

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom Ingenieurin für Biotechnologie

Sylvie Lachmann

aus Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2003

INAUGURAL-DISSERTATION

Funktionelle Bedeutung der Protein-Kinase C η im Infektionszyklus des autonomen Parvovirus *Minute Virus of Mice*

zur

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

vorgelegt von

Diplom Ingenieurin für Biotechnologie

Sylvie Lachmann

aus Berlin

Mai 2003

Funktionelle Bedeutung der Protein-Kinase C η
im Infektionszyklus des autonomen Parvovirus
Minute Virus of Mice

Gutachter: PD Dr. Hans-Hermann Gerdes
Prof. Dr. Lutz Gissmann

Für Dich, Papa ...

Danksagung

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

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Jean Rommelaere für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, das Interesse am Fortgang meiner Arbeit, anregende Diskussionen in den Laborseminaren sowie für so manch ein aufmunterndes Späßchen bedanken.

PD Dr. Hans-Hermann Gerdes und Prof. Dr. Lutz Gissmann danke ich sehr für die Begutachtung dieser Arbeit.

Für das interessante Thema, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft zu fast jeder Tageszeit und die vielen fruchtbaren wissenschaftlichen Anregungen möchte ich mich bei Dr. Jürg Nüesch ganz herzlich bedanken. Nicht zuletzt habe ich auch die exzellente praktische Unterstützung der Laborarbeit durch Bereitstellung zahlreicher Konstrukte und Zelllinien sowie die unermüdliche Motivation in mehr als drei Jahren sehr zu schätzen gewußt.

Herzlich gedankt sei ebenfalls Frau Claudia Plotzky für die ausgezeichnete technische Unterstützung insbesondere bei der Proteinanalytik.

Den gesamten Mitgliedern des Labors 2.208 möchte ich für die sehr angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken. Hier danke ich insbesondere Dr. Laurent Daeffler für interessante wissenschaftliche Diskussionen und Inspirationen.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Nathalie Salomé für die fachkundige Einweisung in die Benutzung des konfokalen Mikroskops.

Mein Dank gilt auch Frau Ellen Burkhard für ihre permanente Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung in allen organisatorischen Unterfangen.

Außerdem möchte ich mich besonders herzlich bei den Frauen Doktorinnen Xanthippi Apsi — für arbeitserleichternde Tips im Labor und die zuverlässigen Protokolle für die Immunpräzipitation und Silberfärbung — sowie Kristiane Wetzels und Claudia Wrzesinski für die abwechslungsreiche Zeit bedanken, die ihr sowohl innerhalb als auch außerhalb des Labors mit mir verbracht habt.

Für das fleißige, gründliche und gleichermaßen kritische Korrekturlesen möchte ich Esther, Jana, Petra und Kristiane herzlichst danken.

Darüber hinaus möchte ich mich besonders bei Thomas Holz für die freundliche, zügige und kompetente Handhabung meiner unzähligen Computerprobleme bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meiner lieben Mutti von ganzem Herzen für ihre unschätzbare Unterstützung und Motivation, ihr Interesse in all den Jahren und nicht zu vergessen, für ihre Mühe und Gründlichkeit beim Korrekturlesen dieser Dissertation.....

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	1
1. Einleitung	2
1.1. Parvoviren	2
1.1.1. Taxonomie der Parvoviren	3
1.1.2. Organisation des MVMP-Genoms	4
1.1.3. <i>Minute Virus of Mice</i> (MVM)	5
1.1.4. Der parvovirale Infektionszyklus	6
1.1.5. Die parvovirale Replikation	9
1.1.5.1. Die virale Replikation findet in distinkten Kernstrukturen statt	9
1.1.5.2. Enzymologie der viralen DNA-Replikation	10
1.1.5.3. Verlauf der MVM-Replikation	11
1.1.6. Die regulatorischen Proteine von MVMP: NS1 und NS2	13
1.1.6.1. Das kleine Nichtstrukturprotein NS2	13
1.1.6.2. Das große Nichtstrukturprotein NS1	13
1.2. Regulation von NS1 durch Phosphorylierung	16
1.2.1. Regulation von NS1 durch Protein-Kinase C	17
1.2.2. Die Protein-Kinase C Familie	18
1.2.3. Signalkaskade zur Aktivierung der PKC	20
1.2.4. Funktionen von PKC in der Zelle	22
1.3. Das Zytoskelett der Zelle	24
1.3.1. Aufbau des Zytoskeletts	24
1.3.1.1. Die Mikrotubuli	24
1.3.1.2. Die Intermediärfilamente	25
1.3.1.3. Die Mikrofilamente	26
1.3.1.4. Die Ezrin Radixin Moesin (ERM)-Familie	27
1.3.2. Bedeutung des Zytoskeletts für bakterielle und virale Pathogene	29
1.4. Zielsetzung der Arbeit	31
2. Material und Methoden	32
2.1. Materialien	32
2.1.1. Zelllinien, Virus- und Bakterienstämme	32
2.1.1.1. Zelllinien	32
2.1.1.2. Virusstamm	32
2.1.1.3. Bakterienstämme	32
2.1.2. Medien und Zusätze	33
2.1.3. Plasmide	33
2.1.4. DNA-Oligonukleotide	33
2.1.5. Antikörper	34
2.1.5.1. Primäre Antikörper	34
2.1.5.2. Sekundäre Antikörper	35
2.1.6. Seren	35
2.1.7. Enzyme	35
2.1.8. Molekularbiologische Reagenziensätze	36
2.1.9. Größenstandards	36
2.1.9.1. DNA-Größenstandard	36
2.1.9.2. Protein-Molekulargewichtstandards	36

2.1.10. Radioaktives Material	36
2.1.11. Chemikalien	36
2.1.12. Spezielle Geräte	37
2.2. Methoden	38
2.2.1. Mikrobiologische Methoden	38
2.2.1.1. Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien Stämmen	38
2.2.1.2. Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien	38
2.2.1.3. CaCl ₂ -Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA durch Hitzeschock	38
2.2.2. Molekularbiologische Methoden	38
2.2.2.1. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38
2.2.2.2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	38
2.2.2.3. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	39
2.2.2.4. Enzymatische Modifizierung von DNA durch Dephosphorylierung	39
2.2.2.5. Phenol- und Chloroform- Extraktionen	39
2.2.2.6. Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	39
2.2.2.7. Agarosegelelektrophorese	39
2.2.2.8. Ligation	39
2.2.2.9. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	40
2.2.2.10. Hybridisierung von Oligonukleotiden	40
2.2.2.11. Sequenzierung	40
2.2.2.12. RNA-Extraktion mit heißem Phenol	40
2.2.2.13. Aufreinigung von mRNA durch magnetische Partikel	41
2.2.2.14. Klonierung von cDNA	41
2.2.2.15. Nachweis von DNA durch <i>Southern Blotting</i>	41
2.2.2.16. Radioaktive Markierung von DNA mit Zufallsoligomeren	42
2.2.3. Zellbiologische Methoden	42
2.2.3.1. Kultivierung von Säugerzellen	42
2.2.3.2. Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen	42
2.2.3.3. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer	42
2.2.3.4. Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen	42
2.2.3.5. Radioaktive Markierung von Proteinen <i>in vivo</i>	43
2.2.3.6. <i>In vivo</i> BrdU-Markierung von replizierender DNA	44
2.2.4. Virologische Methoden	44
2.2.4.1. Virusinfektion von Säugerzellen	44
2.2.4.2. Virusvermehrung und Aufreinigung	44
2.2.4.3. Dichtebestimmung	44
2.2.4.4. Bestimmung des viralen Titers	44
2.2.4.5. Isolierung viraler DNA aus Säugerzellen zur Analyse der <i>in vivo</i> Replikation	45
2.2.4.6. Herstellung rekombinanter Vaccinia Viren	45
2.2.4.7. Identifizierung rekombinanter Vaccinia Viren und Expression heterologer Proteine	46
2.2.4.8. Produktion und Titration rekombinanter Vaccinia Virusstocks	46
2.2.5. Biochemische Proteinanalytik	46
2.2.5.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Säugerzellen für SDS-PAGE	46
2.2.5.2. Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	46
2.2.5.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.2.5.4. Transfer von Proteinen (<i>Western Blotting</i>)	47
2.2.5.5. Immunreaktion und ECL-Detektion	47
2.2.5.6. Auftrennung von Proteinen durch Fraktionierungen	48
2.2.5.7. Nachweis von Proteinen mittels Immunfluoreszenz	49
2.2.5.8. Immunpräzipitation	49
2.2.5.9. Färbung von Proteinen	50
2.2.5.10. Autoradiographie von Polyacrylamid-Gelen	50
2.2.5.11. <i>In vitro</i> Transkription/Translation	50
2.2.5.12. Expression heterologer Proteine durch <i>Escherichia coli</i>	51
2.2.5.13. Expression heterologer Proteine mittels rekombinanter Vaccinia Viren in Säugerzellen	51
2.2.5.14. Aufreinigung von His ₆ -Fusionsproteinen durch Nickelchelatchromatographie	51
2.2.5.15. Alkalische Phosphatase-Behandlung von Proteinen	52
2.2.5.16. <i>In vitro</i> Phosphorylierung von Proteinen	52
2.2.5.17. Analyse von Peptid - Phosphorylierungsmustern mittels tryptischer 2D- Elektrophorese	52

2.2.5.18. <i>In vitro</i> Replikationsassay	53
2.2.5.19. <i>In vitro</i> Aktin-Kosedimentierungsassay	53
2.2.5.20. Auftrennung von Zytoskelettfilamenten mittels Sucrosegradienten	54
3. Ergebnisse	55
3.1. Regulierung der viralen DNA-Replikation durch NS1-Phosphorylierung	55
3.1.1. PKC η aktiviert NS1 für die DNA-Amplifikation zusammen mit PKC λ	55
3.1.2. Einfluß von PKC η auf die DNA-Replikation von MVM in der infizierten Zelle	61
3.1.2.1. Herstellung und Charakterisierung von A9-Zelllinien, die PKC η -Mutanten produzieren	61
3.1.2.2. NS1-Phosphorylierung durch PKC η	69
3.1.2.3. Inaktive PKC η -Mutanten blockieren die MVM-DNA-Replikation	71
3.2. Regulation von PKCη	76
3.2.1. Ermittlung des Aktivitätszustandes von PKC-Isoformen	77
3.2.1.1. Änderung des Löslichkeitsverhaltens nach MVM-Infektion	77
3.2.2. Subzelluläre Lokalisation der NS1-aktivierenden Kinasen PKC λ und PKC η	80
3.2.2.1. Die MVM-Infektion beeinflusst die intrazelluläre Verteilung von PKC-Isoformen- Nachweis durch Kompartiment-Fraktionierung	82
3.2.3. Subzelluläre Lokalisation von PKC η Mutanten	84
3.2.4. Aktivitätszustand von PDK-1 in A9-Zellen	87
3.2.4.1. Überexpression von PDK-1-Mutanten zur Analyse des PKC η - Aktivitätszustandes	89
3.2.4.2. Aktivierung von PKC η durch die MVM-Infektion ist abhängig von PDK-1	92
3.2.5. MVM greift aktiv in intrazelluläre Signaltransduktionswege ein	96
3.2.5.1. Modell zum Ablauf einer MVM-induzierten Aktivierung des PI3-Kinase Signalweges	96
3.3. Mediatorproteine für die Regulation von PKCη	99
3.3.1. PKC η beeinflusst das Löslichkeitsverhalten der ERM-Proteine	100
3.3.2. Radixin ist kein direktes Substrat von PKC η	102
3.3.4. Radixin kolokalisiert mit PKC η -Mutanten	104
3.3.5. Eine Interaktion von Radixin kann mit der katalytisch inaktiven Mutante PKC η T512A durch Kopräzipitation nachgewiesen werden	107
3.4. Interaktion von PKCη mit dem Zytoskelett	111
3.4.1. Die Mikro- und Intermediärfilamente, nicht aber die Mikrotubuli, werden durch eine MVM-Infektion umstrukturiert und abgebaut	112
3.4.2. Die Präsenz der viralen Proteine beeinflusst die Aktin- Filamentvernetzung <i>in vitro</i>	117
3.4.3. Assoziation der ERM-Proteine zu neu polymerisiertem Aktin erfolgt unabhängig von PKC η	119
4. Diskussion	123
5. Literaturverzeichnis	141
6. Anhang	161
6.1. Plasmidkonstruktion und Klonierung von PKCη-Mutanten	161
6.1.1. Klonierung von PKC η cDNA	161
6.1.2. PKC η -Varianten	161
6.2. Expressionsvektoren	162

Abkürzungsverzeichnis

1D/2D	eindimensional/zweidimensional
α	anti
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
ABP	ADV-Bindungsprotein
ADF	<i>actin depolymerising factor</i>
ADV	<i>Aleutian Mink Disease Virus</i>
AGC Kinasen	durch zyklische Nukleotide und DAG, Phospholipide regulierte Protein-Kinase-Familie PKA, PKG, PKC
AKAP	<i>A Kinase anchoring protein</i>
APAR <i>bodies</i>	<i>Autonomous Parvovirus Associated Replication-bodies</i>
Arp 2/3 Komplex	<i>actin-related proteins 2/3</i> Komplex
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BC 1-4	<i>basic cluster 1-4</i>
bp	Basenpaar(e)
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaMKII	Calmodulin abhängige Protein Kinase II
CBB	Coomassie Brilliant Blau
Cdc2 Kinase	<i>cell division cycle 2</i> Kinase, (äquivalent zu Cdk1)
Cdk	<i>cyclin dependent kinase</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio] propansulfonat
CKII	Casein Kinase II
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A ₂
CPV	<i>Canine Parvovirus</i>
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
CRM1	<i>chromosome region maintenance protein 1</i>
Cy2	Carboxycyanin
Cy3	Indocarbocyanin
DAG	Diacylglycerol (Glycerol-Derivat, dessen erste und zweite Hydroxylgruppe mit langkettigen Acyl-Fettsäuren ersetzt sind)
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DOC	<i>Deoxycholic acid</i>
dRF	dimere replikative Form
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E3KARP	<i>Exchanger 3</i> Kinase A regulatorisches Protein
EBP-50	ERM-Bindungsphosphoprotein 50
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
eRF	<i>extended</i> replikative Form
ERM	Ezrin Radixin Moesin
FCS	fötales Kälberserum
FERM	4.1-ERM
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPV	<i>Feline Parvovirus</i>
GAP	GTPase <i>activating protein</i>
H-1	Parvovirus H-1
HA	Hydroxylapaptit
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure

HGF/SF	<i>hepatocyte growth factor /scattered factor</i>
His	Histidin
HMG ½	<i>high mobility group proteins 1 und 2</i>
HPIV	humanes Parainfluenzavirus
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
Hsc70	<i>heat shock cognate protein 70</i>
Hsp70	<i>heat shock protein 70</i>
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFAP	Intermediärfilament-assoziierte Proteine
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
Kap.	Kapitel
LB	<i>Luria Broth</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MAPs	Mikrotubuli assoziierte Proteine
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEM	<i>Eagle's Minimal Essential Medium</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRF	monomere replikative Form
MtOC	<i>microtubule organizing centre</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MVM	Parvovirus <i>Minute Virus of Mice</i>
MW	Molekulargewicht
NF-kappaB	nukleärer Faktor kappa B
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
NP40	Nonidet® –P40
NS1/2	Nichtstrukturproteine 1 und 2
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p.i.	<i>post infection</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDK	<i>Phosphoinositid-dependent Kinase</i>
PDZ	<i>postsynaptic density PSD-95/SAP9/, Drosophila septate junction protein disc large/, tight junction protein ZO-1 Homologie Domäne</i>
Pfu	<i>plaque forming unit</i>
PH	Pleckstrin Homologie-Domäne
PI3K	<i>Phosphoinositid 3-Kinase</i>
PIF	<i>Parvovirus initiation factor</i>
PIP	<i>Phosphatidylinositolphosphat</i>
c,n,a PKC	<i>conventional, novel, atypical Protein-Kinase C</i>
h,m PKC	humane, murine PKC
PKD	Protein-Kinase D
PLC	Phospholipase C
PML-bodies	<i>promyelytic leukemia gene product bodies</i>
pol α/δ	Polymerase α/δ
Poly A	Polyadenylierungssignal
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PS	Phosphatidylserin
RCR	<i>rolling circle replication</i>
Rdx	Radixin
RhoGDI	<i>Rho GDP dissociation inhibitor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

ROCKII/ ROK α	<i>Rho-associated coiled-coil kinase II/ Rho Kinase α</i>
RPA	Replikationsprotein A
RSV	Rous Sarkoma Virus
RT	Raumtemperatur
RTT	Rev- Tubulin toroidaler Komplex
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAAB	SMN- <i>associated APAR-bodies</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGT	<i>small glutamine rich tetratricopeptide repeat protein</i>
SH2	Src Homologie Domäne 2
SMN	<i>survival motor neuron</i>
ss	<i>single stranded</i>
SSC	Salzlösung aus Natriumchlorid und Natriumzitat
STICKs	<i>Substrates for interacting C Kinase</i>
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Azetat-EDTA Puffer
<i>tar-</i>	<i>trans-activation response</i>
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPA	Tetradecanoylphorbol-13-acetate
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
UPM	Universal Primer Mix
UV	ultraviolettes Licht
VF	Verdünnungsfaktor
v/v	Volumenanteil pro Volumen
VP1/2/3	virales Protein 1/2/3
VTE	Virus-Tris-EDTA- Puffer
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

<i>Nummer</i>		<i>Seite</i>
1:	Stammbaumschema der Familie der <i>Parvoviridae</i> mit Nennung einiger wichtiger Vertreter	3
2:	Organisation des MVMp-Genoms und Kodierungsstrategie	4
3:	Dreidimensionale Struktur von MVM	6
4:	Infektionszyklus autonomer Parvoviren	7
5:	Vereinfachte Darstellung der Replikationsgabel am <i>origin</i> des MVM-Genoms	10
6:	Schema der DNA-Replikation von MVMp	12
7:	Schematische Darstellung des NS1-Proteins	14
8:	Schematische Repräsentation der Primärstruktur von Protein-Kinase C Isoenzymen	19
9:	Schematische Darstellung der PKC-Aktivierungskaskade	21
10:	Vereinfachte Darstellung des Auf- und Abbaus von Aktinfilamenten	27
11:	Schematische Darstellung der ERM-Domänenstruktur durch Radixin repräsentiert	28
12:	Aufreinigung von NS1-regulierenden Kinasen aus einem HeLa-Zellextrakt	56
13:	Analyse der HA-2 Subfraktionen nach potentiellen Kinasen, die NS1 ^O für RCR aktivieren	57
14:	Reaktivierung von dephosphoryliertem NS1 in Replikationsassays	59
15:	Aufreinigung von rekombinanter PKC η	60
16:	Schematische Darstellung von PKC η und Mutagenese charakteristischer Motive	62
17:	Schema zur Herstellung von stabil transfizierten A9-Zelllinien welche PKC η Mutanten exprimieren	64
18:	Expressionsnachweis von PKC η -Mutanten	65
19:	Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie von endogener PKC η und <i>Flag</i> -markierten PKC η -Mutanten	67
20:	Phosphorylierung von NS1 durch PKC η <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	70
21:	MVM-DNA-Replikation in A9 und PKC η Mutanten-Zelllinien	72
22:	Detektion viraler DNA-Synthese auf Einzelzellebene mittels Immunfluoreszenz	74
23:	Quantitative Auswertung der viralen DNA-Syntheserate auf Einzelzellebene	75
24:	Schematische Darstellung der Aktivierungskaskade für konventionelle und <i>novel</i> PKC	76
25:	Löslichkeitsverschiebung ausgewählter PKC-Isoformen nach TPA-Stimulus	78
26:	Löslichkeitsverteilung verschiedener Kinasen nach MVM-Infektion	79
27:	Subzelluläre Lokalisation endogener PKC λ und η in A9-Zellen nach MVM-Infektion	81
28:	Verteilung ausgewählter Kinasen innerhalb der Zelle nach MVM-Infektion	83
29:	Subzelluläre Verteilung von PKC η Mutanten	86
30:	Subzelluläre Verteilung endogener PDK-1 nach MVM Infektion	88
31:	Schematische Darstellung und subzelluläre Lokalisation der PDK-1 Mutanten	90
32:	Expression und Löslichkeitsverteilung von PDK-1 Mutanten	92

<i>Nummer</i>	<i>Seite</i>
33: Löslichkeitsverteilung von PKC η in Zelllinien, welche PDK-1 Varianten exprimieren	93
34: Subzelluläre Lokalisation von PKC η und PDK-Varianten nach MVM Infektion	95
35: Immunpräzipitation der <i>in vivo</i> ³² P-markierten PKC η Mutante η T512A	98
36: Löslichkeitsverteilung von Radixin in Abhängigkeit von der PKC η –Aktivität	101
37: Aufreinigung von rekombinantem Radixin	102
38: <i>In vitro</i> Phosphorylierung von Radixin durch ausgewählte Kinasen	103
39: Kolokalisierung von Radixin mit PKC η	105,106
40: Immunpräzipitation von Radixin und PKC η	108
41: Koimmunpräzipitation von ³⁵ S metabolisch markierter PKC η und Radixin	109
42: Identifizierung von PKC η aus Radixin Koimmunpräzipitaten	110
43: Immunfluoreszenz der Zytoskelettveränderungen von A9-Fibroblastenzellen nach MVM-Infektion	113
44: Biochemische Analyse der durch MVM-Infektion induzierten Zytoskelettveränderungen	115
45: Schema der <i>in vitro</i> Assemblierung von Aktin	117
46: Analyse des <i>in vitro</i> assemblierten Aktins über Saccharosegradienten	118
47: Assoziierung von ERM-Proteinen mit <i>in vitro</i> assembliertem Aktin	120
48: Hypothetisches Modell der Aktivierung von PKC η durch ERM-Mediatorfunktion	122
49: Darstellung von Expressionsvektoren für (His) ₆ -Fusionsproteine	163
50: Darstellung des Clontech Vektors pCR-2.1 und Detailausschnitt der multiplen Klonierungsstelle (MCS) mit Angabe der wichtigsten Restriktionsschnittstellen und M13-Primerbindungssequenzen	165
51: Zirkuläre Darstellung des DsRed N1 Plasmids und Klonierungsstrategie zur Herstellung einer <i>Flag</i> -PKC λ Expressionskassette	166
52: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte zur Herstellung von pP38 <i>Flag</i> -Konstrukten	168

Zusammenfassung

Das multifunktionale große Nichtstruktur Protein NS1 des autonomen Parvovirus *Minute Virus of Mice* (MVM) wird posttranslational modifiziert und zumindest teilweise über Phosphorylierung reguliert. Aufgrund seiner enzymatischen Funktionen, wie die ATPase-, Helikase- und Nickase-Aktivitäten ist NS1 essentiell für die Initiierung der viralen Replikation. NS1 ist außerdem in der Lage, heterologe Promotoren zu transregulieren und wirkt zytotoxisch auf die Wirtszelle. Die atypische PKC λ -Isoform phosphoryliert und aktiviert NS1 für Helikase-Funktionen. Diese Aktivierung allein ist jedoch nicht ausreichend, um das virale Protein für die rollende Haarnadelreplikation (*rolling circle replication*) *in vitro* zu stimulieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine weitere zelluläre Kinase, PKC η , identifiziert werden, die NS1 *in vitro* phosphoryliert und so das virale Polypeptid zusammen mit PKC λ für die *rolling circle* Replikation stimuliert. Diese Funktion von PKC η wurde mittels *in vivo* Analysen bestätigt. Dazu wurde die permissive Maus-Fibroblastenzelllinie, A9, stabil mit *Flag*-Epitop markierten Mutanten transfiziert, die die endogene PKC η -Aktivität modulieren. Es resultierten A9 Derivat-Zelllinien mit konstitutiv aktiver oder Kinase-inaktiver PKC η . Eine tryptische Phosphopeptid-Analyse von ³²P-markiertem NS1 ergab, daß in Gegenwart einer dominant negativen PKC η -Mutante distinkte Phosphorylierungsereignisse ausblieben. Diese Beobachtung korrelierte mit einer defizienten Synthese an viralen DNA-Replikationsintermediaten der Gesamtzellpopulation im *Southern Blotting* sowie auf Einzelzellebene mittels BrdU-Inkorporation. Die Ergebnisse belegen damit die Bedeutung der PKC η -Phosphorylierungen von NS1 für die Stimulierung der parvoviralen Replikation.

Interessanterweise löst die MVM-Infektion eine Akkumulierung endogener PKC η in der nukleären Peripherie aus, was als Zeichen der intrazellulären Aktivierung interpretiert wird. Folgerichtig konnte durch Expression einer Kinase-inaktiven Mutante der PKC-aktivierenden *upstream*-Kinase PDK-1 diese Translokation von endogener PKC η nach MVM-Infektion unterbunden werden. Außerdem konnte mittels Fraktionierung gezeigt werden, daß ein Zusammenhang zwischen der PKC η -Aktivität und der Verteilung der Ezrin Radixin Moesin (ERM)-Proteine *in vivo* besteht, die mit PKC η aus einem NS1-aktivierenden zellulären Extrakt über mehrere chromatographische Schritte zusammen aufgereinigt worden waren. Darüberhinaus kolokalisierte Radixin in Immunfluoreszenzanalysen mit den PKC η -Volllänge-Mutanten an der Plasmamembran. Daraus wurde geschlossen, daß die ERM-Proteine eine Rolle beim Transport von PKC η zur Plasmamembran spielen könnten. Durch Immunpräzipitation wurde eine spezifische Interaktion zwischen Radixin und der Kinase-inaktiven PKC η T512A gezeigt, deren funktionelle Relevanz jedoch noch nicht geklärt ist.

Da die beobachtete Aktivierung von PKC η zu Zeitpunkten auftritt, an denen die virale Replikation bereits weit fortgeschritten ist, liegt die Vermutung nahe, daß die Kinase hier möglicherweise weitere, für den viralen Vermehrungszyklus vorteilhafte, Funktionen erfüllt. Es wurde angenommen, daß MVM dieselben Kinase-Aktivitäten, die es zur Initiierung der viralen DNA-Replikation benötigt, auch für die Virus-induzierten morphologischen- und Zytoskelettveränderungen der Wirtszelle ausnutzen könnte. Aus diesem Grund wurden die nach Infektion auftretenden Zytoskelettalterationen anhand von Markerproteinen in der murinen Wirtszelle A9 sowie den Derivaten mit modulierter PKC η -Aktivität untersucht und miteinander verglichen. So konnten die beobachteten Strukturveränderungen der Wirtszelle erstmals konkret auf Modifikationen der Mikrofilamente sowie Intermediärfilamente zurückgeführt werden. Eine Rolle für PKC η in diesen Abbau- und Deassemblierungsvorgängen konnte allerdings nicht gezeigt werden.

1. Einleitung

1.1. Parvoviren

Die hüllenlosen Parvoviren gehören selbst unter den Viren zu den kleinsten Vertretern (lateinisch *parvus*- klein). Ein ikosaedrisches 18-26 nm großes Kapsid umschließt ihr einzelsträngiges lineares DNA-Genom, das durch seine geringe Größe von circa 5000 Nukleotiden nur für wenige virale Proteine kodieren kann.

Entdeckt wurden die Parvoviren erstmalig in den 60iger Jahren, als sie aus Tumoren, Tumorzelllinien oder mit Karzinogenen behandelten Versuchstieren isoliert werden konnten (Kilham, 1959; Toolan, 1962; Lum, 1963). Als Konsequenz daraus sprach man ihnen anfänglich, ähnlich wie den großen DNA-Viren (Herpes-, Papillomviren), onkogene Eigenschaften zu. Der Zusammenhang zwischen Viruspräsenz als Auslöser der neoplastischen Transformation konnte jedoch von Toolan (Toolan, 1967) widerlegt werden, da im Labor infizierte Hamster nach einer Parvovirus-Infektion im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren keine erhöhte Zahl an Tumoren aufwiesen. Genauere Untersuchungen zeigten sogar eine Wachstumshemmung bereits vorhandener oder eine verminderte Etablierung neuer Tumoren (Guetta, 1986; Dupressoir, 1989). Dieser als onkosuppressiv bezeichnete Effekt ließ sich bei einer Reihe von malignen Neoplasien, wie Leukämien, Sarkomen und Karzinomen bestätigen (Guetta, 1986; Yang, 1987; Van Pachterbeke, 1993).

Ihre antionkogene Wirkung macht Parvoviren als potentielle Vektoren für die Krebstherapie attraktiv. In präklinischen Studien an Mäusen zeichnen sich erste Erfolge bei der Wachstumshemmung und Etablierung transplantierte Tumoren in Kombination mit Chemokinen und Interleukinen ab (Giese, 2002; Wetzel, 2001). Eine kurative Wirkung bereits bestehender Tumoren durch autonome Parvoviren ist hingegen mit den gegenwärtigen Vektoren gering. Eine Ursache hierfür ist, daß transformierte Zellen in Versuchstieren nicht selektiv (onkotropisch) infiziert werden. Die virale DNA wird auch in, von der intratumoralen Injektionsstelle entfernten, nicht malignen Organen, insbesondere in lymphatischen Zellen nachgewiesen (N. Giese, DKFZ unveröffentlicht). Die Permissivität einer Wirtszelle richtet sich nicht allein nach dem Vorliegen des viralen Rezeptors. Vielmehr sind die Viren zur Replikation und Proteinexpression auf intrazelluläre Faktoren angewiesen, die bevorzugt in wenig differenzierten, schnell proliferierenden Zellen vorhanden sind (Gardiner, 1988b; Cotmore, 1987; Rommelaere, 1991). Das Studium der Parvoviren kann also einen Beitrag zum Verständnis intrazellulärer Faktoren leisten, durch die sich maligne/transformierte Zellen von nicht transformierten unterscheiden. Außerdem sollten Mechanismen, die zur preferentiellen Lyse transformierter gegenüber nicht transformierter Zellen durch Parvoviren

führen, weiter untersucht werden. Hier könnten sich Hinweise ergeben, wie mittels spezifischer Toxine ein selektives Abtöten von Krebszellen möglich wäre. Entsprechend dieser Aspekte wären Erkenntnisse über die Regulationsvorgänge des großen Nichtstrukturproteins NS1 durch Phosphorylierung äußerst interessant und ermöglichten auch Einblicke über die zytotoxischen Auswirkungen einer parvoviralen Infektion auf die Wirtszelle.

1.1.1. Taxonomie der Parvoviren

Die Familie der *Parvoviridae* wird in zwei Unterfamilien eingeteilt, die Wirbeltierinfizierenden *Parvovirinae* und die Insekten-infizierenden *Densovirinae*. Beide Unterfamilien setzen sich aus verschiedenen Gattungen zusammen, wobei im folgenden lediglich auf die *Parvovirinae* kurz eingegangen werden soll, da nur sie Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind (Abb. 1).

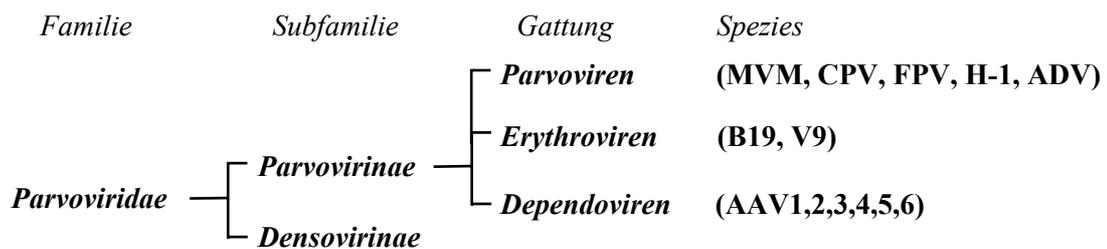


Abb. 1: Stammbaumschema der Familie der *Parvoviridae* mit Nennung einiger wichtiger Vertreter.

Die *Parvovirinae* umfassen mehr als dreißig Viren (Rommelaere, 2000), die aufgrund ihrer ähnlichen Struktur und ihres Genomaufbaus eng miteinander verwandt sind. Entsprechend ihrer Abhängigkeit von Helferviren für eine produktive Infektion unterscheiden sich die *Dependoviren* von den ausschließlich auf Wirtszellfaktoren angewiesenen autonom replizierenden Gattungen *Parvo-* und *Erythroviren* (Siegl, 1985). Zur Gattung der *Dependoviren* gehört die große Gruppe der Adeno-assoziierten Viren (AAV), bei denen neben Adenoviren (Atchison, 1965; Hoggan, 1966) auch andere Viren, wie Herpes- (Thomson, 1994; Buller, 1981) oder Papillomviren (Ogston, 2000; Walz, 1997) als Helferviren fungieren können. Die *Dependoviren* integrieren im Unterschied zu den autonomen *Parvoviren* in Abwesenheit der Helferviren spezifisch ins Genom der Wirtszelle (Chromosom 19q) (Berns, 1975). Bei den *Erythroviren* sind bisher zwei humanpathogene Viren bekannt, B19 und V9. Obwohl eine Infektion mit diesen erythroide Vorläuferzellen-infizierenden *Erythroviren* in der Regel symptomlos abläuft, kann es bei Schwangeren vermehrt zu Aborten, bei immunsupprimierten, anämischen Menschen oder Kindern auch zu Ringelröteln (*Erythema infectiosum*) führen (Hall, 1990; Kurtzman, 1987). Vertreter der

autonomen *Parvoviren* werden oft nach ihrem Wirtsorganismus benannt: *Canine Parvovirus* (CPV), *Aleutian Mink Disease Virus* (ADV) oder der Ratten-infizierende Stamm H-1. Sie werden vor allem mit dem in dieser Arbeit verwendeten Prototypstamm, *Minute Virus of Mice* (MVMp), in nachfolgenden Abschnitten näher beschrieben.

1.1.2. Organisation des MVMp-Genoms

Das einzelsträngige DNA-Genom von MVMp besteht aus 5149 Nukleotiden und liegt in negativer Polarität im Kapsid verpackt vor (Abb. 2 A, B). Aufgrund von asymmetrischen terminalen Wiederholungssequenzen, ITRs (*inverted terminal repeats*), bilden sich an beiden Enden des linearen Genoms spezifische Doppelstrangstrukturen aus. Am 3' Ende nimmt das 121 nt lange Palindrom eine Y- (*rabbit ear*) oder T-Form ein, am 5' Ende hingegen (246 nt) bildet sich eine U-Form (Astell, 1983). Die Unterschiede in den ITRs bewirken, daß die Verpackung der viralen DNA zu 99 % Minusstrang-spezifisch verläuft (Berns, 1995).

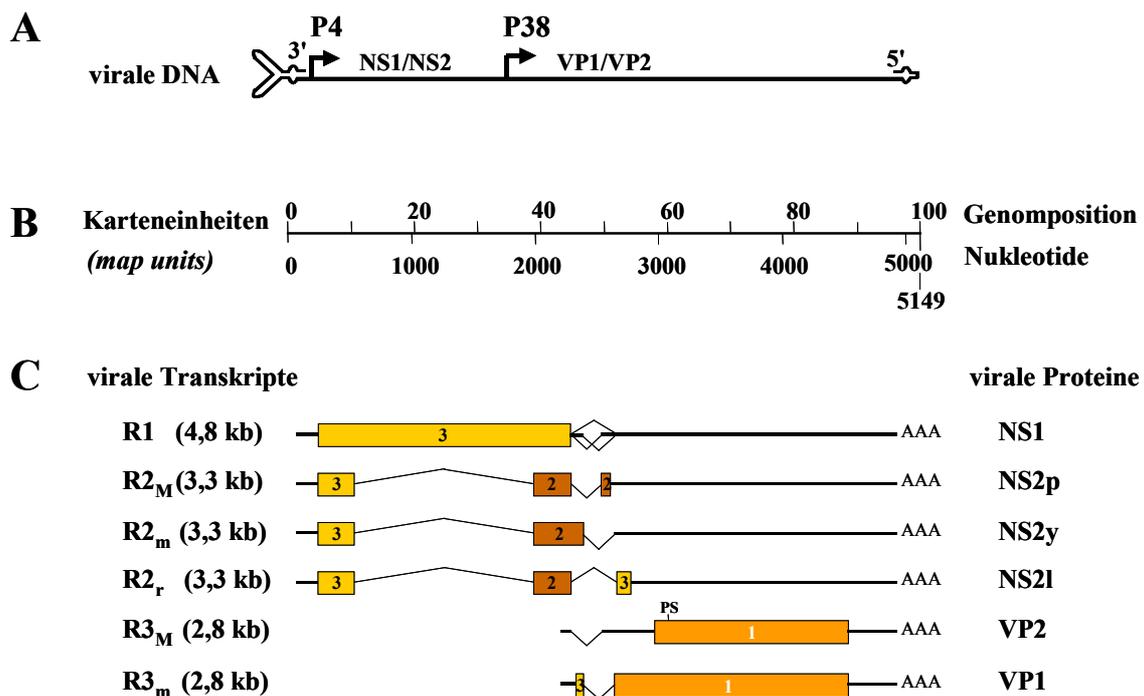


Abb. 2: Organisation des MVMp Genoms und Kodierungsstrategie. **A:** Schematische Darstellung des einzelsträngigen Genoms von negativer Polarität. Die beiden terminalen Haarnadelstrukturen sowie die Promotoren P4 und P38, welche die Nichtstruktur- (NS1/2) und Kapsidproteine (VP1/2) kodieren, sind angedeutet. **B:** Einteilung des Genoms in Karteneinheiten mit gleichzeitiger Angabe der Nukleotidpositionen. **C:** Das virale Genom kodiert für drei unterschiedliche Transkripte R1, R2 und R3, die durch verschiedene Spleißvarianten der kleinen Introns jeweils in drei Formen vorliegen (M: häufigste; m: seltenere; r: rare Transkriptform). Die viralen mRNAs kodieren für das Nichtstrukturprotein NS1 und für die drei Isoformen des NS2-Proteins (NS2p, NS2y und NS2l) sowie für die viralen Kapsidproteine VP1 und VP2. Die verwendeten Leseraster sind in den Boxen mit 1, 2 und 3 bezeichnet und stellen die Proteinsequenzen dar. AAA steht für den Poly A-Schwanz der mRNA.

Das virale Genom ist in zwei überlappenden Transkriptionseinheiten organisiert (Abb.: 2 C), die drei Klassen von Transkripten generieren (Pintel, 1983; Astell, 1986; Clemens, 1987). Alle Transkripte werden aufgrund eines einzigen Polyadenylierungssignals [AATAAA] nahe des 3' Endes terminiert (Pintel, 1983; Clemens, 1987). Die Synthese der beiden längsten Transkripte R1 (4,8 kb) und R2 (3,3 kb) wird vom viralen P4-Promotor aus gesteuert. Unter Verwendung der linksseitigen offenen Leserahmen (ORF 3) kodieren sie für die Nichtstrukturproteine NS1 (83 kDa) und NS2 (24 kDa) (Cotmore, 1986). Die P4-Promotoraktivität wird durch verschiedene Transkriptionsfaktorbindungselemente reguliert. Eine Stimulierung erfolgt durch eine GC-Box als Sp1/3-Bindungsstelle (Raab, 2002; Fuks, 1996; Krady, 1995) sowie durch CRE (*cAMP responsive element*) Konsensussequenzen (Perros, 1995). Außerdem wird die Promotoraktivität *ras*-abhängig (Spegelaere, 1991) durch Ets (Fuks, 1996) sowie S-Phase spezifisch durch E2F-Transkriptionsfaktoren induziert (Deleu, 1998, Deleu, 1999). Der P38-Promotor zur Synthese des R3 (2,8 kb) Transkripts wird erst durch NS1 (Lorson, 1996) transaktiviert und besitzt eine geringe basale Aktivität. Demzufolge werden die P4-Promotor generierten prä-mRNAs deutlich früher gebildet als die des P38. Das R3-Transkript kodiert vom rechten Leserahmen für die Strukturproteine VP1 und VP2.

Allen Transkripten ist eine Region von mehreren kleinen überlappenden Introns gemein, die durch spezifische Spleißvorgänge herausgeschnitten werden. Die Verwendung bestimmter Donor- (D1, D2) und Akzeptorstellen (A1, A2) alterniert und unterliegt geregelten Häufigkeiten (M- *major* 70 %, m- *minor* 25 % r- *rare* 5 %), wodurch drei verschiedene Isoformen des NS2 und die zwei Kapsidproteine entstehen (Abb. 2 C) (Jongeneel, 1986; Morgan, 1986; Clemens, 1990). Darüber hinaus ist das P4-gesteuerte R2 -Transkript noch durch ein großes Intron (μ 10 - 39) gekennzeichnet. Die Spleißereignisse bestimmen auch die im Gleichgewichtszustand vorliegende Menge an Transkripten in der Zelle, die entscheidend für einen optimalen Infektionsverlauf und die Regulation der Proteine im Hinblick auf die Replikationsfunktionen und die Zytotoxizität ist (Schoborg, 1991; Cotmore, 1990).

1.1.3. *Minute Virus of Mice* (MVM)

Der Prototyp des autonomen Parvovirus MVM kommt in zwei allotropen Varianten vor, einem Fibroblasten-spezifischen (MVMp) (Crawford, 1966) sowie einem immunosuppressiven, T-Lymphozyten-infizierenden, Stamm (MVMi) (Bonnard, 1976; McMaster, 1981). MVMp und MVMi sind zu 97 % auf Nukleotidbasis identisch. In den Kapsidproteinen differieren sie lediglich in 14 Aminosäuren (AS) (Agbandje-McKenna, 1998). Für die Unterschiede im Fibro-/Lymphotropismus sind hauptsächlich die AS-Positionen 317 und 321 des VP2 (allotropische Determinanten) verantwortlich (Maxwell, 1995; Ball-Goodrich, 1992).

Beide Varianten sind in der Lage, die Wirtszelle des jeweils anderen Stamms zu infizieren, da sie um denselben Rezeptor konkurrieren (Spalholz, 1983). Sie können jedoch nur nach Transfektion doppelsträngiger viraler DNA in der heterologen Wirtszelle replizieren, da nach Infektion ein Block während des Transports in den Zellkern auftritt (Gardiner, 1988a). Es ist wahrscheinlich, daß die allotropischen Determinanten für Interaktionen der in die Zelle tretenden Virionen mit intrazellulären ‚Rezeptoren‘/Faktoren nötig sind (Agbandje-McKenna, 1998). In anderen Zellsystemen gibt es

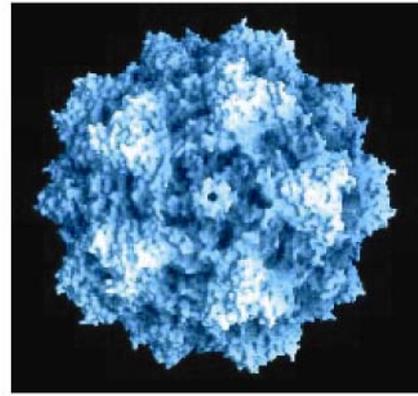


Abb. 3: Dreidimensionale Struktur von MVM. (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998)

Hinweise auf weitere Restriktionen, z. B. auf Ebene der DNA-Amplifikation nach Konversion des viralen Genoms (siehe Kap. 1.1.5.3) (Rubio, 2001). Das einzelsträngige Genom von MVM wird in ein T=1 ikosaedrisches Kapsid (Abb. 3) mit einem Radius von 140 Å verpackt). Röntgenstrukturanalysen ergaben eine Zusammensetzung der Partikel aus 60 asymmetrischen Untereinheiten (Agbandje-McKenna, 1998), die jeweils eine Struktur von acht antiparallelen β -Faltblättern einnehmen. Die Kapside setzen sich aus den drei Strukturproteinen VP1 (83 kDa), VP2 (64 kDa) und VP3 (60-62 kDa) zusammen, wobei VP2 mit 80 % die Hauptkomponente ausmacht. (Cotmore, 1987; Schoborg, 1991). Das VP3-Protein entsteht erst durch N-terminale Abspaltung von circa 20 AS des VP2 während des Eintritts von vollen (DNA enthaltenden) Kapsiden in die Zelle und macht nur einen geringen Anteil des Kapsids aus (Tattersall, 1977). Leere Partikel enthalten kein VP3 (Paradiso, 1981; Santaren, 1993) oder bestehen ausschließlich aus VP2 (Agbandje, 1995). An der Außenseite der Kapside befindet sich auch ein NS1-Molekül, das kovalent an das 5' Ende des viralen Genoms gebunden ist (Cotmore, 1989) und während der Infektion in der Zelle endonukleolytisch abgespalten wird (Cotmore, 1995). Durch ihren strukturellen Aufbau und das Fehlen einer Lipidschichtummantelung kennzeichnet die MVM-Kapside eine enorme Stabilität gegenüber inaktivierenden Agenzien (z.B. Chloroform), pH- oder Hitzebehandlungen (Berns, 1994).

1.1.4. Der parvovirale Infektionszyklus

Der virale Infektionszyklus beginnt mit der Adsorption von Virionen an spezifische Oberflächenmoleküle der Wirtszelle und Internalisation durch Rezeptor-vermittelte Clathrin-abhängige Endozytose, wie für das *Canine Parvovirus* CPV gezeigt wurde (Parker, 2000) (siehe Abb. 4/1). Die einzelnen Parvoviren unterscheiden sich in ihrem Wirtszellspektrum beträchtlich voneinander. Manche Vertreter, wie z.B. das B19-Virus, welches das Blutgruppenantigen P, ein Glykosphingolipid, als Rezeptor verwendet (Brown, 1993),

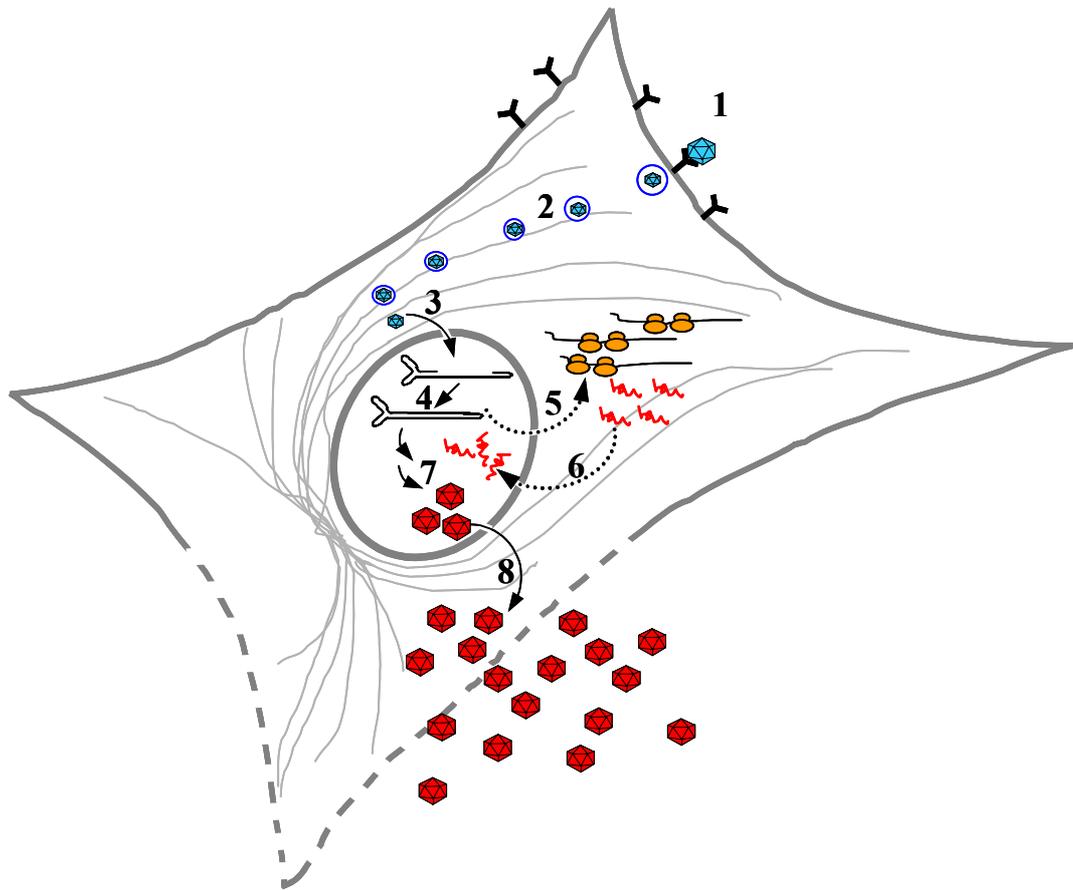


Abb. 4: Infektionszyklus autonomer Parvoviren. Nach Rezeptorbindung (1) und Internalisierung werden die Viren durch Endosomen wahrscheinlich entlang der Mikrotubuli (2) in die nukleäre Peripherie transportiert. Von dort findet ein Import der viralen DNA in den Nucleus statt (3), wobei der genaue Ablauf derzeit nicht bekannt ist. Im Nucleus kommt es zur Replikation der viralen DNA (4). Die Replikationsintermediate dienen auch als Matrize zur Transkription der mRNAs, welche zur Translation ins Zytoplasma geschleust werden (5). Die viralen Proteine, insbesondere auch die Kapsidproteine, werden nach ihrer Synthese im Zytoplasma der Wirtszelle erneut in den Zellkern transportiert (6), wo eine Assemblierung zu Kapsiden sowie die zeitgleiche Verpackung der ss Virion-DNA erfolgt (7). Der Export infektiöser Viren aus der Zelle sowie der Mechanismus (8), der zur beobachteten Zellyse führt, sind bisher ebenfalls nicht erforscht.

infizieren nur wenige Zelltypen obwohl dieser Rezeptor auch auf Endothelzellen und Megakaryozyten vorkommt. Weitere identifizierte Rezeptoren umfassen den Transferrinrezeptor für CPV (Parker, 2001), ein nicht näher charakterisiertes 67 kDa ADV-Bindungsprotein (ABP) als Rezeptor für das *Aleutian Mink Disease Virus* (Fox, 1999) sowie den hFGF-Rezeptor, Heparan-Sulfat und $\alpha V\beta 5$ -Integrine (Qing, 1999; Summerford, 1998; Summerford, 1999) oder Sialsäure (Kaludov, 2001) als Rezeptoren für Adeno-assoziierte Viren (AAV). Der Rezeptor für MVM wurde bislang nicht ermittelt, jedoch weisen die Trypsin- und Neuraminidase-Sensitivität auf ein N-acetyl-Neuraminsäure-gekoppeltes Protein hin (Cotmore, 1987). Proteine mit N-Acetyl-Neuraminsäureresten kommen in großer Anzahl ($1-5 \times 10^5$ pro Zelle) auf vielen Zelltypen unterschiedlicher Gewebe in verschiedenen Organismen vor (Linser, 1977; Spalholz, 1983). Das erklärt, warum parvovirale DNA nach Infektion im Organismus weit verteilt gefunden wird.

Nach Viruseintritt in die Zelle verbleiben die viralen Kapside bis zu 8 Stunden im endosomalen Kompartiment (Ros, 2002; Parker, 2000), wo sie durch Dynein entlang der Mikrotubuli zum perinukleären Raum transportiert (Abb. 4/2) (Suikkanen, 2002; Vihinen-Ranta, 1998) und schließlich in das Zytoplasma entlassen werden. Da CPV Kapside nach endosomaler Freisetzung noch durch mikroinjizierte Antikörper inhibiert werden konnten (Vihinen-Ranta, 2000), geht man davon aus, daß eine Dekapsidierung der Parvoviren erst im Zytoplasma erfolgt und der Ubiquitin-Proteasom-Signalweg durch Chymotrypsinspaltung dabei vermutlich eine essentielle Rolle spielt (Ros, 2002). Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß die Dekapsidierung auch erst im Nukleus selbst geschieht, da die Partikel klein genug sind, um intakt die nukleäre Pore zu passieren (Abb. 4/3) (Feldherr, 1984).

Das Strukturprotein VP1 spielt offenbar für die Initiation der viralen Replikation und Genexpression eine Rolle. Es besitzt eine optimale NLS- Konsensussequenz für Karyopherin α/β -Rezeptoren am N-Terminus (Lombardo, 2002). Interessanterweise ist für eine konservierte 40 AS-umfassende N-terminale Region des VP1 eine Phospholipase- (sPLA₂) Aktivität nachgewiesen worden, die in *cis* für den Transport des viralen Genoms von perinukleären Vesikeln zum Nukleus erforderlich ist (Zadori, 2001). Im Nukleus wird das einzelsträngige Genom in Abhängigkeit von Zyklin A zu einer Duplex-DNA konvertiert (Bashir, 2000) und in spezifischen Strukturen, den APAR- (*autonomous parvovirus associated replication*) *bodies* (Cziepluch, 2000), NS1-abhängig amplifiziert (Abb. 4/4) (siehe Kap. 1.1.5.1). Erst nach Umwandlung (Konversion) des ss Genoms in eine geschlossene monomere Doppelstrangform stehen mRNA-Transkripte für die Translation der viralen Proteine im Zytoplasma zur Verfügung (Abb. 4/5). Beide Vorgänge, die Replikation und die virale Genexpression, beginnen daher nur mit dem Eintritt der Wirtszelle in die S-Phase des Zellzyklus (Wolter, 1980; Cotmore, 1989; Bashir, 2000). Im Gegensatz zu anderen onkogenen DNA-Viren, wie Polyoma- oder Papillomviren (Helt, 2003), sind Parvoviren nicht in der Lage, die S-Phase in der Wirtszelle zu induzieren. Die Expression und Akkumulation der Nichtstrukturproteine führt jedoch über einen ungeklärten Mechanismus zum Abschalten der zellulären DNA-Replikation (Cotmore, 1987; Hardt, 1983) und interferiert mit dem Zellzyklus, wodurch die Wirtszelle in der späten S-Phase arretiert wird (Op de Beek, 1995; Op de Beek, 1997; Corbau, 1999). Ist die Wirtszelle mitotisch aktiv, kann die virale DNA autonomer Parvoviren über längere Zeit in der Zelle vorliegen, ohne dabei ins Wirtszellgenom zu integrieren (Richards, 1979).

Die Verpackung des replizierten viralen Genoms erfolgt ebenfalls im Nukleus, wobei die Strukturproteine unabhängig voneinander vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert werden müssen (Abb. 4/6). Das kleinere VP2 besitzt am C-Terminus eine NLM-Sequenz, die für den nukleären Import zwar wichtig, doch nicht ausreichend ist. Statt dessen sind auch die Faltung und Konformation des Proteins für den Transport ausschlaggebend (Lombardo,

2000). Das große VP1 besitzt neben der mit VP2 gemeinsamen C-terminalen NLM-Region am N-Terminus mehrere basische AS-Bereiche BC 1-4 (*basic cluster*), die den Transfer ins nukleäre Kompartiment erlauben (Lombardo, 2002). Dort erfolgt die Verpackung des viralen Genoms (Abb. 4/7) und das Ausschleusen der infektiösen Virionen aus der Zelle. Wie der Virusexport abläuft (Abb. 4/8) und, ob er zeitgleich oder vor der beobachteten Zellyse der Wirtszelle stattfindet, ist Gegenstand derzeitiger Forschung.

1.1.5. Die parvovirale Replikation

1.1.5.1. Die virale Replikation findet in distinkten Kernstrukturen statt

Die parvovirale Replikation findet im Nukleus infizierter Zellen statt. Hier bilden sich circa 15 h nach Viruseintritt bei H-1 spezielle Strukturen aus, in denen die Replikation des viralen Genoms stattfindet (Cziepluch, 2000; Young, 2002). Zeitgleich kommt die zelluläre Replikation durch einen derzeit unbekanntem Mechanismus zum Erliegen (Cotmore, 1987). Viele DNA-Viren wie Herpes-, Adeno- oder Papovaviren benutzen PML- (*promyelitic leukemia gene product*) *bodies* als subnukleäre Kompartimente für ihre Replikation (Everett, 2001). Parvoviren hingegen induzieren die Neubildung von Strukturkörpern, die sich sowohl von den PML-*bodies* als auch von anderen bisher bekannten nukleären Subkompartimenten, wie die zum Spleißen von RNA sowie zur Assemblierung und Maturation von Ribonukleoproteinen wichtigen Cajal-*bodies* (Übersicht Carmo-Fonseca, 2002; Ogg, 2002), von Nukleoli, die in ribosomaler RNA-Transkription und Prozessierung involviert sind (Scheer, 1999) oder von *speckles* unterscheiden (Matera, 1999; Mintz, 2000). Diese Parvovirus-induzierten Kernkörper wurden dementsprechend APAR- (*autonomous parvovirus-associated replication*) *bodies* genannt und konnten als Orte der viralen Replikation ausgemacht werden (Cziepluch, 2000; Bashir, 2001). In diesen Strukturen akkumuliert auch SGT (*small glutamine rich tetratricopeptide repeat protein*), ein Interaktionspartner von NS1 (Cziepluch, 1998; Kordes, 1998). Das als Kochaperon in neuronalen Zellen beschriebene Protein (Tobaben, 2001) wird für die effiziente Produktion an Einzelstrang-Virionen-DNA oder deren Verpackung benötigt (Apsi, 2002).

Diese APAR-*bodies* scheinen dynamischer Natur zu sein, da sie sich mit fortschreitender Replikation morphologisch verändern (Young, 2002). Zu späteren Zeitpunkten (20 – 30 h p.i.) kommt es dadurch zu einer Kolo-kalisation von NS1 mit dem SMN- (*survival motor neuron*) Protein (Young, 2002), welches in APAR-*bodies* zu früheren Zeitpunkten nicht nachweisbar ist (Cziepluch, 2000). Das SMN ist eine charakteristische Komponente von Cajal-*bodies*, weshalb eine neue Bezeichnung SAAB (SMN- *associated APAR-bodies*) für diese Replikationsstrukturen vorgeschlagen wurde. In den SAAB interagiert NS1 mit dem 65 kDa NSAP1 (*NS1-associated protein 1*) (Harris, 1999), von dem aufgrund seiner Struktur vermutet wird, daß es beim viralen RNA-Spleißen oder der Bildung von

Replikationsintermediaten eine Rolle spielt. Es ist zu schlußfolgern, daß die virale Infektion offenbar massive intranukleäre Umstrukturierungen verursacht.

1.1.5.2. Enzymologie der viralen DNA-Replikation

Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen ist NS1 absolut essentiell für die virale Replikation. Die durch Phosphorylierung gesteuerten Aktivitäten (siehe Kap. 1.2) des Proteins werden insbesondere am Modell der viralen Replikation in dieser Arbeit detaillierter untersucht. Der Ablauf der Replikation sowie die Interaktion von NS1 mit zellulären Replikationsfaktoren werden nachfolgend erläutert.

Neben NS1 werden zahlreiche zelluläre Replikationsfaktoren zu den Orten der Replikations-*origins* rekrutiert. NS1 besitzt eine hohe Homologie zum Nichtstrukturprotein des Simian Virus 40 (SV40) Large T-Antigen, dessen Replikationsfunktionen gut erforscht sind. Jedoch unterscheidet sich die parvovirale von der SV40 DNA-Replikation dahingehend, daß sie nur unidirektional und nicht bidirektional als *leading* und *lagging* Strang-Synthese abläuft. Die DNA-Replikation initiiert an freien 3'-OH Enden der DNA, die entweder durch das Umfalten der ITRs oder durch Endonukleaseaktivität von NS1 entstehen (Christensen, 2002). Für diese Initiationsreaktion wird nur eine Polymerase, pol δ , benötigt (Bashir, 2000). Unter *in vitro* Bedingungen werden PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und RPA (*replication protein A*), die auch für die SV40-Replikation essentiell sind, sowie ein neu entdeckter Kofaktor PIF (*parvovirus initiation factor*) für die Reaktion benötigt (Abb. 5) (Christensen, 1997). Das auch als Glukokortikoid-Transkriptionsmodulator bekannte PIF bildet ein Heterodimer und aktiviert durch Bindung an den parvoviralen *origin* und Interaktion mit NS1 dessen Entwindungs- und spezifische *Nicking*-Funktion (Christensen, 1997b; Nüesch, 2001).

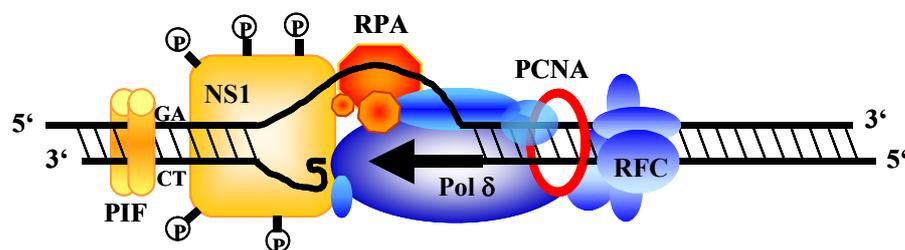


Abb. 5: Vereinfachte Darstellung der Replikationsgabel am *origin* des MVM Genoms. Durch Kooperation mit PIF kann NS1 spezifisch nach Bindung an den MVM *origin* die DNA endonukleolytisch spalten. Die resultierende einzelsträngige DNA wird vom ssDNA Bindungsprotein RPA erkannt und gebunden. Der nachfolgend assoziierende Proteinkomplex RFC lädt PCNA auf die DNA, welches nun seinerseits die verschiedenen Untereinheiten der ebenfalls bindenden Polymerase δ auf der DNA zusammenhält. Durch Phosphorylierung aktiviertes NS1 fungiert in diesem Komplex als Helikase und entwindet die DNA direkt vor der Replikationsgabel. Dadurch wird fortlaufend ein Einzelstrang generiert, dessen Komplementärstrang durch den Polymerase δ Komplex synthetisiert wird.

Dabei ist der Abstand beider Proteine von entscheidender Bedeutung. Für den Einzelstrangbruch am 5'-Terminus der mRF hingegen ist die Funktion von HMG $\frac{1}{2}$ (*high mobility group*)-Proteinen erforderlich (Cotmore, 1998; Cotmore, 2000). Am *origin* gebunden fungiert NS1 im Komplex mit RPA als Helikase der zellulären Replikationsmaschinerie (Christensen, 2002).

1.1.5.3. Verlauf der MVM-Replikation

Die parvovirale Replikation, in Abb. 6 schematisch dargestellt, ähnelt in ihrem Ablauf der Replikation von Prokaryonten (Kornberg A, 1992) und erfolgt nach einem unidirektionalen rollenden Haarnadelmechanismus (*rolling hairpin*) (Tattersall, 1976; Cotmore, 1995). Nach Eintritt der viralen Einzelstrang-DNA in den Nukleus kommt es zuerst in Abhängigkeit von der zellulären S-Phase (Bashir, 2000) zur sogenannten Konversion, bei der unter Verwendung der freien Hydroxylgruppe (3'-OH) des linksseitigen Palindroms als Primer für die Polymerase, die Monomer-DNA in eine Doppelstrangform (mRF) überführt wird (Abb. 6/1). Diese Duplexform dient auch als Matrize für die Transkription und Synthese von NS1, daß für nachfolgende Replikationsschritte benötigt wird. Das 5'-Ende des viralen Genoms ist als einfache Haarnadelstruktur dargestellt. Durch zwei hier einander gegenüberliegende DNA-Bindungsstellen für NS1, bildet sich am rechten Ende eine asymmetrische Kreuzform aus. Die Kreuzform wird vom HMG1-Protein (*high mobility group*) am oberen Strang erkannt und gebunden, wodurch NS1 die endonukleolytische Spaltung des DNA-Strangs ausführen kann (Abb. 6/2) (Cotmore, 2000). Das am 5'-Ende der gespaltenen DNA kovalent gebundene NS1 windet durch seine Helikaseaktivität in 5'-3' Richtung die Haarnadel auf. Die Kreuzform wird aufgeklappt und die Palindromsequenz am 5' Ende durch die zelluläre Polymerase repliziert. Es entsteht eine etwas längere Intermediärstruktur, eRF (*extended RF*), mit dupliziertem Palindrom (Abb. 6/3) (Cotmore, 1995). Durch Aufschmelzen erfolgt die erneute Rückfaltung in zwei Haarnadeln, die eine Kaninchenohrstruktur reRF (*rabbit ear*) einnehmen (Abb. 6/4). Sie dient nun als 3'-OH Primer zur Synthese des Komplementärstranges. Durch fortschreitende Einzelstrang-Verdrängung und nachfolgendes Kopieren des verdrängten Stranges entsteht eine dimere Form (dRF), in der zwei intern miteinander verknüpfte Monomer-Untereinheiten vorliegen (Abb. 6/5). Durch Wiederholung der beschriebenen Vorgänge kann sich die Replikation zirkulär fortsetzen, wodurch tetramere oder auch höher konkatemere RF-Spezies auftreten. Das 3'-Palindrom des viralen Genoms bildet ebenfalls eine Palindromstruktur. Dessen Stamm weist durch eine ungepaarte Base eine lokale Asymmetrie auf, die wichtig für das Ausschneiden der monomeren RF-Moleküle aus der Duplexform ist. Während der unizirkulären Haarnadelreplikation wird die asymmetrische Sequenz verlängert und formt in der dRF eine Duplex-Brücke. Durch Trennung der Nukleotide innerhalb der Blase, in der ein **GAA**-Triplet einem **GA**-Dinukleotid gegenübersteht, entstehen hier innerhalb der Brücke die zwei linken Replikations-*origins*.

