

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Diana Hops
aus Duisburg

Tag der mündlichen Prüfung

Charakterisierung zellulärer Interaktionsproteine des NebenkapSIDproteins L2 humaner Papillomviren

Gutachter: PD Dr. Martin Müller
Prof. Dr. Lutz Gissmann

Danksagung

Mein Dank gilt PD Dr. Martin Müller für die Übernahme des Gutachtens, die Bereitstellung des Projektes und aller Aufwendungen sowie für die hilfreichen Gespräche.

Ich möchte Prof. Dr. Lutz Gissmann für die Übernahme des Gutachtens und die ständige Hilfsbereitschaft danken.

Allen Labormitarbeitern möchte ich herzlichst für den Spass, das gegenseitige Zusprechen von Mut und die Hilfsbereitschaft danken.

Danken möchte ich auch Dr. Thomas Hofmann für die Bereitstellung von Materialien und die Bereitschaft zu hilfreichen Gesprächen.

Herzlichen Dank auch an meine Eltern, ohne die ich meine Ziele nicht hätte erreichen können.

Zuletzt möchte ich meinem Mann Daniel sehr großen Dank aussprechen, da er immer für mich da war und mich sehr unterstützt hat.

Zusammenfassung

Papillomviren sind weit über das Wirbeltierreich verbreitet. Beim Menschen wurden bereits etwa 100 verschiedene Papillomvirus-Typen charakterisiert. Diese lassen sich aufgrund genetischer oder klinischer Merkmale in verschiedene Gruppen klassifizieren. Eine besondere Bedeutung kommt einigen onkogenen Papillomviren zu, die sich für die Entstehung des Zervixkarzinoms verantwortlich gezeigt haben. Die Erkrankung ist weltweit als zweithäufigste Krebsart bei Frauen von größter Bedeutung. Impfstoffe auf der Basis des Hauptkapsidproteins L1 befinden sich in Entwicklung beziehungsweise sind bereits zugelassen.

Das Kapsid des Virus besteht aus 360 Kopien L1 in Pentameren sowie wahrscheinlich 12 Kopien des Nebenkapsidproteins L2. L2 zeigt unter anderem regulatorische Funktionen bei der spezifischen Erkennung der Wirtszellen und ist essentiell für die Infektiosität der Virionen. Nach der Infektion rekrutiert L2 die virale DNA in den Zellkern und ist wichtig für die Verpackung der DNA und die Reifung infektiöser Viruspartikel.

Es wurden in vorangehenden Arbeiten zelluläre Proteine identifiziert, die mit L2 verschiedener Papillomvirus-Typen interagieren. Zwei dieser Proteine waren PLINP und PMSP. PLINP ist ein mit L2 in Assoziation zu PODs (*pml oncogenic domains*) interagierendes Protein, welches ubiquitär in Zelllinien und Geweben transkribiert wird und dessen Expression bei diversen Tumoren verändert ist. Im Laufe dieser Arbeit wurden Studien veröffentlicht, die PLINP als negativen Regulator des Zellzyklus und des Zellwachstums charakterisieren. Das zytoplasmatische PMSP wird durch L2 in PODs rekrutiert und wurde bisher nicht weitergehend charakterisiert. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von PLINP und PMSP in Bezug zu ihrer zellulären Funktion sowie zum Lebenszyklus des humanen Papillomvirus.

Potentielle Interaktionspartner von PLINP und PMSP wurden mittels des *Yeast Two-Hybrid*-Verfahrens aus einer humanen Keratinozyten-cDNA-Bibliothek identifiziert und ihre subzelluläre Lokalisation analysiert. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen TIN-Ag-RP als Interaktionspartner von L2, PLINP und PMSP aufgeklärt werden, der möglicherweise auf einen funktionalen Komplex hindeuten könnte. Ein weiterer Interaktionskomplex, der identifiziert werden konnte, besteht zwischen PLINP, eIF3, COP9 Signalosom und dem Proteasom.

Eine Analyse der subnukleären Lokalisation konnte zeigen, dass PLINP in der Zelle sehr wahrscheinlich nicht nur in PODs, sondern auch partiell mit Mitochondrien assoziiert vorliegt. Es gab keinen Hinweis auf eine SUMOylierung oder eine andere posttranslationale Modifikation des Proteins, obwohl diese vorzuliegen schien. Es war jedoch möglich, eine Interaktion zu dem POD-lokalisierten Protein Daxx aufzuzeigen und die entsprechenden Interaktionsbereiche in der Sequenz von PLINP und Daxx durch Deletionsanalysen einzugrenzen. L2 kann dabei den Effekt der veränderten Lokalisation von PLINP bei einem *Daxx-knockout* teilweise revidieren. Eine PLINP-RNA-Interferenz führt zu einer erhöhten Infizierbarkeit von Zellen mit HPV16 Pseudovirionen, hat aber keinen Einfluss auf die Expression oder Lokalisation der Kapsidproteine L1 und L2. Die antivirale Aktivität von PLINP scheint auch nicht durch eine Anlagerung des Proteins an virale Partikel verursacht zu werden.

Abstract

Papillomaviruses are widespread viruses of higher vertebrates. Already there are around 100 different human papillomaviruses described. The classification of this diverse group of viruses is based on either genetic or clinical characteristics. Of special importance are some oncogenic papillomaviruses, which are responsible for the development of cervical carcinoma. This type of cancer is the second most common cancer in women worldwide. A vaccination on the basis of the major capsid protein L1 is in development or rather accredited.

The virus capsid consists of 360 copies of the major capsid protein L1 assembled in pentameres as well as probably 12 copies of the minor capsid protein L2. L2 fulfills many important functions in the viral life cycle. It has regulatory functions in the specific recognition of the target cells and is essential for the infectibility of the virions. After infection, L2 recruits the viral DNA into the cell nucleus and is necessary for packaging of the viral DNA and the maturation of infectious particles.

In recent studies cellular proteins have been identified which interact with L2 of different papillomavirus types. Two of these proteins are PLINP and PMSP. PLINP is a L2 interacting protein which associates with PODs (pml oncogenic domains) and is ubiquitously expressed in many cell lines and tissues and its level of expression is altered in many tumors. During this thesis a study was published, in which PLINP was characterized as a negative regulator of the cell cycle and proliferation. The cytoplasmic PMSP is recruited into PODs by L2 and has not been further characterized. The aim of this study was the characterization of PLINP and PMSP in the context of their cellular function and their relationship to the life cycle of the human papillomavirus.

Potential interaction partners of PLINP and PMSP have been identified through a yeast two-hybrid screening of a human keratinocyte-cDNA library and were analyzed by the study of their subcellular localization. In this context a connection between TIN-AGRP as an interaction partner of L2, PLINP and PMSP could be demonstrated, which gives a possible hint to a functional complex. Another putative complex, which was characterized, consists of PLINP, eIF3, the COP9 signalosome and the proteasome.

The analysis of the subcellular localization was able to show, that PLINP is not only associated with PODs but also partially to mitochondria. Even if a posttranslational modification is likely, there was no evidence for a SUMOylation or phosphorylation of the protein. However, an interaction with the POD-associated protein Daxx was shown and the domains for the interaction in the sequence of PLINP and Daxx have been narrowed by the analysis of deletion mutants. L2 is able to revise the altered localization of PLINP due to a knockout of Daxx. A gene silencing of PLINP leads to an enhancement of cell infectibility with HPV16 pseudovirions, but had no effect on the localization or expression of the viral capsid proteins L1 and L2. Also there is no hint for an attachment of PLINP to the viral particles.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Papillomviren	1
1.1.1	Einteilung der Papillomviren nach klinischen Gesichtspunkten	2
1.1.2	Die genetische Organisation der Papillomviren	2
1.1.3	Der virale Infektionszyklus	3
1.2	L2-interagierende Proteine	8
1.2.1	PLINP	9
1.2.2	PMSP	11
1.3	Der Zellkern und seine Strukturen	11
1.3.1	Die PODs	12
1.3.2	PODs sind virale Replikations- und Translationsorte	13
1.4	Modifikation von Proteinen	14
1.4.1	SUMOylierung als posttranslationale Modifikation von Proteinen	14
1.5	RNA-Interferenz	15
1.6	Ziele der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	21
2.1.1	Biologische Materialien	21
2.1.2	Molekularbiologische Materialien	22
2.1.3	Kulturmedien	25
2.1.4	Manipulation von Bakterien	27
2.1.5	Manipulation von Nukleinsäuren	27
2.1.6	Elektrophorese	28
2.1.7	Western Blot-Analyse	29
2.1.8	ELISA	30
2.1.9	<i>Tandem Affinity Purification (TAP)</i>	30
2.1.10	Manipulation von Hefe	31
2.1.11	Manipulation von Säugetierzellen	32
2.1.12	Extraktion und Aufreinigung von Pseudovirionen/VLPs	33
2.1.13	Weitere Puffer	33
2.1.14	Chemikalien	34
2.1.15	Geräte	34
2.1.16	Verbrauchsmaterialien und Plastikwaren	35
2.1.17	Software	36
2.2	Methoden	37
2.2.1	Kultivierung und Manipulation von Bakterien	37
2.2.2	Manipulation von DNA	38
2.2.3	Manipulation von RNA	44
2.2.4	Analyse und Charakterisierung von Proteinen	46

2.2.5	Kultivierung und Manipulation von Hefe	49
2.2.6	Kultivierung und Manipulation von Säugetierzellen	53
2.2.7	Aufreinigung und Fraktionierung von Pseudovirionen mittels Gradienten	57
2.2.8	Immunfluoreszenz und Mikroskopie	58
2.2.9	Herstellung von polyklonalem Antiserum	59
2.2.10	Antigen-spezifischer <i>capture</i> -ELISA	60
3	Ergebnisse	62
3.1	Identifikation potentieller Interaktionspartner von PLINP und PMSP mittels des <i>Yeast Two-Hybrid Systems</i>	62
3.1.1	Test des Hefestammes AH109	63
3.1.2	<i>Screening</i> von PLINP mit einer Keratinozyten-cDNA-Bibliohek	64
3.1.3	<i>Screening</i> von PMSP mit einer Keratinozyten-cDNA-Bibliothek	86
3.2	Interaktion von PLINP mit anderen POD-assoziierten Proteinen	91
3.2.1	Interaktion von PLINP mit FLASH	92
3.2.2	Interaktion von PLINP mit Daxx	93
3.3	Analyse der Expression und Lokalisation von PLINP	99
3.3.1	Expression und posttranskriptionale Modifikation von PLINP	102
3.3.2	Nachweis des endogenen PLINP mittels neu hergestellter Antikörper	106
3.4	Einfluss von PLINP auf die Expression und Lokalisation der viralen Kapsidproteine	107
3.5	RNA-Interferenz von PLINP	108
3.5.1	Herstellung der PLINP-spezifischen siRNAs	109
3.5.2	Überprüfung der PLINP-spezifischen siRNAs	109
3.5.3	Einfluss der RNA-Interferenz von PLINP auf die Expression und Lokalisation der viralen Kapsidproteine	116
3.5.4	Einfluss der PLINP-RNA-Interferenz auf die Bildung von L1 in HPV16 Pseudovirionen	118
4	Diskussion	126
5	Literaturverzeichnis	140

1 Einleitung

1.1 Papillomviren

Papillomviren sind kleine DNA-Viren, welche von einer ikosaedrischen Proteinhülle umgeben sind (Howley & Lowy, 2002a). Aufgrund ihrer Morphologie bildet die heterologe Gruppe der Papillomviren, die früher gemeinsam mit den Polyomaviren die Familie der Papovaviren bildete, eine eigene Familie - die Papillomaviridae (Howley & Lowy, 2002b). Papillomviren haben onkogenes Potential und sind mit weltweit ca. einer halben Millionen neuer Krebsdiagnosen jährlich assoziiert, von denen das Zervixkarzinom wohl die bedeutendste Krebsart darstellt.

Wirte der Papillomviren sind jedoch nicht auf den Menschen begrenzt, sondern weit über das Reich der Wirbeltiere verbreitet. Infiziert werden beispielsweise Vögel wie der Papagei, Haus- und Nutztiere wie der Hund sowie im Wasser lebende Säugetiere wie die Seekuh (Bossart *et al.* , 2002). Beim Menschen wurden bis heute schon über 118 verschiedene humane Papillomviren charakterisiert (de Villiers *et al.* , 2004). Weitere vermeintliche Typen sind teilcharakterisiert (de Villiers *et al.* , 2005). Die Wirtsspezifität der Papillomviren ist sehr hoch. *In vivo* ist die Infektion von Pferden und die damit einhergehende mögliche Sarcoidbildung durch das bovine Papillomvirus die einzige bisher bekannte Ausnahme der Wirtsspezifität. Die Infektion erfolgt streng epitheliotrop, das heißt es werden ausschließlich basale Epithelzellen der Haut sowie der Schleimhaut infiziert, die durch Mikroläsionen dem Erreger zugänglich sind. Bestimmte Typen des humanen Papillomvirus können zur Bildung von Warzen oder zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN: *cervical intraepithelial neoplasia*) führen. Diese Läsionen können verschiedene klinische Stadien durchlaufen und sich gegebenenfalls zum Tumor weiterentwickeln. Sogenannte Hoch-Risiko-Typen des Virus wie HPV16, 18, 31, 45 und 56 werden dabei als ursächlich für die Entstehung des Zervixkarzinoms angesehen, wobei HPV16 mehr als 50% der Tumorerkrankungen verursacht (zur Hausen, 2002). Durch Abstriche und Ultraschalluntersuchungen beim Frauenarzt sind Läsionen im frühen Stadium diagnostizierbar, die dann operativ entfernt werden können. Diese medizinische Grundversorgung ist in Entwicklungsländern nicht gegeben, so dass hier der Gebärmutterhalskrebs die häufigste zum Tode führende Tumorerkrankung bei Frauen darstellt. Daher ist die Entwicklung eines Impfstoffes, der eine Immunisierung gegen mehrere Typen des Virus möglich macht, sowohl zur Prophylaxe als auch zur Therapie

von großer Bedeutung. Therapeutische Impfstoffe zur Bekämpfung bereits veränderter Zellen sowie prophylaktische Impfstoffe zur epidemischen Behandlung befinden sich in Entwicklung beziehungsweise sind bereits zugelassen. Ein tetravalenter Impfstoff wird aus L1-Proteinen von vier verschiedenen Virustypen hergestellt, von denen zwei Typen Genitalwarzen verursachen und die anderen zwei Typen für etwa 70% der Fälle von Gebärmutterhalskrebs verantwortlich gemacht werden. Ein anderer bivalenter Impfstoff immunisiert gegen zwei HPV-Typen. Für die Anwendung eines Vakzines in Entwicklungsländern sind Kostenfaktoren und die mangelhafte medizinische Infrastruktur wichtige Aspekte. In diesem Bereich wird unter anderem an der Entwicklung von oralen Vakzinen gearbeitet.

1.1.1 Einteilung der Papillomviren nach klinischen Gesichtspunkten

Die Einteilung der bisher über 100 charakterisierten Papillomvirus-Typen erfolgt anhand von Unterschieden in der Genomsequenz. Eine Einteilung ist ebenso nach der klinischen Diagnostik der verursachten Krankheiten möglich (zur Hausen, 1996). Man unterscheidet hierbei zunächst zwischen kutanen und mukosalen Typen. Kutane HPV-Typen wie HPV1, 5 oder 8 verursachen gutartige Wucherungen oder bösartige Läsionen der Haut. Mukosale Typen des Virus wie HPV6, 11, 16, 18 oder 31 infizieren die Schleimhaut des oralen oder anogenitalen Traktes und können in Hoch- und Niedrig-Risikotypen eingeteilt werden. Gutartige Proliferationen wie Warzen führen bei manchen mukosalen Typen wie HPV6 und 11 fast nie zur Entwicklung von invasiven Tumoren (Niedrig-Risikotypen), wobei eine Weiterentwicklung der Läsionen zu invasiven Tumoren bei Hoch-Risikotypen wie HPV16 und 18 möglich ist. Eine seltene Form der Erkrankung ist die sogenannte *Epidermodysplasia verruciformis*, welche zum Beispiel durch HPV5 hervorgerufen werden kann. Hier ist der gesamte Körper mit Warzen bedeckt, die durch UV-Licht häufig in Hautkrebs ausarten (Glinski *et al.*, 1981).

1.1.2 Die genetische Organisation der Papillomviren

Die Familie der Papillomviren ist genetisch hoch konserviert. Das doppelsträngige DNA-Genom umfasst je nach Typ ca. 7.200 - 8.200 Basenpaare und trägt drei Regionen. Eine nicht-kodierende Region (URR, LCR oder NCR) trägt den Replikationsursprung sowie mehrere Promotoren und Transkriptions-Enhancer-Elemente für die frühe und teilweise auch die späte Region. Durch eine Polyadenylierungsschnittstelle voneinander getrennt sind die beiden anderen Regionen, die die frühen bzw. späten Gene des Virus tragen. Die frühe Region kodiert für sechs verschiedene Gene, die für die Replikation der viralen DNA sowie die Transformation der Wirtszelle verantwortlich sind. In der späten Region findet sich die Kodierung für die zwei Kapsidproteine L1 und L2 (siehe Abbildung 1.1).

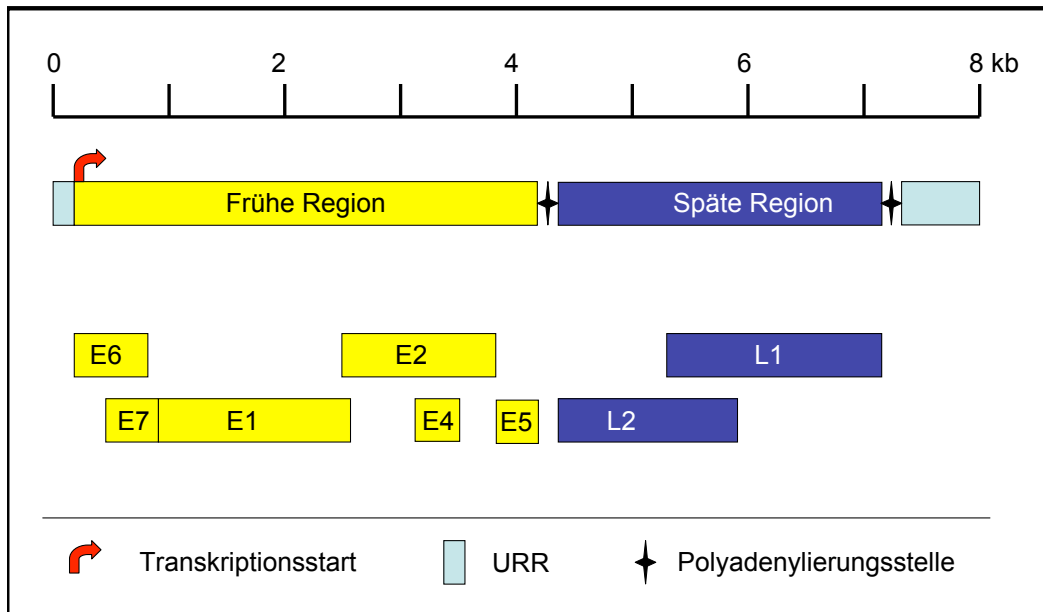


Abbildung 1.1: **Das Genom des humanen Papillomvirus Typ 16.** Das zirkuläre Genom, hier der Übersichtlichkeit halber in linearer Darstellung, besitzt eine Länge von ca. 8 kb und kann in eine frühe und eine späte Region aufgeteilt werden, von denen die frühe Region für die nicht strukturellen Proteine und die späte Region für die Kapsidproteine kodiert. Zwischen diesen Bereichen befinden sich Polyadenylierungsstellen sowie eine nicht kodierende Region (URR) mit verschiedenen Kontrollelementen. Verändert nach <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/smc/fig002smc.htm>

1.1.3 Der virale Infektionszyklus

Der Lebenszyklus von Papillomviren ist sehr eng mit dem Differenzierungsgrad der Epithelzellen der Haut oder Schleimhaut verbunden. An undifferenzierten basalen Epithelzellen, welche durch Mikroläsionen oder Wunden zugänglich sind, findet die Infektion statt. Die Bindung der Viren an die Zielzellen erfolgt dabei vermutlich über zwei Rezeptoren durch Bindung von L1 und über einen spezifischen sekundären Rezeptor durch Bindung von L2. Mittels Clathrin-abhängiger Endozytose erfolgt die Aufnahme der viralen Partikel (Selinka *et al.*, 2002). Die Freisetzung aus den Endosomen erfolgt über ein Membran-destabilisierendes Peptid in Zusammenhang mit der Spaltung von L2 an einer Furin-Erkennungssequenz (Kamper *et al.*, 2006), (Richards *et al.*, 2006). Unter Begleitung von L2 wird das virale Genom in den Zellkern transportiert. Es konnte gezeigt werden, dass L2 mit dem Mikrotubuli-Netzwerk der Zelle über das Motorprotein Dynein interagieren kann und so möglicherweise den Transport der viralen DNA steuert (Florin *et al.*, 2006). Der Import in den Zellkern erfolgt, wie bei HPV18 L2 gezeigt werden konnte, über eine Interaktion mit dem Kap alpha(2)-Adapter sowie den Kap beta(2)- und Kap beta(3)-nukleären Importrezeptoren (Klucevsek *et al.*, 2006). Nach Ankunft im Zellkern wird das HPV-Genom zunächst Zellzyklus-unabhängig amplifiziert. Infizierte Zellen zeigen dabei eine verzögerte Differenzierung und gesteigerte Proliferation, wobei dies der Expression der viralen Proteine E5, E6 und E7 zugeschrie-

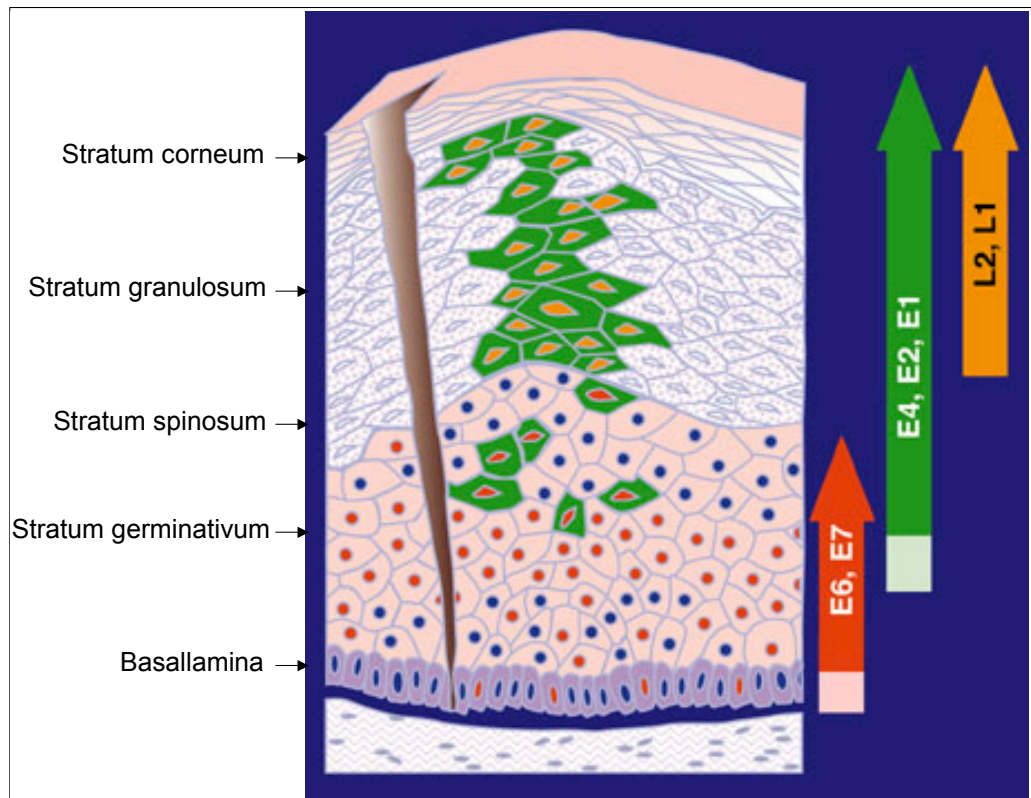


Abbildung 1.2: **Der Infektionszyklus von Papillomviren.** Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Papillomviren. Abbildung verändert nach <http://www.nimr.mrc.ac.uk/virology/doorbar/lifecycle/fig1/>

ben wird. In den höheren Epithelschichten findet die Amplifikation der viralen DNA, die Expression von L1 und L2 und schließlich der Zusammenbau der fertigen Virus-Partikel statt. Durch Abschuppung der oberen Epidermis erfolgt die Freisetzung der Virionen. Die schematische Darstellung des viralen Lebenszyklus ist in Abbildung 1.2 zu erkennen.

1.1.3.1 Die frühen viralen Gene

Die frühe Genomregion des humanen Papillomvirus zeigt sechs offene Leserahmen (ORF: *open reading frame*) für E1, E2, E4, E5, E6 und E7. Zusätzlich existieren einige Spleißvarianten der frühen Gene. Das E4 Protein nimmt dabei als am wenigsten konserviertes Protein eine Sonderstellung ein, da dessen Expression gemeinsam mit der der späten Gene stattfindet. Aufgrund dieser Charakteristika wird E4 zum Teil in die späte Region eingruppiert (Howley & Lowy, 2002b).

Im Folgenden sollen die Charakteristika der einzelnen Papillomvirus-Proteine kurz erläutert werden. Das E1-Protein weist ATP-abhängige Helikase-Aktivität auf und wirkt unter Interaktion mit der DNA-Polymerase als Initiator und Elongator der Replikation. E1 bindet in der Zelle an eine palindromische Sequenz im URR, die durch Interaktion mit E2 verstärkt wird (Chiang *et al.*, 1992). Die Chaperone Hsp40 und Hsp70 fördern die Bindung des E1-Proteins von HPV11 an den Replikationsursprung (Liu *et al.*, 1998).

Die Größe von E2 beträgt je nach Form oder Variante des Proteins zwischen 68 und 85 kDa. E2 wirkt als Homodimer im Kern der Wirtszelle. Die zwei existierenden Spleißvarianten bilden einen Transaktivator bzw. einen Transrepressor (Bouvard *et al.* , 1994). E2 kann an das Papillomvirus-Genom binden, wirkt als Aktivator der Transkription und ist essentiell für die Replikation via Interaktion mit E1. Das bezüglich seiner Funktion noch weitestgehend unerforschte E4-Protein ist mit 11 kDa sehr klein. E4 assoziiert und interagiert mit dem Keratingerüst differenzierender Zellen im Zytoplasma (Doorbar *et al.* , 1991). E5 weist mit lediglich 5 kDa Größe im humanen Papillomvirus schwach transformierende Eigenschaften auf. Untersuchungen am bovinen Papillomvirus (BPV) zeigten allerdings eine starke Transformation der Zellen durch das virale Protein E5 (Schiller *et al.* , 1986). BPV E5 interagiert indirekt mit Wachstumsfaktoren der Zelle wie EGF und PDGF und verstärkt damit die Zellproliferation (Cohen *et al.* , 1993). E6 und E7 nehmen in der Papillomvirus-Forschung eine Sonderstellung ein, da sie die beiden transformierenden Proteine der humanen Papillomviren darstellen und deren Expression in allen HPV-positiven Tumorbiopsien zu finden ist. Die beiden Proteine wirken in Hoch-Risiko-Typen des Virus stark synergistisch (Watanabe *et al.* , 1989), (Hawley-Nelson *et al.* , 1989). *In vitro* sind E6 und E7 allerdings ebenso unabhängig voneinander zur Transformation von Zellen in der Lage, wobei die Effizienz jedoch signifikant geringer ist. E6 interagiert in der Zelle unter anderem mit dem proapoptotischen Protein Bak und dem Tumorsuppressor p53, der eine zentrale Rolle in der Zellzyklus-Kontrolle und anderen essentiellen Prozessen der Zelle spielt. Bak und p53 werden proteolytisch degradiert und damit der Zellzyklus-Stopp bei DNA-Schäden inhibiert (Scheffner *et al.* , 1990). So können sich Mutationen akkumulieren und zur Transformation beitragen. Das E7-Protein wirkt auf die Tumorsuppressoren pRb105 und p107 und p130 sowie AP-1 und interagiert mit den Cyclinen A und E sowie Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (zur Hausen, 2002). Durch die Bindung von pRb kommt es zur Freisetzung von E2F, einem Transaktivator von Zellzyklus-Regulatorproteinen. Die erhöhte Transaktivierung bewirkt eine vermehrte Proliferation der Zellen und somit die Tumorentwicklung (Ibaraki *et al.* , 1993).

1.1.3.2 Die späten viralen Gene

Das 55 nm große ikosaedrische Kapsid der Papillomviren besteht aus dem Hauptstrukturprotein L1 und dem Nebenstrukturprotein L2 (Baker *et al.* , 1991). L1-Proteine bilden dabei das Hauptgerüst des Kapsids, indem sich 360 L1-Proteine zu 72 Pentameren zusammenlagern, welche das Kapsid bilden (Zhou *et al.* , 1992). Eine schematische Abbildung sowie eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Papillomvirus-Kapsiden sind in Abbildung 1.3 dargestellt. Die Pentamere, auch Kapsomere genannt, sind über

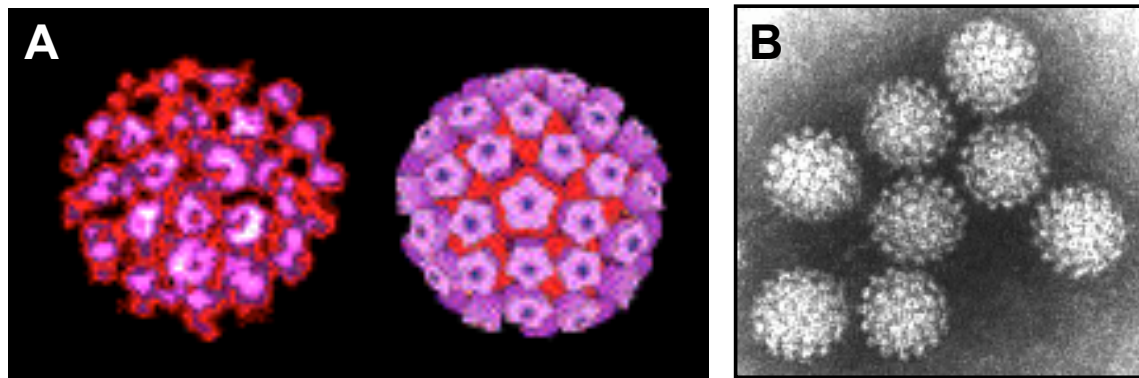


Abbildung 1.3: **Aufbau des Papillomvirus-Kapsids. A: 3-D Schema eines Papillomvirus-Kapsids anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen.** 360 L1 Proteine können sich spontan zu 72 Pentameren zusammenlagern, die dann ein Kapsid bilden. 12 dieser Kapsomere sind pentavalent, die restlichen Kapsomere hexavalent. Kontrovers ist bis heute, ob sich im Zentrum der pentavalenten Kapsomere genau 12 L2-Proteine einlagern, welche das Kapsid vervollständigen. **B: Elektronenmikroskopische Aufnahme humaner Papillomviren.** Die Bilder sind der Quelle <http://www.virology.net/Big-Virology/BVDNApapova.html> entnommen.

Disulfid-Brücken miteinander verbunden. 12 dieser Kapsomere sind pentavalent, die restlichen hexavalent, das bedeutet in Kontakt mit sechs weiteren Kapsomeren. Neben L1 finden sich vermutlich noch 12 Proteine L2 pro Virion (Kirnbauer *et al.*, 1993). Aufgrund stöchiometrischer Untersuchungen wird angenommen, dass L2 im Zentrum der 12 pentameren L1-Kapsomere lokalisiert ist, wobei dies noch nicht experimentell bewiesen werden konnte. Andere Untersuchungen vermuten eine höhere Anzahl von L2-Proteinen im Virion. Diese nicht-kovalenten L1-L2 Verbindungen stabilisieren neben der L1-DNA-Verbindung das virale Kapsid. L2 ist unter anderem für die Infektiosität der Partikel essentiell (Unckell *et al.*, 1997).

L1 ist *in vitro* auch ohne L2 in der Lage, sich selbst spontan zu leeren Viruspartikeln, sogenannten VLPs (*virus-like particles*) zusammenzulagern (Zhou *et al.*, 1991a). Aufgrund dieser Eigenschaft von L1 ist es einfach, VLPs experimentell herzustellen. VLPs sind hoch immunogen und bilden deshalb die Basis der Vakzine (Kirnbauer *et al.*, 1992). Eine Inkorporation von L2 ist möglich, wenn dieses koexprimiert wird und bewirkt eine Verbesserung der Stabilität und Zusammenlagerung der Partikel (Hagensee *et al.*, 1993), (Kirnbauer *et al.*, 1993). Die Herstellung von Pseudovirionen, das heißt Partikel mit inkorporierter DNA, war bis vor Kurzem schwieriger. Mittlerweile sind jedoch Methoden etabliert, mit denen man Pseudovirionen, die ein Marker-Plasmid enthalten, herstellen kann (Buck *et al.*, 2005a). Diese Pseudovirionen sind, sofern sie auch L2 enthalten, infektiös und weisen damit eine große Analogie zu natürlichen Virionen auf, die nur schwer *in vitro* zu vermehren sind.

Das Hauptstrukturprotein L1

L1 bildet mit seinen ca. 500 Aminosäuren und einer Größe von etwa 57 kDa das konservierteste Protein der Papillomviren (Gissmann *et al.*, 1977). Das L1-Protein besitzt neben seiner bereits beschriebenen Fähigkeit zur spontanen Zusammenlagerung zu Virus-ähnlichen Partikeln weitere essentielle Funktionen wie die Verpackung des viralen Genoms sowie die Bindung des Virus an die Wirtszelle. Die Bindung erfolgt sowohl über Heparan-Sulfate auf der Zelloberfläche, als auch über $\alpha 6\beta 4$ -Integrin (Giorgiou *et al.*, 2001), (Fothergill & McMillan, 2006). Da nicht alle Papillomviren diese Rezeptoren zu nutzen scheinen, ist der Sachverhalt noch nicht vollständig klar. Innerhalb der Wirtszelle findet sich das Protein im Zellkern. Die Expression erfolgt erst in vollständig differenzierten Epithelzellen, wobei die Expressionsstärke streng durch Promotor und negative Regulationselemente in der mRNA reguliert wird. Zwei Kernlokalisierungssignale in der L1-Sequenz wurden identifiziert, die zusammen eine Kern-Lokalisation von L1 bewirken (Zhou *et al.*, 1991b).

Das Nebenstrukturprotein L2

Das ca. 72 kDa und durchschnittlich 465 Aminosäuren große Nebenstrukturprotein L2, welches weniger stark als das Hauptstrukturprotein L1 konserviert ist, weist *in vivo* ein sehr niedriges Expressionsniveau auf. Die Regulation erfolgt dabei transkriptional über Polyadenylierungssignale und Transkriptionsfaktoren sowie posttranskriptional über eine instabile mRNA, welche zusätzlich noch über inhibitorische Regulatorsequenzen verfügt. Bisherige Forschungen ergaben neben den bereits erwähnten Funktionen von L2 eine Rolle des Proteins bei der Erkennung der Wirtszelle vor der Infektion über einen sekundären Rezeptor. Nach Internalisierung wurde gezeigt, dass der N-Terminus von L2 mit einer Komponente des endoplasmatischen Retikulums, dem tSNARE Syntaxin 18, interagiert (Bossis *et al.*, 2005). Neben diesen Funktionen bei den ersten Schritten der viralen Infektion hat L2 weiterhin Funktionen bei der Verpackung des viralen Genoms (Holmgren *et al.*, 2005). Der Einfluß von L2 auf diese Genomverpackung scheint dabei im experimentellen System von der Herkunft des L1 Proteins, also des HPV-Typen, abzuhängen (Buck *et al.*, 2005b). Dies geschieht über einen bisher unbekanntem Mechanismus, der in der Zelle an beziehungsweise in PODs (*PML Oncogenic Domains*) stattfindet (siehe auch 1.3.1). L2 ist das einzige virale Strukturprotein, welches bisher in PODs gefunden wurde (Day *et al.*, 2004). In diesen distinkten Kerndomänen interagiert L2 mit den anderen viralen Proteinen L1 und E2. Es wird angenommen, dass diese Proteine neben zellulären Proteinen beim Zusammenbau der viralen Partikel kollaborieren. E2 sorgt dabei auch für die Lokalisation von E1 in PODs. Da die experimentellen Daten auf einer Überexpression von L2 beruhen und PODs die Funktion einer Ablagerungstelle für nicht gebrauchte Proteine haben können, ist die Frage nach der Verifizierung der

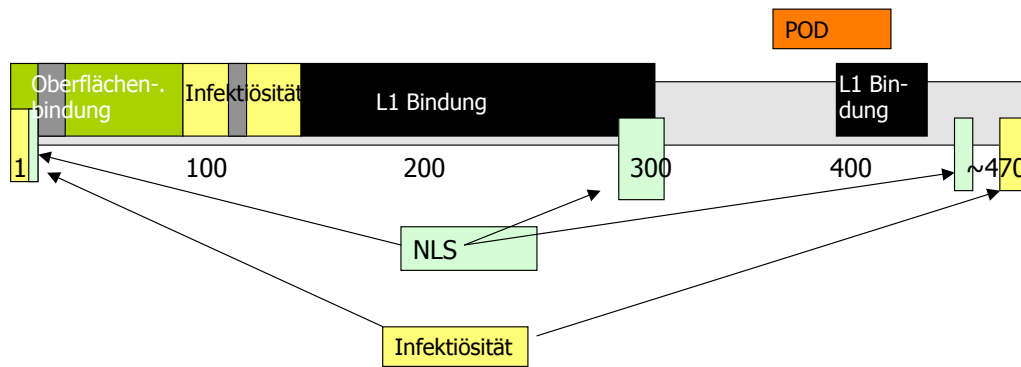


Abbildung 1.4: **Schematische Darstellung der Domänen des Papillomvirusproteins L2.** Graphische Zusammenstellung einiger Domänen von L2 aus verschiedenen wissenschaftlichen Artikeln.

Daten essentiell. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die POD-Lokalisation von L2 einerseits konzentrationsabhängig ist, andererseits von bis jetzt nicht charakterisierten weiteren zellulären Faktoren abhängig zu sein scheint (Kieback & Müller, 2006). Weiterhin konnte durch Studien belegt werden, dass L2 unabhängig von Disulfid-Brücken die Bildung von kleineren Kapsid-ähnlichen Partikeln aus Kapsomeren unterstützt. Dies lässt vermuten, dass L2 an der Formierung von Virionen insofern beteiligt ist, als dass es durch Bindung die Verknüpfung der viralen DNA sowie den Kapsomeren fördert, bevor es unter Bildung von Disulfid-Brücken durch Verknüpfung der Kapsomere zur Entstehung der finalen Kapsidstruktur kommt (Ishii *et al.*, 2005).

Abbildung 1.4 gibt einen Auszug über bereits identifizierte Domänen innerhalb der L2-Sequenz unterschiedlicher HPV-Typen.

1.2 L2-interagierende Proteine

Im Folgenden werden zwei weitere mit L2 interagierende Proteine detailliert dargestellt, die im Zentrum der hier vorliegenden Arbeit stehen. Diese Proteine wurden im Zuge einer früheren Arbeit mittels eines *Yeast Two-Hybrid Screenings* als Interaktionspartner von HPV L2 identifiziert und PLINP und PMSP genannt. Da bis zum damalig herrschenden Kenntnisstand noch sehr wenig über die Funktion von L2 vor allem innerhalb der Wirtszelle bekannt war, sollten Interaktionspartner dieses viralen Proteins gefunden werden. Hier wurde nicht der Anspruch auf Vollständigkeit der Interaktionspartner erhoben, sondern vielmehr ein Fokus darauf gelegt, stark konservierte Interaktionen aufzuzeigen. Deshalb wurde das *Screening* nicht nur mit dem Nebenkapsidprotein eines, sondern dem von drei HPV-Typen durchgeführt. Die verwendeten humanen Papillomvirus-Typen HPV1, HPV11 und HPV16 weisen von ihren Charakteristiken her Divergenzen auf, so dass mögliche Interaktoren an Schlüsselpunkten im Lebenszyklus des Virus eine Rolle spielen.

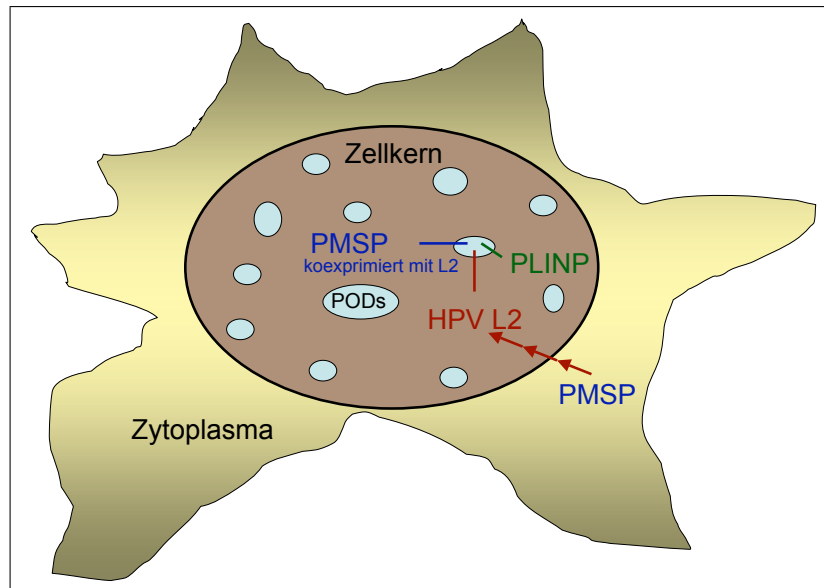


Abbildung 1.5: **Schematische Darstellung der Interaktion des Papillomvirusproteins L2 mit PLINP und PMSP in der Zelle.** Das in PODs lokalisierte PLINP interagiert in diesen distinkten Domänen des Zellkerns mit dem Nebenstrukturprotein L2, wenn dieses koexprimiert wird. Das zytoplasmatisch lokalisierte PMSP dagegen wird von koexprimiertem L2 direkt oder indirekt in diese Strukturen rekrutiert.

Abbildung 1.5 gibt einen schematischen Überblick über die Interaktion von HPV L2 mit PLINP und PMSP in der Zelle, die im Folgenden noch genauer erläutert wird.

1.2.1 PLINP

PLINP (*Papillomavirus L2 Interacting Nuclear Protein*), welches in der Literatur auch unter dem Synonym CRIF1 (*CR6-Interacting Factor 1*) charakterisiert wurde, ist ein ca. 28 kDa großes, aus 222 Aminosäuren bestehendes Protein, welches in der Zelle in geringem Maß, jedoch ubiquitär exprimiert wird (EMBL-Datenbank: NM_052850). Es wurde gezeigt, dass verschiedene tumoröse Gewebe PLINP über- beziehungsweise unter-exprimieren, was auf eine Rolle von PLINP bei bestimmten tumorspezifischen Prozessen hindeutet (Chung *et al.*, 2003). Die DNA-Sequenz von PLINP ist gut konserviert. Beispielsweise beträgt die Homologie zwischen PLINP von Mensch und grüner Meerkatze 92% und die von Mensch und Ratte 61%. Das Gen von PLINP ist auf Chromosom 19 im Bereich p13.2 angesiedelt und weist zwei Exone auf. Computeranalysen der Struktur von PLINP ergeben bis auf ein mögliches zweiteiliges Kern-Lokalisationssignal und ein sich darin befindliches SUMO-Interaktionsmotiv keinerlei weitere Motive. Eine Sekundärstrukturanalyse ergab helikale Bereiche zwischen den Aminosäuren 80 - 215 sowie im Bereich um die Aminosäure 60. Das Protein befindet sich in der Zelle in PODs, in denen es mit L2 des HPV interagiert (Gornemann *et al.*, 2002). Die Abbildung 1.6 zeigt die Expression von PLINP-EGFP in der Zelle auch unter Einfluss von koexprimiertem codon-optimierten HPV16 L2.

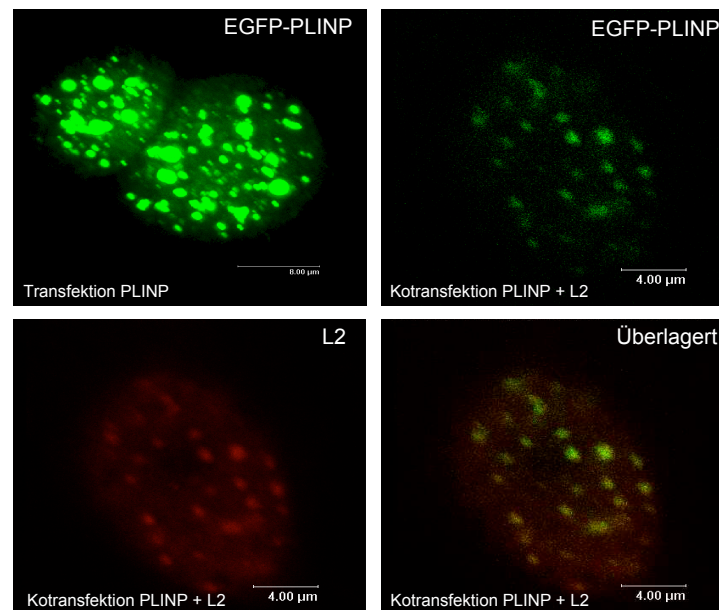


Abbildung 1.6: **EGFP-PLINP und codon-optimiertes HPV16 L2 kolokalisieren in PODs.** EGFP-PLINP wurde in 293T-Zellen sowohl einzeln als auch in Verbindung mit codon-optimiertem HPV16 L2 exprimiert und die subzelluläre Lokalisation analysiert. EGFP-PLINP interagiert mit HPV16 L2 in distinkten subnukleären Strukturen, sogenannten PODs. Auch ohne Koexpression von L2 assoziiert EGFP-PLINP an diese Strukturen.

Eine Mutation der vermeintlichen NLS ergab keine signifikanten Veränderungen in der Lokalisation. Daher wird angenommen, dass ein anderes NLS existiert oder die Lokalisation von PLINP durch einen Träger wie SUMO verursacht wird. Auch das Anfügen eines Kern-Export-Signals bewirkte eine nur partielle Veränderung bezüglich der POD-Lokalisation Richtung Zytoplasma und eine daherrührende Lokalisierungsveränderung von L2. Eine Deletionsmutanten-Analyse ergab weitere PLINP-Domänen wie etwa den L2-Interaktionsbereich bei Aminosäure 163 bis 222. Andere Studien von PLINP zeigten, dass das Protein für die Zelle eine Funktion als Zellzyklusregulator über die Interaktion mit GADD45, einem in den Mechanismus der Apoptose involviertem Protein, besitzt (Chung *et al.*, 2003). Außerdem besitzt PLINP einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der Histon H1 Kinasen Cdc2-cyclin B1 und Cdk2-Cyclin E und wirkt dabei additiv zu Gadd45. Eine Überexpression von PLINP führt zu einer Erhöhung des Prozentsatzes von Zellen in der G1-Phase und einer Reduktion in der S-Phase. Eine Herabsetzung des endogenen PLINP-Levels in der Zelle führt zum gegenteiligen Effekt. Zusätzlich wurde eine Inaktivierung von Rb durch Phosphorylierung festgestellt. So wird vermutet, dass PLINP eine Rolle in der negativen Regulation des Zellzyklus und des Wachstums spielt (Chung *et al.*, 2003). PLINP interagiert ebenfalls mit dem Orphan nukleären Rezeptor Nur77, indem es seine Transaktivierung durch die Nur77 AB-Domäne inhibiert. Inhibiert wird ebenfalls die Nur77-abhängige Induktion der E2F1-Promotoraktivität und der mRNA-Expression sowie die Nur77 vermittelte G1/S Zellzyklus-Fortsetzung (Park *et al.*

, 2005). Dies bestätigt die bereits diskutierte Rolle von PLINP als negativer Regulator.

1.2.2 PMSP

PMSP (*Papillomavirus Minor Structural Protein Interacting Protein*; EMBL-Datenbank: AJ437509) ist ein 183 bp langes Protein, welches für ein 61 Aminosäuren langes Protein kodiert. Eine Computeranalyse zeigt keinerlei Motive oder Domänen innerhalb des Sequenzbereichs. PMSP ist als EGFP-Fusionsprotein im Zytoplasma lokalisiert.

Es wurde gezeigt, dass PMSP mit L2 der HPV-Typen 1, 11 und 16 interagieren kann. Bei Koexpression des EGFP-Fusionsproteins mit L2 ergibt sich allerdings eine Veränderung der Lokalisation zu den PODs hin und es findet sich eine Kolo­kalisierung zwischen L2 und PMSP (Gornemann *et al.*, 2002). Die Abbildung 1.7 gibt einen Überblick über die Analyse der subzellulären Lokalisation mit und ohne Anwesenheit von koexprimiertem codon-optimiertem HPV16 L2. Die Rolle von PMSP in der Zelle und seine Bedeutung für den viralen Lebenszyklus ist noch völlig unbekannt.

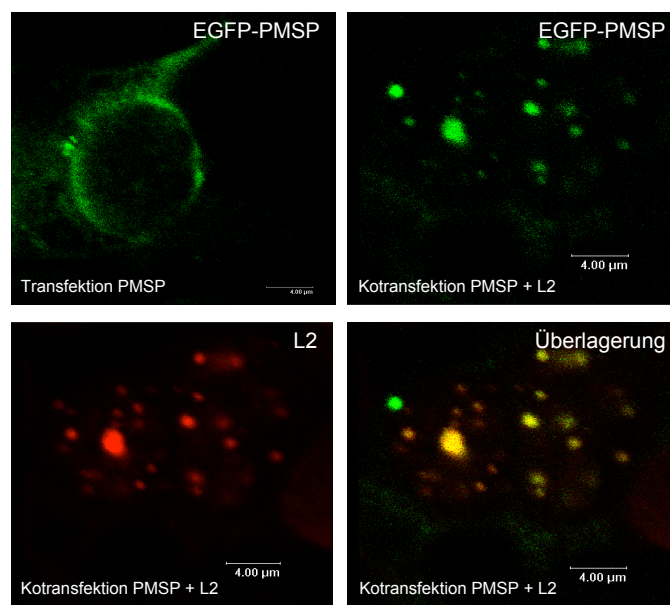


Abbildung 1.7: **Zytoplasmatisch lokalisiertes EGFP-PMSP wird durch eine Koexpression von codon-optimiertem HPV16 L2 in PODs rekrutiert.** EGFP-PMSP wurde in 293T-Zellen sowohl einzeln als auch in Verbindung mit codon-optimiertem HPV16 L2 exprimiert und die subzelluläre Lokalisation analysiert. Durch Koexpression mit HPV16 L2 ändert sich die zuvor zytoplasmatische Lokalisation von exprimiertem EGFP-PMSP drastisch zu einer hauptsächlich POD-Lokalisation.

1.3 Der Zellkern und seine Strukturen

Ein Durchbruch der Zellbiologie war im Jahre 1831 die Entdeckung des Kerns der Zelle durch den englischen Botaniker Robert Brown. Bis heute ist eine immer größer werdende Komplexität dieser Struktur aufgedeckt worden. Bisher identifizierte Kompartimente

des Kerns sind die bereits erwähnten PODs, die Nukleoli, die Cajal-Körperchen sowie die Spleißfaktor-Kompartimente. Zwischen diesen Strukturen und dem Kern sowie dem außen liegenden Zytoplasma herrscht ein dynamischer Austausch. Da die PODs in dieser Arbeit eine zentrale Rolle spielen, soll auf diese Kompartimente folgend detaillierter eingegangen werden.

1.3.1 Die PODs

PODs sind distinkte subnukleäre Domänen, die eine zellzyklusabhängige Größe von 0,3 - 0,5 μm im Durchmesser aufweisen. Die Zahl an PODs ist abhängig vom Zelltyp und Zellzyklus (Koken *et al.*, 1995). Die erste Identifizierung der PODs, die auch unter den Namen ND10 (*nuclear domain 10*), PML-Körperchen oder KB-Körper (Kremer-Körper) in der Literatur zu finden sind, erfolgte bei Patienten mit primärer Gallen zirrhose, in der diese Domänen Ziele von Auto-Antigenen darstellen (Szostecki *et al.*, 1990). Viele Proteine wurden als mit PODs assoziiert beschrieben, darunter PML (Koken *et al.*, 1995), Sp100 (Szostecki *et al.*, 1990), Daxx (Ishov *et al.*, 1999), SUMO-1, der Tumorsuppressor pRB und AP-1. Die im folgenden Abschnitt diskutierten POD-assoziierten Proteine stellen nur einen Bruchteil der Komplexität dieser subnukleären Strukturen dar. PODs spielen eine Rolle in vielen essentiellen Abläufen in der Zelle, darunter der Transkriptionsregulation (LaMorte *et al.*, 1998), der Apoptose (Wang *et al.*, 1998), (Zhong *et al.*, 2000), der Zellzykluskontrolle, dem Differenzierungsstatus (Ruggero *et al.*, 2000) und der Interferon-abhängigen Virusabwehr (Stadler *et al.*, 1995). Allerdings ist neben der antiviralen Funktion auch eine Assoziation mit viralen Proteinen zur Transkription und Replikation des viralen Genoms beschrieben, auf die in einem späteren Abschnitt detaillierter eingegangen wird (siehe 1.3.2). Neben all diesen bisher genannten Funktionen wird auch die Ansammlung von Proteinen als Deponie für nicht mehr benötigte oder überexprimierte Proteine in der Literatur beschrieben. Daneben werden PODs als Zentren für posttranskriptionale Modifikationen wie der SUMOylierung, Phosphorylierung oder Azetylierung beschrieben. Das promyelozytische Leukämie-Protein PML, welches die Hauptstrukturkomponente der PODs bildet (Ishov *et al.*, 1999), wurde bei Patienten mit akuter promyelozytischer Leukämie (APL) identifiziert. Es wurde in stabilen Zelllinien, welche von Leukämiezellen der Patienten stammten, als Fusionsprotein mit dem Retinsäure-Rezeptor (RAR) charakterisiert (Kakizuka *et al.*, 1991). PML ist ein Phosphoprotein und liegt in der Zelle als Genprodukt verschiedener Spleißvarianten vor. PML wird neben anderen Proteinen durch SUMO-1 (*Small Ubiquitin-related Modifier*) an spezifischen Lysin-Resten modifiziert. Forschungen deuten darauf hin, dass der Grad an SUMOylierung von PML sowie vermutlich der Phosphorylierungsstatus für den Aufbau der PODs entscheidend ist. Es wird angenommen, dass der Aufbau durch eine Mul-

timerisierung der PML-Ringdomänen geschieht (Borden *et al.* , 1997). In Zellen, die das PML-Protein nicht haben (PML-*knockout*-Zellen) oder Zellen, die von den APL-Patienten stammen, existieren keine PODs. Die normalerweise dort angesiedelten Proteine weisen dann eine alternative Lokalisation in der Zelle auf. PML-*knockout*-Mäuse sind lebensfähig und weisen eine weitestgehend normale Entwicklung auf; allerdings sind sie anfälliger für Infektionen und Tumorbildung. Eine Aufgabe von PML in Zellen kommt der antiviralen Abwehr zu, da die Expression des Proteins unter Interferon-Induktion stark erhöht wird (Sternsdorf *et al.* , 1997b).

Daxx, ein weiteres POD-lokalisiertes Protein, interagiert direkt mit PML. Daxx wurde im Jahre 1997 als Protein identifiziert, welches mit der „*death domain*“ des Fas-Rezeptors assoziiert (Yang *et al.* , 1997). Die exakte Rolle von Daxx in der Apoptose ist jedoch weiterhin unklar. Mit Daxx interagierende Proteine sind das bereits beschriebene PML, welches während dieser Interaktion SUMO-modifiziert vorliegt, sowie Pax3 und ETS-1. Der Transkriptionsfaktor Pax3 wird durch dessen Interaktion mit Daxx inhibiert (Hollenbach *et al.* , 1999). Den gleichen Effekt hat Daxx auf die ETS-1 vermittelte Transkription. Die Wirkung von Daxx als transkriptionaler Inhibitor wird durch die Lokalisation von Daxx durch das In- beziehungsweise Ausschleusen aus den PODs reguliert. Diese Regulation wiederum erfolgt durch den Phosphorylierungsstatus des Proteins. Neben den zuvor beschriebenen Funktionen von Daxx finden sich diverse, teils widersprüchliche Untersuchungen bezüglich seiner Funktion. In B-Lymphozyten wurden zum Beispiel nicht nur koinhibitorische sondern auch koaktivierende Funktionen gezeigt (Emelyanov *et al.* , 2002). Eine Adapteraktivität von Daxx zu Proteinen, die nicht direkt mit PML interagieren, aber in PODs lokalisiert sind, wird diskutiert. Hier ist zum Beispiel pp71 zu nennen, das Tegumentprotein des humanen Cytomegalovirus.

1.3.2 PODs sind virale Replikations- und Translationsorte

Die erste identifizierte Assoziation von Viren mit PODs beruhte auf Studien mit HSV-1 (Maul *et al.* , 1993), in der eine Lokalisation des *immediate early* Proteins ICP0 in den PODs eine dynamische Verteilungsänderung von PML und SP100 sowie weiteren POD assoziierten Proteinen induziert (Everett & Murray, 2005). Es wurden bis heute zwei verschiedene Mechanismen der Interaktion mit PODs beobachtet. Zum einen ist dies die völlige Auflösung der PODs durch Viren wie etwa HCMV, Epstein-Barr- und Adenoviren (Adamson & Kenney, 2001), (Ishov & Maul, 1996). Zum anderen sieht man eine Umstrukturierung der Domänen durch virale Proteine der SV40 und Papillomviren (Tang *et al.* , 2000), (Florin *et al.* , 2002). Es werden in der Literatur zwei verschiedene Schlussfolgerungen bezüglich der viralen POD-Assoziation diskutiert.

Es ist möglich, dass die zellulären Faktoren die Replikation des viralen Genoms un-

terstützen oder aber reprimieren. Für die zweite Möglichkeit spricht die Interferon-Reaktion oder Untersuchungen an RNA-Viren wie Influenza, die zeigen, dass die Überexpression einer PML-Form, dem PML III, zu einer Verhinderung der Infektion führt.

