INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplom-Biologin Xanthippi Apsi
aus Thessaloniki (GR)

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Funktion des SGT/NS1-Komplexes im Lebenszyklus autonomer Parvoviren

Gutachter: PD Dr. Jürgen Kleinschmidt
PD Dr. Gabriele Petersen

Danksagung

Diese Dissertation wurde am Institut für Angewandte Tumorvirologie des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in der Abteilung von Prof. Dr. Jean Rommelaere in Heidelberg mit der Unterstützung der französischen Forschungsgemeinschaft INSERM, Unité 375, angefertigt.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Jean Rommelaere für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die kontinuierliche Unterstützung dieser Arbeit.

PD Dr. Jürgen Kleinschmidt und PD Dr. Gabriele Petersen möchte für die Begutachtung dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt für Dr. Celina Cziepluch für die Bereitstellung des interessanten Themas dieser Arbeit, für die sehr gute und vor allem geduldige Betreuung und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Annabel Grewenig danke ich ganz besonders für die Einarbeitung im Labor, die „tausend" 2D-Analysen und die H1-Viruspräparationen, die ständige Hilfsbereitschaft und die freundliche Laboratmosphäre. Dr. Laurent Daeffler sei gedankt für seine Mitarbeit beim *in vivo labeling*-Experiment.

Dr. Herbert Spring bin ich zu Dank aufgrund zahlreicher exzellenter konfokaler Bildaufnahmen verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jürg P.F. Nüesch und Sylvie Lachmann für die kritische Durchsicht und die vielen konstruktiven Vorschläge zu meinem Manuskript. Nicht zuletzt danke ich Jürg auch für zahlreiche gemeinsame Pausen und wissenschaftliche Diskussionen.

Sylvie bin ich herzlich für ihre ständigen Aufmunterungen, nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht, dankbar. Sie war immer eine gute Zuhörerin, mußte viel zu oft unter meiner schlechten Laune leiden und hatte in langen Arbeitsnächten einen endlosen Vorrat an Hanuta anzubieten.

Weiterhin möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das lockere und angenehme Arbeitsklima danken. Insbesondere gilt mein Dank Ellen Burkard und Dr. Claudia Wrzesinski für das Korrekturlesen meiner Arbeit, ihre Hilfsbereitschaft sowie etliche gemeinsame Kochabende, an die ich mich noch erinnern werde.

Ganz besonders möchte ich mich bei Lazaros bedanken, der mir stets zur Seite stand und es oft verstand, mich aufzubauen und zu motivieren.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre langjährige Unterstützung.

Abkürzungen

α	anti
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AS	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APAR-bodies	autonomous parvovirus-associated replikation bodies
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphat
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-propansulfonat
Ci	Curie
CKIIA	Casein Kinase IIA
cm	Centimeter
cpm	counts per minute
CSP	*cysteine string protein*
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
d.h.	das heißt
Da	Dalton
dATP	Desoxyribodenosintriphosphat
dCTP	Desoxyribocytidintriphosphat
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*
DMSO	Dimethysulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dRF	dimere replikative Form
ds	double stranded
DTT	Dithiothreitol
ECL	*enhanced chemiluminescence*
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GFP	*green fluorescent protein*
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
H1	Parvovirus H1
HEPES	*N*-2-Hydroxyethylpiperazin-*N´*-2-ethansulfonsäure

His	Histidin
HMG	*high-mobility group*
HRP	*horse radish peroxidase*
Hsc70	*heat shock cognate protein 70*
Hsp70	*heat shock protein 70*
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thiogalactopyranosid
ITR	*inverted terminal repeats*
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
LTR	*long terminal repeats*
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute
mA	Milliampere
mFd	Millifarad
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M	Molar
MEM	*Eagle´s Minimal Essential Medium*
mRF	monomere replikative Form
MOI	*multiplicity of infection*
MVM	*minute virus of mice*
NBT	Nitrotetrazolium Blue Cloride
nM	Nanomolar
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisationssignal (*nuclear localisation signal*)
NP40	Nonidet®-P40
NS1/2	Nichtstrukturprotein ½
nt	Nukleotid(e)
Ω	Ohm
ORF	offener Leserahmen
OD_x	Optische Dichte bei der Wellenlänge „x“
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	*proliferating cell nuclear antigen*
PCR	*Polymerase chain reaktion*
pfu	*plaque-forming units*
PIF	*parvovirus initiation factor*
PKC	Protein Kinase C
RFC	Replikationsfaktor C
RNA	Ribonukleinsäure
Pol α/δ	Polymerase α/δ
RPA	Replikationsprotein A
rpm	*rotations per minute*

RT	Raumtemperatur
RV	*rat virus*
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGT	*small glutamine-rich tetratricopeptid- containing protein*
hSGT	human SGT
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
S. pombe	*Schizosaccharomyces pombe*
sec	Sekunde(n)
ss	single stranded
SSC	*sodium chlorid/sodium citrat*
SV40	*simian virus 40*
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin
TPR	*tetratricopeptid-Repeat*
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolett
U	Units (=Enzymeinheiten)
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VP1/2/3	virales Strukturprotein 1/2/3
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Parvoviren 1

1.1.1 Taxonomie der Parvoviren 1
1.1.2 Morphologie des Viruspartikels 3
1.1.3 Der parvovirale Infektionszyklus 4
1.1.4 Organisation des parvoviralen Genoms 6
1.1.5 Die parvovirale Replikation 8
1.1.6 Die parvoviralen Nicht-Strukturproteine 11
1.1.6.1 Das NS1-Protein 11
1.1.6.1.1 NS1 als Transaktivator viraler und zellulärer Promotoren 12
1.1.6.1.2 Einfluß von NS1 auf den Zellzyklus 13
1.1.6.1.3 NS1 vermittelte Zytotoxizität 13
1.1.6.1.4 Zelluläre NS1-Interaktionspartner 14
1.1.6.2 Das NS2-Protein

1.2 Das SGT-Protein: Struktur und Funktion 17

1.2.1 Entdeckung und Struktur von SGT 17
1.2.2 SGT akkumuliert nach parvoviraler Infektion in APAR-Bodies 20
1.2.3 NS1-Interaktion und NS1 induzierte Modifikation von SGT 21
1.2.4 Funktionen von SGT 21

2 Zielsetzung 24

3 Material und Methoden 25

3.1 Material 25

3.1.1Chemikalien und Materialien 25
3.1.2 Zellinien, Virus- und Bakterienstämme 26
3.1.2.1 Zellinien 26
3.1.2.2 Virusstämme 26
3.1.2.3 Bakterienstämme 27
3.1.3 Medien und Zusätze 27
3.1.3.1 Zellkultur-Medien und Zusätze 27
3.1.3.2 *E. coli*-Medien und Zusätze 27
3.1.4 Plasmide 28
3.1.5 Oligonukleotide 30
3.1.5.1 DNA-Oligonukleotide 30
3.1.5.2 RNA-Oligonukleotide 31
3.1.6 Antikörper 31
3.1.6.1 Primäre Antikörper 31
3.1.6.2 Sekundäre Antikörper 32
3.1.7 Enzyme 32
3.1.8 Molekularbiologische Reagenziensätze 32
3.1.9 Größenstandards 33
3.1.9.1 DNA-Größenstandards 33
3.1.9.2 Protein-Molekulargewichtstandards 33
3.1.10 Radioaktives Material 33

3.2 Methoden 34
3.2.1 Zellbiologische Methoden 34
3.2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen 34
3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen 34
3.2.1.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer 34
3.2.1.4 Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen 35
3.2.1.5 Transfektion von Säugerzellen mit RNAi-Oligonukleotiden 35
3.2.1.6 Radioaktive Markierung von Proteinen mit [32P]-Orthophosphat 36
3.2.1.7 In vivo BrdU-Markierung von DNA 36
3.2.2 Virologische Methoden 37
3.2.2.1 Virusinfektion von Säugerzellen 37
3.2.2.2 Virusvermehrung und -titration (Plaque Assay) 37
3.2.3 Mikrobiologische Methoden 38
3.2.3.1 Kultivierung von E. coli-Stämmen 38
3.2.3.2 Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur 39
3.2.3.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien 39
3.2.3.4 Transformation von E. Coli mit Plasmid-DNA 39
3.2.3.4.1 Elektroporation 39
3.2.3.4.2 TSS-Transformation 40
3.2.4 Präparation, Analyse und Modifikation von DNA 40
3.2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli 40
3.2.4.2 Isolierung von viraler DNA aus Säugerzellen 40
3.2.4.3 Ethanolfällung von Nukleinsäuren 41
3.2.4.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration 42
3.2.4.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA 42
3.2.4.6 Agarosegelektrophorese 42
3.2.4.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einemTAE-Agarosegel 43
3.2.4.8 Klenow-Reaktion 43
3.2.4.9 Ligation 43
3.2.4.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 44
3.2.4.11 Transfer von DNA (Southern Blot) und Hybridisierung 44
3.2.4.12 Radioaktive Markierung von DNA mit Zufallsoligomeren 46
3.2.5 Proteinpräparation und -analyse 46
3.2.5.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen 46
3.2.5.1.1 Proteinextrakte aus mit 32P-Orthophosphat markierten Zellen 46
3.2.5.1.2 Gesamtzellextrakte für Immunpräzipitationen 47
3.2.5.1.3 Gesamtzellextrakte für 1D-SDS-PAGE 47
3.2.5.1.4 Gesamtzellextrakte für 2D-SDS-PAGE 48
3.2.5.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentrationen 48
3.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 48
3.2.5.3.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D-PAGE) 48
3.2.5.3.2 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) 49
3.2.5.4 Transfer von Proteinen (Western Blot) 50
3.2.5.5 Alkalische Phosphatase-Behandlung von Proteinen 51
3.2.5.6 Expression und Aufreinigung von GST und GST-Fusionsproteinen 52
3.2.5.7 Färbung von Proteinen 53
3.2.5.7.1 Coomassie-Färbung 53
3.2.5.7.2 Silber-Färbung 53
3.2.5.8 Autoradiographie von Polyacrylamid-Gelen 53
3.2.5.9 In vitro Transkription/Translation 54
3.2.5.10 In vitro Protein-Bindungsassay (Pulldown-Assay) 54
3.2.5.11 Immunpräzipitation 55
3.2.5.12 Immunfluoreszenz 55

4 Ergebnisse 57

4.1 Domänenstruktur von SGT 58

4.1.1 Die TPR-Domäne und der C-Terminus von SGT werden für die Lokalisation in APAR-Bodies benötigt 60
4.1.2 Die Lokalisation von SGT in APAR-Bodies findet unabhängig von der Interaktion mit NS1 statt 65
4.1.3 NS1 induziert eine subzelluläre Umverteilung von SGT und TPR-C 67

4.2 Posttranslationelle Modifikation von SGT 69

4.2.1 SGT ist ein Phosphoprotein 70
4.2.2 NS1 induziert eine Veränderung der SGT-Phosphorylierung 72
4.2.3 Charakterisierung der Modifikation von SGT mittels 2D-Gelelektrophorese 73
4.2.3.1 SGT setzt sich aus mehr als drei Polypeptidformen zusammen 74
4.2.3.2 Eine H1-Infektion induziert die Entstehung neuer SGT-Polypeptidformen 76
4.2.3.3 NS1 induziert Serin-/Threoninphosphorylierungen von SGT 77
4.2.4 SGT wird im N-terminalen Bereich durch NS1 modifiziert 79

4.3 Zelluläre Interaktionspartner von SGT 82

4.4 Hsc70 lokalisiert nicht mit NS1 in APAR-Bodies 85

4.5 Einfluss von SGT auf die parvovirale Replikation und Akkumulation viraler Proteine 86

4.5.1 Einfluss einer Überexpression von SGT auf die parvovirale Replikation und Akkumulation viraler Proteine 86
4.5.2 SGT-„Knock down": Einfluss auf den parvoviralen Infektionszyklus 90
4.5.2.1. Untersuchung des SGT „knock down" in H1 Wirtszellen 92
4.5.2.2 SGT-„knock down" hat keinen Einfluss auf die S-Phase des Zellzyklus 93
4.5.2.3 SGT-„knock down" hat keinen Einfluss auf den Anteil von infizierten Zellen in einer Zellpopulation 95
4.5.2.4 SGT-„knock down" hat keinen Einfluss auf die Akkumulation viraler Proteine oder des zellulären Hsc70-Proteins 97
4.5.2.5 SGT-„knock down" hat keinen Einfluss auf die Bildung/Stabilität der APAR-Bodies 98
4.5.2.6 Analyse der viralen Replikationsprodukte auf Einzelzellebene 98
4.5.2.7 SGT-„knock down" führt zu einer Reduktion der Menge an mRF, dRF und der einzelsträngigen Virion-DNA 103

5 Diskussion 105

5.1. Beteiligung von SGT an Prozessen im viralen Infektionszyklus 105

5.1.1 Virale DNA-Replikation 105
5.1.2 ssDNA-Synthese/-Verpackung oder Kapsidassemblierung 106

5.2 SGT als Co-Chaperon im parvoviralen Infektionszyklus 107

5.2.1 SGT als Co-Chaperon in der parvoviralen Replikation 108
5.2.2 SGT als Co-Chaperon bei der Kapsidassemblierung 109
5.2.3 SGT als Co-Chaperon bei der Verpackung der viralen DNA 109

5.3. SGT-Komplexe 111
5.3.1. Der SGT/NS1 Komplex 111
5.3.2. SGT-Komplexe mit anderen zellulären Faktoren 113
5.4 Zelluläre Lokalisation und Modifikation von SGT 113
5.5 Ausblick 115
6 Zusammenfassung 117
7 Literatur 119

1 Einleitung

1.1 Parvoviren

Die Etymologie des Namens Parvovirus ist auf das lateinische Wort *parvus* (= klein) zurückzuführen. Wie der Name auch verrät, gehören sie zu den kleinsten bis heute bekannten Viren. Parvoviren besitzen ein lineares einzelsträngiges DNA-Genom von geringer Komplexität. Für ihre Vermehrung sind sie deshalb stark auf Faktoren der Wirtszelle angewiesen.

In den frühen 60er Jahren wurde vermutet, dass Parvoviren onkogen seien, da die ersten Isolate aus Tumoren, Tumorzellinien oder karzinogen-behandelten Versuchstieren stammten (Kilham *et al*., 1959; Toolan *et al*., 1962; Lum *et al*., 1963) und eine Parvovirus-Isolation aus nicht-malignen Geweben nicht möglich war (Kilham *et al*., 1959; Toolan *et al*., 1962).

Toolan (1967) hat diese Hypothese widerlegt. Sie konnte zeigen, dass Hamster nach Parvovirusinfektion kein erhöhtes Krebsrisiko, sondern im Gegenteil eine geringere Tumorrate im Vergleich zu Kontrolltieren zeigten. In den 80er Jahren konnte außerdem gezeigt werden, dass Parvoviren das Wachstum sowie die Etablierung experimentell induzierter Tumoren hemmen können (Guetta *et al*., 1986; Dupressoir *et al*., 1989). Diese Eigenschaft der Parvoviren wird als Onkosuppression bezeichnet. Der Mechanismus dieses Phänomens ist noch ungeklärt. Man vermutet, dass der onkolytische Effekt der Parvoviren auf Zellen, die mit verschiedenen viralen oder zellulären Onkogenen oder chemischen Karzinogenen transformiert worden sind, zur Onkosuppression im Gesamtorganismus beitragen könnte (Mousset *et al*., 1986; Cornelis *et al*., 1988a; Cornelis *et al*., 1988b; Van Hille *et al*., 1989; Salomé *et al*., 1990). Wegen dieser onkosuppressiven und lytischen Eigenschaften werden die Parvoviren als Therapeutika zur Krebsbehandlung und als potenzielle Vektoren für die Gentherapie entwickelt.

1.1.1 Taxonomie der Parvoviren

Die Familie der *Parvoviridae* ist in zwei Unterfamilien gegliedert: Die *Parvovirinae*, welche die Parvoviren der Vertebraten umfassen, und die *Densovirinae*, die Insekten infizieren (Siegl *et al*., 1985).

Zu den *Parvovirinae* zählen drei Gattungen: *Dependovirus*, *Erythrovirus* und *Parvovirus* (Tab. 1-1) .

Zur ersten Gattung, *Dependovirus*, gehören die adeno-assoziierten Viren (AAV). Sie benötigen für ihre Replikation sowie ihren produktiven Infektionszyklus eine Koinfektion der Wirtszelle mit einem Helfervirus. Als Helfer können Adeno- (Atchison *et al*., 1965; Hoggan *et al*., 1966), Herpes- (Buller *et al*., 1981) und Papillomaviren (Walz *et al*., 1997) wirken. In Abwesenheit von Helferviren etablieren die *Dependoviren* eine latente Infektion durch Integration der viralen DNA in das Wirtszellgenom (Berns *et al*., 1975).

Die Mitglieder der Gattungen *Erythrovirus* und *Parvovirus* werden auch als autonome Parvoviren bezeichnet, da sie die Fähigkeit besitzen, in permissiven Zellen autonom, d.h. ohne die Hilfsfunktion eines Helfervirus, zu replizieren (Berns *et al*., 1996).

Zu den *Erythroviren* gehören unter anderem die humanen Parvoviren B19 (Cossart *et al*., 1975) und V9 (Nguyen *et al*., 1999) sowie das Affen-Parvovirus SPV (*simian parvovirus*; Brown *et al*., 1995). Sie zeigen einen ausgeprägten Tropismus für erythroide Vorläuferzellen - daher auch ihr Name. Das humanpathogene Parvovirus B19 kann bei einer akuten Infektion Ringelröteln (Erythema infectiosum) hervorrufen (Anderson *et al*., 1984).

Die dritte Gattung der *Parvoviren* wird anhand der Kapsidstrukturmerkmale in verschiedene Gruppen unterteilt (Cotmore *et al*., 1987). Die größte Gruppe umfasst die RV-artigen Viren (RV: *rat virus*), die die Kapsidstrukturmerkmale des Prototyps der Gattung *Parvovirus*, des „Kilham rat virus“ (KRV) aufweist. Mitglied dieser Gruppe ist unter anderem das in dieser Arbeit verwendete Parvovirus H1. H1 wurde erstmals aus Hamstern isoliert (Toolan, 1960). Es konnte aber auch aus schnell proliferierendem humanem Gewebe, wie z.B. Tumoren, Plazenta und Embryonen, isoliert werden (Toolan *et al*., 1968). Der natürliche Wirt des Virus scheint aber die Ratte zu sein (Kilham *et al*., 1969). Da H1 dem MVM (*minute virus of mice*) sehr ähnelt, beziehen sich die meisten der folgenden Beschreibungen hauptsächlich auf letzteres Virus, da es wesentlich besser untersucht worden ist.

Unterfamilie	**Gattung**	**Vertreter**
Parvovirinae	Parvovirus	MVM: Minute virus of mice
		H1 PV: H1 parvovirus
		KRV: Kilham rat virus
		FPV: Feline parvovirus
		CPV: Canine parvovirus
		PPV: Porcine parvovirus
		LUIIIV: LuIII Virus
		GPV: Goose parvovirus
		AMDV: Aleutian mink disease virus
		BPV: Bovine Parvovirus
	Erythrovirus	B19V: Parvovirus B19
		V9: humanes Erythrovirus V9
		SPV: Simian parvovirus
	Dependovirus	AAV-2,-3,-5: Adeno-associated virus
Densovirinae	Densovirus	JcDNV: Junonia coenia densovirus
	Iteravirus	BmDHV: Bombyx mori densovirus
	Brevidensovirus	AeDNV: Aedes aegypti densovirus

Tab. 1-1: Taxonomie der Parvoviren (Tidona & Darai; The Springer index of viruses; 2001)

1.1.2 Morphologie des Viruspartikels

Das vollständige infektiöse Viruspartikel, auch Virion genannt, besteht zu 19-32% aus DNA, die im Kapsid bis zu 34% geordnet vorliegt (Agbanje *et al.*, 1998), während der Rest aus Kapsidproteinen besteht. Die Kapside weisen eine ikosaedrische Struktur aus 60 identischen Untereinheiten mit einem Durchmesser von 18 bis 26 nm auf (Abb. 1-1; Agbandje *et al.*, 1995). An der Außenseite des hüllenlosen infektiösen Partikels (Siegl, 1985) ist ein Molekül des sogenannten Nicht-Strukturproteins NS1 nachweisbar, das kovalent an das virale Genom gebunden ist (Cotmore & Tattersall, 1989) und während der Infektion endonukleolytisch abgespalten wird (Cotmore & Tattersall, 1995).

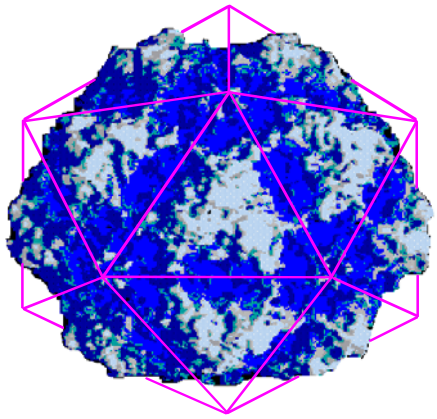


Abb. 1-1: Viruspartikel eines autonomen Parvovirus (verändert nach Sgro und Spencer, Enzyklopädie der Virologie)

Das fertige Kapsid der RV-artigen Parvoviren besteht aus drei Proteinen: VP1 (83-86 kDa), VP2 (64-66 kDa) und VP3 (60-62 kDa). VP1 und VP2 sind die primären Translationsprodukte (Cotmore *et al*., 1983; Rhode & Paradiso, 1983), während VP3 aus einer proteolytischen Spaltung von VP2 hervorgeht (Tattersall *et al*., 1977). VP2 ist der Hauptbestandteil der Kapside, da es in einem Verhältnis von 5:1 zu VP1 vorliegt (Cotmore & Tattersall, 1987). Das VP3 liegt in sehr geringen Mengen vor und kann nur bei infektiösen Partikeln beobachtet werden. Leere, nicht infektiöse Partikel enthalten VP1 und VP2 (Paradiso, 1981; Santarèn *et al*., 1993) oder ausschließlich VP2 (Agbandje *et al*., 1995).

1.1.3 Der parvovirale Infektionszyklus

Der erste Schritt der Infektion ist die Adsorption des Virions an spezifischen Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle (Abb.1-2). Der Tropismus der Parvoviren für bestimmte Zellarten (Spezies- und Gewebespezifität) wird durch eine kleine Region im Kapsid determiniert. Es ist bekannt, dass B19 erythroide Vorläuferzellen im Knochenmark infiziert und das Blutgruppenantigen P, ein Glycosphingolipid, als Rezeptor nutzt (Brown *et al*., 1993). Die Rezeptoren der Parvoviren MVM und H1 sind bislang nicht identifiziert. Man vermutet aber, dass es sich um ein Protein mit N-Acetyl-Neuraminsäureresten handelt, da eine Behandlung potentieller Wirtszellen mit Trypsin und Neuramidase die Infektiosität stark mindert (Cotmore & Tattersall, 1987). Proteine mit N-Acetyl-Neuraminsäureresten kommen in großer Anzahl auf vielen Zelltypen unterschiedlicher Gewebe in verschiedenen Organismen vor (Linser *et al*., 1977; Spalholz und Tattersall, 1983), so ist H1 z.B. in der Lage, sowohl humane, als auch Hamster- und Rattenzellen zu infizieren. Bei den Mitgliedern der Gattung *Parvovirus* wurden bisher der ABP-Rezeptor (*ADV binding Protein*) des *Aleutian mink disease virus* (ADV) (Fox *et al.*, 1999) und der Transferrinrezeptor, der vom *Canine Parvovirus* (CPV) verwendet wird, identifiziert (Parker *et al*., 2001).

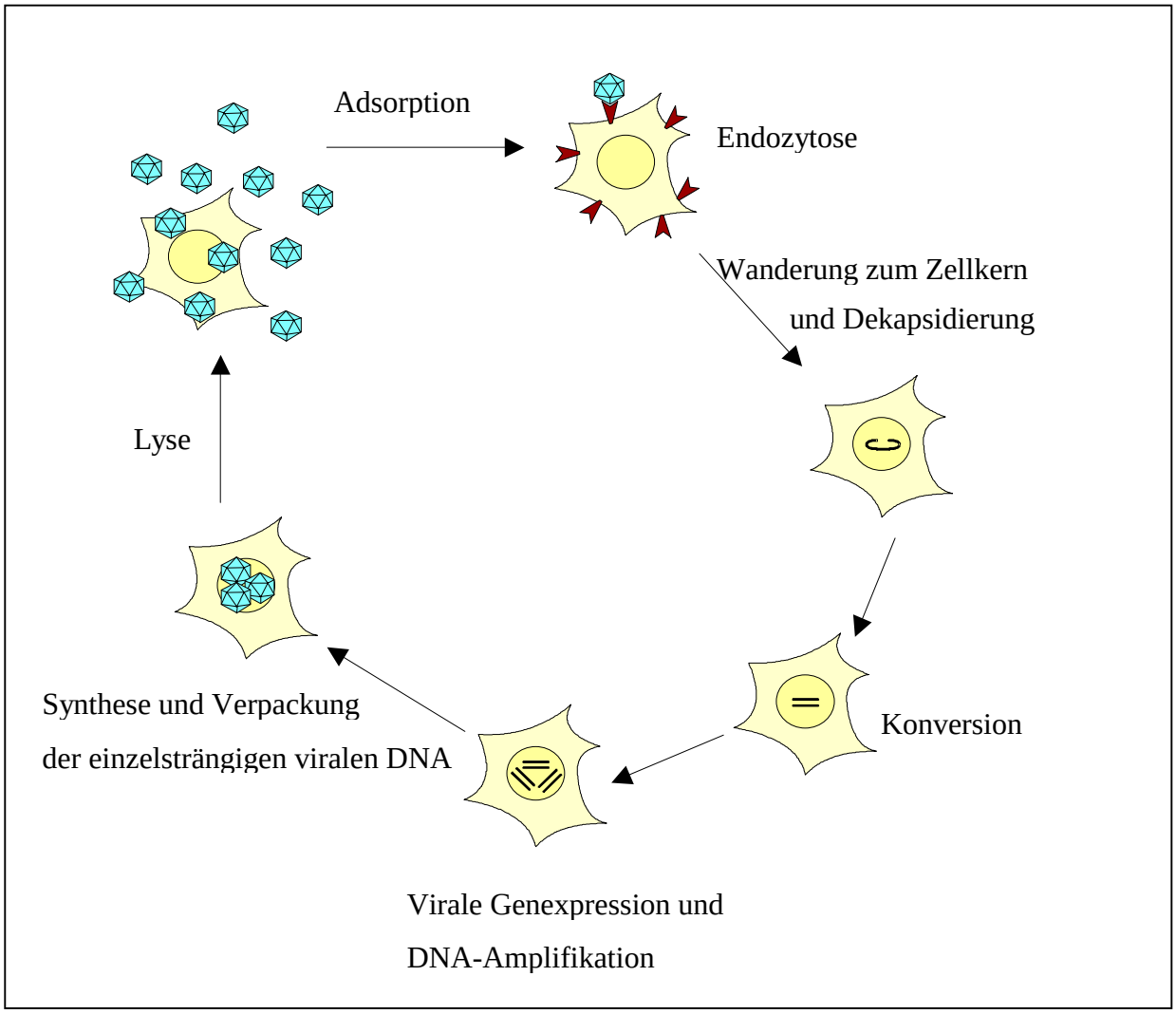


Abb. 1-2: Viraler Infektionszyklus autonomer Parvoviren

Nach der Adsorption erfolgt unabhängig von der Phase des Zellzyklus (Rhode, 1973; Siegel & Gautschi, 1973) die Aufnahme der Virionen in die Zelle über Clathrin-abhängige Endozytose (Linser *et al*., 1977; Parker & Parrish, 1997; Parker & Parrish, 2000). Zunächst über frühe und anschließend über späte Endosomen gelangt das Virus in den perinuklearen Bereich, wo die Dekapsidierung erfolgt. Dabei bleiben die Kapsidproteine größtenteils im Zytoplasma zurück, während die virale DNA in den Kern gelangt. Kürzlich wurde gezeigt, dass für die Wanderung der Virionen von späten Endosom/Lysosom in den perinuklaeran Raum die katalytische Phospholipase A_2-Domäne des VP1-Proteins benötigt wird (Parker & Parrish, 2000; Zádori *et al*., 2001). Im Zellkern wird die virale einzelsträngige DNA in eine monomere doppelsträngige replikative Form überführt. Dieser Schritt wird als Konversion bezeichnet. Anschließend

erfolgt die Genexpression und die Amplifikation sowie die Synthese einzelsträngiger Nachkommen-DNA, die in Kapside verpackt werden. Die Virionen werden dann durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt (Abb. 1-2; Cotmore & Tattersall, 1987).

Genexpression und Replikation des parvoviralen Genoms sind stark von zellulären Faktoren abhängig und beginnen erst mit Eintritt der Wirtszelle in die S-Phase des Zellzyklus (Ward & Dadachanji, 1978; Wolter *et al*., 1980; Cotmore & Tattersall, 1987; Bashir *et al*., 2000). Parvoviren sind nicht in der Lage die S-Phase zu induzieren. Die Akkumulation der viralen Nicht-Strukturproteine führt jedoch zum Abschalten der zellulären Replikation (Cotmore & Tattersall, 1987), wodurch die Wirtszelle in der späten S-Phase arretiert wird (Op De Beeck *et al*., 1995; Op De Beeck & Caillet-Fauquet, 1997; Corbau *et al*., 1999). Ist die Wirtszelle nicht mitotisch aktiv, kann das Virus-Genom für längere Zeit latent in der Zelle vorliegen, ohne jedoch in das Wirtszellgenom zu integrieren (Richards & Armentrout, 1979).

1.1.4 Organisation des parvoviralen Genoms

Die Parvoviren besitzen ein lineares, einzelsträngiges DNA-Genom mit einer Länge von ca. 5000 Nukleotiden (Abb.1-3A). In den Virionen werden fast ausschließlich Genome verpackt, die komplementär zu der während der Infektion synthetisierten mRNA sind (Minus-Stränge) (Bates *et al*., 1984). An den Genomtermini befinden sich palindromische Sequenzabschnitte, die als ITR-Regionen (*inverted terminal repeats*) bezeichnet werden (Astell *et al*., 1983; Rhode & Paradiso, 1983) und sekundäre Y- (3´ Ende) bzw. T-förmige (5´Ende) Haarnadelstrukturen bilden. Die 3´-ITR-Region umfaßt bei allen Vertretern der Gattung Parvovirus ca. 115 Nukleotide (Astell *et al*., 1979). Im Gegensatz dazu ist das 5´-Palindrom je nach Virusstamm unterschiedlich lang. Im Falle von MVM besteht es aus 207 Nukleotiden, im Falle von H1 aus 245 Nukleotiden (Astell *et al*., 1983; Rhode & Paradiso, 1983).

Die ITR-Regionen beinhalten cis-aktive Sequenzen, die für die Replikation und Verpackung der viralen DNA notwendig sind (Faust & Wand, 1979; Cotmore & Tattersall, 1994). Im doppelsträngigen Stamm des 3´-Palindroms entsteht durch eine Fehlpaarung zwischen den Nukleotiden 25-26 und 88-91 eine Blase, die für die Initiation der Replikation essentiell ist (Faust & Wand, 1979; Astell *et al*., 1985; Cotmore & Tattersall, 1987; Cotmore & Tattersall, 1994).

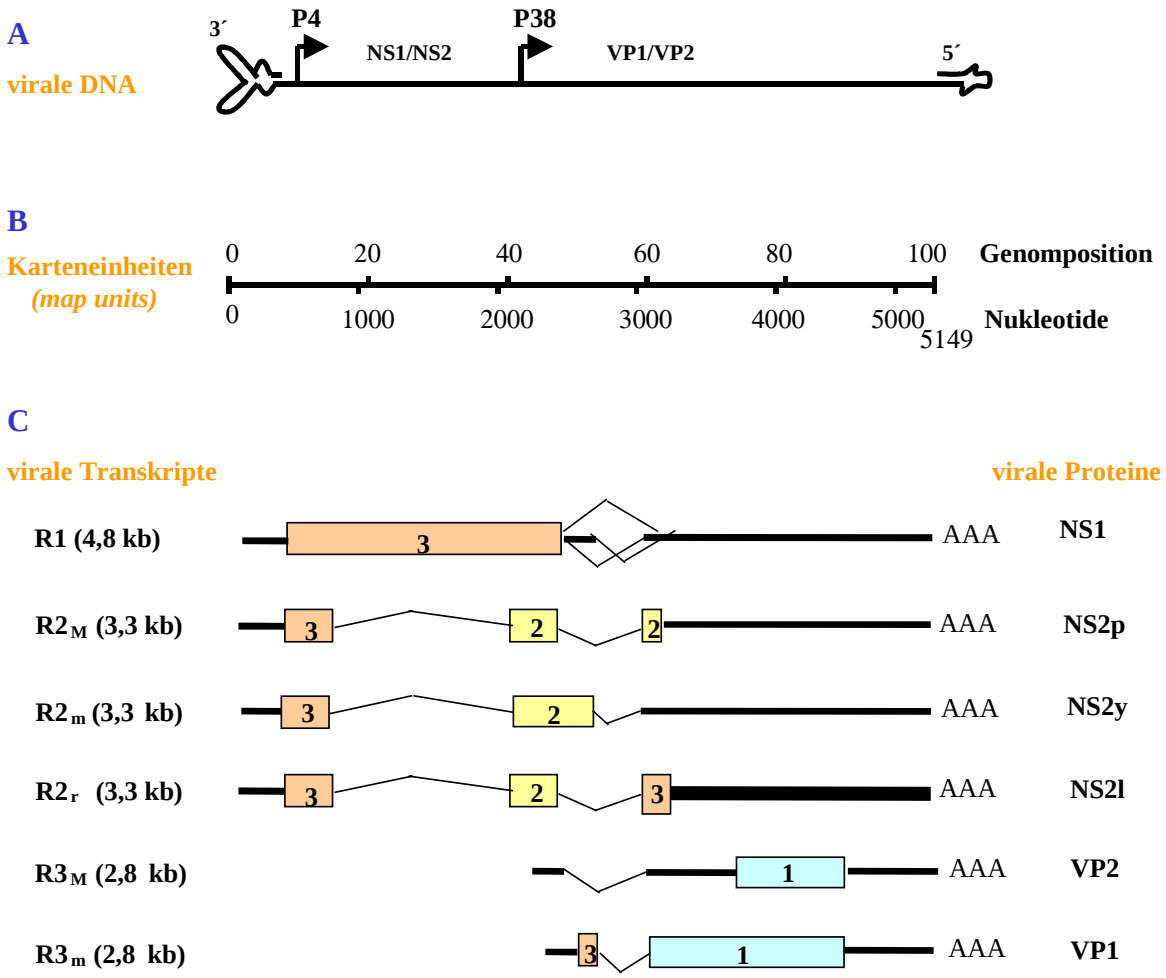


Abb. 1-3: Genomische Organisation und Kodierungsstrategie von MVM

A: Schematische Darstellung des einzelsträngigen parvoviralen Genoms negativer Polarität mit den beiden terminalen Haarnadelstrukturen und den beiden Promotoren P4 und P38 sowie den von ihnen kodierten Proteinen.

B: Einteilung des viralen Genoms in Karteneinheiten (*map units*) unter gleichzeitiger Angabe der Nukleotidpositionen.

C: Das virale Genom kodiert für drei virale Transkriptklassen R1, R2 und R3, die durch die verschiedenen Spleißvarianten der kleinen Introns jeweils in drei Formen vorkommen können (M: häufigste Transkriptform; m: seltenere Transkriptform; r: rare Transkriptionsform). Die viralen mRNAs kodieren für das Nicht-Strukturprotein NS1 und für die drei Isoformen des NS2-Proteins (NS2p,NS2y und NS2l) sowie für die viralen Kapsidproteine VP1 und VP2 in verschiedenen Leserastern (mit 1, 2 und 3 bezeichnet). AAA steht für den PolyA-Schwanz.

Das virale Genom enthält zwei lange überlappende Transkriptionseinheiten mit jeweils eigenem Promotor (Cotmore & Tattersall, 1986; Cotmore & Tattersall, 1987). Der „frühe“ Promotor P4 (Genomposition 4) steuert die Synthese eines Transkripts, aus dem durch alternatives

Spleißen die R1- (4,8 kb) und R2-Varianten (3,3 kb) entstehen (Abb. 1-3C). R1 kodiert für das große Nicht-Strukturprotein NS1 (83kDa) während R2 für das kleine Nicht-Strukturprotein NS2 (25kDa) kodiert. Die ersten 84 Aminosäuren von NS1 und NS2 sind identisch; die beiden Proteine unterscheiden sich jedoch in ihrem C-Terminus aufgrund eines Spleiß-Vorgangs (Cotmore & Tattersall, 1986). Unter der Kontrolle des „späten" Promotors P38 wird das R3-Transkript abgelesen. Durch alternatives Spleißen entstehen hieraus die mRNAs für die Kapsidproteine VP1 und VP2 (Jongeneel *et al*., 1986; Labieniec-Pintel & Pintel, 1986; Abb. 1.3A-D).

1.1.5 Die parvovirale Replikation

Die parvovirale Replikation erfolgt nach einem unidirektionalen rollenden Haarnadelmechanismus (*rolling hairpain mechanismus*) im Nukleus infizierter Zellen und erfordert den Eintritt der Wirtszelle in die S-Phase, was auf eine starke Abhängigkeit der viralen Replikation von zellulären Faktoren hindeutet (Ward & Dadachanji, 1978; Wolter *et al*., 1980; Cotmore & Tattersall, 1987). Solche Faktoren sind z.B. die DNA-Polymerase δ (Christensen *et al*., 1997a; Cossons *et al*., 1996), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), RPA (*replication protein A*) und PIF (*parvovirus initiation factor*) (Christensen *et al*., 1997a; Christensen *et al*., 1997b; Christensen & Tattersall, 2002; in press). Die DNA-Replikation am Beispiel des MVM-Parvovirus ist in Abb. 1-4 schematisch dargestellt.

Der erste Schritt der Replikation ist die Konversion, d.h. die Umwandlung der einzelsträngigen DNA in eine monomere doppelsträngige replikative Form (mRF) (Abb. 1-4[1]). Dabei dient eine einfache Rückfaltung des 3´-Terminus mit seiner freien 3´OH-Gruppe als Primer für die DNA-Polymerase. Dieser Schritt ist ausschließlich von zellulären Faktoren abhängig. Unter anderem wird die komplementäre DNA-Strang-Synthese durch Cyclin A aktiviert (Kollek *et al*., 1982; Bashir *et al*., 2000). Das dabei entstandene doppelsträngige DNA-Molekül mit kovalent gebundenen Termini - auch als cRF (*covalently closed RF*) bezeichnet- dient als

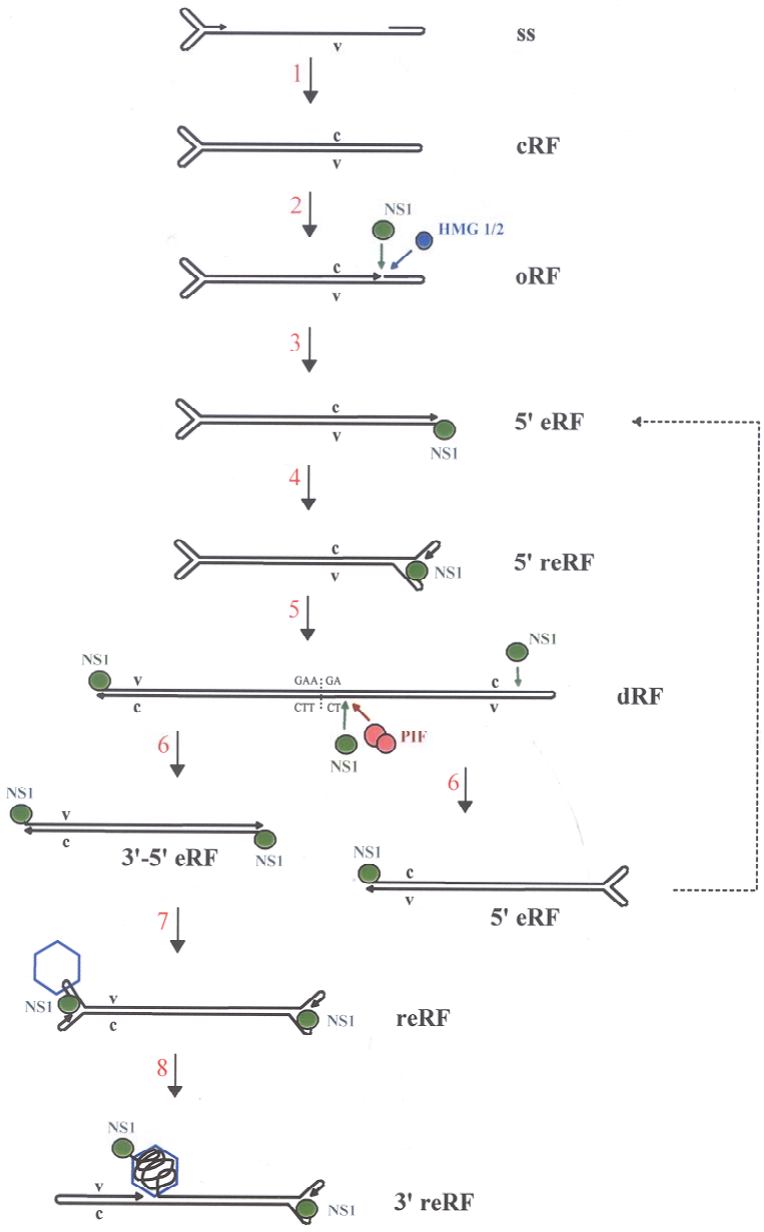


Abb. 1-4: Virale DNA-Replikation am Beispiel des MVM-Parvovirus

ss: einzelsträngige Virion-DNA; cRF: kovalent geschlossene replikative Form; oRF: offene replikative Form; eRF: terminal verlängerte replikative Form; reRF: replikative Form mit terminaler Kaninchenohr-Struktur; dRF: dimere replikative Form; v: virion-Strang; c: komplementärer Strang; NS1: Nicht-Strukturprotein 1; HMG: *high mobility group 1/2 protein*; PIF: *parvovirus initiation factor*. Die roten Ziffern bezeichnen die einzelnen Replikationsschritte, wie im Text beschrieben.

Matrize für die virale mRNA-Synthese. So wird das Nicht-Strukturprotein NS1 exprimiert, welches dann endonukleolytisch die DNA 21 Nukleotide vor dem ursprünglichen 5´-Ende spaltet (Cotmore & Tattersall, 1989) (Abb. 1-4[2]). Für diesen Schritt sind die HMG 1/2-Proteine (*high mobility group 1/2 protein*) notwendig (Cotmore & Tattersall 1998; Cotmore *et al*., 2000). Nach dem Aufschmelzen der Haarnadelstruktur wird die 5´-terminale Sequenz kopiert. So entsteht ein DNA-Molekül, das ein um wenige Nukleotide längeres 5´-Ende gegenüber dem 5´-Ende der viralen DNA besitzt (5´eRF: *5´-terminally extended RF*). NS1 bleibt nach dem Einzelstrangbruch kovalent am 5´-Ende gebunden (Abb. 1-4[3]).

Im nächsten Schritt schmelzen die beiden DNA-Stränge innerhalb des neu entstandenen rechts-terminalen Palindroms auf, wobei mittels Rückfaltung eine Intermediatstruktur entsteht, das als Kaninchenohr bezeichnet wird (5´reRF: *rabbit-eared RF*; Abb. 1-4[4]). Durch die Verlängerung des neu entstandenen Primers entsteht eine dimere RF (dRF) mit interner 3´-3´-Verknüpfung zweier monomerer RF-Untereinheiten (Abb. 1-4[5]). Es können auch tetramere oder höher konkatemere RF-Spezies auftreten, was vermuten lässt, dass die Replikation durch erneutes Aufschmelzen der kopierten terminalen Palindromsequenz und Verlängerung der entstandenen Primer fortgesetzt wird (Cotmore & Tattersall, 1987).

Im weiteren Verlauf werden die 3´-3´-Konkatemere in einer NS1-abhängigen Reaktion geschnitten, aus der zwei RF-Moleküle hervorgehen. Dabei bleibt das NS1 kovalent an den neu entstandenen 5´-Enden der eRF gebunden (Abb. 1-4[6]). Diese Reaktion - auch Konkatemerresolution genannt - ist strang- und sequenzspezifisch und findet nur auf der CT-Seite des zentralen durch lokale Asymmetrie entstandenen Palindroms statt (Cotmore & Tattersall, 1994). Für diesen Schritt ist die Bindung des zellulären PIF-Proteins (parvovirus initiation factor) in der Nähe der NS1-Schnittstelle erforderlich (Christensen *et al*., 1997b).

Der letzte Schritt der Replikation beinhaltet die Synthese viraler Einzelstrang-DNA und ihrer Verpackung. Dabei ist die Anwesenheit vorgefertigter, leerer Kapside essentiell (Müller & Siegel, 1983) (Abb. 1-4[7, 8]). Willwand & Hirt (1991) postulierten, dass für die Verpackung eine spezifische Interaktion zwischen Kapsid und 3´-Palindrom wichtig ist. Das an die neu synthetisierte Einzelstrang-DNA gebundene NS1-Molekül verbleibt nach dem Zusammenbau des Kapsids an der Außenseite der infektiösen Viruspartikel (Cotmore & Tattersall, 1989).

1.1.6 Die parvoviralen Nicht-Strukturproteine

Das Genom der autonomen Parvoviren kodiert für zwei regulatorische Nicht-Strukturproteine, NS1 und NS2, die essentiell für den viralen Lebenszyklus sind (Cotmore & Tattersall, 1987). NS1 und NS2 sind Phosphoproteine und entstehen durch alternatives Spleißen aus der selben prä-mRNA. Die beiden Proteine unterscheiden sich nur in Ihrem C-Terminus, während die ersten 84 Aminosäuren identisch sind (Cotmore & Tattersall, 1986).

1.1.6.1 Das NS1-Protein

NS1 ist mit einem Molekulargewicht von 83kDa das große Nicht-Strukturprotein der Parvoviren, das absolut essentiell für die virale Replikation ist (Tullis *et al*., 1988; Naeger *et al*., 1990; Kap. 1.1.5). Sowohl bei H1 als auch bei MVM besteht NS1 aus 672 Aminosäuren (Abb. 1-5) und die beiden Proteine weisen mit 91.4% eine sehr hohe Sequenzhomologie auf (Shade *et al*., 1986). NS1 ist ein eher stabiles Protein mit einer Halbwertszeit von ca. 6.5h, das ein Kernlokalisationssignal (NLS) aufweist und deswegen überwiegend im Nukleus infizierter Zellen lokalisiert ist. (Cotmore & Tattersall, 1987; Nüesch *et al*., 1992; Nüesch & Tattersall, 1993). Es handelt sich um ein multifunktionelles Protein, dessen Funktionen/Aktivitäten über Phosphorylierung reguliert werden. Als aktivierende Kinasen wurden Mitglieder der PKC-Familie identifiziert (Nüesch *et al*., 1998a; 1998b; Dettwiler *et al*., 1999; Corbau *et al*., 1999; Corbau *et al*., 2000). Neben einer DNA-Helikase- und ATPase-Aktivität (Wilson *et al*., 1991; Nüesch *et al*., 1995), verfügt NS1 über eine strang- und sequenzspezifische Endonukleaseaktivität (Nüesch *et al*., 1995; Christensen *et al*., 1997a; Cotmore & Tattersall, 1998) sowie eine spezifische DNA-Bindungsaffinität (Christensen *et al*., 1995; Cotmore *et al*., 1995; Mouw & Pintel, 1998). Als spezifische Bindungsstelle wurde das DNA-Element $[ACCA]_{2\text{-}3}$ beschrieben, das an mehreren Stellen im viralen Genom zu finden ist (Cotmore *et al*., 1995; Christensen *et al*., 1995). Für eine effiziente Bindung an diese DNA-Motiv ist allerdings eine Oligomerisierung von NS1 in Anwesenheit von ATP notwendig (Nüesch & Tattersall, 1993; Cotmore *et al*., 1995).

