His	Mouse purified $\alpha$ -His Tag, Klon J099B12	WB	BioLegend
$\alpha$ -FLAG <sup>®</sup> M2	Mouse $\alpha$ -FLAG <sup>®</sup> , Klon M2,	WB	Sigma
mIgG	Normal mouse IgG polyklonaler Antikörper (12-371)	EMSA, DPI-ELISA	Merck Millipore
rIgG	Normal rabbit IgG polyklonaler Antikörper (12-370)	ChIP	Merck Millipore

Tabelle 6: **Sekundäre Antikörper**

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ -mouse HRP	goat $\alpha$ -mouse IgG gekoppelt mit Horseradish Peroxidase: sc-2005	WB, DPI-ELISA	Santa Cruz
$\alpha$ -rabbit HRP	goat $\alpha$ -rabbit IgG gekoppelt mit Horseradish Peroxidase: sc-2004	WB	Santa Cruz
$\alpha$ -mouse-A488	Goat $\alpha$ -Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed, Alexa Fluor 488, (A-11001)	IF	Invitrogen, Life Technologies
$\alpha$ -mouse-A555	Goat $\alpha$ -Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed, Alexa Fluor 555, (A-21422)	IF	Invitrogen, Life Technologies
$\alpha$ -rabbit-A488	Goat $\alpha$ -Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed, Alexa Fluor 488, (A-11034)	IF	Invitrogen, Life Technologies
$\alpha$ -rabbit-A555	Goat $\alpha$ -Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed, Alexa Fluor 555, (A-21428)	IF	Invitrogen, Life Technologies
$\alpha$ -rabbit-Cy5	Goat $\alpha$ -Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed, Cyanine5, (A10523)	IF	Invitrogen, Life Technologies

## 2.2 Zellkulturtechniken

In dieser Arbeit wurden die in

Tabelle 7 aufgeführten eukaryotischen Zelllinien verwendet.

Tabelle 7: **Zelllinien**

Name	Beschreibung
HEK293	ATCC No. CRL-1573: Human embryonic kidney cells; adhären; Insertion eines Fragments des Adenovirus Typ 5 Genomes in Chromosom 19, Expression der adenoviralen Proteine E1A und E1B
HEK293 CON	HEK293 Bulk-Population, die mit dem CRISPR Cas9 Kontrollvektor (pSpCas9-GFP-CON) transient transfiziert und sortiert wurde; Vektor ist nach mehreren Zellpassagen nicht mehr enthalten
HEK293 Kap1 k.o.	HEK293 Bulk-Population aus fünf Kap1 k.o. Klonen, die mit dem CRISPR Cas9 (pSpCas9-GFP-Kap1-A oder B) transient transfiziert und sortiert wurden; Vektor ist nach mehreren Zellpassagen nicht mehr enthalten
Lenti-X™ 293T	Clontech Catalog No. 632180, Lenti-X™ 293T Zelllinie, adhären; ein Subklon aus HEK293 Zellen, der stabil SV40 LT-Ag exprimiert; sehr gut transfizierbar, hohe Proteinexpression und lentivirale Titer
H1299	ATCC No. CRL-5803: Human non-small lung carcinoma cell line; adhären; p53 negative; Isolation aus Lymphknoten
H1299 CON	H1299 Bulk-Population, die mit dem CRISPR Cas9 Kontrollvektor (pSpCas9-GFP-CON) transient transfiziert und sortiert wurden; Vektor nach mehreren Zellpassagen nicht mehr enthalten
H1299 Kap1 k.o.	H1299 Bulk-Population aus drei Kap1 k.o. Klonen, die mit dem CRISPR Cas9 (pSpCas9-GFP-Kap1-A oder B) transient transfiziert und sortiert wurden; Vektor nach mehreren Zellpassagen nicht mehr enthalten
PFSK-1	ATCC No. CRL-2060: Human neuroectodermal cell line; adhären; Isolation eines cerebralen Hirntumors
nHDF	Lonza (CC-2509): Neonatale humane dermale Fibroblasten, adhären, Isolation aus neonatalem Präputium ( <i>foreskin</i> ) eines Spenders

Tabelle 8: **Medien und Zusätze**

Name	Medien und Zusätze
HEK293, Lenti-X™ 293T, HEK293 CON, HEK293 Kap1 k.o. und HEK293 Kap1 k.o. + Kap1 wt	DMEM Medium (Dulbecco's Modified Eagle's medium) + Glutamax, 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) Penicillin/ Streptomycin
H1299, H1299 CON und H1299 Kap1 k.o.	DMEM Medium (Dulbecco's Modified Eagle's medium) + Glutamax, 10% (v/v) FBS, 1%(v/v) Penicillin/ Streptomycin
PFSK-1	RPMI 1640 (RosWell Park Memorial Institute Nr.1640 medium), 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) Penicillin/ Streptomycin
nHDF	<i>Fibroblast Growth Medium 2</i> von Promo Cell, 0,02 mL/ mL <i>Fetal Calf Serum</i> , 1 ng/ mL <i>Basic Fibroblast Growth Factor (recombinant human)</i> und 5 µg/ mL <i>Insulin (recombinant human)</i>

### 2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung von eukaryotischen Säugerzellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellkulturmedien sowie deren Zusätze sind in

Tabelle 7 für die unterschiedlichen Zelltypen beschrieben. Die Zellen wurden in Polystyrolzellkulturflaschen oder Schalen bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Das Passagieren von adhärennten Zellen erfolgte durch Waschen der Zellen mit DPBS (Sigma-Aldrich) und das anschließende Ablösen der Zellen vom Gefäßboden durch Trypsin/EDTA (0,25 % Trypsin, EDTA, Thermo Fisher). Beim Passagieren von immortalisierten Zellkulturlinien (wie HEK293, H1299 oder PFSK-1 Zellen) wurde das Trypsin durch die Zugabe von Komplettmedium inaktiviert. Die Zellzahl wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer (Neubauer *improved*, Tiefe 0,1 mm) bestimmt. Die Zellen wurden ohne weitere Waschschrte in neue Kulturgefäße ausgesät. In Tabelle 9 sind die benötigten Zellzahlen für die jeweiligen Kulturgefäße erfasst.

Für die Kultivierung von primären neonatalen, dermalen Fibroblasten (nHDFs) wurde Medium mit speziellen Zusätzen verwendet (Tabelle 8). Um Verunreinigungen wie Seifenrückstände oder Endotoxine zu vermeiden, wurden für primäre Zellen ausschließlich serologische Einweg-Pipetten benutzt. Beim Passagieren primärer Zellen wurde eine Trypsin/EDTA Lösung (0,025 % Trypsin, 0,01 % EDTA, Thermo Fisher) für primäre Zellen verwendet. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte in DPBS mit 10 % (v/v) FBS (Millipore). Diese Zellsuspension wurde bei

300 xg für 4 Min. zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen im gewünschten Volumen aufgenommen und ausgesät.

Tabelle 9: Zellzahlen für unterschiedliche Kulturgefäße

<b>Zellkulturgefäß</b>	<b>Zellzahl</b>	<b>Zellzahl</b>
	<b>Zelllinien</b>	<b>primäre Zellen</b>
96-Well Platte	1x10 <sup>4</sup> /Well	2x10 <sup>3</sup> /Well
24-Well Platte	5x10 <sup>4</sup> /Well	2x10 <sup>4</sup> /Well
6-Well Platte	2-5x10 <sup>5</sup> /Well	1x10 <sup>5</sup> /Well
10 cm Schale	5x10 <sup>6</sup> /Schale	1x10 <sup>6</sup> /Schale

### 2.2.2 Lagerung eukaryotischer Zellen

Zur Langzeitlagerung von Zellen wurden diese wie in 2.2.1 beschrieben abtrysiniert und bei 300 xg, 4 Min. bei Raumtemperatur (RT) pelletiert. Das Medium wurde entfernt und das Zellpellet in FBS mit 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) resuspendiert. In CryoPure-Gefäße wurden die Zellen im Isopropanolbehälter langsam auf -80 °C heruntergekühlt, um Eiskristallbildung zu vermeiden. 24 Stunden später wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um Zellen aus diesem Zustand wieder in Zellkulturbedingungen zu überführen, wurden die CryoPure-Gefäße im 37 °C Wasserbad angewärmt, sodass die äußerste Schicht des Eisstückes auftaute. Die Zellen wurden in DPBS gewaschen und im entsprechenden Medium aufgenommen und ausgebracht. Bei primären nHDFs wurde auf den Waschschrift verzichtet. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um DMSO Rückstände zu entfernen.

### 2.2.3 Transfektionsmethoden

Als Transfektion wird die nicht-virale Einbringung von DNA oder RNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Zur transienten Transfektion von Zellen können chemische Reagenzien oder Elektroporation verwendet werden. Die Einbringung der DNA erfolgt zumeist in Form von zirkulärer Plasmid-DNA. Im Weiteren werden einige dieser Transfektionsmethoden beschrieben.

#### 2.2.3.1 Polyethylenimin (PEI) Transfektion

Polyethylenimin ist ein Polymer, welches sich um die negativ geladene DNA lagert, um die Aufnahme von DNA in die Zelle zu erleichtern. Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vortag in der gewünschten Größenordnung ausgebracht (siehe Tabelle 9 Zellzahlen und Größen). Es wurde dabei eine Konfluenz von 60-80 % erreicht. Für die Transfektion mit Polyethylenimin

wurde zunächst die entsprechende Menge DNA (Tabelle 10) in OptiMEM (Life Technologies) oder DMEM ohne Zusätze vorgelegt. Die 10-fache Menge an PEI (1 mg/mL; Polyscience) wurde anschließend zu dem Transfektionsansatz gegeben und für 25 Min. bei RT inkubiert. Vor der tröpfchenweisen Zugabe des DNA-PEI-Gemisches zu den Zellen wurde das Medium gegen DMEM ohne Zusätze ausgetauscht. Nach 6-24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel zu Vollmedium.

Tabelle 10: **PEI-Transfektion**

<b>Kulturgröße</b>	<b>OptiMEM</b>	<b>DNA</b>	<b>PEI</b>	<b>DMEM ohne Zusätze</b>
24-Well	50 µL	0,5-1 µg	5-10 µL	500 µL
6-Well	100 µL	2 µg	20 µL	2 mL
10 cm Schale	1000 µL	10 µg	100 µL	8 mL

### 2.2.3.2 Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vortag in der gewünschten Größenordnung ausgebracht (siehe Tabelle 9). Es wurde dabei eine Konfluenz von 60-80 % erreicht. DNA-Mengen, Transfektionsreagenz und Transfektionsvolumina wurden der Tabelle 11 entnommen. Die entsprechende Menge Lipofectamin wurde mit DMEM-Medium (ohne Zusätze) vermischt und für 5 Min. bei RT inkubiert, während in einem separaten Ansatz die zu transfizierende DNA mit DMEM Medium (ohne Zusätze) vermischt wurde. Die beiden Ansätze wurden vermengt und für weitere 10 Min. inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit frischem Vollmedium versorgt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise zum frischen Zellmedium gegeben. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel.

Tabelle 11: **Lipofectamine-Transfektion**

<b>Kulturgröße</b>	<b>OptiMEM</b>	<b>DNA</b>	<b>Lipofectamine</b>	<b>DMEM ohne Zusätze</b>
24-Well	50 µL	0,5-1 µg	2 µL	500 µL
6-Well	100 µL	2 µg	10 µL	2 mL

### 2.2.3.3 X-tremeGENE™ DNA-Transfektion

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vortag in der gewünschten Größenordnung ausgebracht (siehe Tabelle 9). Es wurde dabei eine Konfluenz von 60-80 % erreicht. Die zu transfizierende DNA wurde mit DMEM-Medium (ohne Zusätze) vermischt (DNA-Mengen und Transfektionsvolumina siehe Tabelle 12) und die 3-fache Menge an X-tremeGene DNA Transfektionsreagenz dazugegeben. Der Transfektionsansatz wurde für 20 Min. bei RT inkubiert

und anschließend tröpfchenweise zum frischen Zellmedium gegeben. Die Zellen wurden zuvor mit frischem Medium versorgt. Ein Mediumwechsel war nicht notwendig.

Tabelle 12: X-tremeGENE-Transfektion

Kulturgröße	OptiMEM	DNA	X-tremeGENE	DMEM ohne Zusätze
24-Well	50 µL	0,5-1 µg	1,5 µL	500 µL
6-Well	100 µL	2 µg	12 µL	2 mL
10 cm Schale	1000 µL	10 µg	30 µL	8 mL

#### 2.2.3.4 Elektroporation

Bei der Elektroporation wird mithilfe eines elektrischen Pulses die Zellmembran vorübergehend permeabilisiert, was die Aufnahme von Plasmiden in die Zelle begünstigt.

Zur Elektroporation primärer dermaler Fibroblasten (nHDFs) wurde das Neon® Transfection System Kit (Thermo Scientific) verwendet. Hierfür wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in 100 µL Puffer R und 4 µg DNA resuspendiert und ohne Luftblasen in einer 100 µl Neon Spitze aufgenommen. Es erfolgte ein Puls von 1700 V und 20 ms im Neon-Transfection-System. Die Zellen wurden sofort in 1 mL FGM-2 Medium (ohne Antibiotikum) überführt und anschließend mit FGM-2 Fibroblastenmedium (ohne Antibiotikum) aufgefüllt und ausgesät. Um tote Zellen zu entfernen wurde einen Tag nach Elektroporation das Medium gewechselt.

#### 2.2.4 Transduktion von Zellen

##### 2.2.4.1 Herstellung lentiviraler Überstände aus Lenti-X™ 293T Zellen

Zur Herstellung von lentiviralen Überständen wurden  $5 \times 10^6$  Lenti-X™ 293T Zellen in eine 10 cm Schale ausgesät und am Folgetag mithilfe von PEI transfiziert (Abschnitt 2.2.3.1). Hierzu wurden 1 mL OptiMEM mit den Lenti-Verpackungsplasmiden der dritten Generation (10 µg phCMV-gag-pol, 5 µg phCMV-rev, 2 µg phCMV-VSV-G env) zusammen mit 10 µg des jeweiligen lentiviralen Plasmids (LeGo-iG oder LeGo-iC2) und mit 270 µL PEI gemischt. Vor der Zugabe des Transfektionsansatzes wurde das Medium gegen DMEM ohne Zusätze ausgetauscht. Nach acht Stunden wurde das Medium durch 7 mL DMEM + 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) PenStrep und 20 mM HEPES ersetzt. 24 Stunden später wurde das erste Mal der virale Überstand geerntet, steril filtriert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Erzeugerzellen wurden mit 7 mL DMEM + 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) PenStrep und 20 mM HEPES aufgefüllt und nach weiteren 24 Stunden erneut

geerntet. Die LeGo-Plasmide verfügen über fluoreszierenden Selektionsmarker, sodass die Titer der Überstände über Durchflusszytometrie bestimmt wurden.

#### 2.2.4.2 Transduktion von Zellen mit lentiviralen Vektoren

Zur Transduktion der Zielzellen mit lentiviralen Überständen wurden  $2 \times 10^5$  nHDFs in 6-Well ausgeät. Am Folgetag wurde das Medium mit  $8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  Polybrene® versetzt, um die Transduktionseffizienz zu erhöhen, und die Zellen mit  $200 \mu\text{L}$  lentiviralen Überständen transduziert. Nach Zugabe der lentiviralen Partikel wurden die Zellen in den 6-Well Platten für eine Stunde bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $200 \text{ xg}$  zentrifugiert, um die Transduktionseffizienz zusätzlich mithilfe der Gravitationskraft zu verbessern.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen von Polybrene befreit. Weitere 24 bis 48 Stunden später wurden die Zellen mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) entsprechend ihres Fluoreszenzsignals sortiert, um eine homogene Population anzureichern.

#### 2.2.5 Herstellung von Kap1 knock-out (k.o.) Zelllinien

Die Generation von Gen-knock-out Zellen wurde durch die CRISPR-Cas-Technologie revolutioniert. Das CRISPR-Cas System ist ursprünglich ein Bestandteil des Immunsystems verschiedener Bakterien und Archaea und fungiert als adaptive antivirale Abwehr von Bakteriophagen (Sorek et al. 2008, Rath et al. 2015). Die CRISPR-Cas9 Methode wurde erstmals 2012 von Charpentier und Doudna als Werkzeug für RNA-basiertes Genomeditierung in Prokaryoten beschrieben (Jinek et al. 2012). Kurz darauf wurde dieses System als genetisches Werkzeug für eukaryotischen Zellen adaptiert (Zhang 2012). Patentstreite darüber, wer diese richtungsweisende Technologie, welche inzwischen Grundlage für viele weiteren *imaging* und *screening technologies* geworden ist, als erstes beschrieben hat, laufen seither.

In dieser Arbeit wurde der pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) Vektor aus dem Zhang Labor verwendet (Tabelle 1). Das Design der sgRNAs für Kap1 sowie das Design der Kontroll-sgRNA wurde mithilfe des Zhang Protokolls und dem bereitgestellten *CRISPR design tool* durchgeführt (Ran et al., 2013). Die sgRNA Sequenzen inklusive der entsprechenden BbsI-Restriktionsschnittstellen befinden sich in Tabelle 13. Die Oligos wurden 3' phosphoryliert beim Zulieferer Eurofins bestellt.

Tabelle 13: sgRNA Sequenzen für einen CRISPR-Cas9 Gen-knock-out

Zielgen	Oligo-Sequenz
sgRNA_CON_top	CACCgGGGTACATCCGCTCGGAGG

sgRNA_CON_bottom	AAACCCTCCGAGCGGATGTACCCc
sgRNA_Kap1_A_top	CACCgGGAGCGCTTTTCGCCGCCAG
sgRNA_Kap1_A_bottom	AAACCTGGCGGCGAAAAGCGCTCCc
sgRNA_Kap1_B_top	CACCgACTACAGGCCGAGTGCAAAC
sgRNA_Kap1_B_bottom	AAACGTTTGCACCTCGGCCTGTAGTc

### 2.2.5.1 Klonierung der sgRNAs in den CRISPR-Cas9 Vektor

Die Klonierung der Vektoren mit beiden sgRNAs gegen Kap1 oder der Kontroll sgRNA erfolgte in Anlehnung an das Zhang Protokoll (Ran *et al.*, 2013). Der pSpCas-GFP-Vektor wurde mit BbsI über Nacht bei 37 °C verdaut und anschließend über ein säulenbasierte DNA-Aufreinigungsverfahren (Zymo) gereinigt.

Die Oligos wurden zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment zusammengelagert. Hierzu wurden jeweils 1 µL sgRNA top und sgRNA bottom (100 µM) in einem Gesamtvolumen von 10 µL im Thermocycler 5 Min. bei 95 °C aufgeschmolzen, um anschließend schrittweise (5 °C pro Minute) abgekühlt zu werden. 50 ng des BbsI-verdauten Vektors wurden zusammen mit den phosphorylierten und annealten Oligos (1:500) mittels T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) in einem Gesamtvolumen von 20 µL für 1 Std. bei 37 °C ligiert. Nach 10 Min. der Inaktivierung bei 65 °C wurden 5 µL des Ligationsansatzes direkt in *DH5α* kompetente Bakterien durch einen Hitzeschock bei 42 °C transformiert (Abschnitt 2.4.1). Die Überprüfung der Klone erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung (TG\_pCR2.1\_153fw).

### 2.2.5.2 Einzelzellselektion

Zwei Tage nach der Transfektion mit dem Cas9-gRNA-Konstrukt wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie nach GFP-positiven Zellen sortiert und jeweils eine Zelle in ein 96-Well abgelegt (insgesamt 6 Platten). Für die Cas9 Kontroll-gRNA wurden 4 x 1000 Zellen pro 96-Well ausgebracht, um eine gemischte Bulkpopulation zu generieren. Die Einzelzellklone wurden nach 3-5 Wochen mithilfe von SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Westernblot auf ihren Kap1-Proteingehalt getestet. Homozygote Kap1 k.o. Klone wurden hochgezogen und bei -80 °C gelagert. Für weitere Analysen wurden mehrere Einzelzellklone zu einer heterogenen k.o. Population vermengt (siehe Abbildung 11).

## 2.2.6 MCPyV-Replikationsassay

Die MCPyV-Konsensussequenz wurde in einen pMK-Vektor eingefügt, um in Bakterien amplifiziert werden zu können (Neumann *et al.*, 2011). Für die Herstellung des MCPyV-Genoms wurde zunächst das bakterielle Rückgrat durch einen SacI-Restriktionsverdau entfernt und das lineare MCPyV-Genom über eine Agarosegelelektrophorese isoliert und aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Re-Ligation des Genoms und die Transfektion in MCPyV-permissive Zellen. Obwohl die Transfektionseffizienz von Plasmid-DNA in Zellen bei 30-50 % liegt, kommt es in semi-permissiven Zellen nur in 3-5 % der Zellen zur Expression der T-Antigene. Unsere Arbeitsgruppe zeigte kürzlich, dass HEK293, PFSK-1 und H1299 virale DNA-Replikation unterstützen (Neumann *et al.*, 2011). Da allerdings nie eine Neuinfektion der Nachbarzellen durch Viruspartikel beobachtet werden konnte, wurde angenommen, dass diese Krebszelllinien nicht den kompletten Lebenszyklus vom MCPyV unterstützen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass in HEK293 Zellen zwar Viruspartikel im Zytoplasma gebildet werden, diese aber an der inneren Kernmembran zurückgehalten werden.

Zur Untersuchung des Einflusses von Kap1 auf die virale Replikation wurde im semi-permissiven Replikationsassay virale DNA-Replikation in Zellen in An- und in Abwesenheit von Kap1 untersucht. Die zu untersuchenden Zelllinien wurden in 12-Well Platten ausgesät und bei 80 % Konfluenz mit 100 ng religiertem MCPyV-Genom und 250 ng Träger-DNA (pUC18) mithilfe der für den jeweiligen Zelltyp passenden Transfektionsmethode transfiziert (Tabelle 14). Als Transfektionskontrolle wurde separat ein GFP-Kontrollplasmid (XMRV-RBD-PRR) in jede Zelllinie transfiziert (nicht gezeigt). Diese Kontrolle stellte sicher, dass der zu erwartende Phänotyp nicht auf unterschiedliche Transfektionseffizienzen zurückzuführen ist. Zwei, vier und acht Tage nach der Transfektion wurden Zellen zur Isolierung von genomischer DNA oder RNA geerntet (siehe Abschnitt 2.4.4.2 und 2.5.1). An Tag 4 erfolgte üblicherweise ein Hochsplitten der Zellen in 6-Well Platten. Zusätzlich wurden an Tag 2 und Tag 8 nach Transfektion Immunfluoreszenzfärbungen gegen das MCPyV LT-Ag und Kap1 (siehe Abschnitt **Error! Reference source not found.**) vorgenommen.

Tabelle 14: **In vitro** Replikationsassay

Zelllinie	Zellzahl/ Format	Transfektionsmethode
HEK293	9 x 10 <sup>4</sup> / 12-Well	PEI (Abschnitt 2.2.3.129)
H1299	1 x 10 <sup>5</sup> / 12-Well	Lipofectamin (Abschnitt 2.2.3.2)
nHDFs	1 x 10 <sup>6</sup> / 10 cm Schale	Elektroporation (Abschnitt 2.2.3.4)

In der Zwischenzeit wurden durch Liu *et al.*, (2016) dermale Fibroblasten als potenzielle Ursprungszelle des MCPyV identifiziert. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Replikationsassay für permissive Zellen erweitert und die Transfektion des Konsensus MCPyV-Genoms in neonatale dermale Fibroblasten angepasst.

Dermale Fibroblasten wurden abtrypsiniert (Abschnitt 2.2.1) und einmal in PBS gewaschen. Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^6$  Fibroblasten mit 2  $\mu\text{g}$  religiertem, wildtyp bzw. mutiertem MCPyV-Genom oder Kontroll-Plasmid (pUC18) mittels Elektroporation transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.3.4). Ein Tag nach der Transfektion wurde ein Teil der Zellen für die Immunfluoreszenz (Abschnitt 2.3.5), zur Bestimmung des Anteils an MCPyV-positiven Fibroblasten, ausgesät. Im Nachfolgenden wurde in primären Fibroblasten der Einfluss des MCPyV auf die Verteilung der Zellzyklusphasen (Abschnitt 2.2.7), der Einfluss auf das Zellwachstum (Abschnitt 2.2.8.2) und differentielle Expression (Abschnitt 2.4.5.3) sowie der Effekt auf den Phosphorylierungssatus von Kap1 (Abschnitt 2.3.5.2) untersucht.

### **2.2.7 Zellzyklusanalysen in MCPyV-positiven nHDFs**

$1 \times 10^6$  Fibroblasten wurden mit 2  $\mu\text{g}$  religiertem, wildtyp bzw. mutiertem MCPyV-Genom oder Kontroll-Plasmid (pUC18) mittels Elektroporation transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.3.4). Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen abtrypsiniert (siehe Kapitel 2.2.1) und die Hälfte der Zellen direkt weiter kultiviert, um an Tag 4 für Zellzyklusanalysen verwendet zu werden. Die zweite Hälfte der Zellen wurde in PBS gewaschen und in 5 mL 0 °C kaltem 70 % Ethanol über Nacht fixiert. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und anschließend in 50  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer (PBS, 1 % (v/v) FBS, 5 mM EDTA, 25mM Hepes) aufgenommen. Es folgte die Zugabe von RNaseA (Sigma, Endkonzentration 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und die Inkubation für 15 Min. bei 37 °C. Anschließend wurde 200  $\mu\text{L}$  Propidiumiodid-Lösung (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS) dazugegeben und für 10 Min. im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen und in 300  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer aufgenommen. Die DNA-gefärbten Zellen wurden, vor Licht geschützt, am LSRFortessa (BD) bei geringer Fließgeschwindigkeit (maximal 200 Events/ Sek.) im PerCP-Cy5.5 Kanal gemessen. Die Zuordnung in die jeweiligen Zellzyklusphasen erfolgte mithilfe der FlowJo® Software und dem Dean-Jett-Fox Zellzyklus-Algorithmus (Fox, 1980).

## **2.2.8 Proliferationsassays**

### **2.2.8.1 Bestimmung der Zellproliferation der Kap1 k.o. Zelllinien mithilfe des MTT-Assays**

Eine gängige Methode, um Zellproliferation zu bestimmen, ist der MTT-Assay. Er beruht auf der Umsetzung des gelben, wasserlöslichen MTT Farbstoffs (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Hierfür wurden pro Zelllinie sechs Platten mit jeweils 3x 2000 Zellen pro 96-Well (in 100 µL) ausgesät und ein bis sechs Tage bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle 24 Stunden wurde die metabolische Zellaktivität bestimmt. Dazu wurden 10 µL MTT-Lösung in jedes Well gegeben und die Zellen 4 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Durch Zugabe von 100 µL Isopropanol (+ 0,04 % Salzsäure) wurden die blauvioletten Formazan-Salzkristalle aufgelöst und die Färbung wurde am Spektrometer bei 570 nm (Referenz-Wellenlänge 630 nm) bestimmt. Die Intensität der Färbung entspricht der totalen metabolischen Aktivität lebender Zellen und ist somit proportional zur Zellproliferation.

### **2.2.8.2 Bestimmung der Zellproliferation von MCPyV-positiven, dermalen Fibroblasten mithilfe von automatisierter Zellzählung**

Zur Bestimmung der Proliferation von Virus-positiven Fibroblasten im Vergleich zu Virus-negativen Fibroblasten wurden 6 x500 Zellen pro 96-Well ausgesät und 1 - 6 Tage bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle 24 Stunden wurde die Anzahl der Zellen eines Wells mithilfe des TC20™ Automated Cell Counter Systems von Biorad ausgezählt. Durch die Verwendung des Trypanblau-Farbstoffes wurde die Zellzahl von lebenden und toten Zellen bestimmt.

## **2.3 Protein-Techniken**

### **2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen**

Für die Herstellung von Proteinextrakten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, auf Eis gelagert und mithilfe eines Zellschabers abgeschabt. Nach dem Pelletieren der Zellen bei 1200 xg bei 4 °C wurden die Zellen in RIPA-Buffer (50 mM Tris HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP4-0, 0.5% (w/v) Na-Deoxycholat, 5 mM EDTA, 0.1% (w/v) SDS, 1 mM NaF, 2 mM β-Glycerolphosphat, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und cComplete™ Proteaseinhibitorcocktail (Roche)) aufgenommen und resuspendiert. Die Zellmembranen wurden durch mehrmaliges Aufziehen in eine Spritze mit einer Kanüle (0,5x15mm) aufgebrochen. Die RIPA-Extrakte wurden 30 Min. auf Eis inkubiert und anschließend bei 20.000 xg und 4 °C für 20 Min. zentrifugiert, um Zellrückstände zu entfernen. Die Überstände

wurden in neue Gefäße überführt und die Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Reagenz bestimmt (Abschnitt 2.3.2).

Besondere Vorsicht galt dabei bei der Herstellung von Proteinlysaten, die Phosphoproteine enthielten. Für die Proteinanalysen von phosphoryliertem Kap1 wurde zusätzlich PhosSTOP (Sigma-Aldrich) verwendet. Nach dem Waschen der Zellen wurden die Zellen in den Kulturgefäßen auf Trockeneis gestellt. Die Zellen wurden in einem kleinen Volumen (< 150 µL) RIPA-Puffer aufgenommen und resuspendiert.

### **2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des Bradford-Assays (Bradford, 1976). Der im Reagenz enthaltene Coomassie Blue G-250 Farbstoff bindet unspezifisch Proteine, wodurch es zu einer Verschiebung seines Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm kommt. Das Bradford-Reagenz (Bio-Rad) wurde dazu 1:5 in Millipore-Wasser verdünnt und 1 mL in Küvetten vorgelegt. Nach Zugabe des Proteinlysats wurde die Küvette mehrmals invertiert, 5 Min. bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm am Spektralphotometer gemessen. Die Absorption ist dabei direkt proportional zur eingesetzten Proteinmenge. Die absolute Konzentration wurde mithilfe einer BSA-Standardkurve ermittelt. Hierfür wurden 1, 5, 10 und 25 µg BSA eingesetzt. Als Leerwert diente das Bradford-Reagenz ohne Protein. Aus den erhaltenen BSA-Absorptionswerten wurde mittels linearer Regression eine Eichkurve erstellt, die die Berechnung der Konzentration einer unbekanntem Proteinprobe ermöglichte.

### **2.3.3 SDS-PAGE und Westernblot**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen, die es erlaubt, Proteine im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufzutrennen. 25-100 µg Protein wurden mit 4-fach Proteinladepuffer (200 mM Tris-HCl (pH 7,0), 40 % (v/v) Glycerol, 12 % (w/v) SDS, 0,004 % (w/v) Bromophenolblau, 5 % (v/v) β Mercaptoethanol) versetzt und auf 10 oder 12 % Gelen (siehe

Tabelle 15) aufgetragen. 5 µL des farbig markierten Proteinmarkers (Spectra Multicolor Broad Range) wurde als Referenzgröße aufgetragen. Es folgte das Auffüllen der Biorad-Gelvorrichtung mit 1x Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS, (pH. 8,3)). Es wurde für 10 Min. 100 V Spannung angelegt, um die Proben gleichmäßig im Sammelgel zu sammeln. Später wurde die Spannung auf 200 V erhöht, bis die Lauffront des Proteinladepuffers das Ende des Gels erreichte.

Der Westernblot ermöglicht in Kombination mit SDS-PAGE die Identifikation eines Proteins aus einem Proteingemisch durch den Einsatz hochspezifischer Antikörper. Die Proteine wurden dafür auf eine Trägermembran übertragen. Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte über hydrophobe Wechselwirkungen und mithilfe des Semi-Dry-Verfahrens. Das Polyacrylamidgel wurde bei diesem Verfahren zwischen in Puffer getränkten Filterpapieren durch Anlegen eines elektrischen Felds auf die Membran übertragen. Die Reihenfolge der verwendeten Puffer lautete beginnend von unten: 3x Puffer C (25 mM Tris, 25 mM Aminohexansäure, 10 % (v/v) Methanol, (pH 9,4)), SDS-Gel, PVDF-Membran, 1x Puffer B (25 mM Tris, 10 % (v/v) Methanol, (pH 10,4)) und 2x Puffer A (300 mM Tris, 10 % (v/v) Methanol, (pH 10,4)). Die PVDF-Membran wurde vor dem Auflegen in Methanol aktiviert. Der Transfer der Proteine erfolgte pro Gel (ca. 8,5 cm x 6 cm) bei 115 mA für 75 Min. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu vermeiden, wurde die Membran in TBS-Tween (0,05 % (v/v) Tween 20) mit 5 % (w/v) Milchpulver) für 30 Min. geblockt. Die Erst-Antikörper wurden in TBS-Tween mit 5 % (w/v) Milchpulver verdünnt (siehe Tabelle 5) und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurde die Membran dreimal 5 Min. in TBS-Tween gewaschen. Der Sekundärintikörper, der gegen den F<sub>c</sub>-Teil des Primärintikörpers gerichtet und mit der Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, wurde in TBS-Tween mit 5 % (w/v) Milchpulver verdünnt und für 1 Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem, fünfminütigem Waschen in TBS-Tween wurde die Membran mittels Westernblotting-Luminol-Reagenz (Santa Cruz) nach der Herstelleranweisung entwickelt. Die Oxidation des Luminols in der Entwicklerlösung durch die Meerrettichperoxidase führt zur Entstehung von Lumineszenz, die auf Röntgenfilmen festgehalten wird.

Tabelle 15: **Zusammensetzung der Polyacrylamidgele**

Trenngel	Sammelgel
6 - 15 % (v/v) Acryl-Bisacrylamid	5 % (v/v) Acryl-Bisacrylamid
375 mM Tris HCl, (pH 8,8)	125 mM Tris HCl, (pH 6,8)
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) Ammonium Persulfat	0,1 % (w/v) Ammonium Persulfat
0,04 % (v/v) TEMED	0,1 % (v/v) TEMED

### 2.3.3.1 Coomassiefärbung

Zur unspezifischen Färbung der Proteine im Gel wurde die Coomassiefärbung verwendet (Meyer und Lamberts, 1965). Für die Färbung wurde das Gel über Nacht bei RT in Coomassiefärber (50 % (v/v) H<sub>2</sub>O, 40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure (96 %ig), 0,25 % (w/v) Coomassie

Brilliant Blue G-250) auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem Waschschrift in destilliertem Wasser wurde das Gel im Coomassieentfärber (50 % (v/v) H<sub>2</sub>O, 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure (96-prozentig)) bis zur gewünschten Farbintensität entfärbt. Anschließend wurde das Gel in destilliertem Wasser gelagert.

## **2.3.4 Koimmunpräzipitation (Ko-IP)**

### **2.3.4.1 Immunpräzipitation aus Zellen mittels M2-Flag® IP**

Für eine Flag-IP wurden Zellen mit Flag-gekoppelten Expressionskonstrukten transient mit PEI transfiziert. Die entsprechenden Zellzahlen, DNA-Mengen sowie Konstruktkombinationen sind in Tabelle 10 aufgelistet. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Immunpräzipitation mittels M2-FLAG-Kugeln (Sigma-Aldrich).

Zunächst wurden die Zellen mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und ab diesem Schritt auf Eis gehalten. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen in PBS abgeschabt und für 3 Min., 700 xg bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 300 µL Lysis-Puffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 5 mM NaF, 5 mM β-Glycerolphosphat, 0,4 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und cOmplete Proteaseinhibitorcocktail) resuspendiert und die Zellmembranen durch mehrmaliges Ziehen durch eine Kanüle (0,5x15mm) aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 30 µL 10% (v/v) NP-40 zu den Lysaten gegeben, dreimal durch die Kanüle (0,5x15mm) gezogen und 10 Min. auf Eis inkubiert. Vor der Zugabe von 900 µL TN-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-Glycerolphosphat, 0,4 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und cOmplete Proteaseinhibitorcocktail) wurden 50 µL "Inputkontrolle" für Westernblotanalysen abgenommen. Alle Proben wurden für 30 Min. bei 20.000 xg, 4 °C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die M2-FLAG-Kugeln durch dreimaliges Waschen in TN-Waschpuffer vorbereitet. 40 µL Kugeln pro Probe wurden benötigt. Das Waschen der Kugeln erfolgte für 5 Min., 6.000 xg, 4 °C. Die gewaschenen M2-FLAG-Kugeln wurden in einem geringeren Volumen (ca. 50 µL TN-Waschpuffer pro Probe) aufgenommen. An die Agarose ist der monoklonale Mausantikörper gegen M2-FLAG gekoppelt, was es erlaubt, mit dem Flag-Peptid gekoppelte Fusionsproteine zu binden. Der Überstand der Inputkontrollen wurde abgenommen und wurde zur Konzentrationsbestimmung in ein neues Gefäß überführt. Die Konzentration des Proteinlysates wurde mithilfe des Bradford-Assays (Abschnitt 2.3.2) bestimmt. Der Überstand der Lysate wurde ebenfalls in ein neues Gefäß überführt. 1 mg Lysat wurden mit den gewaschenen α-M2-Flag Kugeln für 3 Std. oder über Nacht bei 4 °C rotiert. Die Kugeln wurden mit TN-Waschpuffer fünfmal für 30 Sek. bei 6.000 xg, 4 °C gewaschen. Ab dem vierten Waschvorgang wurden die Kugeln 10 Min. bei 4 °C rotiert. Die Elution der präzipitierten Proteine

erfolgte durch Zugabe von 100 µL Elutionspuffer (1x TBS, 150 ng/µL 3x Flag-Peptid (Sigma)) und 30-minütiger Rotation bei 4 °C. Nach Zentrifugation wurde das Eluat in ein neues Gefäß überführt, mit 4-fach-Probenpuffer versetzt, aufgeköcht und für weitere Analysen auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt.

#### **2.3.4.2 SUMO-IP**

Mithilfe des zellbasierten Assays von Tatham et al. (2009) können SUMOylierte Proteine nachgewiesen werden. Die SUMO-IP wurde in 6His-SUMO2 HeLa-Zellen bzw. parentalen HeLa-Zellen durchgeführt, in denen MCPyV T-Ag transient exprimiert wurden. Unter denaturierenden Bedingungen wurden SUMO-konjugierte Proteine mithilfe von Ni<sup>2+</sup> NTA-Sepharose angereichert. Durch Westernblot Analysen mittels α-Kap1 Antikörper wurde der SUMO-Status von Kap1 bestimmt.

5 x10<sup>6</sup> 6His-SUMO2 HeLa-Zellen bzw. parentalen HeLa-Zellen wurden mit 10 µg MCPyV T-Ag (pCMV2B-ER) oder Leervektor (pCMV2B) mithilfe von PEI transfiziert (Abschnitt 2.2.3.1). Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber in 5 mL PBS abgeschabt. Von einem Fünftel der Zelllösung (1 mL) wurden RIPA-Extrakte für die Inputproben hergestellt (siehe Abschnitt 2.3.1), während die restlichen 4 mL bei 3.000 xg, bei RT herunterzentrifugiert wurden und anschließend in 5 mL Lysispuffer (6 M Guanidinium-HCl, 10 mM Tris, 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 8)) aufgenommen wurden. Alle nachfolgenden Zentrifugations-schritte erfolgten bei RT. Zu dem Lysat wurden 5 mM β-Mercaptoethanol und 5 mM Imidazol gegeben und bei mittlerer Stufe für 30 Sek. (Output 0.6, 0.8 Impulse/Sek.) im gekühlten Wasserbad (Branson Sonifier 450) sonifiziert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 3.000 xg wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Zu dem Lysat wurden 50 µL Ni<sup>2+</sup> NTA-Sepharosekugeln gegeben, die zuvor dreimal in 500 µL Lysispuffer bei 750 xg für 2 Min. gewaschen wurden. Die Proben wurden anschließend über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden bei 750 xg für 2 Min. herunterzentrifugiert und mit 4 mL Waschpuffer I (6 M Guanidinium-HCl, 10 mM Tris, 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 8), 5 mM β-Mercaptoethanol, 0,1 % (v/v) Triton X-100) gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 4 mL Waschpuffer II (8 M Urea, 10 mM Tris (pH 8), 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 8), 5 mM β-Mercaptoethanol, 0,1 % (v/v) Triton X-100), und drei weitere Waschschriffe in 4 mL Waschpuffer III (8 M Urea, 10 mM Tris (pH 6,8), 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,3, 5 mM β-Mercaptoethanol, 0,1 % (v/v) Triton X-100). Die Sepharosekugeln wurden erneut in 1,5 mL Waschpuffer III aufgenommen und in ein 1,5 mL Gefäß überführt. Nach der Zentrifugation bei 6000 xg wurde der Überstand abgenommen und die

präzipitierten Proteine mit 50  $\mu$ L Elutionspuffer (200 mM Imidazol, 5 % (w/v) SDS, 150 mM Tris HCl (pH 6,7), 30 % (v/v) Glycerol, 720 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,0025 % Bromphenolblau) für 20 Min. auf dem Drehrad eluiert. Die Proben wurden bei 17.000 xg für 5 Min. zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

25  $\mu$ g der Inputproben und 25  $\mu$ L der präzipitierten Proteine wurde mit 4-fach-Probenpuffer versetzt, aufgekocht und in einem 10 % SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Mithilfe eines  $\alpha$ -Kap1 Antikörpers wurde SUMOyliertes Kap1 nachgewiesen (Abschnitt 2.3.3).

## **2.3.5 Immunfluoreszenz**

### **2.3.5.1 Immunfluoreszenzfärbung**

4 x10<sup>4</sup> Zellen (nHDFs) wurden auf mit Gelatine beschichteten Deckgläschen im 24-Well ausgesät. Zwei, vier und acht Tage nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit TBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd (in TBS) für 20-30 Min. fixiert. Dabei wurden zum einen Pathogene unschädlich gemacht, zum anderen blieben dabei zelluläre Strukturen wie zum Zeitpunkt der Fixierung erhalten. Nach dreimaligem Waschen (in TBS) wurden die Zellmembranen für 10 Min. im Permeabilisierungspuffer (1x PBS, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) Natriumcitrat) permeabilisiert. Nach erneutem Waschen erfolgte das Blocken der Zellen im Blockpuffer (1x PBS, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,5 % (v/v) Tween 20, 3 % (w/v) BSA Albumin Fraktion) für mindestens 30 Min., wodurch unspezifische Bindungen des Erst- oder Zweitantikörpers minimiert wurden. Die Zellen wurden mit den Erstantikörpern im Blockpuffer (Tabelle 5, 1:500 bis 1:1000) für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen folgte die Inkubation mit den Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpern (Life Technologies, Tabelle 6, 1:2000) für eine Stunde in abgedunkelter Umgebung. Ein finaler Waschschrift wurde durchgeführt, bevor die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf einem Glas-Objektträger mit VECTASHIELD Antifade Mounting Medium mit DAPI eingedeckelt wurden. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurden die Ränder des Deckgläschens mit Klarlack versiegelt.

### **2.3.5.2 Konfokale Mikroskopie und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen**

Die Auswertung und Aufnahme der Zellen erfolgte am konfokalen Spinning-Disk-Mikroskop von Nikon unter Verwendung eines 20er Luftobjektives (nicht-konfokal) und eines 100er Immersionsobjektives. Hierbei wurde von den Zellen ein 3D-Stapel von drei bis fünf Ebenen aufgenommen und mithilfe der Fiji-Software eine maximale Intensitätsprojektion

erzeugt. Die Größenmarkierungen wurden ebenfalls mit der Fiji-Software erzeugt. Die Bilder jeder Abbildung zeigen die gleiche Helligkeit und Kontraste.

### **2.3.5.3 Quantifizierung der Immunfluoreszenz**

Zur Quantifizierung des Kap1-Phosphorylierungssignals in MCPyV-positiven Zellen wurde das Spinning-Disk-Mikroskop von Nikon mit dem 20er Luftobjektives verwendet. Aus den hieraus entstandenen Übersichtsbildern wurden die Zellkerne aller MCPyV-positiven Zellen mithilfe der Kernfärbung von der Fiji-Software erfasst und die "durchschnittliche Intensität" des Kap1-Phosphorylierungssignals bestimmt.

### **2.3.5.4 Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galaktosidasefärbung**

Die Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidasefärbung ist zusammen mit anderen Markern ein Biomarker für Seneszenz (Dimri et al., 1995). Die Färbung beruht darauf, dass seneszente Zellen lysosomale  $\beta$ -Galaktosidase anhäufen, welche im Assay bei einem pH von 6,0 das chromogene Substrat X-Gal spaltet, wodurch ein blaues Präzipitat entsteht. Das Färbeprotokoll wurde nach Itahana, Campisi, und Dimri (2007) angepasst. Für diese Färbung wurden dermale Fibroblasten mit Kontroll-DNA oder religiertem MCPyV-Genom transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.6) und kultiviert ohne Konfluenz zu erreichen. Am neunten Tag wurden die Zellen im 24-Well Format auf Glas-Coverslips zu einer Konfluenz von 50 % ausgesät. Bei dieser Färbung ist es entscheidend, dass die Zellen nicht konfluent werden, da insbesondere Fibroblasten mit zunehmender Konfluenz seneszent werden können. Am Folgetag wurden die Zellen für 3 Min. mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in TBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden die Zellen mit der gelben X-Gal-Färbelösung (1 mg/mL X-Gal, 1x Natriumphosphatpuffer (pH 6,0), 5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(III), 5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(II), 150 mM NaCl und 2 mM  $MgCl_2$ ) über Nacht bei 37 °C ohne  $CO_2$  inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung abgenommen und die Zellen zwei Mal in TBS-T gewaschen. Dem Protokoll folgte anschließend eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem  $\alpha$ -LT Antikörper, um MCPyV-positive Zellen zu identifizieren. Es folgte die Permeabilisierung der Zellen für 10 Min. in Permeabilisierungspuffer. Nach erneutem Waschen erfolgte das Blocken der Zellen in Blockpuffer für mindestens 30 Min. Die Erst- und Zweitantikörperfärbung erfolgte wie in Abschnitt 2.3.5.2 beschrieben. Die Visualisierung der  $\beta$ -Galactosidasefärbung erfolgte mittels Hellfeldmikroskopie in Kombination mit Fluoreszenzmikroskopie.

## 2.4 DNA-Techniken

### 2.4.1 Hitzeschocktransformation und Plasmidisolation

*DH5α* kompetente Bakterien wurden mit ca. 1 µg Plasmid-DNA 30 Min. auf Eis inkubiert. Die Hitzeschocktransformation erfolgte für 45 Sek. im 42 °C temperierten Wasserbad. Die Bakterien wurden ohne Verzögerung für 5 Min. auf Eis inkubiert, mit 500 µL LB Medium aufgefüllt und für eine Stunde bei 37 °C im Inkubationsschüttler geschüttelt. Lentivirale Vektoren (wie die LeGo-Vektoren) wurden grundsätzlich bei 30 °C inkubiert, um Rekombinationen zu verhindern, während alle anderen Plasmide bei 37 °C wuchsen. Die Plasmidisolation wurde mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit durchgeführt. DNA-Konzentrationen wurden am NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer bestimmt.

### 2.4.2 Quikchange Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese ermöglicht es, eine oder mehrere gerichtete Punktmutationen in Plasmide einzubringen. Diese Oligo-gerichtete Mutagenese wird über PCR in den Vektor eingefügt und über weitere Zyklen amplifiziert. Die beiden kurzen Oligos enthalten die gewünschte Mutation und sind komplementär zu der DNA-Template Sequenz. Die Primer sollten dafür eine Länge von 30-40 Nukleotiden besitzen und die komplementären Überhänge rechts und links von der gewünschten Mutation sollten ähnlich lang sein. Zudem sollte der GC-Gehalt der Oligos über 40 % liegen und mit einem G oder C-Nukleotid enden. Es erfolgte eine PCR mit der *Pfu proof reading polymerase* (PfuUltra II HS DNA polymerase, Agilent) (Tabelle 16 und

Tabelle 17). Anschließend wurde der PCR-Ansatz über ein säulenbasiertes Verfahren (Zymo) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym DpnI (Fast Digest, Thermo Scientific) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, um die Template-DNA abzubauen. Der Restriktionsverdau wurde erneut mittels säulenbasiertem Verfahren aufgereinigt und in *DH5α* kompetente Bakterien transformiert (Abschnitt 2.4.1).

Tabelle 16: **Quikchange Mutagenese mit PfuUltra II HS DNA Polymerase**

Reagenz	Menge
zehnfach PfuUltra II Puffer	2 µL
dNTPs (10 mM)	0,5 µL
Primer fw (10 µM)	0,5 µL
Primer rev (10 µM)	0,5 µL
Template (50 ng Plasmid DNA)	1 µL

PfuUltra II HS DNA polymerase	0,5 µL
H <sub>2</sub> O	15 µL

Tabelle 17: PCR-Bedingungen für Quikchange-Mutagenese

Zyklusanzahl	Temperatur	Zeit
1	95 °C	5 Min.
18	95 °C	50 Sek.
	60 °C	50 Sek.
	68 °C	11 Min. (1 Min. pro kB)
1	68 °C	10 Min.

### 2.4.3 Isolierung genomischer DNA (gDNA)

Ein Zellpellet von  $1 \times 10^6$  Zellen wurde in 400 µL gDNA-Puffer (10 mM Tris HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % (w/v) SDS), der mit 50 µg/µL RNaseA (Sigma) und 100 µg/µL Proteinase K (PeqLab) versetzt wurde, resuspendiert und für eine Stunde bei 37 °C und anschließend über Nacht bei 50 °C inkubiert. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Fällung mittels 5PRIME Phase Lock Gel Gefäßen. Hierzu wurde die Lösung in Phase Lock Gefäße überführt und 400 µL Phenol-Chloroform (PCI: Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1) von Roth) dazugegeben. Das Gefäß wurde anschließend für 3 Sek. unter Verwendung eines Vortex gemischt und bei 18.000 xg bei 4 °C für 3 Min. zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 400 µL PCI und anschließend mit 400 µL Chloroform (Roth) wiederholt. Die wässrige Phase oberhalb des Gels wurde abgenommen ohne dabei die Gelmatrix zu berühren. Die DNA wurde mit 0,8-fachen Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M) für 20 Min. bei RT präzipitiert. Die DNA wurde 30 Min. bei 20.000 xg, 4 °C pelletiert und einmal mit 500 µL 70%-igen Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 50 µL Wasser aufgenommen.

### 2.4.4 Semi-permissiver Replikationsassay

#### 2.4.4.1 Herstellung des viralen Genoms

Das bakterielle Rückgrat im pMK-MCPyVsyn Plasmid, welches sich in der MCPyV frühen Region befindet, wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym SacI (Fast Digest, Thermo Scientific) herausgeschnitten. Das lineare MCPyV-Genom besitzt eine Größe von 5,4 kB und wurde über eine

Agarosegelelektrophorese isoliert und mithilfe eines Gel-DNA-Rückgewinnungskits (Zymo) aufgereinigt. Die Religation des Genoms erfolgte in einem Volumen von 500 µL und unter Einsatz der T4 DNA-Ligase (NEB) über Nacht bei 16 °C. Die Ligation wurde anschließend über Zymoclean-Säulen nach Herstellerangaben aufgereinigt und in DEPC Wasser eluiert. Die Transfektion der DNA erfolgte in semi-permissive (siehe Abschnitt 2.2.6).

#### **2.4.4.2 DNA-Isolierung und Aufreinigung**

Zur Messung viraler Genomkopien wurde aus einem Zellpellet zunächst genomische DNA isoliert (Abschnitt 2.4.3). Um neu replizierte MCPyV-DNA von transfizierter DNA zu unterscheiden, wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. DpnI ist ein methylierungssensitives Restriktionsenzym, was ausschließlich – die aus Bakterien stammende – methylierte DNA schneidet. Das Verdauen der DNA mit EcoRI führt zu einer Linearisierung der MCPyV-DNA, was wichtig für Southernblotanalysen ist. Die DNA wurde mit dreifachem Volumen Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M) für mindestens drei Stunden bei -80 °C präzipitiert. Die DNA wurde 30 Min. bei 20.000 xg, 4°C pelletiert, einmal mit 500 µL 70%-igem Ethanol gewaschen und das DNA-Pellet nach der Trocknung in 50 µL Wasser aufgenommen. Die isolierte DNA kann mithilfe von Southernblot (Vergleich Neumann et al. 2011) oder quantitativer PCR (qPCR) analysiert werden. Die aufgereinigte, DpnI- und EcoRI-verdaute DNA wurde auf eine Konzentration von 25 ng/µL eingestellt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am NanoDrop™ 1000 Spektralphotometer. Die Quantifizierung der Genomkopien mittels quantitativer PCR ist in Abschnitt 2.4.5.2 genauer erläutert.

#### **2.4.5 Quantitative Echtzeit-PCR**

Die Echtzeit-PCR ist eine Erweiterung der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion, die es mithilfe eines fluoreszierenden, interkalierenden Farbstoffs ermöglicht, PCR-Produkte in Echtzeit zu quantifizieren. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge des PCR-Produkts zu. qPCR Primer (Tabelle 2) wurden für 80-300 Nukleotid große PCR-Produkte entworfen und vorher auf ihre Spezifität und Effizienz überprüft. Standardkurven von sechs log-Stufen wurden angefertigt, wobei nur Primerpaare verwendet wurden, die eine Primer-Effizienz zwischen 0,9 -1,1 aufwiesen. Zusätzlich wurden die Primerpaare einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen. Die Spezifität wurde außerdem durch Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte bestätigt.