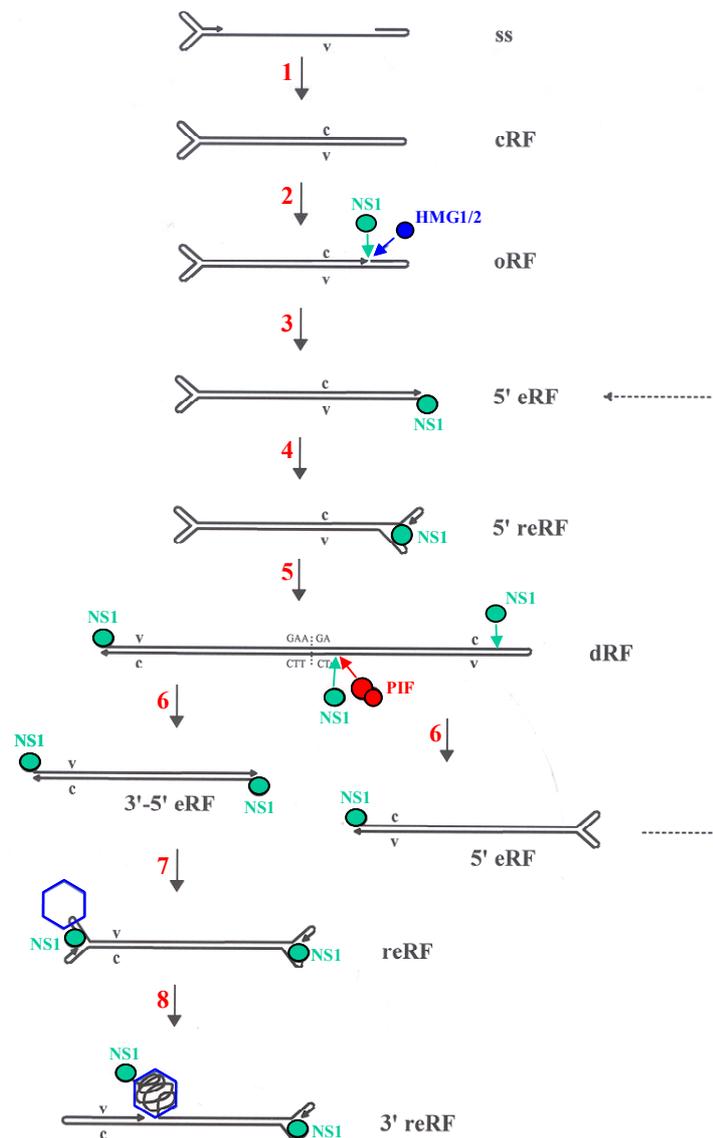


Abb. 6: Schema der DNA-Replikation von MVMP. ss: einzelsträngige Virion-DNA; cRF: kovalent geschlossene replikative Form; oRF: offene replikative Form; eRF: terminal verlängerte replikative Form; reRF: replikative Form mit terminaler Kaninchenohr-Struktur; dRF: dimere replikative Form; v: Virion-Strang; c: komplementärer Strang; NS1: Nichtstrukturprotein 1; HMG: *high mobility group protein 1/2*; PIF: *parvovirus initiation factor*. Die roten Ziffern bezeichnen die einzelnen Replikationsschritte, wie im Text beschrieben.

Obwohl beide *origins* potentielle Spaltstellen für NS1 besitzen, wird nur der *origin* mit dem GA/TC-Duplett der ursprünglichen Blase auch gespalten, da hier der optimale Abstand des an die DNA gebundenen NS1 und dem Kofaktor PIF gegeben ist. Die Spaltung leitet die Auflösung des Konkatemers in zwei Moleküle ein. NS1 bleibt am neu entstandenen 5'-Ende der monomeren Form gebunden (Abb. 6/6). Die Asymmetrie der Replikationsreaktion führt zum Kopieren des Palindroms in nur einer Orientierung, die somit in den Nachkommenviren konserviert ist (Abb. 6/7). Dies ist ein Unterschied zu AAV, bei denen beide Orientierungen gleichermaßen repliziert werden. Für das Kopieren des viralen Stranges bildet sich eine

Holliday-Struktur im zentralen Dimerpalindrom aus. Die Holliday-Struktur wird nach dem Durchlaufen der Replikation, vom rechten 5'-Palindrom ausgehend, aktiv von NS1 aufgelöst (Cotmore, 2003). Zur Bildung der Einzelstrang-DNA ist die Anwesenheit vorgefertigter, leerer Kapside im Nukleus essentiell. Die ss-DNA wird zeitgleich zu ihrer Synthese in das Kapsidinnere befördert (Abb. 6/8) (Willwand, 1991). Ein Vorgang, der durch das am neu synthetisierten Einzelstrang gebundene NS1 eingeleitet wird (Cotmore, 1989). NS1 bleibt nach Verpackung der DNA an der Außenseite der infektiösen Viruspartikel zurück. Durch die sich unterscheidenden Palindromstrukturen am 3' und 5' Ende der ss-DNA erfolgt ausschließlich die Verpackung des Minusstrangs (Corsini, 1995; Cotmore, 2003).

1.1.6. Die regulatorischen Proteine von MVMp: NS1 und NS2

1.1.6.1. Das kleine Nichtstrukturprotein NS2

Das kleine NS2-Protein wird aufgrund alternierender Spleißvorgänge (Kap 1.1.2) in drei verschiedenen Isoformen produziert. Der N-Terminus (84 AS) ist jeweils identisch mit NS1. In phosphorylierter Form liegt NS2 ausschließlich zytoplasmatisch vor, während die nicht phosphorylierte Form darüber hinaus auch im Zellkern gefunden wird (Cotmore, 1990). Die Expression von NS2 ist zu Beginn einer Infektion besonders hoch und übersteigt die Synthese von NS1. Dieser Effekt wird jedoch durch die relativ kurze Halbwertszeit des Proteins von circa 1 h auf Proteinebene ausgeglichen (Cotmore, 1990; Schoborg, 1991). Über die Funktionen des viralen Proteins ist wenig bekannt. NS2 ist nur für eine produktive Infektion in Zellen muriner Wirtsspezies erforderlich, nicht aber in transformierten humanen Zellen oder Ratten (Naeger, 1990; Cater, 1992; Brownstein, 1992). In murinen Zellen wird NS2 für die korrekte Assemblierung der Kapside im Nukleus benötigt und ist an der Amplifikation der viralen DNA beteiligt (Cotmore, 1997). In den letzten Jahren wurden zwei Interaktionspartner von NS2 ermittelt: Mitglieder der 14-3-3-Proteinfamilie (Brockhaus, 1996) sowie der nukleare Exportfaktor CRM1 (*chromosome region maintenance protein 1*) (Bodendorf, 1999). Letzteres ist notwendig, um Nachkommen-Virionen nach Verpackung der DNA aus dem Zellkern zu schleusen (Miller, 2002; Eichwald, 2002). Außerdem lieferten neueste Untersuchungen in unserem Labor Hinweise auf eine mögliche Unterdrückung der antiviralen Interferon β -Abwehrmechanismen der Wirtszelle durch die Nichtstrukturproteine, im speziellen NS2 (L. Daeffler, DKFZ, unveröffentlichte Daten).

1.1.6.2. Das große Nichtstrukturprotein NS1

NS1 ist mit 672 AS das größte regulatorische Protein von MVM und übt während des viralen Infektionszyklus vielfältigste Funktionen aus (Shade, 1986). Es ist absolut essentiell für eine produktive Infektion in allen Zelltypen (Tullis, 1988; Li, 1990; Naeger, 1990). Mit 6,5 h besitzt NS1 eine sehr hohe Halbwertszeit (Cotmore, 1987) und kann damit in die komplexen Vorgänge der viralen Replikation eingreifen. In der infizierten Zelle liegt NS1 zu zwei

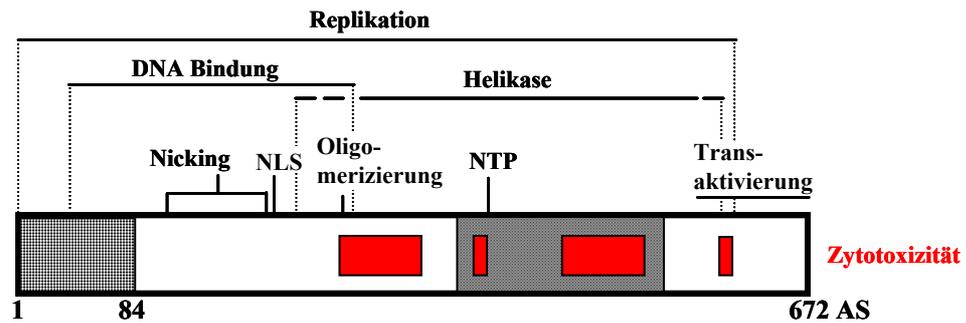


Abb. 7: Schematische Darstellung des NS1 Proteins. Die ersten 84 N-terminalen AS von NS1 und NS2 sind identisch (■). Es folgt eine DNA-Bindungsdomäne mit dem Kernlokalisierungssignal (NLS: KK-X₁₈-KKK; AS 194-216). Die NS1 Homo-Oligomerisierung findet im Bereich von AS 264 bis AS 278 [Motiv: VETTVT-X₉-IQT] statt. Es folgt die Helikasedomäne (■), die auch die Purin-Bindestelle umfaßt. Fast das gesamte Protein wird für die Replikationsfunktionen benötigt. Am C-Terminus ist die Transaktivierungsdomäne lokalisiert. Die für die zytotoxischen Funktionen wichtigen Aminosäurebereiche sind markiert (■).

Dritteln im Zellkern vor, was durch ein Kernwanderungssignal (NLS) ermöglicht wird (Nüesch, 1993). Durch Mutagenesestudien konnten einige spezifische Funktionen diskreten Domänen des Proteins zugeordnet werden (Abb. 7). NS1 bildet ATP-abhängig Oligomere (Nüesch, 1993; Pujol, 1997; Deleu, 2001), eine Fähigkeit, die auch zur Ausübung anderer Funktionen, wie der spezifischen DNA-Bindung zur Sequenz [ACCA]₂₋₃, wichtig ist (Cotmore, 1995; Mouw, 1998). Dieses DNA-Bindungselement ist an mehreren Stellen im viralen Genom zu finden (Cotmore, 1995; Christensen, 1995a) und ist für die virale Replikation und die Aktivierung des P38-Promotors notwendig. Außerdem kann NS1 ATP hydrolysieren (Wilson, 1991; Christensen, 1995a), was besonders durch einzelsträngige DNA (wie das virale Genom) induziert wird (Christensen, 1995a). In der viralen Replikation (Kap. 1.1.5.3) fungiert NS1 auch als Mg²⁺- oder Mn²⁺- abhängige Helikase (Christensen, 1995a; Nüesch, 1995) sowie Strang- und Sequenz- spezifische Endonuklease (Nüesch, 1995; Christensen, 1997). Es interagiert auch mit zellulären Komponenten der Replikations- und Transkriptionsmaschinerie (Kap. 1.1.5.2). Die Eigenschaft, physikalische Komplexe mit zellulären Partnerproteinen einzugehen, könnte auch bei anderen Vorgängen eine wesentliche Rolle für die Funktion von NS1 spielen.

Funktionen von NS1 im Infektionszyklus: NS1 beeinflusst den Zellzyklus der Wirtszelle

Der parvovirale Replikationszyklus ist streng an die S-Phase der Wirtszelle gekoppelt. Parvoviren können zwar nicht die S-Phase der Wirtszelle induzieren (Cotmore, 1986; Cotmore, 1987), jedoch richtet sich aufgrund der P4-Promotor-Regulation (Deleu, 1998; 1999) auch die Genexpression der Nichtstrukturproteine nach der S-Phase des Zellzyklus. Die Bereitstellung des Transkriptionstemplates vom einzelsträngigen Genom verlangt bereits die Präsenz von Zyklin A (Bashir, 2000). Nach NS1-Expression kommt es zu einer Akkumulation der Zellen in der S- oder frühen G2-Phase des Zellzyklus (Op de Beek, 1995;

Op de Beek, 1997). Die Zellzyklusphasen werden neben verschiedenen direkt involvierten Zyklin- abhängigen Kinasen auch durch spezifische Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge, Inhibitoren sowie durch die subzelluläre Lokalisation der Regulatoren kontrolliert (Übersichten bei Sherr, 1999; Pines, 1999). Die Synthese bzw. Aktivität von NS1 beeinflusst solche Zellzyklus-regulierenden Faktoren (De Beeck, 2001) wie p53 oder p21^{WAF-1/cip-1}. Außerdem wurde postuliert, daß NS1-induzierte Läsionen im Chromatin die Ursache für die Arretion des Zellzyklus infizierter Zellen sein könnten (Op de Beek, 1997).

NS1 als Transaktivator

Im parvoviralen Infektionszyklus übernimmt NS1 eine wichtige Funktion als Transkriptionsfaktor (Rhode, 1987; Doerig, 1988; Legendre, 1994; Harris, 1999). Die Hauptaufgabe des NS1 besteht in der Aktivierung des P38-Promotors für die Expression der Kapsidproteine. Diese Transaktivierung wird durch die saure C-terminale Domäne des Proteins bewirkt. Im P38-Promotor wird für die Transaktivierung neben einer GC- und TATA-Box (Ahn, 1992) auch ein kleines *cis*-Element benötigt. Das auch als *tar-* (*trans-activation response*) bezeichnete Element (Sol, 1993) dient als NS1-Bindungsstelle (Christensen, 1995a). Zur Transaktivierung interagiert NS1 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 (Krady, 1995) und wie *in vitro* Studien belegen, wahrscheinlich auch mit TBP und TFII α , β (Lorson, 1998). Die Effizienz der NS1-Transaktivierungsfunktion wird durch den Koaktivator CBP (CREB-Bindungsprotein) erheblich gesteigert (Ohshima, 2001). Bemerkenswert ist an dieser Stelle auch, daß trotz Insertion von *upstream enhancer* Elementen (die den frühen P4-Promotor konstitutiv aktiv gestalten), der P38-Promotor im viralen Genomkontext kaum eine Steigerung der VP-Expression zeigt (Lorson, 1997). Es wird vermutet, daß es durch NS1-Interaktion zu einer Konformationsänderung des Promotors kommt, oder aber, daß NS1 lokal die Konzentration von Transkriptionsfaktoren erhöht, die für die Transaktivierung des viralen Promotors notwendig sind (Lorson, 1998). Die NS1-Abhängigkeit dieser Transaktivierung ist also ein effizientes Mittel, die Produktion der Kapsidproteine zu verzögern, um mögliche toxische/lytische Auswirkungen von VP1 und VP2 auf die Zelle erst zu definierten Zeitpunkten zu erlauben und so den viralen Infektionszyklus auch vollenden zu können - ein beeindruckendes Beispiel angepaßter Regulationsvorgänge.

NS1 wurde ebenfalls als Transregulator viraler und zellulärer Promotoren beschrieben (Legendre, 1994). Beispiele hierfür sind der SV40-Promotor, die RSV- und HIV-LTR-Elemente (Rhode, 1987; Faisst, 1993) sowie der Promotor des *c-erbA1*-Gens, das den Thyroid-Hormon-Rezeptor T3 kodiert (Vanacker, 1993). Durch Stimulierung des Rezeptors werden Wirtszellen möglicherweise sensitiver für zytotoxische Effekte der Viren. Kürzlich

konnte gezeigt werden, daß über NF-kappa B auch die Expression von Interleukin 6 (Mitchell, 2002) und TNF α (Fu, 2002) durch NS1 induziert wird.

NS1 ist ein zytotoxisches Protein

Eine MVM-Infektion ist toxisch für die Wirtszelle und endet nach erfolgreicher Produktion von Nachkommenviren durch Zellyse. Während eine spezifische Zellyse nur in Gegenwart der Kapsidproteine erzielt wird (J. Peters, DKFZ, unveröffentlicht), kann NS1 allein das Absterben der Wirtszelle induzieren (Caillet-Fauquet, 1990; Corbau, 2000). NS1 ist damit die hauptsächlich toxische Komponente von MVM. Eine synergistische Wirkung mit den NS2-Proteinen konnte gezeigt werden (Brandenburger, 1990; Legrand, 1993). Die NS1-Toxizität von B19 und H-1 ruft in einer Reihe von Zellen verschiedenen Ursprungs Zelltod durch Apoptose (Moffatt, 1998; Yaegashi, 1999) oder Nekrose (Ran, 1999) hervor. Dabei ist die ATP-Bindungsdomäne in NS1 absolut notwendig (Li, 1990; Moffatt, 1998) für die Stimulierung des Apoptosesignalwegs, wobei NS1 die Aktivierung der Caspasen 3, 6 und 8 induziert (Sol, 1999). Der zytotoxische Effekt des NS1 konnte auf verschiedene Regionen lokalisiert werden, wobei im C-terminalen Bereich die toxischen Aktivitäten von den replikativen Funktionen getrennt werden konnten (Legendre, 1992; Corbau, 2000; Daeffler, 2003). Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist bisher unbekannt, aber eine Folge des Zusammenwirkens verschiedener NS1-Aktivitäten ist sehr wahrscheinlich. Neben den beschriebenen Aktivitäten kann auch der Einfluß von NS1 auf den Phosphorylierungsgrad zellulärer Proteine zur Zytotoxizität beitragen (Anouja, 1997). Erstaunlicherweise äußert sich die Toxizität in neoplastisch transformierten Zellen wesentlich stärker als in vergleichbaren nicht transformierten Kontrollzellen (Cornelis, 1988; Cornelis, 1988b; Mousset, 1994). Eine mögliche Ursache dafür könnte die vermehrte virale DNA-Replikation (Spegelaere, 1991) sowie eine erhöhte Expression der NS-Proteine sein (van Hille, 1989; Cornelis, 1988b). Alternativ dazu könnte es auch spezifische Interaktionen in transformierten Zellen geben, die Gegenstand aktueller Forschung in unserem Labor sind.

1.2. Regulation von NS1 durch Phosphorylierung

Posttranslationale Modifikationen sind ein weitverbreiteter Mechanismus, die Aktivität von Proteinen zu beeinflussen. Viele Enzyme werden durch Phosphorylierung von einer inaktiven in eine aktive Konformation umgefaltet. Sehr vorteilhaft wirkt sich bei diesem Regulationsprozeß die kurze Zeitdauer der Reaktion sowie ihre Reversibilität durch Phosphatasen aus. Die Phosphorylierung nimmt dabei unter den posttranslationalen Modifikationen einen besonderen Stellenwert ein und konnte selbst in Prokaryonten als Regulationsmechanismus häufig auch in Form der Histidinphosphorylierung nachgewiesen werden. In Eukaryonten dominieren Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Phosphorylierungen

(Übersichten bei Cozzone, 1998; Klumpp, 2002). Auch die Aktivitäten des multifunktionalen NS1 im viralen Zyklus werden über Phosphorylierung gesteuert. Dabei verändert sich das Phosphorylierungsmuster von NS1 in einer synchronisierten Infektion (Corbau, 1999; Daeffler, 2003). Eine Analyse der Aminosäuresequenz ergab mehr als 100 potentielle Konsensusphosphorylierungsstellen unter anderem für die Serin/Threonin-Kinasen Protein-Kinase C (PKC) und Casein-Kinase II (CKII). Um die funktionelle Bedeutung einzelner phosphorylierter Aminosäurereste zu ermitteln, wurden gezielte Mutagenesestudien durchgeführt. Eine Charakterisierung der NS1-Dephosphorylierungsmutanten zeigte, daß viele dieser Mutanten keine Nachkommenviren mehr produzieren konnten, da die NS1-Mutanten für spezifische, an der DNA-Amplifikation beteiligte, Funktionen defizient waren (Corbau, 2000). Interessanterweise wiesen manche Mutanten nach wie vor signifikante Aktivitäten, wie Oligomerisierung, Endonuklease, ATP-ase, Helikase oder Transaktivierung auf. Durch Koexpression von EGFP wurden in Transfektionsexperimenten ebenfalls die zytotoxischen Eigenschaften der NS1-Mutanten untersucht. Das Fehlen bestimmter phosphorylierter Serin/Threonin-Reste verursachte bei einigen Mutanten (S283A, T394A, T403A) ein früheres Absterben, bei anderen (T278A, T363A, T435A, T463A, S473A) ein verlängertes Überleben gegenüber NS1-wt exprimierenden Zellen (Corbau, 2000). Daraus läßt sich schlußfolgern, daß neben spezifischen Phosphorylierungen lediglich die ATP-ase und Oligomerisierungsaktivität von NS1 für die Zytotoxizität maßgeblich sind. Die genauen intrazellulären Regulationsvorgänge, die eine optimale Abfolge diskreter NS1-Funktionen koordinieren, wurden erst in den letzten Jahren ansatzweise durch Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation von NS1 näher erforscht. Es war Ziel der vorliegenden Arbeit, einerseits die Stimulierung von NS1-Aktivitäten durch Phosphorylierung am Beispiel der Replikation zu untersuchen. Andererseits sollte auch der mögliche Einfluß einer MVM-Infektion auf intrazelluläre Signalwege, wie die PKC-Kaskade, näher beleuchtet werden.

1.2.1. Regulation von NS1 durch Protein-Kinase C

Es ist von besonderem Interesse die Kinasen zu bestimmen, die *in vivo* die Phosphorylierung von NS1 ausführen, da so Erkenntnisse über die intrazelluläre Kommunikation zwischen zellulären Signalwegen und viralem Infektionszyklus gewonnen werden. Viele Kinasen weisen *in vitro* allerdings nicht die Substratspezifität auf, die sie in der Zelle aufgrund von Kofaktoren oder Mediatorproteinen besitzen. Aus diesem Grund wurde zur Identifizierung der NS1-phosphorylierenden Kinasen ein Komplementationsansatz verfolgt, bei dem neben einer potentiellen Phosphorylierung auch die erworbene Funktionalität des Proteins überprüft wurde (Nüesch, 1998b). Dazu diente ein *in vitro* Replikationsassay. Durch Zugabe der für die virale Replikation notwendigen Replikationsfaktoren (RPA), akzessorischen Proteine (PIF) sowie T4-DNA-Polymerase kann natives NS1 das als Substrat zugegebene Plasmid mit

aktivem MVM *origin* replizieren. Dephosphoryliertes NS1 ist unter diesen Bedingungen nicht in der Lage, die DNA-Amplifikation zu initiieren. Zur Komplementierung der defizienten Replikationsaktivitäten von dephosphoryliertem NS1 wurden zelluläre Kinasefraktionen zugefügt. Dazu wurden Kinasen zuvor schrittweise durch verschiedene chromatographische Trennverfahren aus einem HeLa-Zellextrakt angereichert. Durch Hydroxylapatit-Affinitätschromatographie (HA) konnte die NS1-aktivierende Zellfraktion in zwei Komponenten aufgeteilt werden. Beide Fraktionen (HA-1,2) wurden für die vollständige *in vitro* Aktivierung von NS1 für die Replikation benötigt. Allerdings genügte die HA-1-Fraktion, um NS1 für Helikasefunktionen zu stimulieren (Nüesch, 1998b). Als aktivierende Komponente der HA-1-Fraktion wurde die atypische PKC λ identifiziert (Dettwiler, 1999). Die benötigten Kofaktoren, um NS1 durch beide HA-Fraktionen für die Replikation zu aktivieren, lieferten Hinweise darauf, daß auch die derzeit noch unbekannte Komponente der HA-2 Fraktion, die mit der vorliegenden Arbeit identifiziert werden sollte, eine weitere, wahrscheinlich *novel* oder klassische PKC-Isoform ist.

1.2.2. Die Protein-Kinase C Familie

PKC bilden eine Gruppe von Isoenzymen, die sich aufgrund ihrer Domänenzusammensetzung in eine konventionelle (cPKC), *novel* (nPKC) oder atypische (aPKC) Subklasse einteilen lassen. Alle PKC besitzen neben der katalytischen auch eine regulatorische Domäne. Diese regulatorische Domäne dient zwei Funktionen. Einerseits ermöglicht sie einen zielgerichteten Transport der Kinase zu Orten der Stimulation durch Membranbindungssequenzen (Newton, 1998), andererseits reguliert sie die Aktivität der Kinase durch sterisches Blockieren der katalytischen Tasche als autoinhibitorisches Modul. Diese sterische Hinderung wird durch Ligandenbindung aufgehoben, wobei sich die einzelnen Isoenzymklassen, und zum Teil auch einzelne Isoformen derselben Subklasse, in ihren spezifischen Liganden voneinander unterscheiden. Über die regulatorische Domäne können auch Protein-Protein-Interaktionen in der Zelle erfolgen (Jaken, 2000; Mochly-Rosen, 1998). Abb. 8 zeigt schematisch die Primärstruktur der verschiedenen PKC-Subklassen.

Die Membranbindungssequenzen, C1 und C2 (*conserved*), der regulatorischen Domäne sind evolutionär konserviert. Die 50 Aminosäuren (AS) umfassende C1-Domäne bildet eine Cystein-reiche kompakte Struktur mit zwei Zinkfingerstrukturen aus, die auch in den verwandten Kinasen PKD und PKC μ auftritt. In den konventionellen und *novel* PKC tritt diese C1-Domäne als Tandemwiederholung auf, wobei sich beide Kopien durch ihre Lipidaffinität voneinander unterscheiden können (Kazanietz, 2002). Die C1-Domäne der cPKC und nPKC bindet Diacylglycerol und Phorbolster, wie TPA (Übersicht bei Cho, 2001).

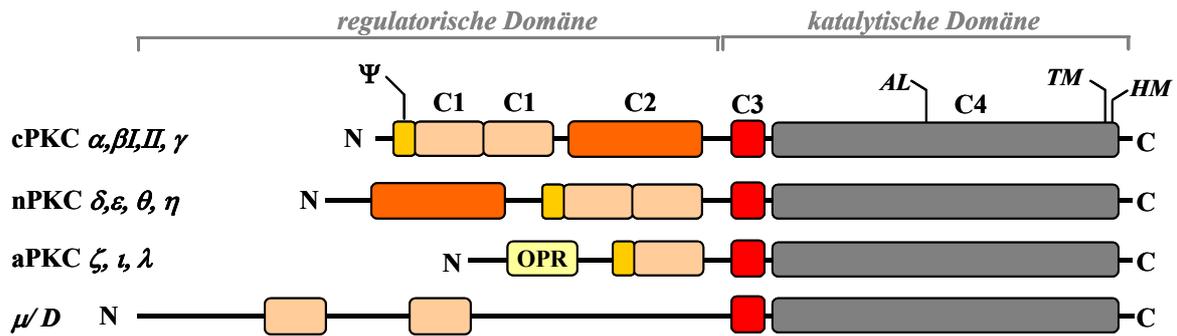


Abb. 8: Schematische Repräsentation der Primärstruktur von Protein Kinase C Isoenzymen. Die Kinasen sind aus einer regulatorischen und einer katalytischen Domäne aufgebaut. Die regulatorische Domäne setzt sich aus verschiedenen konservierten Bereichen zusammen: der Pseudosubstratregion Ψ (), der C1 Domäne () sowie der C2 Domäne (). Die C1 Domäne enthält ein Cystein-Motiv und bindet Diacylglycerol oder Phorbol ester. Die C2 Domäne der cPKC bindet Calcium, die der nPKC hingegen saure Phospholipide oder enthält im Fall der aPKC eine 28 AS lange Protein-Protein Interaktionsdomäne, das **O**cticosapeptid **R**epeat **O**PR (). Die katalytische Domäne besteht aus der ATP Bindungsstelle (C3) und der Substratbindungsdomäne C4 (). Die Motive der Phosphorylierungsstellen sind wie folgt benannt: AL: Aktivierungsloop, TM: Turn-Motiv, HM: hydrophobisches Motiv. Mitglieder der einzelnen Isozymsubklassen sind links angegeben. cPKC-konventionelle PKC, nPKC- novel PKC, aPKC- atypische PKC sowie die eng verwandten PKC μ und PKD. Das Schema ist entlehnt von Alexandra Newton (2003).

Die atypischen PKC hingegen binden diese Liganden nicht, da sie nur ein verkürztes C1-Modul mit kleineren Sequenzvariationen besitzen. Sie werden durch Phosphatidylserin (PS) (Johnson, 2000) aktiviert.

Die 130 Aminosäuren lange konservierte C2-Domäne der PKC wurde zuerst als Kalziumbindungsdomäne der cPKC entdeckt (Xu, 1997). Seitdem wurde diese Domäne auch in einer Vielzahl von Signalüberträgern wie cPLA₂ (*cytosolic* Phospholipase A2), PLC (Phospholipase C) oder PI3-K (*Phosphoinositid-dependent* 3-Kinase) nachgewiesen. Das Kalzium bildet eine Brücke zwischen der C2-Domäne und anionischen Phospholipiden. Außerdem induziert es inter- oder intra- Domänen konformationelle Umfaltungen, die eine Membran- Protein-Wechselwirkung fördern. Es wird vermutet, daß die C1- und C2-Module auch synergistisch miteinander interagieren (Cho, 2001). Die C2-Domäne trägt darüber hinaus zur Membranbindung und Lipidselektion bei. Dabei entscheidet beispielsweise eine kationische Ladung der Aminosäuren am Ca²⁺-Bindungsloop über die Interaktion mit anionischen Lipiden, während aliphatische oder aromatische Reste für eine Bindung an Phosphatidylcholinmembranen essentiell sind. *Novel* PKC fehlen innerhalb ihrer C2-Domäne wichtige Aminosäuren des Kalziumbindungsloops, so daß sie, ebenso wie aPKC, unabhängig von Kalzium und Phospholipiden in der Zelle agieren (Newton, 2003). Auf die katalytische Domäne wird im folgenden eingegangen.

1.2.3. Signalkaskade zur Aktivierung der PKC

Die c-, n- und aPKC besitzen drei konservierte Phosphorylierungsmotive (siehe Abb. 8) innerhalb ihrer katalytischen Domäne. Diese Motive fungieren als regulatorische Schalter, um PKC in der Zelle durch induzierte konformationelle Änderungen in verschiedenen Aktivitätszuständen zu halten. Inaktive PKC besitzen eine halboffene Konformation, in der die regulatorische Domäne schwach mit Membranen assoziiert. Die Aktivierung von PKC (Abb. 9) wird mit der Übertragung einer Phosphatgruppe auf einen Threoninrest im sogenannten Aktivierungsloop durch die *Phosphoinositid-dependent Kinase* (PDK-1) eingeleitet (Le Good, 1998). Dabei wird das hydrophobe Motiv am C-Terminus der PKC von der konstitutiv aktiven PDK-1 erkannt und als Bindungsstelle benutzt (Gao, 2001).

Es ist relativ wenig über die komplexe Regulation der *upstream* Kinase PDK-1 bekannt, dem Schlüsselenzym zur Aktivierung sämtlicher Wachstumsfaktor-stimulierten Serin/Threonin-Kinasen (AGC-Familie). PDK-1 besitzt eine C-terminale Pleckstrin-Homologie-Domäne und läßt sich daher durch PI3-Kinaseaktivität freigesetzte Phosphatidylinositoltriphosphatmoleküle PIP (Adachi, 1992; Übersicht bei Vanhaesebroeck, 1999) sowie durch Spinghosine stimulieren (Übersichten bei Storz, 2002; Vanhaesebroeck, 2000). Durch Wortmannin-Inhibitionsstudien wurde für PKC α eine von PI3-K unabhängige Aktivierung durch PDK-1 gezeigt (Sonnenburg, 2001). Andere Experimente legen jedoch eine vorherige Stimulierung von PDK-1 durch PI3-K nahe (Le Good, 1998; Chou, 1998), von der auch im Schema Abb. 9 ausgegangen wird. Möglicherweise werden cPKC anders durch PDK-1 reguliert als n- oder aPKC. Die von PDK-1 auf den Aktivierungsloop übertragene Phosphatgruppe induziert eine konformationelle Umfaltung der PKC, die nachfolgend eine C-terminale Phosphorylierung des *Turn*-Motivs auslöst. Die konventionellen und *novel* Isoformen erfahren am sogenannten hydrophoben Motiv noch eine weitere Phosphorylierung, während die atypischen PKC λ/ζ an dieser Stelle durch einen Glutaminsäurerest bereits eine negative Ladung besitzen. Es wird angenommen, daß cPKC hier ebenfalls einer Autophosphorylierung unterliegen (Behn-Krappa, 1999). Hingegen ist für die δ Isoform (nPKC) erwiesen, daß die Phosphorylierung im hydrophoben Motiv durch PKC ζ katalysiert werden kann (Ziegler, 1999) und unter Kontrolle einer durch mTOR (*mammalian target of rapamycin*) regulierten (Übersicht bei Jacinto, 2003) Phosphatase steht (Parekh, 1999; Parekh, 2000; Ziegler, 1999). Offenbar werden die Phosphorylierungsschritte der einzelnen PKC-Subklassen verschieden reguliert.

Alternative Postulierungen gehen davon aus, daß die Phosphorylierung des hydrophoben Motivs der des Aktivierungsloops vorausgeht. Diese Modellvorstellung basiert auf detaillierten Interaktions- und Strukturanalysen der AGC-Proteinkinasen, die eine außerordentlich hohe Konservierung der Phosphorylierungsstelle im hydrophoben Motiv [F-X-X-F-S/T^P-F] sowie von Arginin/Lysinresten in der C-Helix aufweisen (Frodin, 2000, Frodin, 2002).

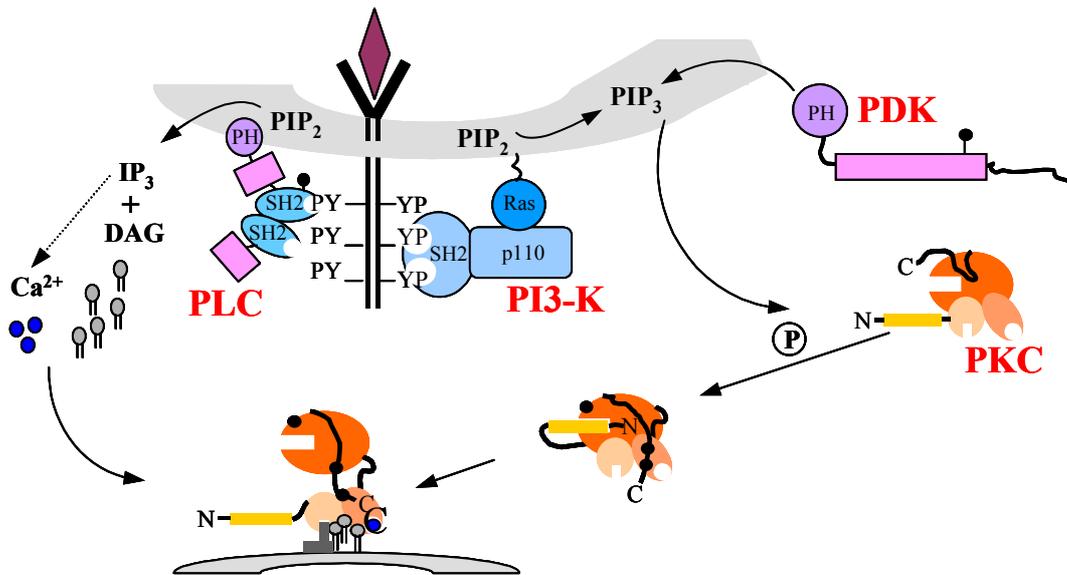


Abb. 9: Schematische Darstellung der PKC Aktivierungskaskade. Durch Wachstumsfaktorstimulus kommt es zur Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren, die durch Autophosphorylierung Bindungsdomänen für weitere Kinasen schaffen und diese aktivieren. Daraufhin phosphoryliert PI3-K Phosphatidylinositolmoleküle, die eine Membranlokalisation von PDK-1 auslösen. Nachfolgend kommt es zur Aktivierung von PKC durch PDK-1 Phosphorylierung. Darüberhinaus benötigen PKC Kofaktoren wie Lipide oder Calcium, die z.B. durch PLC Aktivität freigesetzt werden.

Eine negative Ladung im hydrophoben Motiv erhöht die Affinität der AGC-Kinasen zu PDK-1 um ein vielfaches. Lediglich aPKC werden aufgrund des Glutaminsäurerestes im hydrophoben Motiv unabhängig einer Phosphorylierung von PDK-1 als Substrat erkannt (Frodin, 2002). Somit wäre es denkbar, daß in Analogie zu den anderen AGC-Kinasen auch PKC von PDK-1 erst nach Phosphorylierung des hydrophoben Motivs gebunden werden. Gegen diese Annahme sprechen allerdings Mutationsanalysen des S/T im hydrophoben Motiv der PKC, die eine erhöhte Sensitivität gegenüber Phosphatasen belegen, was das hydrophobe Motiv als erste Phosphorylierungsstelle ausschließen würde (Bornancin, 1997; Edwards, 1997; Gysin, 1997).

Nach Phosphorylierung der katalytischen Domäne an allen Motiven liegen die PKC in einer geschlossenen, löslichen Konformation vor, in der sie außerordentliche Stabilität gegenüber Hitze, Proteinasen und Phosphatasen besitzen (Newton, 2003). In der geschlossenen Konformation blockiert die Pseudosubstratdomäne die katalytische Tasche der Kinase. Die Hemmung wird erst durch Ligandenbindung aufgehoben, wodurch die Kinase eine offene Konformation einnimmt. Sowohl die Affinität zu ausgewählten Liganden (Kalzium, DAG, Phorbolster oder Lipide), als auch der Ort der Liganden-Freisetzung bestimmen in der Zelle das Kompartiment, in dem PKC-Isoformen selektiv aktiviert werden. Die Liganden für c- und nPKC wie Kalzium oder DAG entstehen dabei durch Aktivierung von Phospholipase C (z.B.

PLC γ), die zuvor, ähnlich wie PI3-K, durch Bindung ihrer SH2-Domäne an stimulierte Tyrosinkinaserzeptoren zur Membran rekrutiert wurde (siehe Abb. 9). *Novel* und atypische PKC können auch direkt durch PI3-K-Produkte (PIP) aktiviert werden (Toker, 1998; Toker, 1994). Aktivierte PKC sind sehr anfällig für Dephosphorylierungen, die einer proteasomalen Degradation vorausgehen (Dutil, 1994; Lee, 1996; Lu, 1998). Durch Interaktion des dephosphorylierten *Turn*-Motivs mit dem Hsp70-Chaperon können PKC aber auch stabilisiert und zur erneuten Phosphorylierung bereit gestellt werden (Gao, 2002). Zusammenfassend läßt sich die äußerst interessante Feststellung machen, daß nPKC-Isoformen in ihrer Regulation drei verschiedene Signalwege vereinen: PI3-K, PLC sowie mTOR (Parekh, 1999), während aPKC lediglich vom PI3-K-Signalweg und cPKC von PLC Produkten stimuliert werden.

1.2.4. Funktionen von PKC in der Zelle

Die einzelnen Isoformen der PKC-Familie werden Zell- und Gewebe-spezifisch exprimiert. Dabei gibt es Isoenzyme wie PKC α , λ oder ζ , die universal nachgewiesen werden. Andere (PKC β II, δ und ε) werden in einer Vielzahl von Zellen und Geweben exprimiert, während Isoformen wie PKC γ , η oder θ nur in spezifischen Geweben auftreten (Wetsel, 1992; Shearman, 1987; Nishizuka, 1988; Osada, 1990; Altman, 2002). In vielen Untersuchungen zur Funktionsanalyse von PKC wurden Inhibitoren oder Aktivatoren verwendet, die selten Rückschlüsse auf den Einfluß einer spezifischen Isoform zulassen. Zur Isoenzym-spezifischen Funktionseingrenzung eignen sich eher Experimente, in denen konstitutiv aktive oder Kinase-inaktive Mutanten verwendet werden. Trotzdem ist es oft nicht möglich, generelle Funktionen für spezifische Isoformen *in vivo* zu definieren, da mitunter sogar antagonistische Effekte auftreten. Je nachdem in welchem zellulären Umfeld eine Isoform aktiviert wurde, wirkt sie sich stimulierend oder inhibierend auf einen bestimmten Vorgang aus. Um die Funktion von Kinasen zu ermitteln, ist es unerlässlich, Informationen über ihre Bindungspartner in der Zelle zu erhalten. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Proteine identifiziert, die mit PKC interagieren, wobei nur ein Teil dieser Proteine auch als Substrat der Kinase dient. Die nicht als Substrat auftretenden Interaktionspartner bestimmen oft den Transport und die Lokalisation von PKC innerhalb der Zelle. Erschwerend für die Identifikation potentieller PKC Substrate ist oft eine veränderte Substratspezifität *in vitro*. Interessanterweise zeigen PKC-Isoformen eine ausgeprägte Homologie ihrer, die zellulären Substrate bindenden, katalytischen Domäne. Dies läßt darauf schließen, daß oftmals ein und dasselbe Substrat von verschiedenen Isoenzymen phosphoryliert werden kann, je nachdem in welchen Zellen oder an welchen Orten innerhalb einer Zelle das Substrat vorliegt. In der PKC-Aminosäuresequenz konnten jedoch einige variable *hot spots* ausfindig gemacht werden, die anhand der vorhergesagten dreidimensionalen Struktur der unmittelbaren Nachbarschaft der katalytischen Tasche zugeordnet wurden und sicher Bedeutung für die Substratspezifität einzelner Isoformen besitzen. Bei der Strukturanalyse unterschieden sich besonders die aPKC, da die

Sequenz ihrer katalytischen Domäne im Vergleich mit den anderen Isoformen noch eine kleine Insertion enthält (Dekker, 1997). Die atypische PKC λ ist auch die einzige essentielle Isoform in allen Zelltypen (Wodarz, 2000; Tabuse, 1998). Aufgrund ihrer Bedeutung ist über die Signalwege von PKC λ/ζ relativ viel bekannt. Nachfolgend sollen die atypischen PKC kurz vorgestellt werden, da diese Subklasse offenbar auch bedeutsam für die parvovirale Infektion und besonders für die Regulation von NS1 für die DNA-Replikation ist.

Atypische PKC spielen eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des Zellwachstums, der Differenzierung, des Zellüberlebens, der Wachstumsfaktor-gesteuerten Gen-Transkription oder bei der Inflammation (Übersicht bei Toker, 1998; Diaz-Meco, 1996). PKC λ ist absolut essentiell zur Ausbildung der Polarität von Zellen (Tabuse, 1998). Zur Entschlüsselung ihrer genauen Funktionen helfen auch die bereits identifizierten Bindungspartner wie p62, Par-6, MEK5 und Par-4, die Aufschluß darüber geben können, wie aPKC mit verschiedenen Rezeptorsignalwegen verbunden sind (Moscat, 2000). Zu diesen Rezeptoren gehören beispielsweise der Insulinrezeptor (Standaert, 2002; Standaert, 1999), der PDGF sowie der EGF-Rezeptor (Akimoto, 1996). Atypische PKC induzieren nicht nur den NF-kappaB Signalübertragungsweg (Sanz, 1999; Bonizzi, 1999), sondern können auch eine Kommunikation zwischen verschiedenen Informationswegen in der Zelle vermitteln (*crosstalk*), z.B. zwischen PLA₂ und NF-kappaB (Anthonsen, 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß aPKC wichtige Funktionen in der Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts der Zelle besitzen (Ueberall, 1999). Auch Isoformen der konventionellen oder *novel* PKC sind oft mit dem Zytoskelett assoziiert, und tragen somit zur Zelldynamik bei.

Wie unter 1.1.5.1 beschrieben, findet die MVM-Replikation in speziell induzierten nukleären Strukturen, den APAR-*bodies* und SAAB in infizierten Zellen statt. Kürzlich wurde gezeigt, daß auch NS1 erst im Nukleus durch PKC λ phosphoryliert wird (Nüesch, 2003). Für die atypische PKC λ konnte bereits ein nukleärer Import/Export-Mechanismus durch Importin β bzw. CRM1 aufgezeigt werden (White, 2002; Perander, 2001). Auch das kleine Nichtstrukturprotein NS2, deren phosphorylierte Varianten in den Zellkern translozieren, wird durch CRM1-Interaktion aus dem Nukleus ins Zytoplasma geschleust (Bodendorf, 1999). Es wäre zu spekulieren, ob nukleäres NS2 den nach MVM-Infektion beobachteten Export von PKC λ aus dem Kern induziert. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit nicht nur die Funktion von PKC für die parvovirale Replikation untersucht werden, sondern auch, ob möglicherweise MVM gezielt in PKC-Signalwege eingreift, um beispielsweise morphologische Veränderungen der Wirtszelle zu induzieren.

1.3. Das Zytoskelett der Zelle

Das Zytoskelett der Zelle kann in drei große Filamentstrukturen eingeteilt werden. Die kleinsten Strukturen bilden die Mikrofilamente (6 nm). Die Intermediärfilamente besitzen eine Größe von 12-15 nm, während die Mikrotubuli (25 nm) mit Abstand die größte Filamentstruktur ausmachen. Die zellulären Filamente erfüllen eine Reihe wichtiger Funktionen. Dabei sind sie nicht nur als Gerüst für das Zytoplasma zu verstehen, sondern geben der Zelle auch Struktur, mechanische Stabilität, Polarität, bilden Verbindungen zwischen Proteinkomplexen und Organellen aus und dienen nicht zuletzt als Transportsystem. Die verschiedenen Strukturfilamente wurden viele Jahre als separate Einheiten betrachtet, doch es zeigt sich mehr und mehr, daß die Filamente nicht nur durch eine Vielzahl an Proteinen miteinander verknüpft sind, sondern daß sie auch funktionell zusammenarbeiten (Gavin, 1997). Nachfolgend sollen die Besonderheiten und das Zusammenspiel einzelner Strukturen vorgestellt werden, da dieses Wissen eine Voraussetzung ist, um die Einflüsse einer viralen (MVM)-Infektion auf die Zelle zu studieren.

1.3.1. Aufbau des Zytoskeletts

1.3.1.1. Die Mikrotubuli

Mikrotubuli sind die steifsten Zytoskelettpolymere, die aus 13, von α - und β -Tubulin-Einheiten gebildeten, zylindrischen Protofilamenten bestehen. Mikrotubuli sind, genau wie die Aktinfilamente, keine starren Strukturen, sondern unterliegen einer permanenten Dynamik. Sie wachsen und schrumpfen ausschließlich an ihren Enden, wobei das schneller wachsende Ende als Plus-, das langsamere als Minusende bezeichnet wird. Die Elongation und Depolymerisation von Tubulinpolymeren wird durch eine Vielzahl an Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) reguliert und ist den Prozessen des Aktinfilamentaufbaus (Kap. 1.3.1.3) ähnlich. Die dramatischste Umstrukturierung der Mikrotubuli findet während der Zellteilung statt, bei der der mitotische Apparat durch Bindung der duplizierten Chromosomen an den Plusenden der Tubulinfilamente für deren akkurate Separation verantwortlich ist. In den meisten Zellen sind die Minusenden der Tubulinfilamente im sogenannten MtOC (*microtubule organizing centre*) in unmittelbarer Nähe zum Zellkern miteinander verbunden, wodurch sichergestellt wird, daß alle Plusenden weg vom Zentrum zur Zellperipherie laufen.

An Mikrotubuli konnten spezialisierte Proteine nachgewiesen werden, Kinesin und Dynein als bekannteste Vertreter, die Cargo in jeweils eine festgelegte Richtung transportieren. Diesen Motorproteinen werden seit kurzem auch Regulationseigenschaften zugesprochen. Da sie sich sehr schnell entlang der Tubulinstrukturen zu den Filamentenden bewegen, kommt es zu einer Akkumulation dieser Proteine in unmittelbarer Nähe der Plus- bzw. Minusenden, womit sie

optimal positioniert sind, um das Wachstum oder Schrumpfen der Filamente zu fördern (Joshi, 1998). Darüber hinaus wurde auch eine Stabilisierung und Bündelung der Filamente nach Überexpression der Motorproteine beobachtet (Übersicht bei Joshi, 1998). Zum Cargo der Motorproteine gehören nicht nur einzelne Proteine sondern auch Vesikel und ganze Zellorganellen.

1.3.1.2. Die Intermediärfilamente

Die Intermediärfilamente als Bestandteile des Zytoplasmas und der nukleären Membran verleihen der Zelle zusätzliche Stabilität und Integrität. Sie sind wahrscheinlich für die Positionierung des Nukleus verantwortlich, verbinden die Plasmamembran mit anderen Zytoskelettfilamenten und tragen zu den Strukturveränderungen während der Zellteilung bei (Housewart, 1998; Chou, 2000). Im Gegensatz zu den anderen Filamenten wird der Auf- und Abbau der Intermediärfilamente überwiegend durch Phosphorylierung und zum Teil durch ADP-Ribosylierung reguliert (Übersicht bei Inagaki, 1996). In den letzten Jahren wurden zunehmend auch Intermediärfilament-assoziierte Proteine (IFAP) entdeckt, die bedeutende Verbindungsglieder zu den Mikrotubuli und Mikrofilamenten sind (Housewart, 1999). Monomere Intermediärfilament-Proteine sind aus einem N-terminalen Kopf, einem langen stabförmigen Zentrum mit vielen Wiederholungen bestimmter Aminosäuresequenzmuster und einem C-terminalen Schwanz aufgebaut. Sie weisen einen Durchmesser von 10 nm auf. Die α -helikale mittlere Domäne fördert die Bildung von antiparallel ausgerichteten Dimeren und Tetrameren. Damit besitzen die Intermediärfilamente keine Polarität, ein wichtiger Unterschied zu den Mikrotubuli und Mikrofilamenten. Tetramere lagern sich innerhalb der Zelle zu langen axialen Strukturen zusammen, die durch N-terminale Phosphorylierung deassemblieren. Als Kinasen wurden bisher PKA, PKC, CaMKII (Calmodulin Kinase II), *cdc2* (*cell division control 2*) Kinase, Casein Kinase sowie PKN identifiziert (Inagaki, 1996).

Proteine der Intermediärfilamente werden Zelltyp-spezifisch exprimiert, zum Teil gemeinsam mit anderen Intermediärfilamentproteinen. Daher sind diese Zytoskelettproteine in ihrer Primärsequenz sehr heterolog, sie weisen jedoch eine konservierte Struktur auf. Man unterscheidet mindestens sechs Klassen von Intermediärfilamenten: i-ii) die Zytokeratine Typ I und II, iii) Vimentin, iv) Neurofilament, v) Lamine und vi) Nestin. Die A9 Fibroblastenzellen, die in der vorliegenden Arbeit als Wirtszellen für MVM verwendet wurden, exprimieren Vimentin, wie auch die meisten Zellen mesenchymalen Ursprungs. Es ist bemerkenswert, daß auch die, die Mikrofilamente-regulierenden Rho-GTPasen, Cdc42 und Rac1 die Organisation von Vimentin durch Tyrosinphosphorylierung kontrollieren (Meriane, 2000). Weiterhin unterliegt Vimentin einer Kontrolle durch die Phosphatase PP2A durch Interaktion mit der B55-Untereinheit (Turowski, 1999).

1.3.1.3. Die Mikrofilamente

Zellorganellen bewegen sich nicht nur anhand der Mikrotubuli fort, sondern wechseln dabei scheinbar auch nahtlos zu Mikrofilamenten (Kuznetsov, 1992), was die Vernetzung der Zytoskelettstruktur innerhalb der Zelle eindrucksvoll belegt. Es gibt jedoch funktionelle Unterschiede zwischen den Filamenten, so daß Mikrotubuli eher ein Transport über lange Distanzen, Mikrofilamenten dagegen ein Transport über kurze Strecken zugesprochen wird (Goode, 2000).

Die Mikrofilamente sind nicht nur anders aufgebaut als die Mikrotubuli, sie zeigen auch Besonderheiten in ihrer Verankerung. So werden die aus Aktinpolymeren bestehenden Mikrofilamente (ähnlich den Intermediärfilamenten) an Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontaktstellen assoziiert. Durch direkte Verbindung mit der Plasmamembran sind diese Filamente maßgeblich an der Ausbildung der Zellgestalt, der Anhaftung am Untergrund sowie der Ausbreitung und Bewegung beteiligt. Aktin kann sich zu ganz verschiedenen Strukturen wie Streßfasern, Lamellipodien oder Filopodien zusammenlagern. Es werden auch Aktinbündel in peripherer, konkaver oder konvexer Gestalt beobachtet (Small, 1999). Die Ausbildung der Aktinstrukturen wird jeweils durch verschiedene kleine G-Proteine der Rho-Familie koordiniert. So werden Streßfasern durch Rho, Lamellipodia durch Rac und Filopodia durch Cdc42 reguliert (Hall, 1998). Diese Aktinstrukturen lassen sich nach ihrer Polarität in zwei Gruppen einteilen. Zu den unipolaren Strukturen gehören die Lamelli- und Filopodien, die sich auch ohne Substratanhaftung der Zellen formen, während Streßfasern und periphere Aktinbündel bipolare Aktin- und Myosin II-Strukturen enthalten und aus diesem Grund auch kontrahieren und Spannungen aufbauen können. Daher ist die Voraussetzung für bipolare Strukturen eine Substratverankerung der Zelle. Eine Antwort der Zelle auf externe Stimuli, und damit oft verbunden eine Bewegung auf dem Substrat, erfordert einen sehr schnellen Abbau- und Aufbauprozess der die Bewegung auslösenden Filamente.

Die Aktin-Polymerisierung wird durch zahlreiche an die Filamentenden bindenden Proteine gesteuert, die so eine weitere Verlängerung oder einen Abbau verhindern (Abb. 10). Darüber hinaus gibt es Proteine oder Filamentstrukturen (Tropomyosin), die durch seitliche Bindung mehrerer Aktinuntereinheiten oder Quervernetzung von Polymerketten einen Filamentabbau verlangsamen. Es ist naheliegend, daß es andere Proteine geben muß, die einen Abbau an Untereinheiten und damit die Depolymerisation von Filamenten fördern. ADF/Cofilin wurden als solche Regulatoren entdeckt (Übersicht bei Cooper, 2000). Der Filamentaufbau beginnt mit der Bildung von Aktin-Dimeren oder -Trimeren aus Monomeren. Diese Oligomerisierung wird nur sehr langsam initiiert und kann zusätzlich auch gehemmt werden. Die als *nucleation* benannte Reaktion wird durch den Arp2/3-Komplex leicht beschleunigt. Dieser Komplex bleibt mit den langsam wachsenden *pointed* Enden eng verbunden, was ein Wachsen nur am anderen (*barbed*) Ende der Filamente bewirkt (Mullins, 2000; Mullin, 1998).

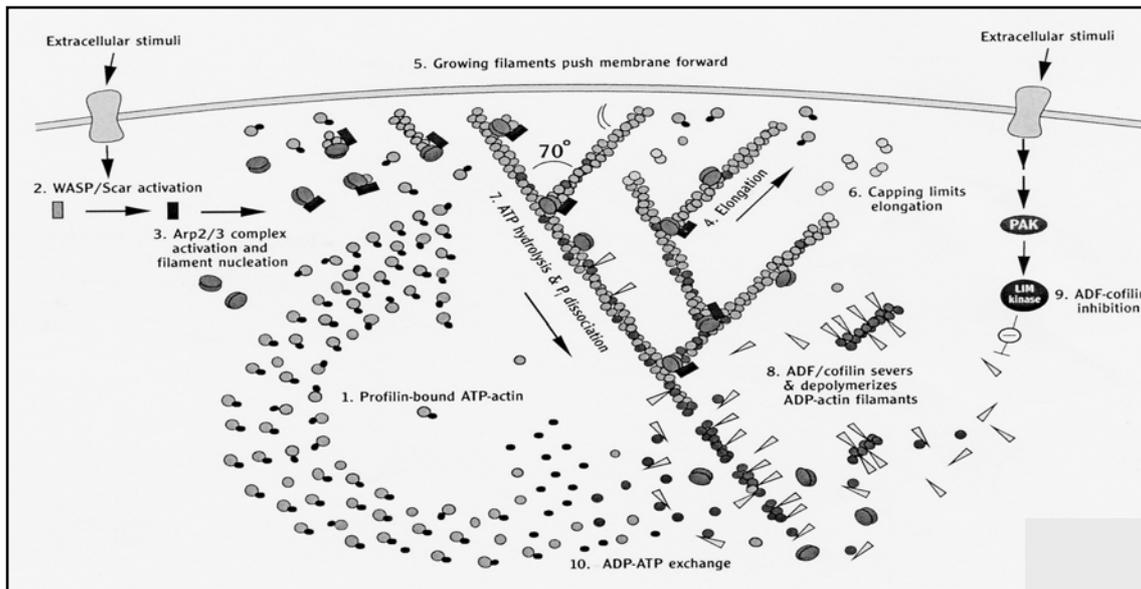


Abb. 10: Vereinfachte Darstellung des Auf- und Abbaus von Aktinfilamenten (nach Pollard, 2001). Die einzelnen Komponenten und Schritte sind im Text detailliert erläutert.

Die Oligomerisierung erfährt eine erhebliche Stimulierung durch Bindung von Proteinen der Wiskott-Aldrich-Syndrom-Familie (WASP) an Aktin-Monomere und den Arp2/3-Komplex. Aktinoligomere dienen auch zur Elongation bestehender Polymerketten. Sie können an beide Filamentenden binden, wobei die Polymerisierung am *barbed* Ende favorisiert wird. Durch reversible Bindung von spezifischen *capping* Proteinen kann ein weiteres Verlängern der Filamente am *barbed* Ende verhindert werden. Interessanterweise sind nahezu alle *barbed* Enden in der Zelle mit solchen *capping* Proteinen belegt. Deshalb kann nach Signalstimulus die Elongation nur an wenigen Filamenten einsetzen. Dieser Regulationsmechanismus erklärt, wie in sehr kurzer Zeit ein drastischer Filamentaufbau an spezifischen Orten in der Zelle und damit eine Bewegung erfolgen kann (Carlier, 1997). Um bestehende Aktinfilamente abzubauen (*severing*), muß der Arp2/3-Komplex vom *pointed* Ende abdissoziieren, was durch ADF/Cofilin beschleunigt wird. Außerdem kann ein Polymer durch Bindung von aktiviertem Gelsolin in zwei Filamente gespalten werden. Gelsolin blockiert dann durch Bindung des schnell wachsenden (*barbed*) Endes die Elongation des Filaments oder Aktin-Monomers (Kwiatkowski, 1999).

1.3.1.4. Die Ezrin Radixin Moesin (ERM)-Familie

Die Verankerung der Mikrofilamente an die Zellmembran erfolgt über Bindeglieder, wie z.B. Ezrin, Radixin oder Moesin. In kultivierten Fibroblasten- und Epithelzellen werden oft alle ERM-Proteine koexprimiert und lokalisieren an spezifischen Zelloberflächenstrukturen wie Mikrovilli, Filopodia oder *ruffling* Membranen. In Körperorganen hingegen beobachtet man eine Zell-spezifische Expression und Verteilung von ERM (Tsukita, 1999; Li, 2000), was auf spezifische Funktionen der einzelnen Proteine schließen läßt. Die 75-82 kDa großen Proteine weisen eine hoch konservierte N-terminale Domäne auf, die auch als FERM-Domäne

bezeichnet wird, da sie der N-terminalen Domäne der „Band 4.1 Proteine“ ähnelt. Zur „Band 4.1 Superfamilie“ gehören unter anderem die bekannten Tumorsuppressoren Merlin und Schwannomin sowie Protein-Tyrosin-Phosphatasen. An die N-terminale Domäne schließen sich ein ausgedehnter α -helikaler Bereich sowie eine geladene C-terminale Domäne an. Die C-terminalen 34 AS sind hoch konserviert und bilden die Hauptbindungsstelle für Aktin. Abb. 11 zeigt eine Darstellung dieser ERM Domänenstruktur. Die FERM-Domäne bindet direkt Membranrezeptoren, wie CD43, CD44 oder ICAM-1,2,3.

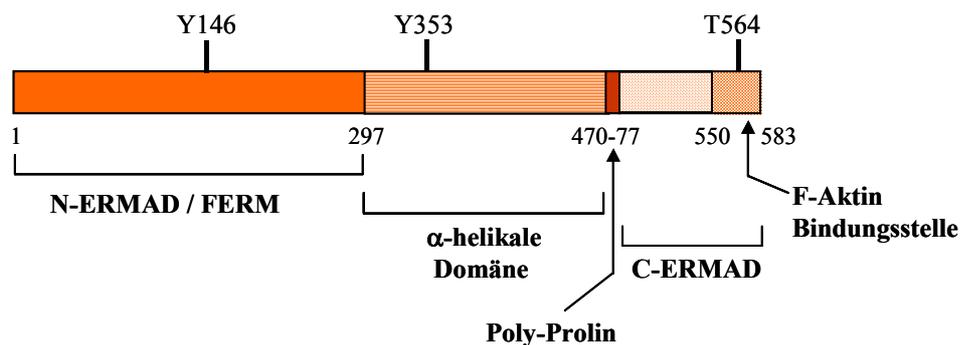


Abb. 11: Schematische Darstellung der ERM Domänenstruktur durch Radixin repräsentiert. Die Ziffern geben Aminosäurepositionen einzelner funktioneller Bereiche an. ERMAD: *terminal ERM association domains*, FERM: 4.1-ERM Domäne. Die für die Regulation durch Phosphorylierung wichtigen Aminosäuren sind oberhalb der Domänen eingezeichnet.

ERM-Proteine können auch indirekt über Linkerproteine, die PDZ-Domänen enthalten (wie EBP-50, *ERM-binding-phosphoprotein 50*, E3KARP, *exchanger 3 kinase A regulatory protein*, RhoGDI), an integrale Membranproteine binden. Durch Interaktion mit zahlreichen Membranrezeptoren und Lipidmolekülen erfüllen ERM-Funktionen bei der zellulären Signalübertragung für Zytoskelettumstrukturierungen durch Rho und PKC (Stapleton, 2002; Bretscher, 2002; Takahashi, 1997). Ezrin fungiert beispielsweise als PKA-Verankerungsprotein (Dransfield, 1997). Darüber hinaus wurde für ERM auch eine Rolle als Regulator für Rho (Mackay, 1997) und PI3-K (Gautreau, 1999) nachgewiesen. Überraschenderweise wurden in unserer Arbeitsgruppe ERM-Proteine in großen Mengen in zellulären Fraktionen (HA-2) nachgewiesen, die NS1-aktivierende Kinasen enthielten (siehe Kap. 1.2.1). Daraus ergab sich die interessante Frage, ob ERM-Proteine möglicherweise an der Stimulierung NS1-aktivierender Kinasen beteiligt sind, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden sollte.

Die Aktivierung der ERM-Proteine ähnelt den bereits für PKC-Isoenzyme beschriebenen Vorgängen. Im inaktiven Zustand liegen ERM „maskiert“ in einer intramolekular geschlossenen Konformation vor, in der die N- an die C-terminale Domäne bindet. Die aktive

Konformation wird einerseits durch Bindung von PIP[4,5] an die N-terminale Domäne (Hamada, 2000), andererseits durch Phosphorylierung spezifischer AS erreicht (siehe Abb. 11). Auch die Interaktion mit Partnerproteinen kann zum konformationellen Demaskieren führen (Vaiskunaite, 2000). Das C-terminale Threonin (566/564/547-E/R/M) zählt zu den phosphorylierten AS. Es kann *in vitro* durch ROK α , ROCKII, Rho, PKC α und PKC θ (Pietromonaco, 1998; Matsui, 1998) phosphoryliert werden und stimuliert die Bindung der ERM an Aktin (Simons, 1998). Die ERM-Phosphorylierung scheint *in vivo* ebenfalls in Abhängigkeit von RhoA zu erfolgen (Matsui, 1999). Es konnte eine Phosphorylierung des konservierten Tyrosin 146 sowie weiterer Tyrosine (Krieg, 1992) durch Lck oder HGF/SF gezeigt werden (Autero, 2003; Wu, 2000; Jiang, 1995). ERM-Proteine werden durch Phosphatasen und möglicherweise Proteolyse inaktiviert (Übersicht bei Tsukita, 1999).