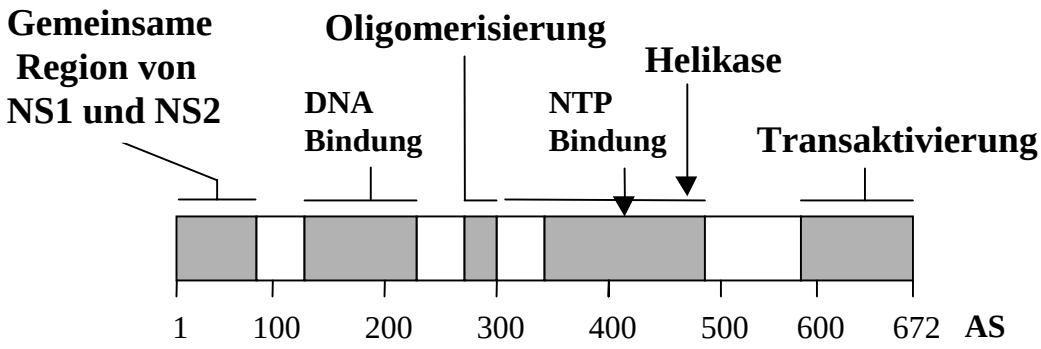


Abb. 1-5: Lineare Darstellung des NS1-Proteins von H1 und MVM

Die ersten 84 N-terminalen AS von NS1 und NS2 sind identisch. Es folgt eine DNA-Bindungsdomäne mit dem Kernlokalisationssignal (NLS). Die NS1-Homo-Oligomerisierung findet im Bereich von AS 264 bis AS 275 statt. Es folgt die Helikasedomäne, die auch die Purin-Bindestelle umfaßt. Am C-Terminus ist die Transaktivierungsdomäne lokalisiert.

1.1.6.1.1 NS1 als Transaktivator viraler und zellulärer Promotoren

Neben seiner essentiellen Funktionen in der viralen Replikation ist NS1 in der Lage, den P38-Promotor zu transaktivieren (Rhode & Richard, 1987; Doerig *et al*., 1990). Dabei spielt der C-Terminus des Proteins eine entscheidende Rolle (Legendre *et al*., 1992; Skiadopoulos *et al*., 1992). Bei der Transaktivierung des Promotors wird neben einer GC- und einer TATA-Box (Ahn *et al*., 1992) ein kleines *cis*-Element stromaufwärts des P38-Promotors benötigt, das als tar-Region (*Trans-Aktivation Response Element*) bezeichnet wird. Außer dem P38-Promotor wird auch der P4-Promotor durch NS1 aktiviert. Es kommt jedoch zusätzlich zu einer inhibitorischen Autoregulation der NS1-Synthese in Abhängigkeit von der NS1-Konzentration in der Wirtszelle (Rhode & Richard, 1987; Ahn *et al*., 1989; Doerig *et al*., 1990; Hanson *et al*., 1991).

NS1 transreguliert nicht nur die parvoviralen Promotoren P4 und P38, sondern auch heterologe virale und zelluläre Promotoren (Legendre & Rommelaere, 1994; Vanacker *et al*., 1996). Dabei ist nicht nur der C-Terminus, sondern auch der N-Terminus beteiligt (Legendre & Rommelaere, 1992). So werden z.B. der SV40-Promotor und die Aktivität der RSV- und der HIV-LTR-Elemente durch NS1 inhibiert (Rhode & Richard 1987; Faisst *et al*., 1993). Auch die Aktivität des zellulären Promotors des *c-erbA1*-Gens kann von NS1 beeinflußt werden. Dieser Promotor wird durch NS1 aktiviert und dadurch kommt es zu einer erhöhten Expressi-

on des Thyroid-Hormon-Rezeptors T3, was die Wirtszellen sensitiver für den zytotoxischen Effekt der Viren macht (Vanacker *et al*., 1993).

1.1.6.1.2 Einfluß von NS1 auf den Zellzyklus

Die Expression von NS1 findet in der S-Phase des Zellzyklus statt, da die Aktivität des P4-Promotors durch den Transkriptionsfaktor E2F reguliert wird (Deleu *et al*., 1998, 1999). Eine hohe NS1-Expression führt zu einer Akkumulation sensitiver Zellen in der S- und G2-Phase des Zellzyklus (Op De Beeck *et al*., 1995; Op De Beeck & Caillet-Fauquet, 1997). Für MVM wurde kürzlich beschrieben, dass bei einer Akkumulation der Zellen in der S-Phase p53 eine Rolle spielt, während bei der Akkumulation in der G2-Phase zusätzlich das p21-Protein benötigt wird (De Beeck *et al*., 2001). Es scheint, dass NS1 die Synthese bzw. die Aktivität zellulärer Faktoren, die in die Regulation des Zellzyklus involviert sind, beeinflußen kann (Op De Beeck *et al*., 1995). Op De Beeck und Caillet-Fauquet (1997) zeigten, dass NS1 auch in der Lage ist, Läsionen in das Chromatin einzuführen, was Ursache für die Unterbrechung des Zellzyklus infizierter Zellen sein könnte.

1.1.6.1.3 NS1 vermittelte Zytotoxizität

Für den zytotoxischen Effekt der Parvoviren auf infizierte Zellen ist NS1 allein ausreichend (Caillet-Fauquet *et al*., 1990; Corbau *et al*., 2000). In einigen Zelltypen, wie den NBE-Zellen scheint jedoch auch NS2 für eine optimale zytotoxische Wirkung notwendig zu sein (Brandenburger *et al*., 1990). Für den zytotoxischen Effekt des NS1-Proteins ist sowohl der N- als auch der C-terminale Bereich notwendig (Legendre & Rommelaere, 1992), wobei der molekulare Mechanismus der der Zytotoxizität zu Grunde liegt, bisher noch nicht bekannt ist. Es wird postuliert, dass die Zytotoxizität eine Folge des Zusammenwirkens verschiedener NS1-Aktivitäten ist, wie die Transregulierung verschiedener zellulärer Promotoren (Legendre & Rommelaere, 1994; Vanacker *et al*., 1996), ihre Auswirkungen auf den Zellzyklus (Op De Beeck *et al*., 1995) und ihren Einfluß auf die chromosomale DNA (Op De Beeck & Caillet-Fauquet, 1997) und Zellmorphologie (Caillet-Fauquet *et al*., 1990). Anouja und Mitarbeiter (1997) verbinden den zytotoxischen Effekt von NS1 mit seinem Einfluss auf die Synthese und Phosphorylierung zellulärer Proteine.

In neoplastisch transformierten Zellen ist interessanterweise der zytotoxische Effekt von NS1 stärker als in vergleichbaren nicht tranformierten Kontrollzellen (Cornelis *et al*., 1988a und b;

Mousset *et al*., 1994). Der Grund kann darin liegen, dass in transformierten Zellen sowohl die virale DNA-Replikation als auch die Expression viraler Nicht-Strukturproteine erhöht sind (Cornelis *et al*., 1988b).

1.1.6.1.4 Zelluläre NS1-Interaktionspartner

Aufgrund der multifunktionellen Natur des NS1-Moleküls kommt es in der Wirtszelle zu vielfältigen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen. So überrascht es nicht, dass mit Hilfe diverser *in vitro* und *in vivo* Ansätze bereits zahlreiche zelluläre Proteine als NS1-Bindungspartner identifiziert werden konnten. Das erste zelluläre Protein, das als Interaktionspartner von NS1 beschrieben worden ist, war der Transkriptionsfaktor SP1. Krady und Ward (1995) konnten NS1 aus Zellextrakten über die Bindung an Promotorelementen die SP1-Bindungsstellen enthielten, isolieren. Die Autoren vermuteten, dass die SP1/NS1-Interaktion notwendig ist, damit NS1 an eine SP1-Bindungsstelle in der P38-Promotorregion binden kann, da bis dahin unbekannt war, dass NS1 selbst sequenzspezifisch an die DNA bindet (Cotmore *et al*., 1995; Christensen *et al*., 1995). Lorson *et al*. (1998) haben durch GST-*Pulldown*-Experimente letztendlich gezeigt, dass nicht nur eine direkte Interaktion zwischen Sp1 und NS1 besteht, sondern auch, dass NS1 mit den Transkriptionsfaktoren TBP und TFIIA interagiert. Die genaue Bedeutung dieser Interaktionen in Bezug auf die Aktivierung des P38-Promotor *in vivo* ist allerdings noch ungeklärt. Es wird vermutet, dass es durch direkte oder indirekte NS1-Interaktionen zu einer erhöhten Konzentration oder einer Konformationsänderung von Transktiptionsfaktoren kommt, die für die Transaktivierung des viralen Promotors notwendig sind (Lorson *et al*., 1998).

Ein weiteres NS1 bindendes Protein, NSAP1 (*NS1-associated protein 1*) wurde mit Hilfe des „*two-hybrid*“-Systems identifiziert (Harris *et al*., 1999). NSAP1 ist ein 65kDa Protein mit vier hintereinander geordneten Ribonukleoprotein-Domänen. Aufgrund seiner Struktur wird vermutet, dass NSAP1 beim viralen RNA-Spleißen oder bei der Bildung der Replikationsintermediate eine Rolle spielen könnte (Harris *et al*., 1999).

Wie bereits beschrieben (Kap. 1.1.5), sind die an der parvoviralen Replikation beteiligten zellulären Faktoren sehr detailliert untersucht worden. Christensen und Mitarbeiter haben gezeigt, dass unter *in vitro*-Bedingungen PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), RPA (*replication protein A*) und PIF (*parvovirus initiation factor*) für die Resolution des 3´-3´-

Konkatemers benötigt werden. PIF ist ein 110kDa Protein mit zwei Untereinheiten (p96/p79), das als Kofaktor einen Beitrag zur Aktivierung der sequenzspezifischen Endonuklease-Aktivität von NS1 am 3´-Terminus leistet und eine Rolle bei der Entwindung der viralen DNA spielt (Christensen *et al*., 1997a; 1997b, 1999). Für den NS1-abhängigen Einzelstrangbruch am 5´-Terminus der cRF DNA werden die HMG 1/2-Proteine (*high mobility group 1/2 protein*) benötigt (Cotmore & Tattersall 1998; Cotmore *et al*., 2000). PIF, RPA und HMG 1/2-Proteine sind in der Lage, mit NS1 *in vitro* zu interagieren, während eine direkte Interaktion zwischen PCNA und NS1 bislang nicht gezeigt werden konnte (Christensen & Tattersall, 2002, in press).

In unserer Abteilung wurde kürzlich gezeigt, dass die replikativen Funktionen von NS1 *in vitro*, insbesondere die Helikase-Aktivität, durch PKC-Phosphorylierung reguliert werden (Nüesch *et al*., 1998a, 1998b; 2001; Dettwiler *et al*., 1999). Allerdings konnte eine direkte Interaktion der Isoenzyme PKC_{λ} oder PKC_{η} mit NS1 noch nicht gezeigt werden. Durch Affinitätschromatographie konnten aber eine weitere Kinase, CKIIA (*Casein-kinase IIA*), sowie Tropomyosin als NS1-Interaktionspartner identifiziert werden. Es gibt Hinweise darauf, dass NS1 einen Einfluß auf die Struktur der Tropomyosinfilamente hat, was zu einer Veränderung der Zellmorphologie führt. Dabei scheint auch CKIIA beteiligt zu sein. Außerdem übernimmt CKIIA wahrscheinlich bei der Kapsidphosphorylierung eine wichtige Rolle (Nüesch *et al*., Virologie-Konferenz, Madison 2001).

Mit Hilfe des „*two-hybrid*"-Systems konnte in unserer Arbeitsgruppe ein neues Protein als Interaktionspartner von NS1 identifiziert werden, das sogenannte SGT (*Small Glutamine-rich Tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein*). Eine direkte Interaktion zwischen NS1 und SGT wurde durch GST-*Pulldown*-Assays bestätigt (Cziepluch *et al*., 1988; Kordes *et al*., 1988). Da SGT der Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, sind Struktur, Eigenschaften und Funktion des Proteins in Abschnitt 1.2 ausführlich beschrieben.

1.1.6.2 Das NS2-Protein

NS2 ist das kleine Nicht-Strukturprotein der Parvoviren mit einem Molekulargewicht von 25kDa. Aufgrund des alternativen Spleißens liegt das Protein in zwei (H1) bzw. drei (MVM) verschiedenen Isoformen vor, die sich lediglich in 6-15 Aminosäuren innerhalb des C-Terminus unterscheiden. Alle Isoformen kommen in einer phosphorylierten und in einer nicht-phosphorylierten Form vor. Die phosphorylierte Form ist ausschließlich zytoplasmatisch, während die nicht-phosphorylierte Form sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachweisbar ist (Cotmore & Tattersall, 1990).

NS2 ist mit einer Halbwertszeit von ca. 90 min ein eher labiles Protein. Die Degradation erfolgt durch einen Ubiquitin-unabhängigen Mechanismus im Proteasom (Miller & Pintel, 2001). Im frühen Infektionsstadium ist NS2 in größerer Menge als NS1 vorhanden, da die Menge an NS2-Transkripten größer ist (Cotmore & Tattersall, 1990; Schoborg & Pintel, 1991). Im Laufe der Infektion nimmt die Aktivität des P4-Promotors ab und da NS2 sehr schnell abgebaut wird, kommt es zu einer höheren Akkumulation des NS1-Proteins (Schoborg & Pintel, 1991).

Über die Funktion des NS2-Proteins ist nur wenig bekannt. Im Fall von MVM und H1 gibt es Hinweise auf eine Beteiligung des Proteins an der DNA-Replikation, insbesondere an der Produktion von viraler Einzelstrang-DNA, jedoch nur in natürlichen Wirtszellen dieser Viren (Naeger *et al*., 1990; Cater & Pintel, 1992; Li & Rhode, 1991; Naeger *et al*., 1993; Cotmore *et al*., 1997). Es wurde außerdem beschrieben, dass NS2 eine Rolle bei der viralen Translation und Proteinsynthese spielt (Naeger *et al*., 1990; Naeger *et al*., 1993). Cotmore *et al*. (1997) konnten zeigen, dass NS2 für den Zusammenbau der Kapside essentiell ist. Darüber hinaus verstärkt NS2 in bestimmten neoplastischen Zellen den zytotoxischen Effekt des NS1-Proteins. NS2 allein besitzt jedoch nur geringe zytotoxische Aktivität (Brandenburger *et al*., 1990; Legrand *et al*., 1993).

Da NS2 seine Funktionen nur zelltyp-spezifisch ausüben kann, wird vermutet, dass zelluläre Faktoren bei den NS2-Aktivitäten beteiligt sein müssen. Bisher wurden zwei Proteine der 14-3-3 Proteinfamilie (Brockhaus *et al*., 1996) und der nukleare Exportfaktor CRM1 (*Chromosom Region Maintenance Protein 1*) als Interaktionspartner von NS2 identifiziert (Bodendorf *et al*., 1999). Die Interaktion zwischen NS2 und CRM1 ist beim Export der Virionen aus dem Zellkern essentiell (Miller & Pintel, 2002).

1.2 Das SGT-Protein: Struktur und Funktion

1.2.1 Entdeckung und Struktur von SGT

SGT ist ein Akronym und steht für „*small glutamine-rich tetratricopeptid repeat (TPR)-containing Protein*“. Dieses Protein wurde erstmals in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe des „*two hybrid*“-Systems als Interaktionspartner von NS1 identifiziert. Zuerst wurde eine für SGT-kodierende cDNA aus einer Fibroblasten-cDNA-Bank der Ratte isoliert (rSGT) (Cziepluch *et al*., 1998). Kurz danach konnte die für das humane SGT (hSGT) kodierende cDNA aus einer humanen Plazenta-cDNA-Bank isoliert werden (Kordes *et al*., 1998). Die Aminosäuresequenz von rSGT und hSGT zeigen eine sehr hohe Homologie von 91%.

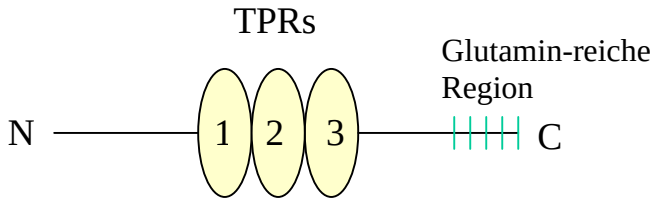
Das hSGT kodierende Gen ist auf Chromosom 19p13 lokalisiert. Dieses Gen kodiert für ein einzelnes Transkript mit einer Länge von ca. 2.4 kb, wobei die kodierende Sequenz jedoch nur 939bp umfasst. Das Protein setzt sich somit aus 313 AS zusammen und hat ein Molekulargewicht von ca. 36kDa (Abb. 1-6B; Kordes *et al*., 1998).

Ein Vergleich der DNA- und AS-Sequenz von hSGT mit verschiedenen DNA- bzw. Protein-Datenbanken hat gezeigt, dass es sich offenbar um ein evolutionär konserviertes Protein handelt, da hSGT-Homologe auch in anderen Organismen, wie *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *C. elegans* identifiziert wurden. Eine mRNA-Analyse in verschiedenen humanen Geweben (Herz, Hirn, Plazenta, Leber, Skelettmuskel, Niere) sowie humanen Zellinien (NBE, HeLa, MRC-5VI, $HaCa_{10}$, U937) ergab, dass die SGT-Transkripte ubiquitär exprimiert werden (Kordes *et al*., 1998; Kordes, Diss., 1997).

Eine Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung und ein Homologievergleich mit der EMBL-Datenbank ließ eine ausgeprägte Dreiteilung der SGT-Sequenz erkennen (Abb. 1-6A). Der C-Terminus des Proteins ist sehr reich an Glutaminresten (30% der 40 C-terminalen AS) während sich im Zentrum des Proteins eine Region mit drei sogenannten TPR-Motiven (*tetratrico- peptide repeat*) befindet. TPR-enthaltende Proteine sind Komponenten von Multiproteinkomplexen, da TPR-Motive intra- und intermolekulare Protein-Interaktionen vermitteln (Goebl & Yanagida, 1991; Lamb *et al*., 1995). Sie bestehen aus 34 AS, die 3-16 mal hintereinander angeordnet vorliegen können (Groves & Barford, 1999). Ein Vergleich der TPRs verschiedener Proteine zeigt, dass acht der 34 AS in Bezug auf ihre Position, Größe und Hy-

drophobizität zueinander hoch konserviert sind (-W-LG-Y-A-F-A-P-) (Hirano *et al.*, 1990; Sikorski *et al.*, 1990).

A



B

```
   1 TCGACGGTCG CCTGAGAGGT ATCACCTCTT CTGGGCTCAA GATGGACAAC AAGAAGCGCC
     1                                    M   D   N   K   K   R   L
  61 TGGCCTACGC CATCATCCAG TTCCTGCATG ACCAGCTCCG GCACGGGGGC CTCTCGTCCG
   8   A   Y   A   I   I   Q   F   L   H   D   Q   L   R   H   G   G   L   S   S   D
 121 ATGCTCAGGA GAGCTTGGAA GTCGCCATCC AGTGCCTGGA GACTGCGTTT GGGGTGACGG
  28   A   Q   E   S   L   E   V   A   I   Q   C   L   E   T   A   F   G   V   T   V
 181 TAGAAGACAG TGACCTTGCG CTCCCTCAGA CTCTGCCGGA GATATTTGAA GCGGCTGCCA
  48   E   D   S   D   L   A   L   P   Q   T   L   P   E   I   F   E   A   A   A   T
 241 CGGGCAAGGA GATGCCGCAG GACCTGAGGA GCCCCGCGCG AACCCCGCCT TCCGAGGAGG
  68   G   K   E   M   P   Q   D   L   R   S   P   A   R   T   P   P   S   E   E   D
 301 ACTCAGCAGA GGCAGAGCGC CTCAAAACCG AAGGAAACGA GCAGATGAAA GTGGAAAACT
  88   S   A   E   A   E   R   L   K   T   E   G   N   E   Q   M   K   V   E   N   F
 361 TTGAAGCTGC CGTGCATTTC TACGGAAAAG CCATCGAGCT CAACCCAGCC AACGCCGTCT
 108   E   A   A   V   H   F   Y   G   K   A   I   E   L   N   P   A   N   A   V   Y
 421 ATTTCTGCAA CAGAGCCGCA GCCTACAGCA AACTCGGCAA CTACGCAGGC GCGGTGCAGG
 128   F   C   N   R   A   A   A   Y   S   K   L   G   N   Y   A   G   A   V   Q   D
 481 ACTGTGAGCG GGCCATCTGC ATTGACCCGG CCTACAGCAA GGCCTACGGC AGGATGGGCC
 148   C   E   R   A   I   C   I   D   P   A   Y   S   K   A   Y   G   R   M   G   L
 541 TGGCGCTCTC CAGCCTCAAC AAGCACGTGG AGGCCGTGGC TTACTACAAG AAGGCTCTGG
 168   A   L   S   S   L   N   K   H   V   E   A   V   A   Y   Y   K   K   A   L   E
 601 AGCTGGACCC CGACAACGAG ACATACAAGT CCAACCTCAA GATAGCGGAG CTGAAGCTGC
 188   L   D   P   D   N   E   T   Y   K   S   N   L   K   I   A   E   L   K   L   R
 661 GGGAGGCCCC CAGCCCCACG GGAGGCGTGG GCAGCTTCGA CATCGCCGGC CTGCTGAACA
 208   E   A   P   S   P   T   G   G   V   G   S   F   D   I   A   G   L   L   N   N
 721 ACCCTGGCTT CATGAGCATG GCTTCGAACC TAATGAACAA TCCCCAGATT CAGCAGCTCA
 228   P   G   F   M   S   M   A   S   N   L   M   N   N   P   Q   I   Q   Q   L   M
 781 TGTCCGGCAT GATTTCGGGT GGCAACAACC CCTTGGGAAC TCCCGGCACC AGCCCCTCGC
 248   S   G   M   I   S   G   G   N   N   P   L   G   T   P   G   T   S   P   S   Q
 841 AGAACGACCT GGCCAGCCTC ATCCAGGCGG GCCAGCAGTT TGCCCAGCAG ATGCAGCAGC
 268   N   D   L   A   S   L   I   Q   A   G   Q   Q   F   A   Q   Q   M   Q   Q   Q
 901 AGAACCCAGA GTTGATAGAG CAGCTCAGGA GCCAGATCCG GAGTCGGACG CCCAGCGCCA
 288   N   P   E   L   I   E   Q   L   R   S   Q   I   R   S   R   T   P   S   A   S
 961 GCAACGACGA CCAGCAGGAG TGACGCTGCC TGCTCCCGGT GTGACCGCGT CCTTCCCTGG
 308   N   D   D   Q   Q   E
1021 CCGACCCGAA GGAAGCCTTC TGGTTGTCTG CCACTTCCTC CTGTTGGACT GCCTGAGAGA
1081 GGGGAAGAGA GAGACCTCGG ACCTGCATGT CAAGATGGAT TTTCCCCTTT TATCTCTGCC
1141 CTCCTCCACT CCCTTTTTGT AACTCCCTTA CAGCCCCCAG ACCCTTCTTG AAACGAGAGC
1201 CAGCAAGCTG AGCACAGACC AGCAGCGACC TCCCTTCCAG CCCCCAGAAA GCTCGGTCAC
1261 TTGAGTGTTT TCTAGAATCC TGGGGTGCTC CCGGGCCGCT CTCAGAGAAG TGGCAGGTTT
1321 CACGTTCAGC CGTGTGGCGG ATCGTGTGGC TTCCAAAGCC TTTTACAGCC CCCGCCCCCC
1381 ATCCCGTGGT CTGTCTGCAG GAACTCTCCC GTCTGTGAGA AGCCTCTTTC CGAGTCGACC
1441 TCCCGGCCAC CCCGGCCCTG TGCCTGCTCG GAAGAGCTCA CTGCCAGCTG CGGCCTGGGC
1501 ACCGCGGGCC ATGTGTGTTT GCATGAGGAA CTCTTTAGTG GCAGACACCT AAGAGACGGC
1561 TGCGGTCACC CCACGCCTCC GCGGCTCAGG AGCCGTCCTG GGTGCATAGG ACCAGTTTCT
1621 GTGACTTTTC TCCAGTTGGG CATGTTGACA GACATGTTTC CCCTCCTCCC ACCCTCATTT
1681 TCTGGTCCTC GCGACTGAGA GCCAGGGGCG ACATCATGAC CTTCTGTCCC GGCCGCCTTA
1741 GCCCCGGGCA CAGGGAAGGC AGCTGGGCCG TTTCTGTCTG TGTCCCATCC TGCTGTCCTT
1801 CTGTCCTGGA TGTTTCATGC CCGGGGCCCC CCAGGGAAGC TTACCCCTCC TGTGCTGGGT
1861 GGAGGCCACG GGACACCTCA GGTGCCACCC ACCTTGGCCC TAAAACAGCC ACCAGGAAAG
1921 CAGCCAGAGA GCCGGACAGC AGGCAGCCTG TCTGGGTTCC TGAGGCCTGG GGGTGGCAGA
1981 CGAGCCCACG GCGCCGTGGT CCCAGCAGCA GGGTTGTCAG TCGGAGCATC CTGGGGCTCC
2041 CTGGCTCCTG GCCGTCTGTG AGGTAGGCGC AGTACCGTGT ATCGTAGGTA GCAGTAGGAA
2101 CGGGGGCCGC CGCGGCCCTG CAGCCGCTCA TGGCGGTGAG GTGTGTGCCA AGCCCACCCG
2161 GGGTGCAGGG CGTGACGTGT GGGGAATAAA TAGGCGTTGT GACCTCAAAA AAAAAAAA
```

Abb. 1-6: A: Schematische Darstellung der SGT-Proteinstruktur

B: cDNA-Sequenz, die für das humane SGT-Protein kodiert.

Die Protein-Sequenz, die aus der kodierenden DNA-Sequenz folgt, ist unterhalb der Nukleotidsequenz angegeben. Mit roten und grünen Buchstaben sind die drei TPR-Motive bzw. die C-terminalen Glutamine markiert. Die Nukleotide im schwarzen Hintergrund geben das Start- bzw. Stopkodon an.

-

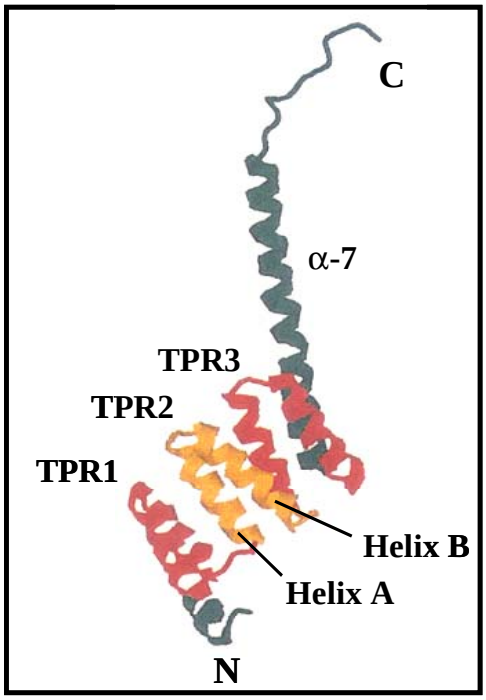


Abb. 1-7: Dreidimensionale Struktur der TPR-Motive von PP5 (Das *et al.*, 1998).

Innerhalb der TPR-Motive weist SGT eine sehr hohe Homologie zu Serin/Threonin Phosphatasen der PP5/PPT1-Familie auf (Chen *et al.*, 1994). Die Kristallstruktur des PP5-Proteins (*protein phosphatase 5*, Abb. 1-7) zeigt, dass ein TPR-Motiv aus zwei antiparallelen α-Helices A und B besteht, die in einem Helix-turn-Helix-Motiv angeordnet sind (Das *et al.*, 1998). Benachbarte TPR-Motive sind derart angeordnet, dass ihre α-Helices immer in einer antiparallelen Anordnung vorliegen (Das *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass die Homo-Oligomerisierung von SGT durch die TPR-Motive vermittelt wird (Cziepluch *et al.*, 1998).

Über das HUSAR-Prosite-Computerprogramm wurden in der AS-Sequenz des hSGT-Proteins neben einer potentielle N-Glykosylierungs-Konsensussequenz auch neun potentielle Phosphorylierungs- und acht potentiellen Myristylierungsstellen ermittelt (Abb. 1-8; Kordes, Diss., 1997). Da SGT in der 1D-Gelelektrophorese in drei SGT-Polypeptidfraktionen aufgetrennt werden kann, wurde vermutet, dass es dabei um posttranslationale Modifikationen von SGT handelt. In der Tat konnte durch Experimente, in denen SGT mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberserum behandelt wurde, gezeigt werden, dass SGT an Serin- und/oder Threoninresten phosphoryliert wird (Kordes, Diss., 1997).

Abb. 1-8: Potentielle Modifikationsstellen des humanen SGT-Proteins

Die potentiellen CKII-Phosphorylierungs- und Myristylierungsstellen sind mit durchgehenden bzw. unterbrochenen Linien unterstrichen. Die PKC-Phosphorylierungsstellen sind mit fetten Buchstaben dargestellt. Die Tyrosin-Kinase-Phosphorylierungssequenz ist in gelb und die *N*-Glykosylierungsstelle in grün angegeben.

1.2.2 SGT akkumuliert nach parvoviraler Infektion in APAR-Bodies

Um Aufschluß über die Verteilung von SGT innerhalb der Zelle zu erhalten, wurden einerseits Immunfluoreszenz-Mikroskopien angewendet und andererseits Fraktionierungsexperimente durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass SGT sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert ist (Cziepluch *et al*., 1998; Kordes, Diss., 1997). Da SGT als Interaktionspartner von NS1 identifiziert worden ist, galt es zu klären, ob eine H1-Infektion eine veränderte Lokalisation von SGT bewirkt. In der Tat akkumuliert SGT in bestimmten Strukturen des Nukleus, den sogenannten APAR-Bodies (*Autonomous Parvovirus-Associated Replication Bodies*; Cziepluch *et al*., 2000; Bashir *et al*., 2001). In diesen Strukturen kolokalisiert SGT mit NS1.

Die Bildung der APAR-Bodies wird durch eine Infektion der Zelle mit Autonomen Parviren spezifisch induziert, und sie lassen sich von anderen subnuklearen Strukturen wie z.B. Nukleoli, „*coiled bodies*“,“*speckled domains*“ oder PML-Bodies unterscheiden. Durch BrdU-Staining und Immunofluoreszenz-Mikroskopie wurde auf Einzelzellebene nicht nur gezeigt, dass die parvovirale Replikation dort stattfindet, sondern auch, dass die zelluläre Replikation während der viralen Infektion stillgelegt wird (Cziepluch *et al*., 2000). In APAR-Bodies akkumulieren außer SGT und NS1 weitere zelluläre Faktoren wie PCNA, Pol α, Pol δ, RPA und Cyclin A (Bashir *et al*., 2001).

1.2.3 NS1-Interaktion und NS1 induzierte Modifikation von SGT

Erste Hinweise auf eine NS1/SGT-Interaktion lieferte der *„two-hybrid screen“* für die Suche von NS1-Interaktionspartnern. Durch *in vitro*-Interaktionsassays und Peptid-ELISA wurde gezeigt, dass hSGT direkt und spezifisch an NS1 bindet (Cziepluch *et al*., 1998; Kordes, Diss., 1997). Bei dieser Interaktion scheint der C-terminus von NS1 beteiligt zu sein. N-terminal verkürzte NS1-Proteine (AS 73-672 und AS 206-672) und ein Peptid, welches aus den AS 655-672 besteht, interagieren mit hSGT. Allerdings waren zwei weitere eher N-terminale NS1-Peptide (AS 144-161 und AS 196-213) in der Lage, hSGT zu binden; sie zeigten aber eine 10fach geringere Bindungsaffinität (Kordes, Diss., 1997).

Neben der Interaktion von SGT mit NS1 wurde auch gezeigt, dass NS1 einen Einfluß auf die SGT-Modifikation hat (Kordes, Diss., 1997). Die Bedeutung und die Art dieser Modifikationsänderung ist jedoch bisher ungeklärt.

1.2.4 Funktionen von SGT

Da SGT ubiquitär exprimiert wird, könnte es sich um ein *Housekeeping*-Protein handeln. Allerdings zeigten sgt-*Knock out*-Mutanten in *S. cerevisiae* keine phänotypische Veränderung beim Wachstum auf Medien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. Die große Homologie von SGT innerhalb der TPR-Motive zu Hop (*Hsp70 und Hsp90 organizing protein*, bekannt auch als p60 oder Sti1p) legt die Vermutung nah, dass SGT eine Rolle als Co-Chaperon spielen könnte (Scheufler *et al*., 2000).

Hop ist ein Adaptor-Protein, das die Assoziation der Chaperone Hsp70 und Hsp90 vermittelt. Das Protein enthält neun TPR-Motive, die zwei Domänen bilden: Die N-terminale TPR-

Domäne des Hop-Proteins, TPR1 ist für die Interaktion mit dem C-Terminus von Hsp70 verantwortlich, wohingegen die C-terminale Domäne, TPR2, für die Bindung an Hsp90 zuständig ist (Chen *et al*., 1996; Lassle *et al*., 1997; Demand *et al*., 1998; Scheufler *et al*., 2000). Liu *et al*. (1999) haben zum ersten Mal gezeigt, dass hSGT tatsächlich über die TPR-Motive mit einem Mitglied der Hsp70-Familie, Hsc70 (*heat shock cognate protein*; Maekawa *et al*., 1989), *in vitro* interagiert. Chaperone der Hsp70-Familie sind beim Faltungsprozeß neu translatierter Proteine, bei der Translokation von Proteinen durch verschiedene zelluläre Kompartimente, bei der Deassemblierung von Proteinkomplexen und bei der Degradation von instabilen Proteinen involviert. Außerdem scheinen sie auch die Aktivität verschiedener regulatorischer Proteine zu kontrollieren (Morimoto *et al*., 1994; Hartl, 1996; Bukau & Horwich, 1998). Die Anwesenheit von ATP ist bei diesen Prozessen essentiell (Flynn *et al*., 1991; Rüdiger *et al*., 1997).

Eine funktionelle Relevanz des hSGT/Hsc70-Komplexes war bis vor kurzem noch nicht bekannt. Erst letztes Jahr wurde von Tobaben *et al*. (2001) gezeigt, dass das hSGT eine Komponente eines trimeren synaptischen ATP-abhängigen Chaperon-Komplexes darstellt. Das dritte Mitglied dieses Komplexes ist das CSP-Protein (*cystein string protein*). CSP ist ein Membran-gebundenes Protein, das ein Cystein-Motiv ($C_2X_5C_{11}X_2C_2$; C steht für Cystein und X für jede beliebige AS) und eine N-terminale J-Domäne enthält (Zinsmaier *et al*., 1990). CSP ist zwar an synaptischen Vesikeln lokalisiert (Mastrogiacomo *et al*., 1994), wurde jedoch auch an anderen sekretorischen Vesikeln gefunden, was auf eine generelle Funktion des Proteins bei der Sekretionsregulation hinweist (Braun & Scheller, 1995; Chamberlain *et al*., 1996). Es scheint bei der Freigabe von Neurotransmittern, Hormonen und Enzym-Vorläufern eine wichtige Rolle zu spielen (Buchner & Gundersen, 1997). Im Chaperonkomplex interagiert CSP über die J-Domäne mit Hsc70 (diese Interaktion wurde schon 1999 von Stahl *et al*. gezeigt) und über den C-Terminus mit SGT. Die Interaktion zwischen SGT und Hsc70 stabilisiert den trimeren Komplex mit CSP (Tobaben *et al*., 2001).

Hinweise darauf, dass SGT eine wichtige Rolle bei Prozessen in neuronalen Synapsen spielt, lieferten auch Experimente mit ausdifferenzierten Neuronen. *Western Blot*-Analysen mit Proteinextrakten aus nicht ausdifferenzierten neuronalen Zellen (NT2) und aus ausdifferenzierten Neuronen (NT2N) zeigten, dass SGT in NT2N-Zellen ein spezifisches Laufverhalten in der SDS-PAGE aufweist während in NT2-Zellen SGT jenes Laufverhalten zeigte, das auch in anderen Geweben und Zellinien nachweisbar war. Außerdem akkumuliert SGT in NT2N-Zellen

sowohl im Kern als auch in den Synapsen. In NT2-Zellen hingegen zeigt SGT nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation (C. Cziepluch, persönliche Mitteilung).

SGT aus mitotischen Zellen zeigt ebenfalls ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE, wobei sich das M-Phase-Muster von dem aus ausdifferenzierten Neuronen unterscheidet. Es kann vermutet werden, dass SGT eine Aufgabe in der Mitose übernimmt, die aber bislang noch nicht bekannt ist (C. Cziepluch, persönliche Mitteilung). In Metaphase-Zellen ist SGT an den Spindelpolen lokalisiert, in Zellen, die sich in den späteren Stadien der Mitose befinden, akkumuliert es in der Mittelregion und im Mittelkörper. Das lässt auf eine mögliche Funktion von SGT bei der Cytokinese schließen (Winnefeld, Dipl., 2002). Die Aufklärung der Rolle von SGT in der Mitose/Cytokinese ist Gegenstand der Forschung in unserer Arbeitsgruppe.

2 Zielsetzung

NS1 ist das wichtigste regulatorische Protein des autonomen Parvovirus H1. Es ist essentiell für die virale DNA-Replikation, die Transaktivierung homologer und heterologer Promotoren sowie für den zytotoxischen Effekt des Virus in transformierten Zellinien. Als *in vitro* Interaktionspartner von NS1 wurde das zelluläre Protein SGT identifiziert. SGT akkumuliert nach H1-Infektion in den APAR-Bodies, den Orten der parvoviralen Replikation, und wird in Anwesenheit von NS1 posttranslationell modifiziert. Aus diesen Gründen kann man annehmen, dass SGT möglicherweise an viralen replikativen oder regulatorischen Prozessen beteiligt ist.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde die Aufklärung der Funktion des zellulären SGT-Proteins im parvoviralen Infektionszyklus angestrebt. Zunächst sollten Bereiche/Domänen im SGT-Protein identifiziert werden, die die Akkumulation dieses Proteins in APAR-bodies vermitteln. Es galt zu klären, ob die Interaktion mit NS1 notwendig und ausreichend für die Lokalisation von SGT in APAR-Bodies ist. Falls hingegen weitere zelluläre Faktoren hier eine Rolle übernehmen, sollten diese Proteine mittels klassischer Ko-Immunpräzipitationsexperimente identifiziert werden. Von Interesse war außerdem, die NS1-induzierte Modifikation näher zu charakterisieren, und zu ermitteln, ob sie für die korrekte Lokalisation von SGT und für die SGT/NS1-Interaktion von Bedeutung ist.

Um Prozesse im Infektionszyklus des Parvovirus H1 zu identifizieren, an denen SGT funktionell beteiligt sein könnte, sollten zwei alternative experimentelle Ansätze verfolgt werden. Der erste Ansatz bestand darin, den Einfluss der Überexpression von SGT oder verkürzter SGT-Proteine auf die virale Replikation und virale Proteinexpression zu untersuchen. Im zweiten Ansatz sollte der Einfluss einer drastisch verringerten SGT-Proteinmenge mittels RNAi-Technik (*RNA interference*-Technik) auf den parvoviralen Infektionszyklus untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Materialien

Standardchemikalien und -materialien wurden von den Firmen Amersham, Merck, Roche, Roth, Serva und Sigma bezogen. Weitere Produkte und deren Hersteller sind in nachfolgender Tabelle (Tab. 3-1) aufgelistet:

Produkte	**Hersteller**
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	Ampligene
Agar	Difco
Agarose	Serva
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampholine (IPG)	Amersham
Amplify	Amersham
Autoradiographiefilme	Kodak
ß-Mercaptoethanol	Roth
BCIP/NBT Color Development Substrate	Promega
BioRad Protein Assay	BioRad
BrdU (Bromodeoxyuridine)	Sigma
BSA	Sigma
Bromphenolblau	Serva
CHAPS	Roche
Cover Fluid (2D-PAGE)	Amersham
DMSO	Merck
DTT	Serva
ECL™ Western Blot Reagenzien	Amersham
Elvanol	Immunotech
Gelstreifen (2D-PAGE)	Amersham
Glas-Deckgläschen	Langenbrinck
Glutathion-Sepharase 4B	Pharmacia

Produkte	**Hersteller**
Harnstoff	Roth
Neubauerzählkammer	Neubauer
Nitrozellulosemembran (Hybond^{TM}-C-extra)	Amersham
Nylonmembran Hybond^{TM}-N	Amersham
NP40	Fluka
Norleucin	Sigma
Objektträger	Langenbrinck
Oligofectamin	Gibco BRL
Polaroidfilm 667	Polaroid
Protease Inhibitor Cocktail	Boehringer Mannheim
Protein A Sepharose	Pharmacia
SDS	Serva
TEMED	Roth
Triton X-100	Serva
Tween 20	Sigma
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schüll
Zellhomogenisator (Douncer)	B. Braun
Zellkulturschalen	Greiner/Nunc

Tabelle 3-1: Chemikalien/Materialien und deren Bezugsquellen

3.1.2 Zellinien, Virus- und Bakterienstämme

3.1.2.1 Zellinien

NBE: humane embryonale SV40-transformierte Nierenzellinie (Shein *et al.*, 1962)

293T: humane SV40/Ad5-transformierte Nierenzellinie (Pear *et al.*, 1993)

3.1.2.2 Virusstämme

H1: Wildtypstamm des autonomen Parvovirus H1 (Toolan, 1962)

3.1.2.3 Bakterienstämme

Bezeichnung	Merkmale	Quelle
E. coli HB101	F^-, hsdS20 (r_B^- m_B^-), supE44, ara14, GalK2, lacY1, proA, rpsL20, (Str^r) xyl-5, mtl-1, recA13, mcrB, thi-1 leuB6	Invitrogen
E. coli BL21DE3	F^-, dcm, ompT, hsdS(r_B^- m_B^-)gal λ(DE3)	Stratagene
E. coli TOP10	F^-, mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, deoR, araD139 Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL (Str^r), endA1, nupG	Invitrogen

3.1.3 Medien und Zusätze

3.1.3.1 Zellkultur-Medien und Zusätze

DMEM Zellkultur Medium(Dulbeccos Modified Eagle Medium)	Gibco BRL
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco BRL
Gentamycin	Gibco BRL
L-Glutamin (200 mM)	Gibco BRL
MEM Zellkultur Medium (Modified Eagle Medium)	Gibco BRL
OPTIMEM-1	Gibco BRL
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL
Trypsin-EDTA	Gibco BRL

3.1.3.2 *E. coli*-Medien und Zusätze

Bacto-Agar	Difco
Bacto-Hefeextrakt	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Ampicillin	Sigma
Tetracyclin	Sigma

3.1.4 Plasmide

Bezeichnung	Genotyp	Derivat von	Referenz
pBlueskript II SK$^+$			Stratagene
pBlue-NS1	nt 264-2280 (NS1 von H1)	pBlueskript II SK$^+$	Kordes, Diss, 1997
pBlue-hSGT	hSGT cDNA-Fragment	pBlueskript II SK$^+$	Kordes, Diss, 1997
pDsRed2-N1			Clontech
pGBT9-NS1	nt 264-2280 (NS1 von H1)	pGBT9	Kordes, Diss, 1997
pGEX-5X-2			Pharmacia
pGEX-hSGT	hSGT cDNA-Fragment	pGEX-5X-2	Kordes, Diss, 1997
pGEX-NS1	nt 264-2280 (NS1 von H1)	pGEX-5X-2	Laborbestand
pGEX- N	nt 42-310 von hSGT-cDNA	pGEX-5X-2	diese Arbeit
pGEX-TPR	nt 285-617 von hSGT-cDNA	pGEX-5X-2	diese Arbeit
pGEX- C	nt 620-981 von hSGT-cDNA	pGEX-5X-2	diese Arbeit
pGFP-C1			Clontech
pGFP-N1			Clontech
pGFP-C-SGT	hSGT cDNA-Fragment	pGFP-C1	diese Arbeit
pGFP-C-NTPR	nt 42-617 hSGT-cDNA	pGFP-C1	diese Arbeit
pGFP-C-TPRC	nt 285-981 hSGT-cDNA	pGFP-C1	diese Arbeit
pGFP-N-SGT	hSGT cDNA-Fragment	pGFP-N1	diese Arbeit
pGFP-N-NTPR	nt 42-617 hSGT-cDNA	pGFP-N1	diese Arbeit
pGFP-N-TPRC	nt 285-981 hSGT-cDNA	pGFP-N1	diese Arbeit

Bezeichnung	**Genotyp**	**Derivat von**	**Referenz**
pRed2-N1-SGT	hSGT cDNA-Fragment	pDSRed2-N1	diese Arbeit
pRed2-N1-NTPR	nt 42-617 hSGT-cDNA	pDsRed2-N1	diese Arbeit
pRed2-N1-TPRC	nt 285-981 hSGT-cDNA	pDsred2-N1	diese Arbeit
pXBglII		pXFlag	diese Arbeit
pXFlag		pBlueskript II SK^+	Laborbestand
pXFlagNS1	nt 264-2280 (NS1 von H1)	pXFlag	Laborbestand
pXFlagGFP	gfp	pXFlag	diese Arbeit
pXFlagSGT	hSGT cDNA-Fragment	pXFlag	diese Arbeit
pXFlagN-TPR	nt 42-617 hSGT-cDNA	pXFlag	diese Arbeit
pXFlagTPR-C	nt 285-981 hSGT-cDNA	pXFlag	diese Arbeit
pXFlagTPR-C-PART	nt 273-617 hSGT-cDNA	pXFlag	diese Arbeit
pXFlagN	nt 42-310 hSGT-cDNA	pXFlag	diese Arbeit
pXFlagTPR	nt 285-617 hSGT-cDNA	pXFlag	diese Arbeit
pXFlagC	nt 620-981 hSGT-cDNA	pXFlag	diese Arbeit
pX-NS1	nt 264-2280 (NS1 von H1)	pX	diese Arbeit
pSR19	nt 1-5176 (H1-Genom)	pUC	Rhode *et al*., 1985
pVP22/myc-His-TOPO®			Invitrogen
pVP-SGT	hSGT cDNA-Fragment	pVP22/myc-His TOPO®	diese Arbeit
pVP-N-TPR	nt 42-617 hSGT-cDNA	pVP22/myc-His TOPO®	diese Arbeit
pVP-TPR-C	nt 285-981 hSGT-cDNA	pVP22/myc-His TOPO®	diese Arbeit

3.1.5 Oligonukleotide

Alle DNA-Oligonukleotide wurden bei Sigma (ARK) bestellt.