### 2.4.5.1 qPCR mit SYBR Green

In dieser Arbeit wurde SYBR™ Green als Farbstoff verwendet. SYBR™ Green bindet doppelsträngige DNA und emittiert dabei grünes Licht bei  $\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$ . Die Zusammensetzung der PCR-Reaktion ist in Tabelle 18 aufgezeigt. Für jedes Primerpaar wurde ein Standardwert aus der zuvor erstellten Standardkurve, sowie eine Wasserkontrolle mitgeführt, um verschiedene PCR-Läufe miteinander vergleichen zu können.

Tabelle 18: SYBR™ Green qPCR Ansatz (10µL)

Reagenz	Menge
2x SensiMix SYBR Hi-Rox Mastermix (Bioline)	5 µL
Primer fw + Primer rev (je 10 µM)	0,3 µL
Template (e.g. cDNA, gDNA, ChIP-DNA)	1,5 µL
H <sub>2</sub> O	3,2 µL

Die qPCR wurde im Rotor-Gene Q Realtime Zyklor (Qiagen) unter in Tabelle 19 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Vor dem Start des Programms wurde standardmäßig eine Anstiegsoptimierung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anhand der Rotor-Gene 6000 Software analysiert und ausgewertet.

Tabelle 19: PCR-Bedingungen für SYBR Green qPCR

Zyklusanzahl	Temperatur	Zeit
1	95 °C	10 Min.
40	95 °C	15 Sek.
	53-57 °C	15 Sek.
	72 °C	15 Sek.

### 2.4.5.2 Quantifizierung neu replizierter MCPyV-DNA mittels qPCR

Zur absoluten Quantifizierung der MCPyV-Genomkopien wurde eine MCPyV-Standardreihe mit SacI-verdautem und aufgereinigtem Genom erstellt. Durch eine Genomgröße von 5388 Basenpaaren wurde berechnet, dass ein Genom eine Masse von  $5,9 \times 10^{-18} \text{ g}$  besitzt.

$$m(\text{MCPyV-SacI}) = 5388 \text{ Bp} * 1.096 \times 10^{-21} \text{ g/Bp} = 5.9 \times 10^{-18} \text{ g}$$

Da für die qPCR grundsätzlich 1,5 µL DNA eingesetzt wurde, wurde folglich eine Standardkurve von 39,3 ng/µL ( $10^{10}$  Kopien/Reaktion) bis 0.39fg/µL (100 Kopien/Reaktion) Plasmid-DNA angefertigt. Zusätzlich wurde eine GAPDH-Standardkurve von genomischer Kontroll-DNA erstellt.

Hierbei wurde berechnet, dass 3,3 pg gDNA der Masse einer haploiden *GAPDH*-Genkopie entspricht.

$$m(\text{haploides Genom}) = 3 \times 10^9 \text{ Bp} * 1,096 \times 10^{-21} \text{ g/Bp} = 3,3 \text{ pg}$$

Für die qPCR wurde 1,5 µL DNA eingesetzt, dementsprechend wurden für die *GAPDH*-Standardkurve log-Verdünnungen von 220 ng/µL (100.000 *GAPDH* Kopien/Reaktion) bis 22 pg/µL (10 *GAPDH* Kopien/Reaktion) angefertigt.

Zur Bestimmung der viralen Genomkopien wurden 1,5 µL Template-DNA (25 ng/µL) mit Primern gegen die MCPyV späte Region (MCPyV\_VP1\_DNA\_fw/ MCPyV\_VP1\_DNA\_rev) amplifiziert. Die Primersequenzen enthalten drei DpnI Restriktionsschnittstellen, um zu gewährleisten, dass ausschließlich neu replizierte DNA amplifiziert wird. Außerdem wurde das Housekeeping-Gen *GAPDH* (*GAPDH\_fw/GAPDH\_RT\_rev*) amplifiziert. Das Verhältnis von MCPyV-Genomkopien zu *GAPDH*-Kopien wurde gebildet und anschließend halbiert, um Genomkopien pro Zelle zu erhalten. Dieser Wert entspricht nicht dem tatsächlichen Zustand, da nur sehr wenige Zellen MCPyV-Genome beinhalten. Allerdings ermöglicht er, verschiedene Experimente miteinander zu vergleichen.

#### **2.4.5.3 Relative Quantifizierung von mRNA Transkripten mittels qPCR**

Zur relativen Bestimmung von zellulären Transkripten wurde 0,5 - 1 µg RNA in cDNA unter Verwendung von zufälligen Hexamerprimern und reverser Transkriptase umgeschrieben (siehe Abschnitt 2.5.3). Alle Primerpaare wurden über Exon-Exon-Spleißstellen entworfen, um die Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern. Eine "minus reverse Transkriptase" Kontrolle (- RT) wurde zu diesem Zweck mitgeführt. Standardkurven für jedes Primerpaar wurden durch die Verdünnung von cDNA angefertigt. Ein Standardwert wurde für jede qPCR mitgeführt. Die Expression von mRNAs wurde normalisiert auf die Expression von den beiden *housekeeping* Genen HPRT1 und YWHAZ.

#### **2.4.5.4 Relative Messung viraler Transkripte**

Für die Bestimmung viraler Transkripte wurde RNA aus dem Replikationsassay in cDNA umgeschrieben (siehe Abschnitt 2.5.3). Frühe LT-Transkripte und späte VP1-Transkripte wurden mit Primern aus Tabelle 2 nachgewiesen. LT-Primer liegen über der sT-Spleißstelle, während VP1-Primer keine Spleißstellen überspannen. Die Anzahl der Transkripte wurde anschließend auf die Genomkopien pro Zelle normalisiert. Eine "minus reverse Transkriptase" Kontrolle (- RT)

wurde zu diesem Zweck mitgeführt. Standardkurven für beide Primerpaare wurden durch die Verdünnung von cDNA angefertigt. Ein Standardwert wurde für jede qPCR mitgeführt.

#### **2.4.5.5 Auswertung von ChIP-Experimenten mithilfe von qPCR**

Die Auswertung von Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR. Hierbei wurde der Anteil an präzipitierter DNA im Vergleich zur eingesetzten DNA an spezifischen Loci in Prozent berechnet. Für alle Primerpaare wurden Standardkurven aus dem Inputmaterial erstellt. Die Anreicherung der präzipitierten DNA an positiven Loci sollte dabei im Vergleich zu negativen Loci deutlich erhöht sein. Die Input-DNA wurde 1:10 oder 1:100 in die qPCR eingesetzt, um im linearen, nachweisbaren Bereich zu bleiben, während die kopräzipitierte DNA unverdünnt eingesetzt wurde. Aus den erhaltenen Werten wurde neben dem Prozent des Inputs auch die Anreicherung im Vergleich zu einer negativen Kontrollregion berechnet.

## 2.5 RNA-Techniken

Für alle Experimente mit RNA wurde nukleasefreies DEPC-Wasser verwendet. Oberflächen und Pipetten wurden vor dem Arbeiten mit RNase-Zap (Ambion) gesäubert. Es wurden RNase-freie Gefäße und gestopfte Pipetten verwendet.

### 2.5.1 RNA-Isolation mit RNA-Bee

Die RNA-Isolierung mittels RNA-Bee (Ambio) beruht auf einer sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Guanidiniumthiocyanat dient dabei als chaotropes Denaturierungsmittel. Dieses Verfahren liefert höchste Reinheit und eine hohe Rückgewinnung im Vergleich zu säulenbasierten RNA-Gewinnungsmethoden.

5 x10<sup>5</sup> Zellen wurden nach der Ernte unverzüglich auf Eis gelagert, einmal in PBS gewaschen und anschließend in 500 µL RNA-Bee resuspendiert. Nach diesem Schritt wurden die Proben im Anschluss weiterverarbeitet oder für spätere Verwendung bei -80 °C gelagert. Es folgte die Zugabe von 100 µL Chloroform (Roth) zu den Zelllysaten und das Mischen der wässrigen und organischen Phase durch 30-sekündiges Mischen auf dem Vortex. Nach 10 Min. der Inkubation auf Eis wurden die Lysate bei 12.000 xg, 15 Min. bei 4 °C zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die RNA befindet sich danach in der oberen, wässrigen Phase, während Proteine in der organischen Phase präzipitiert vorliegen und DNA größtenteils in der Grenzphase vorliegt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, ohne dabei die Grenzphase zu beschädigen und in ein frisches Gefäß überführt. Die RNA wurde mit 250 µL Isopropanol für 10 Min. bei RT präzipitiert. Durch Zentrifugation wurde die RNA pelletiert (20.000 xg, 5 Min., 4 °C). Das Pellet wurde einmal in 75 % Ethanol gewaschen (20.000 xg, 5 Min., 4 °C), luftgetrocknet und in 12-50 µL H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> auf Eis resuspendiert. Die Konzentration der RNA wurde am NanoDrop™-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) oder für sensitivere Anwendungen wie z.B. für die Hochdurchsatzsequenzierung (Abschnitt 2.5.2) am Qubit-Fluorometer (Life Technologies) bestimmt. RNA wurde bei -80 °C gelagert oder direkt zur cDNA-Synthese eingesetzt (Abschnitt 2.5.3).

### 2.5.2 RNA-Hochdurchsatzsequenzierung (RNA-Seq)

RNA-Seq wurde zur Bestimmung differentieller Genexpression in HEK293 Kontrollzellen und HEK293 Kap1 k.o. Zellen in An- und Abwesenheit der MCPyV T-Ag durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit einem Leervektor (pCMV2B) oder MCPyV T-Ag (pCMV2B-ER) mithilfe von PEI transient transfiziert (Abschnitt 2.2.3.1) und RNA mithilfe von RNA-Bee isoliert (Abschnitt 2.5.1). Vor der *Library*-Herstellung wurde die Qualität der RNA am Bioanalyzer mittels RNA-Nano-Kit

(Agilent) überprüft. Die RNA-Proben wiesen dabei eine RIN (*RNA integrity number*) von über neun auf. Die *Library*-Herstellung wurde mithilfe des NEBNext® Ultra RNA Library Prep Kit (Illumina) und dem NEBNext *Poly(A) mRNA magnetic isolation module* nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur magnetischen Aufreinigung wurden Agencourt® AMPure XP-Kugeln (NEB) verwendet. 1 µg RNA wurde dafür als Startmaterial eingesetzt.

Die markierten Proben wurden am Illumina HiSeq2500 als "*single read 50 run*" mit einer angepeilten Tiefe von 10-30 Mio. Genstücke sequenziert. Die Genstücke wurden anschließend auf das humane refseq Genome hg19 abgebildet (Star v2.5 (Dobin *et al.*, 2013)) und differentiell exprimierte Gene mithilfe DEseq2 Programms (Love, Huber und Anders, 2014) identifiziert.

Zur Untersuchung signifikant differentiell exprimierter Gene wurden alle Gene mit einer "*false discory rate*" unter 0,1 (FDR < 0,1) berücksichtigt, die mindestens zweifach herauf- oder herunterreguliert gegenüber der Vergleichsgruppe vorlagen. Gene-Ontology-Analysen (GO-Analysen) und KEGG-Pathway Analysen wurden mithilfe des DAVIDs-Tools (Huang, Brad T Sherman und Lempicki, 2009; Huang, Brad T. Sherman und Lempicki, 2009) untersucht.

### 2.5.3 cDNA Synthese

Die Umschreibung von RNA in cDNA (*complementary DNA*) erfolgte mittels zufälligen Hexameroligonukleotide und der Superscript III reversen Transkriptase (Invitrogen). Der cDNA Synthese vorangehend wurde ein DNaseI-Verdau (Invitrogen) durchgeführt. 1 µg RNA wurde mit 1,1 µL zehnfach DNaseI Puffer und 1 µL DNaseI in einem Gesamtvolumen von 11 µL für 15 Min. bei RT inkubiert. Die DNase wurde inaktiviert durch die Zugabe von 1 µL EDTA (25 mM) und die Inkubation bei 65 °C für 10 Min. im Thermocycler. 1 µg der verdauten RNA (12 µL) wurde mit 1 µL zufälligen Hexamerprimer (250 ng/µL) und 1 µL dNTPs (10 mM) gemischt und bei 65°C, 5 Min inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzubrechen. Anschließend wurde der Ansatz direkt auf Eis gestellt. Es folgte die Zugabe von 4 µL 5x First Strand Puffer, 1 µL DTT (0,1 M), 0,7 µL RNaseOUT und 0,3 µL Superscript III (Invitrogen Kit). Die Proben wurden gemischt und im PCR-Block unter folgenden Bedingungen inkubiert: 25 °C für 5 Min., 50 °C für 60 Min. und 70 °C für 15 Min. (Tabelle20) RNA/ cDNA Hybrid-Komplexe wurden anschließend durch die Zugabe von 0,2 µL RNase H (NEB) bei 37 °C für 20 Min. entfernt. Zur Detektion von zellulären Transkripten wurde dieser Ansatz 1:5 verdünnt in die qPCR (Abschnitt 2.4.5.3) eingesetzt. Die Bestimmung von viralen Transkripten wurde direkt 1,5 µL für die qPCR eingesetzt (Abschnitt 2.4.5.4).

Tabelle 20: **PCR-Bedingungen cDNA-Synthese**

<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Funktion</b>
65°C	5 Min.	Aufschluss von Sekundärstrukturen
+ 4 µL 5x First Strand Puffer		
1 µL DTT (0,1 M)		
0,7 µL RNaseOUT		
0,3 µL Superscript III		
25 °C	5 Min.	Anlagerung der Oligos
50 °C	60 Min.	Verlängerung durch reverse Transkriptase
70 °C	15 Min.	Stoppen und Inaktivierung
+ 0,2 µL RNase H		
37 °C	20 Min.	Abbau RNA/ cDNA Hybride

## 2.6 Techniken zum Nachweis einer DNA-Protein-Interaktion

### 2.6.1 *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)

Der EMSA war eine der ersten Methoden, eine DNA-Protein-Interaktion nachzuweisen und wurde erstmals 1981 beschrieben (Fried und Crothers, 1981; Garner und Revzin, 1981). Bei dieser Technik werden Proteine oder ganze Kernextrakte mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde inkubiert und mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. DNA-Protein-Komplexe wandern bei der Gelelektrophorese langsamer als die ungebundene DNA-Sonde und erzeugen damit eine Bandenverschiebung. Durch die Zugabe eines spezifischen Antikörpers kann die Spezifität des Proteins nachgewiesen werden. Der DNA-Protein-Antikörperkomplex wandert im Gel noch langsamer als der DNA-Protein-Komplex und verursacht dadurch eine zusätzliche Bandenverschiebung. Das Signal wird mittels Autoradiographie detektiert. Durch das Einsetzen eines unmarkierten, spezifischen Kompetitors kann zusätzlich die Spezifität des Assays bestätigt werden. Die Methode kann außerdem durch Verdünnungsreihen dazu genutzt werden, um Affinitäten zu bestimmen (Fried, 1989).

#### 2.6.1.1 Herstellung von Kernextrakten

5 x10<sup>6</sup> HEK293 wurden transient mit MCPyV Expressionskonstrukten mit PEI transfiziert (Abschnitt 2.2.3.1). Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und ab diesem Schritt auf Eis gehalten. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen in

PBS abgeschabt und für 3 Min., 300 xg bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 400 µL Puffer A (10 mM HEPES NaOH (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 2,5 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 2 mM β-Glycerolphosphat, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, cOmplete Proteaseinhibitorcocktail) resuspendiert und 15 Min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 20 µL NP-40 (Endkonzentration 0,5 %) und 10-sekündigem Mischen auf einem Vortex wurde die Zytoplasmamembran aufgebrochen. Die Zellextrakte wurden für 30 Sek. bei 20.000 xg, 4 °C herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und enthielt die Zytoplasmafraktion. Die Kerne wurden in 200 µL hypotonischem Puffer C (20 mM HEPES NaOH (pH 7,9), 25 % (v/v) Glycerol, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM DTT, 1mM PMSF, 1 mM NaF, 2 mM β-Glycerolphosphat, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, cOmplete Proteaseinhibitorcocktail) resuspendiert und mehrmals durch die 1000-ender Pipettenspitze gezogen. In den 15 Min. Inkubation auf Eis diffundieren die Kernproteine durch die Kernporen in den Puffer. Die Kernextrakte wurden für 5 Min. bei 20.000 xg, 4 °C herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und enthielt die Kernextrakte. Die Konzentration der Kernextrakte wurde mittels Bradford-Assay bestimmt (Abschnitt 2.3.2) und anschließend mit Puffer C auf eine Konzentration von 1 mg/mL eingestellt.

#### **2.6.1.2 Herstellung der Ori-Sonde**

Zur Herstellung der radioaktiv markierten MCPyV Ori-Sonde wurden zunächst jeweils 10 pmol der Oligos (ori\_1, ori\_2, Tabelle 4), sowie Annealingpuffer (10 mM Tris HCl (pH 8), 0,1 mM EDTA, 50 mM NaCl) in einem Gesamtvolumen von 10 µL verdünnt und für 5 Min. bei 95 °C im Thermocycler erhitzt. Das schrittweise Abkühlen (5 °C pro Minute) sorgte für eine komplementäre Zusammenlagerung der Oligos und die Entstehung eines doppelsträngigen 80 Bp DNA-Fragmentes. 100 ng des Fragments wurden mit 1 µL [<sup>32</sup>P-γ] ATP (9,25 MBq, Hartmann Analytic) und 10 Einheiten T4-Polynucleotide-Kinase (NEB) nach Herstellerangaben am 5' Ende markiert. Die Aufreinigung der Sonde von ungebundenem [<sup>32</sup>P-γ] ATP erfolgte durch illustra Microspin G-25 Säulchen (GE Healthcare) ebenfalls nach Herstelleranweisungen. Das Eluat (ca. 25 µL) wurde anschließend mit 175 µL DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 0,5 ng/µL eingestellt.

#### **2.6.1.3 Bindereaktion**

Für die DNA-Protein-Bindereaktion (modifiziert nach Diaz *et al.*, 2014) wurden 10 µg Kernextrakt und 0,5 ng markierte Ori-Sonde (Endkonzentration 25 pg/µL) in Bindepuffer (Endkonzentration 30 mM Tris HCL (pH 8), 10 % 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) in einem Gesamtvolumen von 20 µL für 25 Min. bei RT

inkubiert. Adenylyl-imidodiphosphate ist ein ATP-Analog und inhibiert die Helikaseaktivität des LT-Ags, während BSA, sonifizierte Lachs-DNA und Poly d(I-C) dem Blocken unspezifischer Komplexe dienen. Durch die Zugabe von 0,5 µg MCPyV LT-spezifischem Antikörper (Cm2B4, Santa Cruz) bzw. IgG Kontrollantikörper (normal mouse IgG, Millipore) und Inkubation für weitere 10 Min. wurde ein *supershift*-Komplex erzeugt. Die DNA-Protein-Komplexe wurden auf einem nativen 4,5 % Polyacrylamidgel bei 180 V für 40 Min. aufgetrennt. Zum Überprüfen der Lauffront wurde eine Tasche mit 6-fach Ladepuffer mitgeführt. Das Gel wurde für 10 Min. in einem Trocknungspuffer (20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Glycerol) inkubiert und anschließend über Nacht unter einem Abzug zwischen Zellophan-Folien mithilfe eines Trocknungsrahmens getrocknet. Die Autoradiographie wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

### 2.6.2 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die ChIP ist eine Methode, um die Interaktion oder Bindung eines Proteins an DNA nachzuweisen. Mit ChIPs lässt sich die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder anderen DNA-bindenden Proteinen an das humane Genom untersuchen. Im Feld der Epigenetik wird außerdem die Besetzung und Verteilung von Histonmodifikationen analysiert. Für die ChIP werden zunächst die Protein-DNA-Bindungen durch Quervernetzung (*cross linking*) fixiert. Dieser Schritt erfolgt meistens über Formaldehyd, es können allerdings auch weitreichendere Crosslinker wie z.B. EGS verwendet werden. Es folgt die Isolation des Chromatins, welches sowohl Protein- als auch DNA-Bestandteile enthält. Die DNA wird im nächsten Schritt mithilfe von Ultraschall in kleine Fragmente von 200-500 Bp zerlegt. Dann erfolgt die Immunpräzipitation des gewünschten Proteins mithilfe von spezifischen Antikörpern.

5 x10<sup>6</sup> HEK293 wurden transient mit einem MCPyV-Expressionskonstrukt (pCMV2B-ER) zusammen mit einem Ori-Plasmid mit PEI transfiziert (Abschnitt 2.2.3.1). Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen gezählt und Chromatin für ChIP nach Günther *et al.* (2016) isoliert. Dafür wurden die Zellen in 1 % Formaldehyd für 10 Min. quervernetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin abgestoppt. Es wurden Zellkerne isoliert, um Chromatin zu präparieren. Das Chromatin wurde anschließend mithilfe von Ultraschall geschert, um DNA-Fragmente von 200 - 500 Bp zu erhalten. Chromatin von 0,25 x10<sup>6</sup> Zellen wurde als Inputkontrolle vorweg abgenommen. Für die Chromatin-IP wurde pro Ansatz Chromatin von 1 x10<sup>6</sup> Zellen eingesetzt. Um das Hintergrundsignal zu minimieren, wurde das Chromatin mit BSA geblockten Protein-G Agarosekugeln (GE Healthcare) vorgereinigt. Die Inkubation mit 2 µg MCPyV LT-spezifischem Antikörper (CM2B4, Santa Cruz Biotechnology, sc-136172), Kap1-spezifischem Antikörper (abcam, ab10483) oder IgG α-rabbit Antikörper (Millipore) erfolgte über Nacht auf dem Drehrad

bei 4 °C. Die Protein-DNA-Komplexe wurden durch Zugabe von Protein-G Agarosekugeln präzipitiert, mit aufsteigenden Salzkonzentrationen gewaschen und von den Kugeln eluiert. Die Quervernetzung wurde über Nacht bei 65 °C reversiert. Proteine und RNAs wurden mittels ProteinaseK/RNaseA-Verdau abgebaut und die kopräzipitierte DNA über eine Phenol-Chloroform-Fällung gefolgt von einer Ethanol-Fällung aufgereinigt. Die Auswertung der präzipitierten DNA erfolgte anschließend mittels qPCR (Abschnitt 2.4.5.5) oder Hochdurchsatzsequenzierung.

### **2.6.3 DNA-Protein-Interaktions ELISA (DPI-ELISA)**

Der DPI-ELISA ist eine abgewandelte Form des klassischen *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Der Assay weist die direkte Bindung eines Proteins an spezifische DNA-Sequenzen nach. Das Protokoll wurde für die Bindung von MCPyV LT-Ag an virale und zelluläre DNA in Anlehnung an Brand *et al.* (2010) optimiert. Das Protokoll kann für aufgereinigte Proteine oder Kernextrakte verwendet werden. Beim DPI-ELISA wird eine DNA-Sonde bis zu einer Größe von 80 Bp an 96-Well Platten über eine Biotin-Streptavidin-Interaktion gekoppelt. Bei der Inkubation mit Kernextrakten oder dem aufgereinigten Protein entsteht ein DNA-Protein-Komplex, der über spezifische Antikörper nachgewiesen werden kann. Die Auswertung erfolgt dabei kolorimetrisch über die Substratumsetzung der Meerrettichperoxidase, die an den Sekundärantikörper gekoppelt ist.

#### **2.6.3.1 Herstellung und Aufreinigung des LT-Antigens**

5 x10<sup>6</sup> HEK293 CON und HEK293 Kap1 k.o. Zellen wurden mit einem Streptavin-Biotin-Tag (SBT) LT-Ag (MCPyV-ER-SBP) mit PEI transfiziert (Abschnitt 2.2.3.1). Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4 °C kaltem PBS gewaschen ab diesem Schritt auf Eis gehalten. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen in PBS abgeschabt und für 3 Min., 300 xg bei 4 °C zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in 200 µL 10-fach RIPA (50 mM Tris HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 % (v/v) Na-Deoxycholat, 0,1 % (v/v) SDS, Roche cOmplete Proteasecocktail, 1 mM NaF, 2 mM β-Glycerolphosphat, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF) resuspendiert, mehrfach mit einer (0,5x15mm) Kanüle hochgezogen und für 30 Min auf Eis inkubiert. Die Zellextrakte wurden für 30 Min. bei 20.000 xg, 4°C herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1,8 mL Verdünnungspuffer (50 mM Tris HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, Roche cOmplete Proteasecocktail) aufgefüllt. 50 µL Proteinlysate wurde als Inputkontrolle abgenommen. Zeitgleich wurden Streptavidin-Sepharose-High-Performance-Kugeln (GE Healthcare) dreimal mit 1 mL Verdünnungspuffer gewaschen. Die Proteinlysate wurden anschließend mit 100 µL Kugeln über

Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad rotiert, um LT-Ag Proteine zu präzipitieren. Die Kugeln wurden 5 Min. bei 1500 xg, bei 4 °C zentrifugiert, einmal in Waschpuffer I (50 mM Tris HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100) und zweimal in Waschpuffer II (50 mM Tris HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100) gewaschen. Die Elution der präzipitierten Proteine erfolgt durch die Zugabe von Biotin. Hierfür wurde zweimal nacheinander 300 µL Elutionspuffer (20 mM Tris HCl (pH 8,5), 150 mM NaCl, 4 mM Biotin) zu den Kugeln gegeben und für 30 Min. bei 4 °C rotiert. Die 600 µL Proteineluat wurden mit Amicon Ultra Centrifugal Filter Units (0.5 mL 3K, Millipore) auf ca. 1/10 des Volumens aufkonzentriert. Die Konzentration der Proteine wurde mittels Bradford-Assay bestimmt (Abschnitt 2.3.2). Es erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens 50 % (v/v) Glycerols und die Lagerung der Proteine bei -80 °C. Als Reinheitskontrolle wurden die Proteine im 10 % SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mit Coomassie (Abschnitt 2.3.3.1) gefärbt. Im Westernblot wurde die Spezifität nachgewiesen.

### **2.6.3.2 Herstellung der doppelsträngigen DNA-Sonde**

80 Basenpaar lange Oligos wurden 3' biotinyliert über Eurofins bestellt (Tabelle 4). Der jeweils komplementäre Oligo wurde unmodifiziert bestellt. Die Oligos wurden in dem entsprechenden Volumen ( $H_2O_{DEPC}$ ) mit einer Endkonzentration von 100 mM gelöst. Das Zusammenlagern der *sense* und *antisense* Oligos zu einer doppelsträngigen Sonde erfolgte im Annealingpuffer. Je 100 pmol Oligo (entspricht 1 µL Stock-Lösung), 10 µL 10-fach Annealingpuffer (10 mM Tris HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl) und 78 µL  $H_2O_{DEPC}$  wurden in einem Volumen von 100 µL für 5 Min. im Thermocycler bei 95 °C erhitzt. Durch das schrittweise Abkühlen des Ansatzes (5°C pro Minute) kommt es zur komplementären Zusammenlagerung der Oligos. Von diesem Ansatz (1 pmol/ µL) wurde pro 96-Well 1 µL Sonde eingesetzt.

In diesem Assay wurde die Bindung von LT-Ag an die minimale Ori-Sequenz untersucht. Als Negativ-Kontrollen wurden Sonden gegen eine VP1-Sequenz, sowie eine gescrambelte Ori-Sequenz eingesetzt (Tabelle 4). Zudem wurde als spezifischer Kompetitor eine unbiotinylierte Ori-Sonde erzeugt, die in der Bindereaktion eingesetzt wurde.

### **2.6.3.3 DNA-Bindung an die Streptavidinplatten**

Streptavidin beschichtete 96-Well Platten (Greiner Bio One) wurden über Nacht durch Zugabe von Fixierungspuffer (0,1 M Natriumcarbonat (pH 9,7)) aktiviert. Die Bindung der DNA-Sonden erfolgte über die Biotin-Streptavidin-Bindung. Dazu wurde pro Well 1 pmol Sonde in 100 µL PBS-Tween eingesetzt. Die Sonden wurden für eine Stunde bei RT an die Platten gebunden. Anschließend wurde die überschüssige Sonde dreimal mit PBS-T gewaschen. Um

unspezifische Proteinbindung an die Platten zu minimieren, wurden die Platten für 30 Min. mit PBS-T mit 5 % (w/v) Milchpulver geblockt. Die Milchpulver-Rückstände wurden einmal mit PBS-T gewaschen.

#### **2.6.3.4 Protein-DNA-Bindung**

Pro 96-Well wurden 1 µg des aufgereinigten Proteins bzw. 10 µg des Kernextrakts auf 100 µL mit DNA-Protein-Bindepuffer (4 mM HEPES (pH 7,5), 100 mM KCl, 18 % (v/v) Glycerol, 2 mg/mL BSA, 5,5 mM DTT, 1 pmol ori-Kompetitor) aufgefüllt. Der DNA-Protein-Bindepuffer beinhaltet neben Salzen und Glycerol 1 pmol des spezifischen ori-Kompetitors, der unspezifische Bindung des LT-Ags an DNA verhindert. Die Platten wurden 2 Stunden bei RT auf dem Schüttler mit den Proteinen inkubiert. Danach wurden die Platten dreimal mit PBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem LT-Ag-spezifischen Antikörper (CM2B4, Santa Cruz, sc-136172) erfolgte 1:1000 in PBS-T für zwei Stunden bei RT. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde der Sekundärantikörper (Goat α-mouse IgG-HRP, Santa Cruz) 1:5000 in PBS-T zu den Platten gegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde sechs Mal mit PBS-T gewaschen, um Hintergrundsignale bei der Substratumsetzung zu minimieren. Die ABTS-Lösung (Sigma) wurde auf RT vorgewärmt und jeweils 100 µL pro 96-Well eingesetzt. Die Platten wurden auf dem Schüttler ca. 30 Min. bei RT inkubiert bis die Umsetzung des Substrats – ersichtlich durch eine blau-grüne Färbung – ihr Maximum erreichte. Die Auswertung erfolgte am TECAN Reader (Safire 2) durch die Messung der Absorption bei 405 nm.

## **2.7 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der GraphPad Software (Prism5) und der Verwendung des t-Tests, des One-Sample t-Tests bzw. des Mann-Whitney Tests oder des Wilcoxon Signed Rank Test für nicht normalverteilte Ergebnisse. Der Zweistichproben-t-Tests für unabhängige Stichproben wurde verwendet. Eine Ausnahme stellte die Auswertung der Transkripte in Abbildung 25 dar, hierbei wurde die IBM SPSS Software zur Berechnung eines gemischten Modells (Mixed Model + Random Intercept) verwendet. Der Vorteil eines gemischten Modells ist u.a. die Berücksichtigung von zufälligen Effekten bei der Berechnung der statistischen Signifikanz. Zusätzlich können unvollständige Werte in dem Modell berücksichtigt werden.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Identifikation von Kap1 als potenzieller Interaktionspartner des MCPyV LT-Antigens**

Mithilfe von Tandem-Affinitäts-Aufreinigung und anschließender multidimensionaler Protein-Interaktions-Technologie (MudPIT) wurden neue Interaktionspartner der MCPyV kodierten Onkogene in PFSK-1 Zellen identifiziert (Czech-Sioli, Manuskript in Arbeit). Der Chromatin-modifizierende, Zellzyklus-regulierende Korepressor Kap1 (*KRAB-associated protein 1*) befand sich unter diesen Kandidaten als möglicher Interaktionspartner des LT-Ags.

#### **3.2 Bestätigung und Eingrenzung der Interaktion der MCPyV T-Antigene mit Kap1**

Um die Interaktion des LT-Ags mit dem Wirtsfaktor Kap1 zu bestätigen, wurden Koimmunpräzipitationen (Ko-IP) in unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt. Die MCPyV frühe T-Region sowie das LT-Ag und das sT-Ag konnten dabei endogenes Kap1 in H1299 und PSFK-1 Zellen kopräzipitieren (Abbildung 8a und b). Die T-Antigene wurden dafür mit einem Flag-Tag in den Tumorzelllinien exprimiert und zwei Tage nach der Transfektion mittels M2-Flag Kugeln (Sigma-Aldrich) präzipitiert. Unter Gebrauch des GFP-Traps® (Chromotek) konnte ebenfalls endogenes Kap1 mit YFP-markierter T-Region oder verkürztem LT-Ag kopräzipitiert werden (Abbildung 8c). Bei der inversen Immunpräzipitation von Flag-markiertem, überexprimierten Kap1 konnten alle LT-Antigene kopräzipitiert werden (Abbildung 9b). Somit wurde die Interaktion von Kap1 mit beiden T-Antigenen (LT-Ag und sT-Ag) sowie mit dem ausschließlich im Tumor vorkommenden verkürzten LT-Ag bestätigt.

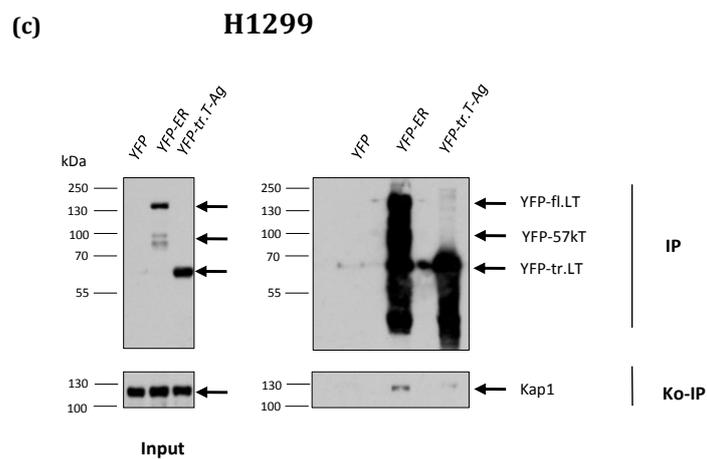
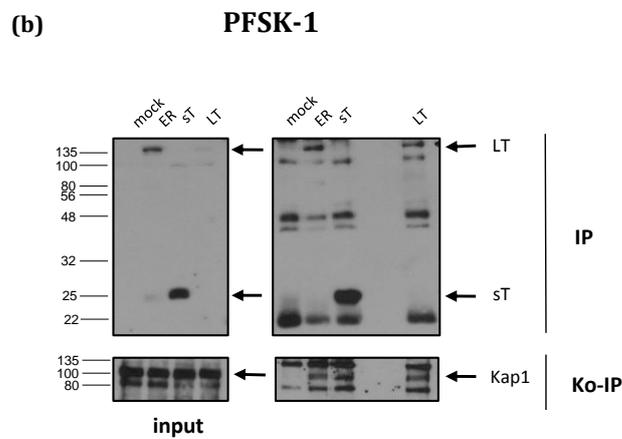
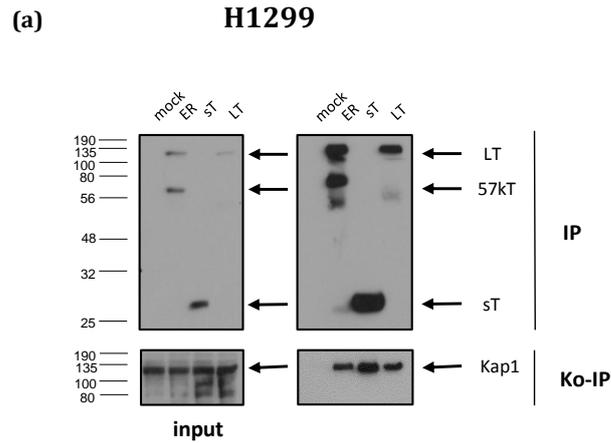


Abbildung 8: **Endogenes Kap1 wird mit MCPyV T-Antigenen in Tumorzelllinien (H1299 und PFSK-1) kopräzipitiert.** **(a)** Anti-FLAG M2 Ko-IP: H1299 Zellen wurden transient mit einem Leervektor oder Flag-markierter T-Region (ER), LT-Ag (LT) oder sT-Ag (sT) mithilfe von Polyethylenimin (PEI) transfiziert. **(b)** Anti-FLAG M2 Ko-IP: PFSK-1 Zellen wurden transient mit einem Leervektor oder Flag-markierter T-Region (ER), LT-Ag (LT) oder sT-Ag (sT) mithilfe von X-tremeGENE transfiziert. **(c)** GFP-Trap: H1299 Zellen wurden transient mit einem YFP-Leervektor, YFP-markierter T-Region (YFP-ER) oder trunkierter YFP-markierten T-Region (tr. T-Ag) mithilfe von PEI transfiziert. Antikörper: anti-FLAG (Sigma Aldrich, M2), anti-Kap1 (abcam, 20C1) und anti-LT (Cm2B4, Santa Cruz).

Es wurde zusätzlich bestimmt, welche Domäne oder Region der beiden Proteine für die Interaktion verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurden Ko-IP mit verkürztem Kap1 oder T-Ag Konstrukten durchgeführt (Abbildung 9, Abbildung 10).

Zur weiteren Untersuchung der Bindestelle im LT-Ag wurden unterschiedliche Stopp-Mutationen in der T-Region durch ortsspezifische Mutagenese erzeugt. Die im pEYFP-N1 Expressionsvektor befindlichen LT-Ag Varianten wurden zusammen mit pDNA3.1-Flag-Kap1 in H1299 Zellen transfiziert und zwei Tage später mittels anti-Flag Kugeln (Sigma-Aldrich) präzipitiert (Abbildung 9). Alle LT-Ag Varianten, volllängen-LT-Ag, LT-Ag mit einer Stoppmutation hinter der Zinkfinger-Domäne (AS 1-729), LT-Ag mit einer Stoppmutation hinter der OBD (AS 1-530) und trunkeertes tLT-Ag (AS 1-350) wurden mit Kap1 kopräzipitiert. Die Interaktion des LT-Ags erfolgt demnach durch den N-Terminus.

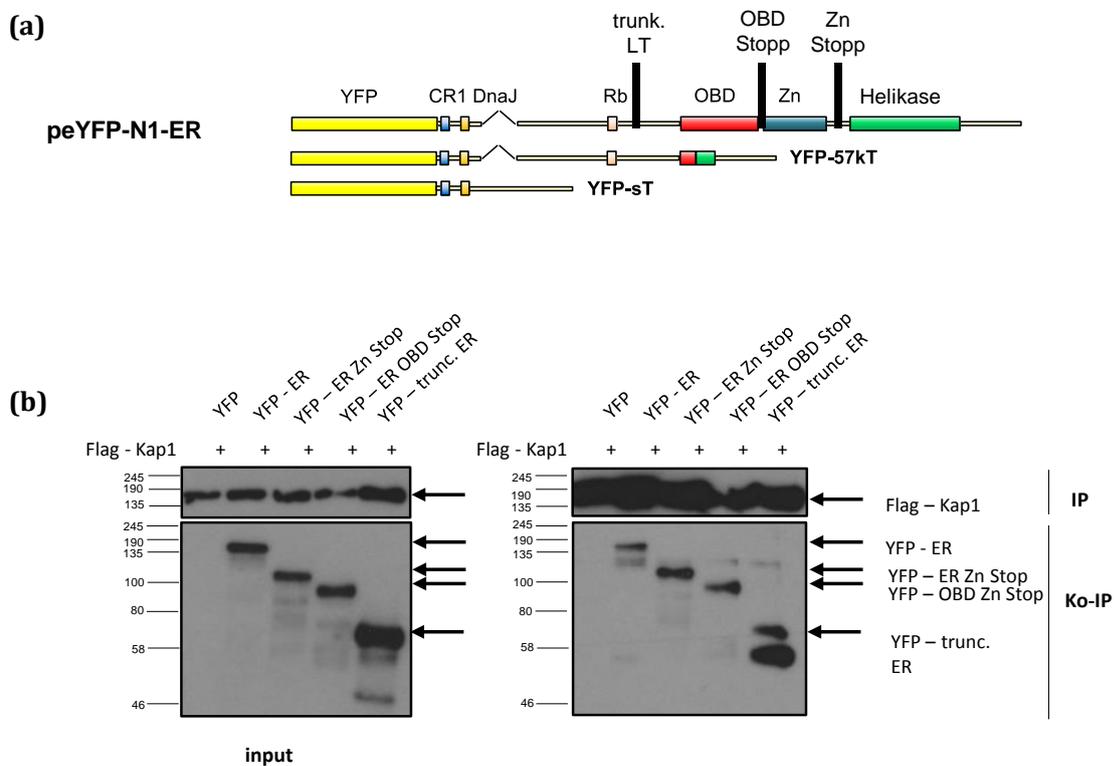


Abbildung 9: **Der N-Terminus des MCPyV LT-Antigens interagiert mit Kap1.** **(a)** Schematische Darstellung der verwendeten T-Region Konstrukte. Von der T-Region (ER) werden unterschiedliche T-Ag exprimiert: YFP-LT-Ag, YFP-sT-Ag und YFP-57kT-Ag. Die schwarzen Balken zeigen die verkürzten T-Region Varianten: (1) das im Tumor vorkommende trunkeerte tLT-Ag, (2) LT-Ag ohne die Zinkfinger(Zn)-Domäne und Helikasedomäne und (3) LT-Ag ohne Helikasedomäne. **(b)** Anti-FLAG M2 Ko-IP: H1299 Zellen wurden transient mit pcDNA3.1-Kap1 und YFP-markierter T-Region (ER) oder Leervektor mithilfe von PEI transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde Flag-markiertes Kap1 mithilfe von FLAG-M2-Kugeln (Sigma) präzipitiert. Das Eluat inklusive der kopräzipitierten Proteine wurde mittels SDS-Page-Gel und Westernblot analysiert. Antikörper: anti-FLAG (Sigma Aldrich, M2), anti-Kap1 (abcam, 20C1).

Um die Interaktionsstelle auf Seiten von Kap1 einzugrenzen, wurden verkürzte Kap1-Expressionskonstrukte in einem pDNA3.1-Flag-Zeo Vektor verwendet (Iyengar et al. 2011; Abbildung 10). Diese Konstrukte wurden freundlicherweise von Peggy Farnham, Universität von Südkalifornien, bereitgestellt. Das LT-Ag wurde von Kap1 und "Kap1 ohne PB-Domäne" kopräzipitiert. Lediglich "Kap1 ohne die RBBC-Domäne" und "Kap1 ohne die RBBC und die PB-Domäne" konnten das LT-Ag nicht kopräzipitieren (Abbildung 10). Folglich ist die RBBC-Domäne von Kap1 für die Interaktion mit dem LT-Ag essentiell.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Interaktion des MCPyV LT-Ags mit dem zellulären Faktor Kap1 über den N-Terminus des LT-Ags und der RBBC-Domäne von Kap1 erfolgt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass ebenfalls sT-Ag mit Kap1 interagiert.

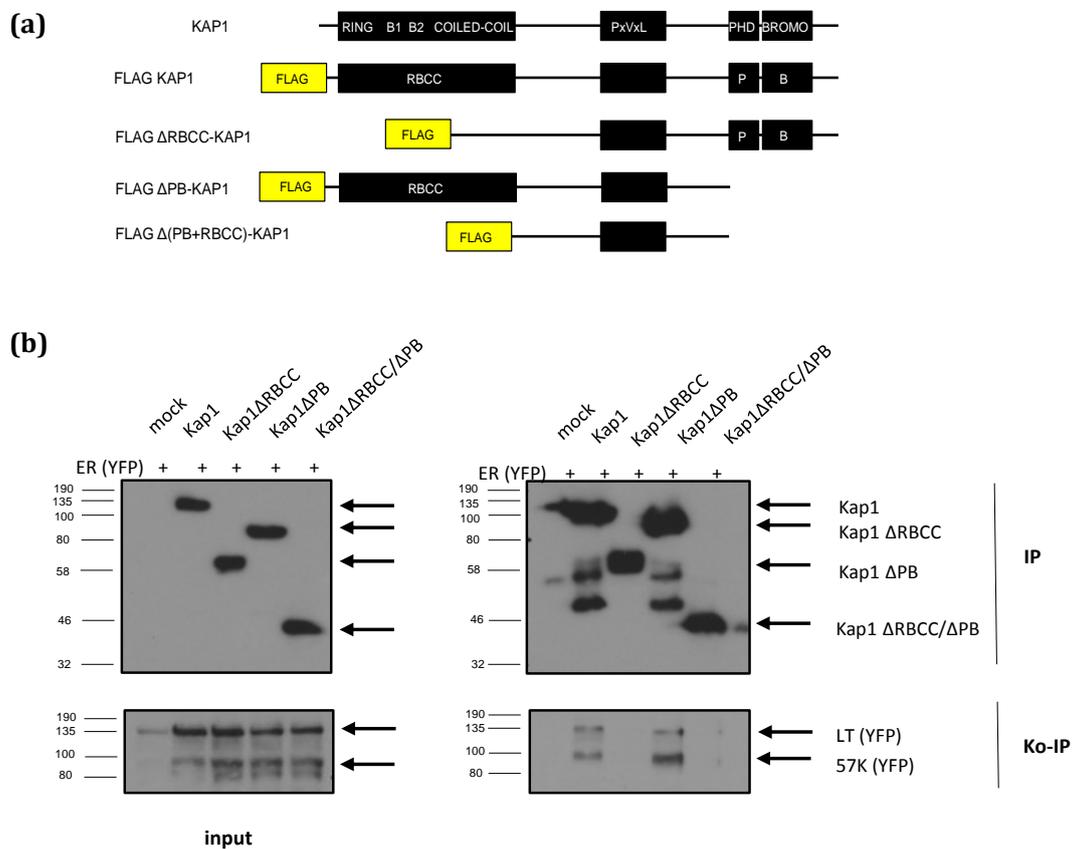


Abbildung 10: **Das LT-Antigen interagiert mit der RBCC-Domäne von Kap1.** **(a)** Schematische Darstellung der verwendeten Kap1-Konstrukte im pcDNA3.1 Vektor. **(b)** Anti-FLAG M2 Ko-IP: H1299 Zellen wurden transient mit YFP-markierter T-Region (ER) und Leervektor oder Flag-markierter Kap1-Konstrukte mithilfe von PEI transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde Flag-markiertes Kap1 mithilfe von FLAG-M2-Kugeln (Sigma) präzipitiert. Das Eluat inklusive der kopräzipitierten Proteine wurde mittels SDS-Page-Gel und Westernblot analysiert. Antikörper: anti-FLAG (Sigma Aldrich, M2), anti-LT (Cm2B4, Santa Cruz).

### 3.3 Konsequenzen der Interaktion im viralen Lebenszyklus

Die Untersuchung des viralen Lebenszyklus war bislang nur im semi-permissiven Replikationsmodell möglich. In diesem System wurden Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs (HEK293, H1299 und PFSK-1) mit MCPyV-DNA transfiziert und ließen dabei die Untersuchung viraler DNA-Replikation, Proteinexpression und Messung viraler Transkripte zu (Feng *et al.*, 2011; Neumann *et al.*, 2011; Schowalter, Pastrana und Buck, 2011). Dieses System hat viele Limitationen (wie in Abschnitt 4.2.2 diskutiert), jedoch hat das Replikationssystem in Tumorzelllinien den Vorteil, leicht manipuliert werden zu können. Um den Einfluss von Kap1 auf unterschiedliche Aspekte des viralen Lebenszyklus zu untersuchen, wurden mithilfe der CRISPR-Cas-Technologie Kap1 *knock-out* (k.o.) Zellen hergestellt (Abschnitt 3.3.1). Da die Replikation von Polyomaviren im Allgemeinen stark von der Proliferation der Wirtszelle abhängt, wurde das Proliferationsverhalten der Kap1 k.o. Zellen mithilfe eines MTT-Assays bewertet (Abschnitt 3.3.2). Im Folgenden wurden die Kap1 k.o. Zellen und die Kontrollzellen im semi-permissiven Replikationsmodell (Neumann *et al.*, 2011) eingesetzt, um den Einfluss von Kap1 auf virale DNA-Replikation und virale Transkripte zu untersuchen (Abschnitt 3.3.3 und 3.3.5.3).

#### 3.3.1 Herstellung von Kap1 k.o. Zelllinien

In dieser Arbeit wurde der pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) Vektor aus dem Zhang Labor verwendet (Addgene #48138). Sowohl das Design der sgRNA-Sequenzen für Kap1 als auch das Design der Kontroll-sgRNA wurde mithilfe des Zhang Protokolls und dem bereitgestellten *CRISPR design tool* durchgeführt (Ran *et al.*, 2013).

Die gRNA-Konstrukte wurden in unterschiedliche Zelllinien (HEK293, H1299 und PFSK-1) transfiziert. Zwei Tage später wurden GFP-positive Zellen mittels FACS sortiert. Die GFP-positiven potenziellen Kap1 k.o. Zellen wurden einzeln in 96-Well Platten abgelegt, während die GFP-positiven Kontrollzellen als Bulkpopulation weiter kultiviert wurden. Einzelzellklone wurden über 3 - 5 Wochen herangezogen und mithilfe von Westernblot nach Klonen gesucht, die einen Kap1 k.o. auf beiden Allelen trugen (Abbildung 11). Klone, die einen homozygoten k.o. auf beiden Kap1 Allelen trugen, wurde vereint, um eine Mischpopulation aus unterschiedlichen k.o.-Klonen zu bilden. Der Knock-out mittels CRISPR-Cas-Technologie wurde erfolgreich in HEK293 und H1299 Zellen durchgeführt, PFSK-1 Einzelzellklone wiesen nach mehrfachen Versuchen keinen homozygoten Kap1 k.o. auf.

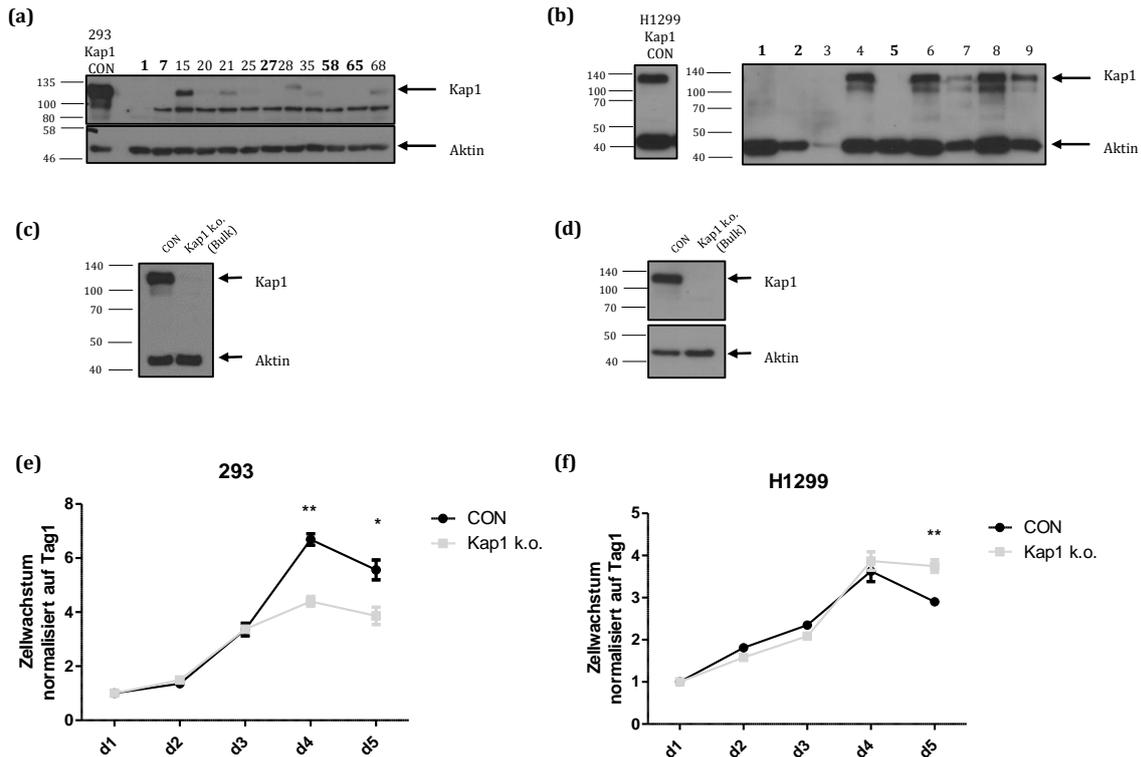


Abbildung 11: **Selektion und Proliferation von Kap1 knock-out Zelllinien im HEK293 und H1299 Hintergrund.** (a+b) Exemplarischer Westernblot von Kap1 knock-out Einzelzellklonen in a) HEK293 Zellen und b) H1299 Zellen. Die hervorgehobenen Klone (1,7,27,58,65 bzw. 1,2,5) wurden zu einer Mischpopulation vereint. Antikörper: anti-Kap1 (Santa Cruz, H-300), anti-Aktin (Santa Cruz, C4). (c+d) Westernblot der gepoolter Mischpopulation aus c) HEK293 Zellen und d) H1299 Zellen. Antikörper: anti-Kap1 (Santa Cruz, H-300), anti-Aktin (Santa Cruz, C4). (e+f) Zellwachstum der Kap1 k.o. Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen wurde mithilfe eines MTT-Assays (Millipore) bestimmt. Dargestellt ist das Wachstum der Zellen im Vergleich zu Tag 1. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde ein t-Test verwendet.

### 3.3.2 Proliferation von Kap1 k.o. Zellen

Bei allen Polyomaviren ist die DNA-Replikation abhängig von der Proliferation der Zellen. Im Gegensatz zu anderen DNA-Viren sind Polyomaviren auf die Replikationsmaschinerie der Wirtszelle angewiesen, die ausschließlich in der S-Phase des Zellzyklus zur Verfügung steht. Aus diesem Grund muss sichergestellt werden, dass bei Zellen, die in diesem Assay verwendet werden, gleiche Wachstumsverhältnisse bestehen. Es besteht anderenfalls die Gefahr, dass der beobachtete Phänotyp über indirekte Effekte entsteht.