1.3.2. Bedeutung des Zytoskeletts für bakterielle und virale Pathogene

Das zelluläre Zytoskelett besitzt eine große Bedeutung für virale und bakterielle Pathogene. Die Filamente sowie einzelne Zytoskelettproteine werden dabei für verschiedenste Funktionen ausgenutzt. Besonderes Interesse haben Bakterien sowie Vaccinia Viren auf sich gezogen, die zu ihrer Fortbewegung in einer Zelle oder aus ihr heraus die Aktinmaschinerie rekrutieren (Übersicht Frischknecht, 2001). *Listeria monocytogenes* beispielsweise besitzt ein Protein (ActA), das aufgrund seiner hohen Homologie die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch WASP nachahmt. Auch für das gram-negative Bakterium *Shigella* sowie für Vaccinia Viren konnte die Bildung sogenannter Aktin-Schwänze (*actin tails*) gezeigt werden, hier allerdings durch direkte oder indirekte Bindung des zellulären WASP. *E. Coli* (EPEC) und *Rickettsia* sind ebenfalls auf solche Aktin-basierenden Transportmittel angewiesen (Frischknecht, 2001). Dabei können oft erstaunliche Distanzen zurückgelegt werden, die die übliche Länge individueller Transportereignisse von 1-2 μm in der Zelle bei weitem überschreiten (Sodeik, 2000). Das Besondere an diesen Organismen ist, daß sie der Zelle die Neubildung von Filamenten sozusagen diktieren. Daneben gibt es Viren, die lediglich bereits vorhandene Filamentstrukturen ausnutzen. Hierzu zählen die an Mikrotubuli transportierten Rotaviren (Nejmeddine, 2000), bovine Papillomviren (Liu, 2001; Selinka, 2002) sowie Parvoviren (Vihinen-Ranta, 1998).

In den letzten Jahren wurden weitere Wechselwirkungen zwischen verschiedenen viralen Systemen mit dem Wirtszell-Zytoskelett beschrieben, die über Transportfunktionen hinausgehen. So greifen einige Viren in die Regulation der Expression von Zytoskelettproteinen ein, wodurch Vimentin nach Epstein Barr Virus- (Pokrovskaja, 1997) bzw. Moesin nach HIV-Infektion (Scheuring, 1998) verstärkt exprimiert werden. In vielen umhüllten Viren können diese oder andere Zytoskelettproteine in die Kapside inkorporiert

werden, da sie offenbar für Assemblierungs- und *Budding*-Prozesse benötigt werden. So wurde in HIV-Partikeln Aktin, Moesin und Cofilin nachgewiesen (Ott, 1996; Hecker, 1997). Die ERM-Proteine sind ebenfalls in Tollwutviren enthalten und eng mit dem Lipidmantel assoziiert (Sagara, 1995). Auch viele im Zytoplasma ablaufende enzymatische Prozesse eines viralen Infektionszyklus setzen eine Interaktion mit Filamenten voraus: beispielsweise werden für die reverse Transkription des HIV intakte Mikrofilamente benötigt (Bukrinskaya, 1998). Die Proteinsynthese der Influenzaviren ist auf intakte Intermediärfilamente angewiesen (Arcangeletti, 1997), die Replikation von Parainfluenzaviren dagegen auf Mikrofilamente (De, 1999). Es zeigt sich also eine spezifische Anpassung der Pathogene an ihren jeweiligen Wirt.

Manche Viren verändern sogar zielgerichtet das Zytoskelett. Um einen Import ihrer übergroßen Kapside in den Nukleus zu erzielen, rekrutieren Cytomegalieviren PKC zur Phosphorylierung der nukleären Lamina, die sich nachfolgend auflöst (Muranyi, 2002). Andere Beobachtungen zeigen, daß viele Viren Filamentstrukturen selektiv abbauen, z. B. um die Zelle auf den Export viraler Partikel vorzubereiten (Kang, 2002; Gerrard, 2002; Candurra, 1999). Es ist bekannt, daß Herpesvirus-Infektionen den Verlust des MtOC auslösen, um das VP22-Protein in den Nukleus zu dirigieren (Kotsakis, 2001). Viele dieser für die Wirtszelle destruktiven Vorgänge konnten bisher lediglich beschrieben, ihre Funktion oft jedoch noch nicht ermittelt werden (Duprex, 2000), so z.B. auch die Auflösung dicker Aktin Streßfasern durch Pseudorabiesviren (Van Minnebruggen, 2002). Hingegen induzieren andere Viren auch die Neubildung von zellulären Strukturen, wie z.B. die in HIV-infizierten Zellen aus geschlossenen Protofilamenten gebildete Ringstruktur (**Rev- Tubulin toroidaler Komplex RTT**) (Watts, 2000). Die Interaktionen viraler oder bakterieller Spezies allein mit dem Zytoskelett ihrer Wirtszellen ist also sehr komplexer Natur. Diese Aspekte gilt es bei der Charakterisierung der MVM-induzierten Zytoskelettveränderungen zu berücksichtigen.

Das NS1 von MVM interagiert in Abhängigkeit seines Phosphorylierungsgrades ebenfalls mit spezifischen Zytoskelettproteinen. Ausgewählte Dephosphorylierungsmutanten von NS1 wurden auf ihre Bindung an zelluläre Proteine aus einem A9-Zellextrakt untersucht und zeigten im Vergleich mit den Interaktionspartnern des nativen NS1 Defizite. Ein Partnerprotein, daß an wt-NS1 bindet, nicht jedoch an die Dephosphorylierungsmutante NS1-T363A, ist Tropomyosin (Nüesch, unveröffentlichte Daten). Dieses Protein stabilisiert Aktinfilamente und wirkt Abbauprozessen von Mikrofilamenten durch ADF/Cofilin (Ono, 2002) oder Gelsolin (Nyakern-Meazza, 2002) entgegen. Neben der Charakterisierung der Zytoskelettveränderungen nach MVM-Infektion, die bei A9 Fibroblastenzellen morphologisch deutlich anhand langer Zellfortsätze sichtbar werden, sollte auch die Rolle der, in NS1-aktivierenden Kinase Fraktionen nachgewiesenen ERM-Proteine untersucht werden.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Autonome Parvoviren ziehen aufgrund ihrer onkolytischen Eigenschaften viel Interesse auf sich, vor allem um diese Fähigkeiten zu therapeutischen Zwecken ausnutzen zu können. Diese ambitionöse Zielsetzung erfordert ein grundlegendes Verständnis über die molekularen Mechanismen, die zum spezifischen Abtöten von Tumorzellen beitragen. Eine zentrale Rolle spielt dabei das große Nichtstrukturprotein NS1 autonomer Parvoviren. Es führt zahlreiche regulatorische Funktionen aus, ist essentiell für die virale Replikation und wirkt zytotoxisch auf die Wirtszelle. Das Zusammenspiel der verschiedenen NS1-Aktivitäten wird zumindest zu einem bedeutenden Teil durch Phosphorylierung koordiniert. Daher sollten die Virus-Wirtszell-Interaktionen, insbesondere die Wechselwirkung mit spezifischen Signalkaskaden, anhand der NS1-Regulation im Rahmen dieser Arbeit extensiver untersucht werden.

Zielstellungen:

- Bis dato ist der Einfluß der Phosphorylierung hauptsächlich anhand der replikativen Funktionen von NS1 untersucht worden, wobei die atypische PKC λ als phosphorylierende und regulierende Kinase für NS1-Helikasefunktion *in vitro* identifiziert wurde. Es gab Hinweise, daß weitere Isoformen der PKC-Familie zur vollständigen Reaktivierung von dephosphoryliertem NS1 für Replikationsaktivitäten *in vitro* benötigt werden. Nach diesen Kinasen sollte gesucht und bei erfolgreicher Bestimmung auch die Bedeutung der Kinase(n) für NS1 und die MVM-Infektion *in vivo* abgeklärt werden.
- Nachfolgend galt es zu ermitteln, inwiefern die MVM-Infektion möglicherweise eine Aktivierung der für diese Kinase(n) relevanten PI3-K/ PDK-1 Signalkaskade induziert oder ob das angepaßte Virus auf bereits aktiv in der Wirtszelle vorliegende Isoenzyme zurückgreift.
- Von besonderem Interesse ist die Fragestellung, welche Rolle den in den NS1-aktivierenden Kinasefraktionen identifizierten ERM- (Ezrin Radixin Moesin) Proteinen zukommt, und ob sie am zielgerichteten Transport der Kinasen zu Orten der NS1-Aktivierung als Mediatorproteine beteiligt sein könnten.
- Die Aktivierungsvorgänge von Kinasen sind oft stark mit dem Zytoskelett und Membranen verbunden. Das zelluläre Zytoskelett unterliegt während der viralen Infektion Umstrukturierungen, die sich in drastischen morphologischen Änderungen der Wirtszelle widerspiegeln. Zum Verständnis der zytotoxischen Eigenschaften von NS1 sollten diese Zytoskelettumstrukturierungen charakterisiert und gegebenenfalls mit den für die NS1-Aktivierung bedeutsamen Signalkaskaden in Verbindung gebracht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Zelllinien, Virus- und Bakterienstämme

2.1.1.1. Zelllinien

A9:	murine (m) Bindegewebszelllinie L929; (Tattersall, 1983)
BSC-40	hitzeresistentes Derivat der BSC1 Affennierenzellen, <i>African Green Monkey Kidney (Cercopithecus aethiops) cells</i> ; (Rempel, 1990)
CV-1	pseudo-diploide Fibroblastenzellen des <i>African Green Monkey</i> ,
HeLa,	humane (h) Zervixkarzinomzelllinie (adhärent);(Gey, 1952)
HeLa-S3	HeLa- Suspensionszellen
A9P38FlagPKC λ DN	A9 stabil transfiziert mit mPKC λ DN, Nüesch, DKFZ
A9P38FlagPKC λ DN+	
MycPKC η A160E	A9 stabil transfiziert mit mPKC λ DN + hPKC η A160E, Nüesch, DKFZ
A9P38FlagPKC λ DN+	
MycPKC η T512A	A9 stabil transfiziert mit mPKC λ N + hPKC η T512A, Nüesch, DKFZ
A9P38FlagPKC η A160E	A9 stabil transfiziert mit hPKC η 160E, diese Arbeit
A9P38FlagPKC η T512A	A9 stabil transfiziert mit hPKC η 512A, diese Arbeit
A9P38FlagPKC η DN	A9 stabil transfiziert mit hPKC η N, diese Arbeit
A9P38MycPKC η A160E	A9 stabil transfiziert mit hPKC η 160E, diese Arbeit
A9P38MycPKC η T512A	A9 stabil transfiziert mit hPKC η 512A, diese Arbeit
A9P38MycPKC η DN	A9 stabil transfiziert mit hPKC η N, diese Arbeit
A9P38MycPDKwt	A9 stabil transfiziert mit mPDKwt, Nüesch, DKFZ
A9P38MycPDK-S244A	A9 stabil transfiziert mit mPDK-S244A, Nüesch, DKFZ
A9P38FlagRdx	A9 stabil transfiziert mit mRadixin, diese Arbeit
A9P38FlagRdx+MycPKC η A160E	A9 stabil transfiziert mit mRadixin und hPKC η 160E, diese Arbeit
A9P38FlagRdx+MycPKC η T512A	A9 stabil transfiziert mit mRadixin und hPKC η 512A, diese Arbeit
A9P38FlagRdx+MycPKC η DN	A9 stabil transfiziert mit mRadixin und hPKC η N, diese Arbeit

2.1.1.2. Virusstamm

MVMp:	fibrotroper Wildtypstamm des autonomen Parvovirus <i>Minute Virus of Mice</i> (Genbanksequenznummer: NC_001510; (Astell, 1983)
-------	--

2.1.1.3. Bakterienstämme

Stammbezeichnung	genotypische Beschreibung	Quelle
<i>E. coli</i> SURE	e14 ⁻ (McrA ⁻), $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171$, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>rel A1</i> , <i>lac</i> , <i>recB</i> , <i>recJ</i> , <i>sbcC</i> , <i>umuC:Tn5(Kan^r)</i> , <i>uvrC</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i> , Tn10(Tetr)] ^c	Stratagen
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi80lacZ\DeltaM15$, $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^r), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL-1 gold	Tet ^r Δ (<i>mcrA</i>), 183 $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> The [F' <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i> Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r] ^a	Stratagene

2.1.2. Medien und Zusätze

Zellkultur-Medien und Zusätze

DMEM (<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>)	Sigma
S-MEM Suspensions-MEM (ohne CaCl ₂)	Sigma
MEM Phosphat-frei	ICN
MEM ohne Methionin/Cystein	ICN
OPTIMEM-1-Medium	Gibco BRL
FCS (<i>Fetal Calf Serum</i>)	PAA Laboratories GmbH, Wien (A)
Gentamycin	Gibco BRL
L-Glutamin (200 mM)	Gibco BRL
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL
Trypsin-EDTA	Gibco BRL

E. coli-Medien und Zusätze

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

2.1.3. Plasmide

Bezeichnung	Referenz	Bezeichnung	Referenz
pCR-2.1	Invitrogen	pP38 <i>Myc</i> PDKwt	Nüesch, DKFZ
pCR-2.1PKC η A160E	diese Arbeit	pP38 <i>Myc</i> PDK-S244A	Nüesch, DKFZ
pCR-2.1PKC η T512A	diese Arbeit	pP38 <i>Myc</i> PKC η A160E	diese Arbeit
pCR-2.1PKC η DN	diese Arbeit	pP38 <i>Myc</i> PKC η DN	diese Arbeit
pCR-2.1Rdx	Nüesch, DKFZ	pP38 <i>Myc</i> PKC η T512A	diese Arbeit
pdBMVp ⁺	(Kestler, 1999)	pQE32	Qiagen
pdBMVp ⁺ -1200	(Kestler, 1999)	pQE32-Rdx	diese Arbeit
pDsRedN1	Clontech	pSV2neo	Clontech
pDsRed-Flag	diese Arbeit	pTM1	(Moss, 1990)
pDsRed-FlagPKC λ	diese Arbeit	pTM-(His) ₆	(Nüesch, 1998b)
pL1-2TC	(Cotmore, 1994)	pTM-(His) ₆ NS1	(Nüesch, 1998b)
pL1-2GAA	(Cotmore, 1994)	pTM-(His) ₆ PKC δ	(Lachmann, 2003)
pP38	Nüesch, DKFZ	pTM-(His) ₆ PKC η	diese Arbeit
pP38FlagPKC η A160E	diese Arbeit	pTM-(His) ₆ PKC λ	(Dettwiler, 1999)
pP38FlagPKC η DN	diese Arbeit	pTM-(His) ₆ PKC ζ	(Dettwiler, 1999)
pP38FlagPKC η T512A	diese Arbeit	pUC19	Invitrogen
pP38FlagPKC λ DN-EGFP	Nüesch, DKFZ	vTF7-3	(Fuerst, 1986)
pP38FlagRdx	diese Arbeit		

2.1.4. DNA-Oligonukleotide

Sämtliche der nachfolgend aufgeführten DNA-Oligonukleotide wurden von der MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Oligonukleotide zur Konstruktion eines Flag-Linkers:

Flag-uni: 5' -CTA GCG CTA **ATG GCT GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GCC** A-3'

Flag-rev: 5' -AGC TTG GCC TTG TCA TCG TCG TCC TTG TAG TCA GCC ATT AGC G-3'

Oligonukleotide zur Klonierung von PKC λ als Flag-Fusionsprotein

PKC λ -uni (*Bam*HI) : 5' -CGC GGG ATC CAA TGA TAA CAC ACT TTG AGC C-3'

PKC λ -rev (*Xho*I, *Not*I): 5' -GTA AGA ATG CGG CCG CCC TCG AGT CAG ACA CAC TCT TCT GCA G-3'

Oligonukleotide zur Klonierung von [His]₆-PKC λ

pTM-His- λ -uni (*Nco*I, *Eco*RV): 5' -GCG GCC ATG GAT ATC ATG GCT GGA AAT GCT TAC TCT-3'

pTM-His- λ -rev (*Xho*I, *Bam*HI): 5' -GGG CCT CGA GGG ATC CTC AGA CAC ACT CTT CTG CAG-3'

Oligonukleotid zur Klonierung eines N-terminalen Myc-Linkers:

Myc-uni (SmaI): 5' -CCC GGG **ATG GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT** ATG
TCG TCT GGC ACC ATG AAG TTC-3'

Oligonukleotide zur Klonierung der hPKC η cDNA sowie von [His]6-PKC η

η -N-uni (*NcoI*): 5' -ATG TCG TCT GGC ACC ATG AAG TTC AAT GGC TAT TTG AGG GTC CG-3'
 η -IN-rev : 5' -CCA CAG TTA GGG GCC ACG TTC GCT TGA CAT CGA ATA TGC A-3'
 η -IN-uni : 5' -TGC ATA TTC GAT GTC AAG CGA ACG TGG CCC CTA ACT GTG G-3'
 η -C-rev (*EcoRV*): 5' -CTA TGG TTG CAA TTC TGG AGA CAC ATA GGA AAA GTT TCT A-3'

Oligonukleotide zur Klonierung von PKC η -Mutanten:

PKC η VL/N-terminal (*SmaI*): 5' -CGG GCC CGG GAT ATG TCG TCT GGC ACC ATG AAG-3'
PKC η VL/C-terminal (*NotI*): 5' -GGC GCG CGG CCG CCT ATG GTT GCA ATT CTG GAG AC-3'
 η A160E-uni : 5' -CAG GAA GCG CCA AAG **GGA AAT** GCG AAG GCG AGT CCA CC-3'
 η A160E-rev : 5' -GGA CTC GCC TTC GCA **TTT CCC** TTT GGC GCT TCC TGG TA-3'
 η T512A-uni : 5' -GTC ACC ACG GCC **GCA** TTC TGT GGC ACG CCA GAC-3'
 η T512A-rev : 5' -GGC GTG CCA CAG **AAT GCG** GCC GTG GTG ACA CCA TTG-3'
 η DN-rev (*XbaI*) : 5' -TAC GTC TAG ATA TCT TAC CCC ACA GTT AGG GGC CAC GTT-3'

Oligonukleotide zur Klonierung von Radixin pQE-Konstrukten:

Rdx-uni (*BamHI*): 5' -GCG CGG ATC CCC ATG GCG AAG CCA ATC AAT GT-3'
Rdx-rev (*Asp718*): 5' -GGC CGG TAC CTC ACA TGG CTT CAA ACT CAT CG-3'

Oligonukleotide zur Klonierung von Radixin pP38-Konstrukten:

Rdx-uni (*BamHI*): 5' -GCG CGG ATC CCA TGG CGA AGC CAA TCA ATG TAA GAG T-3'
Rdx-rev (*NotI*) : 5' -CCG ACG CCG GCG TCA CAT GGC TTC AAA CTC ATC GAT-3'

2.1.5. Antikörper

2.1.5.1. Primäre Antikörper

<i>gerichtet gegen</i>	<i>aus Spezies</i>	<i>erworben von</i>	<i>VF IF</i>	<i>VF WB</i>
α -Aktin	Maus	ICN		1:7000
α -PKC α	Kaninchen	Santa Cruz	1:20	1:2000
α -PKC β I	Kaninchen	Santa Cruz	1:20	1:1000
α -PKC β II	Kaninchen	Santa Cruz	1:20	1:1000
α -PKC γ	Kaninchen	Santa Cruz	1:50	1:5000
α -PKC δ	Kaninchen	Santa Cruz	1:50	1:5000
α -PKC ϵ	Maus	Santa Cruz	1:50	1:1000
α -PKC η	Kaninchen	Santa Cruz	1:20	1:1000
α -PKC λ	Maus	Beckton Dickinson	1:10	1:250
α -PKC ζ	Ziege	Santa Cruz	1:10	1:250
α -PDK-1	Schaf	Upstate Biotechn.	1:10	1:300
α -Ezrin	Ziege	Santa Cruz	1:20	1:300
α -Radixin	Ziege	Santa Cruz	1:20	1:600
α -Moesin	Maus	Beckton Dickinson	1:10	1:5000
α -P-ERM	Ratte	(Tsukita, 1999)	1:5	1:50
α - α -Tubulin	Maus	Sigma	1:100	1:1000
α -Vimentin	Ziege	Santa Cruz	1:40	1:300
α -WASP	Maus	Santa Cruz		1:300
α -Gelsolin	Maus	Beckton Dickinson		1:300
α -NS1 Sp8	Kaninchen	(Brockhaus, 1996)	1:1000	1:2000
α -NS1 3D9	Maus	(Cziepluch, 2000)	1:5	
α -NS1 C-term	Kaninchen	(Cotmore, 1986)	1:50	1:2000
α -NS1 H, N-term	Kaninchen	(Cotmore, 1986)	1:50	
α -VP-Peptid H-1	Kaninchen	Laborbestand		1:2000

α -VP-TATT3-4	Kaninchen	(Cotmore, 1997)	1:20	1:2000
α -VP-TATT1-4	Kaninchen	(Cotmore, 1997)	1:20	1:1000
α -VP-E2F3	Maus	erhalten von S. Cotmore	1:10	1:1000
α -Flag [®] M2	Maus	Sigma	1:1000	1:1000
α -Myc	Maus	Invitrogen	1:500	1:5000
α -Myc	Kaninchen	Upstate Biotechn.	1:100	1:1000
α -BrdU	Ratte	Direct.com	1:50	
α -BrdU	Maus	Becton Dickinson	1:5	

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

<i>gerichtet gegen</i>	<i>aus Spezies</i>	<i>markiert mit</i>	<i>erworben von</i>	<i>VF IF</i>	<i>VF WB</i>
α -Kaninchen	Ziege	HRP	Promega		1:5000
α -Maus	Ziege	HRP	Promega		1:5000
α -Ziege	Esel	HRP	Santa Cruz		1:2000
α -Schaf	Kaninchen	HRP	Upstate Biotechn.		1:4000
α -Ratte	Ziege	HRP	Dianova		1:4000
α -Kaninchen	Ziege	FITC	Dianova	1:100	
α -Kaninchen	Ziege	Cy3	Dianova	1:800	
α -Kaninchen	Esel	Cy3	Dianova	1:800	
α -Maus	Ziege	Rhodamin	Dianova	1:100	
α -Maus	Esel	Cy2	Dianova	1:100	
α -Maus	Esel	Cy3	Dianova	1:800	
α -Ratte	Ziege	Alexa Fluor 555	MoBiTec	1:2000	
α -Schaf	Esel	Cy2	Dianova	1:100	
α -Ziege	Esel	FITC	Dianova	1:100	
α -Ziege	Esel	Cy3	Dianova	1:800	
α -Maus	Kaninchen	unkonjugiert	Dianova		

2.1.6. Seren

Produkte	Hersteller
Eselserum	Santa Cruz
Kaninchenserum	Nüesch, DKFZ
Mausserum	Calbiochem
Ziegenserum	Gibco

2.1.7. Enzyme

Produkte	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Roche
Lysozym	Serva
Phosphokreatinkinase	Roche
PKC-Isoenzym Kit	Sigma
Proteinase K	Roche
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T4-DNA-Polymerase	Roche
Restriktionsenzyme	Fermentas, New England Biolabs, Roche
RNase	Sigma

2.1.8. Molekularbiologische Reagenziensätze

Produkte	Hersteller
Biorad Protein Assay	BioRad
Megaprime DNA Labelling System	Amersham
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen
TA cloning Kit 2.1	Invitrogen
Advantage® -HF PCR Kit	Clontech
Smart™ Race DNA Amplification Kit	Clontech
TNT coupled Reticulocyte Lysate	Promega
PDK-1 Kinase Assay Kit	Upstate Biotechnology

2.1.9. Größenstandards

2.1.9.1. DNA-Größenstandard

λ / *EcoRI* + *HindIII* MBI Fermentas
(Fragmente in bp: 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226)

2.1.9.2. Protein-Molekulargewichtstandards

BenchMark™ (Gibco BRL) Größen in kDa: 8.4; 14.9; 19.6; 26.0; 37.4; 49.5; 63.8; 80.9; 113.7; 176.5
Rainbow™ (Amersham) Größen in kDa: 14.3; 20.1; 30.0; 45.0; 66.0; 97.0; 220.0
Mark12™MW (Invitrogen) Größen in kDa: 2-3; 6.5; 14.3; 20.1; 26.6; 36.5; 42.7; 55.6; 66.4; 97.2; 116.4; 158.2; 212.0)

2.1.10. Radioaktives Material

Produkte	Hersteller
[α - ³² P]-dCTP	Amersham
[α - ³² P]-ATP	Amersham
[γ - ³² P]-ATP	Amersham
TRAN ³⁵ S-LABEL (Methionin, Cystein)	ICN
H ₃ [³² PO ₄] ortho-Phosphat	ICN

2.1.11. Chemikalien

Standardchemikalien und -materialien wurden von den Firmen Amersham, Merck, Roche, Roth, Serva und Sigma in der jeweils höchsten Reinigungsstufe bezogen. Weitere Produkte und deren Hersteller sind nachfolgend aufgelistet.

Produkte	Hersteller	Produkte	Hersteller
Agar	Difco	Neubauerzählkammer	Neubauer
Agarose	Gibco BRL	Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen
Agarose (<i>Low Melt</i>)	Sigma	Nitrozellulose (Hybond™-N)	Amersham
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad	Nitrozellulose (Protran BA 85)	Schleicher & Schüll
Amplify	Amersham	Norleucin	Sigma
Aprotinin	Roche	NP40	Fluka
ATP	Roche	Objektträger (Teflon beschichtet)	Roth
Autoradiographiefilme	Kodak	Phalloidin (Rhodamin-Konjugat)	MoBiTec
β -Mercaptoethanol	Roth	Phosphataseinhibitoren	Sigma
BrdU (Bromodeoxyuridine)	Sigma	Phosphatidylserin	Sigma
BSA	Sigma		

Bromphenolblau	Serva	Phosphozellulose	Whatman
CHAPS	Roche	PMSF	Serva
DE52	Whatman	Protein A, G Sepharose	Pharmacia
Deckgläschen	Langenbrinck	Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Dialyseschläuche (86-8 kDa)	Spectrum Medical Industries Inc	SDS	Sigma
DMSO	Sigma	Streptavidin MagneSphere [®] paramagnetische Partikel	Promega
DOC	Sigma	TEMED	Sigma
DTT	Roche	TPA	Sigma
Dünnschichtchromatographieplatten	VWR	Triton X-100	Serva
ECL [™] Western Blot Reagenzien	Amersham	Tween 20	Sigma
G418	Sigma	Whatman-Filterpapier	Schleicher&
IPTG	Q-Bio Gene		Schüll
Leupeptin	Roche	Zellhomogenisator (Douncer)	B. Braun
Lipofectamin	Gibco BRL	Zellkulturflaschen/-schalen	Greiner/Nunc

2.1.12. Spezielle Geräte

Geräte

1D Elektrophorese Kammern Protean[®] II xi Cell
 2D Elektrophorese Apparatur Multiphor II
 Agarose Gelelektrophorese Kammern Easy-Cast[™] B1A
 Digital Kamera, (Open Lab 2.2.5 Software)
 Durchlichtmikroskop *hund*
 Fluoreszenzmikroskop Leitz DRMD
 FPLC
 Gelrockner Model 583
 Hydroxylapatitsäule (HA-FPLC)
 Konfokales Laserscanning Mikroskop TCS SP
 Naß Blot Apparatur Trans-Blot[™] Cell
 pH Meter *Microprocessor*
 Protaminchlorid-(His)₆-Tag-Säule
 Spektrophotometer Ultrospec 3100pro
 Stratalinker[®] UV Crosslinker
 Trans-Blot Apparatur
 Tri-CARB Liquid Scintillation Analyzer 1600CA
 Ultraschallgerät, *Sonifier* 250
 Vacuum-Konzentrator
 Video Imaging System
 Zentrifugen: Tischzentrifuge 5415C
 Kühlzentrifuge 2 K 15
 Sorvall RC5B und RC5C
 Zellkulturzentrifuge ZK 380
 Ultrazentrifuge Optima LE-80K
 Mini-Ultrazentrifuge TL-100

Hersteller

BioRad
 Pharmacia
 Owl Scientific Incorporation
 Hamamatsu (Improvision)
 Wetzlar
 Leica
 Pharmacia/ Amersham
 BioRad
 MERCK
 Leica
 BioRad
 WTW
 Nüesch, DKFZ
 Amersham
 Stratagene
 BioRad
 Packard
 Branson
 Bachhofer
 Pharmacia
 Eppendorf
 Sigma
 Du Pont
 Hermle
 Beckman
 Beckman

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien Stämmen

E. coli Bakterien wurden in LB-Medium (10 g Bacto Tryptone; 5 g Bacto Hefeextrakt; 5 g NaCl; ad 1 l H₂O) oder auf Agar-Platten (LB-Medium mit 1,7 % Bacto Agar) angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Dazu wurde die in Reagenzgläsern bzw. Glaskolben angezüchtete Suspensionskultur permanent bei 200 rpm geschüttelt. Als Selektionszusatz wurde Ampicillin (100 µg/ml), Tetracyclin (50 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) verwendet. Zur Kryokonservierung wurden die Bakterien aus 1 ml Suspensionskultur abzentrifugiert (2 min, 3000 rpm, Eppendorffzentrifuge), in steriler LB-Glycerollösung (85:15 v/v) aufgenommen und bei -80°C schockgefroren und gelagert.

2.2.1.2. Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA wurden *E. coli* Bakterien nach der Methode von Inoue (1990) kompetent gemacht. Zunächst wurde eine 10 ml Suspensionskultur in LB Medium + Selektionsantibiotikum (2.2.1.1) über Nacht angezüchtet. 1 ml dieser Kultur wurde anschließend als Inokulum für 200-250ml LB in einem 2 l Erlenmeyerkolben verwendet und bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} \leq 0,5$ bei 37 °C (circa 4 h) kultiviert. Nach Erreichen dieser Dichte erfolgte sofort eine Abkühlung der gesamten Bakterienkultur für 10 min auf Eis. Danach wurden die Bakterien in vorgekühlten 50 ml Falcon-Röhrchen bei 4 °C mit 2100 g 12 min sedimentiert und in 10 ml eiskaltem sterilem TB-Puffer (10 mM Pipes, 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; 55 mM MnCl₂; pH 6,7) resuspendiert. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (4 °C, 3150 g, 12 min). Zuletzt wurden die sedimentierten Bakterien in 1/10 des Ausgangsvolumens (20-25ml) TB aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert, mit DMSO versetzt (Endkonzentration 7 %), in vorgekühlte Eppendorffgefäße aliquotiert und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C. Vor Benutzung der für die Hitzeschocktransformation kompetenten Bakterien wurde deren Transformationsrate bestimmt, indem Aliquots mit verschiedenen Verdünnungsstufen von pUC19 transformiert wurden. Im allgemeinen konnte durch diese Methode für SURE oder XL-1 *gold* eine Transformationsrate von $\geq 5 \times 10^7$ erzielt werden.

2.2.1.3. CaCl₂-Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA durch Hitzeschock

50-100 µl kompetenter *E. coli* wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 1-2 µl β-Mercaptoethanol versetzt, mit der zu transformierenden Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien können dabei durch das im TB Puffer (2.2.1.2) enthaltene Kalzium die Plasmid-DNA in Form von Kalzium-Komplexen aufnehmen. Anschließend wurden die Bakterien für 40 sec einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und für 90 sec auf Eis abgekühlt. Die Zugabe von 200 bzw. 400 µl LB Medium (2.2.1.1) ermöglichte den Transformanten durch 40- 60 min Inkubation bei 37 °C ihre neu erworbene Antibiotikaresistenz auszubilden. Die Bakterien wurden zur Selektion rekombinanter Kolonien entweder direkt oder nach vorheriger Zentrifugation (2000 rpm, 30 sec, Eppendorffzentrifuge) und Aufnahme in 100 µl LB Medium auf Agar-Platten (2.2.1.1) mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht angezüchtet.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

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

Je nach gewünschter Plasmid-DNA-Menge erfolgte eine Aufreinigung aus 4 ml *E. coli* Übernachtskultur für kleine Plasmid-Mengen durch den Minipräparationskit (Qiaprep spin) bzw. aus 400 ml Übernachtskultur für große DNA-Ausbeuten mit dem Maxipräparationskit von Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers. Bei der Maxipräparation wurde das getrocknete DNA-Pellet nach Fällung in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

2.2.2.2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentrationen wurden photometrisch durch Messung der Extinktion bei $\lambda=260$ nm bestimmt, da Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum besitzen. Die Extinktion von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml DNA, 40 µg/ml RNA bzw. 37 µg/ml ssDNA. Der Reinheitsgrad läßt sich unter Einbezug der Absorption durch Proteine bei $\lambda = 280$ nm errechnen, wobei der Quotient A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2 liegen sollte.

2.2.2.3. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen von New England Biolabs oder Roche und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Je nachdem, ob es sich um eine analytische oder präparative Spaltung handelte, variierten die eingesetzten DNA-Mengen und Inkubationszeiten jeweils von 2 h bis 12 h in der Regel bei 37 °C (oder je nach Enzym auch bei 25 °C oder 60 °C). Für analytische Spaltungen wurde 1 µg DNA (20 µl Endvolumen), für präparative 5-10 µg (40 µl Endvolumen) eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden entsprechend mit 10x Inkubationspuffer, 1/10 BSA (10 mg/ml) sowie 2 U bzw. 10 U Enzym versetzt und mit H₂O entsprechend dem gewünschten Endvolumen aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden zur Analyse der Restriktionsprodukte mit 4 µl bzw. 8 µl 6x Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 30 % Glycerol) versetzt und durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.2.4. Enzymatische Modifizierung von DNA durch Dephosphorylierung

Um die Selbstligation linearisierter Vektoren zu minimieren, insbesondere bei monoenzymatischen Restriktionsverdau, wurden die 5'- Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Diese Reaktion erfolgte nach Sambrook (1989), wobei 5- 10 µg linearisierte Plasmid-DNA mit CIP Dephosphorylierungs-puffer (100 mM Tris pH 8,5; 10 mM EDTA, 1 mM ZnCl₂) und 2 U Phosphatase (*calf intestine alkaline phosphatase*, Boehringer) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl für 60 min bei 37 °C inkubiert wurden. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung gestoppt (15 min, 65 °C) und das Enzym durch nachfolgende Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA entfernt. Anschließend erfolgte entweder eine Ethanol-fällung der linearisierten dephosphorylierten DNA oder eine erneute Aufreinigung durch Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion.

2.2.2.5. Phenol- und Chloroform- Extraktionen

Zur Abtrennung von Restriktions- oder DNA-modifizierenden Enzymen wurde DNA durch Extraktion mit Phenol und nachfolgend Chloroform gereinigt. Zu diesem Zweck wurde das Probenvolumen auf 150 µl mit H₂O aufgefüllt, mit 250 µl Phenol versetzt und 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation (13 000 rpm, 10 min, Eppendor fzentrifuge) separiert. Die wäßrige Phase wurde nun mit 250 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Abschließend wurde die in der wäßrigen Phase gelöste DNA durch Ethanol-fällung aufkonzentriert.

2.2.2.6. Ethanol-fällung von Nukleinsäuren

Um DNA zu konzentrieren oder um Salze aus einem DNA-Gemisch z.B. bei Restriktionsansätzen zu entfernen, wurde Plasmid-DNA gefällt. Dazu wurden der DNA 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,5) und 2,5 Volumen 98 % Ethanol zugegeben und mindestens 10 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA 15 min bei 13000 rpm (Eppendor fzentrifuge) pelletiert. Der Überstand wurde entfernt, das DNA-Pellet luft- oder vacuumgetrocknet, und im gewünschten Volumen H₂O aufgenommen. Alternativ dazu wurde z.B. nach Maxipräparationen von DNA eine Isopropanol-fällung vorgenommen. Dazu wurde die Salzkonzentration der DNA-Lösung auf 0,5 M eingestellt und anschließend mit 0,7 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation (15 000 g, 30 min, 4 °C) sedimentiert, der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde anschließend zur Entfernung von präzipitiertem Salz mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut pelletiert (15 000 g, 10 min), bei Raumtemperatur getrocknet und in dem gewünschten Volumen, z.B. 500 µl, H₂O aufgenommen.

2.2.2.7. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte je nach Größe der zu trennenden Fragmente auf 0,8- 1,2 % igen (w/v) Agarosegelen in 1x Sharp E (20x: 800 mM Tris; 0,2 M Natriumacetat; 40 mM EDTA pH 8,0; 3,1 % Eisessig) oder TAE Puffer (50x: 2 M Tris; 17,5 % Eisessig; 50 mM EDTA pH 8) mittels Horizontalelektrophorese bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm. Durch die Zugabe von interkalierenden Farbstoffen (1 µg/ml Ethidiumbromid) in die Agaroselösung konnten die DNA-Banden mittels Fluoreszenz im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit einer Polaroidkamera (Image Master VDS, Pharmacia) bei 254 nm, während zu präparativen Zwecken DNA-Fragmente auf Leuchtplatten mit langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten wurden. Zur Isolierung von Fragmenten aus dem Agarosegel wurde der Qiaquick-Extraktionskit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.2.8. Ligation

Zur Verknüpfung von geschnittenen DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten mit entsprechenden Vektoren über eine kovalente Phosphodiesterbindung zwischen der 3' Hydroxylgruppe eines Fragments mit der 5' Phosphatgruppe eines zweiten Fragments wurde eine Ligation durchgeführt. Dazu wurde das Fragment in einem molaren Überschuß von 3:1 zur Vektor-DNA (0,01 pmol) zugegeben, mit 2 µl 10x Ligasepuffer (Boehringer),

5mM ATP sowie 1 U T4 DNA-Ligase versetzt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte für mindestens 4 h bei 16 °C oder über Nacht bei 12 °C.

2.2.2.9. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR lassen sich Kleinstmengen an DNA durch spezifische Primerbindung an DNA-Sequenzen und wiederholte Polymerisierungsreaktionen von hitzeresistenten DNA-Polymerasen nach zyklischem Aufschmelzen der Primer- DNA-Hybride und erneutem Annealing der Primer amplifizieren. Die Wahl der Primersequenzen ermöglicht dabei nicht nur spezifische Mutationen der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, sondern auch das Einführen zusätzlicher Sequenzen, wie z.B. Restriktionsschnittstellen. Die Primersequenzen zur Amplifizierung von kurzen Fragmenten wurden so gewählt, daß die an die DNA-paarenden Nukleotide eine Schmelztemperatur von mehr als 54 °C aufwiesen. Für die PCR wurde ≤ 50 ng DNA-Template, 200 nM dNTP-Mix, je 100 pmol Primer, 5 µl 10x Polymerasepuffer sowie 1 U *Taq/Pfu*-Polymerasegemisch in einem Gesamtvolumen von 50 µl vorbereitet.

Programm zur Amplifizierung von Fragmenten: (≤ 2500 bp)	94 °C: 5 min	} 25 Zyklen
	94 °C: 30 sec	
	54 °C: 45 sec	
	72 °C: 1 min/kb	
	72 °C: 7 min	
	4 °C: T	

Primer für eine Vektor-PCR wurden entsprechend den Empfehlungen von Stratagene ausgewählt. Die Länge dieser Primer sollte mindestens 25 jedoch weniger als 45 Nukleotide betragen, so daß die Schmelztemperatur auf 78 °C eingestellt werden konnte. Die Mutation zur parentalen DNA befand sich in der Mitte der Primer. Die zur PCR-Reaktion zugesetzten Komponenten waren mit denen der Fragment PCR-Ansätze identisch.

Programm zur <i>Quick-Site</i> Mutagenese von Vektoren: (nach Stratagene Protokoll)	95 °C: 30 sec	} 12 Zyklen für Punktmutation oder 16 Zyklen für AS-Austausch
	95 °C: 30 sec	
	55 °C: 1 min	
	68 °C: 2 min/kb	
	0 °C: 2 min	

Zur Eliminierung des parentalen Ausgangsplasmids wurde nach der *Quick Site* Vektor-Mutagenese ein *Dpn I* Verdau (10 U) für 1 h bei 37 °C durchgeführt, da dieses Enzym ausschließlich methylierte DNA abbaut. 1 µl der *Dpn I* verdauten PCR-Mixtur konnte nachfolgend direkt zur Transformation eingesetzt werden, da *E.coli* kleine Bruchstellen, die nach der PCR im Plasmid zurückbleiben, selbst durch Reparaturenzyme ligiert. Zur Kontrolle wurde eine Transformation mit nicht *Dpn I* verdauter PCR-DNA mitgeführt. Die Einführung der Mutation in den Vektor wurde durch Sequenzierung überprüft.

2.2.2.10. Hybridisierung von Oligonukleotiden

Lyophilisierte Oligonukleotide wurden in TE Puffer (2.2.2.1) aufgenommen, so daß deren Konzentration 1 µg/µl betrug. Gleiche Mengen der komplementären Oligonukleotide (50 µg) wurden anschließend gemischt und in Gegenwart von 150 mM NaCl 10 min bei 100 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde danach langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und ein Aliquot dieser Hybridisierungsreaktion in einen entsprechend vorbereiteten Vektor ligiert.

2.2.2.11. Sequenzierung

Die Richtigkeit von DNA-Sequenzen ≤ 700 bp wurde durch Sequenzierung überprüft. Zu diesem Zweck wurden 5 µg DNA durch Ethanol gefällt, durch Zentrifugation 10 min bei 13000 rpm (Eppendorfzentrifuge) bei Raumtemperatur sedimentiert und das Pellet anschließend luftgetrocknet. Alle Sequenzierungsreaktionen wurden in Auftrag gegeben und von der MWG-Biotech AG (Ebersberg) durchgeführt.

2.2.2.12. RNA-Extraktion mit heißem Phenol

Zur Isolierung von Gesamtzell-RNA wurden 2x 10⁶ Zellen zweimal mit PBS (2.2.3.5) gewaschen, bei adhärenen Zellen von der Zellkulturschale abgeschabt und in 3 ml Lysepuffer (50 mM Natriumacetat pH 5,2; 0,5% SDS) aufgenommen. Die Schalen wurden mit weiteren 1,5 ml Lysepuffer ausgespült und mit dem Zellysat vereinigt. Danach wurde die Suspension sofort in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, in die 5 ml heißes Phenol (60 °C, äquilibriert gegen 50 mM Natriumacetat pH 5,2) vorgelegt worden war. Das RNA-Phenolgemisch wurde für 10 min bei 60 °C inkubiert und zur Abtrennung von Proteinen in die phenolische Phase permanent geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung in einem Salz-Eis-Bad abgekühlt und eine Phasentrennung durch

Zentrifugation (5 min, 1600 g, Raumtemperatur) erzielt. Die klare wäßrige Phase wurde abgenommen und erneut mit Phenol extrahiert. Zum Schluß wurde die aufgereinigte RNA aus der wäßrigen Phase durch Ethanol gefällt, ihre Qualität und Quantität auf einem 2 % igen Agarosegel überprüft und zur Lagerung in Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.2.2.13. Aufreinigung von mRNA durch magnetische Partikel

Um aus der Gesamtzell-RNA-Präparation mRNA abzutrennen und anzureichern, wurden mit Streptavidin gekoppelte paramagnetische Partikel (Promega) eingesetzt. Bis zu $1\text{ }\mu\text{g}$ RNA wurde mit Nuklease freiem Wasser zu einem Volumen von $500\text{ }\mu\text{l}$ aufgefüllt, 10 min auf $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und mit $3\text{ }\mu\text{l}$ biotinylierten Oligo-dT-Primern sowie $13\text{ }\mu\text{l}$ SSC-Puffer (siehe 2.2.2.15) versetzt. Das Gemisch wurde zum Annealing der Primer an polyadenylierte mRNA langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Währenddessen wurden die Partikel mit $0,5\times$ SSC mehrmals entsprechend den Vorgaben des Herstellers gewaschen und in einem Finalvolumen von $100\text{ }\mu\text{l}$ aufgenommen. Zu diesen Partikeln wurde nun die gesamte Annealing-Reaktion zugefügt, wobei die hohe Affinität des Biotins zu Streptavidin zur Bindung der Primer gepaarten mRNA an die magnetischen Partikel führt. Von den Oligo-dT-Primern nicht gebundene RNA oder RNA-Bruchstücke bleiben in Lösung und können so von der mRNA getrennt werden. Die Partikel wurden anschließend mehrmals mit $0,1\times$ SSC gewaschen. Die Elution der gebundenen RNA erfolgte durch Resuspension der magnetischen Partikel in H_2O .

2.2.2.14. Klonierung von cDNA

Unter Verwendung des SmartTM Race cDNA Amplifikations-Kits (Clontech) wurde aus der polyadenylierten aufgereinigten mRNA effizient cDNA synthetisiert. Die sogenannte SMART (*switching mechanism at the 5' end of RNA transcript*) Technologie maximiert die Generation von Volllänge-cDNA mit intakten 5' und 3' Termini, wenn diese nicht genau bekannt sind. Dazu werden zwei separate Reaktionen angesetzt, in denen jeweils $1\mu\text{g}$ der poly A⁺ RNA einerseits mit einem optimierten 5' cDNA- sowie einem SMART II Oligonukleotid-Primer (Gesamtvolumen $5\text{ }\mu\text{l}$), andererseits mit einem 3' cDNA-Primer versetzt werden. Die Reaktionsansätze wurden jeweils gemischt, zum Annealen der Primer für 2 min auf $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von $5\times$ First Strand Synthese Puffer, DTT (20 mM) und dNTPs (10 mM) konnte die poly A⁺ RNA nun durch die Power Script reverse Transkriptase (200 U) in einzelsträngige DNA umgeschrieben werden (90 min , $42\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Tricine-EDTA-Puffer (10 mM Tricine-KOH pH 8,5; $1,0\text{ mM}$ EDTA) abgestoppt und 7 min bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ inaktiviert. Diese Einzelstrang-DNA wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nachfolgend konnte aus diesen 5'- und 3'-cDNA-Bibliotheken durch Verwendung Gen-spezifischer Primer in einer PCR die gewünschte cDNA spezifisch amplifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden zu $2,5\text{ }\mu\text{l}$ der generierten ss 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) cDNA $5\text{ }\mu\text{l}$ Universal Primer Mix ($10\times$ UPM) und $10\text{ }\mu\text{M}$ 5' Gen-spezifischer Primer pipettiert und mit H_2O zu einem Volumen von $50\text{ }\mu\text{l}$ aufgefüllt. Analog dazu wurden $2,5\text{ }\mu\text{l}$ der ss 3'- RACE cDNA mit $10\text{ }\mu\text{M}$ des 3'- Gen spezifischen Primers und ebenfalls $5\text{ }\mu\text{l}$ UPM versetzt.

Zyklus Programm zur cDNA PCR:	94 °C: 5 sec	}	5 Zyklen
	72 °C: 3 min		
	94 °C: 5 sec	}	25 Zyklen
	68 °C: 10 sec		
	72 °C: 3 min		

2.2.2.15. Nachweis von DNA durch Southern Blotting

Southern Blotting beinhaltet den Transfer von in einem Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmenten auf eine Nitrozellulosemembran und Nachweis durch Hybridisierung mit einer markierten Sonde. Um einen Transfer von DNA-Molekülen aus dem Gel auf die Membran zu erlauben, muß zuvor eine Depurinierung in $0,25\text{ M}$ HCl für 30 min durchgeführt werden, wobei das Agarosegel leicht geschwenkt wird. Nach Abspülen mit H_2O wird das Gel zweimal je 20 min in Denaturierungspuffer ($1,5\text{ M}$ NaCl; $0,5\text{ M}$ NaOH) und zweimal je 20 min in Neutralisierungspuffer ($1,5\text{ M}$ NaCl; $0,5\text{ M}$ Tris/HCl; pH 7,2; 1 mM EDTA) geschwenkt. Für den Kapillartransfer wurde eine Wanne mit 20x SSC (3 M NaCl; $0,3\text{ M}$ tri-Natriumcitrat pH 7) gefüllt, eine Glasplatte als Plattform darüber gesetzt und drei Lagen Whatman-Papier als Brücke so über die Glasplatte gelegt, daß beide Enden in den Laufpuffer tauchten. Auf diese Brücke wurde das Gel plaziert, dessen freie Bereiche an den Seiten mit Haushaltsfolie abgedichtet wurden. Auf das Gel wurde eine zurechtgeschnittene, positiv geladene, ebenfalls in $20\times$ SSC getränkte Nylonmembran (HybondTM-N, Amersham) luftblasenfrei aufgelegt und mit drei Lagen in $20\times$ SSC befeuchtetem Whatman-Papier sowie einem Stapel trockener Papiertücher überschichtet. Nach Beschweren des Blots mit einem Gewicht (500 g) erfolgte der DNA-Transfer über Nacht. Die Membran wurde zur Fixierung der DNA mit 120 mJ UV-Licht bestrahlt (Stratalinker®, UV Crosslinker). Anschließend wurde die Membran unter kontinuierlichem Schütteln bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mindestens 1 h in Hybridisierungslösung ($3\times$ SSC; $1\text{ }\%$ SDS; $10\times$ Denhardts Lösung [$50\times$ Denhardt's: $2\text{ }\%$ Ficoll; $2\text{ }\%$

Polyvinylpyrrolidon; 2 % BSA]; 5 mM EDTA; pH 8; 100 µg/ml gescherter aufgekochter Heringssperma-DNA) vorinkubiert. Nach Zugabe einer radioaktiv markierten denaturierten Sonde (siehe 2.2.2.16) wurde die Hybridisierung bei 65°C über Nacht fortgesetzt. Nach Dekantieren der Hybridisierungslösung wurde die Membran zweimal 20 min mit Waschlösung 1 (3x SSC; 1 % SDS), dann zweimal 20 min mit der weniger stringenten Waschlösung 2 (0,3x SSC; 1 % SDS) bei 65°C gewaschen. Daraufhin wurde die Membran luftgetrocknet, in Haushaltsfolie eingeschlagen und mit einem Röntgenfilm bei -80 °C exponiert.

2.2.2.16. Radioaktive Markierung von DNA mit Zufallsoligomeren

Zur radioaktiven Markierung einer Sonde wurde der *MegaprimeTM DNA labelling Kit* (Amersham) nach Angaben des Herstellers verwendet. 100 ng DNA (zur Identifizierung von MVM-DNA wurde ein *BstEII-EcoRV*-Fragment des viralen NS1-kodierenden Gens verwendet) wurden mit 5 µl Primerlösung (Zufallsoligomeren) versetzt, auf ein Volumen von 39 µl mit H₂O aufgefüllt, 5 min bei 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 10 µl Markierungspuffer mit Desoxyribonukleotiden, 50 µCi [α ³²P]-dCTP und 2 µl Klenow-Enzym hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 150 µl TE-Puffer (2.2.2.1) zur Volumenvergrößerung zugegeben, um nicht inkorporierte Nukleotide durch Passieren des Reaktionsansatzes über eine Sephadexsäule G-50 (Pharmacia) abzutrennen. Die Inkorporationsrate wurde über einen Cerenkov Counter (Bioscan) bestimmt. Wenn ausreichend radioaktiv markierte Sonde vorlag, wurde sie 5 min bei 95°C denaturiert und der Hybridisierungslösung zugegeben (siehe 2.2.2.15).

2.2.3. Zellbiologische Methoden

2.2.3.1. Kultivierung von Säugerzellen

Etablierte Säugetierzelllinien wurden als *Monolayer*-Kulturen in Zellkulturschalen oder Flaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 95 % Feuchtigkeit kultiviert. Als Medium diente dabei für alle Zelllinien (siehe 2.1.1.1) DMEM versetzt mit 10 % FCS, L-Glutamin (2 mM) und Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml). In der Regel wurden alle Zelllinien zweimal wöchentlich im konfluenten Zustand durch Trypsinbehandlung (0.25 % Trypsin; 1 mM EDTA) von den Zellkulturflaschen/-schalen abgelöst und entsprechend der benötigten Zellmenge zur Vermehrung in geeigneter Zellzahl neu ausgesät. Darüberhinaus wurden auch Suspensionszellen (HeLa-S3) angezüchtet. Dazu wurde eine sterile, mit einer Rührvorrichtung ausgestattete Spinnerflasche mit 2 x 10⁵ Zellen/ml in einem kleinen Volumen Suspensionsmedium (S-MEM versetzt mit 10 % FCS, Glutamin, Antibiotika) angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Die Zelldichte wurde dabei durch tägliche Erhöhung des Volumens mit frischem Suspensionsmedium bei 2-8x 10⁵ Zellen/ml gehalten, bis das maximale Füllvolumen der Spinnerflasche erreicht war. Danach wurden die Zellen bis zu einer maximalen Dichte von 5 x 10⁸ Zellen/ml angezüchtet und geerntet.

2.2.3.2. Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Um Säugerzellen über einen längeren Zeitraum aufzubewahren, wurden sie in Aliquots von mindestens 1x 10⁶ Zellen/ml eingefroren. Dazu wurden die kultivierten Zellen trypsiniert, sedimentiert (3 min, 250g) in Einfrieremedium (8 % DMSO in FCS) aufgenommen und zügig in Kryogefäße überführt. Die Kryogefäße wurden in einem mit Isopropanol isolierten Behälter auf -80 °C abgekühlt (1 °C/min) und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen eingefrorener Zellen wurden diese im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, in 10 ml Medium aufgenommen und 3 min bei 250 g zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturschale/-flasche überführt.

2.2.3.3. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot einer verdünnten Zellsuspension in eine Zählkammer (Neubauer) überführt und die Zellen anhand der auf dem Objektträger markierten Quadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen kann vor Beladung der Zählkammer eine Trypan-Blaufärbung (0,4 %) der Zellen vorgenommen werden, wobei lediglich tote Zellen den Farbstoff aufnehmen. Unter Berücksichtigung des Zählkammervolumens ließ sich die Zellzahl wie folgt berechnen: Zellzahl [ml⁻¹] = Zellzahl/Großquadrat x 10⁴ x Verdünnungsfaktor.

2.2.3.4. Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen

Transfektion durch Kalziumphosphat

Am Vortag der Transfektion wurden 1,5 x 10⁶ Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät, um eine optimale Zelldichte von circa 30 % für die Transfektion zu erzielen. Bei der Transfektion nach der Ca₃(PO₄)₂-Methode (Graham, 1973) wurde die zu transfizierende Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 405 µl H₂O gelöst und

mit 45 µl 2,5 M CaCl₂ versetzt. Diesem Ansatz wurden tropfenweise unter kontinuierlichem Schütteln 450 µl 2x HBSS (1,5 mM Na₂HPO₄; 10 mM KCl; 280 mM NaCl; 12 mM D-Glucose; 50 mM Hepes pH 7,05) hinzugefügt. Das gesamte Präzipitat wurde hernach vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden ohne Mediumwechsel für circa drei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ angezüchtet.

Transfektion durch Lipofectamin

Schwer transfizierbare Zellen, wie die A9 Maus-Fibroblasten-Zelllinie, eignen sich nicht für eine Kalziumphosphat-Transfektion. Aus diesem Grund wurde Plasmid-DNA in solche Zellen mit Hilfe von Lipofectamin (Invitrogen) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers eingebracht.

Spot Slides

Dazu wurden Zellen am Vortag auf unbeschichtete Objektträger ausgesät (6000 Zellen/spot). Für die Transfektion wurde die zu transfizierende DNA in Optimem-Medium aufgenommen und mit einem gleich großen Volumen Lipofectamin enthaltendem Optimem-Medium gemischt (Endkonzentration Lipofectamin 40 µl/ml). Diese Mischung wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die sich dabei ausbildenden DNA-Lipidkomplexe können von Zellen oft besser aufgenommen werden als vergleichbare DNA-Salzpräzipitate. Für die Transfektion von auf Objektträgern angezüchteten Zellen (sogenannten *spot slides*) wurde pro Transfektion 0,5- 1 µg DNA in einem Volumen von 55 µl Optimem-Lipofectamin-Medium auf die Zellen übertragen. Nach 3h erfolgte ein Mediumwechsel gegen DMEM (versetzt mit 10 % FCS; Glutamin; Antibiotika). Die transfizierten Zellen wurden mehrere Tage bei 37 °C angezüchtet.

Stabil transfizierte Zelllinien

Zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurden 1x 10⁵ Zellen auf 6 cm Zellkulturschalen ausgesät. Die gewünschte Plasmid-DNA (25 µg) wurde zusammen mit einem Selektionsplasmid pSV2neo (1 µg) im molaren Verhältnis 25:1 mit 25 µl Lipofectamin im Optimem-Medium (Gesamtvolumen 1 ml) kotransfiziert. Die Zellen wurden 4 h mit dem Optimem Transfektionsgemisch inkubiert bevor ein Mediumwechsel gegen DMEM (siehe oben) durchgeführt wurde. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, in größere Zellkulturflaschen überführt und mit Selektionsmedium verdünnt. In Gegenwart von G418 (Sigma, 400 µg/ml) erfolgte eine Selektion der transfizierten Zellen. Durch den molaren Überschuss des Expressionsplasmids gegenüber dem Neomycin-Resistenzplasmid pSV2neo kann davon ausgegangen werden, daß pSV2neo positive Zellen auch das gewünschte Expressionsplasmid aufgenommen haben. Kontrolltransfektionen mit einem GFP-Gen enthaltenden Reporterplasmid zeigten, daß 95 % aller selektionierten Zellen auch eine GFP Fluoreszenz aufwiesen (Nüesch, DKFZ, persönliche Mitteilung). Die sich ausbildenden Zellkolonien (circa 200 pro 75 cm² Zellkulturflasche) wurden nach vierwöchiger Selektion vereinigt und in Aliquots eingefroren. Die Expression der gewünschten Proteine wurde durch Western Blotting und Immunfluoreszenz überprüft. Für Experimente wurden wenig passagierte Chargen dieser Zelllinien eingesetzt (≤ 25 Passagen). Die Durchführung der Experimente erfolgte in Abwesenheit der Selektionsdroge G418.

2.2.3.5. Radioaktive Markierung von Proteinen *in vivo*

Markierung mit [³²P]-Orthophosphat

Um die Phosphorylierung von zellulären oder viralen Proteinen *in vivo* zu untersuchen, wurde unter Verwendung von [³²P]-*ortho*-Phosphat ein Markierungsexperiment vorgenommen. Dazu wurden 2x 10⁶ Zellen auf 15 cm Zellkulturschalen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen gewaschen und mit P-Labeling-Medium (Phosphat-freies MEM; 5% gegen 10 mM Hepes dialysiertes FCS; 1% L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin) für 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ vorinkubiert. Danach erfolgte der Austausch dieses Mediums mit [³²P]-*ortho*-Phosphat enthaltendem Labeling-Medium, wobei pro Zellkulturschale ein möglichst kleines Volumen von 5 ml angestrebt wurde (1-2 mCi pro 15 cm Schale). Die Zellen wurden nun für weitere 4 h unter permanentem Schwenken bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Hernach wurde das Labeling-Medium entfernt, die Zellen mit 10 ml Hepes Puffer (20 mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl) gewaschen, mit einem Schaber von der Zellkulturschale gelöst, sedimentiert (1100 g, 5 min) in entsprechendem Puffer resuspendiert und auf Eis inkubiert (siehe Kap. 2.2.5.8).

Markierung mit [³⁵S]-Methionin/Cystein

Um die Synthese zellulärer oder viraler Proteine, ihre intrazelluläre Prozessierung, Transport oder Degradation zu untersuchen, eignet sich eine metabolische Markierung mit radioaktiven Aminosäuren. Dazu wurden die gewünschten Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und bis zu 80 % Subkonfluenz angezüchtet. Dann wurden sie mit S-Labeling-Medium (Methionin/ Cystein-freies MEM; 5 % gegen PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,15 mM KH₂PO₄ pH 7,2-7,4) dialysiertes FCS, 1 % Glutamin; 1 %

Penicillin/Streptomycin) gewaschen und anschließend mit 2 ml S-Labeling-Medium und 200 μCi ^{35}S Methionin/Cystein für 4 h bei 37 °C, 5 % CO_2 schwenkend inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen, abgeschabt und sedimentiert (1100 g, 5 min). Die Zellen wurden für Immunpräzipitationsexperimente in 910 μl hypotonischem Puffer (20 mM Hepes-KOH pH 7,5; 5 mM KCl; 5 mM MgCl_2 ; 0,1 mM DTT) oder für die direkte SDS-PAGE in RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 % NP-40; 0,5 % Na-Deoxycholat; 0,1 % SDS) resuspendiert und auf Eis inkubiert. Zur Aufbewahrung wurden die Lysate bei – 80 °C eingefroren.

2.2.3.6. *In vivo* BrdU-Markierung von replizierender DNA

Zum Nachweis der DNA-Synthese während der genomischen oder viralen DNA-Replikation in einzelnen Zellen, bedient man sich Nukleotidanaloga (wie Bromodeoxyuridin: BrdU), die in die synthetisierte DNA eingebaut und mittels spezifischer Antikörper in der Immunfluoreszenz (2.2.5.7) nachgewiesen werden können. Dazu wurde bei auf Deckgläschen angezüchteten Zellen zum gewünschten Zeitpunkt das Medium entzogen, mit 10 μM BrdU (Stock: 1 mM) supplementiertem DMEM (10% FCS; Glutamin; Antibiotika) ersetzt und für weitere 25 min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Zellen mit *p*-Formaldehyd fixiert (2.2.5.7).

2.2.4. Virologische Methoden

2.2.4.1. Virusinfektion von Säugierzellen

Für die Virusinfektion wurden entsprechende Zellen subkonfluent ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Hiernach wurde das Medium entfernt, die Zellen auf der Zellkulturschale zur Entfernung von Serumresten mit PBS (2.2.3.5) gewaschen und mit einem kleinen Volumen an serumfreien, die Virussuspension enthaltendem, Medium bedeckt. Nach einstündiger Inkubation, währenddessen die Zellkulturschalen zur Verteilung der Virussuspension gelegentlich geschwenkt worden sind, wurde entsprechend der Größe der verwendeten Platten komplettes Medium hinzugefügt und die Inkubation für den gewünschten Zeitraum fortgesetzt. Die Zellen wurden je nach Experiment mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 5-100 pfu (*plaque forming units*) /Zelle infiziert.

2.2.4.2. Virusvermehrung und Aufreinigung

Die Vermehrung von MVMP erfolgte durch Infektion von A9-Zellen mit einer MOI von 10^{-3} pfu/Zelle. Der Zeitpunkt der Ernte infizierter Zellen ist dabei so zu wählen, daß möglichst alle Zellen Nachkommenviren bilden, jedoch noch nicht durch die Viren lysiert wurden. Somit können durch Aufschluß der infizierten Zellen mittels Frier-/Tauzyklen die Viren in einem kleinen Volumen gewonnen und von den Zelltrümmern abgetrennt (1600 g, 10 min) werden. Die Zellyse erfolgt dabei in VTE (50 mM Tris HCl pH 8,3; 0,5 mM EDTA), wobei circa 3×10^7 Zellen in 1 ml VTE aufgenommen wurden. Die nachfolgende Virusreinigung erfolgte durch CsCl-Gradienten. Zur Herstellung des Gradienten wurden in einem Zentrifugenröhrchen 5 ml CsCl-Lösung (Dichte $\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$ in VTE) mit 1 ml 1 M Saccharose in VTE und 4 ml der Virussuspension überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte für 20 h bei 10 °C und 250 000 g. Durch Perforation des Zentrifugenröhrchens und langsames Austropfen der CsCl-Lösung konnte der Gradient in kleinen Fraktionen von 300-500 μl abgetragen werden. Durch refraktometrische Dichtebestimmung ließen sich die Fraktionen ermitteln, in denen volle Viruspartikel aufgrund ihrer Größe sedimentieren ($\rho = 1,42 \text{ g/cm}^3$). Die entsprechenden Fraktionen wurden gepoolt und gegen VTE dialysiert.