3.1.5.1 DNA-Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Konstruktion der pXFlag-Derivate:

hSGT 1/3: 5´ GCT CGA GTC ACT CTG CTG AGT CCT CCT C 3´
hSGT 2/3: 5´ GCT CGA GTC AGT TGT CGG GGT CCA GCT C 3´
hSGT 3/3: 5´ GCT CGA GTC ACT CCT GCT GGT CGT CGT TGC 3´
hSGT 4/3: 5´ CGG ATC CCC ATG GAC AAC AAG AAG CGC C 3´
hSGT 5/3: 5´ CGG ATG CCC ATG GCA GAG CGC CTC AAA ACC 3´
hSGT 6/3: 5´ CGG ATG CCC ATG GAG ACA TAC AAG TCC AAC C 3´
hSGT 7/3: 5´ CGG ATC CCC ATG GCA CCG CCT TCC GAG GAG 3´
hSGT 8/3: 5´ ATG GAT CCA TGC CCG CGC GAA CCC CG 3´

Oligonukleotide zur Konstruktion der pVP22-/myc-His-TOPO®-Derivate:

TOPO 22-31: 5´ GAA TTC CTC CTG CTG GTC GTC G 3´
TOPO 22-32: 5´ GAA TTC GTT GTC GGG GTC CAG CTC 3´
TOPO 22-51: 5´ CGA GAT CTC ATA TGA TGG ACA ACA AGA AGC G 3´
TOPO 22-52: 5´ CGA GAT CTC ATA TGG CAG AGC GCC TCA AAA CC 3´

Oligonukleotide zur Konstruktion des pX-BglII-Vektors:

BglII-Oligo1: 5´ AAT TCA GAT CTC CCC GGG CG 3´
BglII-Oligo2: 5´ TCG ACG CCC GGG GAG ATC TG 3´

Oligonukleotide zur Konstruktion des pXFlagGFP-Vektors:

FlagGFP 3´: 5´ TCG ACC ATG GGA TAT CGC TAG CA 3´
FlagGFP 5´: 5´ GAT CTG CTA GCG ATA TCC CAT GG 3´

Oligonukleotide zur Konstruktion der pGFP-C1-, -C2- und pDsred-N1-Derivate

GFP-2/3: 5´ GGG ATC CCC GTT GTC GGG GTC CAG CTC 3´
GFP-3/3: 5´ GGG ATC CCC CTC CTG CTG GTC GTC GTT GC 3´
GFP-4/5: 5´ CGA ATT CCC GAA ATG GAC AAC AAG AAG CGC C 3´
GFP-7/5: 5´ CGA ATT CCC GAA ATG GCA CCG CCT TCC GAG GAG 3´

3.1.5.2 RNA-Oligonukleotide

Die RNA-Oligonukleotide wurden von Xeragon bestellt.

sgt-spezifisches Oligo:

Zielsequenz: 5´ AAC TTG AAG CTG CCG TGG CAT TC 3´
Sense: 5´ CTT GAA GCT GCC GUG GCA TdTdT 3´
Antisense: 5´ AAT GCA CGG CAG CUU CAA GdTdT 3´

gfp-spezifisches Oligo:

Zielsequenz: 5´ CGT ACG CGG AAT ACT TCG ATT 3´
Sense: 5´ CGU ACG CGG AAU ACU UCG AdTdT 3´
Antisense: 5´ UCG AAG UAU UCC GCG UAC GdTdT 3´

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 Primäre Antikörper

α-Hsc70 (monoklonal; 13D3; Maus)	Dianova
α-Tubulin (monoklonal; DM1A; Maus)	Sigma
α-Hsc70 (monoklonal; 13D3; Maus)	Dianova
α-myc (monoklonal; Maus)	Invitrogen
α-NS1 Sp8 (polyklonal; Kaninchen)	Laborbestand
α-NS1 3D9 (monoklonal; Maus)	Laborbestand
α-VP-Peptid (polyklonal; Kaninchen)	Laborbestand
α-hSGT (AG 1.1; polyklonal; Kaninchen)	Laborbestand
α-rSGT (AC 1.1; polyklonal; Kaninchen)	Laborbestand
α-Flag® M2 (monoklonal; Maus)	Sigma
α-BrdU (monoklonal; Ratte)	Direct.com
α-BrdU (monoklonal; Maus)	Becton Dickinson

3.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Ziege α-Kaninchen, HRP (horseradish peroxidase)	Promega
Ziege α-Maus, HRP (horseradish peroxidase)	Promega
Ziege α-Kaninchen, AP (Alkalische Phosphatase)	BioRad
Ziege α-Maus, AP (Alkalische Phosphatase)	BioRad
Ziege α-Kaninchen, FITC (Fluorescein Isothiocyanat)	Dianova
Ziege α-Maus, TRITC (Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat)	Dianova
Ziege α-Kaninchen, TRITC (Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat)	Dianova
Ziege α-Maus, FITC (Fluorescein Isothiocyanat)	Dianova
Ziege α-Ratte, Alexa Fluor 555	MoBiTec
Kaninchen α-Maus (RαM), unkonjugiert	Dianova

3.1.7 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche
RNase	Sigma
Pfu-Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Sigma
T4-DNA-Ligase	Stratagene
Taq-Polymerase	Promega
Restriktionsenzyme	Gibco BRL
	Boehringer Mannheim
	New England Biolabs

3.1.8 Molekularbiologische Reagenziensätze

Biorad Protein Assay	BioRad
Gel Drying Kit	Promega
Megaprime DNA Labelling System	Amersham
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen
TNT coupled Reticulocyte Lysate	Promega

3.1.9 Größenstandards

3.1.9.1 DNA-Größenstandards

GeneRuler™ (1kb DNA Ladder)	Fermentas
Lambda DNA/Eco91I (BstEII) Marker, 15	Fermentas

3.1.9.2 Protein-Molekulargewichtstandards

Rainbow™	Amersham
Full range Rainbow™	Amersham
Mark12™MW Standard	Invitrogen

3.1.10 Radioaktives Material

[γ^{32}P]-ATP	Amersham
[α^{32}P]-dCTP	Amersham
TRAN^{35}S-LABEL	Amersham

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung von etablierten Zellinien erfolgte in Form von *Monolayer*-Kulturen in Zellkulturschalen bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Feuchtigkeit. Zur Vermehrung wurden die Zellen mit einer Trypsin-Lösung (0.25% Trypsin, 1mM EDTA) von den Kulturschalen abgelöst und im Verhältnis 1:5 bis 1:20 mit frischem Medium ausgesät. Alle Medien wurden mit 2mM L-Glutamin 100µg/ml Penicillin/Streptomycin und fötalem Kälberserum versetzt.

Die Kultivierung von NBE-Zellen erfolgte in MEM-Medium mit 5% FCS, während 293T-Zellen in DMEM-Medium mit 5% FCS kultiviert wurden.

3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Zum Einfrieren von Säugerzellen wurden ca. $1x10^6$ Zellen pelletiert (5min, 1200rpm), in 1ml Einfriermedium (90% Medium , 5% FCS, 5% DMSO) aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Diese Röhrchen wurden in einem mit Isopropanol isolierten Behälter über 24h langsam auf -80°C abgekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in 10ml Medium aufgenommen und 5min bei 1200rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in frischem Medium aufgenommen und in eine Kulturschale überführt.

3.2.1.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Ein Aliquot der Zellen wurde unter dem Mikroskop in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Nach Auszählung der Zellen in den 4 Großquadraten (ein Großquadrat besteht aus 16 Kleinquadraten) ermittelt sich die Zellzahl pro µl Medium aus der durchschnittlichen Anzahl der Zellen eines Großquadrats dividiert durch 0.4.

3.2.1.4 Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen

Die Transfektion erfolgte nach der $CaPO_4$-Methode (Graham & van der Eb, 1973). Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde in ein Endvolumen von 450µl H_2O gelöst und mit 50µl 2.5M $CaCl_2$ versetzt. Dem Ansatz wurde tropfenweise unter kontinuierlichem Vortexen 500µl 2xHBS hinzugefügt. Das gesamte Präzipitat wurde dann vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Nach 10-12h Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurde zu den transfizierten Zellen frisches Medium zugegeben. Die Zellen wurden bis zur weiteren Analyse unter den gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Nach der Transfektion von 293T Zellen erfolgte kein Mediumwechsel.

2xHBS (pH 7.1): 280 mM NaCl
50 mM Hepes, pH 7.5
1.5 mM Na_2HPO_4

3.2.1.5 Transfektion von Säugerzellen mit RNAi-Oligonukleotiden

NBE-Zellen wurden in 6 Well-Platten mit Medium (MEM, 5% FCS) ohne Antibiotikum ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 30% konfluent waren. Pro 6er-Well wurden 10µl (2µM) Oligonukleotid-Lösung verwendet. Zur Herstellung des Transfektats wurden zwei Ansätze getrennt vorbereitet. In einem ersten Ansatz wurde die 10µl Oligonukleotid-Lösung mit 175µl OPTIMEM-I®-Medium gemischt, während in einem zweiten Ansatz 3µl Oligofektamin zu 12µl OPTIMEM-I®-Medium zugegeben wurde. Nach 10min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die zwei Ansätze miteinander gemischt und für weitere 20min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen mit Serum- und Antibiotika-freiem Medium gewaschen und mit 800µl frischem OPTIMEM-I®-Medium überschichtet. Das Transfektat wurde dann zu den Zellen vorsichtig zugegeben und die Zellen für 4h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte eine Zugabe von 500µl Antibiotika-freiem MEM-Medium mit 15% FCS. Abhängig vom jeweiligen Experiment wurden anschließend die Zellen 48h bis 96h im Brutschrank weiter inkubiert.

3.2.1.6 Radioaktive Markierung von Proteinen mit [^{32}P]-Orthophosphat

Zur Herstellung *in vivo* mit [^{32}P]-Orthophosphat markierter Zellextrakte wurden die Zellen zuerst 20min mit MEM-minus Medium bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Dann wurde das Medium durch 2ml frisches, 1mCi [^{32}P]-Orthophosphat enthaltendes MEM-minus Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 4h unter häufiges Schwenken bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen vorsichtig 2x mit 2-3 ml PBS gewaschen und dann für die Proteinextraktion (Kap. 3.2.5.1.1) auf Eis gestellt.

MEM-minus Medium: Phosphat-freies MEM
5% dialysiertes FCS
1% L-Glutamin
1% Penicillin/Streptomycin

PBS : 137 mM NaCl
2.7 mM KCl
8.1 mM Na_2HPO_4
1.15 mM KH_2PO_4
pH 7.2-7.4

Bestimmung des radioaktiven Einbaus:

Zur Bestimmung des Einbaus von [^{32}P]-Orthophosphat in die Proteine wurden 5µl Aliquots der fertigen Proteinextrakte in Szintillationsröhrchen überführt und nach Zugabe von 5ml Szintillationslösung ReadySafe (Beckmann) im Szintillationszähler TRI-CARB (Packard) gemessen.

3.2.1.7 *In vivo* BrdU-Markierung von DNA

Um die genomische und virale replizierende DNA in der Zelle mittels Immunfluoreszenz (Kap. 3.2.5.12) sichtbar zu machen, wurde die DNA durch BrdU (Bromodeoxyuridine) markiert. Dafür wurden die Zellen vor der Fixierung mit Formalin in Medium mit 10µM Endkonzentration BrdU (Stock: 1mM) für 20min im Brutschrank inkubiert.

3.2.2 Virologische Methoden

3.2.2.1 Virusinfektion von Säugerzellen

Für die Virusinfektion wurden die entsprechenden Zellen subkonfluent ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1ml frischem Medium, welches die Virussuspension enthielt, bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37°C und 5% CO_2 unter gelegentlichem Schwenken wurden 8ml frisches Medium hinzugefügt und die Zellen bis zur weiteren Analyse bei 37°C und 5% CO_2 weiter inkubiert. Die Zellen wurden mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 10-20 pfu (*plaque forming units*) /Zelle infiziert (siehe auch Kap. 3.2.2.2).

3.2.2.2 Virusvermehrung und -titration (Plaque Assay)

Die Vermehrung von H1-Viren erfolgte durch Infektion von NBE Zellen mit einer MOI von 10^{-3} pfu/Zelle. Die Virusreinigung erfolgte durch CsCl-Gradient wie von *Chen et al.* (1986) beschrieben.

Für die Titerbestimmung des Virusstocks wurden NBE Zellen subkonfluent auf Zellkulturschalen mit 6cm Durchmesser ausgesät. Am nächsten Tag wurden zur Infektion 500µl/Schale des zu titrierenden Virus in verschiedenen Verdünnungen (10^{-6} bis 10^{-9}) zu den Zellen gegeben. Nach 1h Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO_2 unter gelegentlichem Schwenken wurde die Virussuspension abgenommen und die Zellen mit 8ml *Overlay*-Medium überschichtet. Nach 5-tägige Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen mit 3ml Neutralrot-*Overlay*-Mix überschichtet und über Nacht im Brutschrank weiter inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der Plaques auf jeder Schale gezählt und der Titer des Virusstocks berechnet. Der Virustiter berechnet sich in pfu (*plaque forming units*)/ml wie folgt:

$$pfu/ml = P \times 10^{x} \times 2$$

P: durchschnittliche Anzahl der Plaques einer Virusverdünnung
X: absoluter Wert der Verdünnungsstufe

Overlay-Medium:	100ml auf 37°C erwärmtes 2xMEM (10% FCS, 2% NEAA, 2% Glutamin, 2% Gentamycin) wurden mit 75ml geschmolzenem, auf 48°C abgekühltem 2%-igen Bacto-Agar (in H_2O) gemischt.
Neutralrot-*Overlay*-Mix:	22ml 2xPBS (3.2.1.6) und 3ml Neutral-Rot-Lösung (0.33% in H_2O) wurden auf 37°C erwärmt und mit 22.5ml geschmolzenem, auf 48°C abgekühltem 2%igen Bacto-Agar (in H_2O, Difco) gemischt.

3.2.3 Mikrobiologische Methoden

3.2.3.1 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Alle Bakterienstämme wurden in LB-Medium oder auf LB-Platten über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Suspensionskulturen wurden in Reagenzgläser bzw. in Glaskolben, die bis maximal 25% des Gesamtvolumens befüllt waren, bei 200 rpm geschüttelt.

Die Aufbewahrung (Kryokonservierung) von Bakterienstämmen erfolgte in Form von Glycerolstocks. Dabei wurde eine LB-Übernachtkultur auf eine Endkonzentration von 20% mit Glycerol versetzt und bei -80°C gelagert. Bakterienstämme, die für einen kürzeren Zeitraum (ein bis zwei Wochen) aufbewahrt werden sollten, wurden auf einer Platte ausgestrichen und bei 4°C aufbewahrt.

LB (1l)	10 g Bacto Tryptone
(Lauria Broth; Miller, 1972)	5 g Bacto Hefeextrakt
	5 g NaCI

Für die LB-Agarplatten wurden 15g Agar pro Liter LB-Flüssigmedium zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurden Petrischalen mit je 25ml Medium gegossen.

Als Selektionzusätze wurde Ampicillin (100µg/ml) oder Kanamycin (30µg/ml) verwendet.

3.2.3.2 Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578nm am Eppendorf-Photometer bestimmt. Als Referenz diente dabei das Medium, in dem die Bakterien herangezogen wurden.

3.2.3.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Eine frische *E.coli* Übernacht-Kultur wurde 1:100 in 1l LB-Medium verdünnt, bis zu einer OD_{578} von 0.6 bei 37°C wachsen gelassen und dann 15min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden 10min bei 5000rpm in einem vorgekühlten Rotor abzentrifugiert, je einmal mit 1l bzw. 500ml kalten H_2O (4°C) sowie in 20ml 10%-igem Glycerol (4°C) gewaschen und jeweils wie oben angegeben abzentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 2-3ml LB-Medium mit 10% Glycerol aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

3.2.3.4 Transformation von *E. Coli* mit Plasmid-DNA

In dieser Arbeit wurden folgende Transformationsmethoden verwendet:

3.2.3.4.1 Elektroporation

Diese Methode wurde nach Calvin & Hanawalt (1988) durchgeführt. Sie zeichnet sich durch eine hohe Transformationseffizienz aus ($2x10^7$ Transformanten/µg Plasmid-DNA) und deswegen wurde diese Art der DNA-Transformation bei Ligationsansätzen verwendet. Dabei wurden elektrokompetente Bakterien (3.2.3.3) auf Eis aufgetaut. 40µl der Bakteriensuspension wurden mit 1-2µl (10-100ng) DNA-Lösung gemischt und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette (0,2cm Elektrodenabstand, qeqelab) überführt. Die Probe wurde dann bei 200Ω, 1,8kV und 25µFd in einem *E. coli*-Pulser elektroporiert. Nach Zugabe von 1ml antibiotikum-freiem LB-Medium inkubierten die Bakterien für 30 Minuten bei 37°C. Danach wurden die Bakterien 1min abzentrifugiert und in 50µl LB-Medium aufgenommen, auf LB-Sekletionsplatten (mit Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.3.4.2 TSS-Transformation

Die TSS-Transformation nach Chung *et al.* (1989) ist einfach und schneller, besitzt aber eine geringere Effizienz als die Elektroporation und deswegen wurde diese Methode nur zur Transformation gereinigter Plasmide angewendet. Dabei wurden 50µl einer Übernachtkultur mit 50µl eiskaltem 2xTSS gemischt und mit 1µl DNA versetzt. Nach einer Inkubation auf Eis für 20min wurden die Bakterien auf LB-Sekletionsplatten (mit Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2x TSS: 20 % (w/v) PEG-6000
(in LB) 10 % (v/v) DMSO
100 mM Mg_2Cl

3.2.4 Präparation, Analyse und Modifikation von DNA

3.2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für große DNA-Ausbeuten wurden DNA-Maxi- und Midipräparationskits von Qiagen verwendet. Für kleinere DNA-Mengen eignen sich die DNA-Minipräparationskits (Qiaprepspin). Die DNA-Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach der DNA-Fällung wurde das getrocknete Pellet in TE-Puffer oder H_2O aufgenommen.

TE: 10 mM Tris-HCl; pH 8.0
1 mM EDTA; pH 8.0

3.2.4.2 Isolierung von viraler DNA aus Säugerzellen

Die Extraktion von Virus DNA aus Säugerzellen erfolgte in Abwandlung der Methode von Hirt (Hirt, 1967). Infizierte oder transfizierte 293T-Zellen ($2x10^6$) wurden mit PBS (3.2.1.6) gewaschen, in 1ml Hirt-Lysepuffer aufgeschlossen und für 4-6h bei 37°C mit 250µg/ml Proteinase K inkubiert. Anschließend wurde die hochmolekulare DNA durch das Einstellen der

NaCl-Konzentration auf 1.25M, die Inkubation bei 4°C über Nacht und eine Zentrifugation bei 13000rpm, für 30min abgetrennt. Der Überstand wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1, Roth) extrahiert und die niedermolekulare DNA wurde durch Zugabe von 0.7 Volumen Isopropanol und Zentrifugation bei 13000rpm, für 30min und bei 4°C ausgefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol gewaschen und in 10mM Tris/HCL, pH 8.0 aufgenommen. Die DNA wurde dann auf einem Agarasegel (Kap. 3.2.4.6) aufgetrennt und die viralen Replikationsintermediate mittels *Southern Blot* und Hybridisierung (Kap. 3.2.4.11) identifiziert.

Für Quantifizierungsexperimente der Virion-DNA (ssDNA) wurden die Zellen nach dem Waschen in 100µl TE (Kap. 2.2.4.1) resuspendiert und nach Zugabe von 100µl 2x Hirt-Puffer lysiert. Nach Zugabe von 250µg/ml Proteinase K und einer Inkubation für 4-6h bei 37°C wurde die genomische DNA durch mehrmaliges Passieren durch eine Kanüle (∅ 0.4 mm) mechanisch geschert. Die DNA wurde dann direkt auf einem Agarasegel (Kap. 3.2.4.6) aufgetrennt und die viralen Replikationsintermediate mittels *Southern Blot* und Hybridisierung (Kap. 3.2.4.11) identifiziert. Somit ist keine NaCl-Fällung der hochmolekularen DNA erforderlich, die oft zum Verlust der ssDNA führt.

2x Hirtpuffer: 20 mM Tris-HCl pH 7.4
20 mM EDTA pH 8.0
1.2 % SDS

3.2.4.3 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Diese Methode wurde angewendet, wenn ein Doppelrestriktionsverdau von Plasmid-DNA nötig war, aber die Puffer der beiden Enzyme nicht kompatibel waren oder um DNA zu konzentrieren. Dazu wurden der DNA 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5.2) und 2.5 Volumen $Ethanol_{abs}$ zugegeben und 30min bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch 15-minütliches Zentrifugieren bei 1300rpm pelletiert (Tischzentrifuge von Eppendorf). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet luftgetrocknet, bevor die DNA in dem gewünschten Volumen im TE-Puffer (Kap. 3.2.4.1) aufgenommen wurde.

3.2.4.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

DNA-Konzentrationen wurden photometrisch durch Messung der Absorption bei 260nm bestimmt. Die Berechnung der Konzentrationen richtet sich nach folgender Beobachtung:

dsDNA:	A_{260}=1 entspricht 50µg/ml
ssDNA	A_{260}=1 entspricht 37µg/ml

Ein hoher Reinheitsgrad ist erreicht, wenn der A_{260}/A_{280}-Quotient zwischen 1.8 und 2 liegt.

3.2.4.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsansatz (20µl Endvolumen):

1-2 µg DNA
2 µl 10xRestriktionspuffer
2-3 units Restriktionsenzym/µg DNA
2 µl 10x BSA (wenn notwendig)
add. 20µl H_2O

Restriktionspuffer und Inkubationstemperatur wurde nach Angaben des Herstellers gewählt. Die Inkubationsdauer betrug mindestens 2h.

3.2.4.6 Agarosegelektrophorese

Sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken wurde die DNA je nach Größe der zu trennenden Fragmente in 0.8-1 % (w/v) Agarosegelen bei einer Stromstärke von 3.6-6 mV/cm in 1xTAE-Puffer aufgetrennt. Durch die Zugabe von 1µg/ml Ethidiumbromid in das Gel konnten die DNA-Banden mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz im UV-Licht bei 254nm mit einer Polaroidkamera (Image master VDS, Pharmacia) fotografisch dokumentiert werden. Zu präparativen Zwecken geschah das Ausschneiden der Banden auf Leuchtplatten mit langwelligem UV-Licht (366nm).

TAE (50x): 2 M Tris/Essigsäure; pH 7.8
0.05 M EDTA; pH 8.0
0.25 M NaOAc

Ladepuffer (6x): 50 % Glycerin
2 % SDS
1 mM EDTA; pH 8.0
0.5 M Bromphenolblau

3.2.4.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einemTAE-Agarosegel

DNA-Fragmente wurden über 0.8-1%-ige TAE-Agarosegel (Kap. 3.2.4.6) mit 1µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Das gesuchte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht (366nm) mit Hilfe des λ-BST EII-Markers identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Elution der DNA aus dem Agarosestück wurde der Extraktionskit Qiaquick von Qiagen verwendet.

3.2.4.8 Klenow-Reaktion

Das Auffüllen von „sticky“ geschnittenen DNA-Enden und einzelsträngigen DNA-Lücken wird mit Hilfe des Klenowenzyms erreicht.

Ansatz (20 µl): 1 unit Klenowenzym/µg DNA
0.2 mM dNTP
2 µl 10x Klenowpuffer
add. 20µl H_2O

Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C, für 30min inkubiert und das Klenowenzym anschließend bei 75°C, 10min inaktiviert.

3.2.4.9 Ligation

Zur Verknüpfung von geschnittenen DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase-Reaktion wie folgt angesetzt:

Ligationsansatz (20 µl): 30-40 ng Vektor-DNA
7 x Überschuß Insert-DNA
1 unit T4-DNA-Ligase
2 µl 10x Ligasepuffer
add. 20µl H_2O

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C, die anschließende Inaktivierung für 10min bei 65°C.

3.2.4.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR-Methode lassen sich geringe DNA-Mengen amplifizieren. Dabei ist es möglich, Restriktionsschnittstellen einzuführen, über die ein DNA-Fragment in einen bestimmten Vektor kloniert werden kann. Darüber hinaus können durch die Wahl des Primers gezielt Punktmutationen, Deletionen, Proteasenschnittstellen, Stop- oder Startcodons eingeführt werden. Die Methode wurde wie von Ausubel *et al*. (1989) beschrieben durchgeführt.

Standard-PCR-Ansatz:	100-200 ng Template-DNA
(100 µl)	200 nM dNTP-Mix
	500 nM Primer 1
	500 nM Primer 2
	1-2 units *Pfu*- oder *Taq*-Polymerase
	10 µg deacetyliertes BSA
	10 µl 10xPolymerasepuffer
	add. 100µl H_2O

Die Temperatur zum Aufschmelzen der DNA-Matrize betrug immer 95°C und 74°C zur Polymerisation durch die Polymerase. Die Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide wurde entsprechend der verwendeten Primer gewählt.

3.2.4.11 Transfer von DNA *(Southern Blot)* und Hybridisierung

Durch Hirt-Extraktion (Kap. 3.2.4.2) gewonnene DNA wurde auf einem 0.8%-igem Agarosegel (Kap. 3.2.4.6) in 1xTAE aufgetrennt. Zur Depurinierung wurde das Gel 30min in 0.25M HCl geschwenkt, anschließend nach zweimaligem Abspülen mit H_2O 2x je 20min in Denaturierungspuffer, dann 2x je 20min in Neutralisierungspuffer geschwenkt. Für den Kapillartransfer wurde eine Wanne mit 20xSSC gefüllt, eine Glasplatte als Plattform darüber gesetzt und drei Lagen Whatman-Papier als Brücke so über die Glasplatte gelegt, dass beide Enden in den Laufpuffer tauchten. Auf diese Brücke wurde das Gel platziert und die freien Bereiche an den

Seiten mit Haushaltsfolie abgedichtet. Auf das Gel wurde eine zurechtgeschnittene, positiv geladene, in 20xSSC getränkte Nylonmembran (Hybond^{TM}-N, Amersham) luftblasenfrei aufgelegt und mit 3 Lagen in 20xSSC getränktem Whatmanpapier sowie einem Stapel trockener Papiertücher und einer Glasplatte überschichtet. Nach Beschweren des Blots mit einem Gewicht (500g) erfolgte der DNA-Transfer über Nacht. Anschließend wurden Papierhandtücher und Whatmanpapier entfernt, die Lage der Taschen und die Orientierung des Gels auf der Nylonmembran markiert, die Membran luftgetrocknet und für 5min zur Fixierung der DNA mit UV-Licht bestrahlt (Stratalinker®, UV Crosslinker).

Die Membran wurde dann unter kontinuierlichem Schwenken bei 65°C für 1h in Hybridisierungslösung mit 0.2ng/ml gescherter aufgekochter Heringssperma-DNA (Boehring Mannheim) inkubiert. Nach Zugabe einer radioaktiv markierten und denaturierten Sonde (mindestens 800000cpm, Herstellung siehe Kap. 3.2.4.12) wurde die Hybridisierung bei 65°C über Nacht fortgesetzt. Nach Dekantieren der Hybridisierungslösung wurde die Membran 30min mit Waschlösung 1, dann 2x 1h mit Waschlösung 2 bei 65°C gewaschen. Daraufhin wurde die Membran luftgetrocknet, in Haushaltsfolie eingeschlagen und für die Exposition eines Röntgenfilms verwendet.

Denaturierungspuffer:	1.5 M NaCl 0.5 M NaOH
Neutralisierungspuffer	1.5 M NaCl 0.5 M Tris/HCl; pH 7.2 1 mM EDTA
20 x SSC	3 M NaCl 0.3 M *tri*-Natriumcitrat pH 7.0
Hybridisierungslösung	3 x SSC 1 % SDS 10 x Denhardts Lösung 5 mM EDTA; pH 8.0
100 x Denhardt`s Lösung	2 % Bovines Serumalbumin (w/v) 2 % Ficoll 2 % Polyvinylpyrolidon add. 500 ml H_2O, sterillfiltrieren, bei -20°C lagern

3.2.4.12 Radioaktive Markierung von DNA mit Zufallsoligomeren

Durch Hybridisierung mit einer pSR19-Sonde wurde die virale DNA im *Southern Blot* identifiziert. Diese Sonde wurde mit dem *Megaprime™ DNA labelling system* (Amersham) nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Dafür wurden ca. 50ng der DNA auf Eis mit 5µl der Primerlösung (Zufallsoligomere aus dem Kit) gemischt, auf 33µl mit H_2O aufgefüllt und für 5min auf 95°C erhitzt, danach weitere 5min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 10µl Markierungspuffer (aus dem Kit) mit Desoxiribonukleotiden, 50µCi [α^{32}P]-dCTP und 2µl Klenow-Enzym (aus dem Kit) hinzugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 150µl TE-Puffer (3.2.4.1) zur Volumenvergrößerung wurden nicht inkorporierte Nukleotide durch Passieren des Ansatzes über eine Sephadexsäule G-50 (Pharmacia) abgetrennt. Die Inkorporationsrate wurde über einen Cerenkov Counter (Bioscan) bestimmt und die radioaktiv markierte DNA nach 5min Denaturierung bei 95°C als Sonde in einer Hybridisierungsreaktion eingesetzt.

3.2.5 Proteinpräparation und -analyse

3.2.5.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen

3.2.5.1.1 Proteinextrakte aus mit ^{32}P-Orthophosphat markierten Zellen

Die Zellen wurden nach der 4h Inkubationszeit in [^{32}P]-Orthophosphat enthaltendes MEM-minus Medium (Kap. 3.2.1.6) in der Kulturschale mit 1xPBS (3.2.1.6) gewaschen, auf Eis gestellt und mit 1ml RIPA-Puffer bedeckt. Dann wurden die Proteine unter gelegentlichem Schwenken für 30-60min auf Eis extrahiert, anschließend die Zelltrümmer abgeschabt und zusammen mit dem Puffer in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10min, 1500rpm, 4°C) pelletiert, der Überstand als Zellextrakt abgenommen und bei -70°C gelagert.

RIPA-Puffer:
150 mM NaCl
10 mM Tris/HCl, pH 7.5
1 mM EDTA
1 % NP-40
0.5 % Na-Deoxycholat
0.1 % SDS

Zum Puffer wurde direkt vor dem Gebrauch Proteaseinhibitoren (Boeringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers zugegeben.

3.2.5.1.2 Gesamtzellextrakte für Immunpräzipitationen

Die Säugerzellen wurden in den Kulturschalen 2x mit PBS (3.2.1.6) gewaschen bevor sie in 1ml PBS (3.2.1.6) von der Kulturschale abgeschabt und in eine 15ml Falcontube überführt wurden. Es folgte eine Zentrifugation (5min, 1500rpm), wonach das Zellpellet in 850µl hypotonischem Puffer resuspendiert wurde. Der Ansatz wurde 20min auf Eis inkubiert und anschließend mit einem *Douncer* homogenisiert. Die aufgebrochenen Zellen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 750mM NaCl versetzt und für weitere 30min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (13000rpm, 10min 4°C) wurde der Proteinextrakt von den Zelltrümmern abgetrennt. Eine Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach der Bradford-Methode (Kap. 3.2.5.2).

Hypotonischer-Puffer	20 mM Hepes
(pH 7.5):	5 mM KCl
	7.5 mM $MgCl_2$

Zum Puffer wurden direkt vor dem Gebrauch Proteaseinhibitoren (Boeringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers zugegeben.

3.2.5.1.3 Gesamtzellextrakte für 1D-SDS-PAGE

Die Zellen wurden trypsiniert, abzentrifugiert (1000rpm, 3min, RT) und 1x mit PBS (3.2.1.6) gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauerzählkammer wurden die Zellen nach erneuter Zentrifugation pelletiert und in 2x Lämmli-Puffer aufgenommen (75µl 2x Lämmli pro 10^6 Zellen). Nach einer Ultraschallbehandlung zur Zerstückelung der Nukleinsäuren wurde der Proteinextrakt sofort für die 1D-SDS-PAGE verwendet oder bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

2x Lämmli:	50 mM Tris/HCl; pH 6.8
	12 % Glycerin
	4 % SDS
	2 % ß-Mercaptoethanol
	0,1 % Bromphenolblau

3.2.5.1.4 Gesamtzellextrakte für 2D-SDS-PAGE

Die Zellen wurden trypsiniert, abzentrifugiert (1000rpm, 3min, RT) und 1x mit PBS (3.2.1.6) gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauerzählkammer wurden die Zellen nach erneuter Zentrifugation pelletiert. Ca. $4x10^6$-Zellen wurden in 350µl Harnstoff (9M) aufgenommen und mit 0.015g CHAPS, 1.75µl Ampholine (IPG, pH 4-7) und 3.75µl DTT (1M) versetzt. Das Proteingemisch wurde dann für 30min bei 30°C unter ständigem Rollen inkubiert und anschließend auf QIAshredder™-Röhrchen (Qiagen) überführt und bei 13000rpm für 1min abzentrifugiert. Der Proteinextrakt wurde direkt zur 2D-Analyse verwendet.

3.2.5.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Proteinassay-Farbreagenz von BioRad. Dazu wurden 2-10µl des Proteinextrakts mit 1ml verdünntem Farbreagenz (1:5 in H_2O) sorgfältig gemischt und 5-10min bei RT inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde bei 598nm im Photometer (Pharmacia) gemessen und die Proteinkonzentration durch Vergleich mit zuvor durchgeführten Standardreihen ermittelt. Als Referenz-Protein diente BSA mit einer Konzentration von 10µg/µl.

3.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.2.5.3.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D-PAGE)

Mit dieser Technik nach Lämmli (1970) werden Proteine nach ihrer Größe in einer Polyacrylamidmatrix aufgetrennt. Da der Probenpuffer SDS enthält, spielt die Faltung und Eigenladung der Proteine keine Rolle. Die Sammelgele enthielten dabei 5% (w/v) Polyacrylamid und die Trenngele 10%. Die Gele wurden in die Gelkammer (Biorad) eingespannt und mit Laufpuffer überschichtet. Vor dem Auftragen wurden die Proben 1:1 (v/v) mit 2x Lämmli-Puffer (3.2.5.1.3) versetzt und dann 5min auf 95°C erhitzt. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte die Elektrophorese über Nacht bei einer Stromstärke von 10mA pro Gel.

Trenngel (40 ml): 10 ml 1.5M Tris; pH 8.8
13.3 ml 30% Acrylamid-Mix
15.9 ml H_2O
0,4 ml 10% APS
0,4 ml 10% SDS
20 µl TEMED

Sammelgel (10ml): 1.25 ml 0.5M Tris ; pH 6.8
1.5 ml 30% Acrylamid-Mix
7.1 ml H_2O
0,1 ml 10% APS
0,1 ml 10% SDS
10 µl TEMED

Laufpuffer: 25 mM Tris
192 mM (w/v) Glycin
0.1 % (w/v) SDS

3.2.5.3.2 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)

Mit dieser Technik werden Proteine zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt mit dem IPGphor^{TM}-Focusing System (Pharmacia) und danach nach ihrem Molekulargewicht in einer 1D-SDS-PAGE aufgetrennt. Für die isoelektrische Fokusierung wurden Proteinextrakte wie in Kap. 3.2.5.1.4 oder nach Alkalischer Phosphatase-Behandlung wie im Kap. 3.2.5.5 beschrieben vorbereitet. Die 350µl Extrakt wurden auf ein 2D-Schiffchen pipettiert und auf diese Probe wurde dann ein Gelstreifen („*Immobiline Drystript*“ pH 4-7) luftblasenfrei gelegt und mit „*Cover Fluid*“ bedeckt. Anschließend wurde das Schiffchen in die Maschine positioniert und die Proteine nach folgendem Programm aufgetrennt: 12h Rehydrierung bei 20°C, 1h bei 500V, 1h bei 1000V und so lange bei 8000V bis 75000-80000 V/h erreicht sind. Für die Auftrennung in der zweiten Dimension (nach Molekulargewicht) wurde die Gelstreifen 2x für 10min in Equilibrierungspuffer inkubiert und anschließend auf einem 10% SDS-PAA-Gel (Kap. 3.2.5.3.1) ohne Sammelgel horizontal gelegt und mit 1% Agarose (plus eine Spatelspitze Bromphenolblau) überschichtet. Die Gelelektophorese wurde wie in Kap. 3.2.5.3.1 beschrieben durchgeführt.

Equilibrierungspuffer: 50 mM Tris, pH 8.8
6 M Harnstoff
30 % Glycerol
2 % SDS
eine Spatelspitze Bromphenolblau

3.2.5.4 Transfer von Proteinen (*Western Blot*)

Elektrotransfer:

Der Elektrotransfer der über 1D- oder 2D-SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose (Hybond^{TM}-C extra) erfolgte nach dem *Semi-Dry*-Verfahren mit einer *Trans-Blot*-Apparatur von BioRad. Der Aufbau für den Elektrotransfer ist in Abb. 3-1 dargestellt. Transferiert wurde für 1,5h bei 25V und 200mA.

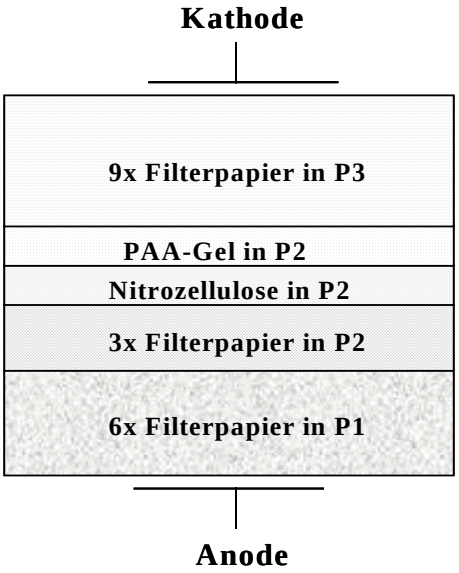


Abb. 3-1: Aufbau einer *Western Blot*-Apparatur für den Elektrotransfer von SDS-PAA-Gelen nach dem *Semi-Dry*-Verfahren. Die Filterpapiere, die Nitrozellulose und das Gel wurden wie dargestellt luftblasenfrei übereinander gestapelt und die Proteine nach Anlegen einer Spannung (25V, 200mA) vom Gel auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

P1: 300 mM Tris, pH 10.4; 20% Methanol
P2: 25 mM Tris, pH 10.4; 20% Methanol
P2: 25 mM Tris, pH 9.4; 40 mM Norleucin

Immunreaktion:

Nach dem Elektrotransfer wurde die Nitrozellulose zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1h bei RT in Blocklösung geschwenkt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (verdünnt in Blocklösung) erfolgte entweder 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nach dem Waschen der Nitrozellulosemembran für 3x 20min in PBS (3.2.1.6) mit 0.5% Tween 20 wurde der Zweitantikörper (1:10000 verdünnt in Blockierlösung) zugegeben und für 45min bei

RT inkubiert. Nach nochmaligem Waschen für 3x 20 min in PBS mit 0.5% Tween 20 folgte eine (ECL)- oder BCIP/NBT-Detektion der Proteine.

Blockierlösung:	10 % Trockenmilch
	0.5 % Tween
	in 1x PBS (3.2.1.6)

ECL-Detektion:

Bei einem HRP *(horseradish peroxidase)* konjugierten Zweitantikörper wurde eine ECL-Detektion (*enhanced-chemi-luminescence,* Amersham) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch unterschiedliche Expositionszeiten der Nitrozellulose auf einem Röntgenfilm (X-Omat AR, Kodak) konnten die Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

BCIP/NBT-Detektion:

Eine BCIP/NBT-Detektion (BCIP/NBT-Color Development Substrate; Promega) kann nur verwendet werden, wenn der Zweitantikörper AP (*Alkalische Phosphatase*) konjugiert ist. Der Protein-Nachweis wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Membran wurde in der Substrat-Lösung so lange geschwenkt, bis die Proteine sichtbar wurden.

3.2.5.5 Alkalische Phosphatase-Behandlung von Proteinen

Um die durch Immunpräzipitation (Kap. 3.2.5.11) an der Protein Sepharose A gebundenen Proteine durch Alkalische Phosphatase aus Kälberserum zu dephosphorylieren wurde das Sepharose-Pellet in 215µl hypotonischem Puffer (Kap. 3.2.5.1.2) aufgenommen, 100µl Alkalische Phosphatase (1U/µl) und 35µl 10x AP-Puffer zugegeben. Nach einer Inkubation für 45min bei 37°C wurde das Sepharose-Pellet 3x mit hypotonischem Puffer gewaschen und in 350µl 9M Harnstoff mit 0.015g CHAPS, 1.75µl Ampholine (IPG, pH 4-7) und 3.75µl DTT (1M) aufgenommen. Es erfolgte eine Inkubation für 30min bei 30°C und eine anschließende Zentrifugation bei 1500rpm für 3min (RT). Der Überstand wurde dann direkt auf einem 2D-Schiffchen pipettiert und wie in Kap. 3.2.5.3.2 beschrieben, die Proteine in 2D-PAGE analysiert.

AP-Puffer (10x): 100 mM Tris (pH 8.0)
100 mM NaCl
5 mM Mg_2Cl

3.2.5.6 Expression und Aufreinigung von GST und GST-Fusionsproteinen

E. coli Bakterien BL21DE3, die mit den pGEX-5X-2-Derivaten transformiert waren, wurden über Nacht bei 37°C in LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin unter Schütteln bei 200rpm inkubiert. Die Übernacht-Kultur wurde dann in frischem LB/amp-Medium (4x1l) 1:10 verdünnt und bei 30°C bis zu einer OD_{578} von 0.6 wachsen gelassen. Durch Zugabe von 1mM IPTG wurde die GST-Proteinexpression induziert und weitere 3h bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 5000rpm bei 4°C abzentrifugiert und 1x mit eiskaltem NTN-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde dann in 30ml NTN-Puffer mit Protease-Inhibitoren resuspendiert und die Zellen durch Ultraschall-Behandlung (6x 20sec) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden für 30min, bei 4°C und 15000rpm abzentrifugiert und der Überstand mit 500µl Glutathion-Sepharose (Pharmacia) gemischt und für 1-2h bei 4°C gerollt. Anschließend wurden die GST-Proteine 4x mit NTN-Puffer gewaschen (2min; 1000rpm; 4°C) und von der Sepharose durch Zugabe von 5mM Glutathion in 500µl Fraktionen eluiert. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde durch SDS-PAGE überprüft, die Fraktionen mit der maximalen Proteinmenge gepoolt und die Proteinkonzentration durch Proteinbestimmung (3.2.5.2) ermittelt. Kleine Protein-Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis auf weitere Analysen bei -80°C gelagert.

2x NTN: 100 mM Tris (pH 7.5)
240 mM NaCl
1 % NP40

3.2.5.7 Färbung von Proteinen

3.2.5.7.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassiefärbung der Proteingele erfolgte nach Sambrook *et al*. (1989). Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden für 30min in Färbelösung geschwenkt und dann 2-3 mal 30min mit Fixierlösung soweit entfärbt, dass die Proteinbanden gut sichtbar wurden. Das Gel wurde anschließend auf einem Geltrockner unter Vakuum bei 80°C getrocknet.

Färbelösung: 0.25 % Coomassie R260
10 % Essigsäure
45 % Methanol

Fixierlösung: 35 % Methanol
10 % Essigsäure
0.08 % Glycerin

3.2.5.7.2 Silber-Färbung

Für die Silber-Färbung der Proteine wurde das SDS-PAA-Gel zunächst für 60min in Fixierlösung (40% Ethanol; 10% Essigsäure) inkubiert und anschließend 2x mit 30% Ethanol gewaschen. Nach 20min Inkubation in H_2O wurde das Gel für 1min in 0.02% Natriumthiosulfat-Lösung gelegt und wieder mit H_2O gewaschen (2x 20sec). Zum Färben wurde das Gel für 20min bei 4°C in der Färbelösung (0.2% Silbernitrat; 0.025% Formaldehyd) inkubiert und nach nochmaligem Waschen für 20sec mit H_2O in Entwicklerlösung (3% Natriumcarbonat; 0.05% Formaldehyd) für 1-5min gelegt. Nach 2x 10min Waschen mit H_2O wurde das Gel unter Verwendung des Gel Drying Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers getrocknet.

3.2.5.8 Autoradiographie von Polyacrylamid-Gelen

Die radioaktive SDS-PAA-Gele wurden zuerst 20min in einer Isopropanollösung fixiert und dann 20min mit Amplify-Lösung (Amersham) behandelt, auf einem Geltrockner bei 80°C für 2h getrocknet und mit einem Röntgenfilm bei -80°C exponiert.

Isopropanol-Fixierlösung:	25 % Isopropanol
	10 % Essigsäure

3.2.5.9 *In vitro* Transkription/Translation

Die *in vitro* Transkription/Translation von Genen erfolgte mittels dem *TNT Coupled Reticulolysat System* (Promega) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden die Derivate des pBlueskript II SK^+-Vektors verwendet, wo die Gene hinter den T3- oder T7-RNA-Polymerase Promotor kloniert waren. Die Translationsprodukte wurden auf einem SDS-PAA-Gel aufgetragen (1µl pro Ansatz) und anschließend durch Autoradiographie (Kap. 3.2.5.8) analysiert.

3.2.5.10 *In vitro* Protein-Bindungsassay (*Pulldown-Assay*)

Für das *Pulldown-Assay* von Proteinen an GST-Fusionsproteine wurden *in vitro* transkribierte, translatierte und mit ^{35}S-markierte Proteine eingesetzt (Kap. 3.2.5.9). Diese wurden zusammen mit den GST-Fusionsproteinen 1h bei 4°C rotierend inkubiert. Danach wurde die Glutathion-Sepharose hinzugefügt, die die GST-Proteine und die damit assoziierten radioaktiv markierten Proteine bindet. Es folgte eine erneute Inkubation für 30min bei 4°C. Durch kurze Zentrifugation (3min, 1500rpm) wurde die Sepharose mit den adsorbierten Proteinen pelletiert und das Pellet wurde dann 5x mit NTN-Puffer (Kap. 3.2.5.6) gewaschen. Nach Aufnahme des Pellets in 50µl 2x Lämmli-Puffer (Kap. 3.2.5.1.3) wurden die Proben für 5min auf 95°C erhitzt und anschließend auf einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetragen. Die radioaktiv markierten Proteine wurde dann durch Autoradiographie (Kap. 3.2.5.8) sichtbar gemacht.

3.2.5.11 Immunpräzipitation

Immunpräzipitation von ^{32}P-markierten Proteinextrakten:

500µl RIPA-^{32}P- Extrakt (3.2.5.1.1) wurde mit 20µl in Extraktionspuffer (RIPA) äquilibrierter Protein A-Sepharose für 20min bei 4°C rotiert, um Proteine, die unspezifisch an die Sepharose binden, zu entfernen. Nach einer Zentrifugation (1000rpm; 3min) wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 5µl Flag-spezifischem Ak und 2µl für die Bindung an die Protein A Sepharose unkonjugiertem RαM-Ak versetzt. Nach 15min Inkubationszeit bei 4°C wurde zu der Protein/Ak-Mischung 20µl Protein A-Sepharose zugegeben und für 2h bei 4°C rotiert. Nach einer Zentrifugation bei 1000rpm für 3min wurde der Überstand entfernt und das Sepharose-Pellet 5x mit 1ml Extraktionspuffer gewaschen. Die Dissoziation der Proteine von den Sepharose-Beads erfolgte durch Zugabe von 2x Lämmli. Die Proteine wurden in 1D-SDS-PAGE (Kap. 3.2.5.3.1) aufgetrennt und durch Autoradiographie (Kap. 3.2.5.8) und *Western-Blot* (3.2.5.4) analysiert.

Immunpräzipitation von nicht markierten Proteinextrakten:

200µl Gesamtzellextrakt (Kap. 3.2.5.1.2) wurde mit 300µl RAF- oder RIPA-Puffer (3.2.5.1.1) gemischt. Die Immunpräzipitation wurde wie oben beschrieben, durchgeführt. Das Waschen erfolgte immer in den entsprechenden Immunpräzipitationspuffern (RAF oder RIPA). Der Nachweis der immunpräzipitierte Proteinen erfolgte durch Silber-Färbung (3.2.5.7.2).

RAF-Puffer: 137 mM NaCl
20 mM Tris/HCl, pH 8.0
10 % Glycerol
1 % NP-40

3.2.5.12 Immunfluoreszenz

NBE-Zellen wurden auf Deckplättchen (∅: 10mm) kultiviert und entweder mit H1 infiziert oder nicht infiziert. Die Plättchen wurden 2x mit PBS (3.2.1.6) gewaschen und mit 1%-igem Formalin für mindestens 20min fixiert. Die Plättchen wurden dann in eine feuchte Kammer überführt und zuerst für 5min mit kaltem Methanol (-20°C) und dann 2min mit kaltem Aceton

(-20°C) behandelt. Zur Permeabilisierung wurde den Zellen 10min 0.2%-iges TritonX-100 zugegeben und anschließend wurden sie jeweils 2x mit Waschlösung 1 und 2x mit Waschlösung 2 gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen 20min mit Ziegenserum (1:100 in Waschlösung 1) inkubiert. Nach 1-stündiger Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die Zellen jeweils 6x mit Waschlösung 1 und 6x mit Waschlösung 2 gewaschen. Nach Zugabe des Zweitantikörpers wurden die Zellen weiter für 1h im Dunkeln inkubiert und zum Schluss nochmals 6x mit Waschlösung 1 und 6x mit Waschlösung 2 gewaschen. Die Plättchen wurden anschließend jeweils 5sec in eine DAPI-Lösung (Sigma), in Wasser und in $Ethanol_{abs}$ getaucht, luftgetrocknet und mit der zelltragenden Seite auf einem Objektträger mit Elvanol platziert. Nach einigen Stunden, im Dunklen aufbewahrt, konnten die Fluoreszenzen mikroskopisch ausgewertet und fotografiert werden.

1% Formalin: 2,7 ml 37% Formaldehyd-Stocklösung in 100 ml PBS
Waschlösung 1: PBS mit 2 mM $MgCl_2$
Waschlösung 2: PBS mit 0.2% Tween 20 und 0.2% NP40

4 Ergebnisse

SGT ist ein funktionell wenig analysiertes, ubiquitär exprimiertes Protein, das als zellulärer Interaktionspartner des parvoviralen NS1-Proteins identifiziert wurde. Aufgrund posttranslationeller Modifikation können mindestens drei SGT-Isoformen nachgewiesen werden. (Cziepluch *et al*., 1998; Kordes *et al*., 1998). Vor kurzem wurde SGT als Mitglied eines neuronalen Komplexes beschrieben, der als spezifische Chaperon-Maschinerie eine Aufgabe in der Vesikel-vermittelten synaptischen Signaltransduktion übernimmt (Tobaben *et al*., 2001). Nach parvoviraler Infektion akkumuliert SGT gemeinsam mit NS1 in subnukleären Strukturen, den sogenannten APAR-Bodies, die als Orte der parvoviralen Replikation identifiziert wurden (Czieplucht *et al*., 2000; Bashir *et al*., 2001). Darüber hinaus wird SGT in Anwesenheit von NS1 modifiziert. Auf Grund der Akkumulation in APAR-Bodies, der Interaktion mit NS1 und der NS1 induzierten Modifikation, liegt die Vermutung nah, dass SGT funktionell am parvoviralen Replikationszyklus beteiligt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte SGT bezüglich seiner Eigenschaften und Funktionen während der parvoviralen Infektion untersucht und charakterisiert werden. Dazu wurde das Gesamtlänge-Protein und verkürzte SGT-Proteine vergleichend analysiert. Die Region innerhalb des SGT-Proteins, die für die Lokalisation von SGT in APAR-Bodies verantwortlich ist, sollte durch Immunfluoreszenzexperimente identifiziert werden, während der, für die SGT/NS1-Interaktion und die Bildung von Homo-Oligomeren verantwortliche Bereich, durch *in vitro* Interaktionsassays bestimmt werden sollte. Mittels *in vivo* ^{32}P-*Labeling*-Experimenten und zweidimensionaler Gelelektrophorese sollte außerdem die posttranslationelle Modifikation von SGT charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang war eine Kartierung der SGT-Domänen von Interesse, die NS1 abhängig und spezifisch modifiziert werden.