Die Proliferation der Kap1 k.o. Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen wurde über fünf Tage mithilfe eines MTT-Assays (Millipore) untersucht (Abbildung 11). An Tag 4 und Tag 5 war das Wachstum der Kap1 k.o. Zellen im HEK293 Hintergrund signifikant langsamer als die Proliferation der Kontrollzellen. Im Vergleich dazu, zeigten H1299 Kap1 k.o. Zellen keine verschlechterte Proliferation. An Tag 5 wuchsen die Kap1 k.o. Zellen signifikant besser.

### 3.3.3 Kap1 ist ein Restriktionsfaktor für die MCPyV DNA-Replikation

Um den Effekt von Kap1 auf die virale DNA-Replikation zu untersuchen, wurde das *in vitro* Replikationssystem von Neumann *et al.* (2011) in Kap1 k.o. Zellen in zwei unterschiedlichen Tumorzelllinien untersucht. Dazu wurden Kap1 k.o. Zellen und Kontrollzellen mit religierten MCPyV-Genom zusammen mit Träger-DNA transfiziert. Zwei, vier und acht Tage nach der Transfektion wurde DNA isoliert, DpnI verdaut und die absoluten MCPyV-Genomkopien pro Zelle mithilfe von qPCR und VP1-Primern bestimmt (Abbildung 12 a, b). Die absolute Genomkopienzahl wurde auf die absolute Anzahl der GAPDH-Kopien normalisiert. In HEK293 Kap1 k.o. Zellen wurden im Vergleich zu den Kontrollzellen an Tag 4 und Tag 8 signifikant mehr Genomkopien gemessen. In den H1299 Kap1 k.o. Zellen wurde nur an Tag 8 nach Transfektion signifikant erhöhte MCPyV-Genomkopien detektiert. Der Trend ist zudem an Tag 4 sichtbar, aufgrund der hohen Standardabweichung als Folge der hohen Variabilität des Assay ist dieser Zeitpunkt allerdings statistisch nicht signifikant. Aus diesen Versuchen – und ebenso aus Kap1 *knock-down* Experimenten, die zuvor in PFSK-1 und H1299 Zellen durchgeführt wurden (nicht gezeigt) – geht hervor, dass Kap1 als Restriktionsfaktor für virale DNA Replikation fungiert.

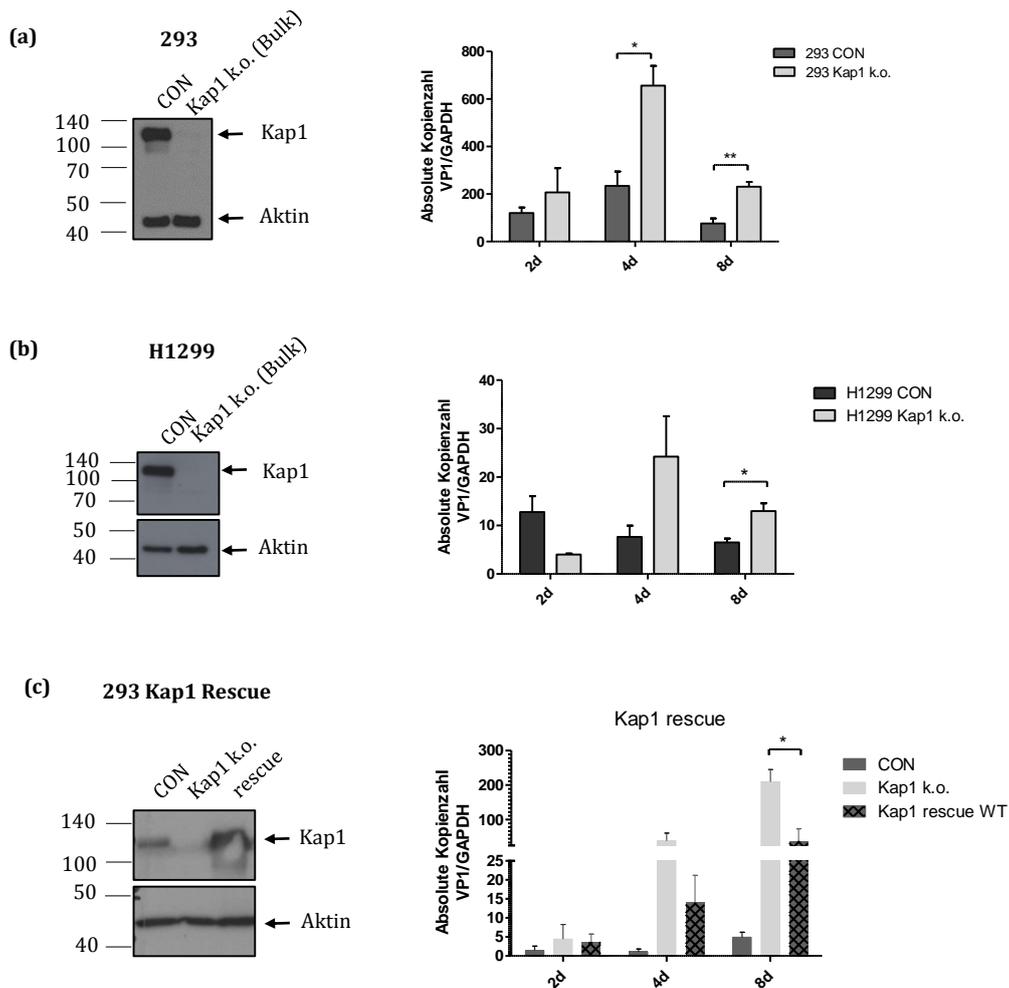


Abbildung 12: **Kap1 ist ein Restriktionsfaktor für die MCPyV DNA-Replikation.** Semi-permissives Replikationsmodell: Transfektion von religiertem Genom in Kap1 k.o. Zellen oder Kontrollzellen (CON). Input-DNA wurde DpnI/ EcoRI verdaut und neu replizierte Genome mithilfe von qPCR quantifiziert. Absolute VP1-Kopien wurden auf absolute GAPDH-Kopien normalisiert. **(a)** Kap1-Proteinlevel in HEK293 Zellen. **(b)** Kap1-Proteinlevel in H1299 Zellen. **(c)** Kap1-Wiedereinführung in HEK293 Zellen: Kap1 k.o. Zellen wurden mit einem iC2-LeGo-Flag-Kap1-Konstrukt transduziert. Eine stabile Zelllinie wurde mithilfe von Durchflusszytometrie hergestellt. Dargestellt ist die SD von n=3; ein t-Test wurde verwendet, um auf statistische Signifikanz zu testen.

### 3.3.4 Wiedereinführung von Kap1 in Kap1 k.o. Zellen

Um die Restriktion von Kap1 für die virale Replikation zu bestätigen, wurde Kap1 in Kap1 k.o. Zellen wiedereingebracht. HEK293 Kap1 k.o. Zellen wurden lentiviral mit einem LeGo-mCherry-Flag-Kap1-Expressionskonstrukt transduziert und vier Tage nach der Transduktion mittels FACS sortiert. In HEK293 Kontrollzellen, Kap1 k.o. Zellen und Kap1 k.o. Zellen mit wiedereingeführtem Kap1 – im Weiteren als Kap1 "rescue" Zellen betitelt – wurde der Replikationsassay durchgeführt (Abbildung 12c). Proliferationsanalysen der Kap1 "rescue" Zellen zeigten keine signifikante Veränderung des Wachstumsverhalten (Anhang Abb. 1). Der negative

Effekt von Kap1 auf die virale DNA-Replikation konnte durch die Wiedereinführung von Kap1 zum Teil umgekehrt werden. Der Wildtyp-Zustand konnte allerdings nicht komplett erreicht werden. Virale DNA-Replikation in Kap1 "rescue" Zellen war an Tag 8 nach der Transfektion im Vergleich zu den Kap1 k.o. Zellen signifikant reduziert (Abbildung 12c).

### 3.3.5 Potentielle Mechanismen der Kap1-vermittelten Restriktion der viralen DNA-Replikation

Des Weiteren wurde nach der Ursache für den negativen Effekt von Kap1 auf die MCPyV-Replikation gesucht. Unterschiedliche Wirkungsmechanismen können den negativen Effekt von Kap1 auf virale DNA-Replikation erklären. Es wurde zum einen untersucht, ob Kap1 das MCPyV-Genom bindet und virale Transkription reguliert. Zum anderen wurde untersucht, ob Kap1 die Bindung des LT-Ags an den Replikationsursprung sterisch behindert.

#### 3.3.5.1 Lokalisierung von Kap1

Um die Lokalisation von Kap1 in MCPyV-positiven Zellen zu untersuchen, wurde der Replikationsassay von Neumann *et al.* (2011) in neonatalen dermalen Fibroblasten (Abschnitt 2.2.6) durchgeführt. An unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion wurde die Lokalisation von Kap1 und dem LT-Ag mithilfe von Immunfluoreszenz detektiert. Abbildung 13 zeigt, dass das Kap1-Protein diffus im Zellkern verteilt ist. Zu keinem Zeitpunkt sah man eine Anhäufung von Kap1 in MCPyV-Replikationszentren.

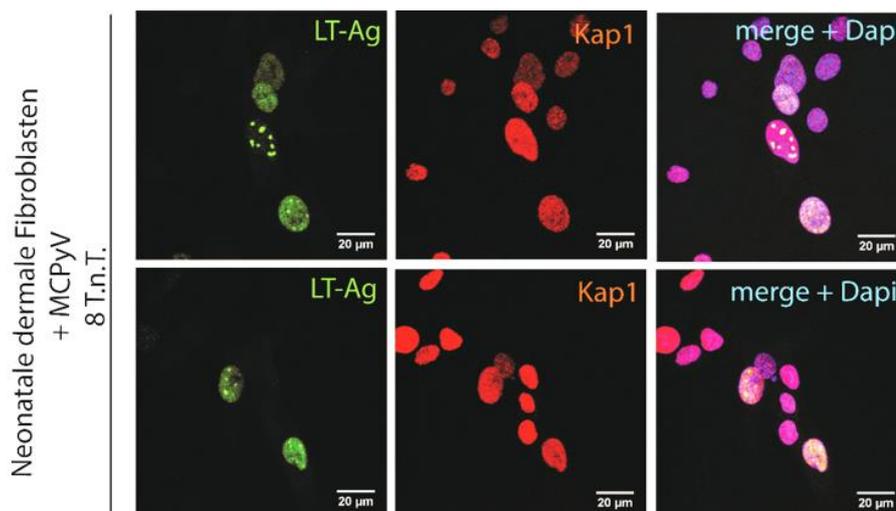


Abbildung 13: **Keine Ko-Lokalisierung des LT-Ags und Kap1 in Replikationszentren.** Neonatale dermale Fibroblasten wurden mittels Elektroporation mit religiertem MCPyV-Genom transfiziert. Acht Tage nach der Transfektion wurde das LT-Ag und Kap1 mithilfe von Immunfluoreszenz detektiert. Verwendete Antikörper: anti-LT (Santa Cruz, Cm2B4) und anti-Kap1 (abcam, ab10483).

### 3.3.5.2 Keine Bindung von Kap1 an den MCPyV-Replikationsursprung

Im Folgenden wurde untersucht, ob Kap1 an das MCPyV-Genom bindet und dadurch virale Genexpression reguliert. Kap1 besitzt kein direktes DNA-bindendes Motiv, sondern wird über andere Faktoren – hauptsächlich KRAB-Transkriptionsfaktoren – zur DNA rekrutiert. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die starke Interaktion mit dem LT-Ag Kap1 zum viralen Promoter (Replikationsursprung) rekrutiert.

Der minimale Replikationsursprung (Ori) (Kwun *et al.*, 2009) wurde in den pCR2.1-Vektor über EcoRI kloniert und zusammen mit oder ohne die MCPyV frühe T-Region in HEK293 Zellen transient exprimiert. Die Chromatin-IP wurde in Anlehnung an Günther *et al.* (2016) unter Verwendung eines Kap1 Antikörpers (abcam ab10483) durchgeführt. Anschließend wurde eine ChIP-qPCR zur Detektion bekannter Kap1-Bindestellen (*ZNF180*, *ZNF274*), negativer Kontrollregionen (*GAPDH*, *ACHE*) und die minimale *Ori*-Region durchgeführt. Die Anreicherung – an durch Kap1 gebundene DNA – wurde als prozentualer Anteil des Inputs in Abbildung 14a dargestellt. Die Anreicherung des positiven *Locis ZNF180* ist mit ungefähr 0,07 - 0,17 % des Inputs relativ gering und verdeutlicht die Schwierigkeit der Präzipitation von indirekt DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren. Im Vergleich zu den negativen Kontrollregionen wurden die beiden positiven Kontrollen angereichert. Die qPCR am viralen *Ori* zeigte keine Anreicherung. Die ChIP-Sequenzierung und statistische Auswertung eines Replikats (Dr. Thomas Günther, HPI) zeigte ebenfalls keine Anreicherung von der MCPyV *Ori*-Region im Vergleich zum Plasmidhintergrund (Abbildung 14b). Auf Grundlage dieses Experimentes wurde keine Bindung von Kap1 an den viralen Replikationsursprung nachgewiesen.

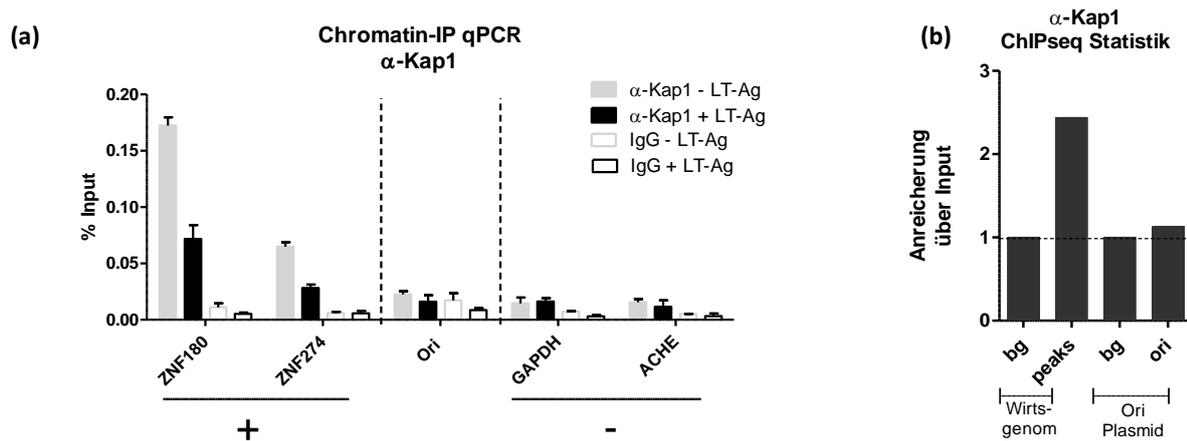


Abbildung 14: **Keine Bindung von Kap1 an den viralen Ori.** **(a)** Quantitative Auswertung der Chromatin-IP gegen Kap1 mittels qPCR. HEK293 wurden transient mit der MCPyV frühen T-Region zusammen mit einem Ori-Plasmid transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde in Anlehnung an Günther *et al.* (2016) Chromatin isoliert und eine anti-Kap1 (abcam, ab10483) oder IgG (Millipore, normal rabbit IgG) ChIP durchgeführt. Dargestellt ist der Input der Anreicherung der positiven Kontrollregionen (*ZNF180* und *ZNF274* aus Iyengar *et al.*, 2011), der negativen Kontrollregionen (*GAPDH* und *ACHE*) sowie die Anreicherung an den MCPyV *Ori* (n=2) in Prozent. **(b)** Statistische Auswertung eines sequenzierten Replikats. Dargestellt ist die Anreicherung der durch Kap1-gebundenen Regionen (*peaks*) im Vergleich zum Hintergrund (*bg*). Die statistische Analyse wurde von Dr. Thomas Günther, Heinrich-Pette-Institut durchgeführt.

### 3.3.5.3 Keine Regulation von viralen Transkripten durch Kap1

Der Einfluss von Kap1 auf virale Genexpression wurde im semi-permissiven Replikationsmodell untersucht. Dabei wurden die frühen und späten MCPyV-Transkripte in Kap1 k.o. Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen in HEK293 und H1299 Zellen bestimmt (Abbildung 15). Zur Messung der frühen Transkripte wurden stellvertretend *lt*-Transkripte bestimmt, während *vp1*-Transkripte stellvertretend für die späten Transkripte gemessen wurden. Die relative Anzahl der Transkripte wurde dabei auf die relativen *gapdh*-Transkripte normalisiert. Die relativen Transkripte wurden anschließend auf die Genomkopienzahl der jeweiligen Zeitpunkte normalisiert. In beiden Zelllinien wurden nur geringfügig späte *vp1*-Transkripte detektiert. Diese Beobachtung unterstreicht die Tatsache, dass HEK293 und H1299 Zellen nicht den kompletten Lebenszyklus des Virus unterstützen. Obwohl zwei Tage nach der Transfektion in beiden Zelllinien erhöhte *lt*-Transkripte gemessen wurden, ist dieser Trend statistisch nicht signifikant (t-Test). Die weiteren Zeitpunkte vier und acht Tage nach der Transfektion zeigten hohe Varianzen und unterschiedliche Tendenzen. Abschließend wurde festgestellt, dass Kap1 im semi-permissiven Replikationsmodell keinen signifikanten Einfluss auf virale Genexpression aufweist. Entsprechende Proteinlevel wurden in diesem System aufgrund der geringen Anzahl an MCPyV-positiven Zellen im Vergleich zu Virus-negativen Zellen nicht untersucht.

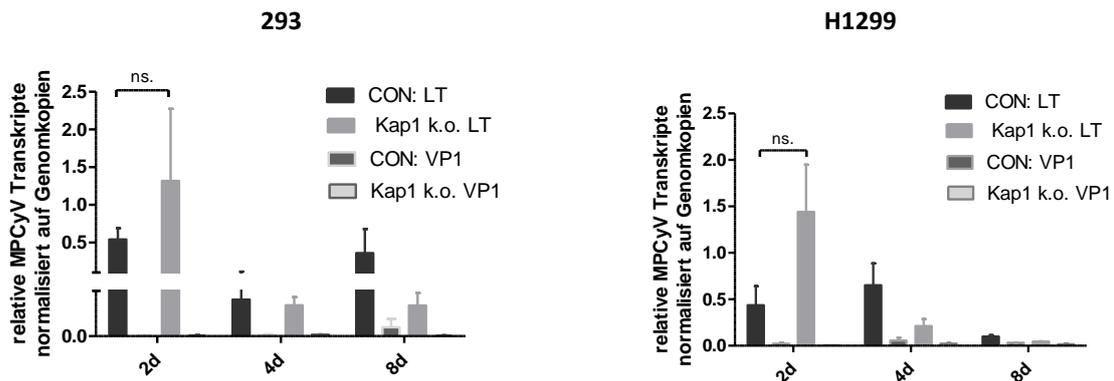


Abbildung 15: **Virale Transkripte im semi-permissiven Replikationssystem in Abhängigkeit von Kap1.** Transfektion von religiertem Genom in Kap1 k.o. Zellen oder Kontrollzellen (CON) im HEK293 oder H1299 Hintergrund. RNA wurde an Tag 2, 4 und 8 nach der Transfektion isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mithilfe von RT-qPCR wurden frühe (*lt*) und späte (*vp1*) virale Transkripte quantifiziert. Dargestellt sind die relativen MPCyV-Transkripte normalisiert auf die relativen *gadh*-Transkripte und normalisiert auf die Genomkopienzahl des jeweiligen Zeitpunkts. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde ein t-Test verwendet.

### 3.3.5.4 Bindung des LT-Antigens an den Replikationsursprung

Da keine Regulierung viraler Transkripte durch die Bindung von Kap1 an das virale Genom festgestellt werden konnte, wurde als nächstes untersucht, ob die Interaktion von Kap1 mit dem LT-Ag zu einer Attenuierung der LT-Bindung am viralen Replikationsursprung (Ori) führt.

Generell gibt es unterschiedliche Methoden, eine Protein-DNA Interaktion zu bestimmen: der "Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA), der DNA-Protein-Interaktions ELISA (DPI-ELISA) und die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der EMSA und der DPI-ELISA für die Bindung des LT-Ags an virale und zelluläre Targets etabliert. Die ChIP wurde in Anlehnung an Günther *et al.* (2016) durchgeführt. Die genaue Ausführung dieser drei Methoden ist in Abschnitt 2.6 nachzulesen.

Zunächst wurde der Einfluss von Kap1 auf die Bindung des LT-Ags an den viralen Ori mithilfe des EMSAs untersucht (Abbildung 16a). In Kontrollzellen sowie in Kap1 k.o. Zellen wurde eine Bandenverschiebung durch die Bindung des LT-Ags an die Ori-Sonde beobachtet (Spalte 3 und 8). Die Menge an eingesetzter Ori-Sonde reduzierte sich dabei sichtbar im Vergleich zu der mock-Kontrolle (Spalte 1 und 6). Somit bindet das LT-Ag in An- und Abwesenheit von Kap1 an den viralen Replikationsursprung. In mock-Kernextrakten hingegen entstand keine Bandenverschiebung. Es traten lediglich einige Hintergrundbanden auf. Die Spezifität des LT-Ori-Komplexes wurde durch die Zugabe des LT-spezifischen Antikörpers (Cm2B4) nachgewiesen. Es wurde eine Auflösung des spezifischen Komplexes durch Zugabe des

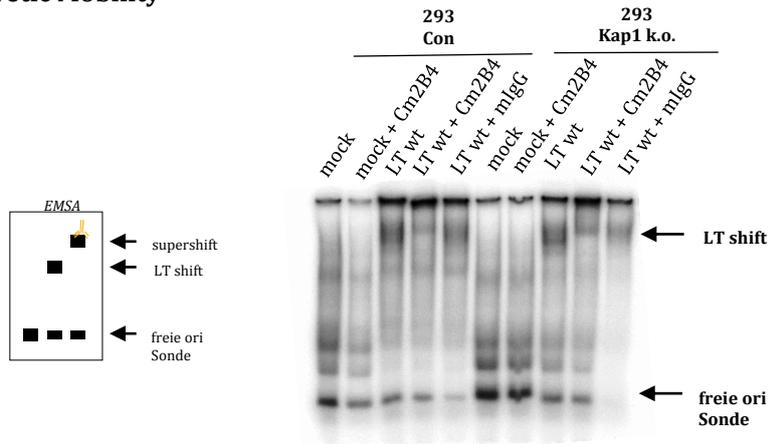
LT-Antikörpers beobachtet (Spalte 4 und 9). Es konnte keine Quantifizierung der Bindung an viralen Ori in An- und Abwesenheit von Kap1 vorgenommen werden.

Um eine bessere Quantifizierung der LT-Ori Bindung zu ermöglichen, wurde als nächstes die Chromatin-IP in HEK293 Kap1 k.o. Zellen und in HEK293 Kontrollzellen angewendet. Dazu wurden die Zellen mit einem Leervektor oder der frühen MCPyV T-Region zusammen mit einem Genomplasmid (pMK-MCVSyn\_Stopp) transfiziert. Das LT-Ag wurde zwei Tage nach der Transfektion präzipitiert und die Anreicherung an *Ori*-DNA im Vergleich zur negativen Kontrollregion (*VP1*) mittels qPCR bestimmt (Abbildung 16b). Bei der Anreicherung von *Ori*-DNA wurde kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontroll-DNA hinsichtlich der Bindung des LT-Ags an den viralen Ori in An- oder Abwesenheit von Kap1 gemessen (t-Test).

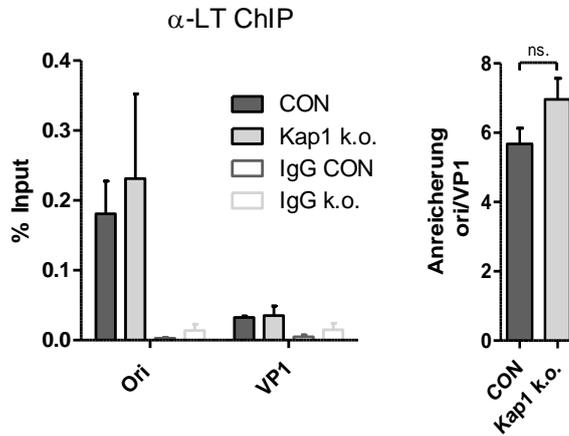
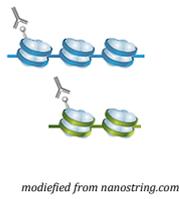
Mithilfe des DPI-ELISAs wurde abschließend der Einfluss von Kap1 auf virale DNA-Replikation untersucht. In diesem Experiment wurde das LT-Ag transient in HEK293 Kap1 k.o. Zellen oder HEK293 Kontrollzellen exprimiert (pNTAP-MCPyV-ER-SBP) und mithilfe eines SBT-Tag aufgereinigt (Abschnitt 2.6.3.1). Abbildung 16c zeigt das aufgereinigte LT-Ag in einem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel. Die 80 Basenpaar lange *Ori*-Sonde sowie die beiden negativen Sonden wurden an Streptavidin-beschichtete Platten über Biotin gebunden. Als Negativkontrolle wurde zum einen die durcheinander gewürfelte Ori-Sequenz (*ori scrambled*) zum anderen eine *VP1*-Sequenz verwendet. Gleiche Proteinmengen wurden mit den Sonden inkubiert. Die in Abbildung 16c dargestellte Nettoabsorption zeigte eine deutliche Bindung des LT-Ags an den *Ori* und eine deutlich schwächere Bindung an die beiden negativen Kontrollregionen. Um mögliche Ungenauigkeiten bei der eingesetzten Proteinmenge auszugleichen, wurde der Quotient aus der Bindung an den *Ori* und der Kontrollsequenz gebildet. Mittels DPI-ELISA wurde kein signifikanter Unterschied bei der Bindung des LT-Ag in An- oder Abwesenheit von Kap1 festgestellt.

Mittels der drei Techniken wurde kein Einfluss von Kap1 auf die Bindung des LT-Ags an den Replikationsursprung nachgewiesen.

**(a) Electrophoretic Mobility Shift Assay**



**(b) Chromatin-IP**



**(c) DPI-ELISA**

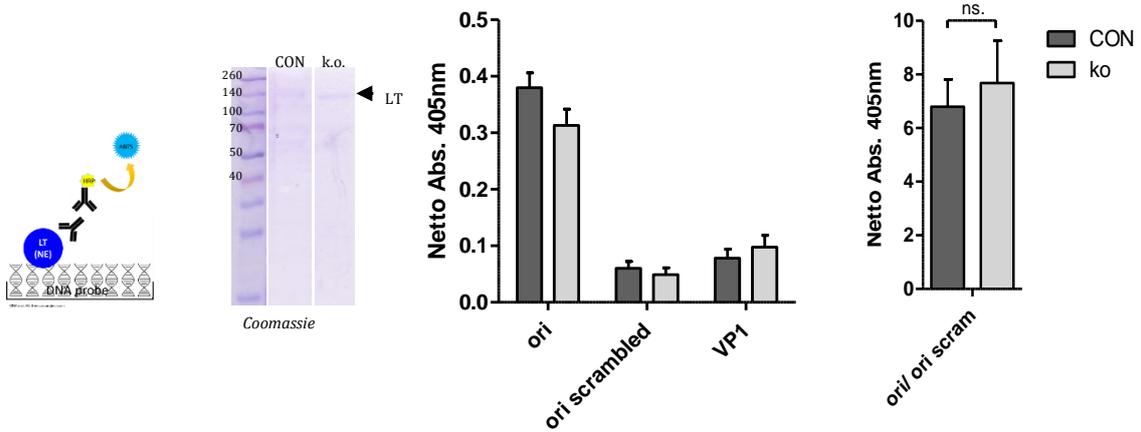


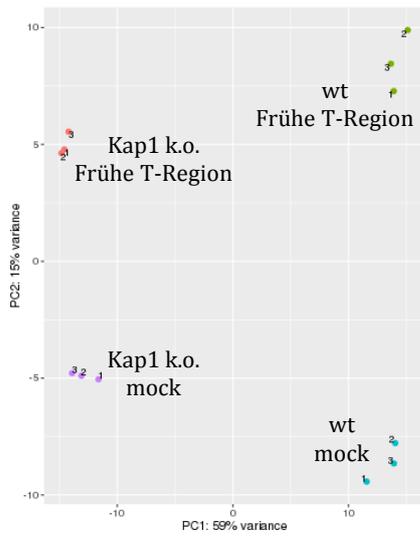
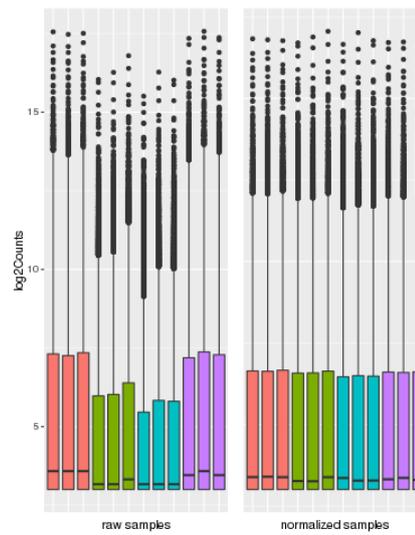
Abbildung 16: **Bindung des LT-Ags an den Replikationsursprung (Ori) in Abhängigkeit von Kap1.** **(a)** EMSA: HEK293 Kap1 k.o. Zellen und Kontrollzellen wurden transient mit der MCPyV frühen T-Region oder mit einem Kontrollplasmid mittels PEI transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Kernextrakte hergestellt und mit einer <sup>32</sup>P-markierter *Ori*-Sonde inkubiert. Anschließend wurde der Protein-DNA-Komplex auf einem 4,5 % nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch die Zugabe des LT-spezifischen Antikörpers (Santa Cruz, Cm2B4) bzw. eines IgG antikörpers (Millipore, normal mouse IgG) wurde eine Bandenverschiebung erzeugt. Mithilfe von Autoradiographie wurde das radioaktive Signal am Phosphor-Imager detektiert (GE Healthcare life Sciences). **(b)** LT-Ag Chromatin-IP: HEK293 Kap1 k.o. Zellen und Kontrollzellen wurden transient mit der MCPyV frühen T-Region oder mit einem Kontrollplasmid und zusätzlich mit einem MCPyV-Plasmid (pMK-MCVSyn\_Stopp) mittels PEI transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde in Anlehnung an Günther *et al.* (2016) Chromatin isoliert und eine anti-LT (Santa Cruz, Cm2B4) oder IgG (Millipore, normal rabbit IgG) CHIP durchgeführt. Dargestellt ist der Input der Anreicherung an den *Ori* und die neagtive Kontrollregion *VP1* in Prozent. Die Anreicherung an den *Ori* im Vergleich zu *VP1* wurde ebenfalls dargestellt. Gezeigt ist die SD von n=3; zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde ein t-Test verwendet. **(c)** DPI-ELISA: HEK293 Kap1 k.o. Zellen und Kontrollzellen wurden transient mit der SBT-markierten MCPyV-frühen T-Region oder mit einem Kontrollplasmid mittels PEI transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde das LT-Ag aus beiden Zelllinien mittels Streptavidin-Kugeln aufgereinigt und jeweils 1µg Protein in den DPI-ELISA eingesetzt. Gezeigt ist ein Coomassiegel des aufgereinigten LT-Ags aus Kontrollzellen und Kap1 k.o. Zellen. Beim DPI-ELISA wurden DNA-Sonden über Biotin an mit Streptavidin-beschichtete 96-Well Platten gebunden und mit Proteinen oder Kernextrakten inkubiert. Die Detektion der DNA-Protein-Interaktion erfolgte mit LT-spezifischen Antikörper und der kolorimetrischen Substratumsetzung. Dargestellt ist die SD von n=3; zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde ein t-Test verwendet.

### 3.4 Differentielle Expression von Wirtsgenen in Abhängigkeit von Kap1 und MCPyV T-Antigenen

Es wurde in dieser Arbeit untersucht, inwieweit die Expression der T-Ag die durch Kap1 regulierten Gene beeinflusst. Zur Identifizierung von Genen, die durch Kap1 reguliert werden, wurde das Transkriptom von HEK293 Kontrollzellen im Vergleich zu HEK293 Kap1 k.o. Zellen untersucht. Zusätzlich wurden Kontrollzellen und Kap1 k.o. Zellen mit der frühen MCPyV T-Region transfiziert. Es werden unterscheidliche Spleißvarianten der T-Ag vom T-Lokus exprimiert: LT-Ag, sT-Ag und 57 kT-Ag. RNA für Transkriptom-Analysen wurde zwei Tage nach der Transfektion isoliert. Die mRNA wurde mittels NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit isoliert und mit Adaptoren versehen. Die Sequenzierung der Proben erfolgte am Illumina High-Seq. Ein Überblick des experimentellen Aufbaus ist in Abbildung 17 dargestellt. Jede Bedingung wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Anzahl an Sequenzstücken für jede Probe (mind. 7,5 Mio. Reads) befindet sich in Abbildung 17c. Eine Hauptkomponentenanalyse ist ein statistisches Verfahren, welches zur Veranschaulichung von umfangreichen Datensätzen genutzt wird und Aufschluss über die Gleichartigkeit von Proben gibt. Die Hauptkomponentenanalyse dieses Datensatzes in Abbildung 17a zeigt die Gemeinsamkeiten der unterschiedlichen Triplikate und die Differenziertheit zu den verschiedenen Probenbedingungen. Zur besseren Vergleichbarkeit bei

der Auswertung wurden die Datensätze mittels DeSeq2 normalisiert (Love, Huber und Anders, 2014) (Abbildung 17b).

In diesem Datensatz ließen sich erstens Gene identifizieren, die durch Kap1 reguliert wurden, zweitens Gene, die durch die Expression der MCPyV T-Antigene beeinflusst wurden und schließlich Gene, die in Abhängigkeit von Kap1 und den MCPyV T-Ag reguliert wurden (Abbildung 17d). Die Tabelle in Abbildung 17e zeigt die Anzahl von Genen, die für den jeweiligen Vergleich signifikant differentiell exprimiert wurden. Als signifikant differentiell exprimiert gelten all die Gene, deren "false discovery rate" unter 0,1 liegt ( $FDR < 0,1$ ) und dessen Anzahl an sequenzierten Reads mindestens zweifach gegenüber der anderen Probe erhöht ist ( $\log_2 \text{fold change} \geq 1$  oder  $\leq -1$ ;  $FDR < 0,1$ ). Die FDR gibt Aufschluss über die Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese fälschlicherweise zurückgewiesen wird, obwohl sie eigentlich zutrifft. Wenn nicht anders hervorgehoben, wird in den folgenden Abschnitten von signifikant regulierten Genen gesprochen, wenn die oben genannten Bedingungen erfüllt sind.

**(a)** Principal Component Analysis**(b)** Normalisierung**(c)**

	# Replikate	# Reads
wt mock	3	7576852
		9864054
		9774943
wt Frühe T-Region	3	10792305
		11278744
		14426016
Kap1 k.o. mock	3	25491123
		29485155
		27010961
Kap1 k.o. Frühe T-Region	3	28861786
		27927612
		29077420

**(d)**

	Vorgenommene Vergleiche	
(1)	wt Frühe T-Region versus wt mock	Regulation von Genen durch Kap1
(2)	Kap1 k.o. Frühe T-Region versus Kap1 k.o. mock	
(3)	Kap1 k.o. mock versus wt mock	Regulation von Genen durch MCPyV T-Antigene
(4)	Kap1 k.o. Frühe T-Region versus wt Frühe T-Region	
(5)	Kap1 k.o. Frühe T-Region versus wt mock	Regulation von Genen durch Kap1 und T-Antigene
(6)	wt Frühe T-Region versus Kap1 k.o. mock	

**(e)**

		wt mock	wt Frühe T-Region	Kap1 k.o. mock	Kap1 k.o. Frühe T-Region
wt mock	vs	-	14	125	297
		-	58	217	976
wt Frühe T-Region	vs	58	-	745	194
		14	-	449	194
Kap1 k.o. mock	vs	217	449	-	1
		125	745	-	28
Kap1 k.o. Frühe T-Region	vs	976	194	28	-
		297	194	1	-

Abbildung 17: **RNA-Seq: Experimentelles Design und Datenerfassung.** **(a)** Hauptkomponentenanalyse (Principle Component Analysis). **(b)** Normalisierte Daten (DeSeq2). **(c)** Anzahl der sequenzierten Sequenzstücke. **(d)** Vorgenommene Vergleiche zur Identifizierung von Genen, die Kap1-abhängig reguliert werden (Vergleich 1 und 2), die durch die Expression der MCPyV T-Ag reguliert werden (Vergleich 3 und 4) und Gene, die in Abhängigkeit von Kap1 und MCPyV T-Ag reguliert werden (Vergleich 5 und 6). **(e)** Anzahl der Gene, die in den unterschiedlichen Vergleichen signifikant ( $\log_2\text{fold change} \geq 1$  oder  $\leq -1$ ;  $\text{FDR} < 0,1$ ) differentiell exprimiert werden.

Im Nachfolgenden wurde untersucht, ob es Gruppen von Genen gibt, die überdurchschnittlich häufig differentiell exprimiert vorliegen. Zu diesem Zweck wurden Gene-Ontology (GO) Analysen und KEGG-Pathway Analysen mithilfe des *online tools* DAVID durchgeführt (Huang, Brad T Sherman und Lempicki, 2009; Huang, Brad T. Sherman und Lempicki, 2009). Für die Auswertung des Datensatzes mittels DAVID wurden die signifikant differentiell exprimierten Gene (hochregulierte und herunterregulierte) aus den verschiedenen Vergleichen (Abbildung 17e) zusammengefasst und gemeinsam analysiert. Üblicherweise werden bei Transkriptomanalysen hochregulierte und herunterregulierte Gene separat betrachtet, aufgrund der Komplexität dieses Datensatzes wurde sich allerdings dagegen entschieden. Die differentiell exprimierten Gene, die in Abhängigkeit der T-Ag und Kap1 reguliert werden (Vergleich 5 und 6), wurden gesondert analysiert. Bevor GO und KEGG-Pathways bestimmt wurden, wurden alle differentiell exprimierten Gene, die in den beiden Vergleichen entgegengesetzt reguliert wurden, eliminiert. Die Zahl der differentiell exprimierten Gene reduzierte sich dadurch von 1888 (gesamt 2467) auf 1512 Gene. Die Listen an signifikant erhöhten GO-Begriffen und KEGG-Pathways, die signifikant ( $p$ -Wert $<0,05$ ) angereichert wurden, ist sehr umfangreich befinden sich aus diesem Grund im Anhang (Anhang Tab. 1-6). Die Listen sind dabei aufsteigend entsprechend ihres  $p$ -Wert sortiert.

### **3.4.1 Regulation Kap1-abhängiger Gene**

Die Anzahl der signifikant differentiell exprimierten Gene, die Kap1-abhängig reguliert wurden (Vergleich 1 und 2 (Abbildung 17d)), betrug 730. Da einige dieser Gene in den beiden Vergleich auftraten, blieben 490 Unikate übrig. Das DAVID-Tool identifizierte eine große Anzahl von signifikant angereicherten GO-Begriffen (Anhang Tab. 1). Unter den ersten 25 Begriffen traten, GO-Begriffe wie "Regulation der Transkription", "Aktivität von Transkriptionfaktoren" und "DNA-Bindung" auf. Weitere signifikant erhöhte GO-Begriffe wie "homophile Zelladhäsion durch Adhäsionsmoleküle der Plasmamembran", "Calcium-abhängige Zell-Zell-Adhäsion", "Zelladhäsion", "proteinöse extrazelluläre Matrix", "extrazellulär Raum" oder "Basalmembran") legen die Rolle von Kap1 bei der Gestaltung und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix dar. Die dritte Gruppe von GO-Begriffen belegt die Assoziation von Kap1 mit der Regulation von Proliferation und zellulärer Entwicklung ("Entwicklung des Nervensystems", "positive Regulation der Zellproliferation", "Aktivität von Wachstumsfaktoren", "Embryonalentwicklung des Verdauungstrakts" oder "negative Regulation der Zellproliferation"). Die KEGG-Pathway Analysen spiegelten dieses Bild zum Teil wieder. So sind die Pathways "Fokale Adhäsion", "Rezeptorinteraktion der extrazellulären Matrix" oder "TGF- $\beta$  Signalweg" unter den fünf am meistens signifikanten KEGG-Pathways. Des Weiteren waren der "PI3K-Akt Signalweg" und der GO-Begriff "karionogene Signalweg" vertreten (Anhang Tab. 2).

### 3.4.2 Regulation von Genen durch die MCPyV T-Antigene

Die Anzahl der Gene, die durch die Expression der MCPyV T-Ag reguliert wurden (Vergleich 3 und 4 (Abbildung 17d)), betrug 101, davon entsprachen 86 Unikaten. Für diese Gene wurde eine Assoziation mit der Immunantwort festgestellt, was sich durch GO-Begriffe wie "Entzündungsantwort", "Immunantwort" oder "angeborene Immunantwort" auszeichnete (Anhang Tab. 3). Zudem wurden GO-Begriffe gefunden, die ein Mitwirken der T-Ag an der Zellproliferation und zellulärer Fortbewegung zeigten ("negative Regulation der Proliferation von Fibroblasten", "extrazellulärer Raum", "negative Regulation der Zellproliferation", "Lamellipodien" oder "positive Regulation der Anordnung von Aktin-Filamentbündel"). Der am signifikantesten erhöhte KEGG-Pathway war dabei "NFκB-Signalweg" (Anhang Tab. 4) und bildet somit ebenfalls die Verknüpfung mit der zellulären Immunantwort ab. Interessanterweise wurde ebenfalls der KEGG-Pathway "transkriptionelle Deregulation in Krebs" signifikant erhöht vorgefunden. Generell wurden weniger Gene durch die Expression der MCPyV-Onkogene beeinflusst, als es zu vermuten ist. Die Interpretation dieser Ergebnisse wird in Abschnitt 4.7.2 diskutiert.

### 3.4.3 Regulation von Genen durch Kap1 und die MCPyV T-Antigene

Die Anzahl der Gene, die durch Kap1 und MCPyV T-Ag reguliert wurden, stellte mit 2467 (1888 Unikate und 1512 gefilterte Gene) die größte Gruppe der zu untersuchenden Gene dar. Die GO-Begriffe (Anhang Tab. 5 und Abbildung 18a) spiegelten wieder, was Kap1-abhängig und abhängig von den MCPyV T-Ag an Gengruppen signifikant reguliert wurde. Die GO-Begriffe mit dem niedrigsten p-Werten waren mit Zelladhäsion, Ionenmembrantransport, extrazellulärer Matrixorganisation und Zellproliferation assoziiert. Die Assoziation mit der Immunantwort und zellulärer Entwicklung wurden ebenfalls unter den 25 signifikantesten GO-Begriffen zu finden. Die fünf signifikantesten KEGG-Pathways für die Gene, die Kap1 abhängig zusammen mit den MCPyV T-Ag reguliert werden (Abbildung 18b), waren "Proteinabbau und Absorption", "Tyrosinmetabolismus", "Zelladhäsionsmoleküle", "Rezeptorinteraktion der extrazellulären Matrix" und "Phenylalanine metabolism" (Anhang Tab. 6).

Die Untersuchung der differentiell exprimierten Gene mithilfe des DAVID *Tools* (Huang, Sherman, und Lempicki 2009a, 2009b) ermöglichte einen groben Überblick an involvierten Signalwegen. GO-Begriffe und KEGG-Pathways bieten die Möglichkeit globale Regulationsmuster zu erkennen. Die Regulation einzelner Gene hingegen benötigt andere systematische Analysemethoden. Zu diesem Zweck wurde die Qiagen-Software Ingenuity-Pathway-Analysis (IPA) herangezogen. Die Software analysiert die Anreicherung von kanonischen Signalwegen und die Assoziationen mit

speziellen Krankheitsbildern, was der Untersuchung und Einteilung in GO-Begriffe und KEGG-Pathways ähnelt. Dabei ermöglicht Ingenuity die gleichzeitige Betrachtung aller vorgenommenen Vergleiche. Die Software ermöglicht außerdem die Betrachtung der Expression einzelner Gene oder Gengruppen wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Kinasen in Form von Wärmekarten. Aufgrund der Komplexität dieser Darstellungsweise und um Repetition zu vermeiden, wurden diese Analysen angehängt. Im Anhang Abb. 5 und Anhang Tab.7 befindet sich eine Darstellung der signifikant regulierten Kinasen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren sowie "upstream regulators" in allen sechs Vergleichen.

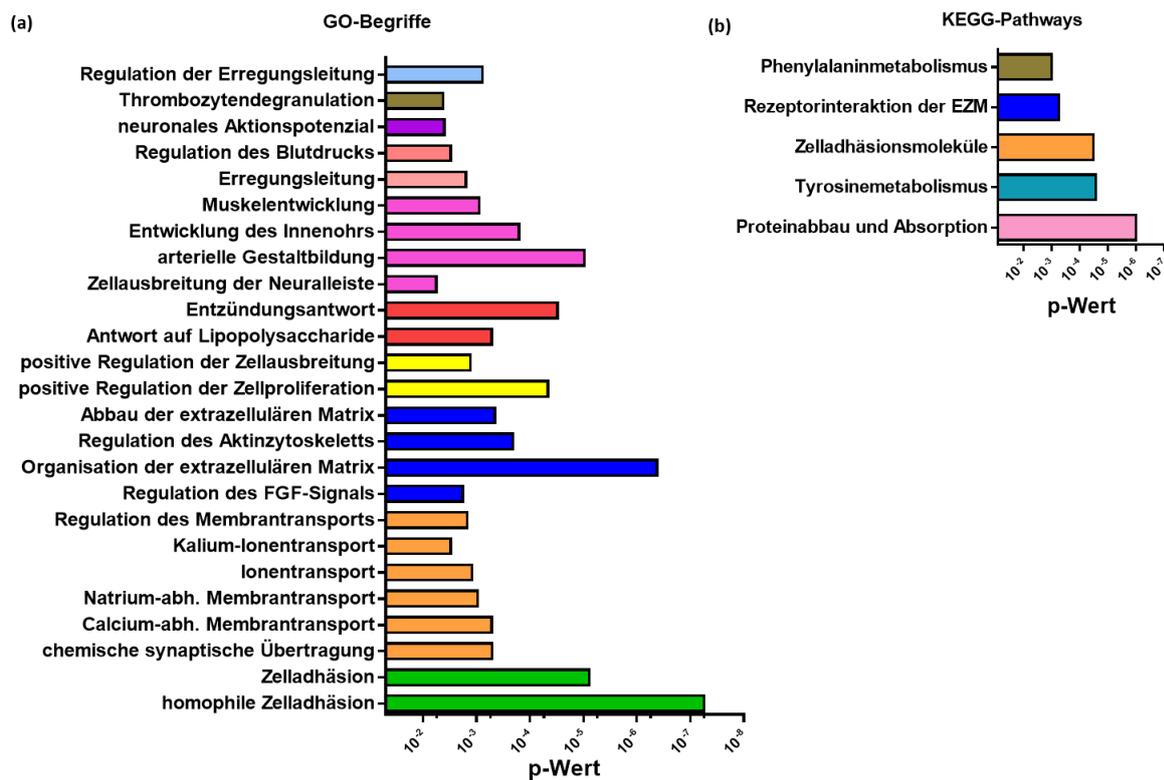


Abbildung 18: **Regulation von Genen durch Kap1 und den MCPyV T-Antigene.** Gene Ontology Begriffe und KEGG-Pathways wurden mittels DAVID Functional Annotation Tool (Huang, Sherman, und Lempicki 2009a, 2009b) identifiziert. **(a)** Gene Ontology Begriffe für die durch Kap1 und MCPyV T-Ag regulierten Gene. Gezeigt sind die 25 GO-Terms mit dem niedrigsten p-Wert. Die farbliche Markierung fasst verwandte Bereiche zusammen. **(b)** Signifikant angereicherte KEGG-Pathways für die durch Kap1 und MCPyV T-Ag regulierten Gene. Gezeigt sind die 5 KEGG-Pathways mit dem niedrigsten p-Wert.

Zusammenfassend wurde in diesem Experiment festgestellt, dass Kap1 einen Einfluss auf die Proliferation und das Wachstum von Zellen hat. Auf diesen Befund wird in der Diskussion bei der Interpretation, warum Kap1 einen negativen Faktor für die MCPyV-Replikation darstellt, genauer eingegangen (Abschnitt 4.6). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Expression der MCPyV T-Antigene zu einer Aktivierung von Genen der Immunantwort führt. Die globalen Effekte auf das

Transkriptom in HEK293 Zellen hingegen waren mit 86 signifikant, differentiell exprimierten Genen vergleichsweise gering. Warum der experimentielle Aufbau in HEK293 Zellen nicht optimal gewählt war, wird in Abschnitt 4.7.2 ebenfalls diskutiert. Dennoch legt die Analyse dieses Datensatzes dar, dass eine große Zahl von Genen in Abhängigkeit von Kap1 und den MCPyV T-Ag reguliert werden. Dabei waren die signifikantesten Gene Ontology Begriffe und die KEGG-Pathways mit Zelladhäsion, Transmembrantransport, extrazellulärer Matrixorganisation, Zellproliferation und Entzündung assoziiert. Der KEGG-Pathway "pathways in cancer" ( $p < 0,001$ ) (Anhang Tab.2) bekräftigt dabei die Beteiligung von Kap1 bei der Entstehung und Entwicklung etlicher Krebsformen (Czerwińska, Mazurek und Wiznerowicz, 2017). Die potentielle Rolle von Kap1 bei der MCPyV-induzierten Transformation wird in Abschnitt 4.8.3 diskutiert.

### **3.5 MCPyV-Replikation in primären Fibroblasten und die Konsequenzen für Kap1**

Der Nachteil an dem Replikationsassay in Fibroblasten ist, dass ein Kap1 k.o. durch die CRISPR-Cas9 Methode in primären Zellen nicht möglich ist. Es wurde daher in dermalen Fibroblasten getestet, welchen Einfluss virale DNA-Replikation auf den Phosphorylierungsstatus von Kap1 ausübt und welche möglichen Auswirkungen das für das weitere Wachstum der Zellen hat.

#### **3.5.1 MCPyV-Replikation in der potenziellen Wirtszelle**

Lange Zeit war die Wirtszelle für das MCPyV nicht bekannt, was das Studieren des Lebenszyklus erheblich erschwerte. 2016 zeigte die Arbeitsgruppe um Jianxin You das erste Mal, dass sich humane dermale Fibroblasten mit Viruspartikeln unter sehr bestimmten Kulturbedingungen infizieren ließen. Diese Ergebnisse konnten in unserer Arbeitsgruppe nur teilweise reproduziert werden. So konnten zwar humane dermale Fibroblasten mit MCPyV-Partikeln infiziert werden, allerdings zu maximal 16 % (Julia Janz Masterarbeit 2017). Zudem konnte in eigenen Experimenten, in denen das MCPyV-Genom transfiziert wurde, niemals virale Transmission beobachtet werden. Obgleich nun ein MCPyV-Infektions-Modell verfügbar ist, ist es weiterhin unglaublich aufwendig eine ausreichend große Zahl an infektiösen, viralen Partikeln herzustellen. So benötigt man für die Infektion von  $2 \times 10^4$  Fibroblasten  $2 \times 10^9$  virale Partikel.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Replikationssystem von Neumann *et al.* (2011) für neonatale dermale Fibroblasten angepasst. Die Menge an religiertem MCPyV-Genom ( $2 \mu\text{g}$  für  $1 \times 10^6$  Zellen) wurde ohne Träger-DNA mittels Elektroporation in Fibroblasten transfiziert. Andere Transfektionsreagenzien wie Lipofectamin (Thermo Fischer), X-treme Gene (Roche) oder PEI führten zu maximal 6 % positiven Zellen (nicht gezeigt). Mittels Elektroporation konnten Transfektionseffizienzen von bis zu 70 % mit einem GFP-Konstrukt erreicht werden

(Experimente von Denise Ohnezeit). Die Transfektion des viralen religierten Genoms wurde mithilfe einer anti-LT Immunfluoreszenz einen Tag später kontrolliert. Abhängig von der Qualität der religierten DNA und dem Konfluenzzustand der Fibroblasten waren 15-40 % der Zellen LT-Ag positiv. Dabei war zu beobachten, dass ungefähr 20 % der Fibroblasten zu diesem Zeitpunkt MCPyV-Replikationszentren aufwiesen. Virale Replikationszentren zeichnen sich durch eine Verdichtung des LT-Ag Signals in bestimmten Regionen im Kern aus. Das LT-Ag ist essentiell für die virale DNA-Replikation und initiiert diese. Dabei sind mehrere LT-Ag in Form von Hexameren an virale Episome gebunden, sodass es zu dieser Signalverstärkung der Antikörperfärbung kommt.