2.2.4.3. Dichtebestimmung

Die Dichte von CsCl oder Sucrosefraktionen wurde mittels eines Refraktometers bestimmt. Dabei wird die Ablenkung streifend einfallenden Lichtes als Maß für die Brechungseigenschaften einer Flüssigkeit herangezogen. Der so ermittelte Refraktionsindex (n) ist der Dichte (ρ) einer Lösung proportional, die sich daher durch Vergleich der Refraktionsindizes mit einer Eichgeraden ermitteln läßt. 10 μl der zu untersuchenden Fraktion eines Gradienten wurden zur Bestimmung des Refraktionsindex eingesetzt. Die ermittelten Werte wurden unter Verwendung normierter Tabellenwerte in die Dichte umgerechnet, oder nach folgender Formel errechnet: $\rho [\text{g/cm}^3] = 10,5416 \times n - 13,059$.

2.2.4.4. Bestimmung des viralen Titers

Plaque-Assay

Zur Ermittlung der Konzentration (Titer) der in einer Lösung vorliegenden infektiösen Viruspartikel (MVMP) wurden Plaque-Assays durchgeführt. Zu diesem Zweck werden A9-Zellen (2×10^5) subkonfluent auf 6 cm

Schalen ausgesät und mit jeweils 500 µl von verschiedenen Verdünnungsstufen der zu titrierenden Ausgangslösung infiziert (10^{-5} – 10^{-9}). Nach einstündiger Inkubation (37 °C; 5 % CO₂) mit gelegentlichem Schwenken wurden die Zellen mit 7 ml *Overlay*-Medium pro Schale überschichtet. Das *Overlay-Medium* setzt sich in einem Verhältnis von 3:4 aus einer vorher geschmolzenen, auf 48 °C abgekühlten 2% igen Bacto Agar Lösung und 2x MEM (supplementiert mit 10 % FCS; 2 % NEAA; 2% Glutamin und 2% Gentamycin) zusammen. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit 3 ml Neutralrot-*Overlay*-Mix angefärbt. Diese Färbelösung wurde zu gleichen Teilen (v/v) aus erhitztem Bacto-Agar (2 % in H₂O) und 2x PBS (2.2.3.5) angesetzt und mit 1/15 (v/v) Neutral-Rot-Lösung (0.33 % in H₂O) versetzt. Dieses Neutralrot- Überzugsmedium wurde ebenfalls erstarren gelassen und die Zellkulturschalen eine weitere Nacht im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurde die Anzahl der Plaques auf jeder Schale gezählt und der Titer des Virusstocks berechnet:

$$\text{plaque forming units (pfu/ml)} = \text{durchschnittliche Anzahl Plaques/Schale} \times \text{VF} \times 2$$

Hämagglutinationsassay

Der Hämagglutinationstest wird angewendet, um die Präsenz von Viruspartikeln in einer Suspension nachzuweisen. Dabei wurde ausgenutzt, daß Parvoviren bei 4 °C und einem pH von 7,2 in der Lage sind, Erythrozyten zu agglutinieren (Meerschweinchenblut eignet sich dafür am besten). Dabei werden die Erythrozyten durch Bindung der viralen Kapsidproteine untereinander vernetzt und verklumpen. Dieser Effekt wird durch die Ausbildung einer gleichmäßig getrübbten roten Schicht in den für den Assay verwendeten Mikrotiterplatten sichtbar. Dagegen liegt keine Agglutination vor, wenn die Erythrozyten punktförmig am Boden des Reaktionsgefäßes sedimentieren. Dieser Test wurde in v-förmig vertieften Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurden in die erste Reihe jeweils 48 µl PBS (2.2.3.5) und 2 µl Probe pipettiert, in alle übrigen Vertiefungen wurden 25 µl PBS vorgelegt. Durch Übertragen von jeweils 25 µl aus den Vertiefungen der ersten Reihe in die darunterliegende ergab sich eine binäre Verdünnungsreihe. Mit Alsever's-Lösung (60 mM Saccharose; 27 mM Natriumcitrat; 140 mM NaCl; 2,6 mM Zitronensäure) gewaschene Meerschweinchen-Erythrozyten wurden mit PBS zu einer 2 % igen Suspension verdünnt, von der 25 µl zu allen Verdünnungen zugegeben wurden. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C wurden die Ansätze hinsichtlich gebildeter Agglutinationen ausgewertet.

2.2.4.5. Isolierung viraler DNA aus Säugerzellen zur Analyse der *in vivo* Replikation

Die Extraktion von Virus-DNA aus Säugerzellen erfolgte in Abwandlung der Methode von Hirt (Hirt, 1967). Circa 1×10^6 MVM infizierte Zellen wurden mit PBS (2.2.3.5) gewaschen, trypsinisiert und sedimentiert (1100 g, 5 min). Das resultierende Zellsediment wurde in 75 µl TE (2.2.2.1) Puffer resuspendiert und bei Bedarf zur Lagerung eingefroren (-20 °C). Diese Zellsuspension wurde durch Zugabe von 75 µl 2x Hirt-Extraktionspuffer (20 mM Tris pH 7,4; 20 mM EDTA; 1,2 % SDS) lysiert. Über Nacht erfolgte ein Verdau mit 80 µg/ml Proteinase K (Stammlösung 20 mg/ml) bei 46 °C. Anschließend wurde die genomische DNA durch Passieren durch eine Spritze (Gauge Nadel 27G ³/₄) mechanisch geschert, während die virale DNA aufgrund ihrer geringen Größe intakt blieb und nachfolgend im Agarosegel aufgetrennt und durch *Southern Blotting* (2.2.2.15) nachgewiesen werden konnte. Für den Nachweis der viralen Replikationsintermediate und ss-DNA genügte 25 µl des aufbereiteten Zellysats.

2.2.4.6. Herstellung rekombinanter Vaccinia Viren

Zur Insertion durch homologe Rekombination von Fremdgenen in Vaccinia Virus-Vektoren wurden diploide Affenzellen (CV-1) in 6 cm Zellkulturschalen subkonfluent ausgesät und mit 0,03 pfu/ Zelle Vaccinia Viren in 1 ml für 2 h bei 37 °C infiziert. Die das Fremdgen-flankierenden Regionen sind zu Bereichen der viralen Thymidin-Kinase (TK) homolog, so daß ein Rekombinationsereignis zum Verlust des TK Gens führt, was für die Selektion rekombinanter Viren ausgenutzt wird. Nach Infektion der CV-1 Zellen mit Wildtyp Vaccinia Viren wurden die Zellen mit 20 µg des jeweiligen pTM-Konstruktes als Lipofectin-DNA-Komplex in Optimem Medium transfiziert (siehe auch 2.2.3.4). Nach 5 bis 6 h wurde das Transfektionsmedium mit 4 ml DMEM (DMEM; 10% FCS; Glutamin; Antibiotika) ersetzt und die Zellen für 2 d bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die generierten rekombinanten Vaccinia Viren wurden durch Abschaben der Zellen und Aufschluß durch Frier-/Tauzyklen freigesetzt und bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Vereinzelung der generierten rekombinanten Viren wurden anschließend konfluent auf 6 cm Zellkulturschalen angezüchtete BSC-40 Zellen mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Virusstocks infiziert. Nach 2 h wurde das Inokulum abgenommen und mit Plaque-Überzugsmedium (50 % 2x MEM; 5 % FCS; 25 µg/ml BrdU; Antibiotika; Glutamin; 2 % *Low melt* Agarose) abgedeckt. Das im Plaque-Überzugsmedium enthaltene BrdU kann lediglich von Wildtyp Vaccinia Viren in die DNA inkorporiert werden, was eine Sensitivität gegenüber UV-Licht und nachfolgende selektive Abtötung der Wildtyp Viren verursacht. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei

37 °C und 5 % CO₂ für mehrere Tage. Die sich bildenden Plaques waren nach ~24 h sichtbar und wurden 2-3 d nach Infektion geerntet. Zu diesem Zweck wurde eine Neutralrotfärbung des Überzugsmediums vorgenommen (siehe 2.2.4.4), um individuelle Plaques durch Aufsaugen mit einer Pipette und Transfer in 1 ml DMEM enthaltende Kryogefäße zu isolieren. Der Aufschluß der BSC-40-Zellen und die Freisetzung der rekombinanten Viren individueller Plaques wurde durch Frier-/Tauzyklen erzielt (Generierung des Primärvirusstocks).

2.2.4.7. Identifizierung rekombinanter Vaccinia Viren und Expression heterologer Proteine

Nachfolgend wurde die Hälfte der so gewonnenen rekombinanten Viren erneut zur Infektion von BSC-40 Zellen in Gegenwart von BrdU eingesetzt, um eine Amplifikation der Viren zu erlauben. Zum Expressionsnachweis des Fremdproteins durch die zuvor amplifizierten Vaccinia Viren wurden HeLa-Zellen subkonfluent in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät, mit 15 pfu/ Zelle des vTF-3 Wildtyp Vaccinia Virus und 1 ml des amplifizierten, das Fremdgen enthaltenden rekombinanten Virusisolats für 2 h bei 37 °C koinfiziert. Danach wurde 3 ml Induktionsmedium (DMEM; 10 % FCS; 190 mM NaCl; Glutamin; Antibiotika) hinzugefügt und die Zellen 18-24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das NaCl dient dabei zur Stimulierung der *cap*-unabhängigen Translation durch die EMCV-Leadersequenz. Die Koinfektion mit Vaccinia Wildtypviren ist notwendig, um den, die Expression des Fremdgens steuernden, T7-RNA-Polymerase abhängigen Promotor zu aktivieren. Hiernach werden die infizierten Zellen durch Abschaben geerntet, sedimentiert (400 g, 5 min) und in 100 µl TE-Puffer (2.2.2.1) resuspendiert. Das Lysat wurde durch SDS-PAGE und Western Blotting auf die Expression des Fremdgens analysiert.

2.2.4.8. Produktion und Titration rekombinanter Vaccinia Virusstocks

Als positiv identifizierte Virusisolate wurden einer weiteren Amplifikations- und BrdU-Selektionsrunde unterzogen (Generierung von Sekundärvirusstocks). Hiernach wurden pro Virusstock vier konfluente 15 cm mit BSC-40 Zellen angezüchtete Zellkulturschalen mit 15 µl aufgereinigten Sekundärvirusstocks für 30 min in Serum-freiem Medium (DMEM) infiziert und anschließend mit Kompletmedium (Endkonzentration FCS 5 %) versetzt. Die Zellen wurden so lange im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert, bis sich > 80 % der Zellen als Folge der Virusinfektion vom Boden der Zellkulturschale ablösten. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und die infizierten Zellen vorsichtig sedimentiert (400 g, 5 min). Das resultierende Zellsediment wurde in 4 ml 10 mM Tris (pH 9) aufgenommen und durch Frier-/Tauzyklen aufgeschlossen. Anschließend wurde das Lysat erneut zentrifugiert (400 g, 5 min), der Überstand in ein Falkonröhrchen transferiert und das Sediment erneut in 2 ml 10 mM Tris pH 9,0 aufgenommen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit den 4 ml des ersten Lysats vereinigt. Abschließend erfolgte eine Aufreinigung des Virus enthaltenden Überstandes, indem dieser über ein Sucrosekissen (25 ml 30 % Sucrose in 10 mM Tris pH 9) zur Abtrennung zellulärer Proteine zentrifugiert wurde (30 400 g, 80 min, 4 °C). Das Virussediment wurde in 8 ml 1 mM Tris pH 9 aufgenommen und zur Bestimmung der Viruskonzentration auf BSC-40 Zellen analog wie in 2.2.4.4 beschrieben, titriert. Die Lagerung aliquotierter Virusstocks erfolgte bei -80 °C.

2.2.5. Biochemische Proteinanalytik

2.2.5.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Säugerzellen für SDS-PAGE

Die adhärennten Zellen wurden einmal mit PBS (2.2.3.5) gewaschen, durch Abschaben geerntet und abzentrifugiert (1100 g, 3 min). Das Zellsediment wurde anschließend in RIPA-Puffer (2.2.3.5) aufgenommen (100 µl/ 10⁶ Zellen), in ein Eppendorfgefäß überführt und zur Zellyse auf Eis inkubiert (20 min). Das Lysat wurde mit 5x Lämmli-Puffer (10 % SDS; 36 % Glycerol; 11 % β-Mercaptoethanol; 3% Bromphenolblau) versetzt, zur Zerstückelung der Nukleinsäuren einer Ultraschallbehandlung (10-20 Pulse; *output control 5; duty cycle 40 %*, *Sonifier 250*, Branson) ausgesetzt und abschließend 5 min bei 99°C gekocht. Vor der Analyse mittels SDS-PAGE wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (13 000 rpm, 2 min, Eppendorfszentrifuge). Die Proben wurden zur Lagerung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.5.2. Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Proteinassay-Farbreagenz von BioRad. Dazu wurden 2-10 µl des Proteinextrakts oder entsprechend vorverdünnter Proben mit 1 ml Farbreagenz (20 % Bradford-Reagenz in H₂O) sorgfältig gemischt und mindestens 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sich ein stabiler Coomassie-Farbstoff-Proteinkomplex (stabil für 60 min) ausbildet. Die Extinktion der Proben wurde bei 595 nm im Photometer (Pharmacia) gemessen

und die Proteinkonzentration durch Vergleich der Extinktionen von parallel mitgeführten Referenz-Standards (1-12 µg/ml BSA) ermittelt.

2.2.5.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit dieser Technik (Laemmli, 1970) werden denaturierte Proteine allein nach ihrem Molekulargewicht in einer Polyacrylamidmatrix aufgetrennt, da der SDS-enhaltende Probenpuffer die Proteine entfaltet und ihnen proportional zur Größe eine stark negative Ladung verleiht, so daß die Eigenladung der Proteine keinen Einfluß auf das Laufverhalten ausübt. Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurde der optimale Vernetzungsgrad der Polyacrylamidmatrix ausgewählt (siehe Sambrook, 1989), wobei hier lediglich die häufig verwendete Konzentration eines 10 % igen Gels wiedergegeben wird (13,3 ml eines Acrylamidgemisches [29,2 % Acrylamid :0,8 % Bisacrylamid]; 10 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 400 µl 10 % SDS; 400 µl 10 % Ammoniumpersulfat; 16 µl TEMED; ad 40 ml H₂O). Die Zusammensetzung des Sammelgels hingegen variierte nicht (1,3 ml Acrylamidgemisch; 1 ml 1 M Tris pH 6,8; 80 µl 10 % SDS; 80 µl 10 % Ammoniumpersulfat; 8 µl TEMED; ad 8 ml H₂O). Die Gele wurden in die mit Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM (w/v) Glycin; 0,1 % (w/v) SDS) befüllte Gelkammer (Biorad) eingespannt, mit selbigem überschichtet und die Taschen des Sammelgels entsprechend mit zuvor frisch in Lämmli-Puffer (2.2.5.1.) aufgekochten (95 °C, 5 min) Proben befüllt. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei einer Spannung von 80 V pro Gel.

2.2.5.4. Transfer von Proteinen (*Western Blotting*)

Semi-Dry-Transfer

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine müssen zum Nachweis durch Antikörperreaktionen auf Nitrozellulose transferiert werden. Dazu eignet sich das sogenannte halbtrockene, oder *Semi-Dry*-Verfahren, welches in der *Trans-Blot*-Apparatur von BioRad erfolgte. Dabei wird durch Einbettung des Polyacrylamidgels in eine Schichtung aus verschiedenen, in basischen Puffern getränkten, Filterpapieren und Anlegen einer äußeren Spannung die Wanderung der im Gel enthaltenen Proteine auf eine darunterliegende Nitrozellulosemembran ausgelöst. Konkret wurden sechs entsprechend der Größe des Polyacrylamidgels zurechtgeschnittene Filterpapiere in *Semi-Dry-Puffer 1* (300 mM Tris pH 10,4; 20% Methanol) befeuchtet und luftblasenfrei auf eine mit der Anode verbundenen Metallplatte übereinander gelegt. Darauf wurden drei weitere, in *Semi-Dry-Puffer 2* (25 mM Tris pH 10,4; 20% Methanol) getränkte Filterpapiere geschichtet. Auf diesen Stapel wurden nacheinander exakt eine Nitrozellulosemembran (in Puffer 2 vorher befeuchtet) sowie das Polyacrylamidgel luftblasenfrei aufgelegt. Darüber wurden abschließend weitere 9, in *Semi-Dry-Puffer 3* (25 mM Tris pH 9,4; 40 mM Norleucin) getränkte Filterpapiere als Verbindung zur Kathode im Deckel der Aparatur positioniert. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei 25 V und 200 mA. Die Effizienz des Proteintransfers ließ sich entweder an gefärbten Molekulargewichtsmarkern ablesen, oder konnte durch reversibles Anfärben der Proteine mit Ponceau (0,5 % Ponceau S; 1 % Essigsäure) überprüft werden.

Naßtransfer

Besonders große Proteine (z.B. MW ≥ 100 kDa) oder durch Glykosylierung posttranslational modifizierte Proteine lassen sich oft besser mit dem Naßverfahren aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran transferieren. Dazu wird eine Plastikschaale mit Transferpuffer (3,5% SDS; 250 mM Glycin; 25 mM Tris pH 8,3; 20 % Methanol) befüllt, in dem die luftblasenfreie Schichtung einer Schaumstoffmatte, zwei auf Gelgröße zugeschnittener Filterpapiere, des Polyacrylamidgels, der Nitrozellulose sowie zwei weiterer Filterpapiere und einer abschließenden Schaummatte vorgenommen werden kann. Die Komponenten werden durch zwei miteinander verbundene Plastikplatten zusammengeklemt und können so in eine mit Transferpuffer befüllte Kammer eingehängt werden, die durch Anlegen einer Spannung von 80 V für 3,5 h den Proteintransfer auf die Membran ermöglicht. Je nach den zu transferierenden Proteinen kann die Transferzeit auch auf über 12 Stunden erhöht werden, jedoch bei kleinerer Stromstärke.

2.2.5.5. Immunreaktion und ECL-Detektion

Der Nachweis der auf Nitrozellulose transferierten Proteine erfolgt gewöhnlich mit einer Immunreaktion. Zu diesem Zweck wird die Nitrozellulosemembran nach dem Western Blotting für mindestens 1 h bei Raumtemperatur in Blocklösung inkubiert (10 % Trockenmilch in PBS (2.2.3.5)), um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde die Membran in einen Behälter überführt, der den gegen das zu untersuchende Protein gerichteten spezifischen Erstantikörper entsprechend den unter 2.1.5.1 angegebenen Verdünnungen enthielt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C und wurde durch Entfernen der Antikörperlösung und mehrmaliges Waschen mit PBS und PBST (PBS; 0,1 % Tween 20) beendet. Nun wurde der Spezies-spezifische HRP-konjugierte Zweitantikörper (siehe 2.1.5.2) ebenfalls verdünnt in Blocklösung zur Membran zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen für je 10 min in

PBS/PBST wurde die Detektion der Proteine durch eine Chemilumineszenz-Reaktion nach Angaben des Herstellers (*enhanced-chemi-luminescence*, Amersham) durchgeführt. Durch unterschiedliche Expositionszeiten der Nitrozellulose auf einem Röntgenfilm (X-Omat AR, Kodak) konnten die Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

2.2.5.6. Auftrennung von Proteinen durch Fraktionierungen

Die Löslichkeitsfraktionierung

Zur Analyse der Stabilität von Zytoskelettfilamenten und Membran- oder Zytoskelett-assoziierten zellulären Proteinen wurde die Löslichkeitsfraktionierung nach Karczewski (1996) angewendet. Dabei wurde eine schrittweise Extraktion und Solubilisierung unlöslicher Proteine und Membranbestandteile durch Inkubation mit verschiedenen Detergenz-haltigen Puffern vorgenommen. Als Ausgangsmaterial dienten 6×10^7 adhärenente Zellen, die durch Abschaben geerntet, mit PBS (2.2.3.5) gewaschen und sedimentiert (1100 g, 5 min) wurden. Das Zellsediment wurde in 200 μ l hypotonischem Puffer (2.2.3.5) aufgenommen und kurz auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch drei Frier-/Tauzyklen (-70 °C/ +37 °C). Die unlöslichen Bestandteile dieses Zellextraktes wurden in einem ersten Zentrifugationsschritt sedimentiert (13 000 rpm, 3 min, 4 °C, Eppendorffzentrifuge). Der Überstand enthielt alle in hypotonischem Puffer löslichen Proteine des Extraktes und wurde als sogenannte S₁ Fraktion in ein neues Eppendorffgefäß überführt und auf Eis aufbewahrt. Das Sediment wurde nun mit 200 μ l Solubilisierungspuffer (50 mM Tris pH 8,0; 5 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,5 % CHAPS) versetzt, gut gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach erfolgte eine erneute Trennung der solubilisierten Proteine von den unlöslichen Bestandteilen (13000 rpm, 3 min, 4 °C, Eppendorffzentrifuge), der Überstand repräsentierte die leicht lösliche Fraktion S₂. In analogen Extraktionsschritten wurde nachfolgend das unlösliche Sediment jeweils mit 200 μ l Solubilisierungspuffer inkubiert und zusätzlich mit 0,2 % DOC (Generierung von Fraktion S₃) bzw. mit 0,2 % DOC und 0,1 % SDS (Generierung von Fraktion S₄) versetzt. Das unlösliche Restsediment wurde in 250 μ l Lämmli-Puffer (2.2.5.1.) aufgeköcht, die übrigen Fraktionen S₁ bis S₄ wurden mit 50 μ l 5x Lämmli-Puffer versetzt und ebenfalls erhitzt (95 °C, 5 min). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blotting hinsichtlich der Verteilung bestimmter Proteine untersucht.

Fraktionierung nach zellulären Kompartimenten

Die Kompartiment-Fraktionierung stellt eine Kombination dar, mit der Proteine nach Detergenzlöslichkeit und ihrem Sedimentationsverhalten aufgetrennt werden. Die angewendeten Experimentierschritte basieren auf der Methode von Lehel (1995): 2×10^8 adhärenente Zellen wurden durch Abschaben geerntet, mit PBS (2.2.3.5) gewaschen und sedimentiert (1100 g, 5 min, 4 °C). Die Zellen wurden anschließend in 800 μ l Lysatpuffer (20 mM Tris HCl; 5 mM EGTA; Proteaseinhibitoren) aufgenommen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Homogenisation in einem Douncer (20x Mörserbewegungen) sowie durch fünfmaliges Passieren durch eine Spritze (Gauge-Nadel 25 G) aufgeschlossen. Die löslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (800 g, 10 min, 4 °C) von unlöslichen, wie dem nukleären Pellet oder Zytoskelettstrukturen, (Sediment 1), getrennt. Der Überstand wurde anschließend durch Zentrifugation (100 000g, 1 h, 4 °C) in eine lösliche zytoplasmatische Fraktion (Z) und eine partikuläre Fraktion, die lösliche Membran- und Zytoskelettelemente enthält (Sediment 2) unterteilt. Die Sedimentfraktionen 1 und 2 wurden jeweils mit 800 μ l Extraktionspuffer (1% Triton in Lysatpuffer) für 1 h bei 4 °C extrahiert. Hiernach wurden auch diese Fraktionen zur Trennung der solubilisierten von unlöslichen Bestandteilen zentrifugiert (100 000g, 1 h, 4 °C). Es resultierten aus der Sedimentfraktion 1: die unlösliche Fraktion ns (*nuclear scaffold*) und die solubilisierete Extraktionsfraktion nm (*nuclear membrane*), aus der Sedimentfraktion 2: die unlösliche Fraktion ctsk (*cytoskeleton*) und die Extraktionsfraktion pm (*plasmamembrane*). Das Volumen aller fünf Fraktionen (einschließlich der zytoplasmatischen Fraktion Z) wurde mit Lysatpuffer auf 800 μ l angeglichen und mit 5x Lämmli-Puffer (2.2.5.1.) gekocht (99°C, 5 min). Die Analyse der Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE und Western Blotting vorgenommen.

Zellfraktionierung über Säulenchromatographie zur Isolation endogener PKC η

Die Aufreinigung endogener PKC η erfolgte durch Dr. Nüesch wie beschrieben (Nüesch, 1998b). HeLa-S3-Suspensionszellen wurden geerntet, mit PBS (2.2.3.5) gewaschen und für 20 min in hypotonischem Puffer (2.2.3.5.) zum Quellen auf Eis inkubiert, bevor sie durch 25-maliges Passieren im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen wurden. Die Nuklei wurden durch Zentrifugation (10 min, 15 000 g, 4°C) abgetrennt, der Überstand durch weitere Zentrifugation (100 000 g) von unlöslichen Bestandteilen gereinigt. Zur Anreicherung von NS1-aktivierenden Kinasen wurden 200 ml aktivierte Phosphozellulose mit dem Lysat aus 4×10^{10} Zellen beladen. Die Zellsuspension wurde zuvor mit 150 mM NaCl versetzt. An die Matrix gebundene Proteine wurden mit Elutionspuffer (20 mM Tris pH 7.5; 5 mM MgCl₂; 400 mM NaCl) eluiert (Schritt 1). Dieses Eluat wurde gegen Dialysepuffer (20 mM Tris pH 7.5; 5 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 20 % Saccharose; 10 % Glycerol) dialysiert, was neben der Entsalzung eine dreifache Aufkonzentrierung der Proteine bewirkte. Die dialysierten Proteine wurden nachfolgend auf 200 mM NaCl eingestellt und über 200 ml DE52 weiter

aufgereinigt. Es wurden alle Proteine weiter verwendet, die nicht an die starke Anionenaustauschersäule binden konnten (Schritt 2). Nach diesen unspezifischen Fraktionierungen durch klassische Säulenchromatographie wurden PKC-Isoformen durch ihre Affinität zu basischen Peptiden über eine 5 ml Protamin-Säule mittels FPLC (*fast liquid performance chromatography*) angereichert. Die an die Matrix gebundenen Proteine wurden durch Puffer D (20 mM Hepes pH 7.5; 1 mM EDTA; 1 M NaCl; 10 % Glycerol) eluiert und gegen Puffer E (20 mM Hepes pH 7.5; 1 mM EDTA; 50 mM NaCl; 20 % Saccharose 10 % Glycerol) über Nacht bei 4 °C dialysiert, auf 50 % Saccharose äquilibriert und bei -80°C eingefroren (Schritt 3).

Die Auftrennung der NS1-aktivierenden Protein-Kinasen über Hydroxylapatit wurde über eine 5 ml Säule (MERCK) mittels FPLC (Pharmacia) durchgeführt. Angereicherte PKC wurden fünfmal in hypotonischem Puffer (2.2.3.5.) mit 50 mM NaCl verdünnt und über einen 50 ml Superloop auf die Hydroxylapatit-Säule geladen. Nach extensivem Waschen (5 Säulenvolumen) mit Puffer F (20 mM Hepes pH 7.5; 1 mM EDTA; 50 mM NaCl; 10 % Glycerol) wurden die gebundenen Proteine schrittweise durch einen Stufengradienten isoliert, der aus Puffer A (150 mM NaCl; 20 mM KPO₄ pH 7.5) und Puffer B (150 mM NaCl; 0.5 M KPO₄ pH 7.5) gemischt wurde: Fraktion HA-1 entspricht 0 % Puffer B; HA-2A 20 % Puffer B; HA-2B 30 %; HA-2C 40 %; HA-2D 50 % und HA-2E 100 %. Die eluierten Proteine wurden wiederum gegen Dialysepuffer dialysiert und in Gegenwart von 50 % Saccharose und Glycerol bei -80°C eingefroren. Alle Chromatographieschritte wurden bei 4°C in Gegenwart von Proteaseinhibitoren (PMSF, Leupeptin, Aprotinin) durchgeführt.

2.2.5.7. Nachweis von Proteinen mittels Immunfluoreszenz

Fixierung von Zellen

A9-Zellen wurden steril in einer feuchten Kammer auf Objektträgern oder auf kleinen Deckplättchen (Ø: 10 mm) kultiviert und subkonfluent mit MVM oder mock infiziert. Nach Inkubation für den gewünschten Zeitraum wurden die Zellen anschließend 30 min bei Raumtemperatur mit Fixierlösung (3 % *p*-Formaldehyd in PBS (2.2.3.5.); 1 mM MgCl₂; 0,5 mM CaCl₂) behandelt. Zum Abstoppen der Fixierung wurden die Zellen hernach für 6 min bei Raumtemperatur mit Fixier-Stopplösung (50 mM NH₄Cl in PBS; 1 mM MgCl₂; 0,5 mM CaCl₂) und zur Membranpermeabilisierung weitere 10 min mit Permeabilisationslösung (0,5 % Triton X-100 in PBS; 1 mM MgCl₂; 0,5 mM CaCl₂) behandelt. Abschließend wurden die fixierten Zellen sechsmal mit PBS gewaschen und bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C in PBS gelagert.

Die Antikörperreaktionen in der Immunfluoreszenzdetektion

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen 30 min mit Spezies-spezifischem Serum in einer feuchten, lichtundurchlässigen Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verwendung des Blockierungsserums richtete sich dabei nach der Speziesabstammung der für den gewünschten Proteinnachweis zu verwendenden Zweitantikörper (siehe Tabelle 2.1.5.2). Zum Beispiel wurde 10 % Ziegen Serum zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen benutzt, wenn die gegen primäre Maus- oder Kaninchenantikörper gerichteten Sekundärantikörper aus der Ziege stammen. Dagegen wurde zur Detektion von primären Ziegenantikörpern mit 5 % Esel Serum vorinkubiert, da die α -Ziege gerichteten Sekundärantikörper aus Eseln bezogen wurden. Sowohl die Verdünnung des Serums als auch die der Primär- und Sekundärantikörper wurden in IF-Puffer (PBS (2.2.3.5.); 1 mM MgCl₂; 0,5 mM CaCl₂) vorgenommen. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungen wurden die Zellen sechsmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der gewünschte Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (siehe Tabelle 2.1.5.1) zugegeben. Die Kombination mehrerer Primärantikörper in einer Nachweisreaktion mußte so erfolgen, daß unspezifische Kreuzreaktionen aufgrund Spezies-kreuzreagierender Sekundärantikörper unterblieben. Nach 2-stündiger Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die Zellen erneut sechsmal mit PBS gewaschen. Hiernach erfolgte die Zugabe entsprechender, mit einem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierter Zweitantikörper. Die Zellen wurden für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und zum Schluss nochmals sechsmal mit PBS gewaschen. Danach wurde auf die Objektträger oder Deckplättchen Elvanol (12,5 % (w/v) Polyvinylalkohol in PBS; 33 % Glycerin gelöst bei 80 °C über Nacht; 0,01% Natriumazid; Aufbewahrung -20 °C) aufgetropft und eine dünne Glasplatte luftblasenfrei zur Fixierung der gebundenen Antikörper auf den Zellen aufgelegt. Nach einigen Stunden, in denen das Abdeckmedium erstarrte, konnten die Fluoreszenzen mikroskopisch ausgewertet und fotografiert werden. Die Aufbewahrung der Objektträger und Plättchen erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

2.2.5.8. Immunpräzipitation

Herstellung von Zellextrakten aus Säugerzellen für die Immunpräzipitation

Adhärenz wachsende Zellen wurden analog wie unter 2.2.5.1 beschrieben geerntet, allerdings wurde hier das Zellsediment (1x 10⁷ Zellen) in 910 µl hypotonischem Puffer (siehe 2.2.3.5.) ohne DTT aufgenommen und unter gelegentlichem Durchmischen 20 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 90 µl 5 M NaCl zupipettiert und die Inkubationszeit um weitere 30 min fortgesetzt, um die Zellen durch osmotischen Schock zu lysieren. Von diesem Lysat wurden 200 µl zur Immunpräzipitation eingesetzt. Der verbleibende Überstand wurde bei -80 °C gelagert.

Immunpräzipitation nicht markierter oder [³⁵S] Methionin/Cystein inkorporierter Proteine

200 µl Gesamtzellextrakt wurde mit 400 µl RAF-Puffer (137 mM NaCl; 20 mM Tris HCl pH 8; 10 % Glycerol; 1 % NP-40) sowie 30 µl in hypotonischem Puffer (2.2.3.5.) äquilibrierter Protein-G-Sepharose und 5 µl unspezifischem Antiserum gemischt und für 30 min bei 4°C rotiert. Dadurch können Proteine, die unspezifisch an Protein-G-Sepharose oder das Spezies-spezifische Antiserum binden, entfernt werden. Nach der Vorinkubation wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und je nach Antikörperkonzentration mit einem adäquaten Volumen des gegen das zu präzipitierende Protein gerichteten Antikörpers (zum Beispiel: 2 µl α-Flag, 4 µl α-Myc [Kaninchen], 10 µl α-NS1_N, 10 µl α-PKC η) und 50 µl Protein-G-Sepharose versetzt. Bei Verwendung von Maus-Antikörpern wurde zur Erhöhung der Antikörperbindung an Protein G Sepharose bei Bedarf zusätzlich ein ungekoppelter Kaninchen α-Maus-Antikörper (2 µl) eingesetzt. Die Reaktionen wurden 4 h rotierend bei 4 °C inkubiert und abschließend zur Entfernung ungebundener Proteine fünfmal mit RAF-Puffer gewaschen. Der Nachweis immunpräzipitierter Proteine erfolgte durch Western Blotting, Autoradiographie oder Silber-Färbung (2.2.5.9)

Immunpräzipitation von ³²P-markierten Proteinextrakten

³²P- markierte Zellextrakte (3x 10⁷ Zellen) wurden nach der Ernte je nach dem zu präzipitierendem Protein in 1ml RAF-Puffer (siehe 2.2.5.8) supplementiert mit 500 mM NaCl (z.B. für PKC η) oder RIPA-Puffer (2.2.3.5) (z.B. für NS1) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die jeweiligen Puffer wurden vorher mit Phosphataseinhibitoren (20 mM Natriumfluorid; 5 mM β-Glycophosphat; 5 mM p-nitro Phenylphosphat; 5 mM Natriummolybdat; 1 mM Natriumorthovanadat; 5 mM Natriumphosphat) und Proteaseinhibitoren (1 µM PMSF, 1 µM Aprotinin, 1 µM Leupeptin) versetzt. Anschließend wurden die chromosomale DNA und Membranen abzentrifugiert (13 000 rpm, 30 min, 4 °C, Eppendorfszentrifuge) und entfernt. Mit dem verbleibenden Zellysat wurde analog wie oben beschrieben, verfahren, jedoch wurde hier das gesamte Lysat für eine Immunpräzipitationsreaktion eingesetzt.

2.2.5.9. Färbung von Proteinen**Coomassie-Färbung**

Die Coomassie-Färbung der Proteingele erfolgte nach Sambrook (1989). Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden je nach vorliegender Proteinmenge (Detektionsgrenze 100 ng) für 1 h oder länger in Coomassie-Färbelösung (0,25 % Coomassie R260; 10 % Essigsäure; 45 % Methanol) geschwenkt und anschließend für mehrere Stunden zwei- bis dreimal mit Entfärbelösung (35 % Methanol; 10 % Essigsäure; 0,08% Glycerin) soweit entfärbt, daß die Proteinbanden gut sichtbar wurden. Das Gel wurde anschließend auf einem Gelrockner für 2 h unter Vakuum bei 80 °C getrocknet.

Silber-Färbung

Für die Silber-Färbung der Proteine, die wesentlich sensitiver (Detektionsgrenze 2 ng) ist als die Coomassie-Färbung wurde das SDS-PAA-Gel zunächst für 60 min in Fixierlösung (40 % Ethanol; 10 % Essigsäure) inkubiert und anschließend zweimal mit 30 % Ethanol gewaschen. Nach 20 min Inkubation in H₂O wurde das Gel für 1 min in 0,02 % Na₂S₂O₃-Lösung zur leichten Primärreduktion von Silberkationen gelegt und wieder mit H₂O gewaschen (zweimal 20 sec), um überschüssiges Thiosulfat zu entfernen. Zum Färben wurde das Gel für 20 min bei 4°C in der Ag-Färbelösung (0,2 % AgNO₃; 0,025 % Formaldehyd) inkubiert und nach nochmaligem Waschen für 20 sec mit H₂O in Entwicklerlösung (3 % Na₂CO₃; 0,05 % Formaldehyd) für 1-5 min gelegt. Nach kurzem Waschen mit H₂O wurde die Färbereaktion durch Inkubation in 5 % Essigsäure (15 min) abgestoppt und das Gel erneut zweimal 10 min mit H₂O gewaschen. Das Gel konnte anschließend unter Verwendung des Gel-Drying-Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers getrocknet werden.

2.2.5.10. Autoradiographie von Polyacrylamid-Gelen

Mit radioaktiven Proteinen beladene Polyacrylamidgele wurden im Anschluß an die Elektrophorese zuerst in Coomassie-Färbelösung (2.2.5.9) für mindestens 30 min fixiert und für weitere 30 min in einer Isopropanol-Fixierlösung (25 % Isopropanol; 10 % Essigsäure) entfärbt. Nach einer 20 minütigen Behandlung mit Amplify-Lösung (Amersham) wurde das Gel auf einem Gelrockner bei 80°C für 2 h getrocknet und mit einem Röntgenfilm bei -80°C exponiert.

2.2.5.11. In vitro Transkription/Translation

Die *in vitro* Transkription/Translation von Genen erfolgte mittels dem *TNT Coupled Reticulolysate System* (Promega) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden Derivate des pCR-2.1-Vektors verwendet, die die zu transkribierenden Gene in richtiger Orientierung hinter dem T7-RNA-Polymerase Promotor enthielten. Die Translationsprodukte wurden auf einem SDS-PAA-Gel aufgetragen (10 µl pro Ansatz) und anschließend durch Autoradiographie (2.2.5.10) analysiert.

2.2.5.12. Expression heterologer Proteine durch *Escherichia coli*

Zunächst wurden pQE-32 Vektoren hergestellt, die die Gensequenz für das zu exprimierende Protein in richtiger Orientierung und im korrekten Leserahmen zur N-terminalen His₆-Sequenz des Vektors enthielten (siehe Anhang). Nach Transformation in *E. coli* (SURE) wurden entsprechend Kolonien isoliert, angezchtet und auf das Vorhandensein des Plasmids überprüft. Von positiv getesteten Kolonien wurde eine Übernachtskultur angeimpft (4 ml), von der am nächsten Morgen 3 ml als Inokulum für 12 ml LB-Induktionsmedium (100 µg/l Ampicillin; 1 mM IPTG) verwendet wurden. Zur optimalen Belüftung wurde das kleine Volumen der Induktionskultur in einem 100 ml Erlenmeyerkolben inkubiert (20 h, 37 °C, 220 rpm). Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (1500 g, 10 min) und das Sediment in 200 ml Resuspensionspuffer (25 mM Sucrose; 10 mM Tris pH 8) aufgenommen. Diese Bakteriensuspension wurde zur Lagerung bei -80 °C aufbewahrt.

Aufreinigung heterologer Proteine aus Einschlusskörpern

Um die His₆-Fusionsproteine aus *E. coli* Einschlusskörpern (*Inclusion-Bodies*) aufzureinigen, wurde die induzierte Bakteriensuspension aufgeschlossen. Dabei wurde durch Zugabe von Lysepuffer (10 mM Tris pH 8; 20 mg/ml Lysozym) und 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur die bakterielle Zellwand perforiert und das Zytoplasma durch drei Frier-/Tauzyklen (-70 °C/+37 °C) zum Platzen gebracht. Das Lysat wurde mit 1,6 ml TET (100 mM Tris pH 8; 25 mM EDTA; 1 % Triton-X-100) und 2 ml RIPA-Puffer (2.2.3.5) versetzt, die chromosomale DNA durch Ultraschall zertrümmert (20 Pulse, *output control 5; duty cycle 40 %*, Sonifier 250, Branson) und nachfolgend abgetrennt (8000g, 10 min, 4 °C). Der verbleibende Überstand wurde entsprechend des Volumens mit 5x Lämmli-Puffer (2.2.5.1.) aufgekocht und über präparative SDS-PAGE aufgetrennt. Durch 5 min Coomassie-Färbung und kurze Entfärbung bis die Proteinbande sichtbar war, konnte die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten werden. Die PAA-Gelstücke wurden zerkleinert, in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und das Protein aus dem Gel durch Zugabe von 1 ml Elutionspuffer (5 mM (NH₄)₂CO₃; 0,1 % SDS) für mindestens 3 h bei Raumtemperatur extrahiert. Der Elutionspuffer wurde als dann von den Gelstückchen getrennt und in einen Schlauch zur Dialyse gegen Dialysepuffer 1 (20 mM Hepes pH 7,5; 50 mM NaCl; 1 % NP-40) gefüllt. Das Ausschlußvolumen des Dialyseschlauchs betrug 6-8000 kDa. Nach mehreren Stunden wurde zur Volumenverkleinerung und Aufkonzentrierung ein Pufferwechsel gegen Dialysepuffer 2 (20 mM Hepes pH 7,5; 50 mM NaCl; 20 % Saccharose; 10 % Glycerol; 0,1 % NP-40) vorgenommen. Der Proteingehalt wurde abschließend durch Bradford-Proteinreagenz (2.2.5.2) bestimmt und die Verunreinigung durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung ermittelt.

2.2.5.13. Expression heterologer Proteine mittels rekombinanter Vaccinia Viren in Säugerzellen

Die Gewinnung ausreichender Mengen des gewünschten Proteins erfolgte wie unter 2.2.4.7 beschrieben. Jedoch wurden nun zu präparativen Zwecken 5 x 10⁸ HeLa-S3-Zellen verwendet und mit je 15 pfu /Zelle vTF7-3 und den aufgereinigten rekombinanten Viren für 2 h in 5 ml DMEM (ohne FCS) bei 37 °C koinfiziert. Anschließend wurde Induktionsmedium (2.2.4.7) zugegeben und die Zellen zur Expression des Zielproteins für den gewünschten Zeitraum inkubiert (z.B. zur Produktion von NS1 18 h). Danach wurden die Zellen abgeschabt, gewaschen, zentrifugiert und das Zellsediment in 800 µl hypotonischem Puffer (2.2.3.5.) aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nun durch Homogenisation in einem Douncer aufgeschlossen. Anschließend wurde KCl (Endkonzentration 0,6 M) und gegebenenfalls 0,1 % NP-40 zugegeben, um bei einer weiteren Inkubation des Lysats auf Eis auch die Zellkerne durch Quellen aufzuplatzen. Zelldebris wurde nachfolgend abgetrennt (12 500 rpm, 10 min, 4 °C, Eppendorfzentrifuge) und das gewünschte Protein aus dem Überstand zum Beispiel durch Nickelchelatchromatographie oder Sucrosegradienten weiter aufgereinigt.

2.2.5.14. Aufreinigung von His₆-Fusionsproteinen durch Nickelchelatchromatographie

Die Aufreinigung von His₆-Fusionsproteinen kann in wenigen Schritten durch Verwendung der Chelatchromatographie erfolgen. Je nach aufzureinigender Proteinmenge wurde eine entsprechende Menge Nickel-NTA-Agarose in einer 5 ml Plastiksäule mit verengtem Ausfluß vorbereitet (pro 10⁸ Zellen 1 ml Ni²⁺-NTA). Das Säulenmaterial wurde mehrmals mit H₂O gewaschen. Anschließend wurde von oben eine Fritte auf das Säulenmaterial aufgelegt, um eine gleichmäßige Beladung der Säule zu gewährleisten. Das Säulenmaterial wurde mit Puffer D (20 mM Hepes-KOH pH 7,5– 8,0; 500 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 15 % Glycerol) äquilibriert und hiernach mit entsprechendem Zellysat beladen. Zur Entfernung nicht gebundener Proteine wurde die Säule jeweils mit dem zehnfachen Säulenvolumen mit Puffer D, Puffer D/ 4 mM Imidazol sowie Puffer D/ 10 mM Imidazol gewaschen. Die His₆-Fusionsproteine wurden durch insgesamt 4 ml Puffer D/ 80 mM Imidazol schrittweise eluiert. Die Lagerung der eluierten His₆ Fusionsproteine erfolgte bei -80 °C, wobei Aliquots von Proteinkinasen zum Erhalt ihrer Aktivität mit 50 % Glycerol versetzt wurden.

2.2.5.15. Alkalische Phosphatase-Behandlung von Proteinen

Zur Dephosphorylierung von His₆-NS1-Fusionsprotein wurde eine Behandlung mit 15 µl EIA-alkalischer Phosphatase ($\geq 7,5$ U/µl) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in Gegenwart von 10x AP-Puffer (10x: 100 mM Tris pH 8.5; 10 mM MgCl₂; 1 mM ZnCl₂; Proteaseinhibitoren) für 12 min bei 37 °C. Im Anschluß daran wurde sofort eine Aufreinigung mittels Nickelchelatchromatographie (siehe 2.2.5.14) durchgeführt.

2.2.5.16. *In vitro* Phosphorylierung von Proteinen

In vitro Phosphorylierungen wurden durchgeführt, um verschiedene PKC-Isoformen auf ihre Fähigkeit zu untersuchen, dephosphoryliertes NS1 oder andere Substrate zu phosphorylieren. 200 ng aufgereinigtes Protein dienten als Substrat. Die Reaktionen wurden in einem die Aktivität von Protein-Kinasen-stabilisierenden Resolutionspuffer (10x: 200 mM Hepes-KOH pH 7,5; 50 mM KCl; 50 mM MgCl₂; 1 mM DTT) und in Gegenwart von [γ -³²P] ATP (für analytische Reaktionen: 10 µCi; für präparative Reaktionen: 30 µCi) als Substrat durchgeführt. Das ermöglichte eine Detektion phosphorylierter Substratproteine mittels Autoradiographie. Zur Aktivierung der zu untersuchenden PKC wurde je nach Isozym 20 µg L- α -Phosphatidyl-L-Serin und/oder 100 nM TPA (10 mM Stammlösung in DMSO) zugegeben. Nach Zugabe von circa 50-100 ng Kinase wurde das Reaktionsvolumen auf 50 µl mit H₂O aufgefüllt und 40 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10x Resolutionsstop-Puffer (1 % SDS; 10 mM EDTA; 0,5 Tris pH 7,5) beendet. Um die Phosphorylierung der Substratproteine analytisch zu untersuchen, wurde 5x Laemmli-Puffer (2.2.5.1.) zupipettiert, der Reaktionsansatz 5 min bei 95 °C inkubiert und nach Auftrennung mittels SDS-PAGE, Gelfixierung und -Trocknung autoradiographisch ausgewertet. Bei präparativen Versuchen hingegen wurde das phosphorylierte Substratprotein durch Immunpräzipitation gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blotting auf PVDF-Membranen transferiert. Nach kurzer Exposition auf einem Röntgenfilm und Identifikation der Substratbande konnte diese von der Membran ausgeschnitten und für gewünschte Analysen weiter verwendet werden.

2.2.5.17. Analyse von Peptid - Phosphorylierungsmustern mittels tryptischer 2D-Elektrophorese

In vivo oder *in vitro* phosphorylierte Proteine wurden nach Immunpräzipitation, Auftrennung mittels SDS-PAGE und Transfer auf PVDF-Membran durch Ausschneiden der entsprechenden Bande mit einem Skalpell isoliert. Das Membranstückchen wurde anschließend 30 min bei 37 °C in PVP-Puffer (0,5 % Polyvinylpyrrolidon; 100mM Essigsäure) inkubiert und fünfmal mit jeweils 1 ml H₂O durch leichtes Auf- und Ab-Pipettieren gewaschen. Hiernach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 50 mM (NH₄)₂CO₃ für 5 min. Der Überstand wurde nachfolgend entfernt und die Membran mit 180 µl frischem (NH₄)₂CO₃ sowie 20 µl Trypsin/Chymotrypsin (50 U ; Promega) versetzt, das als lyophilisiertes Pulver zuvor in 10x Trypsinpuffer aufgenommen worden war. Der tryptische Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Morgen wurde der die tryptischen Peptide enthaltende Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Membran mit 200 µl H₂O gewaschen. Diese 200 µl H₂O wurden anschließend mit dem tryptischen Überstand vereint. Durch mehrstündige Lyophilisation unter Vakuum erfolgte eine Volumeneinengung und Trocknung der tryptischen Peptide, die danach erneut in 400 µl H₂O aufgenommen wurden. Die Trocknung und Resuspension der Peptide wurde zur Abtrennung kontaminierender Bestandteile noch zwei weitere Male wiederholt. Das resultierende Sediment wurde in 50 µl pH-1,9-Puffer (2,2 % (v/v) Ameisensäure; 7,8 % (v/v) Eisessig) aufgenommen und erneut lyophilisiert. Abschließend wurden die Peptide in 5 µl pH-1,9-Puffer aufgenommen und ihre Radioaktivität in einem Cerenkov-Counter (QC 2000, Branson) gemessen. Um das Peptidphosphorylierungsmuster verschiedener Proteine miteinander zu vergleichen, wurde aufgrund der gemessenen Radioaktivität eine Angleichung der Konzentration vorgenommen, so daß gleichstark ³²P-markierte Phosphopeptide auf TLC-Dünnschichtplatten punktförmig aufgetropft wurden. Nach Trocknung der aufgetragenen Probe wurden die Dünnschichtplatten mit pH-1,9-Puffer befeuchtet und in das vorgesehene Elektrophoresegerät (Pharmacia) in der richtigen Orientierung eingelegt. Zu beiden Seiten der Dünnschichtplatte wurden in pH-1,9-Puffer tauchende Filterpapiere aufgelegt, die so eine Verbindung zwischen Kathode und Anode herstellten. Die Auftrennung in der ersten Dimension erfolgte bei fortwährender Kühlung für 40 min bei 1000 V. Danach wurden die Dünnschichtplatten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in eine feuchte Glaskammer gestellt, wo die Peptide nach ihrem Lösungsverhalten in Phosphochromatographie-Puffer (37,6 % n-Butanol; 25 % Pyridin; 7,5 % Eisessig) in einer zweiten Dimension über Nacht getrennt wurden. Nach Trocknung der Platten wurden sie in Klarsichtfolie eingeschlagen und mit einem Röntgenfilm für mehrere Wochen bei -80 °C exponiert.

2.2.5.18. *In vitro* Replikationsassay

Das etablierte *in vitro* Replikationsassay-System erlaubt, den Einfluß spezifischer NS1 Phosphorylierungsereignisse auf die replikativen Funktionen des viralen Proteins zu untersuchen. Der Assay basiert auf einer Phosphozellulose Flow Through Fraktion (P1) von 293-Zellen, aus der durch L-Threonin-Affinitätschromatographie endogene Kinasen entfernt wurden. Von dieser kinasefreien P1-Fraktion, die zelluläre Replikationsfaktoren (PIF) und Hilfsproteine (RPA, PCNA) enthält, wurden 4 µl pro Reaktionsansatz eingesetzt. Als Substrat für die Replikationsreaktion dienten 20 ng Plasmide, die den linksseitig aktiven (pL1-2TC) bzw. inaktiven (pL1-2GAA) origin of replication des MVM-Genoms enthalten. Die Reaktion wurde in Resolutionspuffer (siehe 2.2.5.16) in Gegenwart von je 0,05 mM aller dNTPs, 2 mM ATP sowie 10 µCi [α - 32 P] dATP durchgeführt. Zur Regenerierung des ATP wurde zu allen Reaktionsansätzen 40 mM Kreatinphosphat und 1 µg Phosphokreatinkinase zugegeben, so daß die Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 20 µl stattfanden. Nach Zugabe von 3 U T4-DNA-Polymerase aus Bakteriophagen kann natives NS1 unter diesen Bedingungen die RCR initiieren. Um NS1-aktivierende Kinasen zu identifizieren, wurde der *in vitro* Replikationsassay anstatt mit nativem auch mit dephosphoryliertem NS1 (2.2.5.15) durchgeführt. Zur Komplementation fehlender replikativer Funktionen des dephosphorylierten NS1 wurden zelluläre Kinasefraktionen zugesetzt. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurden die Reaktionen durch Zupipettieren von 2 µl 10x Resolutionsstop-Puffer (2.2.5.16) und enzymatischer Inaktivierung für 30 min bei 70 °C beendet. Zur Analyse wurden die Reaktionsprodukte mit 7 µl α -NS1_N Antiserum sowie 70 µl aufbereiteter Protein-A-Sepharose aus *Staphylococcus aureus* (siehe nachfolgend) in 150 µl Triplepuffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 0,5 % Na-Deoxycholat; 0,1 % SDS) immunpräzipitiert. Die Bakterien wurden danach 2x mit Triplepuffer und 1x mit TEN-Puffer (20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) gewaschen und mit HindIII für 90 min bei 37 °C restringiert. Die Restriktionsansätze wurden durch Zugabe von 10x Resolutionsstop-Puffer (2.2.5.16) und Proteinase K (10 U) für 60 min bei 37 °C, von Proteinen (insbesondere dem 5' terminalen NS1) befreit und die Bakterien durch Zentrifugation abgetrennt. Abschließend wurden die Reaktionsansätze vollständig auf ein 0,8 % Agarosegel beladen und durch Elektrophorese (70 V, 5 h) separiert. Dem Agarosegel wurde hiernach durch Unter- und Überschichten mit trockenem Filterpapier und Gewichtauflegung für 30 min H₂O entzogen. Nach weiterer Trocknung für 90 min bei 60 °C wurden die Gele mit einem Röntgenfilm bei -80 °C exponiert.

Aufreinigung von Protein-A-Sepharose-positiven Formalin-fixierten Staphylococcus aureus für Immunpräzipitationen

Protein-A-positive Formalin-fixierte *Staphylococcus aureus* wurden in 10 ml S. aureus Reinigungspuffer (3 % SDS; 10 % β -Mercaptoethanol in PBS) aufgenommen. Die Zellen wurden durch Inkubation bei 100 °C für 30min gekocht. Die Zelltrümmer wurden nachfolgend abzentrifugiert und erneut mit Reinigungspuffer aufgekocht. Das resultierende Zellsediment wurde mehrmals in PBS gewaschen und schließlich in dem zur Immunpräzipitation verwendeten Triplepuffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA; 1 % Triton-X-100; 0.5 % Na-Deoxycholat; 0.1 % SDS) aufgenommen.

2.2.5.19. *In vitro* Aktin-Kosedimentierungsassay

Um den Einfluß bestimmter Proteine auf die Assemblierung von Aktin oder die Assoziation zu bestimmten Aktinfilamentstrukturen zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Aktin-Kosedimentierungsassay nach Vaiskunaite (2000) durchgeführt. Dabei wurden 8×10^7 subkonfluent angezüchtete adhärenente Zellen durch Abschaben geerntet, in PBS (2.2.3.5) gewaschen und abzentrifugiert (1100 g, 5 min). Das Zellsediment wurde in 800 µl Homogenisierungspuffer (20 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; Proteaseinhibitoren) aufgenommen, für 15 min auf Eis inkubiert und mittels fünfmaligem Passieren durch eine Spritze (Gauge 27 $^{3/4}$) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abgetrennt (800 g, 10 min, 4 °C), der Überstand in ein kleines Polycarbonat-Röhrchen überführt und zur Sedimentation der Membranen erneut zentrifugiert (150 000g, 60 min, 4 °C). Das Zentrifugat wurde danach in ein Eppendorfgefäß überführt, das Membranpellet wurde in 200 µl Extraktionspuffer (20 mM Tris pH 7,9; 20 % Glycerol; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT; Proteaseinhibitoren) resuspendiert. Anschließend wurde der Proteingehalt beider Fraktionen mittels Bradfordbestimmung (2.2.5.2) ermittelt. Zum Vergleich der Aktinassemblierung verschiedener Zellextrakte wurden nun 500 µg Protein der jeweiligen zytosolischen Fraktionen entnommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 20 µl 40x Aktin-Polymerisierungspuffer (200 mM MgCl₂; 4 M KCl; 100 mM ATP; Proteaseinhibitoren) versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 800 µl mit Homogenisierungspuffer aufgefüllt. Als Kontrolle wurde dieselbe zytoplasmatische Proteinmenge in einem Parallelansatz ohne Polymerisierungspuffer inkubiert. Die Assemblierung erfolgte für 60 min bei 37 °C. Neu gebildete Filamente wurden anschließend von löslichen Monomeren durch Zentrifugation (150 000 g, 60 min, 4°C) getrennt und in 200 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert. Abschließend wurden alle Fraktionen entsprechend ihres Volumens mit 5x Lämmli-Puffer (2.2.5.1.) versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. 40 µg der

Membran-Sedimentfraktion, 80 μ l der zytoplasmatischen Fraktion und 50 μ l der Aktin-Sedimentfraktion wurden durch SDS-PAGE und Western Blotting analysiert.

2.2.5.20. Auftrennung von Zytoskelettfilamenten mittels Sucrosegradienten

Alternativ zu 2.2.5.19. wurden die im Aktin-Kosedimentierungsassay gebildeten Filamente auf ihre Struktur und Vernetzung miteinander verglichen. Dabei wurde das Sedimentationsverhalten des in 200 μ l hypotonischem Puffer aufgenommen Aktinfilamentpellets in einem Sucrosegradienten untersucht. Dazu wurden in kleinen 2 ml Polycarbonat-Röhrchen verschieden konzentrierte Sucroselösungen vorsichtig so übereinandergeschichtet, daß sich am Boden des Röhrchens 250 μ l 50 % iger, darüber je weitere 250 μ l 40 %, 30 % sowie 20 % iger Sucroselösungen befanden. Die Röhrchen wurden zur Ausbildung eines diskontinuierlichen Gradienten über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend beladen. Die Zentrifugation erfolgte bei 150 000 g, 4 °C für 24 h. Anschließend wurde der Gradient von oben her mit einer Pipette abgetragen, die Dichte ρ der einzelnen Fraktionen und die Verteilung der gewünschten Proteine durch SDS-PAGE und Western Blotting ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Regulierung der viralen DNA-Replikation durch NS1-Phosphorylierung

NS1 ist das wichtigste regulatorische Protein der autonomen Parvoviren und besitzt dementsprechend eine Vielzahl enzymatischer Funktionen. Aus seiner an die zelluläre S-Phase gekoppelten Expression (Deleu, 1998), sowie der Zyklin A-abhängigen Konversionsreaktion (Bashir, 2000) resultiert die Zellzyklusabhängigkeit der MVM-DNA-Replikation. Bisherige Arbeiten haben gezeigt, daß eine Phosphorylierung von NS1 durch PKC λ unbedingt notwendig ist, um das Protein für die virale DNA-Replikation zu aktivieren. Die Phosphorylierung durch PKC λ ist ausreichend, das virale Polypeptid für die Entwindungsreaktion der DNA am *origin* während der anfänglichen Spaltungsreaktion zur Bereitstellung der Primer für die DNA-Polymeraseaktivität zu stimulieren (Dettwiler, 1999). Darüber hinaus wird NS1 durch PKC λ auch für die anschließende Helikasereaktion am Beginn der Replikationsgabel aktiviert (Nüesch, 2001; Nüesch, 2003). Allerdings ist die alleinige PKC λ -Phosphorylierung ungenügend, um alle NS1-Funktionen *in vitro* zu reaktivieren, die zum Steuern der zirkulären unidirektionalen Replikation durch die zelluläre Replikationsmaschinerie benötigt werden (Nüesch, 1998b; Dettwiler, 1999). Hierfür sind weitere regulatorische Phosphorylierungen und möglicherweise andere posttranslationale Modifikationen des Polypeptids erforderlich.

3.1.1. PKC η aktiviert NS1 für die DNA-Amplifikation zusammen mit PKC λ

Um Kinasen identifizieren zu können, die für eine vollständige Aktivierung von NS1 essentiell sind, wurde ein Kinase-freies *in vitro* Replikationssystem benutzt. Zu diesen Reaktionsansätzen wurden schrittweise aufgereinigte Zellextrakte zugegeben und so auf ihr Reaktivierungspotential von dephosphoryliertem NS1⁰ für die Replikation getestet. Das angewendete mehrstufige Aufreinigungsschema zur Isolierung NS1-phosphorylierender Kinasen ist in Abb. 12 dargestellt. Die für eine NS1 Aktivierung im *in vitro* Replikations-Assay positiv getesteten Proteinextrakte wurden mittels Chromatographie über verschiedene Säulen weiter angereichert (Schritt 1-4). Dabei konnte nur eine einzige Eluat-Fraktion dephosphoryliertes NS1⁰ vollständig zur RCR aktivieren. Erst bei der Aufreinigung über Hydroxylapatit (HA) konnten verschiedene Komponenten voneinander getrennt werden, die für die Aktivierung von NS1 nötig waren (Schritt 5). Durch alleinige Zugabe der sogenannten HA-1 Fraktion konnte dephosphoryliertes NS1⁰ für Helikaseaktivität stimuliert werden

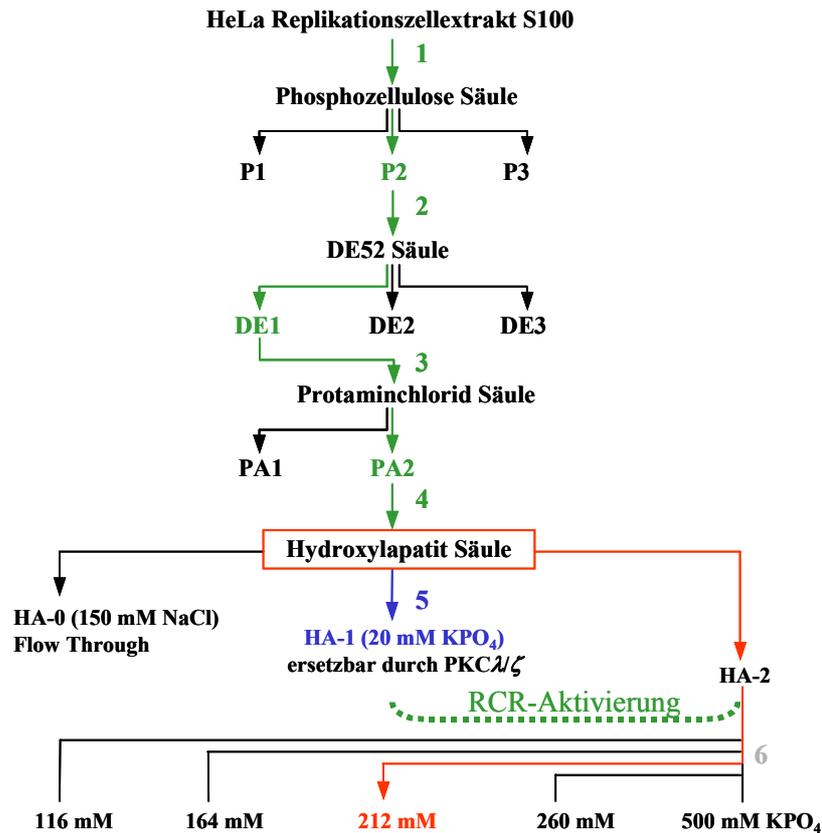


Abb. 12: Aufreinigung von NS1 regulierenden Kinasen aus HeLa-Zellextrakten. Zelluläre Protein Kinasen wurden in mehreren Schritten aufgereinigt: über Phosphozellulose, DE52, Protaminchlorid und Hydroxylapatit (HA) Säulen. Dabei wurden nur die jeweiligen Fraktionen weitergeführt (grün markiert), die NS1 für Replikationsfunktionen im *in vitro* Replikationsassay zur RCR aktivierten (Nüesch *et al.*, 1998b). Erst Hydroxylapatit erlaubte eine Trennung von 2 Komponenten (HA-1, HA-2), die beide für die RCR-Aktivierung von NS1 benötigt wurden. Die blau markierte Fraktion erlaubte eine Aktivierung von NS1 für DNA-Entwindungsfunktionen. Zu Identifikationszwecken wurden die HA-gebundenen Kinasen mittels KPO₄-Stufengradienten eluiert. Atypische PKCλζ eluierten bei 20 mM KPO₄ (HA-1 Fraktion), mit höherer Affinität gebundene Kinasen eluierten mit steigenden KPO₄ Konzentrationen und ergaben Subfraktionen HA-2 A bis E. In rot markiert ist eine bisher nicht identifizierte Komponente, die zur Aktivierung von NS1⁰ RCR Funktionen benötigt wird.