Für funktionelle Analysen wurden verschiedene Methoden angewendet: einerseits wurden Gesamtlängen-SGT bzw. SGT-Detetionsmutanten überexprimiert und andererseits wurde mittels RNAi-Experimente (RNAi: *RNA-interference*) die Proteinmenge von endogenem SGT reduziert. In beiden Fällen wurde die Akkumulation viraler DNA-Replikationsprodukte und viraler Proteine analysiert.

4.1 Domänenstruktur von SGT

In der SGT-Aminosäuresequenz kann eine N-terminale Domäne, eine zentrale TPR-Domäne mit drei TPR-Motiven sowie eine glutaminreiche C-terminale Domäne unterschieden werden. Aufgrund von Sequenzhomologien kann nur die TPR-Domäne mit einer Aktivität in Verbindung gebracht werden, während eine funktionelle Bedeutung des N-Terminus oder der glutamin-reichen C-terminalen Domäne bisher ungeklärt sind. Es ist bekannt, dass TPR-enthaltende Proteine Mitglieder von Multiproteinkomplexen sind, wobei die TPR-Motive bei der Protein-Protein-Interaktion innerhalb dieser Komplexe eine entscheidende Rolle spielen (Goebl & Yanagida, 1991; Lamb *et al*., 1995). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass sowohl bei der Homo-Oligomerisierung von SGT als auch bei der SGT/NS1-Interaktion die TPR-Domäne involviert ist. Um die Domänenstruktur von SGT zu charakterisieren, wurde die kodierende Sequenz der in der Abb. 4-1 dargestellten SGT-Subfragmente in verschiedene Expressionsvektoren kloniert (Abb. 4-2). Während die Derivate des pXFlag-Vektors für die eukaryontische Expression der SGT-Fragmente verwendet wurden, wurden die Derivate des pBlueskript-Vektors (Stratagene) für deren Expression *in vitro* eingesetzt. Die Derivate des Vektors pGEX-5X-2 (Pharmacia) dienten zur bakteriellen Expression von SGT-Proteinfragmenten, welche nach Aufreinigung für *in vitro* Experimente verwendet wurden.

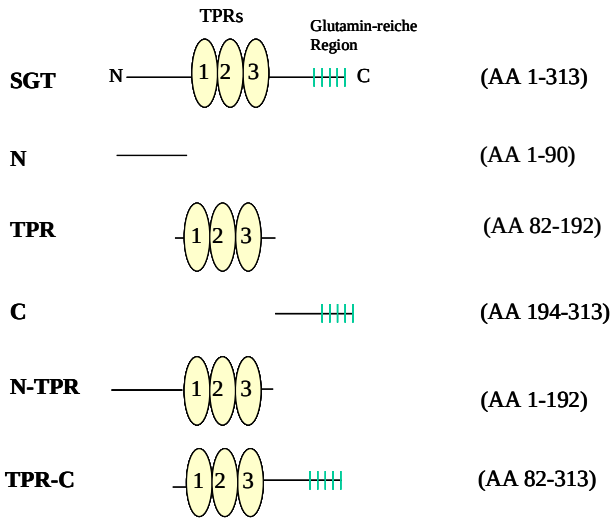


Abb. 4-1: Schematische Darstellung der zu untersuchenden SGT-Subfragmente. Mit TPRs wurden die drei TPR-Motive bezeichnet. N und C, stehen für N- bzw. C-Terminus und die grünen Linien zeigen die Glutamin-reiche Region in C-Terminus. Rechts in Klammern ist die Zahl der Aminosäuren (AA) angegeben.

Für die Klonierung der pXFlag-Vektorderivate wurde die kodierende DNA-Sequenz für alle in der Abb. 4-1 dargestellten SGT-Derivate über PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen BglII/XhoI in den pXFlag-Vektor kloniert (Abb. 4-2A). Diese Vektorderivate ermöglichen mittels CMV-Promotor die starke Expression der verschiedenen SGT-Subfragmente als Flag-Fusionsproteine in eukaryontischen Zellinien. Der Flagtag ermöglicht unter anderem den Nachweis aller Fusionsproteine mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Flag-spezifischen Antikörpers (α-Flag M2, Sigma), ohne Kreuzreaktionen mit dem endogen exprimierten SGT.

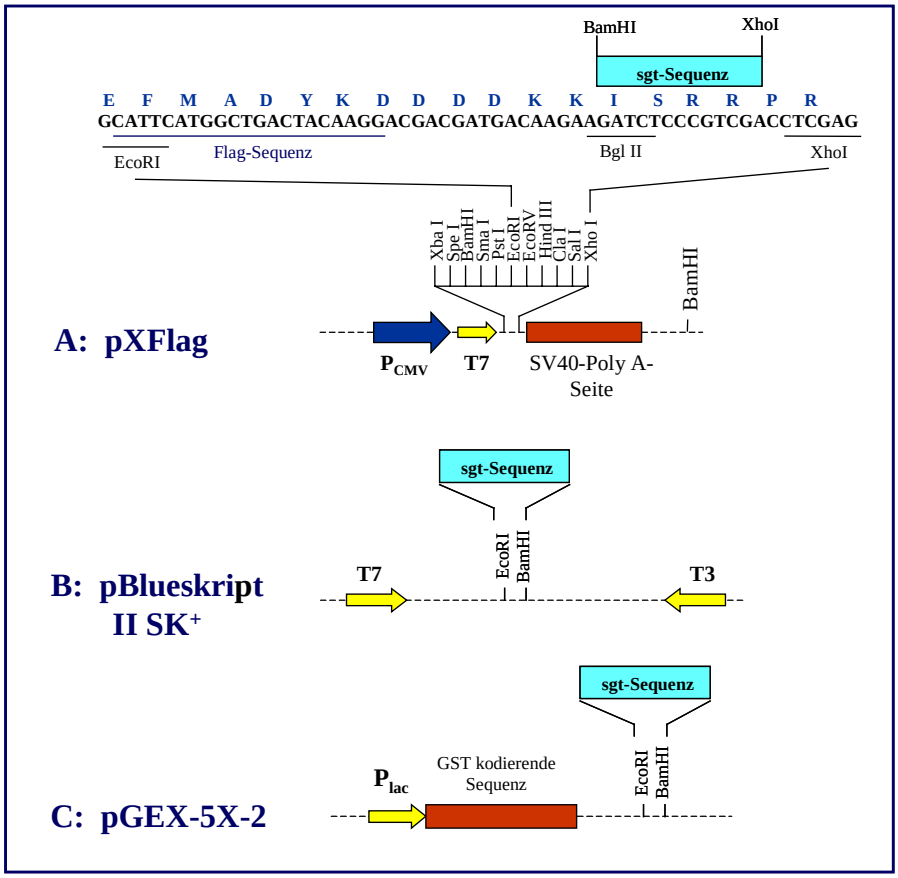


Abb. 4-2: Schematische Darstellung der Klonierungsregion der verwendeten Expressionsvektoren

A: Klonierungsregion des für die *in vivo* Expression verwendeten pXFlag-Vektors. Die Flag-Sequenz ist in der multiplen Klonierungsregion des pX-Vektors über die Restriktionsschnittstellen EcoRI/XhoI kloniert. Die blauen Buchstaben geben die Flag-Aminosäuresequenz an. Die DNA, die für SGT und SGT-Deletionsmutanten kodiert, wurde über PCR amplifiziert und in der pXFlag-Vektor über BglII/XhoI kloniert. P_{CMV}: cytomegalovirus early promotor; T7:T7-RNA-Polymerase-Promotor. **B**: Klonierungsregion des pBlueskript II SK$^+$-Vektors (Stratagene). Die DNA, die für SGT und SGT-Deletionsmutanten kodiert, wurde von den pXFlag-Derivaten ausgeschnitten und in diesem Vektor über EcoRI/BamHI kloniert. T7:T7-RNA-Polymerase-Promotor; T3:T3-RNA-Polymerase-Promotor. **C**: Klonierungsregion des pGEX-5X-2-Vektors (Pharmacia). Die DNA, die für SGT und SGT-Deletionsmutanten kodiert, wurde von den pXFlag-Derivaten ausgeschnitten und über EcoRI/BamH1 kloniert. T7:T7-RNA-Polymerase-Promotor; T3:T3-RNA-Polymerase-Promotor. P*lac*: *lac*-Promotor

Für die *in vitro* Expression von SGT-Subfragmenten wurde die DNA aus den pXFlag-Plasmidderivaten ausgeschnitten und über die Restriktionsschnittstellen EcoRI/BamHI in den Blueskript II SK^+-Vektor kloniert (Abb. 4-2B). Diese Plasmide erlauben in *„TNT coupled Reticulocyte Lysate"*-System (Promega) die *in vitro* Synthese der Polypeptide durch ein gekoppeltes Transkriptions- und Translationssystem mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase. Eine gleichzeitige Markierung der Polypeptide mit ^{35}S-Methionin erlaubte den Nachweis durch Autoradiographie. Für die *in vitro* Expression von Gesamtlängen-SGT wurde das schon im Labor vorhandene Plasmid pBlue-SGT verwendet, was die Synthese von SGT unter Verwendung der T3- RNA-Polymerase ermöglichte.

Um eine bakterielle Expression der N-, TPR- und C-Fragmente zu ermöglichen, wurde die kodierende DNA-Sequenz aus den entsprechenden pXFlag-Derivaten ausgeschnitten und über die Restriktionsschnittstellen EcoRI/BamHI in den pGEX-5X-2 kloniert (Abb. 4-2C). Die pGEX-Derivate ermöglichen nach IPTG-Induktion die bakterielle Expression dieser SGT-Fragmente als GST-Fusionsproteine, welche dann als lösliche Polypeptide über eine Glutathion-Sepharose-Säule (Pharmacia) aufgereinigt wurden.

4.1.1 Die TPR-Domäne und der C-Terminus von SGT werden für die Lokalisation in APAR-Bodies benötigt

Durch indirekte Immunfluoreszenzexperimente einerseits und *Western Blot*-Analysen zytoplasmatischer und nukleärer Proteinextrakte andererseits, wurde gezeigt, dass SGT gleichmäßig im Kern und im Zytoplasma lokalisiert ist (Cziepluch *et al*. 1998; Kordes, Diss., 1997). Nach H1-Infektion akkumuliert SGT mit NS1 und andere zelluläre Faktoren, wie Polα/δ, RPA, PCNA und Cyclin A, in APAR-Bodies (Cziepluch *et al*., 2000; Bashir *et al*., 2001). Bislang ist für SGT noch kein Kernlokalisationssignal identifiziert worden. Hier sollte versucht werden, die SGT-Region zu bestimmen, die für die Kernlokalisation und/oder die Akkumulation von SGT in den APAR-Bodies verantwortlich ist.

Zunächst wurde die Verteilung der verkürzten SGT-Proteine, *Flag*N-TPR und *Flag*TPR-C in der Zelle untersucht und ihre Lokalisation mit der des endogenen SGT-Proteins verglichen. Parallel dazu wurde die zelluläre Lokalisation von *Flag*SGT untersucht, um sicher zu stellen, dass der Flagtag *per se* keinen Einfluss auf die zelluläre Verteilung der SGT-Fragmente hat. Zu diesem Zweck wurden NBE-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und mittels $CaPO_4$-

Methode mit den Vektoren pXFlag-SGT, pXFlag-N-TPR oder pXFlagTPR-C transfiziert. 24h später wurden die Zellen fixiert, mit Flag-spezifischen Antikörpern inkubiert und mittels konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

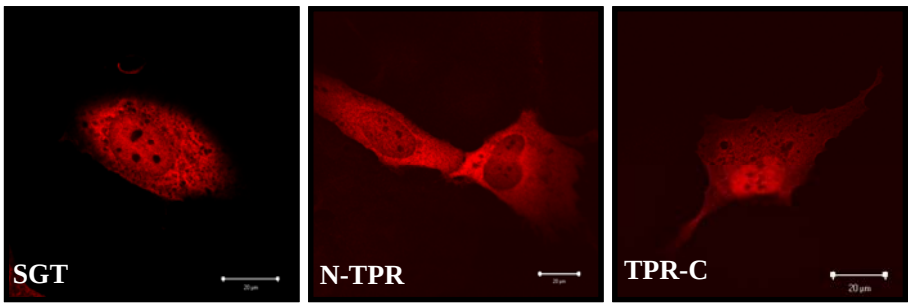


Abb. 4-3: Subzelluläre Lokalisation von *Flag*-SGT und *Flag*-N-TPR und *Flag*-TPR-C in nicht infizierten NBE-Zellen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. $1x10^6$ NBE-Zellen wurden auf Deckplättchen kultiviert und mit 10µg pXFlagSGT (SGT), pXFlagN-TPR (N-TPR) oder pXFlagTPR-C (TPR-C) transfiziert. 24h später wurden die Zellen mit 1% Formalin fixiert und die Lokalisation der exprimierten Proteine durch konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie (LSM510 UV, Carl Zeiss, Jena) analysiert. Für die Detektion der Flag-Fusionsproteine wurde als Erstantikörper der monoklonale Flag-spezifische Ak M2 (1:4000) und als Zweitantikörper ein TRITC-gekoppelter Ziege α-Maus-Antikörper (1:100, rote Fluoreszenz) verwendet.

Wie in der Abb. 4-3 zu erkennen ist, zeigte *Flag*SGT die selbe subzelluläre Verteilung wie das endogene SGT. Es war gleichmäßig im Kern und im Zytoplasma lokalisiert. Dieses Ergebnis zeigte, dass Flagtag keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von SGT hat und deswegen als Fusionsanteil geeignet ist, um die Lokalisationsstudien durchzuführen. Auch *Flag*N-TPR und *Flag*TPR-C waren mit geringen Unterschieden sowohl im Kern als auch im Zytoplasma zu finden. N-TPR kam verstärkt zytoplasmatisch vor, während TPR-C eine überwiegend nukleäre Lokalisation zeigte. *Flag*N-TPR könnte eine Sequenz enthalten, die eine größere Affinität zu zytoplasmatischen Komponenten zeigt, während Sequenzen im C-Terminus für die nukleäre Verteilung/Transport verantwortlich sein könnten. Da aber die N-TPR- wie auch die TPR-C-Mutante ein sehr kleines Molekulargewicht haben und in beiden Kompartimenten detektiert werden konnten, ist eine Diffusion der Proteinfragmente nicht auszuschließen.

Interessant war es nun herauszufinden, ob beide Mutanten bei Infektion mit H1-Virus im Nukleus vorkommen und genauer, ob sie in den APAR-Bodies akkumulieren. Zu diesem Zweck wurden die mit den Flag-Plasmiden transfizierten Zellen zusätzlich mit H1-Virus infiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Flag- bzw. mit NS1-spezifischen Antikörpern

inkubiert. Bei der Immunfluoreszenz-Mikroskopie diente das NS1-Protein als Marker für die Orte der parvoviralen Replikation.

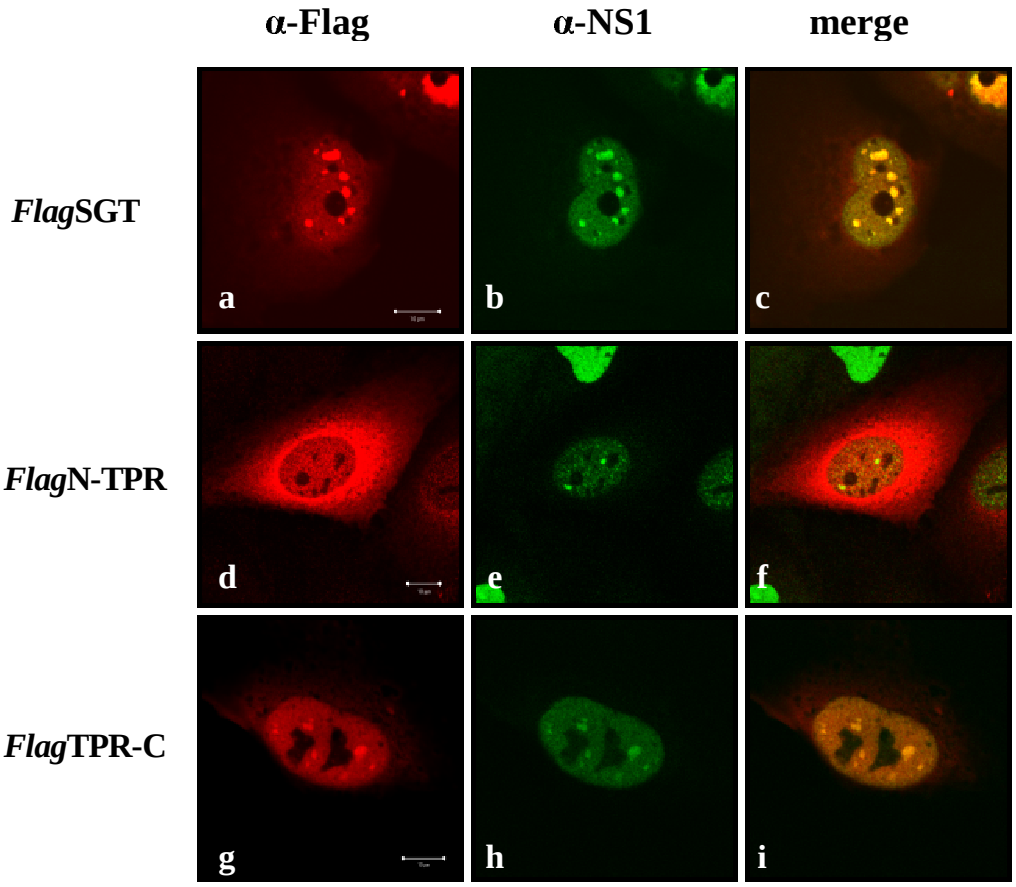


Abb. 4-4: Subzelluläre Lokalisation von *Flag*SGT und *Flag*N-TPR und *Flag*TPR-C in H1 infizierten NBE-Zellen mittels konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie. $1x10^6$ NBE-Zellen wurden auf Deckplättchen kultiviert und mit 10µg pXFlagSGT, pXFlagN-TPR oder pXFlagTPR-C transfiziert. 24h später wurden die Zellen mit H1 (MOI = 10) infiziert und 24h nach Infektion mit 1% Formalin fixiert. Als Erstantikörper wurde für die Detektion von NS1 der polyklonale Sp8-Ak (1:1000; b, e und h) und für *Flag*SGT (a), *Flag*N-TPR (d) und *Flag*TPR-C (g) der monoklonale Flag-spezifische Ak M2 (1:4000) verwendet. Als Zweitantikörper wurde für NS1 ein FITC-gekoppelter Ziege α-Kaninchen-Antikörper (1:100, grüne Fluoreszenz) und für die Flag-Proteine ein TRITC-gekoppelter Ziege α-Maus-Antikörper (1:100, rote Fluoreszenz) verwendet. Nach Überlappung der beiden Kanäle (*merge*; c, f und i) zeigt die gelbe Farbe die Kolokalisation von NS1 mit *Flag*SGT (c) und *Flag*TPR-C (i). *Flag*N-TPR lokalisiert nicht in den APAR-Bodies (f)

In der Abb. 4-4 belegt die gelbe Farbe im *merge* (c) eindeutig, dass NS1 (b) mit *Flag*SGT (a) in den punktartig verteilten APAR-Bodies im Zellkern kolokalisierte, d.h., dass auch hier der Flagtag die Lokalisation von SGT nicht beeinflusste. Eine Akkumulation in den APAR-Bodies war auch bei *Flag*TPR-C (i) zu beobachten. *Flag*N-TPR kolokalisierte dagegen nicht mit NS1 in den parvoviralen Replikationsorten (f) und zeigte eine ähnliche Verteilung wie in nicht infizierten Zellen (Vergleich Abb. 4-3 N-TPR und Abb. 4-4d).

Diese Beobachtungen konnten durch Immunfluoreszenzexperimente mit SGT bzw. SGT-Subfragmenten bestätigt werden, die als *VP22*-Fusionsproteine überexprimiert wurden (Abb. 4-5). Diese Fusionsproteine enthalten das Strukturprotein des HSV-1 (*herpes simplex virus-1*), VP22, als Fusionsanteil an ihrem N-Terminus. An ihrem C-Terminus befindet sich ein *myc*-Epitop sowie ein Histag. Für die Expression der Proteine wurde die DNA über PCR amplifiziert und über TOPO-Klonierung mit dem linearen pVP22/myc-His-TOPO®-Vektor (Invitrogen) ligiert. Bei den Immunfluoreszenzen wurden die Proteine mit Hilfe eines myc-spezifischen Antikörpers sichtbar gemacht.

In Abb. 4-5 ist deutlich zu erkennen, dass wie bei den Flag-Fusionsproteinen *VP*-SGT (a-c) und *VP*-TPR-C (g-i) in APAR-Bodies akkumulierten, während *VP*-N-TPR (d-f) nicht in diesen parvoviralen Replikationsorten lokalisierte. Das VP22-Protein, das hier als Kontrolle diente, lokalisierte unabhängig von einer Infektion im Nukleus (Elliott & O´Hare, 1997), kolokalisierte aber nicht mit NS1 in den APAR-Bodies (j-l).

Es wurden auch N- und C-terminale GFP-Fusionsproteine sowie C-terminale Dsred2-Fusionsproteine konstruiert. Die SGT-Fragmente wurden über PCR amplifiziert und in pGFP-C1-, pGFP-N1 und pDsred2-N1-Vektor über die Restriktionsschnittstellen EcoRI/BamHI reinkloniert. Sowohl bei den N- als auch bei den C-terminalen Konstrukten konnte keine stabile Expression der GFP-Fusionsproteine beobachtet werden. Es liegt wahrscheinlich daran, dass bei diesen Konstrukten der GFP- oder der SGT-Anteil nicht die richtige Konformation einnehmen konnten. Im Gegensatz dazu konnten die SGT-Fragmente als C-terminale Dsred2-Fusionsproteine überexprimiert werden. Als Dsred2-Fusionsproteine zeigten SGT und TPR-C in nicht infizierten Zellen eine ähnliche Lokalisation wie die Flag- und VP22-Fusionsproteine. Dsred2-N-TPR bildete dagegen große Aggregate im Cytoplasma (Daten nicht gezeigt). Seine Expression wie auch die Expression von SGT-Dsred2 schien sehr toxisch für die Zelle zu sein.

Da TPR-C in den APAR-Bodies akkumulierte, sollte auch geklärt werden, ob der C-Terminus oder die TPR-Domäne allein ausreichend für die Lokalisation von SGT in den APAR-Bodies ist. Dafür wurden die TPR-Domäne und der C-Terminus als Flag-Fusionsproteine exprimiert und ihre subzelluläre Lokalisation in infizierten und nicht infizierten Zellen untersucht. Sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Zellen konnten *Flag*TPR und *Flag*C im Nukleus und im Zytoplasma nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Infektion hatte

keinen Einfluss auf ihre subzelluläre Lokalisation. Bei der Verteilung dieser kleinen Fragmente könnte auch eine passive Diffusion in Frage kommen.

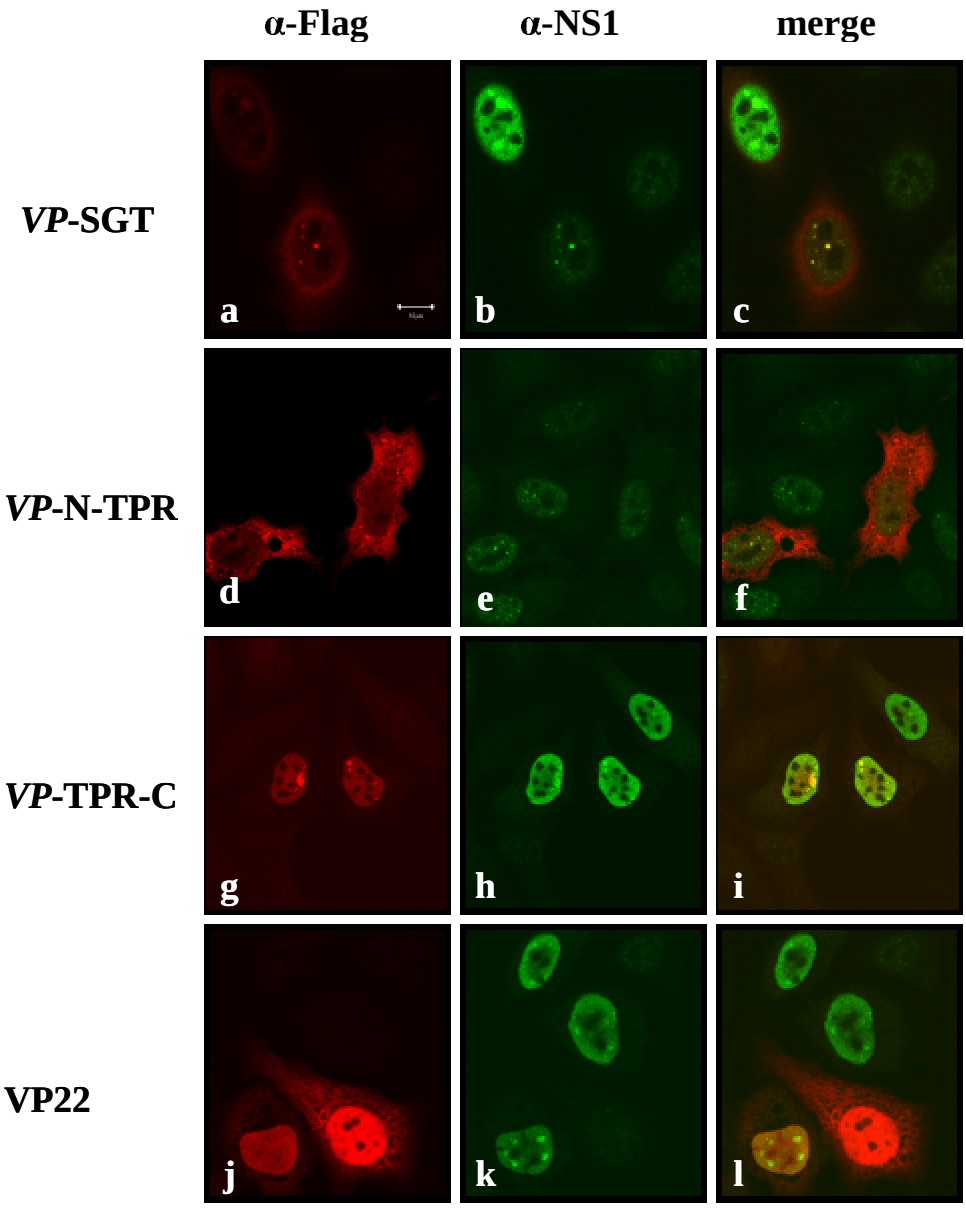


Abb. 4-5: Subzelluläre Lokalisation von VP22, *VP*-SGT, *VP*-N-TPR und *VP*-TPR-C in H1 infizierten NBE-Zellen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. $1x10^6$ NBE-Zellen wurden mit 10µg pVP-SGT, pVP-N-TPR oder pVP-TPR-C transfiziert. 24h später wurden die Zellen mit H1 (MOI = 10) infiziert und 24h nach Infektion mit 1% Formalin fixiert Als Erstantikörper wurde für die Detektion von NS1 der polyklonale Antikörper Sp8 (1:1000; b, e, h und k) und für *VP*-SGT(a) und *VP*-SGT-Subfragmente (*VP*-N-TPR: d; *VP*-TPR-C: g und VP22: j), ein monoklonaler myc-spezifischer Antikörper (Invitrogen; 1:500) verwendet. Als Zweitantikörper wurde für NS1 der FITC-gekoppelte Ziege α-Kaninchen-Antikörper (1:100, grüne Fluoreszenz) und für die VP-Proteine der TRITC-gekoppelte Ziege α-Maus-Antikörper (1:100, rote Fluoreszenz) verwendet. Die Überlappung der beiden Kanäle (merge; c, f, i, l) zeigt die Kolokalisation von SGT(c) und TPR-C(i) mit NS1 in den APAR-Bodies. N-TPR(f) oder VP22(l) akkumulieren nicht in den parvoviralen Replikationsorten.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass die TPR-Domäne und die C-terminale Domäne von SGT ausreichend sind für die korrekte Lokalisation von SGT in APAR-Bodies infizierter Zellen. Die N-terminale Domäne leistet offensichtlich keinen Beitrag zu dieser Positionierung von SGT.

4.1.2 Die Lokalisation von SGT in APAR-Bodies findet unabhängig von der Interaktion mit NS1 statt

Der Einfluss von H1 auf die zelluläre Lokalisation von SGT sowie die Tatsache einer direkten *in vitro* Interaktion von SGT mit NS1 (Cziepluch *et al*., 1998) lassen vermuten, dass die SGT/NS1-Interaktion für die Akkumulation von SGT in APAR-Bodies notwendig sein könnte. Um diese Frage zu klären, wurden SGT-Fragmente auf ihre Fähigkeit hin untersucht mit Gesamtlängen-SGT oder NS1 zu interagieren. Da bisher eine Darstellung der SGT-Oligomerisierung sowie der SGT/NS1-Interaktion *in vivo* mittels Immunpräzipitationen nicht möglich war, wurde für diese Untersuchung ein *in vitro*-System verwendet, der sogenannte *GST-Pulldown Assay*. Dabei wurden NS1, SGT und die verschiedenen SGT-Fragmente, die *in vitro* in einem gekoppelten Transkriptions- und Translationssystem synthetisiert und mit ^{35}S-Methionin radioaktiv markiert wurden, auf ihre Bindung an bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes GST-SGT oder GST-NS1 überprüft. Die radioaktiv-markierten Polypeptide, die an die Fusionsproteine binden konnten, wurden über eine Glutathion-Sepharose-Säule als Komplex gereinigt und über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Mittels Autoradiographie konnten die radioaktiv-markierten Polypeptide dargestellt werden.

In vitro transkribiertes, translatiertes und mit ^{35}S-markiertes N-TPR-Fragment interagierte sowohl mit GST-NS1 (Abb. 4-6A, Spur 2) als auch mit GST-SGT (Abb. 4-6B, Spur 2). Eine Bindung von TPR-C an GST-NS1 (Abb. 4-6A, Spur 3) oder an GST-SGT (Abb. 4-6B, Spur 3) konnte nicht beobachtet werden. Erwartungsgemäß war das Gesamtlänge-SGT (positive Kontrolle) in der Lage, sowohl mit GST-NS1 (Abb. 4-6A, Spur 1) als auch mit GST-SGT (Abb. 4-6B, Spur 1) zu interagieren. Kontrollansätze (Abb. 4-6C) zeigten, dass ^{35}S-markiertes NS1 (Abb. 4-6C, Spur 1) oder SGT (Abb. 4-6C, Spur 3) nicht an GST binden.

Eine Interaktion zwischen GST-SGT oder GST-NS1 mit ^{35}S-markierten N-, TPR- oder C-Domänen von SGT allein konnte nicht gezeigt werden. Da diese SGT-Fragmente sehr klein sind, wurden sie auch als GST-Fusionsproteine in Bakterien überexprimiert und die Bindung

von ^{35}S-markiertem SGT oder ^{35}S–markiertem NS1 an diese Fusionsproteinfragmente untersucht. Eine Interaktion konnte jedoch auch in diesem Fall nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

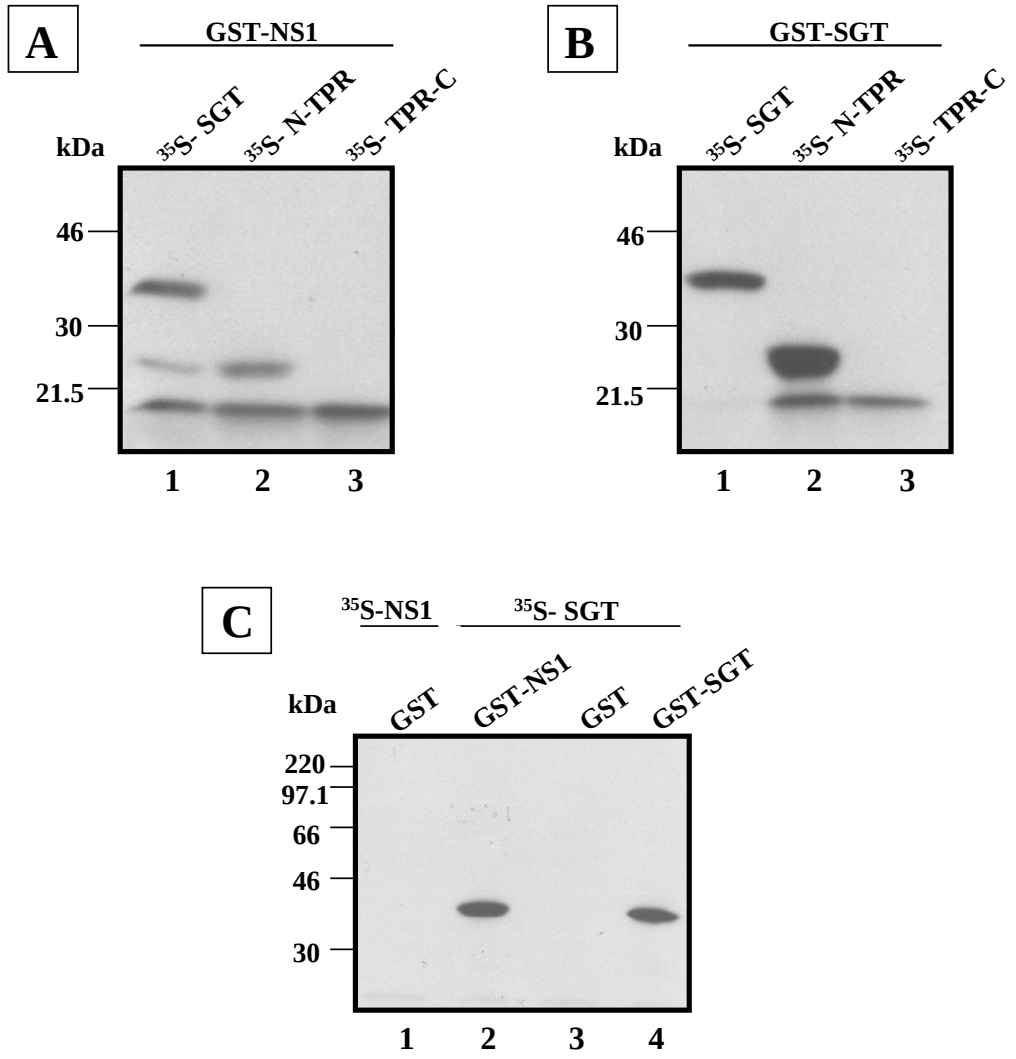


Abb. 4-6: *In vitro* Interaktions-Assay. A: *in vitro* transkribiertes, translatiertes und mit ^{35}S-markiertes SGT (Spur 1), N-TPR (Spur 2) oder TPR-C (Spur 3) wurde in NTN-Puffer mit bakteriell exprimiertem GST-NS1 inkubiert. **B:** bakteriell exprimiertes GST-SGT wurde mit *in vitro* transkribiertem, translatiertem und mit ^{35}S-markiertem SGT (Spur 1), N-TPR (Spur 2) oder TPR-C (Spur 3) in NTN-Puffer inkubiert. **C:** bakteriell exprimiertes GST (Spur 1 und 3), GST-NS1 (Spur 2) oder GST-SGT (Spur 4) wurde mit *in vitro* transkribiertem, translatiertem und mit ^{35}S-markiertem SGT (Spur 2, 3 und 4) oder NS1 (Spur 1) in NTN-Puffer inkubiert.

Alle Ansätze wurden nach Zugabe von Glutathion-Sepharose für 2h bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit NTN-Puffer wurden die an der Glutathion-Sepharose gebundenen Proteine auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Bei manchen Komplexen, an deren Bildung TPR-Motive beteiligt sind, wurde gezeigt, dass nicht nur die TPR-Motive, sondern auch die TPR-flankierenden Sequenzen für die Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung sind (Blatch & Lässle, 1999). Aus diesem Grund und weil TPR-C die TPR-Motive von SGT enthält, aber nicht mit NS1 oder SGT interagiert, wurde ein weiteres Fragment auf seine Fähigkeit an NS1 oder SGT binden zu können, untersucht. Dieses Polypeptidfragment besteht aus dem C-Terminus und der TPR-Domäne von SGT, es ist aber an seinem N-Terminus um vier Aminosäuren länger als TPR-C (AA 87-313). Durch diese vier AA enthält dieses längere TPR-C-Fragment eine vollständige potentielle CKII-Phosphorylierungsstelle mehr als TPR-C, die auch zur Interaktion einen Beitrag leisten könnte. Entgegen unserer Erwartungen war auch dieses Fragment nicht in der Lage mit GST-SGT oder GST-NS1 zu interagieren. (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die TPR-Domäne und die N-terminale Domäne ausreichend sind für die Interaktion mit NS1 oder SGT. Im Gegensatz dazu, ist der C-Terminus von SGT weder für die Oligomerisierung noch für die NS1-Interaktion *in vitro* essentiell.

Diese Ergebnisse sowie die Immunfluoreszenzexperimente (Kap. 4.1.1) ließen den Schluss zu, dass eine direkte Interaktion von SGT mit NS1 nicht für die Lokalisation von SGT in APAR-Bodies verantwortlich ist. Protein-Protein-Interaktion und Lokalisation in APAR-Bodies sind somit zwei unabhängige Aktivitäten von SGT. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass zwischen TPR-C und NS1 *in vivo* eine Bindung besteht, die aber *in vitro* nicht nachgewiesen werden konnte.

4.1.3 NS1 induziert eine subzelluläre Umverteilung von SGT und TPR-C

Die bisher durch die Untersuchungen mit den SGT-Deletionsmutanten erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die *in vitro* SGT/NS1-Interaktion und die Akkumulation von SGT nach H1-Infektion in APAR-Bodies scheinbar unabhängige Aktivitäten von SGT darstellen. Nun war es von Interesse herauszufinden, ob NS1 allein indirekt eine Lokalisationsänderung von SGT verursacht. Dabei ist zu beachten, dass für die Bildung der APAR-Bodies NS1 allein nicht ausreichend ist, sondern zusätzlich die Anwesenheit des viralen Genoms benötigt wird. Da die nachfolgend beschriebenen Experimente auf Transfektionen mit einem NS1-exprimierenden Plasmid basieren, waren diese durch Infektion induzierten subnukleären Strukturen abwesend.

Für diese Experimente wurden NBE-Zellen mit den Plasmiden pXFlagSGT, pXFlagN-TPR oder pXFlagTPR-C und dem NS1-exprimierenden Plasmid, pX-NS1, kotransfiziert. Die Zellen wurden dann 24h nach Transfektion fixiert und mit Flag- bzw. NS1-spezifischen Antikörpern inkubiert und mittels konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Zur Konstruktion des NS1-exprimierenden Plasmids wurde zunächst ein pX-Vektor-Derivat hergestellt durch das Ausschneiden der flag-Sequenz vom pXFlag-Vektor über die Schnittstellen EcoRI und SalI. Über ein doppelsträngiges Oligonukleotid wurde dann über die gleichen Schnittstellen eine BglII-Schnittstelle eingeführt (pXBglII). In diesem pXBglII-Vektor wurde anschließend über BglII/SalI die NS1-kodierende Sequenz aus dem pGBT9-Vektor reinkloniert.

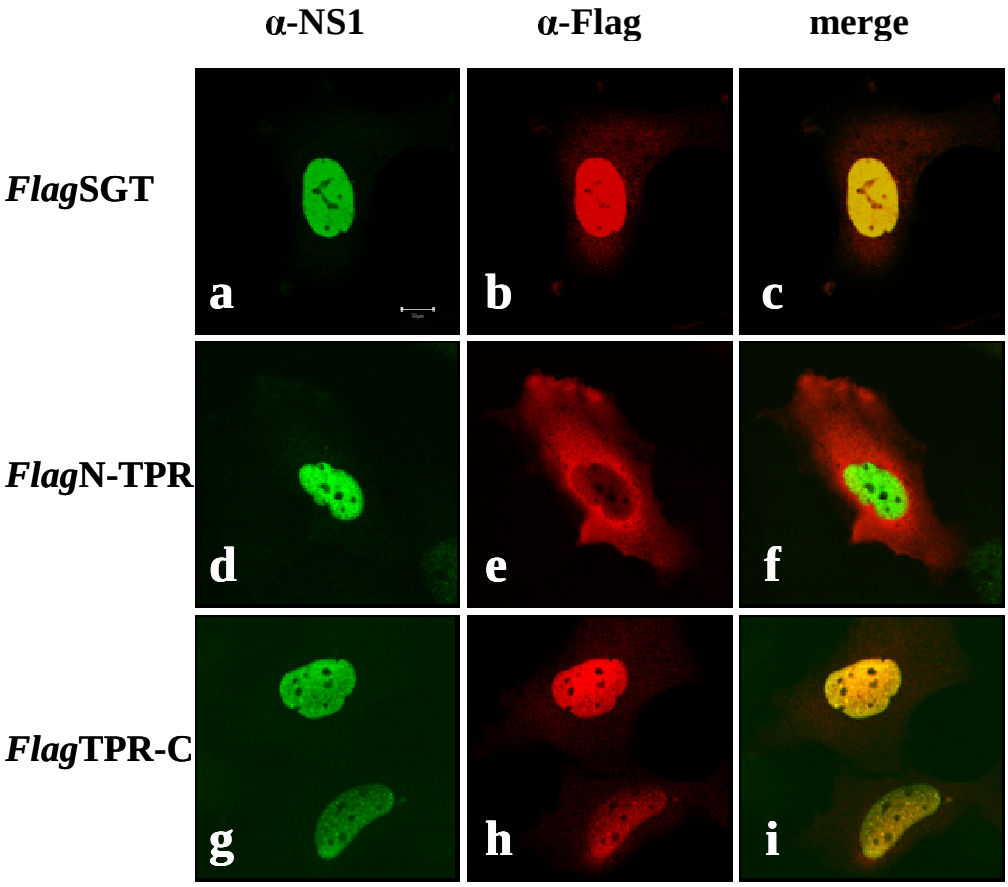


Abb. 4-7: Subzelluläre Lokalisation von *Flag*SGT und *Flag*N-TPR und *Flag*TPR-C in Anwesenheit von NS1 mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. $1x10^6$ NBE-Zellen wurden auf Deckplättchen kultiviert und mit 10µg pXNS1 und 6µg pXFlagSGT, pXFlagN-TPR oder pXFlagTPR-C kotransfiziert. 24h später wurden die Zellen mit 1% Formalin fixiert. Als Erstantikörper wurde für die Detektion von NS1 der polyklonale Sp8-Ak (1:1000; a, d und g) und für SGT (b) und SGT-Subfragmente (e und h) der monoklonale Flag-spezifische Ak M2 (1:4000) verwendet. Als Zweitantikörper wurde für NS1 der FITC-gekoppelte Ziege α-Kaninchen-Antikörper (1:100, grüne Fluoreszenz) und für die Flag-Proteine der TRITC-gekoppelte Ziege α-Maus-Antikörper (1:100, rote Fluoreszenz) verwendet. Im *merge* (c, f und i) ist die Akkumulation von SGT (c) bzw. TPR-C (i) in Anwesenheit von NS1 durch die gelbe Farbe zu erkennen. N-TPR kolokalisiert nicht mit NS1 im Kern (f).

In der Abb. 4-7 ist zu erkennen, dass NS1 zu einer Akkumulation von *Flag*SGT (a-c) und *Flag*TPR-C (g-i) im Kern führte, während die Lokalisation von *Flag*N-TPR (d-f) in Anwesenheit von NS1, wie auch nach Infektion (Abb. 4-4) unbeeinflusst blieb. Dieses Ergebnis zeigte, dass die NS1-induzierte Kernakkumulation und die NS1-Interaktion *in vitro* ebenfalls unabhängige Aktivitäten von SGT sind. *Flag*TPR-C akkumulierte im Kern in Anwesenheit von NS1, aber es interagierte *in vitro* nicht mit NS1. Dagegen interagierte *Flag*N-TPR mit NS1 *in vitro*, akkumulierte aber nicht im Kern. Aus dieser Analyse ließ sich schließen, dass NS1 wahrscheinlich indirekt Einfluss auf die Lokalisation von SGT ausübt, entweder durch die Bildung eines Multiproteinkomplexes mit zusätzlichen zellulären Proteinen oder durch andere NS1-bedingte Veränderungen der Wirtszelle (Anouja *et al*., 1997; Nüesch *et al*., in Vorbereitung).

4.2 Posttranslationelle Modifikation von SGT

Die Funktion und die subzelluläre Verteilung vieler Proteine kann durch posttranslationelle Modifikationen reguliert werden, wobei eine der häufigsten und am besten charakterisierten die Phosphorylierung durch zelluläre Proteinkinasen ist (Marks & Gschwendt, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass sich nach Infektion mit autonomen Parvoviren die Phosphorylierung zellulärer Proteine ändert (Anouja *et al*., 1997). Eine Infektion mit MVM führt unter anderem zur Aktivierung der PDK-1 regulierten Signaltransduktion. Dieses Enzym ist zumindest teilweise für die Aktivierung von Mitgliedern der PKC-Familie während der Infektion verantwortlich, für die bereits eine regulatorische Wirkung auf NS1 nachgewiesen werden konnte (Nüesch *et al*., 1998a; Nüesch *et al*., in Vorbereitung).

Da SGT posttranslationell modifiziert wird und die Art dieser Modifikation in Anwesenheit von NS1 sich ändert (Cziepluch *et al*., 1998), war es wichtig, die posttranslationelle Modifikation von SGT sowie auch deren Veränderungen durch NS1 zu untersuchen. Dabei zählen Phosphorylierungen des SGT-Polypeptids (Kordes, Diss., 1997) zu den naheliegenden Modifikationen, die für eine Regulation auch im Falle einer Infektion in Frage kämen.

4.2.1 SGT ist ein Phosphoprotein

Humanes SGT kann in SDS-PAGE in drei Polypeptidfraktionen aufgetrennt werden (Abb. 4-8A; ohne NS1). Die Hauptfraktion läuft bei einem Molekulargewicht von ungefähr 36kDa (A) und die zwei weiteren Fraktionen (B und C), die in einer geringeren Konzentration vorkommen, haben ein Molekulargewicht von ca. 38kDa bzw. 39kDa (Cziepluch *et al*., 1998). Die zwei höhermolekularen Polypeptidfraktionen (B und C) enthalten SGT-Polypeptide, die mit großer Wahrscheinlichkeit an Serin- und/oder Threoninresten phosphoryliert sind, da nach einer Behandlung von SGT mit Alkalischer Phosphatase diese Polypeptidfraktionen nicht mehr nachgewiesen werden können (Kordes, Diss., 1997).

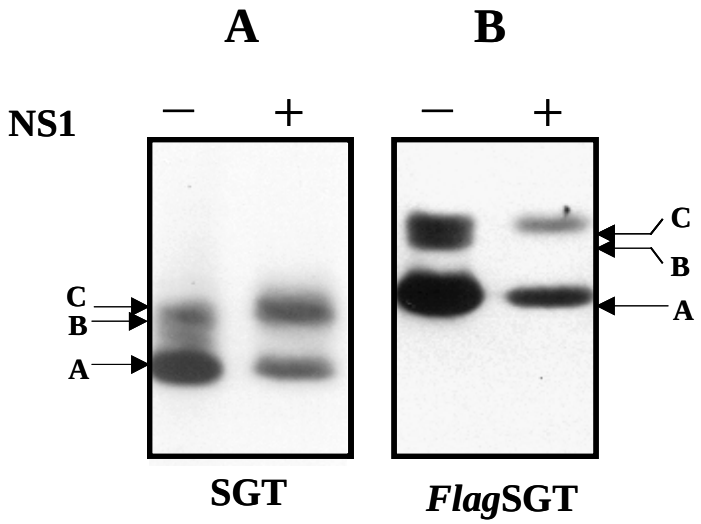


Abb. 4-8: Vergleich der Auftrennung von endogenem SGT und *Flag*SGT in 1D-PAGE in Ab- und Anwesenheit von NS1. A: Modifikation von endogenem SGT ohne [minus-Zeichen (-)] oder nach Transfektion eines NS1-exprimierenden Vektors [plus-Zeichen (+)] (Cziepluch *et al*., 1998). **B:** $2x10^6$ 293T-Zellen wurden mit pXFlagSGT (4µg) transfiziert (-) oder zusätzlich mit pXFlagNS1 (10µg) kotransfiziert (+). 48h nach Transfektion oder Kotransfektion wurden die Zellen durch Zugabe von 2xLämmli lysiert. Die Proteine wurden anschließend in einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membran geblottet. Als Erstantikörper wurde für die Detektion von *Flag*SGT der Flag-spezifische Ak M2 (1:750) und als Zweitantikörper ein HRP-konjugierter Ziege anti-Maus Ak (1:10000) verwendet.