Im Vergleich zu den Tumorzelllinien (HEK293, H1299 und PFSK-1), die im *in vitro* Replikationsassay virale DNA-Replikation unterstützen, zeigten neonatale dermale Fibroblasten eine deutlich robustere virale Replikation. So unterstützen mindestens 10-fach mehr Fibroblasten nach der Transfektion des religierten Genoms virale Genexpression und Replikation. In den zuvor genannten Tumorzelllinien wurde in nur 1-3 % der Zellen virale Genexpression mithilfe von Immunfluoreszenz detektiert (Neumann *et al.*, 2011). In neonatalen dermalen Fibroblasten wurden zudem in der Immunfluoreszenz deutlich mehr Zellen mit Replikationszentren gezählt. Zu frühen Zeitpunkten (zwei Tage nach der Transfektion) zeigten etwa 20 % der Fibroblasten Replikationszentren, während es zu späteren Zeitpunkten (acht Tage nach der Transfektion) etwa ein Drittel aller Zellen waren (Abbildung 23a, b). In PFSK-1 Zellen hingegen wurden maximal 5 % der Zellen mit Replikationszentren beobachtet. Diese Beobachtungen zeigen, dass neonatale dermale Fibroblasten virale DNA-Replikation signifikant besser unterstützen. Der Vergleich in Abbildung 19c zeigt, dass dermale Fibroblasten 100-fach mehr virale DNA-Replikation zu unterschiedlichen Zeitpunkten als PFSK-1 Zellen aufwiesen. Laut Liu *et al.* (2016) konnten 15.000 MCPyV-Kopien pro Zelle gemessen werden. In dieser Arbeit konnte niemals virale Transmission in der Kultur beobachtet werden. Die Zahl der MCPyV-positiven Fibroblasten nahm stetig ab, während sich MCPyV-negative Fibroblasten sehr schnell vermehrten.

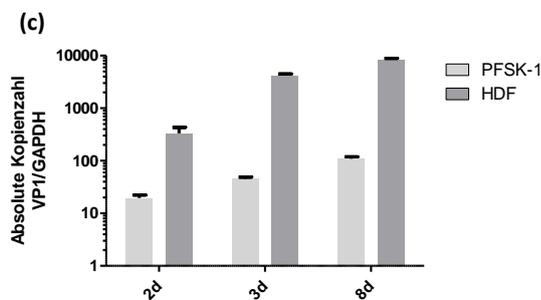
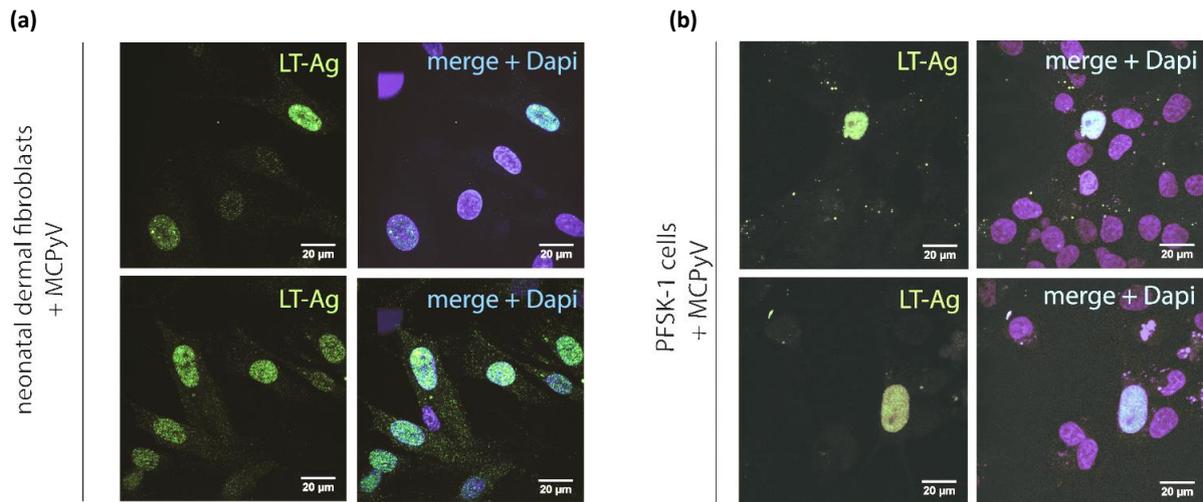
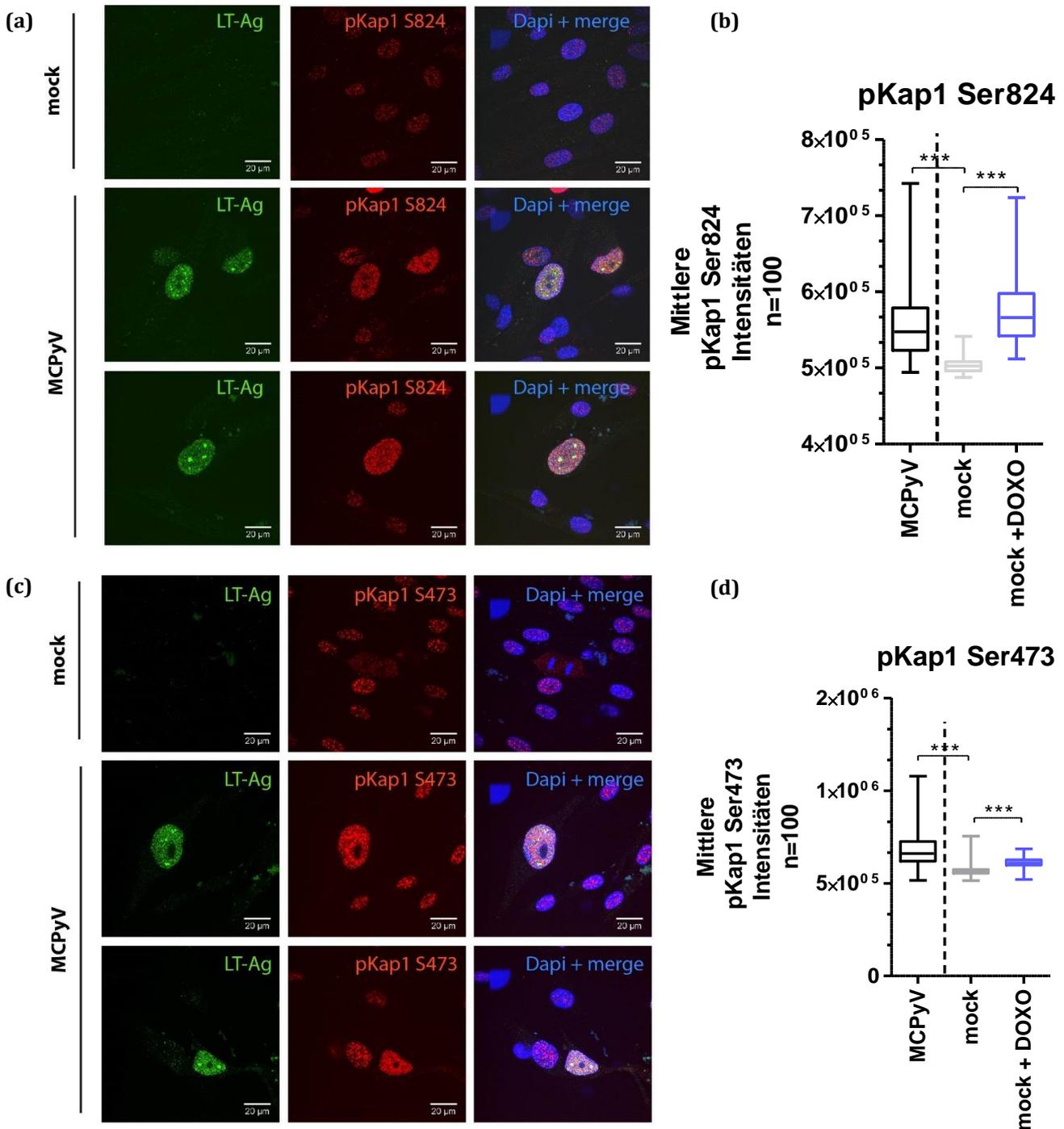


Abbildung 19: **MCPyV-Replikation in der potenziellen Wirtszelle.** (a) Das MCPyV LT-Ag wurde mittels Immunfluoreszenz in neonatalen dermalen Fibroblasten zwei Tage nach der Transfektion des religierten MCPyV-Genoms detektiert. (b) Anti-LT Immunfluoreszenz in PFSK-1 Zellen vier Tage nach der Transfektion des religierten MCPyV-Genoms. (c) Vergleich der absoluten MCPyV-Kopienzahl an unterschiedlichen Zeitpunkten im Replikationsassay in dermalen Fibroblasten und PFSK-1 Zellen.

### 3.5.2 Phosphorylierung von Kap1 Ser824 und Ser473 in MCPyV-positiven primären Fibroblasten

Kap1 stellt ein multifunktionales Protein dar, dessen Funktion über SUMOylierung und Phosphorylierung gesteuert wird (Abschnitt 1.2.1). Die Phosphorylierung von Kap1 am Serin 824 und am Serin 473 regelt die Interaktion mit Heterochromatin-bildenden Komponenten wie dem Heterochromatin Protein 1 (Abschnitt 1.2.2 und 1.2.3).

Der Phosphorylierungsstatus von Serin 824 (pKap1 Ser824) und Serin 473 (pKap1 Ser473) von Kap1 wurde in MCPyV-positiven Fibroblasten mithilfe von Immunfluoreszenz geprüft (Abbildung 20a, c). Hierbei wurde beobachtet, dass die Kap1-Phosphorylierung von Ser824 und Ser473 im Vergleich zu Virus-negativen Fibroblasten deutlich erhöht war. Eine quantitative Auswertung der Intensitäten der Kap1-Phosphorylierung in jeweils 100 Zellen aus unterschiedlichen Bildaufnahmen bestätigte, dass pKap1 Ser824 und Ser473 Intensitäten signifikant anstiegen in



**Abbildung 20: Kap1-Phosphorylierung an Ser824 und Ser473 wird durch das MCPyV ausgelöst.** Neonatale dermale Fibroblasten wurden mit religiertem MCPyV-Genom elektroporiert und acht Tage nach der Transfektion mithilfe von Immunfluoreszenz auf den Kap1-Phosphorylierungsgehalt untersucht. **(a)** anti-LT (Santa Cruz, Cm2B4) und anti-pKap1 Ser824 (abcam, ab70369) Antikörper-Färbung. **(c)** Anti-LT (Santa Cruz, Cm2B4) und anti-pKap1 Ser473 (abcam, ab133225) Antikörper-Färbung. **(b)** **(d)** Die durchschnittlichen Phosphorylierungsintensitäten wurde mithilfe der Fiji-Software quantifiziert. Ser824 Phosphorylierung wurde mit 1  $\mu$ M Doxorubicin 24 Stunden vorher induziert. Gezeigt ist die SD von je 100 Zellen. Der Mann-Whitney Test wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanz verwendet.

Virus-positiven Fibroblasten (Abbildung 20b, d). Als positiv Kontrolle wurden die Fibroblasten mit 1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin für 24 Stunden behandelt. Doxorubicin ist ein DNA-Interkalator und Stabilisator der DNA Topoisomerase II und wird als Zytostatikum bei z.B. Brustkrebs, Blasenkrebs oder Karposi-Sarkomas eingesetzt (Pommier *et al.*, 2010). Die Inkubation von Zellen *in vitro* mit Doxorubicin induziert die Phosphorylierung von pKap1 Ser824 über die ATM-Kinase und führt gleichzeitig zu einer Reduktion der SUMOylierung von Kap1 (Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Dabei aktiviert Doxorubicin die DNA-Schadensantwort und führt zur Phosphorylierung von Effektoren wie u.a. Chk1 und Chk2 (Kurz, Douglas und Lees-Miller, 2004), was letztendlich zu einem Zellzyklusarrest oder Apoptose führt.

Im Zuge der Quantifizierung der Phosphorylierungsintensitäten fiel auf, dass MCPyV-positive Fibroblasten, die virale Replikationszentren besaßen, tendenziell höhere Phosphorylierungslevel zeigten. Etwa ein Drittel aller gezählten Fibroblasten zeigte MCPyV-Replikationszentren, die durch Ansammlung des LT-Ag in Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht wurden. Dabei wurde jede Zelle, die mindestens eine punktartige sich vom Hintergrund deutlich abhebende hellere Struktur im Zellkern aufwies, als Zelle mit aktiven Replikationszentren gezählt. Es wurde ein signifikanter Anstieg der pKap1 Ser824 und pKap1 Ser473 Intensitäten in Zellen mit Replikationszentren im Vergleich zu MCPyV-positiven Zellen ohne sichtbare Replikationszentren festgestellt (Abbildung 23a, b). Diese Tatsache lässt vermuten, dass replikativer Stress, der im Zuge aktiv replizierender viraler Genome entsteht, die Kap1-Phosphorylierung zu einem größeren Teil induzieren als die Anwesenheit der T-Ag ohne virale DNA-Replikation.

Westernblot Analysen wurden zusätzlich eingesetzt, um den beobachteten Phänotyp zu bestätigen (Abbildung 22). Diese Methode ist weniger geeignet als die Untersuchung auf Einzelzellebene, weil in der Bulk-Population ein großer Anteil Virus-negativer Zellen, die Gesamtproteinlevel beeinflusst.

### **3.5.3 Keine Phosphorylierung von Kap1 Ser824 und Ser473 durch die Expression der T-Antigene**

Im Weiteren wurde untersucht, ob die Expression der T-Ag ebenfalls die Phosphorylierung von Kap1 auslöst. Dazu wurden neonatale dermale Fibroblasten mit lentiviralen Partikel transduziert, um stabil einen Leervektor (LeGo-iG), LT-Ag (LeGo-iG-LT), sT-Ag (LeGo-iC2-sT) oder LT-Ag zusammen mit sT-Ag zu exprimieren. Immunfluoreszenzfärbungen von LT-Ag positiven Zellen vier Tage nach Transduktion ergaben, dass Kap1 in Anwesenheit von LT-Ag nicht an Serin 824 phosphoryliert wird (Abbildung 21b). Bei der Phosphorylierung von Kap1 an Serin 473 wurde keine verstärkte Signalintensität im Vergleich zu LT-Ag negativen Zellen festgestellt. Allerdings

veränderte sich die Lokalisation des pKap1 Ser473 Signals von punkteartig zu diffus im Zellkern verteilt (Abbildung 21b). Eine mikroskopische Auswertung mit sT-Ag positiven Zellen konnte nicht vorgenommen werden, da es zum einen keinen kommerziellen und für die Immunfluoreszenz anwendbaren Antikörper für sT-Ag gibt und zum anderen, weil die Expression des Selektionsmarker mCherry zu schwach war. Deswegen wurden zusätzlich Proteinlevel mithilfe von Westernblot gemacht und pKap1-Level überprüft (Abbildung 21a). In Westernblotanalysen konnte keine erhöhten pKap1 Ser824 oder Ser473 Proteinlevel im Vergleich zur mock-Kontrolle beobachtet werden.

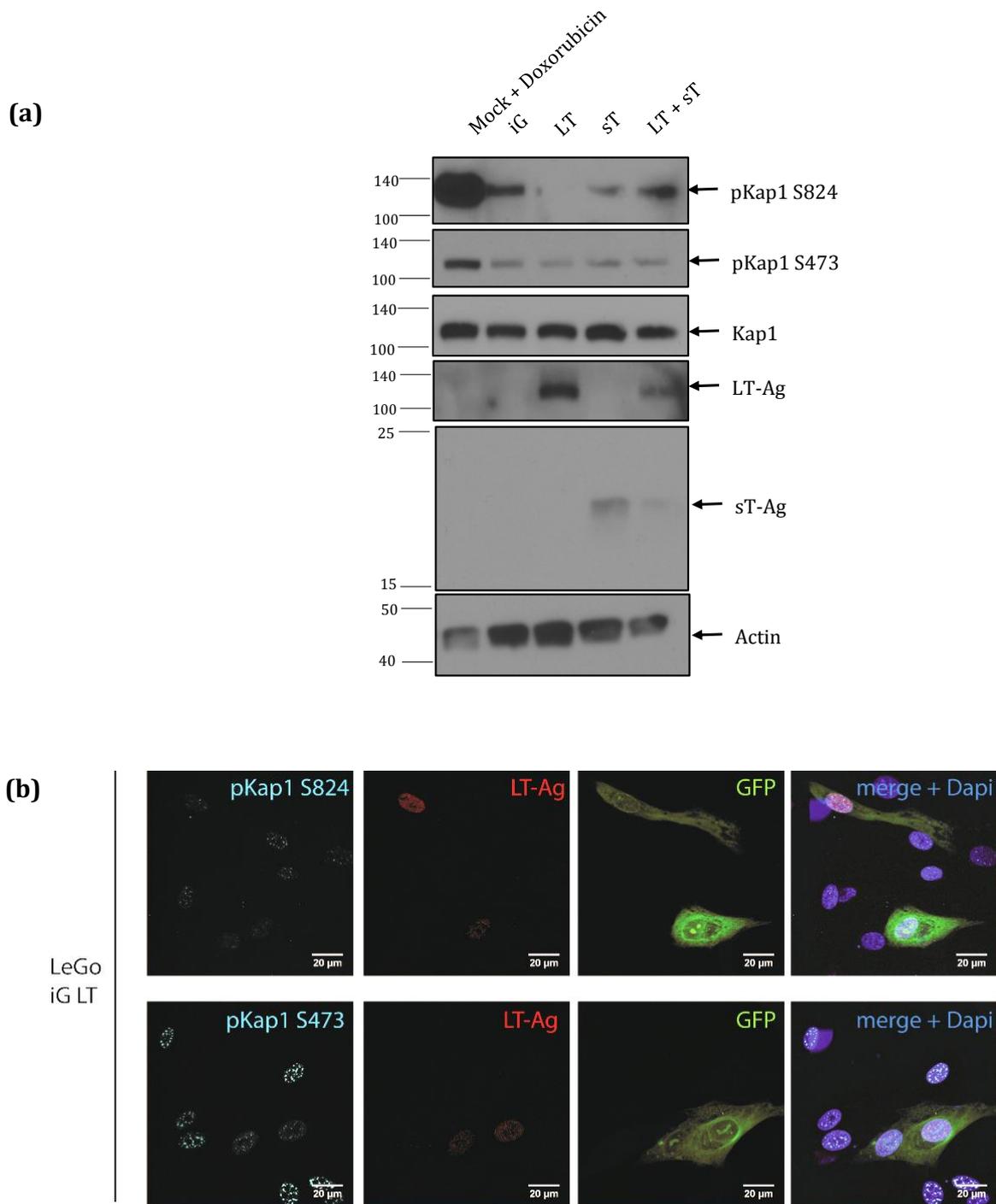


Abbildung 21: **Keine Kap1-Phosphorylierung Ser824 und Ser473 durch die Expression der T-Ag.** **(a)** Neonatale dermale Fibroblasten wurden mit LeGo-iG, LeGo-iG-LT, LeGo-iC2-sT oder LeGo-iG-LT und LeGo-iC2-sT transduziert und vier Tage nach der Transduktion mithilfe von Westernblot untersucht. 50  $\mu$ g Protein wurden aufgetragen. **(b)** Neonatale dermale Fibroblasten wurden mit einem LeGo-iG-LT Konstrukt elektroporiert und zwei Tage nach der Transfektion mithilfe von Immunfluoreszenz auf den Kap1-Phosphorylierungsgehalt untersucht. Verwendete Antikörper: anti-pKap1 Ser824 (abcam, ab70369), anti-pKap1 Ser473 (abcam, ab133225), anti-Kap1 (Santa Cruz, sc-33186), anti-LT (Santa Cruz, Cm2B4) und anti-sT (2T2 Hybridomüberstand).

### **3.5.4 Kap1-Phosphorylierung durch MCPyV-Genommutanten**

Aus der Tatsache, dass die MCPyV T-Antigene keine Kap1-Phosphorylierung induzieren, lässt sich schlussfolgern, dass ein anderer Faktor oder eine Eigenschaft des Virus für die posttranslationale Modifikation von Kap1 verantwortlich ist. Um die Bedeutung viraler DNA-Replikation auf den Phosphorylierungsphänotyp aufzuklären, wurden unterschiedliche MCPyV-Genommutanten in Anlehnung an bereits bekannte Literatur hergestellt und im zuvor beschriebenen Replikationsmodell getestet. Die Genommutante K331A besitzt eine Punktmutation in der OBD des LT-Ags, die die spezifische Motivbindung an den viralen Ori aufhebt und somit ein replikationsdefizientes Virus abbildet (Harrison et al. 2011; Theiss und Siebels, Manuskript in Arbeit). Die Genommutante S816A hingegen besitzt eine Serin-Alanin-Substitution im LT-Ag, die eine Phosphorylierung an Ser816 des LT-Ags verhindert. Dabei wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung an Ser816 durch die ATM-Kinase erfolgt und für die zytotoxischen Eigenschaften von dem C-Terminus des LT-Ags verantwortlich ist (Li *et al.* 2015). Der Anteil der Zellen, in denen LT-Ag exprimiert wurde, wurde an Tag 2 nach der Transfektion der unterschiedlichen Genome mithilfe von Immunfluoreszenz überprüft und betrug 15-40 %.

In neonatalen dermalen Fibroblasten zeigten Immunfluoreszenzfärbungen zwei Tage nach der Transfektion der religierten Genome, dass wt-MCPyV und S816A-Mutante virale Replikationszentren aufwiesen, während die Replikations-defiziente K331A-Mutante, keine Anhäufung von LT-Ag in Replikationszentren zeigten (Anhang Abb. 3 und Anhang Abb. 4). Westernblotanalysen der MCPyV-positiven Mischpopulation zwei und fünf Tage nach der Transfektion zeigten leicht erhöhte pKap1 Ser824 und pKap1 Ser473 bei wt-MCPyV und S816A-Mutante (Abbildung 22). Das replikationsdefiziente Virus induzierte nicht die Phosphorylierung von Kap1, was zusätzlich darauf hindeutet, dass Stress, ausgelöst durch virale DNA Replikation, eine größere Rolle für die Modifizierung von endogenem Kap1 spielt als die MCPyV T-Antigene selbst.

### **3.5.5 Phosphorylierung von Kap1 Ser824 erfolgt über ATM**

Da die Mechanismen der Phosphorylierung von Kap1 an Serin 824 als Folge von DNA-Schädigung bereits sehr gut untersucht worden sind (White *et al.*, 2006) und aus früheren Publikationen bekannt ist, dass die Replikation des MCPyV in U2OS Zellen zu einer Aktivierung der ATM-Kinase führt (Li *et al.*, 2013), wurde untersucht, ob die beobachtete Phosphorylierung von Kap1 Ser824 in MCPyV-positiven dermalen Fibroblasten über die ATM-Kinase erfolgte.

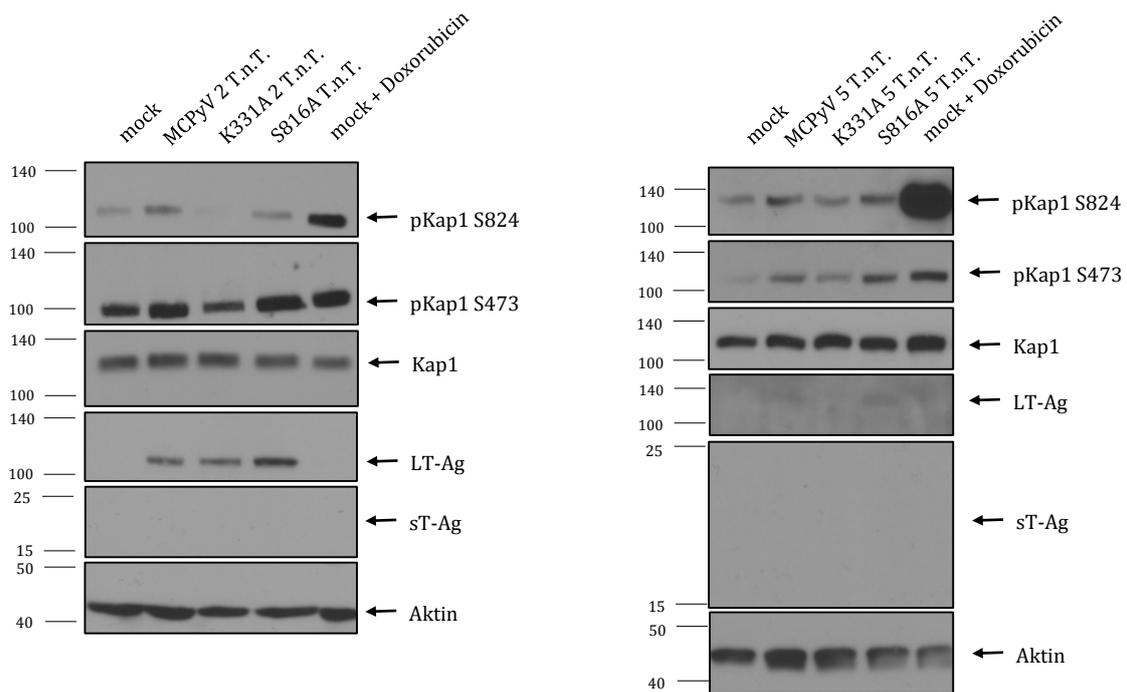


Abbildung 22: **Kap1-Phosphorylierung durch MCPyV-Genommutanten zwei und fünf Tage nach der Transfektion.** Neonatale dermale Fibroblasten wurden mit religiertem MCPyV-Wildtyp und Mutantengenom (die replikationsdefiziente K331A-Mutante oder die anti-apoptotische S816A-Mutante) transfiziert und zwei und fünf Tage nach der Transfektion wurden RIPA-Extrakte hergestellt. Verwendete Antikörper: anti-pKap1 Ser824 (abcam, ab70369), anti-pKap1 Ser473 (abcam, ab133225), anti-Kap1 (Santa Cruz, sc-33186), anti-LT (Santa Cruz, Cm2B4), Hybridomüberstand anti-sT (2T2) und anti-Aktin (Santa Cruz, C4).

Neonatale dermale Fibroblasten wurden mit religiertem Genom oder Kontroll-DNA transfiziert. Sieben Tage nach der Transfektion wurden die MCPyV-positiven Zellen mit und ohne dem ATM-Inhibitor KU55933 für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle wurden Kontrollzellen mit dem ATM-Aktivator Doxorubicin oder Doxorubicin in Kombination mit KU55933 für 24 Stunden inkubiert. Die Quantifizierung von 100 Zellen aus unterschiedlichen Bildausschnitten ergab, dass die Behandlung mit dem ATM-Inhibitor pKap1 Ser824 Intensitäten signifikant reduzierte (Abbildung 23c, d). In MCPyV Infektions-Experimenten konnte dieses Ergebnis reproduziert werden, allerdings mit einer geringeren Zellzahl (Abbildung 24).

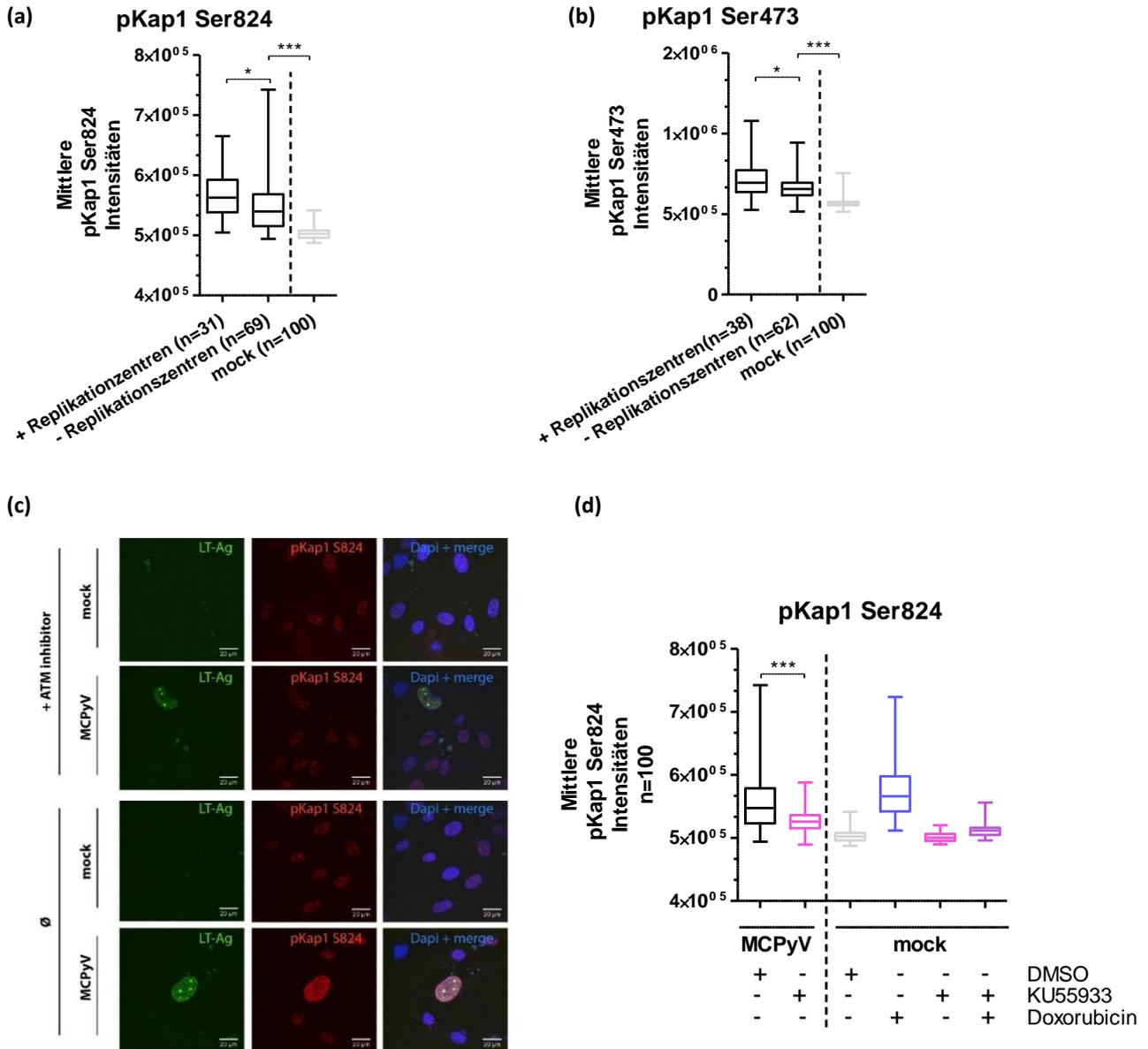


Abbildung 23: **Phosphorylierung von Kap1 Ser824 erfolgt über den ATM-Signalweg.** Neonatale dermale Fibroblasten wurden mit religiertem MCPyV-Genom elektroporiert und acht Tage nach der Transfektion mithilfe von Immunfluoreszenz auf ihren Kap1-Phosphorylierungsgehalt untersucht. **(a)** Kap1-Phosphorylierung an Serin 824 ist erhöht in aktiv replizierenden MCPyV-positiven Fibroblasten. **(b)** Kap1-Phosphorylierung an Serin 473 ist erhöht in aktiv replizierenden MCPyV-positiven Fibroblasten. **(c)** An Tag 7 nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit 10  $\mu$ M ATM-Inhibitor KU55933, mit 1  $\mu$ M Doxorubicin oder mit 10  $\mu$ M ATM-Inhibitor KU55933 und 1  $\mu$ M Doxorubicin behandelt. Immunfluoreszenz: MCPyV LT-Ag (Santa Cruz, Cm2B4), anti-pKap1 Ser824 (abcam, ab70369) und Dapi. **(d)** Die durchschnittlichen Kap1-Phosphorylierungslevel Ser824 Intensitäten wurden mithilfe der Fiji-Software quantifiziert. Der Mann-Whitney Test wurde verwendet um auf Signifikanz zu testen. Gezeigt ist die SD von je 100 Zellen.

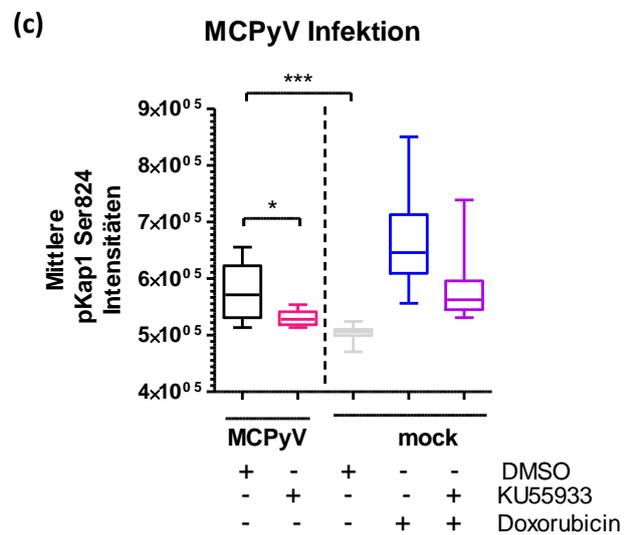
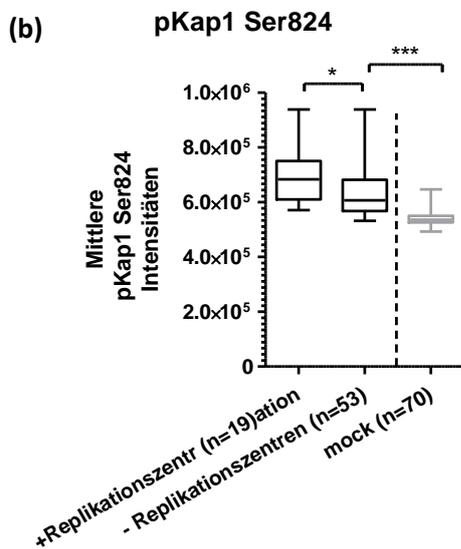
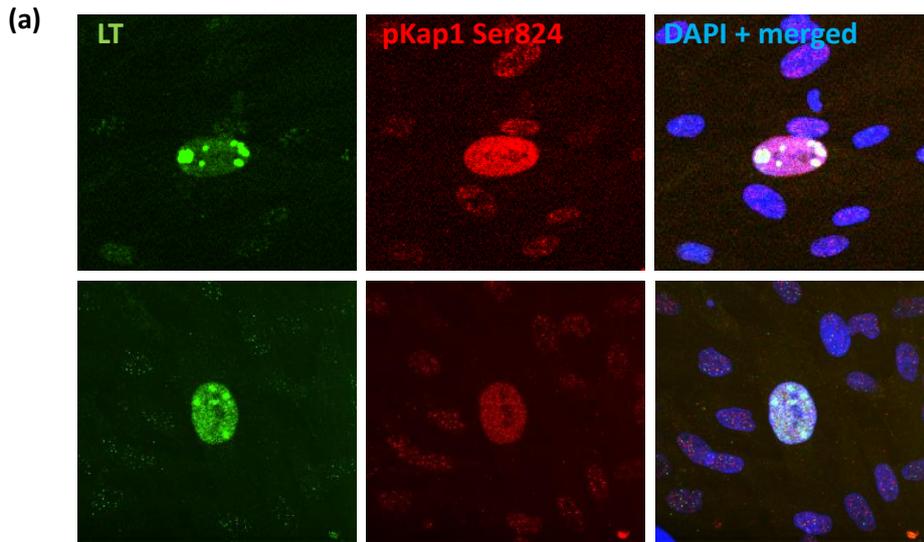


Abbildung 24: **Phosphorylierung von Kap1 Ser824 in MCPyV-infizierten Fibroblasten.**  $2 \times 10^4$  dermale Fibroblasten wurden mit  $2 \times 10^9$  MCPyV-Partikeln infiziert und zwei Wochen nach der Infektion mithilfe von Immunfluoreszenz auf ihren Kap1-Phosphorylierungsgehalt untersucht. **(a)** Cm2B4 und anti-Kap1 Ser824 (abcam, ab70369) Antikörperfärbung. **(b)** Die durchschnittlichen pKap1 Ser824 Intensitäten in MCPyV-positiven und Virus-negativen Fibroblasten wurden mithilfe der Fiji-Software quantifiziert. Der Mann-Whitney Test wurde verwendet, um auf statistische Signifikanz zu testen. Gezeigt die SD von 19, 52 und 70 Zellen. **(c)** pKap1 Ser824 wird durch die ATM-Kinase ausgelöst. Fibroblasten wurden für 24 Stunden entweder mit DMSO, dem ATM-Inhibitor  $10 \mu\text{M}$  KU55933 und mit  $1 \mu\text{M}$  Doxorubicin plus  $10 \mu\text{M}$  DKU55933 inkubiert. Als Positivkontrolle wurde pKap1 Ser824 mit Doxorubicin induziert. Die durchschnittlichen pKap1 Ser824 Intensitäten in MCPyV-positiven und Virus-negativen Fibroblasten wurden mithilfe der Fiji-Software quantifiziert. Gezeigt sind die SD von  $n(1-5)=10; 14; 30; 30; 30$  Zellen. Der Mann-Whitney Test wurde verwendet, um auf statistische Signifikanz zu testen.

### 3.5.6 Hochregulation der *p21*-Transkripte in MCPyV-positiven Fibroblasten

Es wurde in Abschnitt 3.5.2 gezeigt, dass der Phosphorylierungsstatus in MCPyV-positiven Fibroblasten im Vergleich zu MCPyV-negativen Fibroblasten verändert ist. Im Weiteren wurden die Konsequenzen dieser Phosphorylierung untersucht. Ein Gen, das direkt über Kap1 reguliert wird, ist der Zellzyklusregulator *p21* (Abschnitt 1.2.2). Es wurde im Folgenden untersucht inwieweit die *p21*-Transkripte als Konsequenz der Kap1-Phosphorylierung in MCPyV-positiven Fibroblasten aktiviert wurden. Dazu wurde zwei und vier Tage nach der Transfektion der Genome RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relativen *p21*-Transkripte im Vergleich zu den beiden *Housekeeping*-Genen *hprt1* und *ywhaz* bestimmt. Abbildung 25a zeigt, dass die *p21*-Transkripte in MCPyV-positiven Fibroblasten im Vergleich zu MCPyV-negativen Fibroblasten erhöht sind. Dieser Unterschied ist an Tag 2 statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ) und deutet auf eine Derepression des *p21*-Promoters hin. Die replikationsdefiziente-Genommutante K331A weist statistisch keine erhöhten *p21*-Level auf, was im Einklang mit der Beobachtung ist, dass die Mutante keine virale DNA-Replikation unterstützt. Interessanterweise verhält sich die S816A-Mutante an Tag 2 und 4 nach der Transfektion wie das Wildtyp-MCPyV. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass virale Replikation unabhängig von der Expression der T-Ag zur Phosphorylierung von Kap1 führt.

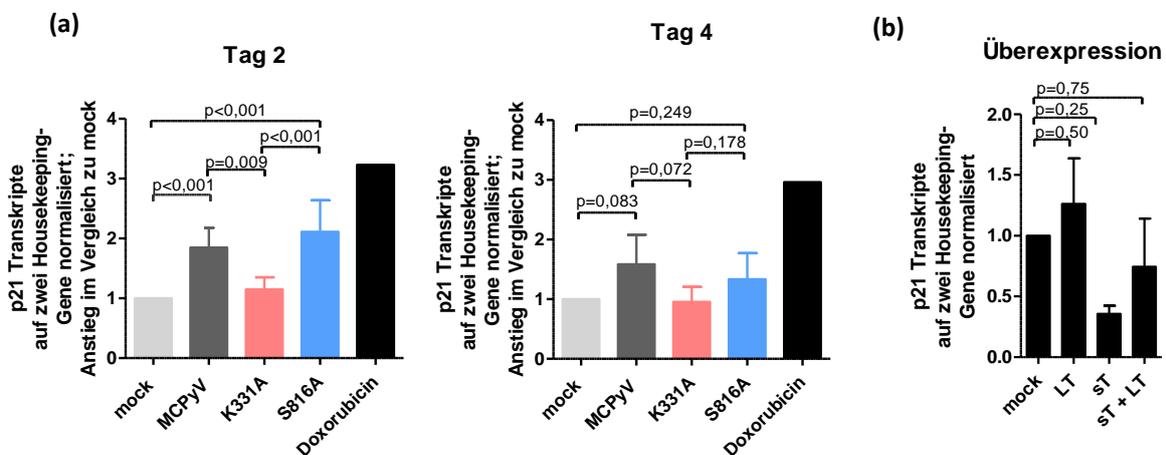


Abbildung 25: **Abwärts von Kap1 werden *p21*-Transkripte reguliert.** **(a)** *p21*-Transkripte in MCPyV-positiven dermalen Fibroblasten.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden mit  $2 \mu\text{g}$  pUC18, religiertem Wildtyp-MCPyV, K331A oder S816A Genom elektroporiert. Zwei und vier Tage nach der Transfektion wurde RNA isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Relative *p21*-Transkripte wurden auf zwei *Housekeeping*-Gene normalisiert und als Anstieg im Vergleich zu mock dargestellt. Aufgrund von fehlenden Werten sowie der hohen Varianz bei der Messung von Transkripten, die Zellzyklus-abhängig reguliert werden, wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanz ein gemischtes Mehrebenenanalysemodell (*random intercept model*) verwendet ( $n=4$ ). **(b)** *p21*-Transkripte in dermalen Fibroblasten bei MCPyV T-Antigenen Überexpression. nHDFs wurden mit LT-Ag, sT-Ag oder MCPyV T-Region transient transfiziert und *p21*-Transkripte zwei Tage nach der Transfektion mittels RT-qPCR detektiert. Relative *p21*-Transkripte wurden auf zwei *Housekeeping*-Gene normalisiert und als Anstieg im Vergleich zu mock dargestellt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde ein One-Sample T-Test verwendet ( $n=3$ ).

### **3.5.7 Keine signifikante Erhöhung der *p21*-Transkripte durch die Expression der T-Antigene**

Im Nachfolgenden wurde betrachtet, ob die MCPyV T-Antigene, die keine Phosphorylierung von Kap1 induzieren, *p21*-Transkripte in primären Fibroblasten regulieren. Li *et al.* (2013) zeigte in U2OS Zellen, dass MCPyV LT-Ag infolge der wachstumshemmenden Eigenschaften, *p21*-Transkription aktivierte. Neonatale dermale Fibroblasten wurden mit LT-Ag, sT-Ag oder MCPyV frühe T-Region mittels Elektroporation transfiziert und zwei Tage nach der Transfektion RNA geerntet. Abbildung 25b zeigt, dass es keine statistisch signifikanten Veränderungen der *p21*-Transkripte im Vergleich zu mock-transfizierten Zellen gibt.

### **3.5.8 Verringerte Proliferation von MCPyV-positiven primären Fibroblasten**

Es wurde bereits in unterschiedlichen Studien gezeigt, dass der C-Terminus von LT-Ag wachstumshemmende Eigenschaften besitzt und zur verminderten Proliferation und Apoptose führt (Cheng *et al.* 2013; J. Li *et al.* 2013; Theiss *et al.* Manuskript in Arbeit). In dieser Arbeit wurde die Proliferation von MCPyV-positiven dermalen Fibroblasten im Vergleich zu mock-transfizierten Fibroblasten untersucht. Um den Einfluss der viralen Replikation zu untersuchen, wurde die Proliferation der Zellen mit der replikationsdefizienten K331A-Mutante integriert. Des Weiteren wurden die Wachstumseigenschaften der S816A-Mutante analysiert, um den Einfluss der T-Ag von dem Einfluss der viralen DNA-Replikation entkoppeln zu können.

Neonatale dermale Fibroblasten wurden mit den unterschiedlichen MCPyV-Genomen transfiziert und am nächsten Tag für MTT-Analysen und Zellzählungsversuche ausgesät. Dafür wurde die Proliferation der MCPyV-positiven Zellen im Vergleich zu MCPyV-negativen Zellen über sechs Tage verfolgt. Der MTT-Assay (Millipore) eignete sich aufgrund der rapiden Proliferation der mock-Fibroblasten nur bis Tag 5 nach der Transfektion. Die Zellzählungsversuche waren hinsichtlich der Sensitivität geeigneter, zeigten aufgrund des aufwendigeren Handlings und der Variabilität des automatischen Zellzählers (Biorad) deutlich höhere Standardabweichungen. Beide Untersuchungsmethoden ergaben, dass MCPyV-positive Fibroblasten weniger proliferierten als mock-transfizierte Fibroblasten (Abbildung 26). Die K331A-Mutante hingegen zeigte kein verringertes Wachstum, sondern verhielt sich ähnlich wie die Kontrollzellen. Kontroverserweise zeigte die S816A-Mutante nicht nur ein signifikant reduziertes Wachstum im Vergleich zu Kontrollzellen, sondern auch deutlich langsames Wachstum als Fibroblasten, die das Wildtyp-MCPyV trugen.

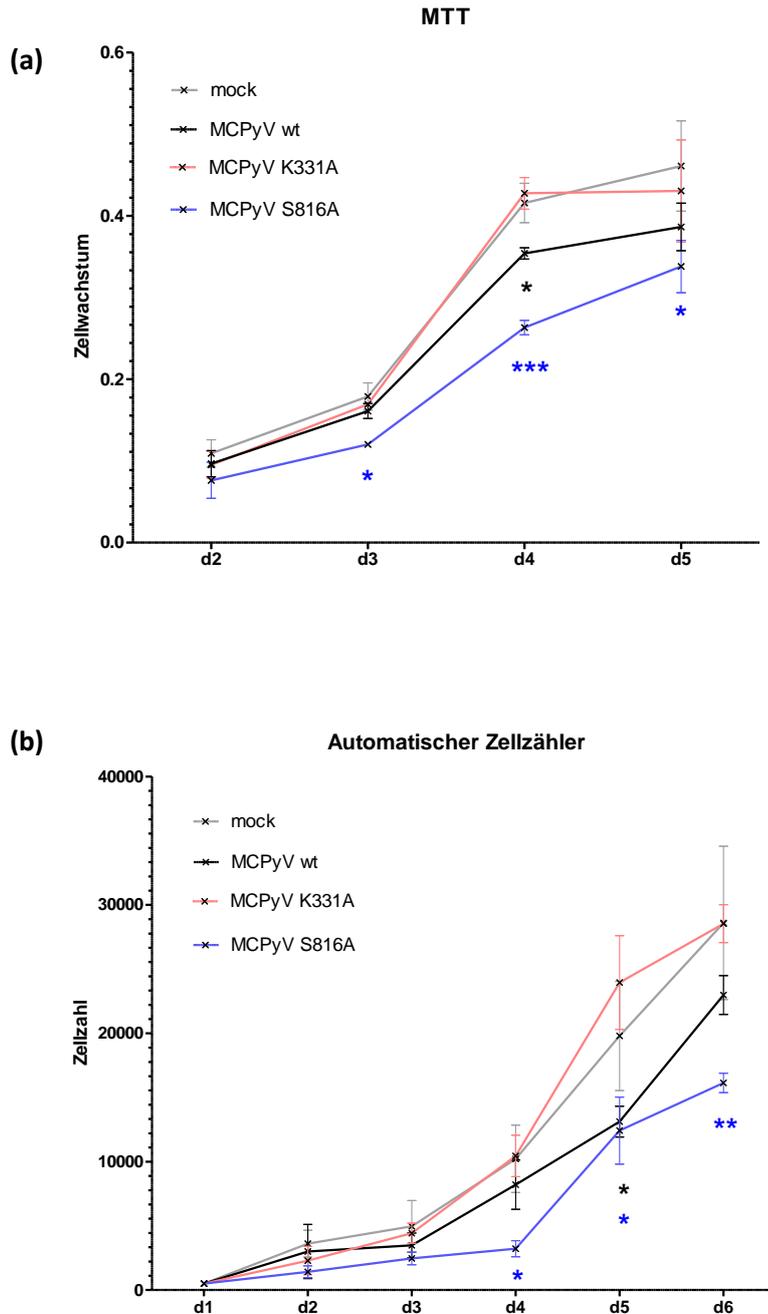


Abbildung 26: **Verringerte Proliferation von MCPyV-positiven primären Fibroblasten.** Neonatale Fibroblasten wurden mit religiertem MCPyV oder Mutantengenom (K331A oder S816A) transfiziert. 1 T.n.T. wurden die Fibroblasten für Zellzählungs-Experimente und Proliferationsexperimente in 96-well Platten ausgesät. **(a)** Proliferation von MCPyV-positiven Zellen im Vergleich zu Virus-negativen Zellen wurde mithilfe des MTT-Assays (Millipore) bestimmt. Mittels ungepaarten t-Test wurde auf statistische Signifikanz getestet. n=3 **(b)** Wachstumsverhalten von MCPyV-positiven Zellen im Vergleich zu Virus-negativen Zellen wurde durch automatische Zellzählung (Biorad cell counter) bestimmt. Aus n=4 wurde mittels ungepaarten t-Test auf Signifikanz getestet.

Diesen Daten weisen darauf hin, dass die verringerte Proliferation in primären Fibroblasten durch das MCPyV vorrangig durch replikativen Stress hervorgerufen wird und erst zweitrangig durch die Eigenschaften des LT-Ag. Allerdings ist der deutliche Phänotyp der S816A-Mutante unklar. In Abschnitt 4.4.2 wird diese Beobachtung weiter diskutiert. Dieser Versuch deutet ebenfalls darauf hin, dass der wachstumsinhibierende Phänotyp in MCPyV-positiven Fibroblasten über einen anderen Mechanismus als die Aktivierung von p53 durch LT-Ag und die Phosphorylierung von LT an Ser816 reguliert wird. Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass dieser alternative Mechanismus vermutlich Kap1 und Kap1-regulierte Gene wie *p21* involviert.

### 3.5.9 G2-Arrest in MCPyV-positiven Zellen

Es wurde nicht nur beobachtet, dass MCPyV-positive Fibroblasten eine verringerte Proliferation im Vergleich zu Virus-negativen Fibroblasten aufwiesen, sondern dass überdies alle Virus-positiven Zellen einen stark vergrößerten Zellkern besaßen (zelluläre Hypertrophie). Wir untersuchten inwieweit die Aktivierung der DNA-Schadensantwort den weiteren Verlauf der Zellen im Zellzyklus beeinträchtigten.

Um den Anteil der unterschiedlichen Zellzyklusphasen in Virus-positiven Zellen einzugruppieren, wurden neonatale dermale Fibroblasten mit religiertem Genom transfiziert und zwei und vier Tage nach der Transfektion mittels Propidiumiodidfärbung der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt. Tote Zellen und Duplikate wurden von der Analyse mithilfe der Durchflusszytometrie ausgeschlossen. Die Verteilung der Zellen entsprechend ihrer Größe und Granularität (FSC gegen SSC) zeigte bereits, dass sich MCPyV-positive Zellen deutlich von ihrer Größe und Struktur von den Virus-negativen Zellen unterschieden (Abbildung 27a). Mithilfe der FlowJo-Software wurden die Zellen auf Grundlage des Dean-Jett-Fox Algorithmus entsprechend ihres DNA-Gehalts in G1, S oder G2-Phase eingeordnet. Dabei wurde in MCPyV-positiven Fibroblasten im Vergleich zu Virus-negativen Zellen zwei und vier Tage nach der Transfektion ein signifikanter Anstieg von Zellen in der G2-Phase detektiert (Abbildung 27b). Spätere Zeitpunkte wurden nicht untersucht, da man berücksichtigen muss, dass alle Versuche mit einer MCPyV-positiven Mischpopulation durchgeführt wurden.

Abbildung 27c zeigt exemplarisch ein Propidiumiodid-Histogramm von Virus-negativen Fibroblasten (mock) im Vergleich zu den unterschiedlichen Virus-Mutanten vier Tage nach der Transfektion. Vergleicht man die Anzahl der Zellen in G2 in den unterschiedlichen Virus-Mutanten, so ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Virus-Mutanten oder zu den Virus-negativen Zellen. Dieser Effekt ist vermutlich der großen Variabilität des Versuches zuzuschreiben. Allerdings passt der beobachtete Trend mit den

Ergebnissen der Proliferationsstudien zusammen, der keinen Unterschied zwischen Virus-negativen und replikationsdefizienter K331A Mutante zeigt. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase steigt hingegen mit dem Wildtyp-MCPyV und der S816A-Genommutante an.