1.4 Modifikation von Proteinen

Die eukaryotische Zelle ist in der Lage, die Expression von Proteinen zu regulieren. Dabei existieren Mechanismen auf verschiedenen Ebenen der Genexpression. Auf RNA-Ebene kann der Einfluss beispielsweise durch RNA-Interferenz, inhibitorische Regulatorsequenzen, RNA-Instabilität oder Transkriptionsfaktoren geschehen. Später nach der Translation ist eine Modifikation der Proteine ebenfalls möglich, so dass die Menge aktiven Proteins in der Zelle reduziert werden kann. So führt zum Beispiel eine Modifikation durch Ubiquitin zum proteolytischen Abbau des Proteins. Aber auch Eigenschaften oder Lokalisationen in der Zelle sind durch posttranslationale Beeinflussung veränderbar. Hier soll besonders auf die Modifikation durch SUMOylierung hingewiesen werden. Eine solche Modifikation kann zur Veränderung der Aktivität des Proteins, dessen Interaktionen zu Bindungspartnern und seine Lokalisation beeinflussen. Einige dieser Modifikationen sollen hier im Folgenden detaillierter beschrieben werden, da sie für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung sind.

1.4.1 SUMOylierung als posttranslationale Modifikation von Proteinen

Die SUMOylierung ist eine der wichtigsten die PODs betreffende Modifikation von Proteinen. SUMO (*Small Ubiquitin-related Modifier*) wurde ursprünglich 1996 als Modifikator von RanGAP1 identifiziert (Matunis *et al.*, 1996). SUMO und Ubiquitin haben eine Sequenzhomologie von nur 18%, weisen aber eine sehr ähnliche Tertiärstruktur auf. Beide Proteine besitzen ein C-terminales Glycin-Glycin-Motiv, über die die Kopplung an das -NH₂-Lysin des Zielproteins erfolgt. Im Gegensatz zu Ubiquitin ist SUMO negativ geladen und zu einer Mehrfach-Modifikation nicht in der Lage. Außerdem führt eine SUMOylierung von Proteinen nicht zur Degradation über das Proteasom. Das Protein, welches in vier Isoformen vorliegt, besitzt eine Größe von 101 Aminosäuren (SUMO-1) und spielt eine Rolle in der Aktivität, der subzellulären Lokalisation und der Stabilität von Proteinen sowie bei Protein-Protein-Interaktionen (Fu *et al.*, 2005). Es findet sich in allen Eukaryonten und ist hoch konserviert. Das zunächst als inaktiver Vorläufer synthetisierte SUMO wird zunächst durch spezifische Proteasen (ULPs) prozessiert, so dass das Doppel-Glycin-Motiv an der Oberfläche exponiert wird. Anschließend bildet das „SUMO-spezifische aktivierende Enzym“ E1 mit Hilfe von ATP einen Thioester zwischen SUMO und E1. Danach bedingt das „SUMO-spezifische konjugierende Enzym

E2“ (Ubc9) eine Transesterifizierung. Zuletzt bewirkt ein SUMO-Ligase-Komplex eine Interaktion von Ubc9 mit dem Zielprotein, die zu der SUMOylierung über das Lysin führt. Es sind virale Proteine, wie die von HCMV und Epstein-Barr-Virus bekannt, die SUMOyliert werden (Hofmann *et al.*, 2000), (Adamson & Kenney, 2001).

1.5 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz ist ein sehr bedeutender Mechanismus der eukaryotischen Zelle, der der Wissenschaft erst seit kurzer Zeit bekannt ist. Untersuchungen an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* zeigten auch die experimentelle Nutzung der genetischen Interferenz durch doppelsträngige RNA (Fire *et al.*, 1998). Dieser Mechanismus beruht auf der posttranskriptionalen Hemmung einer Ziel-mRNA durch kurze 21nt lange spezifische Oligonukleotide und dient zur Genregulation aber auch als Schutz vor mobilen genetischen Elementen wie beispielsweise Viren oder Transposons. RNA-Interferenz kann durch sogenannte siRNA oder miRNA erfolgen, wobei siRNA durch freie dsRNA entsteht, miRNA von zelleigenen Genen transkribiert und prozessiert wird. Man vermutet heute, dass miRNAs einen großen Prozentsatz der menschlichen Gene regulieren und in die Entstehung vieler Arten von Krebs involviert sind (Zhang *et al.*, 2006). Die Prozessierung der siRNA wie auch die der miRNA erfolgt aus größeren Vorläuferproteinen. Das Protein Dicer, eine Typ III-Ribonuklease, erkennt mit Hilfe weiterer involvierter Proteine spezifisch doppelsträngige RNA im Falle der siRNA beziehungsweise kurze Hairpin-Strukturen im Falle der miRNA und schneidet diese auf eine Länge von 21 Nukleotiden (Bernstein *et al.*, 2001). Nach Entwindung der dsRNA wird diese in einen Komplex, den sogenannten RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) eingelegt und unter Mithilfe weiterer Proteine zur fertigen siRNA oder miRNA prozessiert (Martinez & Tuschl, 2004). Neben Dicer finden sich jedoch je nach Organismus noch weitere verwandte Proteine.

Studien konnten zeigen, dass auch virale Genome für miRNAs kodieren. So konnte die Expression verschiedenener miRNAs, welche im Genom des Epstein-Barr Virus kodiert sind, in infizierten Zellen gefunden werden. Virale Regulatoren für die Expression von viralen Proteinen oder Wirtszellproteinen konnten identifiziert werden (Pfeffer *et al.*, 2004). RNA-Interferenz kann als molekularbiologische Technik genutzt werden (Tuschl *et al.*, 1999) (Elbashir *et al.*, 2001). So ist es möglich, siRNA oder miRNA in Zellen zu transfizieren und dadurch spezifisch die Expression von Proteinen zu hemmen (McManus *et al.*, 2002). Dies kann über direkte Transfektion der siRNA/ miRNA oder Vektoren, welche Polymerase III-Promotoren enthalten und für die spezifischen Oligonukleotide kodieren, geschehen.

1.6 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit soll detailliertere Einblicke in die Funktion von PLINP und PMSP als Interaktionspartner von HPV L2 geben. Hierbei wird der Fokus sowohl auf die Funktion der Proteine in der Zelle als auch auf die Rolle dieser Proteine im Replikationszyklus des humanen Papillomvirus gesetzt. Die Analyse der Funktion von PLINP in der eukaryotischen Zelle erfolgte über die Identifikation von Interaktionspartnern mittels *Yeast Two-Hybrid* Analyse und deren Folgeexperimente. Weiterhin erfolgte eine Charakterisierung von Interaktionen zu anderen POD-assoziierten Proteinen, eine RNA-Interferenz von PLINP, die Charakterisierung von posttranskriptionaler Modifikation und eine Analyse von Pseudovirionen. Aufgrund von Zeitbeschränkungen dieser Arbeit war es nicht möglich, PMSP auf ebenso detaillierte Weise zu charakterisieren. Die Analyse von PMSP erfolgte über die Identifikation von zellulären Interaktionspartnern und die Untersuchung der Infektiosität von Pseudovirionen.

2 Material und Methoden

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	...	Aqua bidestilla
ABTS	...	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-Sulfonsäure)
AD	...	Aktivierungsdomäne
A. dest.	...	Aqua destilla
Amp	...	Ampicillin
APS	...	Ammoniumpersulfat
3-AT	...	3-Aminotriazol
BBS	...	<i>BES buffered saline</i> = BES gepufferte Salzlösung
BD	...	DNA-Bindedomäne
BES	...	N,N-bis[2-Hydroxyethyl]2-aminoethansulfonsäure
bp	...	Basenpaare
BPV	...	Bovines Papillomvirus
BSA	...	<i>bovine serum albumine</i> = Rinderserumalbumin
cDNA	...	<i>copy desoxyribonucleic acid</i> = komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIAP	...	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> = alkalische Phosphatase aus Kälbermagen
CIN	...	<i>cervical intraepithelial neoplasia</i>
Cy3	...	Indocarbocyanin
DAPI	...	4',6'-diamino-2-phenyl-indoldihydrochlorid
DEPC	...	Diethylpyrocarbonat
DKFZ	...	Deutsches Krebsforschungszentrum (Heidelberg)
DMEM	...	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	...	N,N-Dimethylformamid
DMSO	...	Dimethylsulfoxid
DNA	...	<i>desoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure

DNase	...	Desoxyribonuklease
dNTPs	...	Desoxynukleosidtriphosphate
ddNTP	...	Didesoxynukleosidtriphosphate
dsDNA	...	<i>double-stranded desoxyribonucleic acid</i> = doppelsträngige DNA
DTT	...	Dithiothreitol
EA-D	...	<i>enhanced chemiluminescence</i> = verbesserte Chemilumineszenz
<i>E. coli</i>	...	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	...	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	...	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	...	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	...	Fetales Kälberserum
FITC	...	Fluoresceinisothiocyanat
g	...	Erdbeschleunigung
GAMPO	...	Ziege anti-Maus Peroxidase-gekoppelter Antikörper
GAPDH	...	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GARPO	...	Ziege anti-Kaninchen Peroxidase-gekoppelter Antikörper
GFP	...	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	...	Stunde
HSV-1	...	Herpes simplex Virus 1
HIS	...	Histidin
HPV	...	Humanes Papillomvirus
HRP	...	<i>horse radish peroxidase</i> = Meerrettich-Peroxidase
Ig	...	Immunoglobulin
IPTG	...	Isopropylthiogalaktosid
Kan	...	Kanamycin
kb	...	Kilo-Basenpaar
kDa	...	Kilo-Dalton
KLH	...	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
LB	...	Luria Bertani

Leu	...	Leucin
min	...	Minute
MOI	...	<i>multiplicity of infection</i>
miRNA	...	microRNA
mRNA	...	<i>messenger RNA</i>
n	...	Stichprobengröße
ND10	...	nukläre Domäne 10
NLS	...	<i>nuclear localization signal</i> = Kernlokalisierungssignal
OD	...	Optische Dichte
o-NPG	...	ortho-Nitrophenylgalaktosid
ORF	...	<i>open reading frame</i> = offener Leserahmen
ori	...	<i>origin of replication</i> = Replikationsursprung
P	...	Promotor
PAA	...	Polyacrylamid
PAGE	...	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	...	<i>phosphate buffered saline</i> = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	...	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
PEG	...	Polyethylenglykol
PFA	...	Paraformaldehyd
PLINP	...	<i>papillomavirus L2 interacting nuclear protein</i>
PML	...	<i>promyelotic leukemia protein</i>
PMSF	...	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PMSP	...	<i>papillomavirus minor structural protein interacting protein</i>
POD	...	<i>PML oncogenic domain</i>
PV	...	Papillomvirus
<i>Pwo</i>	...	<i>Pyrococcus woesei</i>
RISC	...	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	...	<i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
RNase	...	Ribonuklease
rpm	...	<i>rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RT	...	Raumtemperatur
S. cerevisiae	...	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

SD	...	<i>synthetic dropout medium</i> = SD-Minimalmedium
SD-HALT	...	SD-Minimalmedium ohne Histidin, Adenin, Leucin, Tryptophan
SD-HLT	...	SD-Minimalmedium ohne Histidin, Leucin, Tryptophan
SD-HT	...	SD-Minimalmedium ohne Histidin, Tryptophan
SD-LT	...	SD-Minimalmedium ohne Leucin, Tryptophan
SDS	...	Natriumdodecylsulfat
SEAP	...	Sekretierte alkalische Phosphatase
sec	...	Sekunde
siRNA	...	<i>small interfering RNA</i>
SUMO	...	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
TAE ... Tris-Acetat-EDTA-Puffer		
<i>Taq</i>	...	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	...	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	...	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGS	...	Tris-Glycin-SDS-Puffer
Tris	...	Trishydroxymethylaminoethan
Trp	...	Tryptophan
U ... <i>unit</i> = Einheit der Enzymaktivität		
üN	...	über Nacht
UpM	...	Umdrehungen pro Minute
URR	...	<i>upstream regulatory region</i>
UV	...	ultraviolett
VE-Wasser ... voll entmineralisiertes Wasser		
v/v	...	Volumenprozent
wt ... Wildtyp		
w/v	...	Gewichtsprozent bezogen auf das Volumen
X-α-Gal ... 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- α -D-Galaktosid		
X-Gal	...	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
YPDA ... <i>yeast-peptone-dextrose-adenine</i> = Hefe-Pepton-Dextrose-Adenin-Medium		

2.1 Material

2.1.1 Biologische Materialien

2.1.1.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> (<i>r</i> κ ⁻ <i>m</i> κ ⁺) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> <i>deoR</i>
<i>E. coli</i> TG1	K12, Δ (<i>lac-pro</i>) <i>supE</i> <i>thi</i> <i>hsd</i> Δ 5/F' <i>tra</i> Δ 36 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ M15

2.1.1.2 Zelllinien

Zelllinie	Charakteristika
293T	Adenovirus 5 (E1 A/B)-transformierte humane embryonale Nierenzellen mit stabiler Expression des zusätzlich eingeführten SV40 T-Antigens
293TT	293T-Zellen mit stabil transfiziertem Plasmid mit zweitem SV40 T-Antigen
Daxx ^{-/-}	Maus-Fibroblasten mit Daxx- <i>knockout</i> (Ishov <i>et al.</i> , 2004)
HeLa	humane Adenokarzinomzellen aus der Zervix mit integrierter HPV18 DNA; leicht transfizierbare Variante
HeLa-PML ⁺⁺	HeLa-Zellen mit stabiler <i>tet-off</i> induzierbarer Expressionskassette (Sternsdorf <i>et al.</i> , 1997a)
911	Adenovirus 5-transformierte humane embryonale Retinoblasten (Fallaux <i>et al.</i> , 1996)
NIH3T3	Fibroblasten aus der Maus
PML ^{-/-}	SV40 T-Antigen transformierte Maus-Fibroblasten mit PML <i>knockout</i>
Vero2-2	Nierenzellen der grünen afrikanischen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)

2.1.2 Molekularbiologische Materialien

2.1.2.1 Plasmide

Plasmid	Quelle
pACT2	Clontech, U29899
pBabe-puro	addgene, (Morgenstern & Land, 1990)
pBlueskript-KS	Stratagene, X52326
pcDNA 3.1	Invitrogen
pGBKT7	Clontech, in progress
pEGFP-C1/-C2/-C3	Clontech, U57607
pUF3	(Zolotukhin & Potter, 1996)
pZome1-C/-N	cellzome

2.1.2.2 Oligonukleotide

2.1.2.2.1 Primer

Alle Primer stammten von der DKFZ-internen Primer-Syntheseabteilung und wurden entsalzt geliefert.

PLINP

PLINP-3: 5' -TTT TGG ATC CAT GGC GGC GTC CGT GCG AAA GGC ACT C- 3'

PLINP-5: 5' -TTT TGG ATC CGG AGC TGG GTG CCC CAG AGG CTG CTG- 3'

Das Primerpaar dient der Amplifikation der vollständigen PLINP-cDNA.

PLINP-RT

RT-PLINP-3: 5' -CCG CAG GCC GGG ACC CCG GT- 3'

RT-PLINP-5: 5' -CTG GGT GCC CCA GAG GCT GCT- 3'

Das Primerpaar dient der Amplifikation eines Fragments von PLINP in der RT-PCR.

Aktin

actin-3: 5' -AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT- 3'

actin-5: 5' -ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG- 3'

Das Primerpaar dient der Amplifikation des humanen Haushaltsgens Aktin.

GAPDH

GAPDH-3: 5' -AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC- 3'

GAPDH-5: 5' -CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT- 3'

Das Primerpaar dient der Amplifikation der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH).

2.1.2.2 siRNA-Oligonukleotide

1-PLINP sense	5'-AAT CGG GTA CCA TTC GCG TTC CCT GTC TC-3'
1-PLINP antisense	5'-AAG AAC GCG AAT GGT ACC CGA CCT GTC TC-3'
2-PLINP sense	5'-AAC ACA ATC ATC TGT GGC ATC CCT GTC TC-3'
2-PLINP antisense	5'-AAG ATG CCA CAG ATG ATT GTG CCT GTC TC-3'
1-PLINPwrong sense	5'-AAT CGT GTA CCA TTC GCG TGC CCT GTC TC-3'
1-PLINPwrong antisense	5'-AAG CAC GCG AAT GGT ACA CGA CCT GTC TC-3'
siGAPDH sense	in Ambion-Kit mitgeliefert
siGAPDH antisense	in Ambion-Kit mitgeliefert

2.1.2.3 Peptid

synthetisches PLINP-Peptid: N-Terminus-AEEQKRREREQHIAEC-C-terminales Amid

2.1.2.4 Antikörper

Primäre Antikörper

Ratte anti-PLINP monoklonaler Antikörper OFR1 #57	Labor M. Müller (DKFZ)
Kaninchen anti-PLINP polyklonaler Antikörper	Diana Hops (DKFZ)
Maus anti-L2 monoklonaler Antikörper (#2)	Labor M. Müller (DKFZ)
Kaninchen anti-HPV16 L2 polyklonaler Antikörper (Serum #20)	(Gornemann et al. , 2002)
Maus anti-HPV16 L1, monoklonaler Antikörper (Camvir-1)	(Kulski & Sadleir, 1998)
Maus anti-HPV16 L1, monoklonaler Antikörper (1.3.5.15)	(Muller & Zhou, 1997)
Kaninchen anti-HPV16 L1, polyklonaler Antikörper (#4543)	Labor M. Müller (DKFZ)
Maus anti-c-myc	upstate (Charlottesville, VA, USA)
Maus anti-Aktin, monoklonaler Antikörper	ICN Biomedicals (Aurora, Ohio, USA)
Kaninchen anti-GFP	Santa Cruz (St. Cruz, Kalif., USA)
Anti-Flag, FITC-gekoppelt	Sigma (Deisenhofen)

Sekundäre Antikörper

FITC-konjugierter Kaninchen anti-Maus IgG	Dianova (Hamburg)
FITC-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG	Sigma (Deisenhofen)
FITC-konjugierter Ziege anti-Ratte IgG	Dianova (Hamburg)
Cy3-konjugierter Ziege anti-Maus IgG	Dianova (Hamburg)
Cy3-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG	Dianova (Hamburg)
Cy3-konjugierter Ziege anti-Ratte IgG	Dianova (Hamburg)
Peroxidase-konjugierter Ziege anti-Maus IgG (GAMPO)	Sigma (Deisenhofen)
Peroxidase-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG (GARPO)	Sigma (Deisenhofen)
Peroxidase-konjugierter Ziege anti-Ratte IgG	Sigma (Deisenhofen)
Alexa488-konjugierter Kaninchen anti-Maus IgG	Dianova (Hamburg)
Alexa488-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG	Dianova (Hamburg)
Alexa488-konjugierter Ziege anti-Ratte IgG	Dianova (Hamburg)
Alexa594-konjugierter Kaninchen anti-Maus IgG	Dianova (Hamburg)
Alexa594-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG	Dianova (Hamburg)
Alexa594-konjugierter Ziege anti-Ratte IgG	Dianova (Hamburg)
MitoTracker Red	Cambrex (East Rutherford, NJ, USA)

2.1.2.5 Enzyme

Benzonase (250 U/ μ l)	Sigma (Deisenhofen)
CIAP	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNase I	Roche (Pentzberg)
Katalase	Amersham (Freiburg)
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	Roche (Pentzberg)
Restriktionsendonukleasen und Puffer	New England Biolabs (Schwalbach)
Restriktionsendonukleasen und Puffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase A	Roche (Pentzberg)
T4-DNA-Ligase	Life Technologies (Karlsruhe)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Roche (Pentzberg)
TEV-Protease (AcTEV TM)	Invitrogen (Carlsbad, California, USA)

2.1.2.6 Kits

BD Cytifix/Cytoperm Kit	BD Biosciences (San Diego, USA)
Chemiluminescence Detection Kit for Horseradish Peroxidase	AppliChem (Darmstadt)
E.Z.N.A Plasmid Miniprep-Kit	peqlab (Erlangen)
Calmodulin beads	Stratagene (La Jolla, USA)
IgG Sepharose 6 Fast Flow	Amersham Biosciences (Freiburg)
Imject Maleimide Activated mCKLH Kit	Pierce (Rockford, IL, USA)
Protease-Inhibitor Cocktail, EDTA-frei	Roche (Penzberg)
Reverse Transcription	Fermentas (St.Leon-Rot)
Silencer siRNA Construction Kit	Ambion (Huntington, UK)
SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent	Roche (Penzberg)

2.1.3 Kulturmedien

2.1.3.1 Bakterien

LB-Medium:	Trypton	10 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	10 g
	Aqua bidest.	ad 1 l

Mit NaOH auf pH 7.5 einstellen und autoklavieren.

Für Festmedium werden vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar hinzugefügt.

Selektionszusätze wie Antibiotika werden nach Autoklavieren und Abkühlen der Lösung auf ca. 50°C zugegeben.

Ampicillin 100 µg/ml Lösung Endkonzentration

Kanamycin 50 µg/ml Lösung Endkonzentration

2.1.3.2 Hefen

YPDA-Medium:	Difco-Pepton	20 g
	Hefe-Extrakt	10 g
	Adenin-Hemisulfat 0,2%-ige Lösung	15 ml
	Aqua bidest.	ad 1 l

Auf pH 6.5 einstellen und autoklavieren.

Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 50°C werden 50 ml einer 40%igen sterilen Glukose-lösung (w/v) zu einer Endkonzentration von 2% zugegeben.

Für Festmedium werden vor dem Autoklavieren 2% Agar hinzugefügt.

SD-Medium:	<i>Yeast nitrogen base</i>	6,7 g
	10 x <i>Drop-out</i> -Lösung	100 ml
	Aqua bidest.	ad 1 l
	Auf pH 5.8 einstellen und autoklavieren.	

Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 50°C werden 50 ml einer 40%igen sterilen Glukoselösung (w/v) zu einer Endkonzentration von 2% zugegeben.

Für Festmedium werden vor dem Autoklavieren 2% Agar hinzugefügt.

Drop-out-Lösung:	L-Adeninhemisulfat	200 mg
	L-Arginin	200 mg
	L-Isoleucin	300 mg
	L-Histidin	200 mg
	L-Leucin	1000 mg
	L-Lysin	300 mg
	L-Methionin	200 mg
	L-Phenylalanin	500 mg
	L-Threonin	2000 mg
	L-Tryptophan	200 mg
	L-Tyrosin	300 mg
	L-Uracil	200 mg
	L-Valin	1500 mg
	Aqua bidest.	ad 1 l

Die Lösung wird autoklaviert und ist unter Lagerung bei 4°C bis zu einem Jahr haltbar. Je nach Anforderungen des herzustellenden Minimalmediums wird die Lösung ohne die entsprechenden Aminosäuren hergestellt und für die Herstellung von SD-Medium verwendet.

2.1.3.3 Säugetierzellen

DMEM komplett:	DMEM (Sigma)	500 ml
	FCS	10% (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	2% (v/v)
Kryomedium:	DMEM komplett	40% (v/v)
	FCS	40% (v/v)
	DMSO	20% (v/v)
Sonstige Lösungen:	Trypsin-EDTA	Gibco BRL
	Trypanblau	Fluka

2.1.4 Manipulation von Bakterien

Glukose-Puffer:	Glukose	50 mM
	EDTA	10 mM
	Tris pH 8.0	25 mM
Alkalische Lyse-Lösung:	NaOH	0,2 M
	SDS	1% (w/v)
Calciumchlorid-Puffer:	Calciumchlorid	60 mM
	Glycerin	15% (v/v)
	PIPES pH 7.0	10 mM

2.1.5 Manipulation von Nukleinsäuren

TE-Puffer (1x):	Tris/HCl pH 8.0	10 mM
	EDTA pH 8.0	1 mM
Phenol*:	Phenol	1 Volumenanteil
	Chlorophorm-Isoamylalkohol	1 Volumenanteil
Chloroform-Isoamylalkohol:	Chloroform	24 Volumenanteile
	Isoamylalkohol	1 Volumenanteil

2.1.6 Elektrophorese

2.1.6.1 Nukleinsäure-Gelelektrophorese

Hinweise zur Arbeit mit RNA:

Um Kontamination mit RNasen zu verhindern, werden alle zur Arbeit mit RNA verwendeten Materialien zweifach autoklaviert oder mit 5 %iger SDS-Lösung und anschließend mit zunächst 100%igem Ethanol und dann 70%igem Ethanol gewaschen. Pipettenspitzen sind mit Filtereinsatz und Nukleasefrei zu verwenden. Zudem werden alle zu verwendenden Lösungen mit Nuklease-freiem Wasser (Aqua ad injectibilia, Braun) hergestellt.

TAE-Puffer (1x):	Tris	40 mM
	Essigsäure	40 mM
	EDTA	1 mM

Ladepuffer (6x):	Saccharose	50%
	Bromphenolblau	0,15%
	SDS	0,12%

Fragmentgrößen-Standards:	λ /HindIII-Fragmentgrößen-Standard	NEB
	<i>Gene Ruler</i> 100 bp-Marker	Fermentas

2.1.6.2 Protein-Elektrophorese

TGS-Laufpuffer (10x):	Tris	30,34 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	Aqua bidest.	ad 1 l
	Auf pH 8.3 einstellen und autoklavieren.	

SDS-Polyacrylamidgel 12,5% (für 5 Gele)	Trenngel	Sammelgel
30% Acrylamid	12,5 ml	1 ml
1 M Tris/HCl pH 8.8 für Trenngel, pH 6.8 für Sammelgel	11,25 ml	1,25 ml
Wasser	5,65 ml	7,5 ml
10% SDS	300 μ l	100 μ l
10% APS	300 μ l	100 μ l
TEMED	15 μ l	15 μ l

Protein-Probenpuffer (2x):	Tris/HCl pH 6.8	0,125 M
	Glycerin	20% (v/v)
	SDS	4% (w/v)
	DTT	0,2 M
	Bromphenolblau	0,02% (w/v)
Coomassie-Färbelösung:	Coomassie Brilliant Blue R250	0,1% (w/v)
	Methanol	50% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)

Lösungen für Silberfärbung von Proteinen:

Fixierer	30% Ethanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v) in Wasser	
Konditionierer	0,5% Glutaraldehyd (v/v), 0,1% Natriumthiosulfat (w/v), 30% Ethanol (v/v) in 0,4 M Natriumacetat pH 6.0	
Silberlösung	100 mg Silbernitrat, 25 μ l 37% Formaldehyd in 100 ml Wasser	
Entwickler	2,5% Natriumdicarbonat (w/v), 40 μ l 37% Formaldehyd in 100 ml Wasser	
Stopp-Lösung	50 mM EDTA	

Fragmentgrößen-Standards:

peqGOLD vorgefärbter Protein-Marker von peqlab (Erlangen)

2.1.7 Western Blot-Analyse

EMBL-Puffer (1x):	Tris	48 mM
	Glycin	39 mM
	SDS	0,037% (w/v)
	Methanol	20% (v/v)

Strip-Puffer: Glycin/HCl pH 1.8

Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur auf den Blot gegeben und anschließend dreimal 5 Minuten mit Wasser gewaschen. Danach kann der neue Antikörper auf der gestrippten Membran inkubiert werden.

Ponceau-Färbelösung: Ponceau-S 0,5% (w/v) in 1% Essigsäure

Die Lösung wird für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf den Blot gegeben und anschließend bis zur Entfärbung mit Wasser gewaschen. Danach kann Milch-Blockpuffer auf die geblottete Membran gegeben werden.

Milch-Blockpuffer:	Tween 20	0,05 ml
	Milchpulver	5 g
	PBS	ad 100 ml

2.1.8 ELISA

ELISA-Puffer:	Natriumacetat	100 mM
	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	Aqua bidest.	ad 1 l

Mit Essigsäure auf pH 4.2 einstellen und autoklavieren.

ELISA-Substrat:	ABTS-	0,5 ml
	Stammlösung	
	ELISA-Puffer	9,5 ml
	H ₂ O ₂ 30%	1 μ l

ABTS-Stammlösung: 20mg 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-Sulfonsäure) / ml Wasser

2.1.9 Tandem Affinity Purification (TAP)

TAP Puffer 1:	Tris pH 8.0	10 mM
	NaCl	150 mM

Dem Puffer werden nach dem Autoklavieren noch Protease-Inhibitoren zugegeben.

TAP Puffer 2:	Tris pH 8.0	10 mM
	NaCl	150 mM
	Nonidet P-40	0,1%

TAP Puffer 3:	Tris pH 8.0	10 mM
	NaCl	150 mM
	Nonidet P-40	0,1%
	EDTA	0,5 mM
	DTT	1 mM

TAP Puffer 4:	Tris pH 8.0	10 mM
	NaCl	150 mM
	Magnesiumacetat	1 mM
	Imidazol	1 mM
	CaCl ₂	2 mM
	Nonidet P-40	0,1%
	2-Mercaptoethanol	14,3 mM

TAP Puffer 5:	Tris pH 8.0	10 mM
	NaCl	150 mM
	Magnesiumacetat	1 mM
	Imidazol	1 mM
	CaCl ₂	2 mM
	Nonidet P-40	0,1%
	2-Mercaptoethanol	14,3 mM
	EGTA	2 mM

2.1.10 Manipulation von Hefe

Z-Puffer:	Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O	16,1 g
	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	5,5 g
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,246 g
	KCl	0,75 g
	Wasser	ad 1 l
	Auf pH 7.0 einstellen und autoklavieren.	

Z-Puffer/X-Gal-Lösung:	Z-Puffer	100 ml
	2-Mercaptoethanol	0,27% (v/v)
	X-Gal-Vorratslösung	1,67% (v/v)

Wasch-Puffer:	Tris pH 8.0	100 mM
	EDTA pH 8.0	100 mM

Lyse-Puffer (Plasmidpräparation):	Triton X-100	2% (v/v)
	SDS	1% (w/v)
	NaCl	100 mM
	Tris pH 8.0	10 mM
	EDTA	1 mM

Lyse-Puffer (Proteinextraktion):	Triton X-100	0,1% (v/v)
	Glycerin	20% (w/v)
	MgCl ₂	5 mM
	Tris pH 8.0	100 mM
	EDTA	1 mM

2.1.11 Manipulation von Säugetierzellen

X-Gal-Lösung zur Kontrolle der β -Galaktosidase-Expression:

K3 ($K_3Fe[CN]_6$ 400 mM)	10 μ l
K4 ($K_4Fe[CN]_6$ 400 mM)	10 μ l
MgCl ₂ 1 M	2 μ l
PBS (10x)	100 μ l
Wasser	ad 1 ml
+ X-Gal-Stammlösung	50 μ l (frisch zugeben)

X-Gal-Stammlösung:

5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid 20 mg/ml in N,N-Dimethylformamid

BBS-Puffer:

Na ₂ HPO ₄	750 μ M
NaH ₂ PO ₄	750 μ M
BES	50 mM
NaCl	280 mM
Wasser	ad 1 l
Auf pH 6.95 einstellen und bei -20°C lagern.	

RNA-Isolation: Lösung D:

Guanidinium-Thiocyanat	4 M
Natriumcitrat pH 7.0	25 mM
N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz	0,5%
2-Mercaptoethanol	0,1 M

Die Lösung ist, ohne Zugabe von 2-Mercaptoethanol, bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert etwa drei Monate haltbar. Nach Zugabe von 2-Mercaptoethanol ist die Lösung ca. einen Monat haltbar.

BSA-Blockpuffer:

Tween 20	0,05 ml
BSA	2 g
PBS	ad 100 ml

2.1.12 Extraktion und Aufreinigung von Pseudovirionen/VLPs

Extraktionspuffer VLPs:	HEPES	20 mM
	MgCl ₂	5 mM
	CaCl ₂	5 mM
	NaCl	1 M
	Triton X-100	0,01%
	PMSF	1 mM (frisch zugeben)

Auf pH 7.4 einstellen und bei 4°C lagern.

Sucrose-Lösungen:	Sucrose	5% (w/v) in Extraktionspuffer
	Sucrose	50% (w/v) in Extraktionspuffer

Lösung steril filtrieren und bei 4°C lagern.

Modifiziertes PBS:	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	Na ₂ HPO ₄	8 mM
	MgCl ₂	5,6 mM
	CaCl ₂	1 mM
	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM

2.1.13 Weitere Puffer

PBS (10x):	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O	28,9 g
	NaH ₂ PO ₄	2 g
	Aqua bidest.	ad 1 l

FACS-Puffer:	NaN ₃	0,1 g
	BSA	2 g
	PBS (1x)	ad 100 ml

2.1.14 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammten von folgenden Firmen: AppliChem (Darmstadt), Amersham Pharmacia Biotech (München), Calbiochem, Fluka (Neu-Ulm), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma Aldrich (Deisenhofen) und Roth (Karlsruhe). Die Chemikalien haben, sofern nicht anderweitig angegeben, p.A. Qualität.

2.1.15 Geräte

Agarosegel-Elektrophoresekammer, Horizon 58	Gibco BRL (Eggenstein)
Austropfvorrichtung für Saccharosegradienten	DKFZ (Heidelberg)
Bakterieninkubator Certomat	H Braun Melsungen (Melsungen)
Bakterienschüttler	Orbitech Infors GmbH (Elnsbach)
Elektroporationsgerät <i>E. coli</i> Pulser	BIO RAD (München)
Elektrotransfer Blotapparatur, <i>semi dry</i>	BIO RAD (München)
Elektrophorese <i>Power supply</i>	Gibco BRL (Eggenstein)
Elektrophorese-Ablichtungskamera EASY 429K	Herolab (Wiesloch)
ELISA Auslesegerät Multiskan MS	MS Labsystems (Frankfurt)
Entwicklermaschine für Röntgenfilme AgfaCurix 60	Agfa (München)
FACSSort	Becton Dickinson (Heidelberg)
Fluoreszenzmikroskop Leitz DM RBE	Leica (Heidelberg)
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer (Norwalk, USA)
Inversmikroskop Wilorat S	Helmut Hund (Wetzlar)
Kühl- und Gefrierschränke Bosch	Satorius (Göttingen)
Kühlzentrifuge Sorvall RC5C	DuPont (Bad Nauheim)
Laborwaage MC1	Satorius (Göttingen)
Luminometer	Fluoroskan Ascent FL (Thermo Labsystems)
Magnetrührer RCT <i>basic</i>	Janke und Kunkel (Staufen)
Multikanalpipette, elektrisch <i>PreCision</i>	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Mikrowellengerät	Samsung (Korea)
Mikroliter-Pipetten	Gilson Abimed (Langenfeld)
Peristaltische Pumpe P1	Amersham (München)
Pipettierhilfe <i>Pipetboy</i>	Integra Bioscience (Fernwald)
pH-Meter	Knick (Berlin)
Polyacrylamid-Gelelektrophoresekammer	Höfer (SF, USA)

Reaktionsgefäßrotierer	Stuart Scientific (Redhill, UK)
Röntgenfilmkassetten	Kodak (Stuttgart)
Rotor SW41Ti	Beckman Instruments (Paolo Alto, USA)
Rotoren Vti65, SLA 300, SA 600	DuPont (Bad Nauheim)
Saccharose-Gradientenmischer	DKFZ (Heidelberg)
Schweißgerät	Petra Electric (Burgau)
Steuerung für Gelkamera, ICU1	Herolab (Wiesloch)
Stickstofftank, <i>Chronos Biosave</i>	Messer Griesheim (Griesheim)
Speed Vac concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Rührer mit Heizplatte	IKA Labortechnik (Staufen)
Tempcold und Coolboy Kühlblockaggregate	Thermo-Dux (Weinheim)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Tischkühlzentrifuge 54173	Eppendorf (Hamburg)
Tischschwenkplatte Duomax 1030	Heidolph (Schwabach)
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge Sorvall <i>Discovery 90 SE</i>	DuPont (Bad Nauheim)
Vortexer	Heidolph (Schwabach)
UV Transilluminator, 312 und 366 nm Wellenlänge	Konrad Bede (Wiesloch)
Wasserbad	Grant Instruments (UK)
Zellkultur-Inkubator	Haraeus (Hanau)
Zentrifuge 5415C, 5403	Eppendorf (Hamburg)

2.1.16 Verbrauchsmaterialien und Plastikwaren

6-, 12-, 24-, 48- und 96-Lochplatten	Costar (Corning, USA)
Einfrier- (Cryo-)röhrchen, 2 ml	Roth (Karlsruhe)
Deckgläschen für Objektträger	Roth (Karlsruhe)
Elektroporationsküvetten	PeqLab (Erlangen)
ELISA-Platten, Rundboden	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
ELISA-Platten, Flachboden	Costar (Corning, USA)
Filterpapier, Whatman 3 mm	Schleicher und Schuell (Dassel)
Geltrockenfolie	Promega (Madison, Wisconsin, USA)
Gewebekulturschalen, 6- und 10 cm Ø	Greiner (Frickhausen)
Impfösen	Greiner (Frickhausen)
Kanülen zur Injektion	Terumo (Leuven, Belgien)
Laborhandschuhe	Meditrade (Kiefersfelden)

LIA-Platte, weiss, 96 K F-Form	Greiner (Frickenhausen)
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schuell (Dassel)
Objektträger	Langenbrinck (Emmendingen)
Parafilm M Amer.	National Can (Chicago, USA)
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer (Norwalk, USA)
Pasteurpipetten, Kunststoff	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen für Gilson-Pipetten	Greiner (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße, 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße, 15 und 50 ml	Greiner (Frickenhausen)
Röntgenfilme, Hyperfilm	Amersham (München)
Spritzen zur Injektion	Terumo (Leuven, Belgien)
Sterilfilter, Zelluloseacetat 0,2 μm	Renner (Dannstadt)
Sterile Spitzen für Gilson-Pipetten, gestopft	StarLab (Ahrensburg)
Ultrazentrifugen-Röhrchen (14 x 95 mm, PA)	Beckmann (Palo Alto, USA)
Ultrazentrifugen-Röhrchen (für VTi 65-Rotor)	Beckmann (Palo Alto, USA)
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm ²)	Greiner (Frickenhausen)
Zellschaber, groß	Costar (Corning, USA)
Zentrifugenröhrchen, 50 und 500 ml	Nalgene, Nunc (Wiesbaden)

2.1.17 Software

Acrobat v.6.0 <i>Professional</i>	Adobe (Kalifornien, USA)
Analysis v.3.2	Soft Imaging System GmbH (Münster)
CellQuest v.3.3	Becton Dickinson (Heidelberg)
Clone Manager v.7	<i>Scientific and educational software</i> (State Line, Pennsylvania, USA)
Confocal software v.2.5 Leica	Leica (Heidelberg)
L ^A T _E X v.2 ϵ	LaTeX Project Public License (LPPL)
Medline/PubMed	NIH Software
Microsoft Office 2000	Microsoft Corp. (Redmond, Washington, USA)
Microsoft Windows 2000 und XP	Microsoft Corp. (Redmond, Washington, USA)
Photoshop v.7.0	Adobe (Kalifornien, USA)
T _E XShop v.2.09d	GNU Public License (GPL)
The GIMP v.2.211	GNU Public License (GPL)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Manipulation von Bakterien

2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die in der Arbeit verwendeten *E.coli* Stämme (2.1.1.1) werden bei 37°C Inkubations-temperatur mit LB-Medium kultiviert. Diesem fest oder flüssig zu verwendenden Medium können Selektionszusätze wie Antibiotika oder Induktionszusätze wie IPTG zugeben werden. Flüssige Ansätze werden bei 200 rpm geschüttelt, feste Medien werden nach Zugabe von 1,5% Agar zu Flüssigmedium, anschließendem Autoklavieren und Herstellen von Agarplatten unter einer Schutzhaube liegend inkubiert.

2.2.1.2 Herstellung von Bakterien-Glycerinvorräten

Bei -70°C können Bakterien lange Zeit ohne Schäden gelagert werden. Dazu mischt man 500 μ l Bakteriensuspension einer $OD_{600} > 1$ mit der gleichen Menge sterilem Glycerin gründlich und friert diese Mischung bei -70°C ein. Daraus kann man lange Zeit neue feste oder flüssige Medien animpfen.

2.2.1.3 Präparation von elektrokompetenten Bakterien

Für eine Transformation mittels Elektroporation ist eine Salzfreiheit der Bakteriensuspension notwendig, da eine erhöhte Leitfähigkeit zu einem Kurzschluss und damit zum Tod der Bakterien während der Anlegung des Hochspannungsfeldes führen kann.

20-50 ml LB-Medium werden mit einer *E.coli*-Kultur von einer LB-Agarplatte angeimpft und 16-18 h inkubiert. Mit dieser Kultur werden 0,5 l LB-Medium zu einer OD_{600} von 0,2 - 0,3 angeimpft. Die Kultur wird ca. 4 h bis zur exponentiellen Wachstumsphase mit einer OD_{600} von 0,7 - 0,8 inkubiert und anschließend 15-30 min auf Eis heruntergekühlt. Die Bakterien werden dann nach Überführung in passende Zentrifugationsgefäße 15 min bei 0°C und 5.000 UpM pelletiert. Das Pellet wird folgend zweimal mit je 500 ml und sechs- bis siebenmal mit 100 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Der letzte Waschschritt der Bakterien erfolgt mit 100 ml 10%igem Glycerin in eiskaltem Wasser. Danach wird das Pellet in 1 ml 10%igem Glycerin aufgenommen, in 100 μ l Aliquots aufgeteilt und entweder direkt transformiert oder bei -70°C gelagert.

2.2.1.4 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

40 μ l langsam aufgetauter elektrokompetenter Bakterien werden mit auf Eis gekühlter DNA (1 μ l Miniprep-DNA, 10 ng hochreine DNA oder 1-2 μ l Ligationsansatz) in

einem Reaktionsgefäß gemischt und anschließend zügig in ebenfalls gekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Diese werden dann in die Apparatur eingespannt und bei 2,5 kV elektroporiert. Nach diesem Vorgang wird schnell 1 ml LB ohne Selektionszusätze zupipettiert, die ganze Suspension wieder in das Reaktionsgefäß zurückgegeben und für ca. 1 h bei 37°C geschüttelt. Aliquots der Suspension werden zuletzt auf festem Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.5 Präparation von Calciumchlorid-kompetenten Bakterien

400 ml LB-Medium werden mit 1 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt. Die Kultur wird anschließend auf Eis abgekühlt und bei 5.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird dann in 100 ml CaCl₂-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wird noch zweimal wiederholt. Danach wird das Pellet in 10 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen, direkt zur Transformation verwendet oder bei -70°C als Aliquots eingefroren.

2.2.1.6 Hitzeschock-Transformation Calciumchlorid-kompetenter Bakterien

Eine Alternative zur Transformation mittels Elektroporation kann die Hitzeschocktransformation darstellen, die zwar einfacher durchzuführen ist, jedoch über eine geringere Effizienz verfügt.

Die zur Transformation zu verwendende DNA (5 µl Miniprep-DNA, 10 ng hochreine DNA oder 1-2 µl Ligationsansatz) wird zu einem Gesamtvolumen von 10 µl mit Wasser verdünnt und mit 100 µl kompetenten Bakterien 10-30 min auf Eis gekühlt. Danach wird die Hitzeschock-Transformation bei genau 42°C für exakt 2 min durchgeführt. Folgend werden zu dem Ansatz 1 ml LB gegeben und 30-60 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend kann man Aliquots der Suspension auf Selektionsmedium ausplattieren und über Nacht bei 37°C inkubieren.

2.2.2 Manipulation von DNA

2.2.2.1 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA nach Birnboim-Doly (Miniprep)

1,5 ml Bakterien-Übernachtskultur werden 1 min bei 12.000 g zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µl Glukosepuffer resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl alkalischem Lysepuffer und 4-5maligem Invertieren für 5-10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 150 µl 3M Natriumacetat pH 5.2 zugegeben und nach 4-5maliger Invertierung erneut für 5-10 min inkubiert. Nach Zugabe von 450 µl Phenol* wird 5 min kräftig geschüttelt. Die wässrige Oberphase wird abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß

überführt und mit 450 μ l Isopropanol versetzt. Die Plasmid-DNA wird durch 10 min Inkubation bei -70°C und einer Zentrifugation bei 13.000 UpM und 0°C für 20 min ausgefällt. Das DNA-Pellet wird erst mit 70%igem Ethanol und dann mit absolutem Ethanol gewaschen, danach getrocknet und in 50 μ l TE oder Wasser aufgenommen.

2.2.2.2 Präparation von großen Mengen reiner Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxiprep)

250 ml einer Bakterien-Übernachtskultur werden bei 5.000 UpM 10 min zentrifugiert und das Pellet in 6 ml Glukose-Puffer resuspendiert. Die Suspension wird in SS34-Zentrifugenröhrchen überführt, 50 μ l Lysozym (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Ansatz werden 12 ml Lysepuffer gegeben, vorsichtig 4-5mal invertiert und danach 5-15 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 9 ml 3M Natriumacetat pH 5.2 zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis wird der Ansatz 30 min bei 0°C mit 15.000 UpM zentrifugiert. Der klare Überstand wird in ein 50 ml-Falcongefäß überführt. Nach Zugabe von 20 μ l RNase (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wird der Ansatz 10 min bei 37°C inkubiert, die DNA sodann mit 1 Volumen Isopropanol ausgefällt und folgend bei 0°C und 5.000 UpM 30 min pelletiert. Das vorher getrocknete Präzipitat wird in 4 ml TE gelöst und durch Zugabe von 4 ml 5M Lithiumchlorid-Lösung und einer Inkubation von 30 min auf Eis und einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 0°C und 5.000 UpM von Proteinen befreit. Die im Überstand befindliche DNA wird nach Überführung in ein neues Gefäß zum zweiten Mal durch Zugabe von 2,5 Volumina absolutem Ethanol mit einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis und anschließender Zentrifugation bei 0°C und 5.000 UpM für 20 min ausgefällt. Das DNA-Pellet wird luftgetrocknet und in 3,5 ml TE gelöst. Anschließend werden 4,4 g Cäsiumchlorid zugegeben und vollständig gelöst. Quickseal-Röhrchen werden mit 300 μ l Ethidiumbromid bestückt und die DNA-Cäsiumchloridlösung bis zum Rand eingefüllt. Nach Tarierung werden die Gefäße zugeschweisst und mindestens 16 h bei 48.000 UpM und 20°C zentrifugiert. Die nach der Ultrazentrifugation unter langwelligem UV-Licht erkennbare untere *supercoiled*-Plasmid-DNA-Bande wird mittels einer Spritze abgenommen und in ein Falcongefäß überführt. Das fünffache Volumen TE wird zugegeben und die Lösung anschließend bis zur vollständigen Farblosigkeit ca. 6-9 mal mit Wasser-gesättigtem Butanol ausgeschüttelt. Die DNA wird sodann mit dem 2,5 fachen Volumen absolutem Ethanol ausgefällt und durch 30minütige Zentrifugation bei 5.000 UpM und 0°C präzipitiert. Nach Trocknung des Pellets wird dieses in 1 ml TE aufgenommen und die Konzentration und der Reinheitsgrad gemessen.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels photometrischer Messung

Eine photometrische Messung mittels einer Quarzküvette bei 260 nm Wellenlänge gibt Auskunft über die Konzentration c von Nukleinsäuren. Dazu wird eine Nukleinsäurehaltige Lösung passend verdünnt und die Absorption A in einem Photometer gegenüber einer Referenzlösung desselben Lösungsmittels gemessen. Dabei gilt:

$$c = A_{260\text{nm}} * b[\mu\text{g/ml}] * \text{Verdünnungsfaktor}$$

mit $b = 50$ für dsDNA, $b = 30$ für ssDNA und $b = 40$ für RNA

Eine Messung der Absorption bei 280 nm Wellenlänge gibt Auskunft über die Reinheit von dsDNA, da reine DNA einen Quotienten von $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ von 1,8 bis 1,9 aufweist. Ein niedrigerer Wert zeigt eine Kontamination mit Proteinen, während ein höherer Wert auf in der Lösung befindliche RNA oder Lösungsmittelverunreinigung wie zum Beispiel Phenol hinweist. Bei Verunreinigung der DNA sind zusätzliche Reinigungsschritte notwendig.

2.2.2.4 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Bestimmung der Größe, Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren. Das System beruht auf der Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren durch eine Matrix zur Anode. Die gleichmäßig geladenen Nukleinsäure-Moleküle wandern dabei proportional zu ihrer Größe durch die aus Agarose bestehende Matrix und werden so entsprechend aufgetrennt. Mittels mitlaufender Größenmarker definierter Konzentration kann die Größe und die Konzentration der Nukleinsäurefragmente abgeschätzt werden. Die DNA wird im Gel durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht, da diese Substanz in DNA interkaliert und bei Anregung durch UV-Licht fluoresziert. Dies kann photographisch festgehalten werden. Zur Herstellung eines Agarose-Gels wird je nach gewünschter Trennschärfe und erwarteter Fragmentgröße 0,8 % - 2 % Agarose in TAE-Puffer angesetzt und durch Aufkochen gelöst. Anschließend wird die Menge verdampften Wassers ersetzt, nach Abkühlung auf 50°C 1/10.000 Volumen Ethidiumbromid zugegeben und die Mischung in die Gießkammern eingefüllt. Die Gelelektrophorese erfolgt nach Einsetzen des Gels in die Laufkammer, Füllung mit 1x TAE-Puffer sowie Einfüllung der DNA-Proben in die Taschen je nach Gelgröße bei 80 bis 125 Volt für ca. 1 Stunde.

2.2.2.5 Schneiden von Plasmid-DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von Plasmid-DNA wird in präparative und analytische Ansätze unterteilt. Der präparative Ansatz mit 20-30 μg DNA und 200-300 μl Gesamtvolumen dient zur Gewinnung von ausreichenden definierten Fragmentmengen für eine Klonierung. Der analytische Ansatz hingegen mit 0,2 - 2 μg DNA und einem Gesamtvolumen von 20 μl wird zur Identifizierung und Charakterisierung von Plasmidfragmenten genutzt. Je nach Verdau werden 1 - 5 U/ μg DNA Restriktionsenzym(e) benötigt, sowie 1x passender Reaktionspuffer und gegebenenfalls 1x BSA-Lösung und/oder RNase-Lösung (20 mg/ml). Die Inkubation erfolgt, sofern nicht beim Enzymhersteller anderweitig angegeben, für zwei Stunden beim analytischen Verdau und für mindestens drei Stunden beim präparativen Verdau bei den vom Hersteller angegebenen optimalen Bedingungen. Bei einem gleichzeitigen Verdau mit zwei Restriktionsenzymen werden die jeweiligen Herstellerangaben zum Doppelverdau zu Rate gezogen.

2.2.2.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose

Die Agarosegelelektrophorese dient nicht nur der Identifizierung und Charakterisierung von Nukleinsäurefragmenten, sondern es ist ebenfalls möglich, die DNA-Fragmente aus dieser Matrix zu isolieren und aufzureinigen. Dazu wird die mittels langwelligem UV-Licht (366 nm) identifizierte Bande ausgeschnitten und in ein zu einem Drittel mit silanisierter Glaswolle gefülltem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem kleinen Loch auf der Unterseite überführt. Das Agarosegelstück in dem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wird für 10 min bei -70°C eingefroren und anschließend, nachdem es in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gesteckt wurde, für 10 min bei 0°C und 9.000 UpM zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation im 2 ml-Reaktionsgefäß enthaltene Flüssigkeit enthält die DNA und kann über zwei Phenol*- und einen Chloroform-Isoamylalkohol-Schritt aufgereinigt und anschließend mit Ethanol-Natriumacetat gefällt werden.

2.2.2.7 Phenol*- und Chloroform-Isoamylalkoholextraktion

Die Phenol*- und Chloroform-Isoamylalkoholextraktion dient der Entfernung von Proteinen aus DNA-haltigen Lösungen. Die zu behandelnde Lösung wird, wenn das Volumen zu gering ist, auf mindestens 200 μl mit Wasser aufgefüllt, und mit 350 μl Phenol* versetzt. Die Mischung wird für 5 min durch Vortexen gemischt und anschließend 5 min bei maximaler Geschwindigkeit bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Prozedur kann je nach Aufgabenstellung nochmals wiederholt werden. Darauf wird 350 μl Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 zu der Lösung gegeben, wiederum 5 min durch Vort-

zen gemischt und 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die anschließend erhaltene obere wässrige Phase wird wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann nun durch Ethanol-Natriumacetat gefällt werden.

2.2.2.8 Ethanol-Natriumacetat-Fällung von DNA in wässrigen Lösungen

DNA-haltige Lösungen werden mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5.2 und 2-3 Volumina absolutem Ethanol versetzt und nachdem gut gemischt wurde, für 10 min bei -70°C inkubiert. Anschließend wird die Lösung für 20 min bei 0°C bei 13.000 UpM zentrifugiert. Das aus DNA bestehende Präzipitat wird zuletzt noch mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.2.9 Dephosphorylierung von Vektor-Fragmenten

Bei einer Dephosphorylierung von Vektor-Fragmenten zur Verminderung einer Religation in einer folgenden Ligationsreaktion werden Phosphatreste an den Schnittstellen entfernt. Für diese Reaktion wird dem Ansatz direkt nach der Restriktion 1 μl CIAP zugesetzt. Bei einem 5'-überhängendem Ende inkubiert man 30 min bei 37°C , bei 3'-überhängenden Enden oder glatten Enden zusätzlich noch 15 min bei 56°C . Anschließend muss die Lösung durch Phenol*- und Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion von den Restriktionsenzymen und der Phosphatase befreit werden, um einer Modifikation der Insert-DNA vorzubeugen. Zuletzt wird die DNA ausgefällt und in TE oder Wasser aufgenommen.

2.2.2.10 Ligation

Bei einer Ligation werden DNA-Fragmente an ihren komplementären Enden durch das Enzym Ligase verbunden. So kann ein Fragment in einen Vektor eingefügt werden, sofern beide mit den passenden Restriktionsenzymen geschnitten wurden. Um eine Religation des Vektors ohne das Fragment zu vermeiden, wird der Vektor vor der Ligation dephosphoryliert. Ein Ligationsansatz besteht aus 50 ng Vektor, der 3-10 fachen molaren Menge Fragment, 2 μl Ligase (1 U/ μl) und der entsprechenden Menge 5x Reaktionspuffer in 20 μl Gesamtvolumen. Die Reaktion erfolgt für 1-16 h bei $14-16^{\circ}\text{C}$ oder in einer PCR-Maschine in 25 Zyklen mit je 30 Sekunden bei 10°C und 30°C .

2.2.2.11 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR dient zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten. Die Reaktion besteht aus drei Teilen; der Denaturierung, dem *Annealing* und der Elongation in mehreren Zyklen. Zuerst wird die Matrizen-DNA bei 94°C denaturiert und anschließend auf eine

Hybridisierungstemperatur der für die Matrize spezifischen Primer (homologe Oligonukleotide) heruntergekühlt. Nachdem die Primer an die einzelsträngige DNA gebunden haben, beginnt die hitzeresistente DNA-Polymerase in der Elongationsphase die Synthese von DNA aus in der Reaktionslösung vorhandenen Nukleotiden (dNTPs). Die Hybridisierungstemperatur T_m errechnet sich nach

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

Um unspezifische Hybridisierungen zu vermeiden, wird die Hybridisierungstemperatur ausgehend von dem errechneten Wert nochmals um ca. 5°C angehoben.

Die hier eingesetzten Oligonukleotide sind unter [2.1.2.2.1](#) beschrieben. Für die Amplifikation der Matrizen-DNA wird entweder die *Taq*-DNA-Polymerase mit cDNA aus der reversen Transkription (RT-Reaktion) oder die *Pwo*-DNA-Polymerase mit Plasmid-DNA verwendet. Die Inkubation erfolgt anhand der angegebenen Schemata.

Allgemeines Pipettierschema:	PCR-Puffer mit MgSO ₄ (10x)	8 µl
	dNTPs (je 2,5 mM)	8 µl
	<i>Forward-Primer</i> (50 - 100 pmol/µl)	1 µl
	<i>Reverse-Primer</i> (50 - 100 pmol/µl)	1 µl
	DMSO	0 - 8 µl
	Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
	Plasmid-DNA (1 - 10 ng/µl)	1 µl
	oder cDNA aus RT-Reaktion	5 µl
	Wasser	ad 80 µl

Aktin-PCR: Länge des erwarteten Fragmentes 406 bp

5 min	94°C	
1 min	94°C	}x40
1 min	60°C	
2 min	72°C	
10 min	72°C	
∞	4°C	

GAPDH-PCR: Länge des erwarteten Fragmentes ca. 300 bp

5 min	94°C	
1 min	94°C	}x35
45 sec	58°C	
1 min	72°C	
7 min	72°C	
∞	4°C	

PLINP-RT-PCR: Länge des erwarteten Fragmentes ca. 520 bp

5 min	94°C	
30 sec	94°C	} x29
45 sec	52°C	
1 min	72°C	
7 min	72°C	
∞	4°C	

2.2.2.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA

DNA-Sequenzierungen werden entweder durch die Firma GATC oder durch die DNA-Sequenzierungsabteilung des DKFZ von Andreas Hunziker durchgeführt.

2.2.3 Manipulation von RNA

Beim Umgang mit RNA muss mit besonderer Vorsicht gehandelt werden, da RNA leicht durch RNasen an Händen oder Geräten zerstört werden kann. Deshalb werden jederzeit Handschuhe getragen, die Reaktions- und sonstige Gefäße sowie alle Lösungen doppelt autoklaviert, nicht autoklavierbare Versuchsmittel zuerst mit SDS-Lösung und dann mit 70%igem Ethanol behandelt und Nuklease-freies Wasser benutzt.

2.2.3.1 Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen

Zellen einer Zellkulturschale von 10 cm Durchmesser werden zweimal mit kaltem PBS überspült. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von 2 ml Lösung D lysiert und anschließend in ein Falcon-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 0,2 ml 2M Natriumacetat-Lösung pH 4,0, 2 ml Phenol und 0,4 ml Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 49:1) wird die Mischung für 10 Sekunden kräftig geschüttelt und folgend 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 30 min bei 3.000 UpM und 4°C wird die RNA-haltige wässrige Oberphase in ein neues Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Die nachfolgende Fällung der RNA erfolgt über Nacht bei -20°C durch Zugabe von 2 ml Isopropanol. Die RNA wird durch eine Zentrifugation bei 4.000 UpM bei 4°C für 30 min präzipitiert. Das Pellet wird in 600 µl Lösung D resuspendiert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird erneut mit 600 µl Isopropanol für 1-2 h bei -20°C gefällt. Die ausgefällte RNA wird durch eine Zentrifugation von 30 min bei 4°C und 12.000 UpM pelletiert. Das Pellet wird nach einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol für 30 min luftgetrocknet und in 30-50 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen.

