

INAUGURAL-Dissertation

**Funktionelle Analyse von SGTA und SGTB
in humanen und murinen Kulturzellen**

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

vorgelegt von

Diplom-Biologin Julia Köllner
aus Bad Säckingen

April 2011

INAUGURAL-Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Biologin Julia Köllner
aus Bad Säckingen

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Funktionelle Analyse von SGTA und SGTB in humanen und murinen Kulturzellen

Gutachter:

Prof. Dr. Gabriele Petersen

PD Dr. Renate Voit

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Tumorstudiologie von Herrn Prof. Dr. Jean Rommelaere am Forschungsschwerpunkt Infektion und Krebs des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg unter der wissenschaftlichen Leitung von Dr. Celina Cziepluch im Zeitraum von Februar 2008 bis April 2011 angefertigt.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Gabriele Petersen für ihre Bereitschaft, diese Arbeit als Referentin vor der Universität Heidelberg zu vertreten, und PD Dr. Renate Voit für die Übernahme des Zweitgutachtens. Außerdem danke ich beiden für ihre ständige Gesprächsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen, die zur Verbesserung dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung möchte ich mich bei Prof. Dr. Jean Rommelaere bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Celina Cziepluch für die Vergabe des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung dieser Arbeit und die Unterstützung beim Korrekturlesen des Manuskriptes.

Annabel Grewenig danke ich für die Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Virus-Experimente, ihre Hilfsbereitschaft und Geduld, die zahlreichen praktischen Tipps und vor allem für die freundschaftliche Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors.

Den Mitarbeitern der DKFZ *Core Facility Genomics & Proteomics* danke ich für die Durchführung des *Microarrays*, PD Dr. Thomas Giese von der Universität Heidelberg für die qRT-PCR-Analysen, Dr. Agnes Hotz-Wagenblatt für die mRNA-Strukturanalysen, Dr. Felix Bestvater und Dr. Manuela Brom für die Einweisung und Hilfe am Fluoreszenzmikroskop, Dr. Svitlana Grekova für die Unterstützung am FACS sowie Dr. Laurent Daeffler für die Hilfe bei der Durchführung der Southern Blots.

Nadja Thomas gilt mein Dank für das Korrekturlesen des Manuskriptes und die netten und inspirierenden Gespräche.

Olga Kuhlmann, Elif Colak und Georgi Hristov möchte ich für ihre seelisch-moralische Unterstützung und ihre Freundschaft danken.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Rémy Poirey für seine ständige Hilfsbereitschaft, die Beratung und Unterstützung bei vielen praktischen Fragen im Labor, seine Gastfreundschaft an ungezählten Spiele-Abenden und seine einzigartige optimistische und positive Ausstrahlung, die bei mir immer für gute Laune gesorgt hat.

Ganz besonders danken möchte ich schließlich meinen Eltern und meiner Schwester Kristina, die immer für mich da waren, mich großartig unterstützt und auch in schwierigen Zeiten immer wieder aufgebaut und motiviert haben.

Diese Arbeit wurde finanziell großzügig durch ein Stipendium des *Helmholtz International Graduate Program* unterstützt.

INHALT

INHALT	I
ZUSAMMENFASSUNG	V
SUMMARY	VI
ABKÜRZUNGEN	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das SGTA-Protein	1
1.1.1 Das SGTB-Protein	5
1.2 Chaperone	5
1.2.1 Molekulare Wirkungsweise von HSPs	6
1.2.1.1 HSP70-Familie	7
1.2.1.2 HSP90-Familie	8
1.2.2 Co-Chaperone	10
1.2.2.1 J-Domänen-Co-Chaperone	11
1.2.2.2 TPR-Domänen-Co-Chaperone	11
1.2.2.3 NEF-Co-Chaperone	12
1.3 Autonome Parvoviren	16
1.3.1 Lebenszyklus Autonomer Parvoviren	16
1.3.2 Das NS1-Protein	18
1.4 SGTA: ein potenzielles <i>synthetic lethal target</i>	20
1.4.1 Das Konzept der <i>synthetic lethality</i> in der Krebstherapie	20
1.4.2 SGTA als mögliches <i>synthetic lethal target</i>	22
1.4.3 Möglichkeiten der Inhibition der SGTA-Funktion	23
2 ZIELSETZUNG	26
3 MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 Material	27
3.1.1 Chemikalien	27
3.1.2 Sonstige Materialien	28
3.1.3 Geräte	29
3.1.4 EDV-Programme	31
3.1.5 Kulturzellen	31
3.1.5.1 Zelllinien	31
3.1.5.2 Primärzellen	32
3.1.6 Bakterienstämme	33
3.1.7 Medien und Zusätze	33
3.1.7.1 Zellkultur-Medien und -Zusätze	33
3.1.7.2 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur	33
3.1.8 Molekularbiologische Reagenziensätze	34
3.1.9 Größenstandards	34
3.1.10 Enzyme	34

3.1.11 Antikörper und Antiseren	35
3.1.12 Oligonukleotide	36
3.1.12.1 DNA-Oligonukleotide	36
3.1.12.2 RNA-Oligonukleotide	37
3.1.13 Plasmide	38
3.2 Methoden	40
3.2.1 Mikrobiologische Methoden	40
3.2.1.1 Kultivierung von Bakterien	40
3.2.1.2 Langzeit-Lagerung von <i>E.coli</i> -Zellen	41
3.2.1.3 Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte	41
3.2.1.4 Herstellung elektrokompeter Bakterien	41
3.2.1.5 Elektroporation von <i>E. coli</i> -Zellen	42
3.2.2 Zellbiologische Methoden	42
3.2.2.1 Kultivierung von Zellen	42
3.2.2.2 Gewinnung von embryonalen Maus-Zellen (<i>mouse embryonic fibroblasts</i> , MEFs)	43
3.2.2.3 Etablierung von 3T3MEFs	44
3.2.2.4 Transfektion von Kulturzellen mit Plasmid-DNA (Calciumphosphat-Methode)	44
3.2.2.5 Transfektion von MEF-Zellen mit Plasmid-DNA	45
3.2.2.6 Transfektion von Kulturzellen mit siRNA	45
3.2.2.7 Etablierung stabiler Zelllinien durch Antibiotika-Selektion	46
3.2.2.8 Zellzahlbestimmung mit der Neubauerkammer	47
3.2.2.9 Zellzahlbestimmung mit dem „CASY® Cell Counter + Analyser“	48
3.2.2.10 Asynchrone Zellen ernten / Herstellung von Zellextrakt	48
3.2.2.11 Arretierung von MEFs in der Prometaphase der Mitose	49
3.2.2.12 Aufhebung der Arretierung von MEFs in der Prometaphase der Mitose (=“Release“)	49
3.2.2.13 Durchflusszytometrische Analyse von Zellpopulationen	49
3.2.2.14 <i>Softagar</i> -Assay	50
3.2.3 Virologische Methoden	51
3.2.3.1 Virusinfektion von MEF-Zellen	51
3.2.3.2 Virusgewinnung aus MEF-Zellen	52
3.2.3.3 Virustitration (Plaque Assay)	52
3.2.4 Präparation, Analyse und Modifikation von Nukleinsäuren	53
3.2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	53
3.2.4.2 DNA-Extraktion aus Zellkulturzellen	56
3.2.4.3 Extraktion von viraler DNA aus virusinfizierten Zellen	56
3.2.4.4 RNA-Extraktion aus Zellkulturzellen	56
3.2.4.5 Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	57
3.2.4.6 Ethanol-Natriumacetat-Fällung von Nukleinsäuren	57
3.2.4.7 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	58
3.2.4.8 Agarosegelelektrophorese	58
3.2.4.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	59
3.2.4.10 Ligation	59
3.2.4.11 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	60
3.2.4.12 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR)	62
3.2.4.13 Ortsgerichtete Mutagenese von DNA-Sequenzen	62
3.2.4.14 DNA-Sequenzierung	63
3.2.4.15 Southern Blot: DNA-Transfer und Hybridisierung	63
3.2.4.16 Radioaktive Markierung von DNA mit Zufallsoligomeren	65
3.2.4.17 DNA- <i>Microarray</i>	65
3.2.5 Proteinbiochemische Methoden	66
3.2.5.1 Bakterielle Expression von His ₁₀ -Fusionsproteinen	66
3.2.5.2 Aufreinigung von bakteriell exprimierten His ₁₀ -Fusionsproteinen	67

3.2.5.3	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	68
3.2.5.4	Antikörper-Aufreinigung	69
3.2.5.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	70
3.2.5.6	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	71
3.2.5.7	Trocknen von Polyacrylamidgelen	72
3.2.5.8	Western Blot-Transfer von Proteinen	72
3.2.5.9	Immunologischer Nachweis transferierter Proteine	73
3.2.5.10	Herstellung von Mausorgan-Extrakten für Western Blot-Analysen	74
3.2.6	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	75
3.2.6.1	Immobilisierung von Zellen auf unbeschichteten Deckgläschen	75
3.2.6.2	Herstellung immunfluoreszenzmikroskopischer Präparate	75
3.2.6.3	Lichtmikroskopische Auswertung	76
4	ERGEBNISSE	77
4.1	Untersuchung und Vergleich des Vorkommens und der Funktion von SGTA und –B	77
4.1.1	Nachweis des SGTB-Proteins in Mausorganen und humanen Zelllinien	77
4.1.1.1	Herstellung eines α hSGTB-Kaninchenserums	78
4.1.1.2	Western Blot-Analyse zum Nachweis von SGTB in Mausorganen	79
4.1.1.3	Western Blot-Analyse zum Nachweis von SGTB in humanen Zelllinien	80
4.1.2	Experimentelle Verringerung der SGTB-Proteinmenge in humanen Zelllinien durch den Einsatz von hsgtB-spezifischer siRNA	81
4.1.2.1	Verringerung der SGTB-Proteinmenge in HeLaH2A-Zellen	82
4.1.2.2	Verringerung der SGTB-Proteinmenge in NCH82-Zellen	83
4.1.2.3	Verringerung der SGTB-Proteinmenge in U373-Zellen	84
4.1.3	Untersuchung der funktionellen Redundanz von SGTA und –B in U373-Zellen durch ein „Rescue-Experiment“	87
4.1.3.1	Klonierung des Plasmids pXhSGTA	87
4.1.3.2	Herstellung des Plasmids pXmuthSGTA	88
4.1.3.3	Western Blot-Analyse der Überexpression von hSGTA und muthSGTA in HeLaH2A-Zellen bei Einsatz von sgtA-spezifischer siRNA	89
4.1.3.4	Klonierung der Plasmide pIRESneo3-muthSGTA und pIRESneo3-hSGTB	90
4.1.3.5	Etablierung von U373-Zelllinien, die muthSGTA bzw. hSGTB stabil überexprimieren	91
4.1.3.6	„Rescue-Experiment“: Einsatz von Kontroll-siRNA und sgtA-spezifischer siRNA in stabilen U373-Zelllinien	93
4.1.4	Funktionelle Analyse und Vergleich von SGTA und –B wildtyp und <i>doppelknockout mouse embryonic fibroblasts</i> (MEFs)	97
4.1.4.1	Untersuchung von Zellzyklusverteilung und Wachstumsrate	98
4.1.4.2	Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber Nocodazol	101
4.1.4.3	Untersuchung der Genexpression	103
4.1.4.4	Untersuchung der Parvovirus-Produktion	107
4.2	Schritte zur Validierung von SGTA als Zielmolekül für die Krebstherapie	113
4.2.1	Analyse des Wachstums von SV40- <i>Large-T-Antigen</i> -exprimierenden SGTA und –B wildtyp und <i>doppelknockout</i> 3T3MEFs in <i>Softagar</i>	113
4.2.1.1	Herstellung des Plasmids pIRESHyg3-SV40-LT-Ag	114
4.2.1.2	Etablierung von SGTA und –B wildtyp und <i>doppelknockout</i> 3T3MEF-Zelllinien, die das SV40- <i>Large-T-Antigen</i> stabil exprimieren	115
4.2.1.3	<i>Softagar</i> -Assays mit den stabilen wildtyp und <i>doppelknockout</i> 3T3MEF-Zelllinien	116
5	DISKUSSION	118

5.1 Vorkommen und Funktion von SGTA und SGTB	118
5.2 SGTA in der Parvovirus-Infektion	127
5.3 SGTA als Zielmolekül für die Krebstherapie	130
6 LITERATURVERZEICHNIS	136

ZUSAMMENFASSUNG

Das SGTA-Protein ist evolutionär konserviert und wird ubiquitär exprimiert. Wie seine Isoform SGTB bindet es an das Chaperon HSP70/HSC70 und beeinflusst dessen Proteinfaltungsfunktion. SGTA ist essenziell für die Zellteilung von Tumorzellen und könnte ein „*synthetic lethal target*“ der Krebstherapie darstellen. Zudem ist SGTA ein zellulärer Interaktionspartner des NS1-Proteins der autonomen Parvoviren. Durch die Untersuchung von Mausgeweben, humanen Kulturzellen sowie *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) aus wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* Mäusen wurden in dieser Arbeit SGTA und –B funktional verglichen und initiale Experimente zur Validierung von SGTA als Zielmolekül für die Krebstherapie durchgeführt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob SGTA einen Beitrag zum parvoviralen Lebenszyklus leistet.

Ein wichtiges Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit ist, dass SGTB auch in nicht-neuronalen humanen Tumor- bzw. transformierten Zelllinien (HeLa, 293T und NBK) sowie in primären Huvec-Zellen nachweisbar war, und somit nicht – wie ursprünglich bei Tobaben et al. (2003) postuliert – als eine ausschließlich neuronale Isoform von SGTA zu betrachten ist. Während die Verringerung der SGTA-Menge durch den Einsatz von sgtA-spezifischer siRNA zur Arretierung von Tumorzellen in der Mitose und nachfolgendem Zelltod führt (Winnefeld et al., 2004), wurde bei siRNA-vermittelter Verringerung der SGTB-Menge in HeLaH2A-Zellen sowie in den neuronalen Tumor-Zelllinien NCH82 und U373 kein Effekt beobachtet; die Anwesenheit von SGTB ist daher wohl nicht essenziell für das Überleben dieser Zellen. Auch gab es keine Hinweise darauf, dass SGTB in der Lage ist, SGTA funktionell zu ersetzen, denn in U373-Zellen erzeugte die Verringerung der SGTA-Menge bei unverändert hoher und für die Zelllinie regulärer SGTB-Menge den typischen „SGTA-Depletions Phänotyp“. Die stabile Überexpression eines Proteins (muthSGTA), welches so konzipiert wurde, dass es dieselbe Aminosäuresequenz wie endogenes SGTA aufweist, konnte den SGTA-Depletions-Phänotyp nicht „heilen“. Dafür könnten einer oder mehrere Unterschiede in der mRNA-Sequenz zwischen endogenem SGTA versus muthSGTA verantwortlich sein, wie z.B. abweichende Codonverwendung und fehlende 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche. Diese Unterschiede könnten möglicherweise eine abweichende ko- oder posttranslationale Modifikation oder Lokalisation der beiden Proteine zur Folge haben und Ursache für die beobachtete fehlende Funktionalität von muthSGTA sein.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigten klar, dass primäre und immortalisierte MEFs in der Lage sind, ohne SGTA und –B zu überleben und sich zu teilen. Wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* MEFs zeigten keine erkennbaren Abweichungen in Bezug auf Zellzyklusverteilung, Wachstumsrate sowie Empfindlichkeit gegenüber Nocodazol. Die Untersuchung der Genexpression von wildtyp und *doppelknockout* 3T3MEFs in *Microarray*-Analysen und die anschließende Überprüfung der Ergebnisse durch quantitative Reverse-Transkriptase-PCR ergab, dass keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen SGTA und –B wildtyp und *doppelknockout* MEFs nachweisbar waren, die konsistent sowohl primäre als auch 3T3MEFs betrafen.

In Bezug auf die Vermehrung des Parvovirus MVM zeigte sich, dass nach Infektion eine bis zu 10-fach größere Virusmenge aus wildtyp 3T3MEFs gewonnen werden konnte verglichen mit der Ausbeute aus SGTA und –B *doppelknockout* 3T3MEFs. Auch konnten in wildtyp 3T3MEFs durch Western Blot-Analyse deutlich größere Mengen der viralen Proteine NS1 und VP sowie im Southern Blot eine größere Menge des Virus-Genoms und der replikativen Virus-DNA-Formen nachgewiesen werden als in *doppelknockout* 3T3MEFs. Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass SGTA einen klaren Beitrag zum parvoviralen Lebenszyklus leistet.

Wenn Tumorzellen *in vitro* SGTA entzogen wird, sterben diese Zellen. Die Hypothese, dass 3T3MEFs aus SGTA und –B *doppelknockout* Mäusen, die exogenes SV40-*Large-T-Antigen* exprimieren, weniger gut maligne transformierbar sind und in der Folge weniger Kolonien in Weichagar bilden als SV40-*Large-T-Antigen*-exprimierende wildtyp 3T3MEFs, konnte nicht bestätigt werden, denn nur bei *doppelknockout* 3T3MEFs wurde Kolonienbildung in Weichagar beobachtet. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass einerseits SGTA exprimierende Tumorzellen bei experimentellem Entzug von SGTA nicht mehr lebensfähig sein können, während immortalisierte primäre Zellen, die weder SGTA noch –B exprimieren, dennoch eine maligne Transformation durchlaufen können.

SUMMARY

The SGTA protein is evolutionary conserved and ubiquitously expressed. Like its isoform SGTB, it binds to the chaperone HSP70/HSC70 and influences its protein folding ability. SGTA is essential for cell division in tumor cells and may represent a „*synthetic lethal target*“ for cancer therapy. Moreover, SGTA is a cellular interaction partner of the autonomous parvovirus NS1 protein. The thesis presented here aimed at comparing SGTA and –B functionally through analysis of mouse tissues, human cell lines as well as mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from wildtype and SGTA and –B double knockout mice. In addition, initial experiments for the validation of SGTA as a target for cancer therapy were conducted. Finally, it was examined if SGTA contributes to the parvoviral life cycle.

An important finding of my thesis is that SGTB was detectable in non-neuronal human tumor or transformed cell lines (HeLa, 293T and NBK) and in primary Huvec cells, and can therefore not be considered – as postulated by Tobaben et al. (2003) – as an exclusively neuronal isoform of SGTA. Whereas the depletion of SGTA through application of sgtA-specific siRNA leads to arrest in mitosis and subsequent cell death in tumor cells (Winnefeld et al., 2004), no effect was observed by the depletion of SGTB in HeLaH2A cells or in the neuronal tumor cell lines NCH82 and U373. Thus, the presence of SGTB is apparently not essential for the survival of these cells. Moreover, there is no evidence that SGTB is able to functionally replace SGTA, since SGTA depletion caused the typical „SGTA depletion phenotype“ in U373 cells in the presence of unchanged and naturally high levels of endogenous SGTB. The stable overexpression of a protein (muthSGTA) which was drafted as to have the same amino acid sequence as endogenous SGTA couldn't rescue the SGTA depletion phenotype. This might be ascribed to one or more differences in the mRNA sequence between endogenous SGTA versus muthSGTA, like for example different codon usage and absent 5'- and 3'-untranslated regions. These differences might possibly lead to a different co- or posttranslational modification or localization of both proteins, which might be a cause for the observed lack of functionality of the muthSGTA protein.

The results obtained in my thesis clearly showed that primary and immortalized MEFs are able to survive and proliferate without SGTA and –B. Wildtype and SGTA and –B double knockout MEFs displayed no differences concerning their cell cycle, division rate and sensitivity towards nocodazole. Gene expression analysis of wildtype and double knockout 3T3MEFs by microarray-analyses and subsequent verification of the results by quantitative Reverse Transcriptase PCR revealed no significant differences consistently observable in both primary and 3T3MEFs.

Concerning multiplication of parvovirus MVM, it was shown that after infection, up to 10-fold higher amounts of virus were obtained from wildtype 3T3MEFs compared to double knockout 3T3MEFs. In addition, considerably higher amounts of the viral NS1 and VP proteins were detected in wildtype than in double knockout 3T3MEFs by western blot, and also higher amounts of virus genome and replicative viral DNA-forms were detectable by southern blot analysis. Thus, it was shown for the first time that SGTA clearly contributes to the parvoviral life cycle.

Tumor cells deprived of SGTA *in vitro* undergo cell death. The hypothesis that 3T3MEFs from SGTA and –B double knockout mice which express exogenous SV40-Large-T-Antigen can only undergo malignant transformation with lower efficiency than SV40-Large-T-Antigen expressing wildtype 3T3MEFs and therefore form fewer colonies in soft agar could not be confirmed, because colony formation in soft agar was only observed for double knockout 3T3MEFs. Taken together, the results obtained show that on the one hand, SGTA expressing tumor cells can die when deprived of SGTA experimentally, whereas immortalized primary cells that express neither SGTA nor SGTB can nevertheless experience malignant transformation.

ABKÜRZUNGEN

Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
ADP	Adenosindiphosphat
APAR- <i>bodies</i>	<i>autonomous parvovirus-associated replication bodies</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bag	<i>Bcl2-associated athanogene</i>
BD	DNA-Bindungsdomäne
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
ca.	circa
cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre) DNA
CML	chronische myeloische Leukämie
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	<i>foetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
G ₁ -Phase	<i>gap1</i> (Wachstumsphase 1)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactosid
LB	<i>Luria Broth</i> -Medium
Lys	Lysin
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Mio.	Millionen
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
N-	Amino-
NLS	<i>nuclear localization sequence</i> (Kernlokalisationssequenz)
NP40	Nonidet-P40
NTPR	N-terminaler Bereich und TPR-Domäne von SGTA
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	<i>pons hydrogenium</i>
OD	optische Dichte

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TPR	<i>tetratricopeptid-repeat</i>
TPRC	TPR-Domäne und C-terminaler Bereich von SGTA
Tyr	Tyrosin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
u.a.	unter anderem
UBL	<i>ubiquitin-like domain</i> (Ubiquitin-ähnliche Domäne)
UV	ultraviolett
z.T.	zum Teil

Abkürzungen für Proteine

AR	<i>Androgen receptor</i>
BAG6	<i>Bcl-2-associated athanogene 6</i>
BAT-3	<i>HLA-B-associated transcript-3</i>
BRAF	B1-Homolog des murinen v-Raf
CHIP	<i>carboxyl terminus of HSP70-interacting protein</i>
CSP α	<i>cysteine string protein α</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
GHR	<i>Growth hormone receptor</i>
HOP	<i>HSP70/HSP90 organizing protein</i>
HSC70	<i>heat shock cognate protein 70</i>
HSP70	<i>heat shock protein 70</i>
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
NS1	Nichtstrukturprotein 1 der autonomen Parvoviren
PDGFR α	<i>Platelet derived growth factor receptor α</i>
SGTA	<i>small glutamine-rich TPR-containing protein A</i>
SGTB	<i>small glutamine-rich TPR-containing protein B</i>
SGT1	<i>suppressor of G₂ allele of SKP1</i>
VP	Verpackungsprotein der autonomen Parvoviren
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

Größeneinheiten und Physikalische Größen

(n) xg	n-fache Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
A	Ampère
bp	Basenpaare
CPS	<i>counts per second</i>
Da	Dalton
g	Gramm

h	Stunden
kb	tausend Basen/Basenpaare
l	Liter
m	Meter
M	molar, mol/l
min	Minuten
nt	Nukleotide
rpm	<i>rounds per minute</i>
S	Svedberg-Einheit
sec	Sekunden
U	<i>units</i> (enzymatische Aktivitätseinheiten)
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt

Präfixe zur Skalierung von Größeneinheiten

M	Mega	(10 ⁶)
k	Kilo	(10 ³)
c	Zenti	(10 ²)
m	Milli	(10 ⁻³)
μ	Mikro	(10 ⁻⁶)
n	Nano	(10 ⁻⁹)
p	Pico	(10 ⁻¹²)

Einbuchstabencode der Nukleotidbasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymidin
U	Uracil

1 EINLEITUNG

1.1 Das SGTA-Protein

Das SGTA-Protein, dessen Funktion in dieser Arbeit analysiert werden sollte, wurde 1998 in einem *Two-Hybrid-Screen* als zellulärer Interaktionspartner des regulatorischen Nichtstrukturproteins NS1 der autonomen Parvoviren entdeckt (Cziepluch et al., 1998). Nach parvoviraler Infektion akkumuliert SGTA zusammen mit NS1 in subnukleären Strukturen, in denen die virale Replikation erfolgt, den sogenannten APAR-bodies (*autonomous parvovirus-associated replication bodies*), (Cziepluch et al., 2000; Bashir et al., 2001); jedoch ist die Funktion von SGTA im Lebenszyklus autonomer Parvoviren bislang unbekannt.

Bei SGTA handelt es sich um ein evolutionär konserviertes Protein, da ein Vergleich der DNA- und Aminosäure-Sequenz von SGTA mit verschiedenen öffentlichen DNA- bzw. Protein-Datenbanken zeigte, dass SGTA-Homologe auch in anderen Organismen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, nachgewiesen werden können (Kordes et al., 1998). Das humane SGTA-Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert und setzt sich aus 10 Exons und 11 Introns zusammen. Es wird in eine 2,2 kb große mRNA transkribiert, deren 3'-Ende eine relativ große, nicht-kodierende Region beinhaltet; der kodierende Bereich umfasst 942 bp (Kordes et al., 1998). Das humane SGTA-Protein besteht aus 313 Aminosäuren, hat ein apparentes Molekulargewicht von 36-39 kDa (Cziepluch et al., 1998; Kordes et al., 1998) und weist eine ubiquitäre Präsenz auf; es konnte bislang in den Rattengeweben Herz, Hirn, Milz, Lunge, Leber, Muskel, Niere und Hoden nachgewiesen werden (Tobaben et al., 2003). SGTA zeigt eine leichte Anreicherung der Aminosäure Glutamin am C-Terminus (hier sind 13 von 50 Aminosäuren Glutamine); die Funktion dieses Bereiches ist aber gegenwärtig unbekannt. Insgesamt weist die Aminosäuresequenz von SGTA 18 potenzielle Modifikationsstellen auf: eine N-Glycosylierungs-, acht Myristylierungs- und neun Phosphorylierungs-Konsensussequenzen. Bei den potenziellen Phosphorylierungsstellen handelt es sich um eine Tyrosinkinase-Phosphorylierungsstelle, zwei Proteinkinase C- und sechs Casein-Kinase 2-Phosphorylierungsstellen (Kordes, 1997). Nach eindimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Immunblot-Analyse lassen

sich drei SGTA-Proteinbanden (36, 38 und 39 kDa) nachweisen (Cziepluch et al., 1998). Eine Präinkubation von Gesamtzellextrakten mit alkalischer Phosphatase aus Kälberserum zeigte, dass die beiden höher molekularen SGTA-Formen phosphoryliert vorliegen (Kordes, 1997).

Als funktionelle Domäne wurde bei SGTA bislang einzig die TPR-Domäne identifiziert, die sich im Zentrum der Polypeptidkette befindet und aus drei TPR (*tetratricopeptid-repeat*)-Motiven zusammengesetzt ist (Cziepluch et al., 1998). Ein TPR-Motiv besteht aus zwei antiparallelen α -Helices und umfasst 34 Aminosäuren, von denen acht in Bezug auf Ladung, Größe und Abstand zueinander konserviert sind (Sikorski et al., 1990). Benachbarte TPR-Motive sind parallel angeordnet (Das et al., 1998; Scheufler et al., 2000). Durch die gleichförmige räumliche Anordnung der α -Helices bildet sich eine superhelikale Struktur (Das et al., 1998), deren Furche ein möglicher Bindungsort von Zielproteinen ist (Scheufler et al., 2000). Die TPR-Anordnung erlaubt jedoch auch andere Möglichkeiten der Ligandenbindung (Übersicht bei Andrade et al., 2001). In der Regel setzen sich TPR-Domänen aus 3 bis 16 Motiven zusammen (Übersicht bei Groves und Barford, 1999).

In vitro-Experimente zeigten, dass SGTA über seine TPR-Domäne und Bereiche des C-Terminus mit dem Chaperon HSC70 (*heat shock cognate protein 70*) interagiert (Liu et al., 1999). Diese Interaktion konnte *in vivo* durch präparative Co-Immunopräzipitationsexperimente mit Flag-SGTA in HeLa-Zellen bestätigt und darüber hinaus gezeigt werden, dass auch HSP70 (*heat shock protein 70*) *in vivo* mit SGTA interagiert (Winnefeld et al., 2006). Aufgrund seiner Interaktion mit HSC70 wird vermutet, dass SGTA als Co-Chaperon agiert, indem es die Chaperon-Aktivität von HSC70 reguliert. Hefezellen, denen SGTA fehlt, weisen eine 50-fache Verringerung bei der Erholung von einem Hitzeschock im Vergleich zu nativen Hefezellen auf (Angeletti et al., 2002). In neuronalen Zellen, die in Bezug auf die Analyse der Funktion von SGTA das am besten untersuchte System darstellen, wurde ein Komplex aus SGTA, HSC70 und dem J-Domänen-Protein CSP α (*cysteine string protein α*) identifiziert, für den eine Chaperon-Aktivität *in vitro* nachgewiesen werden konnte und der an der Vesikel-vermittelten synaptischen Signaltransduktion beteiligt zu sein scheint (Tobaben et al., 2001). Auf molekularer Ebene wirkt dieser Komplex möglicherweise als Guanosinnukleotid-Austauschfaktor, wobei HSC70 und SGTA die Konformation von CSP α beeinflussen, das seinerseits den Austausch von GDP zu GTP in der G α_s -Untereinheit von G-Proteinen stimuliert (Natochin et al.,

2005). Neuere Ergebnisse zeigen, dass der CSP α -HSC70-SGTA-Komplex als Chaperon eines synaptischen SNARE-Proteins, SNAP-25, wirkt: CSP α -HSC70-SGTA bindet direkt an SNAP-25, verhindert dadurch dessen Aggregation, ermöglicht die SNARE-Komplex-Bildung und damit die Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Plasmamembran (Sharma et al., 2011). Außer mit HSP70/HSC70 interagiert SGTA über seine TPR-Domäne auch mit dem ubiquitären Chaperon HSP90, sowohl mit der konstitutiv exprimierten Isoform HSP90 β (Yin et al., 2006) als auch mit dem unter Stressbedingungen exprimierten HSP90 α (Liou et al., 2005); die Interaktion von SGTA mit HSP90 scheint jedoch schwächer zu sein als die mit HSP70/HSC70 (Angeletti et al., 2002). Die Fähigkeit von SGTA, verschiedene Rezeptormoleküle wie den Wachstumshormon-Rezeptor (*Growth Hormone Receptor*, GHR), den Androgen-Rezeptor (*Androgen Receptor*, AR) oder den Blutplättchen-Wachstumsfaktor α (Platelet-Derived Growth Factor Receptor α , PDGFR α) zu stabilisieren und somit die durch sie vermittelten Signalwege zu kontrollieren (Schantl et al., 2003; Buchanan et al., 2007; Moritz et al., 2010) könnte also mit seiner Co-Chaperon-Funktion für HSP70 und HSP90 assoziiert sein. Die Bindung an die oben genannten Rezeptormoleküle erfolgt direkt über Aminosäuren im SGTA-Protein und nicht indirekt über die Bindung von SGTA an HSP70 oder HSP90 (Schantl et al., 2003; Buchanan et al., 2007; Moritz et al., 2010), jedoch könnte das z.T. als Dimer vorliegende SGTA-Protein (Tobaben et al., 2003) diese Chaperone in den jeweiligen Rezeptor-Komplex hinzuziehen und dadurch die Stabilisierung oder korrekte Faltung der Rezeptoren bewirken. In einem Modell der funktionellen Aktivierung oder Reifung von Steroidhormonrezeptoren wird postuliert, dass diese (neu synthetisierten oder missgefalteten) Moleküle zunächst mit HSP70 und dessen J-Domänen-Co-Chaperon HSP40 interagieren und dann durch ein TPR-enhaltendes Protein wie HOP (*Hsp/Hsp90 Organizing Protein*) – das gleichzeitig sowohl HSP70 als auch HSP90 binden kann – an HSP90 „übergeben“ werden; HSP90 bewirkt anschließend durch ATP-Hydrolyse die Faltung bzw. Aktivierung des Rezeptors (Johnson und Toft, 1994).

Ergebnisse unserer Gruppe zeigen, dass SGTA essenziell für die Zellteilung in Tumorzellen ist: Die experimentelle Verringerung der SGTA-Menge durch den Einsatz von siRNA („*knockdown*“) führte in allen getesteten Tumorzelllinien (HeLa, NBE, NTN, MiaPaCa und Panc 2), in denen der *knockdown* effektiv war, zu einer Arretierung der Zellen in der Mitose aufgrund misslokalisierter Chromosomen an den

Spindelpolen und nachfolgend zum Zelltod in dieser Phase des Zellzyklus („SGTA-Depletions-Phänotyp“) (Winnefeld et al., 2004; Cziepluch, unveröffentlichte Ergebnisse). Darüber hinaus deuten das Mitose-spezifische Phosphorylierungsmuster von SGTA und seine Lokalisation an den Spindelpolen (Prometa- und Metaphase), an der zentralen Spindel (Anaphase) und im Mittelkörper (Telophase und frühe G1-Phase) darauf hin, dass dieses Protein eine direkte oder indirekte Rolle bei der Zellteilung spielt (Winnefeld et al., 2004). Durch präparative Co-Immunopräzipitationsexperimente wurde gezeigt, dass SGTA mit den Proteinen HSP70, HSC70 sowie dem BAG-Domänen-Protein BAG6 sowohl in der Interphase als auch in der Prometaphase der Mitose assoziiert. Stabile Dimere, die entweder aus SGTA und HSP70/HSC70 oder aus SGTA und BAG6 bestehen, konnten mithilfe von Succhrose-Dichtegradienten nachgewiesen werden (Winnefeld et al., 2006). Co-Immunopräzipitationsexperimente mit SGTA-Polypeptiden mit Flag-tag, denen entweder das C-terminale Ende (NTPR) oder das N-terminale Ende (TPRC) fehlte, zeigten, dass BAG6 und HSP70/HSC70 überlappende aber unterschiedliche Bindungsstellen innerhalb des SGTA-Proteins haben. BAG6 benötigt die TPR-Domäne und die N-terminale Region, um an SGTA zu binden, während für eine Bindung von HSP70 und HSC70 an SGTA außer der TPR-Domäne die C-terminale Domäne essenziell ist (Winnefeld et al., 2006). Die experimentelle Verringerung der BAG6- bzw. HSP70-Menge ruft einen Phänotyp hervor (Winnefeld et al., 2006; Rohde et al., 2005), der demjenigen sehr ähnlich ist, welcher bei Verringerung der SGTA-Menge beobachtet wird (siehe oben). Daher kann spekuliert werden, dass SGTA und BAG6 essenzielle Komponenten eines Protein-Netzwerkes darstellen, das HSP70-Funktionen reguliert, die für verschiedenste zelluläre Prozesse – darunter Zellteilung und Apoptose – benötigt werden.

Die Tatsache, dass ein siRNA-vermittelter SGTA-*knockdown* in Tumorzellen zum Tod in der Mitose führt (Winnefeld et al., 2004; Cziepluch, unveröffentlichte Ergebnisse), während SGTA-*knockout*-Mäuse lebensfähig sind und – außer einer verminderten Fertilität bei männlichen Mäusen – keinen auffälligen Phänotyp aufweisen, legt die Vermutung nahe, dass der beobachtete, durch die Verringerung der SGTA-Menge hervorgerufene Zelltod in der Mitose spezifisch für Tumorzellen ist. Basierend auf dieser Vermutung wurde postuliert, dass SGTA ein *synthetic lethal target* der Krebstherapie darstellen könnte (siehe 1.4).

1.1.1 Das SGTB-Protein

Im Rattengehirn konnte eine SGTA-Isoform, SGTB, identifiziert werden, deren Aminosäuresequenz zu 60 % mit der von SGTA identisch ist (Tobaben et al., 2003). Die cDNA-Sequenz des SGTB-Gens, das auf Chromosom 5 lokalisiert ist, stimmt zu 52 % mit der des SGTA-Gens überein (Tobaben et al., 2003). Die für den SGTA-*knockdown* verwendeten siRNA-Sequenzen, die mit unabhängigen Regionen in der SGTA-kodierenden mRNA hybridisieren können, wurden mit den SGTB-kodierenden mRNA-Sequenzen verglichen. Dabei zeigte sich, dass keine der SGTA-spezifischen siRNA-Sequenzen eine hinreichend große Homologie zu der Sequenz der SGTB-kodierenden mRNA aufweist, um wirksam zu sein (Winnefeld et al., 2004 und unveröffentlichte Daten). Das SGTB-Protein wird hauptsächlich im Gehirn nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass SGTB – wie SGTA – mit den Proteinen HSC70 und CSP α interagiert, was die Vermutung nahelegt, dass SGTB als Co-Chaperon eine Rolle in der neuronalen Signaltransduktion spielen könnte (Tobaben et al., 2003).

1.2 Chaperone

Chaperone – zum Beispiel die mit SGTA und –B interagierenden Proteine HSP70 und HSC70 – sind Proteine, die durch transiente Bindung an andere Proteine (im weiteren Verlauf als „Klient-Proteine“ bezeichnet) deren Faltung oder Entfaltung bewirken bzw. den Zusammenbau oder den Abbau von makromolekularen Komplexen fördern. Chaperone erreichen dies ohne stereospezifische Information über die Strukturen ihrer Klient-Proteine und können trotz der Vielfältigkeit ihrer Handlungsmechanismen miteinander kooperieren und sich gegenseitig ersetzen. Falsch gefaltete Proteine sind schädlich für die Zelle bzw. den Organismus, nicht nur aufgrund des Funktionsverlustes der missgefalteten Proteine, sondern vor allem durch die Toxizität von Proteinaggregaten. Chaperone sind reichlich im Cytosol, dem endoplasmatischen Retikulum, den Mitochondrien und (in Pflanzen) den Chloroplasten vorhanden. Die am besten untersuchten Chaperone sind die Hitzeschockproteine (*Heat Shock Proteins*, HSPs), eine hochkonservierte Familie von molekularen Chaperonen, von denen einige durch subletale zelluläre Stressoren wie Temperaturerhöhung, Sauerstoffmangel und oxidative Schäden induziert werden (Young et al., 2004). Die Transkription von induzierbaren HSPs wird durch

Hitzeschockfaktoren (*Heat Shock Factors*, HSFs) reguliert, von denen HSF1 der wichtigste ist (Xiao et al., 1999): Als Antwort auf Stress wird HSF1 aus seinem Komplex mit HSP90 und HSP70 entlassen, bildet Trimere, wird in den Zellkern transportiert und bindet an Hitzeschockelemente in den Promotoren der Hitzeschockgene (Zou et al., 1998; Ali et al., 1998; Voellmy und Boellmann, 2007). HSPs werden gemäß ihres Molekulargewichtes klassifiziert; in Säugetieren gibt es fünf verschiedene Familien: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 und kleine HSPs (*small HSPs*) (Sreedhar et al., 2004; Dugaard et al., 2007; Liberek et al., 2008). Jede Familie besteht aus mehreren Isoformen, die sich in ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden können. Die HSP90-Familie zum Beispiel umfasst HSP90 α und HSP90 β in Zytoplasma und Zellkern, GRP94 im endoplasmatischen Retikulum und TRAP1 in den Mitochondrien (Sreedhar et al., 2004). Darüber hinaus können die verschiedenen Mitglieder jeder HSP-Familie entweder konstitutiv exprimiert oder als Antwort auf Stimuli induziert werden. Beispiele dafür in der HSP70-Familie sind die konstitutiv exprimierte Haupt-Isoform im Zytoplasma, HSC70, und HSP72, das als Antwort auf Stress stark induziert wird (Dugaard et al., 2007; Tavaría et al., 1996).

Sowohl konstitutive als auch induzierbare HSPs haben mehrere Funktionen: (1) die Faltung entstehender Proteine, (2) die Verhinderung der Bildung von Protein-Aggregaten, (3) die Unterstützung der Faltung denaturierter Proteine in ihre korrekte Konformation bzw. die Erleichterung der Degradation von irreparabel geschädigten Proteinen, (4) die Abstimmung des Zusammenbaus bzw. Abbaus von Proteinkomplexen und (5) die Mithilfe bei der Translokation von Proteinen durch Zellmembranen (Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Young et al., 2004). Zusätzlich zu der Ausführung ihrer eigenen einzigartigen und unabhängigen Rollen in der Zelle können einige Funktionen der HSPs die Zusammenarbeit mit anderen HSP-Familien erfordern. HSP90 z.B. arbeitet mit HSP70 zusammen, um Klient-Proteine zu rekrutieren (Dittmar und Pratt, 1997; Morishima et al., 2000).

1.2.1 Molekulare Wirkungsweise von HSPs

Die molekulare Wirkungsweise von HSPs wurde besonders intensiv bei den Familien HSP60, -70 und -90 untersucht. Mit Ausnahme der kleinen HSPs, die Adenosintriphosphat (ATP)-unabhängig sind (Jakob et al., 1993), ist die Funktionsweise aller anderen HSPs durch die Bindung und Hydrolyse von ATP

gekennzeichnet, wodurch Konformationsänderungen im HSP-Molekül ausgelöst werden.

1.2.1.1 HSP70-Familie

Wie bei den Chaperoninen (HSP60-Familie) wird auch bei HSP70 und seiner konstitutiven Form HSC70 die Bindung und Freisetzung von Klient-Proteinen durch einen ATPase-Zyklus kontrolliert, der hier die Kooperation mit Co-Chaperonen (siehe Abschnitt 1.2.2) erfordert. HSP70 und HSC70 bestehen aus zwei Domänen, einer N-terminalen ATPase-Domäne (oder Nukleotidbindungs-Domäne, NBD) und einer C-terminalen Substratbindungs-Domäne (SBD) (Flaherty et al., 1990; Zhu et al., 1996). Eine spezielle Verbindung zwischen den Domänen (*inter-domain linker*) ist für die ATP-getriebene allosterische Interaktion von NBD und SBD verantwortlich: Im ATP-gebundenen Zustand bindet der *linker* an den hydrophoben Spalt zwischen den NBD-Subdomänen 1a und 2a, wodurch Konformationsänderungen in beiden Domänen induziert werden, die bewirken, dass ATP-Bindung die Bindung von Substrat (Klient-Protein) schwächt und Substrat-Bindung die ATPase-Aktivität stimuliert. Im ADP-gebundenen oder leeren Zustand ist der *linker* ungeordnet und die zwei Domänen agieren unabhängig voneinander (Vogel et al., 2006; Swain et al., 2007). Ein ungefaltetes oder teilweise gefaltetes Klient-Protein bindet also an ein HSP70- oder HSC70-Molekül im ATP-Zustand; die anschließende Hydrolyse von ATP zu ADP stabilisiert die Bindung von HSP70/HSC70 an das Klient-Protein (Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Young et al., 2004; Mayer und Bukau, 2005). Durch die Freisetzung von ADP und die erneute Bindung von ATP an HSP70/HSC70 wird das Klient-Protein schließlich entlassen und erhält die Möglichkeit, sich in seine native Konformation zu falten. Falls die Faltung noch nicht vollständig ist, kann das Klient-Protein erneut an HSP70/HSC70 binden, so dass wiederholte Zyklen von Klient-Protein-Bindung und -Freisetzung stattfinden. Eine schematische Darstellung des ATPase-Zyklus von HSP70 zeigt **Abb. 1-1**. Die biologischen Aufgaben von Mitgliedern der HSP70-Familie sind breit gefächert, sie werden sowohl bei der Faltung entstehender Proteine, der Faltung oder Entfaltung zum Zwecke der Translokation oder nach Disaggregation, dem Signalisieren eines Hitzeschocks und als Motor für die Translokation benötigt (Bukau et al., 2006).

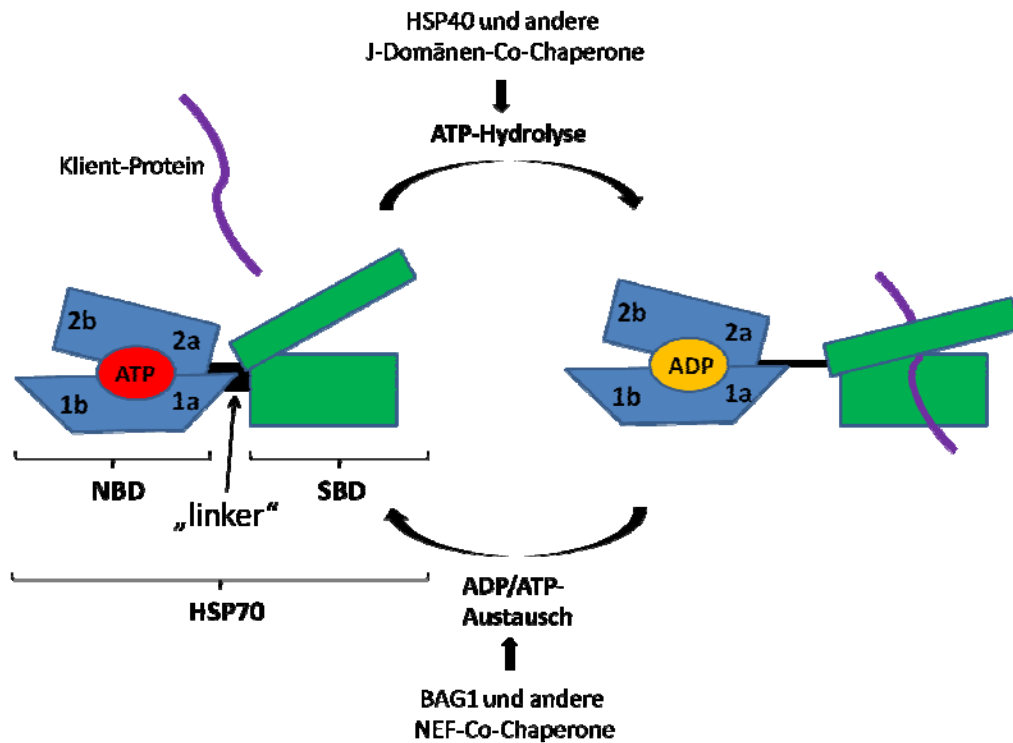


Abb. 1-1 Schematische Darstellung des ATPase-Zyklus von HSP70. NBD: Nukleotidbindungs-Domäne, SBD: Substratbindungs-Domäne; weitere Erklärungen siehe Abschnitt 1.2.1.1. Abbildung verändert nach Young, 2010.

1.2.1.2 HSP90-Familie

HSP90-Chaperone greifen – im Gegensatz zu den Mitgliedern der HSP70-Familie – erst in einem späten Stadium der Proteinfaltung ein und werden für die Stabilisierung, Aktivierung und den Zusammenbau einer Reihe von Klient-Proteinen benötigt (Csermely et al., 1998; Pearl et al., 2008; Pratt et al., 2008), die bei der Signalgebung und anderen Funktionen beteiligt sind (Pearl et al., 2006). Eine genomische Analyse offenbart Aufgaben für HSP90 beim sekretorischen Weg, dem zellulären Transport, dem Zellzyklus und der Zellteilung (McClellan et al., 2007). Medikamente wie das Geldanamycin-Derivat 17-AAG, die die Funktion von HSP90 spezifisch hemmen, haben Anti-Tumor-Aktivität (Hostein et al., 2001), und viele Klient-Proteine sind Kinasen, die an der Zellproliferation beteiligt sind (Whitesell und Lindquist, 2005); diese Umstände machen HSP90 zu einem attraktiven Zielmolekül für die Krebstherapie. HSP90 arbeitet als Dimer und fungiert als molekulare „Klammer“ zusammen mit verschiedenen Co-Chaperonen in Form eines dynamischen Multichaperon-Komplexes (Prodromou et al., 2000). Die konservierte Struktur von HSP90 besteht aus der N-terminalen ATP-Bindungsdomäne, der Mittel-Domäne, die eine amphipatische, Klient-Protein-bindende Schleife enthält, und der

C-terminalen Dimerisierungs-Domäne (Csermely et al., 1998; Pearl et al., 2006). Die N-terminale Domäne und die Mittel-Domäne werden durch einen geladenen, ungeordneten *linker* verbunden; das äußerste C-terminale Ende weist ein MEEVD-Motiv auf, welches eine Bindungsstelle für TPR-Domänen darstellt, die in verschiedenen Co-Chaperonen vorkommen (siehe Abschnitt 1.2.2.2) (Pratt et al., 2004; D'Andrea und Regan, 2003). Während die C-terminale Domäne für die konstitutive Dimerisierung von HSP90 sorgt, erfährt die N-terminale Domäne eine vorübergehende, durch ATP-Bindung ausgelöste Dimerisierung (Chadli et al., 2000; Prodromou et al., 2000). Die Bindung eines Klient-Proteins an HSP90 erfordert die Zusammenarbeit mit HSP70, dessen Co-Chaperon HSP40 und HOP: Der Komplex aus Klient-Protein, HSP70 und HSP40 bindet über die TPR-Domäne von HOP an den HSP90-Dimer in der offenen, ADP-gebundenen Form (Dittmar und Pratt, 1997; Morishima et al., 2000). Durch den Austausch von ADP durch ATP erfolgt die Dimerisierung der N-terminalen Domänen von HSP90, das nun in einer geschlossenen Konformation vorliegt (Chadli et al., 2000; Prodromou et al., 2000). HSP70/HSP40/HOP dissoziiert von HSP90 ab und erlaubt dadurch die Interaktion mit anderen Co-Chaperonen, so dass sich der sogenannte „reife“ Komplex bilden kann. In diesem reifen Stadium ermöglicht HSP90 die Aktivierung von Klient-Proteinen, denn die Blockierung der Bildung des reifen Komplexes durch Geldanamycin verhindert die Produktion von gefalteten Klient-Proteinen (Blagosklonny et al., 1995; Chavany et al., 1996; Schulte et al., 1997; An et al., 1997; Bamberger et al., 1997; Chen et al., 1997; Dasgupta und Momand, 1997; Hartmann et al., 1997; Segnitz und Gehring, 1997; Uma et al., 1997; Whitesell et al., 1997; Garcia-Cardena et al., 1998). Die Hydrolyse von ATP führt HSP90 in die offene Konformation mit dissoziierten N-terminalen Domänen zurück, und das Klient-Protein wird freigesetzt (Panaretou et al., 1998). **Abb. 1-2** zeigt eine schematische Darstellung des ATPase-Zyklus von HSP90. Die ATPase-Aktivität ist für die Funktion von HSP90 in Hefe essenziell (Panaretou et al., 1998), was vermuten lässt, dass das Öffnen und Schließen der HSP90-„Klammer“ eng mit der Faltung oder Aktivierung seiner Klient-Proteine verbunden ist. Es ist jedoch noch weitgehend unbekannt, wie diese Konformationsänderungen an die Faltung einer großen Zahl von strukturell nicht verwandten Klient-Proteinen gekoppelt sind.

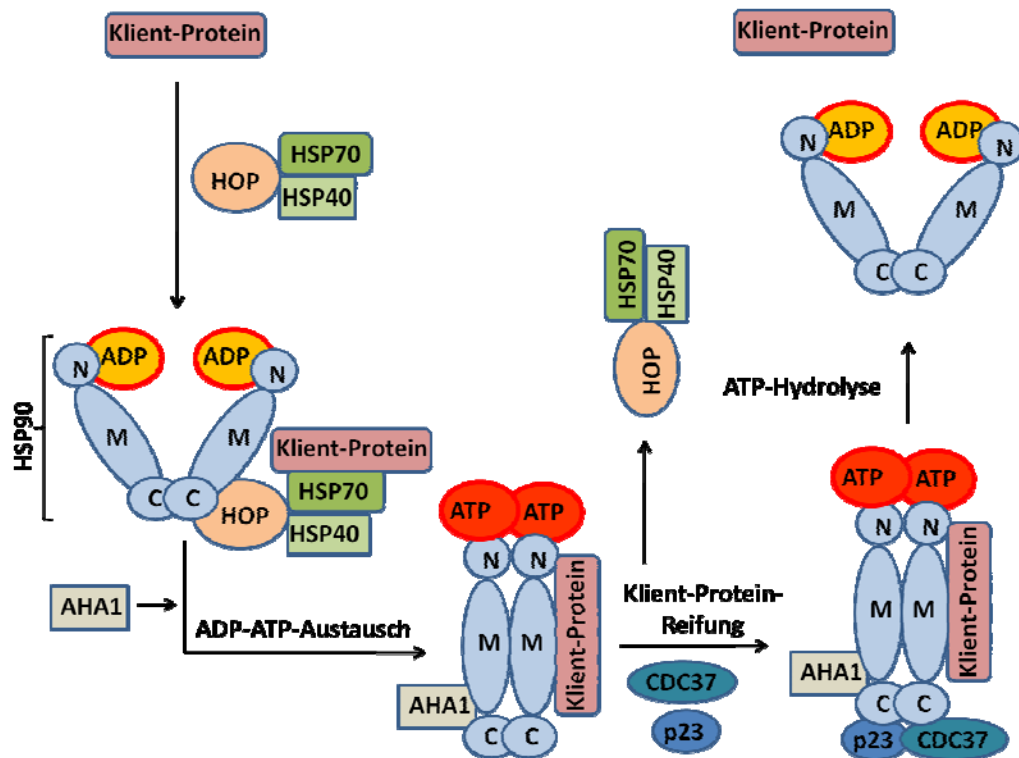


Abb. 1-2 Schematische Darstellung des ATPase-Zyklus von HSP90. N: N-terminale Domäne von HSP90; M: Mittel-Domäne; C: C-terminale Domäne; AHA1, p23 und CDC37: HSP90-Co-Chaperone; weitere Erklärungen siehe Abschnitt 1.2.1.2. Abbildung verändert nach Mahalingam et al., 2009.