(Nüesch, 1998b). Als aktivierende Komponente dieser HA-1 Fraktion wurde PKCλ identifiziert (Dettwiler, 1999). Um eine vollständige Aktivierung von NS1⁰ für die RCR zu bewirken, war jedoch neben HA-1/PKCλ zusätzlich die HA-2 Fraktion notwendig und gleichzeitig auch ausreichend. Somit besitzt die fehlende Komponente der HA-2 Fraktion dasselbe Trennverhalten auf einer Phosphozellulose-, einer Anionenaustauscher- sowie einer Protamin-Affinitätssäule, wie PKCλ (Nüesch, 1998b). Erst auf Hydroxylapatit unterschied sich λ im Bindungsverhalten von der zweiten aktivierenden Komponente, da die atypischen PKC-Isoformen λ und ζ hier bereits bei geringer Phosphatkonzentration (HA-1, 20 mM KPO₄) eluierten, während die zweite Komponente eine höhere Affinität zum Säulenmaterial besaß (HA-2). Durch Elution mit einem Stufengradienten wurde diese HA-2 Fraktion in fünf Subfraktionen (A-E) unterteilt, die erst bei Konzentrationen von 116 mM, 164 mM, 212 mM, 260 mM bzw. 500 mM KPO₄ von der Säule verdrängt wurden (Abb. 12; Schritt 6). Das

identische Aufreinigungsverhalten bis hin zur HA-Säule, sowie die Stimulierung der RCR-Reaktion durch PKC-Aktivatoren wie Phorbol ester (TPA) und Phosphatidylserin deuten auf eine weitere PKC-Isoform in HA-2 hin, die für die vollständige Aktivierung von NS1⁰ nötig sein könnte. Um die in HA-2 enthaltenen Kinasen näher zu analysieren, wurden Aliquots aller fünf Subfraktionen der Größe nach aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie angefärbt (2.2.5.9.). Aus Abb. 13A ist ersichtlich, daß die Subfraktionen insbesondere Proteine eines Molekulargewichts von 70 und 90 kDa enthielten, welches den Größen der PKC-Isoenzyme entspricht.

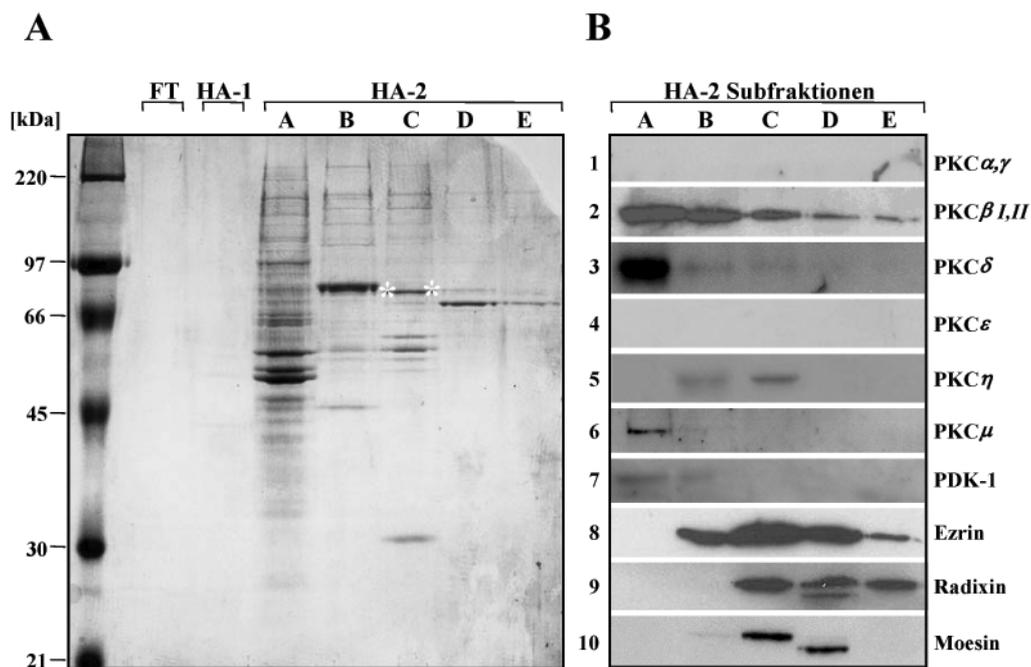


Abb. 13: Analyse der HA-2 Subfraktionen nach potentiellen Kinasen, die NS1⁰ für RCR aktivieren: **A) Coomassie Brilliant Blau (CBB) Färbung.** Proteine wurden in den verschiedenen Fraktionen über 10 % SDS-PAGE aufgetrennt, fixiert und mit CBB gefärbt. FT: Flow Through (HA-0), HA-1: Hydroxylapatit Fraktion 1 (enthält PKC λ/ζ), HA-2: Hydroxylapatit-Fraktion 2. Alle HA-2 Subfraktionen enthalten Proteine mit einem MW zwischen 70-90 kDa, entsprechend der Größe von Protein Kinase C Isoformen. Die 80 kDa Bande (markiert) konnte durch Massenspektrometrie-Analysen als ein ERM (Ezrin Radixin Moesin) Protein identifiziert werden. **B) Western Blot Analyse der HA-2 Subfraktionen.** Die HA-2 Subfraktionen wurden über 10 % SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Western Blot untersucht: 1) PKC α,γ ; 2) PKC $\beta I,II$; 3) PKC δ ; 4) PKC ϵ ; 5) PKC η ; 6) PKC μ ; 7) PDK-1; 8) Ezrin; 9) Radixin; 10) Moesin.

Durch Western Blotting (2.2.5.4.-5.) sollte nun im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob PKC in den HA-2 Subfraktionen A-E vorhanden sind, welche Isoenzyme vorliegen, in welchen Subfraktionen sie möglicherweise angereichert sind und ob individuelle Fraktionen im Kinase-freien *in vitro* Replikationssystem eine Reaktivierung von NS1⁰ zusammen mit PKC λ erlauben. Das ergäbe eine gute Indikation für die Identität der zweiten aktivierenden Komponente. Abbildung 13B zeigt, daß in der Tat durch unterschiedliche spezifische Affinität zu Hydroxylapatit verschiedene PKC-Isoenzyme in HA-2 separiert werden konnten.

Die in HA-2 nachgewiesenen Kinasen PKC β /II, PKC δ , PKC μ und die PKC-aktivierende Kinase PDK-1 eluierten bei niedrigen KPO₄-Konzentrationen, dementsprechend wurden die meisten Proteine in HA-2A detektiert. Mit Ausnahme von PKC β /II eluierten nur marginale Mengen dieser Kinasen bei höheren KPO₄-Elutionsbedingungen. Im Gegensatz dazu zeichnete sich die zu den Kalzium-unabhängigen PKC-gehörende Isoform η durch eine Elution bei mindestens 164 mM Phosphat aus, so daß der Hauptanteil dieser Kinase in Subfraktion HA-2C und ein etwas geringerer Teil in HA-2B nachgewiesen wurde. PKC α , γ und ε waren in HA-2 nicht enthalten (Abb. 13B; Reihen 1, 4), weil sie sich schon zu einem früheren Zeitpunkt in ihren Bindungseigenschaften von PKC λ unterschieden. Darüber hinaus wurden alle HA-2 Subfraktionen auf die Verteilung der ERM-Proteine (**E**zrin **R**adixin **M**oesin) untersucht (Abb. 13B; Reihe 8-10), da diese zuvor durch Mikrosequenzierung der im Coomassie-Gel am stärksten gefärbten Bande in der HA-2C Fraktion identifiziert worden waren (Nüesch, unveröffentlichte Daten). Die N-terminale Aminosäuresequenz der Proteinbande ergab eine vollständige Übereinstimmung mit der Radixin- und Moesin-Sequenz, die beide zueinander hohe Homologie aufweisen. Die ERM-Proteine wiesen eine deutlich höhere Affinität zu Hydroxylapatit auf, als die meisten in den HA-2 Subfraktionen enthaltenen PKC-Isoformen mit Ausnahme von PKC η . Ein Zusammenspiel zwischen den ERM Familienmitgliedern und PKC-Isoformen ist bislang nicht bekannt (siehe Kap. 3.3).

Im Anschluß daran wurden die HA-2 Subfraktionen auf ihre Aktivierungskapazität von NS1^O zur RCR-Initiierung im Kinase-freien *in vitro* Replikationssystem (2.2.5.18.) getestet. Dieser *in vitro* Assay basiert auf einem HeLa-Zellextrakt, aus dem durch Threonin-Affinitätschromatographie zelluläre Kinasen entfernt wurden. Zu diesem Kinase-freien Extrakt wurde T4-DNA-Polymerase sowie dephosphoryliertes NS1^O zugesetzt. Die für die Initiation der parvoviralen Replikation benötigten Faktoren, wie das ss-DNA-Bindungsprotein RPA (**R**eplikations**p**rotein **A**), PCNA (**p**roliferating **c**ell **n**uclear **a**ntigen), sowie der **P**arvovirus-Initiationsfaktor PIF sind somit in der Kinase-freien HeLa-Zellfraktion bereits enthalten. Zirkuläre Plasmide mit einem linksseitigen *origin* dienten als Substrat für den *in vitro* Replikations-Assay. Um das virale NS1^O Polypeptid für seine DNA-Entwindungsfunktionen zu aktivieren (Dettwiler, 1999; Nüesch, 2001), wurden alle Reaktionen in Gegenwart von rekombinanter PKC λ sowie von PKC Aktivatoren (PS und TPA) durchgeführt. Nun konnte die Komplementation der einzelnen Kinase-freien Reaktionsansätze durch die aufgereinigten HA-2 Subfraktionen erfolgen. Um die Syntheseaktivität zu testen, wurden alle Reaktionen für 2 h bei 37 °C in Anwesenheit von α [³²P]dATP durchgeführt. Die Replikationsprodukte des Assays wurden mit α -NS1_H zur Unterscheidung zwischen der Eigenaktivität des Extrakts und spezifischen NS1-initiierten Replikationsprodukten immunpräzipitiert und auf einem 0,8 % igen Agarosegel aufgetrennt. Wie Abb. 14 zeigt, ist phosphoryliertes NS1^P in der Lage zur Stimulierung der RCR (Spur 1), während NS1^O in Abwesenheit von PKC λ keine detektierbare Aktivität besaß (Spuren 3,4).

Die Zugabe von PKC λ (Spur 5) führte nur zu einer marginalen Replikationsaktivität, eine Beobachtung, die mit früheren bereits veröffentlichten Daten übereinstimmt (Dettwiler, 1999; Nüesch, 2003). Im Gegensatz dazu bewirkte die Zugabe der HA-2 Subfraktionen eine deutliche Stimulierung der NS1^O- Replikationsaktivität. Während HA-2A keinen Einfluß auf die Replikationsfunktionen des NS1^O ausübte (Daten nicht gezeigt), stimulierten Subfraktionen mit höherer Affinität zu Hydroxylapatit deutlich (Abb. 14; Spuren 6,7,8); die signifikanteste Stimulation der NS1^O-Replikationsfunktionen wurde mit HA-2C beobachtet (Spur 7).

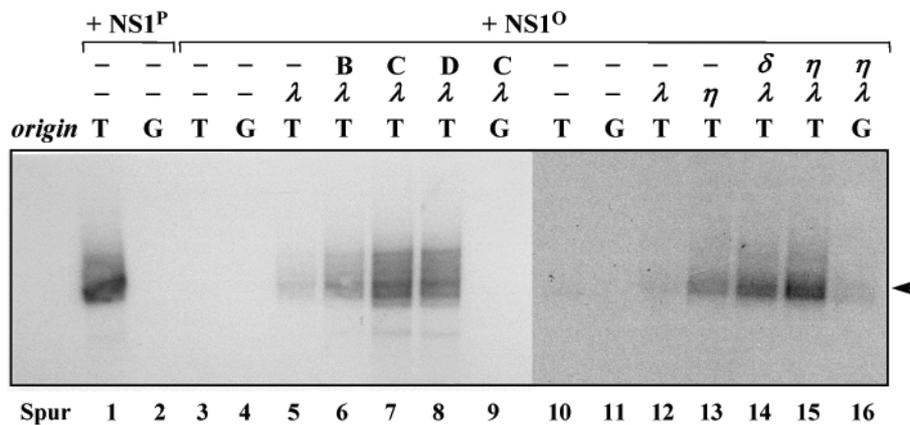


Abb. 14: Reaktivierung von dephosphoryliertem NS1 in Replikationsassays. NS1- abhängige *rolling circle* Replikation von Plasmiden, die einen aktiven (T) oder inaktiven (G) parvoviralen Replikations-*origin* enthalten, wurden in einem Kinase-freien, auf P1-Threonin und T4 DNA-Polymerase basierenden *in vitro* System untersucht (Nüesch *et al.*, 1998b). Reaktionsprodukte wurden nach Immunpräzipitation mit spezifischen NS1-Antisera isoliert, mit *HindIII* linearisiert und nach Deproteinierung durch 0,8 % Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Die Position des linearisierten Plasmids ist mit einem Pfeil angedeutet. Spuren 1-2: phosphoryliertes NS1; 4-16: durch alkaline Phosphatase dephosphoryliertes NS1^O; 5-9, 12, 14-16: Reaktionen unter Zugabe von rekombinanter PKC λ ; 13, 15-16: Reaktionen unter Zugabe von rekombinanter PKC η ; 6: HA-2B; 7,9: HA-2C; 8: HA-2D; 14: rekombinante aufgereinigte mPKC δ nach Vaccinia Virus Expression.

Wenn man nun zu diesem Ergebnis die Western Blot Analyse (Abb. 13B) der einzelnen HA-2 Fraktionen in Betracht zieht, läßt sich festhalten, daß die höchste Stimulierung von NS1^O in Anwesenheit von PKC η erfolgte. Dieser Zusammenhang legt die Wahrscheinlichkeit nahe, daß es sich bei der Kalzium-unabhängigen Isoform PKC η um die NS1-aktivierende Komponente für die RCR handeln könnte. Die Schlußfolgerung wird durch die Beobachtung gestützt, daß andere PKC-Isoformen, wie PKC β/II , PKC μ oder PKC δ , die hauptsächlich in den niedrig HA-affinen Fraktionen vorliegen, nur sehr geringen Einfluß auf die NS1^O-Replikation ausübten.

Um herauszufinden, ob PKC η wirklich in der Lage ist, NS1^O für Replikationsfunktionen zu aktivieren, wurden die *in vitro* Replikationsreaktionen in Gegenwart von rekombinanter PKC λ und PKC η , jedoch ohne Zugabe der HA-2 Subfraktionen durchgeführt. Darüber hinaus

wurden zu Kontrollzwecken die Isoformen α , β , γ , δ und ε benutzt. Zur Herstellung rekombinanter PKC η wurde ein cDNA-Klon mit der vollständigen Sequenz von PKC η aus einer humanen Plazenta cDNA-Bibliothek isoliert (2.2.2.14.), in den Vektor pTHis1 kloniert (siehe Anhang 6.1.1.) und ein rekombinantes Vaccinia Virus hergestellt (diese Arbeiten wurden von Dr. Nüesch ausgeführt, siehe 2.2.4.6.-8.). Die Transkription des PKC η Gens erfolgte in Gegenwart eines zweiten Vaccinia Virus vTF7-3, der die Bereitstellung der aus Bakteriophagen klonierten T7-RNA-Polymerase gewährleistete. Im Anschluß daran erlaubte eine Encephalomyocarditis Virus-Leader-Sequenz eine sehr effiziente cap-unabhängige Translation von PKC η ohne vorherigen Kerntransport der mRNA. Die Herstellung des rekombinanten Proteins erfolgte in HeLa-Zellen. Seine Aufreinigung konnte durch einen N-terminalen [His]₆-Tag mit Nickel-NTA-Agarose-Chelatchromatographie erfolgen (2.2.5.14.). Zur Qualitätskontrolle wurden die eluierten Fraktionen im SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blotting auf die erzielte Menge, sowie durch Coomassie-Färbung auf die erzielte Reinheit von PKC η untersucht. Abb. 15 zeigt, daß PKC η in ausreichender Menge und mit zufriedenstellender Reinheit vor allem in Fraktion 1 angereichert werden konnte.

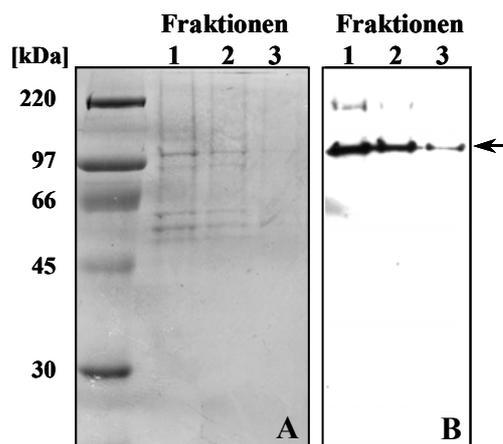


Abb. 15: Aufreinigung von rekombinanter PKC η . His₆-PKC η wurde durch Vaccinia Viren in HeLa Zellen exprimiert und mittels Nickelchelatchromatographie aus dem Gesamtzell-extrakt gereinigt. Die Säulenelution von PKC η erfolgte mit 80 mM Imidazol. 1/40 aller Fraktionen (1-3) wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und durch (A) **Coomassie Brilliant Blau** angefärbt oder (B) **Western Blotting** auf PKC η getestet (siehe Pfeil). Das verlangsamte Laufverhalten von His₆PKC η gegenüber dem theoretisch errechneten MW kann durch den N-terminalen His₆-Tag verursacht werden.

Zum direkten Vergleich wurde ebenfalls ein Vaccinia Virus für die Expression der eng verwandten Kalzium-unabhängigen PKC δ hergestellt. Im Anschluß daran wurde ein möglicher Einfluß dieser PKCs, wie bereits beschrieben, in *in vitro* Replikationsassays untersucht, wobei die verschiedenen rekombinanten PKCs nun die HA-2 Subfraktionen ersetzen. Abb. 13 (Spuren 10-16) belegt, daß in der Tat PKC η in Gegenwart von PKC λ NS1⁰ für Replikationsfunktionen aktivieren konnte, während PKC δ und PKC λ (Spur 14) oder PKC η allein (Spur 13) nur eine moderate Stimulierung zur RCR hervorriefen. In verschiedenen Assays wurde hingegen keine Aktivierung mit rekombinanter PKC α , PKC β /III, PKC γ oder PKC ε erreicht (Daten nicht gezeigt; Lachmann, im Druck). Als Resümee kann festgestellt werden, daß PKC η nach mehrstufiger Aufreinigung von Proteinkinase aus HeLa-Zellen in der zellulären Fraktion identifiziert wurde, die dephosphoryliertes NS1⁰ am besten zur RCR im *in vitro* Replikationsassay aktivierte.

Darüber hinaus konnte dieses Ergebnis durch Ersatz der aktivierenden HA-2C Fraktion mit rekombinanter PKC η im selben Assay bestätigt werden. Damit belegen diese Ergebnisse einen direkten Einfluß von η auf die Regulation von NS1-replikativen Funktionen, der nachfolgend auch *in vivo* untersucht werden soll.

3.1.2. Einfluß von PKC η auf die DNA-Replikation von MVM in der infizierten Zelle

3.1.2.1. Herstellung und Charakterisierung von A9-Zelllinien, die PKC η -Mutanten produzieren

Um einen möglichen Einfluß von PKC η während der MVM-Infektion zu studieren, war es notwendig, die Virus-Replikation in Abhängigkeit von der endogenen PKC η -Aktivität in A9-Zellen zu untersuchen. Zur Vereinfachung dieses Aspektes wurde eine Analyse der MVM-Replikation in Gegenwart von PKC η -Mutanten mit „definierter Aktivität“ durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden A9-Zelllinien hergestellt, die verschiedene PKC η -Mutanten unter Kontrolle des NS1-induzierbaren P38-Promotors stabil in die chromosomale DNA integrierten. Die Zelllinien setzen sich aus circa 200 Einzelzellklonen pro Mutante zusammen, da zur Vermeidung epigenetischer Effekte keine Einzelzellselektion vorgenommen wurde. Die Herstellung solcher Zelllinien bietet eine Reihe weiterer Vorteile: (i) Ungefähr 95% einer Zellpopulation erhielt das Expressionsplasmid und war in der Lage, das Polypeptid zu exprimieren, wie mit einem P38-EGFP-Kontrollplasmid ermittelt wurde (Daten nicht gezeigt). (ii) Durch chromosomale Integration bewegen sich die Expressionsniveaus für die Mehrzahl der Zellen nach Induktion in einem physiologischen Bereich. Demgegenüber kann die kontrollierte episomale Expression einer Fremdsequenz nach transienter Transfektion häufig problematisch sein. (iii) Die Verwendung des parvoviralen P38-Promotors ermöglicht eine induzierbare Expression unabhängig von externen Stimuli, wie Dexamethason oder künstliche Aktivatoren, die wiederum undefiniert zelluläre Promotoren beeinflussen könnten. Darüber hinaus wird ein erhöhtes Expressionsniveau des Transgens erst nach Etablierung einer Infektion erzielt, da der P38-Promotor sowohl episomal als auch chromosomal integriert durch das virale NS1-Protein induziert wird (Nüesch, 1992, Christensen, 1995a; Lorson, 1996). Aus diesem Grund sollte ein möglicher Einfluß der PKC η -Mutanten auf eine Rezeptorinteraktion oder den Viruseintritt unwahrscheinlich sein. (iv) Die Eingliederung des Transgens in die chromosomale DNA und seine ausgeglichene Expression haben keinen Einfluß auf das Überleben und die Vermehrung der Zellpopulation. Die Zelllinien sind über einen längeren Zeitraum unter Selektion gewachsen und reproduzierten sich.

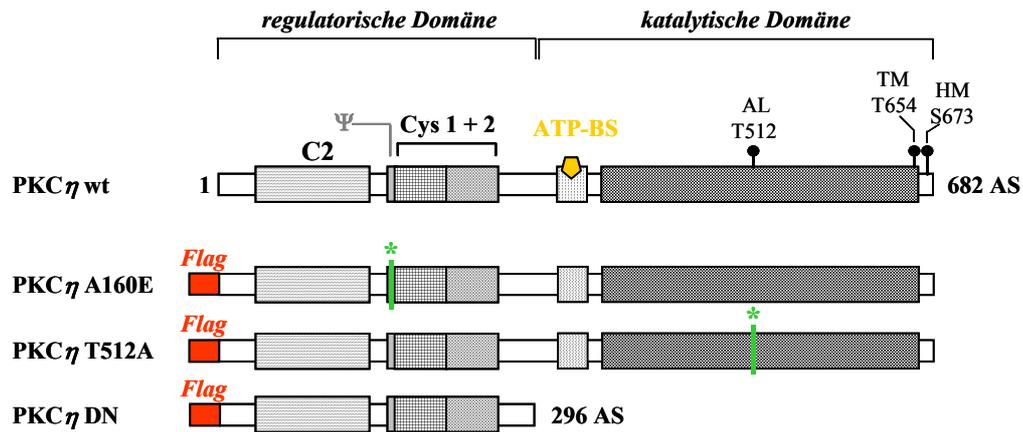


Abb. 16: Schematische Darstellung von PKC η und Mutagenese charakteristischer Motive. Der Aufbau der PKC Familie gliedert sich in eine regulatorische und katalytische Domäne. Die regulatorische Sequenz zeichnet sich durch eine Pseudosubstratregion, die konservierte C2-Region und die (für *novel* PKC) Cystein- reiche Zinkfingerdomäne zur Bindung von Lipidaktivatoren aus. Die katalytische Region enthält die ATP-Bindungsstelle sowie drei C-terminale Phosphorylierungsstellen: Aktivierungsloop (AL-T512); *Turn*-Motiv Autophosphorylierungsstelle (TM-T654) und hydrophoben Motiv (HM-S672); Zur Herstellung einer konstitutiv aktiven Mutante der humanen PKC η -Sequenz wurde Alanin (A160) in der Pseudosubstrat-Region Ψ (AS 154-166) durch Glutaminsäure ersetzt. Die Kinase-inaktive Mutante PKC η T512A wurde durch Austausch des Threonins der PDK-1-Phosphorylierungsstelle (T512) mit Alanin konstruiert, die dominant negative Mutante η DN durch Deletion des C-Terminus (ab AS 297). Aufgrund der zur Klonierung verwendeten Primer ergab sich am C-Terminus von η DN eine Verlängerung um folgende Sequenz: RYLELLHMHVHFGKFN. Zur besseren Unterscheidung zwischen endogener und rekombinanter PKC η wurden alle Mutanten N-terminal mit einem *Flag*-Epitop versehen: **MADYKDDDDKAKLRILQSTVPRARD** (Antikörper-Epitop ist fett gedruckt).

Abb. 16 zeigt die Struktur von PKC η mit den charakteristischen Motiven und Mutationen, die vorgenommen wurden, um die endogene PKC η -Aktivität zu verändern: Durch Mutagenese der Pseudosubstratregion bei Aminosäure (AS) 160 von Alanin zu Glutaminsäure wurde eine konstitutiv aktive Mutante hergestellt, PKC η A160E. Durch Belegung dieser Aminosäureposition 160 mit Alanin, einer nicht geladenen Aminosäure, besitzt das Pseudosubstratmotiv eine sehr hohe Affinität zur Substraterkennungsstelle in der katalytischen Tasche der Kinase. Durch Belegung dieser ungeladenen AS mit einer negativ geladenen (Glutaminsäure), verändert sich diese Affinität. Daraus resultiert eine verminderte intramolekulare Bindung der regulatorischen Domäne zur katalytischen Tasche, so daß diese Mutante in einer offenen Konformation vorliegt. Auch andere PKC-Isoenzyme wiesen durch ähnliche Mutationen an dieser Stelle eine konstitutive Aktivität unabhängig von Kofaktoren, wie PS, DAG oder TPA, auf (Baier-Bitterlich, 1996). Demgegenüber führte die Mutation der PDK-Phosphorylierungsstelle, Threonin 512 zu Alanin, innerhalb des sogenannten Aktivierungsloops zu einer katalytisch inaktiven Mutante PKC η T512A. Diese PKC-Mutante führt keine konformationellen Umlagerungen als Reaktion auf eine negative, geladene Phosphatgruppe mehr aus, da auch weitere konsekutive Phosphorylierungen, wie die Autophosphorylierung am C-Terminus der Kinase in Konsequenz der Mutation ausbleiben

(Dutil, 1998; Nüesch, unveröffentlichte Daten). Es folgt, daß eine Überexpression dieser mutierten Kinase PKC η T512A zumindest einen negativen Einfluß auf die endogene PKC η - Aktivität durch Substratkompetition haben sollte. Zusätzlich wurde eine dominant negative Mutante PKC η DN hergestellt. Die Überexpression der regulatorischen Domäne (AS 1 bis 296) hemmt die endogene PKC-Kinaseaktivität durch Blockieren der Substratbindungsdomäne, wie erst kürzlich für PKC λ gezeigt wurde (Nüesch, 2003). Mitunter kann es auch zu einer Hemmung anderer PKC-Isoformen kommen (Harrington, 2000), wobei das Polypeptid mit der darin enthaltenen Pseudosubstratregion das eigene Substraterkennungsmotiv mit höherer Spezifität und Affinität bindet, als das anderer Isoformen. Weil die künstlich überexprimierte regulatorische Domäne η DN nicht mit der endogenen Kinase verbunden ist, können durch die Kofaktorinteraktionen induzierte konformationelle Änderungen die Hemmung der wt-Kinase nicht aufheben. Die katalytische Domäne bleibt trotz Kofaktoren blockiert (Newton, 1997). Alle drei Mutanten wurden mit einem N-terminalen *Flag*-Epitop (MADYKDDDDDKA) versehen, um eine Unterscheidung der Mutanten von der endogenen PKC η zu gewährleisten. Die Konstrukte wurden in das pP38-Expressionsplasmid kloniert (siehe Anhang 6.1.2.), zusammen mit einem Neomycin-Resistenzplasmid pSV2neo in die Maus-Fibroblasten-Zelllinie A9 transfiziert und stabil transfizierte Zelllinien durch G418-Resistenz selektioniert (siehe Abb. 17).

Bevor die Plasmide für die Transfektion zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien eingesetzt werden konnten, sind sie auf ihre Richtigkeit hinsichtlich der Expression der PKC η - Mutanten durch *in vitro* Translation mit Retikulozytenlysate aus Kaninchen überprüft worden (2.2.5.11.). Die korrekte Länge der Translationsprodukte aller Mutanten η A160E, η T512A und η DN konnte so demonstriert werden (Abb. 18A; Spuren 3-5). Nachdem die stabil transfizierten Zelllinien selektioniert und mindestens dreimal passagiert worden waren, wurde die Expression der PKC η -Mutanten nun mittels Western Blotting untersucht. Dazu wurden für jede Zelllinie Lysate von mock, 24 oder 48 h infizierter Zellen (MOI 10) hergestellt und durch Frier-/Tauzyklen aufgeschlossen. Diese Lysate wurden anschließend im SDS-PAGE aufgetrennt und in Bezug auf ihre Expressionsmenge von η miteinander verglichen. Die Hauptbande der endogenen PKC η wurde bei einer Größe von etwa 176 kDa detektiert (Abb. 18 B; Spuren 1-3, siehe Pfeilmarkierung), obwohl derselbe Antikörper in anderen, vorwiegend humanen, Zelllinien PKC η mit einem Molekulargewicht von circa 80 kDa nachwies (nicht gezeigt). Das anormale Migrationsverhalten von endogener PKC η könnte durch eine posttranslationale Modifikation in Mauszellen begründet sein. (Kang, 2000) berichteten von einer ähnlich großen Form von PKC η in Baby-Hamster-Nieren-Zellen (BHK), allerdings durch Ubiquitinylierung in Gegenwart von Proteasom-Inhibitoren. In den Lysaten der murinen Zelllinien konnten für die Mutanten entgegen der Erwartung mit verschiedenen *Flag*-Antikörpern im Western Blot keine spezifischen Signale nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden selbige Analysen mit dem

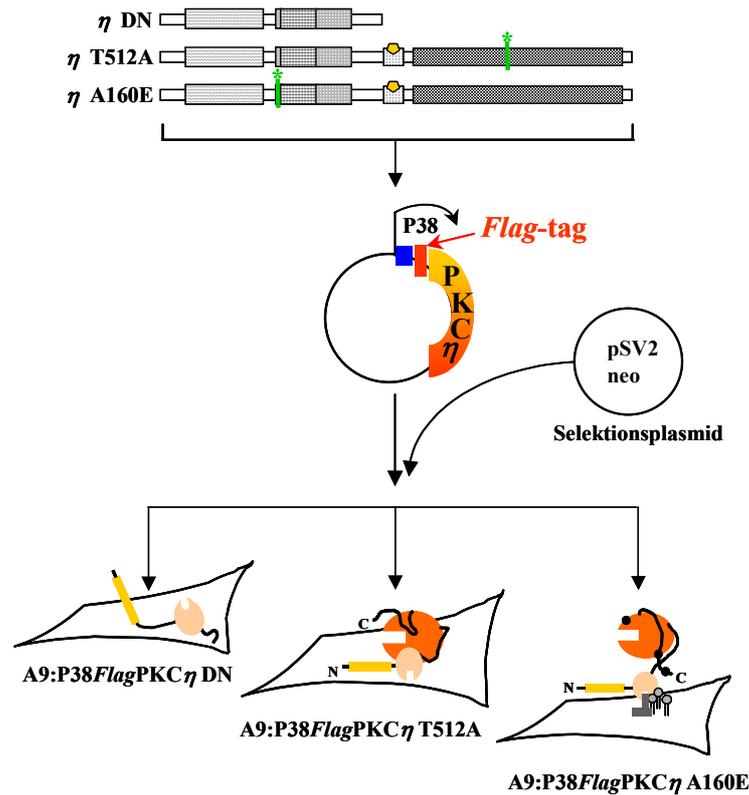


Abb. 17: Schema zur Herstellung von stabil transfizierten A9 Zellen, welche PKC η Mutanten exprimieren. Die für die PKC η Mutanten kodierenden Sequenzen wurden über *Bam*HI, *Nco*I bzw. *Bam*HI, *Xba*I Restriktionsverdau in ein Expressionsplasmid kloniert, das die PKC η Mutanten als Flag-Fusionsproteine unter Kontrolle des P38-Promoters enthält. Diese Plasmide wurden jeweils in einem Verhältnis von 25:1 mit dem pSV2neo Selektionsplasmid durch Lipofectamin kotransfiziert. Das Neomycinresistenzgen in pSV2neo ermöglicht in Gegenwart von G418 Medium die Selektion von Zellen, die dieses Plasmid aufgenommen haben. Durch den molaren Überschuss der PKC η Expressionsplasmide, ist es sehr wahrscheinlich, daß die Neomycin-resistenten Zellen auch die PKC η -kodierenden Plasmide aufgenommen haben. Resistente Zellkolonien wurden in Zellkultur vermehrt, gepoolt und auf die Produktion der Flag-PKC η Konstrukte untersucht.

polyklonalen Kaninchenantikörper α -PKC η durchgeführt, der bereits zum Nachweis der wt-Kinase verwendet worden war (Abb. 18 B). Da jedoch die rekombinanten humanen PKC η -Mutanten PKC η A160E und PKC η T512A im Gegensatz zur endogenen Kinase ein Migrationsverhalten entsprechend des berechneten Molekulargewichts von circa 80 kDa aufwiesen (Abb. 18; Spuren 4-9), konnte dennoch zwischen endo- und exogenen Polypeptiden unterschieden werden. Wie aus Abb. 18 deutlich zu erkennen ist, wiesen beide Zelllinien bereits im nicht induzierten Zustand ein hohes Expressionsniveau unter dem P38-Promotor auf. Nach Infektion wurde dann eine fünffache (η A160E) bzw. eine doppelte Steigerung (η T512A) des rekombinanten Proteins erreicht. Da das polyklonale α -PKC η -Antiserum gegen den C-Terminus der Kinase gerichtet ist, konnte PKC η DN im Western Blot nicht detektiert werden (Abb. 18; Spuren 10-12). Bemerkenswert ist aber, daß in beiden Kinase-negativen Zelllinien A9:P38-PKC η T512A und A9:P38-PKC η DN weniger endogene PKC η vorzuliegen scheint, was möglicherweise durch eine verminderte Halbwertszeit verursacht wird (vergleiche Spuren 1-3 mit 7-12, obere Bande).

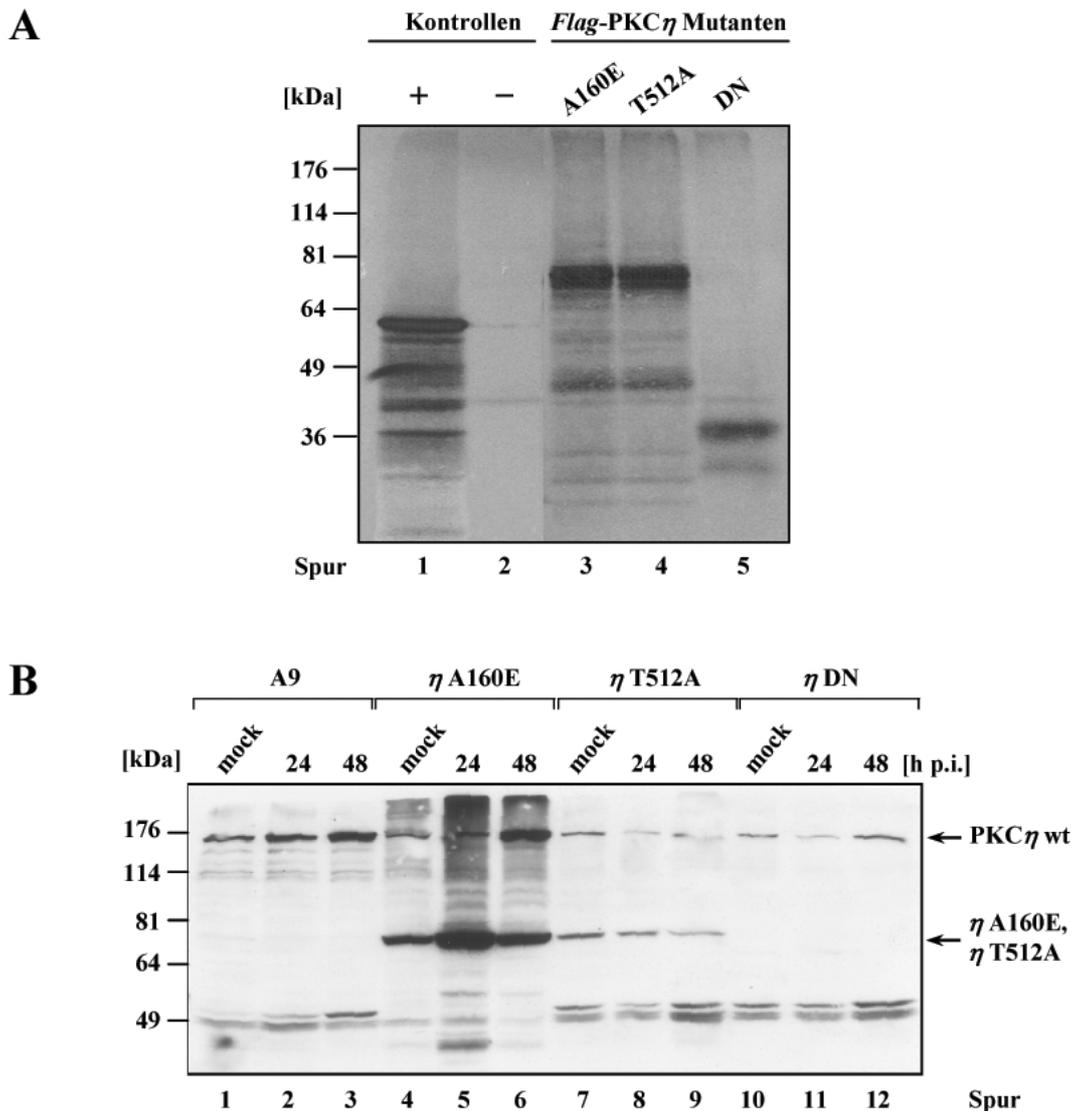


Abb. 18: Expressionsnachweis von PKC η Mutanten. **A) *in vitro* Translation.** pCR2.1 Plasmide mit kodierenden Sequenzen der PKC η Mutanten in der richtigen Orientierung wurden 1 h bei 30 °C mit Retikulozytenlysat, [³⁵S] markierten Methionin/Cystein sowie T7-RNA-Polymerase inkubiert (TNT-Kit, Promega). Reaktionsprodukte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch analysiert: Spur 1) Positivkontrolle: Luciferase-Reportergen; 2) Negativkontrolle: keine Plasmidzugabe; 3) PKC η A160E; 4) PKC η T512A; 5) PKC η DN. **B) Western Blot Analyse von A9 und transfizierten η Zelllinien.** 24 und 48 h nach MVM- (MOI 10) oder mock- Infektion wurden Zellysate hergestellt, über 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis von PKC η erfolgte durch einen polyklonalen Antikörper. Migrationsbanden der posttranslational modifizierten endogenen PKC η wt sowie der rekombinanten PKC η (80 kDa) sind markiert (Pfeile). Spuren 1-3) A9; 4-6) A9:P38-PKC η A160E; 7-9) A9:P38-PKC η T512A; 10-12) A9:P38-PKC η DN.

Zur weiteren Charakterisierung sollten die Zelllinien nach ihrer P38-induzierbaren Expression der PKC η -Varianten im Vergleich zu den parentalen A9-Zellen auch auf Einzelzellebene untersucht werden. Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie (2.2.5.7.) erlaubte neben der Bestimmung der Expressionsmenge der Transgenprodukte einzelner Zellen zusätzlich einen Vergleich der subzellulären Verteilung von PKC η A160E, PKC η DN und PKC η T512A mit der endogenen Kinase. Dazu wurden die Zellen auf Objektträgern ausgesät, mit 20 pfu/Zelle MVMp infiziert und 24 bzw. 48 h nach Infektion mit 3 % Paraformaldehyd fixiert. Endogene PKC η wurde durch ein polyklonales Kaninchenserum und einen CY3- konjugierten Sekundärantikörper detektiert, während NS1 durch einen monoklonalen Mausantikörper (3D9) und CY2- gelabeltes α -Mausserum nachgewiesen wurde (Abb. 19; Spalte C). Wie in Abb. 19; 1A) für die endogene Kinase gezeigt, ist PKC η in nicht infizierten A9-Zellen im gesamten Zytoplasma verteilt, vermutlich assoziiert zu Zytoskelettfilamenten. Nach MVM-Infektion zeigt ein großer Teil der NS1-exprimierenden Zellen (50-60%) eine andere Verteilung. Obwohl PKC η nach wie vor zytoplasmatisch und Filament-gebunden vorliegt, scheint eine signifikante Akkumulation von η um die nukleäre Membran stattzufinden (Abb. 19; 1 B,D). In Übereinstimmung mit aktuellen Modellen der PKC-Aktivierungskaskade weist eine derartige Umverteilung einer PKC-Isoform auf einen Aktivierungsprozess hin (Newton, 1997).

Die rekombinanten PKC η Varianten konnten in der Immunfluoreszenz durch Verwendung eines monoklonalen *Flag*-Antikörpers (α M2) und eines spezifischen Zweitantikörpers leicht von der endogenen Kinase unterschieden werden. Hier zeigte der *Flag*-Antikörper anders als im Western Blot spezifische Signale, die eindeutig auf die Expression der η -Mutanten zurückzuführen waren. Sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten A9-Zellen war die konstitutiv aktive PKC η A160E gleichmäßig im Zytoplasma verteilt (Abb. 19; 2 A,B,D). Wenngleich die Mehrzahl einer Zellpopulation das Transgen in nur geringen, gerade noch detektierbaren Mengen exprimierte, zeigten ca. 10% der Zellen eine starke Anreicherung der Kinase nach MVM-Infektion. In diesen Zellen war neben dem Zytosol eine deutliche Akkumulation der Kinase an der Plasmamembran erkennbar (Abb. 19; 2 B,D). Auffällig war eine ungewöhnliche Gestaltsänderung dieser PKC η A160E-überexprimierenden Zellen. Sie zeigten eine bemerkenswert erhöhte Anzahl langer zellulärer Fortsätze, ähnlich den Verästelungen eines Baumes. Desweiteren wiesen derartige Zellen oft einen markant geschrumpften Zellkörper um den Nukleus auf.

Die katalytisch inaktive Mutante PKC η T512A wurde in vergleichbarer Menge zu η A160E durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Ähnlich der endogenen PKC η blieb diese Mutante überwiegend zytoplasmatisch (Abb. 19; 3A,B,D). Interessanterweise gab es, trotz der eher homogenen Verteilung, eine signifikante Anzahl Zellen, die darüber hinaus eine Anreicherung der Mutante in bestimmten Membranstrukturen, sogenannten *ruffles* zeigte.

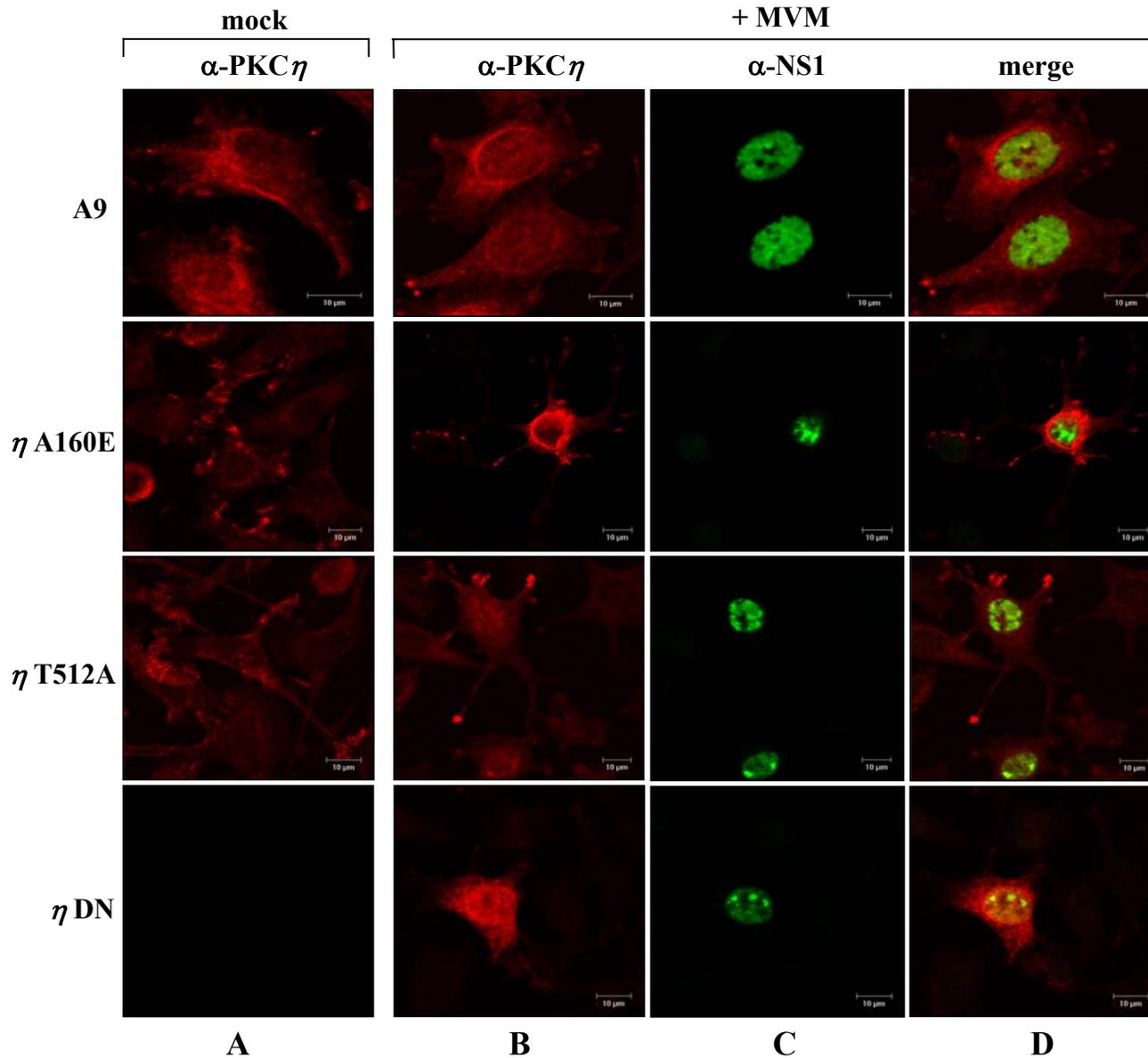


Abb. 19: Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie von endogener PKC η und Flag-markierten PKC η Mutanten.

- A9 Zellen oder Derivate davon wurden auf Objektträgern kultiviert, infiziert oder nicht mit MVM (MOI 20) und 44 h p.i. mit 3 % p-Formaldehyd fixiert. Endogene PKC η wurde mit einem spezifischen polyklonalen Antiserum, die PKC η Mutanten mit monoklonalen Antikörpern gegen das Flag-Epitop nachgewiesen. Die Detektion von PKC η erfolgte mit CY3-konjugierten Spezies-spezifischen Zweitantikörpern (rot). NS1 (grün) wurde entweder durch einen monoklonalen Mausantikörper (3D9) oder polyklonales Kaninchenserum (Sp8) und FITC-gelabelten Zweitantikörpern detektiert. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica TCS SP Mikroskop, Ölimmersionsobjektiv 63x, FITC, TRITC Filtereinstellungen und einem *pinhole* von 1 erstellt.
-
-
-

Dieses Phänomen war sogar in nicht infizierten Zellen bei geringem Expressionsniveau ersichtlich (Abb. 19; 3A). Im Gegensatz zu den Volllänge-Polypeptiden wurde die dominant negative PKC η DN nur schwach exprimiert und ließ sich deshalb auch nach Induktion des parvoviralen P38-Promotors nur in circa 10 % der Zellen nachweisen (Abb. 19; 4B,D). Es ist davon auszugehen, daß η DN wahrscheinlich eine toxische Wirkung auf die Zelle ausübt und daher in nur geringen Mengen toleriert wird. In nicht infizierten Zellen konnte die Mutante durch Immunfluoreszenz gar nicht nachgewiesen werden (Abb. 19; 4A). Vermutlich wegen seiner geringen Größe (40 kDa) konnte das Peptid in den Nukleus diffundieren und war besonders innerhalb der nukleären Membran angereichert. Diese A9-Zelllinie zeigte eine leicht kleinere Zellmorphologie als die parentalen A9, erschien rundlicher und besaß eine geringfügig verlangsamte Wachstumsrate.

Zusätzlich zur Charakterisierung bezüglich der Mutanten-Expression und -Lokalisation wurden die PKC η -Mutanten-Zelllinien auch auf ihre Infizierbarkeit durch MVM getestet. Neben der Virusaufnahme, d.h. der Präsenz der infizierenden Kapside im Zytoplasma, wurde die Etablierung der Infektion auch durch das Vorhandensein von NS1 untersucht. Die Translation von NS1 kann erst erfolgen, nachdem die virale DNA in den Nukleus der Wirtszelle geschleust wurde und eine Konversion des einzelsträngigen viralen Genoms in eine doppelsträngige Form stattgefunden hat, die dann als Matrize für die Transkription der NS1 mRNA dient. In diesem Sinne kann eine NS1-exprimierende Zelle als erfolgreich infiziert betrachtet werden. Die Expression der konstitutiv aktiven PKC η A160E hatte keinen Einfluß auf die Infizierbarkeit durch MVMp. Bereits nach 30 min konnte hier dieselbe Menge an aufgenommenen MVM-Kapsiden wie in der parentalen A9-Zelllinie in einem Zeitkurvenexperiment durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu bewirkte das Ausschalten der PKC η -Aktivität durch die Mutanten PKC η DN oder PKC η T512A eine verzögerte Virusaufnahme (Daten nicht gezeigt). 5 h nach Infektion mit derselben hohen Multiplizität pro Zelle wie bei Infektion der A9 oder η A160E Zelllinie (100 pfu/Zelle) wurden nur 50 % der Zellpopulation beider Zelllinien infiziert, d. h. es konnten Kapside im Zytoplasma nachgewiesen werden. Darüber hinaus war die Menge an aufgenommenem Virus pro Zelle ebenfalls reduziert. Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß bei Berücksichtigung der verzögerten/ verminderten Virusaufnahme, diese PKC η -Isoenzym-Mutanten-exprimierenden Zelllinien trotzdem wertvolle Werkzeuge darstellen, um den Einfluß von η auf die MVM-Replikation und Infektion allgemein *in vivo* zu untersuchen. Um signifikante Vergleiche mit der parentalen A9-Zelllinie durchzuführen, wurden für die Experimente Zellpopulationen ausgewählt, die unter den beschriebenen Bedingungen am besten mit MVM infizierbar waren.

3.1.2.2. NS1-Phosphorylierung durch PKC η

Die stimulierte Replikationsaktivität von NS1^O durch PKC η *in vitro* (Kapitel 3.1.1) gab bereits Hinweise darauf, daß NS1 ein direktes Substrat für eine PKC η -Phosphorylierung sein könnte. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, sollte zuerst untersucht werden, ob PKC η in der Lage ist, NS1^O *in vitro* zu phosphorylieren und wenn ja, ob NS1 auch *in vivo* ein Substrat für diese Kinase sein kann. Aus diesem Grund wurde eine *in vitro* Phosphorylierung (2.2.5.16.) von dephosphoryliertem NS1^O für 30 min bei 37 °C in Anwesenheit der PKC-Aktivatoren PS und TPA, γ -[³²P]ATP sowie rekombinanter PKC η durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde dieselbe Reaktion mit rekombinanter PKC ζ durchgeführt, die auch mittels Vaccinia Virus Expression in HeLa-Zellen gewonnen wurde (Dettwiler, 1999). Nach Beendigung der Reaktion wurde das ³²P-markierte NS1-Protein mit α -NS1_H immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE analysiert. Obwohl die radioaktive Markierung von NS1 durch PKC η wesentlich schwächer war als durch PKC ζ (Abb 20 A; Spuren 1-3), wurde deutlich, daß NS1^O ein Zielsubstrat für PKC η *in vitro* darstellt und bestätigt damit, daß die Aktivierung von NS1^O für die zirkuläre Replikation direkt durch eine PKC η -Phosphorylierung erreicht werden kann.

Ob PKC η auch in der zellulären Umgebung einen Einfluß auf die NS1-Phosphorylierung ausübt, wurde durch metabolisches Markieren mit [³²P] ortho-Phosphat (2.2.3.5.) von NS1 in Anwesenheit der PKC η DN-Mutante, d. h. unter verminderter PKC η -Aktivität, überprüft. Bei diesem Experiment wurde sowohl die Stärke der radioaktiven Markierung als auch das tryptische Phosphopeptid-Muster in Anwesenheit von PKC η DN mit der genuine Phosphorylierung in A9-Zellen während der replikativen Phase miteinander verglichen. Subkonfluente A9 oder A9:P38-PKC η DN Zellen wurden mit 30 pfu/Zelle MVMp infiziert und nach 24 h Inkubation für 4 h mit ortho-Phosphat markiert. Nach Zellaufschluß wurde NS1 mittels Immunpräzipitation mit einem gegen das aminoternale Peptid von NS1- und NS2- gerichteten α -NS1_N Antikörper isoliert und durch SDS-PAGE analysiert. Abb. 20 zeigt (Spuren 4-8), daß 28 h nach Infektion etwa 20 mal weniger phosphoryliertes NS1 in der A9:P38-PKC η DN Zelllinie akkumulierte als in A9-Zellen. Somit scheint NS1 auch *in vivo* ein Zielsubstrat von PKC η zu sein. Bislang ist jedoch nicht belegt, daß auch spezifische Aminosäurepositionen phosphoryliert werden. Aufschluß darüber kann eine zweidimensionale Analyse des durch Immunpräzipitation gewonnenen, ³²P-markierten und anschließend tryptisch verdauten NS1 Proteins geben. Die Anzahl an Phosphopeptiden sowie ihr spezifisches Auftrennungsmuster ergeben sozusagen einen Fingerabdruck des zu untersuchenden Proteins.

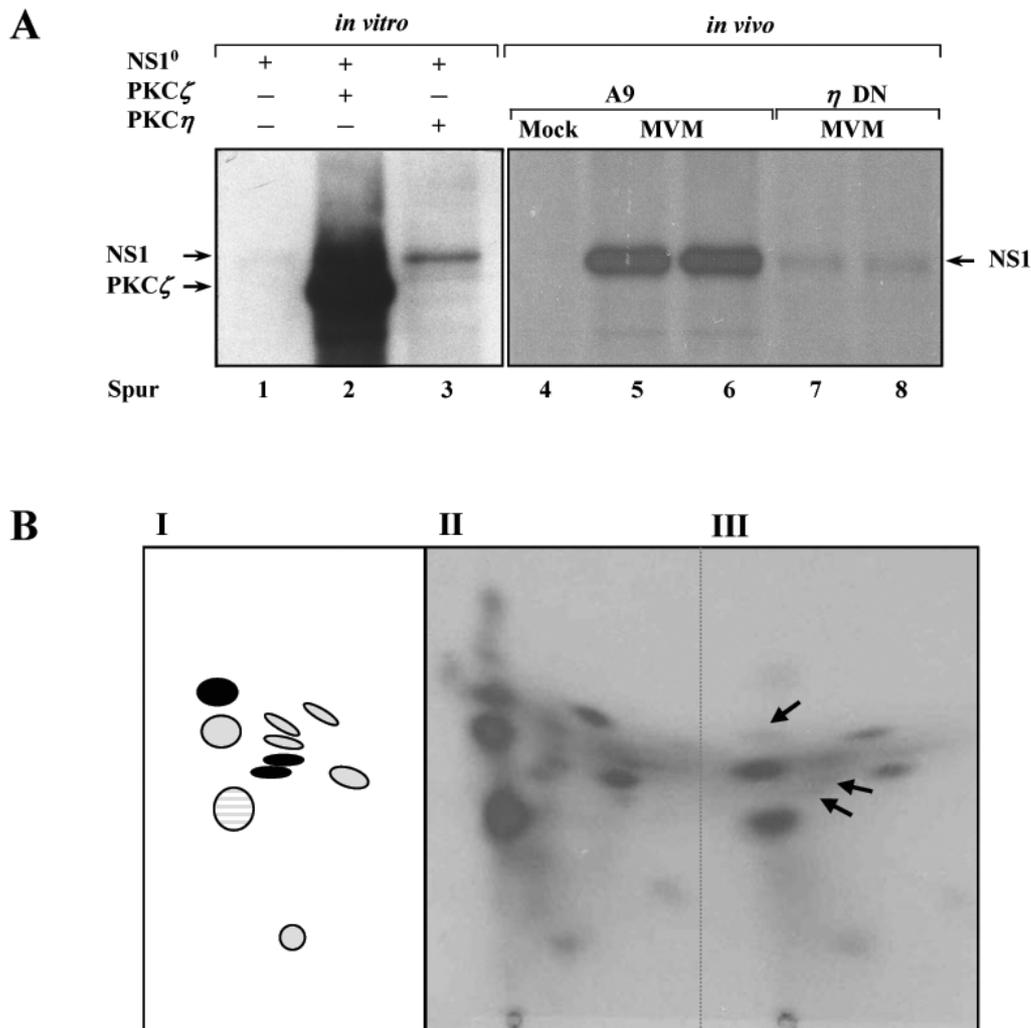


Abb. 20: Phosphorylierung von NS1 durch PKC η *in vitro* und *in vivo*. **A) 1D-Analyse.** NS1⁰ wurde zur *in vitro* Phosphorylierung allein (Spur 1), zusammen mit PKC ζ (2) oder PKC η (3) in Anwesenheit von [γ -³²P] ATP sowie der PKC Aktivatoren TPA und PS für 30 min bei 37 °C inkubiert. Für *in vivo* Phosphorylierungen wurden A9 oder A9:P38-PKC η DN mit mock (4) oder MVMp (MOI 30) 24 h infiziert (5-8) und danach für 4 h mit [³²P] ortho-Phosphat markiert und geerntet. [³²P]-markiertes NS1 wurde immunpräzipitiert, durch 10 % SDS-PAGE aufgereinigt und auf PVDF Membranen transferiert. Die Migration von NS1 und kopräzipitiertem, autophosphoryliertem PKC ζ ist gekennzeichnet (Pfeile). **B) 2D-Tryptische Phosphopeptid-Analyse von [³²P]-markiertem NS1.** **I**, schematische Darstellung eines repräsentativen NS1 Phosphorylierungsmuster während der replikativen Phase einer Infektion in A9, das in **II** gezeigt ist. Das bereits identifizierte Phosphopeptid welches durch PKC λ Phosphorylierung entsteht (phosphorylierte Reste: T435, S473), ist grau gestreift hervorgehoben, die in Gegenwart von η DN fehlenden Spots sind im Schema schwarz und in **III** mit Pfeilen gekennzeichnet, die übrigen Phosphopeptide sind grau dargestellt.

In Abb. 20 (B) ist die schematische Darstellung des charakteristischen Phosphorylierungsmusters von NS1 in der replikativen Phase der Infektion wiedergegeben. Zum besseren Verständnis soll die angewandte Methodik nachfolgend kurz erläutert werden (siehe auch Material & Methoden 2.2.5.17.). Phosphoryliertes NS1 wurde nach Immunpräzipitation, Auftrennung im SDS-PAGE und Transfer auf PVDF-Membran als Bande ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Die daraus resultierenden Phosphopeptide wurden anschließend nach Größe und Ladung mittels Elektrophorese auf Dünnschichtplatten aufgetrennt. Abschließend erfolgte ein weiterer Chromatographieschritt, indem die Phosphopeptide nun nach ihrem Lösungsverhalten in einem Butanol/Pyridin/Eisessig-Gemisch in einer zweiten Dimension voneinander separiert wurden. Das nach der oben beschriebenen Methode erzielte radioaktive Auftrennungsmuster des in der A9:P38-PKC η DN-Zelllinie produzierten NS1 zeigt im Vergleich zu dem der Parentalzelllinie nur wenige, wenngleich bedeutende Unterschiede (Abb. 20 B/I-III). In Anwesenheit von PKC η DN sind drei Phosphopeptide kaum markiert oder gar nicht vertreten (Abb. 20 B/III, siehe Pfeile), während die Mehrzahl der Peptide aus A9, mit inbegriffen die PKC λ -Phosphorylierungsstellen, problemlos identifiziert werden konnten, allerdings in etwas verminderter Intensität. Aus diesem Ergebnis läßt sich schlußfolgern, daß PKC η die Phosphorylierung von NS1 in A9-Zellen beeinflusst und möglicherweise eine regulatorische Komponente für NS1-Funktionen darstellt.

3.1.2.3. Inaktive PKC η -Mutanten blockieren die MVM-DNA-Replikation

Experimente in einem Kinase-freien *in vitro* Replikationssystem belegten (Kapitel 3.1.1), daß PKC η essentiell ist, um dephosphoryliertes NS1^O für RCR zu aktivieren. Um eine mögliche funktionelle Relevanz der NS1-Phosphorylierung durch PKC η *in vivo* in der Zelle nachzuweisen, ähnlich wie es bereits detailliert für PKC λ gelang (Nüesch, 1998b; Dettwiler, 1999), sollte die MVM DNA-Replikation in A9-Zellen in Gegenwart der induzierbaren PKC η -Mutanten untersucht werden, d.h. in Abhängigkeit der modifizierten endogenen η -Aktivität. Zu diesem Zweck wurden A9-Zellen oder die PKC η Derivate A9:P38-PKC η A160E, A9:P38-PKC η T512A, A9:P38-PKC η DN mit 10 pfu/Zelle MVMp infiziert und die virale DNA-Amplifikation zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion analysiert. In Abb. 21 ist gezeigt, daß beide Zelllinien, die parentale A9 und A9:P38-PKC η A160E, eine effiziente Produktion aller replikativen Intermediärformen, der monomeren RF, der dimeren RF sowie auch der ss Virion-DNA in vergleichbaren Mengen zu den angegebenen Zeitpunkten erlaubten. Im Gegensatz dazu zeigte weder die Zelllinie A9:P38-PKC η T512A noch A9:P38-PKC η DN eine vergleichbare DNA-Amplifikation. Eine Infektion dieser Zellen mit verminderter PKC η -Aktivität führte zu einer deutlich verzögerten viralen DNA-Replikation und mehr noch, zu signifikant geringeren Mengen insbesondere der konkatemeren replikativen dimeren Intermediär-Form sowie der Nachkommen-Virion DNA.