2.2.3.2 Reverse Transkription

Durch Reverse Transkription wird aus RNA einzelsträngige cDNA synthetisiert, die in einer folgenden PCR als Matrize dient und somit dsDNA als PCR-Produkt amplifiziert werden kann. Zur Versuchsdurchführung werden 0,1 bis 5 μg isolierter Gesamt-RNA in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben, 1 μl oligo(dT)18-Primer (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zupipettiert und mit nukleasefreiem Wasser auf 12 μl aufgefüllt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 70°C und anschließendem Abkühlen auf 37°C werden 4 μl Reaktionspuffer, 1 μl Ribonukleaseinhibitor und 2 μl dNTPs zugefügt und 5 min bei 37°C inkubiert. Dann wird die M-MuLV-Reverse Transkriptase (200 U/ μl) zupipettiert und die Reaktion für 1 h bei 42°C inkubiert. Zuletzt wird die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt. Ein Aliquot der Lösung kann anschließend direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt werden.

2.2.3.3 Synthese von siRNA

Die synthetisch hergestellten *sense*- und *antisense*- Oligonukleotide werden auf eine Konzentration von 100 μM eingestellt. Anschließend werden die Oligonukleotide mit dem T7-Promotor-Primer hybridisiert. Dies passiert durch die Zusammengabe von 2 μl T7-Promotor-Primer, 6 μl DNA-Hybridisierungspuffer und 2 μl *sense*- oder *antisense*-Oligonukleotide und anschließendes 5-minütiges Erhitzen auf 70°C und folgender 5-minütiger Inkubation bei RT. Das hybridisierte Produkt wird anschließend mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Dieses geschieht durch eine Inkubation bei 37°C für 30 min nach Zugabe und Mischung der folgenden Substanzen: 2 μl 10 x Klenow-Reaktionspuffer, 2 μl 10 x dNTPs, 4 μl Nuklease-freies Wasser und 2 μl Exo-Klenow-Polymerase. Anschließend werden 2 μl *sense*- oder *antisense*-Matrize, 4 μl Nuklease-freies Wasser, 10 μl 2 x dNTP-Mix, 2 μl 10 x T7-Reaktions-Puffer und 2 μl Enzym-Mix zur Initiation der Transkription zusammengegeben und gemischt. Nach 2 h bei 37°C werden die jeweils passenden *sense*- und *antisense*-Ansätze zusammengemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird durch die Zugabe von 6 μl Verdauungspuffer, 48,5 μl Nuklease-freies Wasser, 3 μl RNase und 2,5 μl DNase und einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C 5'-überhängende Leitsequenzen der doppelsträngigen RNA und die DNA-Matrize verdaut. Die abschließende Aufreinigung erfolgt über eine Säule. Dazu wird zu den Ansätzen 400 μl siRNA-Bindepuffer gegeben und 2-5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Mischung wird auf einen angefeuchteten Filter in einem 2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und für 1 min bei 10.000 UpM zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und der Filter zweimal mit je 500 μl Waschpuffer gewaschen. Anschließend werden 100 μl 75°C warmes, Nuklease-freies Wasser auf den Filter, welcher in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß gesteckt wurde, aufgebracht und 2 min bei Raumtem-

peratur inkubiert. Die abschließend durch 2-minütige Zentrifugation bei 12.000 UpM gewonnene siRNA enthaltene Lösung kann direkt mittels METAFECTENE transfiziert (2.2.6.5) oder über einen längeren Zeitraum bei -80°C gelagert werden.

2.2.4 Analyse und Charakterisierung von Proteinen

2.2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Das in Bradford-Reagenz enthaltene Coomassie Brilliant Blue G-250 in einer sauren Lösung kann gelöste Proteine binden. Durch diese Bindung wird das Absorptionsmaximum der Substanz von 465 auf 595 nm Wellenlänge verschoben. Diese Verschiebung ist proportional zur Menge an gebundenem Protein in der Lösung. Durch Messung mit einer BSA-Referenz-Verdünnungsreihe kann man die Konzentration von Proteinlösungen bestimmen. Bei der Versuchsdurchführung wird zunächst die BSA-Standard-Reihe mit einer Anfangskonzentration von 2 mg/ml und 8 Verdünnungen mit gleichen Volumenteilen BSA-Lösung und Wasser hergestellt. 5 μ l dieser Verdünnungsreihe sowie 5 μ l der zu analysierenden Proben (Proteinmenge muss im Bereich der Standardkurve liegen) werden mit 155 μ l Wasser und 40 μ l Bradford-Reagenz gut vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min werden die Proben im ELISA-Messgerät bei 595 nm vermessen und ausgewertet.

2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Man kann mit dieser Methode ebenfalls feststellen, wie viele Proteine welcher Größe und Reinheit in einer Lösung vorliegen. Ebenso kann ein bestimmtes Protein spezifisch durch Western Blot nachgewiesen werden. Unterschiedliche Ladungen, Tertiärstrukturen und Zusammensetzungen der Proteine werden durch Denaturierung der Proteine durch SDS relativiert, indem sich das SDS an die geladenen Proteine anlagert und so für eine einheitliche negative Ladung sorgt. Die Auftrennung erfolgt in einem zweiphasigen Gel, dem Sammelgel und dem Trenngel. Das Sammelgel dient mit einer geringen Acrylamidkonzentration zur Fokussierung der Proteine bis an die Phasengrenze durch das Leition Glycin, welches die Proteine voraustreibt. Durch diese Fokussierung wird eine schärfere Auftrennung der Proteine ermöglicht, die nun im Trenngel erfolgt. Das SDS-Polyacrylamidgel wird in die Elektrophorese-Kammer eingespannt, welche mit TGS-Puffer gefüllt ist. Die Proteinproben werden mit 2x Protein-Probenpuffer versetzt und nach Denaturierung für 10 min bei 95°C in die Taschen eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgt anschließend bei 150 V für ca. 1 h. Nach Entfernung des Sammelgels wird das Trenngel gefärbt oder die Proteine im Western Blot auf

eine Membran übertragen.

2.2.4.3 Färbung von Polyacrylamidgelen

2.2.4.3.1 Färbung mit colloidalem Coomassie-Blau

Der Nachweis von Gesamtprotein durch colloidales Coomassie hat eine Nachweisgrenze von 20 bis 200 ng/0,5 cm Bande. Das Gel wird nach dem Gellauf für eine Stunde in Wasser inkubiert. Anschließend wird es über Nacht in Färbelösung fixiert und gefärbt. Nach dieser Zeit wird das Gel mit Wasser solange entfärbt, bis distinkte Banden zu erkennen sind. Danach wird das Gel zur Aufbewahrung in Folie getrocknet.

2.2.4.3.2 Silberfärbung von Proteinen

Bei einer Silberfärbung sind Proteinmengen von 5-30 ng/0,5 cm Bande nachweisbar. Die Färbung erfolgt durch Bindung des Silbers an die vorher am Gel fixierten Proteine. Nach Alkalisierung der Lösung durch Natriumcarbonat bildet sich schließlich ein Komplex mit Thiosulfat, der – schließlich gelöst von den Proteinen – im Gel an der entsprechenden Stelle nachzuweisen ist. Der Versuch wird folgendermaßen durchgeführt: das Trenngel wird nach dem Gellauf für 1 h in Fixierlösung und folgend 15 min in Konditionierungslösung inkubiert. Nach drei 5-minütigen Waschschritten in Wasser wird das Gel für 20 min in Silberlösung gegeben. Nach zwei kurzen Waschschritten in Wasser erfolgt die Färbung in Entwicklerlösung. Bei ausreichender Färbung wird die Reaktion mit 50 mM EDTA gestoppt. Das Gel kann zur Lagerung in Folie getrocknet werden.

2.2.4.4 Western Blot

Der Western Blot ist der Transfer von Proteinen von der SDS-Polyacrylamid-Gelmatrix auf eine Membran aus Nitrocellulose, +Nylon, PVDF oder anderen Materialien durch Elektrophorese. Über einen immunologischen Nachweis kann anschließend aus dem Gesamtproteingemisch ein spezifisches Protein nachgewiesen werden. Alle Komponenten, die in die Kammer eingelegt werden, sind vorher mit EMBL-Puffer gut getränkt worden. In der Transferkammer werden auf die Anode drei Filterpapiere aufgelegt; darauf wird die Membran aufgebracht, auf die wiederum blasenfrei das Gel aufgelegt wird. Der Aufbau wird nach oben wieder durch drei Filterpapiere abgeschlossen. Die Transferkammer wird durch den Deckel, in den die Kathode eingelassen ist, verschlossen. Die Elektrophorese erfolgt für 1,5 h bei 150 mA für ein Minigel. Optional wird nach dem Blot die Membran für 10 min in Ponceau-Färbelösung gegeben, um die Transfereffizienz der Proteine zu überprüfen. Nach 10 min in dieser Lösung wird mit Wasser solange entfärbt, bis distinkte Banden sichtbar werden. Die Filtermembran wird anschließend

bei Raumtemperatur für 1 h zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in Milch-Blocklösung inkubiert. Für den anschließend folgenden immunologischen Nachweis wird der verdünnte Erstantikörper mit der Membran für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wird dreimal 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Danach wird der ebenfalls verdünnte mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper auf die Membran aufgebracht und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgen wiederum Waschschritte von dreimal 10 min. Anschließend erfolgt der spezifische Protein-Nachweis über eine ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Reaktion (*Chemiluminescence Detection Kit for Horseradish Peroxidase*, AppliChem). Dazu wird Lösung A 1:1 auf ein Gesamtvolumen von 750 μl mit Lösung B gemischt, für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 30 Sekunden auf den Blot gegeben. Danach wird der Filter durch ein Filterpapier getrocknet und zügig in eine Filmkassette gelegt. Die Filme werden exponiert und schließlich mittels eines automatischen Entwicklergerätes fertiggestellt.

2.2.4.5 **Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Eine flexible 96-Lochplatte wird für 1 h bei 37°C mit 100 ng/well aufgereinigtem Protein in PBS mit einem Volumen von 50 μl pro Loch beschichtet. Nach 4-maligem Waschen mit 200 μl /Loch Waschpuffer wird mit 200 μl /Loch Milch-Blockpuffer über Nacht bei 4°C oder 30 min bei 37°C geblockt. Nach Entfernung der Blockmilch wird der erste Antikörper sowie die Kontrollen in geeigneter Verdünnung mit 50 μl /Loch auf die Platte gegeben und für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 5-maligem Waschen mit Waschpuffer wird der zweite Antikörper, welcher mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, in geeigneter Verdünnung mit 50 μl /Loch auf die Platte pipettiert. Nach 5-maligen Waschschritten wird das Substrat mit 100 μl /Loch zugegeben und bei genügend starker Farbreaktion im ELISA-Reader gemessen.

2.2.4.6 **Tandem affinity purification**

Mittels METAFECTENE transfizierte 293T-Zellen aus 10 Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser (siehe 2.2.6.5) werden zur Gewinnung von Gesamtprotein mittels eines Zellschabers abgeschabt und anschließend bei 1.900 UpM für 5 min vom Medium getrennt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wird das Zellpellet in 1 ml TAP-Puffer 1 resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgt durch drei aufeinanderfolgende Frier-Tau-Zyklen in flüssigem Stickstoff und einem 37°C warmen Wasserbad. Zellreste werden darauf durch Zentrifugation bei 16.000 x g für 10 min abgetrennt, das Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt und Nonidet P-40 bis zu einer Endkonzentration von 0,1% zugegeben. Das Zellreste-Pellet und ein Bruchteil des Lysats werden

zur späteren Analyse durch Western Blot bei -20°C gelagert. $50\ \mu\text{l}$ IgG-Sepharose, die vorher achtmal gründlich mit TAP-Puffer 2 gewaschen wurde, wird zum Lysat pipettiert und die Suspension unter Schwenken für 3 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach dieser Zeit wird die Sepharose durch 5-minütige Zentrifugation bei $13.000 \times g$ vom Gesamtlisat getrennt und ein Teil der Sepharose und des Lysates für eine spätere Analyse aufgehoben. Die Sepharose wird folgend dreimal mit TAP-Puffer 2 und einmal mit TAP-Puffer 3 gewaschen und eine Probe nach diesen Waschschritten aufgehoben. Danach werden zur Sepharose $200\ \mu\text{l}$ TAP-Puffer 3 und $50\ \text{U}$ TEV-Protease gegeben und die Mischung unter Schwenken für mindestens zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei $13.000 \times g$ für $5\ \text{min}$ wird der Überstand gelagert und weitere $200\ \mu\text{l}$ TAP-Puffer 3 zur Sepharose gegeben, um den geschnittenen Protein-Komplex möglichst vollständig von der Sepharose abzulösen. Nach erneuter Zentrifugation werden beide Überstände vereinigt und $2\ \mu\text{l}$ 2M CaCl_2 sowie $900\ \mu\text{l}$ TAP-Puffer 4 zupipettiert. $50\ \mu\text{l}$ der vorher achtmal gründlich gewaschenen Calmodulin-Sepharose werden ebenfalls zu den Überständen gegeben. Nach mindestens 2-stündiger schwenkender Inkubation bei Raumtemperatur wird die Sepharose durch Zentrifugation bei $13.000 \times g$ für $10\ \text{min}$ vom Überstand, von dem eine Probe genommen wird, getrennt. Die Sepharose wird dreimal mit je $1\ \text{ml}$ TAP-Puffer 4 gewaschen und eine Probe zur Analyse abgetrennt. Die Elution der Protein-Komplexe erfolgt durch Zugabe von $30\ \mu\text{l}$ TAP-Puffer 5 für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Analyse aller genommenen Proben erfolgt durch Western Blot sowie Silberfärbung von Proteinen.

2.2.5 Kultivierung und Manipulation von Hefe

2.2.5.1 Kultivierung von Hefe

Hefen werden bei einer Temperatur von 30°C auf flüssigem oder festem YPDA-Vollmedium oder in dem dem Versuch entsprechenden Selektionsmedium (SD-Medium) kultiviert. Festes Medium erhält man dabei durch Zugabe von $1,5\%$ Agar.

2.2.5.2 Anlegen von Hefe-Glycerinvorräten

Eine frische Hefekolonie auf einer Agarplatte wird in $500\ \mu\text{l}$ des entsprechenden Mediums resuspendiert. Dann wird ein Volumen steriles 50% iges Glycerin zugegeben und nach gründlichem Mischen bei -70°C eingefroren. So lassen sich die Hefezellen über einen längeren Zeitraum lagern und können bei Bedarf auf Festmedium ausgestrichen werden.

2.2.5.3 Amplifikation der cDNA-Bibliothek

Die in dieser Arbeit benutzte cDNA-Bibliothek liegt als bakterieller Glycerinstock vor. Um ein gleichmäßiges Wachstum der verschiedenen Klone zu erreichen, werden die Bakterien zuerst auf entsprechendem Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Danach werden die Zellen von den Agarplatten abgeschabt und in Flüssigmedium resuspendiert. Nach einer zweistündigen Wachstumsphase bei 37°C wird die Plasmid-DNA aus den Bakterien in großem Maßstab aufgereinigt.

2.2.5.4 Transformation von Hefe

Um Plasmide in Hefezellen einzubringen, werden diese chemisch mittels PEG und Lithiumacetat transformiert.

2.2.5.4.1 Transformation von Einzel-Plasmiden

Aus einer frischen Hefekolonie werden 2 ml Kultur angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Übernachtskultur werden 100 µl entnommen und mit 900 µl Wasser verdünnt. Anschließend werden die Zellen bei 2.000 UpM für 2 min pelletiert und in 100 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Danach wird die Suspension für 5 min bei 30°C geschüttelt. Die Zellen werden dann für 10 sec bei 10.000 UpM pelletiert. Sodann werden 240 µl 50%iges PEG-4.000, 36 µl Lithiumacetat, 5 µl Heringssperma-Träger-DNA, 3 µl Plasmid-DNA und 67 µl Wasser in der angegebenen Reihenfolge auf die Zellen pipettiert. Der Ansatz wird durch kräftiges Vortexen für eine Minute gemischt und folgend für 20 min bei exakt 42°C inkubiert. Danach wird nach kurzem Pelletieren der Zellen für 10 sec bei 10.000 UpM diese in 100 µl Wasser resuspendiert und auf entsprechendes Festmedium ausgestrichen.

2.2.5.4.2 Transformation in großem Maßstab

150 ml einer frischen Hefe-Übernachtskultur, welche aus mehreren frischen Hefekolonien angeimpft wurde, werden in eine 1 l-Kultur YPDA bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2-0,3 gegeben. Die Kultur wird anschließend für 3 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 ± 0,1 schüttelnd inkubiert. Die Hefezellen werden in 50 ml-Falcongefäße überführt und 5 min bei 1.000 x g und Raumtemperatur pelletiert. Die Zellpellets werden dann in insgesamt 500 ml TE oder Wasser gewaschen und vereinigt. Das Zellpellet wird folgend in 8 ml 1 x TE/Lithiumacetat resuspendiert und es werden 200 µl für spätere Kontrollen entnommen. In einem 500 ml-Gefäß werden 0,2 - 1 mg *bait*-Vektor, 0,1 - 0,5 mg *prey*-Vektor, 20 mg Heringssperma-Träger-DNA und 8 ml Hefesuspension in der angegebenen Reihenfolge zupipettiert und gut gemischt. 60 ml sterile frisch hergestellte

PEG/Lithiumacetatlösung wird zugegeben und durch Vortexen kräftig gemischt. Danach wird für 30 min bei 30°C und 200 UpM inkubiert. Nach dieser Zeit werden 7 ml DMSO zugeführt und vorsichtig durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Dann erfolgt die Hitzeschock-Transformation für 15 min bei 42°C im Wasserbad. Nach einer Abkühlungsphase von 1-2 min auf Eis werden die Zellen 5 min bei 1.000 x g und Raumtemperatur abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml YPDA aufgenommen. Abschließend werden alle Zellen auf entsprechende Minimalmedien ausgestrichen. Die im Protokoll entnommenen 200 µl Hefe in 1 x TE/Lithiumacetat werden für Kontroll-Transformationen verwendet.

2.2.5.4.3 Bestimmung der Transformationseffizienz

Bei der Hefetransformation im großem Maßstab ist es essentiell, dass die Transformationseffizienz ausreichend für die Größe der cDNA-Bibliothek ist. Aliquots der Transformation werden auf SD-LT Medium ausgestrichen, womit auf die Anwesenheit beider Plasmide (*bait*- und *prey*-Plasmid) in der Hefe selektiert wird. Zur Berechnung der Transformationseffizienz werden je 100 µl einer dezimalen 1:10 - 1:1.000 Verdünnung ausplattiert, um eine auszählbare Platte zu erhalten. Die gewachsenen Kolonien werden ausgezählt und es gilt:

$$\text{Zahl der Transformanten} = \text{Kolonien} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Volumen des Gesamtansatzes [ml]} * 10$$

2.2.5.5 o-NPG-Flüssigkultur-Test zur Quantifizierung von Protein-Interaktionen

Der o-NPG-Flüssigkultur-Test dient dazu, die Interaktionsstärke zwischen *bait* und *prey* quantitativ zu bestimmen. Dies ist möglich, da angenommen wird, dass bei stärkerer Interaktion der Proteine auch die DNA-Bindungs- und Aktivierungsdomäne stärker aktiviert werden und so eine erhöhte Expression der β -Galaktosidase stattfindet. Mit einer frischen Hefekolonie werden 5 ml des entsprechenden Minimalmediums SD-HALT angeimpft. Als Negativ-Kontrolle wird Hefe mit jeweils leerem *bait*- und *prey*-Vektor in den Versuch eingesetzt. Die Hefekulturen werden über Nacht bei 30°C inkubiert. Anschließend werden 2 ml dieser Kulturen in 8 ml YPDA-Medium für ca. 3-5 h bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 inkubiert. Die exakte optische Dichte der Kulturen wird bestimmt. Bei jedem Ansatz werden für eine statistisch relevante Aussage Triplikate der Ansätze gemessen. Dazu werden von jedem Ansatz dreimal 1,5 ml Kultur entnommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 30 sec bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Das Hefepellet wird in 1,5 ml Z-Puffer gewaschen und anschließend in 100 µl Z-Puffer resuspendiert. Die Zellen werden dann durch dreimalige Frier-Tau-Lyse in flüssigem Stickstoff bzw. einem 37°C-Bad aufgeschlossen. Als Nullwert wird ein Ansatz mit reinem Z-Puffer verwendet. Nach der Lyse werden zu jedem Ansatz 700 µl frisch

bereiteter Z-Puffer mit β -Mercaptoethanol gegeben und gut gemischt. Zur abschließenden Farbreaktion wird nun zügig zu jedem Ansatz 160 μl o-NPG-Lösung pipettiert. Um die Zeitverzögerung dieses Schrittes bei der Anzahl der Proben zu relativieren, werden die Triplikate zufällig zwischen den Ansätzen verteilt. Die Proben werden bis zu einer deutlichen Gelbfärbung bei 30°C inkubiert und abschließend die Reaktion mittels Zugabe von 400 μl 1 M Na_2CO_3 gestoppt. Die Ansätze werden zur Entfernung der Zellreste kurz bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, in 96-Lochplatten überführt und im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen. Die relative enzymatische Aktivität der β -Galaktosidase wird durch folgende Formel bestimmt:

$$\beta - \text{Galunits/Zellen} = 1000 * A_{420} / (OD_{600} * 1,5 * t)$$

mit t = Reaktionszeit in min

2.2.5.6 Plasmid-Isolation aus Hefe

Aus einer frischen Hefekolonie werden 10 - 20 ml Übernachtkultur in Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Hefe-Zellen werden durch 2 min Zentrifugation bei 3.500 UpM pelletiert und in 500 μl Wasch-Puffer gewaschen. Daraufhin wird das Pellet in 200 μl Lyse-Puffer resuspendiert und mit Glaskugeln mit 500 μm Durchmesser versehen. Die Ansätze werden dann in eine Schüttelmaschine eingespannt und für 20 sec kräftig geschüttelt. Danach werden die Ansätze 5 min auf Eis abgekühlt und folgend 5 min bei 15.000 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 200 μl Phenol* versehen. Nach einer Schüttelzeit von 15 sec auf dem Vortex wird erneut 5 min bei 15.000 UpM zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann anschließend direkt transformiert werden. Optional kann eine Ethanol-Fällung der Plasmid-DNA erfolgen. Die Proben sind bei -20°C für längere Zeit lagerbar.

2.2.5.7 Proteinextraktion aus Hefe

Mit einer frischen Hefekolonie werden 50 ml YPDA oder entsprechendes Selektionsmedium angeimpft und für 40 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Zellen werden darauffolgend 5 min bei 2.000 UpM und 4°C pelletiert. Alle nachfolgenden Schritte werden zum Schutz vor Proteasen auf Eis durchgeführt. Das Hefepellet wird in 50 ml kaltem Wasser gewaschen, anschließend in 200 μl Lyse-Puffer für Proteinextraktion resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. 0,3-0,4 ml Glaskugeln mit einem Durchmesser von 0,5 mm werden zu den Ansätzen gegeben und in eine Schüttelmaschine eingespannt. Nach einer Schüttelphase von 20 sec und folgend 5 min auf Eis werden die

Ansätze 5 min bei 12.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Protein-enhaltende Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann für längere Zeit bei -70°C gelagert werden.

2.2.6 Kultivierung und Manipulation von Säugetierzellen

2.2.6.1 Kultivierung von Säugetierzellen

In dieser Arbeit wurde mit adhärent wachsenden Zellen gearbeitet. Diese wachsen bis zur konfluenten Dichte im Zellkulturgefäß und müssen anschließend experimentell verarbeitet oder subkultiviert werden. Die Arbeiten mit Säugetierzellen werden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die konfluenten Zellen werden zunächst vom Medium befreit und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wird 1/10 Medium-Volumen Trypsin-EDTA in das Kulturgefäß gegeben und bis zur Ablösung der Zellen vom Gefäßboden inkubiert. Etwas frisches Medium wird hinzugegeben und ca. 1/10 bis 1/20 der Ursprungszellmenge in das Kulturgefäß zurückgeführt. Zuletzt wird mit frischem Medium wieder auf das Ursprungsvolumen aufgefüllt. Die restlichen Zellen können nun zu Experimenten verwandt werden. Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasseratmosphäre.

2.2.6.2 Bestimmung der Zellzahl durch die Neubauer-Zählkammer

50 µl einer Zellsuspension wird mit der gleichen Menge Trypanblau:PBS (1:1) versetzt und unter eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Das definierte Volumen in der Zählkammer ist in Groß- und Kleinquadrate aufgeteilt, die eine Bestimmung der Zellzahl pro ml möglich machen. Dabei gilt:

$$\text{Zellzahl/ml} = 2 * \text{Mittelwert}(4 \text{ Großquadrate}) * 10^4 * \text{Verdünnung Suspension}$$

Das Trypanblau färbt in diesem Ansatz die toten Zellen, so dass eine Unterscheidung der Lebend- und Tot-Zellzahl gemacht werden kann.

2.2.6.3 Kryokonservierung von Säugetierzellen

Säugetierzellen können über längere Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Zellen einer bekannten Zellzahl aus einer Zellsuspension werden durch eine Zentrifugation bei 1.900 UpM für 5 min bei Raumtemperatur pelletiert. Anschließend werden sie mit frischem Medium auf eine Dichte von 1×10^7 /ml eingestellt, mit der gleichen Menge Kryomedium versetzt und gemischt. Danach werden sie zügig in ein Kryo-Röhrchen aliquotiert und in einem Spezial-Einfrier-Behälter bei -70°C für einige Stunden bis Tage

eingefroren. Danach werden sie aus dem Behälter entnommen und in flüssigen Stickstoff überführt. Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, werden sie zügig bei 37°C aufgetaut und in 9 ml 37°C warmes Medium gegeben. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert, in 10 ml 37°C warmem Medium resuspendiert und in das Kulturgefäß überführt.

2.2.6.4 Transfektion von Säugetierzellen mittels Calciumphosphat-Präzipitation nach Chen-Okayama (1987)

Diese Transfektionsmethode beruht auf der Anlagerung von DNA an kleinste Präzipitate von Calciumphosphat, die von den Zellen mittels Endozytose aufgenommen werden. Die in dem Versuch einzusetzenden Mengen variieren je nach Zelllinie und müssen für jede Linie optimiert werden. Die unten angegebenen Mengen sind Durchschnittswerte.

Größe Zellkulturschale	Ø10 cm	Ø6 cm	6-Loch	12-Loch
Zellzahl Tag 0	5×10^6	1×10^6	5×10^5	2×10^5
DNA [μ g]	15	7	4	2
3 M CaCl ₂ [μ l]	50	18,3	10	10
Wasser [μ l]	450	165	90	90
2 x BBS pH 6.95 [μ l]	500	183	100	100

Am Tag 0 werden die Zellen der oben angegebenen Zellzahl ausgesät. Soll im Anschluss eine Immunfluoreszenz gemacht werden, werden vorher Deckgläschen (Poly-L-Lysin beschichtet oder unbeschichtet) in die Zellkulturschalen eingelegt. Am Tag 1 werden die Transfektionssubstanzen in der oben angegebenen Reihenfolge gemischt, wobei der BBS-Puffer vorsichtig eingetropft wird. Anschließend wird die Lösung vorsichtig gemischt und für 15 bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wird abschließend tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Die Zellen werden nun für 16 h bei 35°C und 3% CO₂ inkubiert. Nach dem darauf folgenden Mediumwechsel werden die Zellen für weitere 24 - 48 h unter normalen Bedingungen inkubiert. Danach können die Zellen für weitere Versuche geerntet werden.

2.2.6.5 Transfektion von Säugetierzellen mittels METAFECTENE (Biontex)

Die Säugetierzellen werden mit der in der Tabelle ersichtlichen Zellzahl am Tag 0 ausplattiert. Für eine geplante Immunfluoreszenz werden vor den Zellen Deckgläschen (Poly-L-Lysin beschichtet oder unbeschichtet) in die Zellkulturschalen gebracht.

Zur Transfektion am Tag 1 werden zwei Lösungen, A und B, hergestellt. Das in der Tabelle verzeichnete Medium ist Zellkulturmedium ohne Zusatz von FCS oder Penicillin/Streptomycin. Lösung A und B werden zusammengegeben und gemischt. Anschlie-

Größe Zellokulturschale	∅10 cm	∅6 cm	6-Loch	12-Loch
Zellzahl Tag 0	5×10^6	1×10^6	5×10^5	2×10^5
Lösung A [μg DNA/ μl Medium]	20/700	7/300	4/100	2/100
Lösung B [μl METAFECTENE/ μl Medium]	30/300	70/700	10/100	10/100

End wird diese Mischung für 15 - 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gabe auf die Zellen erfolgt vorsichtig tropfenweise. Danach werden die Zellen normal im Inkubator gelagert. Ein Mediumwechsel erfolgt 3-6 Stunden nach der Transfektion. 24-72 Stunden später können die Zellen für weitere Versuche geerntet werden. Anstelle von DNA kann auch siRNA transfiziert werden.

2.2.6.6 β -Galaktosidase-Transfektionskontrolle (LacZ-Expression)

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wird ein Ansatz der Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches für eine β -Galaktosidase unter der Kontrolle eines HCMV-IE-Promotors steht. Transfizierte Zellen sind somit in der Lage, eine in dem Versuch zugegebene X-Gal-Lösung unter Farbreaktion umzusetzen. Dadurch sind diese Zellen mikroskopisch von nicht transfizierten Zellen zu unterscheiden und die Transfektionseffizienz ist nach Auszählung der positiven Zellen bestimmbar. Dazu werden die transfizierten Zellen nach einer gegebenen Inkubationsdauer mit Methanol fixiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit PBS für 10 min rehydriert. Anschließend wird die X-Gal-Färbelösung und 50 μl X-Gal-Lösung/ml Färbelösung zugegeben und für 1-24 h bei 37°C inkubiert. Danach wird mikroskopisch ausgewertet.

2.2.6.7 Zell-Lebendfärbung

siRNA kann bei einer Transfektion in Säugetierzellen toxische Effekte auslösen und so weitere Experimente verfälschen. Um solche Effekte zu detektieren, kann die allgemeine Vitalität von mit spezifischer siRNA transfizierten Zellen mit der von Zellen verglichen werden, die eine Referenz-siRNA erhalten haben. Dazu werden siRNA-transfizierte Zellen mit 3,7%igem Paraformaldehyd fixiert und anschließend dreimal in PBS gewaschen. Danach werden die Zellen für 5 min in 1,5%ige Kristallviolett-Lösung gegeben und folgend solange in Wasser gewaschen bis dieses klar bleibt. Daraufhin werden die Ansätze bei 37°C für 1 h getrocknet. Das gebundene Kristallviolett wird schließlich mit 33%iger Essigsäure gelöst und die Ansätze im Photometer bei 595 nm Wellenlänge vermessen.

2.2.6.8 HSV-1 Infektion von Vero2-2-Zellen

Vero2-2-Zellen werden mit HSV-1 infiziert. Danach werden die Zellen lysiert und die Proteine im Western Blot analysiert.

Dazu werden $2,2 \times 10^7$ Zellen in einer 175 cm²-Zellkulturflasche mit einer MOI von 1 beziehungsweise 10 des HSV-ANG LP1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Petra Galmbacher, DKFZ) infiziert, indem die Viren zu 5 ml frischem Zellkulturmedium zupipettiert werden und dieses auf die Zellen gegeben wird. Nach einstündiger Absorption der Viren an die Zellen bei 37°C wird das Medium abgesaugt und frisches Kulturmedium zugegeben. Die Virusinfektion erfolgt für 5 Tage bei normalen Inkubationsbedingungen. Danach werden die Zellen abgeschabt und nach zweimaliger Waschung in PBS im Western Blot analysiert.

2.2.6.9 Produktion von HPV-Pseudovirionen

Zur Produktion von Pseudovirionen werden 7×10^6 293TT Zellen in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser ausplattiert. Am nächsten Tag werden die Zellen mittels METAFECTENE transfiziert (siehe 2.2.6.5) und nach Mediumwechsel für 3-5 Tage bei normalen Bedingungen inkubiert. Anschließend wird der klare Transfektionsüberstand abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Zellen werden trypsinisiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Danach wird die Zellzahl mit modifiziertem PBS auf 5×10^7 Zellen/ml eingestellt und mit 4 µl/ml Zellsuspension Benzonase versetzt. Folgend werden 50 µl/ml Brij58 (10%ige Lösung) bis zu einer Endkonzentration von 0,5% zugegeben und gemischt. Die Lösung wird 1 bis 5 min auf Eis inkubiert und NaCl aus einer 5 M sterilen Lösung bis zu einer Endkonzentration von 850 mM zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis werden die Proben 10 min bei 4°C und 3.500 UpM in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Pseudovirionen enthaltende Überstand wird direkt für eine Infektion eingesetzt oder aliquotiert und kann so lange Zeit bei -70°C gelagert werden.

2.2.6.10 Infektion von Säugetierzellen mit Pseudovirionen

293TT-Zellen werden wie folgt ausplattiert: $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml mit 500 µl pro Loch in einer 24-Lochplatte und 300 µl pro Loch in einer 48-Lochplatte. Am nächsten Tag werden dann Pseudovirionen, sofern nicht anders angegeben, 1:5.000 mit supplementiertem Medium ohne Selektionszugaben verdünnt. Das benötigte Infektionsvolumen ist dabei 1 ml für eine 24-Lochplatte und 750 µl für eine 48-Lochplatte. Je nach Fragestellung wird zur Blockung der Pseudovirionen der Ansatz mit geeignet verdünntem Antikörper 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die Infektion erfolgt für 3-5 Tage bei normalen Infektionsbedingungen. Dabei wird das Medium nicht gewechselt.

2.2.7 Aufreinigung und Fraktionierung von Pseudovirionen mittels Gradienten

Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation ist es möglich, verschiedene Formen der Assemblierung wie Kapsomere oder VLPs durch exprimiertes L1 mit und ohne Koexpression von L2 zu unterscheiden und eine relative Aussage über die Verhältnisse dieser Formen zu treffen.

Zum Erhalt der Proteine werden 5×10^6 293TT-Zellen in einer 10 cm-Zellkulturschale ausgesät. Nach 24 Stunden werden die Zellen mittels METAFECTENE (siehe 2.2.6.5) transfiziert. Je nach Aufgabenstellung wird eine zweite Transfektion nach weiteren 24 Stunden durchgeführt. Nach Mediumwechsel werden die Zellen noch weitere 48 Stunden inkubiert und anschließend mit dem Zellkulturschaber vom Boden der Kulturschale abgelöst. Die Zellen werden 5 min bei 1.900 UpM pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das Pellet ist nun zur weiteren Verarbeitung bereit oder kann bei -20°C für längere Zeit gelagert werden.

Zur Herstellung des Zellextraktes wird das Pellet in $350 \mu\text{l}$ Extraktionspuffer resuspendiert und die Zellen durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und schnellem Auftauen bei 37°C aufgeschlossen. Anschließend wird das Zellysat bei 37°C für 30 min mit 50 U/ml Benzonase, einer Endonuklease, inkubiert, um genomische DNA abzubauen und damit die Viskosität des Extraktes zu verringern. Zelltrümmer werden für 10 min bei $7800 \times g$ abzentrifugiert und $300 \mu\text{l}$ des klaren Extraktes auf die vorbereiteten Sucrose-Gradienten aufgetragen. Das restliche Zellextrakt sowie das bei der Zentrifugation entstandene Zelltrümmer-Pellet werden im Western-Blot auf die Effizienz der Transfektion sowie der Lyse analysiert.

Während der 30-minütigen Inkubation des Zellextraktes mit Benzonase werden die Sucrosegradienten vorbereitet. Der Gradientenmischer, der freundlicherweise von Jürgen Kleinschmidt (DKFZ) zur Verfügung gestellt wurde, ist in der Lage, einen kontinuierlichen Sucrose-Gradienten herzustellen. Dazu werden je 6 ml einer 5%igen beziehungsweise 50%igen Sucroslösung in Extraktionspuffer in verschiedene Kammern des Gerätes eingefüllt und in Zentrifugationsröhrchen gepumpt. Die fertigen Gradienten werden zur Stabilisation noch 10 min bei 4°C ruhig gelagert. Danach kann das Zellysat auf die Gradienten gegeben werden.

Die Zentrifugation erfolgt für 214 min bei $134.470 \times g$ und 4°C . Entsprechend ihres Sedimentationskoeffizienten wandern die verschiedenen gebildeten Assemblierungsformen der Partikel mit unterschiedlicher Geschwindigkeit im Gradienten und trennen sich so voneinander. Nach der Zentrifugation wird ein Loch in den Boden des Zentrifugationsgefäßes gestochen und langsam $600 \mu\text{l}$ -Fraktionen in 1,5 ml-Reaktionsgefäße abgenommen. Die Sucrose-Konzentration jeder einzelnen Fraktion wird refraktometrisch bestimmt. $50 \mu\text{l}$ jeder Fraktion werden einer Western Blot-Analyse unterzogen. Der

Rest wird für weitere Experimente wie dem Antigen-spezifischen *capture*-ELISA oder Infektionsexperimente genutzt und dazu für höchstens 24 Stunden bei 4°C gelagert.

2.2.8 Immunfluoreszenz und Mikroskopie

2.2.8.1 Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin

Eine Poly-L-Lysin-Lösung von 0,01% (w/v) wird 1:10 mit Wasser verdünnt und anschließend auf Deckgläschen aufgebracht. Für ein Deckgläschen von 18 mm Durchmesser reichen dabei 600 μ l Lösung. Es wird 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt werden die Deckgläschen einmal mit Wasser gewaschen und danach getrocknet.

2.2.8.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Säugetierzellen

Die Zellen werden vom Medium befreit und zweimal vorsichtig mit PBS überspült. Danach werden die Zellen mit absolutem Ethanol für 10 min fixiert. Anschließend wird der Alkohol entfernt, die Zellen dreimal 5 min mit PBS gewaschen und anschließend 10 min in PBS rehydriert. In den folgenden 30 min werden unspezifische Bindungsstellen mit Milch-Blockpuffer abgesättigt. Danach wird der geeignet in BSA-Blockpuffer verdünnte Erstantikörper auf die Zellen gegeben und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, werden die Zellen schließlich dreimal 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Dann wird der Zweitantikörper auf die Zellen aufgebracht, dunkel eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut wie oben beschrieben gewaschen. Zuletzt werden die Zellen in 50%igem Glycerin auf Objektträger gebettet und zur Vermeidung von Flüssigkeitsverlust bei der Lagerung mit Nagellack verschlossen. Die Proben können mehrere Wochen bei 4°C dunkel gelagert werden.

2.2.8.3 Präparation von autofluoreszierenden Säugetierzellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Proteine, die an fluoreszierende Stoffe wie beispielsweise an EGFP gekoppelt sind, weisen durch diese Fusion eine sogenannte Autofluoreszenz auf, das heißt sie sind ohne indirekte Immunfluoreszenzfärbung im Fluoreszenzmikroskop nachweisbar, da sie direkt zur Fluoreszenz anregbar sind. Zum Nachweis solcher Zellen müssen diese nur 10 min mit Ethanol fixiert und anschließend mit PBS gewaschen und rehydriert werden. Danach kann optional noch eine DAPI-Färbung durchgeführt werden. Anschließend werden die Zellen in Glycerin gebettet auf Objektträger aufgebracht.

2.2.8.4 Kernfärbung mit DAPI

DAPI ist ein Farbstoff, der sich an DNA anlagert. So können mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops die Nuklei von Zellen sichtbar gemacht werden. Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung wird DAPI einer Konzentration von 0,1 mg/ml in PBS 1:100 verdünnt zum zweiten Antikörper gegeben.

2.2.8.5 Färbung von Mitochondrien

Zu den lebenden Zellen wird der Antikörper MitoTracker 1:20.000 ins Zellkulturmedium gegeben. Nach 20-minütiger Inkubationszeit können die Zellen entnommen und fixiert werden.

2.2.8.6 Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie

Das konfokale Mikroskop erlaubt durch zwei anregende Laser und Schnittebenen eines Objektes wie einer Zelle eine genaue Abbildung der Fluoreszenzlage und relativen Intensität in der Zelle. Durch Aufnahme mehrerer Ebenen ist die Erstellung eines dreidimensionalen Abbildes des Objektes möglich. Die Bedienung des Gerätes und der dazugehörigen Software erfolgte nach Herstellerangaben. EGFP, FITC und Alexa 488 werden mit einer Wellenlänge von 488 nm und Cy3 sowie Alexa 593 mit einer Wellenlänge von 593 nm angeregt. Um eine überlappende Anregung zu vermeiden, wird bei einer Kofärbung zunächst der eine anregende Laser angeschaltet und gemessen, wobei der andere Laser ausgeschaltet bleibt; anschließend wird die Anregung in umgekehrter Reihenfolge gemessen.

2.2.9 Herstellung von polyklonalem Antiserum

2.2.9.1 Kopplung von Peptid an mcKLH

Dieser Versuch dient dazu, durch Kopplung an ein geeignetes Trägermolekül die Immunogenität eines Peptides, welches eigenständig nur bedingt zur Bildung einer Immunantwort des Versuchstieres in der Lage wäre, zu erhöhen. Als geeignete Trägermoleküle haben sich das *keyhole limpet hemocyanin* (KLH), welches auch in diesem Versuch zur Anwendung kommt, sowie Ovalbumin und BSA erwiesen. KLH ist ein kupferhaltiges Protein aus Mollusken und Arthropoden, welches unter neutralen Pufferbedingungen in 5 verschiedenen Zuständen zu finden ist. Das hier verwendete *Mariculture KLH* (mcKLH) weist eine besondere Herstellung und optimierte Eigenschaften auf, so dass die Kopplung zum Peptid und die Versuchsdurchführung verbessert wird.

Zunächst wird das Peptid an mcKLH gekoppelt und das erhaltene Konjugat schließlich

aufgereinigt. 2 mg Maleimid-aktiviertes mCKLH werden in 200 μ l Wasser suspendiert. Dann werden 2 mg des Peptides in 500 μ l Konjugationspuffer gelöst. Sollte dies nicht möglich sein, ist die Benutzung von DMSO bis zu 30% des Endvolumens möglich. Hier wird 10% DMSO zugesetzt. Die beiden Lösungen werden anschließend zusammengesetzt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch darauf folgende kurze Zentrifugation werden eventuell entstandene Präzipitate entfernt. Im nachfolgenden Aufreinigungsschritt über eine Dextran-Entsalzungssäule, die 3-5 mal mit Aufreinigungspuffer gewaschen wird, werden 0,5 ml des Hapten-Träger-Peptid-Konjugats direkt in das Zentrum der Säule gegeben. Es werden 8-10 0,5 ml Aliquots Aufreinigungspuffer auf die Säule pipettiert und die Fraktionen aufgefangen. Zur Identifizierung der Peptid-KLH-enthaltenen Fraktionen wird die Absorbtion bei 280 nm Wellenlänge gemessen. Die positiven Fraktionen werden vereinigt und können anschließend für eine Immunisierung eingesetzt werden. Die Säulen können durch Waschen mit 3-5 Volumen Wasser mit 0,02% NaN_3 regeneriert und in 20%igem Ethanol bei 4°C gelagert werden.

2.2.9.2 Immunisierung von Versuchstieren

Zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen ein spezifisches Protein werden Kaninchen, Ratten oder Mäuse mit dem KLH-Peptid-Konjugat subkutan immunisiert. Zusätzlich wird in derselben Injektion ein Adjuvans mitverabreicht, welches durch Hervorrufung einer Entzündungsreaktion die Immunantwort stimuliert. Das hier verwendete Adjuvans ist Freund's Adjuvants, welches bei der initialen Immunisierung als komplettes Adjuvans, bei den weiteren Boost-Immunisierungen als inkomplettes Adjuvans gegeben wird. Immunisiert wird nach folgendem Schema:

Versuchstierart	KLH-gekoppeltes Peptid [μ g]	Gesamtvolumen in PBS [μ l]	+ Freund's Adjuvans [μ l]
Kaninchen	300	200	200
Ratte	100	100	100
Maus	50	50	50

Je zwei Wochen nach jeder Immunisierung wird dem Tier Blut abgenommen und auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern getestet.

2.2.10 Antigen-spezifischer capture-ELISA

Diese Art von ELISA wird zur Detektion und Quantifizierung von nativem HPV16 L1 oder L2 genutzt. Zur Erhöhung der Genauigkeit werden stets Triplikate hergestellt. Ebenso werden Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt.

Zunächst werden 50 μ l Antikörperlösung (L1/L2: 1.3.5.15 1:1.000 in PBS) in flexi-

ble Mikrotiterplatten gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper werden die Platten fünfmal in PBS/0,05% Tween gewaschen und ausgeklopft. Danach werden 100 µl Milch-Blockpuffer in die Löcher pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Ausklopfen der Platten werden 50 µl der Sucrose-Fraktionen (2.2.7) in die Löcher gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Für den Nachweis von L1 werden die Fraktionen vorher 1:5 verdünnt. Nach erneutem Waschschrift wird der Erstantikörper (L1: #4543 1:4.000 in Milch-Blockpuffer; L2: #2 1:1) in 50 µl-Mengen in die Löcher gefüllt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Platten wird der Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper (1:3.500) mit 50 µl pro Loch zupipettiert und eine weitere Stunde bei 37°C belassen. Nach Entfernung der unspezifisch gebundenen Antikörper durch fünfmaliges Waschen werden 100 µl ABTS-Substratlösung zugegeben, bis zur Erreichung eines genügend starken Signals (5-30 min) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption im ELISA-Meßgerät bei 405 nm Wellenlänge quantifiziert.

3 Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die beiden zellulären Proteine PLINP und PMSP mit dem Nebenstrukturprotein verschiedener humaner Papillomvirus-Typen interagieren. Die Interaktion von PLINP und L2 findet in Assoziation zu PODs (*PML oncogenic domains*) statt, wo auch das endogene PLINP zu finden ist. Domänen des PLINP Proteins, die für die Interaktion mit L2 beziehungsweise für die Lokalisation von PLINP in PODs wichtig sind, konnten bereits eingegrenzt werden. Weiterhin wurde vermutet, dass PLINP in der Zelle eine Rolle als transkriptionaler Kofaktor innehat. Die Interaktion von PMSP und L2 führt zur direkten oder indirekten Rekrutierung des zytosolisch lokalisierten PMSP in PODs. Eine detaillierte Charakterisierung von PMSP erfolgte bis zum heutigen Zeitpunkt nicht.

Da die Funktion von PLINP und PMSP in der Zelle und im Hinblick auf deren Rolle im viralen Lebenszyklus noch weitestgehend ungeklärt sind, war es Aufgabe dieser Arbeit, die Fragestellung einzuengen und möglichst aufzuklären.

3.1 Identifikation potentieller Interaktionspartner von PLINP und PMSP mittels des Yeast Two-Hybrid Systems

Ein häufig benutzter Ansatz zur Aufklärung der Funktion von Proteinen ist das *Yeast Two-Hybrid Screening*, in dem mittels eines Hefesystems nach zellulären Interaktionspartnern in cDNA-Bibliotheken gesucht wird (siehe Abbildung 3.1). Das *Yeast Two-Hybrid Screening* beruht auf der Bindung des sogenannten *preys*, der Beute, repräsentiert durch die cDNA-Bibliothek, an das *bait*, den Köder, welches hier durch PLINP beziehungsweise PMSP dargestellt wird. Das System ist dabei so ausgelegt, dass man Zugriff auf die genetische Information der Interaktionspartner erhält, die dann für weitere Analysen genutzt werden kann. Zudem ist man in der Lage, die Stärke der Interaktion semiquantitativ zu bestimmen. Ein weiterer Vorteil des Hefesystems liegt darin, dass das Milieu einer eukaryotischen Zelle vorliegt. Dennoch hat dieses System auch Nachteile wie das häufige Auftreten falsch positiver Ergebnisse, die Veränderung der Eigenschaften der Proteine oder Peptide durch die Fusion mit Gal4-Teilen oder die Hefe-spezifische posttranskriptionale Modifikation von Proteinen.

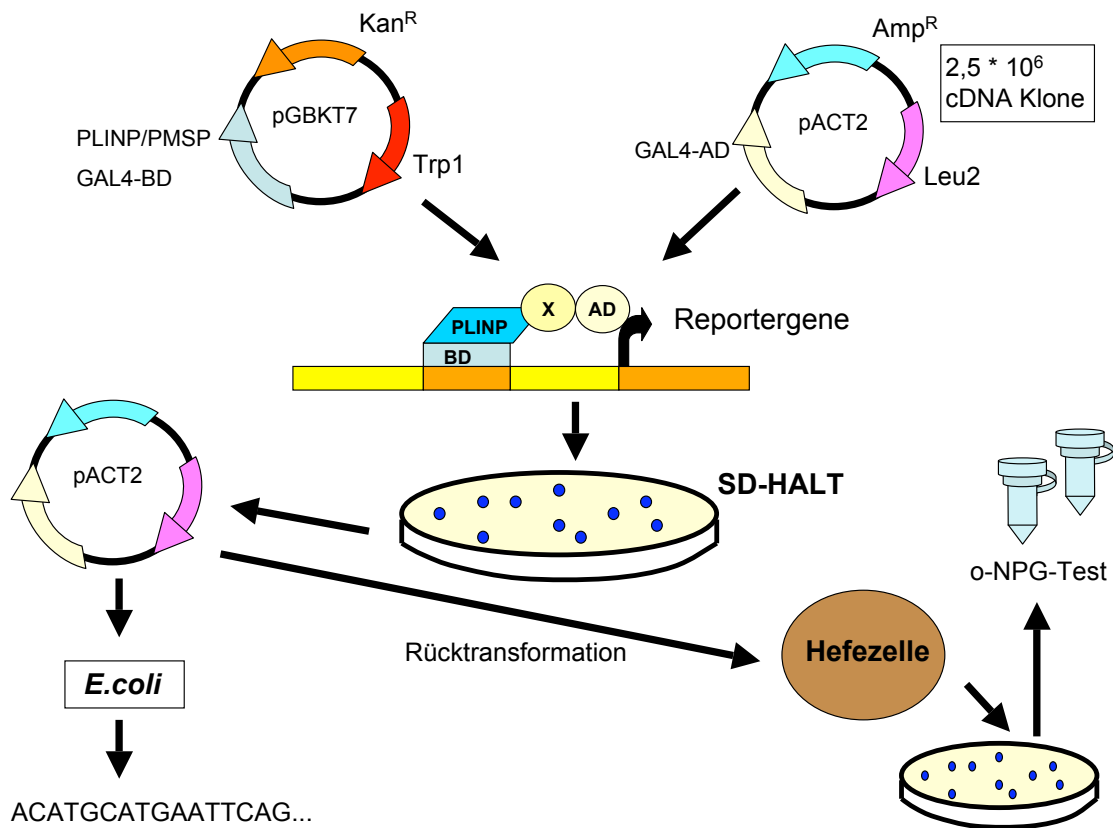


Abbildung 3.1: **Experimenteller Ablauf des Yeast Two-Hybrid Screenings.** Der mit dem *bait*-Plasmid pGBKT7-PLINP beziehungsweise pGBKT7-PMSP transformierte Hefestamm AH109 wird mit der cDNA-Bibliothek im Plasmid pACT2, die eine Komplexität von $2,5 \cdot 10^6$ Klonen abdeckt, erneut transformiert und auf SD-HALT-Platten ausgestrichen. Eine Interaktion zwischen dem *bait* und einem cDNA-Klon führt zur Aktivierung der Reportergene und damit zum Wachstum auf SD-HALT-Selektionsplatten. Nach mehrmaliger Überplattierung der positiven Klone auf neue Selektionsplatten wurde die Plasmid-DNA der Bibliotheksklone aus der Hefe isoliert, in Bakterien eingebracht und amplifiziert. Danach wurden die kodierenden Peptide/ Proteine sequenziert und die Plasmid-DNA in die *bait*-exprimierende Hefe rücktransformiert. Die Interaktionsstärke zwischen *bait* und *prey* wurde mittels o-NPG-Test quantifiziert. Aufbauend auf den Test im Hefesystem wurde die subzelluläre Lokalisation der potentiellen Interaktionsklone analysiert.

3.1.1 Test des Hefestammes AH109

Der Hefestamm AH109 hat Defekte im Genom, die die Synthese bestimmter Aminosäuren betreffen. Diese Defizienzen können durch transformierte Vektoren oder die Aktivierung der Reportergene komplementiert werden, was eine Selektion im *Screening* möglich macht. Um das Wachstum des Hefestammes AH109 zu kontrollieren und eventuelle Kontaminationen auszuschließen, wurde AH109 auf YPDA-Platten ausgestrichen. Ein gewachsener Klon wurde auf SD-Ade, SD-Met, Sd-Trp, SD-Leu, SD-His, SD-Ura, YPD/Cycloheximid sowie YPDA übertragen und das Wachstum nach einer Woche Inkubation beurteilt. Bei Hintergrundwachstum des Hefestammes auf SD-His, was durch verbliebene geringe *HIS3*-Expression verursacht wird und sich durch Kolonien mit einem Durchmesser von 1 mm oder mehr nach einer Woche Inkubationszeit äußert, sollte

3-AT zum Medium hinzugegeben werden. 3-AT ist ein bekannter Inhibitor des *HIS3*-Genproduktes und kann durch Zugabe die Bedingungen für die Selektion verstärken. Das Wachstum der Hefe war den Erwartungen entsprechend (Wachstum des Hefeklons nur auf SD-Met, SD-Ura und YPDA) und da kein Hintergrundwachstum sichtbar war, wurde auf die Zugabe von 3-AT in allen folgenden Experimenten verzichtet.

3.1.2 Screening von PLINP mit einer Keratinozyten-cDNA-Bibliothek

3.1.2.1 Herstellung des PLINP-Hefestammes

Um PLINP im richtigem Leserahmen möglichst nah hinter die Gal4-DNA-bindende Domäne (Gal4-BD) des pGBKT7-Vektors zu klonieren, wurde dieses aus dem Vektor pACT2-PLINP (#2008) über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BglII* direkt in den Vektor eingebracht. Das pGBKT7-PLINP-Plasmid wurde dann in den Hefestamm AH109 transformiert (siehe 2.2.5.4.1). Nach Überprüfung, ob die transformierte Hefe auf SD-Trp-, nicht aber auf SD-HT-Selektionsmedium wächst, wurde in einem separaten Ansatz durch Zusatz von X- α -Gal die LacZ-Expression der Transformanten überprüft. Eine Blaufärbung der Kolonien aufgrund der Umsetzung des Substrates bedeutete, dass PLINP ohne Interaktionspartner in der Lage wäre, die Reportergene zu aktivieren. Dies wäre zum Beispiel bei einigen Transkriptionsfaktoren denkbar. Ein erfolgreiches *Screening* wäre damit nicht möglich. Die mit PLINP transformierten Hefen zeigten jedoch nur weiße Kolonien und waren somit für die Durchführung des *Screenings* geeignet.

Nach diesen Vortests wurde Plasmid-DNA aus der Hefe isoliert (2.2.5.6) und deren Identität mittels Restriktionsanalyse über *SacI* und *HpaI* überprüft (Abb 3.2). Zudem wurde Protein aus der transformierten Hefe isoliert (2.2.5.7), um die Expression des PLINP-Gal4-BD-Fusionsproteins zu überprüfen. Dazu wurden eine Kolonie von AH109/pGBKT7-PLINP sowie eine Kolonie untransformierter Hefe als Proben für den Western Blot aufgearbeitet. Das PLINP-Fusionsprotein wurde in erwarteter Größe mittels des monoklonalen Antikörpers OFR1 #57 nachgewiesen (16 kDa für die Gal4-DNA-Bindedomäne und 28 kDa für PLINP), wohingegen der andere Ansatz keine Banden zeigte (Abb. 3.2). Nach diesen Vorversuchen wurde der transformierte PLINP-Hefeklon für das folgend beschriebene *Screening* verwendet.

3.1.2.2 Screening der cDNA-Bibliothek mit PLINP

Für das *Screening* wurde eine aus HaCat-Zellen gewonnene cDNA-Bibliothek verwendet, da bekannt ist, dass die Expression der Papillomvirus-Kapsidproteine auf differenzierte Epithelzellen, also Keratinozyten, beschränkt ist und die Funktion von PLINP im Hinblick

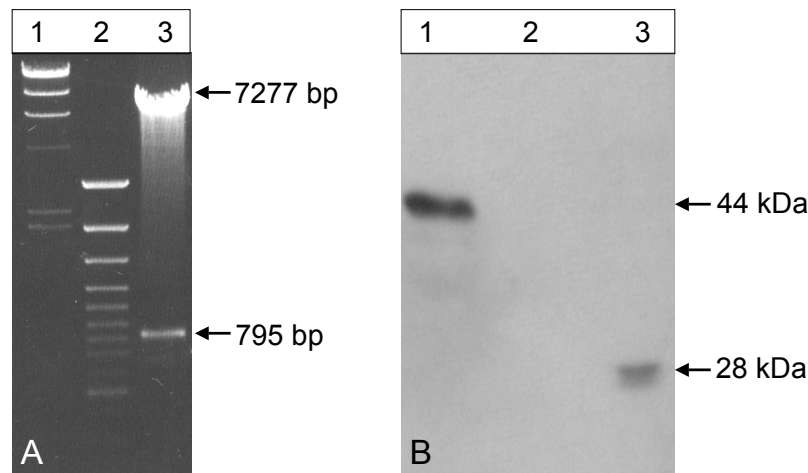


Abbildung 3.2: **Identifikation eines pGBKT7-PLINP-Klons nach Transformation in AH109 durch Restriktionsanalyse und Kontrolle seiner Expression in Hefe.** **A:** Nach Transformation des pGBKT7-PLINP-Plasmides in den Hefestamm AH109 und anschließendem Wachstum auf SD-Trp-Selektionsmedium wurde die Plasmid-DNA isoliert, in *E.coli* DH5 α amplifiziert und nach erneuter Plasmid-Isolation einer Restriktionsanalyse unterworfen. Durch einen Verdau mit *SacI* und *HpaI* konnte die Größe und Orientierung des Konstruktes überprüft werden. Die Fragmente mit 7277 bp und 795 bp zeigten die richtige Orientierung und Größe des pGBKT7-PLINP-Plasmides (Spur 1: λ /*HindIII*-Marker; Spur 2: 100bp-Marker; Spur 3: Plasmid-DNA aus Hefe-Klon). **B:** Western Blot des Gesamtlysates der mit pGBKT7-PLINP transfizierten Hefe AH109 zur Kontrolle der Expression des PLINP-Gal4-BD-Fusionsproteins (Spur 1: pGBKT7-PLINP transfizierte Hefe; Spur 2: untransfizierte Hefe; Spur 3: Gesamtlysate untransfizierter HeLa-Zellen). Der Nachweis erfolgte über OFR1 #57 in einer 1:5 Verdünnung und Ziege anti-Ratte HRP (1:3.000).

auf den Replikationszyklus des Papillomvirus hin untersucht werden sollte.