Um zu überprüfen, ob in der Tat SGT posttranslationell phosphoryliert wird und welche Polypeptidfraktionen davon betroffen sind, wurden in Zusammenarbeit mit Laurent Daeffler ^{32}P-*in vivo-Labeling*-Experimente durchgeführt. Dabei wurde die Auftrennung von ^{32}P-markiertem *Flag*SGT aus 293T-Zellen in SDS-PAGE untersucht. Für diese Untersuchungen ist eine Immunpräzipitation notwendig, um phosphoryliertes SGT von den anderen im Extrakt phosphorylierten Proteinen zu trennen. In diesen Experimenten wurde nicht die Phosphorylierung des

endogenen SGT, sondern der *Flag*SGT-Polypeptidfraktionen untersucht, weil eine Präzipitation aller drei SGT-Fraktionen mit den im Labor verfügbaren hSGT-spezifischen Antikörpern nicht möglich war, aber alle drei *Flag*-SGT-Polypeptidfraktionen mit einem Flag-spezifischen Antikörper präzipitierbar waren (Abb. 4-9; WB mit α-hSGT oder mit α-Flag, ohne NS1). *Flag*SGT war für diese Untersuchungen außerdem durchaus geeignet, da es eine ähnliche Auftrennung in SDS-PAGE wie endogenes SGT aufwies (Abb. 4-8B, ohne NS1). Die proportionale leichte Verschiebung des Molekulargewichtes von *Flag*SGT um ca. 3kDa gegenüber dem endogenen SGT ist auf den Flag-Fusionsanteil zurückzuführen.

Für die *in vivo* ^{32}P-*Labeling*-Experimente wurden 293T-Zellen mit dem *Flag*SGT kodierenden Plasmid (pXFlagSGT) transfiziert und 48h später für 4h mit Medium, dass [^{32}P]-Orthophosphat enthielt, inkubiert. Die Proteine wurden aus diesen Zellen mit RIPA-Puffer extrahiert und *Flag*SGT mit Flag-spezifischen Antikörpern präzipitiert. Die *Flag*SGT-Polypeptidfraktionen wurden nach Auftrennung auf einem 10%igen PAA-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und durch Autoradiographie zur Bestimmung der eingebauten Phosphatmenge analysiert. Anschließend wurde durch *Western Blot* mit Flag-spezifischen oder hSGT-spezifischen Antikörpern die Proteinmenge bestimmt.

Ein Vergleich der Menge der drei SGT-Polypeptidfraktionen, die im *Western Blot* entweder mit Flag-spezifischen (Abb. 4-9; α-Flag; ohne NS1) oder hSGT-spezifischen Antikörpern (Abb. 4-9; α-hSGT; ohne NS1) sichtbar gemacht wurde, zeigte, dass die niedermolekulare Hauptfraktion (A) in größerer Menge nachweisbar war als die zwei höhermolekularen Polypeptidfraktionen (B und C), deren Menge sich untereinander kaum unterschied. In der Autoradiographie (Abb. 4-9; ^{32}P; ohne NS1) zeigte sich, dass die Menge des eingebauten Phosphates in der Polypeptidfraktion A größer war als in den zwei oberen Polypeptidfraktionen B und C. Betrachtete man jedoch die Proteinmenge der Polypeptidfraktionen im Verhältnis zur eingebauten Phosphatmenge, so stellte man fest, dass die Polypeptidfraktionen B und C im Vergleich zu der Polypeptidfraktion A hyperphosphoryliert waren.

Diese Ergebnisse zeigten, dass *in vivo* alle *Flag*SGT-Polypeptidfraktionen phosphoryliert sind. Sie unterschieden sich jedoch in ihrem Phosphorylierungsgrad. Es ist nicht auszuschliessen, dass auch der Flagtag phosphoryliert wurde, da er über einen Tyrosin- und einen Serinrest verfügt (Abb.4-2).

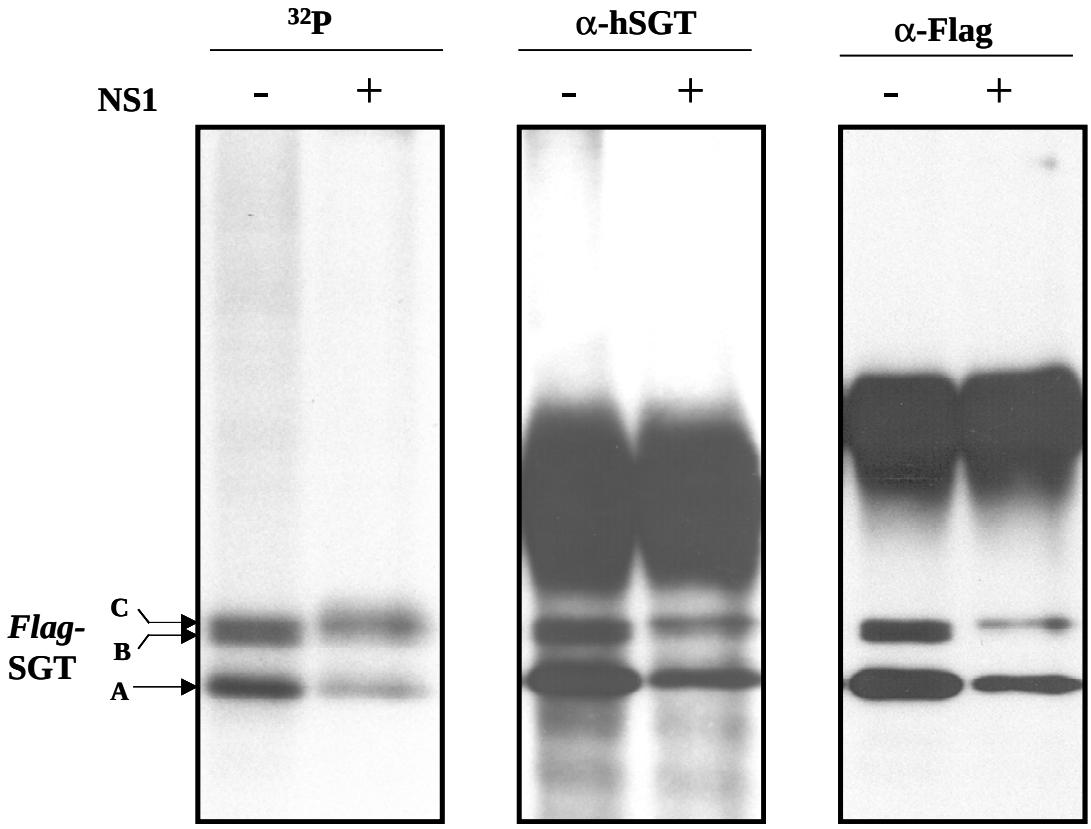


Abb. 4-9: ***In vivo*** **Phosphorylierung von *Flag*SGT.**

$1.5x10^6$ 293T-Zellen wurden mit 2µg pXFlagSGT transfiziert [minus-Zeichen (-)] oder zusätzlich mit 10µg pXFlagNS1 kotransfiziert [plus-Zeichen (+)]. 24h später wurde das Medium durch Phosphat-freies Medium ersetzt und nach Zugabe von [^{32}P]-Orthosphosphat für 4h bei 37°C inkubiert. Nach Herstellung von Gesamtzellextrakten erfolgte Immunpräzipitation mit dem Flag-spezifischen Ak M2 (5µl) und für die Bindung an die Protein A Sepharose notwendigen RaM-Ak (Kaninchen anti-Maus; 2µl). Nach Auftrennung der Proteine auf einem 10% SDS-PAA-Gel und *Blotten* auf Nitrozellulose-Membran wurden die Proteine durch Autoradiographie (^{32}P) sichtbar gemacht. Die gleiche Membran wurde anschließend mit dem hSGT-spezifischen Ak AG1.1 (1:1000; hSGT) oder mit dem Flag-spezifischen Ak M2 (1:750; α-Flag) inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurde ein HRP-konjugierter Ziege anti-Kaninchen Ak (1:10000) bzw. Ziege anti-Maus Ak (1:10000) verwendet. Die Proteine wurden durch ECL-Reaktion detektiert.

4.2.2 NS1 induziert eine Veränderung der SGT-Phosphorylierung

SGT aus nicht infizierten Zellen lässt sich in SDS-PAGE in drei Polypeptidfraktionen nachweisen (A, B und C; Abb. 4-8A, ohne NS1). Dagegen können bei SGT aus infizierten Zellysaten nur zwei SGT-Polypeptidfraktionen unterschieden werden, die den Fraktionen A und C entsprechen (Czieplucht *et al.*, 1998). Dabei nimmt die Konzentration der Polypeptidfraktion C zu, während die mittlere Polypeptidfraktion B nicht mehr nachgewiesen werden kann. Um

zu untersuchen, ob diese NS1-induzierte Modifikationsänderung von SGT ebenfalls durch Phosphorylierung verursacht wird, wurden *in vivo* ^{32}P-*Labeling*-Experimente auch mit pXFlagSGT und pXNS1 kotransfizierten 293T-Zellen durchgeführt. Da NS1 allein eine sehr ähnliche Veränderung von SGT wie eine Infektion induziert (Abb. 4-8A und B, mit NS1; Czieplucl *et al*., 1998) erschien die Analyse dieses Kotransfektionsansatzes durchaus relevant.

Die immunpräzipitierte *Flag*SGT-Proteinmenge wurde mittels *Western Blot* bestimmt und mit der eingebauten Menge an ^{32}P verglichen. Im Gegensatz zur Proteinmenge im *Western Blot*, wo die Polypeptidfraktion A eine eindeutig höhere Konzentration als die Polypeptidfraktion C (Abb. 4-9; α-Flag oder α-hSGT; mit NS1) zeigte, ist Fraktion C wesentlich stärker phosphoryliert als Fraktion A (Abb. 4-9; ^{32}P; mit NS1). Diese Ergebnisse zeigten eindeutig, dass auch durch NS1 eine Veränderung in der Phosphorylierung von SGT induziert wird. Dabei bleibt jedoch unklar, wie diese Veränderung verursacht wird. Es ist wahrscheinlich, dass die Polypeptidformen der Fraktion B in Gegenwart von NS1 hyperphosphoryliert werden und deswegen eine langsamere Migration in SDS-PAGE zeigten. Dies würde eine proportionale Zunahme der SGT-Polypeptidformen nach NS1-Expression in Fraktion C erklären. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Polypeptidformen aus den Fraktionen B und C durch komplexere Dephosphorylierungs- und Phosphorylierungsprozesse auseinander hervorgehen oder dass die Migrationsunterschiede durch andere, nicht Protein-Kinasen abhängige Modifikationen entstehen.

4.2.3 Charakterisierung der Modifikation von SGT mittels 2D-Gelelektrophorese

Um zu untersuchen, ob in SGT neben der Phosphorylierung auch andere Modifikationen durch NS1 induziert werden, wurde die Auftrennung von SGT in Gegenwart von NS1 in 2D-Gelelektrophorese analysiert. Die 2D-Gelelektrophorese ermöglicht oft eine zusätzliche Auftrennung von Polypeptidformen, welche in 1D-PAGE die gleiche Migration zeigen, da eine zusätzliche Auftrennung der Proteine nach dem isoelektrischen Punkt erfolgt (O´Farrell, 1975). Da Phosphorylierungen sowohl eine Erhöhung des Molekulargewichtes als auch eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes des Proteins zum sauren pH-Bereich bewirken können, ist dieses Verfahren unter anderem für Protein-Phosphorylierungsstudien besonders

geeignet (Spector *et al*., 1997). SGT wurde aus zwei Gründen mittels 2D analysiert: zum einen sollten die SGT-Polypeptidformen auf anderen Modifikationen außer Phosphorylierung hin untersucht werden und zum anderen die bisherigen Ergebnisse bezüglich der Phosphorylierung gegebenenfalls bestätigt werden. Um Aufschlüsse über eine mögliche NS1-induzierte Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten zu erhalten, wurde SGT aus NS1-exprimierenden Zellen nach Behandlung mit Alkalischer Phosphatase einer 2D-Analyse unterzogen.

4.2.3.1 SGT setzt sich aus mehr als drei Polypeptidformen zusammen

Da bislang die Auftrennung von SGT nur in 1D-PAGE untersucht wurde, sollte zunächst das Muster der SGT-Polypeptide in Abwesenheit von NS1 in 2D-PAGE analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden 293T-Zellen mit 9M Harnstoff lysiert bzw. aufgeschlossen und die Proteine in 2D-PAGE aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension zunächst in einem pH-Bereich zwischen 3 und 11 und in der zweiten Dimension in einem 10% PAA-Gel. Da sich zeigte, dass alle SGT-Polypeptide immer in einem Bereich zwischen pH 4 und 7 nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurde im folgenden immer eine Auftrennung in diesem pH-Bereich vorgenommen. Die SGT-Polypeptidformen wurden anschliessend durch *Western Blot* mit einem hSGT-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Im Gegensatz zur 1D-Analyse in der nur drei SGT-Polypeptidfraktionen nachweisbar waren (Abb. 4-8A, ohne NS1), ließen sich in Abwesenheit von NS1 in der 2D-Analyse elf verschiedene SGT-Polypeptidformen nachweisen (Abb. 4-10A; mock). Zur besseren Orientierung sind diese SGT-Polypeptidformen in der Abb. 4-10B (mock) schematisch dargestellt und nummeriert. Alle Polypeptidformen hatten ein Molekulargewicht zwischen 36kDa und 39kDa und lagen in einem sauren pH-Bereich zwischen 4.6-5.3. Diese Werte stimmten sehr gut mit dem theoretischen aus der AA-Sequenz berechneten isoelektrischen Punkt des SGT-Proteins überein, der bei 4.62 liegt. Alle Polypeptidformen lagen eng beieinander. Da die vertikale Auftrennung in der 2D-Analyse nicht so gut ist wie in einer 1D-Analyse, ist es schwierig, die SGT-Polypeptidformen den in der 1D-Analyse nachweisbaren drei SGT-Polypeptifraktionen (Abb. 4-8A, ohne NS1) zuzuordnen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die in grauer Farbe dargestellten Polypeptidformen (1-5) zu der in der 1D-PAGE nachweisbaren Polypeptidfraktion A (36kDa) gehören, während die in blauer (6-8) und in gelber Farbe (9-11) dargestellten Polypeptidformen den Polypeptidfraktionen B bzw. C (38kDa bzw. 39kDa) zugeordnet werden

können. Die Polypeptide 6-11 lagen in einem stärker sauren Bereich als die Polypeptidformen 1 und 2, die eindeutig der Fraktion A zugeordnet werden können. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit einer Auftrennung, die man bei Modifikationen durch Phosphorylierung erwartet würde, weil eine Phosphorylierung eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes eines Proteins zu einem stärker sauren Bereich bewirken kann (Spector *et al.*, 1997). Zu Fraktion A gehören neben den Polypeptidformen 1 und 2 wahrscheinlich auch die Polypeptidformen 3, 4 und 5, die einen niedrigeren isoelektrischen Punkt als die Polypeptide 1 und 2 zeigten. Dies könnte darauf hinweisen, dass auch diese SGT-Polypeptide durch Phosphorylierung modifiziert wurden. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit dem Resultat des ^{32}P-*Labeling*-Experiments (Abb. 4-9) überein, in dem in allen drei 1D-Polypeptidfraktionen von SGT eine metabolische ^{32}P-Markierung nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass SGT aus mehr als drei Polypeptidformen besteht, wobei die meisten dieser Formen vermutlich phosphoryliert sind.

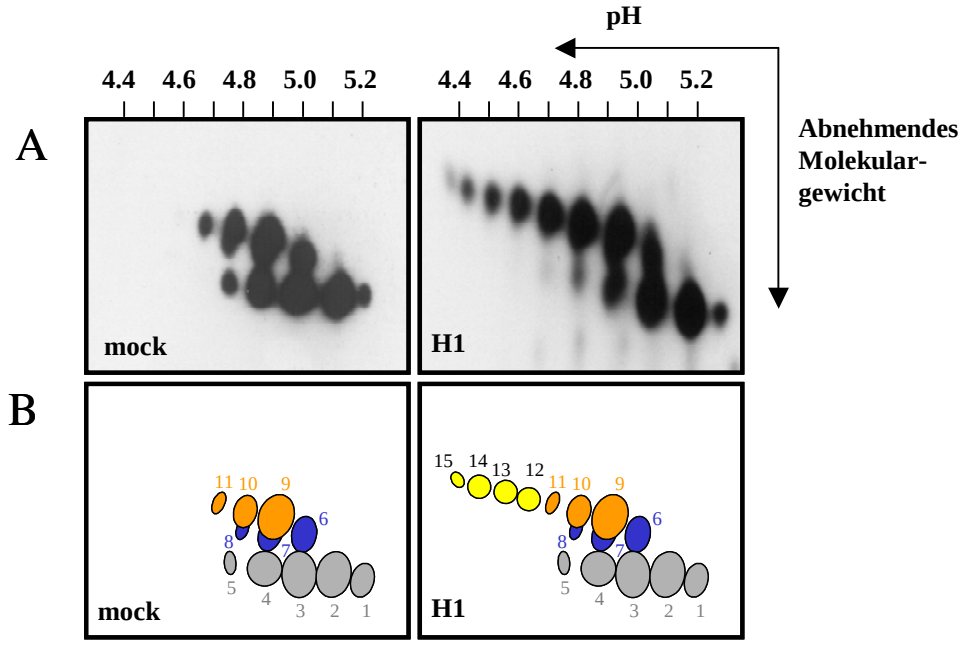


Abb. 4-10: Modifikation von endogenem SGT.

A: Auftrennung der SGT-Polypeptide von nicht infizierten 293T-Zellen (mock) und H1 infizierten Zellen (H1) in 2D-*Western Blot*-Analyse. Die Zellen wurden im Fall einer Infektion mit einer MOI von 10 infiziert. 48h später wurden die Zellen mit 9M Harnstoff aufgeschlossen. Die Proteine wurden in der ersten Dimension in einem pH-Bereich von 4 bis 7 und in der zweiten Dimension in einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetrennt und durch *Western Blot* analysiert. Zur Detektion von SGT wurde als primärer Ak der SGT-spezifische AG1.1 (1:1000) und als sekundärer Ak ein HRP-konjugierter Ziege anti-Kaninchen Ak (1:10000) verwendet. **B:** Schematische Darstellung der SGT-Polypeptide aus nicht infizierten Zellen (mock) oder aus infizierten Zellen (H1). Die grauen, blauen und gelben Punkte stellen die SGT-Polypeptide in mock dar. Die gelben Punkte entsprechen den SGT-Polypeptiden, die nur nach einer Infektion zusätzlich nachweisbar sind.

4.2.3.2 Eine H1-Infektion induziert die Entstehung neuer SGT-Polypeptidformen

Im weiteren sollten die SGT-Polypeptidformen in Gegenwart von NS1 in der 2D-Gelelektrophorese untersucht werden. Dazu wurden 293T-Zellen mit H1-infiziert und 48h später wurde die Auftrennung von SGT in 2D-PAGE wie im vorherigen Abschnitt (4.2.3.1) beschrieben analysiert.

In infizierten 293T-Zellextrakten konnten in der 2D-PAGE alle SGT-Polypeptidformen nachgewiesen werden, wie in nicht infizierten Zellextrakten, und darüber hinaus noch vier neue Formen (Abb. 4-10; H1; 12-15). Diese Infektions-spezifischen Polypeptidformen haben ein Molekulargewicht von annähernd 39kDa und können der Polypeptidfraktion C zugeordnet werden (Abb. 4-8A; mit NS1). Ihr isoelektrischer Punkt lag in einem stärker sauren Bereich als der isoelektrische Punkt der SGT-Polypeptide aus nicht infizierten Zellen. Diese Beobachtung wurde als Hinweis darauf gewertet, dass die Infektions-spezifischen SGT-Polypeptide durch zusätzliche Phosphorylierungen entstehen. Dieses Ergebnis bestätigte die Befunde mit *Flag*SGT aus *in vivo* ^{32}P-*Labeling*-Experimenten (Abb. 4-9), die ebenfalls auf eine Hyperphosphorylierung der Fraktion B nach NS1-Expression schließen ließ. Außer den vier Signalen, die von den Infektions-spezifischen Polypeptiden hervorgehen, sind noch Intensitätsunterschiede bei anderen SGT-Polypeptidsignalen zu beobachten, die auch in nicht infizierten Zellen nachweisbar sind. Ein Vergleich zwischen nicht infizierten und H1-infizierten Zellen (Abb. 4-10) zeigte, dass die Intensität der Signale der Polypeptide 4 und 6 deutlich abnahm, während die Signale der Polypeptide 8, 10 und 11 stärker wurden. Das Polypeptid 5 war fast nicht mehr nachweisbar. Eine Intensitätsveränderung der Polypeptidsignale 1, 2, 3 und 9 konnte nicht beobachtet werden. Bei Polypeptiden 3 bis 11 war außerdem eine leichte Verschiebung in Richtung höheres Molekulargewicht festzustellen. Da die SGT-Polypeptide eine stufenartige Anordnung zeigten und die vertikale Auftrennung bei 2D nicht gut ist, kann über eine Zuordnung der Polypeptidsignale 1 bis 5 zur 36kDa-Bande (A) und der restlichen (6-14) zu 39kDa-Bande (C) von SGT nur spekuliert werden. Eine 2D-Analyse „gemischter Proben“, bei denen die Extrakte aus nicht infizierten und infizierten Zellen vor der Analyse vereinigt wurden, zeigte, dass die SGT-Polypeptide 1 bis 11 beider Extrakte ein identisches Laufverhalten aufwiesen und es sich deshalb um die jeweils selben SGT-Polypeptidformen handelte (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigten, dass bei einer Infektion zusätzliche Modifikationen an SGT-Polypeptiden stattfinden, und sie weisen stark auf eine durch Infektion induzierte Hyperphosphorylierung von SGT hin.

4.2.3.3 NS1 induziert Serin-/Threoninphosphorylierungen von SGT

Um zu klären, ob die Hyperphosphorylierung der SGT-Polypeptidformen, die in der 2D-Analyse in Anwesenheit von NS1 nachgewiesen werden konnten, durch Phosphorylierungen an Serin-/ Threoninresten verursacht werden, wurde eine 2D-Analyse mit Extrakten durchgeführt, die zuvor mit Alkalischer Phosphatase behandelt worden waren. Die Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das die Hydrolyse von Phosphatgruppen an Serin- und Threoninresten katalysiert, nicht aber die Phosphatgruppen an Tyrosinresten entfernt (Shenoliker & Ingebritsen, 1984).

Die beste Auftrennung der SGT-Polypeptidformen in der 2D-Analyse ist aus mit Harnstoff gewonnenen Extrakten erzielt worden. Diese Extrakte können aber mit Alkalischer Phosphatase nicht behandelt werden, da das Enzym durch den Harnstoff denaturiert und dadurch inaktiviert wird. Andererseits ist nach Alkalischer Phosphatase-Behandlung eine 2D-Analyse nicht möglich, da der Reaktionspuffer dieses Enzyms eine für die 2D-Analyse zu hohe Salzkonzentration aufweist. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde zuerst eine Immunpräzipitation mit einem Flag-spezifischen Antikörper aus Extrakten von 293T-Zellen durchgeführt, die zuvor mit dem *Flag*SGT kodierenden Plasmid (pXFlagSGT) entweder allein oder zusammen mit pXNS1 (NS1-kodierendes Plasmid) transfiziert worden waren. Die an der Protein A Sepharose gebundenen Proteine wurden dann mit Alkalischer Phosphatase in dem entsprechenden Puffer für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde das Sepharose-Pellet mit 9M Harnstoff versetzt und eine 2D-Analyse durchgeführt. Zur Kontrolle wurde statt Alkalischer Phosphatase eine vergleichbare Menge an BSA zugesetzt.

Der *Western Blot* (Abb. 4-11) zeigte, dass die Auftrennung von *Flag*SGT in Abwesenheit von NS1 (mock) oder in Gegenwart von NS1 (H1 und NS1) in der 2D-PAGE dem des endogenen SGT (Abb. 4-10) sehr ähnelt. Die drei Signale (mit Pfeile gekennzeichnet), die rechts unten zu sehen sind, sind wahrscheinlich auf Abbau-Produkte zurückzuführen. Diese Ergebnisse zeigten, dass sich *Flag*SGT nicht nur in 1D- (Abb. 4-8B) sondern auch in 2D-Analysen wie das endogene SGT verhält und deswegen für diese Untersuchungen durchaus geeignet ist.

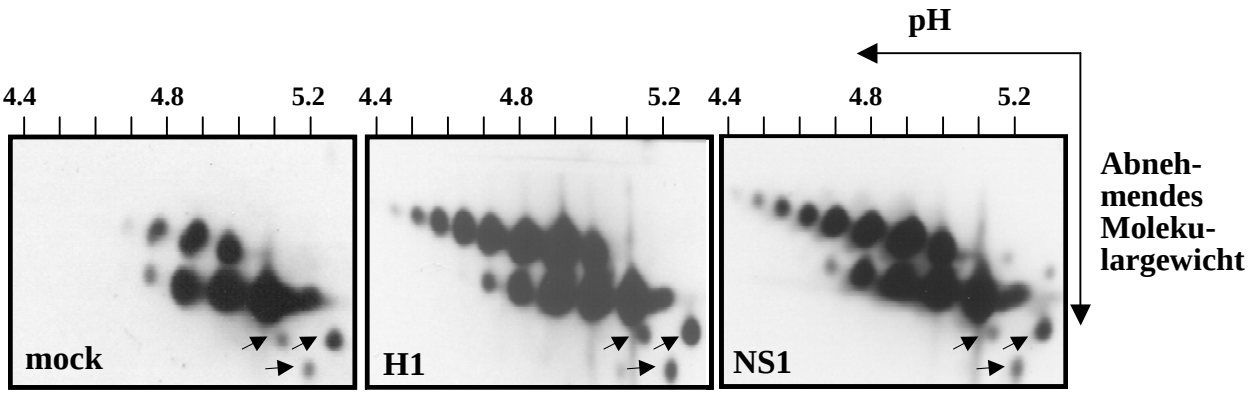


Abb. 4-11: 2D-*Western Blot*-Analyse der Modifikation von *Flag*SGT in Anwesenheit von NS1. $4x10^6$ 293T-Zellen wurde mit 4µg pXFlagSGT transfiziert (mock), zusätzlich mit dem pXFlagNS1-Plasmid (20µg) kotransfiziert (NS1) oder 24h nach pXFlagSGT-Transfektion mit einer MOI von 10 mit H1 infiziert (H1). Die Zellen wurden 48h nach Kotransfektion bzw. nach Infektion durch Zugabe von 9M Harnstoff lysiert. Die Proteine wurden in der ersten Dimension in einem pH-Bereich von 4 bis 7 und in der zweiten Dimension in einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetrennt und durch *Western Blot* analysiert. Zur Detektion von *Flag*SGT wurde als primärer Ak der Flag-spezifische Ak M2 (1:750) und als sekundärer Ak ein HRP-konjugierter Ziege anti-Maus Ak (1:10000) verwendet. Die Pfeile zeigen die SGT-Polypeptidformen, die wahrscheinlich als Abbau-Produkte entstehen.

Die Ergebnisse der Dephosphorylierungsexperimente von *Flag*SGT sind in der Abb. 4-12 dargestellt. Nach Alkalischer Phosphatase Behandlung der Ansätze mit und ohne NS1 konnten jeweils nur noch vier SGT-Polypeptidformen nachgewiesen werden. Die Kontrolle mit BSA zeigte, dass in den Ansätzen mit und ohne NS1 alle SGT-Polypeptidformen präzipitierbar waren. Diese Ergebnisse erlaubten zwei Schlüsse: Erstens sind nicht nur die SGT-Polypeptidformen, die den höhermolekularen SGT-Fraktionen (B und C) zugeordnet werden, an Serin-/Threoninresten phosphoryliert, sondern auch Polypeptidformen der Fraktion A. Dieses Ergebnis stimmte mit den Befunden aus den *in vivo*-Labeling-Experimenten überein, in denen auch ein ^{32}P-Einbau in Fraktion A nachgewiesen werden konnte. Zweitens beruht die NS1-induzierte Modifikation von SGT auf Serin- und Threoninphosphorylierungen.

Zusammenfassend zeigten alle diese Resultate deutlich, dass die meisten posttranslationellen Modifikationen von SGT durch Serin- und/oder Threoninphosphorylierungen verursacht werden. Da nach Alkalischer Phosphatase-Behandlung immer noch vier SGT-Polypeptidformen nachgewiesen werden konnten, ist es möglich, dass neben Serin-/Threoninphosphorylierungen auch Tyrosinphosphorylierungen oder andere Modifikationen von SGT von Bedeutung sind. Desweiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Inkubation der Proteinpolypeptide in Harnstoff zu Karbamylierungen führen kann, welche zusätzlich zur Vielfalt der SGT-Polypeptidformen in der 2D-Analyse beitragen könnte (Cooper, 1991).

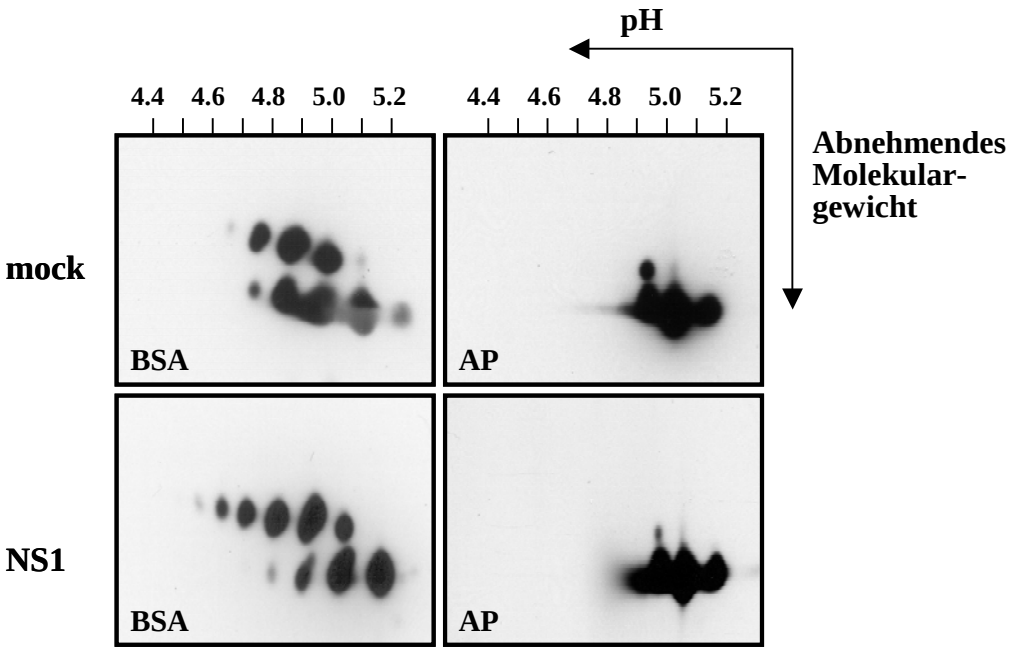


Abb. 4-12: **2D-*Western Blot*-Analyse der *Flag*SGT-Polypeptide nach Alkalischer Phosphatase-Verdau.** $1.5x10^6$ 293T-Zellen wurden mit 2µg pXFlagSGT transfiziert (mock) oder zusätzlich mit 10µg pXFlagNS1 kotransfiziert. Nach Herstellung von Gesamtzellextrakten erfolgte eine Immunpräzipitation mit dem Flag-spezifischen M2 Ak (5µl) und für die Bindung an die Protein A Sepharose notwendigen RaM-Ak (Kaninchen anti-Maus; 2µl). Die an der Sepharose gebundenen Proteine wurden mit Alkalischer Phosphatase (100 U) oder mit einer vergleichbaren Menge an BSA für 45min bei 37°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit hypotonischem Puffer wurde 9M Harnstoff zum Sepharose-Pellet zugegeben. Die Proteine wurden anschließend in der ersten Dimension in einem pH-Bereich 4-7 und in der zweiten Dimension in einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetrennt und durch *Western Blot* analysiert. Zur Detektion der *Flag*SGT-Polypeptide wurde als primärer Ak der Flag-spezifische Ak M2 (1:750) und als sekundärer Ak ein HRP-konjugierter Ziege anti-Maus Ak (1:10000) verwendet.

4.2.4 SGT wird im N-terminalen Bereich durch NS1 modifiziert

In dieser Arbeit (Kap. 4.1.1 und 4.1.2) wurden mit Hilfe der SGT-Deletionsmutanten N-TPR und TPR-C die SGT-Bereiche kartiert, die für die Lokalisation von SGT in APAR-Bodies bzw. für die Interaktion von SGT mit NS1 benötigt werden. Hier wurden diese beiden Mutanten erneut genutzt, um die SGT-Region zu bestimmen, die in Anwesenheit von NS1 modifiziert wird. Zu diesem Zweck wurde die Auftrennung von N-TPR und TPR-C aus Zellen, die kein NS1 oder NS1 exprimierten, in 1D-PAGE analysiert. Dazu wurden 293T-Zellen nur mit pXFlagN-TPR bzw. pXFlagTPR-C transfiziert oder zusätzlich mit pXFlagNS1 kotransfiziert. Die Zellen wurden anschließend mit Lämmli-Puffer aufgeschlossen, die Proteine auf einem 10% PAA-Gel aufgetrennt und durch *Western Blot* nachgewiesen.

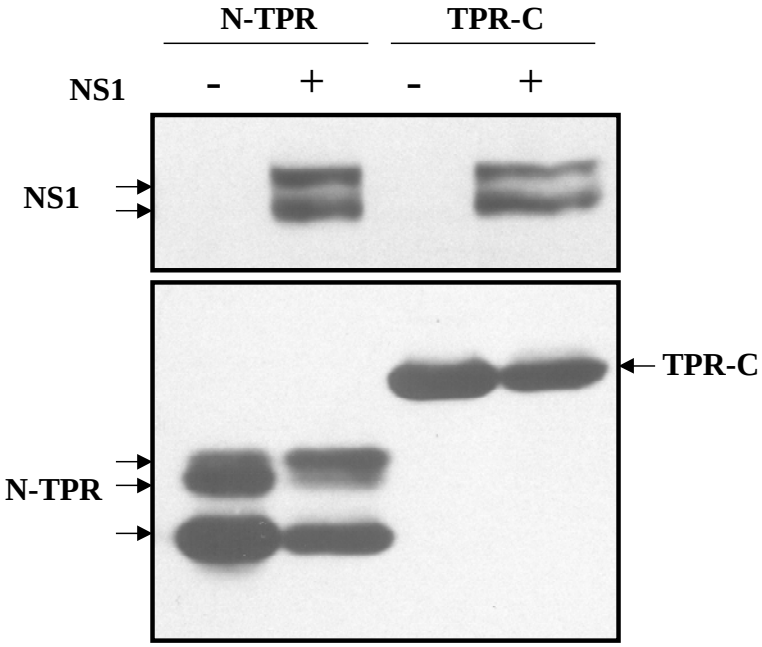


Abb. 4-13: 1D-*Western Blot*-Analyse der *Flag*SGT-Deletionsmutanten in Ab- und Anwesenheit von NS1.

$2x10^6$ 293T-Zellen, die mit 2µg pXFlagN-TPR oder pXFlagTPR-C transfiziert [minus-Zeichen (-)] oder zusätzlich mit 10µg pXFlagNS1 kotransfiziert [plus-Zeichen (+)] waren, wurden durch Zugabe von 2xLämmli lysiert. Die Proteine wurden in einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membran geblottet. Für die Detektion aller Proteine (NS1, N-TPR und TPR-C) wurde als primärer Ak der Flag-spezifische Ak M2 (1:750) und als sekundärer Ak ein HRP-konjugierter Ziege anti-Maus Ak (1:10000) verwendet.

Bei *Flag*N-TPR konnten in Abwesenheit von NS1 drei Polypeptidfraktionen mit einem Molekulargewicht von 27, 29 und 30kDa unterschieden werden (Abb. 4-13; N-TPR, ohne NS1). In Gegenwart von NS1 nahm die Konzentration der mittleren Fraktion zu Gunsten der oberen Fraktion stark ab (Abb. 4-13; N-TPR, mit NS1). Dieses Laufverhalten von *Flag*N-TPR ähnelte sehr dem des endogenen SGT (Abb. 4-8A) und zeigte, dass *Flag*N-TPR NS1-spezifisch modifiziert wird. Im Gegensatz zu *Flag*N-TPR konnte bei *Flag*TPR-C in Abwesenheit von NS1 nur eine Polypeptidfraktion nachgewiesen werden (Abb. 4-13; TPR-C, ohne NS1). Die NS1-Expression hatte keinen Einfluss auf dieses Laufverhalten (Abb. 4-13; TPR-C, mit NS1).

Da die 2D-Analysen zeigten, dass eine SGT-Polypeptidfraktion aus mehr als einer Polypeptidform besteht, wurde die Zusammensetzung von *Flag*TPR-C auch in der 2D-PAGE analysiert. Dadurch kann untersucht werden, ob durch NS1 tatsächlich keine Modifikationen von TPR-C induziert werden, oder ob diese Veränderungen lediglich in der 1D-PAGE nicht nachgewiesen

werden können. Dafür wurden, wie schon zuvor bei der 1D-Analyse, *Flag*TPR-C exprimierende oder NS1-koexprimierende 293T-Zellen verwendet und eine 2D-Analyse durchgeführt.

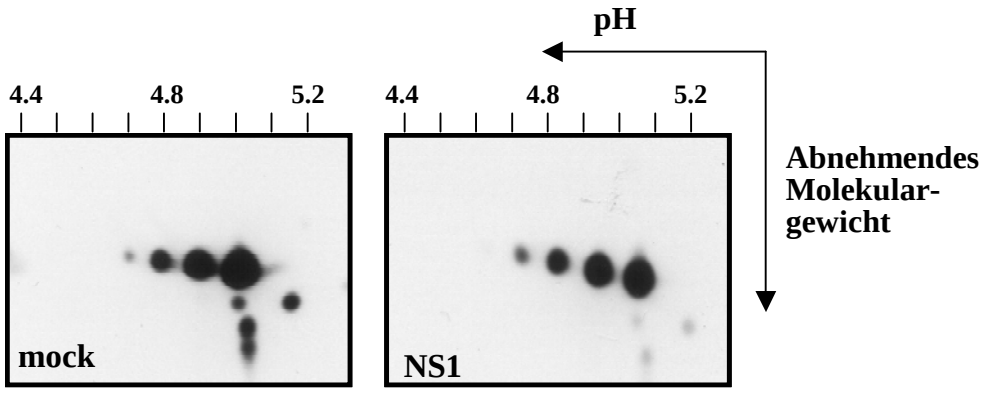


Abb. 4-14: 2D-*Western Blot*-Analyse der Modifikation von der *Flag*SGT-Deletionsmutante *Flag*TPR-C in Ab- und Anwesenheit von NS1. $4x10^6$ 293T-Zellen, die mit 4µg pXFlagTPR-C transfiziert (mock) oder zusätzlich mit dem pXFlagNS1-Plasmid (20µg) kotransfiziert (NS1) waren, wurden durch Zugabe von 9M Harnstoff lysiert. Die Proteine wurden in der ersten Dimension in einem pH-Bereich 4-7 und in der zweiten Dimension in einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetrennt und durch *Western Blot* analysiert. Zur Detektion von *Flag*TPR-C wurde als primärer Ak der Flag-spezifische Ak M2 (1:750) und als sekundärer Ak ein HRP-konjugierter Ziege anti-Maus Ak (1:10000) verwendet.

Die 2D-Analyse (Abb. 4-14) zeigte, dass vier TPR-C Polypeptidformen nachgewiesen werden können, die das gleiche Laufverhalten sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von NS1 zeigten. Daraus ließ sich schließen, dass *Flag*TPR-C tatsächlich nicht NS1-spezifisch modifiziert wird.

Zusammenfassend belegten diese Ergebnisse, dass nur das N-TPR-Fragment Substrat für die NS1 induzierte Modifikation ist, aber nicht das SGT-Fragment TPR-C. Es kann allerdings durch die hier erzielten Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, dass Gesamtlänge-SGT auch am C-Terminus und/oder an der TPR-Domäne NS1-spezifisch modifiziert wird.

4.3 Zelluläre Interaktionspartner von SGT

Die Modifikation von SGT durch eine parvovirale Infektion, die Lokalisation dieses Proteins in den APAR-Bodies sowie die direkte SGT-Interaktion mit NS1 weisen darauf hin, dass dieses zelluläre Protein wesentliche Funktionen im parvoviralen Infektionszyklus haben könnte. Da für SGT eine Funktion als Co-Chaperon beschrieben wurde (Scheufler *et al*., 2000; Tobaben *et al*., 2001) kann davon ausgegangen werden, dass SGT nicht allein sondern eher in Form eines Multiproteinkomplexes seine Funktionen ausübt. Dieses wird auch durch die bisher in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse unterstützt; so weist die Tatsache, dass NS1 eine zelluläre Lokalisationsänderung von SGT induziert aber die SGT/NS1-Interaktionsdomäne nicht mit den Sequenzen übereinstimmt, die für die Lokalisation von SGT in APAR-Bodies verantwortlich sind, auf die Beteilung mindestens eines dritten zellulären Proteins als Mitglied des SGT/NS1-Komplexes hin.

Um zu klären, ob SGT tatsächlich *in vivo* mit weiteren Proteinen einen Komplex bildet, um seine Funktionen sowohl im parvoviralen Infektionszyklus als auch in zellulären Prozessen erfüllen zu können, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Dabei wurden Extrakte aus infizierten und nicht infizierten 293T-Zellen, welche die Flag-Fusionsproteine SGT, N-TPR oder TPR-C überexprimierten, verwendet. Proteine, die in infizierten Zellen an *Flag*TPR-C aber nicht an *Flag*N-TPR binden, könnten bei der Verteilung/Transport von SGT in APAR-Bodies beteiligt sein.

Für die Ko-Immunpräzipitationsexperimente wurden 293T-Zellen mit den Vektoren pXFlagSGT, pXFlagN-TPR oder pXFlagTPR-C transfiziert und 24h nach Transfektion wurden Gesamtzellextrakte (Kap. 3.2.5.1.2) hergestellt. *Flag*SGT, *Flag*N-TPR und *Flag*TPR-C sowie die an diese Polypeptide gebundenen Proteine wurden dann in Raf- (ohne SDS, 10% Glycerol) oder RIPA-Puffer (0,1% SDS, ohne Glycerol) mit dem Flag-spezifischen Antikörper (α-Flag-AK) und für die Bindung an Protein A-Sepharose ungekoppeltem Kaninchen α-Maus-Antikörper (RαM) präzipitiert. Nach Auftrennung der Immunpräzipitate in einem 10% PAA-Gel wurden die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Dadurch dass die Zellen bei diesen Experimenten 24h nach Infektion geerntet wurden, ist eine Modifikation von SGT oder N-TPR nicht zu erwarten, da dieses Phänomen bei nicht synchronisierten Zellen erst 48h nach Kotransfektion nachgewiesen werden kann (Cziepluch *et al*., 1998).

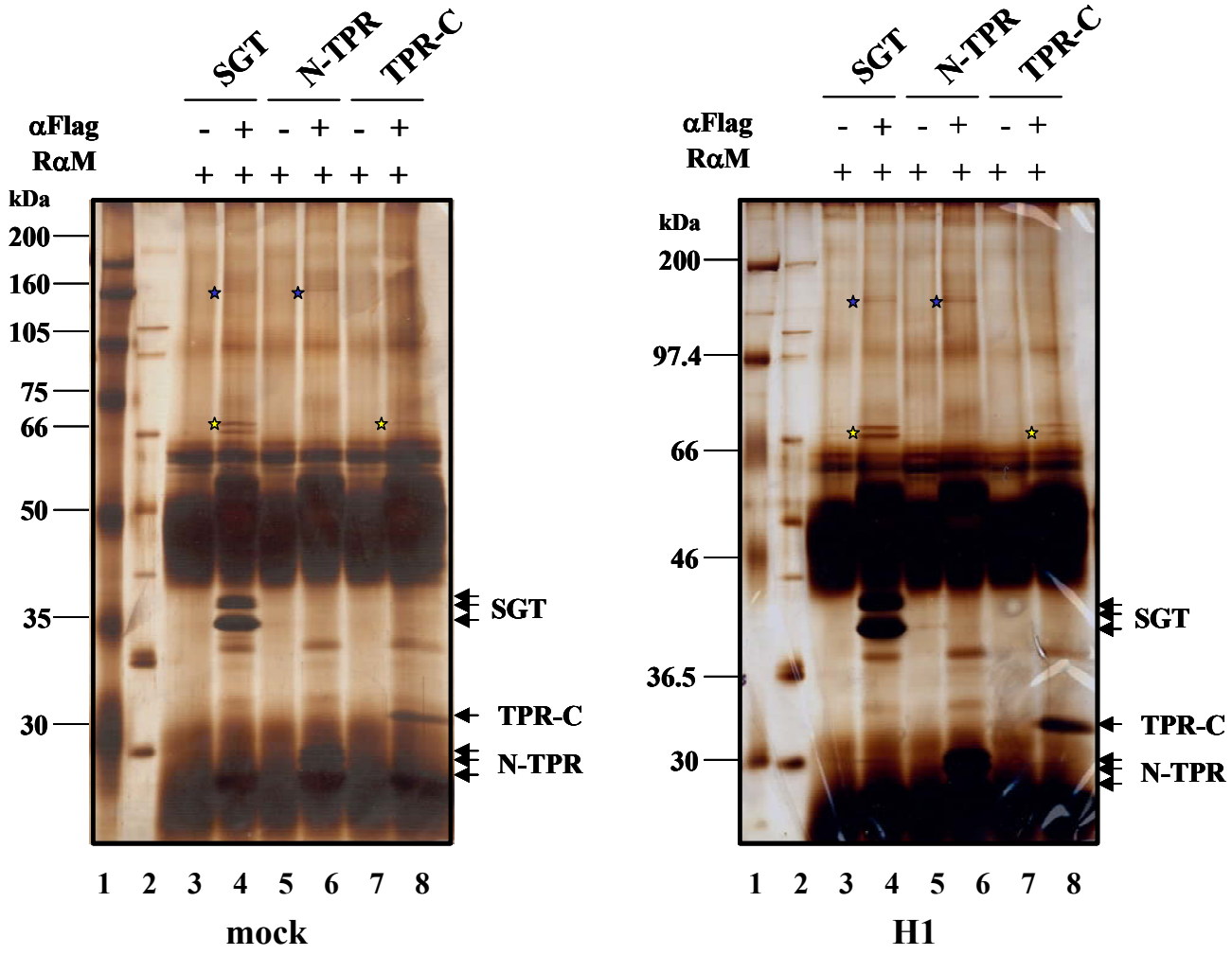


Abb. 4-15: Immunpräzipitation von *Flag*SGT, *Flag*N-TPR oder *Flag*TPR-C mit dem Flag-spezifischen Ak M2. 2x10^6 293T-Zellen wurden mit 10µg pXFlagSGT (Spuren 3 und 4), pXFlagN-TPR (Spuren 5 und 6) oder pXFlagTPR-C (Spuren 7 und 8) transfiziert (mock) und im Fall einer Infektion mit H1 (MOI = 10) infiziert (H1). Nach Herstellung von Gesamtzellextrakten erfolgte Immunpräzipitation in RAF-Puffer mit den Flag-spezifischen Ak M2 (5µl) und für die Bindung an die Protein A Sepharose notwendigen RaM-Ak (Kaninchen anti-Maus; 2µl). Nach 2h Inkubation bei 4°C und mehrmaligem Waschen mit RAF-Puffer wurden die Proteine in einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetrennt und durch Silber-Färbung sichtbar gemacht. Die blauen Sterne weisen auf die 160kDa und die gelben auf die 66kDa koimmunpräzipitierten Proteine hin. **mock**: Spur 1: Full range Rainbow-Marker (Amersham); Spur 2: Mark12 (Invitrogen); **H1:** Spur 1: Rainbow-Marker (Amersham); Spur 2: Mark12 (Invitrogen);

Die Abb. 4-15 zeigt die silbergefärbten 10% SDS-Gele von Immunpräzipitaten aus nicht infizierten (mock) und infizierten (H1) Zellen in RAF-Puffer. In Extrakten aus nicht infizierten Zellen konnten mit SGT (mock, Spur 4) Proteine kopräzipitiert werden, die als zwei Doppelbanden bei einem Molekulargewicht von ca. 160kDa (Abb. 4-15; blauer Stern) und 66kDa (Abb. 4-15; gelber Stern) nachgewiesen werden konnten. Die 160kDa- aber nicht die 66kDa-Proteine konnten ebenfalls mit N-TPR (mock, Spur 6) kopräzipitiert werden. Im Gegensatz

dazu interagierte TPR-C (mock; Spur 8) mit den 66kDa- aber nicht mit den 160kDa-Proteinen. Allerdings ist im TPR-C-Ansatz diese Doppelbande bei 66kDa schwächer ausgeprägt als bei SGT, was auf eine stärkere Interaktion dieser Proteine mit dem Gesamtlängen-SGT hinweisen könnte. Alle diese SGT interagierenden Proteine banden spezifisch an die Flag-Fusionsproteine und konnten bei den Kontrollansätzen, in denen nur der RαM-Antikörper eingesetzt wurde, nicht präzipitiert werden.