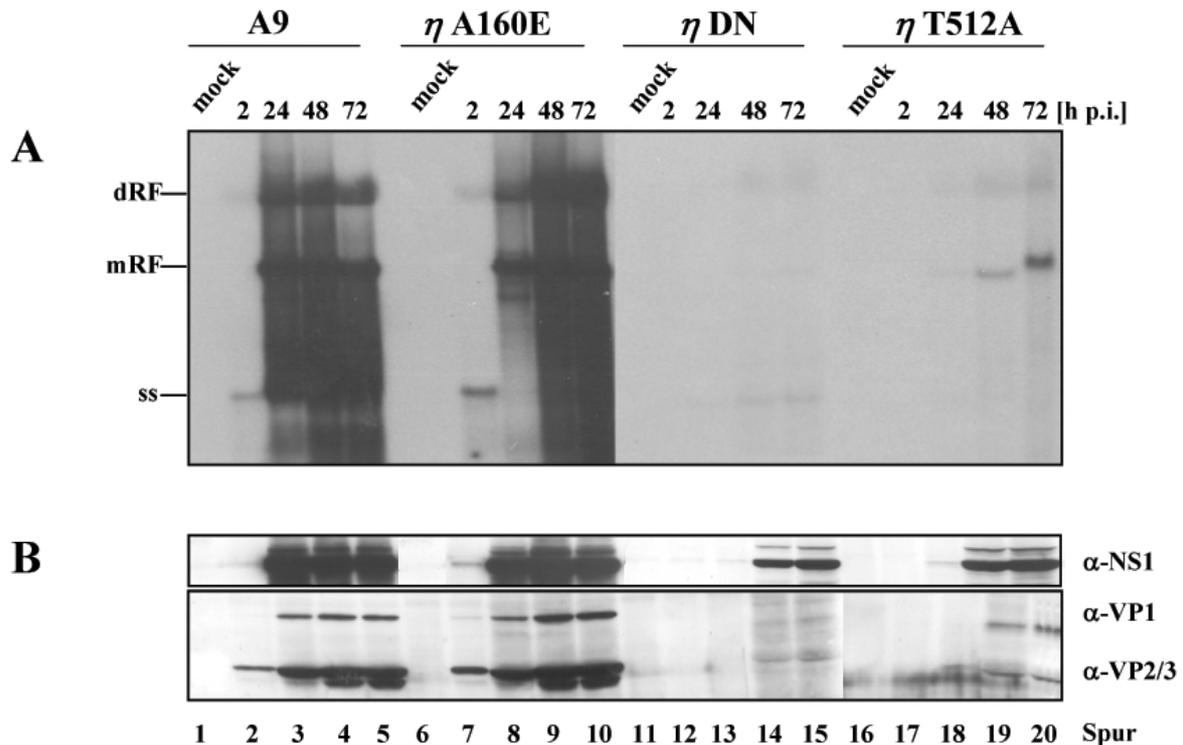


Abb. 21: MVM DNA Replikation in A9 und PKC η Mutanten-Zelllinien. A) Southern Blot Analyse. Je 5×10^5 A9 Zellen, A9:P38 η A160E, A9:P38 η DN und A9:P38 η T512A wurden in 6 cm Schalen ausgesät, mock- oder MVM- (MOI 10) infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Gesamtzell-DNA isoliert. Die virale DNA wurde auf 0.8 % Agarosegelen separiert, auf Nylonmembranen geblottet und mit einer [32 P]-markierten Sonde nachgewiesen, welche das *EcoRV*-*BstEII* Fragment der NS1 kodierenden Sequenz repräsentiert. Spuren 1-5: A9; 6-10: η A160E; 11-15: η DN; 16-20: η T512A. mRF: monomere replikative Intermediärform, dRF: dimere replikative Intermediärform, ss: einzelsträngige-Virion DNA. **B) Western Blot Analyse.** Parallel zum Replikationsnachweis wurden zu allen Zeitpunkten Proteinextrakte hergestellt. Die Menge der synthetisierten NS1 und Kapsidproteine wurde durch SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulose mittels spezifischer Kaninchenantiseren (α -Sp8; α -N-VP[H1]) nachgewiesen.

Letztere war auch 72 h nach Infektion nicht detektierbar. Obgleich diese beiden Zelllinien weniger Virus aufnehmen, ist es unwahrscheinlich, daß es sich hierbei um den einzigen Grund für die beobachtete reduzierte Replikationskapazität und den verspäteten Beginn der MVM-Replikation handelt, sondern vielmehr um eine direkte Defizienz in der viralen DNA-Amplifikation. Interessanterweise führt die verminderte Replikation durch den Mangel an Transkriptionsvorlagen auch zu einer drastisch reduzierten Menge an NS1 in Anwesenheit von PKC η DN oder PKC η T512A, was die dramatischen Differenzen in den Zelllinien mit reduzierter PKC η -Aktivität durch einen Rückkopplungsmechanismus erklärt. In Konsequenz daraus ist neben NS1 auch die Menge an Kapsidproteinen erniedrigt (Abb. 21 B).

Sowohl um diese Annahme zu unterstützen, als auch um auszuschließen, daß die verminderte DNA-Amplifikation lediglich auf eine geringere Anzahl infizierter Zellen zurückzuführen ist, sollte die DNA-Amplifikation auch auf Einzelzellebene untersucht werden (Abb. 22). Zu diesem Zweck wurden A9, A9:P38-PKC η A160E, A9:P38-PKC η T512A oder A9:P38-PKC η DN Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit MVMp infiziert (MOI 50). 24 bzw. 48 h nach Infektion wurde das Kulturmedium durch 100 nM Bromodeoxyuridin (BrdU) enthaltendes Medium ausgetauscht, und um eine Inkorporation des Nukleotids in replizierende DNA zu erlauben, 25 min bei 37°C inkubiert (Methode 2.2.3.6.). Die Zellen wurden anschließend mit 3 % p-Formaldehyd fixiert und mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung des monoklonalen α -BrdU-Antikörpers sowie eines polyklonalen α -NS1-Antikörpers analysiert.

Ohne HCl-Behandlung dient die BrdU-Inkorporation lediglich zur Detektion der viralen replikativen Formen und Einzelstrang-DNA (Veronese, 1989; Asai, 1990). Die chromosomale DNA-Replikation ist unter diesen Bedingungen nicht detektierbar. NS1-positive Zellen wurden gezählt und hinsichtlich des Vorhandenseins eines BrdU-Inkorporationssignals untersucht. Weil die Intensitäten des durch einen CY3-konjugierten Antikörper gefärbten BrdUs eine große Varianz aufwiesen, wurde beim Auszählen der BrdU-positiven Zellen zwischen einem starken und einem schwachen Signal unterschieden (Abb. 23 siehe Markierung durch Dreiecke). Während ein hoher Prozentsatz aller NS1-exprimierenden Zellen von A9 oder A9:P38-PKC η A160E ein starkes BrdU-Signal zeigten, wurden nur wenige BrdU-positive Zellen der A9:P38-PKC η DN oder A9:P38-PKC η T512A Zelllinien gezählt. Demzufolge ist nicht mehr als ein kleiner Prozentsatz an NS1-exprimierenden Zellen in der Lage, in Gegenwart von katalytisch-inaktiver PKC η virale DNA erfolgreich zu replizieren. Repräsentative Ergebnisse einer Quantifizierung der BrdU-Inkorporation sind im Diagramm (Abb. 23) zusammengefaßt.

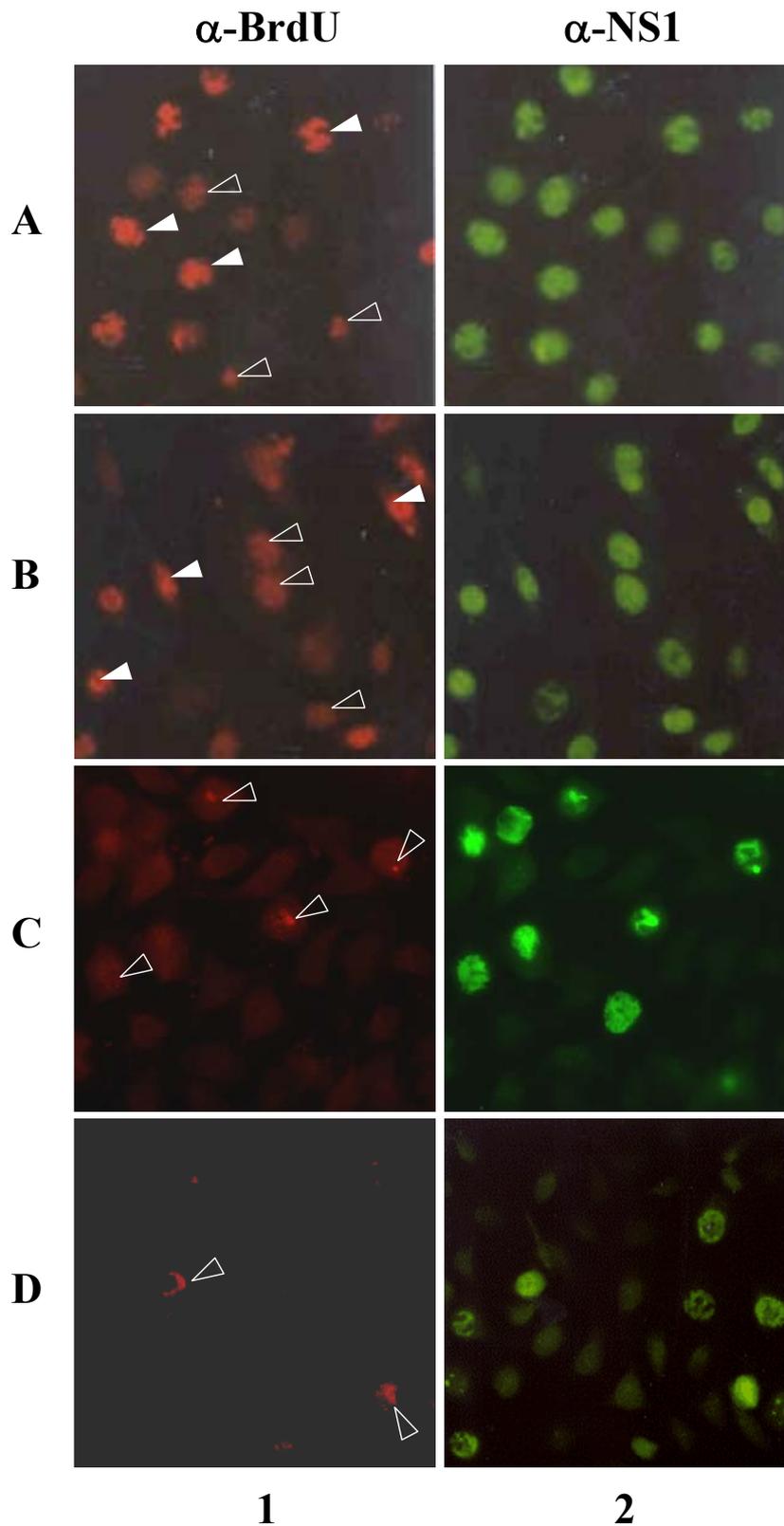
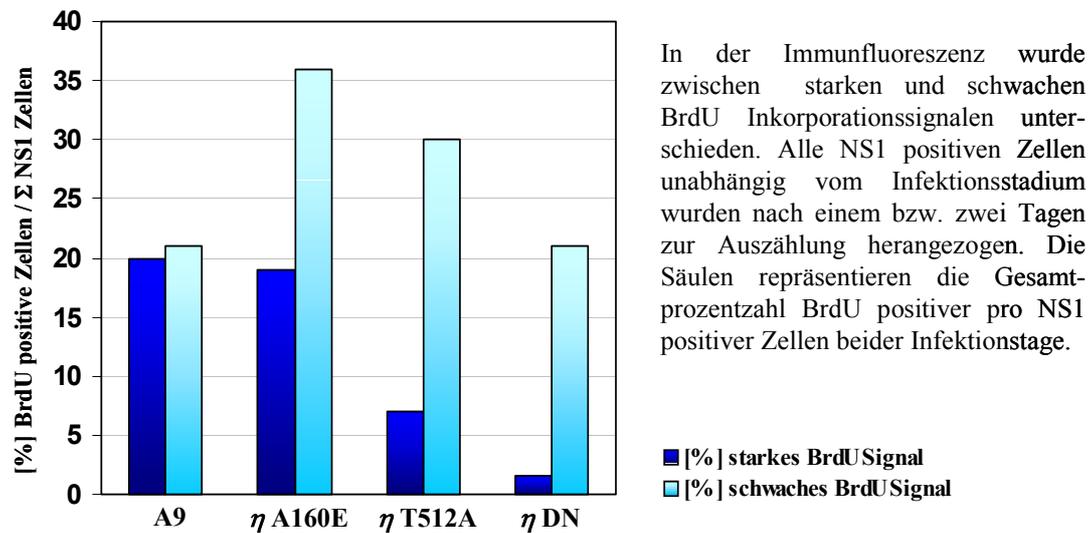


Abb. 22: Detektion viraler DNA Synthese auf Einzelzellebene mittels Immunfluoreszenz. A9 Zellen (A) oder deren Derivate A9:P38 η A160E (B), A9:P38 η T512A (C), A9:P38 η DN (D) wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit MVM (MOI 50) infiziert und 24 h p.i. mit 10 μ M BrdU für 25 min inkubiert. Nach Fixierung mit 3 % p-Formaldehyd wurden (1) inkorporiertes BrdU (rot) durch einen monoklonalen α -BrdU Antikörper, (2) NS1 (grün) durch ein polyklonales Antiserum (Sp8) detektiert. In diesem Experiment wurde zwischen schwachen (offene Dreiecke) und starken BrdU Signalen (ausgefüllte Dreiecke) unterschieden. Die Aufnahmen wurden mit dem Leica Leitz DMRD Mikroskop, 63x Ölimmersionsobjektiv erstellt.

Abb. 23: Quantitative Auswertung der viralen DNA-Syntheserate auf Einzelzellebene.



Mit diesem Experiment, das nur NS1-produzierende Zellen, d.h. Zellen mit einer etablierten Infektion berücksichtigt, ist belegt, daß der negative Einfluß der A9:P38-PKC η DN und A9:P38-PKC η T512A Zelllinien auf den Viruseintritt in die Zelle nicht für die mangelnde DNA-Replikation verantwortlich gemacht werden kann. Zusammen mit den Ergebnissen der Southern Blot Analysen, unterstützen diese Daten eine funktionelle Rolle von PKC η in der Regulation von NS1 für die virale DNA-Amplifikation. Mit dem Wissen, daß PKC η in der Lage ist, spezifische NS1-Phosphorylierungen *in vivo* zu induzieren und dephosphoryliertes NS1⁰ durch *in vitro* Phosphorylierung für die zirkuläre Replikation zu aktivieren, kann vermutet werden, daß diese Kinase eine Regulatorfunktion für NS1-Aktivitäten während eines viralen Infektionszyklus übernimmt.

3.2. Regulation von PKC η

Die Isoenzyme der PKC-Familie liegen in der Zelle in verschiedenen Aktivitätszuständen vor, ausgehend von einer inaktiven, über eine partiell aktive bis hin zur vollständig aktivierten Kinase. Die Aktivierung (siehe Kapitel 1.2.3.) der PKC wird mit der Phosphorylierung der katalytischen Domäne im Aktivierungsloop durch PDK-1 eingeleitet. Die negative Ladung verursacht eine konformationelle Umfaltung bei der die zuvor inaktive Kinase von ihrer halboffenen in eine geschlossene Konformation übergeht. Es kommt nachfolgend zu einer Autophosphorylierung am *Turn*-Motiv der *novel* und atypischen PKC und für erstere zu einer weiteren Phosphorylierung am hydrophoben Motiv. Im phosphorylierten Zustand besitzen die PKC nur eine geringe Grundaktivität, ihre vollständige Aktivität erlangen sie erst nach Ligandenbindung durch die regulatorische Domäne und erneuter Umfaltung der Kinase zu einer offenen Konformation. Wie aus der mehrstufigen Aktivierungskaskade (Abb. 24) ersichtlich ist, resultieren die Konformationsänderungen der PKC in einem veränderten Löslichkeitsverhalten. Die einzelnen Isoformen differieren in ihrem Wirkungsbereich, weshalb erwartungsgemäß auch Unterschiede hinsichtlich ihrer Löslichkeit im aktiven

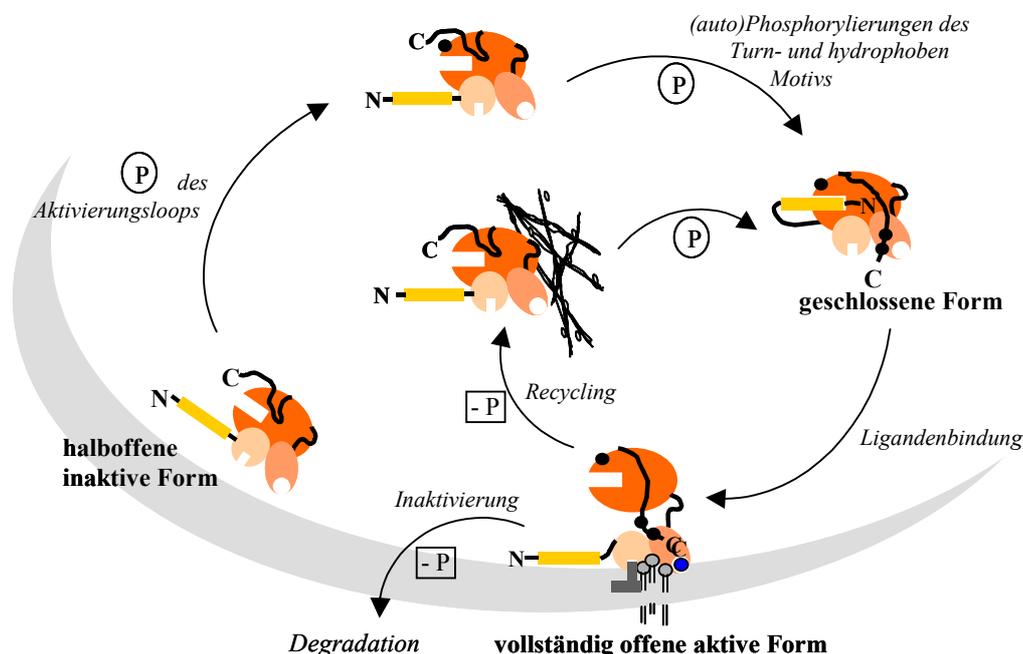


Abb. 24: Schematische Darstellung der Aktivierungskaskade für konventionelle und novel PKC. Inaktive PKC Isoenzyme liegen in der Zelle in einer halboffenen Konformation vor und weisen häufig eine schwache Membranassoziation auf. Im ersten Aktivierungsschritt erfolgt die Phosphorylierung des Aktivierungsloops durch PDK-1. Das bringt eine Umfaltung von der halboffenen zur geschlossenen Konformation der Kinase mit sich und löst (auto)Phosphorylierung(en) am Turn- und hydrophoben-Motiv des C-Terminus aus. Die Kinase liegt nun in ihrer vollständig phosphorylierten Form löslich vor und kann zu Stimulationsorten innerhalb der Zelle translozieren. Ligandenbindung löst eine vollständige Öffnung der Konformation aus und vermittelt eine starke Membranverankerung. Durch Dephosphorylierung werden PKC entweder auf ihre Degradation vorbereitet oder aber recycled, indem sie durch Hsp70 Bindung stabilisiert und erneut phosphoryliert werden können.

Zustand auftreten. Die meisten PKC-Isoformen liegen im aktiven Zustand membranassoziiert und damit unlöslich vor (Nixon, 1999). Somit kann festgehalten werden, daß Aktivierung eine Löslichkeitsveränderung der PKC-Isoform verursacht, eine Eigenschaft, die für nachfolgende Analysen genutzt wurde.

3.2.1. Ermittlung des Aktivitätszustandes von PKC-Isoformen

3.2.1.1. Änderung des Löslichkeitsverhaltens nach MVM-Infektion

Zur Ermittlung des Aktivitätszustandes von PKC-Isoformen in A9-Zellen und einer potentiellen Beeinflussung durch die MVM-Infektion wurde eine Löslichkeitsfraktionierung etabliert (2.2.5.6.). Dabei werden durch Verwendung amphoterischer und ionischer Detergenzien je nach Bindungsstärke schrittweise Membran- und Zytoskelett-gebundene Proteine voneinander getrennt, was eine Unterteilung zellulärer Proteine nach ihrem Löslichkeitszustand erlaubt. Um zu überprüfen, ob diese Methode auch wirklich geeignet ist, eine Aktivitätsveränderung einzelner Kinasen wiederzuspiegeln, wurde ein Kontrollexperiment mit externem Stimulus durch Phorbolster durchgeführt. Die Kalzium-abhängigen (α, β, γ) und unabhängigen Kinasen (δ, ϵ, θ) reagieren innerhalb kurzer Zeit auf die Stimulation und werden im Anschluß an ihre Aktivierung deaktiviert oder degradiert, während die atypischen PKC (λ, ζ) unabhängig eines TPA-Stimulus agieren (Chen, 1993, Gschwendt, 1996). Eine Ausnahme bildet die Isoform PKC η , die ebenfalls durch TPA stimuliert wird, jedoch tritt diese Aktivierung in Astrozyten deutlich später ein (circa 24 h nach Stimulus) als bei den vergleichbaren Isoformen der Ca²⁺ unabhängigen PKC (Chen, 1996). TPA-Stimulus in Keratinozyten hingegen führte weder zu einer Translokation noch zu einer Herabregulation von PKC η (Murakami, 1996). Offenbar ist die C-terminale variable Region für die subzelluläre Lokalisation nach TPA-Stimulus kritisch (Kashiwagi, 2002). Unabhängig von unterschiedlichen Reaktionen einzelner Isoformen auf einen TPA-Stimulus ist die Löslichkeitsfraktionierung als geeignete Methode anzusehen, wenn sich die Aktivierung der Kalzium-abhängigen und -unabhängigen Isoformen durch Phorbolster in einer veränderten Verteilung der Kinasen innerhalb der Detergenzfraktionen niederschlägt.

Für dieses Kontrollexperiment wurden Zellen einer 4- oder 24stündigen Behandlung mit 1 μ M TPA ausgesetzt bzw. zu Vergleichszwecken mock- behandelt und anschließend geerntet. Nach Zellaufschluß durch mehrmalige Frier-/Tauzyklen wurden die Proteine mit kontinuierlich steigender Detergenzstärke (S₁- ohne Detergenz; S₂- Chaps; S₃- Chaps, DOC; S₄- Chaps, DOC, SDS; S₅- Lämmli-Puffer, Hitzedenaturierung) aus dem unlöslichen Zellsediment schrittweise extrahiert. Die Präsenz der verschiedenen Kinasen und deren Verteilung innerhalb der Fraktionen wurde anschließend im Western Blot untersucht. In Abb. 25 ist das Ergebnis der Löslichkeitsfraktionierung ausgewählter PKC nach TPA-Stimulus

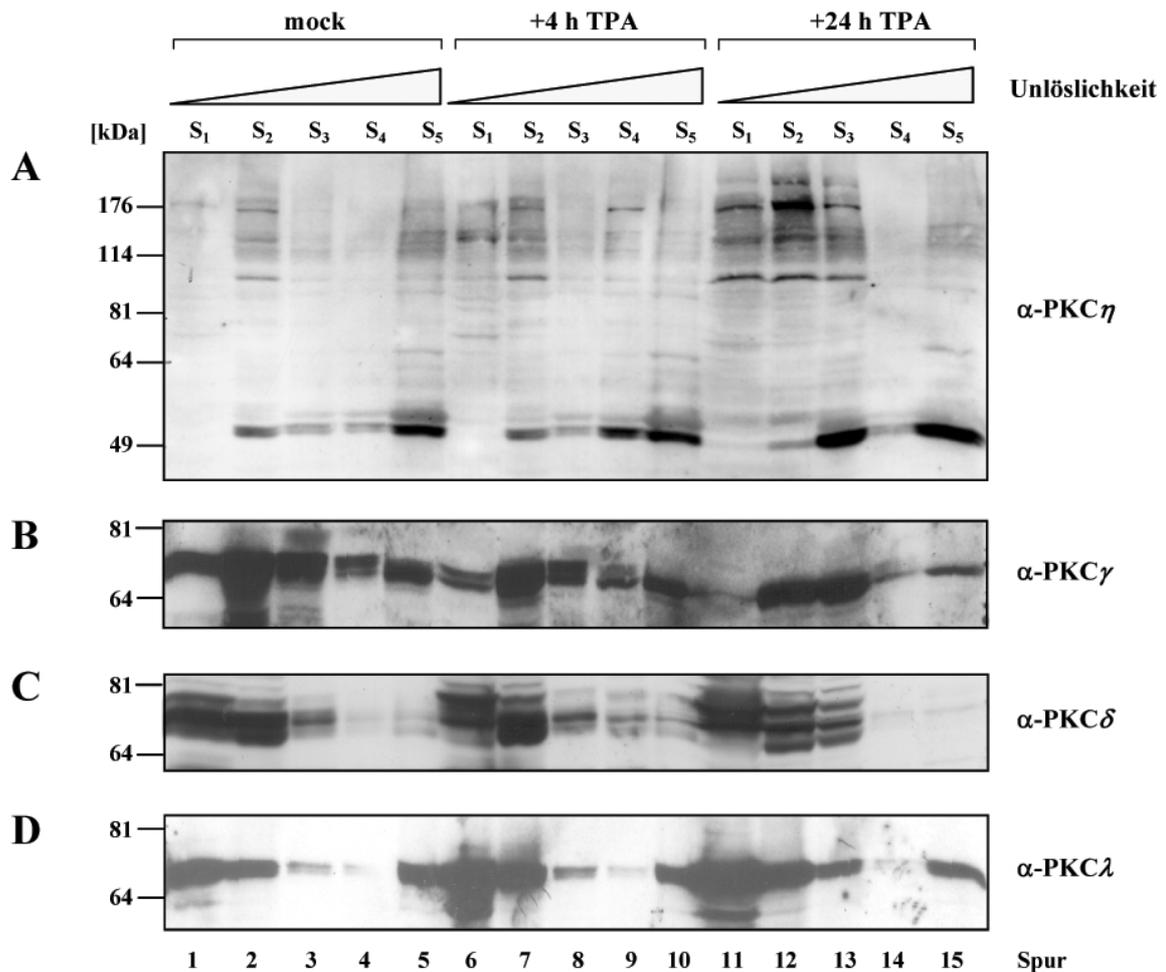


Abb. 25: Löslichkeitsverschiebung ausgewählter PKC Isoformen nach TPA Stimulus. A9 Zellen wurden mock- (Spuren 1-5), 4 (6-10) oder 24 h (11-15) mit 1 μ M TPA stimuliert, geerntet und einer Löslichkeitsfraktionierung mit zunehmender Detergenzstärke und Konzentration unterzogen (S₁ ohne Detergenz; S₂ Chaps; S₃ Chaps+DOC; S₄ Chaps+DOC+SDS; S₅ Lämmli-puffer und Hitzedenaturierung). Proteine wurden über SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt, geblottet und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

wiedergegeben. Abb. 25 A zeigt eine deutliche Verteilung von aktiver PKC η in den Fraktionen S₁, S₂ und S₃ 24 h nach TPA-Zugabe (Spuren 11-13). PKC γ kommt beispielsweise in allen Fraktionen vor (Abb. 25 B), was auf einer in A9-Zellen bereits vorliegenden Aktivierung beruhen kann. Dadurch wäre ein weiterer stimulativer Einfluß durch TPA nicht mehr erkennbar. Erwartungsgemäß zeigt PKC δ eine Aktivierung, d. h. Verschiebung zu Fraktionen S₄ und S₅ 4 h nach Stimulus während PKC λ unabhängig der TPA-Behandlung zu allen Zeitpunkten das gleiche Löslichkeitsmuster aufweist, da die atypischen Isoformen TPA in ihrer regulatorischen Domäne nicht binden können. Der Vergleich der aus der Literatur bekannten Aktivierungsmuster einzelner PKC-Isoformen mit den Indikationen, die sich aus der hier dargelegten Löslichkeitsfraktionierung nach TPA-Stimulation ergaben, weisen die gewählte Fraktionierungsmethode als kompetent aus, mögliche Aktivierungen von PKC-Isoenzymen zum Beispiel nach MVM-Infektion in A9-Zellen mit dieser Methode zu ermitteln.

Um nun auch den Einfluß der MVM-Infektion auf den Aktivitätszustand von PKC-Isoformen zu untersuchen, wurde das Löslichkeitsverhalten der Isoenzyme in infizierten und nicht infizierten Zellen miteinander verglichen. Dazu wurden miteinander vergleichbare Zellysate von mock- und MVM-infizierten Zellen nach 24 und 48 h hergestellt und wie bereits beschrieben nach Zellaufschluß einer Löslichkeitsfraktionierung unterzogen. Abb. 26 zeigt die Fraktionierungsergebnisse für PKC η , $\beta I, II$, δ und λ . Dabei wird deutlich, daß der größte Teil dieser Kinasen in einem löslichen Zustand in der Zelle vorliegt und mit Ausnahme von PKC η kein verändertes Löslichkeitsverhalten nach MVM-Infektion zeigt. Bei genauer Betrachtung des Western Blots von PKC η ergab sich eine leichte, wenngleich signifikante Verschiebung der Kinase zu Fraktionen S₂, S₃ und S₄ (Spuren 7-9).

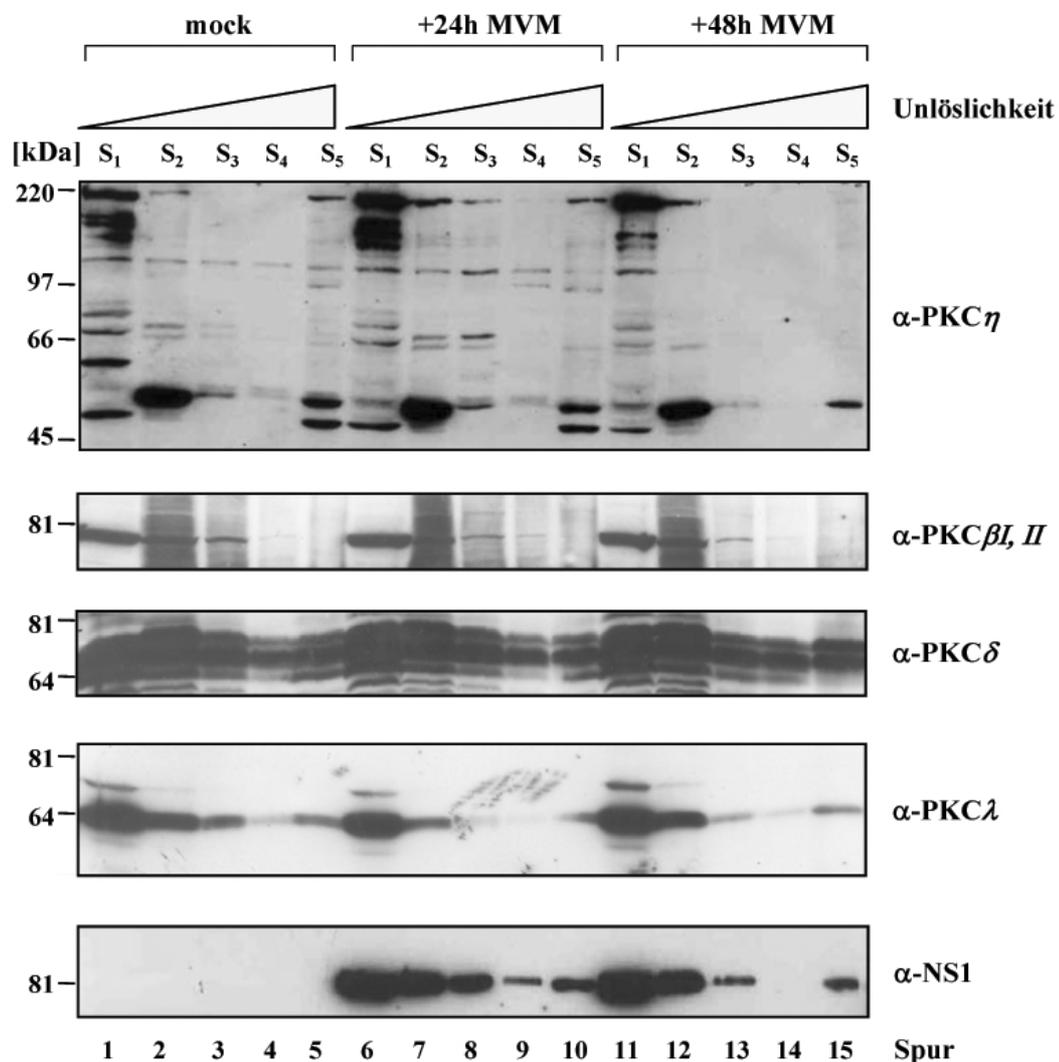
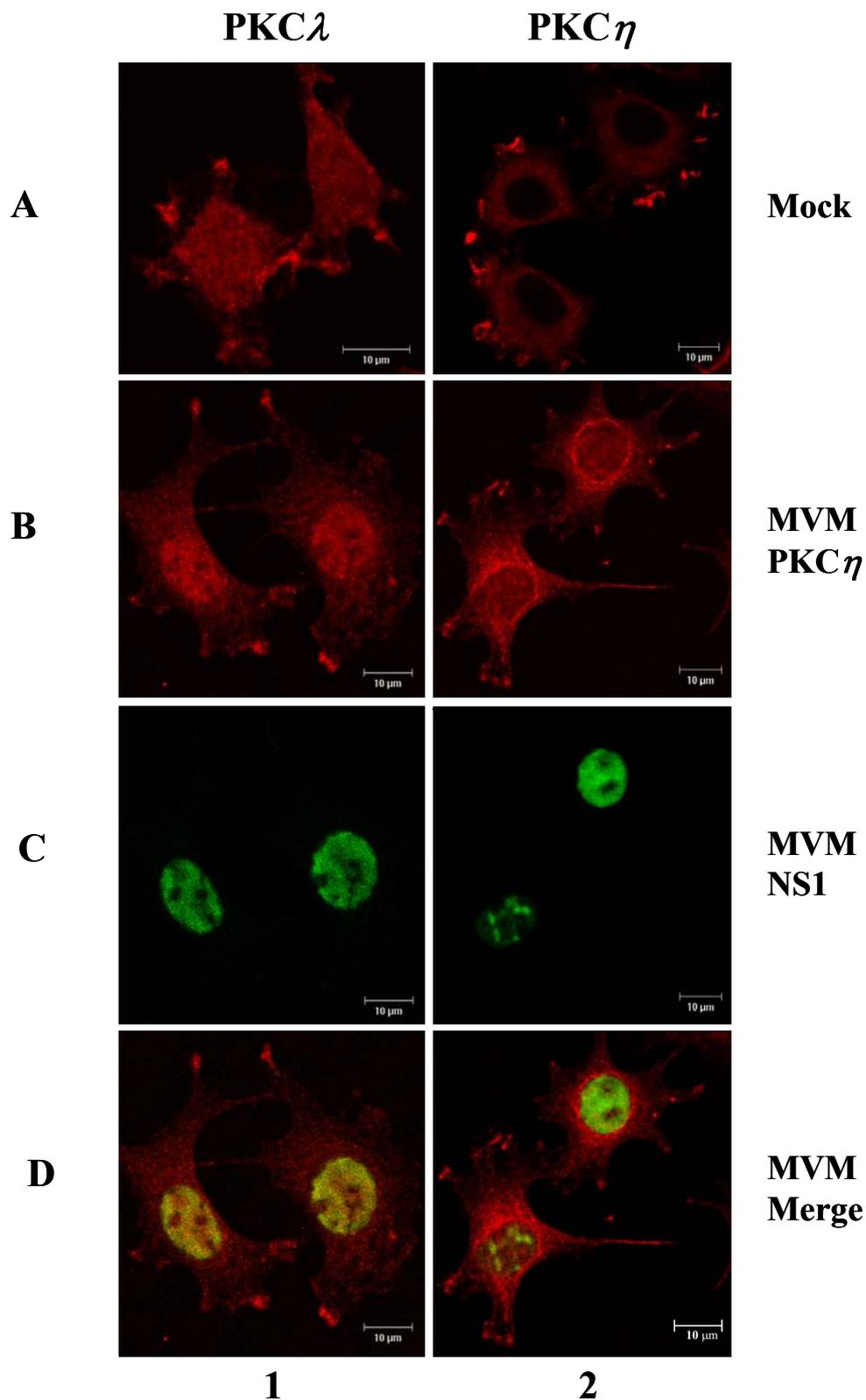


Abb. 26: Löslichkeitsverteilung verschiedener Kinasen nach MVM Infektion. A9 Zellen wurden infiziert oder nicht (Spuren 1-5) mit MVMP (MOI 10), 24 (6-10) oder 48 h p.i. (11-15) geerntet und einer Fraktionierung mit zunehmender Detergenzstärke und Konzentration unterzogen (S₁ ohne Detergenz; S₂ Chaps; S₃ Chaps+DOC; S₄ Chaps+DOC+SDS; S₅ Lämmli-puffer und Hitzedenaturierung). Proteine wurden über SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt, geblottet und Kinasen bzw. NS1 mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

Dieses Löslichkeitsverhalten der Kinase gleicht demjenigen 24 h nach TPA-Stimulation und kann somit als Aktivierung interpretiert werden. Interessanterweise ist diese Verteilung 2 Tage nach Infektion nicht mehr zu beobachten. Im Gegenteil kommt es hier sogar zu einem Rückgang des Kinaseanteils in der unlöslichen Fraktion S₅ (Spur 15). Dieses Ergebnis könnte durch eine möglicherweise zeitlich begrenzte Aktivierung von η erklärt werden. Da PKC durch die Konformationsänderungen zu ihrer Aktivierung auch zeitgleich sensitiv gegenüber Proteasen und proteasomaler Degradation werden, um somit eine schnelle und flexible Signalantwort innerhalb der Zelle umzusetzen, geht die Aktivierung von PKC-Isoenzymen oft mit ihrem Abbau einher. Das gewährleistet eine kurzfristige zeitlich begrenzte Response. Im Fall der Löslichkeitsverschiebung von PKC η würde sich die Beendigung der Isoformaktivierung dahingehend äußern, daß das Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Abbau zu letzteren Gunsten kippt. Durch diesen Prozeß würde PKC η als Bestandteil der unlöslichen Fraktionen entfallen, was der in Abb. 26 gezeigten Verteilung der Kinase 48 h nach Infektion entspricht.

3.2.2. Subzelluläre Lokalisation der NS1-aktivierenden Kinasen PKC λ und PKC η

Zur Absicherung dieser biochemischen Fraktionierungsdaten, erschien es sinnvoll, auch mittels Immunfluoreszenz zu überprüfen, ob sich die Aktivierung von PKC η durch eine Translokation der Kinase innerhalb der Zelle bemerkbar macht. Zu Vergleichszwecken wurde die Lokalisation von PKC λ bestimmt, deren Bedeutung für die Regulation der replikativen Funktionen von NS1 bereits nachgewiesen wurde. Dazu wurden A9-Zellen auf Objektträgern ausgesät, mock- oder MVM-infiziert und 44 h nach Infektion mit 3% p-Formaldehyd fixiert. Die Detektion von NS1, PKC λ und PKC η erfolgte mit entsprechenden Antikörpern. Wie in Abb. 27 gezeigt, ist PKC λ in nicht infizierten Zellen fast uniform in der Zelle verteilt (Spalte 1A), während PKC η in diesen Zellen den Nukleus ausspart und lediglich zytoplasmatisch nachweisbar ist, jedoch mit einer markanten Anreicherung in Membranstrukturen, den sogenannten *ruffles* (Spalte 2A). Nach MVM-Infektion (Abb. 27; Reihen B-D) ist bei beiden Kinasen eine intrazelluläre Verschiebung erkennbar: PKC λ konzentriert sich im Nukleus, wo es NS1 phosphoryliert (Nüesch, 2003), was im gezeigten Bild durch den gelben Überlappungsbereich (Spalte 1, Reihe D) sichtbar wird.



- Abb. 27: Subzelluläre Lokalisation endogener PKC λ und η in A9 Zellen nach MVM Infektion.** A9 Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert, mock (A) oder MVM (MOI 20) infiziert (B-D) und 44 h p.i. mit 3 % p-Formaldehyd fixiert. Endogene PKC λ (Reihe 1 A,B) wurde durch einen monoklonalen Antikörper, PKC η (Reihe 2 A,B) mit polyklonalem Antiserum und jeweils CY3 (rot) konjugierten Spezies-spezifischen Zweitantikörpern nachgewiesen. NS1 (C) wurde entweder durch einen monoklonalen Mausantikörper (3D9) oder polyklonales Kaninchenserum (Sp8) und FITC (grün) gelabelten Zweitantikörpern detektiert. D: merge. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Leica TCS SP Mikroskop, Ölimmersionsobjektiv 63x, FITC, TRITC Filtereinstellungen und einem *pinhole* von 1.

PKC η hingegen akkumuliert deutlich sichtbar in der nukleären Peripherie bzw. an der nukleären Membran. Aufgrund der sehr schwachen Färbung von zytoplasmatischem NS1 kann nicht festgestellt werden, wo es in der Zelle zu einer Phosphorylierung von NS1 durch PKC η kommt. Ähnlich wie unter Kap. 3.1.2.1 beschrieben, ist auch hier wieder eine Anfärbung von PKC η an filamentösen Strukturen der Zelle gegeben.

3.2.2.1. Die MVM-Infektion beeinflusst die intrazelluläre Verteilung von PKC-Isoformen- Nachweis durch Kompartiment-Fraktionierung

Die Löslichkeitsfraktionierung kann zwar eine Indikation über Konformationsänderungen der PKC geben, sagt aber wenig über eventuelle Veränderungen in deren Ligandenaffinität in der Zelle aus. Um einen Nachweis über die zellulären Kompartimente zu erbringen, in denen die aktivierten PKC-Isoformen agieren, war es neben der Immunfluoreszenz auch von Interesse, durch eine andere Methode Informationen auf Ebene der Gesamtzellpopulation zu erlangen. Angelehnt an die von England (2000) beschriebene Methode zur Lokalisation von PKC ϵ wurde zum biochemischen Nachweis der subzellulären Lokalisation von PKC λ und η deshalb eine weitere Fraktionierung durchgeführt. Diese Fraktionierung beruht auf einer Kombination aus Sedimentation und Detergenz-Löslichkeit (2.2.5.6.). Die Bezeichnung der einzelnen Fraktionen in Abb. 28 A wurde von den Autoren übernommen, wengleich die Unterteilung der Kompartimente entsprechend ihrer Namen nicht allzu streng aufgefaßt werden sollte. Von mock- oder MVM-infizierten Zellen wurden 24 bzw. 48 h nach Infektion durch Homogenisation und mechanisches Scheren Zellysate hergestellt. Durch Zentrifugation bei kleiner Geschwindigkeit wurden nachfolgend Nuklei und Zelltrümmer sedimentiert. Zur Gewinnung der löslichen zytosolischen Proteine wurde der Überstand des ersten Schrittes anschließend durch hohe Zentrifugalkraft erneut aufgereinigt (Zytosol-Fraktion). Die beiden Sedimente wurden separat mit einem Triton-EDTA-Puffer extrahiert, um die Membran-gebundenen Proteine in Lösung zu bringen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei hoher Geschwindigkeit erhält man einerseits die Sedimentfraktionen des unlöslichen Gerüsts ns (*nuclear scaffold*) und des löslichen Gerüsts ctsk (*cytoskeleton*) sowie die dazugehörigen Zentrifugate nm (*nuclear membrane*) und pm (*plasma membrane*). Es soll hier darauf hingewiesen werden, daß die Western Blot Analyse der einzelnen Fraktionen proportional zur Zellmenge, nicht aber auf Proteinmenge angeglichen wurde. Das bietet den Vorteil, trotz einer Infektions-bedingten Veränderung des zellulären Proteinreservoirs eine Quantifizierung einzelner ausgewählter Proteine entsprechend ihrer Lokalisation vornehmen zu können, unabhängig davon, ob sich die Gesamtproteinmenge dieser Fraktion durch die MVM-Infektion gegenüber mock erhöht oder erniedrigt hat.

Die Immunfluoreszenzanalysen endogener PKC η (Kap. 3.1.2.1) hatten bereits eine Anreicherung der Kinase in der nukleären Peripherie angedeutet. Dieses Ergebnis konnte durch die oben beschriebene Kompartiment-Fraktionierung auf Ebene der Gesamtzellpopulation bestätigt werden (Abb. 28 B). Obwohl es keine Umverteilung von η zwischen den einzelnen Fraktionen gibt, ist doch eine deutliche Anreicherung in den Membranfraktionen sichtbar (Abb. 28 B; Spuren 7, 9, 12, 14).

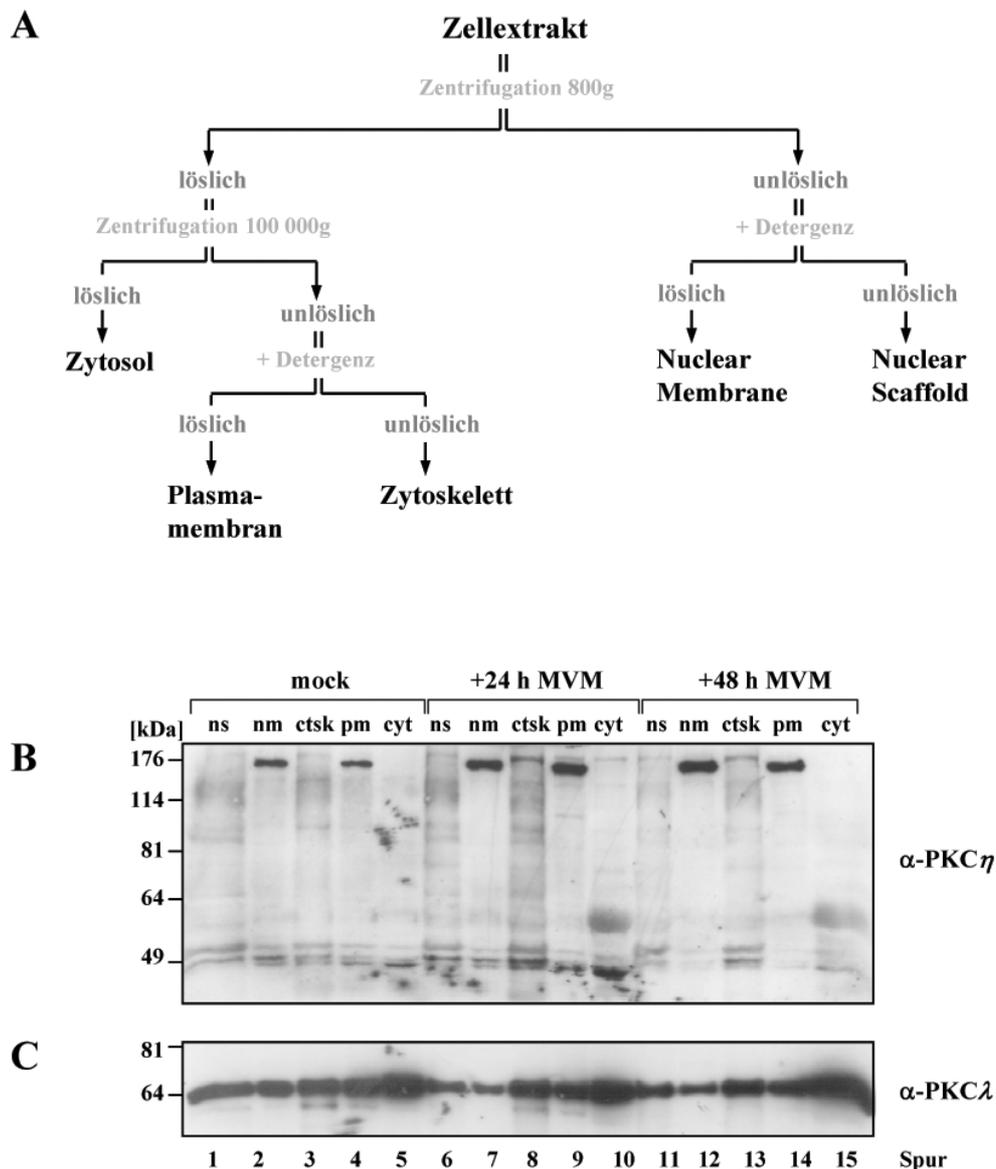


Abb. 28: Verteilung ausgewählter Kinasen innerhalb der Zelle nach MVM Infektion. Das in (A) gezeigte Fraktionierungsschema nach Lehel *et al.*, (1995) ermöglicht durch schrittweise Zentrifugation und Detergenzzugabe die Unterteilung in lösliche, unlösliche und Membranfraktionen. Diese Methode wurde angewendet, um die intrazelluläre Lokalisation von PKC η (B) und PKC λ (C) in mock- (Spuren 1-5) und MVMp (MOI 10) infizierten A9 Zellen 24 h (Spuren 6-10) und 48 h nach Infektion (Spuren 11-15) zu untersuchen. Proteine wurden der Größe nach über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und die Verteilung der Kinasen durch Detektion mit spezifischen Antikörpern ermittelt. ns- nuclear scaffold, nm- nuclear membrane, ctsk- cytoskeleton, pm- plasma membrane, cyt- cytosol.

Es kann davon ausgegangen werden, daß wie bereits unter Kapitel 3.2.1.1 erläutert, die Aktivierung und damit verbundene erhöhte Degradation von η (Kang, 2000) auch in einer gesteigerten Syntheserate der Kinase resultieren. Die Fraktionierung nach zellulären Kompartimenten ergab auch für PKC λ interessante Ergebnisse. Ähnlich zur Immunfluoreszenz zeigt PKC λ auch in dieser Fraktionierung eine ubiquitäre Verteilung in der Zelle (Abb. 28 C). Es ist darüber hinaus bemerkenswert, daß im Laufe der Infektion die Kinase offenbar aus dem Nukleus entfernt wird, da sich eine signifikante Abnahme in der ns- und nm- Fraktion bei gleichzeitiger Zunahme in der zytoplasmatischen Fraktion ergibt (Abb. 28 C; Spuren 6,7,10,11,12,15). Letzteres war mittels Immunfluoreszenznachweis der Kinase nicht sichtbar, was damit erklärt werden mag, daß der PKC λ spezifische Antikörper im Gegensatz zum Western Blot in der Immunfluoreszenz nur ein schwaches Signal zeigt. Eine Kontrolle der Separation einzelner Fraktionen mit sogenannten Organell- oder Membranmarkerproteinen wurde nicht durchgeführt. Alle erzielten Fraktionierungsergebnisse sind jedoch in drei separaten Experimenten reproduziert worden. Darüber hinaus belegten andere detektierte Proteine, wie das Aktin-assoziierte Protein Profilin, eine konstante Verteilung (in den Fraktionen nm, pm, cyt- Daten nicht gezeigt), die sich weder in Abhängigkeit von einer MVM-Infektion noch in den separaten Experimenten änderte. Somit läßt sich schlußfolgern, daß die beobachteten Verschiebungen von PKC λ und η ein Resultat der MVM-Infektion und weniger der Varianz verschiedener Experimente sind. Es kann zusammengefaßt werden, daß mit zwei verschiedenen Methoden eine Translokation der NS1-regulierenden Kinase PKC η nachgewiesen werden konnte, was in Einklang mit den Ergebnissen der Löslichkeitsfraktionierung deutlich für eine Aktivierung dieser Kinase durch die MVM-Infektion spricht.

3.2.3. Subzelluläre Lokalisation von PKC η Mutanten

Zum besseren Verständnis des Aktivitätszustandes und der daraus resultierenden intrazellulären Lokalisation von PKC η sollten auch die modulierten PKC η Zelllinien zu einer Analyse hinsichtlich der Verteilung der Mutanten zur Kompartiment-Fraktionierung herangezogen werden. Die Immunfluoreszenzaufnahmen der Mutanten unter 3.1.2.1 belegten ja bereits eine signifikante Membranlokalisation der konstitutiv aktiven η A160E, während die inaktive Mutante η T512A auf Einzelzellebene zytoplasmatisch und in Membran *ruffles* vorlag. Analog wie unter 3.2.2.1 für A9-Zellen beschrieben, wurde die Fraktionierung der Zelllinien A9:P38PKC η A160E und A9:P38PKC η T512A nun nach Kompartimenten vorgenommen. Interessanterweise ergab sich eine etwas von der endogenen η in A9 abweichende Verteilung beider Mutanten, welche sich wiederum trotz ihrer differierenden

Aktivität untereinander ähnelten. Aus Abb. 29 A (Spuren 2,4,7,9,12,14 obere Bande) wird deutlich, daß sich die endogene PKC η in der konstitutiv aktiven Zelllinie viel stärker an der nukleären Membran anreichert als an der Plasmamembran, während in A9 eine annähernde Gleichverteilung zwischen beiden Fraktionen mit nur geringer Verschiebung zugunsten der nukleären Membran detektiert wurde. Ähnlich wie η in A9-Zellen zeigt sich das Bild der endogenen η in der A9:P38PKC η T512A Zelllinie (Abb. 29 B; Spuren 2,4,7,9,12,14 obere Bande) mit dem kleinen Unterschied, daß deutlich weniger der endogenen Kinase vorhanden ist. Möglicherweise ist die Degradation von η in dieser Zelllinie beschleunigt. Wenn man nun die Lokalisation der Mutanten η A160E und η T512A betrachtet, fällt auf, daß sich der Hauptanteil beider Isoenzymvarianten in den zwei unlöslichsten Fraktionen befindet, und deutlich geringere Mengen in der nukleären-, Plasmamembran- oder zytosolischen Fraktion. Es kann weiterhin festgestellt werden, daß der Anteil η A160E in der nukleären Membranfraktion infizierter Zellen am stärksten zunimmt (Abb. 29 A; Spuren 2,7,12) im Vergleich zu der gerade noch detektierbaren Menge in der Ausgangsfraktion nicht infizierter Zellen.

Dieses Ergebnis kann als Indiz gewertet werden, daß die Kinase in dieser Fraktion die enzymatisch aktive darstellt, während die Anteile in den unlöslichen Fraktionen vielleicht ihre Ursache in einem Überangebot der unter dem P38-Promotor exprimierten Kinase haben. Um diese Hypothese in Einklang zu bringen mit der Verteilung der inaktiven Mutante η T512A, die sich erstaunlicherweise bereits in nicht infizierten Zellen wesentlich stärker in der nukleären Membranfraktion im Vergleich zu den unlöslichen *nuclear scaffold*- und Zytoskelett-Fraktionen ansammelt, als die konstitutiv aktive Mutante, muß von einer erhöhten Halbwertszeit der Mutante ausgegangen werden. Es ist vorstellbar, daß η T512A z. B. durch Mediatorproteine zu denselben intrazellulären Orten gebracht wird, wie endogene oder konstitutiv aktive PKC η , daß aber aufgrund ihrer Inaktivität keine Degradation an diesen Orten erfolgt. Folgerichtig mit dieser Hypothese bleibt der Anteil der Mutante in der nukleären Membranfraktion nach Infektion konstant (siehe Abb. 29 B Spuren 2,7,12). Die allgemeine Mengenabnahme von η T512A zwei Tage nach Infektion, die auch schon bei der Löslichkeitsfraktionierung beobachtet wurde (Abb. 18), könnte auf einer Konkurrenz mit der durch die Infektion induzierten Aktivierung endogener PKC η beruhen und zeitgleich zu einer Sensibilisierung der Mutante gegenüber proteasomaler Degradation führen.

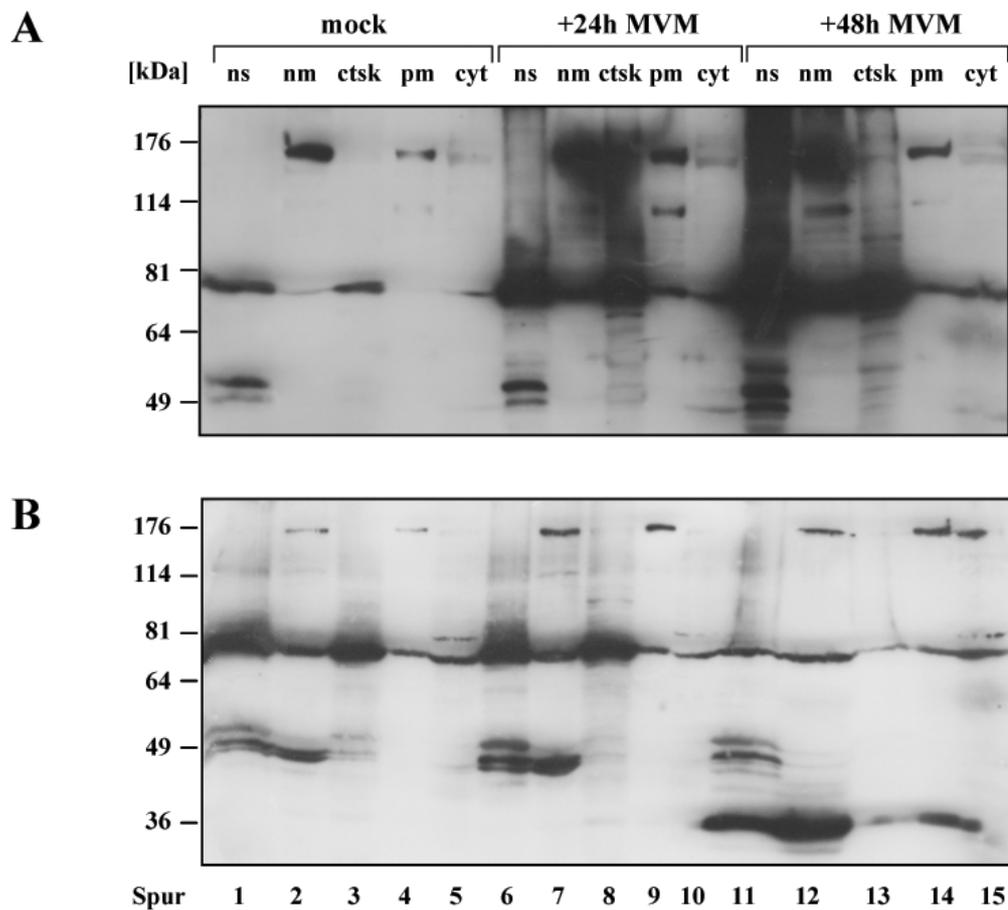


Abb. 29: Subzelluläre Verteilung von PKC η Mutanten. Stabil transfizierte Zelllinien A9:P38Flag-PKC η A160E (A) und A9:P38FlagPKC η T512A (B) wurden mock (Spuren 1-5) oder mit MVMp (MOI 10) für 24 (6-10) und 48 h (11-15) infiziert, aufgeschlossen und biochemischer Fraktionierung unterzogen. Durch schrittweise Zentrifugation und Detergenzzugabe wurden die homogenisierten Zellextrakte in lösliche, unlösliche und Membranfraktionen unterteilt: ns- *nuclear scaffold*, nm- *nuclear membrane*, ctsk- *cytoskeleton*, pm- *plasma membrane*, cyt- *cytosol*. Proteine wurden über SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und die PKC η Mutanten mit spezifischem Antiserum nachgewiesen.

3.2.4. Aktivitätszustand von PDK-1 in A9-Zellen

In den vorangegangenen Abschnitten konnte eine funktionelle Relevanz der Kalzium-unabhängigen PKC η -Isoform für die parvovirale Replikation belegt werden. Darüber hinaus wurde eine spezifische Aktivierung und Umverteilung dieser Kinase durch eine MVM-Infektion nachgewiesen. Um den Ursachen einer solchen Regulation nachzugehen, erschien es sinnvoll zu prüfen, ob der Stimulierung von PKC η auch eine Aktivierung der PKC *upstream*-Kinase PDK-1 vorausgeht. Da dieses Enzym als konstitutiv aktiv beschrieben wurde (Alessi, 1997, Pullen, 1998), lag es nahe, ebenfalls wie bei der PKC-Familie eine mögliche Translokation als Marker einer derartigen Aktivierung zu benutzen. Dazu wurde die intrazelluläre Verteilung der Kinase vor und nach MVM-Infektion durch Immunfluoreszenz überprüft. A9-Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät, infiziert oder nicht und mit p-Formaldehyd fixiert. PDK-1 konnte durch ein polyklonales Schafserum und einen CY2-konjugierten Schafantikörper nachgewiesen werden. Infizierte Zellen wurden durch NS1-Färbung mit polyklonalem Kaninchenserum und CY3-gekoppeltem Sekundärantikörper identifiziert. Obwohl der gegen PDK-1 gerichtete Antikörper die Kinase in der Immunfluoreszenz nur schlecht erkennt, konnte nach MVM-Infektion eine klare Verschiebung der Kinase in den Nukleus beobachtet werden (Abb. 30 A; siehe Pfeile), ein Indiz für eine vorliegende Stimulierung der Kinase.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden daraufhin sowohl die A9-Fractionen der Löslichkeits- als auch der Zellkompartiment-Fraktionierung mock und MVM-infizierter Zellen durch SDS-PAGE und Western Blotting auf die Verteilung von PDK-1 untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 30 B,C dargestellt. In beiden Fraktionierungsansätzen befindet sich der Hauptanteil der Kinase in der löslichen Fraktion. Hier beweist es sich als vorteilhaft, denselben zellulären Vorgang durch mehrere, miteinander verwandte, Methoden zu untersuchen. Verließe man sich allein auf die Löslichkeitsfraktionierung (Abb. 30 B), käme man zu der Schlußfolgerung, daß keine Translokation dieser Kinase vorliegt. Demgegenüber belegt Abb. 30 C jedoch, daß es sehr wohl zu einer Verschiebung dieser Kinase innerhalb infizierter A9-Zellen kommt: PDK-1 wandert von der Plasma- zur nukleären Membran und in den Nukleus (Abb. 30 C Spuren 6,7,9,11,12,14).

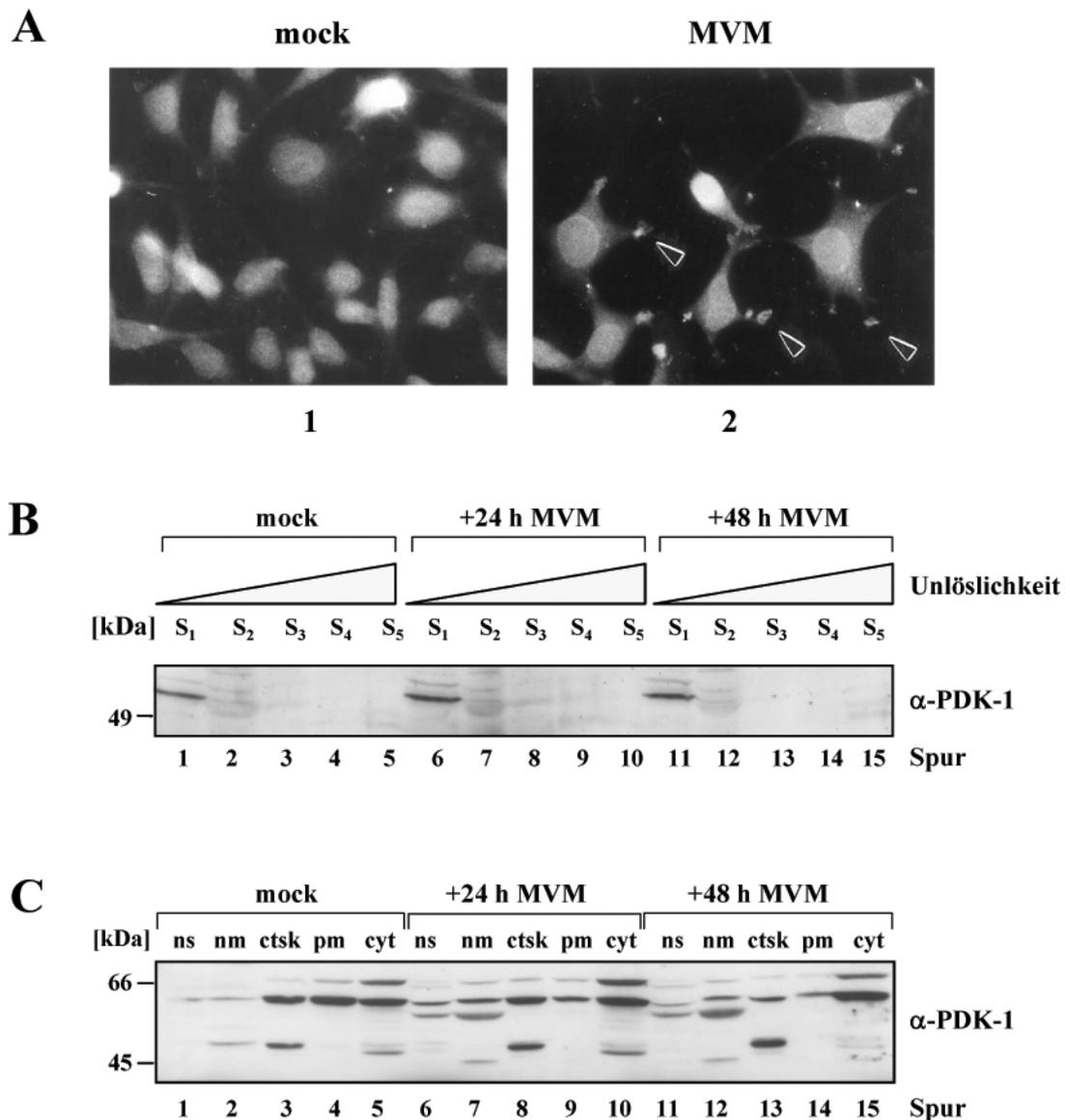


Abb. 30: Subzelluläre Verteilung endogener PDK-1 nach MVM Infektion. (A) **Immunfluoreszenz.** A9 Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert, mock (1) oder MVM (MOI 20) infiziert (2) und 24 h p.i. mit 3 % p-Formaldehyd fixiert. PDK-1 wurde durch ein spezifisches Antiserum nachgewiesen. Die Aufnahmen wurden am Leica Leitz DMRD Mikroskop, 63x Ölimmersionsobjektiv erstellt. (B) **Löslichkeitsfraktionierung.** Nicht infizierte (Spuren 1-5) oder mit MVMp (MOI 10) für 24 h (6-10) oder 48 h (11-15) infizierte A9 Zellen wurden geerntet und biochemisch fraktioniert. Die Zellysate wurden durch zunehmende Detergenzstärke solubilisiert (S₁ ohne Detergenz; S₂ Chaps; S₃ Chaps+DOC; S₄ Chaps+DOC+SDS; S₅ Lämmli-puffer und Hitzedenaturierung). (C) **Intrazelluläre Verteilung.** Durch Zentrifugation und Detergenzzugabe wurden die homogenisierten Zellextrakte schrittweise in lösliche, unlösliche und Membranfraktionen unterteilt : ns- nuclear scaffold, nm- nuclear membrane, ctsk- cytoskeleton, pm- plasma membrane, cyt- cytosol. Proteine wurden der Größe nach durch SDS-PAGE aufgetrennt und endogene PDK-1 mit spezifischem Antikörper im Western Blot nachgewiesen.