In den bereits mit dem pGBKT7-PLINP-Plasmid transfizierten Hefestamm AH109 wurde nach dem Protokoll für Hefetransformation in großem Maßstab (siehe 2.2.5.4.2) die cDNA-Bibliothek eingebracht. Als Kontrollen dienten verschiedene Vektoren, für die parallel bei gleichem Vorgehen Einzelplasmid-Transformationen (2.2.5.4.1) angefertigt wurden. Diese Plasmide waren im einzelnen pCI1, welches eine voll funktionstüchtige Gal4-Domäne trägt, pGBKT7-Lam, dessen exprimiertes Protein nicht zur Aktivierung der Reportergene in der Lage ist sowie eine Kotransfektion von pGADT7-T und pGBKT7-p53 (freundliche Gabe von Karin Butz, DKFZ), von deren kodierten Proteinen eine starke Interaktion bekannt war. Die Transformationen wurden jeweils auf SD-HALT-Platten mit X- α -Gal ausgestrichen. Für die Bestimmung der Transformationseffizienz wurden Aliquots der Transformation in Verdünnungsstufen von unverdünnt bis 1:1.000 auf SD-LT-Platten ausgestrichen. Mit dieser Kontrolle ist es möglich, unabhängig von der Interaktion der kodierten Proteine diejenigen Hefeklone wachsen zu lassen, die sowohl das pGBKT7-PLINP-Plasmid als auch ein Bibliotheksplasmid tragen. Der Rest des Transformationsansatzes wurde je zur Hälfte auf SD-HLT und SD-HALT ausplatziert. Auf diesen Platten können nur solche Klone wachsen, die mit Bibliotheksplasmiden transfiziert wurden, deren Genprodukte mit PLINP interagieren, so dass aus der Gal4-

Binde- und Aktivierungsdomäne ein aktiver Komplex entsteht, der in der Lage ist, die Reporter gene zu aktivieren. Diese Hefeklone sind dank der Aktivierung in der Lage, die Reporter gene Histidin, Adenin, Leucin und Tryptophan zu synthetisieren und so auf dem Selektionsmedium zu wachsen. Die Stringenz der Selektion ist dabei auf dem SD-HALT-Medium gegenüber dem des SD-HLT-Medium erhöht, da bei SD-HALT auch auf die Fähigkeit zur Synthese von Adenin selektiert wird.

Die Transformation der einzelnen Kontroll-Plasmide verlief erwartungsgemäß. Die Transformation im großen Maßstab ergab eine Transformationseffizienz von $4 * 10^6$ Transformanten, welche ausreichend ist, die Komplexität der Bibliothek mit $2,5 * 10^6$ unabhängigen cDNA-Klonen theoretisch abzudecken.

3.1.2.3 Verifikation der potentiellen Interaktionsklone im Hefesystem

Das Wachstum der Kolonien auf Selektionsmedium nach Transformation der cDNA-Bibliothek gibt zwar einen ersten Hinweis auf eine Interaktion der von den Klonen kodierten Proteine mit dem *bait*-Protein PLINP, jedoch besteht die Möglichkeit, falsch positive Klone zu erhalten. Deshalb müssen die primär erhaltenen Klone mehreren Kontrollen unterworfen werden, um die Interaktion zu verifizieren. Die ersten Kontrollen finden im Hefesystem statt. Zunächst wurden die Klone erneut dreimal folgend auf neues Selektionsmedium überplattiert, um das Wachstum zu verifizieren. Ein weiterer Marker, das X- α -Gal, wurde den Kontrollen hinzugezogen, um eine positive Interaktion durch Blaufärbung der Kolonien darzustellen. Da die Expression des Reporter gens β -Galaktosidase keinem Selektionsdruck unterworfen ist, ist diese Farbreaktion ein guter Hinweis auf eine echte Interaktion. Um eine semiquantitative Auswertung der Interaktionsstärke durch Messung der β -Galaktosidase-Expression tätigen zu können, wurde in späteren Kontrollversuchen ein quantitativer o-NPG-Test durchgeführt.

Aus der Ursprungstransformation wurden insgesamt 240 Kolonien auf neues SD-HALT-Medium ausgestrichen. Diese Kulturplatten wurden wie in Abb. 3.3 dargestellt so gestert, dass eine Identifizierung der Klone in allen folgenden Versuchen möglich wurde. Zusätzlich zur Ausplattierung auf SD-HALT-Medium wurden die Kolonien parallel auf SD-LT-Platten gestrichen, um eine Wachstumskontrolle zu haben.

Von den 240 auf Rasterplatten übertragenen primären Klonen waren noch 224 in der Lage, nach drei Übertragungsschritten auf dem Selektionsmedium zu wachsen. Da diese Zahl für eine komplette experimentelle Weiterführung zu hoch war und zudem in dieser Arbeit nicht der Anspruch gestellt wurde, eine möglichst komplette Anzahl an Interaktionspartnern zu identifizieren, sondern die Identifikation zellulärer Interaktionspartner lediglich einen Einblick in die mögliche Funktion des Proteins PLINP geben sollte, wurden nur 116 Klone in die nächsten Versuchsreihen übernommen.

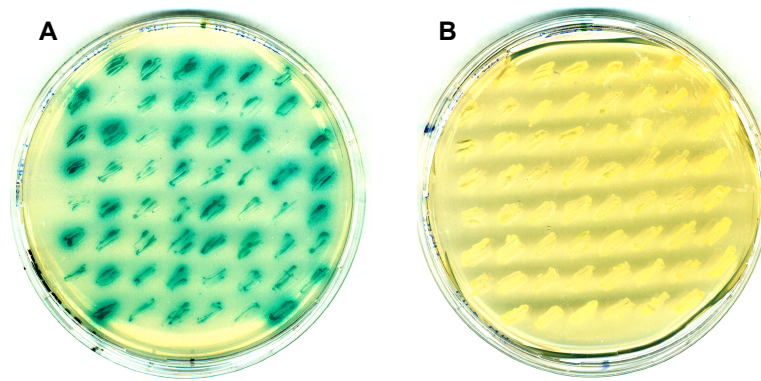


Abbildung 3.3: **Übertrag der transformierten Kolonien auf Rasterplatten und Kontrolle der Interaktion durch Zugabe von X- α -Gal.** Nach Transformation der cDNA-Bibliothek in den vorher mit pGBKT7-PLINP transformierten Hefestamm AH109 und anschließendem Wachstum auf SD-HALT- oder SD-HLT-Selektionsmedium wurden die gewachsenen Klone auf gerasterte neue SD-HALT-Platten übertragen, so dass jeder Klon in den folgenden Experimenten identifizierbar war. Den Selektionsplatten wurde zusätzlich X- α -Gal zugesetzt, so dass sich vorhandene Interaktionen durch eine Blaufärbung der Kolonien deutlich machten (**A**). Die Überprüfung des Klonwachstums erfolgte durch parallel durchgeführten Übertrag auf SD-LT-Selektionsplatten (**B**). Die Abbildung zeigt beispielhaft einen Ansatz mit 60 Klonen.

Im nächsten Schritt wurde aus den 116 Klonen die Plasmid-DNA, welche die cDNA aus der Bibliothek trägt, isoliert und folgend mittels Hitzeschocktransformation (2.2.1.6) in den *E.coli*-Stamm TG1 eingebracht. Nach Transformation mit diesen 116 Plasmiden wuchsen nur 44 Klone heran, mit denen weitergearbeitet wurde. Nach Amplifikation in den Bakterien wurden die Plasmide anschließend einzeln in den Hefestamm AH109, welcher nur das *bait*-Plasmid enthielt, rücktransformiert. Parallel wurden die Plasmide auch in Hefezellen transformiert, die das leere *bait*-Plasmid pGBKT7 tragen. Auf diese Weise war es möglich, diejenigen *prey*-Plasmide ausfindig zu machen, die unabhängig vom *bait* PLINP in der Lage waren, die Reportergene zu aktivieren, wie es zum Beispiel einigen Transkriptionsfaktoren möglich ist. Ein entstandenes Problem war darin zu sehen, dass möglicherweise vorhandene Interaktionen von Transkriptionsfaktoren zu PLINP durch die hier angewandte Strategie nicht identifiziert werden konnten. Nach Rücktransformation erwiesen sich von den 44 getesteten Plasmid-tragenden Klonen nur noch 14 als positiv. Alle anderen getesteten Klone waren nicht mehr in der Lage, nach Transformation in den den *bait*-Vektor enthaltenen Hefestamm AH109 auf SD-HALT-Minimalmedium zu wachsen. Die 14 verbliebenen Klone wurden einem o-NPG-Test unterworfen (siehe 2.2.5.5).

Der o-NPG-Test erlaubt eine semiquantitative Erfassung der Enzymaktivität mittels der Umsetzung des Substrates o-NPG durch das Enzym β -Galaktosidase in einen gelben Farbstoff, der photometrisch vermessen werden kann. Zur Berechnung der β -Galaktosidase-Einheiten, die ein Maß für die Interaktionsstärke bildet, muss das Absorptionsmaximum von o-NPG, welches bei 420 nm liegt, in die Formel eingesetzt werden.

Da in dieser Arbeit jedoch nur ein Filter von 405 nm Wellenlänge zur Verfügung stand, wurde mittels Literaturrecherche ein Vergleich zwischen der Absorption von o-NPG bei 405 und 420 nm angestellt und nur eine geringe, hier vernachlässigbare Absorptionsdifferenz festgestellt.

Für eine höhere Genauigkeit der Messungen wurden ausgehend von einer Kultur jeweils Triplets der verschiedenen Ansätze durchgeführt, die innerhalb der Messung zufällig verteilt waren, so dass die Auswirkungen der zeitabhängigen Farbreaktion minimiert werden konnten.

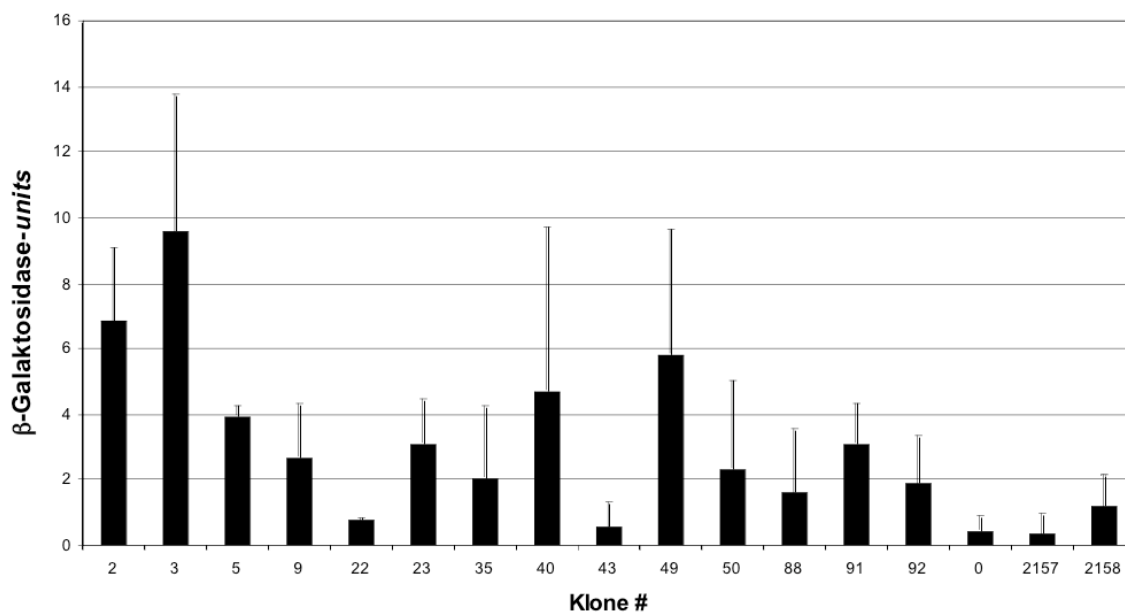


Abbildung 3.4: **Semiquantitativer o-NPG-Test zur Bestimmung der Interaktionsstärke der potentiellen PLINP-Bindungspartner.** Der o-NPG-Test kann die Aktivität der β -Galaktosidase durch die Interaktion von PLINP (*bait*) und einem Protein aus der cDNA-Bibliothek (*prey*) relativ quantifizieren. Die x-Achse zeigt die Nummern der Klone im Hefesystem sowie die Negativ-Kontrollen 0 (pGBKT7 im Hefestamm AH109), 2157 (pGBKT7-PLINP in AH109) und 2158 (pGBKT7-PMSP in AH109). Diejenigen Klone, die gegenüber den Negativkontrollen einen höheren Wert der β -Galaktosidase-units zeigten und zudem durch Analyse der bereits bekannten Eigenschaften interessant zu sein schienen, wurden in die nächsten Versuche übernommen.

Die Abbildung 3.4 zeigt, dass die durch die Klone #22 sowie #43 kodierten Proteine eine Interaktionsstärke zu PLINP aufwiesen, die vergleichbar mit dem Signal der Negativkontrollen im oNPG-Test waren. Alle anderen getesteten cDNA-Klone wiesen höhere Interaktionsstärken verglichen mit den Negativkontrollen auf.

3.1.2.4 Identität der positiven Klone des PLINP-Screenings

In dem folgendem Abschnitt wird die Identität der positiven Klone untersucht. Dazu wurden die Klone mittels Restriktionsanalyse über *Bgl*II daraufhin analysiert, ob möglicherweise Klone doppelt vorliegen und um die Größe der cDNAs zu erfassen (Ergebnisse

nicht gezeigt). Ein mehrfaches Vorliegen derselben cDNA in voneinander unabhängigen Klonen erhöht die Chance, dass eine echte Interaktion vorliegt. Kein Klon zeigte sich mehrfach als unabhängiger Interaktionspartner. Dies ist jedoch nicht ungewöhnlich, da wie bereits beschrieben von einer Vielzahl potentieller Klone bereits nach den ersten Versuchsschritten eine Auswahl getroffen werden mußte, so dass die Auffindung möglicherweise gleicher Proteine verloren gegangen sein könnte.

Parallel wurden die isolierten Klone sequenziert. Durch die Sequenzierung ist es nicht nur möglich, nach Identifikation der kodierten Proteine alle bisher vorhandenen Informationen zu diesem Protein abzurufen, sondern es besteht zudem die Möglichkeit, eventuell falsch positive Klone herauszufiltern. Im Vergleich zahlreicher bisher durchgeführter *Yeast Two-Hybrid Screenings* entstand eine Liste von Proteinen, die sich häufig als unspezifische Interaktoren herausstellten (siehe Tabelle 3.1).

Proteine	Anzahl gefundene Falsch-Positive	möglicherweise als echte Interaktoren angesehen	in anderen Tests als falsch-positiv gefunden
HSPs	16	5	–
Ribosomale Proteine	14	1	3
Cytochrom-Oxidase	5	–	1
Mitochondriale Proteine	3	1	2
Proteasom-Untereinheiten	4	3	–
Ferritin	4	–	2
tRNA Sythetase	3	–	1
Kollagen-bezogene Proteine	3	–	–
Zn-Finger-Proteine	3	4	2
Vimentin	2	–	–
Anorganische Pyrophosphatasen	2	–	–
PCNA	2	–	–

Tabelle 3.1: **Typische unspezifische prey-Proteine im Yeast Two-Hybrid Screening.** Die Tabelle, die der Quelle http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/main_false.html entstammt, zeigt eine Zusammenstellung von im *Yeast Two-Hybrid Screening* häufig gefundenen unspezifischen Bindungspartnern eines *bait*-Proteins. Diese Liste ist nicht vollständig oder statistisch abgesichert, gibt aber eine Möglichkeit auf Kontrolle der gefundenen Bindungspartner. Als ebenfalls falsch-positive Klone werden Elongationsfaktoren, Proteine des Zytoskeletts, rRNA-Klone, Ubiquitin und Lamin genannt.

Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Im Folgenden werden diese Klone einzeln beschrieben.

Bei der Sequenzierung zeigte sich übereinstimmend mit der Restriktionsanalyse, dass unter den vierzehn gefundenen Klonen keiner mehrfach vorhanden war. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im *Screening* einige typisch falsch positive Interaktionspartner nach Tabelle 3.1 identifiziert werden konnten (wie zum Beispiel Klon #5: Proteasom Untereinheit oder Klon #22: Kollagen). Ob diese Interaktionen möglicherweise doch real sind, ist individuell im Zusammenhang mit der vermuteten Funktion des *bait*-Proteins zu betrachten und wird in der Diskussion dieser Arbeit besprochen.

cDNA-Klon	abgeleitetes Protein nach EMBL-Genbank	Zugangsnr. Genbank	kodierte AS/ AS Volllänge/klon
#2	Sorting Nexin 4 (SNX4)	NM_003794	1-273/450
#3	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 3, epsilon	BT006894	3-358/358
#5	Proteasom-Untereinheit	BT006917	1-265/265
#9	KIAA1013 Protein, uncharakterisierte cDNA	AB023230	457-820/1035
#22	Kollagen, Typ XVII, alpha I	NM_130778	1101-1368/1497
#23	P5-1 Gen	AP000506	1-350/812
#35	Mitochondriales ribosomales Protein S12, Kernkodiert	NM_033362	1-138/138
#40	COP9 Signalosom Untereinheit 8 (CSN8)	U51205	1-150/209
#43	Klon DKFZp762M092	HSM803731	37-323/323
#49	Kollagen, Typ XVII, alpha I	NM_130778	69-258/1497
#50	Lipocalin 7 (LCN7); TIN-Ag-RP	NM_022164	258-483/467
#88	40 kDa Keratin Intermediat Filament Vorstufe	J03607	4-260/400
#91	Keratin 18 (KRT18)	NM_000224	1-190/470
#92	EAP30 Untereinheit des ELL Komplexes (EAP30)	NM_007241	1-247/258

Tabelle 3.2: **Übersicht der 14 isolierten potentiellen Interaktionspartner von PLINP.** Die vermutlich falsch positiven Klone sind in roter Schrift, die für diese Arbeit interessanten potentiellen Partner von PLINP in blauer Schrift dargestellt.

3.1.2.5 Beschreibung der isolierten cDNAs mittels veröffentlichter Daten und Computeranalysen

Die Funktion der potentiellen PLINP-Interaktionspartner kann eine Vorstellung der möglichen Interaktion und damit der Funktion von PLINP geben.

3.1.2.5.1 cDNA-Klon #2: Sorting Nexin 4 (SNX4)

Die Funktion dieses Proteins, welches durch Haft *et al.* beschrieben wurde, ist bis heute weitestgehend unbekannt (Haft *et al.*, 1998). Es kodiert für ein Mitglied der Sorting Nexin-Familie, von der Varianten auch in *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces cerevisiae* gefunden wurden. Mitglieder dieser Familie werden durch das Vorhandensein einer ca. 100 Aminosäuren langen Phox-Domäne (PX) charakterisiert, bei welcher es sich um eine Phosphoinositid-bindende Domäne handelt, die eine Rolle beim intrazellulären Transport spielt. Diese hydrophilen Moleküle sind teilweise Membran-assoziiert. Sorting Nexin 4 assoziiert mit der langen Isoform des Leptin-Rezeptors sowie mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen für den *platelet-derived growth factor*, Insulin und den epidermalen Wachstumsfaktor in Zellkulturen. Dieses Protein formt möglicherweise oligomere Komplexe mit anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie und spielt eine Rolle bei der Endozytose (Parks *et al.*, 2001).

Da es sich bei Sorting Nexin 4 wahrscheinlich um ein Protein handelt, welches beim intrazellulären Transport eine Rolle spielt, ist es möglich, dass PLINP durch Sorting Nexin 4 direkt oder indirekt in der Zelle transportiert wird.

3.1.2.5.2 cDNA-Klon #3: Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 3, Untereinheit 5, Epsilon

Der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 3 (eIF3) spielt eine essentielle Rolle bei der aus fünf großen Schritten bestehenden Initiation der eukaryotischen Proteinsynthese. Diese Initiationsphase wird von mindestens zehn Translationsfaktoren vorangetrieben. eIF3 ist ein großer aus zehn oder mehr Untereinheiten bestehender Komplex, welcher an die 40S ribosomale Untereinheit anknüpft (Brown-Luedi *et al.*, 1982). Hier initiiert er die Bindung von Methionyl-tRNA_i und mRNA und spielt somit eine zentrale Rolle bei der beginnenden Proteinsynthese. Teile des eIF3, so auch eIF3e, konnten in Zusammenhang mit Krebs gebracht werden, da sie in einer Vielzahl von Tumoren eine Überexpression zeigten.

Studien zeigten eine erhöhte Expression eines eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors (eIF4) unter Einfluss einer Infektion mit Adenovirus Typ 12 (Dorn *et al.*, 2005). Interessanterweise gibt es eine Verbindung zwischen den cDNA-Klonen #3 und #40, welcher für ein Peptid des COP9 Signalosoms (CSN) kodiert. Studien beschreiben nach einer Ko-Aufreinigung eine Assoziation zwischen dem COP9 Signalosom (CSN1, CSN7, and CSN8) und zwei Untereinheiten des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 3 (eIF3), eIF3e (p48, auch bekannt als INT-6) und eIF3c (p105) (Yahalom *et al.*, 2001). Diese Interaktion wird als translationale Kontrolle durch das COP9 Signalosom diskutiert. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Interaktion von eIF3, CSN und dem Proteasom beschrieben (Watkins & Norbury, 2004). Teile all dieser Proteine wurden innerhalb dieses *Screenings* identifiziert.

Der gefundene cDNA-Klon #3 deckt den kompletten kodierenden Bereich des Proteins ab, der 1074 bp beträgt. Eine Interaktion von PLINP mit der Epsilon-Untereinheit des eIF3 würde auf eine Beteiligung von PLINP bei der Initiation der Proteinsynthese hindeuten. Sowohl Teile des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors (z.B. eIF3e) als auch Teile des COP9 Signalosoms (z.B. CSN7) sind dabei partiell im Zytoplasma und im Zellkern zu finden. Dort ließe sich dann auch eine Interaktion mit PLINP vermuten.

3.1.2.5.3 cDNA-Klon #5: Proteasom-Untereinheit, β -Typ, 4

Untereinheiten des Proteasoms sind, wie in Tabelle 3.1 benannt, typisch falsch positive Interaktionspartner des *Yeast Two-Hybrid Screenings*. Der Klon #5 wurde aus diesem Grund nicht nähergehend untersucht. Zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit stellte sich allerdings heraus, dass eine Interaktion zwischen eIF3, CSN und dem Proteasom besteht (Watkins & Norbury, 2004). Teile all dieser Multiprotein-Komplexe wurden im *Yeast Two-Hybrid Screening* von PLINP identifiziert. Somit ist denkbar, dass die Interaktion von PLINP mit der β -Untereinheit des Proteasoms real ist.

3.1.2.5.4 cDNA-Klon #9: KIAA1013 Protein, uncharakterisierte cDNA

Diese bis heute nicht weiter beschriebene cDNA wurde im Zuge einer Vorhersage neuer unbekannter Klone aus cDNA-Bibliotheken des Gehirns isoliert und identifiziert (Nagase *et al.*, 1999). Existenzen einer FERM-Domäne, die eine Bindung zu Transmembranproteinen initiieren kann, sind vorausgesagt. Der C-terminale Teil des Proteins besitzt Homologien zu murinem GRP1-bindendem Protein (GRSP1). GRP1 (Glycin-reiches Protein 1) ist ein Protein der Signalkaskaden und stellt einen ARF-Austauschfaktor dar. Da in dieser Arbeit der Fokus auf die zelluläre Funktion von PLINP vor allem im Hinblick auf HPV L2 gesetzt werden sollte, wurde darauf verzichtet, bisher unbekannte cDNAs zu untersuchen. Der cDNA Klon #9 wurde deshalb nicht in Folgeexperimente aufgenommen.

3.1.2.5.5 cDNA-Klon #22 und #49: Kollagen, Typ XVII, α 1

Die cDNA-Klone #22 und #49, welche für Teile eines Kollagen-Typs kodieren, stellen, wie in Tabelle 3.1 ersichtlich, typisch falsch-positive Interaktionspartner des Hefe-Screenings dar. Daher wurden diese Klone nicht weiter untersucht.

3.1.2.5.6 cDNA-Klon #23: P5-1 Gen; HLA Klasse I-Region

Das P5-1 Gen stellt ein Exon der HLA Klasse I-Region dar, die im Genom des Menschen auf Chromosom 6 an der Stelle p21.3 lokalisiert ist. In ihrer Sequenz ist die P5 Multi-Kopienfamilie mit mindestens acht Mitgliedern mit den humanen endogenen Retroviren HERV-L und HERV-16 verwandt (Kulski & Dawkins, 1999). Bisherige Studien konnten noch nicht die Funktion der P5 Gene aufdecken, jedoch zeigten sich erhöhte Expressionsraten in lymphoiden Zellen. Die Homologie zu endogenen Retroviren zeigt sich mit 60% Sequenzidentität in der Pol-Region des HERV-L, jedoch kaum in den Gag- und LTR-Regionen. Weiterhin wurden Sequenzhomologien zu retroviraler pol mRNA identifiziert. Analysen der offenen Leserahmen (ORF: *open reading frame*) zeigten viele Stop-Codons und kurze putativ kodierende Regionen, die sowohl in der Sequenz von HERV-L als auch in HLA Klasse I-Genen zu finden sind. Eine Region am 5'-Ende der P5-1 mRNA zeigt große Homologie zum Signalpeptid von HLA-Molekülen. Zusammenfassend wird über die Rolle von P5-1 als *Antisense*-Transkript über eine mögliche Rolle bei der Immunität zu retroviraler Infektion diskutiert.

Dieser Klon stellt einen für die Arbeit besonders interessanten potentiellen Interaktionspartner dar, weil PMSP ebenfalls einen Teil des P5-1 Gens darstellt. Deshalb ist es möglich, dass eine Verbindung zwischen der Interaktion von PLINP und HPV L2 mit PMSP und HPV L2 besteht. Dies wird im folgenden Kapitel genauer diskutiert.

3.1.2.5.7 cDNA-Klon #35: Mitochondriales ribosomales Protein S12, Transkript-Variante 2, kern-kodiert

Der Klon #35 ist als mitochondriales Protein ein potentieller falsch-positiver Interaktionspartner (siehe Tabelle 3.1). Deshalb wurde eine mögliche Interaktion zu diesem Klon nicht weiterverfolgt. Jedoch stellte sich im späteren Verlauf dieser Arbeit ein Zusammenhang von PLINP zu Mitochondrien heraus, weshalb dieser Klon für zukünftige Arbeiten einen interessanten Kandidaten darstellen könnte.

3.1.2.5.8 cDNA-Klon #40: COP9 Signalosom Untereinheit 8 (CSN8)

Die achte Untereinheit des COP9 Signalosoms (CSN8) wurde ursprünglich bei Untersuchungen an der Pflanze *Arabidopsis thaliana* identifiziert und als ubiquitär im Pflanzen- und Tierreich befunden (Chamovitz & Deng, 1995). CSN8 ist die kleinste von insgesamt acht Untereinheiten des Komplexes, die ein Homolog zu einem Unterkomplex des 26S Proteasoms darstellt und somit als Regulator im Ubiquitin-Proteasom-Weg fungiert (Lykke-Andersen & Wei, 2003). Das COP9 Signalosom ist durch die Assoziation mit dem CUL4A-DDB1-Komplex in die Ubiquitinierung involviert. Cul4A ist ein Mitglied der Cullin-Familie der E3 Ubiquitin Ligasen und DDB1 eine Untereinheit des *damaged-DNA-binding*-Proteins (Bondar *et al.*, 2006). CSN2 und CSN5 zeigten sich zudem als essentiell für die Zellproliferation in *Dictyostelium discoideum*, einem zellulären Schleimpilz, der sich an der Grenze zwischen einzelligen und vielzelligen Eukaryoten befindet (Rosel & Kimmel, 2006). Die Rolle von CSN in der Entwicklung von Vertebraten ist bisher weiterhin nicht geklärt. Immunfluoreszenzstudien bei der Embryonalentwicklung von Mäusen konnten belegen, dass CSN8 hauptsächlich in der inneren Zellmasse (ICM: *inner cell mass*) von E3.5 Blastozysten vorkommt und weitgehend in E9.5 Tage alten Embryos exprimiert wird (Lykke-Andersen & Wei, 2003).

Interessanterweise gibt es wie auch schon bei cDNA-Klon #3 beschrieben, eine Assoziation zwischen dem COP9 Signalosom (CSN1, CSN7, and CSN8) und zwei Untereinheiten des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 3 (eIF3), eIF3e (p48, auch bekannt als INT-6) und eIF3c (p105). Dabei scheinen Komponenten wie etwa CSN7 zu existieren, die kein Teil des COP9 Signalosom-Kernkomplexes sind, da die Lokalisation dieser Komponenten nicht nur auf das Zytoplasma der Zelle reduziert ist, sondern sich auch partiell im Zellkern findet. Dort kolokalisieren sie vermutlich mit Untereinheiten des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors wie beispielsweise eIF3e. Studien postulieren in diesem Zusammenhang die translationale Kontrolle durch das COP Signalosom (Yahalom *et al.*, 2001).

Eine Verbindung existiert zudem zum Proteasom, dessen Untereinheit auch im Rahmen dieses Screenings identifiziert werden konnte (Watkins & Norbury, 2004). Watkins *et*

al. konnten eine Interaktion zwischen eIF3, CSN und dem Proteasom aufzeigen. Eine Interaktion von PLINP mit der achten Untereinheit des COP Signalosoms wäre im Zusammenhang mit dessen Interaktion zu dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor und zum Proteasom zu sehen. Hier wäre wie bei den beiden Komponenten allein ein Kontrollmechanismus für die Translation zu vermuten.

3.1.2.5.9 cDNA-Klon #43: Klon DKFZp762M092

Bei cDNA-Klon #43 handelt es sich um einen nicht weiter beschriebenen Klon einer cDNA-Bibliothek des Menschen. Wie bereits bei vorherigen nicht charakterisierten Klonen erklärt, wurden diese Klone nicht in die weiterführenden Untersuchungen übernommen.

3.1.2.5.10 cDNA-Klon #50: Lipocalin 7 (LCN7); TIN-Ag-RP

Dieser Klon kodiert für einen Teil des Lipocalin7 (LCN7) beziehungsweise für TIN-Ag-RP (*tubulointerstitial nephritis antigen-related protein*). Die Identifikation erfolgte als extrazelluläres Matrix-Protein zunächst durch Zhang, K.M. und Chen, B.S. (nicht publiziert) und wurde durch Bromme *et al.* weiter charakterisiert (Bromme *et al.*, 2000). Das Protein wurde später durch Wex *et al.* als Cadhepsin B-verwandtes Protein ohne katalytische Aktivität mit 46% Sequenzidentität mit dem humanen TIN-ag (*tubulointerstitial nephritis antigen*) beschrieben (Wex *et al.*, 2001). Lipocaline sind Transportproteine. Sie sind ubiquitär verbreitet und in viele essentielle Zellprozesse eingebunden. Die funktionale Wirksamkeit erfolgt über einen Trichtermechanismus, in den lipophile Substanzen aufgenommen und festgehalten werden können. Lipocaline sind mit rund 180 Aminosäuren verhältnismäßig klein und ihr Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt.

Der Klon #50 kodiert für den C-terminalen Teil des Proteins. In der Sequenz des Klons sind damit der Cadhepsin B-ähnliche Teil, nicht jedoch das Signalpeptid für die Sezernierung sowie andere Domänen wie die Cystein-reiche Domäne enthalten.

3.1.2.5.11 cDNA-Klon #88: 40 kDa Keratin Intermediat Filament Vorstufe

Der Klon #88 wurde 1988 als Teil eines menschlichen Keratin-Proteins mit einer hohen Sequenzhomologie zu Rinder-Keratin identifiziert (Eckert, 1988). Keratine sind Strukturproteine der Zelle, die für dessen Stabilität und Form verantwortlich sind. Sie bilden unter anderem als Intermediärfilamente, Mikrotubuli und Mikrofilamente das Zytoskelett der Zellen. Zusammen mit den Kollagenen bilden sie die Gruppe der Skleroproteine. Eine Interaktion von PLINP mit dem Zytoskelett der Zelle ist insoweit möglich, wenn

man PLINP als mögliche strukturgebende Komponente ansieht. So ließe sich eine Interaktion von PLINP mit L2 erklären, wenn PLINP möglicherweise eine intrazelluläre Transportfunktion erfüllte. Da zudem in diesem *Screening* zwei voneinander unabhängige Keratin-Klone (#88 und #91) identifiziert werden konnten, spricht dies dafür, dass die Interaktion real sein könnte. Dieser Klon wurde deshalb in die weiteren Versuche zur subzellulären Lokalisation und Kolokalisation mit PLINP aufgenommen.

3.1.2.5.12 cDNA-Klon #91: Keratin 18

Der Klon #91 gehört wie der zuvor beschriebene Klon #88 zur Gruppe der Zytokeratine, die als Strukturproteine die Zellform und Stabilität aufrecht erhalten. Dabei bildet Keratin 18 zusammen mit Keratin 8 einen funktionalen Komplex in der Gruppe der Intermediatfilamente. Die Proteine werden in einzelschichtigen Epithelgeweben exprimiert. Keratin 18 konnte zusätzlich mit einigen Krebsarten, wie zum Beispiel dem Adenokarzinom, in Zusammenhang gebracht werden. Studien belegten die Überexpression sowie die Spaltung von Zytokeratin 8/18 zur Freilegung eines neuen Epitops in Adenokarzinomen (Ditzel *et al.* , 2002). In verschiedenen Typen des Lungenkarzinoms findet sich ebenfalls eine veränderte Expression von Keratin 18 sowie von Desmoplaktin 1 und 2, die eine interzelluläre Verbindung der Zellen im Gewebe gewährleisten (Young *et al.* , 2002).

Wie bereits bei Klon #88 beschrieben, wird auch Klon #91 in die weiteren Versuche übernommen, da eine Funktion von PLINP für den intrazellulären Transport oder als stabilitätsgebendes Protein vorstellbar ist.

3.1.2.5.13 cDNA-Klon #92: EAP30 Untereinheit des ELL Komplexes

ELL ist ein RNA Polymerase II-Transkriptionsfaktor. Zusammen mit zwei anderen Proteinen bildet es den ELL-Komplex. Dieser Komplex erhöht die katalytische Aktivität der RNA Polymerase bei der Elongation. ELL allein ist in der Lage, die Transkriptionsinitiation zu inhibieren, wofür EAP30 verantwortlich gemacht wird (Schmidt *et al.* , 1999). In der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* konnte gezeigt werden, dass EAP30 die Amplifikation der meiotischen Spindelpole blockt (Jin *et al.* , 2005).

PLINP könnte durch Interaktion mit EAP30 an der Inhibierung der Transkriptionsinitiation beteiligt sein; dies wäre konform mit der postulierten Aufgabe von PLINP als negativer Regulator der Zellzyklusweiterführung und des Zellwachstums. Somit stellt der Klon #92 einen erfolgversprechenden Kandidaten für eine Interaktion mit PLINP dar und wird in den nächsten Versuchen detaillierter analysiert.

3.1.2.6 Vergleich der positiven Klone mit potentiellen Interaktionspartnern von HPV L2

Ausgehend von der Tatsache, dass PLINP einen mittels *Yeast Two-Hybrid Screening* gefundenen Interaktionspartner von HPV L2 darstellt und an der Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen möglicherweise direkt oder indirekt weitere Proteine beteiligt sein können, wurde untersucht, ob PLINP und L2 möglicherweise gleiche Interaktionspartner besitzen. Deshalb wurden die Ergebnisse der *Screenings* der verschiedenen HPV-Typen und PLINP miteinander verglichen.

Das *Yeast Two-Hybrid Screening* von PLINP brachte einen cDNA-Klon des Lipocalin 7 beziehungsweise des TIN-Ag-RP (#50) hervor. Vorherige Studien zur Identifikation von Interaktionspartnern des Nebenkapsidproteins L2 verschiedener HPV-Typen konnten das gleiche Protein als potentiellen Interaktionspartner von HPV1, HPV11 und HPV16 L2 finden. Sowohl der im PLINP-*Screening* als auch der im L2-*Screening* gefundene Klon kodieren dabei für den C-Terminus des Proteins, also für den Cadhepsin B-ähnlichen Bereich des TIN-Ag-RP. Vorherige Studien zeigten bereits eine Analyse der Koexpression von TIN-Ag-RP und HPV16 L2. Obwohl das TIN-Ag-RP-Protein in die Zellperipherie sezerniert wird und somit kein Kontakt zu dem kernlokalisierten L2 zu erwarten ist, finden sich einige Zellen, in denen TIN-Ag-RP im inneren Bereich des Zytoplasmas zu finden ist und dort mit L2 kolokalisiert. Es wird vermutet, dass es sich hier um nicht korrekt gefaltetes oder vor der Sekretion aggregiertes Protein handelt und somit eine Interaktion nicht die natürliche Situation widerspiegelt. Dennoch ist es auffällig, dass wahrscheinlich auch PLINP mit TIN-Ag-RP interagiert und bleibt zu diskutieren.

3.1.2.7 Lokalisation der Interaktoren-EGFP-Fusionsproteine in Säugerzellen

Die in den vorherigen Versuchen erhaltenen Ergebnisse ergaben sechs interessante Klone, die betreffend ihrer potentiellen Interaktion mit PLINP im authentischen Umfeld der menschlichen Zelle detaillierter untersucht werden sollten. Die von den Klonen kodierten Proteine sollten daher als EGFP-Fusionsproteine in Säugetierzellen exprimiert werden. So ist es auch ohne spezifischen Antikörper möglich, die Lokalisation der potentiellen Interaktionspartner mit und ohne Einfluss von überexprimiertem PLINP zu untersuchen. Dies erlaubt Schlussfolgerungen auf die funktionelle Interaktion der beschriebenen Proteine und PLINP. Zu beachten ist bei dieser Art der Analyse jedoch immer, dass es bei den EGFP-Fusionsproteinen zu einer veränderten Faltung des Proteins kommen kann, was mit anderen Lokalisations- oder Interaktionseigenschaften einhergehen kann.

Die cDNAs der Klone #2, #3, #50, #88, #91 und #92 wurden mittels der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BglII* im Insert bzw. *BamHI* auf dem pEGFP-C3-Vektor in den Zielvektor umklontiert. Abbildung 3.5 zeigt die Restriktion der Klone.

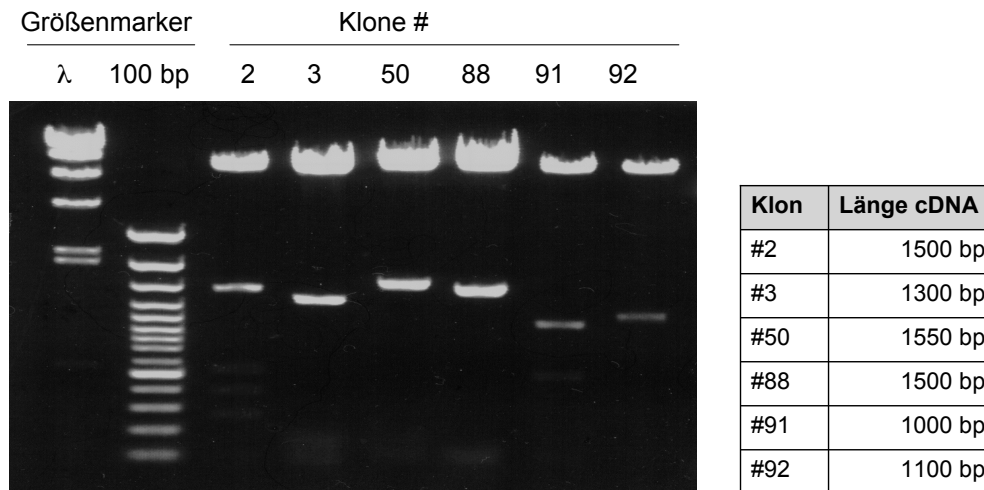


Abbildung 3.5: **Größe der potentiellen Interaktionsklone von PLINP, die für weitere Versuche in das Expressionsplasmid pEGFP umklontiert werden sollen.** Die cDNAs #2, #3, #50, #88, #91 und #92 konnten mittels der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BglII* aus dem Vektor pACT2 geschnitten werden. Die Abbildung zeigt die Auftrennung der Fragmente in einem 1%igen Agarosegel sowie eine tabellarische Übersicht über die Länge der cDNAs bei den einzelnen Klonen.

Um die Expression der Fusionsproteine zu überprüfen, wurden die Konstrukte mittels Transfektion nach Chen/Okayama (siehe 2.2.6.4) in 293T-Zellen eingebracht und nach 48 Stunden die Menge und Größe der exprimierten Proteine überprüft. Wie in Abbildung 3.6 und im Vergleich der experimentell bestimmten sowie errechneten Werte der Proteingrößen in Tabelle 3.3 zu erkennen ist, entsprechen die erhaltenen Daten im Fall von cDNA-Klon #3, #50, #91 und #92 den errechneten Molekulargewichten. Die Werte des cDNA-Klons #3 weicht mit ca. 30 kDa erheblich vom errechneten Molekulargewicht ab.

Klon #	MW lt. Gel/ ohne GFP [kDa]	errechnetes MW Klon/ ohne GFP [kDa]	Übereinstim- mung
2: SNX4	86/54	87/55	ja
3: eIF3	86/54	86/54	ja
50: LCN7	86/54	102/70	(ja)
88: 40 kDa, Keratin	65/33	99/67	nein
91: KRT18	70/38	69/37	ja
92: EAP30	70/38	73/41	ja

Tabelle 3.3: **Vergleich der experimentell bestimmten apparenten und errechneten Molekulargewichte der EGFP-Fusionsproteine.** Die Tabelle zeigt die in der Western Blot-Analyse bestimmten Molekulargewichte der EGFP-Fusionsproteine sowohl wie im Gel sichtbar als auch ohne GFP-Anteil. Verglichen werden diese Werte mit den Molekulargewichten, die sich aus der Aminosäuresequenz errechnen lassen. SNX4, eIF3, LCN7, KRT18 und EAP30 zeigten übereinstimmende Werte. Die Expression des 40 kDa Keratin zeigt keine Übereinstimmung der erhaltenen zur errechneten Größe der Proteine.

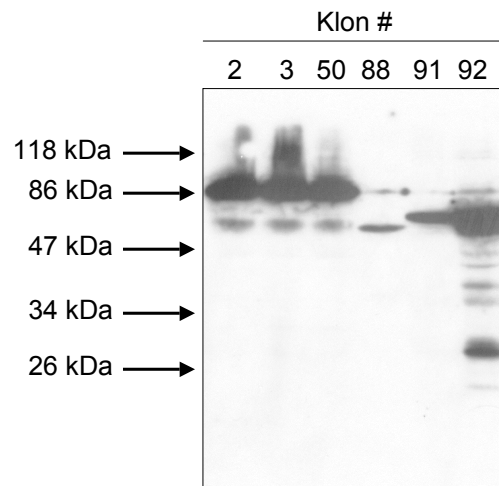


Abbildung 3.6: **Die Größe der potentiellen Interaktionsklone von PLINP im Western Blot weicht bei einem cDNA-Klon erheblich von der errechneten Größe ab.** Die cDNAs #2, #3, #50, #88, #91 und #92 wurden nach 48-stündiger Expression in 293T-Zellen für eine Western Blot-Analyse präpariert. Die Klon #88 zeigt einen von den errechneten Größe abweichenden Wert, die kodierten Proteine der anderen Klone zeigen erwartete Expressionen. Der Nachweis erfolgte über einen anti-GFP-Antikörper in einer 1:10.000 Verdünnung sowie GARPO (1:3.000).

Lokalisation der überexprimierten PLINP-Interaktionspartner in der Zelle und Koexpression mit PLINP

Die PLINP-Interaktionspartner wurden als EGFP-Fusionsproteine in 293T-Zellen exprimiert und die subzelluläre Lokalisation in der Zelle analysiert. Zudem wurde die Lokalisation unter Koexpression von unfusioniertem PLINP untersucht. Im Fall von EGFP-Sortin-Nexin 4 konnte trotz Nachweis der Expression im Western Blot keine Autofluoreszenz in der mikroskopischen Analyse detektiert werden. Da aus Zeitgründen die Klonierung des EGFP-SNX4-Konstruktes nicht wiederholt werden konnte, fließt die subzelluläre Analyse dieses Klons nicht in die Ergebnisse dieser Arbeit ein.

Die überexprimierte Epsilon-Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 3 (eIF3) ist in 293T-Zellen partiell nukleär und zytoplasmatisch lokalisiert (Abbildung 3.7 A). Bei Koexpression von PLINP findet eine Kolo-kalisation im Zellkern statt. Das zytoplasmatisch lokalisierte eIF3 kolo-kalisiert ebenso wie das kernlokalisierte eIF3 mit PLINP (Abbildung 3.7 B-D). Eine Interaktion zwischen eIF3 und PLINP ließe sich deshalb sowohl im Kern als auch im Zytoplasma der Zelle vermuten. In einem möglichen funktionalen Komplex mit eIF3, dem COP9 Signalosoms und dem Proteasom wäre also eine Interaktion mit PLINP denkbar.

Lipocalin 7 (LCN7), welches auch unter dem Synonym TIN-Ag-RP (*tubulointerstitial nephritis antigen (TIN-ag)-related protein*) beschrieben wurde, lokalisiert in 293T-Zellen im Kern und dort partiell in punktartigen Strukturen (Abbildung 3.8 A). Koexprimiert man unfusioniertes PLINP, so ändert sich die Lokalisation von LCN7 in der Zelle nicht

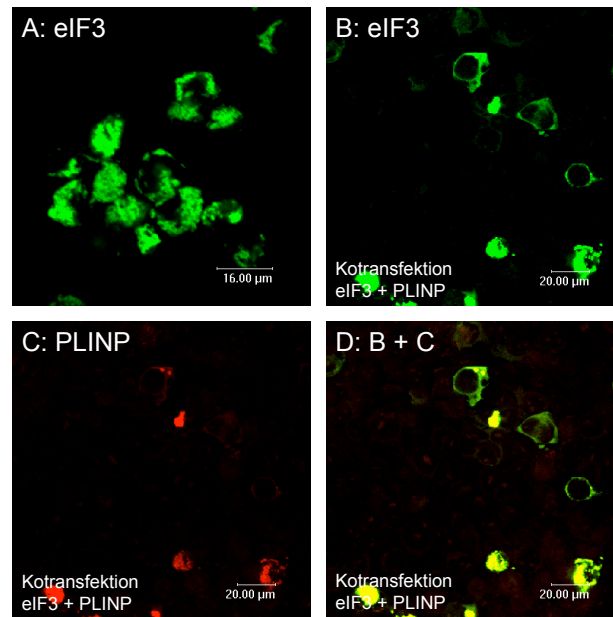


Abbildung 3.7: **Subzelluläre Lokalisation von EGFP-eIF3 (Klon #3) und PLINP in 293T-Zellen.** EGFP-eIF3 ist teilweise zytoplasmatisch und diffus im Kern lokalisiert. Im Zellkern kolokalisiert das EGFP-eIF3-Protein mit überexprimiertem unfusioniertem PLINP. **A:** Lokalisation von EGFP-eIF3 ohne PLINP-Koexpression; **B-D:** Koexpression von EGFP-eIF3 und PLINP; **B:** Lokalisation von EGFP-eIF3; **C:** Lokalisation von unfusioniertem PLINP; Nachweis durch OFR1 #57 (1:5) / Ziege- α -Ratte Cy3 (1:400); **D:** Überlagerung von B und C

(Abbildung 3.8 B-D). Es findet sich eine Kolokalisation mit PLINP in Strukturen, die möglicherweise PODs darstellen, aber nicht genau zugeordnet werden konnten. Wenn sich diese Strukturen in späteren Analysen als PODs herausstellten, wäre dies ein guter Hinweis auf eine reale Interaktion der beiden Proteine *in vivo*, da PLINP in diesen distinkten Kerndomänen weitere Interaktionspartner hat. Auch die Interaktion mit L2 findet sehr wahrscheinlich in Assoziation zu PODs statt.

Der Klon des 40 kDa-Keratins ist teils zytoplasmatisch, teils membrangebunden lokalisiert (Abbildung 3.9 A). In nicht weiter bestimmbar Regionen in Kernnähe kolokalisiert das 40 kDa-Keratin mit unfusioniertem PLINP (Abbildung 3.9 B-D). Dabei zeigt sich das Lokalisationsmuster von PLINP in Bezug zu seiner normalen Verteilung in der Zelle verändert (siehe dazu Abbildung 3.32). So scheint PLINP aus dem Kern der Zelle völlig verschwunden und ausschließlich im Zytoplasma zu finden sein. Bei der Analyse der subzellulären Lokalisation von EGFP-Keratin 40 kDa ist zu beachten, dass die Expression dieses Proteins ein circa 30 kDa höheres Molekulargewicht als das Erwartete zeigt. Deshalb ist die Auswertbarkeit dieser Daten fraglich.

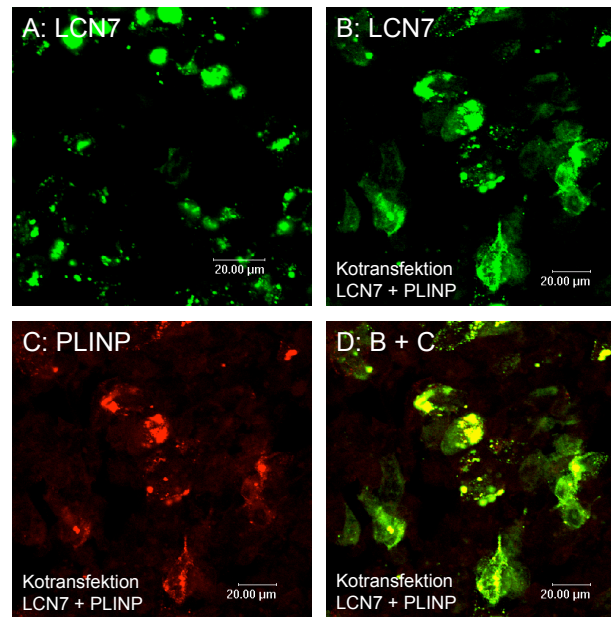


Abbildung 3.8: **Subzelluläre Lokalisation von EGFP-LCN7 (Klon #50) und PLINP in 293T-Zellen.** EGFP-LCN7 zeigt in der Zelle eine zum Teil diffuse und punktartige Verteilung im Zellkern. Bei Koexpression von unfusioniertem PLINP finden sich an einigen Stellen Kolokalisationen zwischen den beiden Proteinen, die jedoch nicht genauer definiert werden konnten. **A:** Lokalisation von EGFP-LCN7 ohne PLINP-Koexpression; **B-D:** Koexpression von EGFP-LCN7 und PLINP; **B:** Lokalisation von EGFP-LCN7; **C:** Lokalisation von unfusioniertem PLINP; Nachweis durch OFR1 #57 (1:5) / Ziege- α -Ratte Cy3 (1:400); **D:** Überlagerung von B und C

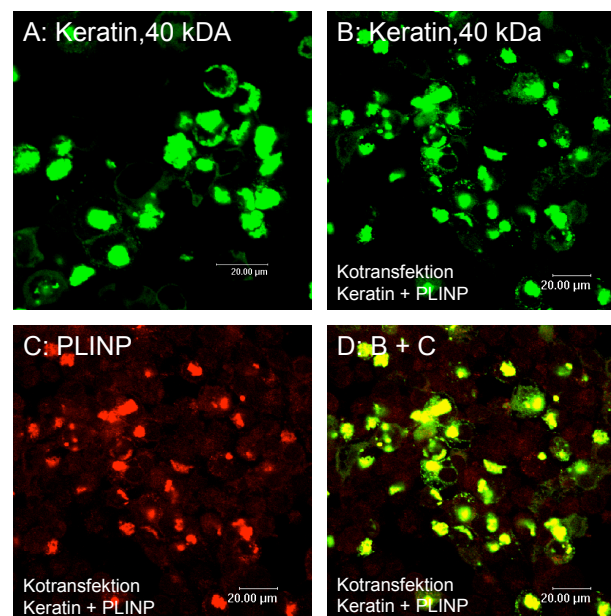


Abbildung 3.9: **Subzelluläre Lokalisation von EGFP-Keratin, 40 kDa (Klon #88) und PLINP in 293T-Zellen.** EGFP-40 kDa-Keratin ist als zelluläres Matrix-Protein sowohl zytoplasmatisch als auch membrangebunden lokalisiert. Unfusioniertes PLINP kolokalisiert in der Kernregion mit dem 40 kDa-Keratin. **A:** Lokalisation von EGFP-Keratin, 40 kDa ohne PLINP-Koexpression; **B-D:** Koexpression von EGFP-Keratin, 40 kDa und PLINP; **B:** Lokalisation von EGFP-Keratin, 40 kDa; **C:** Lokalisation von unfusioniertem PLINP; Nachweis durch OFR1 #57 (1:5) / Ziege- α -Ratte Cy3 (1:400); **D:** Überlagerung von B und C

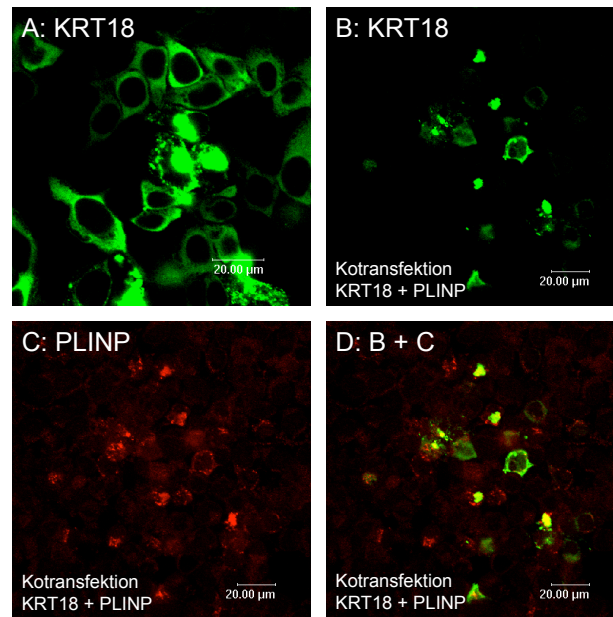


Abbildung 3.10: **Subzelluläre Lokalisation von EGFP-Keratin18 (Klon #91) und PLINP in 293T-Zellen.** EGFP-Keratin18 ist rein zytoplasmatisch lokalisiert und kolokalisiert nicht mit unfusioniertem PLINP, wenn dieses in 293T-Zellen koexprimiert wird. **A:** Lokalisation von EGFP-Keratin18 ohne PLINP-Koexpression; **B-D:** Koexpression von EGFP-Keratin18 und PLINP; **B:** Lokalisation von EGFP-Keratin18; **C:** Lokalisation von unfusioniertem PLINP; Nachweis durch OFR1 #57 (1:5) / Ziege- α -Ratte Cy3 (1:400); **D:** Überlagerung von B und C

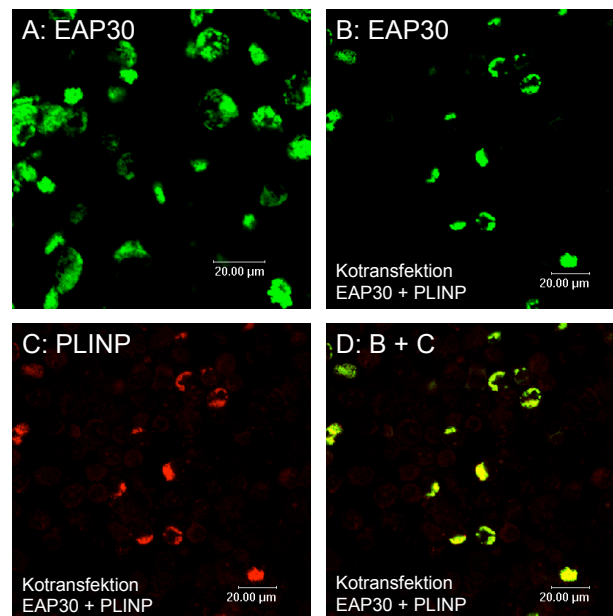


Abbildung 3.11: **Subzelluläre Lokalisation von EGFP-EAP30 (Klon #92) und PLINP in 293T-Zellen.** EGFP-EAP30 ist im Zellkern lokalisiert und kolokalisiert mit PLINP in bestimmten Bereichen des Zellkerns, wenn dieses Protein koexprimiert wird. **A:** Lokalisation von EGFP-EAP30 ohne PLINP-Koexpression; **B-D:** Koexpression von EGFP-EAP30 und PLINP; **B:** Lokalisation von EGFP-EAP30; **C:** Lokalisation von unfusioniertem PLINP; Nachweis durch OFR1 #57 (1:5) / Ziege- α -Ratte Cy3 (1:400); **D:** Überlagerung von B und C

EGFP-Keratin18 ist ausschließlich im Zytoplasma von 293T-Zellen zu finden (Abbildung 3.10 A). Das zelluläre Matrixprotein kolokalisiert an wenigen Stellen mit überexprimiertem unfusioniertem PLINP (siehe Abbildung 3.10 B-D).

EGFP-EAP30 findet man in der Zelle in einer diffusen nukleären Verteilung (Abbildung 3.11 A). Das Protein kolokalisiert mit koexprimiertem PLINP in bestimmten Bereichen im Zellkern (siehe Abbildung 3.11 B-D).