Bei einem Vergleich der Immunpräzipitationsansätze aus nicht infizierten (Abb.4-15 mock) mit denen aus infizierten Extrakten (Abb. 4-15 H1), stellt man keine großen Unterschiede fest, d.h., dass es sich bei keiner dieser Komplexe um ein Infektions-spezifischen Komplex handelte. Der Komplex zwischen SGT und den 160kDa-Proteinen schien in infizierten Extrakten stabiler zu sein, da die 160kDa-Banden intensiver erscheinen. Diese Intensitätsunterschiede könnten aber auch auf die geringere Menge an präzipitiertem SGT im Ansatz ohne Infektion zurückzuführen sein.

Außer den 160kDa- und 66kDa-Proteinen konnten mit SGT, N-TPR und TPR-C ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 36kDa kopräzipitiert werden (mock und H1; SGT: Spur 4; N-TPR: Spur 6; TPR-C: Spur 8). Ein Kontrollansatz, bei dem ein Extrakt aus *Flag*GFP exprimierenden Zellen verwendet wurde, zeigte allerdings, dass es sich dabei nicht um einen spezifischen SGT-Interaktionspartner handelte, sondern um ein Protein, dass unspezifisch mit dem Flag-spezifischen Antikörper präzipitiert wurde.

Um die Stabilität der identifizierten Komplexe zu untersuchen, wurden die Immunpräzipitationen auch in RIPA-Puffer durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Anwesenheit von SDS in diesem Puffer führt zur Dissoziation der meisten Proteinkomplexe. Es gibt aber auch sehr stabile Proteinkomplexe, wie zum Beispiel der zwischen Hsp70 und NAD(P)H:Quinone reductase 1, die in RIPA-Puffer erhalten bleiben (Anwar *et al*., 2002). Die Immunpräzipitationen von SGT und SGT-Deletionsmutanten in RIPA-Puffer zeigten, dass der Komplex zwischen SGT bzw. N-TPR und den 160kDa-Proteinen nur in RAF- und nicht in RIPA-Puffer stabil ist. Hingegen konnten die 66kDa-Proteine bei SGT und TPR-C in RAF-Puffer auch bei Verwendung von RIPA-Puffer kopräzipitiert werden.

Zusammenfassend konnten für N-TPR und SGT Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 160kDa und für TPR-C und SGT die 66kDa-Proteine als spezifische Bindungspartner identifiziert werden. Dabei handelt es sich um keine Infektions-spezifischen Komplexe, die aber unter Umständen dennoch in APAR-Bodies eine Funktion übernehmen könnten. Aus

diesem Grund und weil diese 160kDa- und 66kDa-Proteine bei Funktionen von SGT in zellulären Prozessen involviert sein können, wäre die Identifizierung dieser Proteine z.B. durch Massenspektrometrie von großem Interesse.

4.4 Hsc70 lokalisiert nicht mit NS1 in APAR-Bodies

Nachdem eine Interaktion zwischen SGT und Hsc70 *in vitro* gezeigt wurde (Liu *et al*., 1999) und eine funktionelle Bedeutung dieser Interaktion als ein tripple Chaperon-Komplex mit CSP in neuronalen Zellen nachgewiesen wurde (Tobaben *et al*., 2001), stellte sich die Frage, ob auch Hsc70 in APAR-Bodies akkumuliert und so Hinweise auf einen Beitrag des SGT/Hsc70-Komplexes zur parvoviralen Replikation erhalten werden können. Dazu wurden NBE-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und mit H1 infiziert. 24h nach Infektion wurden die Zellen mit Hsc70- und NS1-spezifischen AK inkubiert und durch konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Durch NS1 wurden dabei die APAR-Bodies sichtbar gemacht.

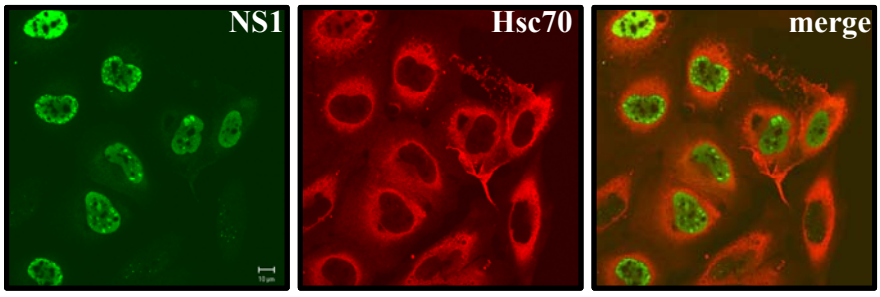


Abb. 4-16: Subzelluläre Lokalisation von Hsc70 in H1 infizierten NBE-Zellen mittels konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie. NBE-Zellen wurden auf Deckplättchen kultiviert und mit H1 (MOI = 10) infiziert. Nach Fixierung der Zellen mit 1% Formalin wurde Hsc70 mit dem monoklonalen Hsc70-spezifischen Ak 13D3 (1:200) und NS1 als Marker der APAR-Bodies mit dem polyklonalen Sp8-Ak (1:1000) detektiert. Als Zweitantikörper wurde für Hsc70 ein TRITC-gekoppelter Ziege α-Maus-Antikörper (1:100, rote Fluoreszenz) und für NS1 ein FITC-gekoppelter Ziege α-Kaninchen-Antikörper (1:100, grüne Fluoreszenz) verwendet. Die Überlappung der beiden Kanäle (*merge)* zeigt, dass Hsc70 mit NS1 nicht in APAR-Bodies kolokalisiert.

Eine Kolokalisation von NS1 mit Hsc70 in APAR-Bodies war in diesem Experiment nicht zu beobachten (Abb. 4-16). Hsc70 zeigte auch nach H1-Infektion eine perinukleäre und zytoplasmatische Lokalisation während NS1 in APAR-Bodies bzw. im Kern lokalisierte. Es kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass Hsc70 in nicht nachweisbaren Mengen in APAR-bodies sich befindet. In jedem Fall kann aber angenommen werden, dass die überwiegende Menge an SGT eine Hsc70 unabhängige Funktion in APAR-bodies ausübt.

4.5 Einfluss von SGT auf die parvovirale Replikation und Akkumulation viraler Proteine

SGT wurde aufgrund seiner Eigenschaft, einen Komplex mit dem wichtigsten regulatorischen Protein autonomer Parvoviren, NS1, bilden zu können, identifiziert. Da SGT nach parvoviraler Infektion in den APAR-Bodies akkumuliert, kann vermutet werden, dass es an viralen Prozessen beteiligt ist, die in diesen Strukturen stattfinden, wie z.B. die virale DNA-Replikation oder virale Genexpression. Um zu überprüfen, welchen Beitrag SGT zu diesen Prozessen leistet, wurde zum einen der Einfluss einer Überexpression von SGT oder SGT-Deletionsmutanten auf die Akkumulation viraler DNA-Replikationsprodukte und viraler Proteine untersucht. Ein weiterer Ansatz bestand darin, die Auswirkungen einer drastischen Reduktion der SGT-Proteinmenge auf diese Prozesse zu ermitteln.

4.5.1 Einfluss einer Überexpression von SGT auf die parvovirale Replikation und Akkumulation viraler Proteine

Um Hinweise auf die Beteiligung von SGT an viralen Prozessen zu erhalten und zur Klärung der Frage, ob SGT ein limitierender Faktor für Prozesse im parvoviralen Lebenszyklus ist, wurde SGT überexprimiert. In den Untersuchungen wurde hierzu *FlagSGT* überexprimiert, da das Flag-Epitop eine experimentelle Unterscheidung zwischen überexprimiertem und endogenem SGT erlaubte. In dieser Arbeit wurde zuvor bereits gezeigt, dass *FlagSGT* in Anwesenheit von NS1 wie das endogene SGT posttranslationell modifiziert wird (Kap. 4.2.1) und in APAR-Bodies lokalisiert (Kap. 4.1.1). Deshalb konnte angenommen werden, dass *FlagSGT* funktionell aktiv sein würde.

Ein häufig beschrittener molekularbiologischer Ansatz zur Identifizierung von Prozessen, an denen ein Protein beteiligt ist, besteht in der Untersuchung von Zellen, in denen dieses Protein oder Mutanten davon überexprimiert werden. Besonders aufschlussreich kann die Analyse von dominant-negativen Mutanten sein, die für viele Proteine beschrieben wurden (z.B. p53, de Vries *et al*., 2002; Monti *et al*., 2002). Solche Mutanten können über die Bildung eines funktionell inaktiven Hetero-Oligomers mit dem endogenen Protein dieses funktionell ausschalten und somit zu Störungen in den Prozessen führen, an denen das zu untersuchende Pro-

tein beteiligt ist. Als potentiell negative Mutante wurde die Deletionsmutante N-TPR in Überexpressionsstudien untersucht, da - wie in dieser Arbeit gezeigt wurde - N-TPR und SGT Hetero-Oligomere bilden können (Kap. 4.1.2).

Die funktionelle Inaktivierung eines Proteins kann auch dann auftreten, wenn eine überexprimierte verkürzte Form dieses Proteins in der Lage ist, das endogene Protein aus einem funktionellen Komplex mit einem weiteren zellulären Faktor zu verdrängen. Ist der Komplex mit dem mutanten Protein inaktiv, kommt es ebenfalls zu Störungen in den betreffenden Prozessen. Da das Gesamtlänge-SGT und N-TPR mit den selben 160kDa-Proteinen Komplexe bildet, während TPR-C mit den selben 66kDa-Proteinen wie SGT interagierte (Kap. 4.3), bestand die Möglichkeit, dominant-negative Einflüsse auf den parvoviralen Lebenszyklus durch die Überexpression der beiden Mutanten zu beobachten.

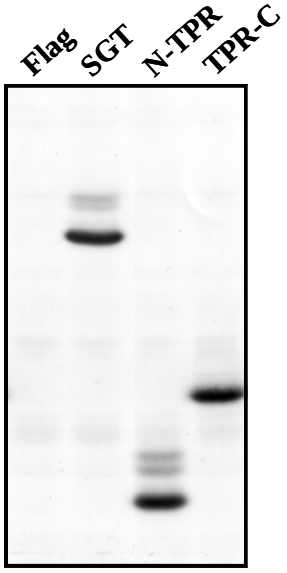


Abb. 4-17: Überexpression von SGT und SGT-Deletionsmutanten. $2x10^6$ 293T-Zellen wurden mit 10µg pXFlag, pXFlagSGT, pXFlagN-TPR oder pXFlagTPR-C transfiziert und 24h später mit H1 infiziert (MOI = 10). 12h nach Infektion wurden die Zellen durch Zugabe von 2xLämmli lysiert. Die Proteine wurden anschließend in einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Für den Nachweis der Flag-Fusionsproteine (SGT, N-TPR und TPR-C) wurde als primärer Ak der Flag-spezifische Ak M2 (1:750) und als sekundärer Ak ein AP-konjugierter Ziege anti-Maus Ak (1:10000) verwendet.

Zur Untersuchung des Einflusses einer Überexpression von *Flag*SGT und *Flag*SGT-Deletionsmutanten auf die virale DNA-Replikation, wurden 293T-Zellen mit pXFlagSGT, pXFlagN-TPR oder pXFlagTPR-C transfiziert und 24h nach Transfektion mit H1 infiziert. Als Kontrolle dienten Ansätze, in denen nur das Flag-Epitop überexprimiert wurde. Zunächst wurden die Ansätze im *Western Blot* auf die Überexpression der entsprechenden Flag-Fusionsproteine hin analysiert (Abb.4-17). Die Expression von Flag alleine konnte unter den hier gewählten Bedingungen nicht nachgewiesen werden, da dieses Polypeptid ein zu geringes Molekulargewicht hat. Da *Flag*SGT, *Flag*N-TPR und *Flag*TPR-C in vergleichbaren Mengen

exprimiert wurden (Abb. 4-17), konnten die Ansätze nun im *Southern Blot* analysiert werden, um möglicherweise auftretende Veränderungen in der Akkumulation von viralen DNA-Replikationsprodukten festzustellen. Dazu wurden die transfizierten und infizierten Zellen 12h nach Infektion mit Hirt-Puffer lysiert. Nach Proteinase K-Verdau wurden die Proteine durch Phenol/Chloroform-Extraktion von der DNA abgetrennt. Durch Fällung der hochmolekularen DNA in Gegenwart von NaCl konnte die Plasmid-DNA anschließend mit DpnI endonukleolytisch gespalten werden. Die viralen Replikationsprodukte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und mittels *Southern Blot* analysiert.

Hier zeigte sich (Abb. 4-18), dass die Überexpression von *Flag*SGT keinen positiven Einfluss auf die Bildung der mRF und dRF hatte. Stattdessen beobachtete man eher eine leichte Abnahme der replikativen Formen gegenüber der Kontrolle, in der Flag allein überexprimiert wurde. Auch nach Überexpression von SGT ohne Flag-Fusionsanteil wurde keine Zunahme der Replikationsprodukte beobachtet (Daten nicht gezeigt). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass SGT in diesen Wirtszellen ein limitierender zellulärer Faktor für die parvovirale Replikation ist.

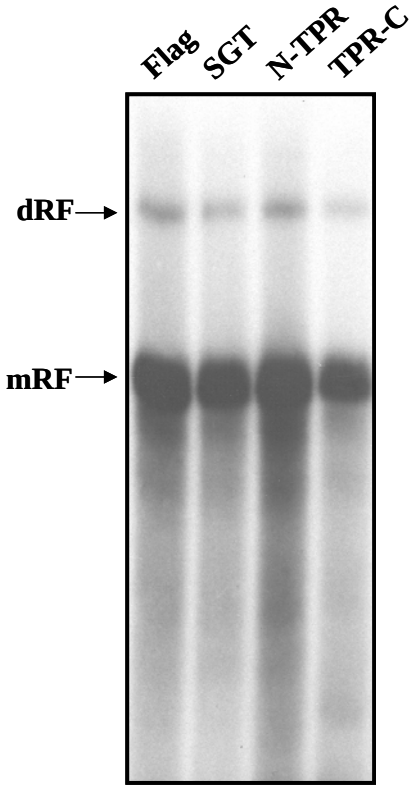


Abb. 4-18: Effekt der Überexpression von *Flag*SGT und *Flag*SGT-Deletionsmutanten auf die H1 DNA-Replikation. $2x10^6$ 293T-Zellen wurden mit 10µg pXFlag, pXFlagSGT, pXFlagN-TPR oder pXFlagTPR-C transfiziert und 24h später mit H1 infiziert (MOI = 10). 12h nach Infektion erfolgte eine Hirtextraktion mit anschließendem Proteinase K-Verdau. Nach Auftrennung der Proteine durch Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die chromosomale DNA mit NaCl gefällt und die Plasmid-DNA mit DpnI gespalten. Nach Auftrennen der viralen DNA über ein 1% Agarosegel wurde sie auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer ^{32}P-markierten H1-Sonde hybridisiert. mRF: monomere Replikative Form; dRF: dimere Replikative Form.

Die Überexpression von *Flag*TPR-C hatte den gleichen leicht inhibitorischen Effekt auf die Akkumulation viraler Replikationsprodukte wie *Flag*SGT (Abb. 4-18). Entgegen unserer Erwartung hatte die Überexpression von *Flag*N-TPR keinen dominant-negativen Effekt auf die virale DNA-Replikation, da die gleiche Menge an viralen Replikationsprodukten wie in der Flag-Kontrolle festgestellt wurde (Abb. 4-18).

Mittels *Western blot* wurde untersucht, welchen Einfluss die Überexpression von *Flag*SGT, *Flag*N-TPR und *Flag*TPR-C auf die Akkumulation viraler Proteine hat (Abb. 4-19). Es zeigte sich, dass die Menge an NS1 und Kapsidproteinen (VP1, 2 und 3) durch die Überexpression von *Flag*N-TPR unbeeinflusst war. Die Ansätze, in denen *Flag*SGT und *Flag*TPR-C überexprimiert wurden, zeigten eine leicht verringerte Menge an NS1 und VPs (Abb. 4-19). Es könnte also sein, dass die verringerte NS1-Proteinmenge ursächlich für die verringerte Menge an VPs und replikativen Formen verantwortlich ist. Allerdings erschien der Effekt insgesamt zu gering, um eine weitere Untersuchung der Ursachen zu rechtfertigen.

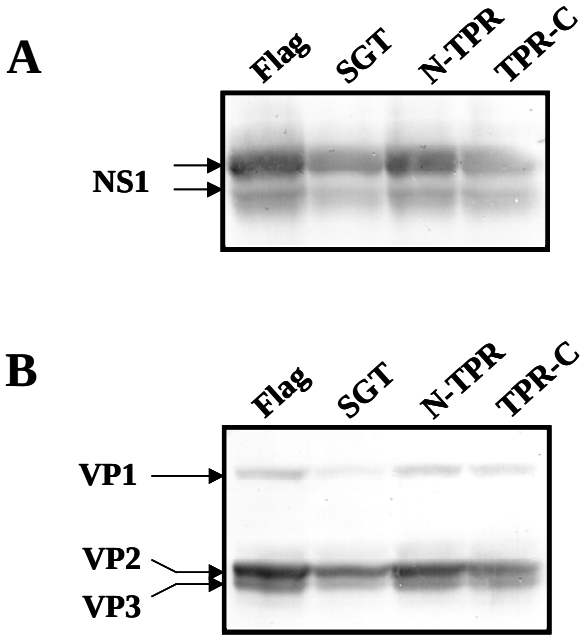


Abb. 4-19: Einfluss der Überexpression von SGT und SGT-Deletionsmutanten auf die NS1- und VP-Akkumulation. $2x10^6$ 293T-Zellen wurden mit 10µg pXFlag, pXFlagSGT, pXFlagN-TPR oder pXFlagTPR-C transfiziert und 24h später mit H1 infiziert (MOI = 10). 12h nach Infektion wurden die Zellen durch Zugabe von 2xLämmli lysiert. Die Proteine wurden anschließend in einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Für die Detektion von NS1 wurde der Sp8-Ak (1:2000) und für die VP-Proteine ein VP-Peptid-spezifischer Ak verwendet. Als sekundärer Ak wurde ein AP-konjugierter Ziege anti-Kaninchen Ak (1:10000) verwendet.

Zusammenfassend zeigen die Überexpressionsstudien, dass weder *Flag*N-TPR noch *Flag*TPR-C einen dominant-negativen Effekt auf die parvovirale Replikation ausübten und dass SGT kein limitierender Faktor für die parvovirale Replikation darstellt. Es zeigte sich aber auch, dass die Überexpression von *Flag*SGT, *Flag*N-TPR und *Flag*TPR-C keinen eindeutigen Rückschluss auf einen Prozess innerhalb der parvoviralen Replikation zuließ, an dem SGT essentiell beteiligt ist. Zur Identifizierung einer Funktion von SGT im parvoviralen Lebenszyklus wurde deshalb im weiteren analysiert, welchen Einfluss eine drastische Reduktion der SGT-Proteinmenge auf die parvovirale Replikation hat.

4.5.2 SGT-„*Knock down*“: Einfluss auf den parvoviralen Infektionszyklus

„*Knock out*“-Ansätze haben schon vielfach entscheidende Hinweise auf die Funktion eines Proteins geliefert (z.B. p53, Luo *et al*., 2001; Jun, Herzog *et al*., 1999). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit angestrebt, den Einfluss des Fehlens von SGT oder zumindest einer deutlichen Reduktion der SGT-Proteinmenge auf die parvovirale Replikation zu untersuchen. Da die Erzeugung von „*knock out*“-Mäusen sehr langwierig, technisch aufwendig und oft gar unmöglich ist, wurde in dieser Arbeit als Alternative die relativ neue Technik der RNAi (RNA-*interference*) eingesetzt.

Die RNAi ist ein bei *C. elegans* und Pflanzen schon länger bekannter Mechanismus zur posttranskriptionellen Regulation von Genen (Bernstein *et al*., 2001). Dabei induzieren doppelsträngige RNA-Moleküle mit Sequenzhomologien zum Zielgen, die nukleolytische Spaltung der genspezifischen mRNA, die dann degradiert wird und nicht mehr zur Translation zur Verfügung steht. Man spricht von einem „*knock down*“ des Gens. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Arbeiten von Tuschl und Mitarbeitern (Elbashir *et al*., 2001) ermöglichten erstmals die experimentelle Nutzung dieses Mechanismus in Säugerzellen. Diese Autoren zeigten, dass kleine doppelsträngige RNA-Oligonukleotide (siRNA: *small interfering* RNA) von bis zu 21bp Länge als katalytische Zwischenprodukte in der RNAi wirken und dass allein die Transfektion solcher Oligonukleotide in Säugerzellen eine genspezifische RNAi hervorruft. Es kommt dabei nicht zur Aktivierung der Interferon-Signaltransduktionskette, die in Säugetierzellen üblicherweise durch höhermolekulare doppelsträngige RNA aktiviert wird, und die eine generelle und unspezifische Abschaltung der Translation bewirkt. Die RNAi mittels siRNA erlaubt damit eine experimentell

relativ einfache, transiente aber spezifische Reduktion von Proteinen in Säugetier-Zellkulturen. Ein Model der Wirkungsweise dieses Mechanismus ist in der Abb. 4-20 dargestellt.

Die Limitationen der RNAi-Methode ergeben sich aus der Transfektionseffizienz, die abhängig von den verwendeten Zellinien variiert und selten 100% beträgt. Zum anderen ist der „*knock down*“ eines Gens, das für ein stabiles Protein mit einer langen Halbwertszeit kodiert, nicht immer vollständig. Da aber auch andere „*housekeeping*“-Gene wie Lamin erfolgreich einem „*knock down*“ unterzogen werden konnten (Harborth *et al*., 2001), schien der Einsatz der RNAi aussichtsreich für die funktionellen Analysen von SGT zu sein. Im weiteren wurde deshalb angestrebt, die SGT-Proteinmenge mittels Transfektion von sgt-spezifischen siRNA-Oligonukleotiden zu reduzieren und den Einfluss dieses SGT-„*knock down*“ auf Prozesse im parvoviralen Infektionszyklus zu untersuchen.

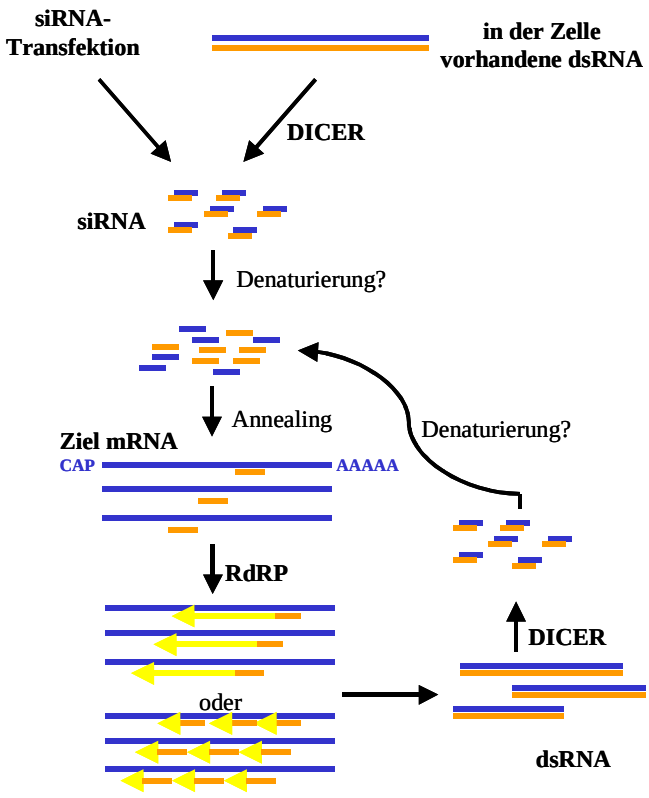


Abb. 4-20: Modell von RNAi nach Nishikura (2001). In der Zelle vorhandene dsRNA wird in einem ersten Schritt durch DICER (*dsRNA-specific endonuclease*) in kleine aus 21-25nt bestehende doppelsträngige RNAs prozessiert (*small interfering* (si) RNA: siRNA). Diese siRNAs, die auch durch Transfektion in die eukaryontische Zelle eingebracht werden können, dienen als Primer für die RdRP (*RNA-directed RNA Polymerase*). In einem zweiten Schritt wird durch dieses Enzym die Ziel-mRNA in einen Doppelstrang umgewandelt, die wieder durch DICER prozessiert wird. Durch dieses Selbst-Recycling wird erreicht, dass nur sehr kleine Mengen an siRNA ausreichend sind, um das Zielgen auszuschalten.

4.5.2.1. Untersuchung des SGT *„knock down“* in H1 Wirtszellen

Ehe der Einfluss einer Reduktion der SGT-Proteinmenge mittels RNAi auf die parvovirale Replikation untersucht werden konnte, musste diese Methode zunächst in Parvovirus H1-Wirtszellen etabliert werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine siRNA für SGT (SGT-siRNA) ermittelt, die sehr effizient zu einer Verringerung der SGT-Proteinmenge in Hela-Zellen führte. Diese SGT-siRNA ist homolog zur sgt-Nukleotidsequenz von Position 315-336 nach dem Start ATG.

Zunächst sollte der zeitliche Verlauf und das Ausmaß des SGT-*„knock down“* in potentiellen Wirtszellen von H1 untersucht werden. Hierzu wurden NBE-Zellen mit SGT-siRNA transfiziert und die SGT-Proteinmenge 2, 3 und 4 Tage nach der Transfektion mittels *Western Blot* analysiert (Abb. 4-21). Eine zur gfp-Gensequenz homologe siRNA (GFP-siRNA) diente als Kontrolle bei der Transfektion. Da NBE-Zellen kein gfp-Gen enthalten, sollte ihr Proteingehalt durch die Kontrollbehandlung unverändert bleiben. Eine weitere Kontrolle bildeten nur mit Puffer transfizierte Zellen.

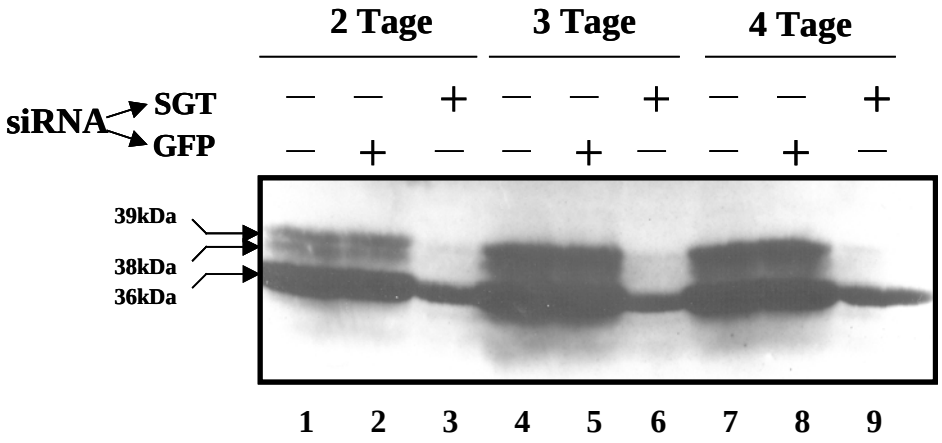


Abb. 4-21: Reduktion von SGT nach SGT-siRNA Behandlung. NBE-Zellen wurden mit GFP- bzw. SGT-siRNA transfiziert oder nur mit Puffer behandelt. 2, 3 oder 4 Tage nach Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Aufgetragen wurde in Spur 1, 2 und 3 ein Extrakt aus $2x10^5$ Zellen, während in den restlichen Spuren ein Extrakt aus $5x10^5$ Zellen aufgetragen wurde. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in Lämmli aufgenommen und die Proteine in einem 10% PAA-Gel aufgetrennt. Zum Nachweis von SGT wurde als Erstantikörper der polyklonale hSGT-spezifische Ak AG 1.1 und als Zweitantikörper ein HRP-konjugierter Ziege anti-Kaninchen Ak (1:10000) verwendet.

Ein Vergleich der SGT-Proteinmenge 2, 3 und 4 Tage nach Behandlung von Zellen mit SGT-siRNA, GFP-siRNA oder Puffer zeigte, dass eine drastische Reduktion der SGT-Proteinmenge bereits 2 Tage nach der Transfektion beobachtet werden kann (Abb. 4-21). Der

Effekt hielt bis zu 4 Tage nach der Transfektion an. Von dieser Reduktion waren alle drei SGT-Polypeptidfraktionen betroffen: Die 38kDa- und 39kDa-Fraktionen waren gar nicht mehr nachweisbar und die 36kDa-Fraktion war deutlich reduziert. Die Ergebnisse zeigten aber auch, dass ähnlich wie bei Lamin (Harborth *et al*., 2001), SGT nicht vollständig ausgeschaltet werden kann.

Für die weiteren Experimente war es nun wichtig, einen günstigen Zeitpunkt für eine Parvovirus-Infektion der SGT-„*knock down*“ Zellen zu bestimmen, zu dem der SGT-„*knock down*“ Effekt schon eingetreten sein sollte und von dem ab der Effekt noch mindestens 24h anhalten sollte, damit die SGT-Proteinmenge während einer nachfolgenden Infektion noch reduziert ist. Der Zeitpunkt „48h nach Transfektion“ (oder zusätzlich „72h nach Transfektion“)wurde als geeigneter bestimmt, um die Infektionen in den weiteren Experimenten durchzuführen.

4.5.2.2 SGT-„*knock down*“ hat keinen Einfluss auf die S-Phase des Zellzyklus

Die DNA-Replikation autonomer Parvoviren erfolgt in der S-Phase des Zellzyklus. Im Gegensatz zu vielen anderen DNA-Viren können sie den Eintritt der Wirtszellen in die S-Phase nicht induzieren (Rhode, 1973; Siegl & Grautschi, 1973; Wolter *et al*., 1980; Tattersall & Bratton, 1983; Cotmore & Tattersall, 1987). Um den Einfluss eines SGT-„*knock down*“ auf die parvovirale Replikation beurteilen zu können, musste zunächst ausgeschlossen werden, dass die S-Phase potentieller Wirtszellen (NBE) durch den „*knock down*“ beeinflusst wird. Dazu wurde der Anteil an S-Phase-Zellen in Zellpopulation mit und ohne SGT-„*knock down*“ durch BrdU-Inkorporation ermittelt. BrdU wird während der Replikation in die aktiv replizierende DNA eingebaut und dient als Marker für Zellen in der S-Phase (Gratzner, 1982). NBE-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und 48h bzw. 72h nach siRNA-Transfektion für 20min vor der Formalin-Fixierung mit BrdU markiert. Nach Fixierung der Zellen mit 1% Formalin wurde die chromosomale DNA mit HCl depuriniert und die eingebauten Bromodeoxyuridine durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem BrdU-spezifischen Antikörper sichtbar gemacht (Abb. 4-22A). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (Abb. 4-22A). Der Anteil an S-Phase-Zellen in den Zellpopulationen wurde durch Auszählung der BrdU-positiven Zellen gegenüber der Gesamtzellzahl (DAPI-Färbung) ermittelt (Abb. 4-22B).

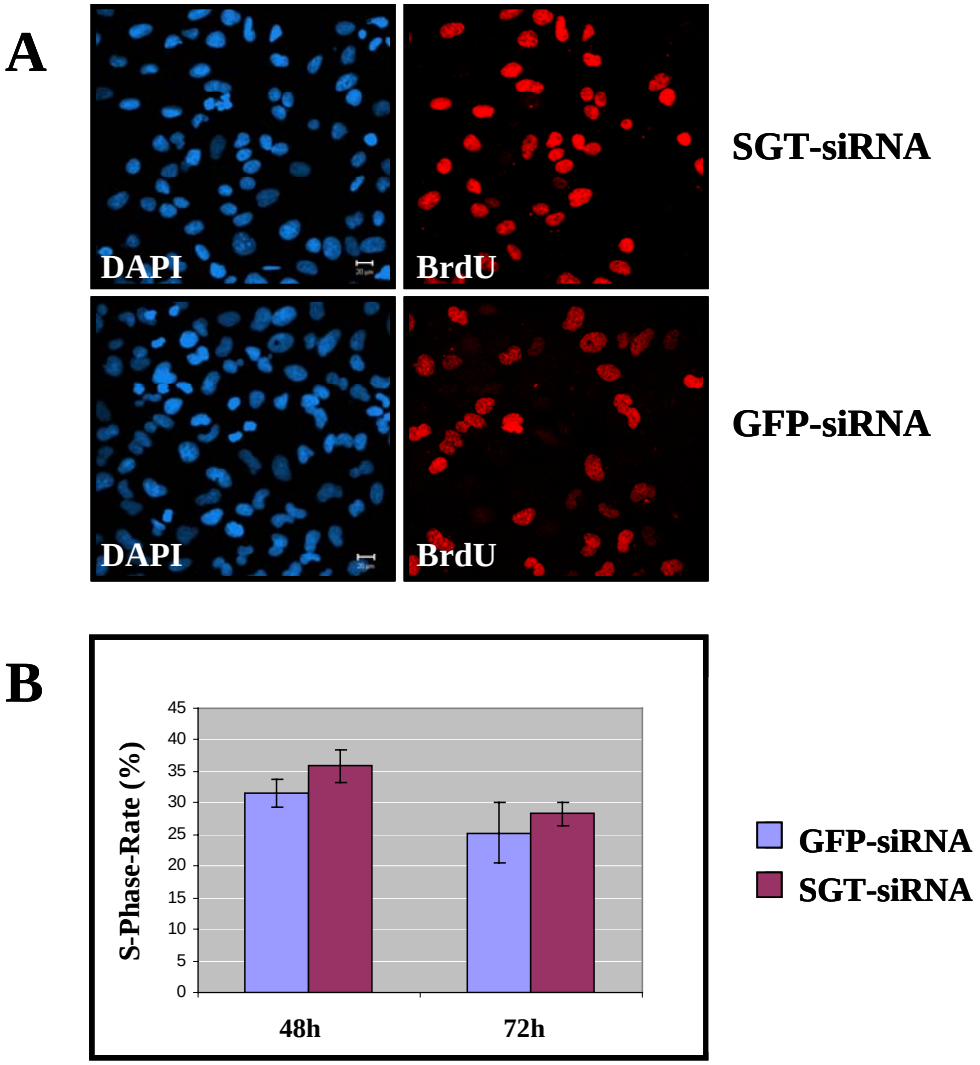


Abb. 4-22: Untersuchung des Einflusses von SGT-*"knock down"* in der S-Phase des Zellzyklus. Auf Deckgläschen kultivierte NBE-Zellen wurden mit GFP- bzw. SGT-siRNA transfiziert und 48h bzw. 72h nach Transfektion für 20min mit BrdU (10µM Endkonzentration) inkubiert. Nach Fixierung der Zellen mit 1% Formalin und nach Methanol/Aceton-Behandlung erfolgte eine Depurinierung der DNA durch Inkubation der Zellen für 10min mit 7.4% HCl. Nach mehrmaligem Waschen mit H_2O und PBS wurde die DNA, in die BrdU eingebaut wurde, mit Hilfe eines monoklonalen BrdU-spezifischen Aks (1:10; Becton Dickinson) detektiert. Als Zweitantikörper wurde ein TRITC-gekoppelter Ziege α-Maus-Antikörper (1:100) verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. **A**: Ausschnitt der BrdU-gefärbten Präparate 48h nach Transfektion. **B**: Ermittlung der S-Phase-Rate nach 48h bzw. 72h nach siRNA-Transfektion durch Auszählung der BrdU-positiven Zellen (rote Fluoreszenz) gegenüber der Gesamtzellzahl (DAPI-Färbung). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die durch Auszählungen in verschiedenen Experimenten ermittelt wurde.

Die statistische Auswertung ergab, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen SGT- und GFP-siRNA behandelten Zellen im Anteil an Zellen in der S-Phase gab, weder 48h noch 72h nach siRNA-Transfektion (Abb. 4-22B). Statistisch signifikant ist ein Unterschied, der außerhalb der Standardabweichung liegt. Diese Daten wurden durch FACS (*Fluorescense-*

activated cell sorting)-Analysen, die in unserer Abteilung durchgeführt wurden, bestätigt (C. Ciepluch, unveröffentlichte Daten).

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass ein SGT-*„knock down“* scheinbar keinen Effekt auf die zelluläre Replikation hat. Somit war nicht zu erwarten, dass eine Analyse der parvoviralen DNA-Replikation in SGT-*„knock down“* Zellpopulationen durch unerwünschte Effekte auf die S-Phase erschwert wird.

4.5.2.3 SGT-*„knock down“* hat keinen Einfluss auf den Anteil von infizierten Zellen in einer Zellpopulation

Im folgenden sollte geklärt werden, ob SGT-*„knock down“* Zellpopulationen mit Parvovirus H1 infiziert werden können. Zur Überprüfung wurden NBE-Zellen 48h und 72h nach Transfektion mit SGT- oder GFP-siRNA mit H1-Virus (MOI=10) infiziert, 20h nach Infektion in Formalin fixiert und in Immunfluoreszenzexperimenten auf das Vorhandensein von NS1 und SGT hin untersucht.

Die mikroskopische Analyse der Immunfluoreszenzpräparate ergab, dass die SGT-Abnahme in NBE-Zellen, die mit SGT-siRNA behandelt wurden, gut zu beobachten war (Abb. 4-23A). In Zellen mit drastisch reduzierter SGT-Proteinmenge war NS1 sehr gut im Kern nachweisbar. Dabei konnte kein Unterschied zur Intensität des NS1-Signals in den GFP-siRNA behandelten Kontrollzellen (Abb. 4-23A) beobachtet werden. Diese Ergebnisse wurden in Ansätzen erhalten, in denen Zellen 48h (Abb. 4-23A) oder 72h (Daten nicht gezeigt) nach Transfektion infiziert wurden.

Die Infektionsrate für beide Infektionszeitpunkte (24h und 48h nach Transfektion) wurde hier als Quotient von NS1-positiven Zellen zur Gesamtzellzahl ermittelt und in Prozent angegeben. Es zeigte sich, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Infektionsrate zwischen SGT- und GFP-siRNA behandelten Zellen gibt (Abb. 4-23B).

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass auch in Zellen mit drastisch reduzierter SGT-Proteinmenge NS1 nach Infektion exprimiert wird, und dass der Anteil von NS1-exprimierenden Zellen in H1-Virus infizierten Zellpopulationen mit dem der Kontrolle vergleichbar ist. Diese Ergebnisse belegten, dass der SGT-*„knock down“* keinen signifikanten Einfluss auf die ersten Schritte der H1-Infektion hat, wie Virusadsorbtion und -aufnahme oder die Konversion, die notwendige Voraussetzungen für die NS1-Expression darstellen.

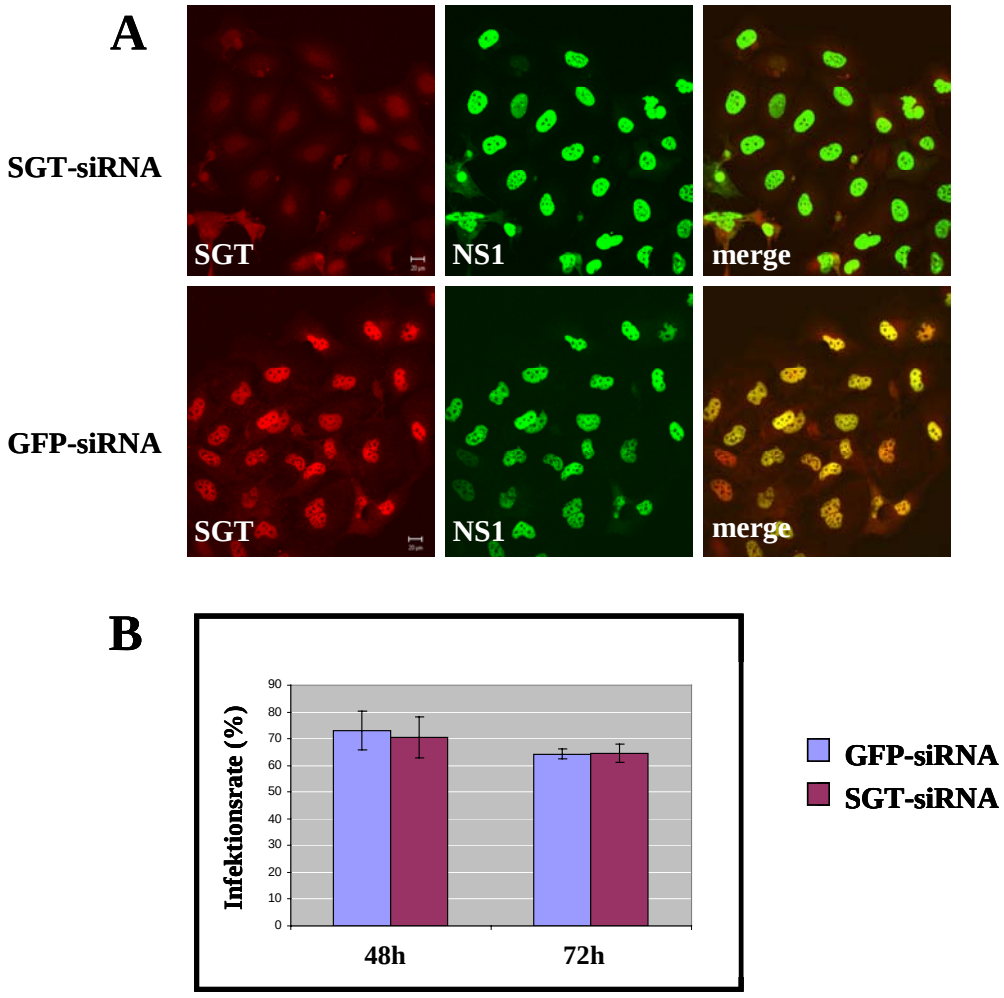


Abb. 4-23: NS1-Akkumulation in SGT-*"knock down"*-Zellen. Auf Deckgläschen kultivierte NBE-Zellen wurden mit GFP- bzw. SGT-siRNA transfiziert und 48h bzw. 72h nach Transfektion mit H1 infiziert (MOI 10). 20h nach Infektion wurden die Zellen mit 1% Formalin fixiert und SGT wurde mit dem SGT-spezifischen Ak (AC 1.1; 1:5) nachgewiesen. Für NS1 wurde der monoklonale Ak 3D9 (1:5) verwendet. Als Zweitantikörper wurde für SGT ein TRITC-gekoppelter Ziege α-Kaninchen-Antikörper (1:100, rote Fluoreszenz) und für NS1 ein FITC-gekoppelter Ziege α-Maus-Antikörper (1:100, grüne Fluoreszenz) benutzt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. **A**: Ausschnitt der gefärbten Präparate, in denen die Zellen 48h nach Transfektion infiziert wurden. **B**: Ermittlung der Infektionsrate in infizierten Zellen, die 48h bzw. 72h nach siRNA-Transfektion infiziert wurden, durch Auszählung der NS1-positiven Zellen (grüne Fluoreszenz) gegenüber der Gesamtzellzahl (DAPI-Färbung). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die durch Auszählungen in verschiedenen Experimenten ermittelt wurde.

4.5.2.4 SGT-„*knock down*“ hat keinen Einfluss auf die Akkumulation viraler Proteine oder des zellulären Hsc70-Proteins

Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass eine starke Reduktion der SGT-Proteinmenge keine Veränderung des Anteils von NS1-exprimierenden Zellen in H1-Virus infizierten Zellpopulationen bewirkt (Kap. 4.5.2.3), ist denkbar, dass dennoch die Akkumulation viraler Proteine durch den SGT-„*knock down*“ beeinträchtigt wird. Um dies zu klären, wurden Zellextrakte aus infizierten Zellen gewonnen, die zuvor mit GFP- oder SGT-siRNA transfiziert wurden. Nach Auftrennung dieser Extrakte in SDS-PAGE wurde die Menge an NS1 und VPs im *Western Blot* unter Verwendung spezifischer Antikörper bestimmt. Es zeigte sich, dass sich die Mengen an NS1(Abb. 4-24B) und VP1, VP2 oder VP3 (Abb. 4-24C) in Zellen mit und ohne SGT-„*knock down*“ nicht unterscheiden. Diese Beobachtungen zeigten, dass ein SGT-„*knock down*“ keinen signifikanten Einfluss auf die Expression/Stabilität parvoviraler Proteine zu haben scheint. VP3, dessen Menge unter SGT-„*knock down*“ Bedingungen unverändert blieb, entsteht aus einer proteolytischen Spaltung von VP2 direkt nach der Infektion und ist nur in infektiösen Partikeln zu finden. Deswegen ist die VP3-Detektion auf das „*Input*“-Virus zurückführen, da normalerweise 20h nach Infektion noch keine neue infektiösen Partikeln gebildet werden.

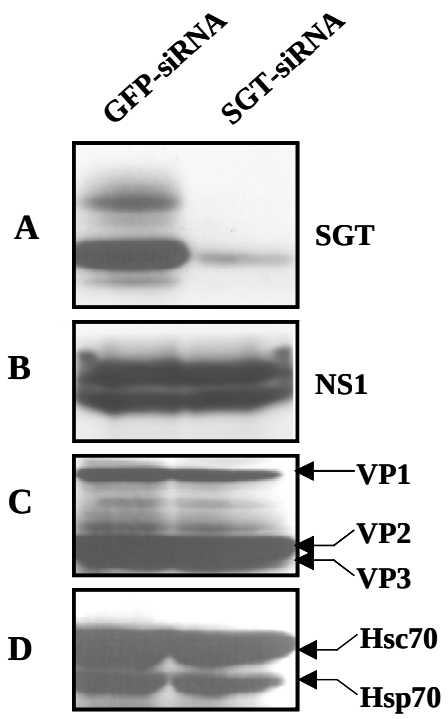


Abb. 4-24: Einfluß von SGT-“*knock down*“ auf die Akkumulation viraler Proteine und Hsc70. Mit GFP- bzw. SGT-siRNA behandelte NBE-Zellen wurden 48h nach siRNA-Transfektion mit H1 infiziert (MOI=10). 20h nach Infektion wurden die Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in Lämmli aufgenommen und die Proteine in einem 10% PAA-Gel aufgetrennt und mittels *Western Blot* analysiert. Aufgetragen wurde der Extrakt von ca. 3.5 x 10^5 Zellen. **A**: Nachweis von SGT mit dem hSGT-spezifischen Ak AG 1.1 (1:250) als Kontrolle für eine erfolgreiche Reduktion der SGT-Menge nach SGT-siRNA-Transfektion. **B**: Nachweis von NS1 mit dem Sp8-Ak (1:2000). **C**: Nachweis von VP1, 2 und 3 mit einem VP-Peptid-spezifischen Ak (1:2000). **D**: Nachweis von Hsc70 mit dem monoklonalen Hsc70-spezifischen Ak 13D3 (1:5000), der auch Hsp70 erkennt.

Als sekundärer Ak wurde für die Detektion von SGT, NS1 und VPs ein HRP-konjugierter Ziege α-Kaninchen Ak (1:10000) verwendet. Für Hsc70 bzw. Hsp70 wurde als Zweitantikörper ein HRP-konjugierter Ziege α-Maus-Ak (1:10000) verwendet.

In diesem Rahmen wurden auch Analysen mit Hsc70-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Da Hsc70 mit SGT Komplexe bilden kann (Liu *et al*., 1999; Tobaben *et al*., 2001), sollte hier untersucht werden, ob der SGT-„*knock down*“ die Hsc70-Proteinmenge beeinflusst. Dies scheint nicht der Fall zu sein, da annähernd identische Mengen an Hsc70 in SGT-„*knock down*“ und Kontrollextrakten nachgewiesen werden konnten (Abb. 4-24D).

4.5.2.5 SGT-„*knock down*“ hat keinen Einfluss auf die Bildung/Stabilität der APAR-Bodies

Da SGT in APAR-Bodies akkumuliert, bestand die Möglichkeit, dass SGT an der Bildung dieser Strukturen beteiligt ist oder deren Stabilität beeinflusst. Mit Hilfe der SGT-„*knock down*“ Zellen konnte diese Hypothese erstmals überprüft werden. Deshalb wurden SGT-„*knock down*“ Zellen aus Kapitel 4.5.2.3, die mit einem NS1-spezifischen Antikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper gefärbt waren, auf APAR-Bodies hin durchsucht. Es zeigte sich, dass NS1-enthaltende APAR-Bodies auch in Zellen mit reduzierter SGT-Proteinmenge nachweisbar sind. Es konnten mit der NS1-spezifischen Färbung keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl, Größe und Verteilung der APAR-Bodies in Zellen mit und ohne SGT-„*knock down*“ erkannt werden (Daten nicht gezeigt).