1.2.2 Co-Chaperone

Sowohl die Mitglieder der HSP70- als auch die der HSP90-Familie erfüllen ihre zahlreichen Funktionen nicht alleine, sondern in Zusammenarbeit mit einer Reihe von sogenannten Co-Chaperonen. Co-Chaperone sind Nicht-Klient-Bindungspartner von HSP90 oder HSP70, und können grob als Proteine definiert werden, die bei der Funktion anderer Chaperone beteiligt sind (Caplan, 2003). Einige Co-Chaperone weisen selbst Chaperon-Aktivität auf. Sie binden an Klient-Proteine und verhindern dadurch deren Aggregation; diese Co-Chaperone können also gleichzeitig an HSP70 oder HSP90 und Klient-Proteine binden. Andere Co-Chaperone interagieren nicht mit Klient-Proteinen, sondern erfüllen eine regulatorische Rolle, indem sie die Nukleotid-Bindung oder -Hydrolyse katalysieren oder HSP90 und HSP70 physisch verbinden. Die Aufgabe von Co-Chaperonen ist es also, die Spezifität einer Chaperon-Reaktion zu vermitteln, indem sie das Klient-Protein auswählen, es HSP70 oder HSP90 präsentieren und dann den Zyklus von Klient-Bindung und -Freisetzung so koordinieren, dass die Faltung von Polypeptiden oder die Demontage von Proteinen erleichtert wird (Caplan, 2003); einzelne Co-Chaperone können manche oder alle dieser Aufgaben erfüllen. Obwohl in Säugetieren wahrscheinlich über 100

verschiedenen Co-Chaperone vorkommen, fallen die meisten in eine von zwei verschiedenen Klassen, die auf der Grundlage ihrer Domänen-Struktur definiert wurden. Diese Domänen sind die „J“-Domäne, die in den HSP40-Co-Chaperonen von HSP70 gefunden wird, und die TPR-Domäne, die in mit HSP70 und HSP90 interagierenden Co-Chaperonen vorkommt. Darüber hinaus benötigt HSP70 zur Vollendung seines ATPase-Zyklus sogenannte Nukleotid-Austausch-Faktoren (*nucleotide exchange factors*, NEFs), die die Freisetzung von ADP katalysieren.

1.2.2.1 J-Domänen-Co-Chaperone

J-Domänen-Proteine sind eine große Klasse von HSP70-assoziierten Co-Chaperonen; es gibt 6 von diesen Proteinen bei *E. coli*, ungefähr 20 bei *S. cerevisiae* und etwa 40 bei Menschen (Qiu et al., 2006; Vos et al., 2008). Diese Proteine sind durch eine konservierte, etwa 70 Aminosäuren lange J-Domäne gekennzeichnet, die nach dem Gründungsmitglied dieser Protein-Klasse, DNAJ von *E. coli*, benannt ist. Die Hauptaufgabe dieser Domäne ist es, die an sich geringe ATPase-Aktivität von HSP70 zu stimulieren (Russell et al., 1999; Greene et al., 1998); die Schlüssel-Region, die für diesen Prozess benötigt wird, ist ein unveränderliches Histidin-Prolin-Asparaginsäure-(HPD)-Motiv, das sich in einer Schleife zwischen Helix 2 und 3 der J-Domäne befindet (Genevaux et al., 2002; Wall et al., 1994; Huang et al., 1999). Interaktionen zwischen der J-Domäne und der NBD von HSP70 stimulieren die ATPase-Aktivität ungefähr 5- bis 10-fach (Chang et al., 2008; Gassler et al., 1998), was zu einer verstärkten Affinität zum Klient-Protein führt. Zusätzlich zu der J-Domäne, die sich normalerweise am N-Terminus befindet, enthalten die Mitglieder dieser Co-Chaperon-Familie eine große Zahl verschiedener Domänen an ihrem C-Terminus; auf der Grundlage dieser C-terminalen Domäne werden die J-Domänen-Proteine in drei verschiedene Klassen (I, II und III) eingeteilt (Szabo et al., 1996; Acebron et al., 2008; Cheetham und Caplan, 1998).

1.2.2.2 TPR-Domänen-Co-Chaperone

TPR-Domänen-Co-Chaperone werden sowohl für die Funktion von HSP70 als auch von HSP90 benötigt. Diese Co-Chaperone enthalten eine sogenannte TPR-Domäne (siehe Abschnitt 1.1) und binden über diese Domäne an ein konserviertes, aus vier Aminosäuren bestehendes Motiv (EEVD), das sich am C-Terminus von HSP70 und

HSP90 befindet (Scheufler, 2000). TPR-Domänen-Co-Chaperone sind in der Lage, die ATPase-Aktivität von HSP70 und HSP90 zu beeinflussen: Das Hefe-Homolog von HOP, genannt STI, hemmt zum Beispiel die ATPase-Aktivität von Hefe-HSP90 *in vitro*, indem es – zusätzlich zu seiner Interaktion mit dem EEVD-Motiv der C-terminalen Domäne – mit Bereichen der N-terminalen Nukleotid-Bindungsdomäne von HSP90 interagiert (Prodromou et al., 1999); im Gegensatz dazu wird die ATPase-Aktivität des Hefe-Homologs von HSP70, SSA1, durch Interaktion mit STI stimuliert (Wegele et al., 2003). Neben ihrer Fähigkeit, an HSP70 bzw. HSP90 zu binden und deren ATP-Hydrolyse zu regulieren, üben die verschiedenen TPR-Domänen-Co-Chaperone mithilfe ihrer anderen Domänen eine große Zahl zusätzlicher Funktionen aus. HOP beispielsweise hat zwei TPR-Domänen und vermittelt die Assoziation zwischen HSP70 und HSP90 (Chen und Smith, 1998). Die von HOP vermittelte Übertragung von Klient-Proteinen zwischen diesen beiden wichtigsten Chaperon-Netzwerken wird als entscheidend für bestimmte Funktionen wie etwa die Signalgebung über Hormonrezeptoren des Zellkerns angesehen (Pratt et al., 2006; Wegele et al., 2006). CHIP (*Carboxyl terminus of HSP70-interacting Protein*) ist ein TPR-Domänen-Protein, das die durch J-Domänen stimulierte ATPase-Aktivität von HSP70 inhibiert und eine U-Box-Domäne enthält, die eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt. Es wurde gezeigt, dass CHIP dadurch in der Lage ist, Klient-Proteine von HSP70 zu ubiquitinieren und sie zum Proteasom umzuleiten (Ballinger et al., 1999; Connell et al., 2001; Meacham et al., 2001; Jiang et al., 2001). CHIP fungiert daher als Chaperon-assoziierte Qualitätskontrolle, die Klient-Proteine für den Abbau markieren kann.

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine SGTA und SGTB weisen ebenfalls eine TPR-Domäne auf (Cziepluch et al., 1998; Tobaben et al., 2003) und interagieren über diese mit HSP70/HSC70 (Liu et al., 1999; Winnefeld et al., 2006; Tobaben et al., 2003); für SGTA wurde darüber hinaus eine Interaktion mit HSP90 nachgewiesen (Angeletti et al., 2002; Liou et al., 2005; Yin et al., 2006). Es wird angenommen, dass SGTA und –B als Co-Chaperone von HSP70/HSC70 (und HSP90 im Fall von SGTA fungieren (siehe Abschnitt 1.1).

1.2.2.3 NEF-Co-Chaperone

Zur Vollendung des ATPase-Zyklus von HSP70 werden sogenannte Nukleotid-Austauschfaktoren (NEFs) benötigt, die die Freisetzung von ADP durch ihre

Interaktion mit der Nukleotidbindungs-Domäne von HSP70 beschleunigen. Die NEFs von HSP70 werden in vier verschiedene, evolutionär nicht verwandte Familien eingeteilt, die jeweils nach charakteristischen Mitgliedern benannt sind: GRPE, BAG1, HSP110 und HSPBP1. Wie J-Domänen-Proteine besitzen diese Co-Chaperone außer ihrer Funktion als NEF separate, spezifische Fähigkeiten und / oder interagieren mit anderen zellulären Pfaden, um HSP70 für eine Vielzahl von Aufgaben zu rekrutieren. BAG1 beispielsweise, der Namensgeber der NEF-Familie der BAG-Proteine (zu der auch das mit SGTA interagierende BAG6 (siehe 1.2.2.3.1) gehört), besitzt außer der BAG-Domäne noch eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (*Ubiquitin-like domain*, UBL), über die das Protein mit dem Proteasom interagieren und die Degradation von HSP70-Klient-Proteinen stimulieren kann (Demand et al., 2001).

1.2.2.3.1 Das BAG6-Protein

Durch Co-Immunopräzipitationsexperimente wurde gezeigt, dass SGTA *in vivo* sowohl in der Interphase als auch in der Prometaphase der Mitose mit dem BAG-Domänen-Protein BAG6 interagiert (Winnefeld et al., 2006). BAG6 ist ein Mitglied der BAG (*Bcl-2-associated athanogene*)-Protein-Familie, einer evolutionär konservierten Familie multifunktioneller Proteine, die das Zellüberleben fördern. Sie sind durch eine gemeinsame konservierte Region gekennzeichnet, die sich nahe dem C-Terminus befindet und BAG-Domäne genannt wird. Diese Domäne enthält 110-124 Aminosäuren (Briknarova et al., 2001; Sondermann et al., 2001) und besteht aus drei antiparallelen α -Helices, von denen jede ca. 30-40 Aminosäuren umfasst. Bei BAG1 interagieren die ersten beiden Helices mit der Serin/Threonin-Kinase Raf1 (Song et al., 2001); über die zweite und dritte Helix findet bei fast allen Mitgliedern der BAG-Familie eine Interaktion mit der ATPase-Domäne von HSP70/HSC70 statt (Sondermann et al., 2001; Takayama und Reed, 2001). Aufgrund ihrer Interaktion mit den Chaperonen HSP70/HSC70 werden die BAG-Proteine als Co-Chaperone bezeichnet; einige Mitglieder der BAG-Familie beeinflussen die Substratfaltungsfunktion dieser Chaperone positiv (Hohfeld und Jentsch, 1997; Stuart et al., 1998), andere negativ (Bimston et al., 1998; Thress et al., 2001). Die Mitglieder der BAG-Protein-Familie sind an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt, darunter Zellüberleben (Stressantwort), Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose (Überblick bei Takayama und Reed, 2001; Doong et al.,

2002). In Bezug auf Krebs und eine mögliche Krebstherapie (siehe Abschnitt 1.4.3) ist von Interesse, dass manche BAG-Proteine bei bestimmten Krebsarten wie Brust- oder Pankreaskrebs überexprimiert werden (Takayama et al., 1998; Brimmell et al., 1999; Ozawa et al., 2000).

Das BAG6-Protein ist das größte der beim Menschen bislang bekannten 6 BAG-Proteine. Es besteht aus 1.154 Aminosäuren und enthält außer einer C-terminalen BAG-Domäne und einer unmittelbar davor befindlichen Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS) eine Prolin-reiche Region und eine UBL-Domäne am N-Terminus (Banerji et al., 1990; Manchen und Hubberstey, 2001). Das BAG6-kodierende Gen, welches auf Chromosom 6 lokalisiert ist, wurde ursprünglich als eines der Gene identifiziert, die sich im menschlichen MHC (*major histocompatibility complex*) befinden (Spies et al., 1989; Banerji et al., 1990); daher ist BAG6 auch unter dem Namen Bat-3 (*HLA-B-associated transcript-3*) bekannt. Eine weitere Bezeichnung für BAG6, die häufig Verwendung fand, ist Scythe (Thress et al., 1998).

Wie fast alle Mitglieder der BAG-Protein-Familie interagiert auch BAG6 über seine BAG-Domäne mit der ATPase-Domäne der Chaperone HSP70 und HSC70 (Thress et al., 1999). BAG6 scheint die Chaperon-Funktion negativ zu regulieren, denn es wurde gezeigt, dass BAG6 die Chaperon-vermittelte Faltung denaturierter β -Galaktosidase inhibiert, und dass dieser inhibitorische Effekt abhängig von der BAG-Domäne ist (Thress et al., 2001). Neuere Ergebnisse zeigen, dass BAG6 die Degradation von HSP70 verhindert und für die Akkumulation von HSP70 nach einem Hitzeschock benötigt wird; sobald sich größere Mengen an HSP70 angesammelt haben sorgt es im Gegenzug für die Degradation von BAG6 und verhindert dadurch eine anhaltende Akkumulation von HSP70 (Corduan et al., 2009).

Verschiedene Ergebnisse weisen darauf hin, dass BAG6 an der Regulation der Apoptose beteiligt sein könnte: (i) BAG6-*knockout*-Mäuse sterben embryonal oder perinatal und zeigen schwere Defekte der Lungen, der Nieren und des Gehirns, die in allen Fällen mit abnormaler Apoptose und Proliferation verbunden waren (Desmots et al., 2005). (ii) Es wurde gezeigt, dass das *Xenopus*-Homolog von BAG6 mit Reaper, einem zentralen Apoptose-Regulator in *Drosophila melanogaster*, interagiert, und dass diese Interaktion für die durch Reaper induzierte Apoptose in *Xenopus*-Zellextrakten notwendig ist (Thress et al., 1998). (iii) BAG6 interagiert mit der Histon-Acetyltransferase p300 und bewirkt dadurch, dass diese an das p53-

Protein binden und es acetylieren kann (Sasaki et al., 2007). Durch die Acetylierung wird p53 stabilisiert (Li et al., 2002); außerdem wird dadurch seine sequenzspezifische DNA-Bindung reguliert und seine transkriptionale Aktivität verstärkt (Gu und Roeder, 1997; Sakaguchi et al., 1998; Luo et al., 2004). In Abwesenheit von BAG6 kann p300 nicht mit dem p53-Protein interagieren und es acetylieren, wodurch die Induktion der Zielgene von p53 wie *p21* und *Puma* stark beeinträchtigt ist.

Da BAG6 über seine UBL-Domäne mit Xrpn10c, einer Untereinheit des 26S-Proteasoms von *Xenopus*, interagiert, wird spekuliert, dass BAG6 an der Qualitätskontrolle von Proteinen beteiligt sein könnte, indem es als „Adapter“ zwischen Proteasom und dem HSP70/HSC70-Chaperon-System fungiert und Chaperon-gebundene Substrate an das Proteasom liefert (Kikukawa et al., 2005). Durch präparative Co-Immunopräzipitationsexperimente mit Flag-SGTA wurde BAG6 als *in vivo*-Interaktionspartner von SGTA identifiziert (Winnefeld et al., 2006). Zuvor war bereits in einem *Two-Hybrid-Screen* SGTA als möglicher *in vitro*-Interaktionspartner von BAG6 identifiziert worden. Aufgrund einer Verwechslung war jedoch ein falscher Proteinname (SGT1) und damit ein anderes Protein als Partner für BAG6 angegeben worden (Lehner et al., 2004 und persönliche Mitteilung C.M. Sanderson). Bei diesem *Two-Hybrid-Screen* wurde der N-terminale Bereich von BAG6 (AS 1-96) als „Köder“ (*bait*) verwendet (Lehner et al., 2004). Daher ist anzunehmen, dass dieser Bereich von BAG6 für die Interaktion mit SGTA hinreichend ist. Die experimentelle Verringerung der BAG6-Menge durch den Einsatz von siRNA ruft in HeLa-Zellen einen Phänotyp hervor, der demjenigen sehr ähnlich ist, welcher bei Verringerung der SGTA-Menge beobachtet wird: Es kommt zu einer Arretierung der Zellen in der Mitose aufgrund misslokalisierter Chromosomen an den Spindelpolen und nachfolgend zum Zelltod in dieser Phase des Zellzyklus (Winnefeld et al., 2006). BAG6 scheint also – vermutlich über seine Interaktion mit SGTA – an der Regulation der Zellteilung beteiligt zu sein; der BAG6-SGTA-Komplex könnte, direkt oder indirekt und möglicherweise im Zusammenspiel mit HSP70, für die korrekte Anordnung der Chromosomen von den Spindelpolen zur Metaphaseplatte verantwortlich sein. Die Interaktion von SGTA und BAG6 stellt daher einen möglichen Angriffspunkt für die Krebstherapie dar, wie unter 1.4.3 erläutert wird.

1.3 Autonome Parvoviren

Autonome Parvoviren (*parvus* = klein) gehören zu den kleinsten bekannten Viren. Sie besitzen ein lineares, einzelsträngiges, ca. 5000 bp langes DNA-Genom mit palindromischen Sequenzabschnitten an den Genomenden, die als ITR-Regionen (*inverted terminal repeats*) bezeichnet werden (Astell et al., 1983; Rhode und Paradiso, 1983) und sekundäre Haarnadelstrukturen bilden. Das Genom wird von einem ikosaedrischen, nicht umhüllten Kapsid eingeschlossen, das einen Durchmesser von ca. 25 nm hat und aus 60 Untereinheiten der Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 besteht (Tattersall, 2006; Agbandje-McKenna et al, 1998). Zu den autonomen Parvoviren zählen die Mitglieder der Gattungen *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Amdovirus* und *Bocavirus*; sie erhielten diese Bezeichnung aufgrund ihrer Fähigkeit, in permissiven Zellen autonom, d.h. ohne die Funktion eines Helfervirus, zu replizieren; jedoch benötigen sie zelluläre, S-Phase-spezifische Faktoren für ihre Replikation (Rommelare und Cornelis, 2001). Das „Minute Virus of Mice“ (MVM), das in dieser Arbeit zur Infektion von MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) verwendet wurde, gehört zur Gattung *Parvovirus* und gilt als gut untersuchter Prototyp dieser Gattung; an diesem Modellvirus wurden die meisten molekularbiologischen Vorgänge bei der Transkription und Replikation geklärt. Als Tierpathogen spielt dieses Virus keine Rolle; es existieren mehrere Stämme, die jedoch überwiegend asymptomatische Infektionen bei erwachsenen Mäusen verursachen.

1.3.1 Lebenszyklus Autonomer Parvoviren

Die Parvovirus-Infektion beginnt mit der Erkennung eines spezifischen Rezeptors an der Oberfläche der Wirtszelle; die verschiedenen Parvoviren binden jeweils an unterschiedliche Zielstrukturen auf der Zelloberfläche. MVM und H-1PV verwenden die Sialylsäuregruppen von Glykoproteinen, die ubiquitär auf Zellen vorhanden sind, als Interaktionspartner (Cotmore und Tattersall, 1987). Nach der Adsorption werden die Viruspartikel von den Zellen vermutlich über rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen; höchstwahrscheinlich erfolgt dies über *clathrin-coated pits*, *clathrin-coated vesicles* und Dynamin, einem Bestandteil der intrazellulären Filamente (Linser et al., 1977; Parker und Parrish, 1997; Duan et al, 1999; Parker und Parrish, 2000). Anschließend werden die Viruspartikel über späte Endosomen zu perinukleären vesikulären Kompartimenten transportiert; es wird angenommen, dass das

Mikrotubuli-Netzwerk eine wichtige Rolle beim zellulären Transport von Viruspartikeln spielt, da es – im Gegensatz zu den Aktinfilamenten und anderen Zytoskeltelelementen – bei der parvoviralen Infektion geschützt wird (Nuesch et al., 2005). Bei der Freisetzung des viralen Genoms aus dem Kapsid spielt die endosomale Ansäuerung eine entscheidende Rolle, da durch sie strukturelle Modifikationen von Kapsidproteinen induziert werden, die für den Zugang zum Zellkern nötig sind (Mani et al., 2006). Der Mechanismus des Viruseintritts in den Zellkern ist weitgehend ungeklärt, vermutlich ist hierfür jedoch die mit dem Strukturprotein VP1 assoziierte Phospholipase A2-Aktivität von Bedeutung (Zadori et al., 2001). Im Zellkern der Wirtszelle akkumulieren die parvoviralen Genome; Genexpression und Replikation des parvoviralen Genoms sind stark von zellulären Faktoren abhängig und beginnen daher erst mit Eintritt der Wirtszelle in die S-Phase des Zellzyklus (Ward und Dadachanji, 1978; Wolter et al., 1980; Cotmore und Tattersall, 1987; Bashir et al., 2000). Im Gegensatz zu DNA-Tumoviren sind Parvoviren nicht in der Lage, in ruhenden Zellen die S-Phase zu induzieren. Die parvovirale Replikation beginnt mit einem Prozess, der als Konversion bezeichnet wird und streng von der Aktivität des zellulären Cyclin A-CDK2-Komplexes abhängig ist, der während der S-Phase stark exprimiert wird (Bashir et al., 2000); dabei wird die virale einzelsträngige DNA in eine monomere, doppelsträngige replikative Form (mRF) überführt. Diese dient dann als Vorlage (*template*) für die virale mRNA-Synthese durch die zelluläre RNA-Polymerase II (Rommelaere und Cornelis, 2001). Es wurde gezeigt, dass der zelluläre Transkriptionsfaktor E2F an der Genexpression vom P4-Promotor von MVM beteiligt ist, und dass die Aktivierung von P4 durch E2F in der frühen S-Phase ein limitierender Faktor für die Parvovirus-Produktion der Wirtszelle ist (Deleu et al., 1999). Die viralen mRNAs werden gecappt, teilweise gespleißt, polyadenyliert und im Zytoplasma translatiert. Die NS-Proteine werden, wie auch die Kapsid-Proteine, nach der Translation mittels der in ihrer Aminosäuresequenz vorhandenen Transportsignale in den Zellkern transportiert, wo die NS-Proteine für die DNA-Replikation und die Induktion der Transkription der Strukturproteingene benötigt werden. Im Verlauf der Replikation, die bei autonomen Parvoviren in abgrenzbaren Kernbereichen, den sogenannten *APAR-bodies* (*autonomous parvovirus-associated replication bodies*) stattfindet (Cziepluch et al., 2000; Bashir et al., 2001), entsteht aus der oben beschriebenen doppelsträngigen replikativen Form ein Replikationsintermediat, das zwei Genome in

Doppelstrangkonfiguration umfasst (dimere replikative Form, dRF); es können auch tetramere oder höher konkatemere RF-Spezies auftreten (Cotmore und Tattersall, 1987). Durch die sequenzspezifische Endonuklease-Aktivität des NS1-Proteins werden die Konkatemere geschnitten, so dass (bei dimeren Formen) zwei mRF-Moleküle entstehen. Der letzte Schritt der Replikation beinhaltet die Synthese viraler Einzelstrang-DNA, die in vorgeformte leere Kapside eingeschlossen wird (Müller und Siegl, 1983); das an die neu synthetisierte Einzelstrang-DNA gebundene NS1-Protein verbleibt nach dem Zusammenbau des Kapsids an der Außenseite der infektiösen Viruspartikel (Cotmore und Tattersall, 1989). Die Virionen werden schließlich durch Lyse freigesetzt (Cotmore und Tattersall, 1987), was zum Tod der Wirtszelle führt.

1.3.2 Das NS1-Protein

Das Genom der autonomen Parvoviren kodiert für zwei regulatorische Nichtstrukturproteine, NS1 und NS2, die essenziell für den viralen Lebenszyklus sind (Cotmore und Tattersall, 1987). NS1 und NS2 sind Phosphoproteine und entstehen durch alternatives Spleißen aus derselben prä-mRNA; sie unterscheiden sich nur in ihrem C-Terminus, während die ersten 84 Aminosäuren identisch sind (Cotmore und Tattersall, 1986). Das große Nichtstrukturprotein der Parvoviren, NS1, hat ein Molekulargewicht von 83 kDa und ist allein ausreichend für den zytotoxischen Effekt der Parvoviren auf infizierte Zellen (Caillet-Fauquet et al., 1990; Corbau et al., 2000). NS1 besitzt eine Vielzahl enzymatischer und regulatorischer Aktivitäten und spielt eine essenzielle Rolle im Lebenszyklus autonomer Parvoviren. Neben seiner Funktion bei der viralen DNA-Replikation, bei der es als sequenzspezifische Endonuklease und ATP-abhängige Helikase fungiert, reguliert NS1 die virale Genexpression, indem es seinen eigenen P4-Promotor sowie den P38-Promotor aktiviert, der die Transkription der Kapsidgene kontrolliert (Rhode, 1985; Cotmore et al., 2007). Darüber hinaus beeinflusst NS1 auch heterologe virale und zelluläre Promotoren; es aktiviert oder reprimiert sie in Wechselwirkung mit Zellfaktoren (Legendre und Rommelaere, 1994; Vanacker et al., 1996). NS1 wird an zahlreichen Positionen durch die zelluläre Proteinkinase C phosphoryliert, wodurch seine replikativen und zytotoxischen Funktionen moduliert werden (Corbau et al., 2000; Nuesch et al., 2003). Bei der ektopischen Expression von NS1 verschiedener Parvoviren wurden in unterschiedlichen Zellsystemen zytostatische und zytotoxische

Effekte beobachtet: Die ektopische Expression von NS1 des Parvovirus B19 beispielsweise induziert in erythroiden Vorläuferzellen und Leberzellen die Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase und Apoptose (Moffatt et al., 1998; Morita et al., 2003). Auf ähnliche Weise wurde gezeigt, dass das Rep78-Protein von AAV-2 zur Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase und p53-abhängiger-Apoptose führt (Saudan et al., 2000; Schmidt et al., 2000). Ratten-Fibroblasten-Zelllinien, die NS1 von MVM stabil unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimieren, arretieren in der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus ohne sichtbare Zeichen von Apoptose (Op de Beeck et al., 2001). Vor allem die Unterbrechung des Zellzyklus in der G2-Phase scheint durch die Fähigkeit des NS1-Proteins verursacht zu sein, die Synthese des zellulären Proteins p21 zu induzieren, das als Inhibitor der Cyclin A-abhängigen Kinase wirkt (Op de Beeck et al., 2001). Die Expression von MVM NS1 wird auch mit der Induktion von DNA-Einzelstrang-Brüchen, der Blockierung der zellulären DNA-Replikation (Op de Beeck und Caillet-Fauquet, 1997) und strukturellen Veränderungen des Zytoskellets (Nuesch et al., 2005) in Verbindung gebracht. Neuere Ergebnisse zeigen, dass die NS1-Expression zur Akkumulation von Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS) führt, die DNA-Einzelstrangbrüche und Apoptose bewirken (Hristov et al., 2010).

1.4 SGTA: ein potenzielles *synthetic lethal target*

1.4.1 Das Konzept der *synthetic lethality* in der Krebstherapie

In den letzten Jahren wurde dem aus der klassischen Genetik stammenden Konzept der „*synthetic lethality*“ in der Krebsforschung eine große Aufmerksamkeit zuteil. In der Genetik werden zwei Gene als „synthetisch letal“ bezeichnet, wenn die Mutation eines der beiden Gene mit dem Leben vereinbar ist, die Mutation beider Gene jedoch zum Tod führt. In **Abb. 1-3** sind schematisch die Genotypen und der Phänotyp einer synthetisch letalen Gen-Gen-Beziehung am Beispiel zweier Gene A und B dargestellt.

Gen A	Gen B	Phänotyp
A	B	lebensfähig
A	b	lebensfähig
a	B	lebensfähig
a	b	letal

Abb. 1-3 Synthetisch letale Interaktion zweier Gene. Zwei Gene werden als „synthetisch letal“ bezeichnet, wenn die Mutation eines der beiden Gene mit dem Leben vereinbar ist, die Mutation beider Gene jedoch zum Tod führt. A, B: Wildtyp-Gen; a, b: mutiertes Gen.

Bezogen auf die Krebstherapie eröffnet dieses Konzept neue Möglichkeiten zur Entwicklung von krebsspezifischen zytotoxischen Agenzien: Die Inhibition eines Genproduktes, dessen Gen synthetisch letal zu einer oder mehreren für die Krebsentstehung relevanten Mutationen ist, sollte theoretisch nur Krebszellen töten, normale Zellen jedoch verschonen. Gene, auf die die oben genannte Beschreibung zutrifft, werden als „*synthetic lethal targets*“ der Krebstherapie bezeichnet (Kaelin, 2005). Epigenetische und genetische Veränderungen in Krebszellen sowie Änderungen in ihrer Umgebung können das Wachstum der Krebszellen – im Gegensatz zu dem normaler Zellen – von der Funktion bestimmter Moleküle (*synthetic lethal targets*) abhängig werden lassen (Weinstein und Joe; 2006; Whitesell et al., 2003) und dadurch die Möglichkeit schaffen, die Krebszellen durch die Inhibition dieser Moleküle spezifisch zu töten. Unter anderem haben Krebszellen einen erhöhten Bedarf an Chaperonen, da viele Onkoproteine nur mit Chaperon-Hilfe ihre korrekte Faltung einnehmen. Es konnte gezeigt werden, dass mutierte

Onkoproteine wie zum Beispiel BRAF (B1-Homolog des murinen v-Raf) und EGFR (*epidermal growth factor receptor*, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) einen erhöhten Bedarf für die HSP90-Proteinfaltungsfunktion aufweisen (Isaacs et al., 2003; Workman, 2004; Neckers und Neckers, 2005). Darüber hinaus benötigen verschiedene Steroidhormonrezeptoren die Interaktion mit HSP90 und assoziierten Co-Chaperonen für ihre Aktivierung bzw. Reifung (Johnson und Toft, 1994); beispielsweise führt die Inhibition von HSP90 zur proteasomalen Degradation des Östrogen-Rezeptors (Whitesell et al., 2005), der durch die Regulation von die Zellproliferation fördernden Genen eine Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs spielt (Sommer und Fuqua, 2001). HSP90-Inhibitoren wie das halbsynthetische Geldanamycin-Analogon 17-AAG blockieren die ATPase-Aktivität von HSP90 (Roe et al., 1999) und induzieren sowohl die Arretierung des Zellzyklus als auch Apoptose in Krebszellen (Hostein et al., 2001); klinische Studien zeigen darüber hinaus eine vielversprechende Aktivität von 17-AAG bei der Behandlung von Krebspatienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (Solit et al., 2007). Auch Co-Chaperone von HSP90 wie AHA1 und CDC37 werden zunehmend als mögliche Zielmoleküle für die Krebstherapie angesehen und unter diesem Aspekt erforscht (Harst et al., 2005; Gray et al., 2007; Holmes et al., 2008; Pearl et al., 2008; Zhang et al., 2008; Smith et al., 2009). Darüber hinaus zeigen neuere Ergebnisse, dass die gleichzeitige, siRNA-vermittelte Reduktion von HSC70 und HSP72 ebenfalls zur Inhibition von HSP90 führt, und dass die dabei beobachteten antiproliferativen und apoptotischen Effekte die des pharmakologischen HSP90-Inhibitors 17-AAG weit übertreffen (Powers et al., 2008). Durch die Ansammlung mutierter oder falsch gefalteter Proteine könnten Krebszellen für ihr Überleben in höherem Maße von proteasomalen Funktionen abhängig sein als normale Zellen (Goldberg, 2003). Der Proteasomen-Inhibitor Bortezomib wird vom Menschen gut toleriert und wurde für die Behandlung des multiplen Myeloms zugelassen (Rajkumar et al., 2005); weitere Proteasomen-Inhibitoren befinden sich in verschiedenen Phasen klinischer Studien (Übersicht bei Bedford et al., 2011).

Diese und weitere Beispiele zeigen, dass *synthetic lethal targets* vielversprechende Ansätze bei der Behandlung von Krebserkrankungen ermöglichen. Mittlerweile stehen sogenannte „*synthetic lethal screens*“ zur Verfügung, die die Identifizierung von synthetisch letalen Interaktionen in menschlichen Zellen durch den Einsatz von RNA-Interferenz-Bibliotheken ermöglichen (Ngo et al., 2006; Berns et al., 2004).

1.4.2 SGTA als mögliches *synthetic lethal target*

Das humane *small glutamine-rich TPR-containing protein A* (SGTA) ist ein nukleocytoplasmatisches Protein, dessen mRNA ubiquitär exprimiert wird (Cziepluch et al., 1998) und das in allen analysierten menschlichen Zelllinien gefunden wurde (Winnefeld et al., 2004). Ergebnisse, die in unserer Arbeitsgruppe erzielt wurden, legen nahe, dass SGTA ein *synthetic lethal target* der Krebstherapie darstellen könnte: Die siRNA-vermittelte Reduktion der SGTA-Menge führte in allen getesteten Tumorzelllinien (HeLa, NBE, NTN, MiaPaCa und Panc 2), in denen der *knockdown* effektiv war, zu einer Arretierung der Zellen in der Mitose und nachfolgend zum Zelltod in dieser Phase des Zellzyklus (Winnefeld et al., 2004; Cziepluch, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Tatsache, dass SGTA-*knockout*-Mäuse, die wir von Dr. Bernd Stahl (Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg) erhielten, lebensfähig sind und – außer einer verminderten Fertilität bei Männchen (Cziepluch, persönliche Kommunikation) – keinen auffälligen Phänotyp aufweisen, legt die Vermutung nahe, dass der beobachtete, durch die Verringerung der SGTA-Menge hervorgerufene Zelltod in der Mitose spezifisch für Tumorzellen ist.

Eine mögliche Erklärung, warum SGTA für die Teilung (bzw. das Überleben) von Tumorzellen wichtiger ist als für die normaler Zellen, konnte durch Studien mit HeLa-Zellen, die ein Histon 2A-YFP-Fusionsprotein exprimieren, gefunden werden. Diese Zellen erlauben eine einfache Beobachtung von mitotischen Chromosomen in der *in vivo*-Mikroskopie. Studien zeigten, dass in diesen Zellen eine mittelmäßig oder stark reduzierte SGTA-Menge misslokalisierte Chromosomen an den Spindelpolen zur Folge hatte. Bei Anwesenheit von SGTA treten ebenfalls misslokalisierte Chromosomen auf, jedoch werden sie stets sehr schnell „gerettet“ und korrekt in der Metaphaseplatte angeordnet. In SGTA-*knockdown*-Zellen dagegen verbleiben die misslokalisierten Chromosomen in der Nähe der Spindelpole und verursachen die Arretierung der Zellen in der Mitose und den darauffolgenden Zelltod (Winnefeld et al., 2006). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass SGTA direkt oder indirekt für die korrekte Positionierung der Chromosomen von den Spindelpolen zur Metaphaseplatte benötigt wird. Aufgrund von tumorspezifischen, genetischen Veränderungen ist die Mitose in Tumorzellen oft weniger stringent reguliert und daher fehleranfälliger als bei normalen, nicht transformierten Zellen (Kops et al., 2005). Zusammen könnte dies dazu führen, dass sich teilende Tumorzellen für ihr Überleben „abhängiger“ von SGTA sind als normale Zellen.

1.4.3 Möglichkeiten der Inhibition der SGTA-Funktion

Um SGTA als Zielmolekül für die Krebstherapie etablieren zu können, muss ein Weg gefunden werden, seine Funktion zu inhibieren. SGTA besitzt keine enzymatische Funktion, die als Ziel für eine therapeutische Intervention genutzt werden könnte. Jedoch könnte SGTA durch die Unterbrechung von Protein-Protein-Interaktionen, die essenziell für seine Funktion sind, inhibiert werden. Protein-Protein-Interaktionen wurden früher aufgrund der großen Interaktionsoberflächen, die daran beteiligt sind, als wenig geeignete Ziele angesehen. Diese Einschätzung musste jedoch, zumindest teilweise, revidiert werden, da in letzter Zeit einige Erfolge bei der Identifizierung von „*small-molecule*“-Inhibitoren (definitionsgemäß Moleküle mit einem Molekulargewicht < 500 Da) krebsrelevanter Protein-Protein-Interaktionen berichtet wurden (Übersicht bei Fry und Vassilev, 2005). Ein Beispiel ist die Entwicklung von *small-molecule*-Inhibitoren der p53/mdm2-Interaktion, der sog. „Nutlins“, die die (Re)Aktivierung des Tumorsuppressors p53 bewirken und mittlerweile in fortgeschrittenen präklinischen bzw. klinischen Phase I- und Phase II-Studien getestet werden (Vassilev et al., 2004; Saddler et al., 2008; Shangary und Wang, 2009).

Unter den verschiedenen Proteinen, mit denen SGTA interagiert, sind BAG6 (Bat-3 / Scythe) und HSC70 mit Hinblick auf eine Krebstherapie am interessantesten, da bekannt ist, dass diese Proteine wichtig für die Lebensfähigkeit von Tumorzellen sind. **Abb. 1-4** veranschaulicht die Interaktionsdomänen von SGTA, BAG6 und HSC70.

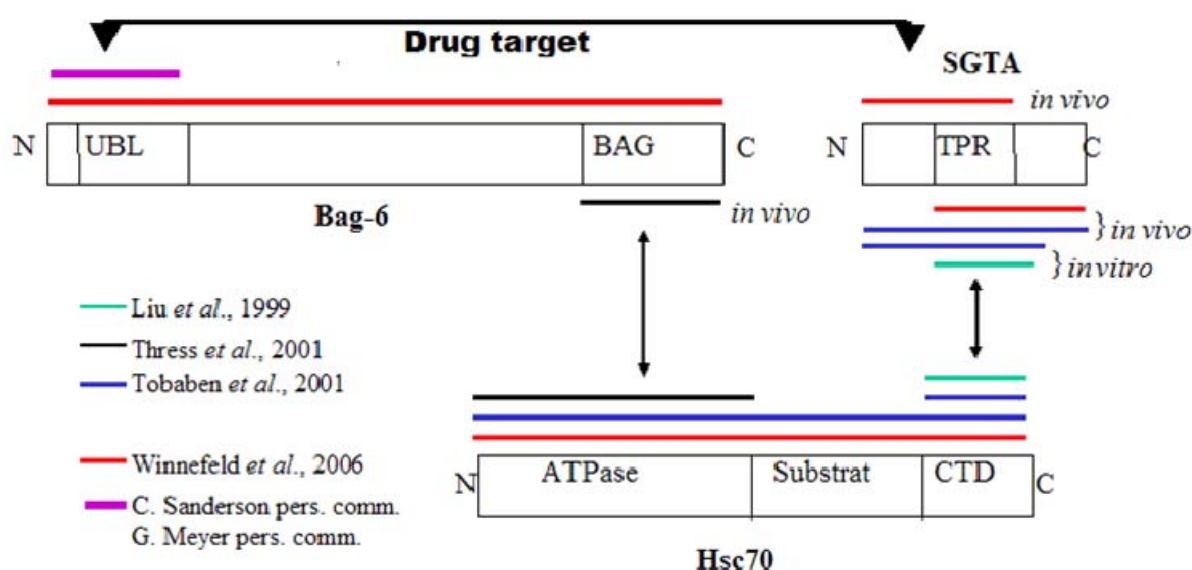


Abb. 1-4 Karte der Interaktionsdomänen von SGTA, BAG6 und HSC70 (verändert nach Winnefeld, 2006).

BAG6, das zur BAG-Protein-Familie gehört (Townsend et al., 2005) ist ein Co-Chaperon und ein Apoptose-Regulator. Es besteht aus 1.154 Aminosäuren; für die Interaktion mit SGTA sind offenbar jedoch die ersten N-terminalen 96 Aminosäuren ausreichend (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) (Lehner et al., 2004; Köllner, 2007). Mehrere Gründe sprechen für eine therapeutische Intervention durch die Inhibition der SGTA-BAG6-Interaktion: Die Reduktion der BAG6-Menge mithilfe der RNA-Interferenz-Methode führt – ebenso wie die Verringerung der SGTA-Menge – zur Arretierung von HeLa-Zellen in der Mitose aufgrund misslokalisierter Chromosomen, gefolgt vom Tod der Zellen (Winnefeld et al., 2006). Darüber hinaus konnte unsere Arbeitsgruppe durch Co-Immunopräzipitationsexperimente mit Flag-SGTA in HeLa-Zellen zeigen, dass ein bedeutender Anteil des zellulären BAG6 mit SGTA interagiert, während nur ein kleiner Bruchteil von HSC70 an SGTA bindet (Winnefeld et al., 2006). Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass SGTA und BAG6 am selben Prozess, möglicherweise – direkt oder indirekt – der korrekten Positionierung von Chromosomen von den Spindelpolen zur Metaphaseplatte, beteiligt sind, und dass sie einen Komplex bilden, um diese Funktion zu erfüllen. Eine Inhibition des SGTA-BAG6-Komplexes sollte also – zumindest theoretisch – zum Tod von Tumorzellen in der Mitose führen, normale Zellen jedoch, wie die Existenz der SGTA-*knockout*-Mäuse vermuten lässt, nicht beeinträchtigen. Neuere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe untermauern diese Hypothese: In einem Hochdurchsatz-*in vitro*-Reaktionsansatz zur Identifizierung von Inhibitoren der SGTA-BAG6-Komplexbildung auf der Basis der *AlphaScreen*TM-Methode (Köllner, 2007) wurden „*small molecule*“-Kandidaten identifiziert, die möglicherweise die Bildung des SGTA-BAG6-Komplexes inhibierten und bei HeLa-Zellen den charakteristischen SGTA-Depletions-Phänotyp bewirkten (Cziepluch, unveröffentlichte Ergebnisse).

Auch die Inhibition der SGTA-HSP70/HSC70-Interaktion könnte einen möglichen Ansatzpunkt für eine Krebstherapie darstellen: SGTA interagiert über seine TPR-Domäne und Bereiche des C-Terminus mit den Chaperonen HSC70 (Liu et al., 1999) und HSP70 (Winnefeld et al., 2006) und verstärkt deren ATPase-Aktivität, was zu einer effizienteren Faltung von Klient-Proteinen führt (Tobaben et al., 2001). HSP70 besitzt zahlreiche anti-apoptotische Funktionen (Garrido et al., 2006; Schmitt et al., 2007) und wird in Zellen und Geweben einer großen Zahl verschiedener Krebsarten überexprimiert (Santarosa et al., 1997; Nanbu et al., 1998; Trieb et al., 1998; Uozaki

et al., 2000). Die siRNA-vermittelte Reduktion der HSP70- bzw. HSC70-Proteinmenge führt in HeLa-Zellen zu einer Verringerung der Zellzahl und einer abgerundeten Zellmorphologie (Rhode et al., 2005); darüber hinaus hat die Verringerung der HSP70-Proteinmenge durch den Einsatz von HSP70-spezifischer siRNA – ebenso wie die Reduktion der SGTA-Proteinmenge – eine Anreicherung von Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus zur Folge (Rhode et al., 2005). Es ist daher theoretisch möglich, dass der bei *SGTA-knockdown* beobachtete Phänotyp zumindest teilweise durch die indirekte Beeinträchtigung der Funktion von HSP70/HSC70 zustande kommt, und daher eine Inhibition des SGTA-HSP70/HSC70-Komplexes den Tod von Tumorzellen bewirken könnte.

2 ZIELSETZUNG

Das SGTA-Protein, dessen siRNA-vermittelte Verringerung in allen getesteten humanen Tumorzelllinien, in denen der *knockdown* effektiv war, zu einer Arretierung in der Mitose und nachfolgend zum Zelltod in dieser Phase des Zellzyklus führte (Winnefeld et al., 2004; Cziepluch, unveröffentlichte Ergebnisse), ist evolutionär konserviert (Kordes et al., 1998) und wird ubiquitär exprimiert (Tobaben et al., 2003). Von seiner im Rattengehirn identifizierten Isoform SGTB, die auf Protein- und DNA-Ebene große Ähnlichkeit mit SGTA aufweist (Tobaben et al., 2003), war bislang nur bekannt, dass sie hauptsächlich im Gehirn nachgewiesen werden kann und in neuronalen Zellen ebenso wie SGTA einen stabilen Komplex mit HSC70 und CSP α bildet (Tobaben et al., 2003). In dieser Arbeit sollten daher Funktion und Expression von SGTA und –B untersucht und verglichen werden.

- i. Dafür wurde zunächst untersucht, in welchen Mausgeweben und humanen Kulturzellen das SGTB-Protein nachgewiesen werden kann und welche Auswirkungen eine Verringerung der SGTB-Proteinmenge in humanen Zellen hat; in einem „Rescue-Experiment“ sollte darüber hinaus überprüft werden, ob SGTB in der Lage ist, SGTA funktionell zu ersetzen.
- ii. Durch den Vergleich von *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) von wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* Mäusen bezüglich ihrer Zellzyklusverteilung und Wachstumsrate, Empfindlichkeit gegenüber Nocodazol, Genexpression und Parvovirus-Produktion sollte ein besseres Verständnis der Funktion von SGTA und –B gewonnen sowie untersucht werden, ob SGTA zum parvoviralen Lebenszyklus beiträgt.
- iii. Als ein Schritt zur Validierung von SGTA als Zielmolekül für die Krebstherapie wurde das Wachstum von SV40-*Large-T-Antigen*-exprimierenden SGTA und –B wildtyp und *doppelknockout* 3T3MEFs in *Softagar* analysiert.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Reagenz	Hersteller
Acrylamid-Mix	national diagnostics
ADP	Roche
Agarose	GE Healthcare
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad
Ampicillin	Stratagene
Bradford-Reagenz	BioRad
Buffer P1, P2, P3, QBT, QC, QF	Qiagen
CASY [®] ton	Innovatis AG
DMEM High Glucose	AMIMED
dNTP-Mix	Fermentas
Essigsäure	Riedel-de Haën
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Acros organics
Glycerol	J.T. Baker
Glycin	Gerbu
Imidazol	Sigma
Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG)	MP
Ligase-Puffer	NEB
Lipofectamin LTX- und Plus-Reagenz	Invitrogen
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Riedel-de Haën
Magnesiumchlorid (für PCR)	Invitrogen
Natriumbicarbonat	Sigma
Natriumchlorid	Sigma
Neutralrotlösung	Sigma
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Nocodazol	Sigma

Reagenz	Hersteller
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Noble Agar	US Biological
Nonidet® P40 (NP40)	Sigma
Oligofectamin-Reagenz	Invitrogen
PCR-Puffer	Invitrogen
Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma
Triton-X-100	AppliChem
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus; Oxidizing Reagent	PerkinElmer™ Life Sciences
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus; Enhanced Luminol Reagent	PerkinElmer™ Life Sciences

3.1.2 Sonstige Materialien

Material	Bezeichnung / Format	Hersteller
Autoradiographie-Film	BioMax MS Film	Kodak
Cellcountergefäße mit Deckel	CASY® cups	Innovatis AG
Chemilumineszenz-Film	Hyperfilm	GE Healthcare
Dialyse-Rahmen	Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette; 0,5 - 3 ml Capacity	Pierce (PerBio)
Eppendorfreaktionsgefäße	1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Falconröhrchen	15 ml und 50 ml	Becton/Dickinson
Filterpapier	Blotting Paper	Sartorius
Frischhaltefolie	Saran	Dow

Material	Bezeichnung / Format	Hersteller
Gewebe- Homogenisierungs-Gefäße	Lysing Matrix D-Tubes	MP Biomedicals
Handschuhe	Gentle Ski® classic	Meditrade®
Neubauerzählkammer	Neubauer	Brand
Nitrozellulosemembran	Protran® Nitrocellulose	Schleicher & Schuell
	Transfer Membrane	BioScience
Nylonmembran	Hybond™-N-Membran	GE Healthcare
Parafilm	Parafilm "M"®	Pechiney Plastic Packaging
Pipettenspitzen	Ultratip	Greiner
Polypropylensäulen	1 ml	Qiagen
Trockenmilchpulver	Milchpulver (Blotting grade)	Roth®
Zellkulturschalen	6, 10 und 15 cm	Sarstedt
	6-well-Platten	Nunc

3.1.3 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blot-Apparatur	Trans-Blot-Apparatur	BioRad
Brutschrank	Modell 3862	Forma Scientific
Bunsenbrenner	Fireboy	Tecnomara
CASY® Zellzähl-Apparatur	CASY® Cell Counter + Analyser, Modell TTC	Innovatis AG
Durchflusszytometer	FACScan	Becton Dickinson
Elektronikrührer	IKAMAG® Reo	Janke & Kunkel
Elektroporations-Gerät	E.coli Pulser	BioRad
Eppendorfreaktionsgefäß- Schüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf
Feinwaage	2002 MPI	Sartorius
Gefrierschrank	- 85 °C Ultra Low Freezer	Labotect
Geltrockner	Gel dryer; Model 583	BioRad
Gewebe-Homogenisator	Precellys 24 tissue	Bertin technologies

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Imaging System für Agarose-Gele	homogenizer ImageMaster® VDS	GE Healthcare
Kühlschrank	+ 4 °C	Bosch
Lichtmikroskop	Wiloverts	Hund Wetzlar
Mikrowelle	Microwave & Grill	Severin
Mini-Vertikale Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN® 3 Cell	BioRad
Mini-Zentrifuge	PicoFuge™	Stratagene
NanoDrop®-Photometer	ND-1000	PeQlab Biotechnologie GmbH
PCR-Gerät	PTC-200	MJ Research
pH-Meter	PB-11	Sartorius
Photometer	Ultrospec 3100 pro	GE Healthcare
Pipetten	2 / 20 / 200 / 1000 µl	Gilson
Pipettierhilfe	pipetus®-akku	Hirschmann
„Roller“ (für Falconröhrchen)	RM 5	CAT / Assistent
Schüttler	A5	Heidolph
	Celloshaker	Renner
	Rockomat	Tecnomara
Spannungsgeräte	EPS 301	GE Healthcare
	E 863	Consort
Sterile Werkbank	Typ B3	Labotect
Thermoblock	neoBlock II	NeoLab
Tischzentrifuge	Biofuge freesco	Heraeus
UV-Platte		Konrad Benda
UV-Crosslinker	UV Stratalinker™ 1800	Stratagene
Vertikale Elektrophoresehalterung	Protean®I xicell	BioRad
Vertikale Elektrophoresekammer	Protean®II xicell	BioRad

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Vertikaler Rotor (für Eppendorfreaktionsgefäße)	Mixing Rotor Variospeed	Renner
Vortex-Gerät	VF2	Janke & Kunkel
Waage	Basic	Sartorius
Wasserbad	UC/8A	Julabo
	U3/7A	Julabo
Zentrifuge	ZK380	Hermle
	Sorvall RC5B und RC5C	DuPont
	5810R	Eppendorf

3.1.4 EDV-Programme

Bezeichnung	Hersteller
AxioVision (Version 4.8.1)	Zeiss
Cell Quest (Version 5.2.1)	Becton Dickinson
EndNote (Version X4)	Thomson Reuters
Geneious (Version 5.1.6)	Biomatters Ltd.
Genome Studio (Version 2009.1)	Illumina

3.1.5 Kulturzellen

3.1.5.1 Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
3T3MEFs	Murine embryonale Epithelzelllinie(n)	Todaro und Green, 1963, und diese Arbeit
HEK 293	Humane E1A-immortalisierte embryonale Nierenepithelzelllinie	Graham und Van der Eb, 1973
HEK 293T	Humane E1A-immortalisierte embryonale Nierenepithelzelllinie;	Graham und Van der Eb, 1973

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
	stabile Expression des SV40 Large-T-Antigens.	
HeLa	Humane zervikale Adenokarzinomzelllinie	Gey et al., 1952
HeLa-H2A-YFP	HeLa-Zelllinie mit stabil integriertem <i>h2A-yfp</i> -Fusionsgen; aufgrund der Expression des Histon-2A-YFP (<i>yellow fluorescent protein</i>)-Proteins lässt sich das Chromatin <i>in vivo</i> fluoreszenzmikroskopisch nachweisen	Knoch, 2002 Knoch, 2002 Toth et al., 2004
NBK	Humane embryonale Nierenepithelzelllinie; SV40 transformiert	Shein und Enders, 1962
NCH82	Humane Glioblastoma-Zelllinie	Herold-Mende et al., 1999
U373 MG	Humane Glioblastoma-Astrocytoma-Zelllinie	Pontén und McIntyre, 1968

3.1.5.2 Primärzellen

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Huvec	Humane Nabelschnur-Endothelzellen	Furie und Furie, 1988
MEFs	Murine embryonale Epithelzellen	diese Arbeit

3.1.6 Bakterienstämme

Stamm	Merkmale	Referenz
<i>E. coli</i> Sure	e14 ⁻ (McrA ⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ umuC::Tn5(kan ^r) uvrC supE44 lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 [F ⁻ proAB lacI ^q Z ΔM15 Tn10 (tet ^r)]	Greener et. al, 1990 (Stratagene)
<i>E. coli</i> DH5α	fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	Meselson und Yuan, 1968

3.1.7 Medien und Zusätze

3.1.7.1 Zellkultur-Medien und -Zusätze

Medium / Zusatz	Hersteller
DMEM Zellkultur-Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma
FBS (Fetal Bovine Serum), Gold	PAA
L-Glutamin	Gibco / Invitrogen
MEM Zellkulturmedium (Modified Eagle's Medium)	Sigma
2x MEM Zellkultur-Medium	Gibco / Invitrogen
OPTI-MEM [®] I + GlutaMAX [™] I	Gibco / Invitrogen
Penicillin-Streptomycin	Gibco / Invitrogen
Trypsin-EDTA	Gibco / Invitrogen

3.1.7.2 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

Reagenz	Hersteller
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Hefeextrakt	Difco

Reagenz	Hersteller
Bacto-Trypton	Difco
Ampicillin	Sigma

3.1.8 Molekularbiologische Reagenziensätze

Kit	Hersteller
ECL (enhanced chemiluminescence)	GE Healthcare
GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System	Invitrogen
Qiagen DNeasy™ Blood and Tissue Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid™ Maxi Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid™ Mini Kit	Qiagen
Qiagen RNeasy™ Mini Kit	Qiagen
QIAquick™ Gel extraction Kit	Qiagen
QIAquick™ PCR purification Kit	Qiagen

3.1.9 Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
Page Ruler™	Fermentas
Smart-Ladder	Eurogentec

3.1.10 Enzyme

Enzym	Hersteller
Proteinase K	Roche
Restriktionsenzyme	Roche / NEB
RNase A	Roche Diagnostics
T4-DNA-Ligase	Roche
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen

3.1.11 Antikörper und Antiseren

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Antiseren erkennen humane Proteine. In eckigen Klammern ist angegeben, wie die jeweiligen Antikörper und Antiseren für Immunblot-Analysen (IB) und Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen (IF) verdünnt wurden.