Lokalisation der überexprimierten PLINP-Interaktionspartner in der Zelle und Koexpression mit HPV16 L2

Die PLINP-Interaktionspartner wurden in 293T-Zellen exprimiert und die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine in der Zelle unter Einfluss von koexprimiertem HPV16 L2 untersucht. So ergeben sich möglicherweise Anhaltspunkte für eine Verbindung zwischen PLINP, L2 und dem entsprechenden PLINP-Interaktionspartner. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit codon-optimiertem HPV16 L2 gearbeitet. Die verbesserte Expression von L2 verglichen mit der viralen Variante ist bei der Beurteilung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

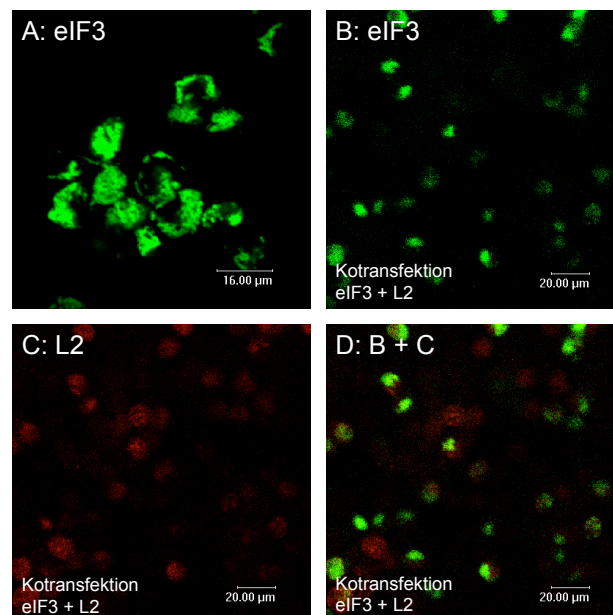


Abbildung 3.12: **Subzelluläre Lokalisation von EGFP-eIF3 (Klon #3) und HPV16 L2 in 293T-Zellen.** EGFP-eIF3 lokalisiert partiell im Zytoplasma und im Kern der Zelle in einer jeweils diffusen Verteilung und kolokalisiert nicht mit HPV16 L2, wenn dieses koexprimiert wird. eIF3 wird jedoch von L2 in seiner Lokalisation beeinflusst. **A:** Lokalisation von EGFP-eIF3 ohne L2-Koexpression; **B-D:** Koexpression von EGFP-eIF3 und L2; **B:** Lokalisation von EGFP-eIF3; **C:** Lokalisation von HPV16 L2; Nachweis durch Serum #20 (1:500) / Ziege- α -Kaninchen Cy3 (1:400); **D:** Überlagerung von B und C

Das partiell nukleär und zytoplasmatisch lokalisierte eIF3 kolokalisiert zwar mit PLINP, jedoch nicht mit L2 in 293T-Zellen (Abbildung 3.12). Dabei beeinflussen sich L2 und

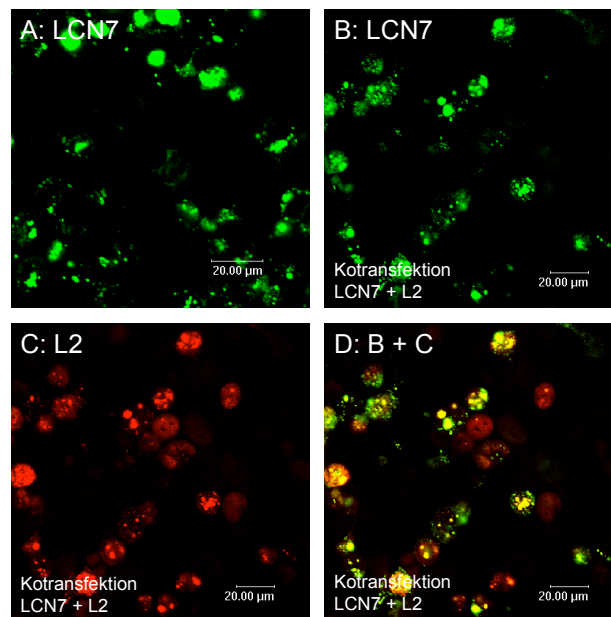


Abbildung 3.13: **Subzelluläre Lokalisation von EGFP-LCN7 (Klon #50) und HPV16 L2 in 293T-Zellen.** EGFP-LCN7 ist partiell diffus und punktiert im Zellkern lokalisiert. Bei Koexpression von L2 findet man an einigen Stellen, die möglicherweise PODs darstellen könnten, eine Kolo-kalisation zwischen LCN7, welches auch unter dem Synonym TIN-Ag-RP beschrieben wurde, und L2. **A:** Lokalisation von EGFP-LCN7 ohne L2-Koexpression; **B-D:** Koexpression von EGFP-LCN7 und L2; **B:** Lokalisation von EGFP-LCN7; **C:** Lokalisation von HPV16 L2; Nachweis durch Serum #20 (1:500) / Ziege- α -Kaninchen Cy3 (1:400); **D:** Überlagerung von B und C

eIF3 in ihrer Lokalisation. Es ist auf Basis dieser Daten durchaus eine Verbindung zwischen L2, eIF3 und PLINP denkbar, die möglicherweise noch mit Proteinen des COP9-Signalosoms und des Proteasoms verknüpft ist. Diese Daten wären dann ein erster Hinweis für eine Verbindung von L2 zu diesem Multiprotein-Komplex, der im Zusammenhang mit der translationalen Kontrolle steht und daher für zukünftige Studien von großem Interesse.

Lipocalin 7 (LCN7), welches auch unter dem Synonym TIN-Ag-RP (*tubulointerstitial nephritis antigen (TIN-ag)-related protein*) bekannt ist, lokalisiert in 293T-Zellen im Zellkern und ist teilweise in punktierten Strukturen zu finden (Abbildung 3.13 A). Koexprimiert man HPV16 L2, so ändert dies nicht die Lokalisation von LCN7 in der Zelle. In einigen punktierten Strukturen des Zellkerns findet sich eine Kolo-kalisation mit L2 (siehe Abbildung 3.13 B-D). Eine Interaktion von TIN-Ag-RP mit L2 war bereits in einer früheren Arbeit beschrieben worden (Gornemann *et al.*, 2002). Es ist also gut möglich, dass die Proteine PLINP, TIN-Ag-RP und HPV L2 in der Zelle in einem funktionalen Komplex interagieren und ist ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Studien.

EGFP-40 kDa-Keratin teilweise zytoplasmatisch, teilweise membrangebunden lokalisiert (Abbildung 3.14 A). Die Koexpression von L2 führt nicht zu einer Änderung der Loka-

lisation von 40 kDa-Keratin und es ist keine Kolokalisation zwischen den beiden Proteinen detektierbar (Abbildung 3.14 B-D). Bei den Kolokalisationsstudien mit L2 ist zu bedenken, dass EGFP-40 kDa-Keratin ein circa 30 kDa höheres Molekulargewicht als erwartet aufweist. Die hier erhaltenen Ergebnisse sind daher fraglich und müssten verifiziert werden.

EGFP-Keratin18 ist ausschließlich im Zytoplasma von 293T-Zellen zu finden (siehe Abbildung 3.15 A). Das zelluläre Matrixprotein kolokalisiert an sehr wenigen Stellen mit HPV16 L2, wenn dieses koexprimiert wird. Es gibt daher einen schwachen Hinweis auf eine Interaktion zwischen Keratin18 und HPV L2 (Abbildung 3.15 B-D). Deutlich wird jedoch eine veränderte Lokalisation von EGFP-Keratin18 unter dem Einfluss von HPV16 L2 deutlich, die höchstwahrscheinlich einen direkten oder indirekten Zusammenhang zwischen diesen beiden Proteinen aufweist.

EGFP-EAP30 findet man in der Zelle in einer diffusen nukleären Verteilung (Abbildung 3.16 A). Das Protein kolokalisiert mit koexprimiertem L2 in wenigen Bereichen im Zellkern, was jedoch auch auf eine zufällige Signalüberlappung zurückzuführen sein kann (siehe Abbildung 3.16 B-D).

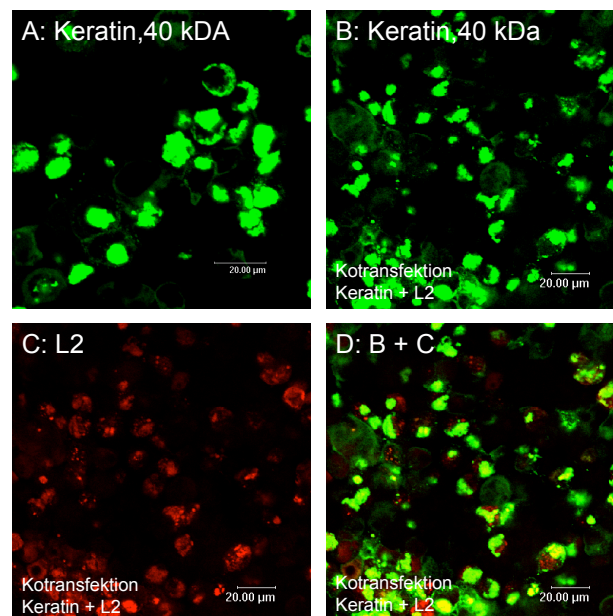


Abbildung 3.14: **Subzelluläre Lokalisation von EGFP-Keratin,40 kDa (Klon #88) und HPV16 L2 in 293T-Zellen.** Die 40 kDa-Form von Keratin ist als EGFP-Fusionsprotein partiell membrangebunden und zytoplasmatisch lokalisiert. Bei Koexpression von HPV16 L2 ist weder die Lokalisation des 40 kDa-Keratin noch die des L2 verändert und die Proteine weisen keine Kolokalisation auf. **A:** Lokalisation von EGFP-Keratin, 40 kDa ohne L2-Koexpression; **B-D:** Koexpression von EGFP-Keratin, 40 kDa und L2; **B:** Lokalisation von EGFP-Keratin, 40 kDa; **C:** Lokalisation von HPV16 L2; Nachweis durch Serum #20 (1:500) / Ziege- α -Kaninchen Cy3 (1:400); **D:** Überlagerung von B und C

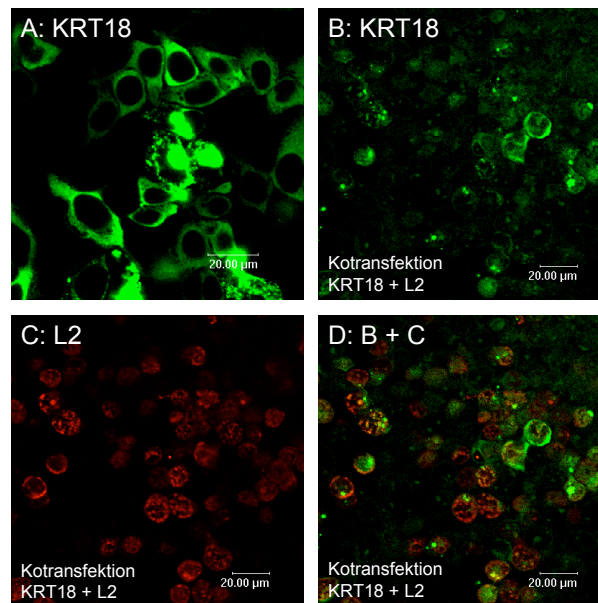


Abbildung 3.15: **Subzelluläre Lokalisation von EGFP-Keratin18 (Klon #91) und HPV16 L2 in 293T-Zellen.** EGFP-Keratin18 ist ausschließlich im Zytoplasma der 293T-Zellen lokalisiert und kolokalisiert nicht mit HPV16 L2, wenn dieses Protein koexprimiert wird. Unter dem Einfluss von L2 ändert sich die Lokalisation von EGFP-Keratin18 in der Zelle deutlich von einer rein zytoplasmatischen zu einer punktartigen Verteilung. L2 findet sich weitgehend unbeeinflusst der Überexpression von Keratin18 in POD-Strukturen des Zellkerns. **A:** Lokalisation von EGFP-Keratin18 ohne L2-Koexpression; **B-D:** Koexpression von EGFP-Keratin18 und L2; **B:** Lokalisation von EGFP-Keratin18; **C:** Lokalisation von HPV16 L2; Nachweis durch Serum #20 (1:500) / Ziege- α -Kaninchen Cy3 (1:400); **D:** Überlagerung von B und C

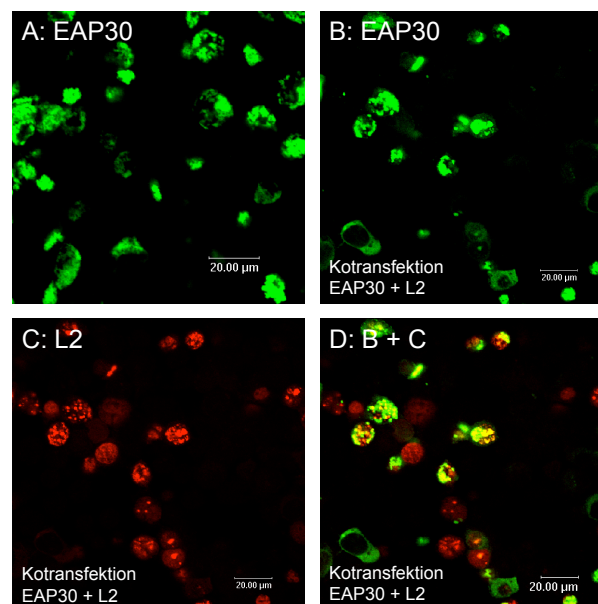


Abbildung 3.16: **Subzelluläre Lokalisation von EGFP-EAP30 (Klon #92) und HPV16 L2 in 293T-Zellen.** EGFP-EAP30 ist in 293T-Zellen diffus nukleär lokalisiert. Bei Koexpression von HPV16 L2 findet sich in wenigen Bereichen im Zellkern eine Kolokalisation. **A:** Lokalisation von EGFP-EAP30 ohne L2-Koexpression; **B-D:** Koexpression von EGFP-EAP30 und L2; **B:** Lokalisation von EGFP-EAP30; **C:** Lokalisation von HPV16 L2; Nachweis durch Serum #20 (1:500) / Ziege- α -Kaninchen Cy3 (1:400); **D:** Überlagerung von B und C

3.1.3 Screening von PMSP mit einer Keratinozyten-cDNA-Bibliothek

3.1.3.1 Herstellung des PMSP-Hefestamms

Die Herstellung des PMSP-Hefestamms erfolgte analog zu der des PLINP-Hefestamms (siehe 3.1.2.1). Die PMSP-kodierende cDNA wurde in den *bait*-Vektor inkloniert. Die Transformation des klonierten Plasmides in den Hefestamm AH109 erfolgte mittels Einzelplasmid-Transformation. Nach Testung des Wachstums auf verschiedenen Selektionsmedien sowie der Überprüfung, dass PMSP nicht selbstständig in der Lage ist, die Reportergene zu aktivieren, wurde die Plasmid-DNA aus der Hefe isoliert und dessen Identität durch Restriktionsanalyse über *NotI* und *EcoRV* und die Expression des Fusionsproteins mittels Western Blot überprüft (siehe Abb. 3.17). Nach positivem Ausgang dieser Vorexperimente konnte das *Screening* der cDNA-Bibliothek durchgeführt werden.

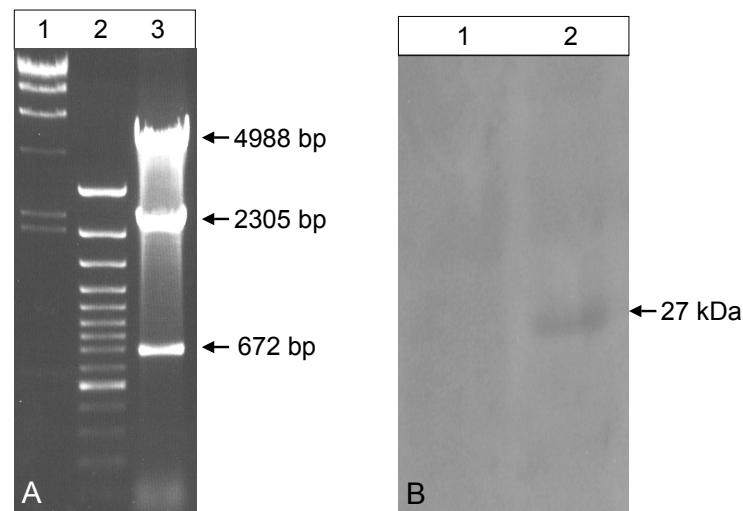


Abbildung 3.17: **Identifikation eines pGBKT7-PMSP-Klons nach Transformation in AH109.** **A:** Nach Transformation des pGBKT7-PMSP-Plasmides in den Hefestamm AH109 und anschließendem Wachstum auf SD-Trp-Selektionsmedium wurde die Plasmid-DNA isoliert, in *E.coli* DH5 α amplifiziert und nach erneuter Plasmid-Isolation einer Restriktionsanalyse unterworfen. Durch die Restriktion mit *NotI* und *EcoRV* konnten Größe und Orientierung des Konstruktes überprüft werden. Die Fragmente mit 4988 bp, 2305 bp und 672 bp waren erwartungsgemäß (Spur 1: λ /*HindIII*-Marker; Spur 2: 100bp-Marker; Spur 3: Plasmid-DNA aus Hefe-Klon). **B:** Western Blot des Gesamtlysates der mit pGBKT7-PMSP transfizierten Hefe AH109 zur Kontrolle der Expression des PMSP-Gal4-BD-Fusionsproteins (Spur 1: untransfizierte Hefe; Spur 2: pGBKT7-PMSP transfizierte Hefe). Der Nachweis erfolgte über einen Maus anti-c-myc-Antikörper (Verdünnung: 1:2.000), GAMPO (Verdünnung: 1:3.000).

3.1.3.2 Screening der cDNA-Bibliothek mit PMSP

Potentielle Interaktionspartner von PMSP wurden analog zu PLINP *gescreent* (siehe 3.1.2.2). Die HaCat-Keratinozyten-Bibliothek wurde in den bereits mit pGBKT7-PMSP transfizierten Hefestamm AH109 mittels Hefetransformation in großem Maßstab

(siehe 2.2.5.4.2) eingebracht und je zur Hälfte auf SD-HLT und SD-HALT ausplattiert. Die Kontrollen wurden analog zum *Screening* mit PLINP mittels Einzelplasmid-Transformation in die Hefe eingebracht. Die erwartungsgemäß gewachsene Kontroll-Transformation und das Wachstum von Transformanten auf den Selektionsmedien zeigten den Erfolg der Transformation der cDNA-Bibliothek. Die Transformationseffizienz ergab 8×10^6 Transformanten, was für die Komplexität der Bibliothek mit $2,5 \times 10^6$ unabhängigen cDNA-Klonen theoretisch ausreichend ist.

3.1.3.3 Verifikation der potentiellen Interaktionsklone im Hefesystem

Das Wachstum der Kolonien auf stringentem Selektionsmedium gibt einen ersten Hinweis auf eine Interaktion der Klone mit PMSP. Diese sind aber noch nicht ausreichend bestätigt, da es sich beispielsweise um unspezifische Bindungspartner handeln könnte. Deshalb wurden von den gewachsenen Klonen 240 ausgewählt, die auf gerasterte SD-HALT-Platten mit X- α -Gal übertragen wurden. Nach dreimaligem Überstreichen auf neue Selektions- und Transformationsplatten waren von den 240 Klonen nur noch 205 in der Lage, auf dem Selektionsmedium zu wachsen beziehungsweise blaue Kolonien zu bilden. 129 dieser Kolonien wurden nach Intensität der Blaufärbung ausgewählt und in den Bakterienstamm TG1 mittels Hitzeschocktransformation (siehe 2.2.1.6) eingebracht. Insgesamt konnten 67 der 129 Plasmide erfolgreich in Bakterien eingebracht werden. Von diesen 67 Transformanten wurde dann wiederum die Plasmid-DNA isoliert und zurück in den Hefestamm AH109 durch Einzelplasmid-Transformation (siehe 2.2.5.4.1) eingebracht. 41 Klone aus der *gescreenten* Bibliothek wuchsen nach Rücktransformation in die Hefe auf dem Selektionsmedium an. Diese weiterhin positiven Klone wurden dann dem quantitativen o-NPG-Test unterworfen. Hier wurden analog zum PLINP-*Screening* für erhöhte Genauigkeit der Messungen jeweils Triplets der verschiedenen Ansätze durchgeführt, die innerhalb der Messung zufällig verteilt waren, so dass die Auswirkungen der zeitabhängigen Farbreaktion minimiert werden konnten. Die Ergebnisse des o-NPG-Tests waren nicht sehr aussagekräftig, da die Werte großen Schwankungen unterworfen waren. Deshalb wurden ausschließlich die später durchgeführten Sequenzierungen der Klone dazu genutzt, interessante Kandidaten in Bezug auf eine Interaktion mit PMSP zu identifizieren.

3.1.3.4 Identität der positiven Klone des PMSP-Screenings

Tabelle 3.4 zeigt eine Auflistung der 41 Klone, die aus dem *Yeast Two-Hybrid-Screening* hervorgegangen sind. Von zweien der 41 Klone war es leider nicht möglich, Sequenzinformationen zu erhalten.

In blauer Schrift sind einige potentielle Interaktionspartner von PMSP dargestellt, die im

cDNA-Klon #	abgeleitetes Protein nach Genbank	Zugangsnummer Genbank
2	keine Sequenzierung möglich	
3	Zell-Stroma entstammender Faktor 2-wie 1	BC006248
6, 25, 42, 58	Guanin Nucleotid-bindendes Protein (G-Protein),GNB2	NM_005273
12, 53, 91, 106	Metallothionein 2A	BC007034
14, 27, 65	Lipocalin 7	NM_022164
16	Klon RP11-2L19	AC129916
17	Klon RP11-353N14	AC100791
18	gleich zu Filamin A, alpha (Aktin bindendes Protein 280)	BC028089
22	keine Sequenzierung möglich	
28	Trypsinogen IV A-Form	X72781
31	Hypothetisches Protein FLJ12910, Klon MGC:16862	BC011348
36	cDNA FLJ40015 fis, Klon STOMA2006229	AK097334
38	Homocystein-induzierbar, Endoplasmisches Retikulum	BC032673
40	4F2 Antigen schwere Kette	HUM4F2A
41	TM7XN1 Protein	AJ011001
43	Klon IMAGE:4779421	BC035487
52	Humane DNA Sequenz Klon RP4-599F21	AL035662
57	Hypothetisches Protein FLJ12799, Klon MGC:44978	BC033843
60	Klon IMAGE:4779421	BC035487
62, 101	Laminin receptor 1 (ribosomales Protein SA, 67kDa)	BC053370
66	Lösbare Carrier Familie 3, Mitglied 2	BC001061
67	Mannosidase, alpha, Klasse 2B, Mitglied 1	BC000736
71	Steroid-sensitives Gen 1 (URB)	XM_087331
74	Gleich zu hypothetischem Protein FLJ13044	BC024212
81	Gleich zu Inhibitor der Bruton's Tyrosin-Kinase	BC027490
82	GlcNAc-phosphotransferase Gamma-Untereinheit	BC014592
85	DnaJ (Hsp40) Homolog, Unterfamilie B, Mitglied 1	NM_006145
93	Hypothetisches Protein FLJ32104	BC051323
116	cDNA DKFZp686P18130	BX571744
117	unbekannte mRNA aus Augengewebe	AF504645
121	Nidogen (Enactin) (NID)	NM_002508
128	Klon RP5-1033B10 auf Chromosom 6p21.2-21.31	AL031228

Tabelle 3.4: **Übersicht der isolierten potentiellen Interaktionspartner von PMSP.** Die für diese Arbeit interessanten potentiellen Partner von PMSP sind in blauer Schrift dargestellt. Die Beschreibung der Klone versteht sich zum Teil als gekürzte Zusammenfassung; detailliertere Beschreibungen der interessanten Klone finden sich im fortlaufenden Text.

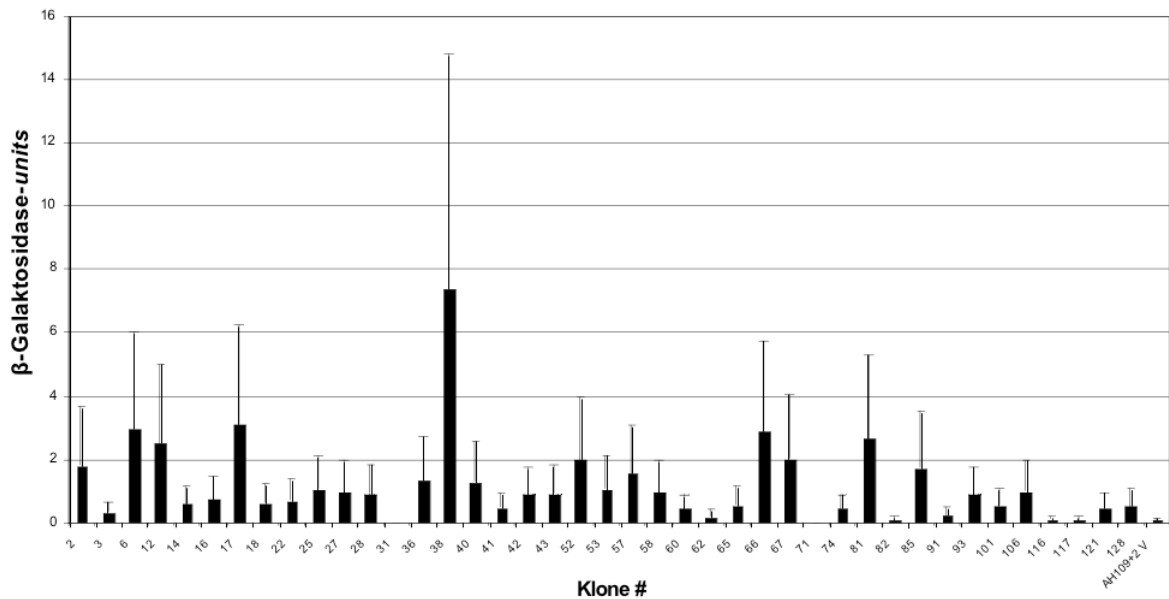


Abbildung 3.18: **Quantitativer o-NPG-Test zur Bestimmung der Interaktionsstärke der potentiellen PMSP-Bindungspartner.** Der o-NPG-Test kann die Aktivität der β -Galaktosidase durch die Interaktion von PMSP (*bait*) und den Proteinen aus der cDNA-Bibliothek (*prey*) relativ quantifizieren. Die x-Achse zeigt die Nummern der Klone im Hefesystem sowie die Negativ-Kontrollen 0 (pGBKT7 im Hefestamm AH109), 2157 (pGBKT7-PLINP in AH109) und 2158 (pGBKT7-PMSP in AH109).

funktionalen Zusammenhang interessant sein könnten. Die Anwesenheit gleicher Proteine als voneinander unabhängig gefundenen Klonen erhöht dabei die Wahrscheinlichkeit einer echten Interaktion. Alle der hier identifizierten potentiell interessanten Partner lagen mehrfach vor und werden folgend detaillierter beschrieben.

3.1.3.4.1 cDNA-Klon #6, #25, #42, #58: Guanin Nucleotid-bindendes Protein (G-Protein), GNB2

Die Genfamilie der G-Protein Untereinheiten sind aus einem Alpha-, Beta- und Gamma-Komplex zusammengesetzt (Downes & Gautam, 1999). G-Proteine liegen in Zellmembrannähe, wo sie mit dem zytoplasmatischen Anteil von Rezeptor-Transmembranproteinen assoziiert sind. Diese Klone kodieren für eine Beta-Einheit und sind damit wichtige Regulatoren der Alpha-Einheiten wie auch für bestimmte Signaltransduktionsrezeptoren und -effektoren. Durch diese Eigenschaften ist GNB2 an der Entstehung von Krebs beteiligt (Shaw & Cantley, 2006).

Ihre zentrale Rolle in den Signaltransduktionsmechanismen der Zelle machen diese cDNA-Klone für eine potentielle Interaktion mit PMSP sehr interessant. Die hier isolierten cDNAs kodieren teilweise für das Volllängeprotein oder nur für C-terminale Stücke des Proteins.

3.1.3.4.2 cDNA-Klon #12, #53, #91, #106: Metallothionein 2a

Metallothioneine gehören zu einer Familie Cystein-reicher, Metall-bindender intrazellulärer Proteine, die mit der Zellproliferation in Verbindung gebracht werden. Metallothionein 2a wurde im Rahmen der Initialanalyse von mehr als 15.000 cDNAs identifiziert (Strausberg *et al.* , 2002). In Brustkrebsgeweben wurde eine erhöhte Expression von Metallothioneinen, insbesondere von Metallothionein 2a, detektiert (Jin *et al.* , 2002). Weiterhin konnte in Studien über Prostata-Krebs gezeigt werden, dass Metallothionein 2a mit der Kinase-Domäne von PKC μ interagiert (Rao *et al.* , 2003).

Metallothioneine sind Stress-Hormone. Eine Interaktion der Klone mit PMSP wäre in diesem Zusammenhang zu vermuten. Dabei ist ebenso eine Stress-Induktion von PMSP denkbar, die in zukünftigen Studien zu untersuchen wäre.

3.1.3.4.3 cDNA-Klon #14, #27: Lipocalin 7 (LCN7)

Diese Klone kodieren für einen Teil des Lipocalin7 (LCN7). Die Identifikation erfolgte als extrazelluläres Matrix-Protein zunächst durch Zhang, K.M. und Chen, B.S. (nicht publiziert) und wurde durch Bromme *et al.* weiter charakterisiert (Bromme *et al.* , 2000). Das Protein wurde später durch Wex *et al.* als Cadhepsin B-verwandtes Protein ohne katalytische Aktivität mit 46% Sequenzidentität mit dem humanen TIN-ag (*tubulointerstitial nephritis antigen*) beschrieben und ist deshalb auch unter dem Synonym TIN-Ag-RP bekannt (Wex *et al.* , 2001). Lipocaline sind Transportproteine. Ubiquitär verbreitet sind sie in viele essentielle Zellprozesse eingebunden. Die funktionale Wirksamkeit erfolgt über einen Trichtermechanismus, in den lipophile Substanzen aufgenommen und festgehalten werden können. Lipocaline sind mit rund 180 Aminosäuren verhältnismäßig klein und ihr Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt.

Die Interaktion von PMSP und TIN-Ag-RP könnte eine funktionale Verbindung zu HPV L2 und PLINP darstellen, da auch beim *Yeast Two-Hybrid Screening* von PLINP und L2 TIN-Ag-RP als potentieller Interaktionspartner auftauchte. Eine denkbare funktionale Verbindung dieser beiden Proteine mit dem Nebenkapsidprotein des humanen Papillomvirus könnte in PODs bestehen.

3.1.3.4.4 cDNA-Klon #62, #101: Laminin Rezeptor 1 (Ribosomales Protein SA, 67 kDa)

Die Klone des Laminin Rezeptors 1 wurden wie auch Metallothionein 2a im Rahmen einer großen Synthese und Analyse von cDNAs identifiziert (Strausberg *et al.* , 2002). Laminin-Rezeptoren werden mit verschiedenen humanen Karzinomarten in Zusammenhang gebracht (Wewer *et al.* , 1986).

Laminine sind Proteine der extrazellulären Matrix. Sie sind in allen Basallaminae, die neben Lamininen aus Kollagen Typ IV, Entactin (Nidogen) und dem Heparansulfatproteoglykan Perlecan bestehen, zu finden. Laminine weisen Oberflächenrezeptoren auf. Der Laminin Rezeptor 1 wird in Tumorzellen verstärkt gebildet. Er kann durch Prione und andere Faktoren gebunden werden, so dass eine Verbindung zum Creutzfeldt-Jakob-Syndrom und zu Krebs hergestellt werden konnte.

3.1.3.5 Vergleich der positiven Klone mit potentiellen Interaktionspartnern von HPV L2

Das *Yeast Two-Hybrid Screening* von PMSP brachte verschiedene voneinander unabhängige Klone des Guanin Nucleotid-bindenden Proteins (G-Protein) hervor. Vorherige Studien zur Identifikation von Interaktionspartnern des Nebenkapsidproteins L2 verschiedener HPV-Typen, in denen ebenfalls ein *Yeast Two-Hybrid Screening* durchgeführt wurde, konnten das gleiche Protein als potentielle Interaktionspartner von HPV11 und HPV16 L2 aufzeigen. Die unabhängig voneinander gefundenen Klone kodierten wie beim *Screening* mit L2 entweder für das Volllängeprotein oder für den C-terminalen Teil des Proteins. Dieser Zusammenhang könnte die Verbindung zwischen L2 und PMSP im Rahmen von Signaltransduktionsmechanismen darstellen, die bis zum heutigen Zeitpunkt nicht aufgeklärt werden konnte.

Ein weiterer potentieller Interaktionspartner von PMSP, das Lipocalin 7 oder auch TIN-Ag-RP, wurde sowohl beim *Screening* mit PLINP als auch mit L2 als *bait* identifiziert. Eine Analyse zur subzellulären Lokalisation von TIN-Ag-RP und L2 konnte eine partielle Kolokalisation zeigen ([Gornemann et al. , 2002](#)), die in dieser Arbeit reproduziert werden konnte. Ebenfalls konnte eine partielle Kolokalisation von PLINP und TIN-Ag-RP gezeigt werden, die möglicherweise einen funktionalen Komplex zwischen PLINP, PMSP, L2 und TIN-Ag-RP aufweist. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass PMSP als Teil des P5-1-cDNA-Klons im PLINP-*Yeast Two-Hybrid-Screening* identifiziert werden konnte.

3.2 Interaktion von PLINP mit anderen POD-assoziierten Proteinen

Neben der Erkenntnis, dass PLINP mit den im *Yeast Two-Hybrid Screening* gefundenen Proteinen interagiert, konnte jedoch in allen bisher angestellten Untersuchungen kein Interaktionspartner von PLINP gefunden werden, der ebenfalls klar in PODs lokalisiert ist. Eine Lokalisation von TIN-Ag-RP in PODs ist wahrscheinlich, konnte jedoch nicht zweifelsfrei bewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass PLINP in den Zellkompartimenten, in

denen es lokalisiert ist, zelluläre Interaktionspartner hat. Da jedoch über 100 verschiedene POD-assoziierte Proteine beschrieben wurden, ist es experimentell unmöglich, alle POD-assoziierten Proteine auf ihre Interaktion mit PLINP hin zu überprüfen. Deshalb ist es sinnvoll, sich auf die Proteine zu konzentrieren, die entweder sehr prominent sind, wie beispielsweise PML, oder von denen bereits gezeigt werden konnte, dass sie mit viralen Proteinen in Zusammenhang stehen. Eine Untersuchung zum Einfluss von PML auf PLINP wurde bereits in früheren Arbeiten durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass PLINP und PML zwar stets assoziiert vorlagen, jedoch nicht vollständig kolokalisierten. Die Überexpression von PML schien die Kolokalisation von PLINP mit L2 nicht zu beeinflussen, jedoch hemmte sie vermutlich die Expression von PLINP.

3.2.1 Interaktion von PLINP mit FLASH

FLASH ist ein Protein, welches in die Fas-vermittelte Aktivierung der Kaspase 8 während der Apoptose involviert ist (Imai *et al.*, 1999). In der Zelle findet sich das Protein in Assoziation zu PODs lokalisiert, wo es in enger Nachbarschaft, jedoch nicht in denselben Bereichen lokalisiert ist. Da ein analoges Lokalisationsmuster auch für PLINP beobachtet wurde, warf dies die Frage auf, ob die beiden Proteine PLINP und FLASH vollständig kolokalisieren und so einen weiteren distinkten Raum im Nukleus der Zelle bilden. FLASH und PLINP wurden deshalb in 293T-Zellen koexprimiert und deren Lokalisation in der Zelle untersucht.

Eine Kolokalisation der beiden Proteine konnte jedoch, wie in Abbildung 3.19 gezeigt ist, ausgeschlossen werden, so dass ein direkter funktionaler Zusammenhang dieser Proteine, beispielsweise im Kontext der Apoptose, unwahrscheinlich ist.

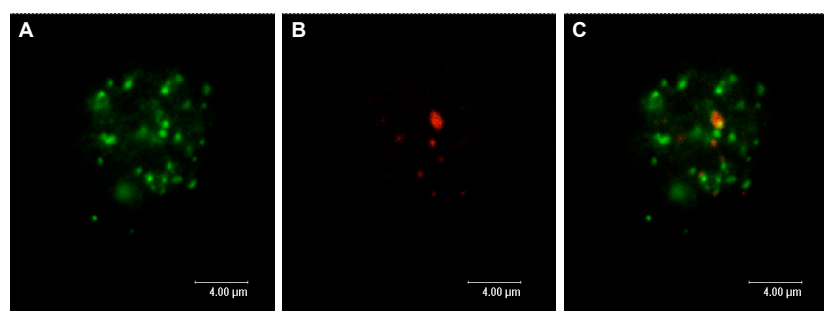


Abbildung 3.19: **PLINP zeigt keine Kolokalisation mit dem in Apoptose involvierten Protein FLASH.** Die Koexpression von PLINP und FLASH in 293T-Zellen zeigt keine gemeinsame Lokalisation in Domänen des Zellkerns. **A:** Lokalisation von EGFP-PLINP; **B:** Lokalisation von FLASH. Nachweis über Flagtag als FLASH-Fusionsprotein mit Maus anti-Flagtag (1:200) / Kaninchen anti-Maus-Cy3 (1:400) **C:** Überlagerung von A und B

3.2.2 Interaktion von PLINP mit Daxx

In anderen Arbeiten konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass die Interaktion von L2 mit Daxx sich von PML unabhängig darstellt. Es besteht die Vermutung, dass Daxx als Adapterprotein in der Zelle fungiert und L2 durch Daxx in PODs rekrutiert wird. Die Wirkung von Daxx als Adapter zwischen pp71 von HCMV und PML wird diskutiert (Hofmann *et al.*, 2002), (Ishov *et al.*, 2002).

Ob Daxx möglicherweise auch mit PLINP interagiert und dort ebenfalls als Adapterprotein für die Rekrutierung von PLINP in PODs verantwortlich ist, sollte mit Hilfe von Daxx-*knockout*-Zellen (Daxx^{-/-}) geklärt werden. Von diesen Zellen waren Mutanten vorhanden, welche stabil mit wtDaxx, dem C-Terminus von Daxx (Daxx-ΔN), dem N-Terminus von Daxx (Daxx-ΔC) oder dem Kontrollplasmid pBabe transfiziert waren (freundliche Gabe von G. Maul) (Ishov *et al.*, 2004). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit einem PML-spezifischen Antikörper angefärbt. Das PML-Protein zeigt in den Zelllinien eine typische Lokalisation in den PODs. Widersprüchlicherweise konnte bereits in anderen Studien belegt werden, dass L2 in Daxx-*knockout*-Zellen sowie den Deletionskonstrukten eine typische Aggregation in PODs zeigte und somit unabhängig von Daxx ist, wobei jedoch eine verzögerte Proteinakkumulation des L2-Proteins in Daxx^{-/-} und den mit Daxx-ΔC retransfizierten Zellen stattfand. Eine Identifikation der Interaktionsdomäne zwischen L2 und Daxx konnte nicht erbracht werden, da L2 nur mit wtDaxx, nicht jedoch mit dem Deletionsmutanten eine gemeinsame Lokalisation auswies (persönliche Mitteilung von Katrin Becker, Universität Mainz).

In dieser sowie früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass PLINP weder durch das putative NLS noch durch Interaktion mit SUMO in den Kern rekrutiert wird (siehe dazu 3.3.1). So sollte untersucht werden, ob die POD-Lokalisation von PLINP möglicherweise durch Daxx als Adapterprotein verursacht wird. Um dies zu klären, wurde PLINP in Daxx^{-/-}-Zellen, die mit unterschiedlichen Konstrukten von Daxx stabil transfiziert waren, exprimiert. Nach Inkubation der Zellen erfolgte der Nachweis im konfokalen Mikroskop über EGFP als PLINP-Fusionsprotein.

Abbildung 3.20 zeigt, dass die Expressionsmuster von exogenem PLINP in den verschiedenen Daxx^{-/-}-Zellen nicht verändert sind. Der Nachweis von endogenem PLINP konnte nicht gelingen, was dadurch zu begründen ist, dass das PLINP-Homolog in den Daxx^{-/-}-Nagerzellen nicht durch die vorhandenen Antikörper nachweisbar ist. Weiterhin wird im Western Blot deutlich, dass unfusioniertes PLINP in diesen Zellen, wie auch bei den anderen in dieser Arbeit verwandten Nagerzellen NIH3T3, keine zusätzliche Bande bei 32 kDa zeigt (siehe dazu Abb. 3.29). Dies wird in einem späteren Abschnitt dieser Arbeit wichtig und dort diskutiert (siehe 3.31). Nachfolgend auf diesen Versuch wurde eine konfokale Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation von PLINP in Daxx^{-/-}-Zellen

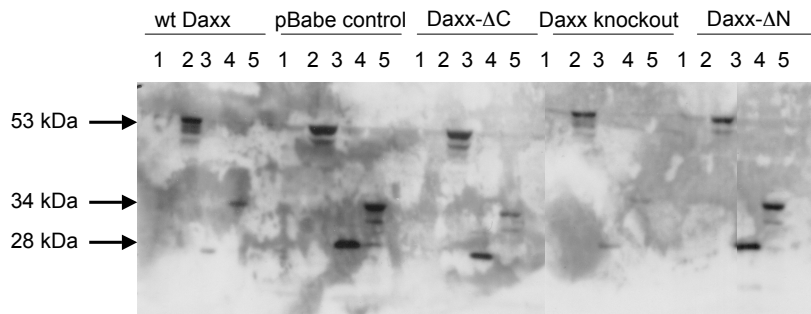


Abbildung 3.20: **PLINP zeigt keine veränderten Expressionsmuster in verschiedenen $Daxx^{-/-}$ -Zellen.** $Daxx^{-/-}$ -Zellen wurden mit verschiedenen Expressionsplasmiden von PLINP transfiziert. 48 Stunden darauf wurde eine Zellyse durchgeführt und die Ansätze für einen Western Blot präpariert. Der Nachweis von PLINP erfolgte durch OFR1 #57 in einer 1:5 Verdünnung. Die Ansätze sind in den über dem Western Blot angegebenen Zelllinien wie folgt beschriftet: 1: untransfizierte Kontrolle; 2: EGFP-PLINP; 3: unfusioniertes PLINP; 4: Flag-PLINP; 5: LacZ

durchgeführt.

Überraschenderweise führte die Abwesenheit von Daxx wie in Abbildung 3.21 A und B ersichtlich, zu einer veränderten Lokalisation von PLINP, was sich darin äußerte, dass das Protein ausschließlich in großen punktartigen Strukturen im Randbereich des Kerns oder zusätzlich in vielen kleinen Punktstrukturen im Kern lokalisiert war. So ist davon auszugehen, dass eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen PLINP und Daxx existiert. Um festzustellen, über welchen Bereich von Daxx diese Interaktion verläuft, wurde EGFP-PLINP ebenfalls mit den Deletionsmutanten von Daxx koexprimiert. Die gleiche Lokalisation von PLINP wie in $Daxx^{-/-}$ -Zellen findet sich in $Daxx^{-/-}$ pBabe $Daxx-\Delta C$, jedoch nicht in der $Daxx-\Delta N$ -Mutante (Abbildung nicht gezeigt). Es ist also anzunehmen, dass die direkte oder indirekte Interaktion von PLINP mit Daxx über den C-terminalen Bereich des Daxx-Proteins erfolgt.

Die Eingrenzung des Bereichs für die Interaktion zwischen PLINP und Daxx war von

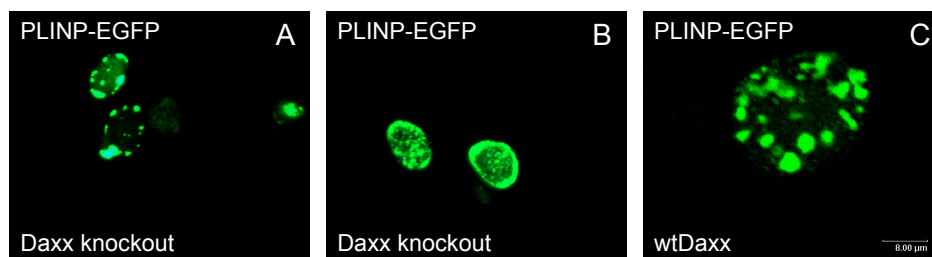


Abbildung 3.21: **PLINP zeigt eine veränderte Lokalisation in $Daxx^{-/-}$ -Zellen.** In $Daxx^{-/-}$ -Zellen mit einem *Daxx knockout* oder mit stabil retransfiziertem wtDaxx wurde EGFP-PLINP exprimiert und die subzelluläre Lokalisation analysiert. EGFP-PLINP zeigt sich bei *Daxx knockout* sowohl ausschließlich in großen punktartigen Strukturen in Assoziation zur Kernmembran (**A**) als auch zusätzlich in vielen sehr kleinen Punktstrukturen im Zellkern (**B**) lokalisiert. Bei Wiederherstellung von Daxx in $Daxx^{-/-}$ -Zellen durch stabile Transfektion von wtDaxx zeigt sich EGFP-PLINP in PODs (**C**).

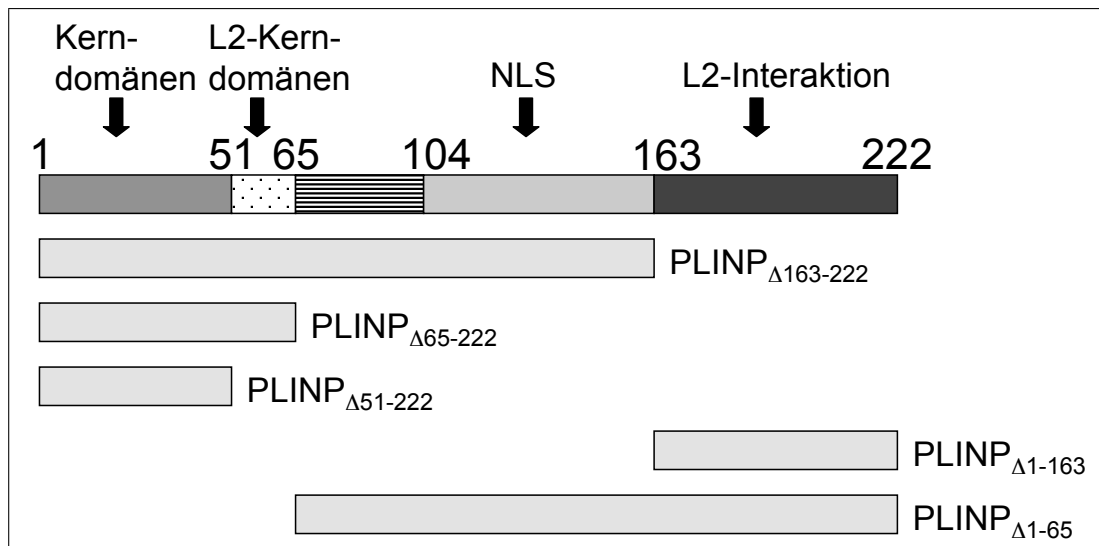


Abbildung 3.22: **Übersicht über die verschiedenen PLINP-Deletionsmutanten.** Bereits zu Beginn dieser Arbeit waren verschiedene Deletionsmutanten von PLINP hergestellt worden, die zur Analyse von Interaktionsbereichen zu anderen Proteinen genutzt werden können. Die Mutanten zeigen verschieden lange Deletionen entweder im C- oder im N-terminalen Bereich des Proteins.

großem Interesse, so dass bereits vor dieser Arbeit hergestellte Deletionsmutanten von PLINP in den verschiedenen *Daxx-knockout*-Zellen exprimiert und deren subzelluläre Lokalisation untersucht wurde. Einen Überblick über die verschiedenen PLINP-Deletionsmutanten gibt Abbildung 3.22.

Die subzelluläre Lokalisation der verschiedenen Deletionsmutanten mit *Daxx*, *Daxx-knockout* und *Daxx*-Deletionsmutanten erlaubt eine Eingrenzung des *Daxx*-Interaktionsbereichs in der PLINP-Sequenz sowie eine Eingrenzung des PLINP-Interaktionsbereichs in der *Daxx*-Sequenz. Die folgenden Abbildungen 3.23 bis 3.27 bieten jeweils typische Lokalisationsformen der PLINP-Mutanten in den verschiedenen *Daxx*^{-/-}-Zellen.

Vergleicht man die Lokalisation der verschiedenen PLINP-Deletionsproteine in *Daxx*^{-/-}-Zellen, in denen wt*Daxx* durch stabile Transfektion wiederhergestellt wurde, so wird deutlich, dass der N-terminale Bereich von PLINP etwa bei Aminosäure 1-65 für die Kernlokalisierung essentiell ist. Dies ist konsistent mit bereits durchgeführten Deletionsanalysen von PLINP, deren Ergebnisse in Abbildung 3.22 dargestellt sind.

Zellen, die kein *Daxx* exprimieren (*Daxx knockout* oder *Daxx knockout* pBabe), zeigten das Volllänge-PLINP-Protein in großen punktförmigen Strukturen am Rande des Zellkerns oder zusätzlich in vielen sehr kleinen punktförmigen Strukturen (Abbildung 3.21 A und B). Wird der C-terminale Bereich von PLINP bei Aminosäure 163 bis 222 deletiert, so ist PLINP in wt*Daxx*-exprimierenden Zellen in vergrößerten punktförmigen Strukturen am Rand des Zellkerns lokalisiert. Es ist also anzunehmen, dass dieser Bereich die direkte oder indirekte Interaktionssequenz mit *Daxx* trägt. In diesem Bereich konnte auch die putative NLS- und die SUMO- sowie die L2 -Interaktionssequenz identifiziert werden.

PLINP-Mutante	Daxx ^{-/-}	wtDaxx	Daxx-Δ-C	Daxx-Δ-N	Daxx ^{-/-} pBabe
wtPLINP	große Dots	POD	große Dots	PODs	große Dots
PLINP _{Δ1-163}	zytopl. Dots	diffus zytopl.	diffus	diffus Kern	diffus zytopl.
PLINP _{Δ1-65}	Kerndots	zytopl. Dots	diffus zytopl.	diffus	diffus zytopl.
PLINP _{Δ163-222}	große Dots	große Dots	diffus Kern	große Dots	große Dots
PLINP _{Δ51-222}	Kerndots	große Dots	Kerndots	Kerndots	Kerndots
PLINP _{Δ65-222}	diffus Kern	große Dots	diffus Kern	diffus Kern	diffus Kern

Tabelle 3.5: **Übersicht der typischen Lokalisationsformen der PLINP-Deletionsproteine in den verschiedenen Daxx^{-/-}-Zellen.** Die hier in der Tabelle dargestellten Lokalisationsformen der PLINP-Deletionsproteine beschreiben typische Lokalisationen, wie sie auch in den Abbildungen 3.23 bis 3.26 zu sehen sind. Zu bedenken ist die teilweise geringe Transfektionseffizienz der Zellen. Schwierig war es deshalb auch, von allen Ansätzen typische Lokisationsmuster abzubilden. So gehen Zellen mit großen Dots am Rand des Zellkerns auch immer mit der Zellen mit vielen kleinen Dots im Kern einher. Der Einfachheit halber ist in der Tabelle nur die Lokalisation in großen Dots aufgelistet.

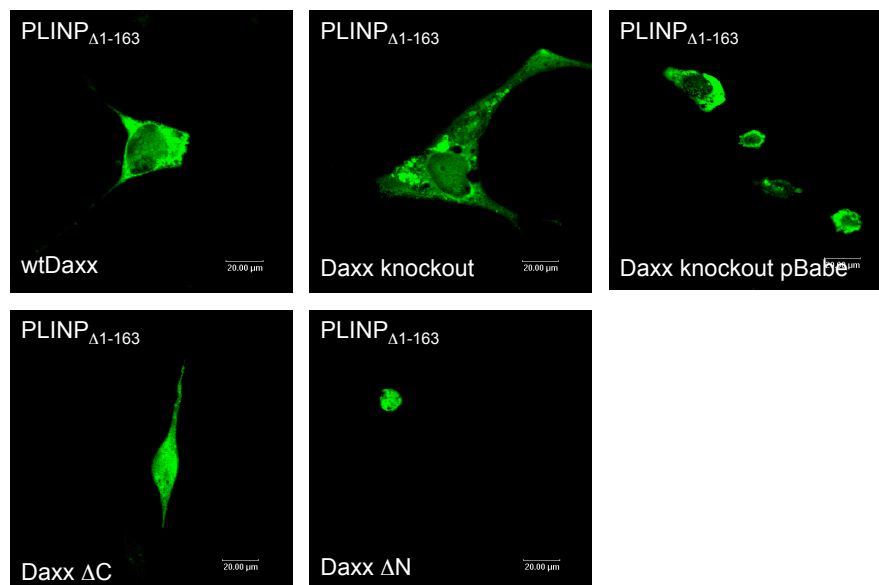


Abbildung 3.23: **Subzelluläre Lokalisation der PLINP_{Δ1-163}-Deletionsmutante in verschiedenen Daxx^{-/-}-Zellen.** PLINP_{Δ1-163} wird als EGFP-Fusionsprotein in verschiedenen Daxx^{-/-}-Zellen exprimiert und soll Aufschluss auf die Interaktionsbereiche in der Sequenz von PLINP und Daxx geben.

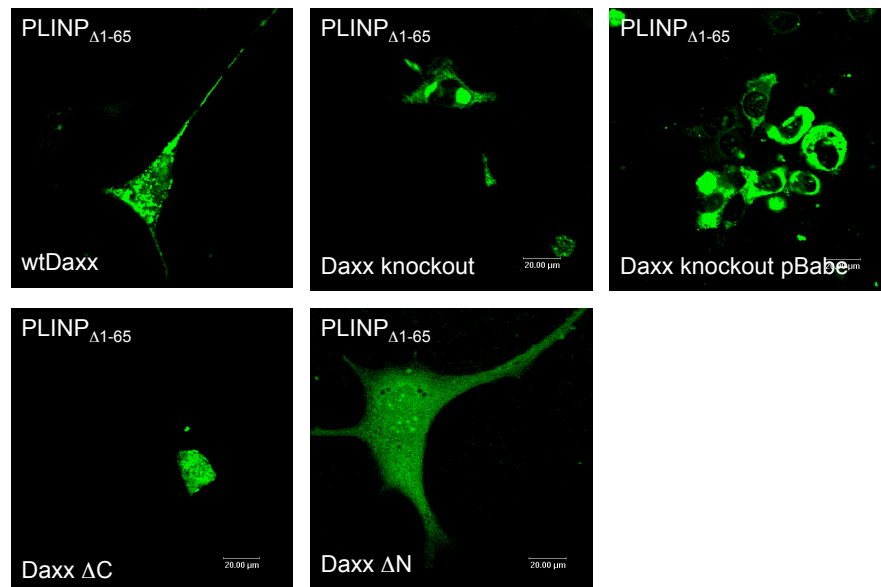


Abbildung 3.24: **Subzelluläre Lokalisation der PLINP Δ_{1-65} -Deletionsmutante in verschiedenen Daxx $^{-/-}$ -Zellen.** PLINP Δ_{1-65} wird als EGFP-Fusionsprotein in verschiedenen Daxx $^{-/-}$ -Zellen exprimiert und soll Aufschluss über die Interaktionsbereiche in der Sequenz von PLINP und Daxx geben.

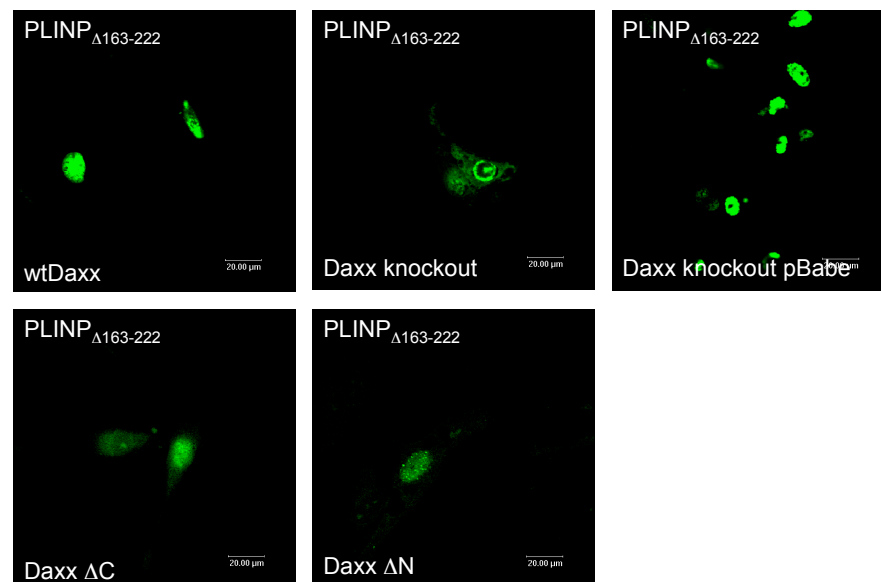


Abbildung 3.25: **Subzelluläre Lokalisation der PLINP $\Delta_{163-222}$ -Deletionsmutante in verschiedenen Daxx $^{-/-}$ -Zellen.** PLINP $\Delta_{163-222}$ wird als EGFP-Fusionsprotein in verschiedenen Daxx $^{-/-}$ -Zellen exprimiert und soll Aufschluss über die Interaktionsbereiche in der Sequenz von PLINP und Daxx geben.

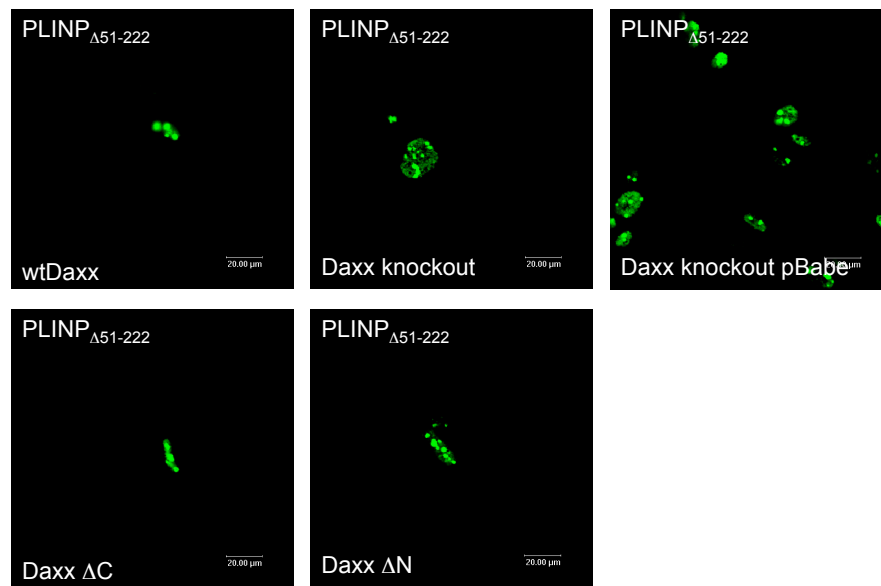


Abbildung 3.26: **Subzelluläre Lokalisation der PLINP Δ 51-222-Deletionsmutante in verschiedenen Daxx $^{-/-}$ -Zellen.** PLINP Δ 51-222 wird als EGFP-Fusionsprotein in verschiedenen Daxx $^{-/-}$ -Zellen exprimiert und soll Aufschluss über die Interaktionsbereiche in der Sequenz von PLINP und Daxx geben.