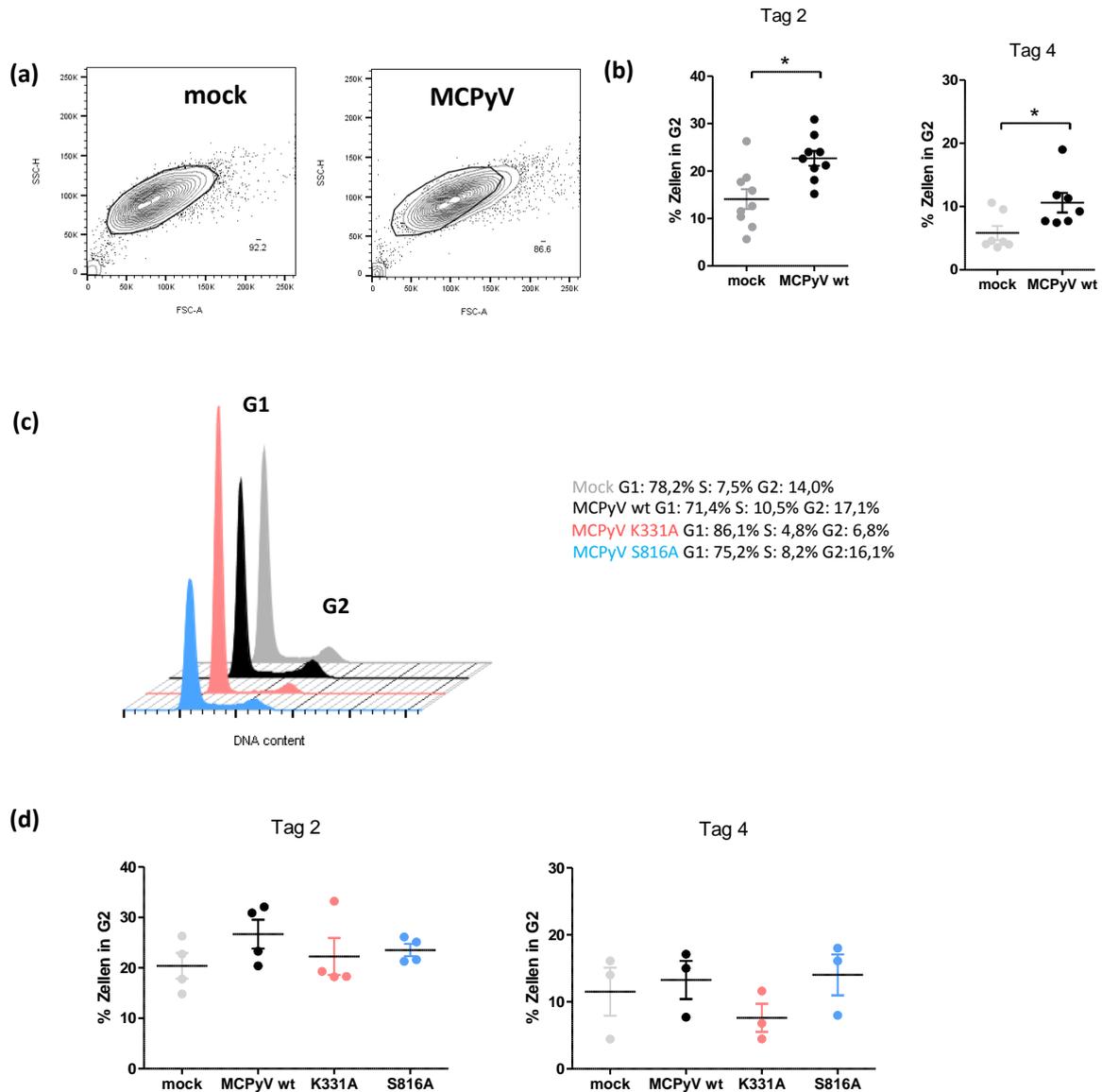


Abbildung 27: **G2-Arrest in MCPyV-positiven Zellen.** Neonatale dermale Fibroblasten wurden mit repliziertem MCPyV-Genom transfiziert und zwei und vier Tage nach der Transfektion mit Propidiumiodid gefärbt. Zellzyklusphasen wurden mithilfe von Durchflusszytometrie und der FlowJo Software bestimmt. **(a)** Granularität und Zellgröße von 20.000 MCPyV-positiven und Virus-negativen Zellen zwei Tage nach der Transfektion eines repräsentativen Durchflusszytometriebots. **(b)** Prozent an Zellen in der G2 Zellyklus-Phase in MCPyV-positiven und Virus-negativen Zellen zwei und vier Tage nach der Transfektion. Ein t-Test wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanz verwendet. **(c)** Repräsentatives Propidiumiodid-Histogramm von MCPyV-positiven Fibroblasten, Genommutanten und Virus-negativen Fibroblasten vier Tage nach der Transfektion. Mittels FlowJo-Software und Dean-Jett-Fox-Algorithmus wurde der Anteil der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen berechnet. **(d)** Prozent an Zellen in der G2-Phase zwei und vier Tage nach der Transfektion. Die beobachteten Unterschiede sind statistisch nicht signifikant (t-Test).

Eine Anhäufung von Zellen in der G2-Zellzyklusphase bezeichnet man als einen G2-Arrest. In diesem Zustand sorgt der G2/M-Kontrollpunkt dafür, dass Zellen mit beschädigten Erbmateriale nicht in die Mitose eintreten und fehlerhaftes Material nicht an Tochterzellen weitergegeben wird. In der Regel wird der G2/M-Kontrollpunkt nicht überschritten, solange DNA-Schäden detektiert und beseitigt werden.

### **3.5.10 MCPyV-positive primäre Fibroblasten und Seneszenz**

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Anteil von Zellen in der G2-Zellzyklusphase in MCPyV-positiven Fibroblasten signifikant gegenüber Virus-negativen Zellen erhöht ist. Die Konsequenzen eines G2-Zellzyklusarrests können entweder jegliche Form von Zelltod oder zelluläre Seneszenz sein. Als zelluläre Seneszenz wird ein irreversibler Zellzyklusarrest bezeichnet, der mit dem Verlust des Proliferationspotentials von Zellen einhergeht. Seneszente Zellen können mit der sogenannten Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidasefärbung ( $\beta$ -Gal) sichtbar gemacht werden.

Ausschließlich frühe Passagen neonatale dermale Fibroblasten (P2-P5) wurden mit reliktiertem MCPyV-Genom transfiziert und sorgfältig unter Zellkulturbedingungen über neun Tage kultiviert ohne dabei Konfluenz zu erreichen. Am Tag neun nach Transfektion wurden MCPyV-positive ebenso wie MCPyV-negative Fibroblasten auf Glas-Coverslips zu einer Konfluenz von 50 % ausgesät. 24 Stunden später wurde die Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Gal-Färbung in Kombination mit Immunfluoreszenzfärbung des LT-Ags durchgeführt, um seneszente und MCPyV-positive Fibroblasten sichtbar zu machen. Die Auswertung erfolgte über Hellfeldmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie. Der Anteil an MCPyV-positiven Zellen zehn Tage nach der Transfektion war mit ca. 1-3 % im Vergleich zu Tag 2 nach Transfektion sehr viel geringer. Dennoch zeigten ein großer Teil der MCPyV-positiven Zellen zu diesem späten Zeitpunkt die grün-bläuliche  $\beta$ -Galaktosidasefärbung im Zytoplasma der Zellen (Abbildung 28). Hierbei wurde erneut beobachtet, dass es sich dabei oftmals um Zellen mit vergrößertem Zellkern handelte. Diese Kerne wiesen sogar virale Replikationszentren auf. Virus-negative Fibroblasten zeigten zu geringen Maße  $\beta$ -Gal-positive Zellen, diese Zellen unterschieden sich morphologisch allerdings wenig von  $\beta$ -Gal negativen Zellen.

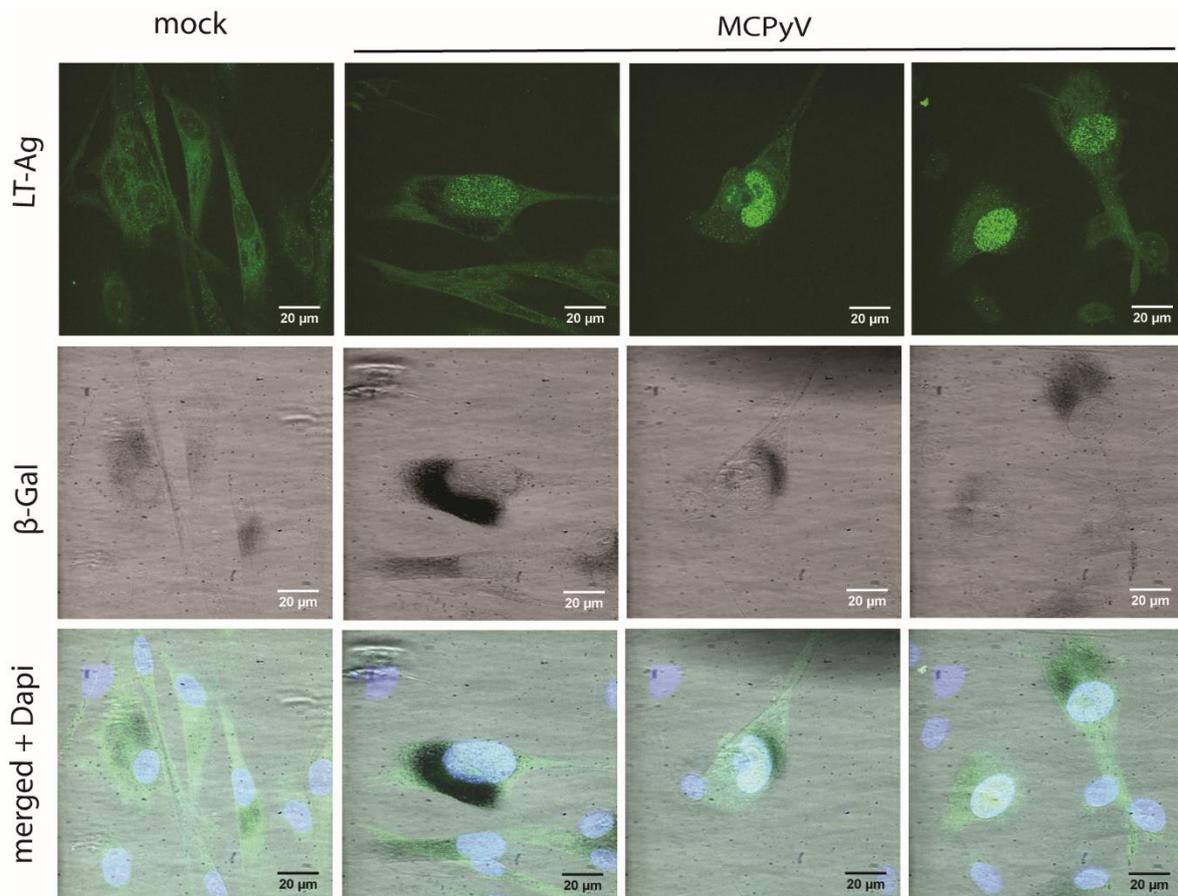


Abbildung 28: **MCPyV-positive primäre Fibroblasten zeigen einen seneszenten Phänotyp.** β-Galaktosidasefärbung als Biomarker für Seneszenz. Neonatale dermale Fibroblasten wurden mit religiertem MCPyV-Genom transfiziert und neun Tage sorgfältig unter Zellkulturbedingungen kultiviert ohne Konfluenz zu erreichen. An Tag 10 wurden die Fibroblasten fixiert und eine β-Galaktosidasefärbung in Kombination mit einer Immunfluoreszenzfärbung gegen das MCPyV LT-Ag durchgeführt.

### 3.5.11 MCPyV T-Antigene und Kap1 regulieren Komponenten des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps.

Bei der Analyse der RNA-Seq Daten aus Abschnitt 3.4 wurde bereits festgestellt, dass Gene, die differentiell durch die MCPyV T-Ag und Kap1 reguliert werden, in GO-Begriffe clustern, die mit der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, mit Wachstumsfaktoraktivität, Proliferation und Entzündung assoziiert sind (Anhang Tab. 5). Die Sekretion genau dieser Gene zeichnet den Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) aus (Abschnitt 1.3). Die genauere Betrachtung der differentiell regulierten Transkripte mithilfe der IPA® Software (Qiagen) zeigte, dass viele Gene, die in Zusammenhang mit einem SASP beschrieben wurden, in Anwesenheit von Kap1 hochreguliert vorliegen. In Abwesenheit von Kap1 hingegen lagen diese Transkripte zum Teil deutlich reduziert vor (z.B. alle Interleukine, *tnf*, *igf*, *egf* oder *vegfa*) oder wurden sogar signifikant herunterreguliert (z.B. *hgf*, *hbegf* oder *pdgfb*) (Abbildung 29).

Da weder das DAVID-Tool noch die Ingenuity-Software einen GO-Begriff oder Signalweg beschreibt, der Gene des SASPs zusammenfasst, wurde eine solche Gruppe auf Grundlage der GeneCards® Datenbank (<https://www.genecards.org/>) zusammengestellt. Die Suche nach "SASP" identifizierte 212 Gene (Stand 09.07.2018), die in unterschiedlichen Publikation mit einem Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp beschrieben wurden (Anhang Tab. 8). Unter Berücksichtigung der aus Vergleich (5) und (6) signifikant differentiell exprimierten Gene (Abbildung 17d, e) und der Gesamtzahl an differentiell exprimierten Genen wurde berechnet, inwieweit Gene des SASP angereichert vorliegen. Unter Verwendung der aus Vergleich (5) und (6) differentiell exprimierten Genen (aus Anhang Tab. 5; n=1512) wurde eine Überrepräsentation des SASP-Pathways ( $p=0.0088$ ) festgestellt. Die Expression dieser Komponenten wurden noch nicht experimentell bestätigt, diese Transkriptomanalysen legen jedoch die Vermutung nahe, dass Kap1 in MCPyV-positiven Fibroblasten an der Ausprägung und Zusammensetzung des SASP mitwirken könnte.

Die Beobachtung, dass MCPyV DNA-Replikation in primären Fibroblasten einen seneszenten Phänotyp auslöst, ist hinsichtlich der zugrundeliegenden Kenntnisse über den viralen Lebenszyklus und die wenigen Details über die Tumorentstehung äußerst spannend. Welcher Zelltyp unterstützt virale Replikation und Transmission und welcher Zelltyp wird durch MCPyV transformiert? Welche Rolle dabei der Einfluss von Kap1 auf den SASP und bei der Transformation durch MCPyV spielen könnte, wird in Abschnitt 4.8.2 und 4.8.3 diskutiert.

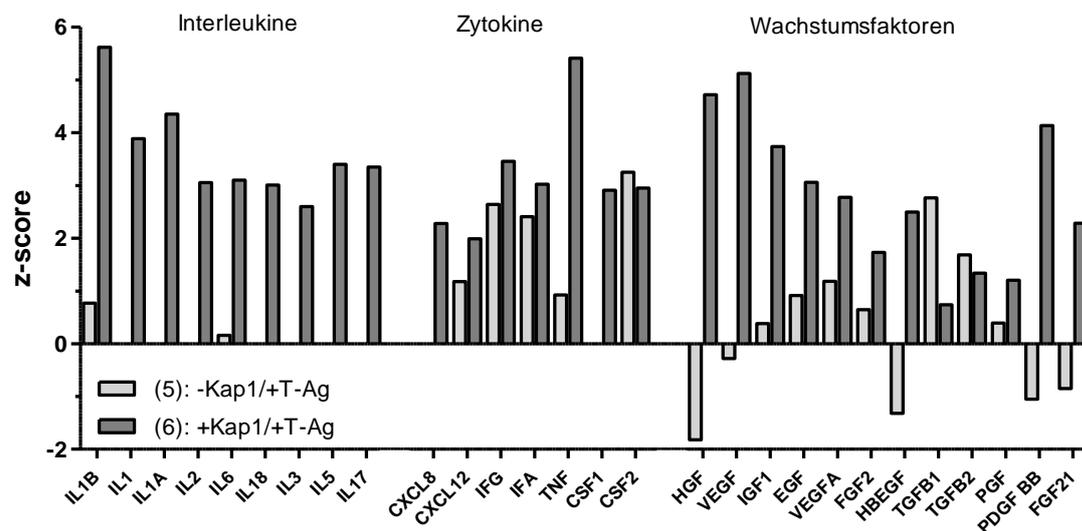


Abbildung 30: **Sekretorische Gene, die in Zusammenhang mit einem Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) beschrieben wurden.** Gezeigt wird der "Activation z-Score" von Genen, die abhängig von Kap1 und MCPyV T-Ag reguliert werden. Der "Activation z-Score" wurde von der IPA Software (Qiagen) ermittelt und beschreibt die vorhergesagte Aktivierung eines Gens (Krämer et al. 2014). Dargestellt sind die beiden Vergleiche (5) "Kap1 k.o. Frühe T-Region versus wt mock" und (6) "wt Frühe T-Region versus Kap1 k.o. mock".

## 4 Diskussion

Das Merkelzell-Polyomavirus ist unter den humanen Polyomaviren das einzige Virus, das Tumorgenese im eigenen Wirt auslöst (Feng *et al.*, 2008; Shuda *et al.*, 2008; Chang and Moore, 2012; DeCaprio und Garcea, 2013; Grundhoff und Fischer, 2015). In der gesunden Bevölkerung zeigt sich eine Seroprävalenz von 60-70 % (Carter *et al.*, 2009; Kean *et al.*, 2009; Pastrana *et al.*, 2009). Das MCPyV-assoziierte Merkelzellkarzinom (MCC) hingegen ist ein sehr seltener aber aggressiver neuroendokriner Tumor mit hohem Metastasierungspotenzial, das vor allem ältere und immunsupprimierte Patienten und Patientinnen betrifft (Hughes *et al.*, 2014). Die Tumor-Antigene LT-Ag und sT-Ag tragen zur Transformation bei (Wendzicki, Moore und Chang, 2015), dennoch ist es auch zehn Jahre nach der Entdeckung des Virus weiterhin nicht bekannt, wie es zur MCC-Entstehung mit der charakteristischen Stopppmutation im LT-Ag sowie zur Integration des viralen Genoms kommt (Grundhoff und Fischer, 2015). Bislang waren nur semi-permissive Replikationssysteme verfügbar, um den Lebenszyklus des Virus zu beleuchten (Feng *et al.*, 2011; Neumann *et al.*, 2011; Schowalter, Pastrana und Buck, 2011). Die Entdeckung der potenziellen Wirtszelle des MCPyV 2016 bot neue Möglichkeiten, neue Facetten des viralen Lebenszyklus zu untersuchen (Liu *et al.*, 2016).

Mithilfe eines massenspektrometrischen Ansatzes und anschließender multi-dimensionaler Protein-Identifikations-Technologie (MudPIT) wurde Kap1 in der Gruppe der Chromatin-verändernden Faktoren als Interaktionspartner der MCPyV kodierten Onkogene in PFSK-1 Zellen identifiziert (Czech-Sioli, Manuskript in Arbeit). Das multifunktionale Protein Kap1 ist ein interessantes Target des MCPyV T-Ags, weil es in vielen Tumoren dereguliert vorliegt und pro-tumorigene Eigenschaften besitzt (Czerwińska, Mazurek und Wiznerowicz, 2017). Zudem wurde bereits für andere Viren eine Verbindung mit Kap1 nachgewiesen (Iyengar und Farnham, 2011; Cheng, Kuo und Ann, 2014).

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion von den MCPyV T-Ag mit dem Wirtsfaktor Kap1 hinsichtlich seiner Konsequenzen und seiner potenziellen Rolle bei der MCPyV-abhängigen

Transformation zu analysieren. Dazu wurde das semi-permissive Replikationsmodell in unterschiedlichen Krebszelllinien angewendet. Zusätzlich wurde dieses Modell für die jüngst identifizierten primären neonatalen Fibroblasten weiterentwickelt.

#### **4.1 Bestätigung der Interaktion von Kap1 mit den MCPyV-kodierten T-Ag**

In dieser Arbeit konnte in unterschiedlichen Krebszelllinien (H1299 und PFSK-1) die Interaktion vom LT-Ag mit endogenem und transient exprimierten Kap1 mithilfe von Koimmunpräzipitationen bestätigt werden. Zusätzlich wurde eine Interaktion des im Tumor vorkommenden, verkürzten LT-Ag mit endogenem Kap1 nachgewiesen sowie eine sT-Ag/ Kap1 Interaktion (Abbildung 8). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass dabei der N-Terminus des LT-Ags mit der RBBC-Domäne von Kap1 interagiert (Abbildung 9 und Abbildung 10). Die Bindestellen dieser Interaktion wurden nicht weiter eingegrenzt. Der Nachweis einer direkten Bindung der T-Ag mit Kap1 zum Beispiel in *in vitro pull-down* Experimenten wurde nicht untersucht. Aus diesem Grund kann eine indirekte Interaktion über andere zelluläre Faktoren nicht ausgeschlossen werden.

Die RBBC-Domäne von Kap1 ist für die Interaktion mit dem KRAB-Repressormodul der KRAB-ZNF und damit für die Bindung an das Wirtsgenom verantwortlich (Peng, Feldman und Rauscher, 2002). Für andere virale Proteine wie E1B-55K, LMP1 oder LANA des Adenovirus Typ5, EBV und KSHV wurde ebenfalls eine Interaktion mit Kap1 publiziert (Sun *et al.*, 2014; Bentz *et al.*, 2015; Bürck *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu der Interaktion des MCPyV LT-Ags mit der RBCC-Domäne von Kap1 wurde für das virale E1B-55K Protein des HAdVs und für LANA von KSHV eine Interaktion mit Kap1 über die PhD/Bromo Domäne bzw. über die RBBC und die PhD/Bromo-Domäne beschrieben (Sun *et al.*, 2014; Bürck *et al.*, 2016).

Es konnte gezeigt werden, dass neben LT-Ag auch sT-Ag mit Kap1 interagiert, was vermuten lässt, dass diese Interaktion über den N-Terminus der T-Ag stattfindet. Der MCPyV T-Antigen Locus ist eine etwas 3,2 kB lange Region, von der verschiedene T-Ag Isoformen durch unterschiedliche Spleißvorgänge gebildet werden können. ST-Ag beinhaltet dabei den T-Ag N-Terminus und einen Teil der Intronsequenz, während das volllängen LT-Ag die Intronsequenz komplett herausspleißt. Der N-Terminus beider T-Antigene ist folglich bis (AS 91) identisch, der C-Terminus sowie die Gesamtproteinelänge unterscheiden sich. In dieser Arbeit konnte über Koimmunpräzipitationen gezeigt werden, dass Kap1 mit dem N-Terminus der T-Ag interagiert. Es wurde allerdings nicht weiter bestimmt, ob es sich dabei um den mit sT identischen N-Terminus handelt oder um die LT-Ag spezifische Sequenz. Es wurde jedoch explizit ausgeschlossen, dass eine Interaktion des LT-Ags mit Kap1 über die OBD-Domäne oder die Helikase/ATPase Domäne geschieht. Alle bisher

beschriebenen zellulären Interaktionspartner des LT-Ags wie Rb, Hsc70, Vamp6p oder Brd4 binden den N-Terminus, vermutlich um die Funktion des C-Terminus nicht zu behindern (X. Wang et al. 2012; Wendzicki, Moore, und Chang 2015). Kap1 reiht sich damit in die Reihe der Wirtsfaktoren ein, die das LT-Ag über den N-Terminus binden.

## **4.2 Kap1 limitiert MCPyV-Replikation.**

### **4.2.1 MCPyV-Zielzelle**

Ein Hindernis bei der Forschung am Merkelzell-Polyomavirus ist das fehlende Wissen über den genauen Lebenszyklus des Virus. Wie andere Polyomaviren besitzt das MCPyV einen sehr strengen Wirtstropismus und kann nur in humanen und zum Teil in Primatenzellen replizieren. Aus diesem Grund sind die zur Verfügung stehenden Tiermodelle begrenzt und können nur bestimmte Fragestellungen wie Tumorgenese oder Metastasierung adressieren. Zu Beginn dieser Arbeit war völlig unbekannt, welcher Zelltyp vom MCPyV infiziert wird oder etwa in welchen Zellen das Virus über einen langen Zeitraum persistiert. Es wurde lediglich ein epidermaler Ursprung vermutet, da MCPyV-Virionen in 40 % aller gesunden Versuchspersonen bei Hautabstrichen gefunden wurden (Schowalter *et al.*, 2010). Eine andere Studie von Mertz et al. hingegen vermutet ein Reservoir des Virus in Monozyten. Erstmals 2016 identifizierte die Arbeitsgruppe um Jianxin You dermale Fibroblasten als Zielzelle für das MCPyV. Sie isolierten dafür humane Haut mit vielen unterschiedlichen Hautzell-Typen wie epidermale Keratinozyten, dermale Fibroblasten und Merkelzellen und infizierten diese unter sehr bestimmten Bedingungen mit MCPyV-Partikeln. Mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und zelltypspezifischen Oberflächenmarkern identifizierten sie neonatale dermale Fibroblasten als den Zelltyp, der vom MCPyV infiziert wurde (Liu *et al.*, 2016).

### **4.2.2 Semi-permissives MCPyV-Replikationssystem**

Zum Startzeitpunkt dieses Projekts im Jahr 2015 gab es lediglich *in vitro* Systeme, die die Untersuchung viraler DNA-Replikation, Proteinexpression und Messung viraler Transkripte zuließen (Feng *et al.*, 2011; Neumann *et al.*, 2011; Schowalter, Pastrana und Buck, 2011). In diesem System konnten Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs (HEK293, H1299 und PFSK-1) mit MCPyV-DNA transfiziert werden und unterstützten dabei Teile des viralen Lebenszyklus. Nach Einbringung der DNA in die Zelle wurden frühe virale Gene exprimiert, virale DNA-Replikation wurde durch LT-Ag initiiert und in HEK293 Zellen wurden des Weiteren virale Partikel gebildet, die sich an der Kernmembran sammelten, aber nicht geteilt wurden. Diese

Systeme haben viele Limitationen: Virale DNA wird nicht auf natürlichen Weg über Oberflächenmoleküle in die Zellen eingebracht, sondern artifiziell über Transfektion des Genoms. Wie weit die Zahl der Genomkopien im Vergleich zu einer natürlichen Infektion abweicht, ist unklar. Außerdem unterstützen nur etwa ein bis fünf Prozent der Zellen virale Replikation, weshalb es, abgesehen von Immunfluoreszenzfärbungen auf Einzelzell-Ebene, nicht möglich ist, Effekte von MCPyV-positiven Zellen zu messen. Des Weiteren ist in semi-permissiven Zellen – mit Ausnahme von HEK293 – kaum späte Genexpression oder Partikelbildung zu beobachten. Der Vorteil beim Arbeiten mit Krebs-Zelllinien liegt in der unkomplizierten Manipulation der Zellen, sodass der Einfluss von zellulären Faktoren auf die DNA-Replikation gut untersucht werden kann. Um den Einfluss von Kap1 auf unterschiedliche Aspekte des viralen Lebenszyklus zu untersuchen, wurden deshalb mithilfe der CRISPR-Cas-Technologie Kap1 *knock-out* (k.o.) Zellen hergestellt. Mithilfe der CRISPR Cas9 Technologie ist der gezielte Gen-knock-out von jedem beliebigen Gen möglich. In dieser Arbeit konnten Kap1 k.o. Zelllinien in HEK293 und H1299 Zellen erfolgreich hergestellt werden. PFSK-1 Zellen überlebten keinen homozygoten Kap1 k.o.. Die Gründe dafür sind nicht bekannt. Sie könnten entweder vom zellulären Hintergrund abhängen oder lediglich zeigen, dass Kap1 ein essentieller Faktor für das Überleben der Zellen darstellt. So wurde z.B. von Cammas *et al.* gezeigt, dass ein Kap1 k.o. letal für Mäuseembryos ist (Cammass *et al.*, 2000).

#### **4.2.3 Proliferationsverhalten von Kap1 k.o. Zellen**

Da die Replikation von PyV auf die Wirts-Replikationsmaschinerie angewiesen ist, die ausschließlich in der S-Phase des Zellzyklus verfügbar ist, hängt die virale DNA-Replikation stark von der Proliferation der Wirtszelle ab. Es wurde deshalb das Proliferationsverhalten der Kap1 k.o. Zellen mithilfe eines MTT-Assays bewertet (Abbildung 11). Das Wachstum der Kap1 k.o. Zellen im HEK293 Hintergrund war dabei an Tag 5 signifikant langsamer als die Proliferation der Kontrollzellen. Im Vergleich dazu zeigten Kap1 k.o. Zellen im H1299 Hintergrund keine verschlechterte Proliferation. An Tag 5 wuchsen die Kap1 k.o. Zellen sogar signifikant besser. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beschreibungen aus der Literatur, in der Kap1 knock-down Zellen ein verschlechtertes Wachstum aufwiesen (Wang et al. 2016) und deuten zudem darauf hin, dass Zellproliferation Kap1-abhängig über p53 reguliert wird. Die H1299 Lungenkrebs-Zelllinie ist p53 negativ.

#### **4.2.4 Virale DNA-Replikation ist in Kap1 k.o. Zellen erhöht**

In HEK293 und H1299 Zellen wurde gezeigt, dass Kap1 k.o. Zellen signifikant mehr virale DNA-Replikation zeigten (Abbildung 12). Der Effekt ist nicht auf das unterschiedliche

Wachstumsverhalten der Kap1 k.o. Zelllinien zurückzuführen. Die Re-Komplementierung von Kap1 in die Kap1 k.o. Zellen konnte den Phänotyp zum Teil wiederherstellen und zeigte im Gegensatz zu den Kap1 k.o. Zellen an Tag 8 nach Transfektion signifikant verminderte DNA-Replikation.

Kap1 wurde ebenfalls als Restriktionsfaktor für das humane Adenovirus Typ 5 (HAdV) beschrieben (Bürck *et al.*, 2016). In dieser Publikation wurde gezeigt, dass Kap1 adenovirale Gene reprimiert und Kap1 im Laufe einer HAdV-Infektion de-SUMOyliert wird. Die Ko-Repressor Funktion von Kap1 wird über den SUMO-Status reguliert (Li *et al.*, 2007, 2010). Für KSHV und hCMV wurde zudem gezeigt, dass Kap1 neben der Bindung an zelluläre Promotoren auch an virale Promotoren bindet (Chang *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014; Rauwel *et al.*, 2015). Während der Latenz von KSHV werden insbesondere lytische Promotoren von Kap1 gebunden und reprimiert (Chang *et al.*, 2009). Zudem wurde für das murine Leukämievirus (MLV), das humane T-Zell lymphotropes Virus-1 (HTLV-1) und das Adeno-assoziierte Virus (AAV) gezeigt, dass Kap1 pro-virale Genaktivierung stilllegt und somit Latenz aufrechterhält (Wolf und Goff, 2007, 2009; Wolf *et al.*, 2008; Wolf, Hug und Goff, 2008; Smith-Moore *et al.*, 2018).

Es konnte im Nachfolgenden kein direkter Effekt von Kap1 auf die virale DNA-Replikation nachgewiesen werden (Abbildung 13-Abbildung 16). Somit verhält sich das MCPyV anders als viele andere DNA-Viren. Kap1 bindet nicht an den viralen Ori und reguliert im semi-permissiven Replikationssystem keine viralen Transkripte wie z.B. Adeno, KSHV, hCMV oder EBV (Cai *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014; Rauwel *et al.*, 2015; Bürck *et al.*, 2016; Li, Burton und Bhaduri-McIntosh, 2017). Ebenso wenig beeinflusst Kap1 die direkte Bindung des LT-Ags an den viralen Ori. In Immunfluoreszenzfärbungen wurde keine Lokalisierung von Kap1 in Replikationszentren beobachtet. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Kap1 lediglich einen indirekten Effekt auf die virale DNA-Replikation ausübt.

### **4.3 Phosphorylierung von Kap1 an Ser824 und Ser473 in MCPyV-positiven primären Fibroblasten erfolgt über replikativen Stress, unabhängig von der Expression der T-Ag.**

#### **4.3.1 Das MCPyV-Replikationssystem in dermalen Fibroblasten**

Die Entdeckung dermalen Fibroblasten als potenzielle Wirtszelle des Merkelzell-Polyomavirus bot neue Möglichkeiten. Im Vergleich zu PFSK-1 Zellen exprimierten bis zu 40 % der dermalen Fibroblasten das LT-Ag zwei Tage nach der Transfektion und zeigten somit eine deutlich robustere virale DNA-Replikation (Abbildung 19). Das erste Mal war es möglich, Erkenntnisse des viralen Lebenszyklus in primären Zellen und nicht in bereits transformierten Krebs-Zelllinien zu

generieren. Da die Infektion von Fibroblasten mit MCPyV-Partikeln zurzeit (Stand 2018) noch nicht effizient durchgeführt werden kann, wurde das semi-permissive Replikationssystem von Neumann *et al.* (2011) für dermale Fibroblasten angepasst. Aufgrund der Transfektion viraler DNA in die Zelle ist das System zwar weiterhin artifiziell, allerdings spiegeln primäre Zellen einen deutlich physiologischeren Zelltyp wider. Infolge von diversen Limitierungen ist es bis heute nicht möglich, MCPyV-positive Zellen zu isolieren und anzureichern. Die große Anzahl an MCPyV-positiven Fibroblasten ermöglichte es aber diese Mischpopulation aus MCPyV-positiven und Virus-negativen Fibroblasten für funktionelle Untersuchungen zu benutzen. Dieser Umstand ist bei den folgenden Experimenten zu berücksichtigen. Proteinexpression, virale und humane Transkripte, Zellproliferation und Phasen des Zellzyklus wurden in der Mischpopulation aus MCPyV-positiven und Virus-negativen Fibroblasten untersucht. Die neonatalen dermalen Fibroblasten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammen von einem Spender (Lonza) und wurden bis maximal acht Passagen verwendet.

Der Nachteil an dem Replikationssystem in Fibroblasten ist die Tatsache, dass primäre Fibroblasten deutlich schwieriger manipuliert werden können als Krebs-Zelllinien und deshalb zum Beispiel ein Kap1 k.o. durch CRISPR-Cas9 nicht möglich ist. Es wurde daher in dermalen Fibroblasten getestet, welchen Einfluss virale DNA Replikation auf den Phosphorylierungsstatus von Kap1 hat und welche möglichen Auswirkungen das für das weitere Wachstum der Zellen hat.

#### **4.3.2 Funktionen von Kap1 im normalen Zellzyklus**

Die Funktion von Kap1 wird streng über posttranslationale Modifikationen wie SUMOylierung und Phosphorylierung reguliert. Dabei leistet Kap1 einen wichtigen Beitrag bei der normalen Zellproliferation während des G1/S Zellzyklus-Übergangs, bei der Aufrechterhaltung der Genomstabilität und trägt zum Überleben der Zelle bei DNA-Schädigung bei (Abschnitt 1.2). Unterschiedliche Phosphorylierungsstellen wurden für Kap1 beschrieben, wobei die Phosphorylierungsstellen an Serin 824 und Serin 473 sehr gut charakterisiert sind (White *et al.*, 2006, 2012; Ziv *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Bolderson *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012).

Durch die Induktion von DNA-Schäden mittels UV-Strahlung oder DNA-Schäden induzierenden Substanzen wie Doxorubicin und Ectoposide kommt es zur Phosphorylierung von Kap1 durch PI3-Kinasen (ATM, ATR und DNA-PK) (White *et al.*, 2006). Kap1 verliert seine Repressorfunktion, sodass heterochromatische Bereiche, die global stillgelegt sind, zum Zweck der DNA-Reparatur entwunden werden. So wurde von Jaiswal *et al.* (2017) erst kürzlich gezeigt, dass die Phosphorylierung von Kap1 an Ser824 über die Dauer der DDR und des G2-Arrests bestimmt und

dass die Wiederaufnahme des Zellzyklus und Eintritt in die Mitose über die De-Phosphorylierung von Kap1 reguliert wird.

#### **4.3.3 DNA-Schadensantwort in MCPyV-positiven Zellen**

In mehreren Arbeitsgruppen wurde beschrieben, dass der C-Terminus des LT-Ag zytotoxische Eigenschaften aufweist (Cheng *et al.*, 2013b; Li *et al.*, 2013, 2015; Theiss *et al.*, 2015) und folglich die DNA-Schadensantwort aktiviert. Es kommt dabei zu einer Aktivierung der ATR-Kinase, zur Aktivierung von p53 und letztendlich zum Zellzyklusarrest und verminderter Proliferation (Li *et al.*, 2013). Die aktive MCPyV-Virusreplikation in U2OS Zellen hingegen führt ebenfalls zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort und insbesondere zur Aktivierung der ATM-Kinase (Li *et al.*, 2013). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung vom LT-Ag an Ser816 durch die ATM-Kinase Zellwachstum inhibiert und Apoptose induziert. Eine LT-S816 Substitutionsmutante konnte die zytotoxischen Eigenschaften des LT-Ag partiell aufheben (Li *et al.*, 2015).

#### **4.3.4 Die MCPyV T-Ag induzieren keine Phosphorylierung von Kap1.**

Da in der Literatur beschrieben ist, dass Kap1 während der DNA-Schadensantwort durch ATM und ATR an Ser824 oder Ser473 phosphoryliert wird (White *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2012), wurde erwartet, dass sowohl die Expression des MCPyV T-Ags als auch virale DNA-Replikation im Viruskontext zu einer Veränderung der Phosphorylierung von Kap1 führt. Interessanterweise haben die MCPyV T-Antigene selbst einen geringen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Kap1 gezeigt. Lediglich die Lokalisierung von pKap1 S473 veränderte sich durch die Expression der frühen MCPyV T-Region (Abbildung 21b). Dabei wurde der Einfluss von LT-Ag, sT-Ag und der frühen T-Region (LT+sT) mittels Immunfluoreszenz und Westernblot untersucht (Abbildung 21a). pKap1 Ser824 Level blieben unverändert. Es wurde keine Phosphorylierung von Kap1 (Ser473 und Ser824) bei der Überexpression der T-Ag in dermalen Fibroblasten festgestellt. Diese Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen. So zeigen zuvor publizierte Daten von Li *et al.*, dass LT-Ag Expression in U2OS Zellen zu einer ATR-Chk1 Aktivierung führt. Dieser Unterschied kann auf unterschiedliche Zelltypen zurückzuführen sein oder es liegt daran, dass die Aktivierung der ATR-Chk1 Antwort durch die Expression des LT-Ag allein nicht ausreicht, um Kap1 als Downstream-Effektor zu phosphorylieren. Die Phosphorylierung von Kap1 (an Ser824 und Ser473) durch die ATR-Kinase wurde in U2OS, HeLa oder FF2425 Zellen gezeigt, wo starke DNA-Schäden mit Strahlung ausgelöst wurden (White *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2012).

#### **4.3.5 Replikativer Stress induziert die Phosphorylierung von Kap1.**

Aus der Literatur ist bekannt, dass virale DNA-Replikation in MCPyV-positiven U2OS Zellen zu replikativem Stress führt und es zur Aktivierung des ATM/Chk2 und des ATR/Chk1 Signalweges kommt (Li *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurde aufbauend darauf gezeigt, dass abwärts (*downstream*) von ATM Kap1 an Ser824 durch die aktivierte ATM-Kinase phosphoryliert wird. Dabei ergab die Quantifizierung von pKap1 Signalen in MCPyV-positiven Fibroblasten, dass Fibroblasten mit Replikationszentren eine signifikant höhere Phosphorylierung an Ser824 und Ser473 aufwiesen als MCPyV-positive Fibroblasten ohne Replikationszentren. Diese Beobachtung unterstreicht die Vermutung, dass Kap1-Phosphorylierung über replikativen Stress und nicht über die Expression der T-Ag erfolgt. Eine Inhibierung der ATM-Kinase durch den ATM-Inhibitor KU55933 verhinderte die Phosphorylierung von Kap1 an Ser824 signifikant (Abbildung 23c, d). Zusätzlich konnte für MCPyV-infizierte Zellen bestätigt werden, dass Kap1 über die ATM-Kinase phosphoryliert wird (Abbildung 24).

Als Folge viraler Replikation wurde zusätzlich Kap1 an Ser473 phosphoryliert. Während des normalen Zellzyklus sorgt die Protein Kinase C delta für die Phosphorylierung von Kap1 an Ser473 (Chang *et al.*, 2008), während der DNA-Schadensantwort hingegen erfolgt die Phosphorylierung an Ser473 über ATM-Chk2 oder ATR-Chk1 Kinasen (Hu *et al.*, 2012). Diese Arbeit adressiert nicht weiter, wodurch die Phosphorylierung an Ser473 induziert wurde. Es ist allerdings zu beobachten, dass der ATM-Aktivator Doxorubicin in Fibroblasten zu einer leichten Verstärkung der Phosphorylierung an Ser473 führt (Abbildung 22). Daraus kann geschlossen werden, dass die Kap1 Phosphorylierung an Ser473 in MCPyV-positiven Fibroblasten über ATM-Chk2 reguliert wird.

#### **4.3.6 Konsequenzen der Phosphorylierung für MCPyV-positive Fibroblasten**

Aus den Studien von Li *et al.* (2007, 2010) wird deutlich, dass der Switch von SUMOylierten zu phosphorylierten Kap1 die Funktion von Kap1 kontrolliert. In seiner SUMOylierten Form fungiert Kap1 als kotranskriptioneller Repressor, in seiner phosphorylierten Form hingegen werden SUMO-abhängige Interaktionen aufgehoben, was die Relaxation des Chromatins und Derepression reprimierter Gene zur Folge hat (Li *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit nicht nur gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus durch das MCPyV verändert wird, sondern dass die Expression der T-Ag zu einer Inhibierung der SUMOylierung von Kap1 führt (Anhang Abb.1). Da sich SUMOylierung und Phosphorylierung von Kap1 (an Ser824 und Ser473) ausschließen (Li *et al.*, 2007, 2010), wird der Phosphorylierungsstatus somit stabilisiert. Über den genauen Mechanismus, wie die

Expression der T-Ag die SUMOylierung von Kap1 reguliert, können zu diesem Zeitpunkt nur Annahmen formuliert werden. Bei der De-SUMOylierung von Kap1 ist die Interaktion mit den T-Ag relevant. Die T-Ag könnten De-SUMOylasen zu Kap1 rekrutieren oder aber über die Interaktion die Auto-SUMOylierung von Kap1 inhibieren.

#### **4.3.7 Kap1-Phosphorylierung durch andere Viren**

Für das humane Adenovirus (hAdV) wurde ebenfalls gezeigt, dass die Infektion die Phosphorylierung an Ser824 induziert und gleichzeitig Kap1 SUMOylierung reduziert (Bürck *et al.*, 2016). Bei Herpesviren oder dem Adeno-assoziierten Virus, die eine Latenz etablieren, wurde hingegen gezeigt, dass der Wechsel von SUMOylierten zu phosphorylierten Kap1 zur Reaktivierung des Virus führt (Chang *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014; Bentz *et al.*, 2015; Rauwel *et al.*, 2015; Li, Burton und Bhaduri-McIntosh, 2017; Smith-Moore *et al.*, 2018). Im Fall von KSHV bildet das virale Protein Kinase (vPK) einen Komplex mit Kap1, in dessen Folge Kap1 an Serin 824 phosphoryliert und SUMOylierung gehemmt wird (Chang *et al.*, 2009). Im Fall des Epstein-Barr Virus führt die Interaktion mit dem viralen LMP1-Protein zur SUMOylierung von Kap1 (Bentz *et al.*, 2015).

### **4.4 MCPyV-induzierte Wachstumsinhibition und G2-Arrest**

#### **4.4.1 Wachstumsinhibierende Eigenschaften des LT C-Terminus**

Die wachstumsinhibierenden Eigenschaften des C-Terminus des LT-Ags wurden als erstes von Cheng *et al.* (2013) beschrieben. Cheng und Kollegen zeigten, dass das Vollängen LT-Ag im Vergleich zum im Tumor vorkommenden tLT-Ag das Wachstum von unterschiedlichen Zelllinien (humane immortalisierte BJ-hTERT Fibroblasten und embryonale Mausfibroblasten) inhibierte. Dabei grenzten sie die wachstumsinhibierenden Eigenschaften des LT-Ag auf Exon 3 des T-Lokus ein. Die stabile Expression des dritten Exons des LT-Ags in der MCC-Zelllinie MKL-1 führte ebenfalls zu vermindertem Wachstum der Zellen. Unsere Arbeitsgruppe konnte zusätzlich zeigen, dass die zytotoxischen Eigenschaften des LT-Ags dosisabhängig von der Menge an eingesetztem LT-Ag sind (Theiss *et al.*, 2015). Li *et al.* publizierte, dass die Expression des Vollängen LT-Ag zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort über ATR/Chk1 führt. Dabei kommt es zur Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 und zur Transkription p53-abhängiger Gene, was letztendlich in einem sogenannten "S-Phasen Zellzyklusarrest" resultiert (Li *et al.*, 2013). Weiter wurde gezeigt, dass durch die artifizielle Aktivierung der ATM-Kinase durch Etoposid das LT-Ag an Serin 816 (Ser816) phosphoryliert und es dadurch zu apoptotischen Aktivitäten kommt (Li *et*

*al.*, 2015). Das auf Grundlage dieser Ergebnisse entstandene Modell besagt, dass das MCPyV LT-Ag p53-abhängige, wachstumsinhibierende Eigenschaften besitzt. Durch replikativen Stress und die damit verbundene Aktivierung der DNA-Schadensantwort kommt es zu einer Verstärkung des Zellzyklusarrests. Die Effekte des LT-Ags und die indirekten Effekte der aktiven Virusreplikation hätten somit einen additiven Effekt. Die Autoren vermuten, dass die ATM-vermittelte LT-Ag Phosphorylierung an Ser816 einen antiviralen Wirtsmechanismus darstellen könnte, um Virus infizierte Zellen zu eliminieren.

#### **4.4.2 Wachstumsinhibition und Zellzyklusarrest in MCPyV-positiven Fibroblasten**

Die Studien, die die wachstumsinhibierenden Eigenschaften des LT-Ag beschreiben, wurden durch transiente Expression oder stabile Transduktion des LT-Ags generiert und berücksichtigten dabei nicht den eigentlichen Viruskontext (Cheng *et al.*, 2013; J. Li *et al.*, 2013). In MCPyV-positiven Zellen liegt immer der gesamte T-Lokus vor, folglich liegt ebenfalls das sT-Ag vor. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass es im Viruskontext in MCPyV-positiven Fibroblasten ebenfalls zur Inhibition der Proliferation und zu einem G2-Zellzyklusarrest kommt. In Einstimmigkeit mit den Beschreibungen von Li *et al.* konnten auch wir zu späten Zeitpunkten seneszente Zellen mit viralen Replikationszentren beobachten, was vermuten lässt, dass es sich eher um einen "Pseudo S-Phasen-Arrest" als einen klassischen G2-Arrest handelt (siehe Abschnitt 4.5). Dass diese Analyse möglich war, ist der Identifikation der potenziellen Wirtszelle für das MCPyV zu verdanken (Liu *et al.*, 2016). Dermale Fibroblasten wurden mit religiertem MCPyV-Genom transfiziert und zeigten zu frühen Zeitpunkten bis zu 40 % MCPyV-positive Zellen, das es ermöglichte diese Bulk-Population aus MCPyV-positiven und Virus-negativen Fibroblasten für funktionale Untersuchungen zu nutzen. Der Anteil an MCPyV-positiven Zellen nahm allerdings kontinuierlich über die Zeit ab, während Virus-negative Fibroblasten stark proliferierten. Dieser Umstand ist bei den folgenden Experimenten zu berücksichtigen und erklärt, warum die Effekte vier Tage nach der Transfektion – im Vergleich zu Tag 2 nach der Transfektion – abgeschwächt vorliegen. Mechanistisch konnte im viralen Kontext gezeigt werden, dass nicht primär die Expression der T-Ag zu einem Zellzyklusarrest führt, sondern vielmehr durch replikativen Stress verursacht wird. Der dabei relevante Mechanismus wird unabhängig vom bereits beschriebenen ATR/Chk1/p53-Signalweg reguliert, nämlich über die ATM-Kinase und dessen Effektor Kap1.

#### **4.4.3 Die Rolle von Kap1 beim MCPyV-induzierten Zellzyklusarrest**

Im normalen Zellzyklus spielt Kap1 eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, indem es den G1/S-Übergang reguliert (Chang *et al.*, 2008). Die in dieser Arbeit generierten Transkriptom-

Daten belegen ebenfalls, dass Kap1 an der Regulation von Genen der Zellproliferation beteiligt ist (Anhang Tab. 1). Während der DNA-Schadensantwort hingegen sichert Kap1 das Überleben der Zelle (White *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2012; Jaiswal *et al.*, 2017). Erst wenn die DNA-Schäden zu schwerwiegend werden und apoptotische Signale überwiegen, kommt es zur Eliminierung der Zellen. Dabei ist die ATM-abhängige Phosphorylierung von Kap1 an Ser824 maßgeblich für die Aufrechterhaltung des G2/M-Kontrollpunkts verantwortlich (Jaiswal *et al.*, 2017). Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Aktivierung der ATM und ATR-Schadensantwort durch MCPyV-Replikation in Fibroblasten zu vermindertem Wachstum und einer Anhäufung von Zellen in der G2-Zellzyklusphase führt. Ein replikationsdefizientes MCPyV-Genom (K331A (Harrison *et al.*, 2011)) zeigte zwar T-Ag Expression, aber keine verminderte Proliferation oder G2-arretierte Fibroblasten (Abbildung 26 und Abbildung 27). Des Weiteren wurde eine Genommutante eingesetzt (S816A), die die wachstumsinhibierenden Eigenschaften des LT-Ag teilweise nicht mehr ausübt (Li *et al.*, 2015). Überraschenderweise zeigte die S816A-Genommutante ebenfalls eine deutlich verringerte Proliferation und eine erhöhte (statistisch allerdings nicht signifikante) Anhäufung von Zellen in der G2-Zellzyklusphase (Abbildung 27c, d). Warum die S816A-Mutante eine stärkere Inhibition der Proliferation aufweist als die des Wildtyp-MCPyV ist nicht klar. Es widerspricht den Beobachtungen von Li *et al.* (2015) dass die Phosphorylierung vom LT-Ag an Ser816 zur p53-abhängigen Wachstumsinhibition beiträgt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein weiterer Wirkmechanismus bei der Wachstumsinhibition durch LT-Ag von Bedeutung sein könnte. Im Viruskontext wurde diese Mutante wenig charakterisiert, Li *et al.* (2015) heben lediglich hervor, dass die virale Replikation durch die Substitution von Serin zu Alanin keine Auswirkungen auf die virale DNA-Replikation haben soll. In den Westernblot Analysen (Abbildung 22) kann allerdings zum Teil beobachtet werden, dass die LT-Ag Proteinlevel der S816A Genommutante höher sind als im Wildtyp oder K331A-Genom. Das Wildtyp-MCPyV und die S816A-Mutante zeigten erhöhte Ser824 und S473 Phosphorelevel zwei und vier Tage nach der Transfektion, wohingegen die replikationsdefiziente K331A-Mutante keine Erhöhung der Phosphorelevel im Vergleich zu mock Fibroblasten zeigte. Der Phänotyp der S816A-Mutante belegt schließlich zusätzlich, dass die wachstumsinhibierenden Eigenschaften des LT-Ags bei dem ATM/Kap1 vermittelten Zellzyklusarrest eine untergeordnete Rolle spielt.

#### **4.4.4 Additiver Effekt der T-Ag und replikativer Stress**

Welchen Beitrag leisten nun also die T-Ag im MCPyV-arretierten Fibroblasten? Wie Li *et al.* durch transiente Expression des LT-Ags zeigen, sollte die Expression des LT-Ags zu einer Aktivierung des ATR/Chk1 Signalwegs führen, den Zellzyklusarrest unterstützen und p53-abhängig Apoptose

induzieren (Li *et al.*, 2015). Erhöhtes Zellsterben in MCPyV-positiven Fibroblasten wurde in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet. Das deutet darauf hin, dass die zytotoxischen Eigenschaften des LT-Ags im Viruskontext – mit aktiv replizierenden Genomen und in Anwesenheit des sT-Ags – eventuell andere Auswirkungen haben, als die Expression des LT-Ags in Zellkultur-Bedingungen. So zeigen aktuelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass die transkriptionellen Effekte, die LT-Ag auf die Zelle ausübt, durch die Anwesenheit des sT-Ag abgeschwächt oder neutralisiert werden (Theiss, Czech-Sioli, Manuskript in Arbeit). Wie von Li *et al.* (2015) prognostiziert induziert das MCPyV LT-Ag Zellzyklusarrest und Apoptose, während viraler, replikativer Stress den Phänotyp des Zellzyklusarrests zusätzlich unterstützt. Nichtsdestotrotz ist kontrovers zu diskutieren, welcher dieser beiden unterschiedlichen Mechanismen einen größeren Beitrag zum MCPyV-induzierten Zellzyklusarrest leistet. Hohe Genomkopien-Zahlen korrelieren normalerweise mit hoher Transkription und hohen Proteinlevels, weswegen nicht ausgeschlossen werden kann, dass die verminderte Zellproliferation Virus-positiver Fibroblasten durch massive DNA-Replikation nicht auf einen Dosis-Effekt des LT-Ag zurückzuführen ist. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten legen allerdings nahe, dass im Viruskontext in MCPyV-positiven Fibroblasten die wachstumsinhibierenden Eigenschaften des LT-Ags und die Induktion von Apoptose eine untergeordnete Rolle einnehmen, während der ATM/Kap1-abhängige G2-Arrest durch massive virale Replikation ausgelöst wird.

#### **4.5 G2/M-Zellzyklusarrest im viralen Lebenszyklus von Polyomaviren**

Des Weiteren bleibt zu klären, welche Konsequenzen oder Vorteile der MCPyV-induzierte G2-Arrest haben könnte. Tatsächlich induzieren viele Viren einen G2/M-Arrest, um unterschiedliche Vorteile daraus zu ziehen (Davy und Doorbar, 2007). So induzieren SV40 und das murine Polyomavirus (MPyV) einen G2-Arrest und eine sogenannte "Pseudo-S-Phase", um virale Replikation unlimitiert stattfinden zu lassen. Die entscheidende Rolle kommt dabei dem LT-Ag zu, welches Gene der S-Phase induziert trotz arretiertem Zellzyklus (Scarano *et al.*, 1994; Lehman, Laffin und Friedrich, 2000). Humane Papillomaviren nutzen diesen Mechanismus zur unbegrenzten Replikation ebenfalls (Frattini *et al.*, 1997; Davy *et al.*, 2002; Nakahara *et al.*, 2002; Knight *et al.*, 2004).