Primäre Antikörper	Beschreibung / Hersteller
anti-Actin	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen Muskel-Actin (HUC1-1 von MP Biomedicals) [IB 1:5.000].
anti-HSC70/HSP70	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen die Chaperone HSC70 und HSP70 (SPA-820 von Stressgen). [IB 1:1.000]
anti-hSGTA	Kaninchen-Antiserum gegen humanes SGTA. Das Antiserum wurde von Dr. Celina Cziepluch und Annabel Grewenig (Infektion und Krebs, DKFZ) hergestellt und über eine Sepharosesäule, an der rekombinantes SGTA kovalent gekoppelt war, aufgereinigt. [IB 1:1.000]
anti-hSGTB	Kaninchen-Antiserum gegen humanes SGTB. Das Antiserum wurde von Julia Köllner und Annabel Grewenig (Infektion und Krebs, DKFZ) hergestellt und über eine Sepharosesäule, an der rekombinantes SGTB kovalent gekoppelt war, aufgereinigt. [IB 1:500]
anti NS1 (Sp8)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das parvovirale NS1-Protein (Laborbestand). [IB 1:4.000].
anti-Phospho-Histon H3	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Phospho-Histon H3 (Ser10) (von Millipore). [IF 1:600]
anti-rSGTA	Kaninchen-Antiserum gegen Ratten-SGTA. Das Antiserum wurde von Dr. Celina Cziepluch und Annabel Grewenig (Infektion und Krebs, DKFZ) hergestellt und über eine Sepharosesäule, an der rekombinantes SGTA kovalent gekoppelt war, aufgereinigt. [IB 1:1000].
anti-SV40-LT-Ag	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen SV40-T-Antigen (PAb416 von Abcam). [IB 1:100].
anti- α -Tubulin	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen α -Tubulin (DM 1A von Sigma). [IB 1:10000, IF 1:500]
anti γ -Tubulin	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen γ -Tubulin (GTU-88 von

Primäre Antikörper	Beschreibung / Hersteller
anti VP	Sigma). [IF 1:2500] Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das parvovirale VP-Peptid (Laborbestand) [IB 1:4.000].

Sekundäre Antikörper	Hersteller
Ziege-anti Kaninchen IgG, Alexa 488-konjugiert [IF 1:500]	Invitrogen
Ziege-anti-Kaninchen IgG, Meerrettichperoxidase konjugiert [IB 1:10.000]	Dianova
Ziege-anti-Maus IgG, Meerrettichperoxidase konjugiert [IB 1:10.000]	Dianova
Ziege-anti-Maus IgG, Cy3-konjugiert [IF 1:100]	Dianova

3.1.12 Oligonukleotide

3.1.12.1 DNA-Oligonukleotide

Alle DNA-Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon bezogen.

Oligonukleotide für die Verifizierung der U373-Zelllinien (pIRESneo, pIRES-A, pIRES-B) durch PCR:

- Primer NCBI A1: 5' TGG AAA ATT TTG AGG CAG CAG TCC ACT 3'
- Primer NCBI A2: 5' TGG GCG TCC GAC TCC GGA TC 3'
- Primer NCBI neo1: 5' CGG CGG CTG CAT ACG CTT GA 3'
- Primer NCBI neo2: 5' ACG AGG AAG CGG TCA GCC CA 3'
- Primer NCBI B1: 5' AGC ACC TGG TTT ATG CAG TTA TTC GT 3'

- Primer NCBI B2: 5' AGG AAT GCT CTT CAG CGC TGC T 3'
- Primer NCBI B3: 5' CAA GCA CCT GGT TTA TGC AGT TAT TCG 3'
- Primer NCBI B4: 5' GAA TGC TCT TCA GCG CTG CTG C 3'

Oligonukleotide zur Konstruktion des pIRESneo3-muthSGTA-Plasmids:

- Primer A1: 5' GCT GAA TTC AAG ATG GAC AAC 3'
- Primer A2: 5' GCT GCG GCC GCT CAC TCC TGC TGG 3'

Oligonukleotide zur Konstruktion des pIRESneo3-hSGTB-Plasmids:

- Primer B1: 5' CTG AAT TCA ATA TGT CAT CTA TC 3'
- Primer B2: 5' GCT GCG GCC GCT CAG GAA TGC TC 3'

Oligonukleotide zur Konstruktion des pIRESHyg3-SV40-LT-Ag-Plasmids:

- Primer Klon SV40 5: 5' CCG CGT ACG TTA TGT TTC AGG 3'
- Primer Klon SV40 6: 5' CGC GCC TTA AGA AGA TGG ATA AA 3'

3.1.12.2 RNA-Oligonukleotide

Mit Ausnahme der sgtB-spezifischen Oligonukleotide (von Invitrogen) wurden alle RNA-Oligonukleotide von Qiagen bezogen.

hsgtA-siRNA:

- Zielsequenz: 5' AAC TTT GAA GCT GCC GTG CAT 3'
- Sense: 5' CUU UGA AGC UGC CGU GCA UdTdT 3'
- Antisense: 5' AUG CAC GGC AGC UUC AAA GdTdT 3'

gl2-siRNA: (Elbashir et al, 2001): Luziferase-spezifisch (Photinus pyralis)

- Zielsequenz: 5' AAC GTA CGC GGA ATA CTT CGA 3'
- Sense: 5' CGU ACG CGG AAU ACU UCG AdTdT 3'
- Antisense: 5' UCG AAG UAU UCC GCG UAC GdTdT 3'

sgtB-siRNA (B1):

- Zielsequenz: 5' CCC TTT CAA ACT CAG TGC CTG AAG A 3'
- Sense: 5' CCC UUU CAA ACU CAG UGC CUG AAG A 3'
- Antisense: 5' UCU UCA GGC ACU GAG UUU GAA AGG G 3'

sgtB-siRNA (B2):

Zielsequenz: 5' GGA TCC CAA TAA TGC AGT TTA CTA T 3'

Sense: 5' GGA UCC CAA UAA UGC AGU UUA CUA U 3'

Antisense: 5' AUA GUA AAC UGC AUU AUU GGG AUC C 3'

3.1.13 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Derivat von	Referenz
pIREShyg3	Expressionsvektor für die Selektion von eukaryontischen Zellen mit Hygromycin. Trägt ein Hygromycin- und ein Ampicillin-Resistenzgen.		Clontech
pIREShyg3-LT-Ag	Enthält die gesamte cDNA-Sequenz von <i>SV40gp6</i> (kodiert für SV40-Large-T-Antigen) unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Trägt ein Hygromycin- und ein Ampicillin-Resistenzgen.	pIREShyg3 (Clontech)	diese Arbeit
pIRESneo3	Expressionsvektor für die Selektion von eukaryontischen Zellen mit Geneticin. Trägt ein Geneticin- und ein Ampicillin-Resistenzgen.		Clontech
pIRESneo3-hSGTB	Enthält die gesamte cDNA-Sequenz von humanem <i>sgtB</i> unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Trägt ein Geneticin- und ein Ampicillin-Resistenzgen.	pIRESneo3 (Clontech)	diese Arbeit
pIRESneo3-muthSGTA	Enthält die mutierte cDNA-Sequenz von humanem <i>sgtA</i> unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Trägt ein Geneticin- und ein Ampicillin-Resistenzgen.	pIRESneo3 (Clontech)	diese Arbeit
pXFlagNN-SGTB	Enthält die gesamte cDNA-Sequenz von humanem <i>sgtB</i> unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Trägt ein Ampicillin-Resistenzgen.	pBluescript II SK ⁺ (Stratagene)	Diplomarbeit Julia Köllner (Infektion und Krebs, DKFZ)
pXhSGTA	Enthält die gesamte cDNA-Sequenz von humanem <i>sgtA</i> unter	pBluescript II SK ⁺	diese Arbeit

Bezeichnung	Beschreibung	Derivat von	Referenz
pXmuthSGTA	der Kontrolle des CMV-Promotors. Trägt ein Ampicillin-Resistenzgen. Enthält die mutierte cDNA-Sequenz von humanem <i>sgtA</i> unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Trägt ein Ampicillin-Resistenzgen.	(Stratagene) pXhSGTA	diese Arbeit

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

Alle unten im Einzelnen aufgeführten mikrobiologischen Methoden wurden gemäß den in Sambrook et al., 1989, beschriebenen Protokollen durchgeführt.

3.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

3.2.1.1.1 *E.coli*-Plattenkultur

E.coli-Bakterien wurden mit Hilfe eines Drigalski-Spatels auf LB-Platten ausplattiert, welche dann umgedreht über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Durch Zugabe eines geeigneten Antibiotikums (z.B. Ampicillin [75 mg/l]) zum LB-Medium konnte auf Plasmid-tragende Bakterien selektioniert werden. Vor dem Gießen der Platten wurde das Medium autoklaviert. Das Antibiotikum wurde erst nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C zugegeben.

- **LB (*Luria Broth*; Miller, 1972):** 1 % Bacto Trypton
0,5 % Bacto Hefeextrakt
0,5 % NaCl

- **LB-Platten (1,5 %):** 1 l LB
15 g Bacto-Agar

3.2.1.1.2 *E.coli*-Flüssigkultur

Zur Herstellung einer Flüssigkultur wurde die gewünschte Menge LB-Medium, dem gegebenenfalls benötigtes Antibiotikum zugesetzt wurde, mit Bakterien beimpft. Die Bakterien stammten entweder von einer Einzelkolonie, die auf einer geeigneten LB-Platte gewachsen war, oder aus flüssigen Vorkulturen. Die Kulturen wurden dann, je nach benötigter Zelldichte, über Nacht oder für einige Stunden in ausreichend großen Erlenmeyerkolben oder in Reagenzgläsern (für Plasmid-Minipräparationen) auf einem Schüttler bei 180 - 220 rpm und 37 °C inkubiert.

3.2.1.2 Langzeit-Lagerung von *E.coli*-Zellen

Je 1,2 ml einer frischen Übernachtskultur wurden in Kryogefäße überführt und mit 400 µl 80 % Glycerol versetzt („Glycerolstock“). Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.1.3 Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte

Zur Bestimmung der Bakteriendichte wurde die optische Dichte (OD) der Bakterienkultur bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm im Vergleich zum unbeimpften LB-Medium mit Hilfe eines Photometers ermittelt.

3.2.1.4 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Kompetenz ist die Fähigkeit von Zellen, frei im umgebenden Medium vorhandene DNA aufzunehmen. Nur bestimmte Bakterienarten zeigen eine natürliche Kompetenz, d.h. sie besitzen spezielle Gene, deren Genprodukte für die Erkennung von DNA, deren Aufnahme in die Zelle und die Integration in das Genom durch Rekombination verantwortlich sind.

Nicht natürlich kompetente Bakterien wie *E.coli* können durch eine Calciumchlorid-Behandlung mit anschließendem Hitzeschock kompetent gemacht werden. Alternativ kann in sogenannte elektrokompetente Bakterien DNA mittels Elektroporation eingeschleust werden. Nur Bakterien, die sich in der 2. Hälfte der logarithmischen / exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} von 0,5 bis 0,9) befinden, sind zur Aufnahme von DNA fähig.

Zur Herstellung von elektrokompetenten Bakterien wurde ein Liter einer exponentiell wachsenden *E.coli*-Kultur mit einer OD_{600} von 0,5 bis 0,9 auf 4 °C abgekühlt, indem der Erlenmeyerkolben mit der Kultur für ca. 20 min in ein Eiswasserbad gestellt und zwischendurch mehrmals geschwenkt wurde. Die Bakterien wurden anschließend insgesamt dreimal gewaschen. Dazu wurden sie jeweils bei 4.000 xg und 4 °C abzentrifugiert und das Bakterien-Pellet einmal in 1 l H₂O bidest (4 °C), einmal in 500 ml H₂O bidest (4 °C), sowie einmal in 20 ml 10 % Glycerin (4 °C) resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Bakterien in 1-2 ml 10 % Glycerin (4 °C) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Eis aliquotiert (200 µl pro Eppendorfreaktionsgefäß) und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

3.2.1.5 Elektroporation von *E. coli*-Zellen

Die Elektroporation ist eine Methode, Zellmembranen permeabel zu machen, um so DNA in Zellen einzuschleusen (Transformation). Durch ein elektrisches Feld, das in der Regel durch einen sich schnell entladenen Kondensator erzeugt wird, entstehen in der behandelten Zellmembran mikroskopisch kleine Löcher, die sich innerhalb von Millisekunden wieder schließen. Fügt man dem umgebenden Medium vorher freie DNA hinzu, so kann diese von den Zellen aufgenommen und in den Zellkern transportiert werden.

40 µl der Suspension mit den elektrokompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-2 µl der zu transformierenden DNA-Lösung (10-200 ng) vermischt und unmittelbar danach in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand) bei 200 Ω, 1,75 kV und 25 µFd elektroporiert. Der τ-Wert lag bei 4,5-5 msec. Anschließend wurden die Bakterien mit 1 ml LB-Medium aus der Küvette gespült und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Es folgte eine 30- bis 45-minütige Inkubation unter leichtem Schütteln bei 37 °C. Schließlich wurden die Bakterien mit Hilfe eines Drigalski-Spatels auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivierung von Zellen

Etablierte humane Zellen und Maus-Zellen (3T3MEFs) wurden in 10 cm-Plastik-Gewebekulturschalen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit mit jeweils 10 ml DMEM-Zellkulturmedium kultiviert. Damit die Zellen nicht zu dicht wachsen, wurden sie alle 2 Tage in Verhältnissen von 1:5, 1:10 oder 1:20 auf neue 10 cm-Schalen ausgesät („Splitten“). Dabei wurde zunächst das Medium von der Schale abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin gespült. Nach dem Absaugen des Trypsins wurde erneut 1 ml Trypsin auf die Zellen pipettiert und die Schale wurde für 3 bis 5 min in den Brutschrank gestellt. Schließlich wurden 9 ml Medium in die Schale mit den durch das Trypsin abgelösten Zellen pipettiert. Je nach „Split“-Verhältnis wurden dann 0,5 bis 2 ml aus dieser Schale in die neuen Schalen überführt und mit 10 ml frischem Medium versetzt.

-
- **DMEM-Zellkulturmedium** (pH 7,2; mit 10 % FBS,
100 µg/ml Penicillin-Streptomycin,
2 mM L-Glutamin)

3.2.2.2 Gewinnung von embryonalen Maus-Zellen (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs)

Schwangere Maus-Weibchen (B6.129P2; heterozygot für SGTA und –B) wurden 13,5 Tage (bzw. 16 Tage für 3T3MEFs) nach der Verpaarung getötet und der Uterus wurde entnommen. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Embryonen wurden aus dem Uterus herauspräpariert und mit 1x PBS gewaschen. Jeder Embryo wurde einzeln in eine separate, nummerierte 6 cm-Kulturschale gelegt und alle Blut führenden Teile (Plazenta, Herz, Leber) wurden entfernt; der Kopf wurde abgeschnitten und zur Gewinnung von DNA für eine Genotypisierungs-PCR verwendet. Anschließend wurde jeder Embryo erneut mit 1x PBS gewaschen, in eine frische nummerierte Schale überführt und mit einer Schere zerkleinert. Das Gewebe wurde mit 500 µl Trypsin-EDTA-Lösung (5 mM; 0,25 %) bedeckt und 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden pro Schale 2,5 ml DMEM-Kulturmedium zugegeben um den Trypsin-Verdau zu stoppen. Zur Homogenisierung wurde das Gewebe jeweils 2-3 Mal mit einer Einwegspritze durch Kanülen mit abnehmendem Durchmesser (1,2 mm; 0,9 mm; 0,7 mm) gezogen; bei der Gewinnung von 3T3MEFs war eine Homogenisierung des Gewebes mit nur einer Kanüle (Durchmesser 1,2 mm) ausreichend. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 2 ml Kulturmedium versetzt (Gesamtvolumen 5 ml) und auf zwei (identisch nummerierte) 6 cm-Kulturschalen aufgeteilt (je 2,5 ml pro Kulturschale). Die MEFs wurden nun für 6 bis 8h im Brutschrank bei 37 °C, 5 %CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, dann wurde ein Mediumwechsel durchgeführt um eventuell vorhandene tote Zellen zu entfernen.

Bei der Gewinnung von primären MEFs wurden die Zellen am folgenden Tag im Verhältnis 1:3 gesplittet. Zur Langzeitlagerung der MEFs wurden sie nach anschließender 48-stündiger Inkubationszeit trypsiniert, mit Kulturmedium versetzt, in Falconröhrchen überführt und bei 200 xg 4 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden mit Kulturmedium und 2x Einfriermedium (50 % FCS, 20 % DMSO, 30 % Kulturmedium) im Verhältnis 1:1 versetzt, resuspendiert und in Kryogefäße überführt (1 ml pro Kryogefäß). Anschließend wurden die Kryogefäße in mit Isopropanol befüllten Boxen bei -80 °C eingefroren und am folgenden Tag in einem Behälter mit

Flüssigstickstoff (-196 °C) untergebracht. Um immortalisierte 3T3MEFs zu erhalten wurde wie unter 3.2.2.3 beschrieben vorgegangen.

3.2.2.3 Etablierung von 3T3MEFs

Die Etablierung von immortalisierten 3T3MEFs erfolgte nach dem Protokoll von George Todaro und Howard Green (Todaro und Green, 1963). Dafür wurden MEFs von 16 Tage alten Embryonen wie unter 3.2.2.2 beschrieben gewonnen. Im Anschluss an den Mediumwechsel am Tag der Präparation erfolgte eine 3-tägige Inkubation der MEFs im Brutschrank. Danach wurden die MEFs trypsinisiert, mithilfe des „CASY[®] Cell Counter + Analyser“ gezählt (siehe 3.2.2.9), in einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro 6 cm-Kulturschale ausgesät und wiederum 3 Tage im Brutschrank kultiviert. Diese Prozedur wurde so fortgeführt bis die „Krise“ (Rückgang der Zellzahl; nach etwa 15-30 Passagen) überwunden war und die Zellen ein unbegrenztes Wachstum zeigten.

3.2.2.4 Transfektion von Kulturzellen mit Plasmid-DNA (Calciumphosphat-Methode)

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellkulturzellen. Das am häufigsten verwendete Transfektionsverfahren ist die Calciumphosphat-Präzipitation. In einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat bindet sich die zu übertragende DNA an ausfallendes Calciumphosphat. Die ausgefallenen Kristalle werden der Zellkultur zugegeben und von den Zellen durch Endocytose aufgenommen.

Am Tag vor der Transfektion wurden die zu transfizierenden Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät (10^6 Zellen pro Schale) und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für jede Schale wurde ein Eppendorfreaktionsgefäß vorbereitet, das 50 µl CaCl₂ und etwa 10 µg der DNA enthielt, mit der die Zellen transfiziert werden sollten. Die Ansätze in den Eppendorfreaktionsgefäßen wurden mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt. Anschließend wurden pro Ansatz langsam 500 µl 2,5 M 2x HBS zugetropft; nach ein paar Tropfen wurde der Inhalt des Eppendorfreaktionsgefäßes stets mit dem Vortex-Gerät gemischt. Auf jede Schale mit den am Vortag ausgesäten Zellen wurde dann der Inhalt eines Eppendorfreaktionsgefäßes pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Ansatz

in kleinen Tropfen gleichmäßig über die ganze Schale verteilt wurde. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen entweder gesplittet, um sie weiter zu kultivieren, oder sie wurden zwecks der Herstellung von Zellextrakt geerntet.

- **2x HBS:** 280 mM NaCl
 50 mM Hepes
 1,5 mM Na₂HPO₄ ; pH 7,1

3.2.2.5 Transfektion von MEF-Zellen mit Plasmid-DNA

Die Transfektion von MEF-Zellen (immortalisierte 3T3MEFs und primäre MEFs) erfolgte mit der Lipofectamin LTX- und der Plus-Reagenz von Invitrogen (Darmstadt), da bei den MEFs mit dieser Methode eine höhere Transfektionseffizienz erreicht werden konnte als mit der Calciumphosphat-Methode. Am Vortag der Transfektion wurden die MEFs in 6-*well*-Kulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden dafür zuvor in DMEM-Zellkulturmedium ohne Penicillin-Streptomycin aufgenommen. Pro *well* wurden 7,5x10⁴ Zellen in 2,5 ml Medium ausgesät und anschließend für ca. 18h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Am Tag der Transfektion wurden 500 µl OPTIMEM-I-Medium (die angegebenen Volumina / Massen entsprechen jeweils den für ein *well* benötigten Volumina / Massen) mit 1,25 µg der Plasmid-DNA gemischt; dann wurde 1,25 µl Plus-Reagenz hinzugefügt und die Mischung 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 6,25 µl Lipofectamin LTX-Reagenz hinzugegeben und gut gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei RT wurde das Transfektat den Zellen zugegeben; die 6-*well*-Kulturplatten wurden im Anschluss kurz geschwenkt um das Transfektat gleichmäßig zu verteilen. Abhängig vom jeweiligen Experiment wurden die Zellen anschließend für weitere 24 bis 48h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.2.2.6 Transfektion von Kulturzellen mit siRNA

Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion in 6-*well*-Kulturplatten ausgesät (5x10⁴ Zellen pro *well*) und für ca. 18 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen zu 30 % konfluent gewachsen sein. Die Transfektion von siRNA Oligonukleotiden erfolgte mit der Oligofectamin-Reagenz (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers. Dazu

wurden (pro Transfektat) zwei Ansätze getrennt vorbereitet; die angegebenen Volumina entsprechen jeweils den für ein *well* benötigten Volumina. In einem ersten Ansatz wurden 10 µl der jeweiligen siRNA-Lösung (siRNA: 20 µM) mit 175 µl OPTIMEM-I-Medium gemischt, während im zweiten Ansatz 3 µl Oligofectamin-Reagenz mit 12 µl OPTIMEM-I-Medium versetzt wurden. Beide Ansätze wurden dann für 5 bis 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die beiden Lösungen vereint und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die ausgesäten Zellen einmal mit OPTIMEM-I-Medium gewaschen und danach mit 800 µl OPTIMEM-I-Medium überschichtet. Schließlich wurde das Transfektat (200 µl) den Zellen zugegeben; um es gut zu verteilen wurden die 6-*well*-Kulturplatten kurz geschwenkt. Nach einer 4-stündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurden pro *well* 500 µl DMEM-Kulturmedium mit 30% FBS zugegeben (Endvolumen 1,5 ml). Anschließend wurden die Zellen für weitere 48h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.2.2.7 Etablierung stabiler Zelllinien durch Antibiotika-Selektion

Durch die Transfektion von Zellen mit Plasmiden, die ein Antibiotikum-Resistenzgen tragen, können in Anwesenheit des jeweiligen Antibiotikums stabile Zelllinien etabliert werden, bei denen das Plasmid mit dem Resistenzgen in das Zellgenom eingebaut wurde und die daher – im Gegensatz zu untransfizierten Zellen. – überleben. Enthält das Plasmid zusätzlich zu dem Resistenzgen weitere Gene, so werden diese ebenfalls stabil von den Zellen exprimiert.

Für die Etablierung stabiler Zelllinien durch Antibiotika-Selektion wurde zunächst die Konzentration des jeweiligen Antibiotikums ermittelt, bei der etwa 5 bis 10 Tage nach Zugabe des Antibiotikums 100 % der Zellen tot waren. Dazu wurden die Zellen in unterschiedlicher Dichte ($2,5 \times 10^4$, 5×10^4 bzw. $7,5 \times 10^4$ Zellen pro *well*) in 6-*well*-Platten ausgesät, am Folgetag mit ansteigenden Konzentrationen des Antibiotikums (0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200 µg / ml) versetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Da Antibiotika bei 37 °C nur wenige Tage stabil sind wurde alle 3 Tage das Medium gewechselt und frisches Zellkulturmedium mit derselben Antibiotikum-Konzentration hinzugegeben. Die Zellen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch betrachtet und nach 10 Tagen wurde die niedrigste Konzentration bestimmt, bei der alle Zellen tot waren. Diese Konzentration

betrug für Geneticin (G418) bei U373-Zellen 800 µg / ml und für Hygromycin B bei 3T3MEFs 250 µg / ml.

Die Ausgangs-Zellen für die Etablierung stabiler Zelllinien (U373-Zellen bzw. 3T3MEFs) wurden in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät (1×10^6 Zellen / Schale) und am darauffolgenden Tag mit Plasmiden transfiziert, die ein Neomycin- bzw. ein Hygromycin B-Resistenzgen tragen. Das Neomycin-Resistenzgen kodiert für eine Aminoglykosid-Phosphotransferase und verleiht Resistenz gegen Geneticin, während das Hygromycin-B-Resistenzgen durch die Kodierung der Hygromycin B-Phosphotransferase Resistenz gegen Hygromycin B verleiht. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert, bevor sie mit den oben genannten Konzentrationen des entsprechenden Antibiotikums versetzt wurden. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Antibiotikum-haltigem Medium. Nach etwa 10 Tagen wurden die überlebenden Zellen gepoolt, in Anwesenheit des Antibiotikums einige Tage weiterkultiviert und dann trypsinisiert, aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.2.8 Zellzahlbestimmung mit der Neubauerkammer

Zur Bestimmung der Anzahl von Zellen in einem bestimmten Volumen wurde eine Neubauerkammer verwendet. Diese besteht aus einem Objektträger, auf dessen Oberfläche 2 Quadrate, die in 4 x 16 kleinere Quadrate eingeteilt sind, eingraviert sind, und einem Deckgläschen, das auf diesen Objektträger gepresst und durch Adhäsionskräfte festgehalten wird. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, in Medium aufgenommen und sorgfältig durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Jeweils ein Tröpfchen der Suspension wurde oben und unten an den Rand des Deckgläschens pipettiert und durch die wirkenden Adhäsionskräfte unter das Deckgläschen gezogen. Anschließend kann man die Neubauerkammer unter dem Lichtmikroskop betrachten und die Zellen zählen. Die Anzahl der Zellen in 16 Quadraten entspricht der Zellzahl in 0,1 µl. Durch Multiplikation dieser Zahl mit 10^4 erhält man die Anzahl der Zellen pro ml in der Ausgangssuspension.

3.2.2.9 Zellzahlbestimmung mit dem „CASY® Cell Counter + Analyser“

Die Zellzahl von MEFs wurde mit einer „CASY® Cell Counter + Analyser“-Apparatur der Firma innovatis bestimmt. Die Zellen (1: 50 oder 1:200 verdünnt in CASY® ton, einer isotonischen Salzlösung) werden bei dieser Methode eine nach der anderen in einer Präzisionsmesspore ausgerichtet und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Die Ergebnisse der Messung jeder einzelnen Zelle werden in einem kalibrierten Mehrkanalmessgerät mit über 500.000 Kanälen akkumuliert und verarbeitet; auf diese Weise werden Informationen über Zellzahl, -volumen und -vitalität generiert.

3.2.2.10 Asynchrone Zellen ernten / Herstellung von Zellextrakt

Von den Schalen mit den zu erntenden Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt. Die Zellen auf jeder Schale wurden mit jeweils 1 ml Trypsin gespült. Nach kurzem Schwenken der Schalen wurde das Trypsin wieder abgenommen und durch jeweils 1 ml frisches Trypsin ersetzt. Nach etwa 10-minütiger Inkubation im Brutschrank wurden ca. 2-3 ml 1x PBS auf jede Schale gegeben. Die abgelösten Zellen wurden dann mitsamt dem Trypsin und dem PBS in 50 ml-Falconröhrchen gesammelt. Nach gründlichem Resuspendieren und Mischen wurde die Zellzahl mit der Neubauerkammer bestimmt und die Zellen durch Zentrifugation des Falconröhrchens (5 min, 200 xg, RT) pelletiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet in 1 ml 1x PBS resuspendiert und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation des Eppendorfreaktionsgefäßes in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet bei -80 °C eingefroren. Wurde Zellextrakt hergestellt, der für die Analyse durch SDS-PAGE (siehe 3.2.5.5) und anschließenden Western Blot (siehe 3.2.5.8) vorgesehen war, so wurden die im Eppendorfreaktionsgefäß pelletierten Zellen in 2x Lämmli-Puffer resuspendiert (pro 100.000 Zellen 7,5 µl 2x Lämmli-Puffer) und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

- 2x Lämmli-Puffer:	4 % SDS
	20 % Glycerol
	120 mM Tris HCl; pH 6,8
	0,02 % Bromphenolblau
	2 % β-Mercaptoethanol

3.2.2.11 Arretierung von MEFs in der Prometaphase der Mitose

Zur Arretierung von MEFs in der Prometaphase der Mitose wurde dem Kulturmedium Nocodazol (Endkonzentration 0,035 µg/ml) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Sobald die Zellen die Prometaphase erreicht hatten verblieben sie für mehrere Stunden in diesem Stadium der Mitose. 24h nach der Nocodazol-Zugabe erfolgte ein „Release“ der MEFs aus der Arretierung in der Prometaphase (siehe 3.2.2.12).

3.2.2.12 Aufhebung der Arretierung von MEFs in der Prometaphase der Mitose (=“Release“)

24 h nach der Zugabe von Nocodazol wurde das Medium (mitsamt den abgelösten mitotischen Zellen) mit einer Plastikpipette von der Kulturschale abgenommen und in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt; es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 200 xg. Währenddessen wurden die auf der Schale verbliebenen Zellen 2 Mal mit 10 ml warmem DMEM (ohne Zusätze) gespült und anschließend mit 5 ml warmem DMEM-Kulturmedium versetzt. Die pelletierten Zellen wurden in 5 ml warmem DMEM-Kulturmedium resuspendiert und zu den Zellen auf der Schale pipettiert. Anschließend wurden die Zellen für 6 bis 48h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert bevor sie zum Zweck der Durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse geerntet wurden.

3.2.2.13 Durchflusszytometrische Analyse von Zellpopulationen

Die zu analysierenden Zellen wurden trypsiniert und die Zellsuspension wurde in Falconröhrchen überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer (siehe 3.2.2.9) wurden die Zellen sedimentiert (200 xg, 4 min, 4 °C) und das Zellpellet drei Mal mit je 10 ml vorgewärmtem 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden je 1x10⁶ Zellen in ein 2 ml-Eppendorfröhrchen überführt und mit 80 %igem Methanol (eiskalt) über Nacht (oder länger) bei -20 °C fixiert. Am Tag der Analyse wurden die Zellen sedimentiert (200 xg, 4 min, 4 °C) und mit 1x PBS gewaschen. Für Zellzyklusanalysen wurden die mit PBS gewaschenen Zellen für 30 min bei 37 °C mit 100 µl/ml RNase A inkubiert. Im Anschluss wurde den Zellen der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid [Ex. (305) 536, Em. 620] (Endkonzentration 50 µg/ml) zugegeben und die Zellen wurden für 45 min auf Eis inkubiert. Die Analyse

erfolgte an einem Durchflusszytometer (FACScan) der Firma Becton Dickinson; zur Auswertung wurde das Programm *Cell Quest* (Version 5.2.1) verwendet.

3.2.2.14 Softagar-Assay

Für die Proliferation von Fibroblasten oder Epithelzellen in Kultur ist normalerweise der Kontakt zu Plastik- oder Glasflächen notwendig. Sogenannte transformierte Zellen wachsen jedoch unabhängig von solchen Kontakten und können daher auch in halbflüssigen Medien wie Weichagar zu größeren Verbänden, sogenannten Zellklonen, heranwachsen. In einem *Softagar-Assay* kann man die Fähigkeit von Zellen untersuchen, einen transformierten Phänotyp zu unterstützen. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen *Softagar-Assay*-Experimenten wurden wildtyp und SGTA und -B *doppelknockout* 3T3MEFs analysiert, die das SV40-*Large-T-Antigen* stabil exprimierten, und Kontroll-3T3MEFs, bei denen nur das Hygromycin B-Resistenzgen stabil in das Genom integriert vorlag. Durch seine Interaktion mit den zellulären Proteinen pRb (Retinoblastom-Protein) und p53 ist das SV40-*Large-T-Antigen* in der Lage, eine Vielzahl von Zelltypen in Kultur und in transgenen Tieren zu transformieren.

Am ersten Tag wurde der sogenannte „*Base-Agar*“ gegossen; im Folgenden sind die Volumina angegeben, die für zwei 6-*well*-Platten benötigt werden. 12 ml 2x DMEM (37 °C) wurden mit 3 ml FCS versetzt; dann wurden 12 ml 1,6 % Agarose (50 °C) hinzugegeben und das Ganze durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer Plastikpipette gut gemischt. Pro *well* wurden 1,5 ml der Mischung ausplattiert. Nach etwa 30 min Standzeit auf der sterilen Werkbank war der Agar ausgehärtet; die 6-*well*-Platten wurden dann bis zum nächsten Tag bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator aufbewahrt.

Auf den „*Base-Agar*“ wurde am darauffolgenden Tag der „*Top-Agar*“ aufgetragen, der die zu untersuchenden Zellen enthielt; die angegebenen Volumina für einen 14-fachen Mix sind für eine 6-*well*-Platte ausreichend. 6 ml 2x DMEM wurden in einem 50 ml-Falconröhrchen mit 1,5 ml FCS gemischt und im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Währenddessen wurden die Zellen geerntet, gezählt und die gewünschte Menge (14x, also z.B. bei 10.000 Z. / *well*: 140.000 Z.) in ein 15 ml-Falcon überführt. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 1.000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 300 µl DMEM (mit 1 % FCS) resuspendiert. Die im Wasserbad aufgewärmte Mischung aus 2x DMEM und FCS wurde mit 1 % Agarose (50 °C)

gemischt und für 2 min zum Abkühlen in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Zellen zu der Mischung hinzugegeben und die Suspension durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gut gemischt; dann wurde 1 ml der Suspension pro *well* ausplattiert. Nach 30-minütiger Aushärtung unter der sterilen Werkbank wurde der Agar in jedem *well* mit 3 ml Zellkulturmedium bedeckt und die 6-*well*-Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ für 4 Wochen inkubiert; dabei wurde einmal pro Woche das Medium vorsichtig abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach 4 Wochen wurde das Medium erneut abgenommen und der Agar mit Kristallviolett-Lösung gefärbt, um die Zellklone besser sichtbar zu machen. Dazu wurden 500 µl Kristallviolett-Lösung (0,005 %) in jedes *well* pipettiert; nach 1-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ konnte der *Softagar-Assay* dann analysiert und zur Dokumentation gescannt werden.

- **2x DMEM:** 6,65 g DMEM-Pulver
1 g NaHCO₃
+ 200 ml H₂O; pH auf 7,0 – 7,3 einstellen mit HCl
ad 250 ml H₂O; Sterilfiltration
+ 5 ml Penicillin / Streptomycin

3.2.3 Virologische Methoden

Alle in dieser Arbeit beschriebenen virologischen Experimente wurden von Annabel Grewenig (DKFZ, Infektion und Krebs) durchgeführt.

3.2.3.1 Virusinfektion von MEF-Zellen

Für die Virusinfektion von MEFs (primäre MEFs und 3T3MEFs) wurden 6x10⁵ Zellen pro 10 cm-Kulturschale ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium entfernt. Die Virussuspension wurde entsprechend der verwendeten MOI (*multiplicity of infection*) in 1 ml serumfreiem Medium (für eine 10 cm-Schale) verdünnt und zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ unter regelmäßigem Schwenken wurde die Virussuspension wieder abgenommen. Die Zellen wurden anschließend mit 10 ml frischem Zellkulturmedium versetzt und bis zur Ernte bei 37 °C und 5 % CO₂ weiterkultiviert. Die Zellen wurden stets mit einer MOI von 0,1 pfu (*plaque forming units*) / Zelle infiziert (siehe 3.2.3.3).

3.2.3.2 Virusgewinnung aus MEF-Zellen

Zur Virusgewinnung aus MEFs (primäre MEFs und 3T3MEFs) wurden die infizierten Zellen 24, 48 oder 72 h nach der Infektion trypsinisiert und gezählt. 50 % der Zellen wurden für eine Western Blot- und 25 % für eine Southern Blot-Analyse präpariert, während die restlichen 25 % der Zellen für die Virusgewinnung und anschließende Virustiterbestimmung verwendet wurden. Dazu wurden die Zellen durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 400 xg sedimentiert; das Pellet wurde in 250 µl vTE-Puffer resuspendiert und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Um die Zellen aufzuschließen wurde eine Frier-Tau-Lyse durchgeführt. Dabei wurde das Zellpellet in dem Eppendorfreaktionsgefäß dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und jeweils im 37 °C-Wasserbad wieder aufgetaut; dann erfolgte eine 10- bis 15-minütige Zentrifugation bei 800 xg. Der Überstand enthielt das Virus und wurde anschließend für die Virustiterbestimmung durch Plaque Assay verwendet.

- **vTE-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 8,3
 0,5 mM EDTA

3.2.3.3 Virustitration (Plaque Assay)

Für die Virustiterbestimmung wurden 6×10^5 NBK-Zellen in 4 ml MEM Zellkulturmedium (mit 5 % FBS) pro 6 cm-Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und 400 µl (pro Schale) des zu titrierenden Virus in verschiedenen Verdünnungen (10^{-3} bis 10^{-7}) zu den Zellen gegeben. Nach 1-stündiger Inkubationszeit bei 37 °C und 5% CO₂ unter regelmäßigem Schwenken wurde die Virussuspension abgenommen und die Zellen mit 7 ml Überzugsmedium überschichtet. Nachdem das Überzugsmedium erstarrt war wurden die Kulturschalen in den Inkubator gestellt und die Zellen für 5 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Färbung der Zellen wurden sie mit 3 ml Neutralrot-Überzugsmedium-Mix überschichtet und über Nacht im Brutschrank weiter inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der Plaques auf jeder Schale bestimmt und der Virustiter berechnet. Der Virustiter wird in pfu (*plaque forming units*) / ml angegeben und berechnet sich wie folgt:

$$\text{pfu / ml} = P \times 10^x \times 2,5$$

P: durchschnittliche Anzahl der Plaques einer Virusverdünnung

X: absoluter Wert der Verdünnungsstufe

- **Überzugsmedium:** 5 Teile auf 37 °C erwärmtes 2x MEM (17,5 % FCS, 2 % Glutamin, 2 % Gentamicin) wurden mit 3 Teilen geschmolzenem, auf 48 °C abgekühltem 2 %igen Bacto-Agar (in H₂O) gemischt
- **Neutralrot-Überzugsmedium-Mix:** 15 Teile 2x PBS und 2 Teile Neutralrotlösung wurden auf 37 °C erwärmt und mit 15 Teilen geschmolzenem, auf 48 °C abgekühltem 2 %igen Bacto-Agar (in H₂O) gemischt

3.2.4 Präparation, Analyse und Modifikation von Nukleinsäuren

Alle Methoden zur Präparation, Analyse und Modifikation von Nukleinsäuren wurden entsprechend den in Sambrook et al., 1989, beschriebenen Protokollen durchgeführt. Einzelheiten der jeweiligen Methoden sind unten aufgeführt.

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

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Bakterien wurden – je nach gewünschter Ausbeute – DNA-Mini- bzw. Maxi-Präparations-Kits von Qiagen verwendet. Beide Kits beruhen auf demselben Prinzip, der alkalischen Lyse mit anschließender Reinigung der DNA. Zunächst werden die Bakterien pelletiert. Das Pellet wird dann in einem Puffer resuspendiert, der eine RNase zur Degradation der RNA enthält. Durch Zugabe eines Puffers, in dem NaOH und das Detergens SDS enthalten sind, werden die Bakterien lysiert. SDS zerstört die Zellmembran und denaturiert Proteine, NaOH denaturiert Proteine sowie chromosomale DNA und Plasmid-DNA. Aufgrund ihrer Konformation ist die Plasmid-DNA jedoch in der Lage, vollständig zu renaturieren, wohingegen die chromosomale DNA präzipitiert, wenn die Neutralisation durch Zugabe eines Kaliumacetat-haltigen Puffers erfolgt. Durch Zentrifugation können die denaturierte chromosomale DNA, denaturierte Proteine, RNA-Fragmente und das SDS, welches mit Kalium einen Komplex bildet, pelletiert werden. Bei diesem Zentrifugationsschritt setzen sich außerdem Zellmembran- und Zellwandbestandteile im Pellet ab. Die Plasmid-DNA befindet sich dagegen im

Überstand. Sie wird anschließend an eine stationäre Phase (hier: Anionen-Austauschsäule) gebunden, mit einem Isopropanol-haltigen Puffer gewaschen und dann eluiert.

3.2.4.1.1 Plasmid-Minipräparation

Zur schnellen Überprüfung von Klonierungsschritten wurde Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (max. Ausbeute: 20 µg) präpariert, um damit anschließend Restriktionsanalysen durchzuführen.

Einzelne Bakterienkolonien wurden mittels steriler Pipettenspitzen von Agarplatten gepickt und in jeweils 4 ml LB mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert.

3 ml (2 mal 1,5 ml) jeder Kultur wurden am folgenden Tag in Eppendorfreaktionsgefäßen in einer Tischzentrifuge bei 15.500 xg und RT für ca. 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Puffer P2 hinzugegeben und durch mehrmaliges Drehen des Eppendorfreaktionsgefäßes mit der Bakteriensuspension gemischt. Nach maximal 5 min erfolgte die Zugabe von 350 µl Puffer N3 zu dem Bakterien-Lysat. Nach sofortigem Mischen durch mehrmaliges Drehen des Eppendorfreaktionsgefäßes schloss sich ein 10-minütiger Zentrifugations-Schritt (15.500 xg) an. Der Überstand wurde auf eine Mini-Säule (*QIAprep spin Column*) pipettiert, welche in ein Eppendorfreaktionsgefäß gestellt und 1 min bei 15.500 xg zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen. Durch die Zugabe von 750 µl Puffer PE und 1-minütiger Zentrifugation bei 15.500 xg wurde die DNA gewaschen. Erneut wurde der Durchfluss verworfen. Um Reste des Waschpuffers zu entfernen, folgte ein weiterer Zentrifugations-Schritt (1 min, 15.500 xg). Anschließend wurde die Säule in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß gestellt, 50 µl Puffer EB darauf pipettiert und nach wenigen Minuten für 1 min zentrifugiert (15.500 xg). Die im Eluat enthaltene Plasmid-DNA konnte anschließend z.B. für Restriktionsanalysen oder zur Transformation von Bakterien verwendet werden.

P1 (Resuspendierungs-Puffer)

50 mM TrisHCl; pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A

P2 (Lyse-Puffer)

200 mM NaOH

	1 % SDS (w/v)
P3 (Neutralisierungs-Puffer)	3 M Kaliumacetat; pH 5,5
Puffer PE / QC (Wasch-Puffer)	1 M NaCl 50 mM MOPS; pH 7,0 15 % Isopropanol (v/v)
Puffer EB / QF (Elutions-Puffer)	1,25 M NaCl 50 mM TrisHCl; pH 8,5 15 % Isopropanol (v/v)

3.2.4.1.2 Plasmid-Maxipräparation

Um eine größere Menge an Plasmid-DNA (bis 500 µg) anzureichern (z.B. für eine Transfektion oder Sequenzierung), wurde eine Plasmid-Maxipräparation durchgeführt.

Am Vortag der Maxipräparation wurden 400 ml LB-Medium mit dem zur Selektion verwendeten Antibiotikum (Konz.: 75 mg/l) versetzt und in einen 1 l-Erlenmeyerkolben gefüllt. Das Medium wurde mit den gewünschten Bakterien beimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

Die Übernachtskultur wurde in große Zentrifugenbecher überführt und 10 min bei 4.000 xg zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer P2 und 5-minütige Inkubation bei RT wurden die Bakterien lysiert. Das Lysat wurde mit 10 ml gekühltem Puffer P3 versetzt und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 27.600 xg. Anschließend wurde der Überstand durch einen Filter auf eine zuvor mit 10 ml Puffer QBT equilibrierte Austauschsäule (Qiagen-tip 500) gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen; dann wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF direkt in ein mit 10,5 ml Isopropanol gefülltes corex-Zentrifugenröhrchen eluiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 16.300 xg wurde das Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen, erneut bei 16.300 xg zentrifugiert (10 min) und das Pellet ca. 5 min trocknen gelassen. Schließlich wurde das Pellet in 500 µl H₂O aufgelöst und die Konzentration und der Reinheitsgrad der DNA spektrophotometrisch untersucht.

Puffer QBT (Equilibrierungs-Puffer)

750 mM NaCl
 50 mM MOPS; pH 7,0
 15 % Isopropanol (v/v)
 0,15 % Triton X-100

3.2.4.2 DNA-Extraktion aus Zellkulturzellen

Zur Extraktion von genomischer DNA aus Zellkulturzellen wurde das *DNeasy™ Blood & Tissue Kit* von Qiagen verwendet. Zur Reinigung der DNA nach der Zellyse kommen dabei Zentrifugensäulen zum Einsatz, die eine Silica-Membran enthalten. Die DNA adsorbiert an diese Matrix bei hohen Konzentrationen chaotroper Salze, wird mit einem ethanolhaltigen Puffer gewaschen und dann mit Wasser eluiert.

3.2.4.3 Extraktion von viraler DNA aus virusinfizierten Zellen

Um die parvovirale Replikation durch Southern Blot (siehe 3.2.4.15) zu analysieren wurden parvovirale (MVM) DNA-Zwischenstufen und Genome mithilfe einer modifizierten Hirt-Methode aus infizierten Zellen extrahiert. Dazu wurden die pelletierten Zellen in 100 µl vTE resuspendiert und durch die Zugabe von 100 µl Hirt-Puffer lysiert. Anschließend erfolgte über Nacht ein Proteinase K-Verdau (400 µg/ml) bei 46 °C. Um die Zell-DNA zu zerstören wurde das Lysat am nächsten Tag mehrmals mit einer Einwegspritze durch eine Kanüle (Durchmesser 0,4 mm) gezogen, bevor die DNA-Konzentration mit dem *NanoDrop®*-Spektrophotometer bestimmt wurde.

- **vTE-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 8,3
0,5 mM EDTA
- **2x Hirt-Puffer:** 20 mM Tris pH 7,4
20 mM EDTA
1,2 % SDS

3.2.4.4 RNA-Extraktion aus Zellkulturzellen

RNA wurde mithilfe des *RNeasy™ Kits* von Qiagen nach Angaben des Herstellers aus Zellkulturzellen extrahiert und dann bis zur Verwendung (für Microarray oder qRT-PCR) bei -80 °C gelagert.

3.2.4.5 Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde ein *NanoDrop*[®]-Spektrophotometer verwendet. Der Vorteil dieses Gerätes verglichen mit herkömmlichen Photometern ist, dass jeweils 1 µl der DNA-Lösung für die Vermessung genügt und dass keine Küvetten benötigt werden. Die DNA-Lösung wird direkt auf die Messvorrichtung des *NanoDrop*[®]-Spektrophotometers pipettiert. Zum Nullabgleich wird Wasser verwendet. Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung beruht auf der Messung der Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren).

Für die Berechnung von DNA-Konzentrationen gilt, dass eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml (doppelsträngige DNA) bzw. 33 µg/ml (einzelfsträngige DNA und Oligonukleotide) entspricht. Der an das *NanoDrop*[®]-Spektrophotometer angeschlossene Computer berechnet auf dieser Basis direkt aus der gemessenen Absorption die DNA-Konzentration in der Lösung.

Das *NanoDrop*[®]-Spektrophotometer misst auch die Absorption der DNA-Lösung bei $\lambda=280$ nm (Absorptionsmaximum von Proteinen). Der Quotient der gemessenen Absorptionswerte bei 260 und 280 nm ist ein Indikator für den Reinheitsgrad der DNA-Präparation. Eine reine DNA-Präparation sollte ein A₂₆₀/A₂₈₀-Verhältnis von 1,8 bis 2,0 haben.

3.2.4.6 Ethanol-Natriumacetat-Fällung von Nukleinsäuren

Um Plasmid-DNA zu konzentrieren oder umzupuffern, wurde diese einer Ethanol-Natriumacetat-Fällung unterzogen.

Durch die Zugabe von Ethanol zu einer wässrigen DNA-Lösung wird die Dielektrizitätskonstante des Wassers gesenkt. Die Dipol-Wechselwirkungen zwischen dem Wasser und der DNA lassen dadurch nach, so dass die DNA ausfällt. Das Salz (z.B. Natriumacetat) wird benötigt, um die negativen Ladungen der Phosphatgruppen der DNA-Moleküle zu neutralisieren, damit keine Abstoßung zwischen den Molekülen besteht sondern sich Aggregate bilden können.

Zu der DNA-Lösung wurde 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und ein 2,5-faches Volumen Ethanol pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde die ausgefallene DNA durch Zentrifugieren (10 min, 15.500 xg) sedimentiert.

Anschließend wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und dann in einem geeigneten Volumen H₂O resuspendiert.

3.2.4.7 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsenzyme kommen natürlicherweise in Bakterien vor und schützen diese vor Viren (z.B. Bakteriophagen), indem sie Fremd-DNA abbauen. Typ II-Restriktionsenzyme schneiden die DNA-Doppelhelix an Stellen, die eine bestimmte (oft palindromische) Nukleotidabfolge aufweisen.

Restriktionsverdaus wurden bei 37 °C in Pufferbedingungen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für einzelne analytische Ansätze wurden in der Regel 0,5-2 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit einer geeigneten Menge an Restriktionsenzym für ca. 1-2 h inkubiert. Wenn Fragmente der verdauten DNA anschließend isoliert und weiterverwendet werden sollte, z.B. für eine Ligation, wurden präparative Verdaus angesetzt. Hierbei betrug das Gesamtvolumen 50 µl, und es wurden 3-5 µg DNA mit einer entsprechend größeren Menge an Restriktionsenzym für 3 h oder über Nacht inkubiert.

3.2.4.8 Agarosegelelektrophorese

Sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken wurden DNA-Fragmente mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. DNA-Fragmente wandern aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zum Pluspol (Anode). Erfolgt diese Wanderung in einer Matrix (z.B. Agarosegel; Agarose: ein Polysaccharid aus Meeresalgen), so wird die Wanderungsgeschwindigkeit entsprechend der Größe des DNA-Fragmentes verzögert; kleinere Moleküle wandern schneller als große. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente werden Agarosekonzentrationen von 0,5 bis 2 % verwendet.

Da DNA im UV-B-Bereich absorbiert, sind DNA-Banden in Agarosegelen unsichtbar, wenn die DNA nicht zuvor markiert oder gefärbt wurde. Eine empfindliche Färbung erreicht man mit dem Farbstoff Ethidiumbromid, der unter UV-Licht fluoresziert, sobald er sich in die Doppelhelix eingelagert hat.

Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurden 0,5 g Agarose in 50 ml 1x TAE gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurde die Agarose-Lösung mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt und in eine kleine, mit einem

Probenkamm bestückte Gelkammer gegossen. Nach dem Erhärten der Agarose wurde der Kamm aus dem Gel gezogen, das Gel in die Elektrophorese-Apparatur gelegt und mit 1x TAE überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 10x Ladepuffer versetzt und anschließend in die Probentaschen des Gels pipettiert. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurden zusätzlich noch verschiedene DNA-Längenstandards aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte dann bei einer konstanten Spannung von 80-100 V. Bei analytischen Gelen wurde anschließend die Ethidiumbromid-Fluoreszenz im UV-Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda=254$ nm mit Hilfe eines Imaging-Systems fotografisch festgehalten. Zu präparativen Zwecken wurden DNA-Fragmente auf Leuchtplatten mit langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten, um eine mögliche Schädigung der DNA zu vermeiden.

- **1x TAE:** 40 mM Tris/Essigsäure; pH 7,8
1 mM EDTA; pH 8,0

- **Ladepuffer (10x):** 30 % Ficoll
2 % SDS
50 mM EDTA; pH 8,0
0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylenblau

3.2.4.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden auf Leuchtplatten mit langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend mittels des *QIAquick™ Gel extraction Kits* von Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Wie bei dem *DNeasy Blood & Tissue Kit* von Qiagen adsorbiert die DNA dabei an die Silica-Membran von Zentrifugensäulen, wird anschließend mit einem ethanolhaltigen Puffer gewaschen und dann mit Wasser eluiert.

3.2.4.10 Ligation

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden können mit Hilfe einer DNA-Ligase (hier: T4-DNA-Ligase) kovalent miteinander verknüpft werden. Das Enzym verbindet dabei die Phosphatgruppe am 5'-Ende des einen mit der OH-Gruppe am 3'-Ende des anderen Stranges. Die T4-Ligase kann sowohl glatte als auch überhängende Restriktionsenden verknüpfen und benötigt ATP als Cofaktor.