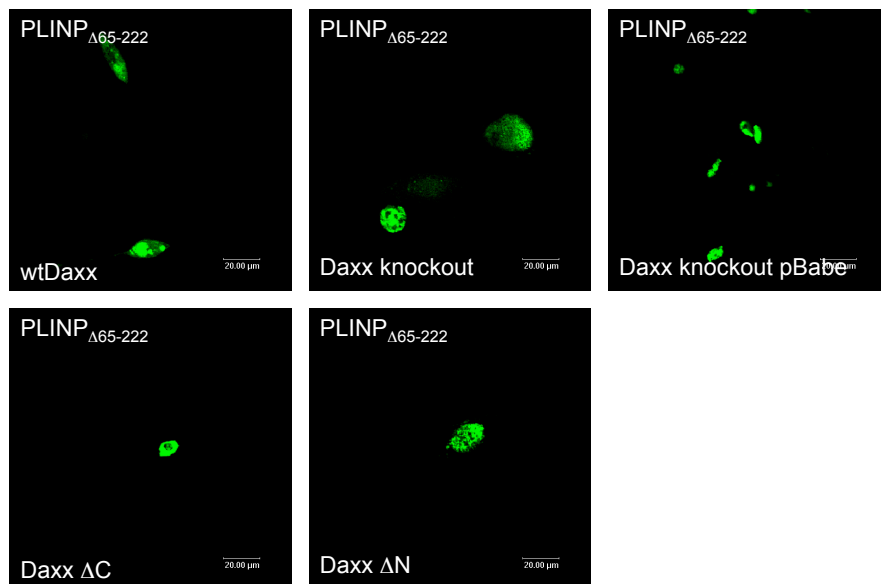


Abbildung 3.27: **Subzelluläre Lokalisation der PLINP Δ 65-222-Deletionsmutante in verschiedenen Daxx $^{-/-}$ -Zellen.** PLINP Δ 65-222 wird als EGFP-Fusionsprotein in verschiedenen Daxx $^{-/-}$ -Zellen exprimiert und soll Aufschluss über die Interaktionsbereiche in der Sequenz von PLINP und Daxx geben.

3.2.2.1 Interaktion von PLINP mit L2 in Daxx^{-/-} Zellen

Die Lokalisation des Nebenkapsidproteins des humanen Papillomvirus in PODs ist unabhängig von den zellulären Proteinen PML und Daxx. L2 interagiert mit Interaktionspartnern wie PLINP und wird durch eine bisher unbekannte Maschinerie in diese punktartigen Kerndomänen rekrutiert. Ob möglicherweise ein funktionaler Zusammenhang zwischen der Interaktion von PLINP mit Daxx und der mit L2 besteht, sollte der folgende Versuch klären. L2 und PLINP wurden in Daxx^{-/-}-Zellen exprimiert und die subzelluläre Lokalisation analysiert.

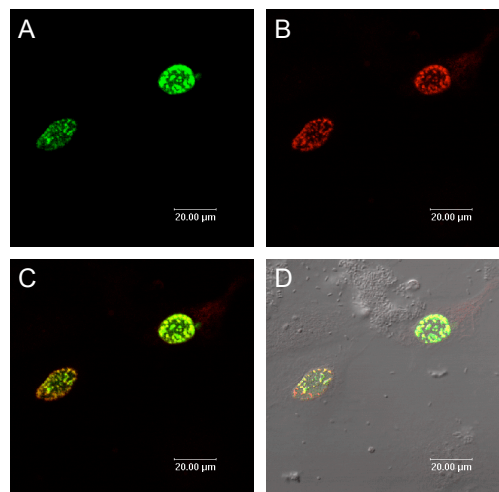


Abbildung 3.28: **Die veränderte Lokalisation von PLINP in Daxx^{-/-}-Zellen wird durch den Einfluss von HPV16 L2 teilweise aufgehoben.** Daxx^{-/-}-Zellen wurden mit EGFP-PLINP sowie HPV16 L2 transfiziert und 48 Stunden später im konfokalen Mikroskop analysiert. Die Lokalisation von EGFP-PLINP in Daxx^{-/-}-Zellen, die ohne Einfluss von L2 in großen punktartigen Strukturen in Assoziation zur Kernmembran zu sehen ist, zeigt sich nach Koexpression von HPV16 L2 wieder weitgehend in PODs. **A:** Lokalisation von EGFP-PLINP durch Autofluoreszenz; **B:** subzelluläre Lokalisation von HPV16 L2; Nachweis über Serum #20 (1:500), Alexa594-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG (1:300); **C:** Überlagerung von A und B; **D:** Überlagerung von A und B im Durchlichtbild.

Interessanterweise führte der Einfluss von L2 auf PLINP in Daxx^{-/-}-Zellen dazu, dass die sonst veränderte Lokalisation von PLINP in großen Punktstrukturen in Assoziation zur Zellkernmembran teilweise wieder aufgehoben wurde (siehe Abbildung 3.28). Einige Zellen zeigen weiterhin die veränderte Lokalisation, die aber nicht mehr so stark ausgeprägt ist wie ohne Koexpression von L2. Der Effekt der veränderten Lokalisation von PLINP bei einem Daxx-*knockout* kann also von L2 teilweise revidiert werden.

3.3 Analyse der Expression und Lokalisation von PLINP

Zu Beginn dieser Arbeit war über die zelluläre Funktion von PLINP sowie über seine Rolle in Bezug zum Lebenszyklus des humanen Papillomvirus wenig bekannt. Das ubiquitär in Säugetierzellen exprimierte PLINP interagiert mit dem Nebenkapsidprotein L2 mehrerer

Typen des humanen Papillomvirus in Assoziation zu distinkten Domänen des Zellkerns der Wirtszelle, sogenannten PODs. Zur detaillierteren Untersuchung der Eigenschaften von PLINP wurden in früheren Arbeiten verschiedene PLINP-Expressionsplasmide sowie ein monoklonaler Antikörper gegen PLINP hergestellt.

Um die Expression der teils selbst hergestellten teils bereits zu Beginn dieser Arbeit vorhandenen PLINP-Expressionsplasmide pcDNA-PLINP, pEGFP-PLINP, pcDNA-Flag-PLINP und pcDNA-PLINP+Tag zu überprüfen, wurden die Plasmide in 911-, 293T-, HeLa- und NIH3T3-Zellen transfiziert und die Menge und Größe der exprimierten Proteine im Western Blot überprüft (siehe Abbildung 3.29).

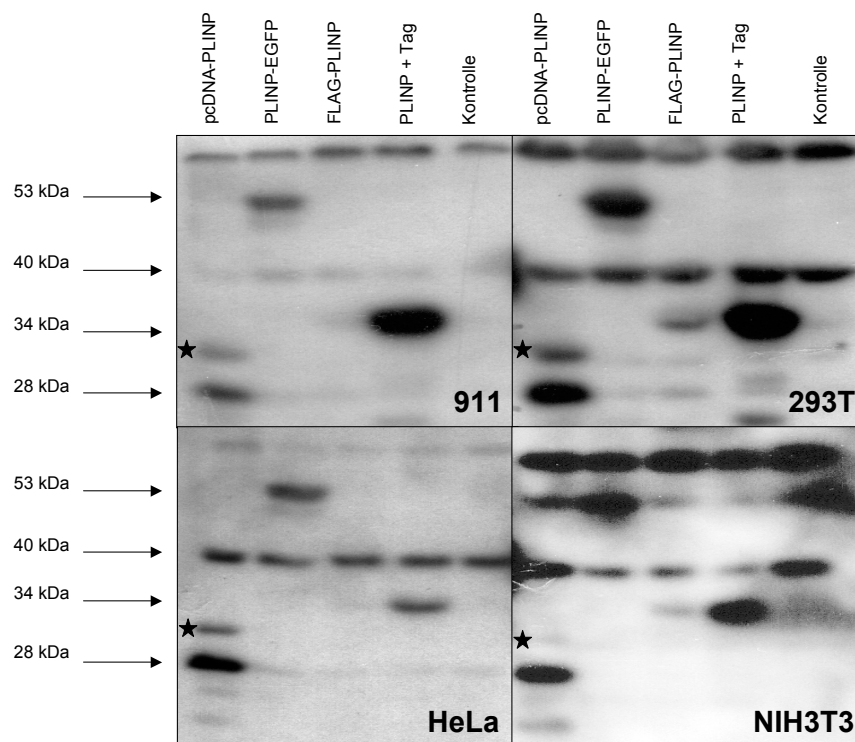


Abbildung 3.29: **Expression verschiedener PLINP-Expressionsplasmide in verschiedenen Zelllinien.** Der Western Blot zeigt die Expression verschiedener PLINP-Konstrukte in den Zelllinien 911, 293T, HeLa und NIH3T3. Die Expression aller Konstrukte ist in sämtlichen getesteten Zelllinien positiv, jedoch zeigen sich Unterschiede in der Intensität der Expression. Das Expressionskonstrukt von unfusioniertem PLINP aus dem pcDNA-Vektor (pcDNA-PLINP) bildet dabei eine erwartete Bande bei etwa 28 kDa sowie eine weitere Bande bei etwa 32 kDa (mit Stern gekennzeichnet). Das EGFP-PLINP-Fusionsprotein findet sich erwartungsgemäß bei einer Größe von etwa 53 kDa. Das PLINP-Fusionsprotein mit dem Flag-Tag wird nur schwach exprimiert und läuft im Western Blot mit etwa 34 Da 6 kDa höher als erwartet. PLINP + Tag ist ein Protein mit einer nicht funktionalen zusätzlichen Sequenz, welches sich im Western Blot wie vorausgesagt bei etwa 34 kDa findet. Die Kontrolle zeigt schwach das endogene PLINP bei einer Größe von etwa 28 kDa, welches aufgrund der geringen Expositionszeit leider nicht deutlicher zu erkennen ist. Die Banden bei etwa 40 und 60 kDa sind unspezifisch und resultieren aus einer Kreuzreaktivität des Antikörpers mit anderen zellulären Proteinen. Der Nachweis erfolgte über den monoklonalen Antikörper OFR1 #57 in einer 1:5 Verdünnung / Ziege anti-Ratte HRP in einer 1:3.000 Verdünnung.

Zunächst lässt sich feststellen, dass PLINP von allen Expressionsplasmiden in sämtlichen getesteten Zelllinien exprimiert wird, wobei das Flag-PLINP-Konstrukt nur eine geringe

Expression zeigt. Zudem ist die erhaltene Bande mit circa 34 kDa etwa 6 kDa größer als erwartet. Eine Kontrolle der Identität dieser Bande mittels eines anti-Flag-Antikörpers verifiziert jedoch diese Bande als Flag-PLINP. Auffällig wird in diesem Experiment außerdem, dass unfusioniertes PLINP neben der erwarteten Bande bei circa 28 kDa noch eine zusätzliche Bande bei circa 32 kDa zeigt. Diese Bande zeigt sich bei allen Zelllinien, ist jedoch bei den NIH3T3-Zellen sehr viel schwächer ausgeprägt als bei den anderen getesteten Linien. Eine Möglichkeit für das Vorhandensein dieser Bande könnte eine posttranslationale Modifikation sein, die beispielsweise durch eine SUMOylierung, eine Phosphorylierung oder auch andere kovalente Veränderungen des Ausgangsproteins hervorgerufen wurde.

Interessanterweise wurde bereits in einer früheren Arbeit festgestellt, dass nach Infektion von Vero2-2-Zellen mit HSV-1 eine zusätzliche Bande des endogenen PLINP bei etwa 32 kDa entsteht (persönliche Mitteilung von Tim Nötzel, DKFZ). Vero2-2-Zellen sind Nierenzellen der afrikanischen Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), in denen PLINP eine hohe Homologie zu der PLINP-Variante des Menschen aufweist. Bei diesen Versuchen konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der zusätzlich entstandenen Bande um Proteine des HSV-1 handelt.

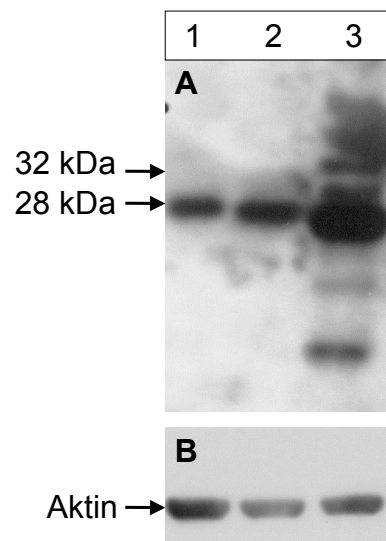


Abbildung 3.30: **Die Infektion von Vero2-2-Zellen mit HSV-1 in einer MOI von 10 lässt keine zusätzliche Bande von PLINP in der Höhe von 32 kDa entstehen.** Vero2-2-Zellen wurden mit HSV-1 Virionen in einer MOI von 10 für einen Zeitraum von 6 Stunden infiziert oder mit pcDNA-PLINP transfiziert und nach einer Inkubation von 48 Stunden für eine Western Blot-Analyse präpariert. Der Blot zeigt dabei PLINP über den Nachweis mit OFR1 #57 in einer 1:5 Verdünnung / Ziege anti-Ratte in einer 1:3.000 Verdünnung (A) oder Aktin als Ladekontrolle durch den Nachweis mit Maus- α -Aktin in einer Verdünnung von 1:5.000 / GAMPO in einer Verdünnung von 1:3.000 (B). Spur 1: HSV-1 infizierte Vero2-2; Spur 2: untransfizierte Zellen; Spur 3: pcDNA-PLINP transfizierte Vero2-2

Der Versuch konnte jedoch, wie in Abbildung 3.30 gezeigt wird, nicht die in einer früheren Arbeit erhaltenen Ergebnisse reproduzieren. Dabei war sowohl die Zelllinie als auch

die zur Infektion genutzte MOI von HSV-1 Viren analog zum damaligen Versuch. In dem durchgeführten Versuch lässt sich im Western Blot deutlich das endogene PLINP mit nur einer distinkten Bande sowohl bei dem mit HSV-1 infiziertem als auch dem Kontrollansatz erkennen. In dem Ansatz hingegen, der mit pcDNA-PLINP transfiziert wurde, ist klar eine zusätzliche Bande bei etwa 32 kDa zu sehen. Dieser Versuch wurde, um Probleme mit dem benutzten Antikörper auszuschließen, außerdem mit dem in dieser Arbeit hergestellten polyklonalen Kaninchen-Serum durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt). Aufgrund der Diskrepanz zu dem damalig angefertigten Versuch ist hier leider zusammenfassend keine Aussage zu treffen. In der damaligen Arbeit wurde jedoch auch das pcDNA-PLINP-Konstrukt hergestellt und in Bezug zu der Expression von PLINP schon damals keine Dokumentation über eine zusätzliche Bande bei 32 kDa angefertigt.

3.3.1 Expression und posttranskriptionale Modifikation von PLINP

In transfizierten Zellen wurden zwei unterschiedliche Formen von PLINP mittels Western Blot nachgewiesen, eine 28 kDa- und eine 32 kDa-Form. Die zusätzliche 32 kDa-Form ist möglicherweise auf eine posttranslationale Modifikation des PLINP-Proteins wie etwa Phosphorylierung oder SUMOylierung zurückzuführen. Das verlangsamte Laufverhalten des modifizierten Proteins führt im Western Blot zu einer zusätzlichen Bande mit höherem Molekulargewicht. Eine SUMOylierung des Proteins ließe eine zusätzliche Bande von 10-15 kDa über der Proteinbande erwarten, also wesentlich höher als die 32 kDa-Form. Eine SUMO-Interaktionssequenz innerhalb der putativen NLS-Region der PLINP-Sequenz ließ jedoch trotzdem eine SUMOylierung möglich erscheinen. Für die Untersuchung einer Modifikation durch SUMO wurde unfusioniertes PLINP transient in 293T-Zellen exprimiert. Koexprimiert wurden SUMO-1 als HA- beziehungsweise GFP-Fusionsprotein sowie Ubc9, welches als SUMO-Ligase den SUMOylierungsprozentsatz des Zielproteins erhöht. Um die Einflüsse der einzelnen Proteine auf die Expression von PLINP zu detektieren, wurden mögliche Kombinationen zwischen den Proteinen koexprimiert. Erwartet wurde bei erfolgreicher SUMOylierung von PLINP die Verstärkung der Bande bei 32 kDa. Dies war jedoch nicht der Fall, wie in Abbildung 3.31 deutlich wird. Der gleiche Versuch wurde freundlicherweise von Mitarbeitern des Labors von Thomas Hofmann (DKFZ) mit SUMO-2 und SUMO-3 durchgeführt, welches zu den gleichen Ergebnissen führte (nicht gezeigt).

Überraschenderweise konnte bei unfusioniertem PLINP eine drastische Änderung im Expressionsverhalten verzeichnet werden. Die 32 kDa-Form von PLINP verschwand bei Koexpression mit GFP-SUMO fast vollständig, bei Koexpression von HA-SUMO in geringerem Maße. Diesen Effekt löst SUMO selbst, jedoch nicht die anderen koexprimierten Proteine aus. SUMO übt folglich einen andersartigen Einfluss als die SUMOylierung

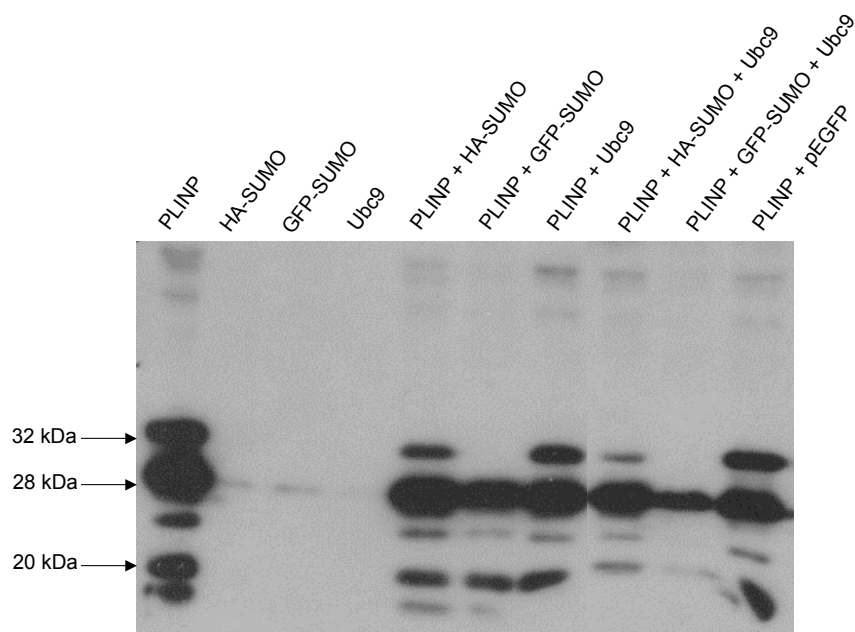


Abbildung 3.31: Die Expression von unfusioniertem PLINP zeigt eine zusätzliche Bande bei ca. 32 kDa, die bei Koexpression mit einem GFP-SUMO-1-Fusionsprotein verschwindet. Ein geringerer Effekt zeigt sich bei Koexpression von HA-SUMO-1; Ubc9 hat keinen Einfluss. Die in den Reihen genannten Proteine wurden in 293T-Zellen exprimiert und im Western Blot analysiert. Es wird deutlich, dass die Expression von GFP-SUMO unabhängig von einer Koexpression von Ubc9 zu einem Verschwinden der 32 kDa-Form von unfusioniertem PLINP führt. HA-SUMO zeigt den gleichen Effekt, der jedoch schwächer ausgeprägt ist.

auf die Expression von PLINP aus.

Fasst man die erhaltenen Ergebnisse zusammen, so gibt es einen Zusammenhang zwischen PLINP und SUMO. Dieser gestaltet sich jedoch nicht erwartungsgemäß über die SUMOylierung von PLINP als posttranskriptionale Modifikation über die putative Interaktionsstelle in der Sequenz von PLINP. Vielmehr führt die Koexpression von SUMO in An- oder Abwesenheit von Ubc9 zusätzlich zum unfusionierten PLINP dazu, dass die 32 kDa-Form verschwindet.

Eine weitere posttranskriptionale Modifikation neben der SUMOylierung ist die Phosphorylierung. Ein Protein kann an den Aminosäuren Tyrosin, Serin oder Threonin phosphoryliert werden. Zumeist führt die Phosphorylierung zu einer kaum veränderten Größe des Proteins, da jede kovalent gebundene Phosphatgruppe nur eine geringe Änderung der Gesamtgröße bewirkt. PLINP könnte theoretisch an 19 Aminosäuren in der Sequenz phosphoryliert sein. Da dies zu einer Größenänderung von etwa 1,5 kDa führen würde, ist eine Phosphorylierung von PLINP als Ursache für die zusätzliche Bande sehr unwahrscheinlich. Dennoch wurde PLINP einer Dephosphorylierung durch CIAP und in einem zweiten Ansatz durch λ -Phosphatase unterzogen. Die Ergebnisse gaben keine Hinweise auf eine Phosphorylierung von PLINP (Daten nicht gezeigt).

Eine Immunpräzipitation für eine spätere MALDI-TOF-Analyse gelang leider mit bei-

den zur Verfügung stehenden Antikörpern für PLINP nicht, so dass diese Methode zur Identifikation der zusätzlichen Bande nicht in Anspruch genommen werden konnte. Es ist somit weiterhin unklar, welche Identität die zusätzliche Bande von PLINP aufweist und wird später diskutiert.

Unterschiede des unfusionierten PLINP im Vergleich zu PLINP-Fusionsproteinen zeigten sich bei Western Blot- und Immunfluoreszenzanalysen. Exprimiert man PLINP unfusioniert oder als EGFP-Fusionsprotein in 293T-Zellen oder anderen menschlichen Tumorzelllinien wie 911-Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt), zeigt unfusioniertes PLINP eine andere Lokalisation im Vergleich zu EGFP-PLINP (3.32). So detektiert man typischerweise das EGFP-PLINP-Protein diffus im Kern oder in PODs (A) lokalisiert. Der Prozentsatz der POD-Lokalisation ist dabei in etwa 20% der PLINP exprimierenden Zellen zu finden, die diffuse Verteilung bei den restlichen 80% der Zellen. Unfusioniertes PLINP findet man dagegen zusätzlich auch in zytoplasmatischen Strukturen. Etwa 60% der Zellen zeigen eine diffuse Kernverteilung von PLINP, je 10% der Zellen findet man in PODs oder sowohl in PODs als auch in punktartigen Strukturen des Zytoplasmas und 20% ausschließlich in diesen punktartigen Strukturen des Zytoplasmas (B). Ausgezählt wurden bei diesem Versuch etwa 500 positive Zellen durch DAPI-Färbung.

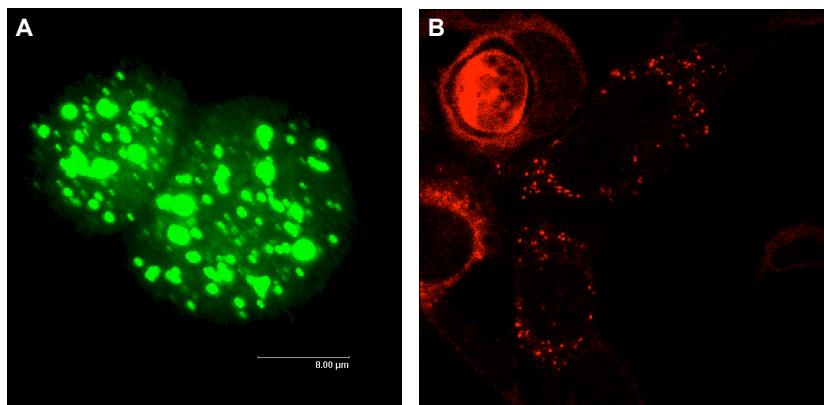


Abbildung 3.32: **Unterschiede in der subzellulären Lokalisation des EGFP-PLINP-Fusionsproteins und pcDNA-PLINP in 293T-Zellen.** Das EGFP-PLINP-Fusionsprotein ist nach Transfektion in 293T-Zellen und 48-stündiger Inkubation ausschließlich im Kern lokalisiert. Dort ist es entweder diffus verteilt oder findet sich in subnukleären Strukturen. Das unfusionierte PLINP-Protein des pcDNA-Expressionskonstruktes zeigt sich zudem in punktartiger Verteilung im Zytoplasma der Zelle. **A:** EGFP-PLINP-Fusionsprotein; Autofluoreszenz; **B:** unfusioniertes PLINP; Nachweis durch OFR1 #57 (1:5) / Ziege- α -Ratte Cy3 (1:400)

Die Diskrepanz, die zwischen der Lokalisation von EGFP-PLINP und unfusioniertem PLINP besteht, konnte durch veränderte Eigenschaften des Fusionsproteins gegenüber der unfusionierten Variante entstehen und dazu führen, dass EGFP-PLINP ausschließlich im Zellkern zu finden ist.

Das aufgrund dieser Diskrepanz zwischen der Lokalisation von unfusioniertem PLINP

subzelluläre Lokalisation	EGFP-PLINP: Anzahl positive Zellen (Prozentsatz Gesamtzellen)	unfusionsiertes PLINP: Anzahl positive Zellen (Prozentsatz Gesamtzellen)
diffuse Kernverteilung	434 (81%)	313 (56%)
ausschließlich Punktstrukturen im Zellkern	91 (17%)	56 (10%)
ausschließlich Punktstrukturen im Zytoplasma	0 (0%)	100 (18%)
zytoplasmatische Dots und diffuse Kernverteilung	0 (0%)	67 (12%)
Punktstrukturen im Zytoplasma und Kern	0 (0%)	11 (2%)
diffuse zytoplasmatische Verteilung	11 (2%)	11 (2%)

Tabelle 3.6: **Vergleich der zellulären Lokalisation von unfusionsiertem PLINP und EGFP-PLINP.** Ein tabellarischer Vergleich zeigt die Unterschiede in der zellulären Lokalisation von unfusionsiertem PLINP und dem EGFP-PLINP-Fusionsprotein in 293T-Zellen auf. Bei Expression von EGFP-PLINP wurden 536 positive Zellen gezählt, bei Expression von unfusionsiertem PLINP 558 positive Zellen.

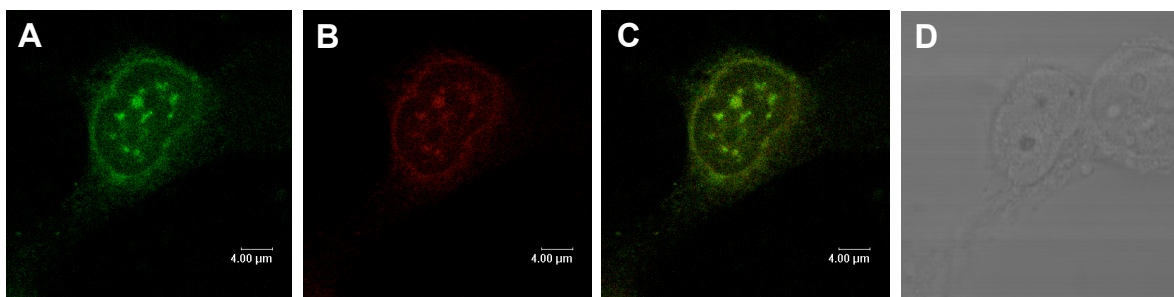


Abbildung 3.33: **Die subzelluläre Lokalisation des Flag-PLINP-Fusionsproteins in 293T-Zellen ist nicht ausschließlich auf den Zellkern beschränkt.** Das Flag-PLINP-Fusionsprotein ist hauptsächlich diffus oder in punktartigen Strukturen im Zellkern lokalisiert. Geringe Signale von Flag-PLINP sind jedoch auch an der Kernmembran und im Zytoplasma zu detektieren. **A:** Flag-PLINP-Fusionsprotein, Nachweis durch anti-Flag Antikörper, FITC-gekoppelt (1:100); **B:** Flag-PLINP-Fusionsprotein; Nachweis durch OFR1 # 57 (1:5) / Ziege- α -Ratte Cy3 (1:400); **C:** Überlagerung von A und B; **D:** Durchlichtbild der Zellen

und EGFP-PLINP klonierte Expressionskonstrukt mit einem Flag-Tag, welches nur einen Anhang von acht Aminosäuren zur Folge hat, zeigte in der Immunfluoreszenz eine ähnliche Verteilung wie EGFP-PLINP (Abbildung 3.33). Jedoch ist ein geringer Teil von Flag-PLINP auch an der Kernmembran und diffus im Zytoplasma lokalisiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei einigen detektierten subzellulären Lokalisationen um Artefakte handeln könnte. Um dies zu klären, war es von höchstem Nutzen, die Lokalisation des endogenen PLINP sichtbar zu machen. Da dieses bis zu dem Zeitpunkt mit den vorhandenen Antikörpern jedoch nicht möglich war, wurde eine Strategie zur Herstellung neuer Antikörper entwickelt, die im nächsten Abschnitt erläutert werden soll.

3.3.2 Nachweis des endogenen PLINP mittels neu hergestellter Antikörper

Ein bereits in einer früheren Arbeit getätigter einmaliger Nachweis des endogenen PLINP in den Zellen konnte zu dieser Zeit mit den bereits vorhandenen Antikörpern nicht reproduziert werden. Deshalb wurde mittels eines PLINP-Peptides, welches zur Erhöhung der Immugenität *in vitro* an das Trägermolekül KLH gekoppelt wurde, ein polyklonales Kaninchen anti-PLINP Antiserum hergestellt (siehe dazu 2.2.9). Dieses Serum war reproduzierbar in der Lage, das schwach exprimierte endogene PLINP in der Zelle nachzuweisen. Dies wird in der Abbildung 3.34 sichtbar.

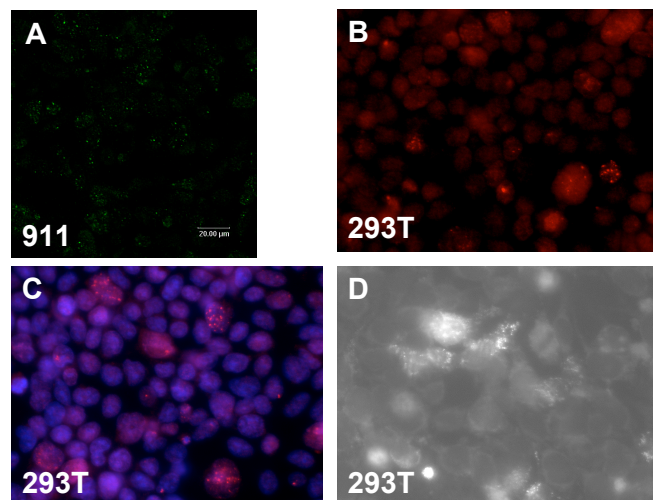


Abbildung 3.34: **Subzelluläre Lokalisation des endogenen PLINP in 911- oder 293T-Zellen.** Endogenes PLINP ist sowohl in subnukleären Strukturen als auch im Zytoplasma lokalisiert. **911**: endogenes PLINP; Nachweis durch polyklonales Kaninchen-Serum (1:800) / Ziege- α -Kaninchen Alexa 488 (1:300), **293T**: endogenes PLINP; Nachweis durch verschiedene Antiseren aus Maus und Kaninchen

Durch den Nachweis des endogenen PLINP in der Zelle konnte gezeigt werden, dass PLINP in der Zelle nicht ausschließlich in PODs lokalisiert ist, sondern zu einem Teil auch in distinkten Punkten des Zytoplasmas. Eine Lokalisation von PLINP sowohl in PODs als auch im Zytoplasma wurde zuvor noch nicht beschrieben.

Folgend war es von größtem Interesse zu klären, in welchen Organellen der Zelle PLINP neben dessen Assoziation zu PODs lokalisiert. Eine Vermutung zur Lokalisation aufgrund des Erscheinungsbildes in der Immunfluoreszenzanalyse war die Lokalisation in Mitochondrien. Um diese Hypothese experimentell zu belegen, wurde unfusioniertes PLINP in 293T-Zellen exprimiert und mit dem Antikörper *MitoTracker* lebend gefärbt. Nach dieser Prozedur konnten die Zellen durch Fixierung auf dem Objektträger haltbar gemacht und folgend der indirekte Antikörpernachweis von PLINP durchgeführt werden. Die Abbildung 3.35 bestätigt die partielle Lokalisation von PLINP in Mitochondrien durch die Kolo-kalisation des zytoplasmatischen PLINP-Signals und des mitochondrialen Markers.

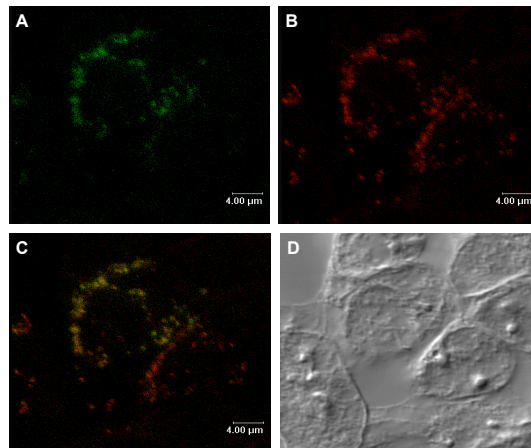


Abbildung 3.35: **Exogenes unfusioniertes PLINP lokalisiert in PODs und kolokalisiert mit Mitochondrien in transfizierten 293T-Zellen.** Unfusioniertes PLINP ist in 293T-Zellen sowohl im Kern lokalisiert als auch kolokalisiert mit Mitochondrien zu finden. **A:** Nachweis von PLINP über OFR1 # 57 (1:5) / Ziege- α -Ratte-FITC, **B:** Nachweis der Mitochondrien durch *MitoTracker-Red* (1:20.000) / Ziege- α -Ratte Cy3 (1:400), **C:** Überlagerung von A und B, **D:** Durchlichtbild der Zellen

Somit ist eine partielle mitochondriale Lokalisation von PLINP wahrscheinlich. Für andere Proteine wurde bereits eine partielle Kern- und Mitochondrien-Lokalisation beschrieben, wie etwa Studien von Lundberg *et al.* am Beispiel von Glutaredoxin zeigen (Lundberg *et al.*, 2001). Dennoch existieren auch Studien über Artefakte einer mitochondrialen Lokalisation von Proteinen, die durch eine Kreuzreaktivität von Antikörpern mit mitochondrialen Proteinen entstehen (Platenik *et al.*, 2005).

Studien belegen die Involvierung der Mitochondrien in die Apoptose (Rogue & Malviya, 1999). Da PLINP ein negativer Regulator des Zellzyklusverlaufs und des Zellwachstums ist und eine Interaktion mit GADD45, ein in die Apoptose eingebundenes Protein, eingeht, würde dies im funktionalen Zusammenhang Sinn ergeben. Aus Zeitgründen konnte die Verbindung von PLINP zu Mitochondrien jedoch nicht detaillierter analysiert werden. Zusammenfassend konnte durch die Experimente gezeigt werden, dass PLINP nicht nur im Kern zu PODs assoziiert, sondern höchstwahrscheinlich partiell mit Mitochondrien assoziiert.

3.4 Einfluss von PLINP auf die Expression und Lokalisation der viralen Kapsidproteine

Bei der Untersuchung, welche Rolle L2 im Hinblick auf die Interaktion mit PLINP erfüllt, ist es zunächst entscheidend zu wissen, ob die Expression von PLINP durch die Anwesenheit von überexprimiertem L2 in der Zelle bezüglich des auftretenden Bandmusters und der Expressionsstärke beeinflusst ist. Dazu erfolgte ein Vergleich zwischen 293T-Zellen, die PLINP, welches durch verschiedene Expressionsplasmide kodiert war, exprimierten

und 293T-Zellen, die zudem noch HPV16 L2 exprimierten.

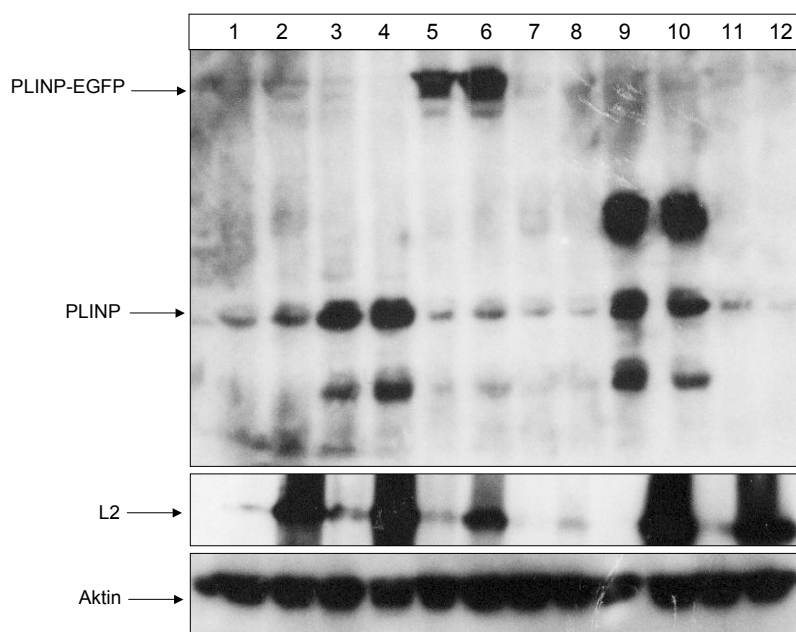


Abbildung 3.36: **Die Expression von L2 hat keinen Einfluss auf die Expressionsmuster von endogenem oder exogenem PLINP.** 293T-Zellen wurden mit verschiedenen Expressionsplasmiden von PLINP transfiziert. Kotransfiziert wurde in einem zweiten Ansatz ein Expressionsvektor von HPV16 L2 in humanisierter Form. Die Ansätze sind wie folgt jeweils zuerst ohne Anwesenheit von L2 (ungerade Ziffern), dann unter Einfluss von L2 (gerade Ziffern). 1/2: LacZ-Kontrolle; 3/4: pcDNA-PLINP; 5/6: EGFP-PLINP; 7/8: Flag-PLINP; 9/10: PLINP + Tag; 11/12: untransfizierte Kontrolle. Der Nachweis erfolgt über OFR1 #57 in einer 1:5 Verdünnung und Ziege anti-Ratte HRP (1:3.000).

Dazu wurden die entsprechenden Expressionsvektoren in 293T-Zellen (ko-)transfiziert und die exprimierten Proteine durch Western Blot-Analyse untersucht. Wie in der Abbildung 3.36 klar wird, kann kein Einfluss von L2 auf das Expressions-Bandenmuster von endogenem oder exogenem PLINP detektiert werden. Die Expressionsstärke ist durch den Western Blot durch nicht gleichmäßige L2-Expression und die nicht exakt gleiche Proteinmenge in den verschiedenen Ansätzen nicht gut zu beurteilen, scheint aber nicht wesentlich beeinflusst zu sein.

3.5 RNA-Interferenz von PLINP

Experimente mit überexprimiertem zellulären Protein stellen immer ein artifizielles System dar, weil diese meist ein anderes Verhalten in der Zelle aufweisen als endogene Proteine. Da zudem die endogene Expression von PLINP sehr gering ist, so dass ein Nachweis stark erschwert war, wurde in dieser Arbeit nach anderen Möglichkeiten gesucht, die Interaktion von PLINP und dem viralen Protein L2 in der Zelle zu charakterisieren.

Die RNA-Interferenz bietet dem Experimentator die Möglichkeit, die Expression eines

zellulären Proteins zu hemmen. Untersucht man nun die Art der Interaktion zwischen zwei Proteinen, so kann man durch gehemmte Expression des einen Proteins den Einfluss auf das andere Protein untersuchen. Dazu gibt es hauptsächlich drei experimentelle Möglichkeiten. Zum einen die Transfektion von siRNA, zum anderen die Transfektion von Vektoren, die für eine Vorstufe der siRNA kodieren, die in der Zelle mittels der RNA-Polymerase III zu ihrer aktiven Form umgewandelt werden. Die dritte noch wenig genutzte Möglichkeit ist die Transfektion von miRNA. In dieser Arbeit wurde die Form gewählt, siRNA *in vitro* herzustellen und direkt in die Zielzellen zu transfizieren. Der Abschnitt 3.5.1 soll zunächst in die Synthese der siRNAs und dann die notwendigen Vorversuche einführen.

3.5.1 Herstellung der PLINP-spezifischen siRNAs

In diesem Versuch wurde die Sequenz bereits in Studien verwendeter siRNAs gewählt (Chung *et al.*, 2003) und diese schließlich synthetisiert. Der Effekt der siRNA ist stark abhängig von der Zielsequenz, die sich zwar anhand bestimmter Regeln optimieren lässt, aber keine Garantie für ein erfolgreiches *Gene Silencing* bietet. Aufgrund dessen wurden zwei verschiedene Sequenzen als Ziel gewählt, um die Chance auf eine erfolgreiche RNA-Interferenz der PLINP-mRNA mit wenigstens einer siRNA zu erhöhen. Die zwei siRNAs wurden mit 1-PLINP und 2-PLINP bezeichnet (siehe 2.1.2.2.2). Um eine Kontrolle für die Spezifität der *Silencing*-Effekte zu haben, wurde neben einer im Kit bereits enthaltenen siRNA gegen das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) zusätzlich eine PLINP-siRNA mit Mutationen in der Sequenz hergestellt. Diese 1-PLINPwrong genannte siRNA basiert mit ihrer Sequenz auf der von 1-PLINP, zeigt aber zwei zuvor am Computer ausgewählte Mutationen an unterschiedlichen Stellen der Sequenz, so dass keine Bindung mehr an die Ziel-mRNA erfolgen sollte. Die Herstellung der siRNA erfolgte nach Synthese der Oligonukleotide für den *sense*- und den *antisense*-Strang nach Angaben des Herstellers *Ambion* nach dem angegebenen Schema 3.37, welches detaillierter in 2.2.3.3 beschrieben wird.

3.5.2 Überprüfung der PLINP-spezifischen siRNAs

Nach Herstellung der siRNAs wurden diese zunächst daraufhin geprüft, ob die hergestellten Konstrukte für die transfizierte Zelle toxisch sind. Dazu wurde durch eine Zell-Lebendfärbung in drei voneinander unabhängigen Experimenten (siehe 2.2.6.7) eine eventuelle Schädigung der Zellen deutlich gemacht. Im Versuch wurde ein Farbstoff zur Färbung von Zellen genutzt. Dabei waren nur die lebenden Zellen zur Bindung des Farbstoffs in der Lage, so dass die Absorptionsmessung bei 595 nm nach erneuter Freisetzung des Farbstoffs aus den Zellen ein Maß für die Anzahl lebender Zellen im Ansatz

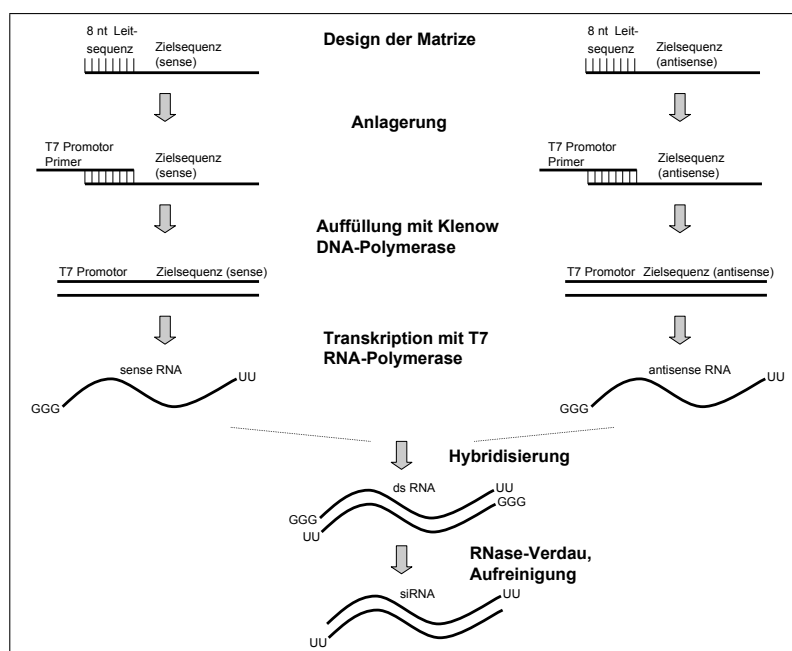


Abbildung 3.37: **Schematische Übersicht der experimentellen Synthese von siRNA nach Herstellerangaben des Silencer siRNA Construction Kit (Ambion).**

Transfektion von	Mittelwert $A_{595 \text{ nm}}$	Prozentsatz
-	$0,500 \pm 0,012$	100 ± 2
1-PLINP	$0,511 \pm 0,010$	101 ± 2
2-PLINP	$0,500 \pm 0,008$	100 ± 2
1-PLINPwong	$0,481 \pm 0,016$	95 ± 3
siGAPDH	$0,498 \pm 0,012$	99 ± 2

Tabelle 3.7: **Eine Zell-Lebendfärbung zeigt keine Beeinflussung von 293T-Zellen durch PLINP-spezifische siRNAs.** 293T-Zellen wurden mit den spezifischen siRNAs für PLINP sowie für die Kontrollen transfiziert und nach 48 Stunden Inkubation einer Zell-Lebendfärbung unterworfen. Der Mittelwert der Absorption bei 595 nm errechnet sich aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die nicht transfizierte Kontrolle bezieht sich auf ohne siRNA transfizierte 293T-Zellen und wird auf 100% normiert. Es sind keine signifikanten Unterschiede der siRNA-Ansätze vergleichbar zur Kontrolle erkennbar.

darstellt. Wie in Abbildung 3.7 gezeigt wird, ist keine signifikante Schädigung der Zellen durch Einfluss der siRNAs zu sehen, so dass die siRNAs in die Zellen transfiziert und der Effekt des Silencing des PLINP-Gens analysiert werden konnte.

Nach diesem Vortest konnte die Funktionalität der hergestellten siRNAs überprüft werden. Dazu wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen siRNA-transfizierten 293T-Zellen extrahiert (siehe 2.2.3.1). Anschließend wurde die RNA auf gleiche Konzentrationen verdünnt und die enthaltene mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgewandelt (siehe 2.2.3.2). Diese wurde erneut bei eventuellen Abweichungen auf eine gleiche Konzentration eingestellt und in eine PLINP-spezifische PCR eingesetzt. Als Kontrollen dienten eine PCR für GAPDH, die die Degradation von GAPDH durch siGAPDH zeigen sollte sowie eine PCR für Aktin, die die gleichmäßige Konzentration der Template-cDNA

durch die Amplifikation des Haushaltsgens Aktin belegen sollte. Als weitere Kontrolle diente eine PCR, in der man die RNA aus dem Schritt vor der cDNA-Synthese einsetzt, um Kontaminationen mit DNA im Ansatz auszuschließen. Alle PCR-Ansätze sind in Vorversuchen durch die Reduktion der Zyklenzahl so optimiert worden, dass Unterschiede in der Konzentration der Template-cDNA in der PCR deutlich werden (siehe 2.2.2.11).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.38 dargestellt.

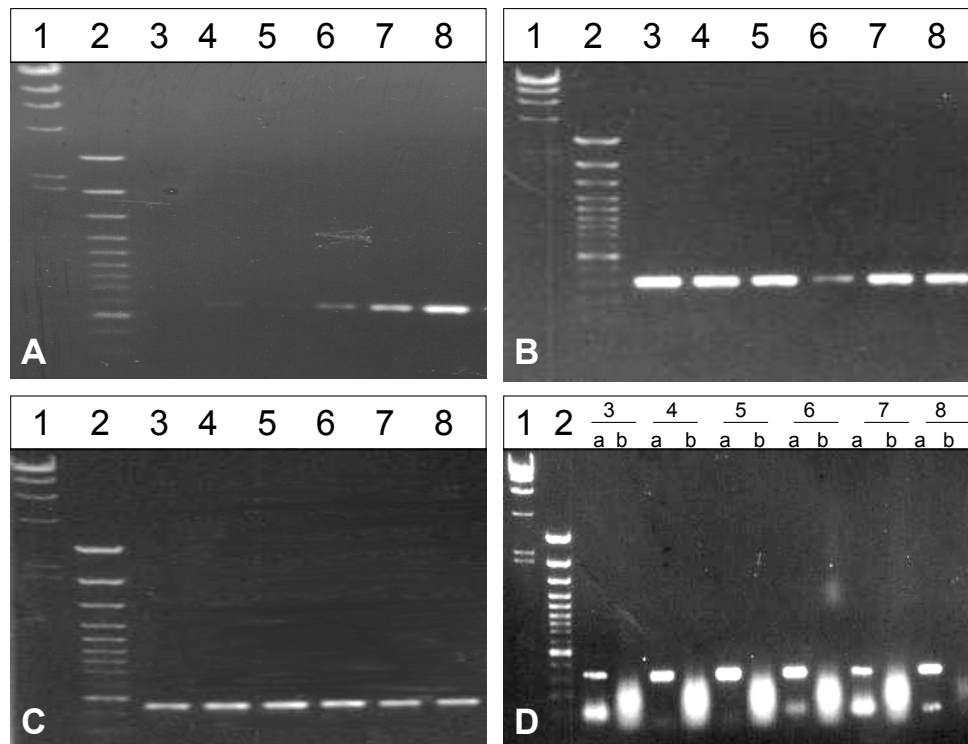


Abbildung 3.38: **Die RNA-Interferenz von PLINP sowie als Kontrolle von GAPDH ist auf RNA-Ebene nach einer RT-PCR signifikant ersichtlich.** 293T-Zellen wurden mit vorhandenen siRNAs oder Expressionsplasmiden transfiziert und nach den PCRs im Agarosegel wie folgt aufgetragen: 1: λ -Marker; 2: 100 bp-Marker; 3: 1-PLINP; 4: 2-PLINP; 5: 1-PLINPwrong; 6: siGAPDH; 7: pEGFP-PLINP; 8: pcDNA-PLINP. Nach 48-stündiger Inkubation wurde Total-RNA aus den Zellen isoliert, auf gleiche Konzentrationen angepasst, mittels reverser Transkription in cDNA umgewandelt, erneut auf gleiche Konzentrationen gebracht und in die spezifischen PCRs eingesetzt. **A:** PLINP-PCR; **B:** GAPDH-PCR; **C:** Aktin-PCR; **D:** GAPDH-PCR mit cDNA (a) und RNA vor der reversen Transkription (b)

Es ist deutlich, dass sowohl die Transfektion von 1-PLINP als auch die von 2-PLINP zur Degradation von PLINP-mRNA führte (siehe 3.38 A). Allerdings wird auch deutlich, dass die Transfektion der Kontrolle 1-PLINPwrong zur Degradation von PLINP-mRNA führte. Dies könnte durch eine nicht genügend hohe Anzahl an Mutationen in der siRNA-Spezifikationskontrolle zu begründen sein, da in der Literatur eine Mindestanzahl von zwei Mutationen für eine siRNA experimentell ermittelt wurde. Die Funktionalität von siGAPDH zeigte sich bei der GAPDH-PCR, in der die Reduktion von GAPDH-mRNA unter Einfluss von siGAPDH sichtbar wird (Abbildung 3.38 B). In dieser Abbildung ist auch

erkennbar, dass kein unspezifischer *Silencing*-Effekt auf GAPDH durch PLINP-siRNAs ausgelöst wird. Es kann ausgeschlossen werden, dass eine ungleichmäßige Konzentration an cDNA in den Ansatz eingesetzt wurde (3.38 C: Aktin-PCR) oder Kontaminationen mit genomischer DNA in der RNA-Präparation vorlagen (3.38 D: GAPDH-PCR mit cDNA und RNA vor der reversen Transkription). Der Versuch 3.38 A bis C wurde zur Absicherung der Ergebnisse mit den anderen Zelllinien 911 und Hela* mit analogen Resultaten durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Nach erfolgtem Nachweis der Degradation von PLINP-mRNA durch die Transfektion von PLINP-siRNA konnte mittels Western Blot geprüft werden, ob auch die PLINP-Expression durch die siRNAs gehemmt ist. Es wurde eine Reduktion der Bandenstärke wie in Abbildung 3.39 unter Einfluss von 1-PLINP, 2-PLINP und 1-PLINPwrong gezeigt, nicht jedoch bei siGAPDH. Die untransfizierte Kontrolle zeigte ebenfalls ein schwächeres Signal im Western Blot als die Kontrolle siGAPDH, was aber dadurch zu begründen ist, dass auch das Aktin-Signal in diesem Ansatz schwächer ist. Aktin stellt als Haushaltprotein einen Marker für die Gesamtproteinmenge dar. Die Reduktion des PLINP-Expressionslevels unter Einfluss von 1-PLINP war etwas stärker als unter 2-PLINP, jedoch zeigte auch die Spezifitätskontrolle aus der Transfektion mit 1-PLINPwrong eine deutliche Minderung des Expressionslevels von PLINP. Eine Analyse der siRNA-Effekte auf das endogene PLINP konnte nicht in anderen Systemen wie der FACS-Analyse oder der Immunfluoreszenz getestet werden, da beide PLINP-spezifischen Antikörper gegen PLINP nicht für die FACS-Analyse geeignet waren beziehungsweise das Signal der Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz so schwach war, dass eine objektive Auswertung nicht realisiert werden konnte.

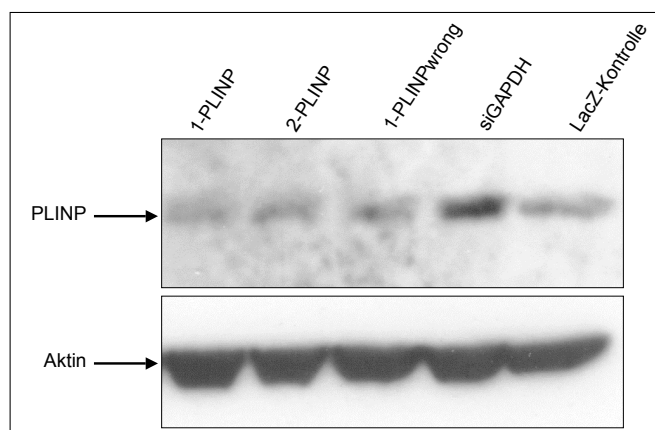


Abbildung 3.39: **Die Expression des endogenen PLINP in 293T-Zellen wird durch PLINP-spezifische siRNA gehemmt.** 293T-Zellen wurden mit zwei siRNAs, welche spezifisch für PLINP sind, einer Spezifikationskontrolle, sowie einer Kontrolle gegen GAPDH transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde ein totales Zellysat präpariert und mittels Western Blot untersucht. Der Nachweis erfolgte mittels OFR1 #57 in einer 1:25 Verdünnung und Ziege anti-Ratte HRP (1:3.000).

Ein zu beachtender Aspekt bei der RNA-Interferenz ist die Halbwertszeit des Proteins. Bei sehr langer Halbwertszeit kann der Effekt der siRNAs auf die Expression des Zielproteins verzögert stattfinden. Aus dem Grund wurde ein Zeitverlauf der gehemmten Proteinexpression von PLINP durch den Einfluss von siRNA angefertigt.

Der Effekt des PLINP-*Silencing* wurde über einen Zeitraum von 12 bis 96 Stunden verfolgt, um den Zeitpunkt der optimalen Reduktion des Proteinlevels zu ermitteln. Aus 1-PLINP transfizierten 911-Zellen wurden zu den in der Abbildung 3.40 angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und diese mit jeweils angeglichenen Gesamtproteinmengen im Western Blot analysiert.

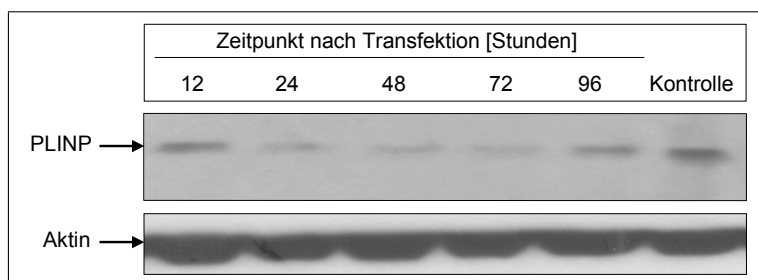


Abbildung 3.40: **Die verminderte Expression von PLINP durch den Einfluss der siRNA 1-PLINP wird ab einem Zeitpunkt von etwa 24 Stunden deutlich und hält bis zu einem Zeitpunkt von etwa 72 Stunden nach der Transfektion in 293T-Zellen an.** Gleiche Anzahlen 293T-Zellen wurden mit 1-PLINP transfiziert. Nach in den Reihen angegebenen Zeitpunkten wurden Ansätze entnommen und die Zellen lysiert. Die Ansätze wurden anschließend nach Angleichung der Proteinkonzentration durch Bradford-Messung in einen Western Blot eingesetzt. Die Kontrolle besteht aus siGAPDH transfizierten 293T-Zellen. Der Nachweis erfolgte über den OFR1 #57-Antikörper in einer 1:25 Verdünnung und Ziege anti-Ratte HRP (1:3.000).

Wie in der Abbildung 3.40 sichtbar, war die Reduktion der PLINP-Expression im Bereich von 24 Stunden bis 72 Stunden stabil, so dass davon auszugehen war, dass in diesem Bereich die Expression von PLINP gehemmt war. Für die folgenden Experimente wurden daraufhin die Zellen nach der Transfektion mit siRNA bis zum Folgeversuch 48 Stunden inkubiert.