3.2.4.1. Überexpression von PDK-1-Mutanten zur Analyse des PKC η -Aktivitätszustandes

Eine weitere Möglichkeit, die Aktivierung von PKC η durch PDK-1 zu verifizieren, besteht darin inaktive PDK-1-Mutanten zu exprimieren, um damit die endogene Aktivität innerhalb der Zelle zu beeinflussen. Somit kann eine Phosphorylierung der in einer Signalkaskade unter PDK-1 liegenden Substratkinasen verhindert oder zumindest reduziert werden. Von dieser Möglichkeit, die dargestellten Ergebnisse der PKC η -Aktivierung zu erhärten, wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Gebrauch gemacht. Wie bereits gezeigt, führte die MVM-Infektion zu einer Aktivierung und damit verbunden, einer Translokation von PDK-1. Mit den nachfolgend beschriebenen Experimenten galt es nun zu zeigen, daß eine weiterführende MVM-induzierte Stimulierung von PKC η von der aktivierten PDK-1 abhängig ist. Für diesen Fall ergäbe sich, daß eine Aktivierung von PKC η durch eine inaktive PDK-1 Mutante wenigstens teilweise unterbleiben sollte.

Die katalytische Aktivität von PDK-1 wird durch Mutation der Phosphorylierungsstelle Serin 241 zu Alanin der humanen Sequenz aufgehoben (Casamayor, 1999). Um die oben genannte Strategie in A9-Zellen auszuführen, mußte zuerst die c-DNA der murinen PDK-1 aus einer c-DNA-Bibliothek aus A9-Zellen isoliert werden (Nüesch, unveröffentlichte Daten). Die entsprechende Phosphorylierungsstelle der murinen Sequenz, Serin 244 wurde mittels PCR zu Alanin mutiert. Zu Kontrollzwecken wurde parallel dazu auch die PDKwt Sequenz in ein Expressionsplasmid kloniert, in welchem die PDK-kodierende Sequenz unter Kontrolle des P38-Promotors plaziert wurde. Zusätzlich wurde N-terminal ein *Myc*-Epitop im selben Leserahmen an die PDK-1-Sequenz fusioniert (MEQKLISEEDLN). Die Richtigkeit der PDKwt sowie der PDK-S244A-Sequenz wurden überprüft. Abb. 31 A zeigt schematisch den Aufbau und die entsprechende Mutation in der Phosphorylierungsstelle von PDK-1. Um die Aktivierung von PKC η im Rahmen einer MVM-Infektion zu untersuchen, wurde erneut von der Etablierung stabil transfizierter Zelllinien (siehe Kapitel 3.1.2.1) Gebrauch gemacht. Die Kotransfektionen der parentalen A9-Zelllinie mit den PDK-1-Expressionsplasmiden und entsprechenden Selektionsmarkern (Neomycin) sowie die Selektion transfizierter Zellklone wurden ebenfalls von Dr. Nüesch ausgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Zelllinien A9:P38*Myc*PDKwt und A9:P38*Myc*PDK-S244A auf die Expression der Mutanten getestet. Dazu wurden die Zelllinien auf Objektträgern ausgesät, mock- oder MVM- infiziert und nach 24 h mit p-Formaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte der Nachweis beider Proteine durch Immunfluoreszenz unter Verwendung eines gegen das *Myc*-Epitop gerichteten polyklonalen Kaninchenserums und FITC- gekoppelten Zweitantikörpern zur Unterscheidung von der endogenen Kinase. Beide

Mutanten ließen sich in nicht infizierten Zellen bis auf wenige Ausnahmen kaum nachweisen (Abb. 31 B,C; Spalte 1). Eine starke Expression erfolgte demgegenüber in infizierten Zellen (Abb. 31 B,C; Spalte 2). Hier war eine deutliche Lokalisation der wt-Kinase in Membranstrukturen (*ruffels*) sowie im Nukleus sichtbar. Die inaktive Mutante PDK-S244A wurde an denselben Stellen wie die wt Kinase nachgewiesen, wenngleich weniger ausgeprägt und zusätzlich mit deutlicher Anreicherung im Zytoplasma.

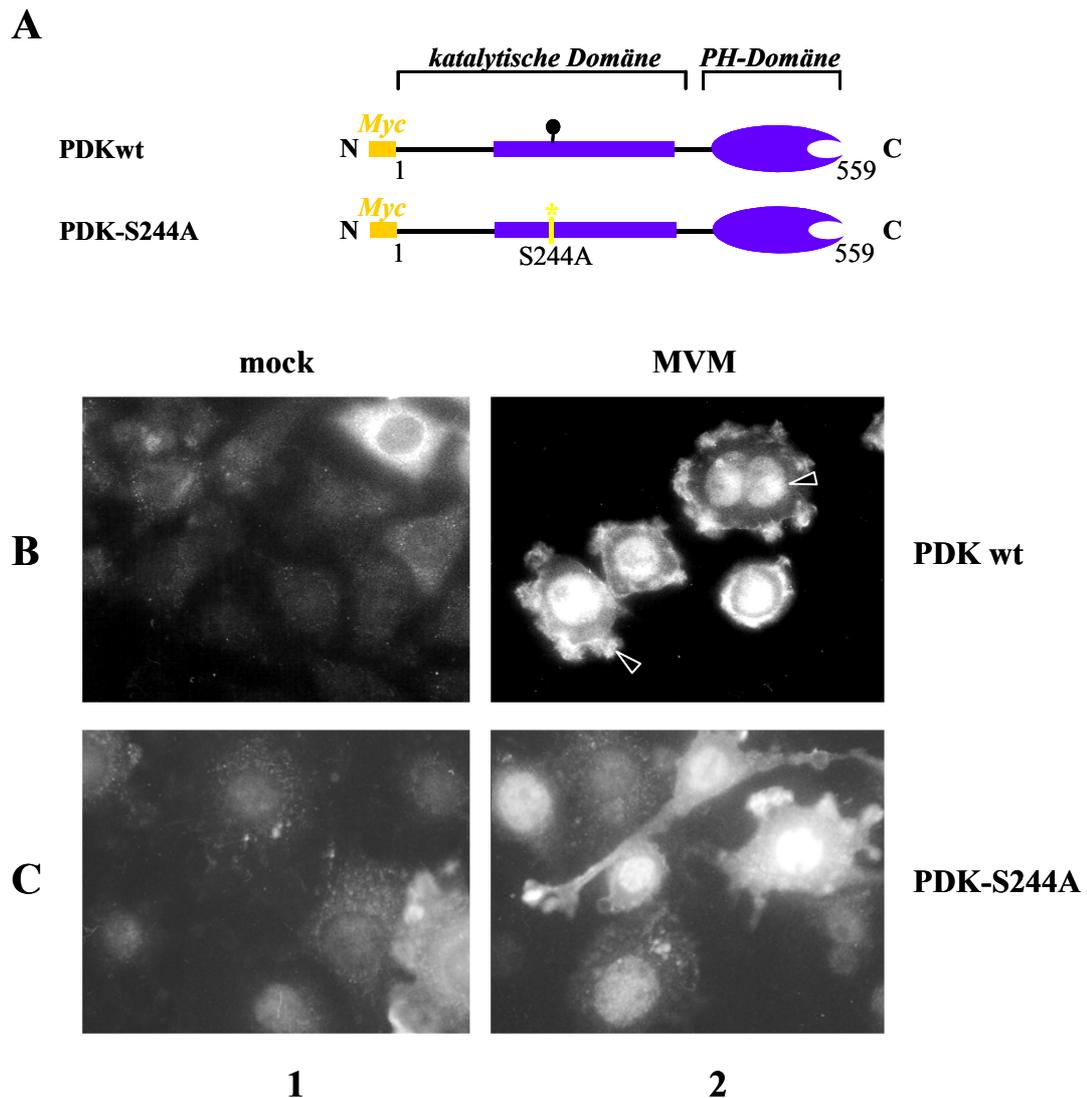


Abb. 31: Schematische Darstellung und subzelluläre Lokalisation der PDK-1 Mutanten. (A) Die aus 559 AS aufgebaute Kinase zeichnet sich durch eine katalytische und eine Pleckstrin-Homologie (PH) -Domäne (C-terminal nach AS 446) zur Bindung an Membranstrukturen aus. Die katalytische Domäne enthält bei AS Serin 244 eine Phosphorylierungsstelle (schwarzer Punkt), die in der gleichnamigen Mutante, PDK-S244A, zu Alanin mutiert ist (gelb), um die katalytische Aktivität zumindest teilweise zu unterbinden. Die kodierenden Sequenzen für PDKwt/S244A wurden in Plasmide kloniert, die eine Expression als N-terminale *Myc*-Epitop (orange) -Fusionsproteine unter dem P38-Promoter erlauben. Stabil transfizierte A9 Zelllinien A9:P38*Myc*PDKwt (B) oder A9:P38*Myc*PDK-S244A (C) wurden auf Objektträgern kultiviert, mock (1) oder MVM (MOI 20) infiziert (2) und 24 h p.i. mit 3 % p-Formaldehyd fixiert. PDK-1 Mutanten wurden durch polyklonales Kaninchenserum gegen das N-terminale *Myc*-Epitop detektiert. Die Aufnahmen wurden am Leica Leitz DMRD Mikroskop, 63x Ölimmersionsobjektiv erstellt und freundlicher Weise von Dr. Nüesch zur Verfügung gestellt.

Um diese Zelllinien auch biochemisch zu charakterisieren, wurde die bereits in Kapitel 3.2.1.1 vorgestellte Löslichkeitsfraktionierung angewendet. Mock- und MVM- infizierte Zellen der PDK Zelllinien wurden durch Abschaben geerntet und nach Zellaufschluß durch Frieren/Tauen zur schrittweisen Solubilisierung von Membran-gebundenen Proteinen mit verschiedenen Detergenzien behandelt. Die Verteilung der PDK-1-Mutanten in den entsprechenden Fraktionen ist in Abb. 32 gezeigt. Es fällt auf, daß die exprimierte Menge in nicht infizierten A9-Zellen viel höher ist, als es von der Immunfluoreszenzauswertung erwartet worden war. Dies kann als Indiz dafür verstanden werden, daß eine Vielzahl von Zellen *Myc*-PDK Varianten offenbar auf sehr geringem Niveau exprimieren, was den Nachweis durch Immunfluoreszenz erschwert, aber durch Analyse einer Zellpopulation mittels Western Blotting sichtbar wird. Weiterhin kann festgestellt werden, daß sich PDKwt hauptsächlich in den löslichen Fraktionen wiederfindet bzw. mit milden Detergenzien in Lösung gebracht werden konnte (Abb. 32 A; Spuren 1,2,3). Nach Infektion erhöht sich der Anteil an überexprimierter PDKwt erwartungsgemäß. Darüber hinaus ist aber auch eine deutliche Zunahme in der unlöslichen Fraktion S₅ und der schwerlöslichen Fraktion S₄ zu beobachten (Spuren 4,5,9,10). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Produktion von Phosphoinositid-3,4,5-triphosphaten sein, die eine Membranassoziation von PDK-1 auslösen. Interessanterweise befindet sich die inaktive Mutante PDK-S244A von Anfang an, d.h. in mock- und MVM- infizierten Zellen, in allen fünf Fraktionen wieder und im Vergleich zu PDKwt auch in signifikant erhöhter Menge in der unlöslichen Fraktion S₅ (Abb. 32 B; Spuren 1-10). Es ist anzunehmen, daß diese Mutante aufgrund einer veränderten Konformation gegenüber der wt-Kinase nicht empfänglich für die Bindung von Substraten ist, jedoch durch ihre PH-Domäne auf Signale durch Phosphatidylinositol-Phosphate reagiert und verstärkt Membran-assoziiert. Wenn PDK-S244A durch seine Punktmutation auch eine erhöhte Halbwertszeit besitzt als PDKwt, wäre es denkbar, daß sie sowohl an den Orten vorliegender Stimulation als auch an Orten in der Zelle nachweisbar ist, an denen keine PDK-aktivierenden Signale vorliegen. Die Charakterisierung der PDK-Mutanten-Zelllinien läßt sich dahingehend zusammenfassen, daß im Vergleich mit der endogenen Kinase diese Zelllinien durchaus geeignet erschienen, die Aktivierung von PKC η detaillierter zu untersuchen.

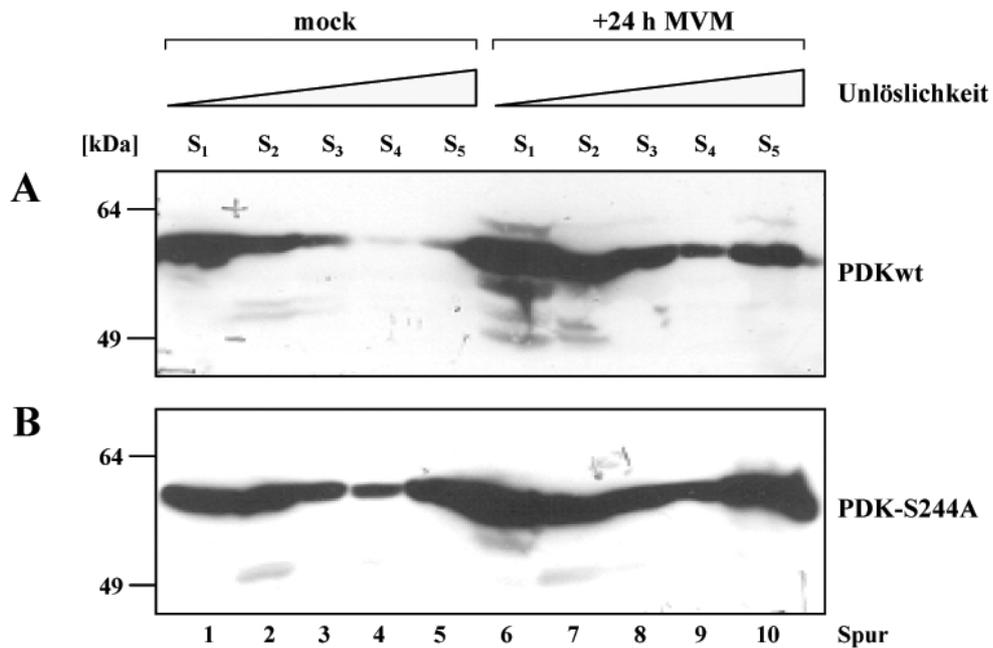


Abb. 32: Expression und Löslichkeitsverteilung von PDK-1 Mutanten. *MycPDKwt*- (A) oder *MycPDK-S244A*- (B) transfizierte A9 Zelllinien wurden mock (Spuren 1-5) oder mit MVMp (MOI 10) (6-10) infiziert, 24 h p.i. geerntet und zum Nachweis ihrer Expression und Membranassoziation einer Detergenz-Löslichkeitsfraktionierung unterzogen (S₁ ohne Detergenz; S₂ Chaps; S₃ Chaps+DOC; S₄ Chaps+DOC+SDS; S₅ Lämmli-puffer und Hitzdenaturierung). Proteine wurden der Größe nach über SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und die PDK-Varianten mit einem spezifischen Antikörper gegen das N-terminale *Myc*-Epitop nachgewiesen.

3.2.4.2. Aktivierung von PKC η durch die MVM-Infektion ist abhängig von PDK-1

Zum Nachweis, ob PKC η in den PDK-Mutanten-Zelllinien durch eine MVM-Infektion aktiviert werden kann, war es naheliegend, erneut die Löslichkeitsfraktionierung dieser Zelllinien heranzuziehen. Eine vergleichbare Menge Zellen beider Zelllinien wurde für 24, 48 h oder gar nicht mit MVM-infiziert und nach den entsprechenden Zeitpunkten geerntet. Die nach Frier- und Tauzyklen gewonnenen Zellysate wurden wie bereits beschrieben fraktioniert (siehe auch 2.2.5.6.) und durch SDS-PAGE und Western Blotting auf eine Translokation von PKC η untersucht. Die Ergebnisse sind in Figur 33 abgebildet. Die PDKwt-Zelllinie zeigt denselben Phänotyp wie die parentale A9-Zelllinie in Hinblick auf eine MVM-induzierte Verschiebung von η zu unlöslichen Fraktionen (Abb. 33 A; Spuren 6,7,8,10). Interessanterweise, zeigt sich dieser Effekt auch hier nur am ersten Tag nach Infektion (Spuren 11-15; vergleiche Abb. 26). Eine ganz andere Verteilung ergibt sich hingegen in der PDK-S244A-Zelllinie. Hier ist die Menge an detektierbarer PKC η in nicht infizierten Zellen deutlich erniedrigt gegenüber der detektierten Menge an PKC η in infizierten Zellen (Abb. 33 B; Spuren 1-5). Es ist bemerkenswert, daß nach Infektion dieser Zelllinie keine Translokation von η in der hochmolekularen Form (ca. 180 kDa) in unlösliche Fraktionen zu beobachten ist (Spuren 6,11).

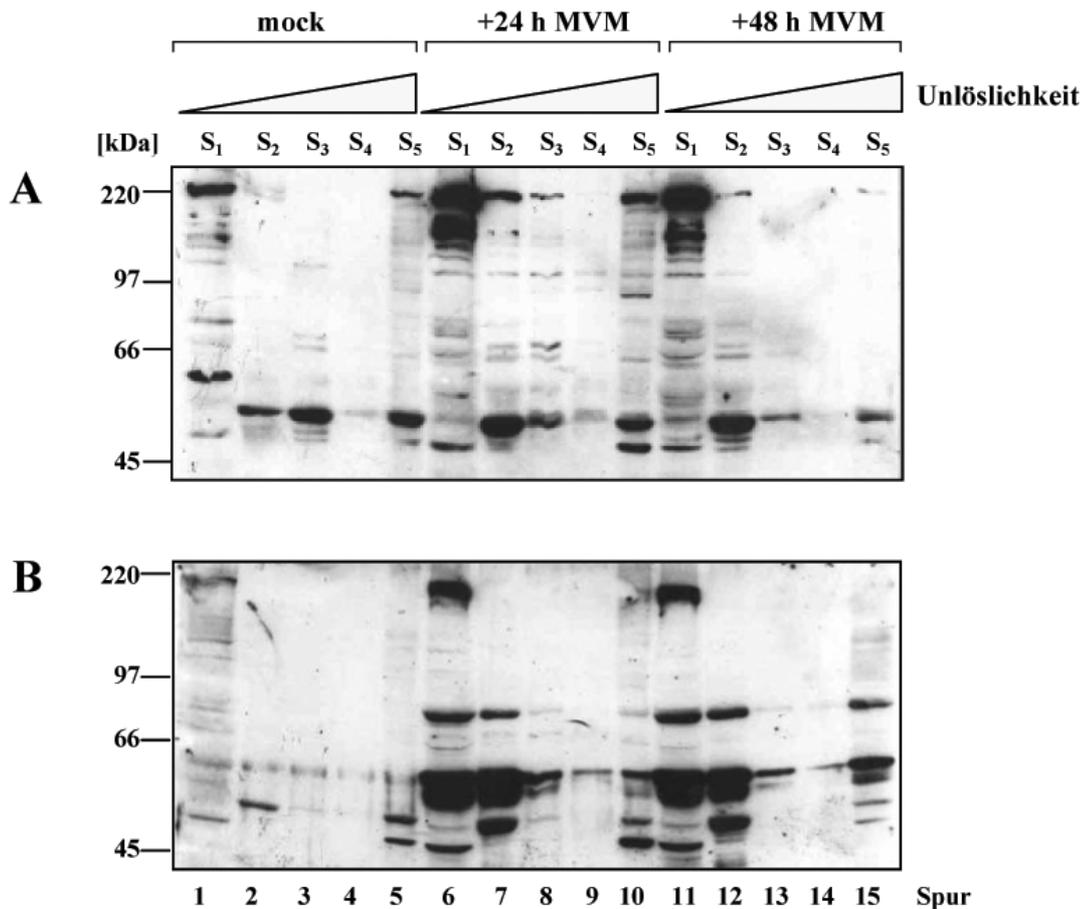


Abb. 33: Löslichkeitsverteilung von PKC η in Zelllinien, welche PDK-1 Varianten exprimieren. P38:*MycPDKwt*- (A) oder P38:*MycPDK-S244A*- (B) transfizierte A9 Zelllinien wurden mock (Spuren 1-5) oder mit MVMp (MOI 10) infiziert, 24 h (6-10) oder 48 h p.i. (11-15) geerntet und einer Fraktionierung mit zunehmender Detergenzstärke und Konzentration unterzogen (S₁ ohne Detergenz; S₂ Chaps; S₃ Chaps+DOC; S₄ Chaps+DOC+SDS; S₅ Lämmli-puffer und Hitzedenaturierung). Proteine wurden über SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt, geblottet und die PKC η durch polyklonales Antiserum nachgewiesen.

Allerdings tritt hier eine nicht vorher detektierte Bande bei 80 kDa auf, was dem tatsächlichen Molekulargewicht von η entsprechen würde. Darüber hinaus, liegen große Mengen an Degradationsprodukten vor (Spuren 6,7,11,12). Die A9:P38*MycPDK-S244A*-Zelllinie wurde ebenfalls einer Kompartiment-Fraktionierung unterzogen (Daten nicht gezeigt). Auch mit dieser Fraktionierungsmethode zeigte PKC η in der PDK-S244A-Zelllinie eine gegenüber A9 veränderte Verteilung nach Infektion. PKC η konnte ausschließlich zytoplasmatisch und an der Plasma- nicht aber der nukleären Membran nachgewiesen werden. Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse die Hypothese, daß die MVM-induzierte Aktivierung von PKC η durch eine inaktive PDK-1 Mutante unterbunden werden kann. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß der Aktivierung von η in infizierten Zellen eine Stimulierung von PDK-1 vorausgeht.

Die Aktivierung einer Kinase durch eine andere innerhalb einer Signalkaskade erfolgt direkt, manchmal unter Mithilfe sogenannter Strukturproteine, die ein Gerüst bilden, an dem sich beide Reaktionspartner treffen können. Auch die Aktivierung von PKC η durch PDK-1 setzt eine direkte Interaktion voraus, die bereits für konventionelle (Dutil, 1998) sowie *novel* und atypische PKC (Le Good, 1998) gezeigt wurde. Um diese Interaktion zwischen PDK-1 und PKC η auch bei der MVM-induzierten Aktivierung von η nachzuweisen, wurden beide Zelllinien, A9:P38PDKwt und A9:P38PDK-S244A, auf Objektträgern ausgesät und mock- oder MVM-infiziert. Nach Fixierung der Zellen mit p-Formaldehyd wurden beide Kinasen in der Immunfluoreszenz mit entsprechenden Antikörpern detektiert. Die PDK-Mutanten sind hier in grün dargestellt, endogene PKC η in roter Farbe. Bereiche, an denen beide Proteine simultan vorkommen, ergeben eine gelbe Färbung. Wie aus Abb. 34 ersichtlich, erkennt man solche gelben Überlappungsbereiche, in denen beide Kinasen kolokalisieren, hauptsächlich in der inaktiven PDK-S244A-Zelllinie. Das mag auf den ersten Blick unerwartet scheinen, da in dieser Zelllinie aufgrund der Punktmutation in PDK keine Aktivierung von PKC η stattfindet. Das schließt jedoch eine Interaktion beider Proteine nicht aus. Im Gegenteil, die Infektionsbedingten Stimuli sollten genauso freigesetzt werden, wie in A9-Zellen und könnten bei entsprechender konformationeller Empfänglichkeit der Kinasen durchaus eine Translokation zu den Orten der Stimulation bewirken. Da aber aufgrund fehlender Kinaseaktivität von PDK-1 die Aktivierung von PKC η nicht stattfinden kann, verbleiben beide Kinasen am Ort der Lipidstimulation (in Membrannähe). Wahrscheinlich ist aus diesem Grund das Zusammentreffen beider Proteine besonders gut in der Immunfluoreszenz der PDK-S244A Zelllinie erkennbar, da es zu keiner nachfolgenden Verschiebung von PKC η z. B. in Richtung nukleärer Membran kommen kann. Diese Interpretation wird auch durch die Lokalisation der inaktiven PKC η T512A Mutante gestützt, die sich wie gezeigt (Abb. 19), stark in Membran *ruffles* ansammelte und damit an vergleichbaren Orten in der Zelle nachweisbar war, wie hier die endogene η in der PDK-S244A- Mutanten-Zelllinie.

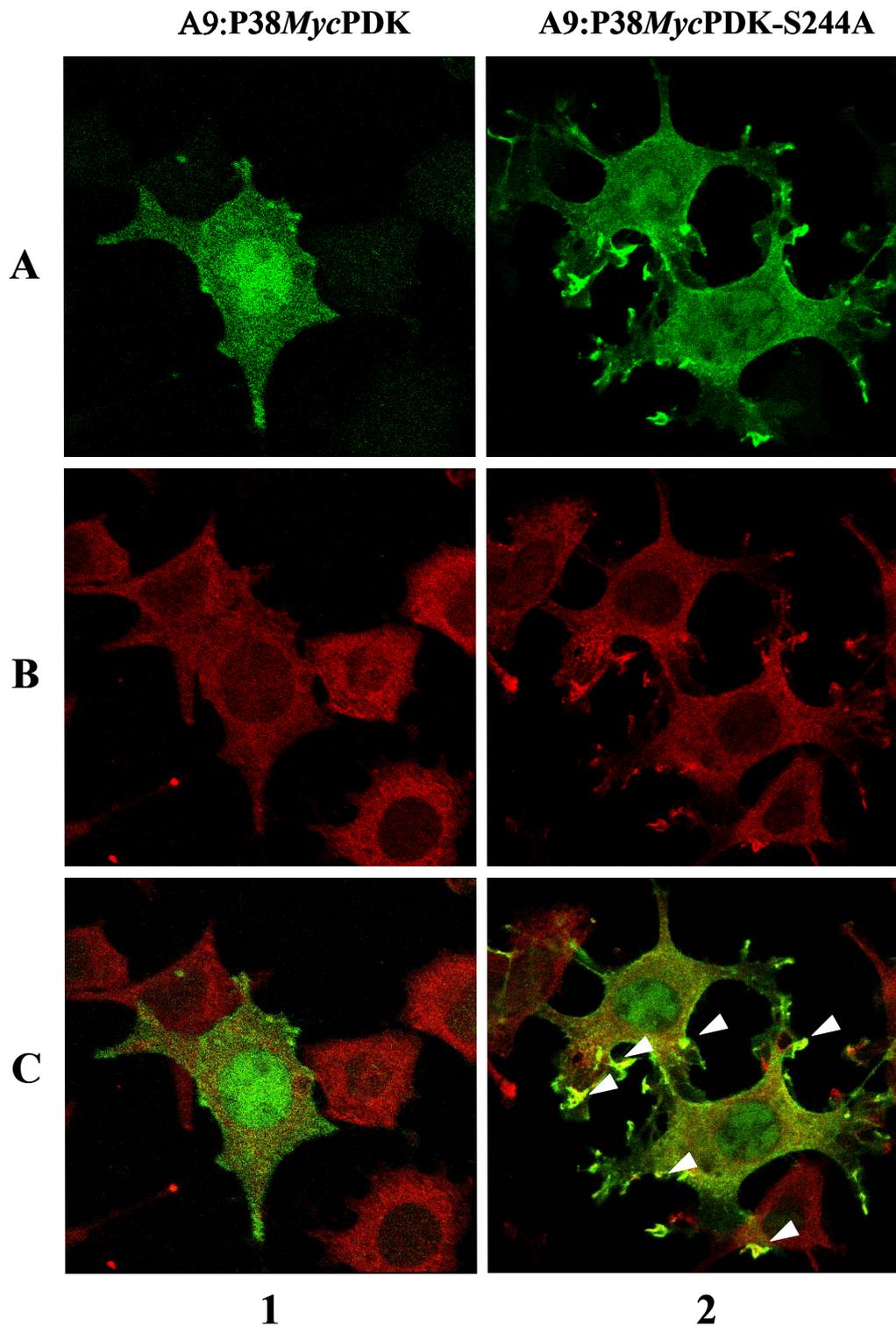


Abb. 34: Subzelluläre Lokalisation von PKC η und PDK-Varianten nach MVM Infektion. *Myc-PDKwt* (Spalte 1) oder *Myc-PDK-S244A* (2) stabil transfizierte A9 Zelllinien wurden auf Objektträgern kultiviert, mit MVM (MOI 20) infiziert und 24 h p.i. mit 3 % p-Formaldehyd fixiert. (A) Detektion überexprimierter PDK Mutanten wt (1) oder S244A (2) durch einen monoklonalen Antikörper und FITC (grün) gekoppelten Zweitantikörper (B), Nachweis von PKC η in beiden Zelllinien durch ein polyklonales Kaninchenserum und CY3 (rot) gelabelten Zweitantikörper. C: Merge, Kolokalisationsorte sind durch Dreiecke markiert. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Leica TCS SP Mikroskop, Ölimmersionsobjektiv 63x, FITC, TRITC Filtereinstellungen, *pinhole* 1.

3.2.5. MVM greift aktiv in intrazelluläre Signaltransduktionswege ein

3.2.5.1. Modell zum Ablauf einer MVM-induzierten Aktivierung des PI3-Kinase Signalweges

Betrachtet man die PDK-Verschiebung in Zusammenhang mit den bekannten Verteilungen von PKC λ und PKC η in infizierten A9-Zellen und berücksichtigt den zeitlichen Ablauf der Translokationen dieser Kinasen, kann man zu folgendem hypothetischem Aktivierungsmodell gelangen: Der Viruseintritt in die Zelle aktiviert den PI3-Kinase Signalweg, was durch Freisetzung von PtdIns[3,4,5]P₃ (PIP) zu einer Aktivierung von PDK-1 an der Plasma- sowie der nukleären Membran bzw. im Nukleus führt. Dort könnte es zu einer nachfolgenden Stimulierung von PKC λ durch PDK-1-Phosphorylierung des Threonins im Aktivierungsloop der Kinase kommen. Für PKC λ wurde ein nukleäres *shuttling* beschrieben, bei dem nach Tyrosin-Phosphorylierung (Y256) Importin β die NLS der Kinase erkennt und einen Transport in den Zellkern ermöglicht (White, 2002), während der Export von λ über die NES in CRM1-Abhängigkeit erfolgt (Perander, 2001). Nach Aktivierung von λ durch PDK-1 könnte in unserem Aktivierungsmodell die Kinase somit über CRM1 aktiv aus dem Nukleus ins Zytoplasma geschleust werden, um dort möglicherweise PKC η zu aktivieren. Bislang wurde publiziert, daß die atypische PKC ζ andere PKC-Isoformen wie PKC δ durch Phosphorylierung im hydrophoben Motiv aktivieren kann (Ziegler, 1999). Es liegt also die Vermutung nahe, daß eine Aktivierung, wie sie in A9-Zellen nach MVM-Infektion für PKC η beobachtet wurde, neben PDK-1 auch die atypischen PKC involviert. Geht man von dieser Annahme aus, ist eine Aktivierung von PKC η durch PKC λ im Zytoplasma vorstellbar, da PKC ζ in MVM-infizierten A9 ausschließlich zytoplasmatisch nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt) und nicht wie PKC λ an Orten der PDK-1 Stimulation nach MVM-Infektion vorkommt. Im letzten Schritt des Modells könnte es durch Mediatorproteine und/oder Ligandenstimulation zu einem Transport aktivierter PKC η an die nukleäre Membran kommen.

Um die Hypothese zu überprüfen, daß PKC λ für die Phosphorylierung des Threonins im hydrophoben Motiv von PKC η verantwortlich sein könnte, sollte die MVM-induzierte Aktivierung von PKC η in einer Zelllinie analysiert werden, in der PKC λ ausgeschaltet ist. Die katalytische Inaktivierung endogener PKC λ durch die dominant negative Mutante, bestehend aus der regulatorischen Domäne von PKC λ ist in Experimenten nachgewiesen worden (Nüesch, 2003). Für die Inaktivierung endogener PKC λ in A9-Zellen wurde A9:P38PKC λ DN-EGFP hergestellt, eine Zelllinie, die die regulatorische Domäne von PKC λ als Fusionsprotein mit EGFP unter Kontrolle des NS1-induzierten P38-Promotors produziert (für diese Arbeit durch Dr. Nüesch bereitgestellt). Durch radioaktive Markierung mittels [γ -

³²P] ortho-Phosphat sollte der Phosphorylierungsgrad von PKC η in der Zelllinie mit ausgeschalteter PKC λ analysiert und mit dem erzielten Phosphorylierungsgrad von η bei Vorliegen aktiver PKC λ verglichen werden. Da sich eine Immunpräzipitation von PKC η bei verschiedenen Experimenten jedoch problematisch gestaltet hatte, erschien es sinnvoll, bei diesem Experiment anstatt mit der endogenen Isoform η , mit den etablierten *Flag*-PKC η -Mutanten zu arbeiten. Auf Basis der A9:P38PKC λ DN-EGFP Zelllinie wurden deshalb Doppelzelllinien hergestellt (Nüesch, unveröffentlichte Arbeiten), die neben λ DN auch die PKC η -Mutanten η A160E sowie η T512A überexprimieren, die sich aufgrund ihres N-terminalen *Flag*-Epitops gut präzipitieren lassen. Daraus resultieren die Zelllinien A9:P38PKC λ DN- η A160E und A9:P38PKC λ DN- η T512A, die vor der Durchführung des *in vivo* Markierungsexperimentes auf Expression von PKC λ -EGFP und den Mutanten η A160E und η T512A durch Immunfluoreszenz überprüft (Daten nicht gezeigt) und für nachfolgend beschriebenes Experiment verwendet wurden. Zur Kontrolle wurden in diesem Experiment auch die jeweiligen Einzelzelllinien A9:P38 η A160E und A9:P38 η T512A sowie die parentalen A9 mitgeführt. Entsprechend des beschriebenen Aktivierungsmodells wäre zu erwarten, daß PKC η in den Zelllinien mit ausgeschalteter PKC λ -Aktivität deutlich weniger phosphoryliert wird, als in den Einzelzelllinien A9:P38 η A160E, A9:P38 η T512A oder A9.

Die Zelllinien: A9:P38PKC λ DN- η A160E, A9:P38PKC λ DN- η T512A, sowie zur Kontrolle A9:P38 η A160E, A9:P38 η T512A und A9 wurden jeweils auf 15 cm Zellkulturschalen ausgesät, zur Induzierung der λ - und η -Mutanten-Expression unter Kontrolle des P38-Promotors mit MVM-infiziert (MOI 20) und 24 h nach Infektion für 4 h mit [γ -P³²] ortho-Phosphat bei 37°C inkubiert (siehe Methode 2.2.3.5.). Im Anschluß an diese Inkubationszeit wurden die Zellen durch Abschaben geerntet und in Raf-Puffer mit Proteinase- und Phosphataseinhibitoren lysiert (siehe 2.2.5.8.). PKC η A160E und η T512A wurden danach durch Inkubation mit einem *Flag*-spezifischen Antikörper (M2) und Protein-G-Sepharose aus den entsprechenden Zellysaten bei 4 °C immunpräzipitiert, während für die endogene Kinase aus A9 ein polyklonales Antiserum verwendet wurde. Zur Analyse der PKC η -Phosphorylierung wurden die Immunpräzipitate durch SDS-PAGE aufgetrennt und entsprechend ihres autoradiographischen Signals ausgewertet. Um Unterschiede im Phosphorylierungsgrad von PKC η auf fehlende Phosphatgruppen, nicht aber auf quantitative Unterschiede in der jeweiligen immunpräzipitierten Proteinmenge zurückführen zu können, wurden von allen Zelllinien parallel Western Blot Analysen vorgenommen. Somit war ein direkter Vergleich der Phosphatsignalbanden von PKC η in allen Zelllinien möglich. Nachfolgend ist das Ergebnis für die PKC η T512A-Mutante abgebildet (Abb. 35). Es wird deutlich, daß, obwohl die Menge an immunpräzipitierter η T512A in der Einzelzelllinie verglichen zur Doppelzelllinie deutlich geringer ist (Abb. 35; Spuren 1,2), ein signifikant

stärkeres Phosphorylierungssignal dieser Mutante in der Einzelzelllinie vorliegt (Spur 3). In Gegenwart von PKC λ DN jedoch wird die Kinase kaum phosphoryliert (Spur 4). Bei identischen Mengen präzipitierter η T512A würde der unterschiedliche Phosphorylierungsgrad der Mutante in beiden Zelllinien also noch deutlicher werden. Damit bestätigt dieses Ergebnis die oben dargelegte Hypothese, in der PKC λ für die Aktivierung von PKC η favorisiert wird. Das *in vivo* Markierungsexperiment wurde parallel auch für die konstitutiv aktive Mutante η A160E durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Wider Erwarten war jedoch weder in der Einzel- d.h. bei vorhandener PKC λ - Aktivität, noch in der Doppelzelllinie mit ausgeschalteter PKC λ -Aktivität eine signifikante Phosphorylierung der η A160E Mutante zu beobachten. Möglicherweise ist die bereits aktive Mutante aufgrund ihrer Konformation oder ihrer zellulären Lokalisation kein Substrat von PKC λ . Nach diesem vorläufigen Experiment bleibt zu klären, ob die gezeigte *in vivo* Phosphorylierung von PKC η T512A in Abhängigkeit der PKC λ -Aktivität direkt oder indirekt erfolgt und möglicherweise in der zellulären Signalkaskade zur Aktivierung von PKC η ebenso fest verankert ist, wie PKC ζ für andere Isoformen. Allerdings steht eine Bestätigung durch Wiederholung dieses Experimentes sowie eine Absicherung durch weitere Analysen noch aus.

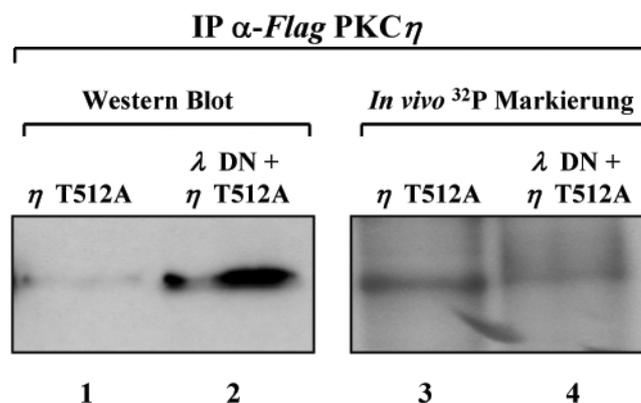


Abb. 35: Immunpräzipitation der *in vivo* [³²P] markierten PKC η Mutante η T512A. 2×10^7 (für Western Blotting) oder 4×10^7 (für *in vivo* Markierung) stabil transfizierte Zellen von A9:P38PKC η T512A (1,3) und A9:P38PKC λ - DN+ η T512A (2,4) wurden mit MVMP infiziert (MOI 20) und 24 h p.i. mit [γ -³²P] ortho-Phosphat für weitere 4 h markiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die chromosomale DNA entfernt. Aus den Überständen wurde in Gegenwart von monoklonalem *Flag*-Antikörper und Protein G-Sepharose die *Flag*-PKC η Mutante in Raf-Puffer immunpräzipitiert. Die Proteine wurden der Größe nach über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und PKC η durch spezifisches Antiserum mittels ECL-Detektion (1,2) oder autoradiographisch nachgewiesen (3,4).

3.3. Mediatorproteine für die Regulation von PKC η

In den vorherigen Kapiteln (3.1. und 3.2.) wurde dargelegt, daß für eine produktive Virusvermehrung während des MVM-Infektionszyklus PKC η benötigt wird. Es konnte gezeigt werden, daß diese Kinase selbst erst durch das Virus aktiviert wird. Die Aktivierung von PKC η äußert sich in einer veränderten Löslichkeit der Kinase, da das Protein mit unterschiedlichen subzellulären Strukturen, wie z.B. Zytoskelettfilamenten oder Membranen assoziiert sein kann. Darüber hinaus konnte eine Translokation von PKC η zur nukleären Membran in infizierten Zellen beobachtet werden. Neben den zur Aktivierung erforderlichen Phosphorylierungsreaktionen am C-Terminus der PKC sind auch eine Vielzahl von Interaktionspartnern beschrieben worden, die zum gezielten Positionieren der Kinasen an entsprechenden Membranoberflächen in der Zelle beitragen (Übersicht bei Jaken, 2000). Diese Interaktionspartner können selektiv im inaktiven Zustand, wie z.B. Ricks (*receptor for inactive C-kinase*), oder im aktiven Zustand, als sogenannte Racks (*receptor for activated C-kinase*), an ausgewählten Bereichen entweder direkt in der regulatorischen Domäne oder indirekt über eine PS-Brücke an spezifische PKC-Isoformen binden. Dadurch kann ein Transport der Kinasen zum Zielort innerhalb der Zelle erreicht werden. Solche „Verankerungsproteine“ (*anchoring proteins*) stellen kein Substrat für PKC dar, da sie nicht die katalytische Tasche der Kinase besetzen. Zu dieser bedeutenden Gruppe von PKC-Bindungspartnern zählen ebenfalls die „Gerüstproteine“ (*scaffold proteins*). Diese Proteine sind so aufgebaut, daß sie zahlreiche Protein-Protein-Interaktionsdomänen (z.B. PDZ, oder PH-Domänen) in unmittelbarer Nachbarschaft auf einem Molekül präsentieren, um eine Basis für multiple Enzym-Substrat-Reaktionen zu schaffen. Sie fungieren als Adaptoren, die gebundene Proteine als Interaktionspartner zusammenhalten und stabilisieren. Zu ihnen zählen beispielsweise InaD, Syndecan-4, aPKC-Bindungsproteine wie LIP, ZIP, ASIP, par-4 A170, EBIAP oder p62 (Übersichten bei: Schechtman, 2001; Jaken, 2000; Newton, 1996). Darüber hinaus werden die Adaptoren durch viele Signalmoleküle modifiziert, womit sie wichtige Verbindungsglieder für einen *crossstalk* zwischen PKC und anderen zellulären Kaskaden bilden. Eine genaue Unterscheidung zwischen Verankerungs- und Gerüstproteinen erscheint mit zunehmendem Wissen über die vielfältigen Funktionen dieser Proteine nicht mehr möglich, da inzwischen auch für Racks Adaptorfunktionen nachgewiesen wurden (Schechtman, 2001). Demgegenüber sind jedoch weitere, weniger selektive Verankerungsproteine bekannt, die von PKC phosphoryliert werden. Aus diesem Grund werden sie als STICKs (*substrates that interact with C-kinase*) bezeichnet.

Bei den Aufreinigungen eines HeLa-Zellextrakts, die zur Identifizierung von PKC η als NS1-regulierende Kinase führten, wurde in zwei unterschiedlichen Aufreinigungsstrategien festgestellt, daß die aktivierende Komponente PKC η zusammen mit ERM- (**E**zrin **R**adixin **M**oesin) Proteinen gefunden wurde (siehe Abb. 13). Interessanterweise steht diese Familie

ebenfalls im Verdacht, als Mediatorproteine eine Verankerung von PKC-Isoenzymen an der Plasmamembran und dem Aktinzytoskelett zu vermitteln (Nüesch, persönliche Mitteilung). Möglicherweise können sie dabei die Substratspezifität der PKC beeinflussen (siehe auch 1.3.1.4). Bisher ist PKC α in einem Komplex mit Ezrin *in vivo* nachgewiesen worden (Ng, 2001). Außerdem ist Ezrin bereits als Verankerungsprotein für cAMP-abhängige Protein-Kinasen identifiziert worden (Dransfield, 1997) und kürzlich wurde den ERM-Proteinen eine neue funktionelle Rolle als Adaptorproteinen zwischen einem Leukozytenadhäsionsmolekül und der Tyrosinkinase Syk nachgewiesen (Urzainqui, 2002). Da nicht alle PKC-Isoformen in der Lage sind, wie beispielsweise PKC βI , II und PKC ϵ selbst direkt an Aktinfilamente zu binden (Blobe, 1996; Prekeris, 1996), kann man sich auch eine ERM-abhängige Verankerung von PKC in Abhängigkeit ihrer Aktivität mit dem Zytoskelett oder Membranproteinen vorstellen. Diesem Aspekt sollte im Hinblick auf PKC η in der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden. Eine solche Positionierung von PKC η hätte wahrscheinlich auch Auswirkungen auf die Zellgestalt, eine Hypothese, die Unterstützung erlangt, wenn man sich die in Kap. 3.1.2.1 beschriebene Morphologie der PKC η -Mutanten-überexprimierenden Zellen in Erinnerung ruft. Um die einzelnen intrazellulären Vorgänge, das heißt einerseits die Aktivierung und Verschiebung von PKC η , sowie andererseits, die nachfolgenden Effekte aufgrund von PKC η -abhängigen Phosphorylierungsreaktionen zu unterscheiden, sollte zunächst zum besseren Verständnis des parvoviralen Vermehrungszyklus der Einfluß einer MVM-Infektion auf das Zytoskelett der A9 Fibroblasten näher charakterisiert werden. Insbesondere war es Ziel, eine Abhängigkeit der induzierten morphologischen Veränderungen von der PKC-Aktivität in der Zelle zu studieren. Dabei war es von großem Interesse zu zeigen, daß nicht nur bestimmte PKC-Isoformen an der Steuerung der NS1-Aktivität beteiligt sind (Kap 3.1), sondern daß vielmehr auch eine Rückkopplung denkbar wäre, in der NS1 eventuell im Zusammenspiel mit weiteren viralen oder zellulären Proteinen dieselben regulatorischen Kinasen benutzt, um das Zytoskelett der Zelle zu seinen Gunsten umzugestalten. In diesem Sinne sind Mediatorproteine zwischen Kinasen und subzellulären Strukturen durchaus in Betracht zu ziehen. Aus diesem Grund soll im nachfolgenden Kapitel der Aktivierungs- und Wirkungsprozeß von PKC η im Zusammenhang mit einer möglichen Funktion der ERM-Proteine genauer behandelt werden.

3.3.1. PKC η beeinflusst das Löslichkeitsverhalten der ERM-Proteine

Die ERM-Proteine werden für ihre Funktionen hauptsächlich durch Phosphorylierungen reguliert. Ähnlich den PKC-Isoenzymen bewirken die eingeführten Phosphatgruppen an den S/T- oder Y-Resten einen Wechsel von einer geschlossenen zu einer geöffneten Konformation der ERM-Proteine. Das ermöglicht die Zugänglichkeit bestimmter Domänen für ihre Bindungspartner. So kommt es beispielsweise nach Phosphorylierung des C-terminalen

Threonins (566/564/547) zur Bindung der ERM-Proteine an Aktinfilamente. Außerdem kann die N-terminale FERM-Domäne bei Vorliegen spezifischer Liganden in ihrer offenen Konformation an Membranstrukturen binden. Beide Vorgänge resultieren in einer Unlöslichkeit der Proteine, während die ERM-Proteine in der inaktiven geschlossenen Konformation löslich bleiben. Eine einfache Art zu überprüfen, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen der PKC η -Aktivität und dem Aktivitätszustand der ERM-Proteine besteht, liegt demnach darin, mit Hilfe einer Fraktionierung die A9-Zelllinien mit modulierter PKC η -Aktivität auf die Löslichkeit der ERM-Proteine zu untersuchen. Neben den PKC η -Mutanten-Zelllinien wurde auch von der A9-Zelllinie mit reduzierter PDK-Aktivität (A9:P38MycPDK-S244A) als weitere Kontrolle einer PKC η inaktiven Zelllinie Gebrauch gemacht. Da die konstitutiv aktive (η A160E), die inaktive (η T512A) sowie die PDK-S244A Mutante alle in ausreichenden Mengen auch bei Nichtinduktion des P38-Promotors exprimiert werden, und um einen Einfluß der viralen Proteine auszuschließen, wurde diese Löslichkeitsfraktionierung zunächst nur von nicht infizierten Zellen durchgeführt. In Abb. 36 ist das Ergebnis von drei repräsentativen Experimenten für Radixin dargestellt. Die deutlichste Zunahme und Verschiebung der ERM-Proteine zu unlöslichen Fraktionen trat in Gegenwart von inaktiver PKC η auf (Abb. 36; Spuren 3,4,5), während sich in der konstitutiv aktiven PKC η Zelllinie (η A160E) die ERM-Proteine lediglich in den leicht löslichen Fraktionen nachweisen ließen. Somit besteht eine Korrelation zwischen dem Aktivitätszustand von PKC η und der Löslichkeit von ERM. Ezrin und Moesin zeigten in allen Zelllinien ein ähnliches Löslichkeitsverhalten wie Radixin (Daten nicht gezeigt). Da die Unterschiede für Radixin am ausgeprägtesten waren, konzentrierten sich nachfolgende Experimente hauptsächlich auf dieses Protein.

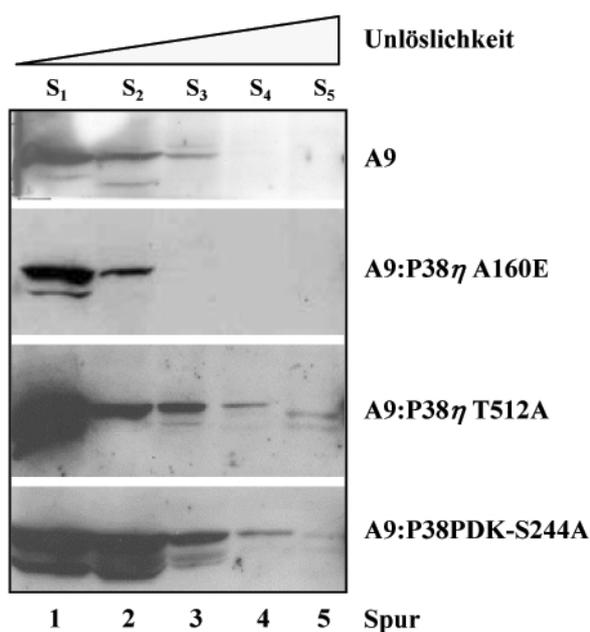


Abb. 36: Löslichkeitsverteilung von Radixin in Abhängigkeit von der PKC η Aktivität. A9, A9:P38PKC η A160E, A9:P38PKC η T512A und A9:P38PDK-S244A Zellen wurden nach Zellaufschluß einer Detergenz-abhängigen Fraktionierung unterzogen: S₁ ohne Detergenz; S₂ Chaps; S₃ Chaps+DOC; S₄ Chaps+DOC+SDS; S₅ Lämmli-puffer und Hitze-denaturierung (Spuren 1-5). Proteine wurden über SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt, geblottet und mit Radixin spezifischem Antiserum auf dessen Membran- und Zytoskelett-assoziation hin untersucht.

3.3.2. Radixin ist kein direktes Substrat von PKC η

Da die ERM-Proteine durch eine Vielzahl von Phosphorylierungen reguliert werden, war es naheliegend zu untersuchen, ob Radixin ein mögliches Substrat für PKC η darstellt. Für PKC θ konnte eine Kinase-Substratbeziehung zu Moesin bereits *in vitro* sowie durch Aufreinigung aus einer Moesin-aktivierenden zellulären Fraktion gezeigt werden (Pietromonaco, 1998). Erstaunlicherweise besitzen ERM-Proteine an dieser C-terminalen Phosphorylierungsstelle KYKTLRQIR eine Domäne, die sich durch eine sehr hohe Homologie zur Pseudosubstratdomäne in PKC auszeichnet [Prozentangaben für die Homologie zu Moesin: PKC ζ (38 %); PKC $\alpha,\beta,\gamma,\epsilon,\eta$ (50 %) PKC δ,θ (75 %)]. Um einen *in vitro* Phosphorylierungsassay mit PKC η durchführen zu können, mußte Radixin zuerst als rekombinantes Protein hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurde die cDNA von Radixin aus einer A9 cDNA-Bibliothek gewonnen und anschließend als pQE32-Konstrukt mit N-terminalem His₆-Tag kloniert (siehe Anhang 6.2.). Das Plasmid wurde in *Escherichia coli* transformiert und das exprimierte Protein aus Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) über SDS-PAGE und Renaturierung durch schrittweise Dialyse gegen NP-40 und Salz aufgereinigt. Ein Vorteil des gewählten bakteriellen Expressionssystems ist das Fehlen von posttranslationalen Modifikationen, so daß aus *E.coli* aufgereinigtes Radixin ohne vorherige Behandlung als nicht phosphoryliertes Substrat im *in vitro* Phosphorylierungsassay eingesetzt werden konnte. Abb. 37 belegt, daß Radixin in ausreichender Menge (Spur 3), mit zufriedenstellender Abtrennung bakterieller Proteine aufgereinigt werden konnte (Spur 2) und somit als Substrat für Kinase-Assays zur Verfügung stand.

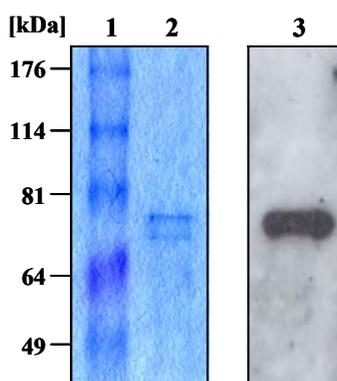


Abb. 37: Aufreinigung von rekombinantem Radixin. pQE32-Rdx, ein bakterielles Expressionsplasmid, das die kodierende Sequenz unter Kontrolle des Tryptophanoperons enthält, wurde in *E. coli* (SURE) transformiert und die Expression von Radixin durch Zugabe von IPTG induziert. Nach Zellaufschluß wurde unlösliches Radixin aus Einschlusskörpern isoliert und über präparative SDS-PAGE weiter aufgereinigt. Nach Gelextraktion, schrittweiser Dialyse zur Renaturierung des Proteins und Aufkonzentrierung wurde 1/10 der Gesamtmenge zu analytischen Zwecken mit SDS-PAGE aufgetrennt, CBB gefärbt (1,2) oder durch Western Blotting (3) auf den Gehalt an Radixin überprüft.

Für den Phosphorylierungsassay von Radixin wurden ausgewählte PKC-Isoenzyme eingesetzt, sowie Casein Kinase II und PDK-1 als Negativkontrollen mitgeführt. Die Reaktion wurde in Gegenwart von PKC Aktivatoren, bzw. für PDK-1 in Gegenwart von Magnesium and β -Glycerolphosphat, sowie [γ -³²P] ATP zur Detektion der transferierten Phosphatgruppen durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden anschließend vollständig auf ein SDS-

Polyacrylamidgel aufgetragen, entsprechend dem Molekulargewicht der Reaktionspartner aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet. Da sich die Größe der eingesetzten Kinasen meistens kaum von der Größe des Substrats unterschied, war aufgrund der Autophosphorylierung der PKC ein spezifisches Reaktionsprodukt nur im Vergleich mit der Negativkontrolle ohne Substrat erkennbar (Abb. 38).

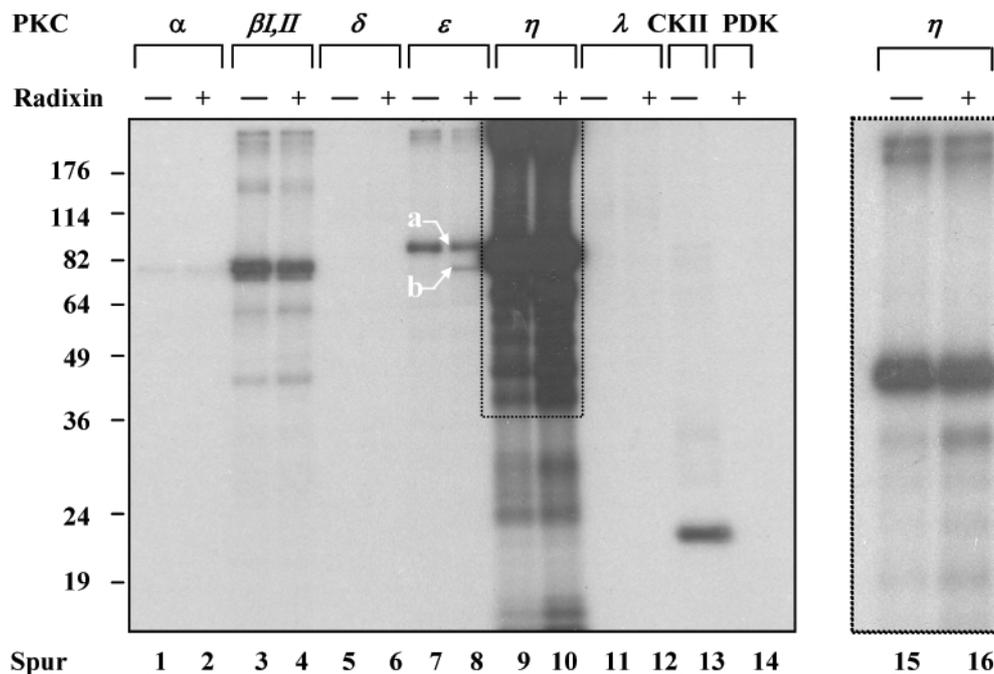


Abb. 38: *In vitro* Phosphorylierung von Radixin durch ausgewählte Kinasen. Aus *E.coli* aufgereinigtes Radixin wurde als Substrat zur *in vitro* Phosphorylierung durch PKC α (1,2); PKC $\beta I, II$ (3,4); PKC δ (5,6); PKC ϵ (7,8); PKC η (9,10,15,16); PKC λ (11,12), CKII α (13) und PDK-1 (14) eingesetzt. Die Reaktionen wurden in Gegenwart von PKC Aktivatoren TPA und PS (Spuren 1-12, 15,16) bzw. von Magnesium und β -Glycerolphosphat (Spur 14) sowie [γ - ^{32}P] ATP 40 min bei 37°C durchgeführt. Die Zugabe von Stop-Puffer beendete die Reaktionen. Proteine wurden danach durch SDS-PAGE aufgetrennt, fixiert, getrocknet und autoradiographisch ausgewertet. Die Pfeile in Spur 8 kennzeichnen die Banden der autophosphorylierten Kinase (a) und des Substrates (b). Spuren 15 und 16 zeigen die beiden η -Reaktionsansätze vergrößert in einer kürzeren Exposition.

Lediglich PKC ϵ zeigte ein spezifisches Phosphorylierungssignal für Radixin (Abb. 38; Spur 8). Die Signalintensität des PKC η -Reaktionsansatzes beruht wahrscheinlich auf einer höheren Ausgangskonzentration der Kinase. In einer kürzeren Exposition (Spuren 15,16) ist klar erkennbar, daß es keine spezifischen Bandenunterschiede zwischen der Negativkontrolle und dem Reaktionsansatz mit Radixin als Substrat gibt. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß Radixin kein direktes Substrat von PKC η *in vitro* darstellt. Dies ist auch in Einklang mit dem Ergebnis der Löslichkeitsfraktionierung, welche darauf hinweist, daß die PKC η -Aktivität nicht zu einer Zytoskelett- oder Membranassoziation führt und somit den inaktiven Zustand von Radixin begünstigt.