Die T4-Ligase-Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

- **Standard-Ligationsansatz (20 µl):** 100 ng Vektor-DNA
5- bis 10-facher molarer Überschuß an Insert
2 µl 10x-Ligasepuffer
1 U T4-DNA-Ligase
ad 20 µl H₂O

Die Ligationsreaktion wurde in PCR-Röhrchen angesetzt und fand über Nacht im PCR-Gerät bei 14 °C statt. Anschließend wurden das Ligationsprodukt mit Ethanol und Natriumacetat gefällt und das Präzipitat in 10 µl H₂O aufgenommen. Die Fällung wurde durchgeführt, um Ligase-Moleküle zu entfernen, die bei der folgenden Transformation von *E.coli*-Bakterien mit dem Ligationsprodukt gestört hätten.

3.2.4.11 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Mit der PCR-Methode kann ein definierter DNA-Bereich milliardenfach amplifiziert werden. Voraussetzung ist, dass jeweils an den Enden des zu amplifizierenden Bereichs *Primer* hybridisieren können, die als Synthesestart für die Polymerase dienen. Zusätzlich können in die *Primer* flankierend zu den homologen Sequenzen Restriktionsschnittstellen eingeführt werden, über die sich die amplifizierten DNA-Fragmente in Vektoren ligieren lassen. Die eigentliche PCR ist ein automatisiertes Verfahren, bei dem ein Zyklus, bestehend aus den drei Schritten Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese, ca. 20 bis 30 Mal hintereinander durchgeführt wird. Bei dem ersten Denaturierungsschritt (95 °C) wird die eingesetzte DNA-Vorlage, das sog. *Template*, in Einzelstränge zerlegt. Dann wird die Temperatur auf ca. 50 °C gesenkt, und es kommt zur Ausbildung eines partiellen Doppelstranges zwischen den *Primern* und der Einzelstrang-DNA (Hybridisierung). Im Syntheseschritt (72 °C) wird mit den *Primern* als Startpunkt komplementär zu den eingesetzten DNA-Strängen jeweils ein vollständiger Doppelstrang synthetisiert. Die Produkte des vorangegangenen Zyklus dienen jeweils als DNA-Vorlagen für den nächsten, und jeder Zyklus verdoppelt die Menge der synthetisierten DNA im Vergleich zur vorhergehenden Runde. Innerhalb weniger Zyklen gibt es ein vorherrschendes DNA-Fragment: Seine Sequenz ist identisch mit der Sequenz, die von den beiden *Primern* auf dem ursprünglichen *Template* eingegrenzt wurde, plus der Sequenz der beiden *Primer*. Für die DNA-Synthese wird eine hitzestabile DNA-

Polymerase (Taq-Polymerase) verwendet, die durch die wiederholte Hitzebehandlung nicht denaturiert wird.

Die PCR-Reaktion wurde folgendermaßen angesetzt:

Standard-PCR-Ansatz (100 µl):

Reagenz	Volumen / Menge	Endkonzentration
10x PCR-Puffer	10 µl	1x
10 mM dNTP-Mix	2 µl	0,2 mM (jedes der 4 Nukleotide)
50 mM MgCl ₂	3 µl	1,5 mM
Primer A [10 µM]	5 µl	0,5 µM
Primer B [10 µM]	5 µl	0,5 µM
Template-DNA [100-200 ng/µl]	1 µl	
Taq-DNA-Polymerase [5 U/ µl]	1 µl	5 U
dest. H ₂ O (autoklaviert)	73 µl	

Die PCR-Reaktion wurde in dünnwandigen, 0,5 ml-PCR-Röhrchen angesetzt.

Das PCR-Gerät wurde folgendermaßen programmiert:

1. Denaturierung: 95 °C, 4 min
2. Denaturierung: 95 °C, 30 sec
3. Hybridisierung: 50-58 °C, 30 sec
4. Extension: 72 °C, 1 min

Es wurden immer 35 Zyklen (Schritte 2. bis 4.) durchgeführt.

Die Hybridisierungs-Temperatur wurde entsprechend der Schmelztemperatur (T_M) der jeweils verwendeten Oligonukleotide gewählt. Als ideal gilt eine Hybridisierung-Temperatur, die ca. 5 °C unter der T_M der *Primer* liegt.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend mit dem *QIAquick™ PCR purification Kit* von Qiagen, das auf dem selben Prinzip wie das *QIAquick™ Gel*

extraction Kit beruht, nach Angaben des Herstellers aufgereingt, präparativ verdaut und anschließend in Ligationsreaktionen eingesetzt.

3.2.4.12 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR ist eine Variante der Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*), einer Labortechnik, die in der Molekularbiologie verwendet wird um viele Kopien einer DNA-Sequenz zu erzeugen (siehe 3.2.4.11). Bei der qRT-PCR dient jedoch nicht DNA als Ausgangsmaterial sondern mRNA, die aus den zu untersuchenden Geweben oder Zellen gewonnen wurde. Die mRNA wird durch reverse Transkription mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in ihr DNA-Gegenstück (komplementäre DNA oder cDNA) umgesetzt, welches dann durch herkömmliche PCR vervielfältigt wird. Durch die gleichzeitige Analyse einer Standard-mRNA bekannter Menge ermöglicht die qRT-PCR die Quantifizierung der Expression eines Gens in bestimmten Zellen, Geweben oder Organismen. Die in dieser Arbeit beschriebenen quantitative Reverse-Transkriptase-PCR-Experimente wurden von PD Dr. Thomas Giese von der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg (Institut für Immunologie und Serologie, Abteilung Allgemeine Immunologie, Serologie und Hämatologische Diagnostik mit Blutbank) und seinen Mitarbeitern durchgeführt.

3.2.4.13 Ortsgerichtete Mutagenese von DNA-Sequenzen

Um ein hSGTA-Protein zu exprimieren, dessen mRNA nicht von der hsgtA-spezifischen siRNA erkannt wird, wurden mithilfe des *GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis*-Systems von Invitrogen 6 Nukleotidaustausche in die hsgtA-cDNA des hSGTA-Expressionsplasmids pXhSGTA eingeführt und somit das Plasmid pXmuthSGTA hergestellt. Mit dem oben genannten System können sowohl Nukleotidaustausche als auch Deletionen und Insertionen von bis zu 21 Nukleotiden in DNA-Plasmiden generiert werden. Dazu muss zunächst das „Ausgangsplasmid“ für 1 h bei 37 °C durch das Enzym DNA-Methylase methyliert werden. Anschließend wird eine PCR-Reaktion („Mutagenese-Reaktion“) mit dem methylierten Plasmid und zwei überlappenden *Primern* durchgeführt, von denen einer die gewünschten Mutationen enthält; das Produkt der Mutagenese-Reaktion ist eine lineare, doppelsträngige DNA mit den gewünschten Mutationen. Mit dieser DNA werden nun

DH5 α [™]-T1^R-Bakterien transformiert. In den Bakterien wird die mutierte DNA zirkularisiert und die methylierte Ausgangs-DNA von der McrBC-Endonuklease abgebaut, sodass nur das unmethylierte, mutierte Produkt übrig bleibt, das anschließend durch Plasmid-Mini- oder Maxipräparation (siehe 3.2.4.1.1 bzw. 3.2.4.1.2) aus den Bakterien gewonnen werden kann.

3.2.4.14 DNA-Sequenzierung

Alle mit PCR-Produkten gewonnenen Plasmide wurden im Bereich des *Inserts* sequenziert. Die DNA-Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma GATC Biotech durchgeführt.

3.2.4.15 Southern Blot: DNA-Transfer und Hybridisierung

Die Southern Blot Analyse ist eine nach ihrem Erfinder Edward M. Southern benannte Methode zum Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen in einer DNA-Probe. Die Gesamt-DNA wird durch Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nylon- oder Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis spezifischer Sequenzen erfolgt durch die Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde.

Je nach Versuch wurden pro Probe 2 oder 3 μg DNA mit 5 μl eines 6x Beladungspuffers und Wasser in einem Gesamtvolumen von 30 μl gemischt und für 2h bei 130 V und 130 mA in einem 0,8%igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Um sicherzustellen, dass für jede Probe die gleiche DNA-Menge geladen wurde, wurde das Agarosegel für 20 min mit Ethidiumbromid gefärbt und ein Foto unter UV-Licht gemacht. Anschließend wurde das Gel für 40 min in 0,25 M HCl geschwenkt, um die DNA zu depurinieren. Nachdem das Gel ein Mal mit H₂O gewaschen wurde erfolgte eine 40-minütige Denaturierung der DNA (Trennung der Doppel- in Einzelstränge) in NaOH-haltigem Denaturierungspuffer. Das Gel wurde anschließend erneut mit H₂O gewaschen und dann für 40 min in Neutralisierungspuffer geschwenkt. Schließlich wurde die Blotvorrichtung aufgebaut mit der die einzelsträngige DNA durch Kapillarkräfte über Nacht auf eine Hybond[™]-N-Membran übertragen wurde.

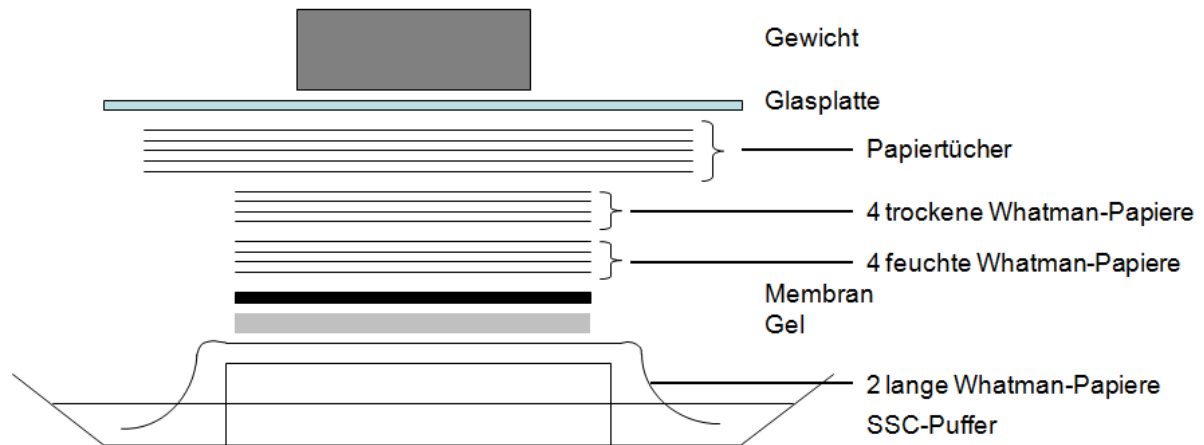


Abb. 3-1 Southern Blot-Aufbau für den Kapillartransfer der DNA von einem Agarosegel auf eine Nylonmembran.

Durch UV-Crosslinken in einem Stratalinker® wurde die DNA auf der Hybond™-N-Membran fixiert. Bevor sie mit ^{32}P -markierter ssDNA versetzt wurde erfolgte eine 1-stündige Prä-Hybridisierung der Membran bei 65 °C in Hybridisierungspuffer um die unspezifische Bindung der Sonde zu blockieren. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit der radioaktiven Sonde bei 65 °C unter permanenter Bewegung hybridisiert. Die Membran wurde dann zwei Mal bei 65 °C für 20 min in Waschlösung A gewaschen und ein Mal für 20 min in Waschlösung B ebenfalls bei 65 °C. Die radioaktiv markierte Zielsequenz wurde durch Autoradiografie auf BioMax MS Filmen sichtbar gemacht.

- **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
- **20x SSC:** 3 M NaCl
0,3 M tri-Natriumcitrat
- **Hybridisierungspuffer:** 10x Denhardts Lösung
1 % SDS
5 mM EDTA pH 8
3x SSC
100 µg/ml Heringssperma-DNA
- **100x Denhardts-Lösung:** 20 mg/ml Ficoll
20 mg/ml Polyvinylpyrrolidon
20 mg/ml BSA

- **Waschlösung A:** 3x SSC pH 7,0
1x SDS
ad 500 ml H₂O
- **Waschlösung B:** 0,3x SSC pH 7,0
1x SDS
ad 500 ml H₂O

3.2.4.16 Radioaktive Markierung von DNA mit Zufallsoligomeren

Die radioaktive Sonde zum Nachweis der verschiedenen parvoviralen DNA-Zwischenstufen und Genome besteht aus dem *EcoRV-EcoRI* (nt 385-1084) - Fragment der MVMp-NS-Gene. Die Sonde wurde gemäß dem Amersham *Megaprime™ DNA Labelling System* (GE Healthcare) präpariert. 10 µl der DNA-Vorlage (*Template*) und 5 µl *Primer*-Lösung wurden auf Eis gemischt. Durch 5-minütige Inkubation der Mischung bei 95 °C wurde die DNA denaturiert; anschließend wurde die Mischung für 5 min auf Eis inkubiert um eine effiziente Bindung der *Primer* zu erreichen. 10 µl Labelling-Puffer mit dNTPs, 5 µl [α -³²P]-dCTP (50 µCi) und 2 µl Klenow-Enzym wurden anschließend hinzugefügt; es folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Um nicht eingebautes radioaktives dCTP zu entfernen wurden 150 µl vTE-Puffer zu der radioaktiven Lösung gegeben; die Lösung wurde im Anschluss durch eine Sephadex G-50-Säule zentrifugiert. Das Eluat wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert, bevor es zur Hybridisierung mit der Membran verwendet wurde.

3.2.4.17 DNA-Microarray

DNA-Microarrays werden in der Genomanalyse, der Diagnostik und bei Untersuchungen der differentiellen Genexpression eingesetzt; sie ermöglichen den Nachweis der mRNA-Menge bestimmter Gene. Bei „*Oligonucleotide Microarrays*“ dienen synthetisch hergestellte Oligonukleotide als Sonden, die an definierte Positionen eines Rasters z.B. auf Glasträger aufgebracht werden. Die RNA wird aus dem zu untersuchenden Objekt extrahiert, in cDNA oder cRNA umgeschrieben und beispielsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Bei der Hybridisierung binden markierte einzelsträngige cDNA- / cRNA-Stücke an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array. Nach dem Abwaschen der nicht gebundenen cDNA / cRNA wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays mittels eines

Lasers ausgelesen. Diese reine Intensität wird üblicherweise noch normalisiert, um Abbaueffekten, verschiedenen guten Extraktionen und anderen Effekten Rechnung zu tragen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen *Microarray*-Experimente wurden von Mitarbeitern der DKFZ *Core Facility „Genomics and Proteomics“* durchgeführt; es wurde die *BeadArray™*-Technologie von Illumina verwendet. Bei dieser Methode werden synthetische, etwa 50 Basen lange Oligonukleotide an Silica-„beads“ gekoppelt; jede der *beads* trägt über 700.000 identische Oligonukleotide, die als Sonden dienen. Die *beads* werden auf *Chips* immobilisiert, welche mit den Biotin-markierten cRNA-Stücken hybridisiert werden. Jeder *bead*-Typ (mit seinem spezifischen Transkript) ist durchschnittlich 30 Mal auf dem *Chip* vorhanden, was die statistische Genauigkeit von Mehrfachmessungen gewährleistet. Nach dem Abwaschen ungebundener cRNA erfolgt die „Färbung“ des *Arrays* mit einem Fluoreszenzmolekül das an Biotin bindet und das anschließende Scannen mit einem Laser.

Für die Analyse der Genexpression von MEFs wurde der *BeadChip® Mouse Sentrix-6 V2* verwendet, der über 1.600.000 *beads* pro *Chip* umfasst und die Analyse des Expressionslevels von 45.281 Maus-Transkripten, -Varianten und -EST (*Expressed Sequence Tags*)-*Clustern* ermöglicht. Auf jedem dieser *Chips* können jeweils 6 verschiedene Proben parallel analysiert werden. Die Auswertung der *Microarray*-Daten erfolgte mit der *Genome-Studio*-Software von Illumina.

3.2.5 Proteinbiochemische Methoden

3.2.5.1 Bakterielle Expression von His₁₀-Fusionsproteinen

Für die Expression des Fusionsproteins His-SGTB wurden *E.coli*-Bakterien des BL21DE3-Stammes mit dem pET16NN-Derivat pET16-SGTB (N-terminal: 10 Histidine) transformiert. Der *E.coli*-BL21DE3-Stamm besitzt ein Gen, das für die T7-RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 kodiert. Somit sind Bakterien dieses Stammes in der Lage, Proteine zu exprimieren, deren Gene unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen, wie es bei dem Plasmid pET16NN der Fall ist. Da bei diesem Plasmid der *lac*-Operator der kodierenden Sequenz vorgeschaltet ist und das Plasmid außerdem für den *lac*-Repressor kodiert, ist eine Induktion der Fusionsprotein-Expression mit Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG) möglich. In Abwesenheit eines Induktors bindet sich der Repressor an die Operator-Sequenz

und blockiert damit den Zugang der RNA-Polymerase zum Promotor. Wenn ein Induktor wie IPTG an den Repressor bindet ändert dieser seine Konformation und verliert die Fähigkeit zur DNA-Bindung. Die RNA-Polymerase kann nun den ersten Schritt der Proteinexpression, die mRNA-Synthese, durchführen.

Transformierte *E.coli*-BL21DE3-Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C in LB-Medium mit Ampicillin [75 mg/l] unter Schütteln inkubiert. Die Übernacht-Kultur wurde dann in frischem, 37 °C-warmem LB_{amp}-Medium 1:100 verdünnt und bei 37 °C schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Durch Zugabe von IPTG (Endkonz.: 200 µM) wurde die Expression des Fusionsproteins His-SGTB induziert. Nach weiterer 4-stündiger Inkubation auf dem Schüttler bei 37 °C wurden die Bakterien schließlich bei 4.000 xg pelletiert. Die Pellets wurden in 5 ml 1x NTN-Puffer resuspendiert und die Suspension in 50 ml-Falconröhrchen überführt. Anschließend wurden die Bakterienpellets entweder sofort zur Proteinaufreinigung verwendet oder bei -20 °C aufbewahrt.

- **1x NTN-Puffer:** 50 mM Tris; pH 7,5
120 mM NaCl
0,5 % NP40

3.2.5.2 Aufreinigung von bakteriell exprimierten His₁₀-Fusionsproteinen

Proteine, die einen His₁₀-Fusionsanteil tragen, können leicht mithilfe einer Affinitäts-Chromatographie aus bakteriellem Lysat aufgereinigt werden. Dazu werden Nickel-Ionen verwendet die an eine Matrix aus Agarose gekoppelt sind. Das Histidin von His₁₀-Fusionsproteinen kann aufgrund des freien Elektronenpaars am Stickstoff des heterozyklischen Ringes einen Chelat-Komplex mit Nickel-Ionen bilden. Die Elution erfolgt mit Imidazol, das ebenfalls Nickel-Ionen chelatieren kann.

Für die Fusionsprotein-Aufreinigung wurden zunächst Bakterienpellets, die wie unter 3.2.5.1 beschrieben hergestellt und dann bei -20 °C gelagert worden waren, aufgetaut. Durch Ultraschall-Behandlung wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurde das Volumen der Suspension mit 1x NTN-Puffer auf 15 ml aufgefüllt und die Zelltrümmer abzentrifugiert (5 min, 8700 xg). Der Überstand wurde in ein 50 ml-Falconröhrchen überführt und mit 800 µl Nickel-Agarose versetzt, welche zuvor 3 Mal mit 1x NTN-Puffer (4 °C) gewaschen worden war. Nach 1-stündiger Inkubation bei 4 °C auf einem „Roller“ für Falconröhrchen wurde 1 min bei 200 xg

und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Agarose 3 Mal mit kaltem (4 °C) 25 mM Imidazol (in 1x NTN-Puffer) gewaschen. Zum Waschen wurde die Agarose mit ca. 30 ml Imidazol versetzt und das Falconröhrchen dann für 20 min bei 4 °C auf dem „Roller“ gedreht. Es schloss sich dann jeweils eine 1-minütige Zentrifugation (200 xg, 4 °C) und das Abnehmen des Überstandes an. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Agarose auf eine 1 ml-Polypropylensäule aufgetragen und His-SGTB durch die Zugabe von 1x NTN-Puffer mit 500 mM Imidazol in 300 µl-Fractionen eluiert. Der Proteingehalt und die Reinheit der Fractionen wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft und die Fractionen mit der größten Proteinmenge anschließend vereinigt. Die Proteinlösung wurde mit Einwegspritzen in einen Dialyserahmen überführt und bei 4 °C über Nacht gegen 1x PBS dialysiert, um das Imidazol zu entfernen. Am folgenden Tag wurde die Proteinkonzentration der Lösung bestimmt.

3.2.5.3 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Proteinassay-Farbreagens von BioRad. Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau bildet in saurer Lösung sowohl mit den kationischen als auch den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe. Das Absorptionsspektrum der ungebundenen (kationischen), rotgefärbten Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfatform stabilisiert, dessen Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Komplexes kann mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagens gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Bestimmung der Proteinkonzentration kann jedoch nur durch den Vergleich mit der Absorption einer Proteinlösung bekannter Konzentration erfolgen, die mit derselben Methode vermessen wurde.

2-20 µl der Proteinlösung, deren Konzentration bestimmt werden sollte, wurden in Plastikküvetten mit 1 ml verdünntem Farbreagens (1:5 in H₂O) gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde bei 595 nm im Photometer gemessen und die Proteinkonzentration durch Vergleich mit einer Standardgeraden ermittelt. Als Referenzlösung diente eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von 1

µg/µl, von der jeweils 2, 4, 6, 8 und 10 µl für die Erstellung einer Standardgeraden eingesetzt wurden.

3.2.5.4 Antikörper-Aufreinigung

Zur Aufreinigung des durch Immunisierung eines Kaninchens mit rekombinantem His-SGTB gewonnenen Antiserums wurde eine Affinitäts-Chromatographie durchgeführt. Dabei adsorbieren anti-SGTB-Antikörper aus dem Antiserum an rekombinantes SGTB, das kovalent an eine Sepharosesäule gekoppelt ist, und können anschließend durch Zugabe eines denaturierenden Puffers eluiert werden. Die verwendete „NHS (N-hydroxysuccinimid)-aktivierte Sepharose® *Fast Flow*“ enthält aktivierte Ester, die schnell und effizient mit Liganden reagieren, die Aminogruppen besitzen, wodurch sich stabile Amidbindungen ausbilden.

2 g NHS-aktivierte Sepharose® *Fast Flow* wurde ca. 15 min in 1 mM HCl quellen gelassen, anschließend in ein 50 ml-Falconröhrchen überführt, zentrifugiert und 3 Mal je 10 min mit Phosphatpuffer gewaschen. Ca. 30 mg aufgereinigtes His-SGTB-Protein (siehe 3.2.5.2), das über Nacht gegen Phosphatpuffer dialysiert worden war, wurde zu der Sepharose gegeben; das Falconröhrchen wurde anschließend 1 h auf einem „Roller“ bei RT gedreht, um eine Kopplung von His-SGTB an die Sepharose zu erreichen. Die Sepharose (mit dem gekoppelten Protein) wurde im Anschluss 4 Mal für jeweils 30 min bei RT mit 0,2 M Glycin (pH 8,0) gewaschen, dann je 4 Mal für jeweils 10 min im Wechsel mit 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 4,0), 0,5 M NaCl und Phosphatpuffer und schließlich mit 0,2 M Glycin (pH 2,1). Es folgte eine 1-stündige Inkubation mit Equilibrierungspuffer, bevor die Sepharose in eine Säule pipettiert wurde, welche an eine Pumpe und ein OD-Messgerät angeschlossen wurde. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. 9 ml His-SGTB-Antiserum wurde auf die Sepharosesäule aufgetragen; nachdem das Serum die Säule ein Mal durchlaufen hatte wurde es aufgefangen und erneut aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 1.) Equilibrierungspuffer und 2.) Waschpuffer jeweils so lange gewaschen, bis die OD 0 betrug. Schließlich erfolgte die Elution der anti-SGTB-Antikörper mit Elutionspuffer I (20 Fraktionen à 500 µl) und im Anschluss mit Elutionspuffer II (20 Fraktionen à 500 µl). Zur Neutralisation wurde bei der Elution mit Elutionspuffer I je 30 µl Tris pH 9,2 zu den Fraktionen hinzupipettiert bzw. 70 µl bei der Verwendung von Elutionspuffer II. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden anschließend vereinigt und über Nacht gegen 1x PBS

dialysiert. In Aliquots von 250 µl wurde der aufgereinigte Antikörper dann bei -20 °C bis zu seiner Verwendung gelagert.

- **Phosphatpuffer:** 0,1 M Phosphat, pH 7,5
0,5 M NaCl
- **Equilibrierungspuffer:** 20 mM Tris, pH 7,5
0,1 M NaCl
0,5 % NP40
- **Waschpuffer:** 20 mM Tris, pH 7,5
0,1 M NaCl
- **Elutionspuffer I:** 0,2 M Glycin, pH 2,7
- **Elutionspuffer II:** 0,2 M Glycin, pH 2,1

3.2.5.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche, vertikale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die vom negativ geladenen Detergens SDS (*Sodium dodecyl sulfate*; Natriumdodecylsulfat) umlagerten Proteine wandern in Richtung Anode und werden durch den Siebeffekt des Trägers (Polyacrylamid) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Zur Herstellung eines großen SDS-Gels wurde zunächst die Gießapparatur, die aus 2 Glasplatten, 2 Plastikstreifen („Spacer“), 2 Seitenteilen und einem Bodenteil besteht, aufgebaut, und dann das Trenngel bis zur Markierung an den Seitenteilen gegossen und mit wassergesättigtem N-Butanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels (ca. 30 min) wurde das Butanol mit Whatman-Papier abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen. Anschließend konnte das Sammelgel gegossen und ein Kamm oben zwischen die Glasplatten geschoben werden. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm herausgezogen und die Taschen mit Whatman-Papier gesäubert. Die Glasplatten mit dem Gel und den Seitenteilen wurden in eine Vorrichtung eingespannt und mitsamt dieser Vorrichtung in eine Plastikwanne gestellt.

Nachdem die zu analysierenden Proben mit 2x Lämmli-Puffer versetzt (pro 100.000 Zellen 7,5 µl Puffer) und die darin enthaltenen Proteine 3 min bei 94°C denaturiert worden waren, wurden sie in einem Endvolumen von 10-120 µl in die Taschen des großen Gels pipettiert. Bei Minigelen wurden maximal 15 µl aufgetragen. Um später

das Molekulargewicht der Proteine anhand ihrer Laufhöhe bestimmen zu können, wurde auf die Gele noch ein Protein-Größenmarker (Page Ruler™ von Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Laufpuffer (1x Tris-Glycin, 0,1% SDS) über Nacht bei 25 mA und 80 V (große Gele) bzw. ca. 1 h bei 25 mA und 300 V (Minigele).

	großes Gel (10 %)		2 Minigele (10 %)	
KOMPONENTEN DER LÖSUNGEN	Trenngel (40 ml- Ansatz)	Sammelgel (10 ml- Ansatz)	Trenngel (10 ml- Ansatz)	Sammelgel (10 ml- Ansatz)
dH ₂ O	15,90 ml	7,10 ml	4,000 ml	7,10 ml
Tris (0,5 M; pH 6,8)	-	1,25 ml	-	1,25 ml
(1,5 M; pH 8,8)	10,00 ml	-	2,500 ml	-
30 % Acrylamid-Mix	13,30 ml	1,50 ml	3,300 ml	1,50 ml
10 % SDS	0,400 ml	0,10 ml	0,100 ml	0,10 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,400 ml	0,10 ml	0,100 ml	0,10 ml
TEMED	0,016 ml	0,01 ml	0,004 ml	0,01 ml

- **2x Lämmli-Puffer:** 4 % SDS
20 % Glycerol
120 mM Tris HCl; pH 6,8
0,02 % Bromphenolblau
2 % β-Mercaptoethanol

- **Tris-Glycin-Laufpuffer:** 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

3.2.5.6 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Die Coomassie-Brillant-Blau-Färbung erfolgte nach Sambrook et. al. (1989).

Durch diese Methode können Proteine in Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht werden. Der blaue Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau lagert sich dabei reversibel an Proteine an.

Nach beendeter Gelelektrophorese wurden die Gele zunächst für mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend 2-3 Mal mit Fixierlösung soweit entfärbt, dass die Proteinbanden gut sichtbar waren.

- **Coomassie-Färbelösung:** 25% MetOH
10% Essigsäure
0,1% Coomassie R260
- **Fixierlösung:** 25% MetOH
10% Essigsäure

3.2.5.7 Trocknen von Polyacrylamidgelen

Fixierte Polyacrylamidgele wurden auf ein mit dH₂O angefeuchtetes Whatman-Papier gelegt und mit einer Frischhaltefolie bedeckt. Die Trocknung erfolgte in einem Gel Trockner unter Vakuum bei 80 °C für 2h.

3.2.5.8 Western Blot-Transfer von Proteinen

Der Elektrotransfer der durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose erfolgte nach dem „*Semi-Dry-Blot*“-Verfahren mit einer Trans-Blot-Apparatur. Dabei wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteine aus dem Gel in Richtung Anode auf eine Membran (z.B. aus Nitrozellulose oder Nylon) wandern. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten und die Proteine sind nun für verschiedene Nachweismethoden zugänglich. **Abb. 3-2** zeigt den Aufbau für den Elektrotransfer:

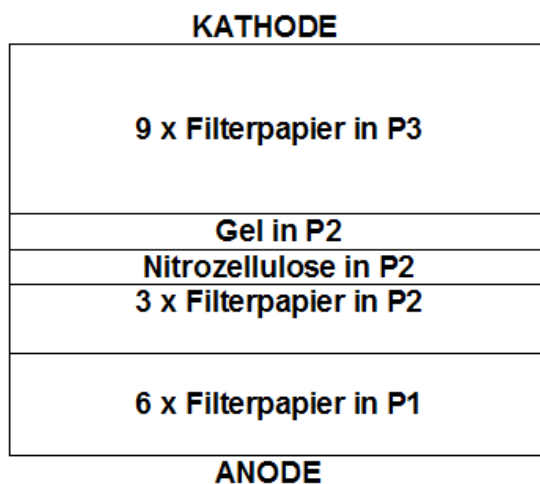


Abb. 3-2 Aufbau einer Western Blot-Apparatur für den Elektrotransfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran nach dem „*Semi-Dry-Blot*“-Verfahren.

Das Whatman-Filterpapier, die Nitrozellulosemembran und das Gel wurden kurz im entsprechenden Puffer geschwenkt und dann luftblasenfrei gemäß **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** übereinander gelegt. Anschließend wurde 1,5 h bei 25 V und 200 mA transferiert.

Puffer	Zusammensetzung
P1	300 mM Tris; pH 10,4 20 % Methanol p.A.
P2	25 mM Tris; pH 10,4 20 % Methanol p.A.
P3	25 mM Tris; pH 9,4 40 mM Norleucin

3.2.5.9 Immunologischer Nachweis transferierter Proteine

Membrangebundene Proteine wurden über eine Immunodetektion nachgewiesen. Bei dieser Methode bindet ein antigenspezifischer Primär-Antikörper an Epitope des nachzuweisenden Proteins. An den primären Antikörper bindet wiederum ein sekundärer Antikörper, der gegen den konstanten Teil des Erstantikörpers gerichtet ist und durch ein gekoppeltes Enzym den Proteinnachweis ermöglicht. Die von uns verwendeten sekundären Antikörper waren mit dem Enzym HRP (*horseradish peroxidase*; Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt. Die HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form; dabei kann Lumineszenz durch Schwärzung eines empfindlichen Films nachgewiesen werden.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für die Antikörper wurde die Membran für 1 h bei RT in Blocklösung geschwenkt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper, verdünnt in Blocklösung (1:100 bis 1:1.000; je nach Art des 1. Antikörpers und dem erwarteten Signal), erfolgte über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken (bei Inkubation in Plastikschaalen) bzw. Rollen (bei Inkubation in Falconröhrchen). Nachdem die Nitrozellulosemembran 4 Mal 5 min mit Waschlösung gewaschen worden war, wurde sie für 45 min bei RT mit dem 2. Antikörper (1:10.000 in

Blocklösung verdünnt) inkubiert. Die Membran wurde anschließend erneut 4 mal 5 min gewaschen.

Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe des „*Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus*“-Systems von PerkinElmer: Je nach Größe der Nitrozellulosemembran wurden 3 bis 7 ml der „*Oxidizing Reagent*“-Lösung in ein Becherglas pipettiert und ein gleichgroßes Volumen der „*Enhanced Luminol Reagent*“-Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde gleichmäßig auf die mit der „Proteinseite“ nach oben in einer Glasschale liegende Membran pipettiert. Nach 1 min wurde die Membran auf eine Glasscheibe gelegt und mit einer transparenten Plastikfolie abgedeckt. In der Dunkelkammer wurden die Proteinbanden auf einem Chemilumineszenzfilm sichtbar gemacht, indem dieser für die Dauer von wenigen Sekunden bis 10 Minuten auf die Membran gelegt und dann in einer Entwicklermaschine entwickelt wurde.

- **Blocklösung:** 10 % Trockenmilchpulver in 1 x PBS
0,2 % Tween 20
- **Waschlösung:** 1 x PBS
0,1 % Tween 20

3.2.5.10 Herstellung von Mausorgan-Extrakten für Western Blot-Analysen

Um die Expression von SGTA und -B in verschiedenen Mausgeweben durch Western Blot-Analyse zu untersuchen wurden Extrakte von unterschiedlichen Organen (Skelettmuskel, Herz, Leber, Niere, Milz, Testis, Hirn) von wildtyp-, SGTA ko- und SGTB ko-Mäusen hergestellt. Dazu wurden den getöteten Mäusen die oben genannten Organe entnommen, in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäße überführt und gewogen. Die Organe wurden anschließend in spezielle Röhrchen gegeben, die Keramikkügelchen enthielten (*Lysing Matrix D-Tubes*), und pro 100 mg mit 600 µl 2x Lämmli-puffer (ohne SDS, Bromphenolblau und β-Mercaptoethanol) versetzt. In einer Homogenisierungs-Apparatur (*Precellys 24 tissue homogenizer*) wurden die Organe homogenisiert und lysiert (2x 20 s, 5000 rpm) und dann mit SDS (Endkonzentration 4 %), Bromphenolblau und β-Mercaptoethanol (Endkonzentration 0,5 %) versetzt. Anschließend wurden 500 µl von jeder Probe in ein 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß

überführt und die darin enthaltene DNA durch Ultraschall zerkleinert. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Organextrakte bei -80 °C gelagert.

3.2.6 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

3.2.6.1 Immobilisierung von Zellen auf unbeschichteten Deckgläschen

U373-Kulturzellen wurden in 6-well-Kulturschalen ausgesät, in die zuvor unbeschichtete Deckgläschen gelegt worden waren. Im Anschluss wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank kultiviert und am nächsten Tag wie unter 3.2.2.6 beschrieben mit *hsgtA*-spezifischer oder Kontroll-siRNA transfiziert und für weitere 48 h im Brutschrank kultiviert.

3.2.6.2 Herstellung immunfluoreszenzmikroskopischer Präparate

Die auf unbeschichteten Deckgläschen immobilisierten Zellen wurden mit 1x PBS vorsichtig gespült, um Mediumreste zu entfernen. Zur Fixierung wurden die Zellen für 15 min mit 2 % (w/v) Formaldehyd (in 1x PBS) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Waschpuffer I gespült und für 5 min mit 50 mM NH₄CL-Lösung (in 1x PBS) inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss in eine feuchte Kammer überführt, mit 0,2 % Triton-X-100-Lösung (in 1x PBS) für 5 min permeabilisiert und wiederum mit Waschpuffer I gespült. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen 20 min mit Ziegsenserum (1:100 mit 1x PBS verdünnt) behandelt, bevor sie mit einem Primärantikörper für 1 h inkubiert wurden. Für den Nachweis von mehr als einem Antigen wurde ein Antikörper-Mix aus den jeweiligen Primärantikörpern eingesetzt. Nach Spülung der Zellen mit Waschpuffer II und Waschpuffer I erfolgte im Dunkeln eine einstündige Inkubation mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (oder einem Antikörper-Mix). Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper wurden immer in Waschpuffer I verdünnt. Nach einem weiteren Waschschrift mit Waschpuffer II und I wurden die Zellen – zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der DNA – wenige Sekunden mit einer Hoechst-33342-Lösung (2 µg/ml inkubiert, anschließend mit dH₂O sowie Ethanol kurz gespült und mit Elvanol eingebettet. Nach einer mehrstündigen Inkubationszeit

im Dunkeln zur Aushärtung des Elvanols konnten die Zellen lichtmikroskopisch analysiert werden.

- **Waschpuffer I:** 2 mM MgCl₂ in 1x PBS
- **Waschpuffer II:** 0,2 % (v/v) Tween 20; 0,2 % (v/v) NP40 in 1x PBS
- **Elvanol:** 8 % (w/v) Polyvinylalkohol (E4); 33 % (v/v) Glycerin in 1x PBS

3.2.6.3 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung von Immunfluoreszenzpräparaten (siehe 3.2.6.2) erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop von Zeiss (*Zeiss Cell Observer*). Um die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa 488 (Ex. 495 nm, Em. 520 nm), Cy3 (Ex. 550, Em. 570) und Hoechst-33342 (Ex. 347 nm, Em. 483 nm) nachzuweisen, wurden Leuchtdioden (LEDs, *Light Emitting Diodes*) eingesetzt; Alexa 488 wurde mit Licht der Wellenlänge 470 nm angeregt, Cy3 mit 555 nm und Hoechst mit 365 nm. Die emittierten Photonen wurden in einem Kanal detektiert, der den zugehörigen Filter für die jeweiligen Wellenlängen besaß (Alexa 488 und Cy3: Filter 56HE, Hoechst-33342: Filter 49). Einige Präparate wurden zusätzlich durch Differential-Interferenzkontrast-Mikroskopie analysiert. Dabei handelt es sich um eine häufig angewendete Version der Interferenzkontrast-Mikroskopie, die von G. Nomarski entwickelt wurde (Allen et al., 1969). Mit Hilfe einer Digitalkamera (*gray scale CCD camera AxioCam*) wurden Aufnahmen der Präparate gemacht; mit der Zeiss AxioVision-Software (Version 4.8.1) wurden diese gespeichert und der Maßstab der analysierten Objekte festgelegt.

4 ERGEBNISSE

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die funktionelle Analyse des humanen SGTA-Proteins und seiner Isoform SGTB. Dafür wurde zunächst untersucht, in welchen Mausgeweben und humanen Kulturzellen das SGTB-Protein nachgewiesen werden kann und welche Auswirkungen eine Verringerung der SGTB-Proteinmenge in humanen Zellen hat; in einem „Rescue-Experiment“ sollte darüber hinaus überprüft werden, ob SGTB in der Lage ist, SGTA funktionell zu ersetzen. Durch den Vergleich der Eigenschaften von *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) von wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* Mäusen sollte ein besseres Verständnis der Funktion von SGTA und –B gewonnen sowie untersucht werden, ob SGTA einen Beitrag zum parvoviralen Lebenszyklus leistet. Als ein Schritt zur Validierung von SGTA als Zielmolekül für die Krebstherapie wurde das Wachstum von SV40-*Large-T-Antigen*-exprimierenden SGTA und –B wildtyp und *doppelknockout* 3T3MEFs in *Softagar* analysiert.

4.1 Untersuchung und Vergleich des Vorkommens und der Funktion von SGTA und –B

4.1.1 Nachweis des SGTB-Proteins in Mausorganen und humanen Zelllinien

sgtA-Transkripte wurden bisher in allen untersuchten humanen Geweben und Rattengeweiben (Herz, Hirn, Plazenta, Leber, Skelettmuskel und Niere) nachgewiesen (Cziepluch et al., 1998; Kordes et al., 1998). Auf Proteinebene konnte SGTA in den Rattengeweiben Herz, Hirn, Milz, Lunge, Leber, Muskel, Niere und Hoden detektiert werden (Tobaben et al., 2003) sowie in humanen transformierten bzw. Tumor-Zelllinien (U937, HeLa, NBE, NBK, MCF-7, U87 und IMR32) und Primärzellen (Lymphozyten, BJ und HCEAC) (Winnefeld et al., 2004). Im Gegensatz zu der ubiquitären Präsenz von SGTA wurden SGTB-mRNA und -Protein bei der Analyse von Rattengeweiben durch Northern und Western Blot hauptsächlich im Gehirn nachgewiesen (Tobaben et al., 2003). Um zu untersuchen, in welchen Mausgeweben das SGTB-Protein detektiert werden kann und ob es wie SGTA in humanen Zelllinien vorhanden ist, wurde ein α hSGTB-Kaninchenserum hergestellt

und damit Organextrakte von wildtyp und SGTA-*knockout* Mäusen sowie Extrakte verschiedener humaner Zelllinien durch Western Blot analysiert.

4.1.1.1 Herstellung eines α hSGTB-Kaninchenserums

Zur Herstellung eines Kaninchen-Antiserums gegen rekombinantes humanes SGTB wurde ein Kaninchen mit dem Fusionsprotein His-SGTB (siehe 3.2.5.2) immunisiert und das Antiserum anschließend über eine Sepharosesäule, an der rekombinantes SGTB kovalent gekoppelt war, aufgereinigt (siehe 3.2.5.4). Die Spezifität des aufgereinigten α hSGTB-Serums wurde anschließend in einer Western Blot-Analyse mit Leber- und Hirn-Extrakten von SGTA- bzw. SGTB-*knockout* Mäusen untersucht. Die Extrakte wurden wie unter 3.2.5.10 beschrieben gewonnen und die darin enthaltenen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden SGTA und SGTB nachgewiesen. Für den Nachweis von SGTA wurde α rSGTA verwendet, ein Kaninchen-Antiserum gegen Ratten-SGTA, das auch murines SGTA erkennt.

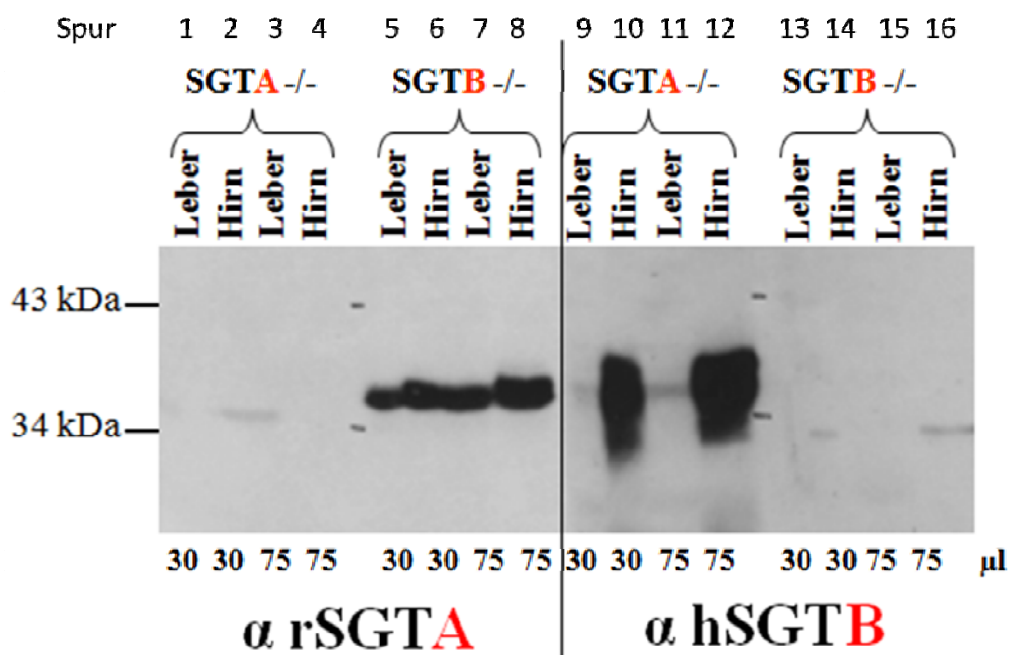


Abb. 4-1 Test des aufgereinigten α hSGTB-Kaninchenserums in einer Western Blot-Analyse von Mausorgan-Extrakten. Leber- und Hirnextrakte von SGTA- bzw. SGTB-*knockout* Mäusen wurden wie unter 3.2.5.10 beschrieben hergestellt; die in den Extrakten enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden SGTA und SGTB nachgewiesen.

Wie man in **Abb. 4-1** sieht, erkennt das α hSGTB-Serum Maus-SGTB in den Hirn-Extrakten der SGTA-*knockout* Mäuse (Spuren 10 und 12), kreuzhybridisiert jedoch nicht mit Maus-SGTA in den Organextrakten der SGTB-*knockout* Mäuse (Spuren 13

bis 16). In einer Western Blot-Analyse von Extrakten verschiedener humaner Zelllinien (siehe Abschnitt 4.1.1.3) konnte zudem gezeigt werden, dass das α hSGTB-Serum humanes SGTB, jedoch nicht humanes SGTA erkennt (siehe **Abb. 4-3**).

4.1.1.2 Western Blot-Analyse zum Nachweis von SGTB in Mausorganen

Um zu untersuchen, in welchen Mausgeweben das SGTB-Protein nachgewiesen werden kann, wurden Extrakte verschiedener Organe (Leber, Niere, Milz, Herz, Muskel, Hirn) von wildtyp und SGTA-*knockout* Mäusen hergestellt und in einem Western Blot mit α hSGTB-Serum analysiert. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis, das Tobaben et al. für Rattengewebe erhielten, konnte SGTB nur in Hirn-Extrakt nachgewiesen werden (Spuren 6, 12, 18, 24), und war auch bei längerer Exposition des Chemilumineszenzfilms in allen anderen untersuchten Organextrakten nicht nachweisbar (siehe **Abb. 4-2**).

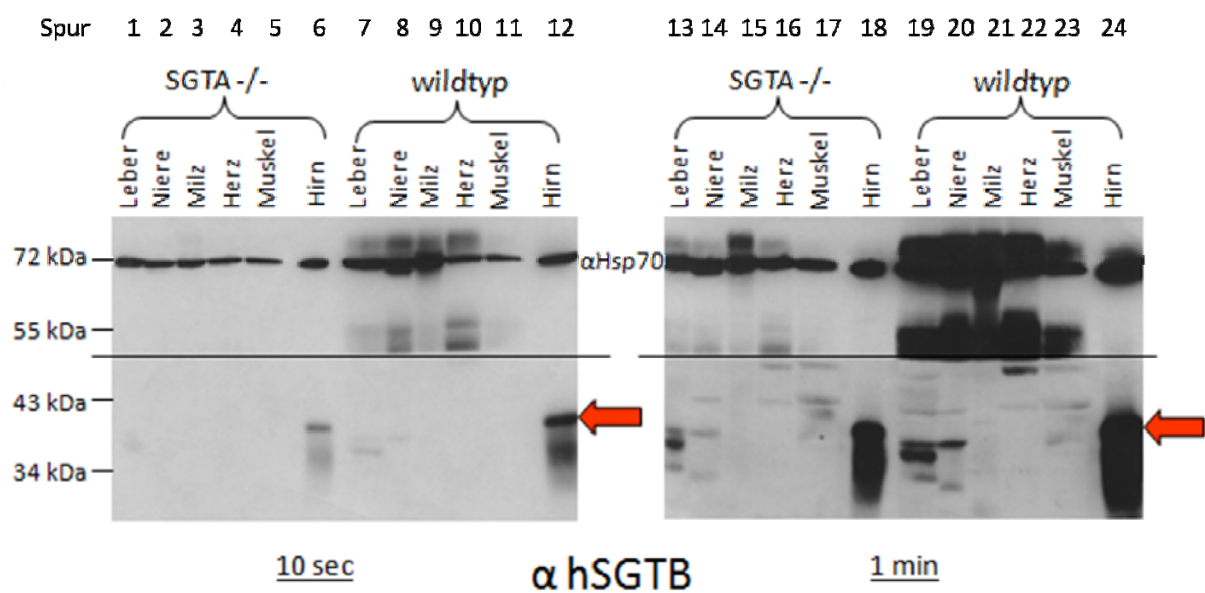


Abb. 4-2 Western Blot-Analyse zum Nachweis von SGTB in Mausorganen. Extrakte verschiedener Organe (Leber, Niere, Milz, Herz, Muskel, Hirn) von wildtyp und SGTA-*knockout* Mäusen wurden wie unter 3.2.5.10 beschrieben hergestellt. Die in den Extrakten enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden HSP70 (als Ladekontrolle) und SGTB (Laufhöhe markiert durch rote Pfeile) nachgewiesen.

4.1.1.3 Western Blot-Analyse zum Nachweis von SGTB in humanen Zelllinien

In einer weiteren Western Blot-Analyse wurde die Anwesenheit von SGTB in humanen Zelllinien untersucht und überprüft, ob das α hSGTB-Serum mit humanem SGTA-Protein kreuzhybridisiert. Dazu wurden Extrakte von verschiedenen humanen Zelllinien (NCH82, 293T, NBK, HeLa) sowie den primären Huvec-Zellen wie unter 3.2.2.10 beschrieben hergestellt. Extraktmengen, die gleichen Zellzahlen entsprachen (30 μ l bzw. 400.000 Zellen pro Spur), wurden auf ein großes Acrylamidgel aufgetragen und die in den Extrakten enthaltenen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Als Positivkontrolle für das SGTB-Protein wurde zusätzlich Extrakt von 293T-Zellen analysiert, die 48 h vor der Gewinnung des Extraktes mit dem SGTB-Expressionsplasmid pXNNSGTB transfiziert worden waren („293T *“; Spuren 1 und 8). Um die Spezifität des α hSGTB-Serums zu testen wurde außerdem Extrakt von HeLa-Zellen untersucht, bei denen die SGTA-Proteinmenge durch Behandlung mit sgtA-spezifischer siRNA verringert worden war („HeLa (kd A)“; Spuren 6 und 13). **Abb. 4-3** zeigt, dass das α hSGTB-Serum humanes SGTB, jedoch nicht humanes SGTA erkennt, denn die experimentelle Verringerung der SGTA-Menge führt bei Verwendung des α hSGTB-Serums nicht zu einem verringerten Signal (Spur 12 bzw. 13). Wie in **Abb. 4-3** außerdem zu sehen ist, war SGTB in der neuronalen Zelllinie NCH82 nachweisbar (Spur 9). Darüber hinaus konnten etwas geringere Mengen von SGTB auch in den nicht-neuronalen humanen Tumor- bzw. transformierten Zelllinien HeLa (Spuren 12 und 13), 293T (Spur 10) und NBK (Spur 11) sowie in primären Huvec-Zellen (Spur 14) nachgewiesen werden.

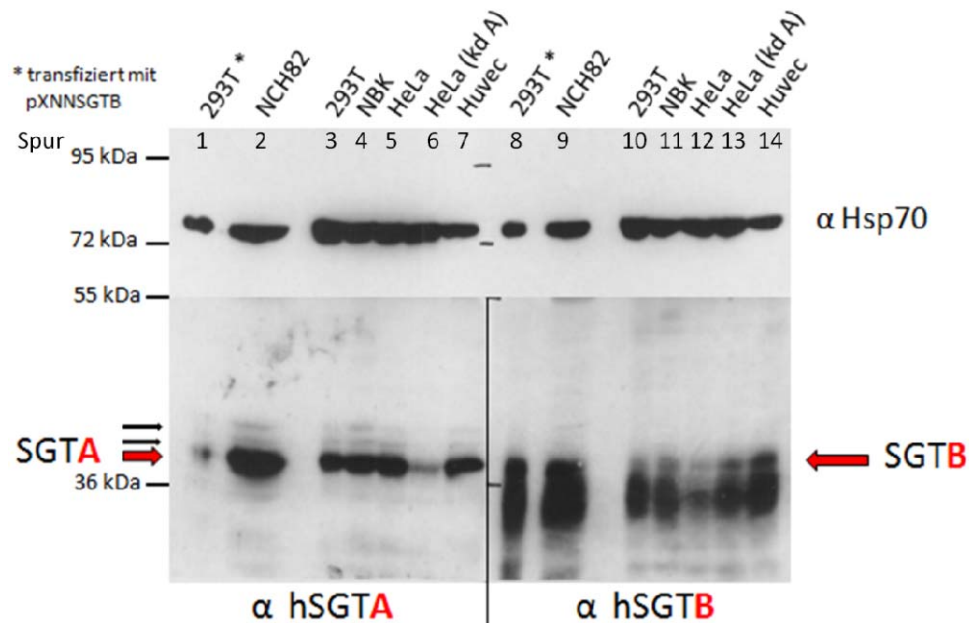


Abb. 4-3 Western Blot-Analyse zum Nachweis von SGTB in humanen Zelllinien. Extrakte von verschiedenen humanen Zelllinien (293T, NCH82, NBK, HeLa; Huvec) wurden wie unter 3.2.2.10 beschrieben hergestellt. „293T *“ waren 48 h zuvor mit dem SGTB-Expressionsplasmid pXNNSGTB transfiziert worden (siehe 3.2.2.4); bei „HeLa (kd A)“ hatte 48 h zuvor eine Behandlung mit sgtA-spezifischer siRNA stattgefunden (siehe 3.2.2.6). Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden HSP70 (als Ladekontrolle) sowie SGTA und SGTB nachgewiesen.