Nach erfolgtem Nachweis des reduzierten endogenen PLINP-Expressionslevels wurde nun die Reduktion des überexprimierten EGFP-PLINP-Fusionsproteins durch PLINP-spezifische siRNAs getestet. Die genutzten Methoden bieten die Möglichkeit, die Reduktion des Expressionslevels von EGFP-PLINP zu zeigen und zudem quantitativ zu analysieren, was Analysen des endogenen PLINP nur bedingt erlauben. Es wurden 293T-Zellen mit verschiedenen siRNAs transfiziert und für den jeweiligen Versuch präpariert. Zur Auswertung der Immunfluoreszenz wurden mit Hilfe der *Analysis*-Software durch DAPI-Färbung 500 Zellen gezählt. Von diesen Zellen wurden wiederum GFP-positive Zellen gezählt und in Relation gesetzt. Zur Auswertung der unterschiedlichen Ansätze wurde der Kontroll-Ansatz (EGFP-PLINP) auf 100% gesetzt. Die Daten ergaben, wie

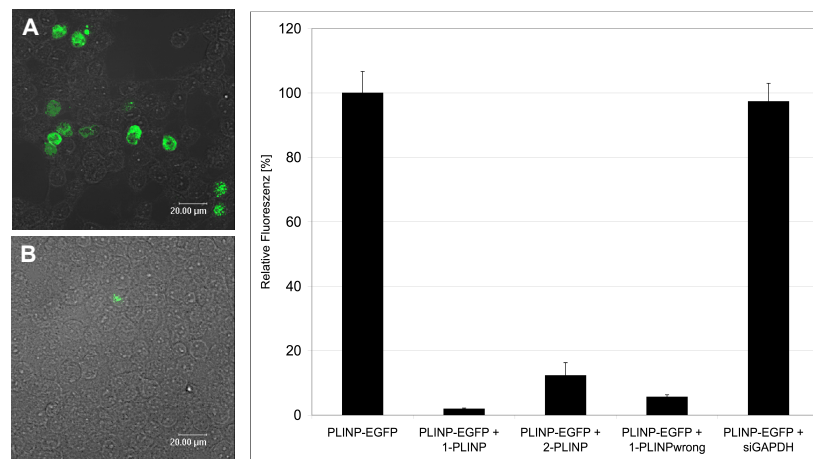


Abbildung 3.41: **Die Expression von EGFP-PLINP in der direkten Immunfluoreszenz ist nach Transfektion von PLINP-spezifischer siRNA in 293T-Zellen signifikant reduziert.** 293T-Zellen wurden mit verschiedenen siRNA-Konstrukten transfiziert und nach 48 Stunden in der direkten Immunfluoreszenz ausgezählt. Mittels *Analysis*-Software wurden 500 Zellen nach DAPI-Färbung und die prozentuale Anzahl EGFP-positiver Zellen gezählt. Dabei wurde die Anzahl positiver Zellen im Kontrollansatz auf 100% gesetzt. **A:** siGAPDH-Transfektion in der Immunfluoreszenz; **B:** 1-PLINP-Transfektion in der Immunfluoreszenz; **Diagramm:** Auswertung der siRNA-Transfektionen in der Übersicht

in Abbildung 3.41 ersichtlich, eine über 96%-ige Reduktion des Fluoreszenzsignals unter Einfluss von 1-PLINP. 2-PLINP reduzierte das exogene EGFP-PLINP-Fusionsprotein um über 86%. Die Wirksamkeit der Spezifikationskontrolle 1-PLINPwrong auf die Hemmung der Expression von PLINP zeigte sich mit einer Reduktion der Fluoreszenzpositivität von 92% auch hier.

Als zweite unabhängige Methode zur Überprüfung der Wirkung der PLINP-spezifischen siRNAs wurde die FACS-Analyse gewählt, da sie eine exakte quantitative Auswertung der Fluoreszenzpositivität und -intensität erlaubt. Die verschiedenen siRNAs wurden in 293T-Zellen transfiziert und im FACS analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.42 dargestellt. Neben der tabellarischen Auswertung der Ergebnisse, welche aus drei voneinander unabhängigen Versuchen stammen, sind in der Abbildung exemplarisch einige Original-Plots aus der Software *CellQuest* dargestellt.

Die Auswertung der FACS-Analyse zeigte die gleichen Ergebnisse wie auch die Auswertung der Immunfluoreszenz. Hier waren ebenso 1-PLINP als auch 2-PLINP in der Lage, die Expression von EGFP-PLINP um fast 80% zu reduzieren. 1-PLINPwrong wies mit einer Signalreduktion von annähernd 60 % einen fast ebenso starken Effekt auf wie die spezifischen siRNAs. Die siGAPDH-Kontrolle hingegen blieb ohne Effekt für die Fluoreszenzpositivität und -intensität der EGFP-PLINP transfizierten Zellen.

Um den Nachweis einer erfolgreichen RNA-Interferenz-Strategie zu komplettieren und zu zeigen, dass kaum noch Expression des EGFP-PLINP-Fusionsproteins durch den Einfluss der PLINP-spezifischen siRNAs stattfindet, wurde ein Western Blot mit siRNA

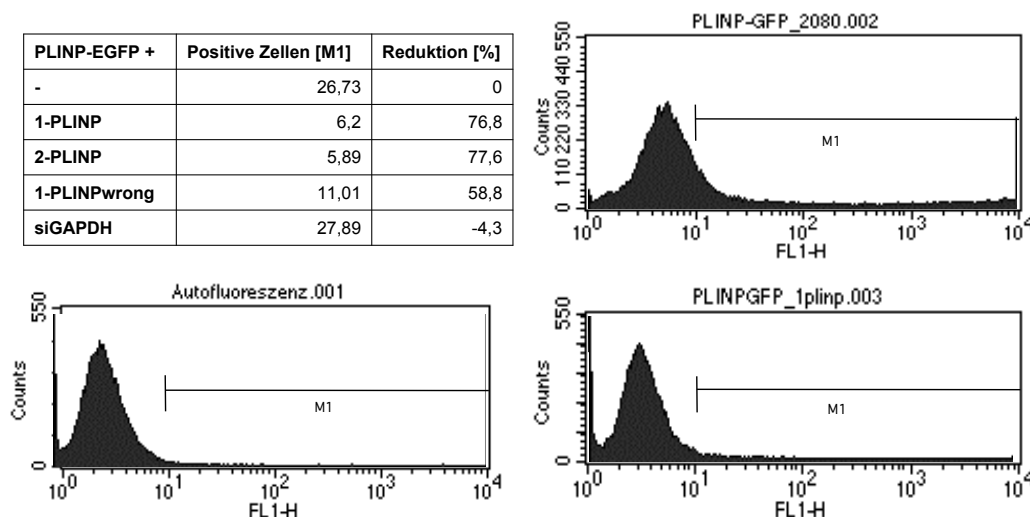


Abbildung 3.42: **Die Expression von EGFP-PLINP in der FACS-Analyse ist nach Transfektion von PLINP-spezifischer siRNA in 293T-Zellen signifikant reduziert.** 293T-Zellen wurden mit verschiedenen siRNA-Konstrukten transfiziert und nach 48 Stunden einer FACS-Analyse unterzogen. Die Abbildung zeigt die Auswertung der FACS-Analyse mit *CellQuest* sowie beispielhaft einige Original-Plots der Auswertungssoftware. Dabei ist mit „Autofluoreszenz“ der untransfizierte Ansatz 293T-Zellen, mit „PLINP-GFP_2080“ der mit dem EGFP-PLINP-Expressionskonstrukt transfizierte und mit „PLINP-GFP_1plinp“ der mit EGFP-PLINP und 1-PLINP kotransfizierte Ansatz beschriftet.

und EGFP-PLINP transfizierten 293T-Zellen durchgeführt.

Abbildung 3.43 zeigt wie auch die Ergebnisse der anderen verwandten Methoden, dass sowohl 1-PLINP, 2-PLINP als auch 1-PLINPwrong nach Transfektion in Zielzellen in der Lage sind, die Expression von EGFP-PLINP zu hemmen. Die Kontrolle siGAPDH dagegen hemmt diese Expression nicht.

Abschließend zu diesem Kapitel ist zusammenzufassen, dass sowohl die Expression von endo- als auch exogenem PLINP durch die siRNAs 1-PLINP und 2-PLINP durch die Degradation der PLINP-mRNA um ca. 80% gehemmt werden konnte. Die Spezifikationskontrolle 1-PLINPwrong, welche zwei Punktmutationen in der Sequenz aufwies, hatte bedauerlicherweise einen fast gleichwertigen Effekt und war aus diesem Grunde leider unbrauchbar. Eine Spezifikationskontrolle wäre eine zusätzliche Absicherung der Daten gewesen, ist aber wegen der Kontrolle durch siGAPDH nicht zwingend notwendig. Die erfolgreiche Strategie zur Hemmung der Expression von PLINP kann nach diesen Versuchen nun dazu genutzt werden zu klären, inwieweit und in welcher Form sich die Abwesenheit von PLINP auf die Expression und Lokalisation der viralen Kapsidproteine L1 und L2 sowie auf die Bildung und Infektiosität von Pseudovirionen auswirkt. Bedenken muss man bei den Folgeversuchen jedoch stets, dass bei Einflussnahme auf Zellen durch siRNAs auch immer die Möglichkeit unerwünschter Nebeneffekte besteht. Diese Nebeneffekte könnten sich beispielsweise durch eine Aktivierung der Abwehr gegen mobile genetische Elemente äußern, die mit einer Ausschüttung von Interferonen

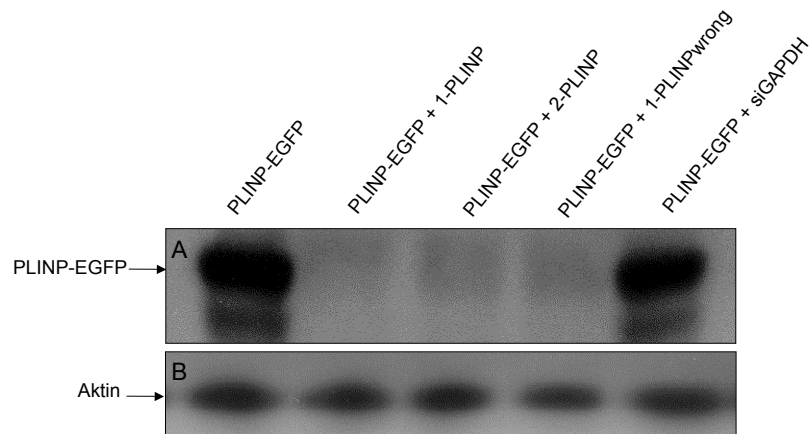


Abbildung 3.43: **Die Expression von EGFP-PLINP ist nach Transfektion von PLINP-spezifischer siRNA in 293T-Zellen signifikant reduziert.** 293T-Zellen wurden mit den siRNAs 1-PLINP, 2-PLINP, 1-PLINPwrong sowie siGAPDH und EGFP-PLINP kotransfiziert und nach 48 Stunden Inkubationszeit im Western Blot analysiert. **A:** Der Nachweis von PLINP erfolgte über OFR1 #57 (1:5)/ Ziege anti-Ratte HRP (1:3.000); **B:** Der Nachweis von Aktin erfolgte über den Antikörper Maus anti-Aktin in einer 1:5.000 Verdünnung/ GAMPO in einer 1:3.000 Verdünnung.

einhergeht. Dies könnte wiederum die Interaktion von PLINP mit den viralen Kapsidproteinen verändern, so dass die folgenden Experimente immer auch unter diesem Aspekt zu betrachten sind.

3.5.3 Einfluss der RNA-Interferenz von PLINP auf die Expression und Lokalisation der viralen Kapsidproteine

Nachdem durch die vorherigen Versuche gezeigt werden konnte, dass die Expression von PLINP nach Transfektion von PLINP-siRNA signifikant gehemmt wurde, stellte sich die Frage, ob dies einen Einfluss auf die Lokalisation der viralen Kapsidproteine hat. Die Analyse der Lokalisation und Expression von L1 und L2 erfolgte unter dem Einfluss der 24 Stunden vorher transfizierten siRNA in 911-Zellen in den folgenden Abschnitten.

3.5.3.1 Einfluss auf L1

Wie in Abbildung 3.44 sichtbar, ist die nukleäre Lokalisation von L1 unter dem Einfluss von 1-PLINP in 911-Zellen unverändert. Die Abbildungen der indirekten Immunfluoreszenz sollen hier exemplarisch typische Lokalisationen des L1-Proteins in der Zelle aufzeigen. Die Expression von L1 unter dem Einfluss von PLINP-spezifischen siRNAs ist schwer zu beurteilen, da das Signal des Antikörpers übersättigt ist.

Aus diesen Resultaten ergeben sich keine Hinweise einer direkten oder indirekten Verbindung von L1 zu PLINP. Jedoch ist es möglich, dass die geringe Menge an PLINP, die in der Zelle unter Einfluss der siRNA verbleibt, für eine direkte oder indirekte Interaktion mit L1 ausreicht. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass L2 das Bindeglied zwischen

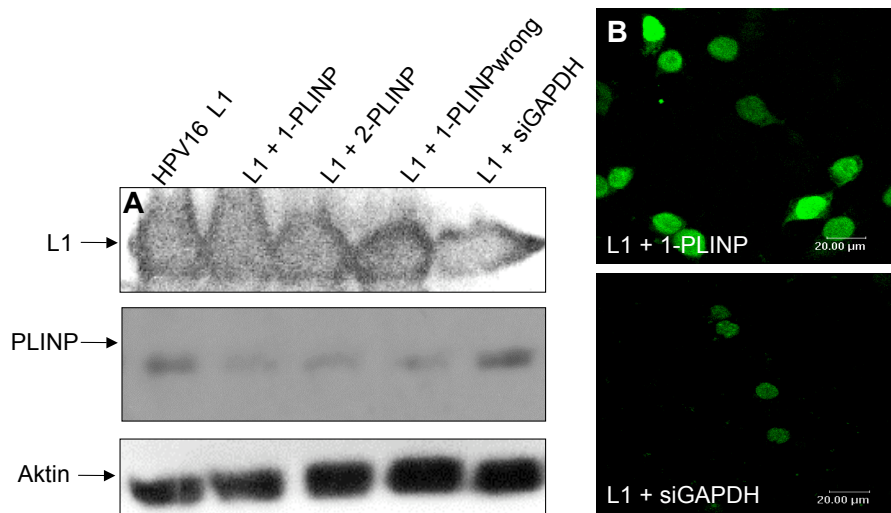


Abbildung 3.44: **Die RNA-Interferenz von PLINP zeigt keinen Einfluss auf die Lokalisation des Hauptkapsidproteins L1.** Die Lokalisation und Expression von L1 ist nach dessen Transfektion in 911-Zellen, die einen Tag vorher mit der entsprechenden PLINP-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert wurden, nicht verändert. **A:** Nachweis der Expression von L1, PLINP sowie des Haushaltsgens Aktin als Kontrollprotein im Western Blot in 911-Zellen, die 24 Stunden vorher mit der entsprechenden siRNA transfiziert wurden. Nachweis von L1 über Camvir1 (1:250) / GAMPO (1:3.000); Nachweis von PLINP über ORF1 #57 (1:25) / Ziege anti-Ratte HRP (1:3.000); Nachweis von Aktin über Maus- α -Aktin (1:7.500) / GAMPO (1:3.000); **B:** Lokalisation von L1 in 911-Zellen, in die 1-PLINP oder siGAPDH transfiziert wurde. Nachweis von L1 über Camvir1 (1:250) / Ziege- α -Maus-FITC (1:400)

PLINP und L1 darstellt.

3.5.3.2 Einfluss auf L2

Eine Interaktion von PLINP mit dem Nebenkapsidprotein L2 der HPV-Typen HPV11 und HPV16 konnte in vorangehenden Arbeiten gezeigt werden. Die Domäne in der PLINP-Sequenz, an der die Interaktion mit L2 stattfindet, konnte ebenfalls eingegrenzt werden. Die Funktion, die dieser Interaktion zugrunde liegt, ist jedoch bis heute nicht geklärt.

Abbildung 3.45 zeigt, dass weder die Expression noch die Lokalisation von L2 in der Zelle unter Einfluss von PLINP-siRNA verändert sind. Die hier gewählte Darstellung der L2-positiven Zelle in der indirekten Immunfluoreszenz ist ein möglicher Fall der L2-Lokalisation. Die Mehrzahl der L2-transfizierten Zellen zeigen eine diffuse Kernverteilung dieses viralen Proteins und nur etwa 10-20% der L2-positiven Zellen zeigen L2 in PODs. Da jedoch in dieser Arbeit die Lokalisation in PODs eine zentrale Stellung einnimmt, wurde dieses konfokale Fluoreszenzbild für die Abbildung gewählt. Zusammenfassend führten diese Ergebnisse zu keinen Hinweisen auf eine Interaktion von PLINP und L2 im Zusammenhang mit der Expressionsstärke oder mit der Lokalisation, also beispielsweise dem Transport von L2 in die PODs.

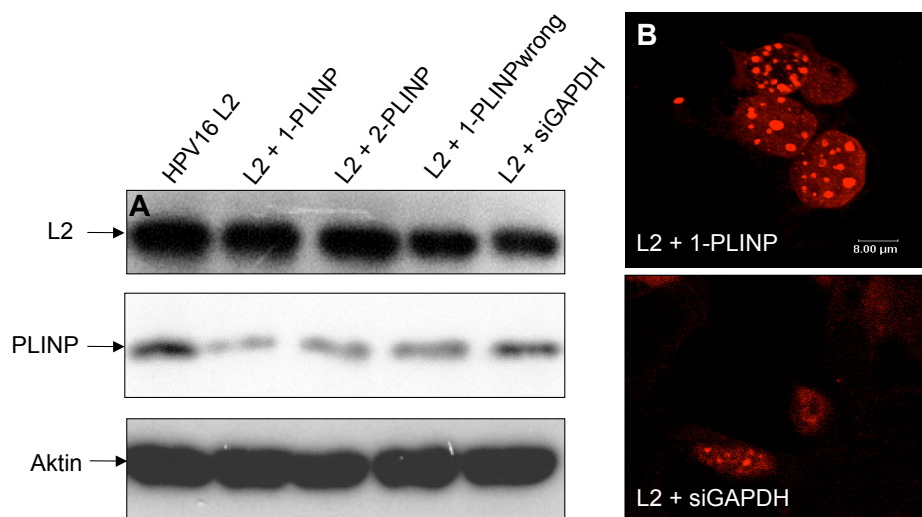


Abbildung 3.45: **Die RNA-Interferenz von PLINP zeigt keinen Einfluss auf die Expression und Lokalisation des Nebenkapsidproteins L2.** Die Lokalisation und Expression von L2 ist nach dessen Transfektion in 911-Zellen, die einen Tag vorher mit der entsprechenden PLINP-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert wurden, unverändert. **A:** Nachweis der Expression von L2, PLINP sowie des Haushaltsgens Aktin als Kontrollprotein im Western Blot in 911-Zellen, die 24 Stunden vorher mit der entsprechenden siRNA transfiziert wurden. Nachweis von L2 über geblocktes Serum #20 (1:50) / GARPO (1:3.000); Nachweis von PLINP über OFR1 #57 (1:25) / Ziege anti-Ratte HRP (1:3.000); Nachweis von Aktin über Maus- α -Aktin (1:7.500) / GAMPO (1:3.000); **B:** Lokalisation von L2 in 911-Zellen, in die 1-PLINP oder siGAPDH transfiziert wurde. Nachweis von L2 über Serum #20 (1:500) / Ziege- α -Kaninchen-Cy3 (1:400)

3.5.4 Einfluss der PLINP-RNA-Interferenz auf die Bildung von L1 in HPV16 Pseudovirionen

In der Vergangenheit war es schwierig, Virionen oder Pseudovirionen des humanen Papillomvirus *in vitro* herzustellen. Buck *et al.* entwickelten jedoch eine Möglichkeit, im Zellsystem von 293TT-Zellen Pseudovirionen zu produzieren, deren Analyse einen besseren Einblick in bestimmte Zusammenhänge bieten kann als Experimente mit überexprimierten einzelnen Proteinen des Virus (Buck *et al.*, 2005a). Das Schema 3.46 zeigt die Herstellung von Pseudovirionen in 293TT-Zellen, die Infektion von 293TT-Zellen mit diesen zuvor hergestellten Pseudovirionen sowie die Nachweismöglichkeiten bei den verschiedenen Schritten. Eine Quantifizierung von infizierten oder PsV-produzierenden Zellen erfolgt durch das Enzym SEAP (Sekretierte alkalische Phosphatase) in einem hochsensitiven Chemilumineszenz-Reportersystem im 96-Lochplattenformat, da die Zellen SEAP in das Kulturmedium abgeben. Die SEAP wird durch den Vektor kodiert, der als Verpackungsplasmid in die Pseudovirionen inkorporiert ist.

Für die Bildung von Pseudovirionen in Säugetierzellen ist eine starke Expression der viralen Kapsidproteine notwendig, da sonst nur ungenügend oder gar keine pseudovirale Partikel gebildet werden können. Deshalb wurden für dieses Experiment 293TT-Zellen verwandt, die hohe Mengen an SV40 T-Antigen produzieren. Das Pseudogenomplasmid

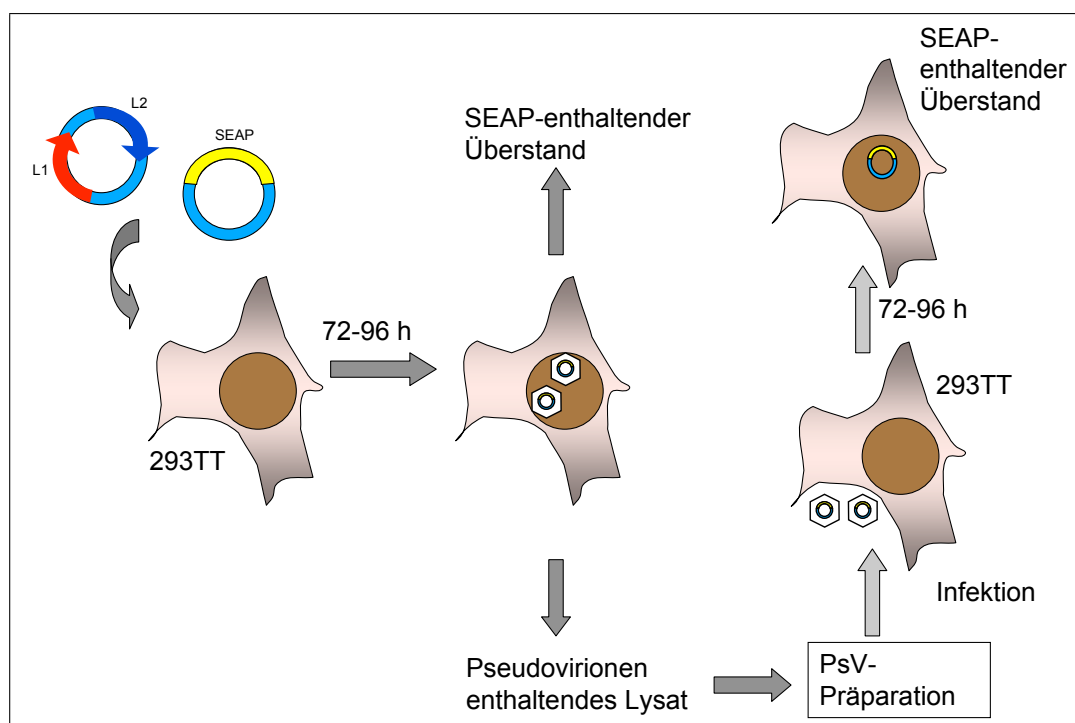


Abbildung 3.46: **Produktion von Pseudovirionen des humanen Papillomvirus in 293TT-Zellen sowie die Infektion von 293TT-Zielzellen mit diesen Pseudovirionen.** 293TT-Zellen werden mit einem Verpackungs- sowie einem Reporterplasmid transfiziert und für 72 bis 96 Stunden inkubiert. Die Expression der auf dem Reporterplasmid kodierten sekretierten alkalischen Phosphatase (SEAP) lässt sich im Überstand der Zellen nachweisen. Pseudovirionen lassen sich aus dem Gesamtlisat der Zellen aufreinigen und für eine Infektion von 293TT-Zielzellen nutzen. Diese werden folgend nach der Infektion 72 bis 96 Stunden inkubiert. Eine erfolgreiche Infektion kann durch die im Überstand vorhandene SEAP nachgewiesen werden. Der Nachweis der SEAP erfolgt über eine hochsensitive Chemilumineszenzreaktion, bei der Licht emittiert wird, welches dann quantitativ im Luminometer gemessen werden kann und Rückschlüsse auf die Menge gebildeter Pseudovirionen beziehungsweise auf die Anzahl infizierter Zellen zulässt.

mid, welches für die viralen Kapsidproteine L1 und L2 kodiert, enthält wie auch das Reporterplasmid einen Replikationsursprung des SV40 (*ori: origin of replication*).

Sollte eine Infektion mit Pseudovirionen erfolgen, wurden durch stabile Transfektion selbst hergestellte 293TT-Zellen verwandt, die eine höhere Infizierbarkeit als die bereits vorhandenen 293TT-Zellen aufwiesen (Ergebnisse zur Herstellung der 293TT-Zellen sind nicht gezeigt).

3.5.4.1 Einfluss von überexprimiertem PLINP oder PMSP auf die Bildung von Pseudovirionen

Die Möglichkeit, Pseudovirionen des humanen Papillomvirus in Säugetierzellen herzustellen und deren Infektiosität testen zu können, eröffnet die Möglichkeit einer detaillierteren Untersuchung von PLINP und PMSP. So kann der Effekt der Überexpression dieser Proteine oder der Expressionshemmung auf die Produktion, Neutralisation oder Infektiosität von Pseudovirionen untersucht werden. Es wurde zunächst untersucht, ob die

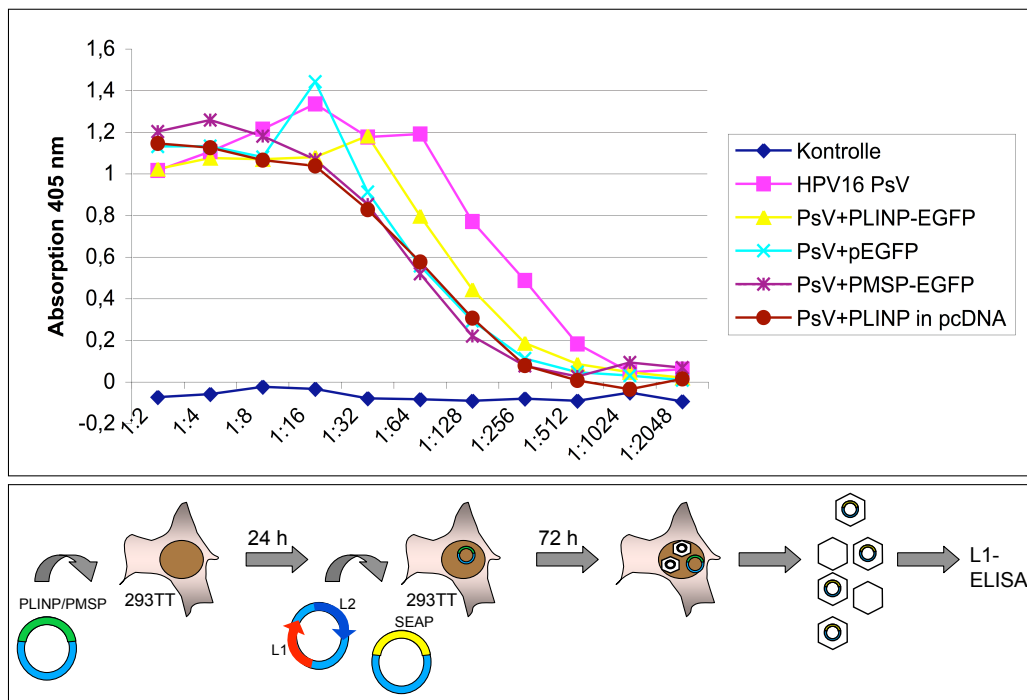


Abbildung 3.47: **Die Überexpression von EGFP-PLINP führt zu einer 1,5-fach erhöhten Bildungsmenge an HPV16 L1.** 293TT-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden von PLINP und PMSP transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen erneut mit dem Verpackungs- und Reporterplasmid kotransfiziert (Bezeichnung in den Ansätzen: PsV). Nach weiteren 72 Stunden Inkubation erfolgte die Lyse der Zellen und die Aufreinigung von Pseudovirionen. Der quantitative Nachweis erfolgte mittels Absorptionsmessung einer Verdünnungsreihe im L1-spezifischen *capture*-ELISA bei 405 nm.

Überexpression von PLINP oder PMSP zu einer Änderung der Menge gebildeter Pseudovirionen führt. Für diesen Versuch wurden gleiche Anzahlen 293TT-Zellen zunächst mit den entsprechenden Expressionsplasmiden von PLINP oder PMSP transfiziert. 24 Stunden später wurden diese Zellen mit dem Verpackungs- und Reporterplasmid erneut transfiziert. Nach weiteren 72 Stunden wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden aus dem Lysat der Ansätze Pseudovirionen präpariert. Die Menge an L1 wurde in einer Verdünnungsreihe mittels L1-spezifischem *capture*-ELISA (siehe 2.2.10) quantifiziert und graphisch dargestellt (Abbildung 3.47).

Die Kotransfektion von weiteren Expressionsvektoren zu den Verpackungs- und Reporterplasmiden für die Bildung von Pseudovirionen mit etwa 25% verglichen mit der Kontrolle führte zu einer deutlichen Verminderung an exprimiertem L1. Dies ist dadurch begründbar, dass bei Kotransfektionen mehrerer Plasmide die Transfektionseffizienz jedes einzelnen Konstruktes herabgesetzt wird. Weiterhin wird deutlich, dass die Überexpression von PLINP im Vergleich zum Ansatz mit transfiziertem leerem pEGFP-Plasmid zu einer etwa 1,5-fach höheren Expression von L1 führt. Überexprimiertes unfusioniertes PLINP oder PMSP-EGFP führen nicht dazu, dass die Zellen in der produzierten Menge von HPV16 L1 für die Bildung von Pseudovirionen beeinträchtigt sind.

3.5.4.2 Einfluss von PLINP auf die Infizierbarkeit von 293TT-Zellen durch Pseudovirionen

Pseudovirionen können durch verschiedene Einflüsse daran gehindert werden, Zielzellen zu infizieren. So existieren beispielsweise Mechanismen der Zielzelle für eine antivirale Abwehr. Um zu überprüfen, ob PLINP in irgendeiner Art und Weise an dieser Abwehr beteiligt ist, wurde der folgende Versuch durchgeführt (siehe Abbildung 3.48). Die 24 Stunden zuvor mit siRNA oder Expressionsplasmiden von PLINP transfizierten 293TT-Zellen wurden mit gleichen Mengen HPV16 Pseudovirionen infiziert und der Überstand nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden luminometrisch analysiert.

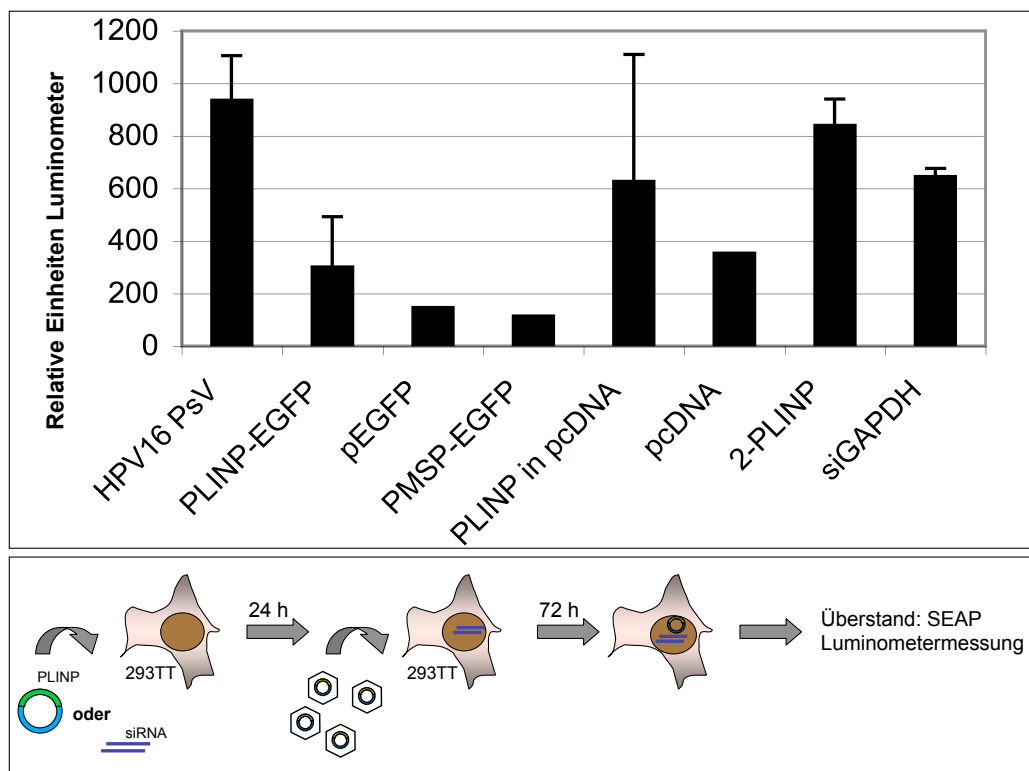


Abbildung 3.48: **Die RNA-Interferenz von PLINP führt zu einer erhöhten Infizierbarkeit von 293TT-Zellen durch HPV16 Pseudovirionen; die Überexpression von PLINP oder PMSP resultiert jedoch in keiner signifikanten Veränderung.** 293TT-Zellen wurden zunächst mit PLINP-siRNAs oder Expressionsplasmiden von PLINP beziehungsweise PMSP transfiziert und nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit HPV16 Pseudovirionen infiziert. Nach einer Inkubation von weiteren 72 Stunden wurde der Gehalt an SEAP im Überstand quantitativ bestimmt.

In diesem Versuch wird zunächst deutlich, dass die Transfektion von Expressionsplasmiden in die Zellen die Menge an exprimierter SEAP um etwa die Hälfte reduziert. Dies kann durch die Transfektion dieser Plasmide vor der Infektion durch die Pseudovirionen und die damit einhergehende Expression zweier Proteine begründet werden. Die verminderte Anwesenheit von PLINP in der Zelle, ausgelöst durch die Transfektion von 2-PLINP, führte dazu, dass diese mehr SEAP exprimierten als Zellen, die

mit der Kontroll-siRNA siGAPDH transfiziert wurden. Die Überexpression von PLINP oder PMSP dagegen führte zu keiner signifikanten Veränderung der Expression von SEAP in den infizierten 293TT-Zellen. Dies ließe eine Rolle von PLINP bei der direkten oder indirekten antiviralen Abwehr vermuten, da die erhöhte Expression von SEAP in 1-PLINP-transfizierten 293TT-Zellen für eine erhöhte Infizierbarkeit mit Pseudovirionen bei einer Hemmung von PLINP sprechen könnte. Um diese Hypothese detaillierter zu untersuchen, wurden weitere Experimente zur Sensitivität und Infizierbarkeit von 293TT-Zellen unter Veränderung der Expression von PLINP durchgeführt. Die in den Diagrammen angegebenen Einheiten des Luminometers sind dabei als relative Werte zu verstehen. Diese differieren zum Teil um das Tausendfache, was daran liegt, dass zwei verschiedene Luminometer für die Messungen eingesetzt wurden. Die Daten wurden dahingehend überprüft, ob die Werte relativ vergleichbar sind. Dies konnte experimentell belegt werden, so dass die erhaltenen Messwerte, auch wenn sie stark differieren, gleichwertig sind (Ergebnisse nicht gezeigt).

Eine mögliche Wirkung von PLINP auf das infektiöse Potential von Pseudovirionen wäre in dem Rahmen denkbar, dass PLINP an den Virionen anhaftet und so zu einer verminderten Anlagerung der Partikel an die Wirtszellen führt. Um dies zu überprüfen, wurden 293TT-Zellen zunächst mit der PLINP-spezifischen siRNA oder mit einem Expressionskonstrukt von PLINP transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen ein zweites Mal transfiziert; diesmal mit dem Verpackungs- und dem Reporterplasmid. Die Präparation von Pseudovirionen erfolgte nach einer Inkubationszeit von weiteren 72 Stunden. Mit den präparierten Pseudovirionen wurden angegliche Anzahlen 293TT-Zellen infiziert. Die Infektion wurde nach 96-stündiger Inkubation durch Quantifizierung der SEAP im Überstand vermessen und im Diagramm 3.49 dargestellt.

In diesem Versuch wird deutlich, dass die spezifische Verminderung der Expression von PLINP durch den Einfluss von siRNA nicht dazu führt, dass die Pseudovirionen eine erhöhte Infektivität besitzen. Die Überexpression von PLINP in den PsV-produzierenden Zellen führt ebenfalls zu keiner signifikanten Verminderung der Infektivität der Pseudovirionen. Diese Ergebnisse geben keine Hinweise auf eine mögliche Anlagerung von PLINP an Pseudovirionen und so auf einen Eingriff in die Infektiosität der viralen Partikel.

Um eine mögliche Anlagerung von PLINP an virale Partikel auszuschliessen, wurden Pseudovirionen mittels Sedimentationsanalyse aufgereinigt und fraktioniert. Die Herstellung dieser Partikel stand unter dem Einfluss von 24 Stunden zuvor transfiziertem pcDNA-PLINP. In dem der Fraktionierung folgenden Schritt wurde eine mögliche Anlagerung von PLINP an die Pseudovirionen, Kapsomere oder Intermediate mittels Antigen-spezifischem *capture*-ELISA (Nachweis von L1 und L2, siehe 2.2.10) und Western Blot (Nachweis von PLINP mittels OFR1 #57) analysiert.

Aus der Sedimentationsanalyse ergibt sich kein Hinweis auf eine Anlagerung von PLINP

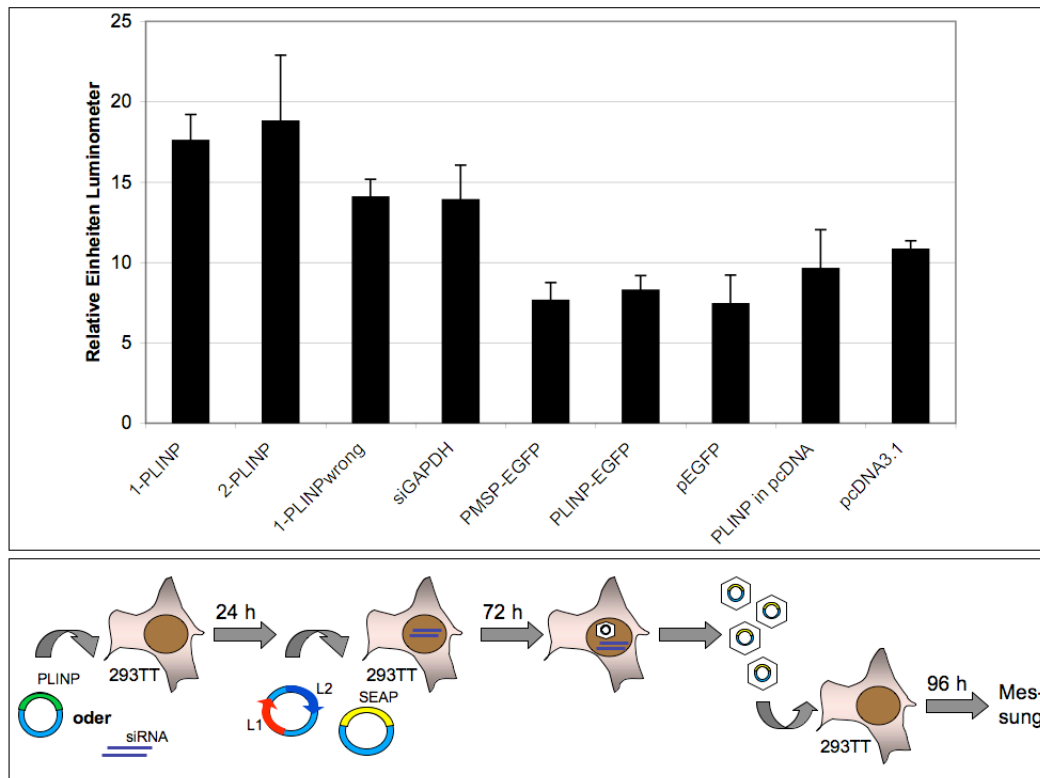


Abbildung 3.49: **Die RNA-Interferenz von PLINP führt zu keiner erhöhten Sensitivität für eine pseudovirale Infektion in 293TT-Zellen.** 293TT-Zellen wurden zuerst mit siRNA beziehungsweise Expressionsplasmiden von PLINP sowie den Kontrollen transfiziert. Nach einem Tag Inkubation wurden die Zellen erneut mit dem Verpackungs- und Reporterplasmid für Pseudovirionen transfiziert. Nach Präparation der Pseudovirionen 72 Stunden später wurden diese genutzt, um eine angeglichene Anzahl 293TT-Zellen zu infizieren. 96 Stunden später wurde das im Überstand vorhandene SEAP chemiluminometrisch quantifiziert. Die Ansätze sind nach den Zellen benannt, die für die Produktion von Pseudovirionen unter Einfluss eines veränderten PLINP-Gehaltes genutzt wurden. Die Daten stammen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

an HPV16 Pseudovirionen. PLINP findet sich vielmehr in den Fraktionen mit der geringsten Dichte, in der ungebundene Proteine vermutet werden. Die pseudoviralen Partikel dagegen finden sich bei höherer Dichte, wie auch das Maximum der Graphen von L1 und L2 in den Fraktionen 6 bis 8 zeigt. Intermediate sieht man in der Abbildung etwa bei Fraktion 16, Kapsomere in den Fraktionen 18 bis 20. Der gleiche Versuch ohne Koexpression von L2 zeigte keine Unterschiede in der Fraktionierung von PLINP (Ergebnisse nicht gezeigt). Möglicherweise lagert sich PLINP an die Kapsomere an, was höchstwahrscheinlich über die Bindung an L2 erfolgen würde. Dann wäre zu erwarten, dass PLINP ebenfalls in der Fraktion 18 bis 20 zu finden ist. Da dies nicht der Fall ist, wird eine Anlagerung von PLINP an Kapsomere als nicht wahrscheinlich erachtet. Eine Möglichkeit für keinerlei Detektion von PLINP in den Pseudovirionen-haltigen Fraktionen ließe sich allerdings auch dadurch begründen, dass sich nur eine geringe Anzahl von PLINP-Molekülen an Pseudovirionen anlagert, so dass diese Menge an PLINP unter der Nachweisgrenze im Western Blot liegt.

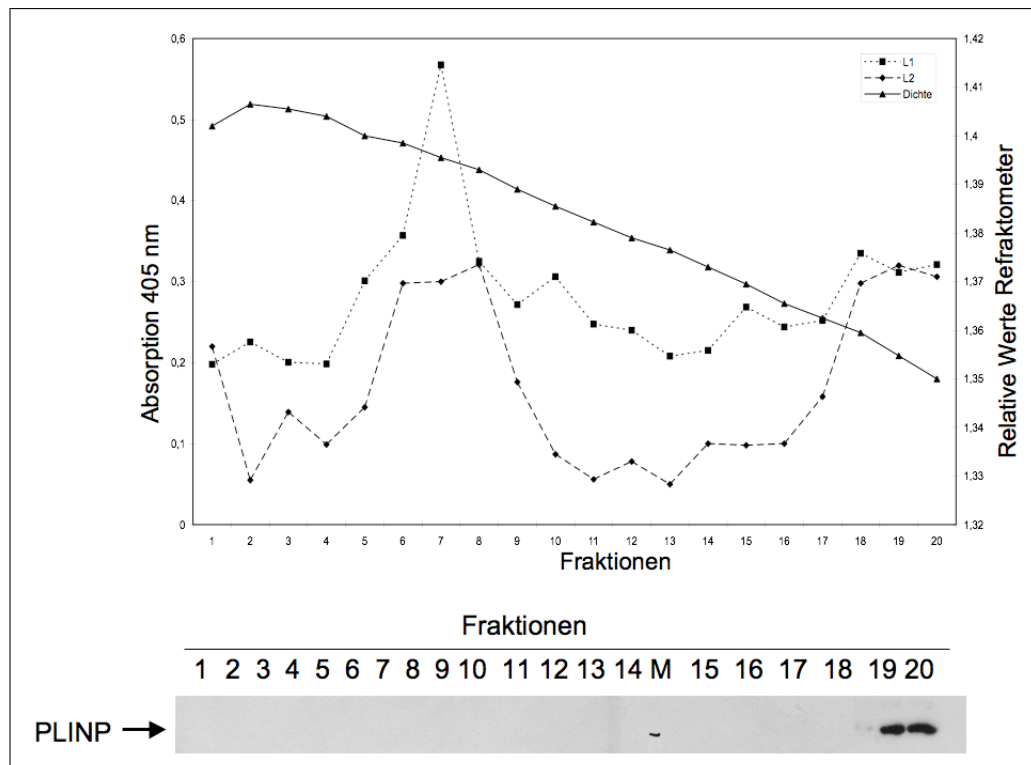


Abbildung 3.50: **Die Sedimentationsanalyse von HPV16 Pseudovirionen lässt keine Anlagerung von PLINP an die viralen Partikel vermuten.** 293TT-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden von HPV16 L1, L2, einem GFP-Verpackungsplasmid sowie einem Expressionsplasmid von PLINP (pcDNA-PLINP) transfiziert. Nach 96 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen für eine folgende Sedimentationsanalyse präpariert. Der Verlauf des Graphen für die relativen Refraktometerwerte zeigt den kontinuierlichen Konzentrationsverlauf der Sucrose von 50% bis 5%. Die erhaltenen Fraktionen wurden in spezifischen ELISAs für L1 und L2 photometrisch vermessen. Der Nachweis von L1 sowie L2 erfolgte über den Antigen-spezifischen capture-ELISA nach Standardbedingungen. Die Dichte der Sucrose in den Fraktionen wurde mittels Refraktometer bestimmt. PLINP wurde in den einzelnen Fraktionen mittels Western Blot unter Nachweis durch OFR1 #57 (1:5) und Ziege anti-Ratte HRP (1:3.000) detektiert. M zeigt eine Markerreihe an.

3.5.4.3 Einfluss von PLINP auf die Neutralisation von HPV16 Pseudovirionen

Die 24 Stunden zuvor mit siRNA oder Expressionsplasmiden transfizierten 293TT-Zellen wurden mit geblockten HPV16 Pseudovirionen infiziert. Geblockt wurden diese zuvor durch ein Antiserum gegen HPV16 L1 (#4543) in den in der Abbildung angegebenen Verdünnungen und dann zu den Ansätzen der Pseudovirionen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden wurde der Überstand der infizierten Zellen im Lumino-meter vermessen (siehe 3.51).

Die Ergebnisse des Versuches zeigen, dass bei einer Verdünnung des HPV16 L1-Antiserums von 1:25.000 die Überexpression von PLINP oder PMSP als EGFP-Fusionsproteine zu einem erhöhten Prozentsatz an neutralisierten Pseudovirionen verglichen mit der Kontrolle (pEGFP-Vektor ohne kodiertes Protein) führt. Die Hemmung der PLINP-Expression dagegen führte zu keinem messbaren Effekt. Die übrigen Verdünnungsstufen

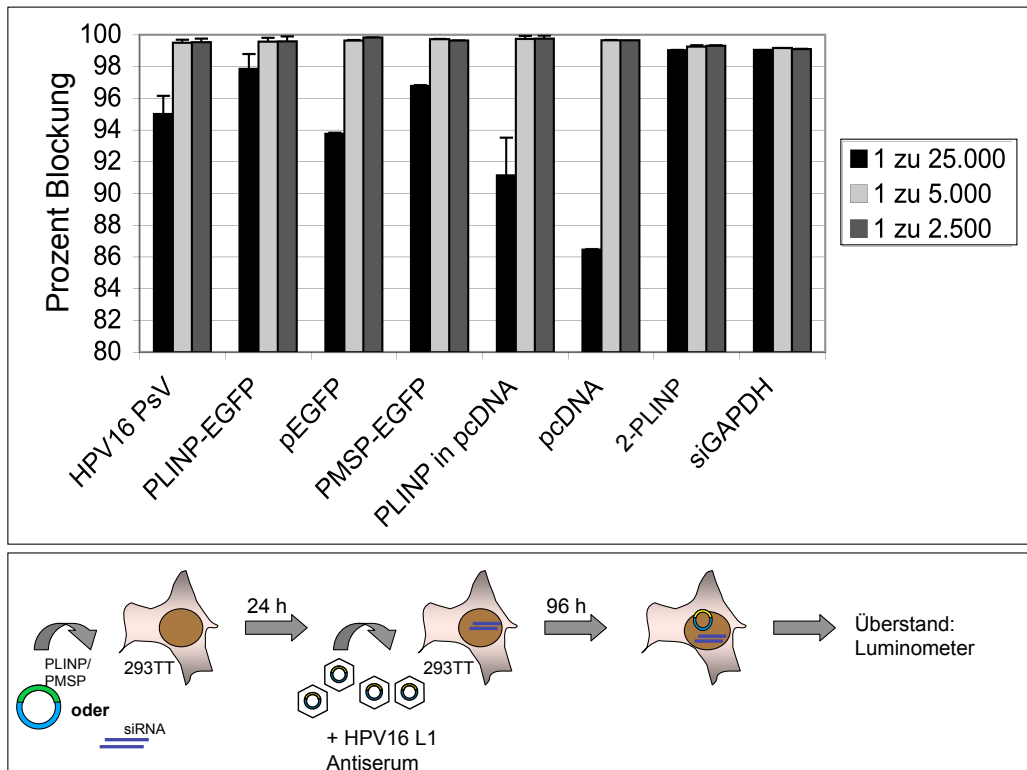


Abbildung 3.51: **Die Neutralisation von HPV16 Pseudovirionen mittels eines spezifischen Antiserums wird durch die Überexpression von EGFP-PLINP oder PMSP-EGFP verstärkt.** 293TT-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden oder siRNAs von PLINP oder einem Expressionsplasmid von PMSP transfiziert, 24 Stunden später mit einer normierten Menge HPV16-Pseudovirionen infiziert und für 4 Tage inkubiert. Diese Pseudovirionen wurden zuvor mit dem spezifischen Antiserum #4543 gegen HPV16 L1 neutralisiert. Die Verdünnung dieses Antiserums ist in der Legende angegeben. Anschließend wurde SEAP im Überstand mittels Chemilumineszenztest quantitativ aus diesen Ansätzen bestimmt und auf den Prozentsatz Blockung umgerechnet.

des L1-Antiserums neutralisierten alle Pseudovirionen und sind somit nicht auszuwerten.
Punktstrukturen

4 Diskussion

Das Nebenkapsidprotein L2 des humanen Papillomvirus hat wichtige Funktionen im viralen Lebenszyklus inne. Studien zeigten, dass L2 einen sekundären Rezeptor auf der Oberfläche der Wirtszelle bindet und essentiell für die Infektiosität von gebildeten Virionen ist. Nach erfolgter Infektion erfüllt L2 entscheidende Aufgaben bei der Freisetzung der viralen Bestandteile aus Endosomen und dem Transport des viralen Genoms zum Zellkern. Später im Verlauf des viralen Lebenszyklus ist L2 für den Zusammenbau der Viruspartikel wichtig und rekrutiert dazu benötigte Faktoren in punktförmige Domänen des Zellkerns, sogenannte PODs. Die genauen Abläufe im Zusammenhang mit den PODs vor allem in Bezug zur viralen Transkription und Replikation waren zu Beginn der Arbeit noch weitestgehend unbekannt. So wurden in einer früheren Arbeit zelluläre Proteine identifiziert, die mit den Nebenkapsidproteinen verschiedener humaner Papillomvirus-Typen interagieren. Die im System eingesetzten L2-Proteine, die HPV1, HPV11 und HPV16 entstammten, weisen eine Homologie von 48% bis 60% auf (Datenbank von <http://hvp-web.lanl.gov>). Die Proteine, die mit mehr als einem humanen Papillomvirus interagierten, sollten konservierte Schlüsselprozesse, an denen L2 beteiligt ist, aufzeigen.

Die Untersuchung von zweien dieser Proteine, PLINP und PMSP, sollte zu mehr Verständnis über die Vorgänge der Interaktion mit dem viralen Kapsidprotein L2 und die Charakteristika dieses Virus beitragen. Da zudem diese beiden Proteine zellbiologisch noch weitestgehend uncharakterisiert waren, lag eine zweite Aufgabe dieser Arbeit in der Untersuchung der zellulären Funktion dieser Proteine.

PLINP wurde in der vorhergehenden Arbeit detaillierter untersucht, wobei dessen Funktion sowohl im Hinblick auf seine Rolle in der Zelle als auch auf die Interaktion mit dem viralen Protein L2 weitestgehend unbekannt blieb. Es konnten jedoch Erkenntnisse über die Lokalisation von PLINP erlangt werden, welche das Protein in An- oder Abwesenheit von koexprimiertem L2 in Assoziation zu distinkten punktförmigen Domänen im Zellkern zeigt, welche als PODs identifiziert wurden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass PLINP ubiquitär in allen getesteten Zelllinien exprimiert wurde. Weiterhin konnten durch Analyse von Deletionsmutanten von PLINP die L2-bindende Domäne sowie der Bereich, der für die POD-Lokalisation verantwortlich ist, eingegrenzt werden. Zuletzt wurde durch Experimente mit dem p53-abhängigen Promotor von bax in einem *in vitro*-Transkriptionstest ein Hinweis auf eine Funktion von PLINP als transkriptionaler

Kofaktor gegeben.

Weitere Publikationen offenbarten eine Rolle von PLINP unter dem Synonym CRIF1 als negativer Regulator des Zellzyklus und des Zellwachstums im Zusammenhang mit Gadd45, bei welchem es sich um ein in die Apoptose involviertes Protein handelt (Chung *et al.*, 2003). Weiterhin wurde in diesen Studien die Expression von PLINP in vielen verschiedenen Tumorgeweben quantifiziert und es konnte eine Über- oder eine Unterexpression in unterschiedlichen Tumorarten gezeigt werden. Warum PLINP in manchen Tumorgeweben unter- und in anderen überexprimiert wird, ist noch nicht klar, hängt wohl jedoch mit den spezifischen Mechanismen der Immortalisierung der Zellen zusammen. Dies ließe sich ebenfalls wie die Interaktion mit Gadd45 durch eine Rolle von PLINP bei der Zellzykluskontrolle und des Zellwachstums erklären.

PMSP wurde bislang nur im Hinblick auf dessen Lokalisation in der Zelle unter An- oder Abwesenheit von L2 untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Koexpression von L2 zu einer drastischen Änderung des Aufenthaltsortes von PMSP in der Zelle führten. Dies äußerte sich dahingehend, dass sich das sonst im Zytoplasma der Zelle befindliche PMSP unter Einfluss von L2 in Assoziation zu PODs gelagert hatte, in denen es mit L2 kolokalisierte.

Eine Möglichkeit, über die Funktion bisher uncharakterisierter Proteine Klarheit zu erlangen, ist die Identifizierung von Interaktionspartnern dieser Proteine, die einen funktionalen Zusammenhang offenlegen können. Verfahren wie zum Beispiel die Koimmunopräzipitation, das *Phage Display* oder Benutzung von CHIP-Technologie dienen diesem Zweck. In der vorliegenden Arbeit wurde eine prominente Methode gewählt, mit der man sehr viele auch längere Protein- beziehungsweise Peptidabschnitte auf eine eventuelle Interaktion hin testen kann. Diese Methode, die als *Yeast Two-Hybrid Screening* bekannt ist, hat neben dem bereits Genannten die Vorteile, dass es sich um ein eukaryotisches System handelt, das keine speziellen Gerätschaften voraussetzt sowie einfach, wenn auch langwierig, durchzuführen ist. Zudem hat man nach dem Versuch die cDNA der potentiellen Interaktionspartner in der Hand, so dass weiterführende Versuche leicht möglich sind. Bedeutende Nachteile dieser Methode sind die Identifikation vieler falsch positiver Interaktionspartner, was umfangreiche Kontrollen innerhalb des Systems notwendig macht, sowie die Tatsache, dass Interaktionen zu einigen Transkriptionsfaktoren durch das System nicht immer identifiziert werden können.

Zelluläre Interaktionspartner von PLINP und PMSP wurden identifiziert

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zelluläre Interaktionspartner von PLINP und PMSP identifiziert. Für das *Screening* mit einer humanen Keratinozyten-cDNA-Bibliothek wurden sehr stringente Bedingungen gewählt, da nicht der Anspruch erhoben wurde, möglichst alle Interaktionspartner zu finden, sondern vielmehr der Fokus darauf

gerichtet war, etwas über die mögliche Funktion dieser Proteine zu erfahren. Nach allen durchzuführenden Kontrollen im Hefesystem blieben noch 14 potentielle Interaktoren von PLINP und 39 von PMSP übrig. Im Rahmen dieser Arbeit war es jedoch nur möglich, mit der detaillierteren Charakterisierung eines Proteins, also PLINP oder PMSP fortzufahren. Die Entscheidung fiel hier zugunsten von PLINP, da dieses Protein bereits teilweise charakterisiert und eine mögliche Beteiligung an der viralen Transkription bereits angedeutet werden konnte.

PLINP, PMSP und L2 haben gemeinsame zelluläre Interaktionspartner

Im *Screening* von PLINP und PMSP konnten cDNA-Klone des Lipocalin 7 identifiziert werden, die ebenso unter dem Synonym TIN-Ag-RP bekannt sind. TIN-Ag-RP konnte bereits als Interaktor von HPV L2 identifiziert werden ([Gornemann et al. , 2002](#)). Die gefundenen Zusammenhänge bieten einen möglichen Modell-Ansatz. So ist zum Beispiel ein funktionaler Zusammenhang zwischen TIN-Ag-RP, PLINP, PMSP und dem viralen Protein L2 denkbar. Dieses wird dadurch gestützt, dass PMSP als Teil von P5-1 auch im *Screening* von PLINP auftauchte.