Das humane JC- und BK-Polyomavirus induzieren während ihrer Replikation die DNA-Schadensantwort und zeigen einen sehr ausgeprägten G2-Arrest (Orba *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2012). Im Fall der Virusreplikation des JC-Polyomavirus allerdings wurde gezeigt, dass das LT-Ag den G2-Zellzyklusarrest fast ausschließlich selbst durch Bindung an zelluläre DNA verursacht und replikativer Stress eine untergeordnete Rolle spielt (Orba *et al.*, 2010). Der

Mechanismus des induzierten G2-Arrests durch JC unterscheidet sich somit deutlich vom ATM/Kap1-induzierten G2-Arrest bei der Replikation des MCPyV. Eine wichtige Rolle bei der Replikation von Polyomaviren spielt die richtige Wirtszelle. Für das JC-Virus ist die Wirtszelle (Epithelzellen der Niere) bekannt, für das MCPyV hingegen ist noch nicht vollständig geklärt, ob es sich bei den neonatalen dermalen Fibroblasten tatsächlich um die Wirtszellen des Virus handelt. Die Ausprägung und Konsequenzen in einer anderen Zielzelle könnten anders ausgeprägt sein, als wie es für Fibroblasten in dieser Arbeit beschrieben wurde. Eines haben viele der Polyomaviren (BK, JC und MPyV) gemein: die Aktivierung der ATM- und ATR-Schadensantwort ist für eine effiziente Virusproduktion essentiell (Orba *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2012; Heiser, Nicholas und Garcea, 2016). Und auch für MCPyV wurde beschrieben, dass virale DNA-Replikation durch die Lokalisation von Komponenten der DNA-Schadensantwort in Replikationszentren die virale Replikation erhöht (Tsang *et al.*, 2014).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass viele Viren die Arretierung des Zellzyklus induzieren, um zum Beispiel eine "Pseudo-S-Phase" zur viralen Replikation zu nutzen, die Reifung von Viruspartikeln zu ermöglichen oder um Transkription und Translation viraler Proteine zu ermöglichen (Davy und Doorbar, 2007). Eine besondere Bedeutung des G2-Arrests könnte für das MCPyV zutreffen. Unter den humanen Polyomaviren ist es das einzige, welches Tumorgenese im eigenen Wirt auslöst. In Abschnitt 4.8 wird deshalb auf die mögliche Beteiligung von arretierten, seneszenten Fibroblasten an der MCPyV-induzierten Tumorentstehung eingegangen.

#### **4.6 Modell für die Restriktion der MCPyV DNA-Replikation durch Kap1**

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass das MCPyV in Kap1 k.o. Zellen, im semi-permissiven Replikationssystem, signifikant besser repliziert. Dabei konnte kein direkter Effekt von Kap1 auf virale DNA-Replikation – etwa durch die Regulation der Virusexpression oder bei der Initiierung der viralen Replikation durch Bindung des LT-Ags an den Ori – bewiesen werden. Es wurde jedoch im Replikationssystem in dermalen Fibroblasten gezeigt, dass Kap1 durch replikativen Stress während der viralen DNA-Replikation ATM-abhängig an Ser824 phosphoryliert wird und dadurch einen G2-Zellzyklusarrest induziert. Während der DNA-Replikation von Polyomaviren entstehen häufig Doppelstrangbrüche (DSB) in der DNA, die zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort führen (Hollingworth und Grand, 2015). Die Aktivierung der DNA-Schadensantwort und im Detail die Aktivierung der ATM-Kinase führt zur Kap1-Phosphorylierung an Ser824. Die Phosphorylierung von Kap1 an Ser473 trägt vermutlich ebenso zu diesem Phänotyp bei. Die Restriktion der viralen Replikation dient dem Schutz der Zelle. Durch virale wie zelluläre Replikation kommt es zu DNA-Schäden, die behoben werden

müssen, bevor die Zellteilung fortgesetzt wird, und um die Weitergabe an die Tochtergeneration zu verhindern. Aus der Literatur wie auch aus den RNA-Seq Daten in dieser Arbeit wurde ersichtlich, dass Kap1 als wichtiger Regulator der Zellproliferation dient. Während der DNA-Schadensantwort spielt Kap1 eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus insbesondere bei der Arretierung und der Wiederaufnahme des Zellzyklus. So wurde von Jaiswal *et al.* (2017) erst kürzlich beschrieben, dass die Phosphorylierung von Kap1 an Ser824 über die Dauer der Schadensreparatur und des G2-Arrests bestimmt, und dass die Wiederaufnahme des Zellzyklus und Eintritt in die Mitose über die De-Phosphorylierung von Kap1 reguliert wird.

Das hier vorgestellte Modell beschreibt Kap1 als wichtigen Regulator bei replikativen Stress, der Zellproliferation von geschädigten Zellen arretiert und als Konsequenz virale Replikation limitiert. In Abwesenheit von Kap1 würde dieser G2/M-Kontrollpunkt nicht durch Kap1 reguliert werden. Virusreplikation kann uneingeschränkt ablaufen bis DNA-Schäden einen Grenzwert überschreiten und infizierte Zellen elimiert werden. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Kap1 als Restriktionsfaktor für virale DNA-Replikation fungiert. Kap1 übt lediglich einen indirekten Einfluss auf die MCPyV DNA-Replikation aus. Damit unterscheidet sich das MCPyV deutlich von seinen verwandten DNA-Viren (KSHV, EBV, hCMV oder AdV5), bei denen Kap1 direkt virale Genexpression steuert.

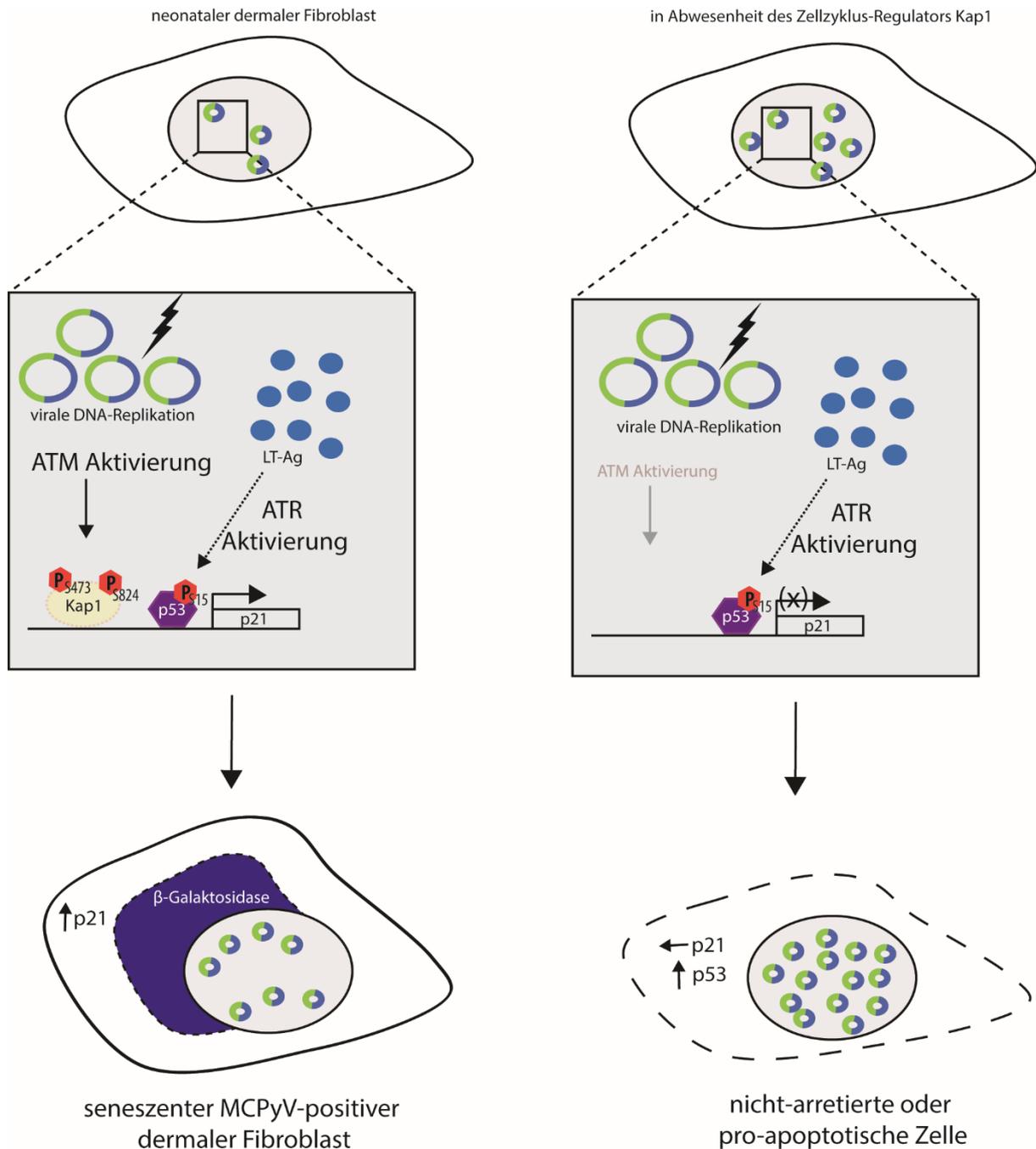


Abbildung 31: **Modell für die Restriktion der MCPyV DNA-Replikation durch Kap1.** Virusreplikation in dermalen Fibroblasten führt zur Aktivierung der ATM-Kinase der DNA-Schadensantwort und zur der Phosphorylierung des Effektors Kap1. Kap1-Phosphorylierung führt zur Derepression des Zellzyklusregulators p21. Die Expression des LT-Ags aktiviert zudem die ATR-Kinase und resultiert in der Aktivierung und Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 an Serin 15. Die p21-Genexpression wird zusätzlich über p53 aktiviert und trägt insgesamt zur Erhöhung der p21-Transkription bei. Durch die anhaltende virale DNA-Replikation und die damit verbundene Aktivierung der DNA-Schadensantwort arretieren MCPyV-positive Fibroblasten in der G2-Zellzyklusphase und etablieren einen seneszenten Phänotyp. Kap1 limitiert virale Replikation, da der G2-Arrest maßgeblich durch phosphoryliertes Kap1 (Ser824) aufrechterhalten wird (Jaiswal *et al.*, 2017). Ein Zellzyklusarrest kann in Abwesenheit des Zellzyklusregulators Kap1 nicht aufrechterhalten werden, was unlimitierte Virusreplikation zur Folge hat. Pro-apoptotische Signale, die durch das MCPyV LT-Ag ausgelöst werden (Li *et al.*, 2015) führen letztendlich zur Eliminierung MCPyV-positiver Fibroblasten.

## 4.7 Kap1-abhängige und Kap1-unabhängige MCPyV-induzierte Seneszenz

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Anteil von Zellen in der G2-Zellzyklusphase in MCPyV-positiven Fibroblasten signifikant gegenüber Virus-negativen Zellen erhöht ist. Die Konsequenzen eines G2-Zellzyklusarrests können entweder jegliche Form von Zelltod oder zelluläre Seneszenz sein. Als zelluläre Seneszenz wird ein irreversibler Zellzyklusarrest bezeichnet, der durch interne und externe Stimuli wie DNA-Schäden, onkogenen Stress oder zytotoxische Substanzen ausgelöst wird (Shay und Roninson, 2004; Carnero *et al.*, 2015). Im Vergleich zu der altersabhängigen Seneszenz wird die Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) durch die Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ausgelöst, wobei die beiden wichtigsten intrinsischen Regulatoren dabei p53 und Rb sind (zusammengefasst in X. Liu, Ding, und Meng 2018). Seneszenz wurde in MCPyV-positiven Fibroblasten durch die sogenannte Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidasefärbung nachgewiesen (Dimri *et al.*, 1995; Itahana, Campisi und Dimri, 2007; Nacarelli, Liu und Zhang, 2017). Des Weiteren zeigten MCPyV-positive Fibroblasten seneszenten Eigenschaften wie hypertrophe Kerne und eine abgeflachte Morphologie. Schließlich wurden in Virus-positiven Zellen signifikant erhöhte *p21*-Transkripte gemessen. *P21* gilt als einer der wichtigsten Biomarker für Seneszenz (Dimri, 2005).

### 4.7.1 P21 ist der Initiator der Seneszenz

*P21* ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus und initiiert Apoptose in geschädigten Zellen. Dabei kann *p21* auf unterschiedlichen Ebenen reguliert werden. Die Listen mit p53-abhängigen, aber auch p53-unabhängigen Mechanismen der *p21*-Regulation sind lang (Karimian, Ahmadi und Yousefi, 2016). Interessanterweise ist Kap1 kotranskriptioneller Repressor von *p21* und bindet über das KRAB-Zinkfingerprotein ZBRK1 an den Promoter von *p21* (*CDKN1A*) (Lee *et al.*, 2007). Die p53-abhängige Regulation von *p21* durch das MCPyV LT-Ag wurde bereits nachgewiesen (Li *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit führte die Expression von LT-Ag kontroverserweise nur zu einer leichten Erhöhung der *p21*-Transkripte. Die Expression von sT-Ag hingegen führte zu reduzierten *p21*-Levels. Interessanterweise führte die Expression von der frühen T-Region (LT + sT) zu keiner Veränderung der *p21*-Transkripte im Vergleich zu den mock transfizierten Fibroblasten. Dass die Expression der frühen Region des MCPyV keinen Einfluss auf *p21*-Transkripte in U2OS und PFSK-1 Zellen zeigt, wurden bereits zuvor in dieser Arbeitsgruppe publiziert (Borchert *et al.*, 2014). Das lässt darauf schließen, dass sich die Effekte, die die unterschiedlichen T-Antigene einzeln ausüben können, im Viruskontext neutralisieren und gegenseitig ausgleichen könnten.

Dieser Trend wurde ebenfalls in anderen Studien unserer Arbeitsgruppe in hTERT immortalisierten BJ-5ta Fibroblasten beobachtet (Theiss, Czech-Sioli, Hartwig unveröffentlicht). Des Weiteren ist zu erwähnen, dass in HEK293 Zellen die Expression der MCPyV frühen T-Region ebenfalls nicht zu signifikant erhöhten *p21* (*CDKN1A*) Transkripten führte. Der Unterschied zu den von Li *et al.* (2015) publizierten Daten ist die Verwendung unterschiedlicher LT-Ag Expressionskonstrukte sowie die Verwendung unterschiedlicher Zelltypen. Während Li *et al.* (2015) ausschließlich LT-Ag und die U2OS Tumorzelllinie verwendet, wurde in unseren RNA-Sequenzierungen in HEK293 Zellen ein MCPyV Expressionskonstrukt verwendet, das die komplette frühe Region abdeckt, und neben LT-Ag ebenfalls sT-Ag und 57 kT exprimiert.

In dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass replikativer Stress in MCPyV-positiven Fibroblasten über die Phosphorylierung von Kap1 an Ser824 und Ser473 zu erhöhten *p21*-Transkripten und somit zur Derepression des *p21*-Promoters führt. Somit trägt zu der MCPyV-induzierten Seneszenz replikativer Stress zu gleichen Teilen bei wie die p53-abhängige Regulation von *p21*. Da die replikationsdefiziente K331A-Genommutante keine signifikante Erhöhung der *p21*-Transkripte und zudem keine Kap1-Phosphorylierung von Ser824 und Ser473 zeigte, wird erneut die Annahme bestätigt, dass vorrangig replikativer Stress und somit die ATM/Kap1 abhängige Regulierung von *p21* im viralen Kontext von Bedeutung ist.

#### **4.7.2 Bedeutung von Kap1 bei der MCPyV-induzierten Seneszenz**

Die MCPyV-induzierte Seneszenz kann aufgrund der Eigenschaften der T-Onkogene als Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) eingestuft werden. Interessanterweise wurde von Santos und Gil (2014) beschrieben, dass Kap1 über die Phosphorylierung an Ser824 eine Rolle bei der OIS spielt. So verhinderte der *knock-down* von Kap1 teilweise die OIS und reduzierte die Sekretion von Komponenten des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP). Entsprechend führte der Kap1 k.o. in HEK293 Zellen in Anwesenheit der MCPyV T-Ag ebenfalls zur Inhibition der Transkripte entzündlicher Interleukine, Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Abbildung 29). Die GO-Analysen von Genen, die durch Kap1 und die MCPyV T-Ag reguliert wurden, bestätigten diesen Trend. So sind unter den 25 signifikantesten GO-Begriffe "Reorganisation der extrazellulären Matrix", "Wachstumsfaktoraktivität" und "Entzündungsantwort" zu finden (Anhang Tab. 5). Der RNA-Seq Datensatz wurde in HEK293 generiert, weil man den Einfluss von Kap1 in Kap1 k.o. Zellen untersuchen wollte, was nicht in primären dermalen Fibroblasten möglich war. Dabei muss berücksichtigt werden, dass HEK293 Zellen durch DNA des humane Adenovirus 5 transformiert wurden (Graham *et al.*, 1977) und dementsprechend Effekte auf adenovirale Proteine zurückzuführen sein könnten. Insbesondere die Effekte der MCPyV T-Ag auf

das Transkriptom waren vergleichsweise gering mit 101 differentiell exprimierten Genen. Unsere RNA-Sequenzierungen in HEK293 Kap1 k.o. Zellen bestätigten, dass eine große Anzahl von Genen durch Kap1 reguliert wird. Da zu diesem Datensatz allerdings keine Kap1 Chromatin-IPs durchgeführt wurden, lässt sich nicht zuordnen, welche Gene direkt auf Transkriptionsebene von Kap1 reguliert werden und welche Gene indirekt über Kap1 reguliert werden.

Die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Chemokinen, Zytokinen und Matrixmetalloproteasen ist von zentraler Bedeutung bei der Kommunikation von seneszenten Zellen, Immunzellen und angrenzenden Nachbarzellen und kann abhängig von der Zusammensetzung tumorhemmende oder tumorfördernde Eigenschaften besitzen. Die Daten in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Kap1 bei der Ausprägung der MCPyV-induzierten Seneszenz eine Rolle spielt und maßgeblich an der Zusammensetzung der Umgebung um MCPyV-positive Fibroblasten beteiligt ist.

Insgesamt kann resümiert werden, dass in dieser Arbeit MCPyV-positive, dermale Fibroblasten identifiziert wurden, die Charakteristiken von Seneszenz aufwiesen wie die Hochregulation von p21 und  $\beta$ -Galaktosidase. Die MCPyV-induzierte Seneszenz wird vermutlich auf mehrfache Weise reguliert. So sind die MCPyV T-Ag über die p53-abhängige p21-Aktivierung an der Initiierung des seneszenten Phänotyps beteiligt. Die Expression des LT-Ags reicht allerdings nicht aus, diesen Zustand zu halten – vielmehr dominieren apoptotische Signale. Zum anderen wird über den viralen, replikativen Stress die DNA-Schadensantwort ausgelöst, was zur ATM/Kap1-abhängigen Derepression und Aktivierung des p21-Promoters führt. Die MCPyV-induzierte Seneszenz unterscheidet sich somit deutlich von der SV40-induzierten Seneszenz, bei der das LT-Ag autark über die Interaktion mit p53 und Rb Seneszenz induziert (Shay, Pereira-Smith und Wright, 1991).

## **4.8 Modell zu der Beteiligung MCPyV-induzierter Seneszenz bei der MCC-Entstehung**

### **4.8.1 Charakteristiken des Merkelzellkarzinoms**

Ca. 80% aller Merkelzellkarzinome (MCC) sind MCPyV-positiv. Zwei besondere Merkmale zeichnen MCPyV-positive MCCS aus. Zum einen ist das virale Genom in allen Tumoren monoklonal ins Wirtsgenom integriert und zum anderen weisen alle Tumore eine Stoppmutation im T-Lokus auf, die das Virus replikationsdefizient macht (Feng *et al.*, 2008). Die MCC sind dabei abhängig von der Expression der T-Ag (Houben *et al.*, 2010). Das initiale Transformationsevent ist unbekannt.

#### 4.8.2 Die bivalente Rolle zellulärer Seneszenz generell bei Tumorentstehung

Bisher wurde angenommen, dass Seneszenz einen Schutzmechanismus der Zelle darstellt, die Vermehrung geschädigter Zellen zu verhindern. Die Sekretion von Komponenten des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP) signalisiert Stress in die Umgebung und sorgt für die Eliminierung durch Immunzellen (Campisi, 1997; Kang *et al.*, 2011; Lecot *et al.*, 2016). Schon früh nach der Entdeckung der Seneszenz wurde diese als ein zweischneidiges Schwert beschrieben. Inzwischen gibt es zunehmend mehr Evidenz, dass seneszente Zellen Tumorentstehung fördern oder begünstigen.

Eine Hypothese, die derzeit im klassischen Feld der Tumorbilogie aufkommt, ist die Annahme, dass Seneszenz oder vielmehr der Bypass der Seneszenz eine Vorstufe zur Tumorentstehung darstellt. Dieser Mechanismus wird vor allem bei altersbedingten Krebsformen angenommen, der durch eine hohe Zahl von somatischen Mutationen charakterisiert ist (Milholland *et al.*, 2015). Die Umgehung der Seneszenz führt nicht sofort zur Tumorentstehung. Vielmehr kann das Einwirken unterschiedlicher Faktoren wie Onkogenen oder Tumorsuppressoren Schritt für Schritt "on the road to the cancer highway" mitwirken (Dimri, 2005). In seneszenten Zellen spielen epigenetische und genetische Veränderung wie Chromatinstrukturierungen und die Anhäufung von Mutationen eine entscheidende Rolle (Nacarelli, Liu und Zhang, 2017). In alternden Organismen kann onkogener Stress zur chronischen Aktivierung der DNA-Schadensantwort und zu einer Erschöpfung der Reparaturmechanismen führen, wodurch seneszente Zellen genetisch instabil werden (De Cecco *et al.*, 2013; Criscione *et al.*, 2016; Bielak-Zmijewska, Mosieniak und Sikroa, 2018). Diese Hypothese wird durch Tatsache bekräftigt, dass für die Etablierung eines *in vitro* Transformationsmodells in murinen und humanen Fibroblasten zelluläre Seneszenz als Ausgangsschritt benötigt wird (Boehm *et al.*, 2005). Da in MCPyV-positiven MCC die Mutationsrate im Vergleich zu MCPyV-negativen Tumoren sehr viel geringer ist (Goh *et al.*, 2016), ist ein derartiger Mechanismus sehr wahrscheinlich nicht an der MCPyV-abhängigen Transformation und MCC-Entstehung beteiligt.

Diverse andere Studien weisen außerdem darauf hin, dass Seneszenz durch parakrine Effekte und eine damit verbundene Seneszenz-assoziierte Entzündung zur Tumorgenese von Nachbarzellen beitragen kann (van Deursen, 2014; Lecot *et al.*, 2016; Liu, Ding und Meng, 2018). In der klassischen Tumorbilogie ist schon lange klar, dass das Mikroumgebung von wichtiger Bedeutung bei Entwicklung und Metastasierung von Tumoren ist (zusammengefasst in M. Wang *et al.* 2017). Die Tumormikroumgebung setzt sich aus der extrazellulären Matrix (EZM), Fibroblasten, Myofibroblasten, neuroendokrinen Zellen, Fettzellen, Immunzellen und Blut- und Lymphgefäßnetzwerke zusammen. Seneszente Zellen sekretieren hauptsächlich entzündlicher

Komponenten wie Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine sowie Matrixmetalloproteasen (MMP) und anderen Proteasen. Die Sekretion dieser SASP-Komponenten kann abhängig vom Kontext unterschiedliche Konsequenzen haben (zusammengefasst in van Deursen 2014). Es kann Gewebekomöostase und Geweberegeneration stören, indem Stammzellnischen verändert oder abnormale Zelldifferenzierungen induziert werden. Die Sekretion der SASP-Komponenten kann weiter zur Zerstörung der EZM und zu chronischer Gewebsentzündung führen. Schließlich können diese Bestandteile Seneszenz in Nachbarzellen auslösen.

Tatsächlich bilden seneszente Zellen dabei eine tumorfördernde Mikroumgebung wie es auch für mit Krebs assoziierte Fibroblasten beschrieben ist (Campisi, 2005). Krebs-assoziierte Fibroblasten sind Fibroblasten, die z.B. während der Wundheilung durch Stimuli wie Wachstumsfaktoren (TGF $\beta$ , EGF, PDGR oder FGF2) oder durch direkte Zell-Zell-Kommunikation oder über Adhäsionsmoleküle aktiviert werden. Sie zeichnen sich durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren (HGF, IGF, NGF, WNT1, EGF und FGF2), Zytokinen (IL1), Chemokinen (MCP1) und EZM-abbauende Proteasen z.B. MMP aus. Dadurch spielen mit Krebs assoziierte Fibroblasten eine Schlüsselrolle bei der Tumorentstehung vieler Krebsarten (zusammengefasst in Kalluri und Zeisberg 2006).

#### **4.8.3 Bedeutung der MCPyV-induzierten Seneszenz bei der MCC-Entstehung**

MCPyV-induzierte Seneszenz (MCPyV-IS) kann einen antiviralen Wirtsmechanismus darstellen, MCPyV-positive Zellen zu eliminieren. Ein Argument gegen diese Ansicht ist die Beobachtung, dass seneszente MCPyV-positive Fibroblasten hypertrophe Kerne mit Replikationszentren zeigen. Die Existenz von Replikationszentren deutet darauf hin, dass Komponenten der S-Phase anwesend sind, die virale DNA-Replikation ermöglichen. Wie für SV40 oder MPyV beschrieben (Scarano *et al.*, 1994; Lehman, Laffin und Friedrich, 2000), gibt es auch beim MCPyV wahrscheinlich eine Pseudo-S-Phase, die virale Replikation ermöglicht. MCPyV-seneszente Zellen stellen demnach Replikationsfabriken dar, dessen Eliminierung vermutlich eine große Menge an Viruspartikeln freisetzen würde, die neue Wirtszellen infizieren können.

Andererseits könnte MCPyV-IS zur MCC-Entstehung und initialen Transformation der Ursprungszelle durch die Gestaltung einer tumorfördernden Mikroumgebung beitragen. Die Sekretion von Seneszenz-assoziierten MMP und anderer Proteasen kann dazu beitragen, Bestandteile der EZM abzubauen und die Infektion von nicht-permissiven Zellen zu ermöglichen. Die Ursprungszelle des MCC wird kontrovers diskutiert (Abschnitt 1.1.5.1). Weiterhin ist unklar, ob das MCC initial in der Wirtszelle des MCPyV oder in einem Zelltyp mit einem Replikationsblock entsteht. Ursprünglich wurde vermutet, dass MCC aus Merkelzellen in der Haut entstehen, weil

MCC charakteristische Oberflächenmarker trugen (zusammengefasst in Tilling und Moll 2012). Aufgrund der Heterogenität von MCC und des ausdifferenzierten Charakters von Merkelzellen, vermuten Tilling und Moll aber eher epidermale Stammzellen als Ursprungszelle des MCCs. Allerdings gibt es seit kurzem Hinweise darauf, dass differenzierte dermale Fibroblasten insbesondere durch das MCPyV sT-Ag transformiert werden können (unpublizierte Daten von Denise Galloway, Fred Hutchinson Cancer Research Center und Denise Ohnezeit, AG Fischer). Die Frage nach der Ursprungszelle des MCCs ist weiterhin kontrovers und Bedarf weitere experimentelle Ansätze.

Der Wirtsfaktor und Zellzyklusregulator Kap1 spielt eine wichtige Rolle bei der initialen Arretierung des Zellzyklus sowie vermutlich bei der Sekretion verschiedener Matrixproteine, Wachstumsfaktoren und entzündlicher Faktoren. Die Transkriptomanalysen dieser Arbeit zeigen eine signifikante Regulation dieser Komponenten, dennoch muss in Zukunft experimentell ein Nachweis für die Sekretion SASP-Komponenten in dermalen Fibroblasten erbracht werden. Der Gewebekontext hängt entscheidend davon ab, welche Konsequenzen ein SASP zur Folge hat. Für die Zusammensetzung des SASP scheint Kap1 von zentraler Bedeutung zu sein. Interessant ist nicht nur die Tatsache, dass Kap1 in vielen Tumoren dereguliert vorliegt, sondern dass die Expression der MCPyV T-Ag im Zusammenspiel mit Kap1-regulierten Genen ein Milieu schafft, welches mit Krebs assoziiert ist. Das zeigte die Transkriptomuntersuchung in HEK293 und HEK293 Kap1 k.o. Zellen, die eine signifikante Überrepräsentation des KEGG-Pathways "pathways in cancer" ( $p < 0,001$ ) zeigte (Anhang Tab. 6).

Die transformierenden Eigenschaften der MCPyV T-Ag sind gut untersucht (Abschnitt 1.1.6). Trotzdem ist nach wie vor völlig unklar, wie es zur MCC-Entstehung und insbesondere zur Integration des Genoms und der Mutation des T-Lokus kommt. Seneszente Zellen sind überwiegend in frühen Tumorstadien zu finden und nicht mehr zu späten Stadien (Collado und Serrano, 2006). Bislang gibt es keine Kenntnisse zu MCC-Vorstufen. Es ist allerdings vorstellbar, dass die Mikroumgebung einen Beitrag zu solchen Vorstufen leisten könnte. Von Bedeutung könnte dabei insbesondere der Abbau der EZM und die Verbesserung des Infektionsvorganges sein. Die Entstehung des MCC durch das MCPyV bleibt nach wie vor rätselhaft. Die Ergebnisse dieser Arbeit beleuchten die Rolle einer virusabhängigen Mikroumgebung, die ein Mikromillieu schaffen könnte, indem Integrations- und Mutationsgeschehnisse begünstigt werden.

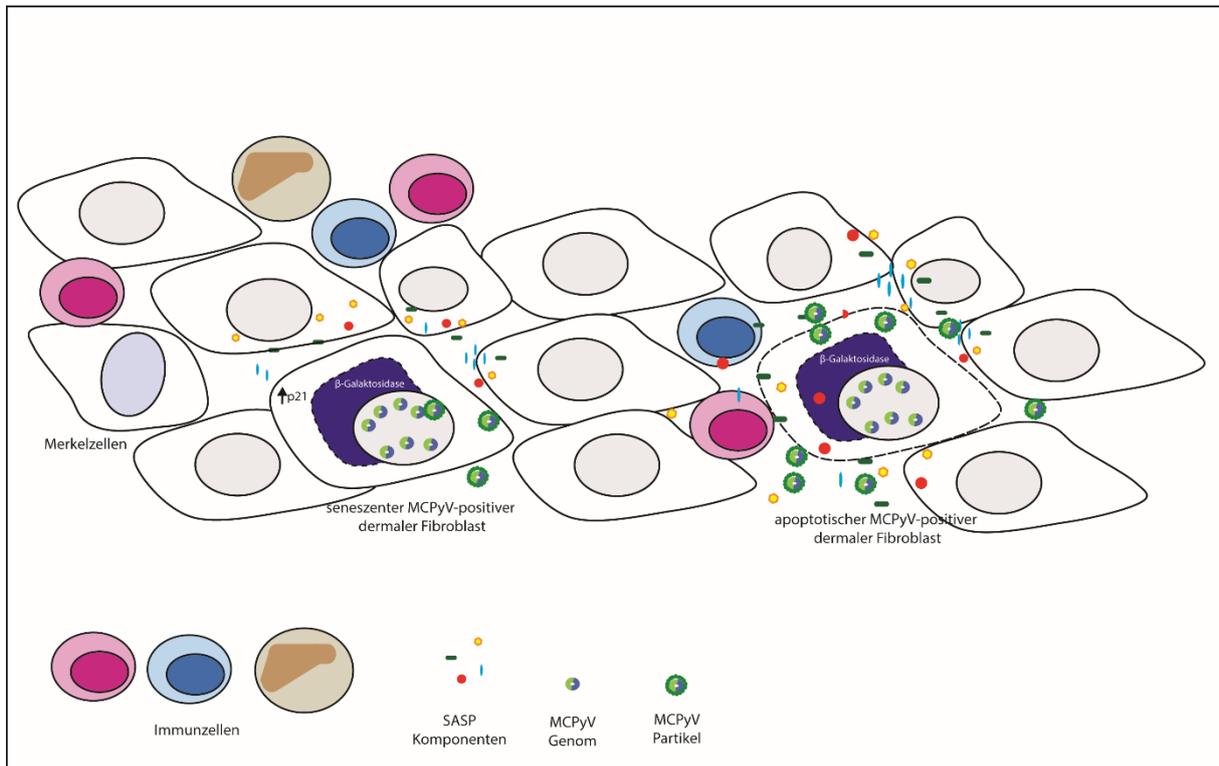


Abbildung 32: **Modell zur MCPyV-induzierten Seneszenz in dermalen Fibroblasten und deren Beitrag zur MCC-Entstehung.** Seneszente MCPyV-infizierte dermale Fibroblasten formen durch die Sekretion von SASP-Komponenten ein tumorigenes Mikroenvironment in der Haut. Immunzellen wie Lymphozyten und Neutrophile migrieren zu den Entzündungsquellen und tragen zu einer entzündlichen Umgebung bei. Durch die Beseitigung oder Apoptose von MCPyV-infizierten Fibroblasten kommt es zur MCPyV-Partikelfreisetzung und zur zufällig Neuinfektion von dermalen Fibroblasten oder nicht-permissiven Zellen. In diesem Modell könnten MCPyV-infizierte Fibroblasten zur Tumorgenese von Fibroblasten oder Nachbarzellen durch die Schaffung eines Mikromillieus, in dem Mutations- und Integrationsereignisse begünstigt werden, beitragen.

## 5 Schlussbetrachtung und Ausblick

Die Interaktion der MCPyV-kodierten T-Antigene, LT-Ag und sT-Ag, mit dem Wirtsfaktor Kap1 konnte in unterschiedlichen Zelllinien bestätigt und auf den N-Terminus der T-Ag und die RBCC-Domäne von Kap1 eingegrenzt werden. Ob diese Bindung direkt oder indirekt erfolgt, kann nur mithilfe von *in vitro* Pull-down Experimenten bewiesen werden, die nicht Teil dieser Arbeit waren. Die direkte Konsequenz dieser Bindung in Zellen, die mit dem MCPyV infiziert sind, ist bislang nicht bekannt. Die SUMO-Immünpräzipitationen, die eine Inhibierung der SUMOylierung von Kap1 in Anwesenheit der T-Ag zeigten, legen die Vermutung nahe, dass die Interaktion dieser beiden Faktoren, den SUMOstatus von Kap1 durch Inhibierung der AutoSUMOylierung von Kap1 oder durch die Rekrutierung von einer DeSUMOylase regulieren könnte. Mechanistisch kann diese Frage schwer adressiert werden. Mithilfe einer T-Ag Bindemutante, die die Interaktion mit Kap1 nicht mehr aufweist, könnte die AutoSUMOylierung untersucht werden. Da die Bindestelle dieser Interaktion aber nicht weiter bestimmt wurde, ist eine solche Untersuchung nicht möglich. Durch den gezielten Gen-knock-out von zellulären DeSUMOylasen könnte eine De-SUMOylierung von Kap1 durch die putative Rekrutierung von DeSUMOylasen analysiert werden. Ohne weitere Hinweise, um welche spezifische DeSUMOylase es sich handeln könnte, ist diese Frage ebenfalls sehr schwer zu beantworten.

Der Wirtsfaktor Kap1 stellt einen antiviralen Restriktionsfaktor für die MCPyV DNA-Replikation dar und leistet somit einen Beitrag seinen Wirt bei einer Virusinfektion zu schützen. Die Interaktion von den MCPyV T-Ag mit Kap1 spielt dabei vermutlich eine untergeordnete Rolle. Vielmehr trägt die posttranslationale Phosphorylierung von Kap1 durch die Aktivierung der DNA-Schadensantwort als Folge viraler DNA-Replikation indirekt zur Zellzykluskontrolle und Zellproliferation bei. Kap1 ist maßgeblich an der Arretierung des Zellzyklus infolge von DNA-Schäden beteiligt und limitiert dadurch MCPyV DNA-Replikation, die ausschließlich in der S-Phase des Zellzyklus stattfinden kann.

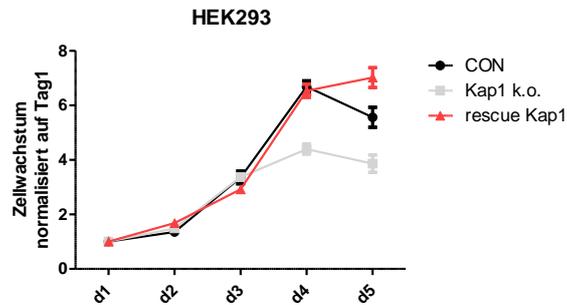
Das Verständnis des viralen Lebenszyklus in der putativen Wirtszelle des MCPyV ist von sehr großer Relevanz, um initiale Transformationsereignisse, die zur Entstehung des MCC beitragen, zu verstehen. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass

MCPyV-positive Fibroblasten eine verringerte Proliferation im Vergleich zu Kontrollzellen aufwiesen, weil signifikant mehr Zellen in der G2-Zellzyklus Phase arretierten und MCPyV-positive Fibroblasten sich zusätzlich durch einen seneszenten, nicht proliferierenden Phänotyp auszeichneten. Der seneszente Phänotyp, der sich u.a. durch die  $\beta$ -Galaktosidase Expression und die Sekretion von SASP-Komponenten auszeichnet, wird durch den Zellzyklusregulator p21 auf p53-abhängige und p53-unabhängige Weise initiiert (Georgakilas, Martin und Bonner, 2017). Bei der MCPyV-IS kommen entsprechend unterschiedliche Mechanismen der p21-Regulation zum Tragen. Zum einen die ATM/ Kap1 abhängige p21-Regulation, die über replikativen Stress ausgelöst wird, und zum anderen die ATR/ p53-abhängige p21-Regulation durch die Expression der T-Ag. In Transkriptom-Analysen zeigte die Expression der T-Ag eine Aktivierung der intrinsischen Immunantwort, während die Expression der T-Ag in Abwesenheit von Kap1 teilweise zu einer Inhibierung von Interleukinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren führte. Zusammengefasst spiegeln diese Gene einen Großteil der Gene wieder, die den Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) beschreiben.

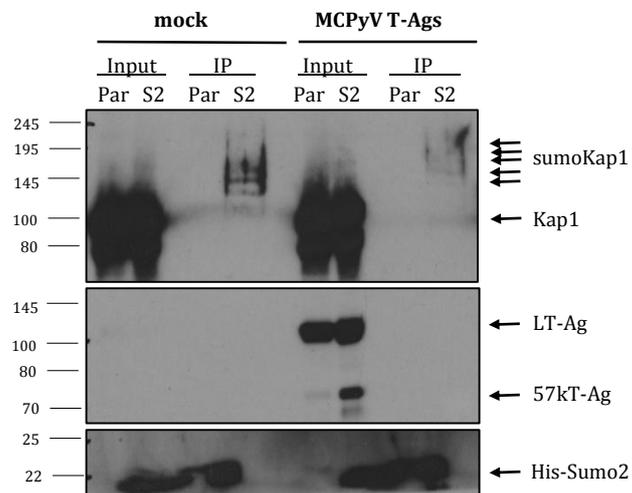
Für weitere funktionale Untersuchungen, wie z.B. die Sekretion von SASP-Komponenten in MCPyV-positiven Fibroblasten genau aussieht, bedarf es ein permissives Infektionssystem, indem eine effektive Infektion und Virusproduktion erreicht werden kann. Das Replikationsmodell in dermalen Fibroblasten stellt zwar einen Fortschritt zum einst semi-permissiven Replikationssystem dar, dennoch wird ein Infektionssystem benötigt, in dem vor allem die Infektion mit dem Virus möglich ist. Zurzeit (Stand 2018) kann zwar eine große Zahl von Viruspartikel in HEK293 Zellen hergestellt werden, diese sind aber nur zu einem geringen Teil infektiös. Zusätzlich müssen dermale Fibroblasten unter sehr speziellen Kulturbedingungen infiziert werden (Schowalter, Pastrana und Buck, 2011; Liu *et al.*, 2016, 2017). Ist ein vollständig permissives System erst einmal etabliert, können globale Effekte der MCPyV-IS auf Chromatinebene untersucht werden wie z.B. die Identifikation von der Seneszenz-assoziierten Heterochromatin Formation (SAHF) (Narita, 2007). Aber auch in nicht-seneszenten, infizierten Zellen sind die globalen Effekte der MCPyV-Infektion im Hinblick auf das Verständnis des viralen Lebenszyklus und im Hinblick auf Transformationsgeschehnisse äußerst spannend. Der seneszente Phänotyp, der in MCPyV-positiven Fibroblasten in dieser Arbeit beschrieben wurde, wirft die Frage auf, inwieweit neonatale dermale Fibroblasten tatsächlich die Wirtszelle für das MCPyV abbilden. Wie wird durch diesen Zustand virale Transmission gewährleistet? Kommt es zur Virusfreisetzung und Infektion von Nachbarzellen, sodass eine persistente Infektion sichergestellt wird? Weitere Forschungsbemühungen im gesamten MCPyV-Feld müssen diese Fragen beantworten. Es bleibt weiterhin die Frage nach dem Reservoir des MCPyV sowie die Ursprungszelle des Merkelzellkarzinoms zu klären.

Von großer Relevanz wäre zudem ein Transformationsmodell, indem die Rolle von Kap1 bei der MCPyV-abhängigen Transformation untersucht werden könnte. Bislang (Stand 2018) gibt es kein Transformationsmodell für das MCPyV. Vielversprechend sind Versuche in dermalen Fibroblasten, die allein durch die Expression des MCPyV sT-Ag innerhalb weniger Tage transformiert werden (unpublizierte Daten von Denise Galloway, Fred Hutchinson Cancer Research Center und Denise Ohnezeit, AG Fischer). Sollte sich herausstellen, dass MCPyV-seneszente Zellen tatsächlich eine Rolle bei der MCPyV-induzierten Merkelzellkarzinom Entstehung spielen, so wäre eine Strategie zur Vermeidung der Tumorgenese in immunsupprimierten und älteren Patienten die Eliminierung der seneszenten Zellen. Es wurden bereits Reagenzien wie FOXO4-DRI oder MitoTam beschrieben, die gezielt senescente Zellen eliminieren. Diese Reagenzien werden zurzeit als Mittel für altersbedingte Erkrankungen diskutiert (Krimpenfort und Berns, 2017; Serrano, 2017; Hubackova *et al.*, 2018).

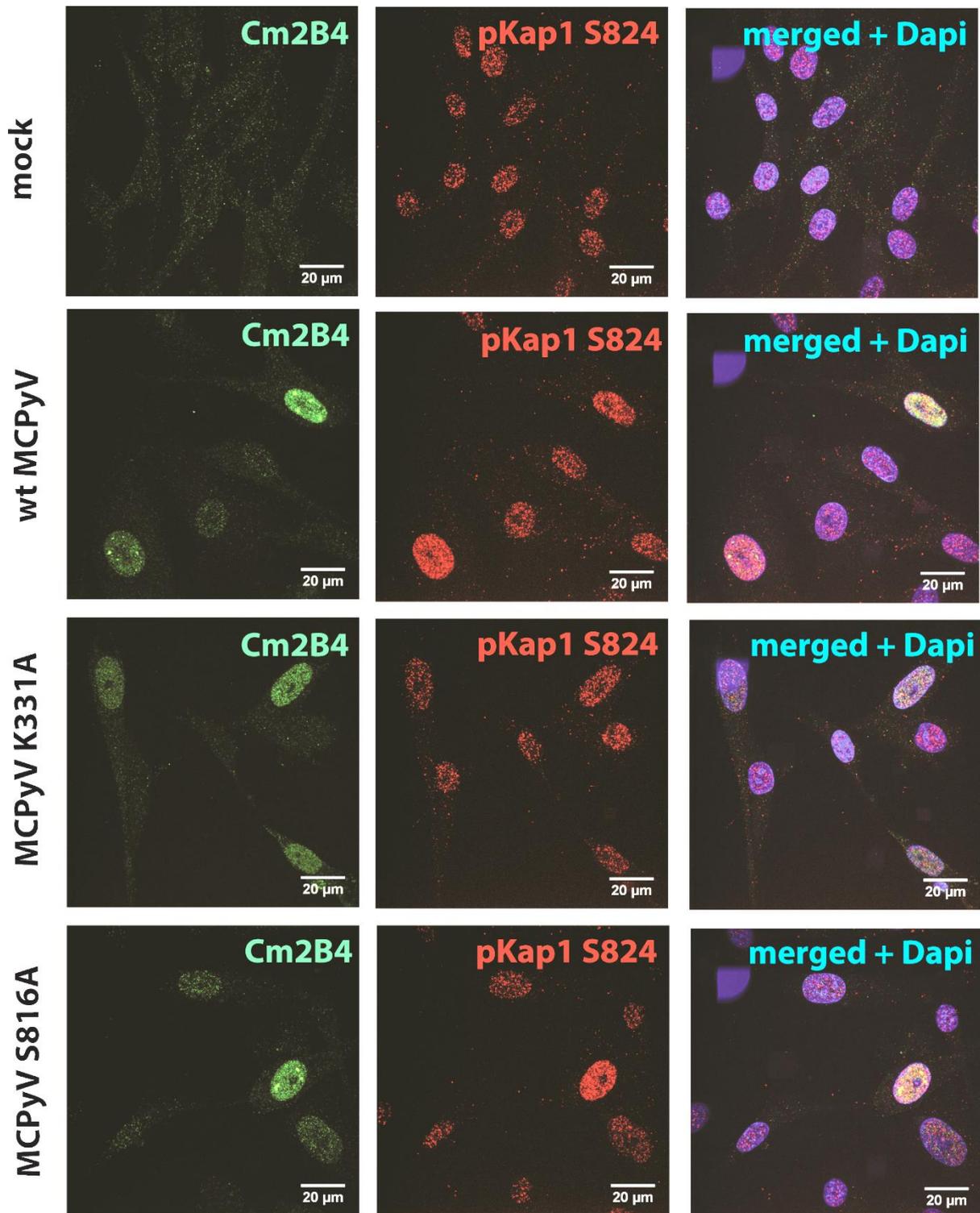
## 6 Anhang



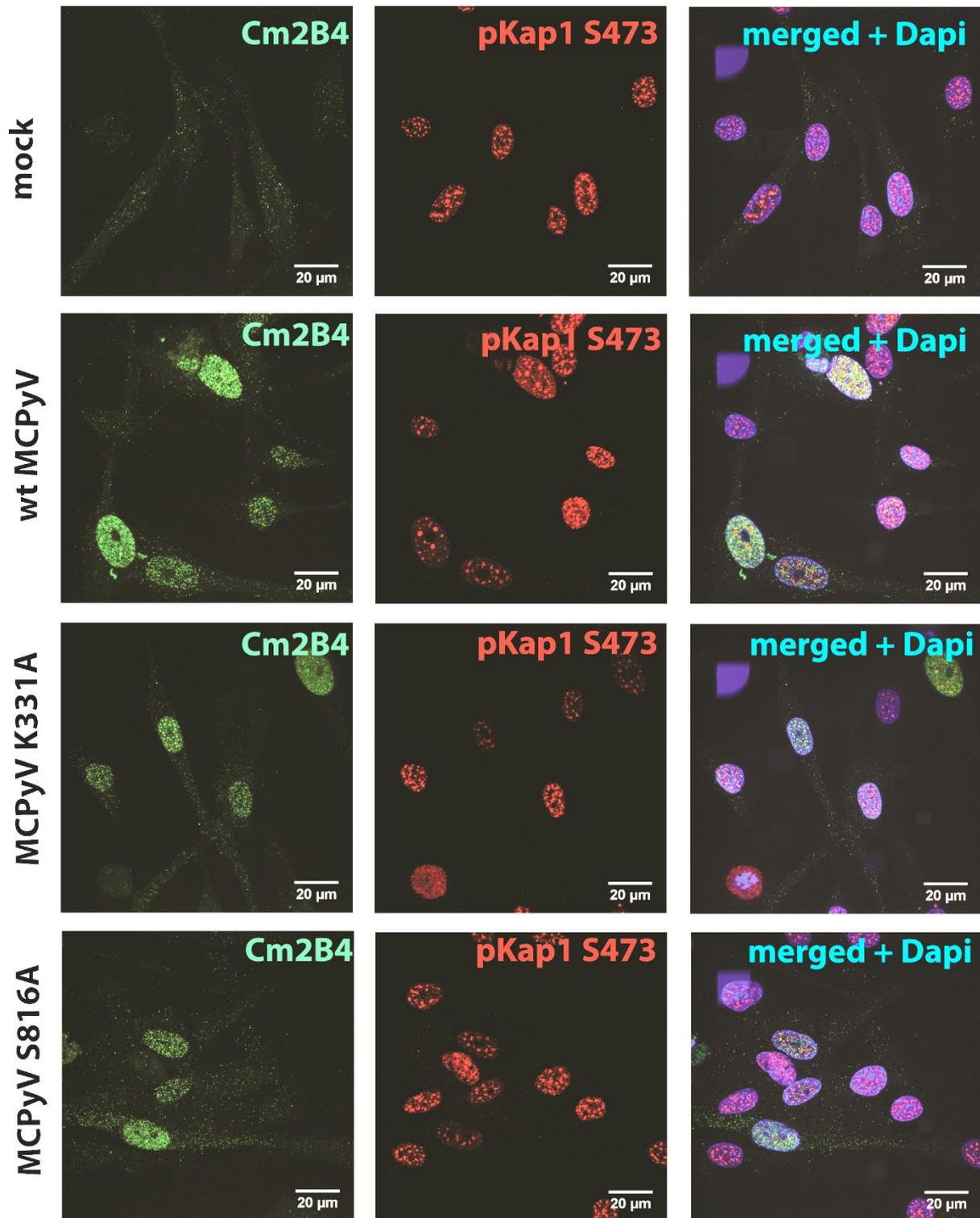
Anhang Abb. 1: Zellwachstum der HEK293 Kap1 "Rescue" Zellen im Vergleich zu HEK293 Kap1 k.o. Zellen und Kontrollzellen. MTT-Assays (Millipore): Dargestellt ist das Wachstum der Zellen im Vergleich zu Tag 1.



Anhang Abb. 2: Expression der MCPyV T-Ag führt zur verminderten SUMOylierung von endogenem Kap1. SUMO2-IP in HeLa Zellen. Parentale (Par) und SUMO2 stabile HeLa Zellen (S2) (Tatham et al. 2009) wurden mit einem Leervektor oder der MCPyV frühen Region transfiziert. 2 T.n.T wurden die Zellen geerntet und His-SUMO2 mithilfe von Ni-NTA Agarose Kugeln (Thermo Fisher) unter stark denaturierenden Bedingungen präzipitiert. Verwendete Antikörper: anti-Kap1 (abcam, 20C1), anti-LT-Ag (Cm2B4, Santa Cruz) und anti-His (Biolegend).



Anhang Abb. 3: **Phosphorylierung von Kap1 an Ser824 durch unterschiedliche MCPyV-Mutanten.** Neonatale dermale Fibroblasten wurden mit religiertem MCPyV-Genom elektroporiert und zwei Tage nach der Transfektion mithilfe von Immunfluoreszenz auf Kap1-Phosphorylierungsgehalt untersucht. **(a)** Anti-LT (Santa Cruz, Cm2B4) und anti-pKap1 Ser824 (abcam, ab70369) Antikörperfärbung.



Anhang Abb. 4: **Phosphorylierung von Kap1 an Ser473 durch unterschiedliche MCPyV-Mutanten.** Neonatale dermale Fibroblasten wurden mit religiertem MCPyV-Genom elektroporiert und zwei Tage nach der Transfektion mithilfe von Immunfluoreszenz auf Kap1-Phosphorylierungsgehalt untersucht. Anti-LT (Santa Cruz, Cm2B4) und anti-pKap1 Ser473 (abcam, ab133225) Antikörperfärbung.

Anhang Tab. 1: **Signifikante Gene Ontology Terms in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von Kap1.** Alle signifikant differentiell hochregulierten Gene ( $\log_2\text{fold change} \geq 1$ ;  $\text{FDR} < 0,1$ ) und alle signifikant herunterregulierten Gene ( $\log_2\text{fold change} \leq -1$ ;  $\text{FDR} < 0,1$ ) aus den Vergleichen (1) und (2) wurden zusammen betrachtet ( $n=490$ ). Mithilfe des *DAVID-Tools* (Huang, Sherman, und Lempicki 2009a, 2009b) wurden Gene Ontology Begriffe (GO -Terms) für Gene, die durch Kap1 reguliert werden, bestimmt. Dargestellt sind alle GO-Terms mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  und die jeweilige Anzahl differentiell exprimierter Gene in dieser Gruppe (n).