Die hier gemachten Beobachtungen ergaben einen starken Hinweis darauf, dass eine reguläre SGT-Proteinmenge keine notwendige Voraussetzung für die Etablierung von APAR-Bodies ist. Da in „*knock down*“ Zellen noch eine sehr geringe Menge an SGT nachweisbar war (Abb. 4-23A), kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Restmenge an endogenem SGT zur Bildung dieser Strukturen beiträgt.

4.5.2.6 Analyse der viralen Replikationsprodukte auf Einzelzellebene

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine drastische Reduktion der SGT-Proteinmenge weder einen signifikanten Einfluss auf die Infektionsrate (Kap. 4.5.2.3) und die Akkumulation viraler Proteine (NS1 und VPs; Kap. 4.5.2.4) hat, noch auf die Entstehung und Stabilität der APAR-Bodies (Kap. 4.5.2.5), sollte im weiteren untersucht werden, wie ein SGT-„*knock down*“ auf die parvovirale DNA-Replikation wirkt. Dazu sollte die Bildung der viralen Replikationsformen auf der Ebene der einzelnen Zelle untersucht werden. Hierzu wurden Immunfluoreszenzanalysen BrdU-markierter Zellen durchgeführt. Wie bereits erwähnt

wurde, wird BrdU bei der DNA-Replikation anstelle von Thymidin eingebaut und kann mittels spezifischem Antikörper nachgewiesen werden (Gratzner, 1982). In der chromosomalen DNA sind diese modifizierten Basen ohne Vorbehandlung mit HCl nicht zugänglich, während die viralen Replikationsprodukte detektiert werden können (Oleksiewicz *et al.*, 1998; Cziepluch *et al.*, 2000). Um sicherzustellen, dass nur die virale Replikation sichtbar gemacht wird, sind die folgenden Experimente ohne HCl-Behandlung durchgeführt worden.

Im einzelnen wurden NBE-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und mit SGT- oder GFP-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden 48h bzw. 72h nach Transfektion mit H1 infiziert und 20h später für 20min in Medium mit BrdU inkubiert. Nach Fixierung der Zellen mit 1% Formalin wurden sie mit einem BrdU-spezifischen Antikörper und einem entsprechenden Fluoreszenz-gefärbten Sekundärantikörper inkubiert. Die Zellen wurden zusätzlich mit DAPI und einem NS1-spezifischen Antikörper gefärbt (Abb. 4-25 und 4-26).

In den Zellen, die 48h (Abb. 4-25A) oder 72h (Abb. 4-26A) nach Transfektion infiziert wurden, konnten zwei verschiedene BrdU-gefärbte Zellpopulationen nachgewiesen werden. Es gab Zellen, die eine starke, den ganzen Kern ausfüllende BrdU-Fluoreszenz zeigten und im weiteren als $BrdU_{voll}$ bezeichnet werden. Die zweite Gruppe von Zellen zeigte ein punktartiges BrdU-Muster im Kern ($BrdU_{punktartig}$ oder kurz $BrdU_{pt}$). Der Anteil an $BrdU_{voll}$ oder $BrdU_{pt}$ Zellen in der Gesamtpopulation wurde ermittelt (Abb. 4-25B; Abb. 4-26B).

Es zeigte sich, dass annährend 72% weniger $BrdU_{voll}$-Zellen in SGT-„*knock down*“ Populationen im Vergleich zur Kontrolle vorhanden waren. Dieser Unterschied erwies sich als statistisch signifikant. Im Gegensatz dazu, wurde kein signifikanter Unterschied zwischen SGT-„*knock down*“ und Kontrollansätzen im Anteil an $BrdU_{pt}$-Zellen festgestellt. Die relativ große Fehlerrate und damit Standardabweichung bei der Bestimmung der $BrdU_{pt}$-Fraktion entstand, weil die Entscheidung, ob ein schwaches Signal bereits als positiv oder noch als Hintergrundsignal gewertet wird, naturgemäß fehlerbehafteter ist als eine Entscheidung darüber, ob das Signal den ganzen Kern ausfüllt oder nicht.

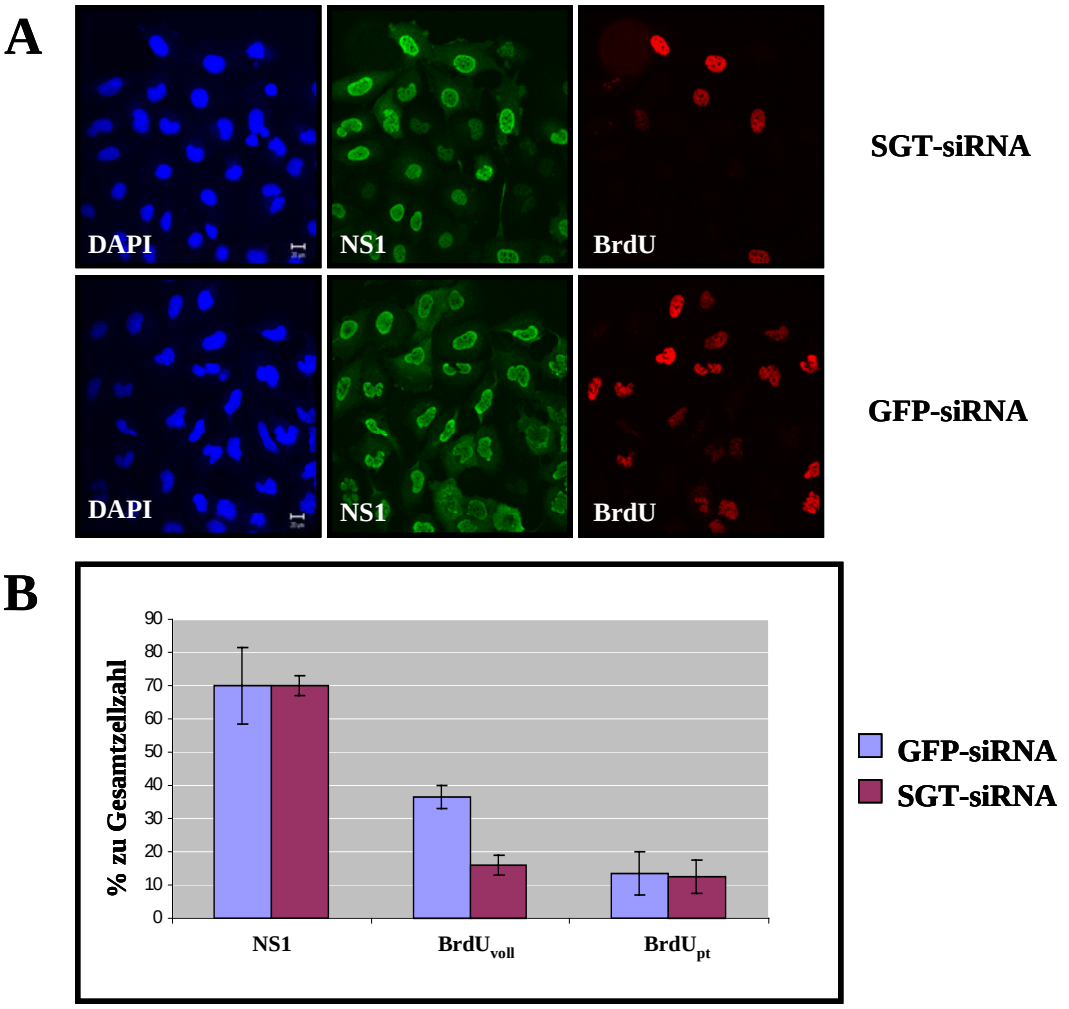


Abb. 4-25: Virale DNA-Replikation auf Einzelzellebene in SGT-"*knock down*"-Zellen (48h). Auf Deckgläschen kultivierte NBE-Zellen wurden mit GFP- bzw. SGT-siRNA transfiziert und 48h nach Transfektion mit H1 (MOI 10) infiziert. 20h nach Infektion wurden die Zellen für 20min mit BrdU (10µM Endkonzentration) inkubiert und anschließend mit 1% Formalin fixiert. Ohne vorherige Behandlung mit HCI wurde zur Detektion der viralen DNA ein monoklonaler BrdU-spezifischer Ak verwendet (1:70; Direct.com), für den NS1-Nachweis der monoklonale 3D9-Ak (1:5). Als Zweitantikörper für BrdU wurde ein mit dem Farbstoff Alexa 555 gekoppelter Ziege α-Ratte-Ak (1:2000) und für NS1 ein FITC-gekoppelter Ziege α-Maus-Ak (1:100) verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. **A**: Ausschnitt der gefärbten Präparate. **B**: Ermittlung der Rate der NS1-positiven (grüne Fluoreszenz), $BrdU_{voll}$ - bzw. $BrdU_{pt}$-Zellen (rote Fluoreszenz) gegenüber der Gesamtzellzahl (DAPI-Färbung). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die durch Auszählungen in verschiedenen Experimenten ermittelt wurde.

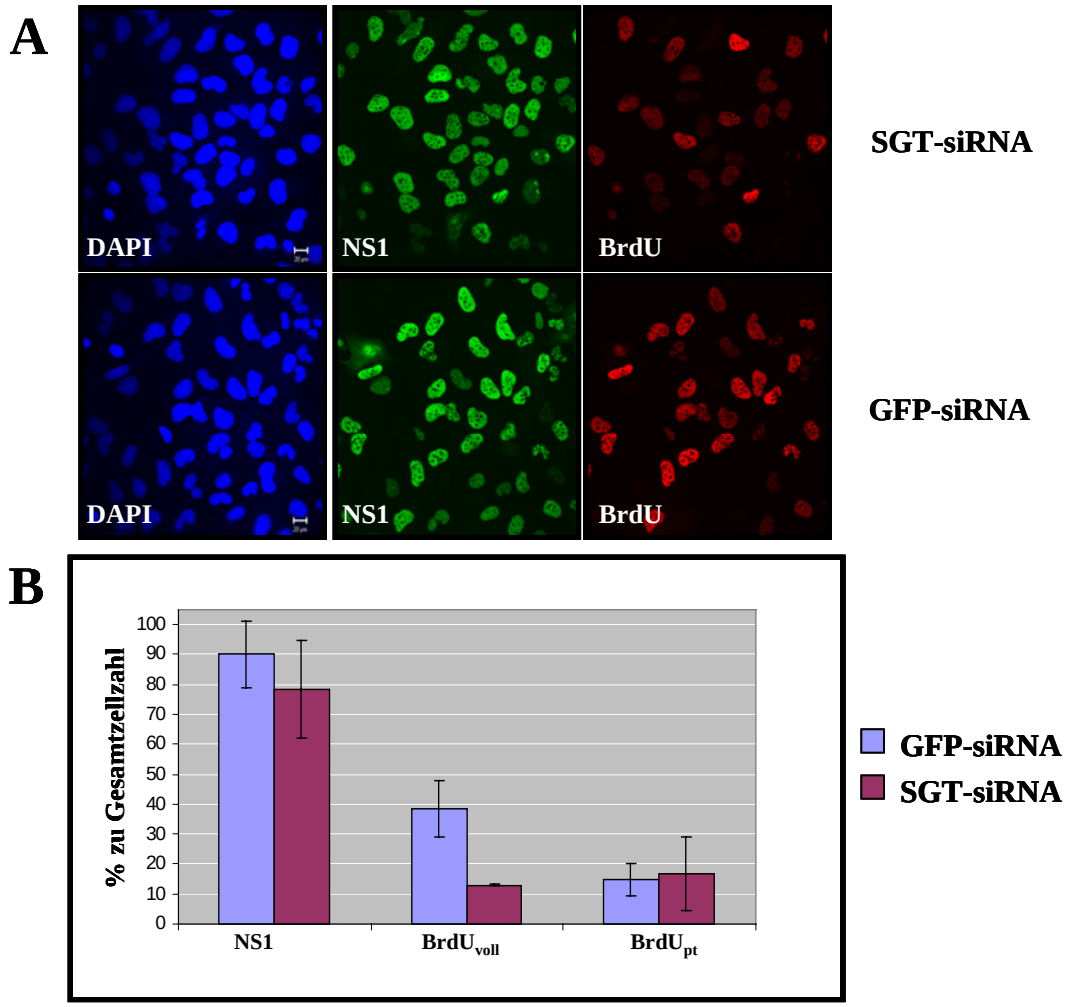


Abb. 4-26: Virale DNA-Replikation auf Einzelzellebene in SGT-*"knock down"*-Zellen (72h). Auf Deckgläschen kultivierte NBE-Zellen wurden mit GFP- bzw. SGT-siRNA transfiziert und 72h nach Transfektion mit H1 (MOI 10) infiziert. 20h nach Infektion wurden die Zellen für 20min mit BrdU (10µM Endkonzentration) inkubiert und anschließend mit 1% Formalin fixiert. Ohne vorherige Behandlung mit HCI wurde zur Detektion der viralen DNA ein monoklonaler BrdU-spezifischer Ak verwendet (1:70; Direct.com), für den NS1-Nachweis der monoklonale 3D9-Ak (1:5). Als Zweitantikörper für BrdU wurde ein mit dem Farbstoff Alexa 555 gekoppelter Ziege α-Ratte-Ak (1:2000) und für NS1 ein FITC-gekoppelter Ziege α-Maus-Ak (1:100) verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. **A**: Ausschnitt der gefärbten Präparate. **B**: Ermittlung der Rate der NS1-positiven (grüne Fluoreszenz), $BrdU_{voll}$ - bzw. $BrdU_{pt}$-Zellen (rote Fluoreszenz) gegenüber der Gesamtzellzahl (DAPI-Färbung). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die durch Auszählungen in verschiedenen Experimenten ermittelt wurde.

Auf die Gesamtpopulation bezogen, konnte ermittelt werden, dass im Kontrollansatz zum Zeitpunkt der Analyse annähernd 55% aller Zellen an der Replikation beteiligt waren ($BrdU_{voll}$ plus $BrdU_{pt}$). In der SGT-„*knock down*" Population waren es dagegen nur annähernd 30% (Abb 4-26B). Das bedeutete, dass nur etwa 25% der SGT-„*knock down*" Gesamtpopulation eine drastische Abnahme der viralen Replikation zeigten. Es waren demnach nicht alle Zellen

der Population gleichermaßen von der Abnahme der Replikationsprodukte betroffen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte darin bestehen, dass sich in den unsynchronisierten Zellpopulationen der hier vorgestellten Experimente nicht alle Zellen zum Zeitpunkt der Analyse im gleichen Stadium der Infektion befanden. Um diese Varianz auszuschliessen, sollten nur Zellen miteinander verglichen werden, die sich ungefähr im gleichen Infektionsstadium befanden. Da die größte Auswirkung des SGT-„*knock down*“ in der Abnahme der $BrdU_{voll}$-Population bestand, wurde genau bestimmt, wie groß der Anteil der Zellen in Ansätzen mit und ohne SGT-„*knock down*“ war, die gleichzeitig eine starke NS1- und BrdU-spezifische Fluoreszenz im gesamten Kern zeigten ($NS1_{voll}$ und $BrdU_{voll}$).

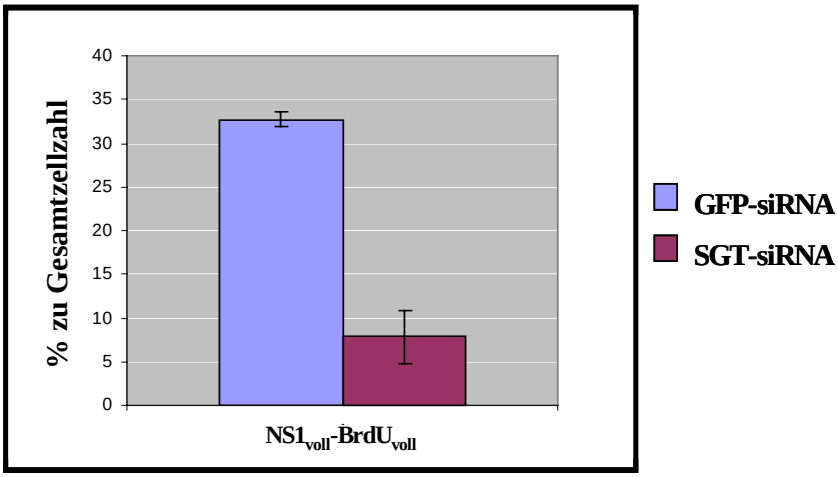


Abb. 4-27: Ermittlung der Rate der $BrdU_{voll}$-$NS1_{voll}$-Zellen zur Gesamtzellzahl. Die Zellen wurden so behandelt wie in Abb. 4-25 bzw. 4-26 beschrieben. Ermittelt wurde hier die Rate der $BrdU_{voll}$–Zellen zur Gesamtzellzahl, die gleichzeitig auch eine starke NS1-Fluoreszenz zeigten ($NS1_{voll}$). Die Zellen wurden in diesem Fall 48h nach Transfektion mit H1 infiziert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die durch Auszählungen in verschiedenen Experimenten ermittelt wurde.

Der Anteil von $NS1_{voll}$-$BrdU_{voll}$-Zellen betrug annähernd 33% im Kontrollansatz und nur annähernd 8% im SGT-„*knock down*“ Ansatz (Abb. 4-27). Das zeigte klar, dass unter SGT-„*knock down*“ Bedingungen der Anteil an aktiv Virus-replizierenden Zellen ($NS1_{voll}$-$BrdU_{voll}$) im Vergleich zur Kontrolle annähernd um 75% reduziert war. Diese BrdU-Experimente zeigten, dass ein SGT-„*knock down*“ einen Effekt auf die virale Replikation ausübt. Der genaue Schritt, an welchem SGT involviert ist, konnte jedoch nicht bestimmt werden.

4.5.2.7 SGT-*„knock down“* führt zu einer Reduktion der Menge an mRF, dRF und der einzelsträngigen Virion-DNA

Da mittels der im vorigen Kapitel beschriebenen BrdU-Experimente keine Aussage über den Einfluss von SGT auf die Replikationsschritte getroffen werden konnte, wurden *Southern Blot*-Analysen duchgeführt. Das erlaubte, einige DNA Replikationsprodukte zu identifizieren und somit zu bestimmen, welche Schritte durch den *„knock down“* von SGT betroffen sein können.

Im einzelnen wurden dazu NBE-Zellen mit GFP- oder SGT-siRNA transfiziert und 48h später mit H1-Virus (MOI=10) infiziert. 20h nach Infektion wurden Hirt-Extrakte gewonnen. Nach Proteinase K-Verdau wurde die genomische DNA durch mehrmaliges Passieren durch eine Spritze mechanisch geschert. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit (Kap. 4.5.1) beschriebenen Überexpressionsstudien wurde hier keine Fällung der chromosomalen DNA in Gegenwart von NaCl durchgeführt. Dadurch wurde sichergestellt, dass die virale ssDNA (Virion-DNA) bei der Extraktion nicht verloren geht. Anschließend wurden die viralen Replikationsprodukte auf einem Agarosegel aufgetrennt und mittels *Southern Blot* und Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten H1-Sonde identifiziert.

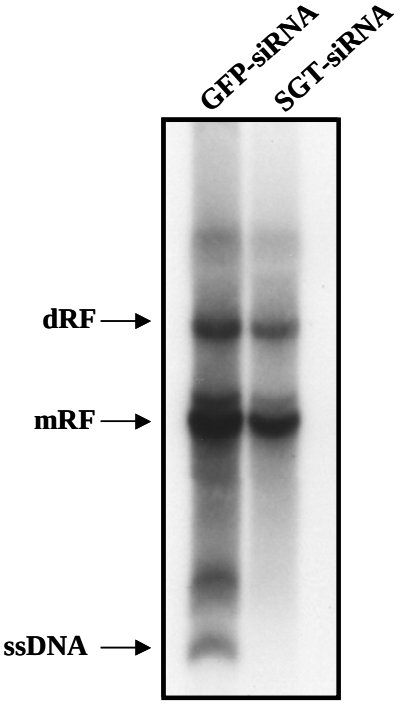


Abb. 4-28: Einfluss von SGT-*“knock down“* auf die H1 DNA-Replikation. Mit GFP- bzw. SGT-siRNA behandelte NBE-Zellen wurden 48h nach siRNA-Transfektion mit H1 infiziert (MOI=10). 20h nach Infektion wurden die Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in Hirtpuffer lysiert und nach Proteinase K-Verdau wurde die chromosomale DNA durch mehrmaliges Passieren durch eine Spritze mechanisch geschert. Nach Auftrennen der viralen DNA über ein 1% Agarosegel wurde sie auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer ^{32}P-markierten H1-Sonde hybridisiert. Aufgetragen wurde der Extrakt aus $4.6x10^4$ Zellen. mRF: monomere Replikative Form; dRF: dimere Replikative Form; ssDNA: einzelsträngige DNA

Ein Vergleich der Menge an viralen Replikationsformen zwischen Ansätzen mit und ohne SGT–„*knock down*“ zeigte, dass die Menge an mRF und dRF in SGT-„*knock down*“ Zellen reduziert war (Abb. 4-28). Die größte Reduktion war bei der ssDNA zu beobachten, die in diesem Experiment fast nicht mehr nachweisbar war (Abb. 4-28). Diese Ergebnisse wurden in unabhängigen Experimenten reproduziert, wobei immer die Menge an mRF, dRF und ssDNA in den Ansätzen mit SGT-„*knock down*“ gegenüber der Kontrolle deutlich reduziert war (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigten zum ersten Mal einen Effekt des SGT-„*knock down*“ auf die Akkumulation aller viralen Replikationsformen (mRF, dRF, ssDNA). Ob dieser Effekt auf der Ebene der Synthese oder Stabilität der akkumulierten Replikationsformen zustande kommt, lässt sich aus den hier durchgeführten Untersuchungen nicht schließen. Allerdings konnten triviale Erklärungen, wie eine Verringerung des Anteils der Zellen in der S-Phase (Kap. 4.5.2.2) oder eine verringerte Menge von NS1 als Ursachen für diesen Effekt ausgeschlossen werden (Kap. 4.5.2.3; Kap. 4.5.2.4).

Die Reduktion der Menge an Replikationsprodukten in SGT-„*knock down*“ Zellen könnte aber nicht direkt auf der Ebene der Replikation, sondern durch indirekte Einflüsse zustande kommen. Da Replikation und Verpackung gekoppelt sind (Tullis *et al*., 1993; Cotmore & Tattersall, 1995) und die größte Reduktion in der ssDNA-Menge beobachtet wurde, besteht die Möglichkeit, dass SGT für eine effiziente Verpackung der ssDNA oder aber für die Kapsidassemblierung benötigt wird.

5 Diskussion

Die hier vorgelegte Arbeit zielte auf die Klärung der Funktion des zellulären SGT-Proteins im Lebenszyklus des H1-Parvovirus, da es bereits zu Beginn dieser Arbeit Hinweise über eine Beteiligung von SGT an der viralen DNA-Replikation und/oder regulatorischen Prozessen in APAR-Bodies gab. Zum einen bildet SGT *in vitro* einen Komplex mit NS1 (Cziepluch *et al*., 1998), dem wichtigsten Regulations- und Replikationsprotein des Virus. Zum anderen akkumuliert SGT nach Infektion in APAR-Bodies, den Orten der viralen DNA-Replikation (Cziepluch *et al*., 2000) und wird NS1-spezifisch modifiziert (Cziepluch *et al*., 1998).

5.1. Beteiligung von SGT an Prozessen im viralen Infektionszyklus

Um Prozesse zu bestimmen, an denen SGT während einer H1-Infektion beteiligt ist, wurden zwei methodische Ansätze verfolgt: Die Überexpression des Proteins konnte keine funktionellen Hinweise liefern. Dagegen wurde durch SGT-„*knock down*“ Experimente mittels RNAi (RNA *interference*) eine funktionelle Relevanz dieses zellulären Proteins für die parvovirale Infektion erfolgreich gezeigt. Die Ergebnisse führten zum Schluß, dass SGT entweder direkt einen Einfluss auf die virale DNA-Replikation nimmt, oder indirekt durch eine Beteiligung an der Verpackung der Virion-DNA oder der Kapsidassemblierung.

Der SGT-„*knock down*“ hatte nachweislich keinen Einfluss auf (1) den Anteil der Zellen in S-Phase, (2) die nachweisbaren Mengen viraler Proteine (NS1 und VPs) oder (3) die Menge und Verteilung der APAR-Bodies. Daraus folgt, dass SGT nicht zu frühen Infektionsprozessen wie der Virusadsorption und –aufnahme sowie Konversion oder Akkumulation viraler Proteine beiträgt.

5.1.1 Virale DNA-Replikation

Der Einfluss von SGT auf die virale Replikation wurde einerseits auf Einzelzellebene durch Immunfluoreszenzexperimente, andererseits biochemisch mittels *Southern Blot*-Analysen untersucht. Die Analyse der Replikation auf Einzelzellebene durch BrdU-Inkorporation ergab interessanterweise, dass nicht alle Zellen einer SGT-„*knock down*“ Population im gleichen

Maße für die Verringerung der Menge an viralen DNA-Replikationsprodukten verantwortlich sind. Betroffen waren vor allem Zellen, deren Kern ganz mit NS1 erfüllt war und die eine starke BrdU-Färbung zeigten. Deshalb kann angenommen werden, dass sich die betroffenen Zellen in einem fortgeschrittenen Stadium der Infektion befanden. SGT-„*knock down*“ bewirkte eine Reduktion der Virus-DNA in dieser Zellpopulation um annähernd 75%. Wahrscheinlich manifestierte sich der SGT-„*knock down*“ Replikationsphänotyp eher in späten Infektionsstadien. Da die viralen Proteine quantitativ in unveränderter Menge vorlagen, können diese Ergebnisse nicht mit einer generellen Verzögerung der Infektion aufgrund einer herabgesetzten SGT-Menge begründet werden. Vielmehr kann geschlussfolgert werden, dass die Replikation durch das Fehlen von SGT vorzeitig eine Sättigung erreicht. Allerdings zeigten die SGT-Überexpressionsexperimente in NBE-Wirtszellen deutlich, dass SGT unter regulären Bedingungen keinen limitierenden Faktor für die parvovirale DNA-Replikation darstellt.

Den wichtigsten Hinweis auf eine direkte Beteiligung von SGT an der viralen Replikation lieferte die vergleichende *Southern Blot*-Analyse infizierter Zellen mit und ohne SGT-„*knock down*“. Unter SGT-„*knock down*“ Bedingungen war die nachweisbare Menge der viralen Replikationsprodukte mRF, dRF und ssDNA im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert. Eine direkte Beteiligung von SGT an der viralen Replikation wird zusätzlich durch folgende Gründe verstärkt: (1) SGT akkumuliert schon sehr früh nach Infektion in APAR-Bodies, zu einem Zeitpunkt an dem bereits virale Replikation gut nachweisbar ist aber noch keine Akkumulation von VP in diesen Strukturen zu beobachten war (Cziepluch *et al*., 2000), (2) es gibt bislang keine Hinweise darauf, dass bei fehlender oder nicht effizienter ssDNA-Synthese/-Verpackung auch die Synthese der mRF und dRF beeinträchtigt wird.

5.1.2 ssDNA-Synthese/-Verpackung oder Kapsidassemblierung

Da auf Einzelzellebene der Defekt auf die virale Replikation in Zellen zu beobachten war, deren Kern ganz mit NS1 ausgefüllt war, kann vermutet werden, dass sie sich im fortgeschrittenen Replikationsstadium befanden. Das weist auf eine Rolle von SGT zu einem spätem Zeitpunkt in der Infektion hin. Die *Southern Blot*-Analysen von infizierten SGT-„*knock down*“ Zellpopulationen belegten, dass die Menge der viralen mRF und dRF nicht so stark durch den „*knock down*“ abnahm, wie die Menge an ssDNA. Bei Parvoviren ist die ssDNA-Synthese mit der Verpackung in vorgeformte Kapside gekoppelt (Tullis *et al*., 1993; Cotmore & Tattersall,

1995). Daher liegt die Vermutung nahe, dass SGT eine Rolle bei der Verpackung der ssDNA oder direkt bei der Kapsidassemblierung spielt, und somit einen Einfluss auf die Replikation ausüben könnte.

5.2 SGT als Co-Chaperon im parvoviralen Infektionszyklus

Über zelluläre Funktionen von SGT ist bislang sehr wenig bekannt. Erst vor kurzem wurde SGT als Co-Chaperon in einem Komplex zusammen mit Hsc70 und CSP beschrieben (Tobaben *et al*., 2001). In diesem trimeren Komplex leistet SGT wahrscheinlich einen Beitrag zur effizienteren Vesikel-vermittelten synaptischen Signalübermittlung. Dieser Befund sowie die große Ähnlichkeit der TPR-Domäne des SGT-Proteins zu der von Hop (*Hsp70/90 organizing Protein Hop*), (Scheufler *et al.*, 2000), das als Co-Chaperon fungiert (Frydman & Hohfeld, 1997; Johnson *et al*., 1998; Chen & Smith, 1998), lassen vermuten, dass auch im viralen Infektionszyklus SGT so eine Funktion übernimmt.

Von einem Co-Chaperon würde man erwarten, dass es nur in einem Chaperonkomplex seine Funktionen ausübt. Es ist unwahrscheinlich, dass der CSP/Hsc70/SGT-Komplex eine Bedeutung für die SGT-Funktion im parvoviralen Infektionszyklus hat, da nach H1-Infektion Hsc70 nicht in APAR-Bodies akkumulierte. Allerdings könnten die Proteine mit einem Molekulargewicht von 160kDa bzw. 66kDa, die in dieser Arbeit durch Ko-Immunpräzipitationsexperimente als spezifische zelluläre SGT-Interaktionspartner identifiziert werden konnten, durchaus Mitglieder eines neuartigen SGT-Chaperonkomplexes sein. Die möglichst rasche Identifizierung dieser Proteine nimmt deshalb einen hohen Stellenwert ein.

Auch NS1 selbst könnte in einem SGT-Chaperonkomplex eine Chaperonaktivität aufweisen. Über eine solche Funktion von NS1 ist bislang nichts bekannt. Die multiplen Aufgaben dieses viralen Proteins lassen die Möglichkeit für eine derartige NS1-Funktion offen. Vor allem die ATPase-Aktivität von NS1 könnte zu einer Chaperon-Funktion beitragen, da bei den meisten Chaperon-unterstützten Reaktionen die ATP-Hydrolyse essentiell ist (Bukau & Horwich, 1998).

5.2.1 SGT als Co-Chaperon in der parvoviralen Replikation

Für die virale Replikation autonomer Parvoviren sind sowohl virale als auch zelluläre Proteine essentiell. Zu den zellulären Replikationsfaktoren, die an der viralen Replikation beteiligt sind, zählen unter anderem die DNA-Polymerase δ (Cossons *et al*., 1996), ihr Kofaktor PCNA (*proliferating cell nuclear antigen;* Jonsson & Hubscher, 1997, Christensen *et al*., 1997a,) sowie das einzelsträngige DNA-Bindungsprotein RPA (*replication protein A*; Christensen *et al*., 1997a). Alle diese Proteine kolokalisieren mit NS1 und SGT in den APAR-Bodies (Bashir *et al*., 2001). Wie bei den meisten Proteinen sind für die Funktion sowohl von Replikationsfaktoren als auch von NS1 Konformationsänderungen sehr wichtig. Bekannter maßen katalysieren Chaperone solche Umfaltungen in Proteinen (Hartl, 1996; Bukau & Horwich, 1998), daher könnte SGT als Mitglied eines Chaperonkomplexes die Konformationsänderungen der Replikationsfaktoren ermöglichen. Änderungen in der Proteinstruktur könnten auch in NS1 für seine multiplen Aktivitäten in der parvoviralen Replikation, wie Helikase-, ATPase- oder Endonuklease-Aktivität, bedeutend sein. Denkbar ist die Induktion einer neuen aktiven Konformation oder die Stabilisierung einer bereits aktiven Proteinstruktur durch einen SGT-Chaperonkomplex. Eine weitere Möglichkeit ist, dass SGT zur Assemblierung/Deassemblierung oder zur Stabilität der Replikationsmaschinerie beiträgt.

Eine Funktion von zellulären Chaperonen in der viralen Replikation wurde ebenfalls anhand einiger Beispiele in der Literatur beschrieben: Bereits in den 70iger Jahren wurde der Chaperonkomplex DnaK/DnaJ als essentieller Faktor für die DNA-Replikation von Bakteriophagen identifiziert (Georgopoulos, 1977; Friedman *et al.,* 1984). Auch das E1-Protein von Papillomaviren benötigt Chaperone (Hsp70/40) für die Bindung an den Replikationsorigin. Außerdem erhöht die Zugabe dieser Chaperone die Effizienz der Papillomavirus DNA-Replikation in einem Zell-freien Replikationssystem (Liu *et al*., 1998). So könnte auch SGT die Bindung von NS1 an die virale DNA direkt oder indirekt begünstigen und dadurch die parvovirale Replikation positiv beeinflussen.

5.2.2 SGT als Co-Chaperon bei der Kapsidassemblierung

Chaperone spielen vielfach auch eine Rolle bei der viralen Kapsidassemblierung: So benötigen z.B. T4- und λ-Phagen für die Bildung ihrer Kapside GroEL (Georgopoulos *et al*., 1973; Sternberg, 1973), während das Hsp90-Chaperon bei der Kapsidbildung des Hepadnavirus eine wichtige Funktion übernimmt (Hu *et al*., 1997). Ein anderes Beispiel, das die Wichtigkeit der Chaperone bei der Kapsidassemblierung unterstreicht, ist das Closteroviridae-kodierte HSP70h-Protein, das zum zellulären Hsp70-Chaperon homolog ist und für die Kapsidassemblierung dieser Viren benötigt wird (Satyanarayana *et al*., 2000). Die Beteiligung eines SGT-Chaperonkomplexes an der parvoviralen Kapsidassemblierung wäre folgendermaßen vorstellbar: SGT könnte die intranukleäre Kapsidbildung steuern oder bei der Faltung und korrekten Assemblierung der Kapside involviert sein. Eine Verhinderung von Aggregation oder Degradation der noch nicht fertig geformten Kapside wäre ebenfalls eine denkbare Aufgabe dieses SGT-Komplexes, um eine Stabilisierung der vorgeformten Kapside solange zu ermöglichen, bis die Synthese und Translokation der viralen DNA abgeschlossen ist.

5.2.3 SGT als Co-Chaperon bei der Verpackung der viralen DNA

Über den Verpackungsmechanismus der parvoviralen DNA in Kapside ist bislang nur wenig bekannt. Das einzige Modell zur Verpackung viraler DNA der Familie Parvoviridae wurde kürzlich für AAV von King und Mitarbeitern (2001) postuliert. Nach diesem Modell erfolgt das Einschleusen der replizierten DNA in vorgefertigte leere Kapside, wobei zunächst die virale DNA über die am 5´-Ende kovalent verankerten Rep-Proteine 68/78 am Kapsid gebunden wird. Nach dem „Andocken“ des Komplexes an die Kapside wird die Einzelstrang-Virion-DNA mit Hilfe der kleinen, am Kapsid immobilisierten, Rep-Proteine über das 3´-Ende während der DNA-Synthese ins Kapsidinnere gepumpt (King *et al*., 2001). Für diesen Ablauf scheinen die Helikase-Aktivitäten der großen AAV-Rep-Proteine nicht ausreichend zu sein, so dass eine zusätzliche Helferfunktion durch die Helikase-Aktivität der kleinen Rep-Proteine 40/52 (Smith & Kotin, 1998) benötigt wird (King *et al*., 2001). Dieser Prozess setzt eine Interaktion zwischen den Kapsiden und den Rep-Proteinen voraus, die mittels „*two-hybrid*“-System sowie Ko-Immunpräzipitationen nachgewiesen werden konnte (Dubielzig *et al.*, 1999).

Betrachtet man nun die autonomen Parvoviren kommt lediglich NS1 für derartige Funktionen während des Verpackungsprozesses in Betracht, da es als einziges Protein dieser Viren eine Helikase-Aktivität besitzt. Dass NS1 bei der Verpackung des parvoviralen Genoms beteiligt sein könnte, wird durch den Befund unterstützt, dass ein NS1-Molekül auch nach Abschluss der Verpackung kovalent an das virale Genom gebunden bleibt und an der Außenseite der Viruspartikel lokalisiert ist (Cotmore *et al*., 1989). Durch die nachgewiesene Bindung von SGT an NS1 könnte die intrinsische Helikase-Aktivität von NS1 stimuliert und somit die Verpakkung der viralen DNA in Kapside ermöglicht werden. Alternativ dazu wäre auch eine Stimulation der NS1 Endonuklease-Aktivität durch SGT denkbar, da nach dem Modell von King *et al*. (2001) auch DNA-Konkatamere als Substrat für die Verpackung dienen können.
Strukturanalysen des MVM-Kapsids lassen eine weitere Modellvorstellung über die Funktion von SGT während des Verpackungsvorgangs zu: Agbandje und Mitarbeiter (1998) konnten zeigen, dass Glycin-reiche N-terminale Peptide des VP2-Proteins eine Art Kanal im MVM-Kapsid bilden, deren Funktion bislang jedoch ungeklärt blieb. Diese Glycinkanäle könnten einer Art rotierendes „*portal*“ analog zu den Bakteriophagen (Fujisawa & Morita, 1997) entsprechen. Wenn diese Kanäle den Eintritt der viralen DNA in die Kapside ermöglichen, könnte ein SGT-Chaperonkomplex bei so einem rotierenden Modell die Bewegung dieses Kanals entlang der DNA erlauben oder nur strukturell eine Haftungsoberfläche anbieten, wodurch die Rotation des Kanals unterstützt werden würde. Bei so einem Rotationssystem kann die virale DNA nur unter ATP-Hydrolyse in die Kapside reingepumpt werden (Hendrix, 1998). Somit könnte der SGT-Komplex auch bei der Stimulierung der ATPase-Aktivität von NS1 involviert sein. Dies wird durch die Ergebnisse von Tobaben und Mitarbeitern unterstützt (2001), die gezeigt haben, dass SGT als Mitglied des CSP/SGT/Hsc70-Komplexes die Aktivität von Hsc70 stimulieren kann. Die Stimulation der ATPase-Aktivität von Hsc70 durch SGT oder CSP alleine ist jedoch viel schwächer. Dieser Befund belegt erneut, dass SGT offensichtlich nicht alleine seine Aufgaben ausübt, sondern nur in Form eines Komplexes. Deshalb ist es von großer Bedeutung, die SGT-Interaktionspartner zu identifizieren, in Ko-Immunpräzipitationsexperimenten an SGT banden und bereits aufgereinigt werden konnten.

5.3. SGT-Komplexe

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war, den SGT-Komplex mit NS1 näher zu charakterisieren. Außerdem wurde angestrebt, SGT-Komplexe mit zellulären Faktoren zu identifizieren, die möglicherweise Infektions-spezifisch gebildet werden. Die Identifikation solcher Komplexe kann auch Aufschluss geben über die zelluläre Funktion von SGT.

5.3.1. Der SGT/NS1 Komplex

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es zu zeigen, dass die TPR-Domäne und der N-Terminus von SGT notwendig und ausreichend sind für die SGT/NS1-Interaktion. Der C-Terminus von SGT wurde für die Bindung an NS1 nicht benötigt. Diesen Schluß lassen die *in vitro* Interaktionsstudien der SGT-Deletionsmutanten zu. Ein SGT-Fragment (N-TPR), welches die TPR-Domäne und den N-Terminus enthielt, interagierte mit NS1, während die Deletionsmutante TPR-C (bestehend aus der TPR-Domäne und dem C-Terminus des Proteins) nicht an NS1 binden konnte. Auch Tobaben und Mitarbeiter (2001) beschreiben, dass für die Interaktion von SGT im Komplex mit CSP und Hsc70 sowohl die TPR-Domäne als auch der N-Terminus von SGT benötigt werden.

TPR-Domänen sind nachweislich typische Protein-Protein-Interaktionsdomänen (Blatch & Lässle, 1999). Dennoch konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Bindung von NS1 an die TPR-Domäne von SGT allein nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu genügt für die Interaktion von SGT mit Hsc70 allein die TPR-Domäne mit nur wenigen flankierenden Sequenzen (Liu *et al*., 1999). Diese Diskrepanz kann auf mindestens zwei unterschiedliche Erklärungen zurückgeführt werden: Entweder wird die NS1 Bindung tatsächlich durch AA auf der N-terminalen Seite des SGT-Proteins beeinflusst, oder das in dieser Arbeit exprimierte TPR-Domänen Fragment, das etwas kleiner war als jenes, welches von Liu und Mitarbeitern exprimiert wurde, war nicht korrekt gefaltet. Gegen die zweite Möglichkeit sprechen Ergebnisse, die von Scheufler und Kollegen veröffentlicht wurden. Sie zeigen klar, dass die TPR1-Domäne von Hop, die der TPR-Domäne von SGT sehr ähnlich ist, auch ohne flankierende Sequenzen korrekt falten konnte (Scheufler *et al*., 2000). Dass die TPR-Domäne essentiell aber nicht ausreichend ist, um die Interaktionen innerhalb eines Komplexes zu vermitteln, und dass dabei auch die flankierenden Sequenzen an der TPR-Domäne eine essentielle Rolle spie-

len können, wurde auch für die Interaktionen von Hip (*Hsp70 interacting protein*) mit Hsp70 gezeigt (Irmer *at al*., 1997).

Bislang konnte der SGT/NS1-Komplex nicht durch Immunpräzipitationsexperimente dargestellt werden. Auch andere *in vitro* beschriebene NS1-Komplexe z.B. mit TFIID (Lorson *et al*., 1998), SP1 (Lorson *et al*., 1998) oder NASP1 (*NS1-associated protein 1*; Harris *et al*., 1999), lassen sich nicht mittels Immunpräzipitationen nachweisen. Das könnte bedeuten, dass native NS1-Komplexe, grundsätzlich nicht mit Ko-Immunpräzipitation oder auch Ko-Sedimentationsstudien darstellbar sind. Ein Haupthinderungsgrund könnte darin liegen, dass sich ein SGT/NS1-Komplex nur unter Bedingungen aus den APAR-Bodies lösen lässt, die auch die Dissoziation des Komplexes bewirken würden. Interagiert SGT nur mit NS1-Homooligomeren, die zu ihrer Stabilisierung ATP benötigen (Nüesch & Tattersall, 1993; Cotmore *et al*., 1995), dann wäre ATP auch essentiell für den Nachweis eines SGT/NS1-Komplexes.

Ein anderer Grund dafür kann die Modifikation von SGT *in vivo* sein (siehe auch Kap. 5.4). In dieser Arbeit wurde durch ^{32}P-*Labeling*-Experimente und 2D-Analysen gezeigt, dass SGT NS1-spezifisch an Serin- und Threoninresten phosphoryliert wird. In *in vitro* Bindungsstudien, in denen der Komplex stabil ist, liegen beide Proteine nicht-phosphoryliert vor. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass der Komplex *in vivo* mit den korrekt modifizierten Partnern nur transient gebildet wird. So ein Fall wurde für das TPR-enthaltende Immunophilin, FKBP52 beschrieben, das durch die Casein Kinase II (CKII) phosphoryliert wird. Im Gegensatz zu unphosphoryliertem Protein ist phosphoryliertes FKBP52 nicht mehr in der Lage, an Hsp90 zu binden (Miyata *et al*., 1997).

Nach einer Behandlung infizierter und nicht infizierter Zellen mit SGT-siRNA konnten die hochmolekularen posttranslationell modifizierten SGT-Polypeptidfraktionen nicht mehr nachgewiesen werden, während die nicht NS1-spezifisch phosphorylierte niedermolekulare SGT-Fraktion noch nachweisbar war. Sollte unmodifiziertes SGT nicht mehr an NS1 binden, könnte es in diesen Zellen zu einer funktionellen Inaktivierung des Komplexes kommen und somit die Defekte in der viralen Replikation erklären.

5.3.2. SGT-Komplexe mit anderen zellulären Faktoren

Im Rahmen dieser Arbeit ließen sich SGT-Komplexe mit zellulären Faktoren sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Zellen nachweisen. Es handelte sich dabei um jeweils zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 66kDa bzw. 160kDa. Da bei Immunpräzipitationsexperimenten mit den verkürzten SGT-Polypeptiden N-TPR und TPR-C gezeigt werden konnte, dass die 160kDa-Proteine mit N-TPR und die 66kDa-Proteine mit TPR-C einen Komplex bilden, könnte vermutet werden, dass jeweils die 160kDa- und die 66kDa Proteine untereinander verwandt sind. Dass diese Proteine unabhängig von einer Infektion mit SGT interagierten, weist darauf hin, dass derartige SGT-Komplexe in der Zelle prä-existieren und eventuell auch als solche vom Virus genutzt werden. Da aber die Identität der Proteine noch unbekannt ist, kann über eine Funktion dieser Komplexe in zellulären oder viralen Prozessen nur spekuliert werden.

Als zellulärer Interaktionspartner von SGT, welcher in APAR-Bodies zusammen mit SGT eine Funktion ausüben könnte, kam im Rahmen dieser Arbeit auch Hsc70 in Frage, da dieses Protein mit SGT einen Komplex bilden kann (Liu *et al*., 1999; Tobaben *et al*., 2001). Hsc70 konnte jedoch nicht in APAR-Bodies nachgewiesen werden, so dass angenommen werden muss, dass SGT unabhängig von Hsc70 eine Funktion in der viralen DNA-Replikation, der ssDNA-Synthese/-Verpackung oder der Kapsidassemblierung ausübt.

5.4 Zelluläre Lokalisation und Modifikation von SGT

In der vorliegenden Arbeit konnte nicht geklärt werden, wie SGT in APAR-Bodies akkumuliert. Es kann aber vermutet werden, dass die Interaktion mit NS1 oder anderen zellulären Proteinen einen Beitrag zur Lokalisation von SGT in den APAR-Bodies leistet, da die SGT-Proteinsequenz kein Kernlokalisationssignal aufweist. Eine Interaktion mit NS1 ist allerdings nachweislich nicht ausreichend für die SGT-Akkumulation in APAR-Bodies, da ein verkürztes SGT-Protein (N-TPR), dass *in vitro* an NS1 binden konnte, nicht in diesen Strukturen akkumulierte. Es konnte stattdessen gezeigt werden, dass die TPR-Domäne und der C-Terminus von SGT zur korrekten Positionierung ausreichen. Allerdings kann ein Einfluss von NS1 auf die Lokalisation von TPR-C indirekt, z.B. über die 66kDa-Proteine, nicht ausgeschlossen

werden. Die Abwesenheit von N-TPR in den Bodies ließe sich dann durch die fehlende Interaktion mit den 66kDa-Proteinen erklären.

Die NS1-abhängige Phosphorylierung und Lokalisation von SGT in APAR-Bodies könnten zwei gekoppelte Aktivitäten sein, da der Anteil an hyperphosphoryliertem SGT in den APAR-Bodies mit fortschreitender Infektion immer mehr zunimmt. Die SGT-Kartierung bezüglich der Modifikation belegte jedoch, dass N-TPR, das nicht in APAR-Bodies lokalisiert, NS1 spezifisch modifiziert wird. Dagegen akkumuliert TPR-C in den Bodies, trotzdem es nicht modifiziert wird. Diese Befunde könnten durch folgendes Modell mit einer Modifikation von SGT in den APAR-Bodies erklärt werden: Die Hyperphosphorylierung könnte zur Exposition C-terminaler Sequenzen führen, die für den Verbleib von SGT in den APAR-Bodies verantwortlich sind. Da für TPR-C keine Phosphorylierung nachgewiesen wurde, könnten hier die betreffenden Sequenzen bereits exponiert sein, so dass eine Akkumulation in APAR-Bodies unabhängig von der Hyperphosphorylierung möglich ist. N-TPR wird in diesem Modell zwar NS1-abhängig hyperphosphoryliert, enthält aber keine C-terminalen Sequenzen, so dass deshalb ein Verbleib in den APAR-Bodies verhindert ist.