Es stellt sich die Frage, in welchen Kompartimenten der Zelle diese Interaktion stattfinden könnte. Bei den hier durchgeführten Studien zur subzellulären Lokalisation der potentiellen Interaktionspartner wurden EGFP-Fusionsklone verwendet, da in diesem Fall auf einen spezifischen Antikörper verzichtet werden konnte. Zu bedenken sind in diesem artifiziellen System allerdings mögliche veränderte Lokalisations- und Interaktionseigenschaften der Fusionsproteine. TIN-Ag-RP ist ein sezerniertes glykosyliert vorliegendes katalytisch inaktives Protein, welches sich ausserhalb der Zelle oder in Vesikeln befindet und in fast allen Zellen und Geweben exprimiert wird ([Wex et al. , 2001](#)), ([Bromme et al. , 2000](#)). Regulatorische oder strukturgebende Funktionen ähnlich zu TIN-Ag werden diskutiert. Ein möglicher funktionaler Zusammenhang zwischen TIN-Ag-RP, PLINP, PMSP und HPV L2 ist auf Grundlage dieser Informationen nur schwer vorzustellen, da eine gemeinsame Lokalisation der Proteine *in vivo* fraglich ist. Für die Interaktion zu L2 wurde bisher eine Bindung ausserhalb der Zelle beim Viruseintritt angenommen, bei der eine Beteiligung von PLINP unwahrscheinlich ist, weil es innerhalb der Zelle lokalisiert ist und es keinen Hinweis auf eine Anlagerung von PLINP an die viralen Partikel gibt. Da TIN-Ag-RP bis heute nur peripher beschrieben wurde, besteht eine andere Möglichkeit zur Interaktion in einer bisher noch nicht beschriebenen Charakteristik von TIN-Ag-RP innerhalb der Zelle.

Beim *Screening* von PMSP konnte eine Untereinheit des G-Proteins identifiziert werden, die auch beim *Screening* von L2 aufgetaucht war. Die membranständigen heterotrimeren G-Proteine, die aus den drei Untereinheiten α , β und γ aufgebaut sind, belegen eine Schlüsselposition in der Signaltransduktion zwischen Rezeptor und *Second Messenger*.

Die α -Untereinheit besitzt die GDP/GTP-Bindungsdomäne. Ein GTP-Austauschfaktor bewirkt den Zerfall des Komplexes zu den Untereinheiten α sowie $\beta\gamma$. Beide so freigesetzten G-Proteinuntereinheiten können verschiedene Effektoren aktivieren (Vetter & Wittinghofer, 2001). Es ist denkbar, dass L2 über PMSP und G-Proteine in die Signaltransduktionsmechanismen der Wirtszelle eingreift, da es das zytoplasmatisch lokalisierte PMSP in den Zellkern rekrutiert, so dass PMSP seine Funktion über die G-Protein vermittelten Signalkaskaden nicht mehr ausüben kann. Weiterhin müsste neben diesem Sachverhalt in zukünftigen Studien untersucht werden, ob PMSP in PODs Funktionen erfüllt, die für den viralen Lebenszyklus wichtig sind. In dieser Arbeit konnte auch eine potentielle Interaktion von PMSP mit Metallothioneinen aufgezeigt werden, die auf eine mögliche Funktion von PMSP im Zusammenhang mit Stressreaktionen hinweist. Metallothioneine sind Stress-induzierbare Proteine, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind. Dies ergibt auch im Bezug zur Interaktion mit L2 Sinn, da eine Hinderung an den Aufgaben in der Zelle, die PMSP zu erfüllen hat, zu Vorteilen für den Virus führen würde. Dies ist allerdings an dieser Stelle nur Spekulation und müsste detaillierter analysiert werden.

Das *Yeast Two-Hybrid-Screening* von PLINP führte zur Identifikation eines weiteren möglichen funktionalen zellulären Komplexes. So interagiert und kolokalisiert PLINP mit cDNA-Klonen des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors (eIF3) und des COP9-Signalosoms (CSN). Eine Interaktion konnte außerdem mit einem Teil des Proteasoms aufgezeigt werden. Teile dieser drei Multiproteinkomplexe zeigen eine Interaktion und Kolokalisation im Zellkern (Watkins & Norbury, 2004). So wurde nach einer Ko-Aufreinigung eine Assoziation zwischen dem COP9 Signalosom (CSN1, CSN7, and CSN8) und zwei Untereinheiten des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 3 (eIF3), eIF3e (p48, auch bekannt als INT-6) und eIF3c (p105) beschrieben (Yahalom *et al.*, 2001). Später stellten Watkins *et al.* Teile des Proteasoms in diesen Zusammenhang. Die partielle Kolokalisation von eIF3, CSN und dem Proteasom im Kern ist zellzyklusabhängig und zeigt ein Minimum in der frühen S-Phase. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist der genaue Interaktionszusammenhang nicht geklärt. So bleibt auch die Interaktion mit PLINP ungeklärt, ist aber wahrscheinlich im Zusammenhang der Zellzyklus- oder Translationskontrolle zu sehen (Yahalom *et al.*, 2001). In diesem Bereich wäre dann auch die Einflussnahme von HPV L2 zu erwarten.

PLINP interagiert in PODs mit Daxx, jedoch nicht mit FLASH

Die Identifikation möglicher Interaktionspartner des PLINP-Proteins brachte einige wichtige neue Erkenntnisse über mögliche Funktionen, führte jedoch nicht zur Klärung der zellulären Funktion von PLINP. Da dieses Protein in PODs lokalisiert ist, ist es wahrscheinlich, dass PLINP in diesen Domänen Interaktionspartner besitzt. Es gibt jedoch

eine Vielzahl von Proteinen in diesen Domänen, so dass für die Untersuchungen eine Auswahl getroffen werden musste. Das Protein PML, der Namensgeber für die PODs, wurde bereits in einer früheren Arbeit auf eine Interaktion mit PLINP hin untersucht. Es konnte eine Assoziation beider Proteine, jedoch keine vollständige Kolo-kalisation belegt werden. Weiterhin schien die Überexpression des einen Proteins die Expression des jeweils anderen zu hemmen (persönliche Mitteilung von Janina Görnemann, Universität Dresden). Die nicht vollständige Überlappung des PLINP- und PML-Signals in der Immunfluoreszenz könnte auf die Existenz POD-assoziiertes, abgegrenzter Strukturen hindeuten. Ein Protein, welches ebenfalls eine analoge Lokalisationscharakteristik aufweist und bis heute noch nicht detailliert beschrieben wurde, ist FLASH (persönliche Mitteilung von Thomas Hofmann, DKFZ). Eine funktionale Interaktion von PLINP und FLASH wurde als unwahrscheinlich erachtet, da in dieser Arbeit keine gemeinsame Lokalisation der beiden Proteine detektiert werden konnte. Wenn also in Assoziation zu PODs weitere distinkte Domänen existieren, so findet sich dort keine Interaktion von PLINP mit FLASH.

Daxx ist neben PML und SUMO eine zentrale Komponente der PODs. Es werden zunehmend mehr Studien publiziert, die eine Interaktion von Proteinen mit Daxx zeigen, die die Lokalisation, die Transkription oder die Phosphorylierung von Daxx beeinflusst (Li *et al.* , 2000). Daxx ist ein Protein, welches im Heterochromatin und in PODs lokalisiert ist. Es wird von SUMO posttranskriptional modifiziert, was jedoch nicht mit einer Lokalisationsänderung einhergeht (Jang *et al.* , 2002). Eine Rolle von Daxx als Adapterprotein, in der es andere Proteine, die keine direkte Interaktion zu PML aufweisen, in PODs rekrutiert, wird vermutet (Ishov *et al.* , 1999). Diese indirekte Assoziation wird nicht nur für zelluläre, sondern ebenso für einige virale Proteine angenommen. So fungiert Daxx als Adapter zwischen PML und dem Tegumentprotein pp71 des humanen Cytomegalovirus (Ishov *et al.* , 2002), (Hofmann *et al.* , 2002). Eine analoge Funktion wäre auch für HPV L2 denkbar, da keine direkte Assoziation zwischen PML und L2 belegt werden konnte. Dennoch assoziiert L2 ebenso in Daxx-*knockout*-Zellen in PODs, was auf die Anwesenheit weiterer Komponenten hindeutet (Becker *et al.* , 2004). PLINP könnte dieses Verbindungsglied sein. Es ist zwar ohne Daxx im Zellkern, jedoch in veränderter Lokalisation zu finden. Die Lokalisation von PLINP zeigt keine sonst typische POD-Assoziation, sondern vielmehr Signale in großen punktförmigen Strukturen an der inneren Kernmembran, die partiell mit der Lokalisation in vielen kleinen punktförmigen Kernstrukturen einhergeht. Deletionsanalysen von PLINP sowie von Daxx offenbarten die direkten oder indirekten Interaktionsbereiche zwischen den beiden Proteinen. So ist der Bereich zur direkten oder indirekten Interaktion mit Daxx in der Region bei Aminosäure 163-222 angesiedelt, in der auch die L2-Interaktion stattfindet. Der C-terminale Bereich von Daxx interagiert mit PLINP. Interessanterweise scheint L2

in der Lage zu sein, die bei *knockout* von Daxx veränderte PLINP-Lokalisation zu revidieren, so dass PLINP unter Koexpression von HPV16 L2 bei einem *knockout* von Daxx nicht mehr in großen punktartigen Strukturen im Randbereich des Zellkerns zu finden ist. Es ist denkbar, dass PLINP durch das Adapterprotein Daxx und nicht wie vermutet durch SUMO in PODs gelangt. Dies wäre ein interessanter Ansatz in zukünftigen Studien.

Viele Viren nutzen die Assoziation an PODs für ihre Transkription. Die erste identifizierte Assoziation von Viren mit PODs beruhte auf Studien mit HSV-1 (Maul *et al.* , 1993), in der eine Lokalisation des *immediate early* Proteins ICP0 in den PODs eine dynamische Verteilungsänderung von PML und SP100 sowie weiteren POD assoziierten Proteinen induziert (Everett & Murray, 2005). Viren interagieren mit PODs auf zwei verschiedene Arten. Zum einen können PODs durch Viren wie etwa HCMV, Epstein-Barr- und Adenoviren zerstört werden (Adamson & Kenney, 2001), (Ishov & Maul, 1996). Zum anderen sieht man eine Umstrukturierung der Domänen durch virale Proteine der SV40 und Papillomviren (Tang *et al.* , 2000), (Florin *et al.* , 2002). Es ist möglich, dass die zellulären Faktoren die Replikation des viralen Genoms unterstützen oder aber reprimieren. Die viralen Proteine E1 und E2 sind in die Replikation des Genoms involviert und tragen zur Lokalisation in PODs bei. Auch L2 scheint zur Rekrutierung der viralen DNA in den Zellkern durch Interaktion über das Mikrotubuli-Netzwerk mit dem Motorprotein Dynein zu interagieren (Florin *et al.* , 2006). In den PODs induziert L2 die Reorganisation dieser Strukturen. Es wird angenommen, dass L2 Daxx in PODs einschleust und für den Ausschluss von Sp100, einem Transkriptionsaktivator, verantwortlich ist. Dieser Prozess beendet die Phase der Transkription und Replikation und führt zur Einleitung der Verpackung des viralen Genoms (Florin *et al.* , 2002).

Es ist anzunehmen, dass PLINP in den Prozess der Transkription und Replikation des HPV-Genoms involviert ist, da das Protein einen negativen Regulator des Zellzyklus darstellt (Chung *et al.* , 2003). Daxx könnte durch eine Interaktion von PLINP, die möglicherweise mit einer Änderung seines Phosphorylierungsstatus oder seiner Lokalisation einhergeht, in seiner Funktion als Transkriptionsrepressor beeinflusst werden (Li *et al.* , 2000). Eine direkte oder indirekte Interaktion von PLINP mit Daxx über seinen C-Terminus könnte im Zusammenhang mit Histonen und der Kondensation von Chromatin stehen, da Daxx über den C-Terminus mit Histon-Deacetylasen interagiert. Für PLINP konnte eine direkte negative Einflussnahme auf die Histon H1-Kinaseaktivität gezeigt werden (Chung *et al.* , 2003).

PLINP scheint posttranskriptional modifiziert zu sein, wird aber nicht SUMOyliert oder phosphoryliert

Eine SUMOylierung von PLINP als posttranslationale Modifikation des PLINP-Proteins schien denkbar, da in der mittleren Sequenzregion von PLINP ein SUMO-Interaktionssequenz identifiziert werden konnte. Ein anderer Hinweis auf eine mögliche SUMOylierung war eine zusätzliche Bande, die unfusioniertes PLINP im Western Blot zeigte. Neben der erwarteten Bande bei etwa 28 kDa zeigte sich eine weitere Bande mit dem höheren Molekulargewicht von etwa 32 kDa. Eine SUMOylierung schien hier jedoch nicht wahrscheinlich, da diese Modifikation eine Erhöhung des Molekulargewichtes um etwa 10-15 kDa erwarten ließe. Tatsächlich führte die Koexpression von SUMO-1, SUMO-2 oder SUMO-3 nicht wie bei einer SUMOylierung angenommen zu einer Verstärkung der zusätzlichen höheren Bande von unfusioniertem PLINP. Vielmehr führte die Koexpression von EGFP-SUMO-1 unabhängig von anderen Faktoren wie der Koexpression der SUMO-Ligase Ubc9 zu einem Verschwinden dieser 32 kDa-Bande von unfusioniertem PLINP. Der analoge Effekt zeigte sich in abgeschwächter Form ebenso bei Koexpression von HA-SUMO. Es konnte in dieser Arbeit leider nicht geklärt werden, welche Identität diese 32 kDa-PLINP-Bande im Western Blot hat und welcher Art der Einfluss von SUMO ist. Bei Expression von unfusioniertem PLINP konnte in Nagerzellen eine Reduktion der zusätzlichen PLINP-Bande bei 32 kDa im Vergleich zu humanen Zellen wie 293T verzeichnet werden, was jedoch ebenso nicht zu einer Identitätsklärung dieser Bande führte. Eine Phosphorylierung ebenfalls ausgeschlossen werden, da eine Behandlung mit verschiedenen Phosphatasen nicht zu einer Änderung der Bande führte. Weiterhin wurde eine Phosphorylierung nicht als wahrscheinlich angesehen, da diese nur eine maximale Erhöhung des Molekulargewichtes um 1,5 kDa erwarten ließe, da PLINP 19 phosphorylierbare Aminosäuren in seiner Sequenz aufweist. So ist zusammenfassend festzustellen, dass die Identität der 32 kDa-Bande von PLINP im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte.

Die Betrachtung überexprimierter Proteine wie dem unfusioniertem PLINP sind immer unter dem Aspekt des artifiziellen Systems zu betrachten. So ist beim Nachweis von endogenem PLINP in Zellen keine zusätzliche Bande von 32 kDa zu detektieren. Dies lässt mehrere Erklärungen zu. Es ist möglich, dass die 32 kDa-Bande von unfusioniertem PLINP ein Artefakt ist, welches sich durch eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen zellulären Proteinen erklären ließe. Dann müssten beide verwendeten Antikörper, also der monoklonale Ratten-Antikörper OFR1 #57 und das polyklonale Kaninchenserum die gleiche Kreuzreaktivität besitzen, da beide die 32 kDa-Bande detektieren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die 32 kDa-Bande von unfusioniertem PLINP tatsächlich eine modifizierte Variante des Proteins darstellt. In diesem Fall ist es denkbar, dass diese Variante des endogenen PLINP eine für den Nachweis im Western Blot zu schwache

Expression zeigte. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, wenn man sich die Verhältnisse der 28 kDa-Form und der 32 kDa-Form von unfusioniertem PLINP ansieht. Vorstellbar ist auch, dass die 32 kDa-Form von endogenem PLINP in der Zelle abgebaut wird. Dann wäre die 32 kDa-Form von unfusioniertem PLINP durch einen nicht vollständigen Abbau des modifizierten Proteins zu begründen. Weiterhin ist möglich, dass die Überexpression von PLINP zu einer massiven Steigerung der Modifikation führt, was mit dem Nachweis der 32 kDa-Bande von PLINP einhergeht. In diesen Zusammenhang passt auch die Entdeckung, dass eine Infektion von Vero2-2-Zellen, die der grünen Meerkatze entstammen, mit HSV-1 zu einer Entstehung einer 32 kDa-Bande bei endogenem PLINP führt (persönliche Mitteilung von Tim Nötzel, Universität Dresden).

Eine endgültige Klärung der Identität der 32 kDa-Bande könnte in zukünftigen Studien auf verschiedene Weisen erfolgen. So wurde bereits in dieser Arbeit mit einer Koimmunpräzipitation zur Anreicherung der 32 kDa-Bande von PLINP und der späteren Analyse in der MALDI-TOF Massenspektroskopie begonnen, konnte jedoch nicht erfolgreich beendet werden.

PLINP scheint nicht nur mit PODs im Zellkern assoziiert zu sein, sondern auch mit Mitochondrien im Zytoplasma

In dieser Arbeit konnten weitere bisher unbekannte Eigenschaften bezüglich des unfusionierten PLINP offengelegt werden. So zeigte sich das Protein nicht nur wie EGFP-PLINP in diffusen Strukturen im Zellkern oder in PODs, sondern auch in punktartigen Strukturen des Zytoplasmas. Detaillierte Analysen zeigten eine partielle Kolo-kalisation von unfusioniertem PLINP mit Mitochondrien. In bisherigen Studien wurde ausschließlich eine Kernlokalisation von PLINP beschrieben ([Gornemann et al. , 2002](#)), ([Chung et al. , 2003](#)). Ein daraufhin kloniertes Flag-PLINP, welches nur einen Anhang von acht Aminosäuren hat, zeigte sich ähnlich der Lokalisation von EGFP-PLINP. Jedoch waren Signale von Flag-PLINP an der Zellkernmembran und in geringer Intensität auch im Zytoplasma zu detektieren. Im Allgemeinen kann man sagen, dass bei größer werdendem Fusionsanhang an PLINP die Wahrscheinlichkeit einer Konformationsänderung des Proteins und damit auch eine veränderte Lokalisation in der Zelle steigt. Dies spräche dafür, dass die Lokalisation von unfusioniertem PLINP die *in vivo*-Situation am geeignetsten darstellt. Die im Vergleich veränderte Lokalisation von EGFP-PLINP ließe sich dadurch begründen, dass EGFP-PLINP durch eine Konformations- und Größenänderung nicht mehr mit Mitochondrien assoziiert. Eine andere Erklärung wäre beispielsweise eine nicht mehr vorhandene Modifikation, die zur Rekrutierung des Proteins an Mitochondrien führen würde. Zur Klärung dieser putativen mitochondrialen Assoziation von PLINP war es essentiell, die Lokalisation des endogenen PLINP zu betrachten.

Das daraufhin hergestellte PLINP-Antiserum aus Kaninchen und Mäusen war in der

Lage, die subzelluläre Lokalisation von endogenem PLINP in der Zelle aufzuzeigen. Dies konnte mit dem bereits zu Beginn dieser Arbeit vorliegendem monoklonalen PLINP-Antikörper aus der Ratte nicht gelingen. Dabei konnte gezeigt werden, dass endogenes PLINP wahrscheinlich wie unfusioniertes PLINP mit Mitochondrien assoziiert.

Zu bedenken ist jedoch, dass Kreuzreaktivitäten von Antikörpern zu mitochondrialen Proteinen zu Artefakten führen können. Dies konnte beispielsweise beim zyklischen AMP Reporterelement-Bindeprotein (*Cyclic AMP response element binding protein* (CREB)) gezeigt werden, das sowohl nukleär als auch mitochondrial lokalisiert sein sollte. Die Kreuzreaktivität fand in diesem Fall mit Pyruvatdehydrogenase statt (Platenik *et al.*, 2005).

Warum PLINP ebenfalls in Mitochondrien zu finden ist, konnte aus Zeitgründen nicht geklärt werden. Es existiert jedoch ein Zusammenhang von Mitochondrien und Apoptose, die mit den bereits schon bekannten Eigenschaften von PLINP als negativer Zellzyklusregulator und seiner Interaktion mit GADD45 Sinn ergeben könnten. Dies bleibt allerdings in weiterführenden Studien durch Ausschluss der Kreuzreaktivität der Antikörper zu verifizieren.

Eine PLINP-spezifische RNA-Interferenz zeigte eine signifikante Hemmung der Expression von endogenem und exogenem PLINP

Um weiterführende Kenntnisse in Bezug zum viralen Lebenszyklus des humanen Papillomvirus zu erhalten, wurde eine relativ junge molekularbiologische Methode gewählt, die RNA-Interferenz. Diese Methode birgt jedoch einige Gefahren, die beachtet werden müssen. Häufig wird zum Beispiel ein toxischer Effekt der transfizierten siRNAs detektiert, der zur Verfälschung der erhaltenen Daten führt. Im Rahmen der Stressreaktion der Zellen kann es dabei unter anderem zur Ausschüttung von Interferonen kommen, die ebenfalls erhaltene Daten verfälschen oder Versuche stören können. Zur Vermeidung dieser unerwünschten Nebeneffekte existiert noch kein etabliertes System, so dass immer eine individuelle Beurteilung erfolgen muss.

Zur Herstellung von PLINP-spezifischer siRNA wurden zwei verschiedene Silencing-Konstrukte ausgewählt, die in den Versuchen 1-PLINP und 2-PLINP genannt wurden. Die Sequenz dieser siRNAs stammte aus der Publikation von Chung *et al.* (Chung *et al.*, 2003), die ebenfalls in ihren Studien zu PLINP, welches sie CRIF1 nannten, die Methode der RNA-Interferenz nutzten. Daneben wurde zur Kontrolle der Spezifität der siRNA auf Basis des ersten Konstruktes eine siRNA hergestellt, welche zwei Punktmutationen aufwies, die dazu führen sollten, dass PLINP-mRNA nicht mehr degradiert werden kann. Dieses Konstrukt erhielt den Namen 1-PLINPwrong. Als weitere Kontrolle war im Kit (*Silencer siRNA Construction Kit, Ambion*) eine bereits fertige siRNA vorhanden, die das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) spezifisch

silencen kann (siGAPDH), so dass im Versuch eine interne Normierung möglich ist. Im Rahmen dieser Normierung kann auch begrenzt beurteilt werden, ob die verwendeten siRNAs einen unspezifischen Effekt auslösen.

Der Einfluss von 1-PLINP und 2-PLINP zeigte im Western Blot eine signifikante Reduktion der Expression des endogenen PLINP-Proteins. Ein Zeitverlauf offenbarte, dass die RNA-Interferenz in einem Zeitrahmen von etwa 24 -72 Stunden stabil blieb. Unglücklicherweise zeigte die Spezifikationskontrolle 1-PLINPwrong eine fast ebenso starke Reduktion der PLINP-Expression wie 1-PLINP und 2-PLINP. So war diese Kontrolle nutzlos. In der Literatur ist beschrieben, dass für eine Spezifikationskontrolle der siRNA mindestens zwei Punktmutationen vorliegen müssen, um eine auf die Ziel-mRNA gerichtete funktionslose Variante der siRNA zu erhalten. Allerdings sind die Mechanismen, wann genau eine siRNA spezifisch mit der Ziel-mRNA interagiert, weitestgehend unbekannt. Durch Untersuchungen konnten bis heute nur bestimmte Regeln aufgestellt werden, die bei der Konstruktion einer siRNA zu beachten sind, damit diese funktionell ist. Es wird allgemein empfohlen, etwa fünf verschiedene siRNAs pro Ziel-RNA herzustellen, um sicher zu gehen, eine funktionale siRNA zu erhalten. Somit ist es möglich, dass entweder die Anzahl der Punktmutationen in der 1-PLINPwrong siRNA zu gering war, um die Spezifikation herabzusetzen, oder die siRNA unabhängig von den Punktmutationen funktional war. Die Kontrolle der Spezifität durch siGAPDH bei den Versuchen war jedoch für Schlussfolgerungen ausreichend, so dass von einer erneuten Synthese einer Spezifikationskontrolle abgesehen wurde.

Der Nachweis der PLINP-spezifischen mRNA, der mittels RT-Reaktion und nachfolgender PLINP-spezifischer PCR erfolgte, zeigte das gleiche Ergebnis. Der Versuch wurde mit verschiedenen Zelllinien durchgeführt, um die erhaltenen Ergebnisse im möglichen Rahmen abzusichern. Leider konnte die Reduktion der endogenen PLINP-Expression nicht in der Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden, da hier das Signal des spezifischen PLINP-Antikörpers auch im unbehandelten Zustand der Zelle am Detektionsminimum lag.

Da die Nachweismöglichkeiten des endogenen PLINP aufgrund der geringen Expression in Säugetierzellen beschränkt waren und zudem der Effekt der PLINP-spezifischen siRNAs quantifiziert und nicht ausschließlich relativ betrachtet werden sollte, wurde exogenes EGFP-PLINP mit PLINP-spezifischer siRNA behandelt. Die Untersuchungen in der Immunfluoreszenz sowie im FACS erlaubten eine quantitative Auswertung der Expressionshemmung anhand der Fluoreszenzpositivität und -intensität. Das Expressionsmuster des PLINP-EGFP-Fusionsproteins unter Einfluss mit PLINP-siRNA wurde zusätzlich im Western Blot überprüft.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PLINP-spezifische siRNA bei endogenem und auch bei exogenem Protein in der Lage ist, die mRNA zu zerstören und damit die

PLINP-Expression zu hemmen. Es konnte eine Reduktion der Proteinmenge um etwa 80-90% bei exogenem PLINP detektiert werden. Dies ist eine sehr starke Reaktion, wenn man bedenkt, dass es sich um das überexprimierte PLINP handelt.

Eine Rolle von PLINP bezüglich der Lokalisation und Expression der viralen Kapsidproteine ist unwahrscheinlich.

Die viralen Kapsidproteine der Papillomviren, L1 und L2, sind im viralen Lebenszyklus in viele essentielle Prozesse eingebunden. In jüngster Zeit wurden vor allem im Bereich von L2 große Fortschritte zur Aufklärung seiner Funktion sowohl bei der Erkennung und Bindung der Wirtszellen als auch in späteren Prozessen nach erfolgter Infektion gemacht. So erfolgt Bindung der Viren an die Zielzellen durch Bindung von L1 und über einen spezifischen sekundären Rezeptor durch Bindung von L2. Die Aufnahme der viralen Partikel erfolgt mittels Clathrin-abhängiger Endozytose (Selinka *et al.* , 2002). Die Freisetzung aus den Endosomen erfolgt über ein Membran-destabilisierendes Peptid in Zusammenhang mit der Spaltung von L2 an einer Furin-Erkennungssequenz (Kamper *et al.* , 2006), (Richards *et al.* , 2006). Unter Begleitung von L2 wird das virale Genom in den Zellkern transportiert. Es konnte gezeigt werden, dass L2 mit dem Mikrotubuli-Netzwerk der Zelle über das Motorprotein Dynein interagieren kann und so möglicherweise den Transport der viralen DNA steuert (Florin *et al.* , 2006). Nach Internalisierung wurde gezeigt, dass der N-Terminus von L2 mit einer Komponente des endoplasmatischen Retikulums, dem tSNARE Syntaxin 18, interagiert (Bossis *et al.* , 2005). Der Import in den Zellkern erfolgt, wie bei HPV18 L2 gezeigt werden konnte, über eine Interaktion mit dem Kap alpha(2)-Adapter sowie den Kap beta(2)- und Kap beta(3)-nukleären Importrezeptoren (Klucevsek *et al.* , 2006). Nach Ankunft im Zellkern führt L2 in PODs die Rekrutierung des Transkriptionsrepressors Daxx und die Ausschleusung des transkriptionalen Aktivators Sp100 herbei und sorgt so für den Übergang der viralen Transkription und Replikation zur Verpackung des viralen Genoms (Florin *et al.* , 2002).

Im Bereich der Transkription und Replikation der Virus-DNA in Assoziation zu PODs ist auch die Interaktion von L2 zu PLINP zu vermuten. Es ist dabei denkbar, dass PLINP durch den Einfluss von L2 gehemmt wird und so seine Funktion in der Kontrolle des Zellzyklus nicht mehr ausüben kann. Denkbar ist ebenso, dass PLINP durch L2 aktiviert wird. Da das Virus jedoch Vorteile von einer Fortsetzung des Zellzyklus und einer Blockierung von Zellzyklus-Kontrollproteinen hat, ist eine Hemmung von PLINP durch L2 viel wahrscheinlicher als eine Aktivierung.

Um zu überprüfen, ob eine Interaktion von PLINP und L2 im Bereich der Lokalisation des viralen Proteins eine Rolle spielt, wurde unter der Hemmung der PLINP-Expression die subzelluläre Lokalisation von L2 untersucht. Da eine Involvierung von L1 durch eine indirekte Interaktion mit PLINP möglich erschien, wurde der Versuch auch mit experi-

miertem HPV16 L1 durchgeführt. Es zeigte sich, dass die RNA-Interferenz von PLINP keinerlei Einfluss auf die Expression oder Lokalisation der viralen Kapsidproteine L1 und L2 hat. Da jedoch eine Interaktion von PLINP mit dem Nebenkapsidprotein L2 bekannt ist und ein funktionaler Zusammenhang dieser Interaktion in der Zelle sehr wahrscheinlich ist, wurden weitere mögliche Ansatzpunkte zur Interaktion untersucht. Es ist aus früheren Studien bekannt, dass L2 eine Rolle beim Zusammenbau der Virionen spielt. Hier sollten die nächsten Versuche anknüpfen, die eine mögliche Verbindung von PLINP zu dem Zusammenbau der Viruspartikel, der Infektiosität, der Neutralisierbarkeit der Virionen durch ein spezifisches Antiserum oder der Infizierbarkeit von Zellen offenlegen könnten.

Erst seit jüngster Zeit ist es möglich, Pseudovirionen des humanen Papillomvirus *in vitro* herzustellen. Zur Produktion dieser Pseudovirionen braucht man eine sehr massive Expression der viralen Kapsidproteine in der Zelle. Dazu wurden deshalb 293TT-Zellen verwendet, die neben dem stabil in das Genom integrierte T-Antigen des SV40-Virus ein weiteres stabil transfiziertes T-Antigen aufweisen, welches in der Zelle als Plasmid vorliegt. Durch die erhöhte Menge an T-Antigen vergleichbar mit unbehandelten 293T-Zellen ist eine erhöhte Expression der Kapsidproteine L1 und L2 sowie des Reporterplasmides möglich, da eine Replikation der Plasmide über den Replikationsursprung von SV40 erfolgt. Es ist zu Nachweiszwecken wichtig, ein Reporterplasmid zu kotransfizieren. Früher wurde angenommen, dass die Größe des Verpackungsplasmides essentiell ist und dass sogar die Größe des Plasmides exakt mit der Größe des Genoms des jeweils benutzten HPV-Typs übereinstimmen muss. Dies wurde durch Studien mittlerweile widerlegt (Buck *et al.*, 2005a). Das hier verwandte Reporterplasmid ist so gestaltet, dass über die Expression des kodierten Proteins der sekretierten alkalischen Phosphatase (SE-AP) ein quantitativer biochemischer Nachweis einer erfolgten Infektion beziehungsweise Produktion von Pseudovirionen möglich ist. Dieser Nachweis beruht auf der biochemischen Umwandlung von Luminol zu einer Licht emittierenden Substanz, die mittels luminometrischer Messung quantifiziert werden kann. Die Produktion der Pseudovirionen erfolgt nach Kotransfektion des Verpackungsplasmides und des Reporterplasmides; die Gewinnung der Pseudovirionen aus den produzierenden 293TT-Zellen erfolgt 72 bis 96 Stunden nach der Infektion. Diese Pseudovirionen sind, sofern L2 enthalten ist, in der Lage, wieder 293TT-Zellen zu infizieren, die dann nach Aufnahme des Pseudovirus ebenfalls das Reporterplasmid exprimieren, so dass ein quantitativer Nachweis der Infektion erfolgen kann.

PLINP ist an den antiviralen Abwehrmechanismen der Zellen beteiligt.

Zunächst wurde deutlich, dass die Transfektion weiterer Expressionsplasmide zusätzlich zum Verpackungs- und Reporterplasmid zu einer drastischen Reduktion an exprimiertem

L1 und damit indirekt an der Menge gebildeter Pseudovirionen führt. Eine Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass die Erhöhung an transfizierten Expressionsplasmiden die Transfektionseffizienz jedes einzelnen Plasmides hemmt. Eine so drastische Hemmung auf etwa 25% verglichen mit der Kontrolle war jedoch nicht zu erwarten. So muss in diesem Zusammenhang möglicherweise an eine Hemmung der L1-Expression durch die Expressionsplasmide, auch wenn diese für kein Gen kodieren, gedacht werden.

Die Hemmung von PLINP führte zu einer erhöhten Expression von SEAP bei Pseudovirionen-produzierenden Zellen. Dies führt zu dem Schluss, dass PLINP in einem bisher unbekanntem Zusammenhang an der antiviralen Abwehr der Zellen beteiligt. Ein Bezug zum viralen Lebenszyklus besteht also in einer zumindest zu einem Teil antagonistischen Rolle von PLINP im Infektionsprozess. Dies ergibt auch bezüglich der Rolle von PLINP als negativer Regulator des Zellzyklus Sinn.

Es gibt keinen Hinweis auf eine Interaktion von PLINP mit viralen Partikeln oder Kapsomeren

Um zu klären, ob möglicherweise PLINP beim Zusammenbau der Virionen eine funktionale Interaktion mit L2 eingeht, wurden Sucrose-Gradienten von Zelllysaten angefertigt, die neben Pseudovirionen auch PLINP überexprimieren oder in denen das Protein durch RNA-Interferenz ausgeschaltet ist. Hier lassen sich dichteabhängig Virionen von Kapsomeren und Zelldebris trennen und anreichern. Bei einer Interaktion und damit Anlagerung von PLINP mit viralen Partikeln oder Kapsomeren, die zu einer Verminderung der Infektiosität führen könnte, würde man PLINP in den entsprechenden Fraktionen der Virionen oder Kapsomeren detektieren. In diesem Zusammenhang sei auch an die mögliche Interaktion von PLINP mit TIN-Ag-RP und L2 gedacht, die ausserhalb der Zelle erfolgen könnte. Eine Anlagerung von PLINP an virale Partikel konnte jedoch nicht bestätigt werden, so dass eher ein Einfluss von PLINP in der Zielzelle wahrscheinlich ist. Als verbliebene Möglichkeit sei noch zu nennen, dass eine Anlagerung von wenigen Molekülen PLINP an virale Strukturen unter der Nachweisgrenze liegen könnte.

Ausblick

Die hier vorliegende Arbeit gibt zahlreiche Ansätze zu weiterführenden Studien:

Es finden sich bei den im *Yeast Two-Hybrid-Screening* von PLINP identifizierten potentiellen Interaktionspartnern weitere, zum Teil noch völlig uncharakterisierte cDNA-Klone, deren Interaktion mit PLINP nicht analysiert wurde. Die Klone, deren subzelluläre Lokalisation und Kolo­kalisierung mit PLINP bereits untersucht wurde, bieten ebenfalls noch zahlreiche Möglichkeiten für weitere Studien. Hingewiesen sei hier beispielsweise auf die Analyse der möglichen funktionellen Komplexe zwischen PLINP, dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor (eIF3), einer Untereinheit des COP9-Signalsoms sowie dem Proteasom. Weiterhin könnte ein funktionaler Zusammenhang zwischen PLINP, PMSP, TIN-Ag-RP und HPV L2 bestehen, dessen Charakteristika in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt werden konnten. PMSP besitzt zudem weitere interessante potentielle Interaktionspartner wie eine Untereinheit des G-Proteins, welches auch als Interaktionspartner von L2 beschrieben wurde. Diese Interaktionspartner konnten im Rahmen der Arbeit nicht weiter analysiert werden.

Die Charakteristika von PLINP und PMSP lassen zudem weitere Fragen in Bezug zu ihrer Funktion in der Zelle und ihrer Rolle im viralen Lebenszyklus offen. So konnte beispielsweise die zusätzliche 32 kDa-Bande von unfusioniertem PLINP, die auf eine mögliche posttranslationale Modifikation des Proteins hinweist, noch nicht charakterisiert werden. Zudem konnte für PLINP eine partielle Assoziation mit Mitochondrien gezeigt werden, die nach Verifizierung der Daten durch Ausschluss einer Kreuzreaktion der Antikörper mit mitochondrialen Proteinen genauer analysiert werden sollte.

Schließlich ist die Wirkung der PLINP-RNA-Interferenz auch im Zusammenhang mit der erhöhten Infizierbarkeit von Zellen mit HPV16-Pseudovirionen weitergehend zu charakterisieren. Es könnte eine genaue Funktion von PLINP im Zusammenhang zum Lebenszyklus des humanen Papillomvirus und die Charakteristik der Interaktion zum Nebenkapsidprotein L2 aufgeklärt werden.

In diesem Rahmen ist weiterhin an die Rolle von L2 bei der Zellzykluskontrolle zu denken, da PLINP neben seiner Rolle als negativer Regulator des Zellzyklus und des Zellwachstums auch in die Apoptosemechanismen der Zelle involviert zu sein scheint.

5 Literaturverzeichnis

- Adamson, A.L., & Kenney, S. 2001. Epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies. *J Virol*, **75**(5), 2388–99.
- Baker, T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H., Cowser, L.M., Olson, C., & Brown, J.C. 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J*, **60**(6), 1445–56.
- Becker, K.A., Florin, L., Sapp, C., Maul, G.G., & Sapp, M. 2004. Nuclear localization but not PML protein is required for incorporation of the papillomavirus minor capsid protein L2 into virus-like particles. *J Virol*, **78**(3), 1121–8.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., & Hannon, G.J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**(6818), 363–6.
- Bondar, T., Kalinina, A., Khair, L., Kopanja, D., Nag, A., Bagchi, S., & Raychaudhuri, P. 2006. Cul4A and DDB1 associate with Skp2 to target p27Kip1 for proteolysis involving the COP9 signalosome. *Mol Cell Biol*, **26**(7), 2531–9.
- Borden, K.L., CampbellDwyer, E.J., & Salvato, M.S. 1997. The promyelocytic leukemia protein PML has a pro-apoptotic activity mediated through its RING domain. *FEBS Lett*, **418**(1-2), 30–4.
- Bossart, G.D., Ewing, R.Y., Lowe, M., Sweat, M., Decker, S.J., Walsh, C.J., Ghim, S.J., & Jenson, A.B. 2002. Viral papillomatosis in Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *Exp Mol Pathol*, **72**(1), 37–48.
- Bossis, I., Roden, R.B., Gambhira, R., Yang, R., Tagaya, M., Howley, P.M., & Meneses, P.I. 2005. Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *J Virol*, **79**(11), 6723–31.
- Bouvard, V., Storey, A., Pim, D., & Banks, L. 1994. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J*, **13**(22), 5451–9.

- Bromme, N.C., Wex, T., Wex, H., Levy, B., Lipyansky, A., & Bromme, D. 2000. Cloning, characterization, and expression of the human TIN-ag-RP gene encoding a novel putative extracellular matrix protein. *Biochem Biophys Res Commun.*, **271**(2), 474–80.
- Brown-Luedi, M. L., Meyer, L. J., Milburn, S. C., Mo-Ping Yau, P., Corbett, S., & Hershey, J. W. B. 1982. Protein synthesis initiation factors from human HeLa cells and rabbit reticulocytes are similar: comparison of protein structure, activities, and immunochemical properties. *Biochem*, **21**(18), 4202–06.
- Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., & Schiller, J.T. 2005a. Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Methods Mol Med*, **119**, 445–62.
- Buck, C.B., Thompson, C.D., Pang, Y.Y., Lowy, D.R., & Schiller, J.T. 2005b. Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol*, **79**(5), 2839–46.
- Chamovitz, D. A., & Deng, X.W. 1995. The novel components of the Arabidopsis light signaling pathway may define a group of general developmental regulators shared by both animal and plant kingdoms. *Cell*, **82**(3), 353–4.
- Chiang, C.M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T.F., Broker, T.R., & Chow, L.T. 1992. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(13), 446–54.
- Chung, H.K., Yi, Y.W., Jung, N.C., Kim, D., Suh, J.M., Kim, H., Park, K.C., Song, J.H., Kim, D.W., Hwang, E.S., Yoon, S.H., Bae, Y.S., Kim, J.M., Bae, I., & Shong, M. 2003. CR6-interacting factor 1 interacts with Gadd45 family proteins and modulates the cell cycle. *J Biol Chem*, **278**(30), 28079–88.
- Cohen, B.D., Goldstein, D.J., Rutledge, L., Vass, W.C., Lowy, D.R., Schlegel, R., & Schiller, J.T. 1993. Transformation-specific interaction of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein with the platelet-derived growth factor receptor transmembrane domain and the epidermal growth factor receptor cytoplasmic domain. *J Virol*, **67**(9), 5303–11.
- Day, P.M., Baker, C.C., Lowy, D.R., & Schiller, J.T. 2004. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(39), 14252–7.
- de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., & zur Hausen, H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, **324**(1), 17–27.

- de Villiers, E.M., Whitley, C., & Gunst, K. 2005. Identification of new papillomavirus types. *Methods Mol Med*, **119**, 1–13.
- Ditzel, H.J., Strik, M.C., Larsen, M.K., Willis, A.C., Waseem, A., Kejling, K., & Jensenius, J.C. 2002. Cancer-associated cleavage of cytokeratin 8/18 heterotypic complexes exposes a neoepitope in human adenocarcinomas. *J Biol Chem*, **277**(24), 21712–22.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., & Crawford, L. 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, **352**(6338), 824–7.
- Dorn, A., Zhao, H., Granberg, F., Hosel, M., Webb, D., Svensson, C., Pettersson, U., & Doerfler, W. 2005. Identification of specific cellular genes up-regulated late in adenovirus type 12 infection. *J Virol*, **79**(4), 2404–12.
- Downes, G.B., & Gautam, N. 1999. The G protein subunit gene families. *Genomics*, **62**(3), 544–52.
- Eckert, R.L. 1988. Sequence of the human 40-kDa keratin reveals an unusual structure with very high sequence identity to the corresponding bovine keratin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(4), 1114–8.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**(6836), 428–9.
- Emelyanov, A.V., Kovac, C.R., Sepulveda, M.A., & Birshstein, B.K. 2002. The interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx can result in transcriptional activation in B cells. *J Biol Chem*, **277**(13), 11156–64.
- Everett, R.D., & Murray, J. 2005. ND10 components relocate to sites associated with herpes simplex virus type 1 nucleoprotein complexes during virus infection. *J Virol*, **79**(8), 5078–89.
- Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., van Ormondt, H., Hoeben, R.C., & van der Eb, A.J. 1996. Characterization of 911: A new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.*, **7**, 215–22.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., & Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**(6669), 806–11.

- Florin, L., Schafer, F., Sotlar, K., Streeck, R.E., & Sapp, M. 2002. Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein L2. *Virology*, **295**(1), 97–107.
- Florin, L., Becker, K.A., Lambert, C., Nowak, T., Sapp, C., Strand, D., Streeck, R.E., & Sapp, M. 2006. Identification of a Dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein L2. *J Virol*, **80**(13), 6691–6.
- Fothergill, T., & McMillan, N.A. 2006. Papillomavirus virus-like particles activate the PI3-kinase pathway via alpha-6 beta-4 integrin upon binding. *Virology*, **im Druck**.
- Fu, C., Ahmed, K., Ding, H., Ding, X., Lan, J., Yang, Z., Miao, Y., Zhu, Y., Shi, Y., Zhu, J., Huang, H., & Yao, X. 2005. Stabilization of PML nuclear localization by conjugation and oligomerization of SUMO-3. *Oncogene*, **24**(35), 5401–13.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R.E., & Sapp, M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*, **75**(3), 1565–70.
- Gissmann, L., Pfister, H., & Zur Hausen, H. 1977. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology*, **76**(2), 569–80.
- Glinski, W., Obalek, S., Jablonska, S., & Orth, G. 1981. T cell defect in patients with epidermodysplasia verruciformis due to human papillomavirus type 3 and 5. *Dermatologica*, **162**(3), 141–7.
- Gornemann, J., Hofmann, T.G., Will, H., & Muller, M. 2002. Interaction of human papillomavirus type 16 L2 with cellular proteins: identification of novel nuclear body-associated proteins. *Virology*, **303**(1), 69–78.
- Haft, C.R., de la Luz Sierra, M., Barr, V.A., Haft, D.H., & Taylor, S.I. 1998. Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors. *Mol Cell Biol*, **18**(12), 1278–87.
- Hagensee, M.E., Yaegashi, N., & Galloway, D.A. 1993. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*, **67**(1), 315–22.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R., & Schiller, J.T. 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*, **8**(12), 3905–10.
- Hofmann, H., Floss, S., & Stamminger, T. 2000. Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b. *J Virol*, **74**(6), 2510–24.

- Hofmann, H., Sindre, H., & Stamminger, T. 2002. Functional interaction between the pp71 protein of human cytomegalovirus and the PML-interacting protein human Daxx. *J Virol*, **76**(11), 5769–83.
- Hollenbach, A.D., Sublett, J.E., McPherson, C.J., & Grosveld, G. 1999. The Pax3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx. *EMBO J*, **18**(13), 3702–11.
- Holmgren, S.C., Patterson, N.A., Ozbun, M.A., & Lambert, P.F. 2005. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *J Virol*, **79**(7), 3938–48.
- Howley, P., & Lowy, D. 2002a. Papillomaviruses. *Pages 2231–2264 of: Knipe, D., & Howley, P. (eds), Fields Virology*, forth edn., vol. 2. London: Lippincott Williams and Wilkins.
- Howley, P., & Lowy, D. 2002b. Papillomaviruses and their Replication. *Pages 2197–2230 of: Knipe, D., & Howley, P. (eds), Fields Virology*, forth edn., vol. 2. London: Lippincott Williams and Wilkins.
- Ibaraki, T., Satake, M., Kurai, N., Ichijo, M., & Ito, Y. 1993. Transacting activities of the E7 genes of several types of human papillomavirus. *Virus Genes*, **7**(2), 1485–91.
- Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K., & Yonehara, S. 1999. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature*, **398**(6730), 777–85.
- Ishii, Y., Ozaki, S., Tanaka, K., & Kanda, T. 2005. Human papillomavirus 16 minor capsid protein L2 helps capsomeres assemble independently of intercapsomeric disulfide bonding. *Virus Genes*, **31**(3), 321–8.
- Ishov, A.M., & Maul, G.G. 1996. The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol*, **134**(4), 815–26.
- Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F. 3rd., & Maul, G.G. 1999. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol*, **147**(2), 221–34.
- Ishov, A.M., Vladimirova, O.V., & Maul, G.G. 2002. Daxx-mediated accumulation of human cytomegalovirus tegument protein pp71 at ND10 facilitates initiation of viral infection at these nuclear domains. *J Virol*, **76**(15), 7705–12.

- Ishov, A.M., Vladimirova, O.V., & Maul, G.G. 2004. Heterochromatin and ND10 are cell cycle-regulated and phosphorylation-dependent alternate sites of the transcription repressor Daxx and the SWI/SNF protein ATRX. *JCS*, **117**(17), 3807–20.
- Jang, M.S., Ryu, S.W., & Kim, E. 2002. Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1. *Biochem Biophys Res Commun.*, **295**(2), 495–500.
- Jin, R., Chow, V.T., Tan, P.H., Dheen, S.T., Duan, W., & Bay, B.H. 2002. Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. *Carcinogenesis*, **23**(1), 81–6.
- Jin, Y., Mancuso, J.J., Uzawa, S., Cronembold, D., & Cande, W.Z. 2005. The fission yeast homolog of the human transcription factor EAP30 blocks meiotic spindle pole body amplification. *Dev Cell*, **9**(1), 63–73.
- Kakizuka, A., Miller, W. H. Jr., Umesono, K., Warrell, R. P. Jr., Frankel, S.R., Murty, V.V., Dmitrovsky, E., & Evans, R.M. 1991. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell*, **66**(4), 663–74.
- Kamper, N., Day, P.M., Nowak, T., Selinka, H.C., Florin, L., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J.T., & Sapp, M. 2006. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol*, **80**(2), 759–68.
- Kieback, E., & Müller, M. 2006. Factors influencing subcellular localization of the human papillomavirus L2 minor structural protein. *Virology*, **345**(1), 199–208.
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., & Schiller, J.T. 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(24), 12180–4.
- Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Durst, M., Gissmann, L., Lowy, D.R., & Schiller, J.T. 1993. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*, **67**(12), 6929–36.
- Klucsevsek, K., Daley, J., Darshan, M.S., Bordeaux, J., & Moroianu, J. 2006. Nuclear import strategies of high-risk HPV18 L2 minor capsid protein. *Virology*, **352**(1), 200–8.
- Koken, M.H., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M.K., Sobczak-Thépot, J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F., & de The, H. 1995. The PML growth-

- suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene*, **10**(7), 1315–24.
- Kulski, J. K., & Dawkins, R. L. 1999. The P5 multicopy gene family in the MHC is related in sequence to human endogenous retroviruses HERV-L and HERV-16. *Immunogenetics*, **49**(5), 404–12.
- Kulski, J. K., & Sadleir, J. W. 1998. Type specific and genotype cross reactive B epitopes of the L1 protein of HPV16 defined by a panel of monoclonal antibodies. *Virology*, **243**(2), 275–82.
- LaMorte, V.J., Dyck, J.A., Ochs, R.L., & Evans, R.M. 1998. Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(9), 4991–6.
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E.J., & Chen, J.D. 2000. Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol*, **20**(5), 1784–96.
- Liu, J.S., Kuo, S.R., Makhov, A.M., Cyr, D.M., Griffith, J.D., Broker, T.R., & Chow, L.T. 1998. Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J Biol Chem*, **273**(46), 30704–12.
- Lundberg, M., Johansson, C., Chandra, J., Enoksson, M., Jacobsson, G., Ljung, J., Johansson, M., & Holmgren, A. 2001. Cloning and Expression of a Novel Human Glutaredoxin (Grx2) with Mitochondrial and Nuclear Isoforms. *J Biol Chem*, **276**(28), 26269–75.
- Lykke-Andersen, K., & Wei, N. 2003. Gene structure and embryonic expression of mouse COP9 signalosome subunit 8 (Csn8). *Gene*, **321**, 65–72.
- Martinez, J., & Tuschl, T. 2004. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev*, **18**(9), 975–80.
- Matunis, M.J., Coutavas, E., & Blobel, G. 1996. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **135**(6 Pt 1), 1457–70.
- Maul, G.G., Guldner, H.H., & Spivack, J.G. 1993. Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J Gen Virol*, **74**(Pt 12), 2679–90.

- McManus, M.T., Petersen, C.P., Haines, B.B., Chen, J., & Sharp, P.A. 2002. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA*, **8**(6), 842–50.
- Morgenstern, J.P., & Land, H. 1990. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Research*, **18**(12), 3587–96.
- Muller, M., & Zhou, J. 1997. Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology*, **234**(1), 93–111.
- Nagase, T., Ishikawa, K., Suyama, M., Kikuno, R., Hirose, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., & Ohara, O. 1999. Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XIII. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in vitro. *DNA Res*, **6**(1), 63–70.
- Park, K.C., Song, K.H., Chung, H.K., Kim, H., Kim, D.W., Song, J.H., Hwang, E.S., Jung, H.S., Park, S.H., Bae, I., Lee, I.K., Choi, H.S., & Shong, M. 2005. CR6-interacting factor 1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and inhibits its transactivation. *Mol Endocrinol*, **19**(1), 12–24.
- Parks, W.T., Frank, D.B., Huff, C., Renfrew Haft, C., Martin, J., Meng, X., de Caestecker, M.P., McNally, J.G., Reddi, A., Taylor, S.I., Roberts, A.B., Wang, T., & Lechleider, R.J. 2001. Sorting nexin 6, a novel SNX, interacts with the transforming growth factor-beta family of receptor serine-threonine kinases. *J Biol Chem*, **276**(22), 19332–39.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., & Tuschl, T. 2004. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, **304**(5671), 734–6.
- Platenik, J., Balcar, V.J., Yoneda, Y., Mioduszewska, B., Buchal, R., Hynek, R., Kiliánek, L., Kuramoto, N., Wilczynski, G., Ogita, K., Nakamura, Y., & Kaczmarek, L. 2005. Apparent presence of Ser133-phosphorylated cyclic AMP response element binding protein (pCREB) in brain mitochondria is due to cross-reactivity of pCREB antibodies with pyruvate dehydrogenase. *J Neurochem*, **95**(5), 1446–60.
- Rao, P.S., Jaggi, M., Smith, D.J., Hemstreet, G.P., & Balaji, K.C. 2003. Metallothionein 2A interacts with the kinase domain of PKC μ in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, **310**(3), 1032–8.
- Richards, R.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T., & Day, P.M. 2006. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(5), 1522–7.

- Rogue, P.J., & Malviya, A.N. 1999. Calcium signals in the cell nucleus. *EMBO*, **18**, 5147–52.
- Rosel, D., & Kimmel, A.R. 2006. The COP9 signalosome regulates cell proliferation of *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Cell Biol*, **im Druck**.
- Ruggero, D., Wang, Z.G., & Pandolfi, P.P. 2000. The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of cancer. *Bioessays*, **22**(9), 827–35.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., & Howley, P.M. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, **63**(6), 1129–36.
- Schiller, J.T., Vass, W.C., Vousden, K.H., & Lowy, D.R. 1986. E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. *J Virol*, **57**(1), 1–6.
- Schmidt, A.E., Miller, T., Schmidt, S.L., Shiekhattar, R., & Shilatifard, A. 1999. Cloning and characterization of the EAP30 subunit of the ELL complex that confers derepression of transcription by RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **274**(31), 21981–5.
- Selinka, H.C., Giroglou, T., & Sapp, M. 2002. Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology*, **299**(2), 279–87.
- Shaw, R.J., & Cantley, L.C. 2006. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*, **441**(7092), 424–30.
- Stadler, M., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M.H., Venturini, L., Lee, C., Saib, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemin, M.C., Schindler, C., & et al. 1995. Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene*, **11**(12), 2565–73.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., & Will, H. 1997a. Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol*, **139**(7), 1621–34.
- Sternsdorf, T., Grotzinger, T., Jensen, K., & Will, H. 1997b. Nuclear dots: actors on many stages. *Immunobiology*, **198**(1-3), 307–31.
- Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F., Zeeberg, B., Buetow, K.H., Schaefer, C.F., Bhat, N.K., Hopkins, R.F., Jordan, H., Moore, T., Max, S.I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A.A., Rubin, G.M.,

- Hong, L., Stapleton, M., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Brownstein, M.J., Usdin, T.B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Prange, C., Raha, S.S., Loquellano, N.A., Peters, G.J., Abramson, R.D., Mullahy, S.J., Bosak, S.A., McEwan, P.J., McKernan, K.J., Malek, J.A., Gunaratne, P.H., Richards, S., Worley, K.C., Hale, S., Garcia, A.M., Gay, L.J., Hulyk, S.W., Villalon, D.K., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Lu, X., Gibbs, R.A., Fahey, J., Helton, E., Kettelman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Madan, A., Young, A.C., Shevchenko, Y., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Touchman, J.W., Green, E.D., Dickson, M.C., Rodriguez, A.C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Butterfield, Y.S., Krzywinski, M.I., Skalska, U., Smailus, D.E., Schnerch, A., Schein, J.E., Jones, S.J., Marra, M.A., & Team., Mammalian Gene Collection Program. 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(26), 16899–903.
- Szostecki, C., Guldner, H.H., Netter, H.J., & Will, H. 1990. Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. *J Immunol*, **145**(12), 4338–47.
- Tang, Q., Bell, P., Tegtmeyer, P., & Maul, G.G. 2000. Replication but not transcription of simian virus 40 DNA is dependent on nuclear domain 10. *J Virol*, **74**(20), 9694–700.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P., & Sharp, P.A. 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*, **13**(24), 3191–7.
- Unckell, F., Streeck, R.E., & Sapp, M. 1997. Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J Virol*, **71**(4), 2934–9.
- Vetter, I.R., & Wittinghofer, A. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, **294**(5545), 1299–304.
- Wang, Z.G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R., & Pandolfi, P.P. 1998. PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet*, **20**(3), 266–72.
- Watanabe, S., Kanda, T., & Yoshiike, K. 1989. Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. *J Virol*, **63**(2), 965–9.
- Watkins, S.J., & Norbury, C.J. 2004. Cell cycle-related variation in subcellular localization of eIF3e/INT6 in human fibroblasts. *Cell Proliferation*, **37**(2), 149–60.

- Wewer, U.M., Liotta, L.A., Jaye, M, Ricca, G.A., Drohan, W.N., Claysmith, A.P., Rao, C.N., Wirth, P., Coligan, J.E., Albrechtsen, R., Mudryj, M., & Sobel, M.E. 1986. Altered Levels of Laminin Receptor mRNA in Various Human Carcinoma Cells that Have Different Abilities to Bind Laminin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**(19), 1350–7.
- Wex, T., Lipyansky, A., Bromme, N.C., Wex, H., Guan, X.Q., & Bromme, D. 2001. TIN-ag-RP, a novel catalytically inactive cathepsin B-related protein with EGF domains, is predominantly expressed in vascular smooth muscle cells. *Biochemistry*, **40**(5), 1350–7.
- Yahalom, A., Kim, T.H., Winter, E., Karniol, B., von Arnim, A.G., & Chamovitz, D.A. 2001. Arabidopsis eIF3e (INT-6) associates with both eIF3c and the COP9 signalosome subunit CSN7. *J Biol Chem*, **276**(1), 334–40.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H.Y., & Baltimore, D. 1997. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, **89**(7), 1067–76.
- Young, G.D., Winokur, T.S., Cerfolio, R.J., Van Tine, B.A., Chow, L.T., Okoh, V., & Garver, R.I. Jr. 2002. Differential expression and biodistribution of cytokeratin 18 and desmoplakins in non-small cell lung carcinoma subtypes. *Lung Cancer*, **36**(2), 133–41.
- Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M.S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T.L., Barchetti, A., Ward, M.R., Yao, G., Medina, A., O'brien-Jenkins, A., Katsaros, D., Hatzigeorgiou, A., Gimotty, P.A., Weber, B.L., & Coukos, G. 2006. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Ntl Acad Sci U S A*, **im Druck**.
- Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D., & Pandolfi, P.P. 2000. Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med*, **191**(4), 631–40.
- Zhou, J., Sun, X.Y., Stenzel, D.J., & Frazer, I.H. 1991a. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*, **185**(1), 251–7.
- Zhou, J., Doorbar, J., Sun, X.Y., Crawford, L.V., McLean, C.S., & Frazer, I.H. 1991b. Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology*, **185**(2), 625–32.
- Zhou, J., Sun, X.Y., Davies, H., Crawford, L., Park, D., & Frazer, I.H. 1992. Definition of linear antigenic regions of the HPV16 L1 capsid protein using synthetic virion-like particles. *Virology*, **189**(2), 592–9.

- Zolotukhin, S., & Potter, M. 1996. A 'humanized' green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J Virol*, **70**(7), 4646–54.
- zur Hausen, H. 1996. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, **1288**(2), F55–78.
- zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, **2**(5), 342–50.