

Nadja Vera Melquiot
Dr. med.

Biochemische und funktionelle Charakterisierung der SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) Homologe von Molluscum Contagiosum Virus

Geboren am 15.08.1974 in Bielefeld
Reifeprüfung am 21.06.1994 in Ladenburg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994/1995 bis WS 2001/2002
Physikum am 12.09.1996 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg und Lyon/Frankreich
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 03.05.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. J. J. Bugert

Molluscum Contagiosum Virus (MCV) ist heute, mit Ausnahme seltener Orthopockenoonosen, das einzige authentische Pockenvirus des Menschen. Das Virus repliziert ausschließlich in der humanen Epidermis und induziert dort benigne, epidermale Tumoren. Interessante Charakteristika dieser Infektion sind die Änderung von Differenzierungsmerkmalen infizierter, humaner Keratinozyten, die Induktion zellulärer Hyperplasie sowie das Fehlen von zellulären Immuneffektoren (CTL und Langerhans Zellen) in den frühen MCV Läsionen. MCV infizierte Keratinozyten zeigen zudem eine Überexpression von EGF (Epidermal Growth Factor) Rezeptor und Transferrin Rezeptor.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten biochemische und funktionelle Eigenschaften der MCV SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule)-Homologie Genfamilie (mc002L, mc161R und mc162R) im Hinblick auf ihre mögliche Funktion im Lebenszyklus von MCV untersucht werden. Diese Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen :

i. Ein MCV Infektionsmodell in humanen, primären Fibroblastenzellen wurde etabliert und charakterisiert. Dabei zeigten MCV-infizierte Fibroblasten eine erhöhte Progressionsrate von der G1- zur S-Phase, ein Effekt, der auf die Wirkung viraler zellzyklusregulatorischer Faktoren hinweist.

ii. Virale mRNA Transkripte der untersuchten Gene konnten *in vivo*, in MCV infizierten Hautbiopsien, und *in vitro* im Zellkulturinfektionsmodell nachgewiesen werden. In Transkriptionskinetiken der verschiedenen MCV Gene konnten schon 2-3 Stunden p.i. erste Transkripte detektiert werden. Eine Persistenz transkriptionell aktiver, viraler genomischer DNA über mindestens 14 Tage wurde in Zellkultur beobachtet. Die Signifikanz dieser Beobachtung kann noch nicht in letzter Konsequenz abgeschätzt werden. Sie erlaubt aber die Möglichkeit der Persistenz poxviraler Nukleinsäuren in infizierten Zellen, ein Phänomen, das bei Herpesviren schon lange bekannt ist, bei Pockenviren bisher noch nicht beobachtet wurde. Die 5' und 3' Termini viraler mRNA Transkripte *in vitro* und *in vivo* wurden bestimmt und führten zu einer wichtigen Korrektur des Startcodons von Leserahmen mc161R. Ein 8 Aminosäuren C-terminal gelegenes tatsächliches Startcodon führt zu einem kürzeren mc161R Signalpeptid. Diese Korrektur erlaubte die Expression des authentischen Gens anstelle eines längeren Genartefakts bei den weiteren funktionellen Untersuchungen.

iii. Eine Interaktion der extrazellulären Domäne von mc161R mit dem zellulären SLAM Rezeptor konnte in einem speziell für diesen Zweck etablierten Masernvirus-Synzytium-Reduktionsassay nachgewiesen werden.

iv. Eine Interaktion der zytoplasmatischen Enden von mc002L und mc162R mit zellulären E3 Ubiquitin Ligasen der Nedd4 Familie (Neuronally Expressed Developmentally

Downregulated Protein 4) konnte nachgewiesen werden. Am Beispiel von mc162R konnte *in vitro* in *E. coli* Expressionsstudien mit GST Fusionsproteinen gezeigt werden, dass diese Interaktion durch prolinreiche Sequenzen (PY Motive) in der zytoplasmatischen Domäne von mc162R vermittelt wird und durch Mutagenese dieser Motive aufgehoben werden kann.

v. Eine PY Motiv-unabhängige Bindung der zytoplasmatischen Domäne von mc162R an das zelluläre Protein Hepatocyte Growth Factor Kinase Substrate (Hrs/Hgs) wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in stabil und transient mit mc162R transfizierten NIH3T3 und HeLa Zellen nachgewiesen. Hgs/Hrs assoziiert mit frühen endosomalen Vesikeln, einem Zellkompartiment, das beim Recycling von Oberflächenrezeptoren eine wichtige Rolle spielt.

vi. Stabil mit mc162R transfizierte NIH3T3 Zellen zeigen bei mc162R Überexpression einen eigentümlichen Phänotyp, der mit auffällig vergrößerten, endosomalen Vesikeln einhergeht. Dieser Phänotyp wurde bisher bei Hrs/Hgs Null-Mutanten beobachtet. In diesen Zellen sind zelluläre Oberflächenproteine, insbesondere Wachstumsfaktorrezeptoren, fehlreguliert. Die durch Überexpression von mc162R induzierte Vesikelaberration in stabil transfizierten NIH3T3 Zellen wurde als « Hgs-Depletionsphänotyp » bezeichnet.

vii. In transient mc162R transfizierten HaCaT und HeLa Zellen kolokalisiert mc162R mit Markern für endosomale Vesikel (Transferrinrezeptor) und frühe Endosomen (EEA-1 (Early Endosomal Antigen 1)).

Die beschriebenen Ergebnisse sind die Grundlage für zwei weiterführende Hypothesen über mögliche Mechanismen der Induktion benigner epidermaler Tumoren durch MCV.

Hypothese 1 : Lange Verweildauer transkriptionell aktiver viraler DNA in infizierten Zellen stellt eine Analogie zu den Latenz- und Persistenzmechanismen der Herpesviren dar. Eine zellzyklusregulatorische Aktivität von MCV wurde beobachtet und kommt als mögliche Ursache der Hyperproliferation MCV-infizierter Keratinozyten in Betracht.

Hypothese 2 : Die Bindung von Hrs/Hgs durch mc162R könnte durch verminderten Abbau zur Hochregulation von Oberflächenrezeptoren führen, von denen der EGF Rezeptor in MCV-infizierter Haut bekanntermaßen überexprimiert ist. Dieser Mechanismus kommt als zweite mögliche Ursache der Hyperproliferation epidermaler Zellen in MCV-infizierter Haut in Betracht.

Diese Ergebnisse bilden die Grundlage zu einer Neubeurteilung von MCV als humanpathogenem Pockenvirus.