4.1.2 Experimentelle Verringerung der SGTB-Proteinmenge in humanen Zelllinien durch den Einsatz von hsgtB-spezifischer siRNA

Die siRNA-vermittelte Reduktion der SGTA-Proteinmenge („SGTA-knockdown“) führte in allen getesteten Tumorzelllinien (HeLa, NBE, NTN, MiaPaCa und Panc 2) zu einer Arretierung der Zellen in der Mitose und nachfolgend zum Zelltod in dieser Phase des Zellzyklus (nachfolgend z.T. als „SGTA-Depletions-Phänotyp“ bezeichnet) (Winnefeld et al., 2004; Cziepluch, unveröffentlichte Ergebnisse). Studien mit HeLaH2A-Zellen – HeLa-Zellen, die ein Histon 2A-YFP-Fusionsprotein exprimieren und daher eine einfache Beobachtung von mitotischen Chromosomen in der *in vivo*-Mikroskopie erlauben – zeigten, dass in diesen Zellen eine mittelmäßig oder stark reduzierte SGTA-Menge misslokalisierte Chromosomen an den Spindelpolen zur Folge hatte. In Kontrollzellen, bei Anwesenheit regulärer Mengen von SGTA, treten ebenfalls misslokalisierte Chromosomen auf, jedoch werden sie stets sehr schnell „gerettet“ und korrekt in der Metaphaseplatte angeordnet. In SGTA-knockdown-Zellen dagegen verbleiben die misslokalisierten Chromosomen in der Nähe der Spindelpole und verursachen die Arretierung der Zellen in der Mitose und

darauffolgenden Zelltod (Winnefeld et al., 2006). Da eine Western Blot-Analyse (siehe 4.1.1.3) gezeigt hatte, dass SGTB – ebenso wie SGTA – in humanen Zelllinien nachgewiesen werden kann, sollte untersucht werden, ob die Verringerung der SGTB-Menge in humanen Zelllinien ebenfalls zu dem oben für den SGTA-*knockdown* beschriebenen Phänotyp führt.

4.1.2.1 Verringerung der SGTB-Proteinmenge in HeLaH2A-Zellen

Um eine Verringerung der SGTB-Menge in HeLaH2A-Zellen zu erreichen, wurden zwei unterschiedliche siRNAs – genannt B1 und B2 – verwendet, die mit zwei unabhängigen Regionen in der SGTB-kodierenden mRNA hybridisieren können (siehe 3.1.12.2). HeLaH2A-Zellen wurden wie unter 3.2.2.6 beschrieben mit diesen siRNAs bzw. mit *sgtA*-spezifischer siRNA transfiziert, nach 48 bzw. 72 h lichtmikroskopisch analysiert und anschließend zur Herstellung von Zellextrakt verwendet. 30 µl der Extrakte (entspricht 400.000 Zellen) wurden jeweils auf ein großes Polyacrylamidgel aufgetragen; nach elektrophoretischer Auftrennung der in den Extrakten enthaltenen Proteine wurden SGTA und SGTB sowie Tubulin im Western Blot nachgewiesen.

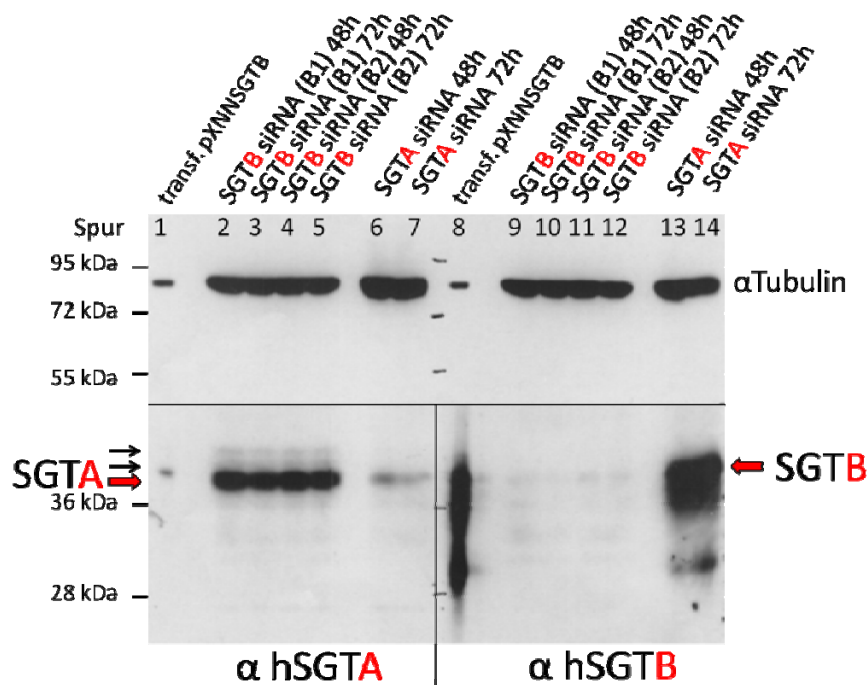


Abb. 4-4 Western Blot-Analyse von mit *sgtA*- bzw. *sgtB*-spezifischer siRNA behandelten HeLaH2A-Zellen. HeLaH2A-Zellen wurden wie unter 3.2.2.6 beschrieben mit *sgtA*- bzw. *sgtB*-spezifischer (B1 und B2) siRNA behandelt oder mit dem SGTB-Expressionsplasmid pXNNSGTB transfiziert (siehe 3.2.2.4). 48 bzw. 72 h später wurden die Zellen geerntet und zur Herstellung von Zellextrakt verwendet. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden Tubulin (als Ladekontrolle) sowie SGTA und SGTB nachgewiesen.

Abb. 4-4 zeigt, dass die SGTB-Proteinmenge durch den Einsatz der sgtB-spezifischen siRNAs (B1 bzw. B2) bereits nach 48 h effektiv verringert wurde (Spuren 9 bis 12), während kein Einfluss dieser siRNAs auf die SGTA-Menge beobachtet werden konnte (Spuren 2 bis 5); umgekehrt wurde auch die SGTB-Menge nicht durch die Transfektion der Zellen mit sgtA-spezifischer siRNA beeinflusst (Spuren 13 und 14). Wie die lichtmikroskopische Analyse und die Auswertung der Zellzahlen der mit sgtA- bzw. sgtB-spezifischer siRNA behandelten HeLaH2A-Zellen zeigte, führte der Einsatz der sgtA-spezifischen siRNA zum Zelltod, während die Verringerung der SGTB-Proteinmenge keinen Effekt hatte (Köllner, nicht gezeigte Daten).

4.1.2.2 Verringerung der SGTB-Proteinmenge in NCH82-Zellen

Da das SGTB-Protein bei der Analyse von Ratten- und Mausgeweben durch Western Blot bisher nur in Hirn-Extrakten nachgewiesen werden konnte (Tobaben et al., 2003; diese Arbeit) und darüber hinaus in neuronalen Zellen ein stabiler trimerer Komplex bestehend aus SGTB, HSC70 und CSP α identifiziert wurde (Tobaben et al., 2003) ist es möglich, dass SGTB vor allem in neuronalen Zellen eine wichtige Funktion erfüllt. Daher wurde untersucht, welche Auswirkung die Verringerung der SGTB-Proteinmenge in den humanen neuronalen Zelllinien NCH82 und U373 (siehe 4.1.2.3) hat. Da in Betracht gezogen wurde, dass SGTA in der Lage sein könnte, SGTB funktionell zu ersetzen, wurden zusätzlich zu den Einzeltransfektionen von sgtA-bzw.- sgtB-spezifischer (B1) siRNA auch Transfektionen von NCH82-Zellen (humane Glioblastoma-Zellen; Herold-Mende et al., 1999) mit beiden siRNAs durchgeführt, um die Menge von SGTA und SGTB gleichzeitig zu verringern; dabei wurden entweder je 5 oder 10 μ l (100 bzw. 200 pmol; entspricht einer Endkonzentration im Medium von 0,1 bzw 0,2 μ M) der jeweiligen siRNA pro Ansatz verwendet. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen einer lichtmikroskopischen Analyse unterzogen und die Extrakte der Zellen (je 30 μ l Extrakt bzw. 400.000 Zellen) anschließend im Western Blot untersucht.

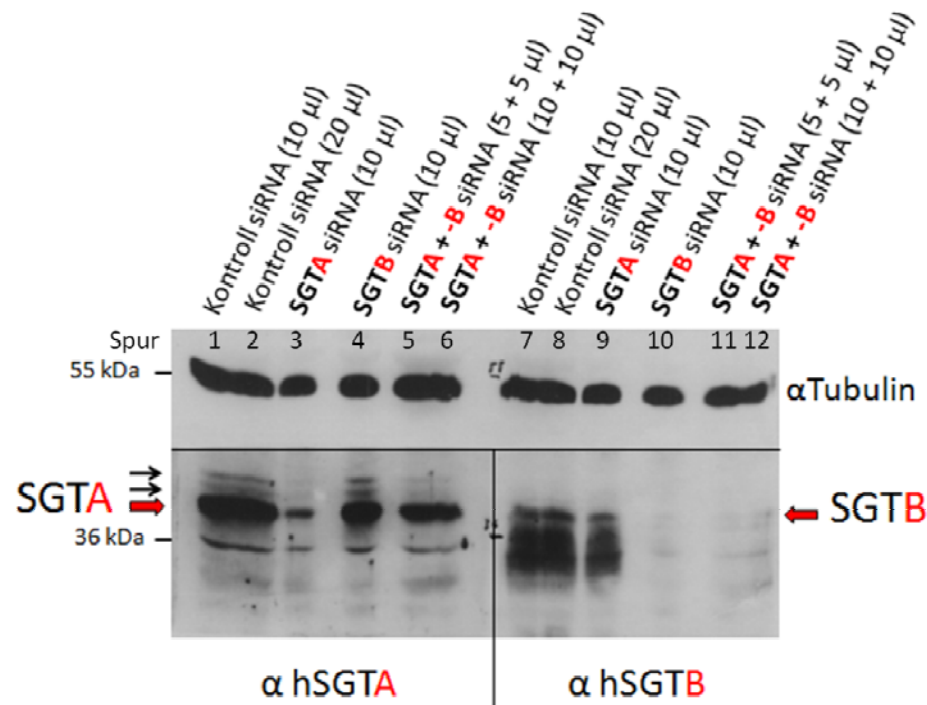


Abb. 4-5 Western Blot-Analyse von mit sgtA- bzw. sgtB-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelten NCH82-Zellen. NCH82-Zellen wurden wie unter 3.2.2.6 beschrieben mit sgtA- bzw. sgtB-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt. In Klammern sind die siRNA-Volumina angegeben, die für ein well einer 6-well-Platte eingesetzt wurden. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und zur Herstellung von Zellextrakt verwendet. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden Tubulin (als Ladekontrolle) sowie SGTA und SGTB nachgewiesen.

Anhand der lichtmikroskopischen Analyse und der Auswertung der Zellzahlen konnte in der humanen Glioblastoma-Zelllinie NCH82 weder ein Einfluss von sgtA- noch von sgtB-spezifischer siRNA auf die Vitalität der Zellen festgestellt werden (Köllner, nicht gezeigte Daten), obwohl zumindest für SGTB eine sehr effektive Verringerung der Proteinmenge erreicht wurde, wie **Abb. 4-5** (Spur 10) zeigt. Der gleichzeitige Einsatz von sgtA- und sgtB-spezifischer siRNA (Spuren 5, 6, 11 und 12) führte ebenfalls nicht zu einem Effekt; auch war hier die Verringerung der SGTA-Proteinmenge (Spuren 5 und 6) weniger effektiv als bei der alleinigen Verwendung von sgtA-spezifischer siRNA (Spur 3).

4.1.2.3 Verringerung der SGTB-Proteinmenge in U373-Zellen

U373-Zellen sind eine humane Glioblastoma-Astrocytoma-Zelllinie (Pontén und Macintyre, 1968). Wie in **Abb. 4-6** zu sehen ist, konnte in dieser Zelllinie sowohl die SGTA- (Spur 2; oben) als auch die SGTB-Proteinmenge (Spur 3; unten) durch den Einsatz der jeweiligen siRNA effektiv verringert werden.

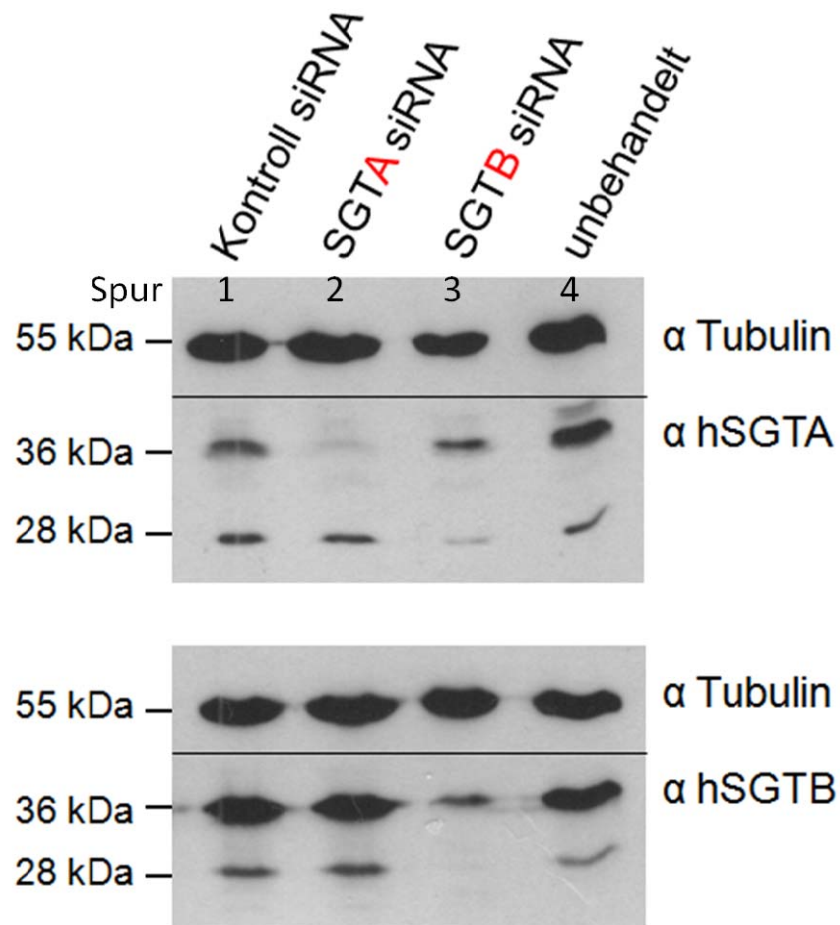


Abb. 4-6 Western Blot-Analyse von mit sgta- bzw. sgtb-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelten U373-Zellen. U373-Zellen wurden wie unter 3.2.2.6 beschrieben mit sgta- bzw. sgtb-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA behandelt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und zur Herstellung von Zellextrakt verwendet. Die in den Proben (je 10 µl Extrakt; entspricht etwa 130.000 Zellen) enthaltenen Proteine wurden in einem Polyacrylamid-Minigel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden Tubulin (als Ladekontrolle) sowie SGTA und SGTB nachgewiesen.

Die lichtmikroskopische Analyse von mit sgta- bzw. sgtb-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelten U373-Zellen ergab, dass die Verringerung der SGTA-Proteinmenge zum Tod der Zellen führte (siehe **Abb. 4-7 A**). Durch eine FACS-Zellzyklusanalyse und die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von mit Hoechst-33342 gefärbten U373-Zellen wurde gezeigt, dass der Einsatz von sgta-spezifischer siRNA zur Arretierung der Zellen in der G₂/M-Phase und zu misslokalisierten Chromosomen an den Spindelpolen führte (siehe **Abb. 4-7 B** und **C**; misslokalisierte Chromosomen sind in **Abb. 4-7 C** durch Pfeile gekennzeichnet). Bei Verringerung der SGTB-Proteinmenge wurde – wie auch in HelaH2A- und NCH82-Zellen (siehe 4.1.2.1 und 4.1.2.2) – kein Effekt festgestellt.

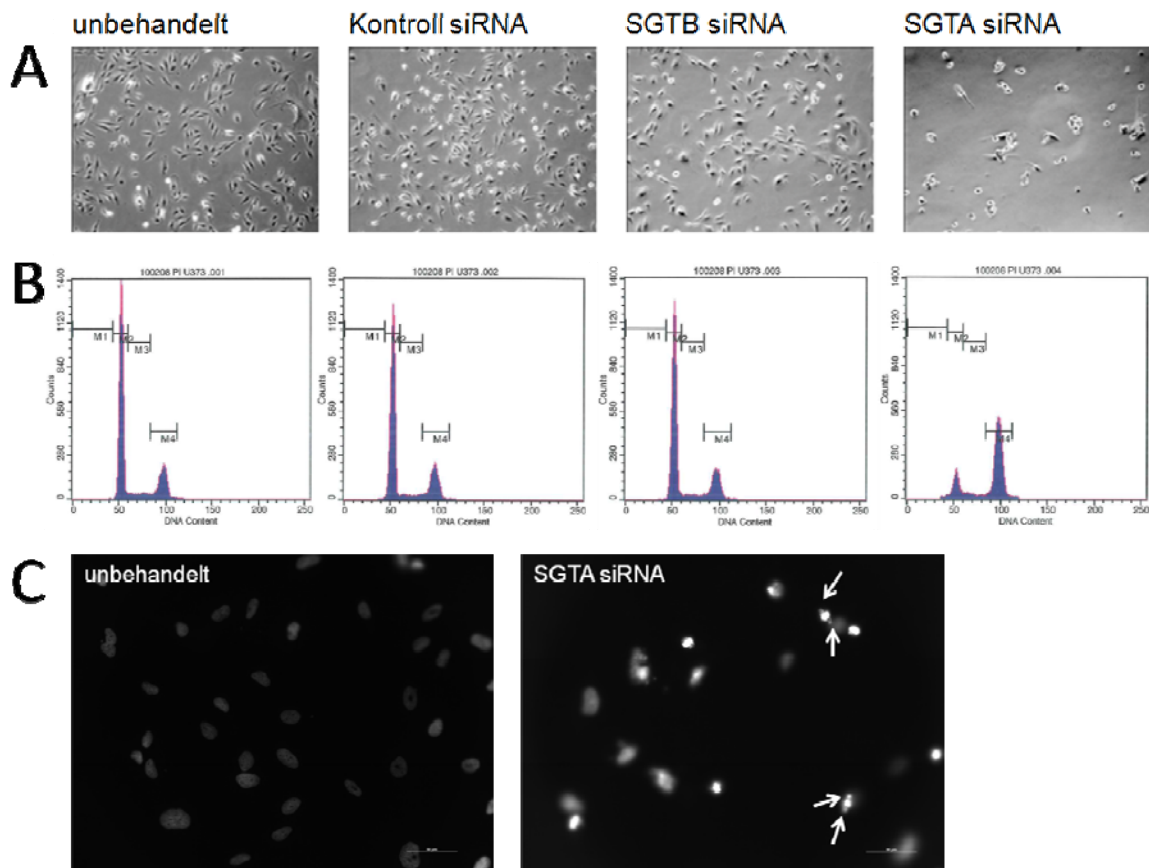


Abb. 4-7 Analyse von mit sgta- bzw. sgtb-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelten U373-Zellen. U373-Zellen wurden wie unter 3.2.2.6 beschrieben mit sgta- bzw. sgtb-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt. **A:** Lichtmikroskopische Analyse 48 h nach der Transfektion. **B:** FACS-Zellzyklusanalyse (siehe 3.2.2.13) 48 h nach Transfektion der siRNA. **C:** Fluoreszenzmikroskopische Analyse: U373-Zellen wurden auf unbeschichteten Deckgläschen immobilisiert (siehe 3.2.6.1) und am Folgetag mit sgta- bzw. sgtb-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt. 48 h nach der Transfektion wurden fluoreszenzmikroskopische Präparate der Zellen angefertigt (siehe 3.2.6.2), die mit dem DNA-bindenden Farbstoff Hoechst-33342 gefärbt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert wurden. Die Pfeile weisen auf misslokalisierte Chromosomen an den Spindelpolen.

Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass die Anwesenheit von SGTB offensichtlich nicht notwendig für das Überleben von HeLaH2A-, NCH82- und U373-Zellen ist. Außerdem ist endogenes SGTB offenbar nicht in der Lage, SGTA funktionell zu ersetzen, denn bei siRNA-vermittelter Reduktion von SGTA in den SGTB-exprimierenden U373-Zellen wurde der typische SGTA-Depletions-Phänotyp beobachtet, der durch eine Arretierung der Zellen in der Mitose und nachfolgenden Zelltod gekennzeichnet ist.

4.1.3 Untersuchung der funktionellen Redundanz von SGTA und -B in U373-Zellen durch ein „Rescue-Experiment“

Humanes SGTA und SGTB weisen sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene eine große Ähnlichkeit auf: Die cDNA-Sequenz des SGTB-Gens stimmt zu 52 % mit der des SGTA-Gens überein; die Aminosäuresequenz des SGTB-Proteins ist zu 60 % mit der von SGTA identisch (Tobaben et al., 2003). Außerdem interagiert SGTB ebenso wie SGTA in neuronalen Zellen mit den Proteinen HSC70 und CSP α (Tobaben et al., 2003). Es besteht daher die Möglichkeit, dass SGTA und -B in der Zelle dieselbe Funktion ausüben, ein Sachverhalt, der als „funktionelle Redundanz“ bezeichnet wird. Zwar spricht die unter 4.1.2.3 beschriebene Beobachtung, dass eine Verringerung der SGTA-Proteinmenge in U373-Zellen trotz Anwesenheit von SGTB zum SGTA-Depletions-Phänotyp führt, gegen die Annahme, das endogene SGTB SGTA funktionell ersetzen kann. Es ist jedoch möglich, dass bei dem oben genannten Experiment die Menge an endogenem SGTB nicht ausreichend war, um den SGTA-Depletions-Phänotyp zu verhindern. Um direkt zu untersuchen, ob SGTB in ausreichender Menge in der Lage ist, SGTA funktionell zu ersetzen, sollte ein sogenanntes „Rescue-Experiment“ durchgeführt werden: Dazu sollte eine U373-Zelllinie, die SGTB stabil überexprimiert, mit sgtA-spezifischer siRNA behandelt und 48 h später durch FACS-Zellzyklus- und Immunfluoreszenz-Analyse untersucht werden. Als positive Kontrolle für einen „Rescue“ des SGTA-Depletions-Phänotyps sollte eine U373-Zelllinie mit sgtA-siRNA behandelt werden, die ein SGTA-Protein stabil überexprimiert, das dieselbe Aminosäuresequenz wie endogenes hSGTA aufweist, dessen mRNA jedoch aufgrund von einigen Nukleotidaustauschen in der SGTA-cDNA nicht von der sgtA-spezifischen siRNA erkannt wird. Trotz des Einsatzes von sgtA-spezifischer siRNA müsste in dieser Zelllinie daher genügend SGTA-Protein vorhanden sein, um den SGTA-Depletions-Phänotyp zu verhindern.

4.1.3.1 Klonierung des Plasmids pXhSGTA

Zur Klonierung des hSGTA-Expressionsplasmids pXhSGTA wurde die hSGTA-cDNA-Sequenz, die die gesamte kodierende Region von humanem SGTA umfasst (942 nt), mithilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI aus dem Plasmid

pET16NNkristSGTA ausgeschnitten und mit dem EcoRI / XhoI-geschnittenen Vektor pXFLAGhSGTA (Winnefeld et al., 2006) ligiert (siehe **Abb. 4-8**).

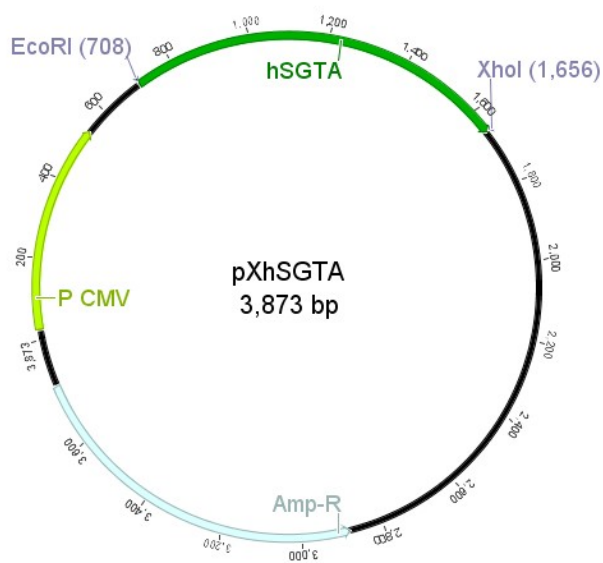


Abb. 4-8 Physikalische Karte von pXhSGTA. Das Plasmid besitzt einen CMV-Promotor (P CMV) und kodiert für das humane SGTA-Protein (hSGTA) und β -Lactamase (Amp-R), die Ampicillin-Resistenz verleiht.

4.1.3.2 Herstellung des Plasmids pXmuthSGTA

Um das Plasmid pXmuthSGTA herzustellen, das für ein SGTA-Protein („muthSGTA“) kodiert, dessen mRNA nicht von der sgTA-spezifischen siRNA erkannt wird, wurden wie unter 3.2.4.13 beschrieben 6 Nukleotidaustausche in die im hSGTA-Expressionsplasmid pXhSGTA enthaltene hsgtA-cDNA eingeführt. Wie **Abb. 4-9 A** zeigt, wurden die Nukleotide so ausgetauscht, dass Codons entstanden, die für dieselbe Aminosäure kodieren wie das ursprüngliche Codon. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, dass keine extrem seltenen Codons (nach *Weizman Institute of Science*) für pXmuthSGTA verwendet wurden (siehe **Abb. 4-9 B**).

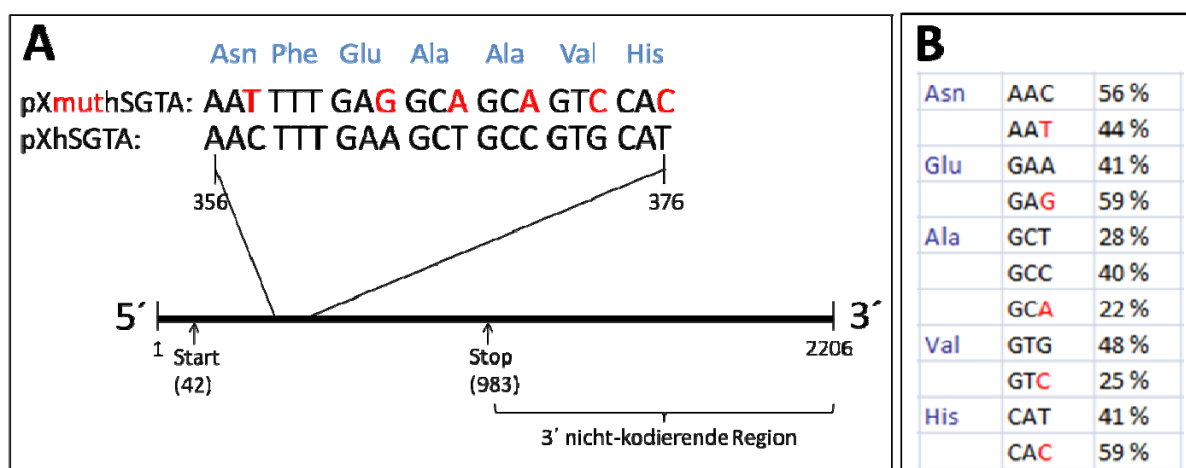


Abb. 4-9 Art und Position der Nukleotidaustausche in der hsgtA-cDNA zur Herstellung des Plasmids pXmuthSGTA und relative Häufigkeit der Codon-Verwendung für die jeweilige Aminosäure. **A:** Schematische Darstellung der cDNA des vollständigen hsgtA-Transkriptes. Die ausgetauschten Nukleotide sind rot markiert; die sich für übereinstimmende Nukleotid-Triplets ergebende Aminosäure ist jeweils oberhalb in blauer Farbe angegeben. **B:** Relative Häufigkeit der Codon-Verwendung für die jeweilige Aminosäure in humanen kodierenden Regionen (nach *Weizman Institute of Science*).

4.1.3.3 Western Blot-Analyse der Überexpression von hSGTA und muthSGTA in HeLaH2A-Zellen bei Einsatz von sgtA-spezifischer siRNA

Um das Ausmaß der Überexpression von hSGTA und muthSGTA in humanen Zellen zu überprüfen und zu untersuchen, wie sich der Einsatz von sgtA-spezifischer siRNA auf die Überexpression dieser Proteine auswirkt, wurden HeLaH2A-Zellen mit jeweils 7,5 µg der Plasmide pXhSGTA bzw. pXmuthSGTA transfiziert und 24 h später mit sgtA-spezifischer siRNA behandelt („kd SGTA“). Nach weiteren 48 bzw. 72 h wurden die Zellen geerntet und zur Herstellung von Zellextrakt verwendet. Gleiche Mengen des Zellextraktes (10 µl), jeweils etwa 130.000 Zellen entsprechend, wurden auf ein Polyacrylamid-Minigel aufgetragen; die in den Extrakten enthaltenen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Im Immunblot wurden anschließend SGTA und Tubulin nachgewiesen.

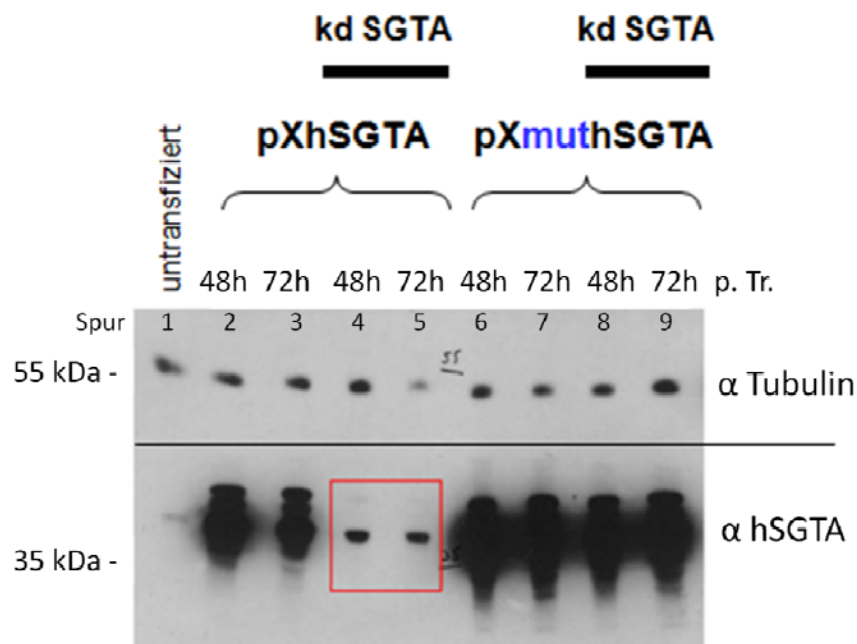


Abb. 4-10 Western Blot-Analyse der Überexpression von hSGTA und muthSGTA in HeLaH2A-Zellen bei Einsatz von sgtA-spezifischer siRNA. HeLaH2A-Zellen wurden mit jeweils 7,5 µg der Plasmide pXhSGTA bzw. pXmuthSGTA transfiziert (siehe 3.2.2.4) und 24 h später wie unter 3.2.2.6 beschrieben mit sgtA-spezifischer siRNA behandelt (kd SGTA). Nach weiteren 48 bzw. 72 h wurden die Zellen geerntet und zur Herstellung von Zellextrakt verwendet. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden Tubulin (als Ladekontrolle) und SGTA nachgewiesen.

Wie **Abb. 4-10** zeigt, führte die Transfektion von HeLaH2A-Zellen mit den Plasmiden pXhSGTA bzw. pXmuthSGTA jeweils zu einer starken Überexpression von hSGTA

(Spuren 2 und 3) bzw. von – im Western Blot nicht von hSGTA unterscheidbarem – muthSGTA (Spuren 6 bis 9). Bei Behandlung der transfizierten Zellen mit sgtA-spezifischer siRNA („kd SGTA“; Spuren 4, 5, 8 und 9) wurde die gesamte SGTA-Proteinmenge (endogenes und überexprimiertes SGTA) nur in den Zellen verringert, die mit pXhSGTA transfiziert worden waren (Spuren 4 und 5), jedoch nicht in den mit pXmuthSGTA transfizierten Zellen (Spuren 8 und 9), da hier nur die – im Vergleich zur der Menge an überexprimiertem muthSGTA – geringe Menge an endogenem SGTA verringert wurde. Durch eine FACS-basierte Zellzyklusanalyse von hSGTA- bzw. muthSGTA überexprimierenden HeLaH2A-Zellen wurde ausgeschlossen, dass die Überexpression dieser Proteine einen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung der Zellen hat (Köllner, nicht gezeigte Daten).

4.1.3.4 Klonierung der Plasmide pIRESneo3-muthSGTA und pIRESneo3-hSGTB

Um U373-Zelllinien zu etablieren, die SGTB bzw. muthSGTA stabil überexprimieren, wurden Plasmide benötigt, die für SGTB bzw. muthSGTA kodieren und ein Antibiotikum-Resistenzgen tragen. Die Selektion der Zelllinien sollte mit dem Antibiotikum Geneticin (G418) erfolgen, daher wurde als Ausgangspunkt für die Klonierung der oben genannten Expressionsplasmide der Vektor pIRESneo3 gewählt, der ein Neomycin-Resistenzgen besitzt welches durch die Kodierung einer Aminoglycosid-Phosphotransferase Resistenz gegen G418 verleiht.

Zur Klonierung von pIRESneo3-muthSGTA, das für die stabile Expression von muthSGTA verwendet werden sollte, wurden zunächst 2 Oligonukleotide („*Primer*“), A1 und A2, so ausgewählt, dass sie die cDNA-Sequenz 42 - 983 nt von humanem sgtA flankierten. Darüber hinaus enthielten die *Primer* Restriktionsschnittstellen: A1 eine *EcoRI*-Schnittstelle vor und A2 eine *NotI*-Schnittstelle nach der SGTA-kodierenden Sequenz. In einer „*Polymerase chain reaction*“ (PCR) mit den genannten Oligonukleotiden und dem Plasmid pXmuthSGTA als DNA-Vorlage (*Template*) wurde der gewünschte DNA-Abschnitt amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* endonukleolytisch geschnitten und mit dem ebenso geschnittenen Vektor pIRESneo3 ligiert (siehe **Abb. 4-11 A**). Das Plasmid wurde dann aus *E.coli*-SURE-Bakterien, die mit dem Ligationsprodukt transformiert worden waren, durch Plasmidmaxipräparation gewonnen. Die Klonierung von pIRESneo3-hSGTB erfolgte nach dem gleichen

Prinzip: Mit den Oligonukleotiden B1 und B2, die die gesamte codierende Sequenz von humanem *sgtB* flankierten und eine *EcoRI*-Schnittstelle (B1) bzw. eine *NotI*-Schnittstelle (B2) enthielten, und dem Plasmid pXNNSGTB als DNA-*Template* wurde eine PCR durchgeführt und das aufgereinigte, *EcoRI*- / *NotI*-geschnittene PCR-Produkt anschließend mit dem *EcoRI*- / *NotI*-geschnittenen Vektor pIRESneo3 ligiert (siehe **Abb. 4-11 B**). Die Korrektheit der Sequenz der Plasmide pIRESneo3-muthSGTA und pIRESneo3-hSGTB wurde durch Sequenzierung überprüft.

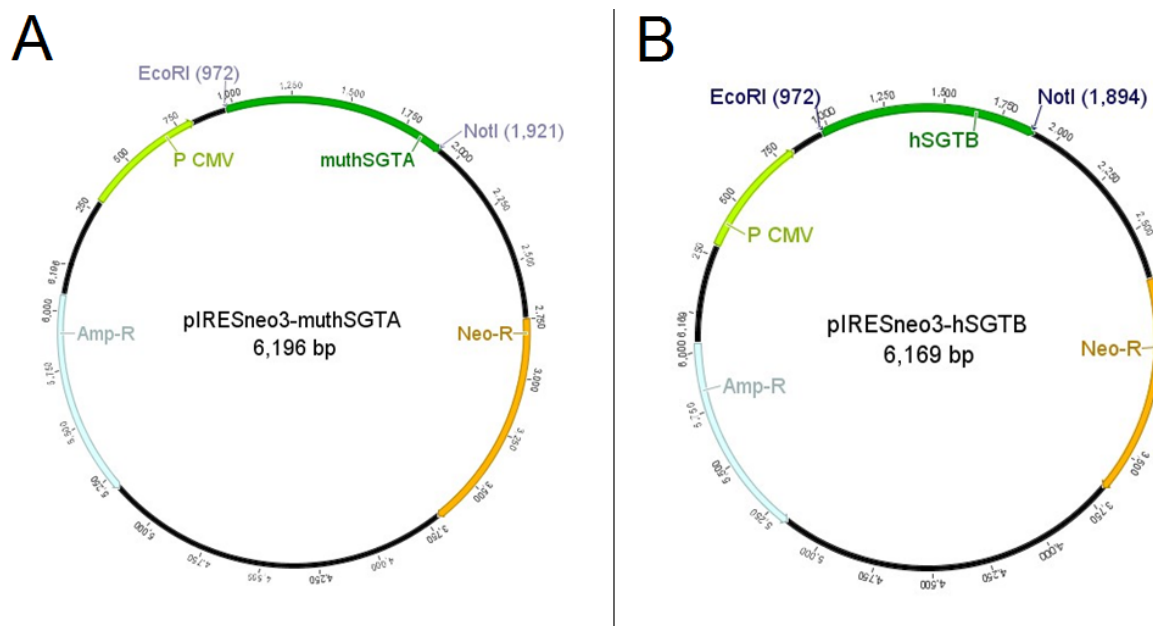


Abb. 4-11 Physikalische Karten von pIRESneo3-muthSGTA (A) und pIRESneo3-hSGTB (B). Die Plasmide besitzen einen CMV-Promotor (P CMV) und kodieren für Aminoglycosid-Phosphotransferase (Neo-R), die Resistenz gegen G418 (Geneticin) verleiht, und β -Lactamase (Amp-R), welche Ampicillin-Resistenz verleiht. pIRESneo3-muthSGTA kodiert außerdem für ein mutiertes humanes SGTA-Protein (muthSGTA), während pIRESneo3-hSGTB für das humane SGTB-Protein (hSGTB) kodiert.

4.1.3.5 Etablierung von U373-Zelllinien, die muthSGTA bzw. hSGTB stabil überexprimieren

Durch die Transfektion von U373-Zellen mit den Plasmiden pIRESneo3-muthSGTA bzw. pIRESneo3-hSGTB und G418-Selektion wurden wie unter 3.2.2.7 beschrieben die stabilen Zelllinien U373-A bzw. U373-B etabliert. Außerdem wurden U373-Zellen mit dem „leeren“ G418-Resistenzvektor pIRESneo3 transfiziert, um die Kontroll-Zelllinie U373-pIRES zu etablieren.

Um zu überprüfen, ob die durch G418-Selektion erhaltenen Zelllinien tatsächlich die transfizierten Plasmide in ihrem Genom enthalten, wurde die genomische DNA der verschiedenen U373-Zelllinien (U373, U373-A, U373-B, U373-pIRES) wie unter

3.2.4.2 beschrieben gewonnen und als *Template* in PCR-Reaktionen (siehe 3.2.4.11) mit unterschiedlichen *Primer*-Paaren eingesetzt. *Primer*-Paar NCBI neo1 / 2 (in **Abb. 4-12 A** mit „N“ abgekürzt) diente zum Nachweis des Neomycin-Resistenzgens; mit den *Primer*-Paaren NCBI A1 / 2 („A“) bzw. NCBI B1 / 2 („B“) konnte die sgtA- bzw. die sgtB-cDNA nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle für die jeweiligen *Primer*-Paare wurden PCR-Reaktionen durchgeführt, bei denen die Plasmide pIRESneo3-muthSGTA, pIRESneo3-hSGTB bzw. pIRESneo3 als *Template* eingesetzt wurden. Die Produkte der PCR-Reaktionen wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

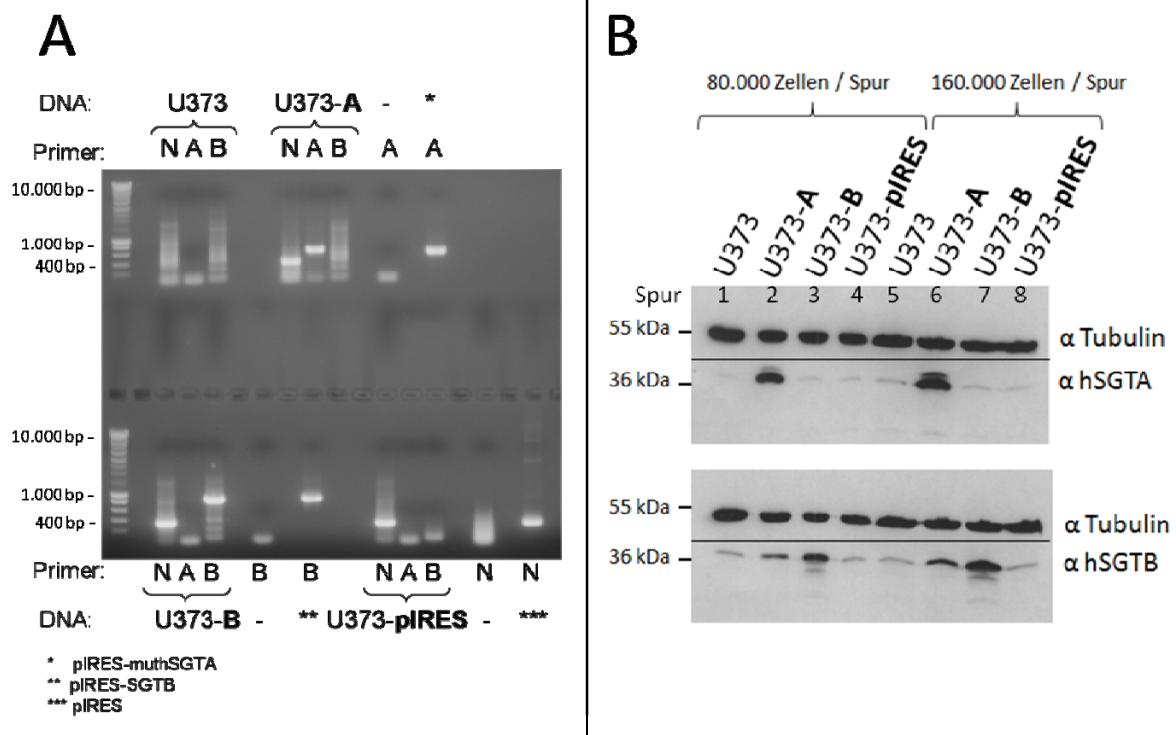


Abb. 4-12 Analyse der stabilen U373-Zelllinien. **A:** Gelelektrophoretische Analyse der PCRs zur Überprüfung der stabilen U373-Zelllinien: Die genomische DNA der verschiedenen U373-Zelllinien (U373, U373-A, U373-B, U373-pIRES) wurde wie unter 3.2.4.2 beschrieben gewonnen und als *Template* in PCR-Reaktionen (siehe 3.2.4.11) mit unterschiedlichen *Primer*-Paaren eingesetzt. *Primer*-Paar „N“ diente zum Nachweis des Neomycin-Resistenzgens; mit den *Primer*-Paaren „A“ bzw. „B“ konnte die sgtA- bzw. die sgtB-cDNA nachgewiesen werden. Die Produkte der PCR-Reaktionen wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte wurde der DNA-Größenstandard „Smart-Ladder“ im selben Gel aufgetrennt. **B:** Western Blot-Analyse: Extrakte der verschiedenen U373-Zelllinien (s.o.) wurden wie unter 3.2.2.10 beschrieben hergestellt und jeweils 6 bzw. 12 µl davon (entspricht 80.000 bzw. 160.000 Zellen) auf ein Polyacrylamid-Minigel aufgetragen. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden Tubulin (als Ladekontrolle) sowie SGTA und SGTB nachgewiesen.

Wie **Abb. 4-12 A** zeigt, konnte durch PCR im Genom der Zelllinien U373-A, U373-B und U373-pIRES das Neomycin-Resistenzgen nachgewiesen werden. Im Genom der

U373-A- und der U373-B-Zellen ließ sich zusätzlich die *sgtA*-cDNA bzw. die *sgtB*-cDNA nachweisen. Beim Einsatz von genomischer DNA der Ausgangszelllinie U373 hingegen waren die PCR-Reaktionen mit allen 3 *Primer*-Paaren negativ, d.h. es entstand kein PCR-Produkt da keine DNA-Sequenzen vorhanden waren, mit denen die *Primer* hybridisieren konnten.

Um die U373-Zelllinien U373-A und U373-B auf ihre Überexpression der Proteine (mut)hSGTA bzw. SGTB zu überprüfen, wurden Extrakte der verschiedenen U373-Zelllinien (s.o.) wie unter 3.2.2.10 beschrieben hergestellt und die in den Proben enthaltenen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden Tubulin sowie SGTA und SGTB nachgewiesen. Wie in **Abb. 4-12 B** zu sehen ist, überexprimiert die Zelllinie U373-A (mut)hSGTA (Spuren 2 und 6; oben), während U373-B-Zellen Überexpression von hSGTB zeigen (Spuren 3 und 7; unten)

4.1.3.6 „Rescue-Experiment“: Einsatz von Kontroll-siRNA und *sgtA*-spezifischer siRNA in stabilen U373-Zelllinien

In einem „Rescue-Experiment“ wurde untersucht, ob durch die Überexpression von SGTB in den U373-B Zellen der SGTA-Depletions-Phänotyp, der bei Verringerung der SGTA-Proteinmenge durch den Einsatz von *sgtA*-spezifischer siRNA in humanen Kulturzellen auftritt (siehe 4.1.2), verhindert bzw. abgemildert werden kann. Dazu wurden die stabilen U373-Zelllinien U373-pIRES, -A und -B mit *sgtA*-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt und 48 h später einer FACS-Zellzyklusanalyse unterzogen bzw. immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert.

4.1.3.6.1 FACS-Zellzyklusanalyse

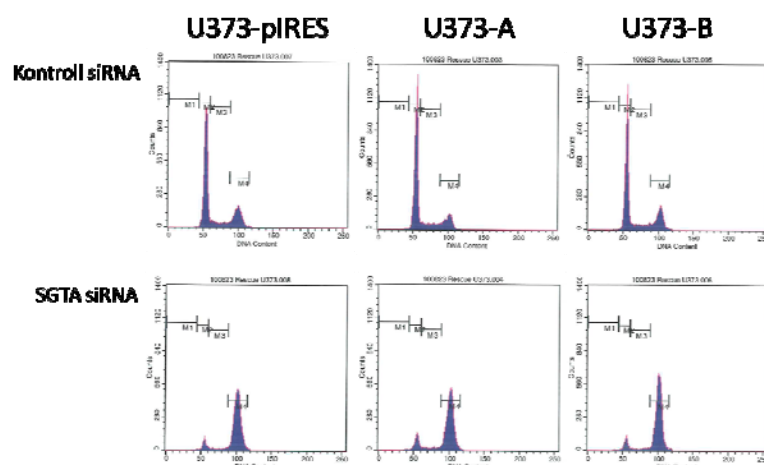


Abb. 4-13 FACS-Zellzyklusanalyse von mit *sgtA*-siRNA oder Kontroll-siRNA behandelten U373-Zelllinien. Die U373-Zelllinien U373-pIRES, U373-A und U373-B wurden wie unter 3.2.2.6 beschrieben mit Kontroll-siRNA (obere Reihe) oder *sgtA*-spezifischer siRNA behandelt und 48 h später einer FACS-Zellzyklusanalyse (siehe 3.2.2.13) unterzogen.

Wie **Abb. 4-13** zeigt, führte die Transfektion von sgtA-spezifischer siRNA sowohl bei den U373-pIRES-Kontrollzellen als auch bei den muthSGTA- bzw. hSGTB-überexprimierenden U373-Zellen zu einer Arretierung in der G₂/M-Phase des Zellzyklus. Sowohl SGTB als auch muthSGTA sind daher offensichtlich nicht in der Lage, die Funktion von endogenem SGTA zu übernehmen.

4.1.3.6.2 Immunfluoreszenz-Analyse

Durch die FACS-Analyse (s.o.) konnte lediglich festgestellt werden, dass die mit sgtA-spezifischer siRNA-behandelten Zellen in der G₂/M-Phase arretieren; der SGTA-Depletions-Phänotyp ist jedoch durch Arretierung in der Mitose gekennzeichnet. Daher sollte durch eine Immunfluoreszenz-Analyse mit anti- α -Tubulin- und anti-Phospho-Histon-H3-Antikörpern geklärt werden, ob (1) U373-A- und U373-pIRES-Zellen bei Verringerung der (endogenen) SGTA-Menge tatsächlich den gleichen Phänotyp aufweisen und ob (2) dieser Phänotyp dem SGTA-Depletions-Phänotyp entspricht. Durch die Immunlokalisation des in Mikrotubuli enthaltenen Proteins α -Tubulin können mitotische Spindeln sichtbar gemacht werden, während der Nachweis von mitotischen Chromosomen in einer Immunfluoreszenzanalyse durch die Verwendung eines anti-Phospho-Histon-H3-Antikörpers gelingt, da Histon H3 nur in mitotischen Chromosomen phosphoryliert vorliegt.

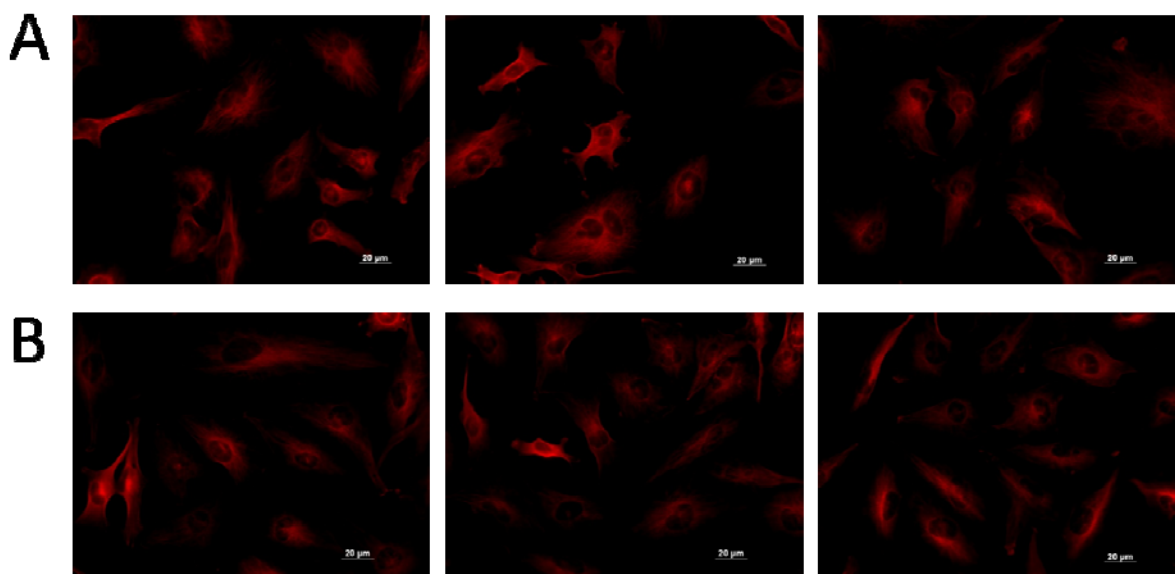


Abb. 4-14 Immunlokalisation von α -Tubulin in U373-pIRES-Zellen (A) und U373-A-Zellen (B) nach Behandlung mit Kontroll-siRNA. U373-pIRES- und U373-A-Zellen wurden wie unter 3.2.2.6 beschrieben mit Kontroll-siRNA transfiziert und 48 h nach der Transfektion fixiert.

Abb. 4-14 zeigt die Immunlokalisation von α -Tubulin in U373-pIRES-Zellen (**A**) und U373-A-Zellen (**B**) nach Behandlung mit Kontroll-siRNA. Wie man sieht befanden sich die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen fast ausschließlich in der Interphase, da keine mitotischen Spindeln zu sehen sind. Außerdem ist bei der Verwendung des anti-Phospho-Histon-H3-Antikörpers kein Signal erkennbar (Köllner, nicht gezeigte Daten), da Histon H3 in der Interphase unphosphoryliert vorliegt.