GO-Term	n	p-Wert
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-templated	93	6.43E-15
GO:0006351~transcription, DNA-templated	107	1.09E-13
GO:0003700~transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	66	7.98E-13
GO:0003676~nucleic acid binding	63	5.93E-11
GO:0046872~metal ion binding	102	1.07E-10
GO:0005622~intracellular	73	1.12E-09
GO:0007156~homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	20	3.36E-08
GO:0003677~DNA binding	81	3.89E-08
GO:0030198~extracellular matrix organization	22	4.92E-08
GO:0005509~calcium ion binding	45	9.75E-08
GO:0016339~calcium-dependent cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules	9	4.09E-07
GO:0000978~RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding	28	5.93E-07
GO:0007399~nervous system development	25	6.02E-07
GO:0007155~cell adhesion	31	4.38E-06
GO:0007416~synapse assembly	10	2.78E-05
GO:0007268~chemical synaptic transmission	19	6.54E-05
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	28	1.06E-04
GO:0008083~growth factor activity	14	3.03E-04
GO:0005578~proteinaceous extracellular matrix	18	5.79E-04
GO:0048566~embryonic digestive tract development	5	6.59E-04
GO:0005576~extracellular region	63	7.80E-04
GO:0045766~positive regulation of angiogenesis	11	8.86E-04
GO:0005604~basement membrane	9	9.30E-04
GO:0045165~cell fate commitment	7	0.001205981
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	22	0.001843382
GO:0005634~nucleus	169	0.001846337
GO:0071300~cellular response to retinoic acid	8	0.002339045
GO:0000977~RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	14	0.003008498

GO:0042475~odontogenesis of dentin-containing tooth	7	0.003063525
GO:0046545~development of primary female sexual characteristics	3	0.003968874
GO:0031012~extracellular matrix	17	0.004199404
GO:0060389~pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	4	0.004201572
GO:0051216~cartilage development	7	0.004362742
GO:0030155~regulation of cell adhesion	6	0.005121843
GO:0051965~positive regulation of synapse assembly	7	0.005575126
GO:0001755~neural crest cell migration	6	0.006229816
GO:0005615~extracellular space	50	0.008101887
GO:0035914~skeletal muscle cell differentiation	6	0.008931239
GO:0005581~collagen trimer	8	0.009370564
GO:0030855~epithelial cell differentiation	7	0.009991555
GO:0005788~endoplasmic reticulum lumen	12	0.010798005
GO:0006165~nucleoside diphosphate phosphorylation	4	0.010879467
GO:0008584~male gonad development	8	0.011728057
GO:0004550~nucleoside diphosphate kinase activity	4	0.014070424
GO:0030509~BMP signaling pathway	7	0.014628961
GO:0045666~positive regulation of neuron differentiation	7	0.016460255
GO:0043235~receptor complex	9	0.016610427
GO:0000976~transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	6	0.016776065
GO:0007267~cell-cell signaling	14	0.016805603
GO:0001657~ureteric bud development	5	0.016993872
GO:0005104~fibroblast growth factor receptor binding	4	0.018299457
GO:0001503~ossification	7	0.018443823
GO:0030199~collagen fibril organization	5	0.018554721
GO:0005518~collagen binding	6	0.019182638
GO:0001077~transcriptional activator activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding	13	0.019993012
GO:0010628~positive regulation of gene expression	14	0.02108485
GO:0045662~negative regulation of myoblast differentiation	4	0.021443854
GO:0016331~morphogenesis of embryonic epithelium	3	0.021830167
GO:0007507~heart development	11	0.022641089
GO:0005160~transforming growth factor beta receptor binding	5	0.022676384
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-templated	22	0.022966594
GO:0016525~negative regulation of angiogenesis	6	0.02303537
GO:0030335~positive regulation of cell migration	11	0.023406062
GO:0001658~branching involved in ureteric bud morphogenesis	5	0.023758054

GO:0060348~bone development	5	0.023758054
GO:0007422~peripheral nervous system development	4	0.024041643
GO:0009954~proximal/distal pattern formation	4	0.024041643
GO:0019215~intermediate filament binding	3	0.026109678
GO:0005667~transcription factor complex	11	0.027329591
GO:0014068~positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling	6	0.027610272
GO:0001501~skeletal system development	9	0.027908239
GO:0002053~positive regulation of mesenchymal cell proliferation	4	0.029723648
GO:0032870~cellular response to hormone stimulus	5	0.029762531
GO:0051591~response to cAMP	5	0.031945393
GO:0048484~enteric nervous system development	3	0.032220436
GO:0006600~creatine metabolic process	3	0.032220436
GO:0051781~positive regulation of cell division	5	0.034219749
GO:0001938~positive regulation of endothelial cell proliferation	6	0.034551965
GO:0098869~cellular oxidant detoxification	6	0.036441227
GO:0031581~hemidesmosome assembly	3	0.038005412
GO:0043616~keratinocyte proliferation	3	0.038005412
GO:0030336~negative regulation of cell migration	7	0.038657428
GO:0042572~retinol metabolic process	4	0.043008292
GO:0014032~neural crest cell development	3	0.044151564
GO:0060644~mammary gland epithelial cell differentiation	3	0.044151564
GO:0008144~drug binding	6	0.04666313

Anhang Tab. 2: **Signifikante KEGG Pathways in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von Kap1.** Alle signifikant differentiell hochregulierten Gene ( $\log_2\text{fold change} \geq 1$ ;  $\text{FDR} < 0,1$ ) und alle signifikant herunterregulierten Gene ( $\log_2\text{fold change} \leq -1$ ;  $\text{FDR} < 0,1$ ) aus den Vergleichen (1) und (2) wurden zusammen betrachtet ( $n=490$ ). Mithilfe des DAVID-Tools (Huang, Sherman, und Lempicki 2009a, 2009b) wurden KEGG-Pathways für Gene, die durch Kap1 und die T-Ag reguliert werden, bestimmt. Dargestellt sind alle KEGG-Pathways mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  und die jeweilige Anzahl differentiell exprimierter Gene in dieser Gruppe (n).

KEGG-Pathway	n	p-Wert
hsa04510:Focal adhesion	18	4.40E-06
hsa05200:Pathways in cancer	25	9.28E-06
hsa04151:PI3K-Akt signaling pathway	23	1.16E-05
hsa04512:ECM-receptor interaction	11	2.74E-05
hsa04350:TGF-beta signaling pathway	8	0.003072235
hsa04974:Protein digestion and absorption	8	0.003989457
hsa05146:Amoebiasis	8	0.010874157

hsa04390:Hippo signaling pathway	9	0.022849692
hsa04015:Rap1 signaling pathway	10	0.052705634
hsa00590:Arachidonic acid metabolism	5	0.053821445
hsa05145:Toxoplasmosis	7	0.054215301
hsa04014:Ras signaling pathway	10	0.076183749
hsa05218:Melanoma	5	0.080251707

Anhang Tab. 3: **Signifikante Gene Ontology Terms in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von den MCPyV T-Ag.** Alle signifikant differentiell hochregulierten Gene ( $\log_2\text{fold change} \geq 1$ ;  $\text{FDR} < 0,1$ ) und alle signifikant herunterregulierten Gene ( $\log_2\text{fold change} \leq -1$ ;  $\text{FDR} < 0,1$ ) aus den Vergleichen (3) und (4) wurden zusammen betrachtet ( $n=86$ ). Mithilfe des DAVID-Tools (Huang, Sherman, und Lempicki 2009a, 2009b) wurden Gene Ontology Begriffe (GO -Terms) für Gene, die durch Kap1 reguliert werden, bestimmt. Dargestellt sind alle GO-Terms mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  und die jeweilige Anzahl differentiell exprimierter Gene in dieser Gruppe (n).

GO-Term	n	p-Wert
GO:0006954~inflammatory response	8	0.001620951
GO:0071222~cellular response to lipopolysaccharide	5	0.001718495
GO:0005102~receptor binding	7	0.004205072
GO:0032496~response to lipopolysaccharide	5	0.0065229
GO:0048147~negative regulation of fibroblast proliferation	3	0.008634912
GO:0005615~extracellular space	13	0.018583106
GO:0014070~response to organic cyclic compound	3	0.020724955
GO:0019233~sensory perception of pain	3	0.02316631
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	6	0.033622864
GO:0008217~regulation of blood pressure	3	0.035000352
GO:0030828~positive regulation of cGMP biosynthetic process	2	0.035646632
GO:0030027~lamellipodium	4	0.0366382
GO:0002237~response to molecule of bacterial origin	2	0.040013341
GO:0034144~negative regulation of toll-like receptor 4 signaling pathway	2	0.040013341
GO:0006955~immune response	6	0.041974894
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	8	0.044081553
GO:0045087~innate immune response	6	0.045264359
GO:0032233~positive regulation of actin filament bundle assembly	2	0.048688305

Anhang Tab. 4: **Signifikante KEGG Pathways in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von den MCPyV T-Ag.** Alle signifikant differentiell hochregulierten Gene ( $\log_2\text{fold change} \geq 1$ ;  $\text{FDR} < 0,1$ ) und alle signifikant herunterregulierten Gene ( $\log_2\text{fold change} \leq -1$ ;  $\text{FDR} < 0,1$ ) aus den Vergleichen (3) und (4) wurden zusammen betrachtet ( $n=86$ ). Mithilfe des *DAVID-Tools* (Huang, Sherman, und Lempicki 2009a, 2009b) wurden KEGG-Pathways für Gene, die durch Kap1 und die T-Ag reguliert werden, bestimmt. Dargestellt sind alle KEGG-Pathways mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  und die jeweilige Anzahl differentiell exprimierter Gene in dieser Gruppe (n).

KEGG-Pathway	n	p-Wert
hsa04064:NF-kappa B signaling pathway	6	5.88E-05
hsa04913:Ovarian steroidogenesis	4	0.001718275
hsa05202:Transcriptional misregulation in cancer	5	0.008853561
hsa05323:Rheumatoid arthritis	4	0.008982318

Anhang Tab. 5: **Signifikante Gene Ontology Terms in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von Kap1 und den MCPyV T-Ag.** Alle signifikant differentiell hochregulierten Gene ( $\log_2\text{fold change} \geq 1$ ;  $\text{FDR} < 0,1$ ) und alle signifikant herunterregulierten Gene ( $\log_2\text{fold change} \leq -1$ ;  $\text{FDR} < 0,1$ ) aus den Vergleichen (5) und (6) wurden zusammen betrachtet. Zusätzlich wurden alle differentiell exprimierten Gene, die in den beiden Vergleichen entgegengesetzt reguliert wurden, eliminiert. Die Zahl der differentiell exprimierten Gene reduzierte sich dadurch von 1888 (gesamt 2467) auf 1512 Gene. Mithilfe des *DAVID-Tools* (Huang, Sherman, und Lempicki 2009a, 2009b) wurden Gene Ontology Begriffe (GO -Terms) für Gene, die durch Kap1 und die T-Ag reguliert werden, bestimmt. Dargestellt sind alle GO-Terms mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  und die jeweilige Anzahl differentiell exprimierter Gene in dieser Gruppe (n).

GO-Term	n	p-Wert
GO:0007156~homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	34	5,19E-08
GO:0030198~extracellular matrix organization	37	3,92E-07
GO:0007155~cell adhesion	62	7,27E-06
GO:0048844~artery morphogenesis	10	8,99E-06
GO:0006954~inflammatory response	52	2,87E-05
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	60	4,33E-05
GO:0048839~inner ear development	12	1,50E-04
GO:2000249~regulation of actin cytoskeleton reorganization	8	1,94E-04
GO:0022617~extracellular matrix disassembly	16	4,27E-04
GO:0007268~chemical synaptic transmission	34	4,76E-04
GO:0032496~response to lipopolysaccharide	26	4,88E-04
GO:0070588~calcium ion transmembrane transport	21	4,90E-04
GO:1903779~regulation of cardiac conduction	13	7,28E-04
GO:0007517~muscle organ development	17	8,23E-04
GO:0035725~sodium ion transmembrane transport	15	8,85E-04
GO:0006811~ion transport	21	0,001140808
GO:0030335~positive regulation of cell migration	27	0,001213673
GO:0034765~regulation of ion transmembrane transport	19	0,001403525

GO:0061337~cardiac conduction	11	0,001478566
GO:0040036~regulation of fibroblast growth factor receptor signaling pathway	5	0,001691989
GO:0006813~potassium ion transport	15	0,002813107
GO:0008217~regulation of blood pressure	13	0,002822269
GO:0019228~neuronal action potential	8	0,003726197
GO:0002576~platelet degranulation	17	0,003923828
GO:0001755~neural crest cell migration	10	0,005335077
GO:0060749~mammary gland alveolus development	6	0,006651431
GO:0007411~axon guidance	22	0,007508038
GO:0030326~embryonic limb morphogenesis	9	0,008434718
GO:0001525~angiogenesis	28	0,008685216
GO:0007275~multicellular organism development	55	0,008793538
GO:0031214~biomineral tissue development	7	0,008810942
GO:0050900~leukocyte migration	18	0,009110126
GO:0071222~cellular response to lipopolysaccharide	17	0,009648472
GO:0061098~positive regulation of protein tyrosine kinase activity	7	0,010746183
GO:0030097~hemopoiesis	11	0,011298025
GO:0048661~positive regulation of smooth muscle cell proliferation	11	0,01267722
GO:0060047~heart contraction	5	0,012781097
GO:0017144~drug metabolic process	7	0,012963989
GO:0035987~endodermal cell differentiation	7	0,012963989
GO:0048538~thymus development	9	0,013053
GO:0010629~negative regulation of gene expression	19	0,01333617
GO:0017015~regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	6	0,013826431
GO:0019233~sensory perception of pain	10	0,013886803
GO:0006508~proteolysis	52	0,013971241
GO:0001503~ossification	13	0,015136218
GO:0086010~membrane depolarization during action potential	7	0,015483387
GO:0060333~interferon-gamma-mediated signaling pathway	12	0,015595501
GO:0048469~cell maturation	8	0,015608251
GO:0021773~striatal medium spiny neuron differentiation	3	0,015862477
GO:0070278~extracellular matrix constituent secretion	3	0,015862477
GO:0048172~regulation of short-term neuronal synaptic plasticity	5	0,016854728
GO:0010001~glial cell differentiation	5	0,016854728
GO:0060080~inhibitory postsynaptic potential	4	0,017458712
GO:0045909~positive regulation of vasodilation	7	0,018322332

GO:0045214~sarcomere organization	7	0,018322332
GO:0048666~neuron development	9	0,019292475
GO:0019882~antigen processing and presentation	10	0,019670295
GO:1902476~chloride transmembrane transport	14	0,020400727
GO:0042517~positive regulation of tyrosine phosphorylation of Stat3 protein	8	0,020737947
GO:0034113~heterotypic cell-cell adhesion	6	0,020750683
GO:0051384~response to glucocorticoid	11	0,021539088
GO:0007204~positive regulation of cytosolic calcium ion concentration	18	0,021736604
GO:0045766~positive regulation of angiogenesis	16	0,023911641
GO:0051091~positive regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity	15	0,024033593
GO:0070206~protein trimerization	4	0,024754954
GO:0090197~positive regulation of chemokine secretion	4	0,024754954
GO:0060452~positive regulation of cardiac muscle contraction	4	0,024754954
GO:0060021~palate development	12	0,024909677
GO:0043200~response to amino acid	7	0,025024323
GO:0071392~cellular response to estradiol stimulus	7	0,025024323
GO:0006952~defense response	11	0,026113317
GO:0001501~skeletal system development	18	0,02635923
GO:0045071~negative regulation of viral genome replication	8	0,026935119
GO:0043010~camera-type eye development	8	0,026935119
GO:0061028~establishment of endothelial barrier	5	0,027205164
GO:0044130~negative regulation of growth of symbiont in host	5	0,027205164
GO:2000969~positive regulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate selective glutamate receptor activity	3	0,030159326
GO:0002925~positive regulation of humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	3	0,030159326
GO:0001938~positive regulation of endothelial cell proliferation	11	0,031343487
GO:0006955~immune response	43	0,033126806
GO:0008272~sulfate transport	4	0,033437148
GO:0040011~locomotion	4	0,033437148
GO:0048265~response to pain	5	0,033529389
GO:0030048~actin filament-based movement	5	0,033529389
GO:0071805~potassium ion transmembrane transport	16	0,035696783
GO:0042472~inner ear morphogenesis	9	0,037631526
GO:0032355~response to estradiol	13	0,037662548
GO:0000902~cell morphogenesis	10	0,039564832
GO:0007267~cell-cell signaling	28	0,039803188

GO:0006939~smooth muscle contraction	5	0,040637027
GO:0030225~macrophage differentiation	5	0,040637027
GO:0001709~cell fate determination	5	0,040637027
GO:0055085~transmembrane transport	27	0,041956454
GO:0006874~cellular calcium ion homeostasis	13	0,043470519
GO:0002064~epithelial cell development	4	0,043481529
GO:0048484~enteric nervous system development	4	0,043481529
GO:0006600~creatine metabolic process	4	0,043481529
GO:0002003~angiotensin maturation	4	0,043481529
GO:0032233~positive regulation of actin filament bundle assembly	4	0,043481529
GO:0031069~hair follicle morphogenesis	6	0,046808303
GO:0060337~type I interferon signaling pathway	10	0,047115107
GO:0030574~collagen catabolic process	10	0,047115107
GO:0008015~blood circulation	8	0,047611649
GO:0006572~tyrosine catabolic process	3	0,047801303
GO:0030240~skeletal muscle thin filament assembly	3	0,047801303
GO:0042403~thyroid hormone metabolic process	3	0,047801303
GO:0031622~positive regulation of fever generation	3	0,047801303
GO:0098914~membrane repolarization during atrial cardiac muscle cell action potential	3	0,047801303
GO:2000343~positive regulation of chemokine (C-X-C motif) ligand 2 production	3	0,047801303
GO:0006855~drug transmembrane transport	5	0,048531107
GO:0042832~defense response to protozoan	5	0,048531107

Anhang Tab. 6: **Signifikante KEGG Pathways in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von Kap1 und den MCPyV T-Ag.** Alle signifikant differentiell hochregulierten Gene ( $\log_2\text{fold change} \geq 1$ ;  $\text{FDR} < 0,1$ ) und alle signifikant herunterregulierten Gene ( $\log_2\text{fold change} \leq -1$ ;  $\text{FDR} < 0,1$ ) aus den Vergleichen (5) und (6) wurden zusammen betrachtet. Zusätzlich wurden alle differentiell exprimierten Gene, die in den beiden Vergleichen entgegengesetzt reguliert wurden, eliminiert. Die Zahl der differentiell exprimierten Gene reduzierte sich dadurch von 1888 (gesamt 2467) auf 1512 Gene. Mithilfe des DAVID-Tools (Huang, Sherman, und Lempicki 2009a, 2009b) wurden KEGG-Pathways für Gene, die durch Kap1 und die T-Ag reguliert werden, bestimmt. Dargestellt sind alle KEGG-Pathways mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  und die jeweilige Anzahl differentiell exprimierter Gene in dieser Gruppe (n).

KEGG-Pathway	n	p-Wert
hsa04974:Protein digestion and absorption	22	8,93E-07
hsa00350:Tyrosine metabolism	12	2,37E-05
hsa04514:Cell adhesion molecules (CAMs)	26	2,93E-05
hsa04512:ECM-receptor interaction	17	4,79E-04
hsa00360:Phenylalanine metabolism	7	9,12E-04

hsa05323:Rheumatoid arthritis	16	0,00160403
hsa04080:Neuroactive ligand-receptor interaction	35	0,001777021
hsa05200:Pathways in cancer	45	0,002602744
hsa05140:Leishmaniasis	13	0,004907502
hsa05145:Toxoplasmosis	18	0,00511877
hsa04672:Intestinal immune network for IgA production	10	0,006170697
hsa04726:Serotonergic synapse	17	0,006475454
hsa04725:Cholinergic synapse	17	0,006475454
hsa05414:Dilated cardiomyopathy	14	0,007488568
hsa05144:Malaria	10	0,008170632
hsa05146:Amoebiasis	16	0,009742248
hsa05410:Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	13	0,010463934
hsa05202:Transcriptional misregulation in cancer	22	0,010474148
hsa04610:Complement and coagulation cascades	12	0,010765361
hsa04510:Focal adhesion	25	0,01492147
hsa05150:Staphylococcus aureus infection	10	0,015304658
hsa05134:Legionellosis	10	0,015304658
hsa05330:Allograft rejection	8	0,016092561
hsa05321:Inflammatory bowel disease (IBD)	11	0,016805655
hsa04020:Calcium signaling pathway	22	0,020405321
hsa05416:Viral myocarditis	10	0,021341382
hsa04064:NF-kappa B signaling pathway	13	0,023601834
hsa04913:Ovarian steroidogenesis	9	0,024296163
hsa04060:Cytokine-cytokine receptor interaction	26	0,02870573
hsa04918:Thyroid hormone synthesis	11	0,029825826
hsa04622:RIG-I-like receptor signaling pathway	11	0,029825826
hsa04940:Type I diabetes mellitus	8	0,030822556
hsa02010:ABC transporters	8	0,038648555
hsa04640:Hematopoietic cell lineage	12	0,044285892
hsa04668:TNF signaling pathway	14	0,0443985



Anhang Abb. 5: **Regulation von (a) Kinasen, (b) Zytokinen und (c) Wachstumsfaktoren in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von Kap1 und den MCPyV T-Ag.** Heatmaps wurden mit der Ingenuity Pathway Analysis Software von Qiagen erstellt und stellen den "Activation z-score" dar. Der "Activation z-score" visualisiert die Expression der Gene und sagt voraus, ob ein Gen aktiviert (rot) oder inhibiert (blau) wird. Gezeigt sind alle Gene mit einem z-score  $\geq 1$  oder  $\leq (-1)$ . Folgende Vergleiche wurden miteinander verglichen (1) wt Frühe T-Region versus wt mock, (2) Kap1 k.o. Frühe T-Region versus Kap1 k.o. mock, (3) Kap1 k.o. mock versus wt mock (4), Kap1 k.o. Frühe T-Region versus wt Frühe T-Region, (5) Kap1 k.o. Frühe T-Region versus wt mock, (6) wt Frühe T-Region versus Kap1 k.o. mock.

Anhang Tab. 7: **Ingenuity Upstream Regulators.** Mithilfe der Ingenuity Pathway Analysis (IPA®) Software von Qiagen wurden die am meisten differentiell exprimierte Gene aus allen Vergleichen gegenübergestellt und aufgeführt. Mindestens ein Gen in jedem Vergleich weist einen Activation z-score  $\geq 3$  oder  $\leq (-3)$  auf. Folgende Vergleiche wurden miteinander verglichen (1) wt Frühe T-Region versus wt mock, (2) Kap1 k.o. Frühe T-Region versus Kap1 k.o. mock, (3) Kap1 k.o. mock versus wt mock (4), Kap1 k.o. Frühe T-Region versus wt Frühe T-Region, (5) Kap1 k.o. Frühe T-Region versus wt mock, (6) wt Frühe T-Region versus Kap1 k.o. mock. N/A= not annotated.

Upstream regulators	(3)	(4)	(1)	(2)	(5)	(6)
NFkB (complex)	-1.89	-3.60	4.24	3.76	1.44	4.71
IL1B	-1.69	-3.79	4.52	3.26	0.77	5.62
TNF	-1.00	-2.38	4.65	3.53	0.92	5.41
F2	-1.70	-3.37	3.85	2.91	0.89	5.04
tretinoin	-1.37	-2.57	3.94	3.05	1.41	5.21
HGF	-2.80	-3.06	2.68	2.35	-1.82	4.72
lipopolysaccharide	-1.40	-2.43	3.37	2.78	1.74	5.39
poly rI:rC-RNA	N/A	-2.49	3.81	3.29	1.76	4.87
LY294002	N/A	2.12	-3.75	-3.48	-2.39	-4.44
IFNG	-0.22	-1.26	4.66	2.46	2.64	3.46
CD40LG	-2.01	-2.14	3.64	3.02	N/A	3.81
E. coli B5 lipopolysaccharide	N/A	-3.03	2.23	2.74	2.70	3.92
Vegf	-2.81	-3.80	2.33	N/A	-0.28	5.12
phorbol myristate acetate	-0.74	-1.49	3.87	3.12	1.12	3.77
U0126	0.55	2.01	-3.64	-2.53	-1.35	-3.95
HIF1A	-2.63	-3.26	2.72	1.06	-0.48	3.87
Alpha catenin	1.67	2.30	-2.95	-2.45	-0.52	-3.98
IGF1	-1.63	-2.73	2.50	2.77	0.38	3.74
CSF2	N/A	-1.77	2.63	3.05	3.25	2.95
P38 MAPK	-2.06	-2.61	3.12	1.97	-0.03	3.81
IRF1	2.38	N/A	3.06	2.17	3.23	2.72
F2R	-2.25	-2.81	2.39	2.39	0.19	3.49
PD98059	2.68	2.41	-2.14	-2.81	0.01	-3.48
decitabine	-0.73	-2.08	2.44	3.07	0.71	4.41

E. coli B4 lipopolysaccharide	N/A	N/A	3.18	2.90	3.61	3.74
TLR3	-2.04	-1.98	2.88	2.20	N/A	4.08
IL1A	N/A	-3.05	3.37	2.36	N/A	4.35
SMARCA4	-0.84	-1.80	3.38	N/A	2.08	4.87
Tlr	N/A	-1.98	2.59	2.21	2.59	3.36
SP1	1.80	1.24	2.37	1.96	4.28	1.01
salmonella minnesota R595 lipopolysaccharides	N/A	N/A	3.23	3.11	3.71	2.59
Salmonella enterica serotype abortus equi lipopolysaccharide	N/A	-1.85	2.37	2.39	1.36	4.51
MYD88	N/A	N/A	2.87	2.85	3.64	3.07
RELA	-1.64	-1.39	2.18	2.75	0.78	3.55
ATF4	-3.09	-2.15	-1.71	N/A	-3.39	1.75
IL1RN	N/A	1.92	-3.36	-2.58	-0.82	-3.23
tributyryn	N/A	-2.56	2.16	2.43	0.55	4.14
PDGF BB	-1.74	-2.67	2.22	N/A	-1.05	4.14
thapsigargin	-3.10	-2.55	1.27	N/A	-1.90	2.86
EGF	-1.25	-2.25	1.24	2.90	0.92	3.06
ERK1/2	-1.86	-1.24	2.05	2.19	0.71	3.52
FOXA1	2.66	3.15	N/A	N/A	3.13	-2.62
TLR7	N/A	N/A	3.22	2.06	2.74	3.48
TICAM1	N/A	N/A	3.14	2.97	2.96	2.41
doxorubicin	-1.65	-1.80	2.59	2.17	-0.05	3.04
KLF3	1.52	2.78	N/A	N/A	4.15	-2.73
TCF7L2	-1.90	-2.56	3.43	N/A	N/A	3.23
EGLN	2.09	3.21	N/A	N/A	2.52	-3.04
5-azacytidine	0.86	N/A	2.75	1.96	3.20	1.98
bromodeoxyuridine	N/A	N/A	2.41	2.20	2.97	3.15
STAT1	N/A	0.23	2.78	2.42	3.65	1.62
ESR1	-2.27	-2.60	-0.22	-0.77	-3.31	1.50
AGT	-1.28	-2.53	1.84	1.62	0.08	3.07
IL1	N/A	-2.38	2.57	1.55	N/A	3.88
Interferon alpha	N/A	N/A	3.00	1.92	2.41	3.02
APP	-0.42	N/A	3.06	1.61	1.80	3.27
salirasib	2.17	3.16	N/A	N/A	1.53	-3.29
JAK1/2	N/A	N/A	3.00	2.24	2.98	1.90
F3	-2.45	-1.90	N/A	1.99	N/A	3.76
IKBKB	N/A	-1.63	2.46	2.39	0.37	3.17

IFNL1	N/A	-1.04	2.16	1.93	1.50	3.30
IL2	-1.74	-2.15	2.94	N/A	N/A	3.06
EDN1	-2.10	-2.24	N/A	2.18	N/A	3.34
stallimycin	N/A	N/A	2.41	2.20	2.06	3.15
mitomycin C	-2.20	-2.40	0.22	N/A	-3.09	1.86
peptidoglycan	-1.95	N/A	2.34	1.95	N/A	3.51
TLR4	N/A	N/A	3.09	2.33	2.63	1.65
OSM	-1.02	-2.39	1.78	1.18	N/A	3.26
cyclic AMP	-0.60	-2.09	1.93	1.85	N/A	3.12
IL6	N/A	-2.49	2.10	1.56	0.16	3.10
RAF1	-2.29	-2.11	0.67	N/A	-0.73	3.57
DDX58	N/A	0.36	2.17	1.73	3.22	1.78
INSIG1	2.14	3.15	N/A	N/A	N/A	-3.90
Pka	-1.39	-2.25	N/A	N/A	-2.20	3.27
CTNNB1	-0.36	-2.03	2.29	N/A	1.29	3.05
Nr1h	N/A	N/A	-2.38	-2.39	-3.35	-0.73
KITLG	N/A	-2.90	N/A	2.39	N/A	3.37
TLR9	N/A	N/A	2.77	2.23	N/A	3.60
JUN	-0.64	-1.98	2.93	N/A	N/A	3.04
IL18	N/A	N/A	3.21	2.36	N/A	3.01
IL12 (complex)	N/A	N/A	3.08	2.59	N/A	2.90
AHR	-0.26	1.72	-3.27	N/A	-1.15	-1.95
calphostin C	N/A	2.59	-2.21	N/A	N/A	-3.54
REL	N/A	N/A	3.05	2.20	N/A	3.06
Nfat (family)	N/A	-2.16	2.58	N/A	N/A	3.32
5-O-mycolyl-beta-araf-(1->2)-5-O-mycolyl-alpha-araf-(1->1')-glycerol	N/A	N/A	2.53	2.24	N/A	3.16
mycophenolic acid	N/A	N/A	2.12	1.81	N/A	3.89
SMARCB1	-1.07	-2.49	N/A	N/A	N/A	4.04
Tnf (family)	N/A	N/A	2.57	1.84	N/A	3.16
CpG oligonucleotide	N/A	-2.38	N/A	1.98	N/A	3.21
miR-155-5p(miRNAsw/seedUAAUGCU)	1.53	N/A	-1.80	N/A	0.80	-3.06
STAT4	-1.55	-2.31	N/A	N/A	0.03	3.29
CD40	N/A	N/A	3.01	2.17	N/A	1.84
IL5	N/A	-0.89	N/A	2.56	N/A	3.40
Ap1	N/A	-1.95	1.16	N/A	N/A	3.61
FN1	-0.71	N/A	N/A	2.10	0.76	3.07

NKX2-3	-1.30	0.00	-3.05	N/A	-1.86	0.36
IL17A	N/A	N/A	1.20	1.91	N/A	3.35
COL18A1	N/A	N/A	-1.09	-2.22	N/A	-3.06
CEBPA	N/A	-1.44	1.81	N/A	N/A	3.11
PRKCA	N/A	N/A	2.76	N/A	N/A	3.26
CHUK	-0.62	-1.06	N/A	1.18	N/A	3.12
CEBPB	-1.77	N/A	N/A	0.74	N/A	3.24
IL7	N/A	N/A	2.19	N/A	N/A	3.10
F2RL1	N/A	-2.11	N/A	N/A	N/A	3.06
GAST	N/A	-1.88	N/A	N/A	N/A	3.04
IFN alpha/beta	N/A	N/A	N/A	N/A	3.16	N/A

Anhang Tab. 8: **Liste von Genen aus der GeneCards® Datenbank (<https://www.genecards.org/>), die mit einem SASP assoziiert sind.** Der Download dieser Liste erfolgte am 09.07.2018. Der "GeneCards Inferred Functionality Scores" (GIFtS) bewertet dabei die Relevanz des Gens zum jeweiligen Suchbegriff (genauer nachzulesen in Harel *et al.*, 2009).

	Symbol	Description	GIFtS	GC id
1	CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A	59	GC09M021957
2	TP53	Tumor Protein P53	65	GC17M007661
3	CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A	61	GC06P040154
4	SIRT1	Sirtuin 1	59	GC10P067884
5	RB1	RB Transcriptional Corepressor 1	59	GC13P048303
6	CXCL8	C-X-C Motif Chemokine Ligand 8	47	GC04P073740
7	IL6	Interleukin 6	59	GC07P022765
8	MAPK14	Mitogen-Activated Protein Kinase 14	61	GC06P040140
9	CDKN1B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B	59	GC12P012716
10	NFKB1	Nuclear Factor Kappa B Subunit 1	63	GC04P102501
11	CDK6	Cyclin Dependent Kinase 6	63	GC07M092604
12	ATM	ATM Serine/Threonine Kinase	65	GC11P108127
13	IL1A	Interleukin 1 Alpha	54	GC02M112773
14	BMI1	BMI1 Proto-Oncogene, Polycomb Ring Finger	53	GC10P022326
15	CDK2	Cyclin Dependent Kinase 2	63	GC12P055966
16	MTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase	63	GC01M011166
17	STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3	62	GC17M042313
18	MAPK1	Mitogen-Activated Protein Kinase 1	63	GC22M021754
19	RELA	RELA Proto-Oncogene, NF-KB Subunit	59	GC11M065671
20	CDK4	Cyclin Dependent Kinase 4	67	GC12M057743
21	H2AFX	H2A Histone Family Member X	54	GC11M119095

22	IGFBP7	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 7	55	GC04M057030
23	TNF	Tumor Necrosis Factor	64	GC06P031673
24	CAV1	Caveolin 1	59	GC07P116524
25	CCNA2	Cyclin A2	55	GC04M121816
26	CDKN2B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B	56	GC09M021992
27	JUN	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	60	GC01M058780
28	MAPK3	Mitogen-Activated Protein Kinase 3	60	GC16M030125
29	IGF1	Insulin Like Growth Factor 1	59	GC12M102395
30	FOS	Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	61	GC14P075278
31	CCL2	C-C Motif Chemokine Ligand 2	57	GC17P034255
32	NOX4	NADPH Oxidase 4	51	GC11M089324
33	UBC	Ubiquitin C	51	GC12M124911
34	HIST4H4	Histone Cluster 4 H4	49	GC12M014767
35	TXN	Thioredoxin	55	GC09M110243
36	CDKN2C	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2C	55	GC01P050960
37	CEBPB	CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta	54	GC20P050190
38	IL1B	Interleukin 1 Beta	58	GC02M112829
39	RPS27A	Ribosomal Protein S27a	53	GC02P055231
40	H2AFZ	H2A Histone Family Member Z	52	GC04M099948
41	CXCL1	C-X-C Motif Chemokine Ligand 1	51	GC04P073869
42	CDKN2D	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2D	52	GC19M010566
43	CCNA1	Cyclin A1	52	GC13P036431
44	IFNG	Interferon Gamma	58	GC12M068064
45	PPARG	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma	64	GC03P012328
46	H3F3A	H3 Histone Family Member 3A	52	GC01P226061
47	KDM6B	Lysine Demethylase 6B	48	GC17P007834
48	UBB	Ubiquitin B	53	GC17P016301
49	UBA52	Ubiquitin A-52 Residue Ribosomal Protein Fusion Product 1	50	GC19P018563
50	HSF1	Heat Shock Transcription Factor 1	54	GC08P144291
51	HIST1H2AB	Histone Cluster 1 H2A Family Member B	46	GC06M026033
52	HIST1H2AC	Histone Cluster 1 H2A Family Member C	44	GC06P026845
53	HIST1H2AE	Histone Cluster 1 H2A Family Member E	44	GC06P026859
54	HIST2H2AA3	Histone Cluster 2 H2A Family Member A3	43	GC01M149843
55	HIST2H2AC	Histone Cluster 2 H2A Family Member C	48	GC01P149886
56	HIST2H2BE	Histone Cluster 2 H2B Family Member E	48	GC01M149884

57	HIST1H2BL	Histone Cluster 1 H2B Family Member L	44	GC06M027808
58	HIST1H2BD	Histone Cluster 1 H2B Family Member D	44	GC06P026813
59	HIST1H2AJ	Histone Cluster 1 H2A Family Member J	43	GC06M027816
60	HIST1H2BK	Histone Cluster 1 H2B Family Member K	42	GC06M027138
61	HIST1H2BO	Histone Cluster 1 H2B Family Member O	42	GC06P027895
62	HIST1H2AD	Histone Cluster 1 H2A Family Member D	42	GC06M026198
63	HIST1H4E	Histone Cluster 1 H4 Family Member E	41	GC06P026204
64	HIST1H2BN	Histone Cluster 1 H2B Family Member N	41	GC06P027844
65	HIST2H2AA4	Histone Cluster 2 H2A Family Member A4	34	GC01P149855
66	H2AFV	H2A Histone Family Member V	46	GC07M044828
67	HIST1H4C	Histone Cluster 1 H4 Family Member C	46	GC06P026815
68	HIST1H4I	Histone Cluster 1 H4 Family Member I	45	GC06P027138
69	HIST1H4J	Histone Cluster 1 H4 Family Member J	45	GC06P027824
70	HIST1H2BA	Histone Cluster 1 H2B Family Member A	45	GC06P025726
71	HIST1H4H	Histone Cluster 1 H4 Family Member H	44	GC06M026589
72	HIST1H4F	Histone Cluster 1 H4 Family Member F	44	GC06P026240
73	HIST1H2BC	Histone Cluster 1 H2B Family Member C	44	GC06M026583
74	HIST1H2BJ	Histone Cluster 1 H2B Family Member J	44	GC06M027125
75	HIST1H4A	Histone Cluster 1 H4 Family Member A	44	GC06P026021
76	HIST1H4B	Histone Cluster 1 H4 Family Member B	44	GC06M026027
77	HIST1H2BH	Histone Cluster 1 H2B Family Member H	44	GC06P026251
78	H2AFJ	H2A Histone Family Member J	43	GC12P014782
79	HIST1H2BI	Histone Cluster 1 H2B Family Member I	43	GC06P026890
80	HIST1H4K	Histone Cluster 1 H4 Family Member K	43	GC06M027850
81	HIST1H4D	Histone Cluster 1 H4 Family Member D	42	GC06M026188
82	HIST1H2BB	Histone Cluster 1 H2B Family Member B	42	GC06M026043
83	HIST1H4L	Histone Cluster 1 H4 Family Member L	42	GC06M028074
84	HIST1H2BE	Histone Cluster 1 H2B Family Member E	42	GC06P026814
85	HIST3H2BB	Histone Cluster 3 H2B Family Member B	41	GC01P228458
86	HIST1H2BM	Histone Cluster 1 H2B Family Member M	41	GC06P027815
87	HIST1H2BF	Histone Cluster 1 H2B Family Member F	41	GC06P026199
88	HIST2H4A	Histone Cluster 2 H4 Family Member A	40	GC01P149804
89	HIST1H2BG	Histone Cluster 1 H2B Family Member G	39	GC06M026551
90	HIST2H4B	Histone Cluster 2 H4 Family Member B	36	GC01M149854
91	H2AFB1	H2A Histone Family Member B1	34	GC0XP154884
92	LOC102724334	Histone H2B Type F-S-Like	5	GC21M005972
93	VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	61	GC06P043737

94	KL	Klotho	55	GC13P033016
95	H3F3B	H3 Histone Family Member 3B	49	GC17M075776
96	ARG2	Arginase 2	55	GC14P067619
97	FZR1	Fizzy And Cell Division Cycle 20 Related 1	49	GC19P003506
98	RHOA	Ras Homolog Family Member A	56	GC03M049397
99	FAS	Fas Cell Surface Death Receptor	61	GC10P088969
100	KIR2DL4	Killer Cell Immunoglobulin Like Receptor, Two Ig Domains And Long Cytoplasmic Tail 4	48	GC19P054994
101	CNOT6	CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 6	48	GC05P180494
102	HIST1H3B	Histone Cluster 1 H3 Family Member B	47	GC06M026031
103	HIST1H3H	Histone Cluster 1 H3 Family Member H	44	GC06P027810
104	HIST1H3A	Histone Cluster 1 H3 Family Member A	44	GC06P026020
105	HIST1H3C	Histone Cluster 1 H3 Family Member C	43	GC06P026062
106	HIST1H3J	Histone Cluster 1 H3 Family Member J	43	GC06M028077
107	HIST1H3I	Histone Cluster 1 H3 Family Member I	43	GC06M028073
108	HIST2H3C	Histone Cluster 2 H3 Family Member C	42	GC01M149839
109	HIST1H3F	Histone Cluster 1 H3 Family Member F	42	GC06M026250
110	HIST1H3G	Histone Cluster 1 H3 Family Member G	42	GC06M026269
111	HIST1H3E	Histone Cluster 1 H3 Family Member E	41	GC06P026889
112	HIST1H3D	Histone Cluster 1 H3 Family Member D	41	GC06M026582
113	HIST2H3D	Histone Cluster 2 H3 Family Member D	39	GC01M149814
114	HIST2H3A	Histone Cluster 2 H3 Family Member A	38	GC01P149857
115	MIR4738	MicroRNA 4738	14	GC17M075784
116	IL1R1	Interleukin 1 Receptor Type 1	56	GC02P102136
117	IRAK1	Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1	58	GC0XM154010
118	FGF2	Fibroblast Growth Factor 2	57	GC04P122826
119	EHMT2	Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 2	53	GC06M031879
120	IL1RAPL2	Interleukin 1 Receptor Accessory Protein Like 2	46	GC0XP104566
121	MAPKAPK2	Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2	56	GC01P206684
122	CDC27	Cell Division Cycle 27	51	GC17M047117
123	ANAPC7	Anaphase Promoting Complex Subunit 7	46	GC12M110372
124	ANAPC5	Anaphase Promoting Complex Subunit 5	46	GC12M121326
125	ANAPC4	Anaphase Promoting Complex Subunit 4	44	GC04P025379
126	UBE2D1	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 D1	54	GC10P058334
127	IL2	Interleukin 2	56	GC04M122451
128	NFE2L2	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2	55	GC02M177227
129	UBE2C	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 C	55	GC20P045812

130	ANAPC11	Anaphase Promoting Complex Subunit 11	48	GC17P081890
131	ANAPC2	Anaphase Promoting Complex Subunit 2	48	GC09M137174
132	RPS6KB1	Ribosomal Protein S6 Kinase B1	59	GC17P059893
133	RPS6KA3	Ribosomal Protein S6 Kinase A3	63	GC0XM020149
134	RPS6KA1	Ribosomal Protein S6 Kinase A1	60	GC01P026540
135	MAPK7	Mitogen-Activated Protein Kinase 7	57	GC17P019379
136	EHMT1	Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 1	55	GC09P137618
137	RPS6KA2	Ribosomal Protein S6 Kinase A2	55	GC06M166409
138	UBE2E1	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 E1	51	GC03P023805
139	CDC16	Cell Division Cycle 16	48	GC13P114234
140	CDC23	Cell Division Cycle 23	48	GC05M138198
141	ANAPC10	Anaphase Promoting Complex Subunit 10	47	GC04M144831
142	ANAPC1	Anaphase Promoting Complex Subunit 1	46	GC02M111768
143	ANAPC16	Anaphase Promoting Complex Subunit 16	42	GC10P072222
144	CDC26	Cell Division Cycle 26	42	GC09M113255
145	ANAPC15	Anaphase Promoting Complex Subunit 15	38	GC11M072106
146	MIR146A	MicroRNA 146a	21	GC05P160485
147	ILF3	Interleukin Enhancer Binding Factor 3	48	GC19P010625
148	MMP3	Matrix Metalloproteinase 3	61	GC11M102835
149	KMT2A	Lysine Methyltransferase 2A	51	GC11P118436
150	BHLHE40	Basic Helix-Loop-Helix Family Member E40	48	GC03P004997
151	CD40LG	CD40 Ligand	57	GC0XP136649
152	ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1	60	GC19P010270
153	GATA4	GATA Binding Protein 4	59	GC08P011676
154	XDH	Xanthine Dehydrogenase	59	GC02M031294
155	VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1	57	GC01P100719
156	CXCR2	C-X-C Motif Chemokine Receptor 2	58	GC02P218125
157	MIR335	MicroRNA 335	16	GC07P130496
158	G6PD	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase	59	GC0XM154531
159	ITGB3	Integrin Subunit Beta 3	59	GC17P047254
160	CDH1	Cadherin 1	62	GC16P068737
161	MIR24-1	MicroRNA 24-1	15	GC09P095086
162	HMGB2	High Mobility Group Box 2	51	GC04M173331
163	CRP	C-Reactive Protein	56	GC01M159682
164	TLR4	Toll Like Receptor 4	62	GC09P117704
165	PRKD1	Protein Kinase D1	56	GC14M029576
166	SPP1	Secreted Phosphoprotein 1	55	GC04P087975

167	PRKCH	Protein Kinase C Eta	59	GC14P061187
168	CCR2	C-C Motif Chemokine Receptor 2	53	GC03P046356
169	TRIM28	Tripartite Motif Containing 28	51	GC19P058544
170	BRD4	Bromodomain Containing 4	52	GC19M015236
171	PDGFRB	Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta	66	GC05M150113
172	USP28	Ubiquitin Specific Peptidase 28	48	GC11M113797
173	MIR15B	MicroRNA 15b	16	GC03P160404
174	SIRT4	Sirtuin 4	47	GC12P120291
175	HLA-B	Major Histocompatibility Complex, Class I, B	55	GC06M031277
176	CEBPG	CCAAT/Enhancer Binding Protein Gamma	46	GC19P033373
177	PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2	59	GC01M186640
178	MIR29C	MicroRNA 29c	17	GC01M207802
179	ADAM17	ADAM Metallopeptidase Domain 17	61	GC02M009580
180	SLC7A11	Solute Carrier Family 7 Member 11	53	GC04M138164
181	SELE	Selectin E	55	GC01M169722
182	IL2RA	Interleukin 2 Receptor Subunit Alpha	63	GC10M006010
183	CFH	Complement Factor H	56	GC01P196621
184	A2M	Alpha-2-Macroglobulin	55	GC12M009067
185	TFE3	Transcription Factor Binding To IGHM Enhancer 3	52	GC0XM049028
186	ASPSCR1	ASPSCR1, UBX Domain Containing Tether For SLC2A4	50	GC17P081976
187	IL1RN	Interleukin 1 Receptor Antagonist	58	GC02P113241
188	MIR24-2	MicroRNA 24-2	15	GC19M013899
189	NQO1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1	59	GC16M069706
190	ELANE	Elastase, Neutrophil Expressed	57	GC19P000854
191	DDX58	DEXD/H-Box Helicase 58	57	GC09M032455
192	ATF4	Activating Transcription Factor 4	57	GC22P039519
193	NFKBIA	NFKB Inhibitor Alpha	61	GC14M035401
194	ALOX5	Arachidonate 5-Lipoxygenase	54	GC10P045338
195	CHUK	Conserved Helix-Loop-Helix Ubiquitous Kinase	61	GC10M100188
196	MPO	Myeloperoxidase	61	GC17M058269
197	CSF1	Colony Stimulating Factor 1	54	GC01P109911
198	NFKB2	Nuclear Factor Kappa B Subunit 2	63	GC10P102394
199	SAA1	Serum Amyloid A1	51	GC11P018267
200	CX3CL1	C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1	51	GC16P057372
201	MTHFR	Methylenetetrahydrofolate Reductase	57	GC01M011845
202	ITGAM	Integrin Subunit Alpha M	56	GC16P031271

203	IKBKB	Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta	64	GC08P042247
204	IL12B	Interleukin 12B	53	GC05M159314
205	SELL	Selectin L	51	GC01M169659
206	CD59	CD59 Molecule (CD59 Blood Group)	58	GC11M033699
207	CD55	CD55 Molecule (Cromer Blood Group)	57	GC01P207321
208	CD46	CD46 Molecule	56	GC01P207752
209	FANCA	Fanconi Anemia Complementation Group A	57	GC16M089740
210	MIR155	MicroRNA 155	17	GC21P025573
211	PTH1H	Parathyroid Hormone Like Hormone	55	GC12M027959
212	CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4	57	GC02P203867

## 7 Referenzen

- Allouch, A. *et al.* (2011) 'The TRIM family protein KAP1 inhibits HIV-1 integration.', *Cell host & microbe*, 9(6), pp. 484–95. doi: 10.1016/j.chom.2011.05.004.
- An, P., Sáenz Robles, M. T. and Pipas, J. M. (2012) 'Large T Antigens of Polyomaviruses: Amazing Molecular Machines', *Annual Review of Microbiology*, 66(1), pp. 213–236. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150154.
- Becker, J. C. *et al.* (2009) 'MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients.', *The Journal of investigative dermatology*, 129(1), pp. 248–50. doi: 10.1038/jid.2008.198.
- Becker, J. C. *et al.* (2018) 'Epidemiology, biology and therapy of Merkel cell carcinoma: conclusions from the EU project IMMOMECC', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 67(3), pp. 341–351. doi: 10.1007/s00262-017-2099-3.
- Bentz, G. L. *et al.* (2015) 'LMP1-Induced Sumoylation Influences the Maintenance of Epstein-Barr Virus Latency through KAP1', *Journal of Virology*. Edited by L. Hutt-Fletcher, 89(15), pp. 7465–7477. doi: 10.1128/JVI.00711-15.
- Berrios, C. *et al.* (2016) 'Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Promotes Pro-Glycolytic Metabolic Perturbations Required for Transformation', *PLOS Pathogens*. Edited by R. F. Kalejta, 12(11), p. e1006020. doi: 10.1371/journal.ppat.1006020.
- Beucher, A. *et al.* (2009) 'ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2.', *The EMBO journal*, 28(21), pp. 3413–27. doi: 10.1038/emboj.2009.276.
- Bhatia, K. *et al.* (2010) 'Merkel cell carcinoma subgroups by Merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression.', *International journal of cancer*, 126(9), pp. 2240–6. doi: 10.1002/ijc.24676.
- Bhattacharjee, S. and Chattaraj, S. (2017) 'Entry, infection, replication, and egress of human polyomaviruses: an update.', *Canadian journal of microbiology*, 63(3), pp. 193–211. doi: 10.1139/cjm-2016-0519.
- Bielak-Zmijewska, A., Mosieniak, G. und Sikroa, E. (2018) 'Is DNA damage indispensable for stress-induced senescence?', *Mechanisms of Ageing and Development*, 170, pp. 13–21. doi: 10.1016/j.mad.2017.08.004.
- Boehm, J. S. *et al.* (2005) 'Transformation of Human and Murine Fibroblasts without Viral

- Oncoproteins', *Molecular and Cellular Biology*, 25(15), pp. 6464–6474. doi: 10.1128/MCB.25.15.6464-6474.2005.
- Bofill-Mas, S. *et al.* (2010) 'Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants.', *Virology journal*, 7(1), p. 141. doi: 10.1186/1743-422X-7-141.
- Bolderson, E. *et al.* (2012) 'Krüppel-associated Box (KRAB)-associated Co-repressor (KAP-1) Ser-473 Phosphorylation Regulates Heterochromatin Protein 1 $\beta$  (HP1- $\beta$ ) Mobilization and DNA Repair in Heterochromatin', *Journal of Biological Chemistry*, 287(33), pp. 28122–28131. doi: 10.1074/jbc.M112.368381.
- Borchert, S. *et al.* (2014) 'High-Affinity Rb Binding, p53 Inhibition, Subcellular Localization, and Transformation by Wild-Type or Tumor-Derived Shortened Merkel Cell Polyomavirus Large T Antigens', *Journal of Virology*, 88(6), pp. 3144–3160. doi: 10.1128/JVI.02916-13.
- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.', *Analytical biochemistry*, 72, pp. 248–54.
- Brand, L. H. *et al.* (2010) 'DPI-ELISA: a fast and versatile method to specify the binding of plant transcription factors to DNA in vitro.', *Plant methods*. BioMed Central, 6, p. 25. doi: 10.1186/1746-4811-6-25.
- Bürck, C. *et al.* (2016) 'KAP1 Is a Host Restriction Factor That Promotes Human Adenovirus E1B-55K SUMO Modification.', *Journal of virology*. American Society for Microbiology, 90(2), pp. 930–46. doi: 10.1128/JVI.01836-15.
- Busam, K. J. *et al.* (2009) 'Merkel cell polyomavirus expression in merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas.', *The American journal of surgical pathology*, 33(9), pp. 1378–85. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181aa30a5.
- Cai, Q. *et al.* (2013) 'A unique SUMO-2-interacting motif within LANA is essential for KSHV latency.', *PLoS pathogens*. Edited by S.-J. Gao. Public Library of Science, 9(11), p. e1003750. doi: 10.1371/journal.ppat.1003750.
- Cammas, F. *et al.* (2000) 'Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1 $\beta$  are defective in early postimplantation development.', *Development (Cambridge, England)*, 127(13), pp. 2955–63.
- Campisi, J. (1997) 'Aging and cancer: the double-edged sword of replicative senescence.', *Journal of the American Geriatrics Society*, 45(4), pp. 482–8.

- Campisi, J. (2005) 'Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors.', *Cell*. Elsevier, 120(4), pp. 513–22. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.003.
- Carnero, A. *et al.* (2015) 'Disruptive chemicals, senescence and immortality', *Carcinogenesis*, 36(Suppl 1), pp. S19–S37. doi: 10.1093/carcin/bgv029.
- Carter, J. J. *et al.* (2009) 'Association of Merkel Cell Polyomavirus–Specific Antibodies With Merkel Cell Carcinoma', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. Oxford University Press, 101(21), pp. 1510–1522. doi: 10.1093/jnci/djp332.
- Carter, J. J. *et al.* (2013) 'Identification of an overprinting gene in Merkel cell polyomavirus provides evolutionary insight into the birth of viral genes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(31), pp. 12744–9. doi: 10.1073/pnas.1303526110.
- De Cecco, M. *et al.* (2013) 'Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements.', *Aging cell*. NIH Public Access, 12(2), pp. 247–56. doi: 10.1111/accel.12047.
- Chang, C.-W. *et al.* (2008) 'Phosphorylation at Ser473 regulates heterochromatin protein 1 binding and corepressor function of TIF1beta/KAP1.', *BMC molecular biology*. BioMed Central, 9, p. 61. doi: 10.1186/1471-2199-9-61.
- Chang, P.-C. *et al.* (2009) 'Kruppel-associated box domain-associated protein-1 as a latency regulator for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and its modulation by the viral protein kinase.', *Cancer research*. NIH Public Access, 69(14), pp. 5681–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4570.
- Chang, Y. und Moore, P. S. (2012) 'Merkel cell carcinoma: a virus-induced human cancer.', *Annual review of pathology*, 7(September 2011), pp. 123–44. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130227.
- Chen, T. *et al.* (2011) 'Serological evidence of Merkel cell polyomavirus primary infections in childhood.', *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 50(2), pp. 125–9. doi: 10.1016/j.jcv.2010.10.015.
- Cheng, C.-T. *et al.* (2016) 'Metabolic Stress-Induced Phosphorylation of KAP1 Ser473 Blocks Mitochondrial Fusion in Breast Cancer Cells', *Cancer Research*, 76(17), pp. 5006–5018. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2921.
- Cheng, C.-T., Kuo, C.-Y. und Ann, D. K. (2014) 'KAPtain in charge of multiple missions: Emerging roles of KAP1.', *World journal of biological chemistry*, 5(3), pp. 308–20. doi:

10.4331/wjbc.v5.i3.308.