Wo das SGT innerhalb der Zelle phosphoryliert wird und durch welche Kinasen bleibt jedoch unklar. Als potentielle Kinasen für die Phosphorylierung von SGT können Mitglieder der MAP-Kinase-Kaskade gelten. Lewis und Mitarbeiter (2000) identifizierten SGT als Zielprotein der MKK/ERK-Signaltransduktionskaskade. Für den Fall, dass SGT tatsächlich in den Bodies phosphoryliert wird, kommt der Cyklin A/cdk2-Komplex für die SGT-Phosphorylierung in Frage, da Cyklin A mit NS1 und SGT dort kolokalisiert (Bashir *et al*., 2001). Die Phosphorylierung von SGT in den APAR-Bodies könnte ebenfalls durch CKII erfolgen, da CKII durch ihr NLS-Signal im Nukleus lokalisiert ist (Marks, 1996). Außerdem besteht eine direkte Interaktion zwischen NS1 und CKII (Nüesch *et al.*, Virologie-Konferenz, Madison 2001), so dass es über die SGT/NS1-Interaktion zur Phosphorylierung von SGT durch CKII kommen könnte. Die SGT AA-Sequenz besitzt zudem sechs potentielle CKII-Konsensus-Phosphorylierungsstellen (Abb. 1-8). Mitglieder der PKC-Familie könnten neben ihrer Bedeutung für die Phosphorylierung von NS1 auch für die SGT-Modifikation verantwortlich sein, da die SGT-Sequenz neben den sechs CKII- zwei potentielle PKC-Phosphorylierungsstellen enthält (Abb. 1-8).

5.5 Ausblick

Mit dem Befund, dass SGT in der parvoviralen Replikation, insbesondere für die Produktion und Verpackung des viralen Genoms benötigt wird, eröffnen sich weitere neue Möglichkeiten, die hier präsentierten Projekte weiterzuführen. Kurzfristig müssen selbstverständlich die Daten erhärtet werden und muss die spezifische Funktion von SGT in den viralen Prozessen erforscht werden. Dabei sollte erstmals geklärt werden, ob SGT direkt in den Replikationsprozessen involviert ist oder in der Kapsidassemblierung oder ob es eher in der Verpackung der einzelsträngigen Virion-DNA eine Rolle spielt. Eine Funktion von SGT in der Kapsidassemblierung kann durch einen Vergleich der Menge der gebildeten Kapside in Zellpopulationen mit und ohne SGT-„*knock-down*“ untersucht werden. Die Menge assemblierter Kapside, die aus ^{35}S-markierten Zellextrakten mit Kapsid-spezifischen Antikörpern präzipitiert werden kann, wird Aufschluss über einen Beitrag von SGT zur Kapsidassemblierung geben. Ähnlich kann auch ein Einfluss von SGT in der Verpackung überprüft werden, indem man die immunpräzipitierten Kapside im *Southern-Blot* auf die Menge der einzelsträngigen Virion-DNA untersucht. Sollten die selben Mengen Kapside produziert werden, aber die Menge DNA in diesen Kapsiden unterschiedlich sein, dürfte eine Involvierung von SGT im Verpackungsprozess oder der Produktion der Einzelstrang-DNA vorliegen. Ein genereller Einfluss von SGT auf die DNA-Amplifizierung kann mittels rekombinanter Parvoviren festgestellt werden, welche eine Defizienz in der VP-Synthese besitzen. Bei diesen rekombinanten Viren werden nur die monomeren und konkatemeren Doppelstrang-Replikationsintermediate gebildet. Ein indirekter Einfluss auf die Bildung der Replikationsintermediate aufgrund fehlender Einzelstrang-DNA-Synthese kann mit diesen Viren ausgeschlossen werden.

Die erzielten Ergebnisse in dieser Arbeit legen nahe, dass die SGT-Funktionen in viralen Prozessen durch NS1-induzierte Phosphorylierungen an Serinen und Threoninen reguliert werden können. Dabei ist zu erwarten, dass im Verlauf der funktionellen Analysen immer mehr regulatorische Fragestellungen in den Vordergrund rücken. Gezielte Mutagenese könnte Beweise erbringen, dass in der Tat die SGT-Phosphorylierung eine regulatorische Rolle spielt. Neben solchen Phosphorylierungsmutanten, könnten auch die in der Arbeit hergestellten Deletionsmutanten weiter untersucht werden. Durch eine Expression solcher SGT-Fragmente in SGT-„*knock-down*“ Zellen, können die SGT-Domänen kartiert werden, die für Prozesse im parvoviralen Lebenszyklus essentiell sind.

Mittelfristig sollte eine genaue Charakterisierung der SGT-Funktionen in diesen Prozessen *in vitro* untersucht werden. Kürzlich konnte in einem ausschliesslich auf rekombinanten Proteinen basierenden Replikationssystem die DNA-Amplifikation vom linken Replikations-Origin rekonstruiert werden. Bei einer Weiterentwicklung dieser *in vitro* Replikation zur vollständigen DNA-Amplifikation, d.h. Produktion von monomeren und konkatemeren Replikations-Intermediaten bis hin zur verpackten Virion-DNA, könnten dabei SGT-abhängige Prozesse im Detail untersucht werden. Sind diese Prozesse erst bekannt, dürfte die weitere Etablierung von *in vitro* Assays für die detaillierte Funktionsanalyse von SGT durchaus realistisch werden.

Da die bislang beschriebene Aktivität des SGT-Proteins, einem Hsc70-spezifischen Co-Chaperon entspricht, liegt die Vermutung nahe, dass SGT auch in parvoviralen Prozessen eine ähnliche Funktion übernimmt. Da Hsc70 während der parvoviralen Infektion nicht mit SGT in Zusammenhang gebracht werden konnte, ist der Identifizierung des Chaperons, mit dem SGT als Co-Chaperon in viralen Prozessen zusammenarbeitet, hohe Priorität einzuräumen. Als Mitglieder eines SGT-Chaperonkomplexes kommen neben NS1 auch die beiden zellulären SGT-Interaktionspartner (66kDa und 160kDa), welche im Rahmen dieser Arbeit identifiziert worden sind, in Frage. Diese Proteine könnten zusammen mit SGT in ATPase-Assays und klassischen Proteinrückfaltungsexperimenten getestet werden.

Diese projizierten Versuche werden sicherlich auf lange Sicht hin gesehen neue Erkenntnisse sowohl über die Aufgaben von SGT im parvoviralen Infektionszyklus als auch über die zellulären Funktionen dieses Proteins liefern. Mit der hier präsentierten Arbeit ist sicherlich ein Grundstein zur Etablierung eines *in vitro* Replikations- und Verpackungssystems autonomer Parvoviren gelegt worden. Gerade eine solche Entwicklung würde es erlauben, neue rekombinante Parvoviren für die Gentherapie herzustellen, deren Produktion in der Zelle nicht möglich ist. Dabei soll nur erwähnt werden, dass neben Viren die für toxische Proteine kodieren, auch solche Viren hergestellt werden könnten, die keine NS1-kodierende Region enthalten. Damit wäre nicht nur die Kodierungskapazität von rekombinanten Parvoviren um ein Vielfaches erhöht, sondern es ergeben sich auch grundsätzlich neue Möglichkeiten der Gentherapie.

6 Zusammenfassung

Autonome Parvoviren sind kleine hüllenlose Viren mit ikosaedrischem Kapsid und einem einzelsträngigen linearen DNA-Genom von nur etwa 5000 Basen. Dieses kodiert für zwei regulatorische Nichtstrukturproteine (NS1 und NS2) sowie die Kapsidproteine (VP). Für die Vermehrung sind Parvoviren stark auf zelluläre Faktoren angewiesen. Ein zelluläres Protein, das dabei eine Rolle spielen könnte, ist das *small glutamine rich TPR-containing protein* (SGT). Es wurde als Interaktionspartner des hauptregulatorischen NS1-Proteins vom autonomen Parvovirus H1 identifiziert. SGT akkumuliert nach Infektion zusammen mit NS1 und zellulären Replikationsfaktoren in APAR-Bodies, nukleären Strukturen, die als Orte der parvoviralen Replikation beschrieben wurden. Darüber hinaus wird SGT NS1-abhängig modifiziert. Den Beitrag von SGT im parvoviralen Lebenszyklus zu untersuchen, war Ziel der vorgelegten Arbeit.

Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass SGT für einen optimalen Ablauf der parvoviralen DNA-Replikation benötigt wird. Eine durch RNAi (RNA *interference*) drastisch reduzierte SGT-Menge bewirkte eine Abnahme der monomeren und dimeren viralen Replikationsformen. Am stärksten war die Mengenabnahme bei der Virion-DNA (ssDNA). Die SGT-spezifische RNAi hatte keinen Einfluss auf (1) die Akkumulation viraler Proteine (NS1 und VP), (2) die S-Phase des Zellzyklus, auf die das Virus zur Replikation angewiesen ist, oder (3) die Anzahl und Verteilung der APAR-Bodies. Somit sind triviale Gründe, wie das Fehlen von NS1 oder eine verminderte Zahl an S-Phase-Zellen, für den beobachteten Effekt ausgeschlossen. Die erzielten Ergebnisse zeigten auch, dass SGT nicht für die Etablierung der viralen Infektion benötigt wird, die Prozesse wie Virusadsorption, -aufnahme, Konversion des einzelsträngigen Genoms in eine doppelsträngige Form oder virale Proteinexpression beinhaltet. Vielmehr liessen alle Ergebnisse den Schluss zu, dass SGT entweder direkt an der viralen DNA-Replikation beteiligt ist oder an damit gekoppelten Prozessen, wie der Verpackung des viralen Genoms oder der dafür benötigten Kapsidassemblierung.

Für alle diese viralen Prozesse ist in Infektionsmodellen anderer Viren die Beteiligung von Chaperonkomplexen bereits nachgewiesen worden. Da SGT mit CSP und Hsc70 in neuronalen Zellen nachweislich einen funktionellen trimeren Chaperonkomplex bildet, kann vermutet werden, dass SGT auch in der parvoviralen Replikation die Funktion eines Co-Chaperons übernimmt. Allerdings wurde in dieser Arbeit Hsc70 nicht in APAR-Bodies nachgewiesen, so

dass für die parvovirale Replikation andere Chaperonpartner von SGT postuliert werden müssen. Hierfür kommen NS1 und in dieser Arbeit identifizierte zelluläre SGT-Bindungsproteine von 66kDa bzw. 160kDa in Frage.

Weiteres Ziel war es, SGT-Bereiche zu kartieren, die für verschiedene Aktivitäten, wie (1) die Bindung von SGT an NS1, (2) die NS1-abhängige Modifikation von SGT und (3) die Lokalisation von SGT in APAR-Bodies verantwortlich sind. SGT enthält drei Bereiche, die jeweils etwa 100 Aminosäuren umfassen: Eine N-terminale Domäne, eine zentrale TPR-Domäne und eine Glutamin-reiche C-terminale Domäne. Mittels *in vitro*-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion mit NS1 die TPR-Domäne und der N-Terminus von SGT notwendig und ausreichend sind. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass SGT an N-terminalen Serin- und Threoninresten NS1-abhängig phosphoryliert wird. Zur korrekten Positionierung von SGT in APAR-Bodies genügten die TPR-Domäne und der C-Terminus. Zusammenfassend zeigten die hier erzielten Ergebnisse, dass NS1 einen Beitrag zur korrekten Lokalisation von SGT in APAR-Bodies leisten kann, aber nicht ausreichend dafür ist. Es muss deshalb postuliert werden, dass zusätzliche zelluläre Faktoren zur Verankerung von SGT in APAR-Bodies benötigt werden. Die in dieser Arbeit identifizierten 66kDa-Proteine, die mit einem verkürzten SGT-Fragment interagierten, das die TPR-Domäne und den C-Terminus enthält und in APAR-Bodies lokalisiert, kommen dafür in Frage.

Die Analyse von Proteinfunktionen stellt eine der größten Herausforderungen dar. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über virale Prozesse an denen SGT beteiligt ist, zelluläre Faktoren mit denen SGT interagiert und post-translationelle Modifikationen, denen SGT unterliegt, eröffnen erfolgversprechende Perspektiven, um die Funktion von SGT und deren Regulation sowohl im parvoviralen Lebenszyklus als auch in der Zelle zu studieren.

7 Literatur

Agbandje, M., Parrish, C.R., and Rossmann, M.G. (1995), 'The structure of parvoviruses', *Sem. Virol.*, 6, 299-309.

Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A.L., Wang, F., Tattersall, P. and Rossmann, M.G. (1998), 'Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice', *Structure*, 6, 11, 1369-81.

Ahn, J.K., Gavin, B.J., Kumar, G. and Ward, D.C. (1989), 'Transcriptional analysis of minute virus of mice P4 promoter mutants', *J Virol*, 63, 12, 5425-39.

Ahn, J.K., Pitluk, Z.W., Ward, D.C. (1992), 'The GC box and TATA transcription control elements in the P38 promoter of thge minute virus of mice are necessary and sufficient for transactivation by the nonstructural protein NS1', *J. Virol.*, 66, 3776-3783.

Anderson, M.J., Lewis, E., Kidd, I.M., Hall, S.M. and Cohen, B.J. (1984), 'An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection', *J-Hyg-Lond*, 93, 1, 85-93.

Anouja, F., Wattiez, R., Mousset, S. and Caillet Fauquet, P. (1997), 'The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins', *J.Virol.*, 71, 6, 4671-4678.

Anwar, A., Siegel, D., Kepa, J.K. and Ross, D. (2002), 'Interaction of the Molecular Chaperone Hsp70 with Human NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1', *J Biol Chem*, 277, 16, 14060-7.

Astell, C.R., Chow, M.B. and Ward, D.C. (1985), 'Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication', *J.Virol.*, 54, 1, 171-177.

Astell, C.R., Smith, M., Chow, M.B. and Ward, D.C. (1979), 'Structure of the 3' hairpin termini of four rodent parvovirus genomes: nucleotide sequence homology at origins of DNA replication', *Cell*, 17, 3, 691-703.

Astell, C.R., Thomson, M., Merchlinsky, M. and Ward, D.C. (1983), 'The complete DNA sequence of minute virus of mice, an autonomous parvovirus', *Nucleic Acids Res*, 11, 4, 999-1018.

Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hannon, W.H. (1965). ´Adenovirus-associated defective parvovirus particles´, *Science*, 149, 754-756.

Ausubel, F.R., Bernt, R., and Kingst, R.E. (1989), `Short protocols in molecular biology´, *Greene Publishing Associates and J. Wiley and son, N.Y.*

Bashir, T., Horlein, R., Rommelaere, J. and Willwand, K. (2000), 'Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10, 5522-7.

Bashir, T., Rommelaere, J. and Cziepluch, C. (2001), 'In vivo accumulation of cyclin A and cellular replication factors in autonomous parvovirus minute virus of mice-associated replication bodies', *J Virol*, 75, 9, 4394-8.

Bates, R.C., Snyder, C.E., Banerjee, P.T. and Mitra, S. (1984), 'Autonomous parvovirus LuIII encapsidates equal amounts of plus and minus DNA strands', *J Virol*, 49, 2, 319-24.

Berns, K.I. (1996), 'Parvoviridae: The viruses and their replication', *in* Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Channock, R., Hirsh, M.S. and Melnick, J.L. (eds.), *Fields Virology*, Philadelphia, Lipincott-Raven Publishers.

Berns, K.I., Pinkerton, T.C., Thomas, G.F. and Hoggan, M.D. (1975), 'Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells', *Virology*, 68, 2, 556-60.

Bernstein, E., Denli, A.M. and Hannon, G.J. (2001), 'The rest is silence', *Rna*, 7, 11, 1509-21.

Blatch, G.L. and Lassle, M. (1999), 'The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein- protein interactions', *Bioessays*, 21, 11, 932-9.

Bodendorf, U., Cziepluch, C., Jauniaux, J.C., Rommelaere, J. and Salome, N. (1999), 'Nuclear export factor CRM1 interacts with nonstructural proteins NS2 from parvovirus minute virus of mice', *J Virol*, 73, 9, 7769-79.

Bradford, M.M. (1976), 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Anal Biochem*, 72, 248-54.

Brandenburger, A., Legendre, D., Avalosse, B. and Rommelaere, J. (1990), 'NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp', *Virology*, 174, 2, 576-584.

Braun, J.E. and Scheller, R.H. (1995), 'Cysteine string protein, a DnaJ family member, is present on diverse secretory vesicles', *Neuropharmacology*, 34, 11, 1361-9.

Brockhaus, K., Plaza, S., Pintel, D.J., Rommelaere, J. and Salome, N. (1996), 'Nonstructural proteins NS2 of minute virus of mice associate in vivo with 14-3-3 protein family members', *J Virol*, 70, 11, 7527-34.

Brown, K.E., Anderson, S.M. and Young, N.S. (1993), 'Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus', *Science*, 262, 5130, 114-7.

Brown, K.E., Green, S.W. and Young, N.S. (1995), 'Goose parvovirus--an autonomous member of the dependovirus genus?', *Virology*, 210, 2, 283-291.

Buchner, E. and Gundersen, C.B. (1997), 'The DnaJ-like cysteine string protein and exocytotic neurotransmitter release', *Trends Neurosci*, 20, 5, 223-7.

Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998), 'The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines', *Cell*, 92, 3, 351-66.

Buller, R.M., Janik, J.E., Sebring, E.D. and Rose, J.A. (1981), 'Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus- associated virus replication', *J Virol*, 40, 1, 241-7.

Caillet Fauquet, P., Perros, M., Brandenburger, A., Spegelaere, P. and Rommelaere, J. (1990), 'Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins', *EMBO J.*, 9, 9, 2989-2995.

Calvin, N.M. and Hanawalt, P.C. (1988), 'High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation', *J Bacteriol*, 170, 6, 2796-801.

Cater, J.E. and Pintel, D.J. (1992), 'The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells', *J.Gen.Virol.*, 73, Pt 7, 1839-1843.

Chamberlain, L.H., Henry, J. and Burgoyne, R.D. (1996), 'Cysteine string proteins are associated with chromaffin granules', *J Biol Chem*, 271, 32, 19514-7.

Chen, M.X., McPartlin, A.E., Brown, L., Chen, Y.H., Barker, H.M. and Cohen, P.T. (1994), 'A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus', *Embo J*, 13, 18, 4278-90.

Chen, S., Prapapanich, V., Rimerman, R.A., Honore, B. and Smith, D.F. (1996), 'Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins hsp90 and hsp70', *Mol Endocrinol*, 10, 6, 682-93.

Chen, S. and Smith, D.F. (1998), 'Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery', *J Biol Chem*, 273, 52, 35194-200.

Chen, Y.Q., de Foresta, F., Hertoghs, J., Avalosse, B.L., Cornelis, J.J. and Rommelaere, J. (1986), 'Selective killing of simian virus 40-transformed human fibroblasts by parvovirus H-1', *Cancer Res*, 46, 7, 3574-9.

Christensen, J., Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1995), 'Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner', *J.Virol.*, 69, 9, 5422-5430.

Christensen, J., Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1997a), 'A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication', *J.Virol.*, 71, 2, 1405-1416.

Christensen, J., Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1997b), 'Parvovirus initiation factor PIF: a novel human DNA-binding factor which coordinately recognizes two ACGT motifs', *J.Virol.*, 71, 8, 5733-5741.

Christensen, J., Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1999), 'Two new members of the emerging KDWK family of combinatorial transcription modulators bind as a heterodimer to flexibly spaced PuCGPy half-sites', *Mol Cell Biol*, 19, 11, 7741-50.

Christensen, J., and Tattersall, P. (2002), `Parvovirus initator protein NS1 and RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system´, *J. Virology*, in press.

Chung, C.T., Niemela, S.L. and Miller, R.H. (1989), 'One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7, 2172-5.

Cooper, J.A. (1991), `Estimation of Phosphorylation Stoichiometry by Separation of Phosphorylated Isoforms´, *Methods in Enzymology*.

Corbau, R., Duverger, V., Rommelaere, J. and Nuesch, J.P. (2000), 'Regulation of MVM NS1 by protein kinase C: impact of mutagenesis at consensus phosphorylation sites on replicative functions and cytopathic effects', *Virology*, 278, 1, 151-67.

Corbau, R., Salom, N., Rommelaere, J. and Nuesch, J.P. (1999), 'Phosphorylation of the viral nonstructural protein NS1 during MVMp infection of A9 cells', *Virology*, 259, 2, 402-15.

Cornelis, J.J., Becquart, P., Duponchel, N., Salome, N., Avalosse, B.L., Namba, M. and Rommelaere, J. (1988a), 'Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice', *J.Virol.*, 62, 5, 1679-1686.

Cornelis, J.J., Spruyt, N., Spegelaere, P., Guetta, E., Darawshi, T., Cotmore, S.F., Tal, J. and Rommelaere, J. (1988b), 'Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression', *J.Virol.*, 62, 9, 3438-3444.

Cossart, Y.E., Field, A.M., Cant, B. and Widdows, D. (1975), 'Parvovirus-like particles in human sera', *Lancet*, 1, 7898, 72-3.

Cossons, N., Faust, E.A. and Zannis Hadjopoulos, M. (1996), 'DNA polymerase delta-dependent formation of a hairpin structure at the 5' terminal palindrome of the minute virus of mice genome', *Virology*, 216, 1, 258-264.

Cotmore, S.F., Christensen, J., Nuesch, J.P. and Tattersall, P. (1995), 'The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]2-3', *J.Virol.*, 69, 3, 1652-1660.

Cotmore, S.F., Christensen, J. and Tattersall, P. (2000), 'Two widely spaced initiator binding sites create an HMG1-dependent parvovirus rolling-hairpin replication origin', *J Virol*, 74, 3, 1332-41.

Cotmore, S.F., D'abramo, A.M., Jr., Carbonell, L.F., Bratton, J. and Tattersall, P. (1997), 'The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells', *Virology*, 231, 2, 267-280.

Cotmore, S.F., Gunther, M. and Tattersall, P. (1989), 'Evidence for a ligation step in the DNA replication of the autonomous parvovirus minute virus of mice', *J.Virol.*, 63, 2, 1002-1006.

Cotmore, S.F., Sturzenbecker, L.J. and Tattersall, P. (1983), 'The autonomous parvovirus MVM encodes two nonstructural proteins in addition to its capsid polypeptides', *Virology*, 129, 2, 333-343.

Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1986), 'Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice', *J.Virol.*, 58, 3, 724-732.

Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1987), 'The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates', *Adv Virus Res*, 33, 91-174.

Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1989), 'A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles', *J Virol*, 63, 9, 3902-11.

Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1990), 'Alternate splicing in a parvoviral nonstructural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics', *Virology*, 177, 2, 477-487.

Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1994), 'An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication', *EMBO J.*, 13, 17, 4145-4152.

Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1995), `DNA replication in the autonomous parvoviruses', *Semin. Virol.*, 6, 271-281.

Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1998), 'High-mobility group 1/2 proteins are essential for initiating rolling-circle-type DNA replication at a parvovirus hairpin origin', *J.Virol.*, 72, 11, 8477-8484.

Cziepluch, C., Kordes, E., Poirey, R., Grewenig, A., Rommelaere, J. and Jauniaux, J.C. (1998), 'Identification of a novel cellular TPR-containing protein, SGT, that interacts with the nonstructural protein NS1 of parvovirus H-1', *J.Virol.*, 72, 5, 4149-4156.

Cziepluch, C., Lampel, S., Grewenig, A., Grund, C., Lichter, P. and Rommelaere, J. (2000), 'H-1 parvovirus-associated replication bodies: a distinct virus-induced nuclear structure', *J Virol*, 74, 10, 4807-15.

Das, A.K., Cohen, P.W. and Barford, D. (1998), 'The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions', *Embo J*, 17, 5, 1192-9.

De Beeck, A.O., Sobczak-Thepot, J., Sirma, H., Bourgain, F., Brechot, C. and Caillet-Fauquet, P. (2001), 'NS1- and minute virus of mice-induced cell cycle arrest: involvement of p53 and p21(cip1)', *J Virol*, 75, 22, 11071-8.

de Vries, A., Flores, E.R., Miranda, B., Hsieh, H.M., van Oostrom, C.T., Sage, J. and Jacks, T. (2002), 'Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 5, 2948-53.

Deleu, L., Fuks, F., Spitkovsky, D., Horlein, R., Faisst, S., and Rommelaere, J. (1998), 'Opposite transcriptional effects of cyclic AMP responsive elements on confluent or p27-kip-expressing cells versus serum-starved or growing cells.', *Mol. and Cell. Biol.*, 18, 409-419.

Deleu, L., Pujol, A., Faisst, S., and Rommelaere, J. (1999), 'Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice (MVM) at the early S phase is required for productive infection.', *J. Virol.*, in press.

Demand, J., Luders, J. and Hohfeld, J. (1998), 'The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors', *Mol Cell Biol*, 18, 4, 2023-8.

Dettwiler, S., Rommelaere, J., and Nuesch J.P.F. (1999), 'DNA unwinding functions of minute virus of mice NS1 protein are modulated by the lambda isoform of protein kinase C.', *J. Virol.*, 73, 7410-7420.

Doerig, C., Hirt, B., Antonietti, J.P., and Beard, P. (1990), 'Non-structural proteins of parvovirus B19 and minute virus of mice control transcription.', *J. Virol.*, 64, 387-396.

Dubielzig, R., King, J.A., Weger, S., Kern, A. and Kleinschmidt, J.A. (1999), 'Adeno-associated virus type 2 protein interactions: formation of pre- encapsidation complexes', *J Virol*, 73, 11, 8989-98.

Dupressoir, T., Vanacker, J.M., Cornelis, J.J., Duponchel, N. and Rommelaere, J. (1989), 'Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells', *Cancer Res.*, 49, 12, 3203-3208.

Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001), 'RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs', *Genes Dev*, 15, 2, 188-200.

Elliott, G. and O'Hare, P. (1997), 'Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein', *Cell*, 88, 2, 223-33.

Faisst, S.R., Faisst, S., Grangette, C., Schlehofer, J.R., Rommelaere, J. (1993), 'NFkB upstream regulatory sequences of the HIV-1 LTR are involved in the inhibition of HIV-1 promoter activity by the NS proteins of autonomous parvoviruses H-1 and MVMp.', *Virology*, 197, 770-773.

Faust, E.A. and Ward, D.C. (1979), 'Incomplete genomes of the parvovirus minute virus of mice: selective conservation of genome termini, including the origin for DNA replication', *J Virol*, 32, 1, 276-92.

Flynn, G.C., Pohl, J., Flocco, M.T. and Rothman, J.E. (1991), 'Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP', *Nature*, 353, 6346, 726-30.

Fox, J.M., McCrackin Stevenson, M.A. and Bloom, M.E. (1999), 'Replication of Aleutian mink disease parvovirus in vivo is influenced by residues in the VP2 protein', *J Virol*, 73, 10, 8713-9.

Friedman, D.I., Olson, E.R., Georgopoulos, C., Tilly, K., Herskowitz, I. and Banuett, F. (1984), 'Interactions of bacteriophage and host macromolecules in the growth of bacteriophage lambda', *Microbiol Rev*, 48, 4, 299-325.

Frydman, J. and Hohfeld, J. (1997), 'Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection', *Trends Biochem Sci*, 22, 3, 87-92.

Fujisawa, H. and Morita, M. (1997), 'Phage DNA packaging', *Genes Cells*, 2, 9, 537-45.

Georgopoulos, C.P. (1977), 'A new bacterial gene (groPC) which affects lambda DNA replication', *Mol Gen Genet*, 151, 1, 35-9.

Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Casjens, S.R. and Kaiser, A.D. (1973), 'Host participation in bacteriophage lambda head assembly', *J Mol Biol*, 76, 1, 45-60.

Goebl, M. and Yanagida, M. (1991), 'The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription', *Trends Biochem Sci*, 16, 5, 173-7.

Graham, F.L., and van der Eb, A.J. (1973), `Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5´, *Virology*, 54, 536-539.

Groves, M.R. and Barford, D. (1999), 'Topological characteristics of helical repeat proteins', *Curr Opin Struct Biol*, 9, 3, 383-9.

Guetta, E., Graziani, Y. and Tal, J. (1986), 'Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice', *J Natl Cancer Inst*, 76, 6, 1177-80.

Hanson, N.D., Rhode, S.L. (1991), 'Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification.', *J. Virol.*, 65, 4325-4333.

Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T. and Weber, K. (2001), 'Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs', *J Cell Sci*, 114, Pt 24, 4557-65.

Harris, C.E., Boden, R.A. and Astell, C.R. (1999), 'A novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus of mice', *J Virol*, 73, 1, 72-80.

Hartl, F.U. (1996), 'Molecular chaperones in cellular protein folding', *Nature*, 381, 6583, 571-9.

Hendrix, R.W. (1998), 'Bacteriophage DNA packaging: RNA gears in a DNA transport machine', *Cell*, 94, 2, 147-50.

Herzog, K.H., Chen, S.C. and Morgan, J.I. (1999), 'c-jun Is dispensable for developmental cell death and axogenesis in the retina', *J Neurosci*, 19, 11, 4349-59.

Hirano, T., Kinoshita, N., Morikawa, K. and Yanagida, M. (1990), 'Snap helix with knob and hole: essential repeats in S. pombe nuclear protein nuc2+', *Cell*, 60, 2, 319-28.

Hirt, B. (1967), 'Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures', *J Mol Biol*, 26, 2, 365-9.

Hoggan, M.D., Blacklow, N.R. and Rowe, W.P. (1966), 'Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 55, 6, 1467-74.

Hu, J., Toft, D.O. and Seeger, C. (1997), 'Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi- component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids', *Embo J*, 16, 1, 59-68.

Irmer, H. and Hohfeld, J. (1997), 'Characterization of functional domains of the eukaryotic co-chaperone Hip', *J Biol Chem*, 272, 4, 2230-5.

Johnson, B.D., Schumacher, R.J., Ross, E.D. and Toft, D.O. (1998), 'Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding', *J Biol Chem*, 273, 6, 3679-86.

Jongeneel, C.V., Sahli, R., McMaster, G.K. and Hirt, B. (1986), 'A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus', *J.Virol.*, 59, 3, 564-573.

Jonsson, Z.O. and Hubscher, U. (1997), 'Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases', *Bioessays*, 19, 11, 967-75.

Kilham, L. and Margolis, G. (1969), 'Transplacental infection of rats and hamsters induced by oral and parenteral inoculations of H-l and rat viruses (RV)', *Teratology*, 2, 2, 111-23.

Kilham, L., Olivier, L.J. (1959), 'A latent virus of rats isolated in tissue culture.', *Virology*, 7, 428-437.

King, J.A., Dubielzig, R., Grimm, D. and Kleinschmidt, J.A. (2001), 'DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids', *Embo J*, 20, 12, 3282-91.

Kollek, R., Tseng, B.Y. and Goulian, M. (1982), 'DNA polymerase requirements for parvovirus H-1 DNA replication in vitro', *J Virol*, 41, 3, 982-9.

Kordes, E. (1997), `Klonierung und Charakterisierung eines neuen humanen Proteins, hSGT, das mit dem NS1-Protein des Pervovirus H-1 interagiert´, *Dissertation*, Uni Heidelberg.

Kordes, E., Savelyeva, L., Schwab, M., Rommelaere, J., Jauniaux, J.C. and Cziepluch, C. (1998), 'Isolation and characterization of human SGT and identification of homologues in Saccharomyces cerevisiae and Caenorhabditis elegans', *Genomics*, 52, 1, 90-4.

Krady, J.K. and Ward, D.C. (1995), 'Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1', *Mol.Cell Biol.*, 15, 1, 524-533.

Labieniec-Pintel, L., Pintel, D.J. (1986), 'The minute virus of mice P39 transcription unit can encode both capsid proteins.', *J. Virol.*, 57, 1163-1167.

Laemmli, U.K. (1970), 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227, 259, 680-5.

Lamb, J.R., Tugendreich, S. and Hieter, P. (1995), 'Tetratrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR?', *Trends Biochem Sci*, 20, 7, 257-9.

Lassle, M., Blatch, G.L., Kundra, V., Takatori, T. and Zetter, B.R. (1997), 'Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases', *J Biol Chem*, 272, 3, 1876-84.

Legendre, D. and Rommelaere, J. (1992), 'Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition', *J.Virol.*, 66, 10, 5705-5713.

Legendre, D. and Rommelaere, J. (1994), 'Targeting of promoters for trans activation by a carboxy- terminal domain of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice', *J.Virol.*, 68, 12, 7974-7985.

Legrand, C., Rommelaere, J., Caillet-Fauquet, P. (1993), 'MVM(p) NS-2 protein expression is required with NS-1 for maximal cytotoxicity in human transformed cells.', *Virology*, 195, 149-155.

Lewis, T.S., Hunt, J.B., Aveline, L.D., Jonscher, K.R., Louie, D.F., Yeh, J.M., Nahreini, T.S., Resing, K.A. and Ahn, N.G. (2000), 'Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry', *Mol Cell*, 6, 6, 1343-54.

Li, X., Rhode, S.L., (1991), 'Nonstructural protein NS2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cells in vivo and in vitro.', *Virolgoy*, 184, 117-130.

Linser, P., Bruning, H., Armentrout, R.W. (1977), 'Specific binding sites for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells.', *J. Virol.*, 24, 211-221.

Liu, F.H., Wu, S.J., Hu, S.M., Hsiao, C.D. and Wang, C. (1999), 'Specific interaction of the 70-kDa heat shock cognate protein with the tetratricopeptide repeats', *J Biol Chem*, 274, 48, 34425-32.

Liu, J.S., Kuo, S.R., Makhov, A.M., Cyr, D.M., Griffith, J.D., Broker, T.R. and 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.

Lorson, C., Pearson, J., Burger, L. and Pintel, D.J. (1998), 'An Sp1-binding site and TATA element are sufficient to support full transactivation by proximally bound NS1 protein of minute virus of mice', *Virology*, 240, 2, 326-337.

Lum, G.S., Schreier, A.W. (1963), `Study of a virus isolated from a chloroleukemic Wistar rat`, *Cancer Res*, 23, 1742-1747.

Luo, J.L., Yang, Q., Tong, W.M., Hergenhahn, M., Wang, Z.Q. and Hollstein, M. (2001), 'Knock-in mice with a chimeric human/murine p53 gene develop normally and show wild-type p53 responses to DNA damaging agents: a new biomedical research tool', *Oncogene*, 20, 3, 320-8.

Maekawa, M., O'Brien, D.A., Allen, R.L. and Eddy, E.M. (1989), 'Heat-shock cognate protein (hsc71) and related proteins in mouse spermatogenic cells', *Biol Reprod*, 40, 4, 843-52.

Marks, F., and Gschwendt, M. (1996), `Protein Phosphorylation´, *VCH*.

Marks, F., Pyerin, W., Ackermann, K., and Lorenz, P. (1996), `Protein Phosphorylation´, *VCH*.

Mastrogiacomo, A., Evans, C.J. and Gundersen, C.B. (1994), 'Antipeptide antibodies against a Torpedo cysteine-string protein', *J Neurochem*, 62, 3, 873-80.

Miller, J.H. (1972), `Experiments in molecular genetics´, *Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Miller, C.L. and Pintel, D.J. (2001), 'The NS2 protein generated by the parvovirus minute virus of mice is degraded by the proteasome in a manner independent of ubiquitin chain elongation or activation', *Virology*, 285, 2, 346-55.

Miller, C.L. and Pintel, D.J. (2002), 'Interaction between parvovirus NS2 protein and nuclear export factor Crm1 is important for viral egress from the nucleus of murine cells', *J Virol*, 76, 7, 3257-66.

Miyata, Y., Chambraud, B., Radanyi, C., Leclerc, J., Lebeau, M.C., Renoir, J.M., Shirai, R., Catelli, M.G., Yahara, I. and Baulieu, E.E. (1997), 'Phosphorylation of the immunosuppressant FK506-binding protein FKBP52 by casein kinase II: regulation of HSP90-binding activity of FKBP52', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 26, 14500-5.

Monti, P., Campomenosi, P., Ciribilli, Y., Iannone, R., Inga, A., Abbondandolo, A., Resnick, M.A. and Fronza, G. (2002), 'Tumour p53 mutations exhibit promoter selective dominance over wild type p53', *Oncogene*, 21, 11, 1641-8.

Morimoto, R.I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C. (1994), `The biology of Heat Shock Proteins and Molekular Chaperones´, *Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Mousset, S., Cornelis, J.J., Spruyt, N., Rommelaere, J. (1986), 'Transformation of established murine fibroblasts with ana activated cellular Harvey-ras oncogene or the polyoma middle T gene increases cell permissiveness to parvovirus minute virus of mice.', *Biochimie*, 68, 951-955.

Mousset, S., Ouadrhiri, Y., Caillet Fauquet, P., and Rommelaere, J. (1994), 'The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice non-structural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression.', *J. Virol.*, 68, 6446-6453.

Mouw, M.a.P., D. (1998), 'Amino acids 16-275 of minute virus of mice NS1 include a domain that specifically binds (ACCA)2-3-containing DNA.', *Virology*, 251, 123-131.

Muller, D.-E., Siegl, G. (1983), 'Maturation of parvoviurs LuIII in a subcellular system.ptimal conditions for in vitro synthesis and encapsidation of viral DNA.', *J. Gen. Virol.*, 64, 1043-1054.

Naeger, L.K., Cater, J., and Pintel, D.J. (1990), 'The small non-structural protein (NS2) of minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner.', *J. Virol.*, 64, 6166-6175.

Naeger, L.K., Salome, N., and Pintel, D.J. (1993), 'NS2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells.', *J. Virol.*, 67, 1034-1043.

Nguyen, Q.T., Sifer, C., Schneider, V., Allaume, X., Servant, A., Bernaudin, F., Auguste, V. and Garbarg-Chenon, A. (1999), 'Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia', *J Clin Microbiol*, 37, 8, 2483-7.

Nishikura, K. (2001), 'A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst', *Cell*, 107, 4, 415-8.

Nuesch, J.P., and Tattersall, P. (1993), 'Nuclear targeting of the parvoviral replicator protein molecule NS1: evidence for self-association prior to nuclear transport.', *Virology*, 196, 637-651.

Nuesch, J.P., Christensen, J. and Rommelaere, J. (2001), 'Initiation of minute virus of mice DNA replication is regulated at the level of origin unwinding by atypical protein kinase C phosphorylation of NS1', *J Virol*, 75, 13, 5730-9.

Nuesch, J.P., Corbau, R., Tattersall, P. and Rommelaere, J. (1998a), 'Biochemical activities of minute virus of mice nonstructural protein NS1 are modulated In vitro by the phosphorylation state of the polypeptide', *J.Virol.*, 72, 10, 8002-8012.

Nuesch, J.P., Cotmore, S.F., and Tattersall, P. (1992), 'Expression of functional parvoviral NS1 from recombinant vaccinia virus: effects of mutations in the nucleotide-binding motif.', *Virology*, 191, 406-416.

Nuesch, J.P., Cotmore, S.F., and Tattersall, P. (1995), 'Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine.', *Virology*, 209, 122-135.

Nuesch, J.P.F., Corbau, R., and Rommelaere, J. (1998b), 'Replicative functions of NS1 are regulated by the lambda isoform of protein kinase C.', *American Society for Virology 17th Annual Meeting*, Vancouver, Canada.

Nüesch, J.P.F., Lachmann, S., Corbau, R., and Rommelaere, J. (2002), `Parvovirus Host Cell Interaction: Regulatory Interplay between MVM NS1 and Atypical PKC$_\lambda$ *in vivo´*, In Vorbereitung.

Nüesch, J.P.F., Lachmann, S., Daeffler, L., and Rommelaere, J. (2001), `Parvovirus Host Cell Interaction: Interrelationship between MVM NS1 and Protein Kinase C´, *Virology-Conference*, Madison.

O´Farrell, P.H. (1975), `High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins´, *J. Biol. Chem.*, 250, 4007-4021.

Oleksiewicz, M.B., Wolfinbarger, J.B. and Bloom, M.E. (1998), 'A comparison between permissive and restricted infections with Aleutian mink disease parvovirus (ADV): characterization of the viral protein composition at nuclear sites of virus replication', *Virus Res*, 56, 1, 41-51.

Op De Beeck, A. and Caillet Fauquet, P. (1997), 'The NS1 protein of the autonomous parvovirus minute virus of mice blocks cellular DNA replication: a consequence of lesions to the chromatin?', *J.Virol.*, 71, 7, 5323-5329.

Op de Beek, A.A., F., Mousset, S., Rommelaere, J., Caillet-Fauquet, P. (1995), 'The non-structural proteins of the autonomous parvovirus minute virus of mice interfere with the cell cycle, inducing accumulation in G2.', *Cell Growth Differ.*, 6, 781-787.

Paradiso, P.R. (1981), 'Infectious process of the parvovirus H-1: correlation of protein content, particle density, and viral infectivity', *J Virol*, 39, 3, 800-7.

Parker, J.S., Murphy, W.J., Wang, D., O'Brien, S.J. and Parrish, C.R. (2001), 'Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells', *J Virol*, 75, 8, 3896-902.

Parker, J.S. and Parrish, C.R. (1997), 'Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid', *J Virol*, 71, 12, 9214-22.

Parker, J.S. and Parrish, C.R. (2000), 'Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking', *J Virol*, 74, 4, 1919-30.

Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L. and Baltimore, D. (1993), 'Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 18, 8392-6.

Rhode, S.L. (1973), 'Replication of the parvovirus H-1. I. Kinetics in a parasynchronous cell system.', *J. Virol.*, 11, 856-861.

Rhode, S.L., Paradiso, P.R. (1983), 'Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation.', *J. Virol.*, 45, 173-184.

Rhode, S.L.I., and Richard, S.M. (1987), 'Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter.', *J. Virol.*, 61, 2807-2815.

Richards, R.G. and Armentrout, R.W. (1979), 'Early events in parvovirus replication: lack of integration by minute virus of mice into host cell DNA', *J Virol*, 30, 1, 397-9.

Rudiger, S., Buchberger, A. and Bukau, B. (1997), 'Interaction of Hsp70 chaperones with substrates', *Nat Struct Biol*, 4, 5, 342-9.

Salome, N., van Hille, B., Duponchel, N., Meneguzzi, G., Cuzin, F., Rommelaere, J. and Cornelis, J.J. (1990), 'Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMp is restricted to specific oncogenes', *Oncogene*, 5, 1, 123-130.

Sambrook; J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989), `Molecular cloning: A laboratory manual, 2nt ed.´, *Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory*.

Santaren, J.F., Ramirez, J.C., and Almendral, J.M. (1993), 'Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMp: Involvement of phosphorylated VP2 subtypes in viral morphogenesis.', *J. Virol.*, 67, 5126-5138.

Satyanarayana, T., Gowda, S., Mawassi, M., Albiach-Marti, M.R., Ayllon, M.A., Robertson, C., Garnsey, S.M. and Dawson, W.O. (2000), 'Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly', *Virology*, 278, 1, 253-65.

Shein, H.M., and Enders, J.F. (1962), ´Multiplication and cytopathogenicity of simian vacuolating virus 40 in cultures of human tissue´, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 109, 495-503.

Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U. and Moarefi, I. (2000), 'Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine', *Cell*, 101, 2, 199-210.

Schoborg, R.V. and Pintel, D.J. (1991), 'Accumulation of MVM gene products is differentially regulated by transcription initiation, RNA processing and protein stability', *Virology*, 181, 1, 22-34.

Sgro, J.Y. and Spencer, S. ´Encyclopedia of Virology´.

Shade, R.O., Blundell, M.C., Cotmore, S.F., Tattersall, P. and Astell, C.R. (1986), 'Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis', *J.Virol.*, 58, 3, 921-936.

Shenolikar, S. and Ingebritsen, T.S. (1984), 'Protein (serine and threonine) phosphate phosphatases', *Methods Enzymol*, 107, 102-29.

Siegl, G., Bates, R.C., Berns, K.I., Carter, B.J., Kelly, D.C., Kurstak, E., Tattersall, P. (1985), 'Characteristics and taxonomy of Parvoviridae.', *Intervirology*, 23, 61-73.

Siegl, G., Gautschi, M. (1973), 'The multiplication of parvovirus LuIII ina synchronized culture system.', *Arch. Ges. Virusforsch.*, 40, 105-127.

Sikorski, R.S., Boguski, M.S., Goebl, M. and Hieter, P. (1990), 'A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis', *Cell*, 60, 2, 307-17.

Skiadopoulos, M.H., Salvino, R., Leong, W.L. and Faust, E.A. (1992), 'Characterization of linker insertion and point mutations in the NS-1 gene of minute virus of mice: effects on DNA replication and transcriptional activation functions of NS-1', *Virology*, 188, 1, 122-34.

Smith, R.H. and Kotin, R.M. (1998), 'The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity', *J Virol*, 72, 6, 4874-81.

Spalholz, B.A., Tattersall, P. (1983), 'Interaction of minute virus of mice with differntiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors.', *J. Virol.*, 46, 937.

Spector, L.D., Goldman, R.D. and Leinwand, L.A. (1997), `Culture and Biochemical Analysis of Cells´, *Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Stahl, B., Tobaben, S. and Sudhof, T.C. (1999), 'Two distinct domains in hsc70 are essential for the interaction with the synaptic vesicle cysteine string protein', *Eur J Cell Biol*, 78, 6, 375-81.

Sternberg, N. (1973), 'Properties of a mutant of Escherichia coli defective in bacteriophage lambda head formation (groE). I. Initial characterization', *J Mol Biol*, 76, 1, 1-23.

Tattersall, P. and Bratton, J. (1983), 'Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice', *J Virol*, 46, 3, 944-55.

Tattersall, P., Shatkin, A.J. and Ward, D.C. (1977), 'Sequence homology between the structural polypeptides of minute virus of mice', *J Mol Biol*, 111, 4, 375-94.

Tidona, C.A., Darai, G. (2001), `The Springer index of viruses`.

Tobaben, S., Thakur, P., Fernandez-Chacon, R., Sudhof, T.C., Rettig, J. and Stahl, B. (2001), 'A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine', *Neuron*, 31, 6, 987-99.

Toolan, H.W. (1960), `Production of a “mongolian-idiot” like abnormality in hamsters`, *Fed.Proc.*, 19, 208.

Toolan, H.W. (1967), 'Lack of oncogenic effect of the H-viruses for hamsters', *Nature*, 214, 92, 1036.

Toolan, H.W., Buttle, G.A.H., Kay, H.E.M. (1962), 'Isolation of the H-1 and H-3 viruses directly from human embryos.', *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 3, 368.

Toolan, H.W., Lendinko, N. (1968), 'Inhibition by H-1 virus of the incidence of tumors produced by adenovirus 12 in hamsters.', *Virology*, 35, 475-478.

Tullis, G.E., Burger, L.R. and Pintel, D.J. (1993), 'The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity', *J Virol*, 67, 1, 131-41.

Tullis, G.E., Labieniec-Pintel, L., Clemens, K.E., Pintel, D.J. (1988), 'Generation and characterization of a temperature-sensitive mutation in the NS-1 gene of the autonomous parvovirus minute virus of mice.', *J. Virol.*, 62, 2736-2744.

van Hille, B., Duponchel, N., Salome, N., Spruyt, N., Cotmore, S.F., Tattersall, P., Cornelis, J.J. and Rommelaere, J. (1989), 'Limitations to the expression of parvoviral nonstructural proteins may determine the extent of sensitization of EJ-ras- transformed rat cells to minute virus of mice', *Virology*, 171, 1, 89-97.

Vanacker, J.-M., Corbau, R., Adelmant, G., Perros, M., Laudet, V., and Rommelaere, J. (1996), 'Transactivation of a cellular promoter by the NS1 protein of the parvovirus minute virus of mice through a putative hormone-responsive element.', *J. Virol.*, 70, 2369-2377.

Vanacker, J.M., Laudet, V., Adelmant, G., Stehelin, D. and Rommelaere, J. (1993), 'Interconnection between thyroid hormone signalling pathways and parvovirus cytotoxic functions', *J Virol*, 67, 12, 7668-72.

Walz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Durst, M., Rabreau, M. and Schlehofer, J.R. (1997), 'Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium', *J Gen Virol*, 78, Pt 6, 1441-52.

Ward, D.C., Dadachanji, D. (1978), 'Replication of minute virus of mice DNA.', *in* Ward, D.C., Tattersall, P. (ed.), *Replication of mammalian parvoviruses.*, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.

Willwand, K. and Hirt, B. (1991), 'The minute virus of mice capsid specifically recognizes the 3' hairpin structure of the viral replicative-form DNA: mapping of the binding site by hydroxyl radical footprinting', *J Virol*, 65, 9, 4629-35.

Wilson, G.M., Jindal, H.K., Yeung, D.E., Chen, W., and Astell, C.R. (1991), 'Expression of minute virus of mice major non-structural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities.', *Virology*, 185, 90-98.

Winnefeld, M. (2002), ´Subzelluläre Lokalisation und posttranslationelle Modifikation des small glutamine-rich TPR-containing protein (SGT) in mitotischen Zellen´, *Diplomarbeit*, Uni Bremen.

Wolter, S., Richards, R. and Armentrout, R.W. (1980), 'Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus', *Biochim Biophys Acta*, 607, 3, 420-31.

Zadori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.C., Li, Y., Gariepy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I.R. and Tijssen, P. (2001), 'A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity', *Dev Cell*, 1, 2, 291-302.

Zinsmaier, K.E., Hofbauer, A., Heimbeck, G., Pflugfelder, G.O., Buchner, S. and Buchner, E. (1990), 'A cysteine-string protein is expressed in retina and brain of Drosophila', *J Neurogenet*, 7, 1, 15-29.