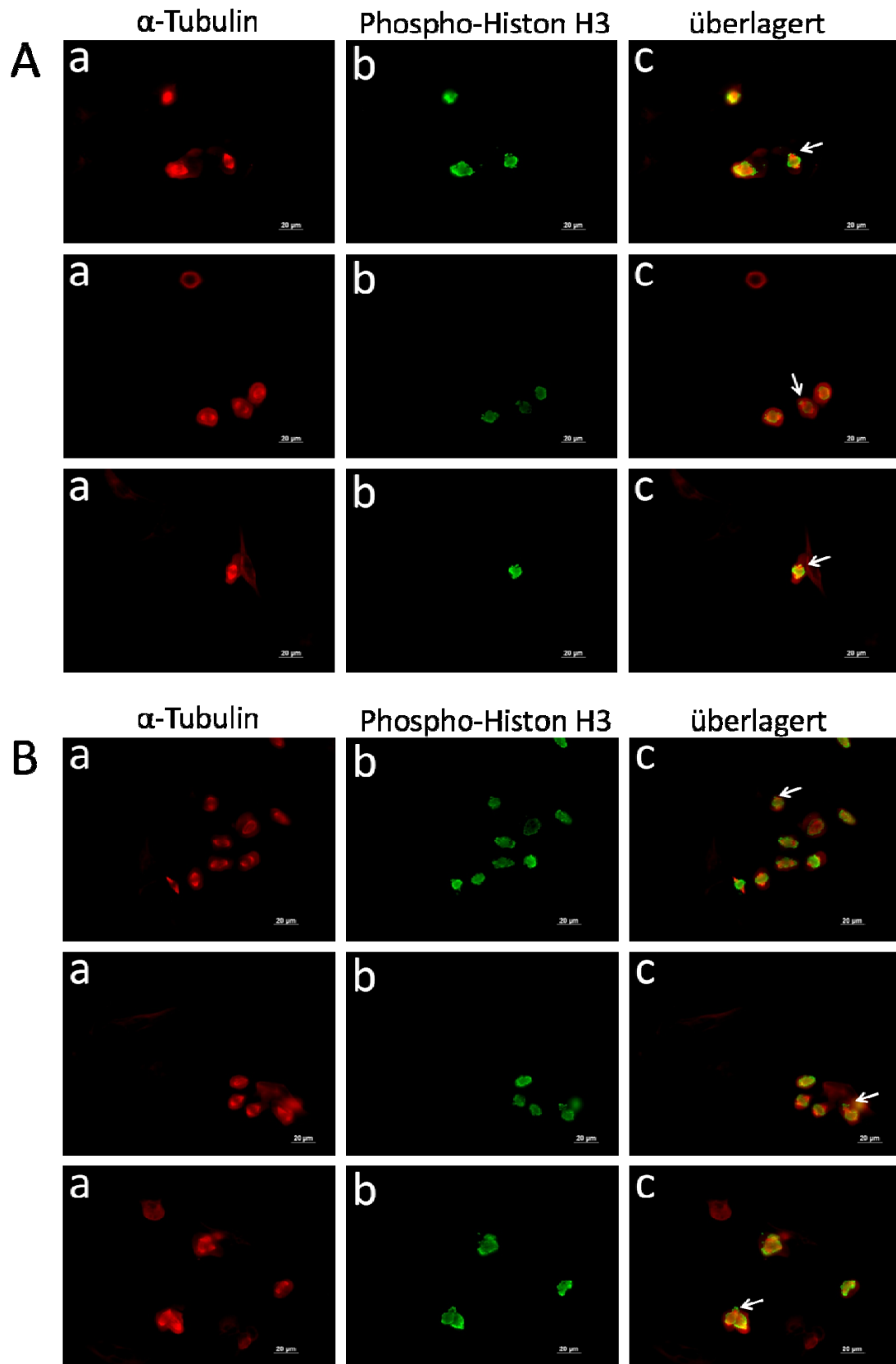


Abb. 4-15 Immunlokalisation von α -Tubulin und Phospho-Histon H3 in U373-pIRES-Zellen (A) und U373-A-Zellen (B) nach Behandlung mit sgtA-spezifischer siRNA. U373-pIRES- und U373-A-Zellen wurden wie unter 3.2.2.6 beschrieben mit sgtA-spezifischer siRNA transfiziert und 48 h nach der Transfektion fixiert. **a:** Immunlokalisation von α -Tubulin. **b:** Immunlokalisation von Phospho-Histon H3. **c:** Überlagerung der Einzelfluoreszenzaufnahmen von α -Tubulin und Phospho-Histon H3; die Pfeile weisen auf misslokalisierte Chromosomen an den Spindelpolen.

Wie **Abb. 4-15** zeigt, arretierten die mit sgtA-spezifischer siRNA behandelten Zellen in überwiegender Zahl in der Prometaphase der Mitose: Es sind mitotische Spindeln erkennbar sowie Chromosomen, die in der Metaphaseplatte angeordnet sind; außerdem können misslokalisierte Chromosomen an den Spindelpolen beobachtet werden (in **Abb. 4-15** durch Pfeile gekennzeichnet). Sowohl die Kontroll-Zellen (U373-pIRES, **Abb. 4-15 A**) als auch die muthSGTA-überexprimierenden Zellen (U373-A, **Abb. 4-15 B**) zeigten diesen für die Verringerung von SGTA charakteristischen Phänotyp; das überexprimierte muthSGTA ist also offenbar nicht in der Lage, die Funktion von endogenem SGTA zu übernehmen.

4.1.4 Funktionelle Analyse und Vergleich von SGTA und –B wildtyp und *doppelknockout mouse embryonic fibroblasts* (MEFs)

Für ein besseres Verständnis der Funktion von SGTA und –B und zur Untersuchung des (möglichen) Beitrages von SGTA zur Parvovirus-Infektion sollten in verschiedenen Experimenten die Eigenschaften von *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) von SGTA und –B *doppelknockout* Mäusen analysiert und mit denen von wildtyp MEFs verglichen werden. Um die für diese Untersuchungen benötigten MEFs zu gewinnen, wurden für SGTA und –B heterozygote Mäuse verpaart und aus den Embryonen primäre (wildtyp bzw. SGTA und –B *doppelknockout*) MEFs präpariert (siehe 3.2.2.2). Die heterozygoten Mäuse stammten aus vorherigen Verpaarungen von weiblichen SGTA und –B *doppelknockout* (B6.129P2 SGTA^{tm1Mpin} SGTB^{tm1Mpin}) und männlichen wildtyp Mäusen, die wir von Dr. Bernd Stahl (IMT Marburg) erhalten hatten. Da die männlichen *doppelknockout* Mäuse offenbar nicht fortpflanzungsfähig waren, konnten *doppelknockout* Embryonen nur durch die Verpaarung von heterozygoten Mäusen gewonnen werden. Die aus individuellen Embryonen präparierten primären MEFs wurden mit den Bezeichnungen „wt6“ und „wt7“ (wildtyp) bzw. „dd3“, „dd6“ und „dd8“ (SGTA und –B *doppelknockout*) versehen. Außerdem wurden Mischungen („pools“) von Fibroblasten verschiedener Embryonen des gleichen Genotyps (wildtyp bzw. SGTA und –B *doppelknockout*) hergestellt und mit „+/+“ (für wildtyp) bzw. „dd“ (für *doppelknockout*) bezeichnet.

Zusätzlich zu den primären MEFs sollten auch immortalisierte 3T3MEFs (wildtyp bzw. SGTA und –B *doppelknockout*) analysiert werden. Diese wurden wie unter 3.2.2.3 beschrieben nach dem Protokoll von Todaro (Todaro und Green, 1963)

etabliert. Ein Vorteil von 3T3MEFs gegenüber primären MEFs für ihre Verwendung in der Forschung ist ihr unbegrenztes Wachstum, für das spontane Mutationen verantwortlich sind, die im Verlaufe des Etablierungsprozesses entstehen und meist direkt oder indirekt die Funktion des p53-Proteins beeinträchtigen (Harvey et al., 1991; Kamijo et al., 1997). Dieses unbegrenzte Wachstum der 3T3MEFs ermöglicht es, große Mengen an einheitlichen Zellen für Experimente zu verwenden und Ergebnisse zu reproduzieren. Darüber hinaus lassen sich 3T3MEFs leicht durch Expression des SV40-Large-T-Antigens transformieren (Pontén et al., 1971; Topp et al., 1980), was sie dazu befähigt, Kolonien in Softagar zu bilden (siehe 4.2.1). Insgesamt wurden sieben 3T3MEF-Zelllinien etabliert, drei wildtyp- („wt-pool“, „1wt“, „2wt“) und vier SGTA und –B *doppelknockout*- („dd-pool“, „5dd“, „6dd“, „7dd“) Zelllinien. Dabei stammen die mit Zahlen bezeichneten Linien von individuellen Embryonen ab, während die „pools“ eine Mischung von Fibroblasten verschiedener Embryonen des gleichen Genotyps (wildtyp bzw. SGTA und –B *doppelknockout*) darstellen. Man beachte, dass hier – im Unterschied zu der Bezeichnung der primären MEFs – jeweils die Zahl vor der Abkürzung für den Genotyp steht.

Primäre MEFs und 3T3MEFs von SGTA und –B *doppelknockout* bzw. wildtyp Mäusen sollten in Bezug auf ihre (1) Zellzyklusverteilung und Wachstumsrate, (2) Empfindlichkeit gegenüber Nocodazol, (3) Genexpression und (4) Parvovirus-Produktion untersucht und verglichen werden. In den folgenden Unterkapiteln (4.1.4.1 - 4.1.4.4) sind die zu diesem Zwecke durchgeführten Experimente im Einzelnen ausgeführt.

4.1.4.1 Untersuchung von Zellzyklusverteilung und Wachstumsrate

Durch eine FACS-Analyse sollte untersucht werden, ob es Unterschiede im Zellzyklus von SGTA und –B *doppelknockout* und wildtyp MEFs gibt. Dazu wurden 3T3MEFs und primäre MEFs von wildtyp und *doppelknockout* Mäusen in einer Dichte von 500.000 Zellen pro 10 cm-Schale ausgesät und 24 h später einer FACS-Zellzyklusanalyse (siehe 3.2.2.13) unterzogen.

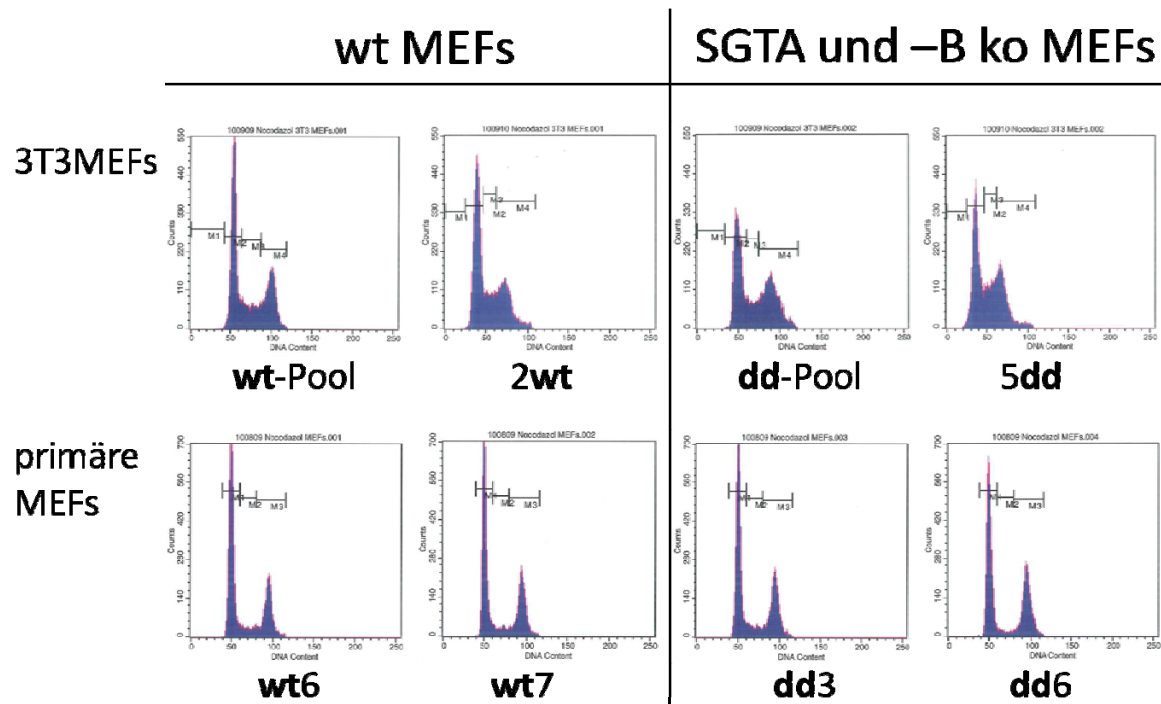


Abb. 4-16 FACS-Zellzyklusanalyse von wildtyp und SGTA und -B doppelknockout MEFs. Wildtyp und SGTA und -B doppelknockout MEFs (immortalisierte 3T3MEFs und primäre MEFs) wurden in einer Dichte von 500.000 Zellen pro 10 cm-Schale ausgesät und 24 h später einer FACS-Zellzyklusanalyse (siehe 3.2.2.13) unterzogen.

Wie in **Abb. 4-16** zu sehen ist, unterscheiden sich 3T3MEFs (obere Reihe) und primäre MEFs (untere Reihe) offensichtlich in ihrer Zellzyklusverteilung: Während primäre MEFs eine „normale“ Zellzyklusverteilung zeigten, wies ein ungewöhnlich hoher Anteil der 3T3MEFs einen für die S-Phase des Zellzyklus charakteristischen DNA-Gehalt auf. Durch eine Immunfluoreszenzanalyse von Hoechst-33342-gefärbten 3T3MEFs wurde untersucht, ob Binukleation für dieses Phänomen verantwortlich sein könnte; dies war jedoch nicht der Fall (Köllner, nicht gezeigte Daten). Beim Vergleich der Zellzyklusverteilung von wildtyp MEFs und SGTA und -B doppelknockout MEFs konnten sowohl bei den 3T3MEFs als auch bei den primären MEFs keine Unterschiede festgestellt werden (siehe **Abb. 4-16**).

Um die Wachstumsrate von wildtyp und SGTA und -B doppelknockout 3T3MEFs zu vergleichen wurden sie in einer Dichte von 500.000 Zellen pro 10 cm-Schale ausgesät. Nach 24, 48, 72 bzw. 96 h wurden die Zellen jeweils geerntet und die Zellzahl mit dem „CASY® Cell Counter + Analyser“ (siehe 3.2.2.9) bestimmt. Die Berechnung der Wachstumsrate der 3T3MEFs in definierten Zeitintervallen nach der Aussaat erfolgte durch Division der Zellzahl am Ende des Intervalls durch die

Zellzahl zu Beginn des jeweiligen Intervalls. Die in **Abb. 4-17** rot dargestellten Balken geben den Mittelwert der Wachstumsrate von drei verschiedenen wildtyp-3T3MEF-Zelllinien an; blaue Balken zeigen den Mittelwert der Wachstumsrate von drei verschiedenen *doppelknockout*-3T3MEF-Zelllinien.

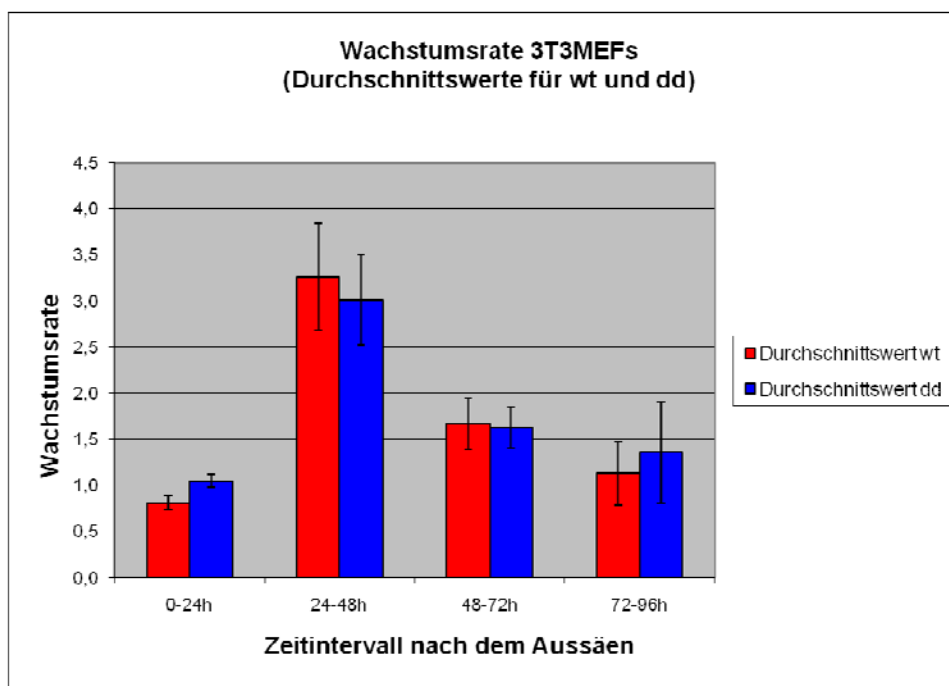


Abb. 4-17 Vergleich der Wachstumsrate von wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* 3T3MEFs. Wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* 3T3MEFs wurden in einer Dichte von 500.000 Zellen pro 10 cm-Schale ausgesät. Nach 24, 48, 72 bzw. 96 h wurden die Zellen jeweils geerntet und die Zellzahl mit dem „CASY® Cell Counter + Analyser“ (siehe 3.2.2.9) bestimmt. Die Wachstumsrate der 3T3MEFs in definierten Zeitintervallen wurde berechnet, indem die Zellzahl am Ende des Intervalls durch die Zellzahl zu Beginn des jeweiligen Intervalls dividiert wurde. Rote Balken zeigen den Mittelwert der Wachstumsrate von 3 verschiedenen wildtyp-3T3MEF-Zelllinien; blaue Balken geben den Mittelwert der Wachstumsrate von 3 verschiedenen *doppelknockout*-3T3MEF-Zelllinien an.

Wie **Abb. 4-17** zeigt, ergab der Vergleich der Wachstumsrate von wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* 3T3MEFs keine signifikanten Unterschiede. In dem Zeitintervall 24 – 48 h nach dem Aussäen wuchsen sowohl wildtyp als auch *doppelknockout* 3T3MEFs am schnellsten (Wachstumsrate von 3,3 +/- 0,6 bzw. 3,0 +/- 0,5); mit steigender Zelldichte verlangsamte sich das Wachstum der wildtyp und *doppelknockout* 3T3MEFs, so dass die Wachstumsrate 72 - 96 h nach dem Aussäen nur noch bei 1,1 +/- 0,3 (wildtyp) bzw. 1,4 +/- 0,5 (*doppelknockout*) lag.

4.1.4.2 Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber Nocodazol

Verschiedene Ergebnisse weisen darauf hin, dass SGTA eine direkte oder indirekte Funktion bei der Zellteilung ausübt: (1) Die experimentelle Verringerung der SGTA-Menge durch den Einsatz von sgtA-spezifischer siRNA führte in allen getesteten Tumorzelllinien (HeLa, NBE, NTN, MiaPaCa und Panc 2) zu einer Arretierung der Zellen in der Mitose aufgrund misslokalisierter Chromosomen an den Spindelpolen und nachfolgend zum Zelltod in dieser Phase des Zellzyklus (Winnefeld et al., 2004; Cziepluch, unveröffentlichte Ergebnisse). (2) SGTA weist ein Mitose-spezifisches Phosphorylierungsmuster auf (Winnefeld et al., 2004). (3) SGTA ist an Mitose-relevanten Strukturen lokalisiert: in der Prometa- und Metaphase an den Spindelpolen, in der Anaphase an der zentralen Spindel und in der Telophase und frühen G1-Phase im Mittelkörper (Winnefeld et al., 2004). Daher wäre es möglich, dass Zellen, denen SGTA (und –B) fehlt, empfindlicher auf Störungen im Ablauf der Zellteilung reagieren bzw. sich weniger gut von solchen Störungen erholen. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden primäre wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* MEFs wie unter 3.2.2.11 beschrieben mit Nocodazol behandelt, einer Chemikalie, die die Depolymerisierung von Mikrotubuli auslöst und dadurch eine Arretierung von Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus bewirkt. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit Nocodazol wurden die Zellen entweder direkt für die FACS-Zellzyklusanalyse geerntet (siehe 3.2.2.13) oder es wurde ein sogenannter „*Release*“ der Zellen durchgeführt (siehe 3.2.2.12), d.h. das Nocodazol-haltige Medium wurde entfernt und die Zellen nach mehrmaligem Spülen mit frischem Medium versetzt. Die so behandelten Zellen wurden dann 6 bzw. 48 h später geerntet und einer FACS-Zellzyklusanalyse unterzogen.

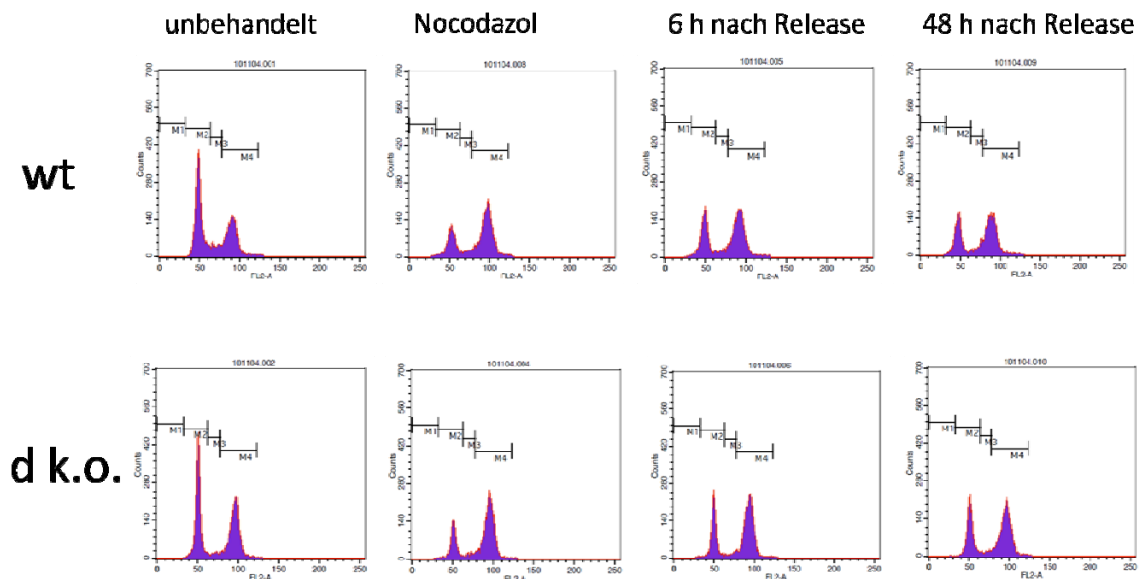


Abb. 4-18 FACS-Zellzyklusanalyse Nocodazol-behandelter wildtyp und SGTA und –B doppelknockout MEFs. Primäre wildtyp und SGTA und –B doppelknockout MEFs wurden in einer Dichte von 500.000 (wildtyp) bzw. 800.000 (doppelknockout) Zellen pro 10 cm-Schale ausgesät und 24 h später wie unter 3.2.2.11 beschrieben mit Nocodazol behandelt. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit Nocodazol wurden die Zellen entweder direkt für die FACS-Zellzyklusanalyse geerntet (siehe 3.2.2.13) oder es wurde ein „Release“ der Zellen durchgeführt (siehe 3.2.2.12). Die so behandelten Zellen wurden dann 6 bzw. 48 h später geerntet und einer FACS-Zellzyklusanalyse unterzogen.

Abb. 4-18 zeigt das Ergebnis dieser Zellzyklusanalyse. Die beiden mit der Überschrift „Nocodazol“ versehenen Abbildungen zeigen die Analyse der wildtyp (wt; oben) bzw. doppelknockout MEFs (d k.o.; unten), die direkt (also ohne „Release“) nach der 24-stündigen Inkubation mit Nocodazol für die FACS-Analyse geerntet worden waren; zum gleichen Zeitpunkt erfolgte auch die Ernte der unbehandelten MEFs. Wie in **Abb. 4-18** zu sehen ist, arretierten sowohl wildtyp als auch SGTA und –B doppelknockout MEFs bei Behandlung mit Nocodazol in der G₂/M-Phase des Zellzyklus. 6 bzw. 48 h nach der Entfernung des Nocodazols aus dem Zellkulturmedium befand sich ein Teil dieser arretierten Zellen wieder in der G₁-Phase, jedoch blieb der Gesamtanteil der Zellen in der G₁-Phase geringer und der der Zellen in der G₂/M-Phase höher als bei den unbehandelten Zellen, d.h. die durch die Nocodazol-Behandlung ausgelöste Arretierung konnte vermutlich nicht bei allen Zellen wieder aufgehoben werden. Vergleicht man wildtyp und SGTA und –B doppelknockout MEFs in dieser Hinsicht, so ist festzustellen, dass sie einen vergleichbar (in)effizienten „Release“ vom Nocodazol-induzierten G₂/M-Arrest zeigten. Dies wird auch durch **Abb. 4-19** deutlich, in der eine Zusammenfassung von drei unabhängig voneinander durchgeführten „Nocodazol-Experimenten“ mit wildtyp

und *doppelknockout* MEFs zu sehen ist. Es ist der prozentuale Anteil der (lebenden), unterschiedlich behandelten wildtyp und *doppelknockout* MEFs in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G_1 , S, G_2/M) angegeben. Bei Behandlung mit Nocodazol stieg der Anteil von in der G_2/M -Phase arretierten wildtyp und *doppelknockout* MEFs in vergleichbarem Maße und sank bei Entfernung des Nocodazols in ebenso vergleichbarem Größenumfang wieder leicht ab.

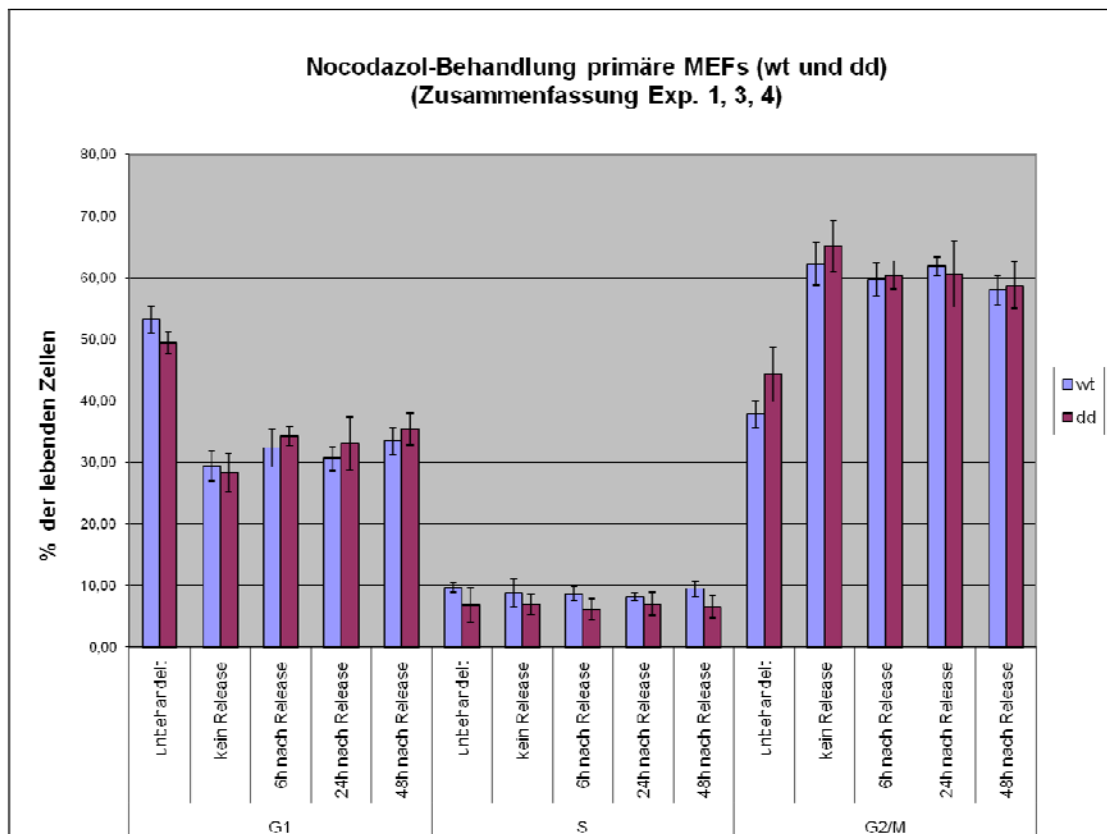


Abb. 4-19 Zusammenfassende Darstellung der FACS-Zellzyklusanalyse Nocodazol behandelter wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* MEFs. Primäre wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* MEFs wurden wie unter Abb. 4-18 beschrieben behandelt. Es ist der prozentuale Anteil der (lebenden), unterschiedlich behandelten wildtyp und *doppelknockout* MEFs in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G_1 , S, G_2/M) angegeben. Die Darstellung ist eine Zusammenfassung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.1.4.3 Untersuchung der Genexpression

4.1.4.3.1 Microarray

Um zu untersuchen, ob die Abwesenheit von SGTA und –B zu Unterschieden in der Genexpression führt, wurden wildtyp und *doppelknockout* 3T3MEF-Zelllinien in Zusammenarbeit mit der DKFZ Core Facility „Genomics and Proteomics“ in einem Microarray analysiert (siehe 3.2.4.17). Dafür wurde der BeadChip „Mouse Sentrix-6“

von Illumina verwendet, der die Analyse des Expressionslevels von 45.281 Maus-Transkripten, -Varianten und -*Expressed Sequence Tag (EST)*-Clustern ermöglicht. Auf jedem *Chip* sind sechs *Arrays* vorhanden, so dass sechs Proben untersucht werden können, in diesem Fall drei wildtyp („wt-pool“, „1wt“, „2wt“) und drei *doppelknockout* („dd-pool“, „6dd“, „7dd“) 3T3MEF-Zelllinien.

Die *Microarray*-Daten wurden mit der Software „*Genome Studio*“ von Illumina ausgewertet. In einer sogenannten *Scatter Blot*-Analyse wurde das durchschnittliche Expressions-Signal (AVG-Signal) für die einzelnen untersuchten Gene in den *doppelknockout* 3T3MEFs dem durchschnittlichen Expressions-Signal in den wildtyp 3T3MEFs gegenübergestellt, wodurch unterschiedlich exprimierte Gene leicht identifiziert werden können. Bei dieser Analyse wurden die *Microarray*-Daten für die Zelllinie „1wt“ nicht berücksichtigt, da sich herausgestellt hatte, dass diese Zelllinie für SGTB heterozygot und nicht wildtyp war.

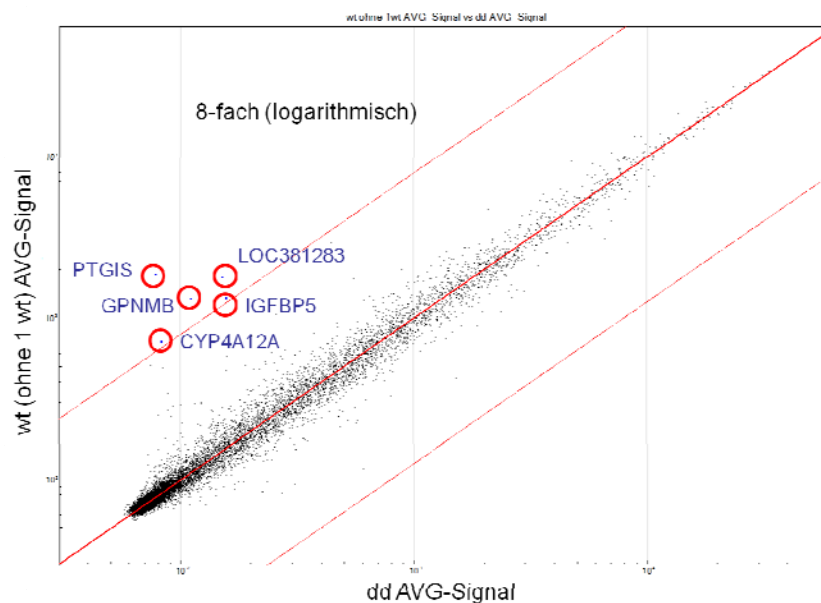


Abb. 4-20 *Scatter Blot*-Analyse eines *Microarrays* mit wildtyp und SGTB und –B *doppelknockout* 3T3MEFs: Darstellung der in wildtyp 3T3MEFs höher exprimierten Gene. Die Genexpression von zwei wildtyp und drei *doppelknockout* 3T3MEF-Zelllinien wurde in einem *Microarray* untersucht (siehe 3.2.4.17). Mithilfe der Software „*Genome Studio*“ von Illumina wurden in einer *Scatter Blot*-Analyse Gene identifiziert, die im *Microarray* eine mehr als 8-fach höhere Expression in wildtyp als in *doppelknockout* 3T3MEFs zeigten.

Wie **Abb. 4-20** zeigt, ergab die Analyse der *Microarray*-Daten für die Gene *kif1a* (hier: *loc381283*), *gpnmb*, *ptgis*, *igfbp5* und *cyp4a12a* eine mehr als 8-fach höhere Expression in wildtyp 3T3MEFs als in SGTB und –B *doppelknockout* 3T3MEFs. Die Gene *mmp9*, *cops8* und *loc386405* hingegen zeigten im *Microarray* eine 4-fach

höhere Expression in doppelknockout verglichen mit wildtyp 3T3MEFs (siehe **Abb. 4-21**).

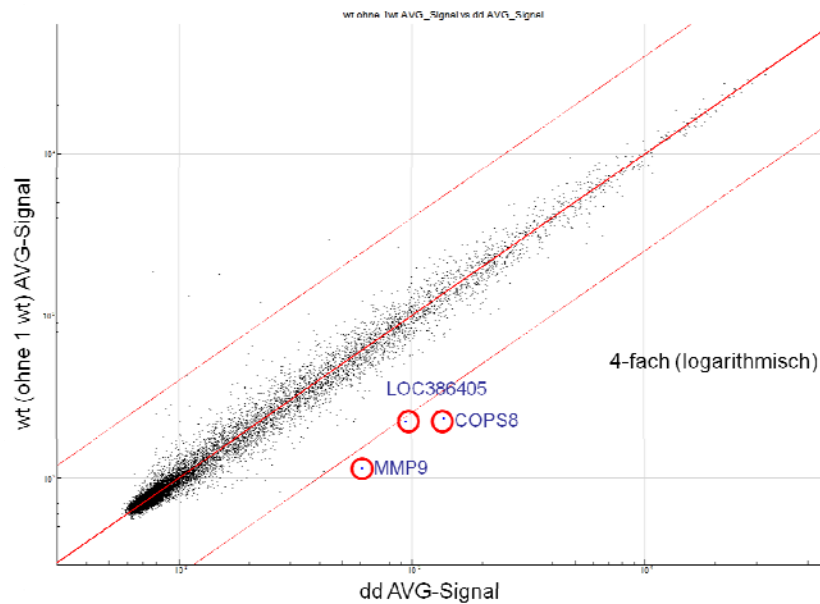


Abb. 4-21 Scatter Blot-Analyse eines Microarrays mit wildtyp und SGTA und –B doppelknockout 3T3MEFs: Darstellung der in doppelknockout 3T3MEFs höher exprimierten Gene. Die Genexpression von zwei wildtyp und drei doppelknockout 3T3MEF-Zelllinien wurde in einem Microarray untersucht (3.2.4.17). Mithilfe der Software „Genome Studio“ von Illumina wurden in einer Scatter Blot-Analyse Gene identifiziert, die im Microarray eine mehr als 4-fach höhere Expression in doppelknockout als in wildtyp 3T3MEFs zeigten.

4.1.4.3.2 qRT-PCR

Um die unter 4.1.4.3.1 beschriebenen Ergebnisse zu überprüfen, wurde die Expression der Gene mmp9, cops8, gpnmb und kif1a in einer quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR; siehe 3.2.4.12) untersucht, die in Zusammenarbeit mit PD Dr. Thomas Giese von der Universität Heidelberg durchgeführt wurde. Während ein Microarray aufgrund der vielen stattfindenden Amplifikationsschritte keine Aussagen über die absolute Menge an exprimierter mRNA ermöglicht, sondern nur eine Tendenz des Expressionsniveaus einzelner Gene wiedergibt, ist die qRT-PCR eine sehr viel sensitivere Methode und damit auch genauer. Zusätzlich zu ihrer Expression in den sechs 3T3MEF-Zelllinien (siehe 4.1.4.3.1) wurde die Expression der oben genannten Gene auch in primären wildtyp und doppelknockout MEFs sowie in Gewebeproben von für SGTA und –B heterozygoten bzw. doppelknockout Mäusen durch qRT-PCR analysiert.

			mu MMP9	mu COPS8	mu KIF1a	mu GPNMB
Probe 1	wt-pool (3T3MEFs)	wt (3T3)	21	1900	465	3204
Probe 2	1wt (3T3MEFs)		17	2100	53	2722
Probe 3	2wt (3T3MEFs)		13	1540	161	1546
Probe 4	dd-pool (3T3MEFs)	d ko (3T3)	272	2004	18	46
Probe 5	6dd (3T3MEFs)		47	1734	7	13
Probe 6	7dd (3T3MEFs)		57	1709	3	23
Probe 7	wt (primäre MEFs)	wt (primär)	5	1933	448	3705
Probe 8	dd (primäre MEFs)	d ko (primär)	7	1889	564	3589
Probe 9	Hirn (für SGTA und -B heterozygote Maus)	het	40	1976	8400	56
Probe 10	Muskel (für SGTA und -B heterozygote Maus)		10	576	3	14
Probe 11	Leber (für SGTA und -B heterozygote Maus)		20	936	1	3
Probe 12	Testis (für SGTA und -B heterozygote Maus)		123	22940	4892	164
Probe 13	Hirn (doppelknockout-Maus)	d ko	25	2052	7770	41
Probe 14	Muskel (doppelknockout-Maus)		8	422	0	10
Probe 15	Leber (doppelknockout-Maus)		10	1323	2	3
Probe 16	Testis (doppelknockout-Maus)		102	22122	3956	209

Abb. 4-22 qRT-PCR-Analyse der Expression von mmp9, cops8, kif1a und gpnmb in wildtyp und SGTA und –B doppelknockout MEFs und Mausgeweben. Mithilfe einer qRT-PCR wurde die Expression der Gene mmp9, cops8, kif1a und gpnmb in 3T3MEFs, primären MEFs und verschiedenen Mausgeweben untersucht. Die untersuchten primären MEFs und 3T3MEFs stammten von wildtyp und SGTA und –B doppelknockout Mäusen, während die Gewebe für SGTA und –B heterozygoten („het“) bzw. doppelknockout („d ko“) Mäusen entnommen worden waren.

Wie **Abb. 4-22** zeigt, bestätigte die qRT-PCR teilweise die Tendenz der *Microarray*-Ergebnisse: Das Expressionsniveau von mmp9 ist generell niedrig, in *doppelknockout* 3T3MEFs jedoch signifikant höher als in wildtyp 3T3MEFs, wohingegen kif1a und gpnmb in wildtyp 3T3MEFs signifikant höher exprimiert werden als in *doppelknockout* 3T3MEFs; für cops8 lassen sich – im Gegensatz zu dem Ergebnis des *Microarrays* – keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau zwischen wildtyp und *doppelknockout* MEFs feststellen. Die Expression aller vier untersuchten Gene in primären MEFs und Gewebeproben ist jedoch sehr ähnlich wenn ein Vergleich bezüglich des genetischen Hintergrunds „wildtyp“ („heterozygot“ bei den Gewebeproben) bzw. „*doppelknockout*“ angestellt wird. Das Expressionsniveau von mmp9, kif1a und gpnmb in primären wildtyp und *doppelknockout* MEFs ist sehr ähnlich und mit dem in wildtyp 3T3MEFs vergleichbar, so dass die höhere bzw. niedrigere Expression dieser Gene in den *doppelknockout* 3T3MEFs eine durch den Etablierungsprozess entstandene Veränderung darstellen

könnte. Zusammen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* MEFs gibt, die konsistent in primären und 3T3MEFs nachweisbar sind.

4.1.4.4 Untersuchung der Parvovirus-Produktion

SGTA ist ein zellulärer Interaktionspartner des Nichtstrukturproteins 1 (NS1) der autonomen Parvoviren (Cziepluch et al., 1998); in infizierten Zellen akkumuliert es zusammen mit NS1 in sogenannten „*autonomous parvovirus-associated replication (APAR)-bodies*“, subnukleären Strukturen, in denen die virale Replikation stattfindet (Cziepluch et al., 2000; Bashir et al., 2001). Die Rolle von SGTA im Lebenszyklus autonomer Parvoviren ist jedoch bislang unbekannt. Um zu untersuchen, ob SGTA und –B *doppelknockout* MEFs und wildtyp MEFs eine Parvovirus-Infektion unterschiedlich gut unterstützen, wurden primäre MEFs und immortalisierte 3T3MEFs von wildtyp und *doppelknockout* Mäusen mit dem Parvovirus MVM mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,1 infiziert. 24, 48 und 72 h nach der Infektion wurden die MEFs für Western und Southern Blot-Analyse geerntet. Außerdem wurde das Virus präpariert und für einen Plaque-Assay mit NBK-Zellen verwendet, um den Virustiter zu bestimmen. Zur Berechnung der relativen Virusvermehrung wurde der Quotient aus *Virus-Output* und *Virus-Input* gebildet.

4.1.4.4.1 Parvovirus Produktion in 3T3MEFs

Abb. 4-23 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Infektions-Experimenten mit wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* 3T3MEFs. Die relative Virusvermehrung war reproduzierbar für wildtyp 3T3MEFs bis zu 10-fach höher als für *doppelknockout* 3T3MEFs.

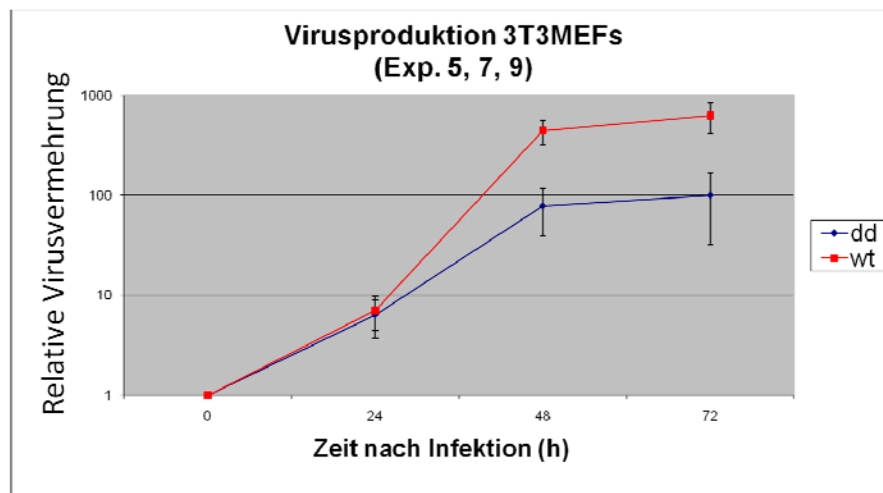


Abb. 4-23 Virusproduktion in 3T3MEFs. SGTA und –B wildtyp (wt) und *doppelknockout* (dd) 3T3MEFs wurden mit dem Parvovirus MVM mit einer MOI von 0,1 infiziert. 24, 48 und 72 h nach Infektion wurden die MEFs geerntet; das Virus wurde aus den Zellen präpariert und für einen Plaque-Assay mit NBK-Zellen verwendet, um den Virustiter zu bestimmen. Zur Berechnung der relativen Virusvermehrung wurde die Virus-Output-Konzentration durch die Virus-Input-Konzentration dividiert. Es ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Infektions-Experimenten mit wildtyp und *doppelknockout* 3T3MEFs dargestellt.

Die sich durch die Bestimmung der relativen Virusvermehrung ergebende Tendenz wurde auch durch die Western und Southern Blot-Analyse der infizierten 3T3MEFs bestätigt: Wie **Abb. 4-24 A** zeigt, war die im Western Blot nachweisbare Menge der viralen Proteine NS1 und VP in wildtyp 3T3MEFs (Spuren 4, 8 und 12) deutlich höher als in SGTA und –B *doppelknockout* 3T3MEFs (Spuren 2, 6 und 10); außerdem konnten in wildtyp 3T3MEFs mehr Virus-Genome (ssDNA) und replikative Virus-DNA-Formen (mRF, dRF) detektiert werden als in *doppelknockout* 3T3MEFs (siehe **Abb. 4-24 B**).

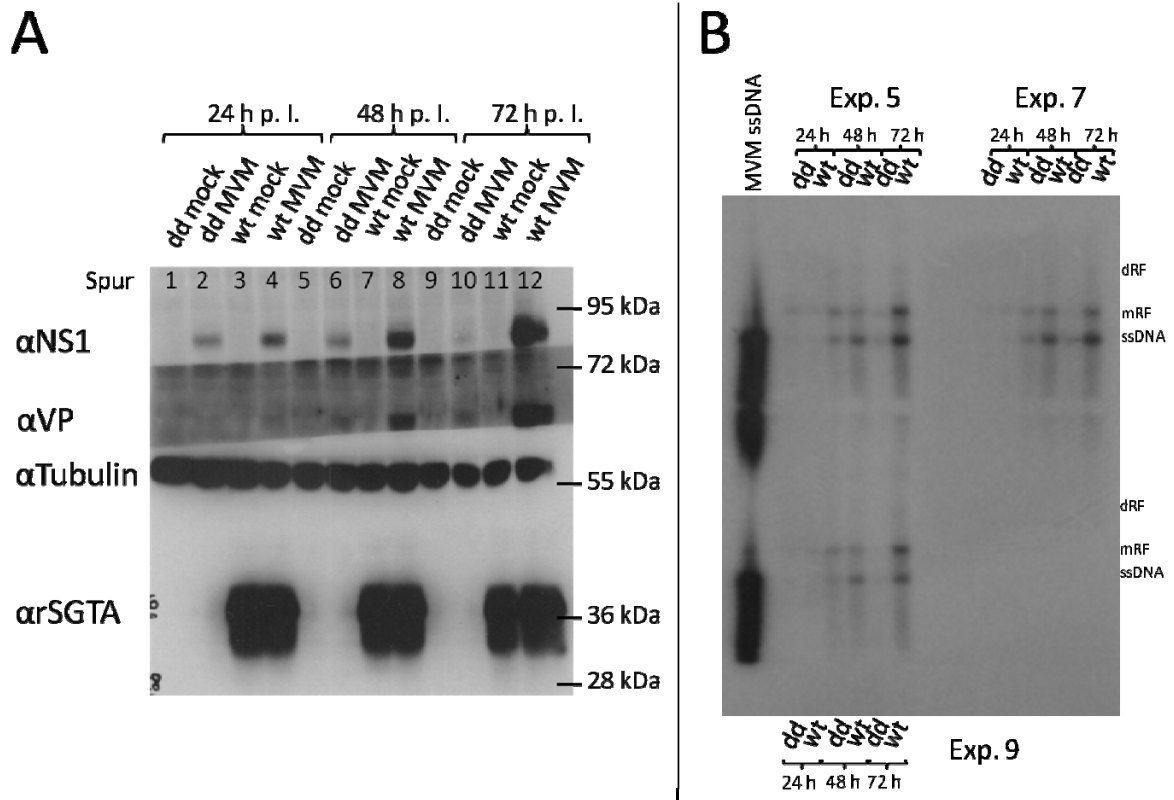


Abb. 4-24 Analyse der Parvovirus-Produktion in 3T3MEFs durch Western und Southern Blot. SGTA und -B wildtyp (wt) und *doppelknockout* (dd) 3T3MEFs wurden mit dem Parvovirus MVM mit einer MOI von 0,1 infiziert bzw. nicht infiziert („mock“). 24, 48 und 72 h nach Infektion wurden die MEFs geerntet. **A:** Western Blot-Analyse: Zellextrakt der infizierten und mock-infizierten MEFs wurde wie unter 3.2.2.10 beschrieben hergestellt und jeweils 30 μ l davon (entspricht 400.000 Zellen) auf ein großes Polyacrylamidgel aufgetragen; die in den Proben enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden die parvoviralen Proteine NS1 und VP sowie die zellulären Proteine Tubulin (als Ladekontrolle) und rSGTA nachgewiesen. **B:** Southern Blot-Analyse: Die virale DNA wurde wie unter 3.2.4.3 beschrieben aus den infizierten MEFs extrahiert, in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Southern Blot (siehe 3.2.4.15 und 3.2.4.16) analysiert. Als Größenmarker wurden 16 ng MVM *single-strand* DNA (ssDNA) auf das Agarosegel aufgetragen.

4.1.4.4.2 Parvovirus-Produktion in primären MEFs

Bei den primären wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* MEFs konnte kein Unterschied hinsichtlich der Parvovirus-Produktion festgestellt werden; die relative Virusvermehrung war bei wildtyp und *doppelknockout* MEFs sehr ähnlich (siehe **Abb. 4-25**).

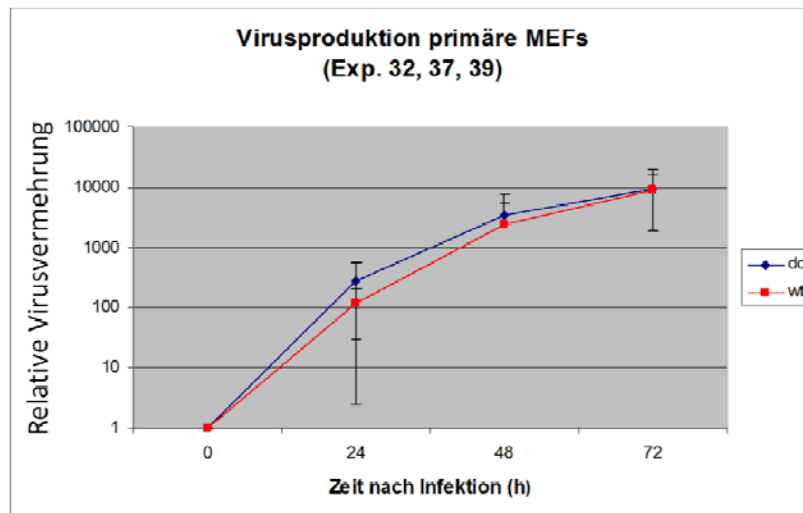


Abb. 4-25 Virusproduktion in primären MEFs. Primäre SGTA und –B wildtyp (wt) und *doppelknockout* (dd) MEFs wurden mit dem Parvovirus MVM mit einer MOI von 0,1 infiziert. 24, 48 und 72 h nach Infektion wurden die MEFs geerntet; das Virus wurde aus den Zellen präpariert und für einen Plaque-Assay mit NBK-Zellen verwendet, um den Virustiter zu bestimmen. Zur Berechnung der relativen Virusvermehrung wurde die Virus-Output-Konzentration durch die Virus-Input-Konzentration dividiert. Es ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Infektions-Experimenten mit primären wildtyp und *doppelknockout* MEFs dargestellt.

Wie in **Abb. 4-26 A** zu sehen ist, konnten im Western Blot vergleichbare Mengen der viralen Proteine NS1 und VP in primären wildtyp (Spuren 4, 8 und 12) und SGTA und –B *doppelknockout* MEFs (Spuren 2, 6 und 10) nachgewiesen werden, was mit dem in **Abb. 4-25** gezeigten Ergebnis der Virustiter-Bestimmung übereinstimmt. Bei der Analyse der primären wildtyp und *doppelknockout* MEFs durch Southern Blot (**Abb. 4-26 B**) ist erkennbar, dass es zwischen den einzelnen Präparationen der primären MEFs starke Schwankungen in der Virusproduktion gibt, sowohl bei wildtyp als auch bei *doppelknockout* MEFs. Da es sich hier um primäre Zellen handelt sind sie generell uneinheitlicher als 3T3MEFs, was sich bei den hier untersuchten primären MEFs jedoch nur bei der Untersuchung der Virusproduktion, nicht aber bei der Analyse anderer Eigenschaften (Wachstum, Zellzyklusverteilung, Empfindlichkeit gegenüber Nocodazol und Genexpression) zeigte.

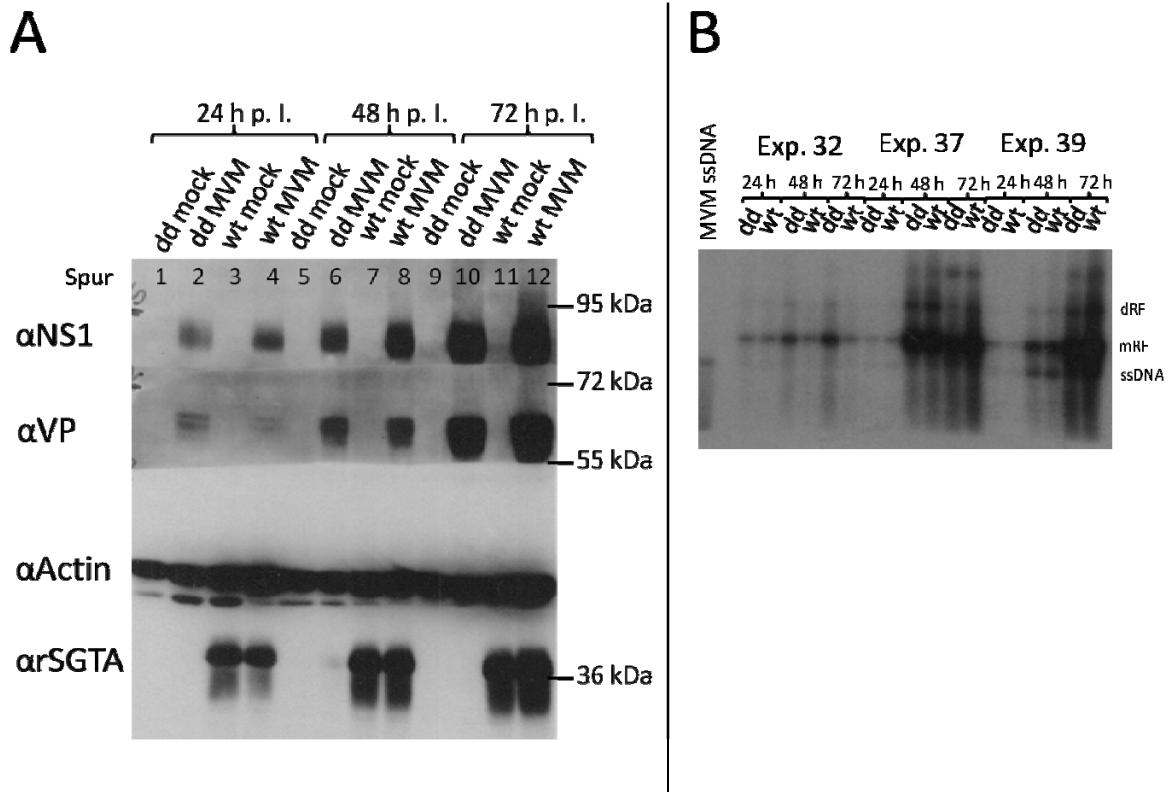


Abb. 4-26 Analyse der Parvovirus-Produktion in primären MEFs durch Western und Southern Blot. Primäre SGTA und -B wildtyp (wt) und *doppelknockout* (dd) MEFs wurden mit dem Parvovirus MVM mit einer MOI von 0,1 infiziert bzw. nicht infiziert („mock“). 24, 48 und 72 h nach Infektion wurden die MEFs geerntet. **A:** Western Blot-Analyse: Zellextrakt der infizierten und mock-infizierten MEFs wurde wie unter 3.2.2.10 beschrieben hergestellt und jeweils 30 µl davon (entspricht 400.000 Zellen) auf ein großes Polyacrylamidgel aufgetragen; die in den Proben enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden die parvoviralen Proteine NS1 und VP sowie die zellulären Proteine Tubulin (als Ladekontrolle) und rSGTA nachgewiesen. **B:** Southern Blot-Analyse: Die virale DNA wurde wie unter 3.2.4.3 beschrieben aus den infizierten MEFs extrahiert, in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Southern Blot (siehe 3.2.4.15 und 3.2.4.16) analysiert. Als Größenmarker wurden 16 ng MVM *single-strand* DNA (ssDNA) auf das Agarosegel aufgetragen.