- Cheng, J. *et al.* (2009) 'Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens', *Seminars in Cancer Biology*, 19(4), pp. 218–228. doi: 10.1016/j.semcancer.2009.03.002.
- Cheng, J. *et al.* (2013) 'Merkel cell polyomavirus large T antigen has growth-promoting and inhibitory activities.', *Journal of virology*. American Society for Microbiology, 87(11), pp. 6118–26. doi: 10.1128/JVI.00385-13.
- Collado, M. und Serrano, M. (2006) 'The power and the promise of oncogene-induced senescence markers', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 6(6), pp. 472–476. doi: 10.1038/nrc1884.
- Colunga, A., Pulliam, T. and Nghiem, P. (2017) 'Merkel Cell Carcinoma in the Age of Immunotherapy: Facts and Hopes', *Clinical Cancer Research*. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0439.
- Coppé, J.-P. *et al.* (2008) 'Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor', *PLoS Biology*. Edited by J. Downward, 6(12), p. e301. doi: 10.1371/journal.pbio.0060301.
- Ciscione, S. W. *et al.* (2016) 'Reorganization of chromosome architecture in replicative cellular senescence', *Science Advances*, 2(2), p. e1500882. doi: 10.1126/sciadv.1500882.
- Czech-Sioli, M. (2016) 'Einfluss der Ubiquitin spezifischen Protease 7 auf den Lebenszyklus des Merkel Zell Polyomavirus'. Doktorarbeit an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.
- Czech-Sioli, M. (O.J.) 'Charakterization of the interaction of LT-Ag and cellular Usp7', *Manuskript in Arbeit*.
- Czerwińska, P., Mazurek, S. und Wiznerowicz, M. (2017) 'The complexity of TRIM28 contribution to cancer', *Journal of Biomedical Science*, 24(1), p. 63. doi: 10.1186/s12929-017-0374-4.
- Davis, R. J., Welcker, M. und Clurman, B. E. (2014) 'Tumor Suppression by the Fbw7 Ubiquitin Ligase: Mechanisms and Opportunities', *Cancer Cell*, 26(4), pp. 455–464. doi: 10.1016/j.ccell.2014.09.013.
- Davy, C. *et al.* (2002) 'Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16.', *Journal of virology*, 76(19), pp. 9806–18.
- Davy, C. und Doorbar, J. (2007) 'G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses.', *Virology*, 368(2), pp. 219–26. doi: 10.1016/j.virol.2007.05.043.

- DeCaprio, J. a und Garcea, R. L. (2013) 'A cornucopia of human polyomaviruses.', *Nature reviews. Microbiology*. Nature Publishing Group, 11(4), pp. 264–76. doi: 10.1038/nrmicro2992.
- van Deursen, J. M. (2014) 'The role of senescent cells in ageing.', *Nature*. NIH Public Access, 509(7501), pp. 439–46. doi: 10.1038/nature13193.
- Diaz, J. *et al.* (2014) 'Phosphorylation of large T antigen regulates merkel cell polyomavirus replication.', *Cancers*, 6(3), pp. 1464–86. doi: 10.3390/cancers6031464.
- Dimri, G. P. *et al.* (1995) 'A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), pp. 9363–9367. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.
- Dimri, G. P. (2005) 'What has senescence got to do with cancer?', *Cancer Cell*. Cell Press, 7(6), pp. 505–512. doi: 10.1016/J.CCR.2005.05.025.
- Dobin, A. *et al.* (2013) 'STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner', *Bioinformatics*, 29(1), pp. 15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
- Duncavage, E. J., Zehnbauer, B. A. and Pfeifer, J. D. (2009) 'Prevalence of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma.', *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 22(4), pp. 516–21. doi: 10.1038/modpathol.2009.3.
- Eddy, B. E. *et al.* (1962) 'Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell culture as simian virus 40.', *Virology*, 17, pp. 65–75.
- Fanning, E. und Zhao, K. (2009) 'SV40 DNA replication: From the A gene to a nanomachine', in *Virology*, pp. 1–24. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.038.
- Fanning, E., Zhao, X. und Jiang, X. (2009) 'Polyomavirus Life Cycle', in *DNA Tumor Viruses*. New York, NY: Springer US, pp. 1–24. doi: 10.1007/978-0-387-68945-6\_1.
- Feng, H. *et al.* (2008) 'Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinomas', *Science*, 319(5866), pp. 1096–1100. doi: 10.1126/science.1152586.Clonal.
- Feng, H. *et al.* (2011) 'Cellular and viral factors regulating Merkel cell polyomavirus replication.', *PloS one*, 6(7), p. e22468. doi: 10.1371/journal.pone.0022468.
- Fields, B. N., Knipe, D. M. (David M. und Howley, P. M. (2007) *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Fischer, N. *et al.* (2010) 'Detection of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in Merkel cell carcinoma cell lines: cell morphology and growth phenotype do not reflect presence of the virus.', *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 126(9), pp. 2133–42. doi:

10.1002/ijc.24877.

- Foulongne, V. *et al.* (2008) 'Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma, France.', *Emerging infectious diseases*, 14(9), pp. 1491–3. doi: 10.3201/eid1409.080651.
- Foulongne, V. *et al.* (2011) 'Detection of Merkel cell polyomavirus on environmental surfaces.', *Journal of medical virology*, 83(8), pp. 1435–9. doi: 10.1002/jmv.22110.
- Fox, M. H. (1980) 'A model for the computer analysis of synchronous DNA distributions obtained by flow cytometry', *Cytometry*. Wiley-Blackwell, 1(1), pp. 71–77. doi: 10.1002/cyto.990010114.
- Frattini, M. G. *et al.* (1997) 'Abrogation of a mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses correlates with increased turnover of the p53 tumor suppressor protein', *The EMBO Journal*, 16(2), pp. 318–331. doi: 10.1093/emboj/16.2.318.
- Fried, M. und Crothers, D. M. (1981) 'Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 9(23), pp. 6505–25.
- Fried, M. G. (1989) 'Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay', *Electrophoresis*, 10(5–6), pp. 366–376. doi: 10.1002/elps.1150100515.
- Friedman, J. R. *et al.* (1996) 'KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain.', *Genes & Development*, 10(16), pp. 2067–2078. doi: 10.1101/gad.10.16.2067.
- Garner, M. M. und Revzin, A. (1981) 'A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 9(13), pp. 3047–60.
- Garneski, K. M. *et al.* (2009) 'Merkel Cell Polyomavirus Is More Frequently Present in North American than Australian Merkel Cell Carcinoma Tumors', *Journal of Investigative Dermatology*, 129(1), pp. 246–248. doi: 10.1038/jid.2008.229.
- Garvin, A. J. *et al.* (2013) 'The deSUMOylase SENP7 promotes chromatin relaxation for homologous recombination DNA repair.', *EMBO reports*, 14(11), pp. 975–83. doi: 10.1038/embor.2013.141.
- Georgakilas, A. G., Martin, O. A. und Bonner, W. M. (2017) 'p21: A Two-Faced Genome Guardian.', *Trends in molecular medicine*. Elsevier, 23(4), pp. 310–319. doi: 10.1016/j.molmed.2017.02.001.
- Geuting, V., Reul, C. und Löbrich, M. (2013) 'ATM Release at Resected Double-Strand Breaks

- Provides Heterochromatin Reconstitution to Facilitate Homologous Recombination', *PLoS Genetics*. Edited by S. Jinks-Robertson, 9(8), p. e1003667. doi: 10.1371/journal.pgen.1003667.
- Goh, G. *et al.* (2016) 'Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy', *Oncotarget*, 7(3), pp. 3403–15. doi: 10.18632/oncotarget.6494.
- González-Vela, M. D. C. *et al.* (2017) 'Shared Oncogenic Pathways Implicated in Both Virus-Positive and UV-Induced Merkel Cell Carcinomas.', *The Journal of investigative dermatology*, 137(1), pp. 197–206. doi: 10.1016/j.jid.2016.08.015.
- Goodarzi, A. A. *et al.* (2008) 'ATM Signaling Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks Associated with Heterochromatin', *Molecular Cell*, 31(2), pp. 167–177. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.017.
- Goodarzi, A. A., Kurka, T. und Jeggo, P. A. (2011) 'KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response.', *Nature structural & molecular biology*, 18(7), pp. 831–9. doi: 10.1038/nsmb.2077.
- Goodarzi, A. A., Noon, A. T. und Jeggo, P. A. (2009) 'The impact of heterochromatin on DSB repair.', *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 3), pp. 569–76. doi: 10.1042/BST0370569.
- Graham, F. L. *et al.* (1977) 'Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5', *Journal of General Virology*, 36(1), pp. 59–72. doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59.
- Groner, A. C. *et al.* (2010) 'KRAB-Zinc Finger Proteins and KAP1 Can Mediate Long-Range Transcriptional Repression through Heterochromatin Spreading', *PLoS Genetics*. Edited by H. D. Madhani, 6(3), p. e1000869. doi: 10.1371/journal.pgen.1000869.
- Gross, L. (1953) 'A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice.', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 83(2), pp. 414–21.
- Grundhoff, A. und Fischer, N. (2015) 'Merkel cell polyomavirus, a highly prevalent virus with tumorigenic potential', *Current Opinion in Virology*, 14, pp. 129–137. doi: 10.1016/j.coviro.2015.08.010.
- Guastafierro, A. *et al.* (2013) 'Characterization of an early passage Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma cell line, MS-1, and its growth in NOD scid gamma mice.', *Journal of virological methods*, 187(1), pp. 6–14. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.10.001.

- Günther, T. *et al.* (2016) 'Investigation of Viral and Host Chromatin by ChIP-PCR or ChIP-Seq Analysis', in *Current Protocols in Microbiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 1E.10.1-1E.10.21. doi: 10.1002/9780471729259.mc01e10s40.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: the next generation.', *Cell*. Elsevier, 144(5), pp. 646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harel, A. *et al.* (2009) 'GIFtS: annotation landscape analysis with GeneCards', *BMC Bioinformatics*. BioMed Central, 10(1), p. 348. doi: 10.1186/1471-2105-10-348.
- Harms, K. L. *et al.* (2016) 'Analysis of Prognostic Factors from 9387 Merkel Cell Carcinoma Cases Forms the Basis for the New 8th Edition AJCC Staging System', *Annals of Surgical Oncology*, 23(11), pp. 3564–3571. doi: 10.1245/s10434-016-5266-4.
- Harms, P. W. *et al.* (2015) 'The Distinctive Mutational Spectra of Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma.', *Cancer research*, 75(18), pp. 3720–3727. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0702.
- Harrison, C. J. *et al.* (2011) 'Asymmetric Assembly of Merkel Cell Polyomavirus Large T- antigen Origin Binding Domains at the Viral Origin', 409(4), pp. 529–542. doi: 10.1016/j.jmb.2011.03.051.Asymmetric.
- zur Hausen, A. *et al.* (2013) 'Early B-Cell Differentiation in Merkel Cell Carcinomas: Clues to Cellular Ancestry', *Cancer Research*, 73(16), pp. 4982–4987. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0616.
- Hayflick, L. und Moorhead, P. S. (1961) 'The serial cultivation of human diploid cell strains', *Experimental Cell Research*. Academic Press, 25(3), pp. 585–621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
- Heiser, K., Nicholas, C. und Garcea, R. L. (2016) 'Activation of DNA damage repair pathways by murine polyomavirus', *Virology*, 497, pp. 346–356. doi: 10.1016/j.virol.2016.07.028.
- Hollingworth, R. und Grand, R. J. (2015) 'Modulation of DNA damage and repair pathways by human tumour viruses.', *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 7(5), pp. 2542–91. doi: 10.3390/v7052542.
- Houben, R. *et al.* (2010) 'Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens.', *Journal of virology*, 84(14), pp. 7064–72. doi: 10.1128/JVI.02400-09.
- Houben, R. *et al.* (2012) 'An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells.'

- International journal of cancer. Journal internationale du cancer*, 130(4), pp. 847–56. doi: 10.1002/ijc.26076.
- Hu, C. *et al.* (2012) 'Roles of Kruppel-associated Box (KRAB)-associated Co-repressor KAP1 Ser-473 Phosphorylation in DNA Damage Response.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 287(23), pp. 18937–52. doi: 10.1074/jbc.M111.313262.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. und Lempicki, R. A. (2009a) 'Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists', *Nucleic Acids Research*, 37(1), pp. 1–13. doi: 10.1093/nar/gkn923.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. und Lempicki, R. A. (2009b) 'Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources', *Nature Protocols*, 4(1), pp. 44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211.
- Hubackova, S. *et al.* (2018) 'Selective elimination of senescent cells by mitochondrial targeting is regulated by ANT2', *Cell Death & Differentiation*. Nature Publishing Group, p. 1. doi: 10.1038/s41418-018-0118-3.
- Hughes, M. P. *et al.* (2014) 'Merkel Cell Carcinoma: Epidemiology, Target, and Therapy', *Current Dermatology Reports*. Springer US, 3(1), pp. 46–53. doi: 10.1007/s13671-014-0068-z.
- Itahana, K., Campisi, J. und Dimri, G. P. (2007) 'Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 371, pp. 21–31.
- Ivanov, A. V. *et al.* (2007) 'PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing.', *Molecular cell*, 28(5), pp. 823–37. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.012.
- Iyengar, S. *et al.* (2011) 'Functional analysis of KAP1 genomic recruitment.', *Molecular and cellular biology*, 31(9), pp. 1833–47. doi: 10.1128/MCB.01331-10.
- Iyengar, S. und Farnham, P. J. (2011) 'KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome.', *The Journal of biological chemistry*, 286(30), pp. 26267–76. doi: 10.1074/jbc.R111.252569.
- Jackson, S. P. und Bartek, J. (2009) 'The DNA-damage response in human biology and disease.', *Nature*. Europe PMC Funders, 461(7267), pp. 1071–8. doi: 10.1038/nature08467.
- Jaiswal, H. *et al.* (2017) 'ATM/Wip1 activities at chromatin control Plk1 re-activation to determine G2 checkpoint duration.', *The EMBO journal*, 36(14), pp. 2161–2176. doi: 10.15252/embj.201696082.

- Jansen, B. *et al.* (1999) 'Farnesylthiosalicylic acid inhibits the growth of human Merkel cell carcinoma in SCID mice.', *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 77(11), pp. 792–7.
- Janz, J. (2017) 'Etablierung der MCPyV-Infektion in dermalen Fibroblasten.' *Masterarbeit*.
- Jiang, M. *et al.* (2012) 'Roles of ATM and ATR-Mediated DNA Damage Responses during Lytic BK Polyomavirus Infection', *PLoS Pathogens*. Edited by J. Pipas, 8(8), p. e1002898. doi: 10.1371/journal.ppat.1002898.
- Kalluri, R. und Zeisberg, M. (2006) 'Fibroblasts in cancer', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 6(5), pp. 392–401. doi: 10.1038/nrc1877.
- Kang, T.-W. *et al.* (2011) 'Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development', *Nature*, 479(7374), pp. 547–551. doi: 10.1038/nature10599.
- Karimian, A., Ahmadi, Y. und Yousefi, B. (2016) 'Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage', *DNA Repair*, 42, pp. 63–71. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.04.008.
- Kassem, A. *et al.* (2008) 'Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene.', *Cancer research*, 68(13), pp. 5009–13. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0949.
- Kean, J. M. *et al.* (2009) 'Seroepidemiology of Human Polyomaviruses', *PLoS Pathogens*. Edited by W. J. Atwood. Public Library of Science, 5(3), p. e1000363. doi: 10.1371/journal.ppat.1000363.
- King, C. A. (2013) 'Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus kaposin B induces unique monophosphorylation of STAT3 at serine 727 and MK2-mediated inactivation of the STAT3 transcriptional repressor TRIM28.', *Journal of virology*, 87(15), pp. 8779–91. doi: 10.1128/JVI.02976-12.
- Knight, G. L. *et al.* (2004) 'Cooperation between different forms of the human papillomavirus type 1 E4 protein to block cell cycle progression and cellular DNA synthesis.', *Journal of virology*, 78(24), pp. 13920–33. doi: 10.1128/JVI.78.24.13920-13933.2004.
- Knips, J. *et al.* (2017) 'Spontaneous lung metastasis formation of human Merkel cell carcinoma cell lines transplanted into scid mice', *International Journal of Cancer*, 141(1), pp. 160–171. doi: 10.1002/ijc.30723.
- Krimpenfort, P. und Berns, A. (2017) 'Rejuvenation by Therapeutic Elimination of Senescent Cells.', *Cell*. Elsevier, 169(1), pp. 3–5. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.014.

- Kubota, S. *et al.* (2013) 'Phosphorylation of KRAB-associated Protein 1 (KAP1) at Tyr-449, Tyr-458, and Tyr-517 by Nuclear Tyrosine Kinases Inhibits the Association of KAP1 and Heterochromatin Protein 1 $\alpha$  (HP1 $\alpha$ ) with Heterochromatin', *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), pp. 17871–17883. doi: 10.1074/jbc.M112.437756.
- Kurz, E. U., Douglas, P. und Lees-Miller, S. P. (2004) 'Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 279(51), pp. 53272–81. doi: 10.1074/jbc.M406879200.
- Kwun, H. H. J. *et al.* (2013) 'Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Controls Viral Replication and Oncoprotein Expression by Targeting the Cellular Ubiquitin Ligase SCF Fbw7', *Cell host & microbe*. Elsevier Inc., 14(2), pp. 125–35. doi: 10.1016/j.chom.2013.06.008.
- Kwun, H. J. *et al.* (2009) 'The minimum replication origin of merkel cell polyomavirus has a unique large T-antigen loading architecture and requires small T-antigen expression for optimal replication.', *Journal of virology*, 83(23), pp. 12118–28. doi: 10.1128/JVI.01336-09.
- Kwun, H. J. *et al.* (2017) 'Merkel cell polyomavirus small T antigen induces genome instability by E3 ubiquitin ligase targeting', *Oncogene*, 36(49), pp. 6784–6792. doi: 10.1038/onc.2017.277.
- Laude, H. C. *et al.* (2010) 'Distinct merkel cell polyomavirus molecular features in tumour and non tumour specimens from patients with merkel cell carcinoma.', *PLoS pathogens*, 6(8), p. e1001076. doi: 10.1371/journal.ppat.1001076.
- Lecot, P. *et al.* (2016) 'Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development.', *British journal of cancer*. Nature Publishing Group, 114(11), pp. 1180–4. doi: 10.1038/bjc.2016.115.
- Lee, S. *et al.* (2011) 'Identification and validation of a novel mature microRNA encoded by the Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas.', *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. Elsevier B.V., 52(3), pp. 272–5. doi: 10.1016/j.jcv.2011.08.012.
- Lee, Y.-K. *et al.* (2007) 'Doxorubicin down-regulates Kruppel-associated box domain-associated protein 1 sumoylation that relieves its transcription repression on p21WAF1/CIP1 in breast cancer MCF-7 cells.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 282(3), pp. 1595–606. doi: 10.1074/jbc.M606306200.
- Lehman, J. M., Laffin, J. und Friedrich, T. D. (2000) 'Simian virus 40 induces multiple S phases with

- the majority of viral DNA replication in the G2 and second S phase in CV-1 cells.', *Experimental cell research*, 258(1), pp. 215–22. doi: 10.1006/excr.2000.4927.
- Lemasson, G. *et al.* (2012) 'Presence of putative stem cells in Merkel cell carcinomas', *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 26(6), pp. 789–795. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04132.x.
- Levican, J. *et al.* (2018) 'Role of BK human polyomavirus in cancer', *Infectious Agents and Cancer*, 13(1), p. 12. doi: 10.1186/s13027-018-0182-9.
- Li, J. *et al.* (2013) 'Merkel cell polyomavirus large T antigen disrupts host genomic integrity and inhibits cellular proliferation.', *Journal of virology*, 87(16), pp. 9173–88. doi: 10.1128/JVI.01216-13.
- Li, J. *et al.* (2015) 'Phosphorylation of Merkel Cell Polyomavirus Large Tumor Antigen at Serine 816 by ATM Kinase Induces Apoptosis in Host Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 290(3), pp. 1874–1884. doi: 10.1074/jbc.M114.594895.
- Li, X. *et al.* (2007) 'Role for KAP1 serine 824 phosphorylation and sumoylation/desumoylation switch in regulating KAP1-mediated transcriptional repression.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 282(50), pp. 36177–89. doi: 10.1074/jbc.M706912200.
- Li, X. *et al.* (2010) 'SUMOylation of the transcriptional co-repressor KAP1 is regulated by the serine and threonine phosphatase PP1', *Science Signaling*, 3(119), pp. 1–22. doi: 10.1126/scisignal.2000781.
- Li, X., Burton, E. M. und Bhaduri-McIntosh, S. (2017) 'Chloroquine triggers Epstein-Barr virus replication through phosphorylation of KAP1/TRIM28 in Burkitt lymphoma cells', *PLoS Pathogens*. Edited by P. M. Lieberman, 13(3), p. e1006249. doi: 10.1371/journal.ppat.1006249.
- Liu, W. *et al.* (2016) 'Identifying the Target Cells and Mechanisms of Merkel Cell Polyomavirus Infection', *Cell Host & Microbe*. Elsevier, 19(6), pp. 775–787. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.024.
- Liu, W. *et al.* (2017) 'Merkel cell polyomavirus infection of animal dermal fibroblasts', *Journal of Virology*, 92(4), p. JVI.01610-17. doi: 10.1128/JVI.01610-17.
- Liu, X., Ding, J. und Meng, L. (2018) 'Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer', *Acta Pharmacologica Sinica*. doi: 10.1038/aps.2017.198.
- Love, M. I., Huber, W. und Anders, S. (2014) 'Moderated estimation of fold change and dispersion

- for RNA-seq data with DESeq2', *Genome Biology*. BioMed Central, 15(12), p. 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Ma, J. und Brewer, J. (2014) 'Merkel Cell Carcinoma in Immunosuppressed Patients', *Cancers*, 6(3), pp. 1328–1350. doi: 10.3390/cancers6031328.
- Mertz, K. D. *et al.* (2010) 'Inflammatory monocytes are a reservoir for Merkel cell polyomavirus.', *The Journal of investigative dermatology*. The Society for Investigative Dermatology, Inc, 130(4), pp. 1146–51. doi: 10.1038/jid.2009.392.
- Meyer, T. S. und Lamberts, B. L. (1965) 'Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips.', *Biochimica et biophysica acta*, 107(1), pp. 144–5.
- Milholland, B. *et al.* (2015) 'Age-related somatic mutations in the cancer genome', *Oncotarget*, 6(28), pp. 24627–35. doi: 10.18632/oncotarget.5685.
- Miller, R. W. und Rabkin, C. S. (1999) 'Merkel cell carcinoma and melanoma: etiological similarities and differences.', *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 8(2), pp. 153–8.
- Mita, P. *et al.* (2016) 'URI Regulates KAP1 Phosphorylation and Transcriptional Repression via PP2A Phosphatase in Prostate Cancer Cells.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 291(49), pp. 25516–25528. doi: 10.1074/jbc.M116.741660.
- Nacarelli, T., Liu, P. und Zhang, R. (2017) 'Epigenetic Basis of Cellular Senescence and Its Implications in Aging', *Genes*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 8(12), p. 343. doi: 10.3390/genes8120343.
- Nakahara, T. *et al.* (2002) 'Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4.', *Journal of virology*, 76(21), pp. 10914–20.
- Narita, M. (2007) 'Cellular senescence and chromatin organisation', *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 96(5), pp. 686–691. doi: 10.1038/sj.bjc.6603636.
- Neumann, F. *et al.* (2011) 'Replication, gene expression and particle production by a consensus Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) genome.', *PloS one*, 6(12), p. e29112. doi: 10.1371/journal.pone.0029112.
- Nickeleit, V. *et al.* (2018) 'The two-faced nature of BK-polyomavirus: Lytic infection or non-lytic large-T positive carcinoma', *The Journal of Pathology*. doi: 10.1002/path.5127.

- Noon, A. T. *et al.* (2010) '53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair', *Nature Cell Biology*, 12(2), pp. 177–184. doi: 10.1038/ncb2017.
- Noren Hooten, N. und Evans, M. K. (2017) 'Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence.', *Journal of visualized experiments: JoVE*. NIH Public Access, (123). doi: 10.3791/55533.
- Okamoto, K., Kitabayashi, I. und Taya, Y. (2006) 'KAP1 dictates p53 response induced by chemotherapeutic agents via Mdm2 interaction', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(1), pp. 216–222. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.022.
- Orba, Y. *et al.* (2010) 'Large T Antigen Promotes JC Virus Replication in G<sub>2</sub>-arrested Cells by Inducing ATM- and ATR-mediated G<sub>2</sub> Checkpoint Signaling', *Journal of Biological Chemistry*, 285(2), pp. 1544–1554. doi: 10.1074/jbc.M109.064311.
- Pastrana, D. V. *et al.* (2009) 'Quantitation of Human Seroresponsiveness to Merkel Cell Polyomavirus', *PLoS Pathogens*. Edited by R. L. Garcea. Public Library of Science, 5(9), p. e1000578. doi: 10.1371/journal.ppat.1000578.
- Pastrana, D. V. *et al.* (2012) 'Positive correlation between Merkel cell polyomavirus viral load and capsid-specific antibody titer', *Medical Microbiology and Immunology*, 201(1), pp. 17–23. doi: 10.1007/s00430-011-0200-7.
- Paulson, K. G. *et al.* (2010) 'Antibodies to Merkel Cell Polyomavirus T Antigen Oncoproteins Reflect Tumor Burden in Merkel Cell Carcinoma Patients', *Cancer Research*, 70(21), pp. 8388–8397. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2128.
- Paulson, K. G. *et al.* (2017) 'Viral oncoprotein antibodies as a marker for recurrence of Merkel cell carcinoma: A prospective validation study', *Cancer*, 123(8), pp. 1464–1474. doi: 10.1002/cncr.30475.
- Paulson, K. G. *et al.* (2018) 'Merkel cell carcinoma: Current US incidence and projected increases based on changing demographics', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(3), p. 457–463.e2. doi: 10.1016/j.jaad.2017.10.028.
- Peng, H., Feldman, I. und Rauscher, F. J. (2002) 'Hetero-oligomerization Among the TIF Family of RBCC/TRIM Domain-containing Nuclear Cofactors: A Potential Mechanism for Regulating the Switch Between Coactivation and Corepression', *Journal of Molecular Biology*, 320(3), pp. 629–644. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00477-1.
- Pommier, Y. *et al.* (2010) 'DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and

- Antibacterial Drugs', *Chemistry & Biology*. Cell Press, 17(5), pp. 421–433. doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2010.04.012.
- Ran, F. A. *et al.* (2013) 'Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system', *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 8(11), pp. 2281–2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143.
- Rauwel, B. *et al.* (2015) 'Release of human cytomegalovirus from latency by a KAP1/TRIM28 phosphorylation switch.', *eLife*, 4. doi: 10.7554/eLife.06068.
- Rodig, S. J. *et al.* (2012) 'Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus', *Journal of Clinical Investigation*, 122(12), pp. 4645–4653. doi: 10.1172/JCI64116.
- Santos, J. und Gil, J. (2014) 'TRIM28/KAP1 regulates senescence.', *Immunology letters*, 162(1 Pt B), pp. 281–9. doi: 10.1016/j.imlet.2014.08.011.
- Sarnaik, A. A. *et al.* (2010) 'Clinical Recognition, Diagnosis, and Staging of Merkel Cell Carcinoma, and the Role of the Multidisciplinary Management Team', *Current Problems in Cancer*, 34(1), pp. 38–46. doi: 10.1016/j.currproblcancer.2010.01.002.
- Sauer, C. M. *et al.* (2017) 'Reviewing the current evidence supporting early B-cells as the cellular origin of Merkel cell carcinoma', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 116, pp. 99–105. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.05.009.
- Scarano, F. J. *et al.* (1994) 'Simian virus 40 prevents activation of M-phase-promoting factor during lytic infection.', *Journal of virology*, 68(4), pp. 2355–61.
- Schlagbauer-Wadl, H. *et al.* (2000) 'Bcl-2 antisense oligonucleotides (G3139) inhibit Merkel cell carcinoma growth in SCID mice.', *The Journal of investigative dermatology*, 114(4), pp. 725–30. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00937.x.
- Schowalter, R. M. *et al.* (2010) 'Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin.', *Cell host & microbe*, 7(6), pp. 509–15. doi: 10.1016/j.chom.2010.05.006.
- Schowalter, R. M., Pastrana, D. V und Buck, C. B. (2011) 'Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry.', *PLoS pathogens*. Edited by M. Imperiale. Public Library of Science, 7(7), p. e1002161. doi: 10.1371/journal.ppat.1002161.
- Schowalter, R. M., Reinhold, W. C. und Buck, C. B. (2012) 'Entry Tropism of BK and Merkel Cell Polyomaviruses in Cell Culture', *PLoS ONE*. Edited by J. M. Brandner. Public Library of Science, 7(7), p. e42181. doi: 10.1371/journal.pone.0042181.

- Seo, G. J., Chen, C. J. und Sullivan, C. S. (2009) 'Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression.', *Virology*. Elsevier Inc., 383(2), pp. 183–7. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.001.
- Serrano, M. (2017) 'Ageing: Tools to eliminate senescent cells', *Nature*. Nature Publishing Group, 545(7654), pp. 294–296. doi: 10.1038/nature22493.
- Shay, J. W., Pereira-Smith, O. M. und Wright, W. E. (1991) 'A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence', *Experimental Cell Research*. Academic Press, 196(1), pp. 33–39. doi: 10.1016/0014-4827(91)90453-2.
- Shay, J. W. und Roninson, I. B. (2004) 'Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy', *Oncogene*, 23(16), pp. 2919–2933. doi: 10.1038/sj.onc.1207518.
- Shuda, M. *et al.* (2008) 'T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(42), pp. 16272–7. doi: 10.1073/pnas.0806526105.
- Shuda, M. *et al.* (2009) 'Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors.', *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 125(6), pp. 1243–9. doi: 10.1002/ijc.24510.
- Shuda, M. *et al.* (2011) 'Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator', 121(9), pp. 3623–3634. doi: 10.1172/JCI46323DS1.
- Shuda, M. *et al.* (2015) 'Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Induces Cancer and Embryonic Merkel Cell Proliferation in a Transgenic Mouse Model', *PLOS ONE*. Edited by S. Chen, 10(11), p. e0142329. doi: 10.1371/journal.pone.0142329.
- Sihto, H. *et al.* (2011) 'Merkel Cell Polyomavirus Infection, Large T Antigen, Retinoblastoma Protein and Outcome in Merkel Cell Carcinoma', *Clinical Cancer Research*, 17(14), pp. 4806–4813. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3363.
- Smith-Moore, S. *et al.* (2018) 'Adeno-associated virus Rep proteins antagonize phosphatase PP1 to counteract KAP1 repression of the latent viral genome', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201721883. doi: 10.1073/pnas.1721883115.
- Sowd, G. A. und Fanning, E. (2012) 'A Wolf in Sheep's Clothing: SV40 Co-opts Host Genome Maintenance Proteins to Replicate Viral DNA', *PLoS Pathogens*. Edited by R. C. Condit, 8(11), p. e1002994. doi: 10.1371/journal.ppat.1002994.
- Spurgeon, M. E. und Lambert, P. F. (2013) 'Merkel Cell Polyomavirus: A newly discovered Human

- Virus with Oncogenic Potential', *Virology*, 435(1), pp. 118–130. doi: 10.1016/j.virol.2012.09.029.Merkel.
- Stakaitytė, G. *et al.* (2014) 'Merkel cell polyomavirus: molecular insights into the most recently discovered human tumour virus.', *Cancers*, 6(3), pp. 1267–97. doi: 10.3390/cancers6031267.
- Stakaitytė, G. *et al.* (2017) 'Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Drives Cell Motility via Rho-GTPase-Induced Filopodium Formation', *Journal of Virology*. Edited by L. Banks, 92(2), pp. e00940-17. doi: 10.1128/JVI.00940-17.
- Sun, R. *et al.* (2014) 'Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA interacts with host KAP1 to facilitate establishment of viral latency.', *Journal of virology*, 88(13), pp. 7331–44. doi: 10.1128/JVI.00596-14.
- Sunshine, J. C. *et al.* (2018) 'Are there multiple cells of origin of Merkel cell carcinoma?', *Oncogene*. doi: 10.1038/s41388-017-0073-3.
- Tatham, M. H. *et al.* (2009) 'Detection of protein SUMOylation in vivo', *Nature Protocols*, 4(9), pp. 1363–1371. doi: 10.1038/nprot.2009.128.
- Tello, T. L. *et al.* (2018) 'Merkel cell carcinoma: An update and review', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(3), pp. 445–454. doi: 10.1016/j.jaad.2017.12.004.
- Theiss, J. M. *et al.* (2015) '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 Pathogens*. Edited by C. B. Buck, 11(7), p. e1004974. doi: 10.1371/journal.ppat.1004974.
- Theiss, J. M. (2015) 'Characterization of the Merkel cell polyomavirus encoded miRNA mcv-miR-M1'. Doktorarbeit an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.
- Thorvaldsdottir, H., Robinson, J. T. und Mesirov, J. P. (2013) 'Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration', *Briefings in Bioinformatics*. Oxford University Press, 14(2), pp. 178–192. doi: 10.1093/bib/bbs017.
- Tilling, T. und Moll, I. (2012) 'Which are the cells of origin in merkel cell carcinoma?', *Journal of skin cancer*, 2012, p. 680410. doi: 10.1155/2012/680410.
- Tolstov, Y. L. *et al.* (2009) 'Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays.', *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 125(6), pp. 1250–6. doi:

10.1002/ijc.24509.

- Tolstov, Y. L. *et al.* (2011) 'Asymptomatic primary Merkel cell polyomavirus infection among adults.', *Emerging infectious diseases*, 17(8), pp. 1371–80. doi: 10.3201/eid1708.110079.
- Tsang, S. H. *et al.* (2014) 'Host DNA damage response factors localize to merkel cell polyomavirus DNA replication sites to support efficient viral DNA replication.', *Journal of virology*, 88(6), pp. 3285–97. doi: 10.1128/JVI.03656-13.
- Verhaegen, M. E. *et al.* (2014) 'Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Is Oncogenic in Transgenic Mice.', *The Journal of investigative dermatology*. The Society for Investigative Dermatology, Inc. doi: 10.1038/jid.2014.446.
- Verhaegen, M. E. *et al.* (2017) 'Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Initiates Merkel Cell Carcinoma-like Tumor Development in Mice', *Cancer Research*, 77(12), pp. 3151–3157. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0035.
- Visscher, D. *et al.* (1989) 'Cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma: an immunophenotypic, clinicopathologic, and flow cytometric study.', *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 2(4), pp. 331–8.
- Wang, C. *et al.* (2005) 'MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation.', *The EMBO journal*, 24(18), pp. 3279–90. doi: 10.1038/sj.emboj.7600791.
- Wang, C. *et al.* (2007) 'Regulation of E2F1 function by the nuclear corepressor KAP1.', *The Journal of biological chemistry*, 282(41), pp. 29902–9. doi: 10.1074/jbc.M704757200.
- Wang, M. *et al.* (2017) 'Role of tumor microenvironment in tumorigenesis.', *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher, 8(5), pp. 761–773. doi: 10.7150/jca.17648.
- Wang, X. *et al.* (2012) 'Bromodomain protein Brd4 plays a key role in Merkel cell polyomavirus DNA replication.', *PLoS pathogens*, 8(11), p. e1003021. doi: 10.1371/journal.ppat.1003021.
- Wang, Y. *et al.* (2016) 'KAP1 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and its clinical significance.', *International journal of clinical oncology*, 21(5), pp. 927–933. doi: 10.1007/s10147-016-0979-8.
- Weber, K. *et al.* (2008) 'A Multicolor Panel of Novel Lentiviral "Gene Ontology" (LeGO) Vectors for Functional Gene Analysis', *Molecular Therapy*, 16(4), pp. 698–706. doi: 10.1038/mt.2008.6.
- Welcker, M. und Clurman, B. E. (2008) 'FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation', *Nature Reviews Cancer*, 8(2), pp. 83–93. doi: 10.1038/nrc2290.

- Wendzicki, J. A., Moore, P. S. und Chang, Y. (2015) 'Large T and small T antigens of Merkel cell polyomavirus.', *Current opinion in virology*. NIH Public Access, 11, pp. 38–43. doi: 10.1016/j.coviro.2015.01.009.
- White, D. *et al.* (2006) 'KAP1, a novel substrate for PIKK family members, colocalizes with numerous damage response factors at DNA lesions.', *Cancer research*, 66(24), pp. 11594–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4138.
- White, D. *et al.* (2012) 'The ATM substrate KAP1 controls DNA repair in heterochromatin: regulation by HP1 proteins and serine 473/824 phosphorylation.', *Molecular cancer research : MCR*, 10(3), pp. 401–14. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0134.
- Wolf, D. *et al.* (2008) 'Primer Binding Site-Dependent Restriction of Murine Leukemia Virus Requires HP1 Binding by TRIM28', *Journal of Virology*. American Society for Microbiology (ASM), 82(9), pp. 4675–4679. doi: 10.1128/JVI.02445-07.
- Wolf, D. und Goff, S. P. (2007) 'TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells.', *Cell*, 131(1), pp. 46–57. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.026.
- Wolf, D. und Goff, S. P. (2009) 'Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs', *Nature*. NIH Public Access, 458(7242), pp. 1201–1204. doi: 10.1038/nature07844.
- Wolf, D., Hug, K. und Goff, S. P. (2008) 'TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of Lys1,2 tRNA-utilizing retroviruses in embryonic cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(34), pp. 12521–12526. doi: 10.1073/pnas.0805540105.
- Wong, S. Q. *et al.* (2015) 'UV-Associated Mutations Underlie the Etiology of MCV-Negative Merkel Cell Carcinomas', *Cancer Research*, 75(24), pp. 5228–5234. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1877.
- Yang, N. und Hu, M. (2005) 'The limitations and validities of senescence associated- $\beta$ -galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells', *Experimental Gerontology*, 40(10), pp. 813–819. doi: 10.1016/j.exger.2005.07.011.
- Youlden, D. R. *et al.* (2014) 'Incidence and Survival for Merkel Cell Carcinoma in Queensland, Australia, 1993-2010', *JAMA Dermatology*, 150(8), p. 864. doi: 10.1001/jamadermatol.2014.124.
- Ziv, Y. *et al.* (2006) 'Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway.', *Nature cell biology*, 8(8), pp. 870–6. doi: 10.1038/ncb1446.

## 8 Indices

### 8.1 Abbildungen

Abbildung 1: <b>Phylogenetischer Stammbaum humaner und nicht-humaner Polyomaviren</b> .....	2
Abbildung 2: <b>MCPyV Genom</b> .....	3
Abbildung 3: <b>MCPyV T-Ag Lokus</b> .....	4
Abbildung 4: <b>Merkelzellkarzinom</b> .....	6
Abbildung 5: <b>Modelle zur MCC-Entstehung</b> .....	9
Abbildung 6: <b>Funktionen von Kap1</b> .....	13
Abbildung 7: <b>Proteinstruktur und posttranslationale Modifikationen von Kap1</b> .....	14
Abbildung 8: <b>Endogenes Kap1 wird mit MCPyV T-Antigenen in Tumorzelllinien kopräzipitiert</b> .....	58
Abbildung 9: <b>Der N-Terminus des MCPyV LT-Antigens interagiert mit Kap1</b> .....	59
Abbildung 10: <b>Das LT-Antigen interagiert mit der RBCC-Domäne von Kap1</b> .....	60
Abbildung 11: <b>Selektion und Proliferation von Kap1 knock-out Zelllinien</b> .....	62
Abbildung 12: <b>Kap1 ist ein Restriktionsfaktor für die MCPyV DNA-Replikation</b> .....	64
Abbildung 13: <b>Keine Ko-Lokalisierung des LT-Ags und Kap1 in Replikationszentren</b> .....	65
Abbildung 14: <b>Keine Bindung von Kap1 an den viralen Ori</b> .....	67
Abbildung 15: <b>Virale Transkripte im semi-permissiven Replikationssystem in Abhängigkeit von Kap1</b> .....	68
Abbildung 16: <b>Bindung des LT-Ags an den Replikationsursprung (Ori) in Abhängigkeit von Kap1</b> ..	71
Abbildung 17: <b>RNA-Seq: Experimentelles Design und Datenerfassung</b> .....	73
Abbildung 18: <b>Regulation von Genen durch Kap1 und den MCPyV T-Antigene</b> .....	76
Abbildung 19: <b>MCPyV-Replikation in der potenziellen Wirtszelle</b> .....	79
Abbildung 20: <b>Kap1-Phosphorylierung an Ser824 und Ser473</b> .....	80
Abbildung 21: <b>Keine Kap1-Phosphorylierung Ser824 und Ser473 durch die Expression der T-Ag</b> ..	83
Abbildung 22: <b>Kap1-Phosphorylierung durch MCPyV-Genommutanten</b> .....	85
Abbildung 23: <b>Phosphorylierung von Kap1 Ser824 erfolgt über den ATM-Signalweg</b> .....	86
Abbildung 24: <b>Phosphorylierung von Kap1 Ser824 in MCPyV-infizierten Fibroblasten</b> .....	87
Abbildung 25: <b>Abwärts von Kap1 werden p21-Transkripte reguliert</b> .....	88
Abbildung 26: <b>Verringerte Proliferation von MCPyV-positiven primären Fibroblasten</b> .....	90
Abbildung 27: <b>G2-Arrest in MCPyV-positiven Zellen</b> .....	92

Abbildung 28: MCPyV-positive primäre Fibroblasten zeigen einen seneszenten Phänotyp .....	94
Abbildung 29: Sekretorische Gene, die in Zusammenhang mit einem Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) beschrieben wurden .....	95
Abbildung 30: Modell für die Restriktion der MCPyV DNA-Replikation durch Kap1 .....	110
Abbildung 31: Modell zur MCPyV-induzierten Seneszenz in dermalen Fibroblasten und deren Beitrag zur MCC-Entstehung.....	117
Anhang Abb. 1: Zellwachstum der HEK293 Kap1 "Rescue" Zellen .....	121
Anhang Abb. 2: Expression der MCPyV T-Ag führt zur verminderten SUMOylierung von Kap1 .....	121
Anhang Abb. 3: Phosphorylierung von Kap1 an Ser824 durch unterschiedliche MCPyV-Mutanten	122
Anhang Abb. 4: Phosphorylierung von Kap1 an Ser473 durch unterschiedliche MCPyV-Mutanten	123
Anhang Abb. 5: Regulation von (a) Kinasen, (b) Zytokinen und (c) Wachstumsfaktoren .....	134

## 8.2 Tabellen

Tabelle 1: Plasmide .....	22
Tabelle 2: Primer für qPCR und RT-qPCR .....	23
Tabelle 3: Primer für Quikchange-Mutagenese .....	24
Tabelle 4: Oligonukleotide für EMSA und DPI-ELISA .....	24
Tabelle 5: Primäre Antikörper .....	25
Tabelle 6: Sekundäre Antikörper.....	26
Tabelle 7: Zelllinien.....	27
Tabelle 8: Medien und Zusätze .....	28
Tabelle 9: Zellzahlen für unterschiedliche Kulturgefäße.....	29
Tabelle 10: PEI-Transfektion.....	30
Tabelle 11: Lipofectamine-Transfektion .....	30
Tabelle 12: X-tremeGENE-Transfektion .....	31
Tabelle 13: sgRNA Sequenzen für einen CRISPR-Cas9 Gen-knock-out .....	32
Tabelle 14: In vitro Replikationsassay.....	34
Tabelle 15: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele .....	38
Tabelle 16: Quikchange Mutagenese mit PfuUltra II HS DNA Polymerase .....	43

Tabelle 17: <b>PCR-Bedingungen für Quikchange-Mutagenese</b> .....	44
Tabelle 18: <b>SYBR™ Green qPCR Ansatz</b> .....	46
Tabelle 19: <b>PCR-Bedingungen für SYBR Green qPCR</b> .....	46
Tabelle 20: <b>PCR-Bedingungen cDNA-Synthese</b> .....	51
Anhang Tab. 1: <b>Sign. GO Terms in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von Kap1</b> .....	124
Anhang Tab. 2: <b>Sign. KEGG Pathways in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von Kap1</b> .....	126
Anhang Tab. 3: <b>Sign. GO Terms in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von den MCPyV T-Ag</b> .....	127
Anhang Tab. 4: <b>Sign. KEGG Pathways in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von den MCPyV T-Ag</b> .....	128
Anhang Tab. 5: <b>Sign. GO Terms in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von Kap1 und den MCPyV T-Ag</b>	128
Anhang Tab. 6: <b>Sign. KEGG Pathways in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von Kap1 und den MCPyV T-Ag</b> .....	131
Anhang Tab. 7: <b>Ingeniuty <i>Upstream Regulators</i></b> .....	134
Anhang Tab. 8: <b>Liste von Genen aus der GeneCards® Datenbank</b> .....	137

### 8.3 Abkürzungen

$\beta$ -TrCP	<i>Beta-transducin repeats-containing proteins</i>
°C	Grad Celsius
$\mu$ g	microgramm
$\mu$ L	microliter
57kT-Ag	57k Tumor-Antigen
A	Adenosin
A	Alanin
AAV	Adeno-assoziierte Virus
ABTS-Lösung	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ALTO	<i>Alternate frame of the Large T open reading frame</i>
AMP-PNP	Adenylyl-imidodiphosphat
AS	Aminosäure
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
BK	Initialen des Patienten, in dem das Virus gefunden wurden
BKV	BK-Polyomavirus
Bp	Basenpaare
Brd4	<i>Bromodomain-containing protein 4</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C	Cytosin
CC	<i>Leucine zipper coiled-coil region</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHD3	<i>Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Chk1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
Chk2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
ct	<i>cycle threshold</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DDR	<i>DNA-Damage Response</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNA-PK	<i>DNA Protein Kinase</i>
dNTP	Deoxyribonukleotid-Mix
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DPEC Wasser	0,1 % Diethyldicarbonat in Wasser
DPI-ELISA	<i>DNA-Protein-Interaction Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
DSB	Doppelstrangbrüchen
DTS	<i>Digital Transcriptome Subtraction</i>
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGS	<i>Ethylene glycol bis(succinimidyl succinate)</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ER	<i>Early Region</i>
et al.	Et alteri
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FOXO4-DRI	<i>Forkhead box protein O4 D-retro-inverso</i>
G	Guanin
g	gramm
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gen)</i>
<i>gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Transkripte)</i>
gDNA	genomische DNA
GO	<i>Gene Ontology</i>
H1299	Humane Lungenkrebszelllinie
HAdV	Humaner Adenovirus
hCMV	humanes Cytomegalievirus
HDAC1	<i>Histone deacetylase 1</i>

HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HP1BD	<i>Heterochromatin-Protein 1 Bindedomäne</i>
HPRT1	<i>Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1</i>
HR	<i>homologous recombination</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hsc70	<i>Heat shock Protein 70</i>
HTLV-1	humane T-lymphotrope Virus
IP	Immunpräzipitation
k.o.	<i>knock-out</i>
Kap1	<i>KRAB-associated Protein-1</i>
kB	kilo Basenpaare
kB	Kilobasen
kB	Kilo Basenpaare
KCl	Kalسيومchlorid
kDa	Kilo Dalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KRAB	<i>Krüppel-associated-box</i>
KRAB-ZNF	KRAB-Zinkfinger
KSHV	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus
KU55933	ATM-Inhibitor
L	Liter
LB Medium	<i>Lysogeny broth medium</i>
LPV	lymphotropen Polyomavirus
LSD	<i>LT stabilzation domain</i>
LT-Ag	<i>Large Tumor Antigen</i>
M	molar
Mb	Mega Basenpaare
MBq	Megabequarell
MCC	<i>Merkel cell carcinoma</i>
MCPyV	Merkelzell Polyomavirus
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten

mind.	mindestens
Mio.	Millionen
miRNA	microRNA
mL	milliliter
MLV	murine Leukämievirus
mm	millimeter
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MUR	<i>MCPyV Unique Region</i>
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
NaCl	Natrium Chlorid
NaF	Natrium Flourid
NaOH	Natriumhydroxid
NCCR	<i>Non coding control region</i>
N-CoR	<i>Nuclear receptor co-repressor 1</i>
ng	nanogramm
nHDF	neonatale humane dermale Fibroblasten
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i>
NP-40	Nonoxinol 40
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
NuRD	<i>Nucleosome Remodeling Deacetylase</i>
OBD	<i>Origin binding domain</i>
OD	<i>Optical density</i>
OIS	Onkogen-induzierten Seneszenz
Ori	<i>Origin of replication</i>
p21	<i>p21<sup>Cip1</sup>, p21<sup>Waf1</sup>, CDKN1A</i>
p53	Tumor protein p53, tumor suppressor p53
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCI	Phenol-Chloroform
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PEI	Polyethylenimin
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehy
PHD/BROMO	<i>Plant Homeo Domäne/Bromodomäne</i>
PI	Propidiumiodid
PI3-Kinasen	Phosphoinositid-3-Kinasen

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PS	Pentanukleotidsequenzmotive
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
PyV	Polyomavirus
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaktion</i>
Rb	Retinoblastoma
RBCC	<i>RING, B-Boxen, leucine zipper coiled-coil region</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	RosWell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SAHF	Seneszenz-assoziierten heterochromatischen Foci
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp
SA-β-gal	Seneszenz- assoziierte β-Galaktosidase
SBT	Streptavin-Biotin-Tag
SCF	<i>Skp, Cullin, F-box containing complex</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Sek.	Sekunden
Seq	<i>Sequencing</i>
Ser	Serin
SETDB1	<i>SET Domain Bifurcated 1</i>
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
sign.	signifikant
SMARCAD1	<i>SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1</i>
sT-Ag	<i>Small Tumor Antigen</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related MODifier</i>
SV40	<i>simian vacuolating Virus 40</i>
T	Thymin

TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
TSS	TRIM spezifische Sequenz
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Volume
VP	Hüllprotein von Polyomaviren
vPK	virale Protein Kinase
VZV	Varizella Zoster Virus
wt	Wildtyp
x g	Gravity
X-Gal	<i>β-D-galactopyranosid</i>
YFP	<i>Yellow Flourescent Protein</i>
<i>ywhaz</i>	<i>tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein zet</i>
ZBRK1	Zinkfinger ZBRK1

## 9 Veröffentlichungen und Präsentationen

### Veröffentlichungen:

Engels G, Hierweger AM, Hoffmann J, Thieme R, Thiele S, Bertram S, Dreier C, Resa-Infante P, Jacobsen H, Thiele K, Alawi M, Indenbirken D, Grundhoff A, Siebels S, Fischer N, Stojanovska V, Muzzio D, Jensen F, Karimi K, Mittrücker HW, Arck PC, Gabriel G.

Pregnancy-Related Immune Adaptation Promotes the Emergence of Highly Virulent H1N1 Influenza Virus Strains in Allogeneically Pregnant Mice.

Cell Host Microbe. 2017 Mar 8;21(3):321-333. doi: 10.1016/j.chom.2017.02.020.

### Präsentationen:

Svenja Siebels, Manja Czech-Sioli, Juliane Theiss, Michael Spohn, Claudia Schmidt, Adam Grundhoff and Nicole Fischer

MCPyV replicative stress induces senescence in neonatal dermal fibroblasts in a Kap1-dependent manner.

DNA Tumor Virus Meeting 2018, Madison (USA)

Svenja Siebels, Manja Czech-Sioli, Juliane Theiss, Michael Spohn, Claudia Schmidt, Adam Grundhoff and Nicole Fischer

Characterization of the interaction of the host factor Kap1 (TRIM28) and the Merkel cell polyomavirus encoded oncoproteins.

DNA Tumor Virus Meeting 2017, Birmingham (UK)

Svenja Siebels, Manja Czech-Sioli, Juliane Theiss, Michael Spohn, Claudia Schmidt, Adam Grundhoff and Nicole Fischer

Characterization of the interaction of the host factor Kap1 (TRIM28) and the Merkel cell polyomavirus encoded oncoproteins.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie e. V. (GfV) 2017, Marburg

## 10 Danksagung

Diese Arbeit wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Äpfelbacher im Zeitraum vom Februar 2015 bis Juli 2018 durchgeführt. Das Projekt wurde von der Erich und Gertrud Roggenbuck-Stiftung zur Förderung der Krebsforschung unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Nicole Fischer für die Bereitstellung und Betreuung dieser Dissertation. Ich habe stets die vertrauensvolle und kompetente Unterstützung geschätzt. Ein Dankeschön möchte ich Herrn Prof. Dr. Adam Grundhoff für die großzügige Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Heinrich-Pette-Institut aussprechen.

Danken möchte ich Herrn Michael Spohn und Herrn Dr. Thomas Günther für die bioinformatische Unterstützung bei der Auswertung der Hochdurchsatzsequenzierungen sowie den Mitgliedern der NGS-Plattform des Heinrich-Pette Instituts. Frau Marion Ziegler und Frau Claudia Schmidt danke ich vielmals für die Hilfe bei der Umsetzung von Experimenten. Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. Manja Czech-Sioli, Frau Dr. Juliane Theiss und Herrn Dr. Thomas Günther für anregende Diskussionen und die Einarbeitung im Labor. Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Arbeitskollegen der AG Fischer und AG Grundhoff und Studienkollegen für das Testlesen und die konstruktive Rückmeldung bedanken.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Peggy Farnham für die Bereitstellung der Kap1-Expressionskonstrukte, bei Herrn Prof. Ronald Hay für die Zurverfügungstellung der SUMO-Zellen und schließlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner für die Versorgung mit Reagenzien. Zusätzlich gilt ihm mein Dank für die Ko-Betreuung dieser Dissertation und die freundliche Zusammenarbeit.

## **11 Eidesstattliche Versicherung**

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

Hamburg, den 26.07.2018

Svenja Siebels