4.1.4.4.3 Vergleich der Parvovirus-Produktion in 3T3MEFs und primären MEFs

Vergleicht man infizierte 3T3MEFs und primäre MEFs in Western- und Southern-Blot-Analyse, so fällt auf, dass in den primären MEFs offenbar eine stärkere Virusproduktion stattfindet als in den 3T3MEFs: Es sind in den primären MEFs sowohl größere Mengen der viralen Proteine NS1 und VP im Western Blot nachweisbar (**Abb. 4-27 A**) als auch mehr Virusgenome und replikative Virus-DNA-Formen im Southern Blot (**Abb. 4-27 B**) als in den 3T3MEFs. Diese Tendenz wird auch durch den Vergleich der relativen Virusvermehrung in 3T3MEFs und primären MEFs bestätigt (siehe **Abb. 4-23** und **Abb. 4-25**): die relative Virusvermehrung ist bei primären wildtyp MEFs nach 72 h etwa 10-fach höher als bei wildtyp 3T3MEFs.

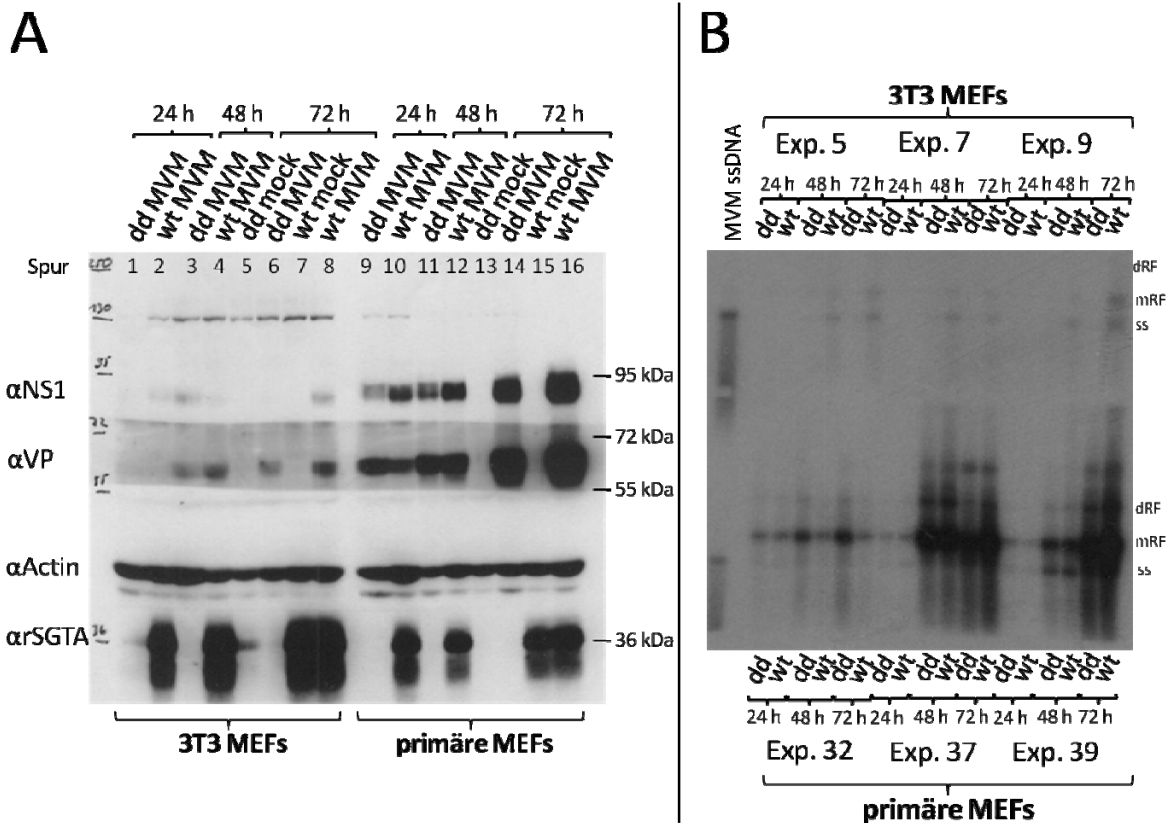


Abb. 4-27 Vergleichende Analyse der Parvovirus-Produktion in 3T3MEFs und primären MEFs durch Western und Southern Blot. 3T3MEFs und primäre MEFs von SGTA und -B wildtyp und *doppelknockout* Mäusen wurden mit dem Parvovirus MVM mit einer MOI von 0,1 infiziert bzw. nicht infiziert („mock“). 24, 48 und 72 h nach Infektion wurden die MEFs geerntet. **A:** Western Blot-Analyse: Zellextrakt der infizierten MEFs wurde wie unter 3.2.2.10 beschrieben hergestellt und jeweils 30 µl davon (entspricht 400.000 Zellen) auf ein großes Polyacrylamidgel aufgetragen; die in den Proben enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden die parvoviralen Proteine NS1 und VP sowie die zellulären Proteine Tubulin (als Ladekontrolle) und rSGTA nachgewiesen. **B:** Southern Blot-Analyse: Die virale DNA wurde wie unter 3.2.4.3 beschrieben aus den infizierten MEFs extrahiert, in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Southern Blot (siehe 3.2.4.15 und 3.2.4.16) analysiert. Als Größenmarker wurden 16 ng MVM *single-strand* DNA (ssDNA) auf das Agarosegel aufgetragen.

4.2 Schritte zur Validierung von SGTA als Zielmolekül für die Krebstherapie

4.2.1 Analyse des Wachstums von SV40-Large-T-Antigen-exprimierenden SGTA und –B wildtyp und *doppelknockout* 3T3MEFs in *Softagar*

Die siRNA-vermittelte Reduktion der SGTA-Menge führt in allen getesteten Tumorzelllinien (HeLa, NBE, NTN, MiaPaCa und Panc 2) zu einer Arretierung der Zellen in der Mitose und nachfolgend zum Zelltod in dieser Phase des Zellzyklus (Winnefeld et al., 2004; Cziepluch, unveröffentlichte Ergebnisse), wohingegen SGTA-*knockout*-Mäuse lebensfähig sind und – abgesehen von einer verminderten Fertilität bei männlichen Mäusen (Cziepluch, persönliche Kommunikation) – keinen abnormalen Phänotyp aufweisen. Dies legt die Vermutung nahe, dass der beobachtete, durch die Verringerung der SGTA-Menge hervorgerufene Zelltod in der Mitose spezifisch für Tumorzellen ist, und SGTA daher ein *synthetic lethal target* der Krebstherapie darstellen könnte (siehe Abschnitt 1.4). Die Reduzierung der SGTA-Menge hat misslokalisierte Chromosomen an den Spindelpolen zur Folge (Winnefeld et al., 2006); darüber hinaus lassen das Mitose-spezifische Phosphorylierungsmuster von SGTA und seine Lokalisation an Mitose-relevanten Strukturen vermuten, dass SGTA eine Funktion bei der Zellteilung erfüllt (Winnefeld et al., 2004). Da die Mitose in Tumorzellen aufgrund von tumorspezifischen, genetischen Veränderungen oft weniger stringent reguliert und daher fehleranfälliger ist als bei normalen, untransformierten Zellen (Kops et al., 2005) könnte es sein, dass sich teilende Tumorzellen für ihr Überleben „abhängiger“ von SGTA sind als normale Zellen. Um diese Hypothese zu überprüfen sollte getestet werden, ob Zellen, denen SGTA und –B fehlen, eine maligne Transformation weniger gut unterstützen als wildtyp-Zellen. Dafür sollte das Wachstum in *Softagar* von SGTA und –B wildtyp und *doppelknockout* 3T3MEFs, die das SV40 (Simian Virus 40)-Large-T-Antigen (SV40-LT-Ag) exprimieren, analysiert werden. Eine transiente Transfektion mit einem SV40-LT-Ag-Expressionsplasmid wurde nicht angestrebt, da die Transfektionseffizienz der 3T3MEFs sehr niedrig war und diese geringe Effizienz den *Softagar*-Assay undurchführbar gemacht hätte. Stattdessen wurde eine stabile Expression angestrebt. Durch seine Interaktion mit den zellulären Proteinen p53 und pRb kann das LT-Ag von SV40 die Transformation von Zellen bewirken (Mietz et al., 1992;

DeCaprio et al., 1988; Ali und DeCaprio, 2001); ein Kennzeichen transformierter Zellen ist ihre Fähigkeit zum Wachstum in *Softagar* (Montesano et al., 1977; San et al., 1979).

4.2.1.1 Herstellung des Plasmids pIRESHyg3-SV40-LT-Ag

Zur Etablierung von 3T3MEF-Zelllinien (wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout*), die das SV40-LT-Ag stabil exprimieren, wurde ein Plasmid benötigt, das für SV40-LT-Ag kodiert und ein Antibiotikum-Resistenzgen trägt, um eine Selektion zu ermöglichen. Die Selektion der Zelllinien sollte mit dem Antibiotikum Hygromycin B erfolgen, daher wurde als Ausgangspunkt für die Klonierung der Vektor pIRESHyg3 von Clontech gewählt, der ein Hygromycin-B-Resistenzgen besitzt, welches durch die Kodierung der Hygromycin-B-Phosphotransferase Resistenz gegen Hygromycin B verleiht. Das SV40-LT-Ag-kodierende Gen (2.163 bp) wurde durch die Firma MWG Eurofins synthetisiert und in das Plasmid pUC57 kloniert (=> pUC57-SV40-LT-Ag). Zur Klonierung von pIRESHyg3-SV40-LT-Ag, das für die stabile Expression von SV40-LT-Ag in 3T3MEFs verwendet werden sollte, wurden zunächst 2 *Primer*, Klon SV40 5 und Klon SV40 6, so ausgewählt, dass sie die kodierende Sequenz (2.163 nt) des SV40-LT-Ag-Gens flankierten. Darüber hinaus enthielten die *Primer* Restriktionsschnittstellen: Klon SV40 6 eine *AflII*-Schnittstelle vor und Klon SV40 5 eine *BsiWI*-Schnittstelle nach der SV40-LT-Ag-kodierenden Sequenz. In einer PCR mit den genannten *Primern* und dem Plasmid pUC57-SV40-LT-Ag als DNA-Vorlage wurde der gewünschte DNA-Abschnitt amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen *AflII* und *BsiWI* geschnitten und mit dem ebenso geschnittenen Vektor pIRESHyg3 ligiert (**Abb. 4-28**). Das Plasmid wurde dann aus *E.coli*-SURE-Bakterien, die mit dem Ligationsprodukt transformiert worden waren, durch Plasmidmaxipräparation gewonnen.

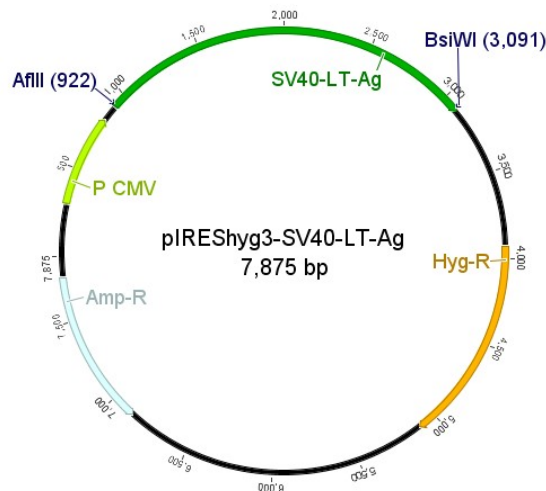


Abb. 4-28 Physikalische Karte von pIRESHyg3-SV40-LT-Ag. Das Plasmid besitzt einen CMV-Promotor (P CMV) und kodiert für das SV40-Large-T-Antigen (SV40-LT-Ag), Hygromycin-B-Phosphotransferase (Hyg-R), die Resistenz gegen Hygromycin B verleiht, und β -Lactamase (Amp-R), welche Ampicillin-Resistenz verleiht.

4.2.1.2 Etablierung von SGTA und –B wildtyp und *doppelknockout* 3T3MEF-Zelllinien, die das SV40-Large-T-Antigen stabil exprimieren

Durch die Transfektion von wildtyp bzw. SGTA und –B *doppelknockout* 3T3MEFs (Zelllinien 2wt bzw. 5dd) mit dem Plasmid pIRESHyg3-SV40-LT-Ag und Hygromycin-B-Selektion wurden wie unter 3.2.2.7 beschrieben die stabilen Zelllinien 2wt-SV40-LT-Ag bzw. 5dd-SV40-LT-Ag etabliert. Um die Kontroll-Zelllinien 2wt-pIRESHyg3 und 5dd-pIRESHyg3 zu etablieren, wurden 3T3MEFs der Linien 2wt und 5dd mit dem „leeren“ Hygromycin-B-Resistenzvektor pIRESHyg3 transfiziert und ebenfalls mit Hygromycin B selektioniert.

Zur Überprüfung der stabilen 3T3MEF-Zelllinien auf ihre Expression des SV40-LT-Ag wurden Extrakte dieser Zelllinien aus gleichen Zellzahlen hergestellt und im Western Blot analysiert (7,5 μ l Extrakt bzw. 100.000 Zellen pro Spur). Als Positivkontrolle für die Expression des SV40-LT-Ag wurde zusätzlich Extrakt von 293T-Zellen untersucht, die dieses Protein stabil exprimieren; als Negativkontrolle dienten 293-Zellen.

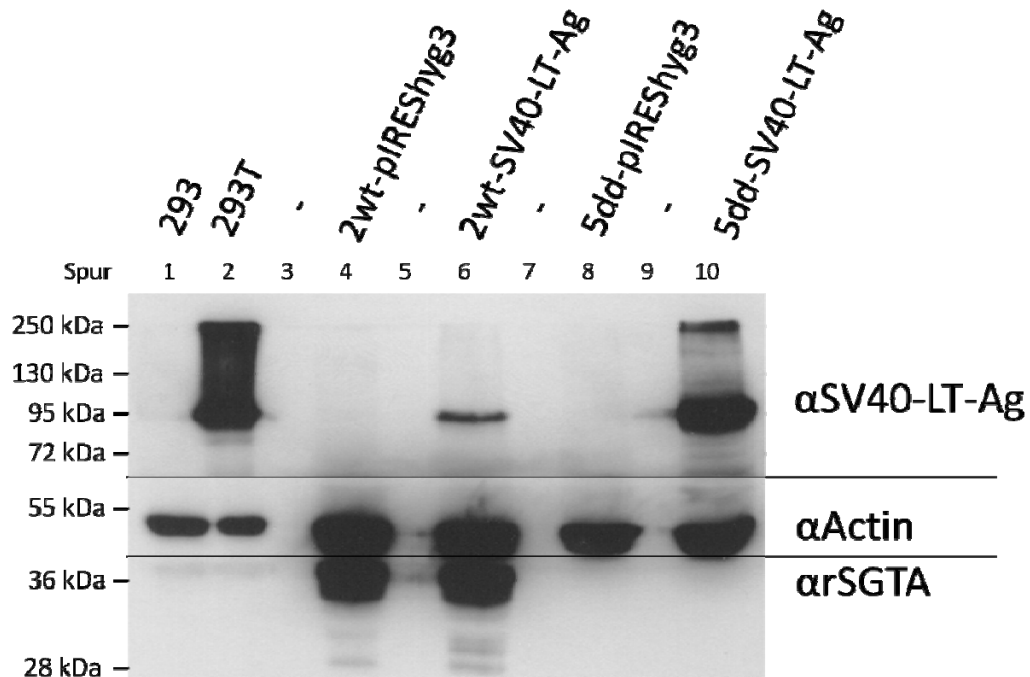


Abb. 4-29 Western Blot-Analyse der stabilen 3T3MEF-Zelllinien: Extrakte der verschiedenen stabilen 3T3MEF-Zelllinien (s.o.) sowie der Zelllinien 293 und 293T wurden wie unter 3.2.2.10 beschrieben hergestellt. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunblot wurden SV40-LT-Ag sowie rSGTA und Actin (als Ladekontrolle) nachgewiesen.

Wie **Abb. 4-29** zeigt, kann sowohl in 2wt-SV40-LT-Ag- (Spur 6) als auch in 5dd-SV40-LT-Ag-Zellen (Spur 10) das *Large-T-Antigen* von SV40 nachgewiesen werden, jedoch ist die nachweisbare Menge dieses Proteins bei der Zelllinie 5dd-SV40-LT-Ag wesentlich größer als bei der Linie 2wt-SV40-LT-Ag. Da beide Zelllinien Mischkulturen der 3T3MEF-Zellen (2wt bzw. 5dd) darstellen, die durch Hygromycin-B-Selektion nach Transfektion mit dem Plasmid pIRESHyg3-SV40-LT-Ag gewonnen wurden, könnte es sein, dass ein Teil der 2wt-SV40-LT-Ag-Zellen nur die für die Hygromycin-B-Resistenz verantwortliche Hygromycin-B-Phosphotransferase, nicht jedoch das SV40-LT-Ag exprimiert.

4.2.1.3 Softagar-Assays mit den stabilen wildtyp und doppelknockout 3T3MEF-Zelllinien

Mit den SV40-LT-Ag-exprimierenden 3T3MEF-Zelllinien 2wt-SV40-LT-Ag und 5dd-SV40-LT-Ag sowie den Kontroll-Zelllinien 2wt-pIRESHyg3 und 5dd-pIRESHyg3 wurden wie unter 3.2.2.14 beschrieben *Softagar*-Assays durchgeführt. Nach 4-wöchiger Inkubation im Brutschrank bei wöchentlichem Mediumwechsel wurden die

Assays mit Kristallviolett-Lösung gefärbt und zur Dokumentation gescannt. **Abb. 4-30** zeigt das Ergebnis dieser *Softagar*-Assays.

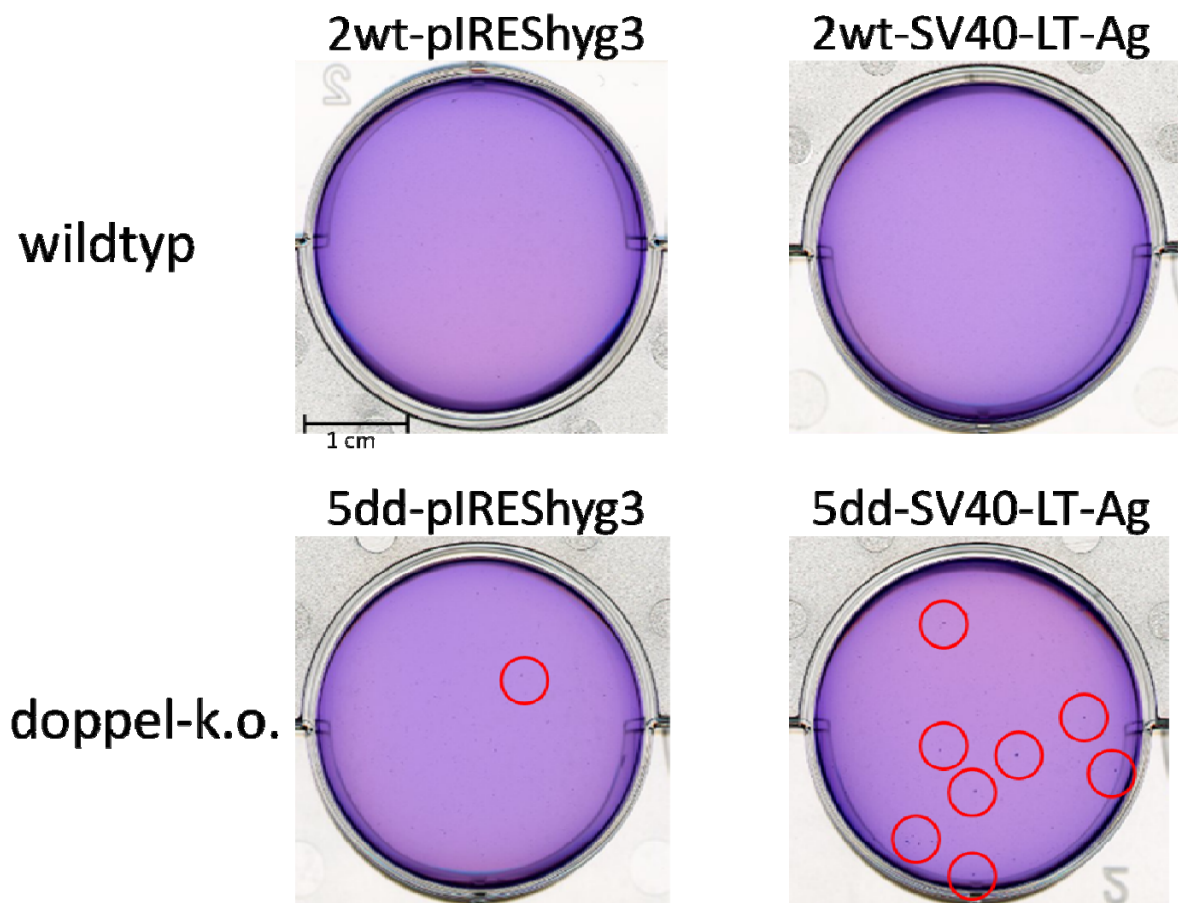


Abb. 4-30 *Softagar*-Assays mit stabilen wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* 3T3MEF-Zelllinien. Mit den SV40-LT-Ag-exprimierenden MEF3T3-Zelllinien 2wt-SV40-LT-Ag und 5dd-SV40-LT-Ag sowie den Kontroll-Zelllinien 2wt-pIRESHyg3 und 5dd-pIRESHyg3 wurden wie unter 3.2.2.14 beschrieben *Softagar*-Assays durchgeführt. Es wurden jeweils 45.000 Zellen pro well verwendet. Nach 4-wöchiger Inkubation im Brutschrank bei wöchentlichem Mediumwechsel wurden die Assays mit Kristallviolett-Lösung gefärbt und zur Dokumentation gescannt. Zellkolonien sind durch rote Umkreisungen hervorgehoben.

Wie in **Abb. 4-30** zu sehen ist, konnten sowohl bei den wildtyp-Kontroll-Zellen, die nur den „leeren“ pIRESHyg3-Vektor enthielten (2wt-pIRESHyg3), als auch bei den SV40-LT-Ag-exprimierenden wildtyp-Zellen (2wt-SV40-LT-Ag) keine *Softagar*-Kolonien nachgewiesen werden. Bei den *doppelknockout*-Kontroll-Zellen (5dd-pIRESHyg3) wurden pro well einer 6-well-Platte maximal 2 (sehr kleine) Kolonien beobachtet, während die SV40-LT-Ag-exprimierenden SGTA und –B *doppelknockout* Zellen (5dd-SV40-LT-Ag) im Durchschnitt 10 (etwas größere) Kolonien pro well bildeten.

5 DISKUSSION

Die funktionelle Analyse des SGTA-Proteins und seiner Isoform SGTB stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Durch die Untersuchung von Mausgeweben, humanen Kulturzellen sowie *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) von wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* Mäusen sollten Vorkommen und Funktion von SGTA und –B analysiert und verglichen werden. Darüber hinaus wurde untersucht, ob SGTA einen Beitrag zum parvoviralen Lebenszyklus leistet, und ein erster Schritt zur Validierung von SGTA als Zielmolekül für die Krebstherapie unternommen.

5.1 Vorkommen und Funktion von SGTA und SGTB

Das SGTA-Protein weist eine ubiquitäre Präsenz auf; es konnte in den Rattengeweben Herz, Hirn, Milz, Lunge, Leber, Muskel, Niere und Hoden (Tobaben et al., 2003) sowie in humanen Tumor- bzw. transformierten Zellen (U937, HeLa, NBE, NBK, MCF-7, U87 und IMR32) und Primärzellen (Lymphozyten, BJ und HCEAC) (Winnefeld et al., 2004) nachgewiesen werden. SgtA-Transkripte wurden bisher in allen untersuchten humanen Geweben und Rattengeweben (Herz, Hirn, Plazenta, Leber, Skelletmuskel und Niere) nachgewiesen (Cziepluch et al., 1998; Kordes et al., 1998). Im Gegensatz zu der ubiquitären Präsenz von SGTA ließ sich SGTB-mRNA und -Protein bei der Analyse von Rattengeweben durch Northern und Western Blot hauptsächlich im Gehirn nachweisen (Tobaben et al., 2003). In der hier vorgelegten Arbeit wurden Extrakte verschiedener Organe (Leber, Niere, Milz, Herz, Muskel, Hirn) von wildtyp und SGTA-*knockout* Mäusen hergestellt und im Western Blot mit α hSGTB-Serum analysiert. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis, das Tobaben et al. für Rattengewebe erhielten, konnte das SGTB-Protein nur im Hirn-Extrakt nachgewiesen werden. Bei der Western Blot-Analyse der Extrakte verschiedener humaner Zelllinien (NCH82, 293T, NBK, HeLa) und der primären Huvec-Zellen war SGTB wie erwartet in der neuronalen Zelllinie NCH82 nachweisbar; etwas geringere Mengen von SGTB konnten jedoch auch in den nicht-neuronalen humanen Tumor- bzw. transformierten Zelllinien HeLa, 293T und NBK sowie in primären Huvec-Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde SGTB in primären *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) detektiert (Cziepluch und Senís Herrero, unveröffentlichte Ergebnisse). Das SGTB-Protein ist also offenbar keine ausschließlich neuronale Isoform von SGTA, sondern wird auch in transformierten

Zellen, Tumorzellen und embryonalen Zellen exprimiert; in Geweben aus adulten Tieren scheint die Expression von SGTB (bei Nicht-Tumorzellen) auf neuronales Gewebe beschränkt zu sein. Der in neuronalen Zellen nachgewiesene Komplex aus SGTB, CSP α und HSC70 (Tobaben et al., 2003) und die postulierte Rolle in der neuronalen Signaltransduktion stellen daher höchstwahrscheinlich nicht die einzige Funktion von SGTB dar; es kann vermutet werden, dass SGTB in den Zellen, in denen es nachweisbar ist, weitere Aufgaben übernimmt, die möglicherweise mit seiner Co-Chaperon-Funktion für HSC70 assoziiert sind. Zur Analyse der über die Signaltransduktion hinausgehenden Funktionen von SGTB wäre es von Interesse, weitere gegebenenfalls auch nicht-neuronenspezifische Bindungspartner von SGTB zu identifizieren und zu überprüfen, welche der bekannten SGTA-Interaktionspartner auch mit SGTB eine Interaktion eingehen. Es wurde bereits gezeigt, dass exogen exprimiertes Flag-SGTB, das erwartungsgemäß HSP70 und HSC70 binden kann, in HeLa-Zellen mit BAG6 interagiert, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als Flag-SGTA (Köllner, 2007).

Die siRNA-vermittelte Reduktion der SGTA-Proteinmenge (SGTA-*knockdown*) führte in allen getesteten Tumorzelllinien (HeLa, NBE, NTN, MiaPaCa und Panc 2), in denen der *knockdown* effektiv war, zu einer Arretierung der Zellen in der Mitose und nachfolgend zum Zelltod in dieser Phase des Zellzyklus (Winnefeld et al., 2004; Cziepluch, unveröffentlichte Ergebnisse); durch die Analyse von HeLaH2A-Zellen wurden als Auslöser für diesen Phänotyp („SGTA-Depletions-Phänotyp“) misslokalisierte Chromosomen an den Spindelpolen identifiziert (Winnefeld et al., 2006). Da SGTB – ebenso wie SGTA – durch Western Blot-Analyse in humanen Zelllinien nachgewiesen werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Verringerung der SGTB-Menge in humanen Tumorzelllinien ebenfalls zu dem oben für den SGTA-*knockdown* beschriebenen Phänotyp führt. Die SGTB-Proteinmenge wurde durch den Einsatz zweier unterschiedlicher siRNAs, die mit unabhängigen Regionen in der SGTB-kodierenden mRNA hybridisieren können, effektiv reduziert; es wurde jedoch sowohl in den neuronalen Zelllinien NCH82 und U373 als auch in HeLaH2A-Zellen kein (nachweisbarer) Effekt durch diese Reduzierung festgestellt. Die Anwesenheit von SGTB ist daher offenbar nicht essenziell für das Überleben von NCH82-, U373- und HeLaH2A-Zellen. Im Gegensatz dazu wurde bei siRNA-vermittelter Reduktion von SGTA in den

neuronalen U373-Zellen, die vergleichbare Mengen an SGTA und –B exprimieren, der typische SGTA-Depletions-Phänotyp beobachtet. Durch eine FACS-Zellzyklusanalyse und die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von mit Hoechst-33342 gefärbten U373-Zellen wurde gezeigt, dass der Einsatz von sgtA-spezifischer siRNA zur Arretierung der Zellen in der G₂/M-Phase und zu misslokalisierten Chromosomen an den Spindelpolen führt; außerdem ergaben lichtmikroskopische Analyse und Zellzahlbestimmung, dass die Verringerung der SGTA-Proteinmenge den Tod der Zellen zur Folge hatte. Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass endogenes SGTB nicht in der Lage ist, SGTA funktionell zu ersetzen. In einem „Rescue-Experiment“ wurde außerdem untersucht, ob die Überexpression von SGTB den durch die siRNA-vermittelte Verringerung der SGTA-Menge ausgelösten Phänotyp in U373-Zellen verhindern kann (siehe unten). Trotz Überexpression von SGTB wurde bei Einsatz von sgtA-spezifischer siRNA der charakteristische SGTA-Depletions-Phänotyp beobachtet, jedoch führte die Überexpression eines (als Positiv-Kontrolle für einen „Rescue“ dienenden) Proteins, das von einer mRNA translatiert wurde, die für dieselbe Aminosäuresequenz wie endogenes hSGTA kodiert, ebenfalls nicht zu einem „Rescue“ (siehe unten). Daher kann anhand des *Rescue*-Experiments keine Aussage darüber getroffen werden, ob SGTB die Funktion von SGTA übernehmen kann; aufgrund der oben beschriebenen Beobachtung des SGTA-Depletions-Phänotyps bei Einsatz von sgtA-spezifischer siRNA in U373-Zellen wird dies jedoch als unwahrscheinlich angesehen. Ob das ubiquitär exprimierte SGTA in der Lage ist, SGTB funktionell zu ersetzen, und die Verringerung der SGTB-Proteinmenge aus diesem Grund keinen (nachweisbaren) Effekt zur Folge hatte, konnte anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente nicht abschließend geklärt werden, da eine gleichzeitige effektive Verringerung der SGTA- und SGTB-Proteinmenge durch den simultanen Einsatz der jeweiligen spezifischen siRNAs nicht erreicht werden konnte. SGTA-Protein war also immer in den Zellen vorhanden, wenn die SGTB-Menge durch den Einsatz von sgtB-spezifischer siRNA verringert wurde; daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass SGTA den Verlust von SGTB kompensiert. Der offensichtliche funktionelle Unterschied zwischen den beiden SGT-Isoformen, der sich darin manifestiert, dass SGTA essenziell für das Überleben bzw. die Zellteilung der getesteten Tumorzelllinien ist, während SGTB offenbar nicht (dafür) benötigt wird, könnte durch unterschiedliche Bindungspartner dieser Proteine

bedingt sein. Sowohl SGTA als auch SGTB interagieren zwar mit HSC70 und HSP70 und beeinflussen deren ATPase-Aktivität und damit wahrscheinlich ihre Fähigkeit, Klient-Proteine zu falten (Liu et al., 1999; Tobaben et al., 2001; Tobaben et al., 2003; Angeletti et al., 2002; Winnefeld et al., 2006); es ist jedoch möglich, dass SGTA und SGTB – aufgrund der Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz, – sich in ihrer Affinität zu Partner-Proteinen unterscheiden. In einem Lumier-Assay wurde beispielsweise gezeigt, dass die Interaktion von SGTA und BAG6 wesentlich stärker ist als jene von SGTB und BAG6 (Cziepluch und Kögl, unveröffentlichte Ergebnisse). Es ist zudem nicht ausgeschlossen, dass SGTA neben den bekannten Partnern andere Klient-Proteine oder Co-Chaperone als SGTB rekrutiert. Im Internet (<http://www.genecards.org>) werden unterschiedliche Protein-Interaktionen für SGTA und SGTB verzeichnet (siehe **Tabelle 5-1** und **5-2**).

Interactant		Interaction Details
GeneCard	External ID(s)	
<u>BAG6</u>	<u>P46379</u>	<u>EBI-347996,EBI-347552</u> <u>MINT-62791</u> <u>MINT-62617</u> <u>MINT-62715</u>
<u>BAT3</u>	<u>P46379</u>	
<u>ENSG00000229524</u>	<u>P46379</u>	
<u>EFEMP1</u>	<u>Q12805</u>	<u>MINT-68037</u>
<u>EFEMP2</u>	<u>O95967</u>	<u>MINT-67150</u>
<u>GPX7</u>	<u>Q96SL4</u>	<u>MINT-67512</u>
<u>NME3</u>	<u>Q13232</u>	<u>MINT-67252</u>
<u>PFN2</u>	<u>P35080</u>	<u>MINT-63165</u>
<u>PTN</u>	<u>P21246</u>	<u>MINT-63164</u>
<u>SPP1</u>	<u>P10451</u>	<u>MINT-66220</u>
<u>SPPL2A</u>	<u>Q8TCT8</u>	<u>MINT-67903</u>
<u>SRGN</u>	<u>P10124</u>	<u>MINT-66585</u>
<u>SYT4</u>	<u>Q9H2B2</u>	<u>MINT-68022</u>
<u>ZG16</u>	<u>O60844</u>	<u>MINT-66848</u>
--	<u>Q9Y5B2</u>	<u>MINT-66278</u>
--	<u>Q6ZMH6</u>	<u>MINT-67734</u>

Tabelle 5-1 Protein-Interaktionen von SGTA (aus <http://www.genecards.org>, Stand 2011).

Interactant		Interaction Details
GeneCard	External ID(s)	
EFEMP2	O95967	MINT-66443
RAI2	Q9Y5P3	MINT-67571

Tabelle 5-2 Protein-Interaktionen von SGTB (aus <http://www.genecards.org>, Stand 2011).

Anhand eines *Rescue*-Experiments wurde in dieser Arbeit überprüft, ob die Überexpression von SGTB den SGTA-Depletions-Phänotyp verhindern kann. Dazu wurde eine U373-Zelllinie etabliert, die SGTB stabil überexprimiert (U373-B); diese Zellen wurden mit sgtA-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt. Als Positiv-Kontrolle für einen „*Rescue*“ wurden U373-Zellen (U373-A) verwendet, die ein Protein (als muthSGTA bezeichnet) überexprimieren, das durch das sequenzierte Expressionskonstrukt dieselbe Aminosäuresequenz wie endogenes humanes SGTA aufweisen sollte, dessen mRNA-Transkript jedoch aufgrund von 6 Nukleotidaustauschen in der SGTA-cDNA nicht von der sgtA-spezifischen siRNA erkannt wird. Eine FACS-Zellzyklusanalyse der mit sgtA-spezifischer siRNA behandelten stabilen U373-Zelllinien U373-pIRES, U373-A und U373-B ergab, dass sowohl die (Negativ-)Kontroll-Zellen U373-pIRES als auch die SGTB- bzw. muthSGTA-überexprimierenden Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus arretierten. Durch eine fluoreszenzmikroskopische Analyse von U373-pIRES-Kontroll-Zellen und muthSGTA-überexprimierenden Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zellen beider Linien bei Behandlung mit sgtA-spezifischer siRNA in überwiegender Zahl in der Prometaphase der Mitose arretierten und misslokalisierte Chromosomen an den Spindelpolen aufwiesen, was den typischen SGTA-Depletions-Phänotyp kennzeichnet. Sowohl SGTB als auch muthSGTA waren – unter den Voraussetzungen dieses *Rescue*-Experiments – also offensichtlich nicht in der Lage, die Funktion von endogenem SGTA zu übernehmen. Für SGTB könnte dies – wie bereits oben erläutert – darin begründet sein, dass diese SGT-Isoform andere Bindungspartner besitzt und daher andere Funktionen ausübt als SGTA. Die Tatsache jedoch, dass die Überexpression von muthSGTA den bei Einsatz der sgtA-spezifischen siRNA beobachteten SGTA-Depletions-Phänotyp nicht verhindern konnte, ist schwieriger zu verstehen. Eine generelle Toxizität der siRNA-Behandlung für die untersuchten Zellen kann ausgeschlossen werden, da nur der Einsatz der sgtA-siRNA zu einer Arretierung der Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus und

nachfolgendem Zelltod führte, wohingegen die Behandlung der Zellen mit sgtB-spezifischer oder Kontroll-siRNA (Luziferase-spezifisch; Elbashir et al., 2001) keinen Effekt hatte. Es ist bekannt, dass der Einsatz von siRNA unspezifische Veränderungen der Genexpression zur Folge haben kann (Jackson et al., 2003). Im Falle der sgtA-siRNA sind solche unspezifischen oder „*Off-Target*“-Effekte jedoch sehr unwahrscheinlich, da gezeigt wurde, dass die Verwendung von zwei verschiedenen siRNA-Oligonukleotiden, die mit zwei unterschiedlichen Regionen innerhalb des SGTA-Transkriptes hybridisieren können, denselben spezifischen Phänotyp bewirkt (Winnefeld, 2006). Drei weitere unterschiedliche sgtA-spezifische siRNAs lösen ebenfalls den SGTA-Depletions-Phänotyp aus (Cziepluch, unveröffentlichte Ergebnisse). Auch der Einsatz eines Plasmids, das für eine sgtA-spezifische *small hairpin* RNA (shRNA) kodiert, führt zu dem charakteristischen SGTA-Depletions-Phänotyp (Winnefeld, 2006); außerdem wurden in BLAST-Abfragen die Sequenzen der SGTA-siRNAs und der shRNA auf mögliche Homologien zu anderen Genen bzw. cDNAs untersucht, ohne dass dabei signifikante Übereinstimmungen festgestellt wurden (Winnefeld, 2006). Die Herstellung und Translation der muthSGTA-mRNA erfolgt offenbar problemlos und wird nicht durch den Einsatz der sgtA-spezifischen siRNA beeinträchtigt, denn in einer Western Blot-Analyse konnten große Mengen an muthSGTA-Protein in Extrakten von (mit sgtA-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelten) U373-A-Zellen nachgewiesen werden. MuthSGTA wurde so konzipiert, dass es die gleiche Aminosäuresequenz wie endogenes SGTA besitzen sollte. In der kodierenden Sequenz (des Plasmids pXmuthSGTA) erfolgten 6 Nukleotidaustausche so, dass die Aminosäure-Kodierung der Codons nicht betroffen war und sich auch die Verwendungshäufigkeit der Codons nicht dramatisch änderte. Nach eindimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Western Blot-Analyse zeigen endogenes SGTA und muthSGTA ein identisches Bandenmuster (Köllner, nicht gezeigte Daten). Es ist jedoch möglich, dass trotz gleicher Aminosäuresequenz unterschiedliche ko- oder posttranslationale Modifikationen an einem Protein vorgenommen werden, die dann eine unterschiedliche Funktion zur Folge haben. In einem kürzlich in *Science* erschienenen Artikel wurde am Beispiel von β - und γ -Actin gezeigt, dass Unterschiede in der Codon-Verwendung zu Unterschieden bei der kotranslationalen Modifikation und damit der Protein-Funktion führen (Zhang et al., 2010). Im Fall von β - und γ -Actin wird dies auf die unterschiedliche Struktur der mRNA zurückgeführt,

die bei β -Actin eine schnelle und bei γ -Actin eine langsame Translation bewirkt. Da sich die mRNA von muthSGTA aufgrund der in die SGTA-cDNA eingeführten Nukleotidaustausche und des Fehlens der großen 3'-untranslatierten Region (UTR) ebenfalls von der endogenen SGTA-mRNA unterscheidet, könnte man annehmen, dass die beiden daraus entstehenden Proteine ebenfalls unterschiedlich modifiziert werden und dass daher kein *Rescue* des SGTA-Depletions-Phänotyps durch muthSGTA zu beobachten ist. Bestimmte posttranslationale Modifikationen scheinen bei SGTA entscheidend für seine Funktion zu sein, denn es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von SGTA an Serin 305 essenziell für die Stabilisierung des PDGFR α (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor α*) ist (Moritz et al., 2010). Eine Analyse durch zweidimensionale SDS-PAGE (auch in Kombination mit alkalischer Phosphatase-Behandlung der Proteinextrakte) ergab, dass endogenes SGTA und exogen exprimiertes Flag-SGTA sich in ihrem Phosphorylierungsmuster unterscheiden (Apsi, 2002); es erscheint daher möglich, dass endogenes SGTA und muthSGTA ebenfalls unterschiedlich phosphoryliert werden. Die Struktur der mRNAs, die der kodierenden Sequenz von endogenem SGTA bzw. muthSGTA entsprechen, wurde von Dr. Agnes Hotz-Wagenblatt (DKFZ *Core Facility „Genomics and Proteomics“*) mithilfe des RNAFOLD-Web-Servers (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) analysiert. Die mRNA-Struktur wurde mittels der Programme „mfold“ und „plotfold“ (M. Zuker et al., 1990) vorhergesagt und verglichen; dabei wurde festgestellt, dass durch die Nukleotidaustausche einige Basenpaarungen verschwinden und die Gesamtenergie des Moleküls etwas abnimmt, außerdem änderte sich die Struktur in geringem Umfang (Hotz-Wagenblatt, persönliche Kommunikation). Bei dieser Untersuchung wurde jedoch das Fehlen der 3'-UTR in der muthSGTA-mRNA nicht berücksichtigt, da nur die kodierenden Sequenzen verglichen wurden. Allerdings ist bekannt, dass vor allem die Struktur in der Nähe des 5'-Endes der mRNA einen Einfluss auf die Translation hat (Babendure et al., 2006), sodass das Fehlen der 3'-UTR in Bezug auf den Aspekt der Translation (und damit verbundene Modifikationen) vermutlich vernachlässigbar ist. Die 3'-UTR ist jedoch bekanntermaßen für die Lokalisation von mRNAs in der Zelle entscheidend (Jambhekar und Derisi, 2007; Jansen, 2001); es könnte daher sein, dass die muthSGTA-mRNA aufgrund der nicht vorhandenen 3'-UTR nicht korrekt lokalisiert wird und muthSGTA aus diesem Grund nicht in der Lage ist, die Funktion von endogenem SGTA zu erfüllen. SGTA ist sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma

nachweisbar; in der Mitose weist es jedoch eine Lokalisation an Mitose-relevanten Strukturen wie den Spindelpolen (Prometa- und Metaphase), der zentralen Spindel (Anaphase) und dem Mittelkörper (Telophase und frühe G1-Phase) auf (Winnefeld et al., 2004). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass möglicherweise die Unterschiede der mRNA-Sequenz von endogenem SGTA und muthSGTA zu einer unterschiedlichen ko- oder posttranslationalen Modifikation oder Lokalisation der beiden Proteine führen und daher der SGTA-Depletions-Phänotyp durch die Überexpression von muthSGTA nicht verhindert werden kann.

Für ein besseres Verständnis der Funktion von SGTA und –B wurden in dieser Arbeit *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) von wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* Mäusen bezüglich ihrer Zellzyklusverteilung, Wachstumsrate, Empfindlichkeit gegenüber Nocodazol und Genexpression verglichen; dabei wurden sowohl primäre MEFs als auch immortalisierte 3T3MEFs untersucht. Da verschiedene Ergebnisse darauf hinweisen, dass SGTA eine direkte oder indirekte Funktion bei der Zellteilung ausübt (Winnefeld et al., 2004), wurden vor allem in diesem Bereich Unterschiede zwischen wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* MEFs bzw. Defekte bei den *doppelknockout* MEFs vermutet; mit dem Vergleich der Zellzyklusverteilung, der Wachstumsrate und der Empfindlichkeit gegenüber Nocodazol wurde daher dieser Aspekt genauer untersucht. Sowohl bei den 3T3MEFs als auch den primären MEFs konnten keine Unterschiede in der Zellzyklusverteilung zwischen wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* MEFs festgestellt werden; ebenso ergab der Vergleich der Wachstumsrate von wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* 3T3MEFs keine signifikanten Unterschiede. Auch von einem durch Nocodazol-Behandlung ausgelösten G₂/M-Arrest erholten sich primäre wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* MEFs in vergleichbar (in)effizienter Weise. Verglichen mit wildtyp MEFs weisen SGTA und –B *doppelknockout* MEFs also – auch unter Stressbedingungen wie einer Nocodazol-Behandlung – keine (offensichtlichen) Beeinträchtigungen der Zellteilung auf. Diese Ergebnisse schließen nicht aus, dass SGTA (und möglicherweise auch SGTB) eine Funktion bei der Zellteilung ausübt, sie zeigen jedoch, dass primäre und immortalisierte MEFs offenbar in der Lage sind, ohne diese Funktion zu überleben und sich zu teilen. Zusammen mit der Tatsache, dass SGTA und –B *doppelknockout* Mäuse lebensfähig sind und – außer einer verminderten Fertilität bei männlichen Mäusen (Cziepluch, persönliche

Kommunikation) – keinen auffälligen Phänotyp aufweisen, unterstützen die aus dem Vergleich der MEFs gewonnenen Ergebnisse die Vermutung, dass SGTA und –B für die Zellteilung von „normalen“ Zellen nicht essenziell sind. Im Gegensatz dazu scheinen Tumor- und transformierte Zellen – wie ihr Phänotyp bei Verringerung der SGTA-Menge zeigt – für die Zellteilung auf die Funktion von SGTA angewiesen und der beobachtete Phänotyp daher spezifisch für diese Zellen zu sein.

Die Untersuchung der Genexpression von wildtyp und *doppelknockout* 3T3MEFs in *Microarray*-Analysen und die anschließende Überprüfung der Ergebnisse durch quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) ergab, dass keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen SGTA und –B wildtyp und *doppelknockout* MEFs existieren, die konsistent in primären und 3T3MEFs nachweisbar sind. Die im *Microarray* zwischen wildtyp und *doppelknockout* 3T3MEFs festgestellten Unterschiede bei der Expression der Gene *mmp9*, *gpnmb* und *kif1a* konnten in der qRT-PCR zwar bestätigt werden. Die qRT-PCR zeigte jedoch, dass die Expression der untersuchten Gene in primären MEFs und Gewebeproben sehr ähnlich ist, wenn ein Vergleich bezüglich des genetischen Hintergrunds „wildtyp“ („heterozygot“ bei den Gewebeproben) bzw. „*doppelknockout*“ angestellt wird. Das Expressionsniveau von *mmp9*, *kif1a* und *gpnmb* in primären wildtyp und *doppelknockout* MEFs war sehr ähnlich und mit dem in wildtyp 3T3MEFs vergleichbar, so dass die höhere bzw. niedrigere Expression dieser Gene in den *doppelknockout* 3T3MEFs eine durch den Etablierungsprozess entstandene Veränderung darstellen könnte. Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass das Fehlen von SGTA und –B offenbar keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von primären und immortalisierten MEFs bewirkt. Da SGTA und –B u.a. als Co-Chaperone von HSP70/HSC70 (und vermutlich von HSP90 im Fall von SGTA) wirken, wäre beispielsweise eine erhöhte Expression von anderen Co-Chaperonen zur Kompensation des Verlustes von SGTA und –B denkbar gewesen. Im Vergleich zu den hier untersuchten primären bzw. immortalisierten Zellen scheinen Tumor- und transformierte Zellen „abhängiger“ von der Funktion von SGTA zu sein. Die Untersuchung der Genexpression von mit *sgtA*-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA behandelten Tumor- oder transformierten Zellen könnte daher möglicherweise größere Unterschiede bei der Genexpression erkennen lassen, als dies bei den hier verglichenen primären bzw. immortalisierten wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* Zellen der Fall war.

5.2 SGTA in der Parvovirus-Infektion

Das SGTA-Protein wurde 1998 in einem *Two-Hybrid-Screen* als zellulärer Interaktionspartner des regulatorischen Nichtstrukturproteins NS1 der autonomen Parvoviren entdeckt (Cziepluch et al., 1998). Um herauszufinden, ob SGTA einen Beitrag zum parvoviralen Lebenszyklus leistet, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob das Fehlen von SGTA (und –B) einen Einfluss auf die Parvovirus-Vermehrung hat; dazu wurden primäre MEFs und immortalisierte 3T3MEFs von SGTA und –B wildtyp und *doppelknockout* Mäusen mit dem Parvovirus MVM infiziert. Es zeigte sich, dass die relative Virusvermehrung (ausgedrückt als Quotient aus *Virus-Output* und *Virus-Input*) für wildtyp 3T3MEFs reproduzierbar bis zu 10-fach höher ist als für *doppelknockout* 3T3MEFs. Auch konnten in wildtyp 3T3MEFs durch Western Blot-Analyse deutlich größere Mengen der viralen Proteine NS1 und VP sowie im Southern Blot mehr Virus-Genome und replikative Virus-DNA-Formen nachgewiesen werden als in *doppelknockout* 3T3MEFs. Die parvovirale Vermehrung in 3T3MEFs scheint also beeinträchtigt zu sein, wenn SGTA fehlt. Zu welchem Schritt des viralen Lebenszyklus (DNA-Replikation, Genexpression oder Partikelfreisetzung) SGTA beiträgt, lässt sich anhand des oben beschriebenen Ergebnisses nicht sagen; eine Beteiligung von SGTA an der viralen DNA-Replikation und / oder Genexpression erscheint jedoch am wahrscheinlichsten (siehe unten). Um zu überprüfen, ob (wenige) einzelne wildtyp 3T3MEFs eine sehr starke virale DNA-Replikation / Genexpression aufweisen oder die virale DNA-Replikation / Genexpression in wildtyp 3T3MEFs (im Vergleich zu *doppelknockout* 3T3MEFs) generell (und uniform) erhöht ist, könnte man MVM-infizierte wildtyp und *doppelknockout* 3T3MEFs in einer Immunfluoreszenzanalyse auf die Anwesenheit des VP-Proteins untersuchen.

Außer mit NS1 interagiert SGTA mit drei weiteren viralen Proteinen: Vpu (*Viral-encoded protein*) und Gag (*Group-specific antigen*) von HIV-1 (*Human immunodeficiency virus-1*) (Callahan et al., 1998) und Protein 7a von SARS-CoV (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus*) (Fielding et al., 2006). Vpu von HIV-1 ist ein 16 kDa großes integrales Membranphosphoprotein vom Typ I (Cohen et al., 1988; Strebel et al., 1988); es fördert die spezifische Degradation des HIV-1-Rezeptors CD4 und verstärkt die virale Partikelfreisetzung. Das Gag-Protein ist der Hauptstrukturbestandteil des viralen Kapsids und kann über eine myristylierte N-terminale Domäne mit der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran assoziieren (Review bei Swanstrom und Wills, 1997); die stabile Membranassoziation von Gag

wird für Virus-Zusammenbau und -Freisetzung benötigt (Scarlatà und Carter, 2003; Bukrinskaya, 2004). Die Überexpression von SGTA in Zellen, die mit einem HIV-1-Provirus-Konstrukt transfiziert wurden, reduziert die Effizienz der Freisetzung viraler Partikel (Callahan et al., 1998); außerdem wurde gezeigt, dass die Expression von Vpu zu einer Umverteilung von SGTA und Gag an die Zellperipherie führt (Handley et al., 2001). Es wird daher angenommen, dass SGTA über seine Interaktion mit Vpu und Gag an der viralen Partikelfreisetzung und / oder dem Viruszusammenbau beteiligt sein könnte, möglicherweise auch im Zusammenhang mit seiner Funktion als Co-Chaperon von HSP70/HSC70 (Angeletti et al., 2002). Das SARS-CoV-Protein 7a wird in SARS-CoV-infizierten Vero E6-Zellen exprimiert (Fielding et al., 2004; Nelson et al., 2005); es scheint an der Apoptose während der SARS-CoV-Infektion beteiligt zu sein und möglicherweise an der Pathogenese von SARS-CoV (Tan et al., 2004). Außer mit SGTA interagiert SARS-CoV 7a mit den viralen Proteinen M und E, die für den Viruszusammenbau verantwortlich sind (Fielding et al., 2006); ausgedessen wurde eine mögliche Rolle von SGTA beim Zusammenbau oder der Freisetzung von SARS-CoV postuliert (Fielding et al., 2006).

Bei autonomen Parvoviren ist, anders als bei HIV-1 und SARS-CoV, eine Funktion von SGTA bei der DNA-Replikation und / oder Genexpression wahrscheinlicher. In mit Parvovirus H-1 infizierten Zellen akkumuliert SGTA zusammen mit dem viralen NS1-Protein in sogenannten APAR-bodies (*autonomous parvovirus-associated replication bodies*), subnukleären Strukturen, in denen die virale Replikation erfolgt (Cziepluch et al., 2000). Der SGTA-Interaktionspartner NS1 ist essenziell für die virale DNA-Replikation, bei der er als sequenzspezifische Endonuklease und ATP-abhängige Helikase fungiert; außerdem reguliert NS1 die virale Genexpression, indem es seinen eigenen P4-Promotor sowie den P38-Promotor aktiviert, der die Transkription der Kapsidgene kontrolliert (Rhode, 1985; Cotmore et al., 2007). SGTA ist ein Co-Chaperon von HSP70/HSC70, daher wäre es denkbar, dass SGTA – im Zusammenspiel mit HSP70/HSC70 – für die korrekte Faltung und / oder Stabilisierung von NS1 sorgt und damit den reibungslosen Ablauf der NS1-vermittelten Funktionen bei der viralen DNA-Replikation und Genexpression sicherstellt. Darüber hinaus zeigen verschiedene Beispiele aus der Literatur, dass der HSP70/HSC70-Chaperon-Komplex eine direkte Rolle bei der viralen DNA-Replikation spielt: Beispielsweise erfordert die Initiation der DNA-Replikation des Phagen Lambda die Aktivität des bakteriellen HSP70-Homologs DnaK und des

Chaperon-Komplexes (DNAK, DNAJ und GRPE), um die DNA-Entwindungs-Aktivität der DNA-Helikase DNAB zu erleichtern (Hoffmann et al., 1992). Bei humanen Papillomaviren erleichtert ein Komplex aus HSP70, HSP40 und der viralen E1-Helikase die Bindung von E1 an den Replikationsursprung und stimuliert die DNA-Replikation (Liu et al., 1998). Außerdem interagiert das SV40-*Large-T-Antigen* – welches (u.a.) für die virale DNA-Replikation benötigt wird – über seine J-Domäne direkt mit HSP70/HSC70 (Li et al., 2001). Angeletti und Kollegen äußerten daher die Vermutung, dass der HSP70/HSC70-Chaperon-Komplex auch für die Replikation von autonomen Parvoviren benötigt und von NS1 durch seine Interaktion mit SGTA an den Ort der viralen DNA-Synthese gebracht werden könnte (Angeletti et al., 2002).

Im Gegensatz zu der oben bei der Infektion von 3T3MEFs beschriebenen Beobachtung konnte bei der Infektion von primären MEFs mit dem Parvovirus MVM kein Einfluss des Fehlens von SGTA (und –B) auf die Parvovirus-Vermehrung festgestellt werden: Die relative Virusvermehrung war bei wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* MEFs sehr ähnlich, und im Western Blot konnten vergleichbare Mengen der viralen Proteine NS1 und VP in primären wildtyp und *doppelknockout* MEFs nachgewiesen werden. Bei der Analyse der primären wildtyp und *doppelknockout* MEFs durch Southern Blot wurden starke Schwankungen in der Virusproduktion zwischen den einzelnen Präparationen der primären MEFs festgestellt, sowohl bei wildtyp als auch bei *doppelknockout* MEFs. Diese rühren vermutlich daher, dass es sich hier um primäre Zellen handelt, welche generell uneinheitlicher sind als „etablierte“ 3T3MEFs. Der Vergleich der relativen Virusvermehrung in primären MEFs und 3T3MEFs ergab, dass diese bei primären wildtyp MEFs nach 72 h etwa 10-fach höher ist als bei wildtyp 3T3MEFs; außerdem waren in den primären MEFs sowohl größere Mengen der viralen Proteine NS1 und VP im Western Blot nachweisbar als auch mehr Virusgenome und replikative Virus-DNA-Formen im Southern Blot als bei 3T3MEFs. Diese starken Unterschiede in der Parvovirus-Vermehrung zwischen 3T3MEFs und primären MEFs könnten auf das unterschiedliche Alter der Embryonen zurückzuführen sein, aus denen die MEFs gewonnen werden: 13,5 Tage bei primären MEFs und 16 Tage bei 3T3MEFs. Es ist bekannt, dass autonome Parvoviren der Nager wie H-1 und das hier verwendete MVM tödlich für Föten und Neugeborene ihres natürlichen Wirtes sind, während sie in erwachsenen Tieren keine Schäden verursachen (Jacoby et al., 1996). Daher

könnte es sein, dass MEFs aus jüngeren Tieren – möglicherweise aufgrund des unausgereiften *innate* (= angeborenen) Immunsystems – anfälliger für eine Infektion mit MVM sind als die einige Tage älteren 3T3MEFs. Um abschließend zu klären, ob das Fehlen von SGTA (und –B) tatsächlich – wie hier bei den 3T3MEFs festgestellt – einen (negativen) Einfluss auf die Parvovirus-Vermehrung hat und ob das Alter der Embryonen bzw. der aus ihnen gewonnenen MEFs eine Rolle für deren Infektionsanfälligkeit spielt, sollten schwangere wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten in der Schwangerschaft (z.B. 10, 13, 17, 20 Tage) mit MVM infiziert und der Virustiter im Blut bestimmt und verglichen werden. Würde bei wildtyp Mäusen zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Schwangerschaft ein deutlich höherer Virustiter festgestellt als bei *doppelknockout* Mäusen, so ließe dies auf eine grundlegende Rolle von SGTA bei der parvoviralen Vermehrung *in vivo* schließen.

5.3 SGTA als Zielmolekül für die Krebstherapie

Auf Grundlage der Beobachtung, dass die siRNA-vermittelte Verringerung der SGTA-Proteinmenge zum Tod von Tumor- bzw. transformierten Zellen führt (Winnefeld et al., 2004; Cziepluch, unveröffentlichte Ergebnisse), während SGTA-*knockout*-Mäuse lebensfähig sind und – außer einer verminderten Fertilität bei Männchen (Cziepluch, persönliche Kommunikation) – keinen auffälligen Phänotyp aufweisen, wurde die Hypothese formuliert, dass sich teilende Tumorzellen für ihr Überleben „abhängiger“ von SGTA sind als normale Zellen und SGTA daher ein *synthetic lethal target* der Krebstherapie darstellen könnte (siehe Abschnitt 1.4). Um diese Hypothese zu überprüfen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Zellen, denen SGTA und –B fehlen, eine maligne Transformation weniger gut unterstützen als wildtyp-Zellen; dafür wurde das Wachstum in *Softagar* von SGTA und –B wildtyp und *doppelknockout* 3T3MEFs analysiert, die das SV40 (Simian Virus 40) *Large-T-Antigen* (SV40-LT-Ag) stabil exprimieren. Nur bei den SV40-LT-Ag-exprimierenden *doppelknockout* 3T3MEFs konnte ein nennenswertes Wachstum von Kolonien in *Softagar* festgestellt werden; bei Einsatz von 45.000 Zellen / *well* ergaben sich durchschnittlich etwa 10 Kolonien pro *well*. Die wildtyp-Zellen bildeten (bei dieser Zellmenge) auch bei Expression des SV40-LT-Ag keine Kolonien in *Softagar*. Dieses Ergebnis ist überraschend und wurde so nicht erwartet. Da aufgrund verschiedener Ergebnisse vermutet wird, dass SGTA eine direkte oder

indirekte Funktion bei der Zellteilung einnimmt (Winnefeld et al., 2004) und Tumorzellen sterben, wenn die Menge an SGTA verringert wird, wurde angenommen, dass Zellen, denen die Proteine SGTA und –B fehlen, mit geringerer Effizienz maligne transformierbar sind und weniger Kolonien in *Softagar* bilden als wildtyp Zellen, bzw. überhaupt nicht dazu in der Lage sind. Eine mögliche Erklärung dafür, dass bei den SV40-LT-Ag-exprimierenden *doppelknockout* 3T3MEFs mehr *Softagar*-Kolonien nachgewiesen wurden als bei den wildtyp 3T3MEFs, könnte die unterschiedliche Menge an SV40-LT-Ag sein, die von den Zellen exprimiert wird, bzw. der unterschiedliche Anteil an Zellen innerhalb des Mischzellklons, die das SV40-LT-Ag tatsächlich exprimieren und daher eine nötige Voraussetzung für die Kolonienbildung in *Softagar* besitzen. Durch Western Blot-Analyse wurde in der *doppelknockout*-Zelllinie 5dd-SV40-LT-Ag eine wesentlich größere Menge des SV40-LT-Ag nachgewiesen als in der wildtyp-Zelllinie 2wt-SV40-LT-Ag. Da beide Zelllinien Mischkulturen der 3T3MEF-Zellen (2wt bzw. 5dd) darstellen, die durch Hygromycin-B-Selektion nach Transfektion mit dem Plasmid pIREShyg3-SV40-LT-Ag gewonnen wurden, könnte es sein, dass ein Teil der 2wt-SV40-LT-Ag-Zellen nur die für die Hygromycin-B-Resistenz verantwortliche Hygromycin-B-Phosphotransferase, nicht jedoch das SV40-LT-Ag exprimiert, und dass dieser Anteil (der nicht-SV40-LT-Ag-exprimierenden Zellen) größer ist als bei den *doppelknockout* Zellen. Möglich ist auch, dass die einzelnen Zellen der Linie 5dd-SV40-LT-Ag eine starke Expression des SV40-LT-Ag aufweisen als die 2wt-SV40-LT-Ag-Zellen. Dieser Sachverhalt könnte überprüft werden, indem man die beiden Zelllinien in einer Immunfluoreszenz- oder FACS-Analyse auf die Anwesenheit des SV40-LT-Ag untersucht. Um auszuschließen, dass die exprimierte Menge an SV40-LT-Ag bzw. der Anteil an SV40-LT-Ag-exprimierenden Zellen innerhalb der Mischzellklone das Ergebnis des *Softagar*-Assays beeinflusst, sollte ein *Softagar*-Assay mit Einzelzellklonen (wildtyp und *doppelknockout*) durchgeführt werden, die gleiche Mengen an SV40-LT-Ag exprimieren.

Sollten bei gleicher Menge an SV40-LT-Ag SGTA und –B *doppelknockout* 3T3MEFs mehr Kolonien in *Softagar* bilden als wildtyp 3T3MEFs, wäre damit die Hypothese, dass sich teilende Tumorzellen für ihr Überleben „abhängiger“ von SGTA sind als normale Zellen und SGTA daher ein *synthetic lethal target* der Krebstherapie darstellen könnte, zwar in Frage gestellt, jedoch nicht grundsätzlich widerlegt. Die hier verwendeten *doppelknockout* 3T3MEFs sind Zellen, die von vornherein ohne

SGTA und –B auskommen mussten und womöglich auf die eine oder andere Art an diesen Zustand adaptiert sind. Bei Expression des SV40-LT-Ag sind sie trotz Fehlen von SGTA und –B daher offensichtlich transformierbar und in der Lage, Kolonien in *Softagar* zu bilden. Analog dazu wurden in einem DMBA/TPA-Mehrstufenkarzinogenese-Experiment in der Maushaut bei SGTA-*knockout*-Mäusen nicht weniger Tumoren festgestellt als bei wildtyp-Mäusen (Karin Müller-Decker und Celina Cziepluch, persönliche Kommunikation). Auch hier konnte in Mauszellen ohne SGTA die Behandlung mit dem Tumorinitiator DMBA und dem Tumorpromotor TPA die Induktion von Tumoren der Haut bewirken. Bei einer potenziellen Krebstherapie wird eine andere Strategie verfolgt, die vergleichbar mit dem *knockdown* von SGTA in Tumorzellen *in vitro* ist: die Inaktivierung der SGTA-Funktion soll in Tumorzellen bewirkt werden, die möglicherweise für ihr Überleben auf SGTA angewiesen sind. Unter diesen Umständen kann erwartet werden, dass – analog zum *in vitro*-SGTA-*knockdown* –der Tod der Tumorzellen eintritt.

Außer der Tatsache, dass Tumorzellen bei Verringerung der SGTA-Menge sterben, während SGTA und –B *doppelknockout* Mäuse lebensfähig sind, spricht auch die in dieser Arbeit beschriebene Beobachtung, dass zwischen wildtyp und SGTA und –B *doppelknockout* MEFs kein signifikanter Unterschied in Hinsicht auf Zellzyklusverteilung, Wachstumsrate, Empfindlichkeit gegenüber Nocodazol und Genexpression besteht, für die Vermutung, dass „normale“ Zellen – im Gegensatz zu Tumorzellen – für Überleben und Zellteilung nicht essenziell auf SGTA und –B angewiesen sind. Der einzige Phänotyp, der bei Fehlen von SGTA und –B (jedoch nicht beim alleinigen Fehlen von SGTA) bisher beobachtet werden konnte, ist eine verminderte Fertilität bzw. Sterilität bei männlichen Mäusen. Die Vermutung, dass SGTA und –B *doppelknockout* Mäuse vermindert bzw. vollkommen fortpflanzungsunfähig sein könnten, ergab sich aus der Beobachtung, dass aus der Verpaarung von männlichen SGTA und –B *doppelknockout* Mäusen mit *doppelknockout*, heterozygoten oder wildtyp Weibchen niemals schwangere Weibchen hervorgingen, während SGTA und –B *doppelknockout* Weibchen bei der Verpaarung mit heterozygoten oder wildtyp Männchen schwanger wurden. Die mögliche Sterilität von männlichen SGTA und –B *doppelknockout* Mäusen könnte mit der Rolle von SGTA bei der Kontrolle des Androgen-Rezeptors (AR) in Zusammenhang stehen: SGTA interagiert mit dem AR und verhindert seine Aggregation im Zytoplasma; außerdem wirkt SGTA einer Überaktivität des AR

entgegen, indem es ihn im Zytoplasma stabilisiert und damit verhindert, dass der AR bei Abwesenheit eines spezifischen Hormonsignals in den Kern wandert und seine Zielgene aktiviert (Buchanan et al., 2007). Diese Funktion von SGTA könnte mit seiner Rolle als Co-Chaperon von HSP70 und HSP90 assoziiert sein, da diese Chaperone an der funktionellen Aktivierung oder Reifung von Steroidhormonrezeptoren beteiligt sind (Johnson und Toft, 1994); außerdem ist bekannt, dass der AR ein Klient-Protein des zytosolischen HSP40-HSP70-Systems ist. Das J-Domänen Co-Chaperon DJA1 nimmt *in vitro* zusammen mit HSC70 und HSP90 eine Funktion bei der Faltung des Progesteron-Rezeptors (PR) ein (Cintron und Toft, 2007). Interessanterweise zeigen männliche DJA1-*knockout*-Mäuse eine stark verminderte Fertilität; massive Defekte bei der Spermatogenese wurden auf einen überaktiven AR zurückgeführt (Terada et al., 2005). Es erscheint daher möglich, dass das Fehlen von SGTA und –B ebenfalls zu einer Überaktivität des AR und daher zu einer verminderten Fruchtbarkeit von männlichen SGTA und –B *doppelknockout* Mäusen führen könnte. Allerdings trat die beobachtete Sterilität nicht bei SGTA-*knockout* Mäusen auf, sondern nur, wenn sowohl SGTA als auch SGTB fehlten. Dies lässt vermuten, dass SGTB in diesem Fall in der Lage sein könnte, SGTA funktionell zu ersetzen; es wäre daher interessant zu untersuchen, ob SGTB ebenfalls eine Interaktion mit dem AR eingeht. Das Konzept einer Krebstherapie durch die Inhibition der Funktion von SGTA wird durch den oben für männliche SGTA und –B *doppelknockout* Mäuse beschriebenen Phänotyp nicht in Frage gestellt, da Sterilität als Nebenwirkung dieser Therapie wohl nur aufträte, wenn auch die Funktion von SGTB inhibiert wird, wie die Fruchtbarkeit der SGTA-*knockout*-Mäuse zeigt.

Die Idee, die Funktion von SGTA mit dem Ziel der Therapie von Krebs zu inhibieren, wurde mittlerweile auch von einer anderen Gruppe formuliert: Moritz und Kollegen haben kürzlich gezeigt, dass an Serin 305 phosphoryliertes SGTA essenziell für die Stabilisierung des Blutplättchen-Wachstumsfaktors α (Platelet-Derived Growth Factor Receptor α , PDGFR α) und das Überleben von PDGFR α -abhängigen Krebszellen ist. Der siRNA vermittelte *knockdown* von SGTA verstärkt den Tod dieser Zellen durch den PDGFR α -Inhibitor Gleevec; SGTA wird daher als potenzielles Zielmolekül für eine Kombinationstherapie mit Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren wie Gleevec genannt (Moritz et al., 2010). Darüber hinaus rücken das Chaperonsystem im Allgemeinen und Co-Chaperone (wie SGTA und –B) im Speziellen bei der Suche

nach möglichen Angriffspunkten für eine Krebstherapie zunehmend in den Fokus der Forschung. Beispielsweise konnten bei der Inhibition zweier Co-Chaperone von HSP90, AHA1 und CDC37, vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Funktionsinhibition von HSP90 und der zellulären Antwort auf den HSP90-Inhibitor 17-AAG erzielt werden (Harst et al., 2005; Gray et al., 2007; Holmes et al., 2008; Pearl et al., 2008; Zhang et al., 2008; Smith et al., 2009). Auch TPR-Domänen-Co-Chaperone wie HOP oder CHIP werden als attraktive Zielmoleküle angesehen, da sie mit HSP90 und / oder HSP70 über ein kurzes Peptid-Motiv am C-Terminus der Chaperone interagieren, das in einem Spalt der TPR-Domäne gebunden wird (Scheufler et al., 2000; Zhang et al., 2005). Dieser Typ der Protein-Protein-Interaktion (vergleichbar mit der Bindung eines Substrats an eine Protease) ist – im Gegensatz zu den flachen, hydrophoben Oberflächen, die bei vielen Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind – besonders gut durch *small molecules* angreifbar. Mithilfe eines Hochdurchsatz-Reaktionsansatzes auf der Basis der *Alpha-Screen™*-Methode haben Yi und Regan eine neue Klasse von *small molecule*-Inhibitoren der HOP-HSP90-Interaktion identifiziert. Diese Verbindungen waren *in vitro* toxisch für WST-1-Zellen, was mit einer wichtigen Rolle der HOP-HSP90-Interaktion vereinbar ist (Yi und Regan, 2008). Da SGTA ebenfalls über seine TPR-Domäne (und Bereiche des C-Terminus im Fall von HSP70/HSC70) mit HSP70/HSC70 und HSP90 interagiert, könnte diese Interaktion möglicherweise auch durch ein *small molecule* unterbrochen und dadurch die SGTA-spezifische Chaperon-Funktion von HSP70/HSC70 und HSP90 inhibiert werden. Da HSP70/HSC70 und HSP90 mit vielen verschiedenen Co-Chaperonen über deren TPR-Domäne interagieren müsste jedoch sichergestellt werden, dass die Inhibition der SGTA-HSP70/HSC70- bzw. -HSP90-Interaktion spezifisch ist. Ob der bei SGTA-*knockdown* auftretende Phänotyp durch die indirekte Inhibition der Funktion von HSP70/HSC70 zustande kommt ist unklar; er ähnelt dem bei *knockdown* von HSP70 beobachteten Phänotyp jedoch sehr: Es wurde gezeigt, dass die siRNA-vermittelte Reduktion der HSP70- bzw. HSC70-Proteinmenge in HeLa-Zellen zu einer Verringerung der Zellzahl und einer abgerundeten Zellmorphologie führt (Rhode et al., 2005). Darüber hinaus hat die Verringerung der HSP70-Proteinmenge durch den Einsatz von HSP70-spezifischer siRNA – ebenso wie die Reduktion der SGTA-Proteinmenge – eine Anreicherung von Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus zur Folge (Rhode et al., 2005). Es wäre interessant zu untersuchen, ob der HSP70-*knockdown* wie die Verringerung der SGTA-Menge zu

misslokalisierten Chromosomen an den Spindelpolen führt; die Klärung dieses Sachverhaltes könnte einen Hinweis darauf liefern, wie der SGTA-Depletions-Phänotyp zustande kommt und einen weiteren funktionellen Bezug zwischen SGTA und HSP70 herstellen. Wie unter 1.4.3 erläutert, könnte auch die Inhibition der Interaktion von SGTA und BAG6 eine Option darstellen, die Funktion von SGTA zu inhibieren. Die an dieser Interaktion beteiligten Oberflächen sind jedoch vermutlich großflächiger als dies bei der SGTA-HSP70/HSC70 bzw. -HSP90-Interaktion der Fall ist, da die UBL-Domäne von BAG6 hierfür benötigt wird. Daher ist die SGTA-BAG6-Interaktion möglicherweise weniger gut für ein *small molecule* zugänglich bzw. hemmbar. Aufgrund der hohen Löslichkeit von SGTA war es bisher nicht möglich, einen Ko-Kristall von SGTA und BAG6 herzustellen, dessen Röntgenstrukturanalyse die Überprüfung dieses Sachverhaltes ermöglichen würde.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ali SH, DeCaprio JA (2001) Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol* **11**: 15-23
- An WG, Schnur RC, Neckers L, Blagosklonny MV (1997) Depletion of p185erbB2, Raf-1 and mutant p53 proteins by geldanamycin derivatives correlates with antiproliferative activity. *Cancer Chemother Pharmacol* **40**: 60-64
- Andrade MA, Perez-Iratxeta C, Ponting CP (2001) Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J Struct Biol* **134**: 117-131
- Angeletti PC, Walker D, Panganiban AT (2002) Small glutamine-rich protein/viral protein U-binding protein is a novel cochaperone that affects heat shock protein 70 activity. *Cell Stress Chaperones* **7**: 258-268
- Apsi X (2002) Funktion des SGT/NS1-Komplexes im Lebenszyklus autonomer Parvoviren. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- Astell CR, Thomson M, Merchlinsky M, Ward DC (1983) The complete DNA sequence of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *Nucleic Acids Res* **11**: 999-1018
- Babendure JR, Babendure JL, Ding JH, Tsien RY (2006) Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA* **12**: 851-861
- Ballinger CA, Connell P, Wu Y, Hu Z, Thompson LJ, Yin LY, Patterson C (1999) Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* **19**: 4535-4545
- Bamberger CM, Wald M, Bamberger AM, Schulte HM (1997) Inhibition of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor function by the heat shock protein 90-binding agent geldanamycin. *Mol Cell Endocrinol* **131**: 233-240
- Banerji J, Sands J, Strominger JL, Spies T (1990) A gene pair from the human major histocompatibility complex encodes large proline-rich proteins with multiple repeated motifs and a single ubiquitin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 2374-2378
- Bashir T, Horlein R, Rommelaere J, 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**: 5522-5527
- Bashir T, Rommelaere J, 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**: 4394-4398
- Bedford L, Lowe J, Dick LR, Mayer RJ, Brownell JE (2011) Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 29-46
- Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, Brummelkamp TR, Velds A, Heimerikx M, Kerkhoven RM, Madiredjo M, Nijkamp W, Weigelt B, Agami R, Ge W, Cavet G, Linsley PS, Beijersbergen RL, Bernards R (2004) A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* **428**: 431-437
- Bimston D, Song J, Winchester D, Takayama S, Reed JC, Morimoto RI (1998) BAG-1, a negative regulator of Hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release. *EMBO J* **17**: 6871-6878
- Blagosklonny MV, Toretsky J, Neckers L (1995) Geldanamycin selectively destabilizes and conformationally alters mutated p53. *Oncogene* **11**: 933-939

- Briknarova K, Takayama S, Brive L, Havert ML, Knee DA, Velasco J, Homma S, Cabezas E, Stuart J, Hoyt DW, Satterthwait AC, Llinas M, Reed JC, Ely KR (2001) Structural analysis of BAG1 cochaperone and its interactions with Hsc70 heat shock protein. *Nat Struct Biol* **8**: 349-352
- Brimmell M, Burns JS, Munson P, McDonald L, O'Hare MJ, Lakhani SR, Packham G (1999) High level expression of differentially localized BAG-1 isoforms in some oestrogen receptor-positive human breast cancers. *Br J Cancer* **81**: 1042-1051
- Buchanan G, Ricciardelli C, Harris JM, Prescott J, Yu ZC, Jia L, Butler LM, Marshall VR, Scher HI, Gerald WL, Coetzee GA, Tilley WD (2007) Control of androgen receptor signaling in prostate cancer by the cochaperone small glutamine rich tetratricopeptide repeat containing protein alpha. *Cancer Res* **67**: 10087-10096
- Bukau B, Weissman J, Horwich A (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**: 443-451
- Bukrinskaya AG (2004) HIV-1 assembly and maturation. *Arch Virol* **149**: 1067-1082
- Cailliet-Fauquet P, Perros M, Brandenburger A, Spegelaere P, Rommelaere J (1990) Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J* **9**: 2989-2995
- Callahan MA, Handley MA, Lee YH, Talbot KJ, Harper JW, Panganiban AT (1998) Functional interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vpu and Gag with a novel member of the tetratricopeptide repeat protein family. *J Virol* **72**: 8461
- Caplan AJ (2003) What is a co-chaperone? *Cell Stress Chaperones* **8**: 105-107
- Chadli A, Bouhouche I, Sullivan W, Stensgard B, McMahon N, Catelli MG, Toft DO (2000) Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12524-12529
- Chang L, Bertelsen EB, Wisen S, Larsen EM, Zuiderweg ER, Gestwicki JE (2008) High-throughput screen for small molecules that modulate the ATPase activity of the molecular chaperone DnaK. *Anal Biochem* **372**: 167-176
- Chavany C, Mimnaugh E, Miller P, Bitton R, Nguyen P, Trepel J, Whitesell L, Schnur R, Moyer J, Neckers L (1996) p185erbB2 binds to GRP94 in vivo. Dissociation of the p185erbB2/GRP94 heterocomplex by benzoquinone ansamycins precedes depletion of p185erbB2. *J Biol Chem* **271**: 4974-4977
- Cheetham ME, Caplan AJ (1998) Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* **3**: 28-36
- Chen HS, Singh SS, Perdew GH (1997) The Ah receptor is a sensitive target of geldanamycin-induced protein turnover. *Arch Biochem Biophys* **348**: 190-198
- Chen S, Smith DF (1998) Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem* **273**: 35194-35200
- Cintron NS, Toft D (2006) Defining the requirements for Hsp40 and Hsp70 in the Hsp90 chaperone pathway. *J Biol Chem* **281**: 26235-26244
- Cohen EA, Terwilliger EF, Sodroski JG, Haseltine WA (1988) Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature* **334**: 532-534
- Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Hohfeld J, Patterson C (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* **3**: 93-96

- Corbau R, Duverger V, Rommelaere J, Nuesch JP (2000) Regulation of MVM NS1 by protein kinase C: impact of mutagenesis at consensus phosphorylation sites on replicative functions and cytopathic effects. *Virology* **278**: 151-167
- Corduan A, Lecomte S, Martin C, Michel D, Desmots F (2009) Sequential interplay between BAG6 and HSP70 upon heat shock. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1998-2004
- Cotmore SF, Gottlieb RL, Tattersall P (2007) Replication initiator protein NS1 of the parvovirus minute virus of mice binds to modular divergent sites distributed throughout duplex viral DNA. *J Virol* **81**: 13015-13027
- Cotmore SF, Tattersall P (1986) Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **58**: 724-732
- Cotmore SF, Tattersall P (1987) The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* **33**: 91-174
- Cotmore SF, Tattersall P (1989) A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J Virol* **63**: 3902-3911
- Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, Nardai G (1998) The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* **79**: 129-168
- Cziepluch C, Kordes E, Poirey R, Grewenig A, Rommelaere J, Jauniaux JC (1998) Identification of a novel cellular TPR-containing protein, SGT, that interacts with the nonstructural protein NS1 of parvovirus H-1. *J Virol* **72**: 4149-4156
- Cziepluch C, Lampel S, Grewenig A, Grund C, Lichter P, Rommelaere J (2000) H-1 parvovirus-associated replication bodies: a distinct virus-induced nuclear structure. *J Virol* **74**: 4807-4815
- D'Andrea LD, Regan L (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* **28**: 655-662
- Das AK, Cohen PW, Barford D (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* **17**: 1192-1199
- Dasgupta G, Momand J (1997) Geldanamycin prevents nuclear translocation of mutant p53. *Exp Cell Res* **237**: 29-37
- Daugaard M, Rohde M, Jaattela M (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* **581**: 3702-3710
- DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM (1988) SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* **54**: 275-283
- Deleu L, Pujol A, Faisst S, Rommelaere J (1999) Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J Virol* **73**: 3877-3885
- Demand J, Alberti S, Patterson C, Hohfeld J (2001) Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol* **11**: 1569-1577
- Desmots F, Russell HR, Lee Y, Boyd K, McKinnon PJ (2005) The reaper-binding protein scythe modulates apoptosis and proliferation during mammalian development. *Mol Cell Biol* **25**: 10329-10337
- Dittmar KD, Pratt WB (1997) Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J Biol Chem* **272**: 13047-13054

- Doong H, Vrillas A, Kohn EC (2002) What's in the 'BAG'?--A functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Lett* **188**: 25-32
- Duan D, Li Q, Kao AW, Yue Y, Pessin JE, Engelhardt JF (1999) Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* **73**: 10371-10376
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**: 188-200
- Fielding BC, Gunalan V, Tan TH, Chou CF, Shen S, Khan S, Lim SG, Hong W, Tan YJ (2006) Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 7a interacts with hSGT. *Biochem Biophys Res Commun* **343**: 1201-1208
- Fielding BC, Tan YJ, Shuo S, Tan TH, Ooi EE, Lim SG, Hong W, Goh PY (2004) Characterization of a unique group-specific protein (U122) of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* **78**: 7311-7318
- Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB (1990) Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* **346**: 623-628
- Fry DC, Vassilev LT (2005) Targeting protein-protein interactions for cancer therapy. *J Mol Med* **83**: 955-963
- Furie B, Furie BC (1988) The molecular basis of blood coagulation. *Cell* **53**: 505-518
- Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* **392**: 821-824
- Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G (2006) Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* **5**: 2592-2601
- Gassler CS, Buchberger A, Laufen T, Mayer MP, Schroder H, Valencia A, Bukau B (1998) Mutations in the DnaK chaperone affecting interaction with the DnaJ cochaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15229-15234
- Genevaux P, Schwager F, Georgopoulos C, Kelley WL (2002) Scanning mutagenesis identifies amino acid residues essential for the in vivo activity of the Escherichia coli DnaJ (Hsp40) J-domain. *Genetics* **162**: 1045-1053
- Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952) Tissue Culture Studies of the Proliferative Capacity of Cervical Carcinoma and Normal Epithelium. *Cancer Research* **12**: 264-265
- Goldberg AL (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**: 895-899
- Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467
- Gray PJ, Jr., Stevenson MA, Calderwood SK (2007) Targeting Cdc37 inhibits multiple signaling pathways and induces growth arrest in prostate cancer cells. *Cancer Res* **67**: 11942-11950
- Greene MK, Maskos K, Landry SJ (1998) Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6108-6113
- Greener A, Filutowicz MS, McEachern MJ, Helinski DR (1990) N-terminal truncated forms of the bifunctional pi initiation protein express negative activity on plasmid R6K replication. *Mol Gen Genet* **224**: 24-32
- Groves MR, Barford D (1999) Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 383-389

- Gu W, Roeder RG (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**: 595-606
- Handley MA, Paddock S, Dall A, Panganiban AT (2001) Association of Vpu-binding protein with microtubules and Vpu-dependent redistribution of HIV-1 Gag protein. *Virology* **291**: 198-207
- Harst A, Lin H, Obermann WM (2005) Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. *Biochem J* **387**: 789-796
- Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**: 1852-1858
- Hartmann F, Horak EM, Cho C, Lupu R, Bolen JB, Stetler-Stevenson MA, Pfreundschuh M, Waldmann TA, Horak ID (1997) Effects of the tyrosine-kinase inhibitor geldanamycin on ligand-induced Her-2/neu activation, receptor expression and proliferation of Her-2-positive malignant cell lines. *Int J Cancer* **70**: 221-229
- Herold-Mende C, Steiner HH, Andl T, Riede D, Buttler A, Reisser C, Fusenig NE, Mueller MM (1999) Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. *Lab Invest* **79**: 1573-1582
- Hoffmann HJ, Lyman SK, Lu C, Petit MA, Echols H (1992) Activity of the Hsp70 chaperone complex--DnaK, DnaJ, and GrpE--in initiating phage lambda DNA replication by sequestering and releasing lambda P protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 12108-12111
- Hohfeld J, Jentsch S (1997) GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J* **16**: 6209-6216
- Holmes JL, Sharp SY, Hobbs S, Workman P (2008) Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res* **68**: 1188-1197
- Hostein I, Robertson D, DiStefano F, Workman P, Clarke PA (2001) Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis. *Cancer Res* **61**: 4003-4009
- Hristov G, Kramer M, Li J, El-Andaloussi N, Mora R, Daeffler L, Zentgraf H, Rommelaere J, Marchini A (2010) Through its nonstructural protein NS1, parvovirus H-1 induces apoptosis via accumulation of reactive oxygen species. *J Virol* **84**: 5909-5922
- Huang K, Ghose R, Flanagan JM, Prestegard JH (1999) Backbone dynamics of the N-terminal domain in E. coli DnaJ determined by 15N- and 13CO-relaxation measurements. *Biochemistry* **38**: 10567-10577
- Isaacs JS, Xu W, Neckers L (2003) Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* **3**: 213-217
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* **21**: 635-637
- Jacoby RO, Ball-Goodrich LJ, Besselsen DG, McKisic MD, Riley LK, Smith AL (1996) Rodent parvovirus infections. *Lab Anim Sci* **46**: 370-380
- Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* **268**: 1517-1520
- Jambhekar A, Derisi JL (2007) Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. *RNA* **13**: 625-642
- Jansen RP (2001) mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 247-256

- Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, Hohfeld J, Patterson C (2001) CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* **276**: 42938-42944
- Johnson JL, Toft DO (1994) A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23. *J Biol Chem* **269**: 24989-24993
- Kaelin WG, Jr. (2005) The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* **5**: 689-698
- Kikukawa Y, Minami R, Shimada M, Kobayashi M, Tanaka K, Yokosawa H, Kawahara H (2005) Unique proteasome subunit Xrpn10c is a specific receptor for the antiapoptotic ubiquitin-like protein Scythe. *FEBS J* **272**: 6373-6386
- Knoch TA (2002) Approaching the three-dimensional organisation of the human genome. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Köllner J (2007) Etablierung eines Hochdurchsatz-*in vitro*-Reaktionsansatzes zur Identifizierung von Inhibitoren der SGTA-BAG6-Komplexbildung. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW (2005) On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* **5**: 773-785
- Kordes E (1997) Klonierung und Charakterisierung eines neuen humanen Proteins, hSGT, das mit dem NS1-Protein des Parvovirus H-1 interagiert. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Kordes E, Savelyeva L, Schwab M, Rommelaere J, Jauniaux JC, Cziepluch C (1998) Isolation and characterization of human SGT and identification of homologues in *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*. *Genomics* **52**: 90-94
- Legendre D, 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**: 7974-7985
- Lehner B, Semple JI, Brown SE, Counsell D, Campbell RD, Sanderson CM (2004) Analysis of a high-throughput yeast two-hybrid system and its use to predict the function of intracellular proteins encoded within the human MHC class III region. *Genomics* **83**: 153-167
- Li H, Soderbarg K, Houshmand H, You ZY, Magnusson G (2001) Effect on polyomavirus T-antigen function of mutations in a conserved leucine-rich segment of the DnaJ domain. *J Virol* **75**: 2253-2261
- Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W (2002) Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* **277**: 50607-50611
- Liberek K, Lewandowska A, Zietkiewicz S (2008) Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J* **27**: 328-335
- Linser P, Bruning H, Armentrout RW (1977) Specific binding sites for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells. *J Virol* **24**: 211-221
- Liou ST, Wang C (2005) Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein is composed of three structural units with distinct functions. *Arch Biochem Biophys* **435**: 253-263
- Liu FH, Wu SJ, Hu SM, Hsiao CD, Wang C (1999) Specific interaction of the 70-kDa heat shock cognate protein with the tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* **274**: 34425-34432
- Liu JS, Kuo SR, Makhov AM, Cyr DM, Griffith JD, Broker TR, Chow LT (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**: 30704-30712

- Luo J, Li M, Tang Y, Laszkowska M, Roeder RG, Gu W (2004) Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2259-2264
- Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ (2009) Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br J Cancer* **100**: 1523-1529
- Manchen ST, Hubberstey AV (2001) Human Scythe contains a functional nuclear localization sequence and remains in the nucleus during staurosporine-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **287**: 1075-1082
- Mani B, Baltzer C, Valle N, Almendral JM, Kempf C, Ros C (2006) Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. *J Virol* **80**: 1015-1024
- Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**: 670-684
- McClellan AJ, Xia Y, Deutschbauer AM, Davis RW, Gerstein M, Frydman J (2007) Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* **131**: 121-135
- Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM, Cyr DM (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* **3**: 100-105
- Meselson M, Yuan R (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* **217**: 1110-1114
- Mietz JA, Unger T, Huibregtse JM, Howley PM (1992) The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J* **11**: 5013-5020
- Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N, Sugamura K (1998) Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol* **72**: 3018-3028
- Montesano R, Drevon C, Kuroki T, Saint Vincent L, Handleman S, Sanford KK, DeFeo D, Weinstein IB (1977) Test for malignant transformation of rat liver cells in culture: cytology, growth in soft agar, and production of plasminogen activator. *J Natl Cancer Inst* **59**: 1651-1658
- Morishima Y, Murphy PJ, Li DP, Sanchez ER, Pratt WB (2000) Stepwise assembly of a glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex resolves two sequential ATP-dependent events involving first hsp70 and then hsp90 in opening of the steroid binding pocket. *J Biol Chem* **275**: 18054-18060
- Morita E, Nakashima A, Asao H, Sato H, Sugamura K (2003) Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G(1) phase. *J Virol* **77**: 2915-2921
- Moritz A, Li Y, Guo A, Villen J, Wang Y, MacNeill J, Kornhauser J, Sprott K, Zhou J, Possemato A, Ren JM, Hornbeck P, Cantley LC, Gygi SP, Rush J, Comb MJ (2010) Akt-RSK-S6 kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases. *Sci Signal* **3**: ra64
- Müller DE, Siegl G (1983) Maturation of parvovirus Lull in a subcellular system. Optimal conditions for *in vitro* synthesis and encapsidation of viral DNA. *J Gen Virol* **64**: 1043-1054
- Nanbu K, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Hamid AA, Komatsu T, Mori T (1998) Prognostic significance of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas. *Cancer Detect Prev* **22**: 549-555
- Natochin M, Campbell TN, Barren B, Miller LC, Hameed S, Artemyev NO, Braun JE (2005) Characterization of the G alpha(s) regulator cysteine string protein. *J Biol Chem* **280**: 30236-30241

- Neckers L, Neckers K (2005) Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutics - an update. *Expert Opin Emerg Drugs* **10**: 137-149
- Nelson CA, Pekosz A, Lee CA, Diamond MS, Fremont DH (2005) Structure and intracellular targeting of the SARS-coronavirus Orf7a accessory protein. *Structure* **13**: 75-85
- Ngo VN, Davis RE, Lamy L, Yu X, Zhao H, Lenz G, Lam LT, Dave S, Yang L, Powell J, Staudt LM (2006) A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* **441**: 106-110
- Nuesch JP, Lachmann S, Corbau R, Rommelaere J (2003) Regulation of minute virus of mice NS1 replicative functions by atypical PKC λ in vivo. *J Virol* **77**: 433-442
- Nuesch JP, Lachmann S, Rommelaere J (2005) Selective alterations of the host cell architecture upon infection with parvovirus minute virus of mice. *Virology* **331**: 159-174
- Op De Beeck A, 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**: 5323-5329
- Op De Beeck A, Sobczak-Thepot J, Sirma H, Bourgain F, Brechot C, Caillet-Fauquet P (2001) NS1- and minute virus of mice-induced cell cycle arrest: involvement of p53 and p21(cip1). *J Virol* **75**: 11071-11078
- Ozawa F, Friess H, Zimmermann A, Kleeff J, Buchler MW (2000) Enhanced expression of Silencer of death domains (SODD/BAG-4) in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **271**: 409-413
- Panaretou B, Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1998) ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J* **17**: 4829-4836
- Parker JS, Parrish CR (1997) Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. *J Virol* **71**: 9214-9222
- Parker JS, Parrish CR (2000) Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol* **74**: 1919-1930
- Pearl LH, Prodromou C (2006) Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* **75**: 271-294
- Pearl LH, Prodromou C, Workman P (2008) The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem J* **410**: 439-453
- Ponten J, Macintyre EH (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**: 465-486
- Powers MV, Clarke PA, Workman P (2008) Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell* **14**: 250-262
- Pratt WB, Galigniana MD, Harrell JM, DeFranco DB (2004) Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal* **16**: 857-872
- Pratt WB, Morishima Y, Murphy M, Harrell M (2006) Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handb Exp Pharmacol*: 111-138
- Pratt WB, Morishima Y, Osawa Y (2008) The Hsp90 chaperone machinery regulates signaling by modulating ligand binding clefts. *J Biol Chem* **283**: 22885-22889

- Prodromou C, Panaretou B, Chohan S, Siligardi G, O'Brien R, Ladbury JE, Roe SM, Piper PW, Pearl LH (2000) The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J* **19**: 4383-4392
- Prodromou C, Siligardi G, O'Brien R, Woolfson DN, Regan L, Panaretou B, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1999) Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J* **18**: 754-762
- Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L (2006) The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* **63**: 2560-2570
- Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC (2005) Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol* **23**: 630-639
- Rhode SL, 3rd (1985) trans-Activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *J Virol* **55**: 886-889
- Rhode SL, 3rd, Paradiso PR (1983) Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation. *J Virol* **45**: 173-184
- Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1999) Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem* **42**: 260-266
- Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M (2005) Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev* **19**: 570-582
- Rommelaere J, Cornelis JJ (2001) Autonomous parvoviruses. In "Replication-competent viruses for cancer therapy", Hernáiz-Driever P, Rabkin SD (eds.), Karger, Basel, 100-129,
- Russell R, Wali Karzai A, Mehl AF, McMacken R (1999) DnaJ dramatically stimulates ATP hydrolysis by DnaK: insight into targeting of Hsp70 proteins to polypeptide substrates. *Biochemistry* **38**: 4165-4176
- Saddler C, Ouillette P, Kujawski L, Shangary S, Talpaz M, Kaminski M, Erba H, Shedden K, Wang S, Malek SN (2008) Comprehensive biomarker and genomic analysis identifies p53 status as the major determinant of response to MDM2 inhibitors in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **111**: 1584-1593
- Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* **12**: 2831-2841
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- San RH, Laspia MF, Soiefer AI, Maslansky CJ, Rice JM, Williams GM (1979) A survey of growth in soft agar and cell surface properties as markers for transformation in adult rat liver epithelial-like cell cultures. *Cancer Res* **39**: 1026-1034
- Santarosa M, Favaro D, Quaia M, Galligioni E (1997) Expression of heat shock protein 72 in renal cell carcinoma: possible role and prognostic implications in cancer patients. *Eur J Cancer* **33**: 873-877
- Sasaki T, Gan EC, Wakeham A, Kornbluth S, Mak TW, Okada H (2007) HLA-B-associated transcript 3 (Bat3)/Scythe is essential for p300-mediated acetylation of p53. *Genes Dev* **21**: 848-861
- Saudan P, Vlach J, Beard P (2000) Inhibition of S-phase progression by adeno-associated virus Rep78 protein is mediated by hypophosphorylated pRb. *EMBO J* **19**: 4351-4361

- Scarlata S, Carter C (2003) Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochim Biophys Acta* **1614**: 62-72
- Schantl JA, Roza M, De Jong AP, Strous GJ (2003) Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein (SGT) interacts with the ubiquitin-dependent endocytosis (UbE) motif of the growth hormone receptor. *Biochem J* **373**: 855-863
- Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU, Moarefi I (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**: 199-210
- Schmidt M, Afione S, Kotin RM (2000) Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53. *J Virol* **74**: 9441-9450
- Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C (2007) Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* **81**: 15-27
- Schulte TW, An WG, Neckers LM (1997) Geldanamycin-induced destabilization of Raf-1 involves the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **239**: 655-659
- Segnitz B, Gehring U (1997) The function of steroid hormone receptors is inhibited by the hsp90-specific compound geldanamycin. *J Biol Chem* **272**: 18694-18701
- Shangary S, Wang S (2009) Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**: 223-241
- Sharma M, Burre J, Sudhof TC (2011) CSPalpha promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nat Cell Biol* **13**: 30-39
- Shein HM, Enders JF (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**: 1164-1172
- Sikorski RS, Boguski MS, Goebel M, 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**: 307-317
- Smith JR, Clarke PA, de Billy E, Workman P (2009) Silencing the cochaperone CDC37 destabilizes kinase clients and sensitizes cancer cells to HSP90 inhibitors. *Oncogene* **28**: 157-169
- Solit DB, Ivy SP, Kopil C, Sikorski R, Morris MJ, Slovin SF, Kelly WK, DeLaCruz A, Curley T, Heller G, Larson S, Schwartz L, Egorin MJ, Rosen N, Scher HI (2007) Phase I trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* **13**: 1775-1782
- Sommer S, Fuqua SA (2001) Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol* **11**: 339-352
- Sondermann H, Scheufler C, Schneider C, Hohfeld J, Hartl FU, Moarefi I (2001) Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science* **291**: 1553-1557
- Song J, Takeda M, Morimoto RI (2001) Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat Cell Biol* **3**: 276-282
- Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JL (1989) A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* **243**: 214-217
- Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF (2004) Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* **562**: 11-15
- Strebel K, Klimkait T, Martin MA (1988) A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* **241**: 1221-1223

- Stuart JK, Myszka DG, Joss L, Mitchell RS, McDonald SM, Xie Z, Takayama S, Reed JC, Ely KR (1998) Characterization of interactions between the anti-apoptotic protein BAG-1 and Hsc70 molecular chaperones. *J Biol Chem* **273**: 22506-22514
- Swain JF, Dinler G, Sivendran R, Montgomery DL, Stotz M, Gierasch LM (2007) Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker. *Mol Cell* **26**: 27-39
- Swanstrom R, Wills, JW (1997) Synthesis, assembly and processing of viral proteins. In "Retroviruses" Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 263-334
- Szabo A, Korszun R, Hartl FU, Flanagan J (1996) A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J* **15**: 408-417
- Takayama S, Krajewski S, Krajewska M, Kitada S, Zapata JM, Kochel K, Knee D, Scudiero D, Tudor G, Miller GJ, Miyashita T, Yamada M, Reed JC (1998) Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res* **58**: 3116-3131
- Takayama S, Reed JC (2001) Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat Cell Biol* **3**: E237-241
- Tan YJ, Fielding BC, Goh PY, Shen S, Tan TH, Lim SG, Hong W (2004) Overexpression of 7a, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus, induces apoptosis via a caspase-dependent pathway. *J Virol* **78**: 14043-14047
- Tattersall P (2006) The evolution of parvovirus taxonomy. In "Parvoviruses" Kerr J, Cotmore SF, Bloom ME, Linden RM, Parrish CR (eds.) Hodder Arnold, London
- Tavaria M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL (1996) A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* **1**: 23-28
- Terada K, Yomogida K, Imai T, Kiyonari H, Takeda N, Kadomatsu T, Yano M, Aizawa S, Mori M (2005) A type I DnaJ homolog, DjA1, regulates androgen receptor signaling and spermatogenesis. *EMBO J* **24**: 611-622
- Thress K, Evans EK, Kornbluth S (1999) Reaper-induced dissociation of a Scythe-sequestered cytochrome c-releasing activity. *EMBO J* **18**: 5486-5493
- Thress K, Henzel W, Shillinglaw W, Kornbluth S (1998) Scythe: a novel reaper-binding apoptotic regulator. *EMBO J* **17**: 6135-6143
- Thress K, Song J, Morimoto RI, Kornbluth S (2001) Reversible inhibition of Hsp70 chaperone function by Scythe and Reaper. *EMBO J* **20**: 1033-1041
- Tobaben S, Thakur P, Fernandez-Chacon R, Sudhof TC, Rettig J, Stahl B (2001) A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron* **31**: 987-999
- Tobaben S, Varoqueaux F, Brose N, Stahl B, Meyer G (2003) A brain-specific isoform of small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein binds to Hsc70 and the cysteine string protein. *J Biol Chem* **278**: 38376-38383
- Todaro GJ, Green H (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* **17**: 299-313
- Toth KF, Knoch TA, Wachsmuth M, Frank-Stohr M, Stohr M, Bacher CP, Muller G, Rippe K (2004) Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci* **117**: 4277-4287
- Townsend PA, Stephanou A, Packham G, Latchman DS (2005) BAG-1: a multi-functional pro-survival molecule. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 251-259

- Trieb K, Lechleitner T, Lang S, Windhager R, Kotz R, Dirnhofer S (1998) Heat shock protein 72 expression in osteosarcomas correlates with good response to neoadjuvant chemotherapy. *Hum Pathol* **29**: 1050-1055
- Uma S, Hartson SD, Chen JJ, Matts RL (1997) Hsp90 is obligatory for the heme-regulated eIF-2alpha kinase to acquire and maintain an activable conformation. *J Biol Chem* **272**: 11648-11656
- Uozaki H, Ishida T, Kakiuchi C, Horiuchi H, Gotoh T, Iijima T, Imamura T, Machinami R (2000) Expression of heat shock proteins in osteosarcoma and its relationship to prognosis. *Pathol Res Pract* **196**: 665-673
- Vanacker JM, Corbau R, Adelmant G, Perros M, Laudet V, 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
- Vassilev LT (2004) Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle* **3**: 419-421
- Voellmy R, Boellmann F (2007) Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Adv Exp Med Biol* **594**: 89-99
- Vogel M, Mayer MP, Bukau B (2006) Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker. *J Biol Chem* **281**: 38705-38711
- Vos MJ, Hageman J, Carra S, Kampinga HH (2008) Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry* **47**: 7001-7011
- Wall D, Zylicz M, Georgopoulos C (1994) The NH2-terminal 108 amino acids of the Escherichia coli DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication. *J Biol Chem* **269**: 5446-5451
- Ward DC, Dadachanji D (1978) Replication of minute virus of mice DNA. In "Replication of mammalian parvoviruses" Ward DC, Tattersall P (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Wegele H, Haslbeck M, Reinstein J, Buchner J (2003) Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. *J Biol Chem* **278**: 25970-25976
- Wegele H, Wandinger SK, Schmid AB, Reinstein J, Buchner J (2006) Substrate transfer from the chaperone Hsp70 to Hsp90. *J Mol Biol* **356**: 802-811
- Weinstein IB, Joe AK (2006) Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* **3**: 448-457
- Whitesell L, Bagatell R, Falsey R (2003) The stress response: implications for the clinical development of hsp90 inhibitors. *Curr Cancer Drug Targets* **3**: 349-358
- Whitesell L, Lindquist SL (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* **5**: 761-772
- Whitesell L, Sutphin P, An WG, Schulte T, Blagosklonny MV, Neckers L (1997) Geldanamycin-stimulated destabilization of mutated p53 is mediated by the proteasome in vivo. *Oncogene* **14**: 2809-2816
- Winnefeld M (2006) Funktionelle Analyse des small glutamine-rich TPR-containing Proteins (SGT) in humanen Kulturzellen. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- Winnefeld M, Grewenig A, Schnolzer M, Spring H, Knoch TA, Gan EC, Rommelaere J, Cziepluch C (2006) Human SGT interacts with Bag-6/Bat-3/Scythe and cells with reduced levels of either protein display persistence of few misaligned chromosomes and mitotic arrest. *Exp Cell Res* **312**: 2500-2514

- Winnefeld M, Rommelaere J, Cziepluch C (2004) The human small glutamine-rich TPR-containing protein is required for progress through cell division. *Exp Cell Res* **293**: 43-57
- Wolter S, Richards R, Armentrout RW (1980) Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus. *Biochim Biophys Acta* **607**: 420-431
- Workman P (2004) Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Lett* **206**: 149-157
- Xiao X, Zuo X, Davis AA, McMillan DR, Curry BB, Richardson JA, Benjamin IJ (1999) HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J* **18**: 5943-5952
- Yi F, Regan L (2008) A novel class of small molecule inhibitors of Hsp90. *ACS Chem Biol* **3**: 645-654
- Yin H, Wang H, Zong H, Chen X, Wang Y, Yun X, Wu Y, Wang J, Gu J (2006) SGT, a Hsp90beta binding partner, is accumulated in the nucleus during cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **343**: 1153-1158
- Young JC (2010) Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem Cell Biol* **88**: 291-300
- Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 781-791
- Zadori Z, Szelei J, Lacoste MC, Li Y, Gariepy S, Raymond P, Allaire M, Nabi IR, Tijssen P (2001) A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell* **1**: 291-302
- Zhang F, Saha S, Shabalina SA, Kashina A (2010) Differential arginylation of actin isoforms is regulated by coding sequence-dependent degradation. *Science* **329**: 1534-1537
- Zhang M, Windheim M, Roe SM, Pegg M, Cohen P, Prodromou C, Pearl LH (2005) Chaperoned ubiquitylation--crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex. *Mol Cell* **20**: 525-538
- Zhang T, Hamza A, Cao X, Wang B, Yu S, Zhan CG, Sun D (2008) A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* **7**: 162-170
- Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **272**: 1606-1614
- Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R (1998) Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* **94**: 471-480
- Zuker M, Jaeger JA, Turner DH (1990) Predicting optimal and suboptimal secondary structure for RNA. *Methods Enzymol* **183**: 281-306