3.3.4. Radixin kolokalisiert mit PKC η -Mutanten

Um zu überprüfen, ob die ERM-Proteine möglicherweise als Gerüstprotein für PKC η dienen, daß jedoch im Fall von Radixin kein Substrat der Kinase darstellt, wurde die intrazelluläre Verteilung von endogenem Radixin ermittelt. Durch Doppel-Immunfluoreszenz zusammen mit den bereits beschriebenen PKC η -Varianten sollte durch konfokale Mikroskopie herausgefunden werden, ob beide Proteine in der Zelle in ähnlichen Strukturen vorkommen. Für den Fall einer Kolokalisation war von Interesse, eine Abhängigkeit vom Aktivitätszustand der Kinase zu untersuchen. Wie bereits in vorhergehenden Experimenten wurden erneut die stabil transfizierten PKC η -Zelllinien verwendet. Da das Signal der PKC η -Mutanten in der Immunfluoreszenz in nicht infizierten Zellen deutlich schlechter ist, als das Signal vergleichbarer Zellen im Western Blotting, wurde es für dieses Experiment vorgezogen, mit infizierten Zellen zu arbeiten. In Abb. 39 sind ausgewählte Aufnahmen aller Zelllinien repräsentativ dargestellt. Endogenes Radixin wurde durch ein grünes, die PKC η -Mutanten bzw. endogene PKC η in A9-Zellen durch ein rotes Signal dargestellt, überlappende Bereiche erscheinen in gelb. Zur Absicherung, daß es sich bei den gelben Farbbereichen um wirkliche Kolokalisationsorte beider Proteine handelt, wurde von allen vier Zelllinien sowohl eine Einzelschicht von 0,2 μm als auch ein berechnetes Mittelbild aus mehr als 30 Einzelschichtbildern dargestellt (sogenannter *extended focus*). Überraschenderweise, zeigten sich in drei Zelllinien, den A9 Parentalzellen, sowie den A9-Zellen mit stabil transfizierter konstitutiv aktiver PKC η A160E oder inaktiver η T512A größere Bereiche, in denen beide Proteine am selben Ort in der Zelle angefärbt werden konnten. Während die überexprimierten η -Mutanten deutlich an der Plasmamembran zusammen mit Radixin vorliegen, scheint in den A9-Parentalzellen die nukleäre Membran Ort der Kolokalisation zu sein. Wie in Kapiteln 3.1.2.1. und 3.2.2. dargelegt, ist die nukleäre Membran Zielort für aktivierte endogene PKC η nach MVM-Infektion. In nicht infizierten Zellen ist keine ausgeprägte Akkumulation der endogenen Kinase an diesem Ort zu beobachten, so daß sich auch mit Radixin keine Kolokalisationsbereiche bilden (Daten nicht gezeigt). Erschwerend kommt hinzu, daß die ERM-Proteine in großer Menge im Zytoplasma der Zelle vorhanden sind. Mittels Immunfluoreszenz ist daher auch nach MVM-Infektion keine subzelluläre Ortsänderung dieser Proteine nachzuweisen. Möglicherweise kommt es aber zu einer lokalen Aktivierung der ERM-Proteine durch Phosphorylierung. Genauere Aussagen, ob das ort- und zeitgleiche Auftreten von Radixin und PKC η auch zu einer Interaktion führt, können mit der Immunfluoreszenz allein jedoch nicht getroffen werden. Hierfür wären weitergehende Untersuchungen z.B. durch Elektronenmikroskopie oder FRET- (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) Experimente erforderlich. Für die dominant negative Mutante PKC η DN, obwohl sie deutlich in der nukleären Membran angereichert ist, ergab sich kein Überlappungsbereich mit Radixin. Eine Ursache hierfür mag in der C-terminalen Deletion dieser Mutante liegen. Damit ist es sehr wahrscheinlich, daß der C-Terminus von PKC η für

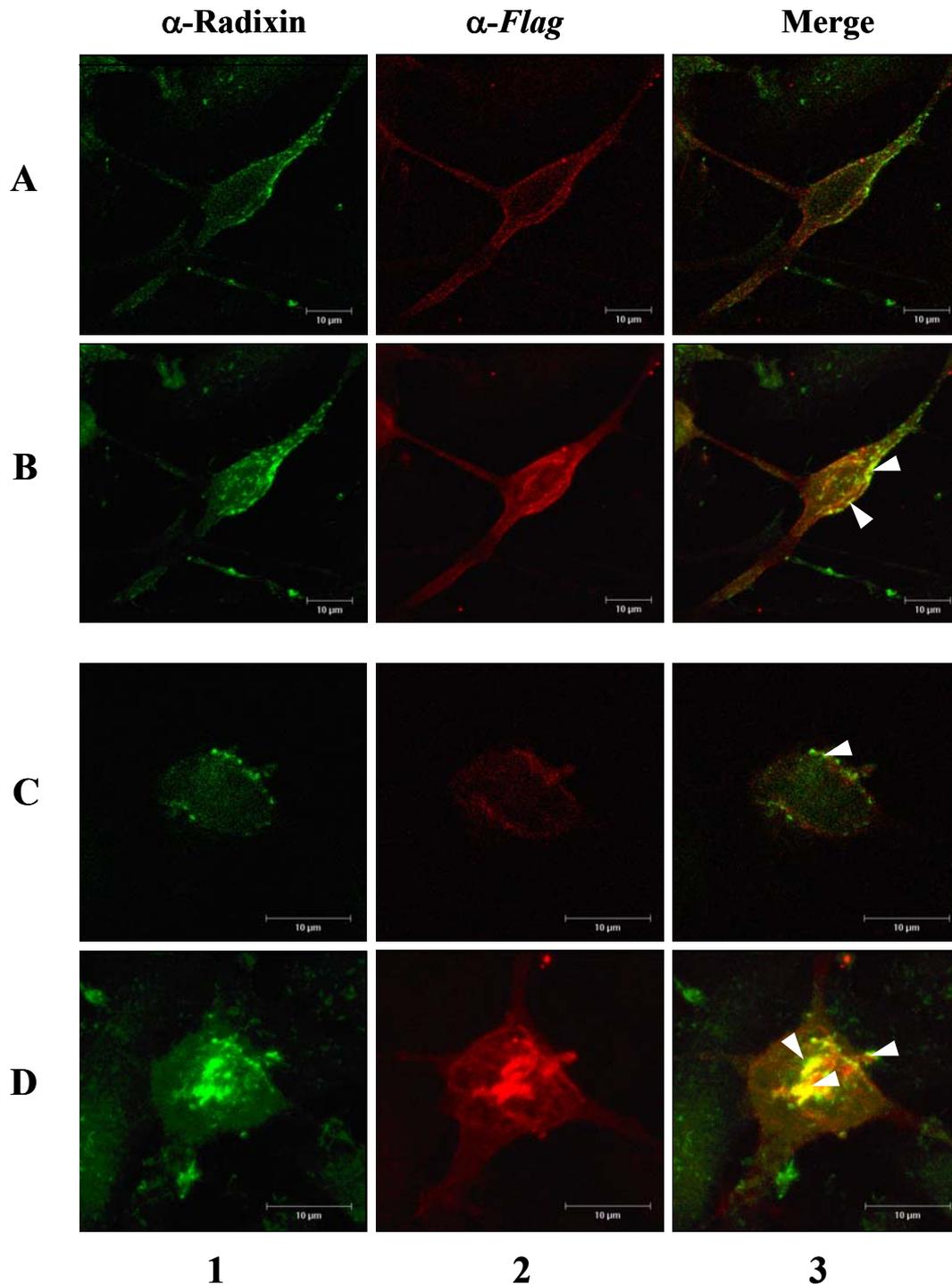
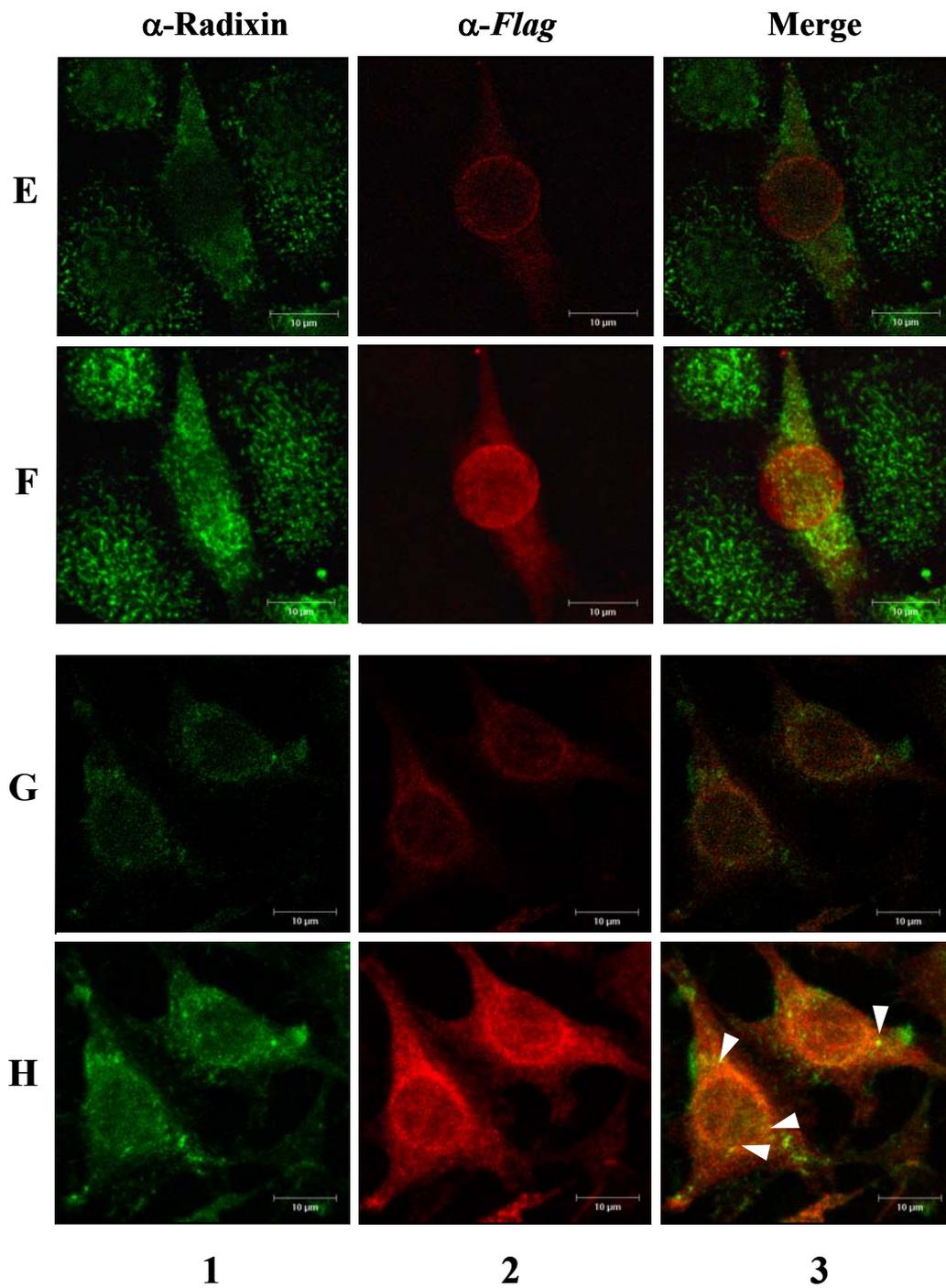


Abb. 39: Kolokalisierung von Radixin mit PKC η . A9:P38 η A160E (A,B), A9:P38 η T512A (C,D), A9:P38 η DN (E,F) und A9 Zellen (G,H) wurden auf Objektträgern kultiviert, mit MVMP (MOI 20) infiziert und 48 h p.i. mit 3 % p-Formaldehyd fixiert. Für die Detektion von Radixin mittels Immunfluoreszenz wurde ein spezifisches polyklonales Antiserum und ein CY2 (grün) markierter Sekundärantikörper (1), für endogene PKC η ein spezifisches Kaninchenserum und für die PKC η Mutanten der monoklonale *Flag*-Antikörper (M2) verwendet. PKC η und Derivate wurden mit Spezies-spezifischen CY3 (rot) konjugierten Sekundär-antikörpern gefärbt (2). Zur Feststellung einer Kolokalisierung wurden beide Fluoreszenzen überlagert (Merge, 3), bei Überlappung ergibt sich eine Gelbfärbung. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica TCS SP Mikroskop, Ölimmersionsobjektiv 63x, FITC, TRITC Filtereinstellungen, *pinhole* 1 erstellt. Um abzuschließen, daß es sich bei den gelb gefärbten Bereichen um Kolokalisationsorte von Radixin und PKC η Mutanten (siehe Markierung durch Dreiecke) handelt, sind Aufnahmen einer einzelnen Schicht von 0,2 μ m Dicke (A,C,E,G) als auch das aus einer Vielzahl von Schichten errechnete Bild (B,D,F,H) wiedergegeben.



Fortsetzung Abb. 39: Kollokalisierung von Radixin mit PKC η . A9:P38 η DN (E,F) und A9 (G,H).

diese Interaktion erforderlich ist. Da Radixin jedoch kein direktes Substrat von PKC η darstellt, müssen andere Möglichkeiten als eine direkte Phosphorylierung in Betracht gezogen werden, wie PKC η das Verhalten der ERM-Proteine beeinflussen kann. Es mag spekuliert werden, daß vielleicht die Phosphorylierung des hydrophoben Motivs der PKC das Kriterium für eine Interaktion zwischen PKC η und Radixin bildet. Zu dieser Schlußfolgerung gelangt man, wenn man nach den bisher erzielten Ergebnissen davon ausgeht, daß zumindest die konstitutiv aktive Mutante η A160E und die endogene Kinase nach MVM-Infektion an dieser Stelle aktiviert vorliegen sollten, während die endogene Kinase in nicht infizierten Zellen wahrscheinlich inaktiv ist. Entsprechend den unter 3.2.5.1. dargestellten Ergebnissen kann vermutet werden, daß auch η T512A am hydrophoben teilweise phosphoryliert wird.

3.3.5. Eine Interaktion von Radixin kann mit der katalytisch inaktiven Mutante PKC η T512A durch Kopräzipitation nachgewiesen werden

Die bisher gezeigten Ergebnisse, daß die ERM-Proteine und PKC η in einer gemeinsamen Aufreinigungsfraction (HA-2C) wiedergefunden wurden, und daß sie in der Zelle an spezifischen Strukturen koloalisieren, sprechen für einen Kontakt oder eine Komplexbildung beider Proteine auch *in vivo*. Diese Interaktion ist allerdings keine Enzym-Substrat-Reaktion, da Radixin nicht durch PKC η *in vitro* phosphoryliert wird. Durch Koimmunpräzipitationsexperimente sollte nun festgestellt werden, ob Radixin mit PKC η eine stabile Protein-Protein-Interaktion (z.B. als PKC-Verankerungs- oder Gerüstprotein) eingeht, die sich auch biochemisch nachweisen läßt. Dazu wurden Zellen unter milden Bedingungen lysiert, die potentiell miteinander interagierende Proteine im Komplex erhalten. Erschwerend für derartige Experimente können sich Membran- oder Zytoskelettassoziationen jeweiliger Partnerproteine auswirken, die eine Kopräzipitation von Bindungspartnern nur schwer erlauben. Aus diesem Grund wird oft davon Gebrauch gemacht, alle vermuteten Bindungspartner eines Komplexes überzuexprimieren, um danach eine Immunpräzipitation durchführen zu können. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit nach dem bereits erläuterten Prinzip stabil transfizierte Doppelzelllinien hergestellt (siehe Methode 2.2.3.4.), die sowohl die PKC η -Mutanten (versehen mit einem N-terminalen *Myc*-Epitop) und Radixin (fusioniert mit einem ebenfalls N-terminalen *Flag*-Epitop) unter Kontrolle des P38-Promotors exprimieren. Diese Doppelzelllinien wurden anschließend für die Immunpräzipitation verwendet. Zunächst wurden die Doppelzelllinien zur Expression von Radixin bzw. den PKC η -Mutanten mit MVM infiziert und 24 h später durch Abschaben der Zellen geerntet. Die Zellen wurden durch osmotischen Schock aufgeschlossen und zur Immunpräzipitation mit Raf-Puffer, α -*Flag* bzw. α -*Myc* Antikörpern sowie Protein-G-Sepharose versetzt. Nach 4h Inkubationszeit wurden die Sepharose-Kügelchen gewaschen und die Präzipitate zur Analyse über SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt.

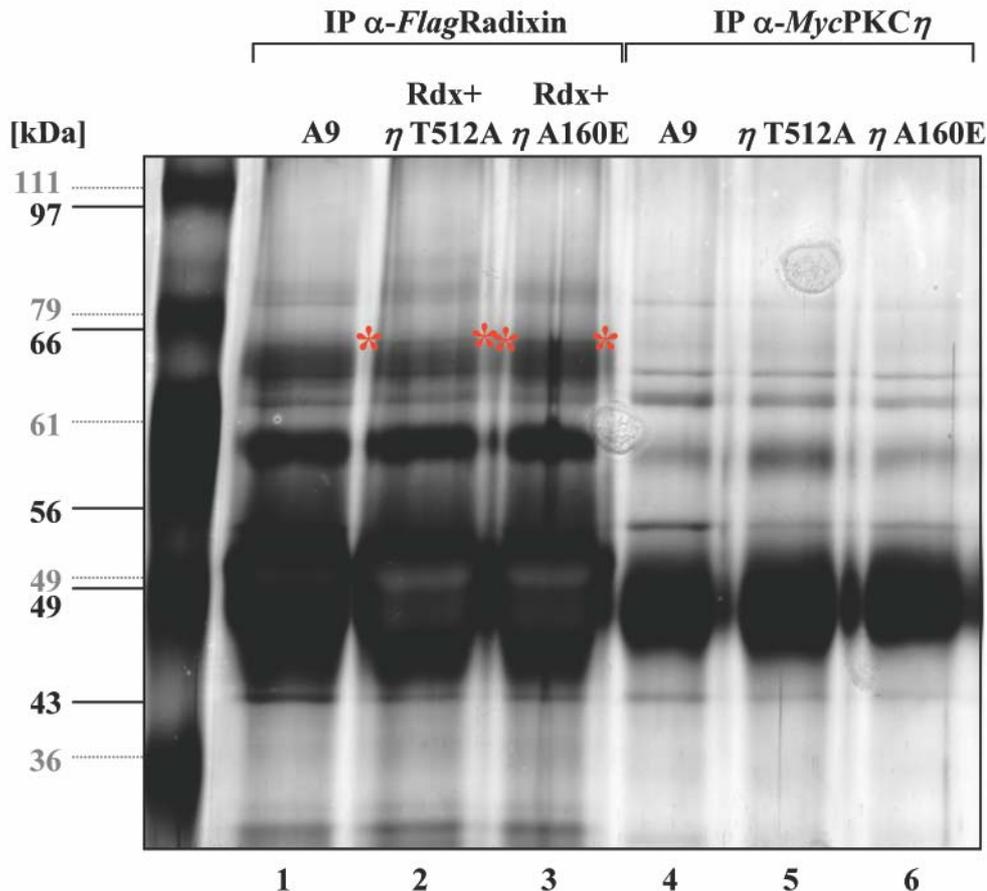


Abb. 40: Immunpräzipitation von Radixin und PKC η . A9, Stabile *Flag*-Radixin oder *Myc*-PKC η Mutanten-exprimierende Zelllinien wurden mit MVMp infiziert (MOI 10) und nach 24 h geerntet. 1,4) A9, 2) A9:P38*Flag*-Rdx+*Myc* η T512A, 3) A9:P38*Flag*-Rdx+*Myc* η A160E, 5) A9:P38*Myc* η T512A; 6) A9:P38*Myc* η A160E. Anschließend wurden die Zellen durch osmotischen Druck mit 500 mM NaCl aufgeschlossen und Immunpräzipitationen von Radixin oder PKC η Mutanten in Gegenwart von monoklonalem *Flag*-Antikörper (M2) (Spuren 1-3) oder polyklonalem *Myc*-Antiserum (Spuren 4-6) durchgeführt. Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und zur Sichtbarmachung der Proteine mit Silbernitrat angefärbt. Die Größe der Radixin/PKC η Bande ist mit Sternchen markiert.

Das Gel wurde anschließend fixiert und zur Sichtbarmachung der Proteine Redoxreaktionen mit Silbernitrat ausgesetzt (siehe 2.2.5.9.). Durch diese sensitive Methode der Silberfärbung können auch sehr geringe Mengen an Proteinen im Gel nachgewiesen werden. Das Ergebnis der α -*Flag*-Radixin (Spuren 1-3) sowie der α -*Myc*-PKC η -Präzipitationen (Spuren 4-6) ist in Abb. 40 dargestellt. Mit dem α -*Flag*-Antikörper läßt sich Radixin in beiden Doppelzelllinien auch im Silbergel nachweisen (Spur 2,3; siehe Sternchen), während die präzipitierten PKC η -Mutanten nicht durch Silberfärbung sichtbar gemacht werden konnten (Spuren 5,6). Es lassen sich darüber hinaus auch keine weiteren Proteinbanden nachweisen, die spezifisch in nur einer Mutanten-Zelllinie als mögliche Interaktionspartner präzipitiert werden.

Zur weiteren Kontrolle, daß die überexprimierten Proteine Radixin, sowie PKC η A160E und PKC η T512A mit der beschriebenen Methode präzipitiert werden können, wurde zusätzlich nach 40 h MVM-Infektion mit ^{35}S -markiertem Methionin/ Cystein für 4 h metabolisch

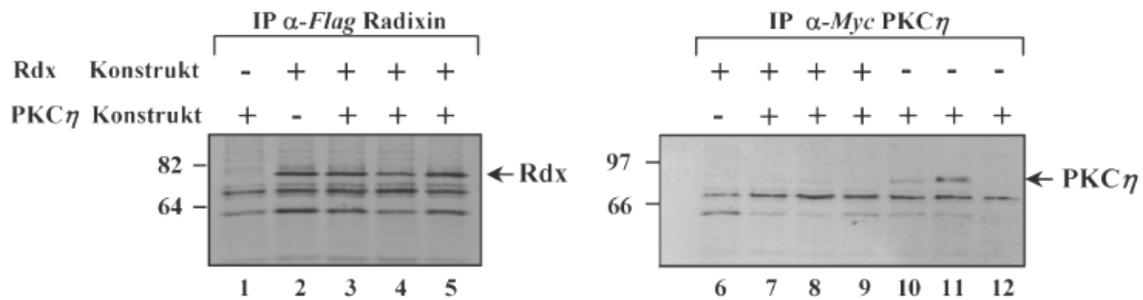


Abb. 41: Koimmunpräzipitation von [35 S] metabolisch markierter PKC η und Radixin. Stabile *Flag*-Radixin oder *Myc*-PKC η Mutanten-exprimierende Zelllinien wurden mit MVMp infiziert (MOI 10) und 40 h p.i. für weitere 3 h mit [35 S] markiertem Methionin/Cystein metabolisch gelabelt: 1,10) A9:P38*Myc* η A160E; 2,6) A9:P38*Flag*-Rdx; 3,7) A9:P38*Flag*-Rdx+*Myc* η A160E; 4,8) A9:P38*Flag*-Rdx+*Myc* η T512A; 5,9) A9:P38*Flag*-Rdx+*Myc* η DN; 11) A9:P38*Myc* η T512A; 12) A9:P38*Myc* η DN. Anschließend wurden die Zellen durch osmotischen Druck mit 500 mM NaCl aufgeschlossen, und Koimmunpräzipitationen von Rdx oder PKC η Mutanten mit monoklonalem *Flag*-Antikörper (M2) bzw. polyklonalem *Myc*-Antiserum durchgeführt. Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele zur Verstärkung des radioaktiven Signals in Gegenwart von Amplify^R fixiert, getrocknet und autoradiographisch ausgewertet. Präzipitiertes Rdx bzw. PKC η ist mit einem Pfeil markiert.

gelabelt (2.2.3.5.). Die nach derselben Methode angefertigten Immunpräzipitate wurden ebenfalls durch SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet. Aus Abb. 41 ist ersichtlich, daß die Doppelzelllinien Radixin in großen Mengen exprimieren (Spuren 2-5) während PKC η offenbar in viel geringerer Menge translatiert wird und im selben Experiment lediglich in den Einzel-, stabil mit *Myc*-PKC η transfizierten Zelllinien (Spuren 10,11), nicht aber in den Doppelzelllinien durch metabolisches Markieren nachweisbar war (Spuren 7-9). Eine Expression der *Myc*-PKC η -Mutanten konnte jedoch in diesen Doppelzelllinien durch Immunfluoreszenz belegt werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu bestimmen, ob Radixin mit PKC η in einem Komplex vorliegt, wurden Präzipitationen der Doppelzelllinien entweder mit α -*Flag* oder mit α -*Myc*-Antikörpern durchgeführt und das jeweils andere Protein (bei α -*Flag* IP: PKC η bzw. bei α -*Myc* IP: Radixin) durch Western Blotting detektiert. Die Ergebnisse der α -*Flag*-Radixin-Immunpräzipitation mit nachfolgendem Western Blotting gegen PKC η sind in Abb. 42 dargestellt. Hier zeigte sich ausschließlich in der Doppelzelllinie A9P38-*Flag*Rdx-P38*Myc*PKC η T512A eine schwache Bande, die auf eine Kopräzipitation der inaktiven Kinase schließen läßt (Abb. 42; Spur 4). Möglicherweise besitzt in dieser Zelllinie der Radixin-PKC η T512A-Komplex eine erhöhte Halbwertszeit und kann dementsprechend besser nachgewiesen werden, als beispielsweise die konstitutiv aktive Mutante. Leider ließ sich dieses Ergebnis durch die umgekehrte Reihenfolge, das heißt Immunpräzipitation α -*Myc*PKC η T512A und Western Blotting α -Radixin nicht bestätigen, was auf ein Mengenproblem bei der Präzipitation zurückzuführen sein mag.

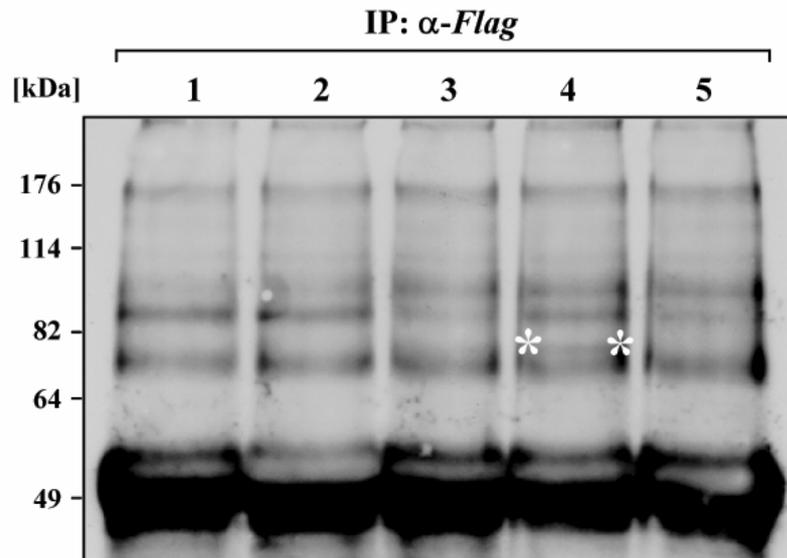


Abb. 42: Identifizierung von PKC η aus Radixin Koimmunpräzipitaten. A9 (1), A9:P38FlagRdx (2), A9:P38FlagRdx-Myc η A160E (3), A9:P38FlagRdx-Myc η T512A (4) und A9:P38FlagRdx-Myc η DN (5) Zellen wurden mit MVMP infiziert (MOI 10). 44 h nach Infektion wurden die Zellen geerntet und Interaktionspartner von Radixin mittels monoklonalem Flag-Antikörper (M2) in Gegenwart von PKC η Mutanten präzipitiert. Das Sepharose gebundene Präzipitat wurde der Größe nach über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit PKC η Antiserum auf das Vorhandensein von kopräzipitierter Kinase untersucht (siehe Stern).

Es ist weiterhin in Betracht zu ziehen, daß beide Proteine im Komplex nicht in gleichen Mengen vorliegen müssen und vielleicht ein deutlicher Überschuß an Radixin besteht. Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß Radixin mit inaktiver PKC η im Komplex nachweisbar ist. Außerdem assoziiert es in bestimmten subzellulären Strukturen mit PKC η vermutlich über eine Bindung an den C-Terminus der Kinase, unterliegt jedoch keiner Substratphosphorylierung durch PKC η . Denkbar wäre, daß sich die Interaktion beider Proteine nach Aktivierung von PKC η auflöst. Für die inaktive η T512A könnte die Komplexauflösung jedoch blockiert sein, da die Kinase nicht vollständig aktiviert werden kann. Gegenwärtig wird im Labor durch A9-Zelllinien mit Radixin-Deletions- und Phosphorylierungsmutanten geprüft, ob das Protein für die Aktivierung von PKC η zur Stimulierung der NS1-replikativen Funktionen notwendig ist. Es gilt weiterhin zu klären, wie und durch welche Auslöser es zu einer Komplexbildung von PKC η mit Radixin kommen kann und ob eine Verankerung der Kinase durch die ERM-Proteine z.B. am Aktinzytoskelett auftritt.

3.4. Interaktion von PKC η mit dem Zytoskelett

Eine MVM-Infektion geht mit markanten Veränderungen der Wirtszellmorphologie einher, die bisher jedoch wenig erforscht und verstanden sind. So kommt es etwa nach 24 h zur Bildung von langen zellulären Fortsätzen, die eine Abflachung und zeitgleiche Ausstreckung der infizierten Zellen dokumentieren. Ähnliche morphologische Veränderungen kann man auch nach Behandlung der A9-Fibroblastenzellen mit dem Phorbolster TPA beobachten (Daten nicht gezeigt). Es ist deshalb naheliegend, daß solche Veränderungen der Zellgestalt durch Aktivierung bestimmter Signalkaskaden, nach Phorbolster-Stimulus insbesondere PKC-Signalwegen, begründet sein können. Das Ausstrecken der Zellen ist zeitlich begrenzt und wird von einem Abrundungsprozeß der Zellen abgelöst, bevor die Wirtszellen schließlich zur Virusfreisetzung aktiv lysiert werden. Auch diese Beobachtungen sprechen für eine direkte Einflußnahme von MVM auf zelluläre Signalwege, die nur über einen definierten Zeitraum andauern und vielleicht einen Nutzen für bestimmte Schritte im viralen Vermehrungszyklus besitzen. Neben einer direkten Abhängigkeit der MVM-Replikation von PKC λ und PKC η konnte im vorangehenden Kapitel (3.2.4) deutlich belegt werden, daß die MVM-Infektion PKC, insbesondere die PKC η -Aktivität, über PDK-1 moduliert. Daher ist die PDK-1-PKC-Signalkaskade eine potentielle Kandidatin, die auch für die beobachteten morphologischen Veränderungen relevant sein könnte.

Aus diesen Gründen bot es sich an, einen möglichen Einfluß der durch MVM-aktivierten PKC-Isoformen auf die Zellmorphologie zu untersuchen. Für atypische PKC wurde bereits gezeigt, daß sie in der Lage sind, Aktin-Streßfasern nach *H-Ras*-Stimulus von NIH3T3-Zellen aufzulösen, wobei PKC λ oberhalb von PI3-K und PKC ζ unterhalb von PI3-K und *Rac* agiert (Ueberall, 1999). Beide Isoformen haben also einen Einfluß auf den Assemblierungszustand des Aktin-Zytoskeletts. Für PKC η ist ein solcher Zusammenhang spekulativ, obwohl die Interaktion dieser Kinase mit dem Zytoskelett und die zeitlich begrenzte Aktivierung durchaus eine solche Hypothese unterstützen. Um herauszufinden, ob PKC η entweder neben der Regulation von NS1-Replikationsfunktionen auch für zytotoxische Eigenschaften des Proteins bedeutsam ist, oder alternativ dazu, durch MVM gezielt aktiviert wurde, um als Effektor kinase z.B. das Zytoskelett der Wirtszelle zugunsten des Virus umzugestalten, wurden zunächst die MVM-induzierten morphologischen Veränderungen der A9-Wirtszelle charakterisiert. Nach Abklärung, welche Filamentstrukturen an diesen Umstrukturierungen beteiligt bzw. davon betroffen sind, sollte anschließend untersucht werden, ob diese Prozesse möglicherweise durch die MVM-induzierte Aktivierung von PKC η kontrolliert werden und sich dementsprechend in den Zelllinien mit modulierter PKC η -Aktivität verschieden äußern.

3.4.1. Die Mikro- und Intermediärfilamente, nicht aber die Mikrotubuli, werden durch eine MVM-Infektion umstrukturiert und abgebaut

Zur Charakterisierung der Zytoskelettveränderungen wurde das Vorhandensein und die Verteilung ausgewählter Markerproteine der drei Hauptfilamentstrukturen von Fibroblastenzellen mittels Immunfluoreszenz untersucht. Zur Anfärbung der Mikrofilamente wurde Phalloidin (Alkaloids substanz des Weißen Knollenblätterpilzes) verwendet, das sich an assemblierte Aktinstreißfasern anlagert. Die Mikrotubuli wurden mit einem α -Tubulin-Antikörper sichtbar gemacht, die Intermediärfilamente mit einem Vimentin-Antikörper. Auf Objektträgern ausgesäte A9-Zellen wurden mock- oder MVM-infiziert (MOI 50), ein bzw. zwei Tage nach Infektion mit Paraformaldehyd fixiert und im Anschluß daran auf ihre vorliegende Filamentstruktur analysiert und miteinander verglichen. Abb. 43 zeigt repräsentative Aufnahmen aller Filamenttypen (Reihe A: Mikrofilamente, B: Mikrotubuli, C: Intermediärfilamente) von mock- und infizierten Zellen. Es wird deutlich, daß ein markanter Abbau der Mikrofilamente sowie der Intermediärfilamente stattfindet, während die Mikrotubulistrukturen erhalten bleiben und sogar ausgedehnt werden, da sie in die Spitzen der sich neu bildenden Zellfortsätze hineinreichen (Abb. 43; Reihe B). Diese Ergebnisse belegen, daß ein selektiver Abbau der Filamente stattfinden muß und die beobachteten Veränderungen nicht lediglich als Reaktion der Zelle auf Streß zurückzuführen sind. Nicht zufällig benutzen Parvoviren die erhalten bleibenden Mikrotubulifilamente nach Virusaufnahme und -eintritt in die Zelle als Transportmittel ihrer Kapside zum Zellkern (Vihinen-Ranta, 2000) und möglicherweise auch für den intrazellulären Transport viraler Komponenten oder den Export der Nachkommenviren. Im Gegensatz zu den Mikrotubuli weisen die Mikrofilamente Veränderungen auf, die besonders 44 h nach MVM-Infektion deutlich werden. Sie äußern sich sowohl in einem Abbau an Aktinstreißfasern im Zytosol, als auch in einer Abnahme der Aktinfärbung an sogenannten Adhäsionshaftpunkten der Zelle zum Untergrund. Gleichzeitig kommt es zu einer zunehmend punktförmigen Färbung von Aktinfilament-Bruchstücken in Agglomeraten, sogenannten *patches* (Abb. 43; Reihe A). Es wäre von Interesse zu klären, ob dieser Prozeß ein regulierter Vorgang ist und Funktionen im viralen Vermehrungszyklus erfüllt, oder ob er lediglich eine Streßreaktion der Zelle aufgrund des zytotoxischen NS1-Proteins und veränderter Zellphysiologie darstellt. Ebenso bedarf der beobachtete Kollaps der Intermediärfilamente, der sich in einer Deassemblierung langer Filamentketten im Zytoplasma und einer ringförmigen Konzentration von Vimentin um den Nukleus äußert, weiterer Erklärungen (Abb. 43; Reihe C). Gegen eine Nebenreaktion als Zeichen von Zellstreß sprechen Experimente, die belegen, daß dieselben Veränderungen und Deassemblierungen der Mikro- und Intermediärfilamente nach MVM-Infektion auch in anderen Zelltypen, z.B. humanen Ursprungs (NBK) zu beobachten sind (Daten nicht gezeigt). Da die Filamentformen innerhalb einer Zelle jedoch weitgehend in komplexer Art und Weise miteinander vernetzt sind, kann der Zusammenfall einer Filamentstruktur durchaus aus

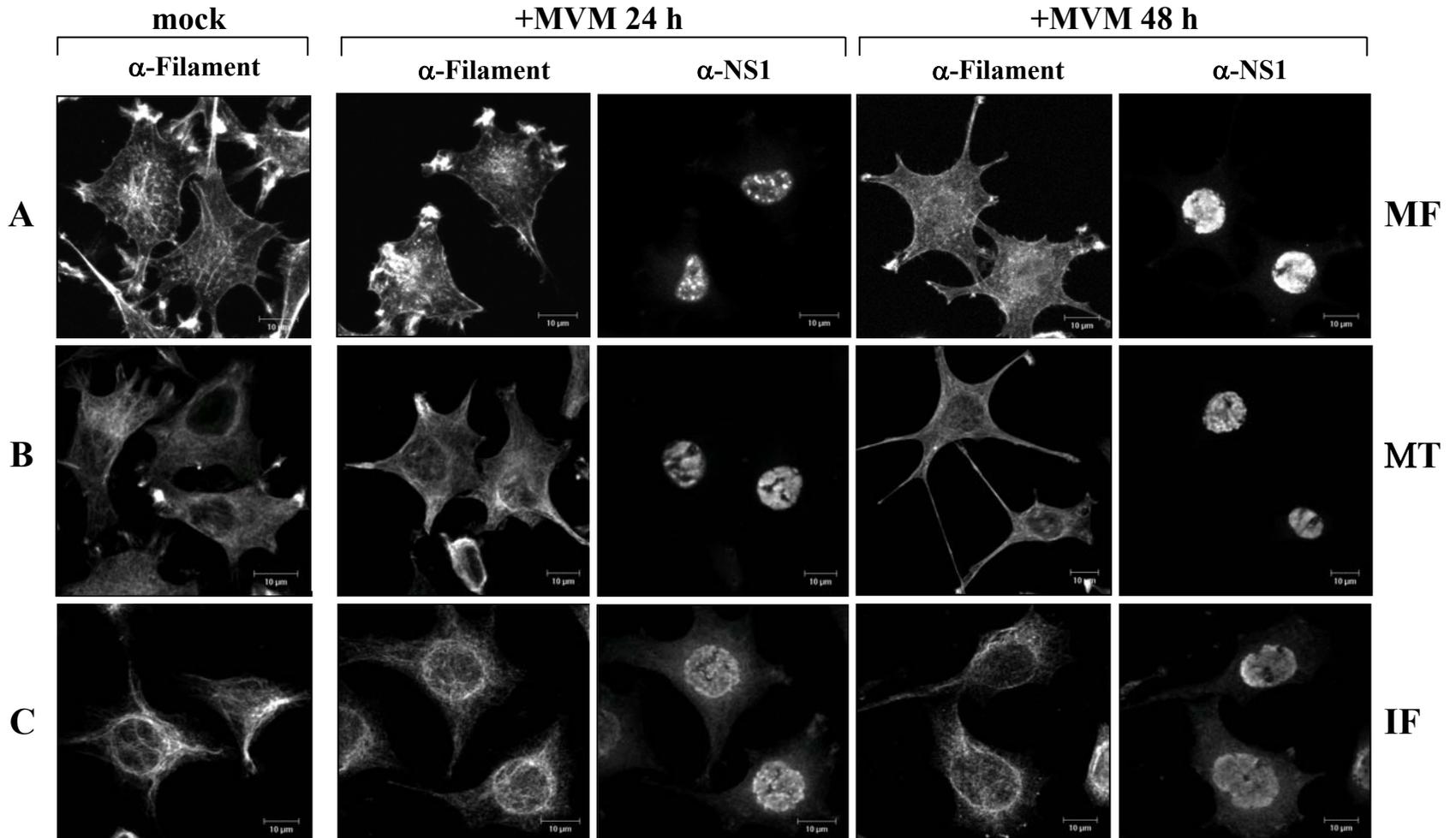


Abb. 43: Immunfluoreszenz der Zytoskelettveränderungen von A9 Fibroblastzellen nach MVMp Infektion. A) Mikrofilamente, B) Mikrotubuli, C) Intermediärfilamente. A9 Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert, mock oder MVMp infiziert (MOI 20) und 24 h bzw. 48 h p.i. mit 3 % p-Formaldehyd fixiert. Mikrofilamente wurden mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt, Mikrotubuli mit monoklonalem α -Tubulin Antikörper, Intermediärfilamente mit polyklonalem Vimentin-Antikörper. NS1 wurde mittels monoklonalem Antikörper (3D9) oder polyklonalem Kaninchenserum (Sp8) angefärbt. Alle Spezies-spezifischen Sekundärantikörper wurden von Dianova bezogen. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica TCS SP Mikroskop, Ölimmersionsobjektiv 63x, FITC, TRITC Filtereinstellungen, *pinhole* 1 erstellt.

spezifischen Deassemblierungsvorgängen einer anderen Struktur resultieren, die somit als Vernetzungspartner und Gerüststabilisator entfällt (Gard, 1997). Das Vimentin-Netzwerk der Zelle ist schon häufiger als Sekundärfilament beschrieben worden, welches unter Einfluß anderer Umstrukturierungen der Zelle kollabiert (Sorci, 2000). Dabei wurden individuelle Intermediärfilamente langsam zum perinukleären Raum transportiert, wo sie als Ringstruktur akkumulieren, ohne daß *per se* ein Abbau dieser Strukturen stattfinden würde (Ho, 1998).

Zur Unterstützung der Immunfluoreszenzdaten über die Virus-induzierten Zytoskelettveränderungen wurden erneut Fraktionierungen angewendet, um die Verteilung und die vorhandene Menge der Markerproteine in mock- und MVM-infizierten Zellen miteinander zu vergleichen. Aus diesem Grund wurden Zellysate von nicht infizierten sowie von infizierten Zellen 24 bzw. 48 h nach Viruszugabe hergestellt, durch Frieren und Tauen aufgeschlossen und einer Löslichkeitsfraktionierung (Methode 2.2.5.6.) unterzogen. Die einzelnen Fraktionen wurden im Anschluß daran durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Markerproteine mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. Die Ergebnisse sind für Aktin, Tubulin und Vimentin in Abb. 44A gezeigt. Die Verteilung der einzelnen Proteine weist nur geringe Unterschiede zwischen mock- und infizierten Zellen auf. Beispielsweise ist für Aktin nur eine leichte Mengenabnahme in den unlöslichen Fraktionen S₄ und S₅ 48 h nach Infektion detektierbar (Spuren 14, 15), was auf die visuell beobachteten Degradationen und Deassemblierungen der Aktinstreißfasern zurückzuführen sein könnte. Im Gegensatz dazu ließ sich α -Tubulin 2 d nach Infektion verstärkt in Fraktion S₃ (Spur 13) nachweisen und zeigt darüber hinaus noch eine leichte Verschiebung in die unlösliche Fraktion S₅ (vergleiche Spuren 5,10,15) - ein mögliches Zeichen verstärkter Assemblierung und Filamentbildung. Die Verteilung von Vimentin weist keine sichtbaren Besonderheiten auf, die eine Interpretation auf biochemischer Basis über Strukturumwandlungen der Intermediärfilamente innerhalb der Zelle zuließen. Eine Erklärung mag darin liegen, daß die um den Nukleus kollabierten Filamente möglicherweise noch intakt und in ihrer Löslichkeit unverändert sind. Problematisch kann sich auf die Versuchsbedingungen auswirken, daß Zytoskelettproteine in der Regel in großen Mengen vorhanden sind. Durch den vorliegenden Überschuß an Struktur-bildenden Proteinen könnten Veränderungen eines geringen Anteils dieser Markerproteine aufgrund von Degradations- und Deassemblierungsvorgängen zwar in der Immunfluoreszenz erkannt werden, eine potentielle Umverteilung zwischen verschiedenen Fraktionen bliebe so aber verdeckt. Hier wären Experimente, die dem Assemblierungszustand, der Filamentgröße, dem Phosphorylierungsgrad beteiligter Proteine oder anderen Merkmalen Rechnung tragen, geeigneter gewesen als Löslichkeitsfraktionierungen, um derartige Veränderungen im zellulären Zytoskelett zu untersuchen. Um der Dynamik der Aktinfilamente besser Rechnung zu tragen, wurde die Präsenz und Verteilung von regulierenden Proteinen der Aktinmaschinerie analysiert. Da diese Proteine überwiegend in löslicher Form zytoplasmatisch agieren, wurde anstatt der

Löslichkeitsfraktionierung die Kompartiment-Fraktionierung (Methode 2.2.5.6.) zur Charakterisierung herangezogen. Abb. 44B zeigt das Ergebnis der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Fraktionen und die durch Western Blotting nachgewiesenen Proteine WASP (Aktivator des Arp2/3-Synthese-Komplexes) und Gelsolin (Aktin *Severing* Protein).

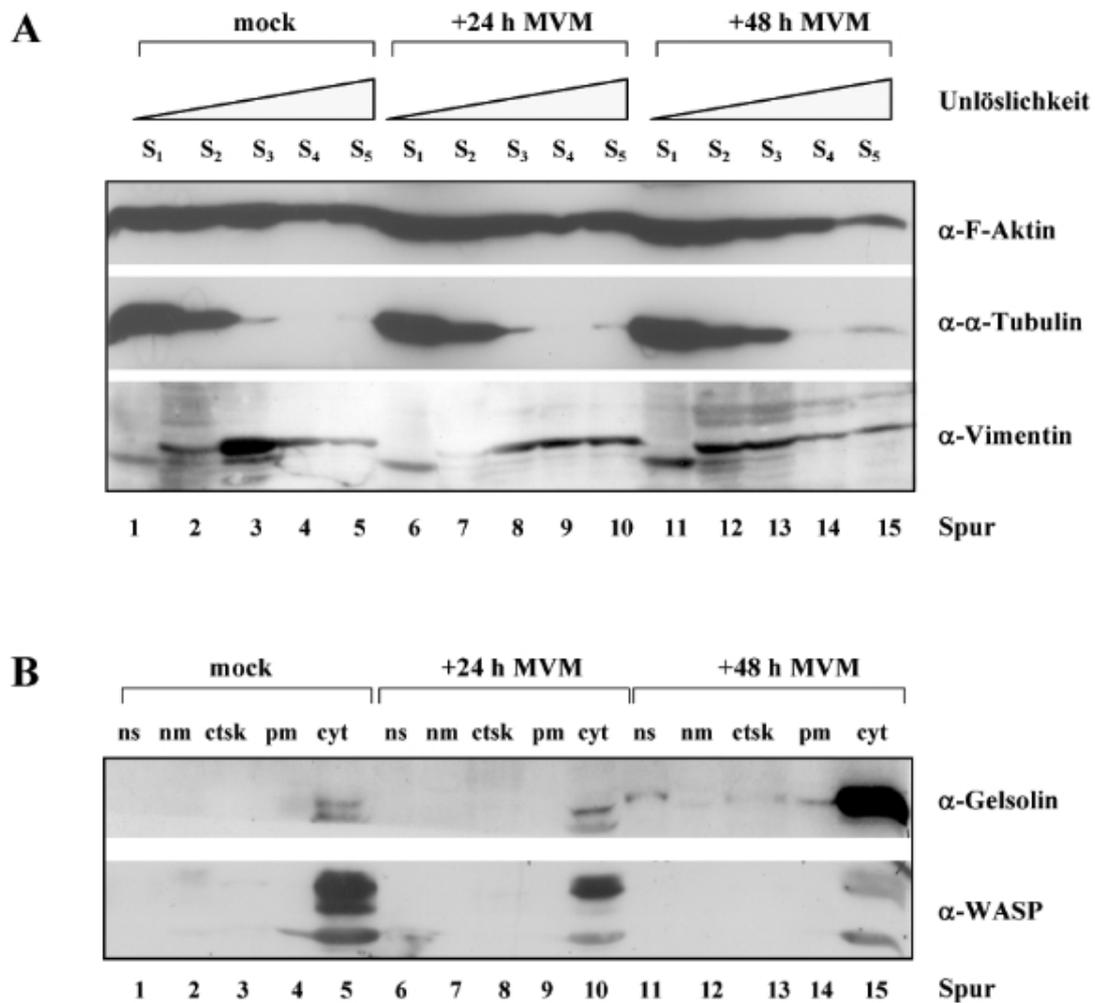


Abb. 44: Biochemische Analyse der durch MVM-Infektion induzierten Zytoskelettveränderungen. A9 Zellen wurden mock (Spuren 1-5) oder für 24 h (6-10) bzw. 48 h (11-15) mit MVMp infiziert. **A) Löslichkeitsfraktionierung.** Zellextrakte wurden durch mehrfache Detergenzbehandlung in verschiedene lösliche Fraktionen unterteilt (S₁ ohne Detergenz; S₂ Chaps; S₃ Chaps+DOC; S₄ Chaps+DOC+SDS; S₅ Lämmli-puffer + Hitzedenaturierung). Mit dieser Methode können Zytoskelettproteine auf ihren Vernetzungs-/Polymerisierungsgrad (entsprechend zunehmender Unlöslichkeit) und auf ihre Membranverankerung untersucht werden. **B) Sedimentationsfraktionierung.** Zellextrakte wurden homogenisiert und bezüglich (Detergenz-) Löslichkeit und Sedimentationsverhalten fraktioniert: ns- *nuclear scaffold*, nm- *nuclear membrane*, ctsk- *cytoskeleton*, pm- *plasma membrane*, cyt- *cytosol*. Proteine wurden der Größe nach durch SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

Es fällt auf, daß sich beide Proteine in Bezug auf ihre Menge gegensätzlich verhalten. Während die Gesamtmenge an Gelsolin mit der Infektionszeit stark zunimmt (vergleiche Spuren 5, 10 und 15), wurde 48 h nach MVM-Infektion signifikant weniger WASP nachgewiesen, als vor der Infektion (Abb. 44 B; Spuren 5, 10, 15). Dieses Ergebnis konnte mehrfach reproduziert werden und stärkt die Ergebnisse der Immunfluoreszenz hinsichtlich eines Mikrofilamentabbaus. Offensichtlich kommt es nach MVM-Infektion zu einem Ungleichgewicht in der Aktinsynthese, die durch geringere Mengen an zur Verfügung stehendem WASP verlangsamt wird, wohingegen der Abbau bestehender Aktinfilamente durch höhere Mengen an Gelsolin beschleunigt wird. In der Zukunft sollte daher untersucht werden, was die Auslöser für dieses veränderte Gleichgewicht in der Aktinsynthese sind und ob parvovirale Proteine an der Regulation des komplexen Aktinauf- und abbaus in infizierten Zellen beteiligt sind, bzw. in vorhandene Prozesse eingreifen. Es sollte hier ergänzt werden, daß andere, an der Aktin-Dynamik beteiligte Proteine, wie Cofilin, Profilin oder Arp 3, kein verändertes Profil nach Infektion zeigten (Nüesch, unveröffentlichte Daten).

Abschließend soll an dieser Stelle noch auf den Aspekt eingegangen werden, ob die durch eine MVM-Infektion aktivierte PKC-Isoform η zielgerichtet an den morphologischen Umstrukturierungen infizierter A9-Zellen beteiligt ist. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden die A9-Zelllinien mit modifizierter endogener PKC η -Aktivität parallel zu den parentalen A9-Zellen mit MVM infiziert und sowohl in der Immunfluoreszenz (MOI 50) als auch mittels Fraktionierungen (MOI 10) auf Veränderungen ihres Zytoskeletts im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen analysiert. Im wesentlichen waren dieselben Umstrukturierungen wie in den A9-Zellen nach Infektion zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Die Zelllinien, die die inaktive PKC η T512A oder die dominant negative Mutante η DN exprimierten, zeigten weitgehend den mock-Phänotyp des Zytoskeletts. Da die parvovirale Replikation in diesen Zelllinien inhibiert ist (siehe Abb. 21), kann aus diesem Experiment jedoch keine Schlußfolgerung gezogen werden, weil der Infektionszyklus nicht so weit fortschreitet, um Zytoskelettveränderungen zu beobachten. Die eine konstitutiv aktive PKC-Mutante η A160E-exprimierenden Zellen zeigten die Zytoskelettveränderungen in der Immunfluoreszenz etwas später als die A9-Zellen, ein Zeichen geringerer toxischer Auswirkungen des NS1-Proteins in diesen Zellen. Außerdem können die Ergebnisse dahingehend interpretiert werden, daß die morphologischen Veränderungen von anderen, vermutlich unter Kontrolle von Ras und Rho-GTPasen-stimulierten zellulären Kinasen reguliert werden. Es ergibt sich, daß die Virus-induzierten morphologischen Veränderungen der Wirtszelle weitaus komplexerer Natur sind und nicht lediglich auf einige der wenigen Kinasen zurückgeführt werden können, die für andere Funktionen (wie in dieser Arbeit am Beispiel der Replikation gezeigt) im viralen Vermehrungszyklus essentiell sind.

3.4.2. Die Präsenz der viralen Proteine beeinflusst die Aktin-Filamentvernetzung *in vitro*

Weil kaum Schlußfolgerungen über den Einfluß von PKC η auf das Zytoskelett *in vivo* gezogen werden konnten, sollten die Umstrukturierungen der Mikrofilamente *in vitro* detaillierter untersucht werden. Dazu wurde ein *in vitro* Aktin-Assemblierungsexperiment etabliert, welches eine Berücksichtigung der vorliegenden Filamentform und –größe erlaubt (siehe Methode 2.2.5.19.). A9-Zellen mock- oder MVM- infiziert wurden nach ein bzw. zwei Tagen durch Abschaben geerntet und mittels Passieren durch eine Spritze (27 $\frac{3}{4}$ Gauge Nadel) aufgeschlossen. Die so gewonnenen Zellysate wurden in ihrer Gesamtproteinmenge auf 500 μ g pro Reaktionsansatz angeglichen und mit Polymerisierungspuffer versetzt, der in seiner Zusammensetzung spezifisch die Assemblierung von Aktin zu Mikrofilamenten fördert. Assemblierungsreaktionen wurden für 1 h bei 37°C durchgeführt, die Filamente durch Zentrifugation sedimentiert und von den löslichen Monomeren sowie zytosolischen Proteinen abgetrennt. Eine schematische Übersicht des Experimentierablaufs ist in Abb. 45 gezeigt.

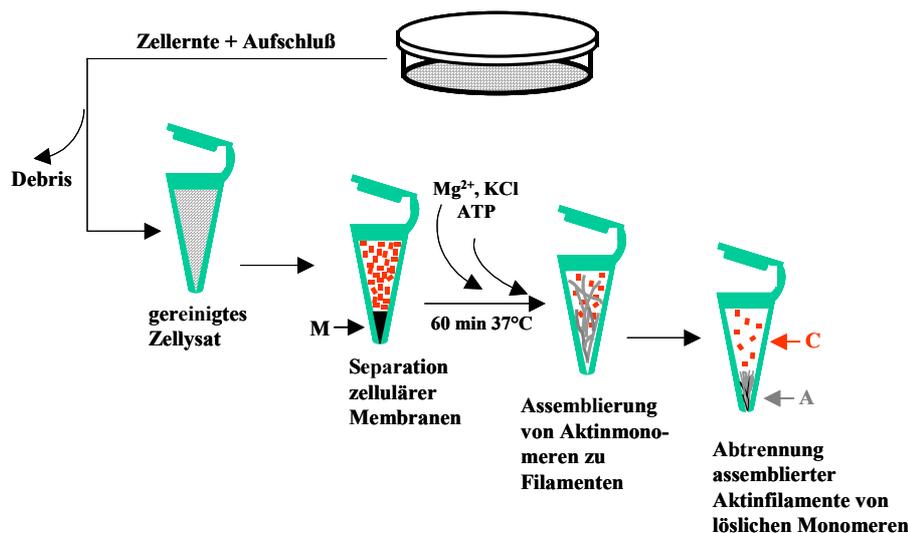


Abb. 45: Schema der *in vitro* Assemblierung von Aktin. 8×10^7 Zellen wurden in hypotonischem Puffer mittels Passieren durch eine Spritze aufgeschlossen und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 800 g abgetrennt. Der lösliche Überstand wurde 1 h bei 150 000 g zentrifugiert, um die Membrankomplexe (M) zu isolieren. Danach wurde das Zentrifugat mit darin enthaltenen löslichen Aktinmonomeren mit Polymerisierungspuffer versetzt, 1 h bei 37 °C inkubiert und zur Trennung der polymerisierten Filamente (A) von löslichen Monomeren (C) erneut zentrifugiert.

Das entstandene Aktinfilamentsediment wurde anschließend in hypotonischem Puffer resuspendiert, auf einen diskontinuierlichen 20-50 % igen Sucrosegradienten geladen und 24h bei 150 000 g zentrifugiert (siehe 2.2.5.20.). Die Filamente wandern im Gradienten entsprechend ihrer Größe, Vernetzung und Dichte unterschiedlich weit. Abschließend wurde der Gradient schichtweise abgetragen und die entsprechenden Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blotting auf das Vorhandensein von Aktin ausgewertet.

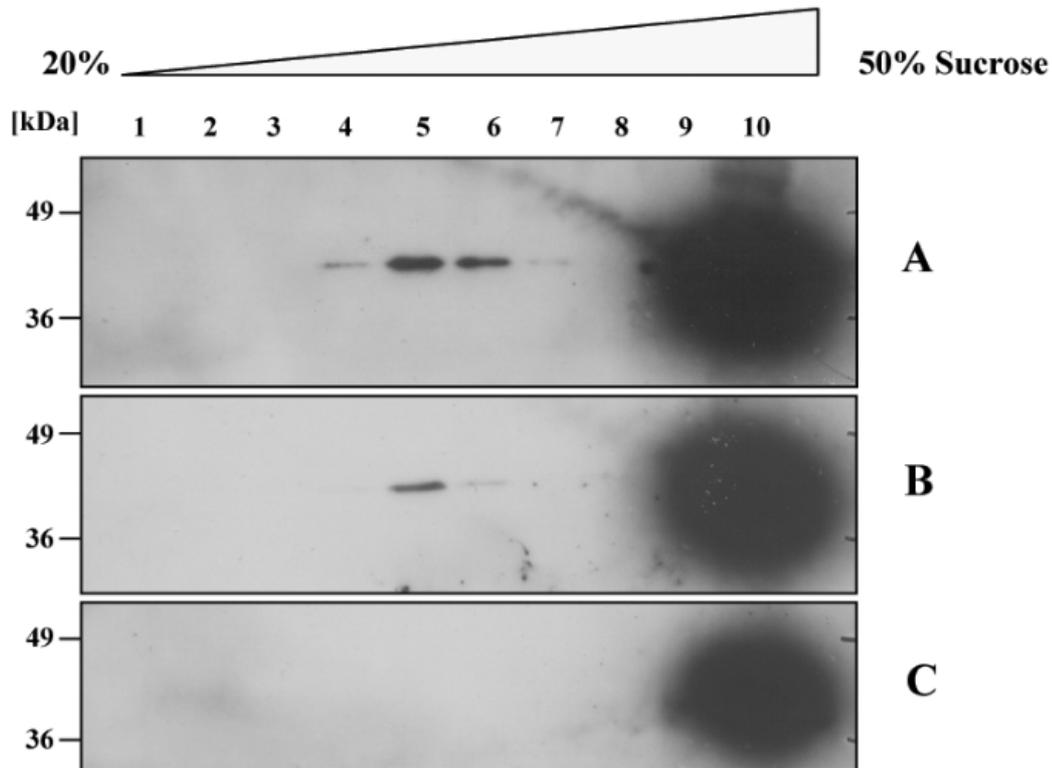


Abb. 46: Analyse des *in vitro* assemblierten Aktins über Saccharosegradienten. Zellextrakte aus mock (A) oder MVMp (MOI 10) infizierten A9 wurden 24 h (B) oder 48 h p.i. (C) hergestellt und *in vitro* Aktin-Assemblierungsassays unterzogen. Das filamentöse Aktinpellet wurde in hypotonischem Puffer resuspendiert, auf einen 20-50 % igen diskontinuierlichen Saccharosegradienten geladen und 24 h bei 150 000 g zentrifugiert. Der Gradient wurde von oben beginnend (1-10) mit einer Pipette abgetragen, in Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE und Western Blotting auf die Aktinverteilung untersucht.

In Abb. 46 ist gezeigt, daß sich sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten A9-Zellen der wesentliche Teil der gebildeten Aktinfilamente in vergleichbarer Menge am Boden des Gradienten ansammelte. Allerdings gibt es auffällige Veränderungen in der Aktinverteilung zwischen mock- und infizierten Zellen im Dichtebereich von $1,127 - 1,146 \text{ g/cm}^3$. Es ist wahrscheinlich, daß sich hier besonders vielfältig und fein verzweigte Filamente ansammeln, die mit fortschreitender Infektionsdauer aufgrund des Zusammenspiels der viralen mit bestimmten zellulären Proteinen der Aktinmaschinerie entweder nicht mehr vorhanden sind, nicht mehr gebildet werden oder bereits abgebaut worden sind. Daß die parvoviralen Proteine die Zellphysiologie derart verändern, daß eine Umstrukturierung des Zytoskeletts stattfindet, konnte hiermit erstmalig in einem funktionellen Assay belegt werden.

Um das Fehlen der Aktinfilamente im Dichtebereich von 1,127 – 1,146 g/cm³ nach 2 Infektionstagen möglicherweise mit der PKC η -Aktivität in Verbindung bringen zu können, wurde die *in vitro* Aktin-Assemblierungsreaktion auch mit vergleichbaren, nicht infizierten Zellysaten der A9-Zelllinien mit stabil transfizierter η A160E und η T512A durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Für beide Zelllinien ergab sich dieselbe Aktinverteilung im Gradienten wie in nicht infizierten A9. Somit konnte auch mit diesem Experiment kein funktioneller Zusammenhang zwischen den MVM-induzierten Umstrukturierungen und Deassemblierungen der Mikrofilamente mit der PKC η -Aktivität nachgewiesen werden.

3.4.3. Assoziation der ERM-Proteine zu neu polymerisiertem Aktin erfolgt unabhängig von PKC η

In vorherigen Kapiteln wurde darauf hingewiesen, daß einerseits die Aktivierung von PKC η mit einer Assoziation an ERM-Proteine einhergehen könnte und andererseits, daß ein solcher Komplex aufgrund der Bindungseigenschaften der ERM-Proteine wahrscheinlich Membran- oder Zytoskelett-assoziiert ist. Im folgenden sollte der Fragestellung nachgegangen werden, welchen Einfluß PKC η im nachgewiesenen Komplex auf die Funktionalität der ERM-Familie hat. Die Ergebnisse der Löslichkeitsfraktionierung wiesen darauf hin, daß sich die Assoziation der ERM-Proteine zur Membran oder zum Zytoskelett in Abhängigkeit der PKC η -Aktivität ändert. Da die ERM-Proteine C-terminal eine Aktinbindungsdomäne besitzen, eignete sich hier der *in vitro* Aktin-Assemblierungsassay, um einen Einfluß der PKC η -Aktivität auf die Aktinbindung der ERM-Proteine zu untersuchen. Wie unter Kapitel 3.4.2. beschrieben, wurden lösliche Zellysate aus je 8×10^7 Zellen der A9-Parentalzelllinie sowie der PKC η -Mutanten-Zelllinien A9:P38PKC η A160E und A9:P38PKC η T512A hergestellt und die Assemblierung von Aktin durch Polymerisierungspufferzugabe eingeleitet. Zur Kontrolle wurden auch Reaktionen ohne Zugabe von Polymerisierungspuffer mitgeführt (Abb. 47; grau markierte Fraktionen). Aus diesen Kontrollexperimenten ergab sich, daß erwartungsgemäß bereits ein Teil der Aktinfilamente in unlöslicher Form vorlag. Die Polymerisierungsreaktion in den Reaktionsansätzen mit Pufferzugabe (Abb. 47; schwarz beschriftete Fraktionen) bewirkte zusätzlich eine Verschiebung von zytoplasmatischen Aktinmonomeren zur Filamentfraktion, was insbesondere in den PKC η -Mutanten-Zelllinien sichtbar wird. Idealerweise wäre eine Verteilung von Aktin erwartet worden, bei der im Reaktionsansatz mit Pufferzugabe Aktin aus der zytoplasmatischen Fraktion vollständig assembliert und dementsprechend ausschließlich in Fraktion A detektiert worden wäre. Wahrscheinlich war jedoch das System mit Aktin übersättigt, so daß keine vollständige Assemblierung erfolgt ist. Außerdem weist der Aktin-Antikörper eine sehr hohe Sensitivität auf, die auch Kleinstmengen an Aktin detektiert. Da jedoch andere Strukturproteine wie Tubulin (Abb. 47) und Vimentin (Daten nicht gezeigt), die zu Kontrollzwecken ebenfalls auf

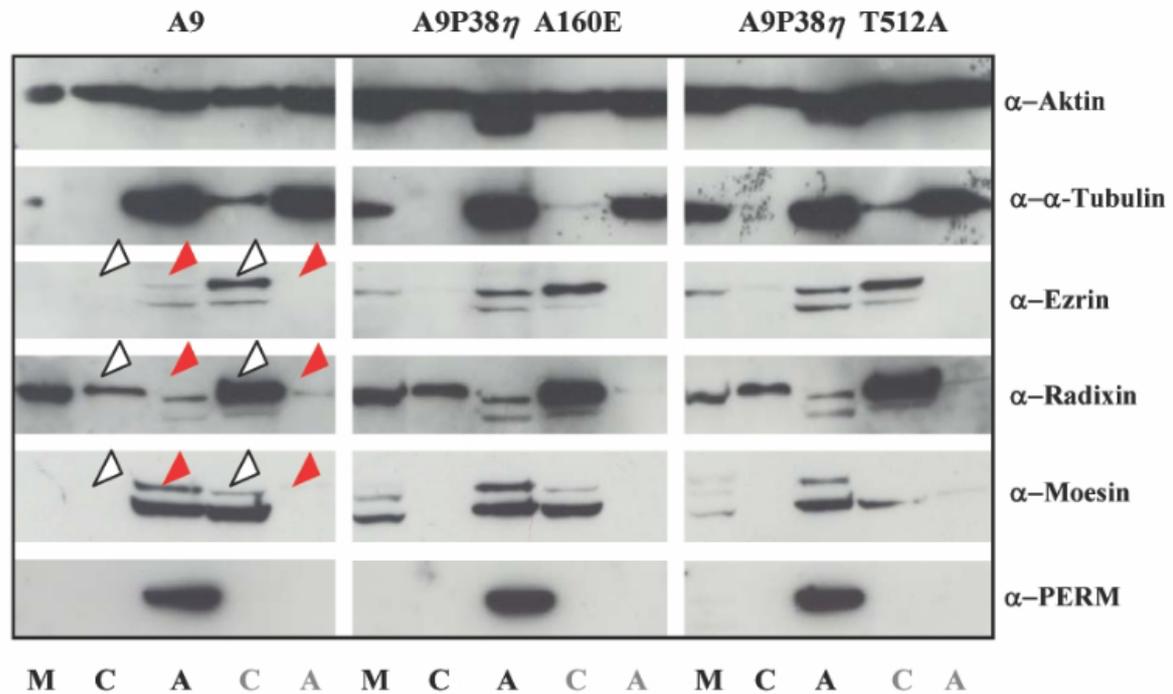


Abb. 47: Assoziierung von ERM Proteinen mit *in vitro* assembliertem Aktin. A9, A9:P38 η A160E und A9:P38 η T512A Zellextrakte wurden einer *in vitro* Aktin-Assemblierung unterzogen. Die resultierenden drei Fraktionen aller Zelllinien: Membranen (M), Zytosol (C) mit löslich gebliebenen Aktinmonomeren und die neu polymerisierten Aktinfilamente (A) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und die Verteilung der ERM Proteine in den verschiedenen Fraktionen mit spezifischen Antikörpern untersucht. Zur Kontrolle wurden Reaktionen ohne Polymerisierungspufferzusatz mitgeführt (C, A grau beschriftet). Zum Vergleich der Verteilung von ERM Proteinen zwischen der Aktinsedimentfraktion bzw. zytoplasmatischen Fraktion im Kontrollansatz mit denen des Polymerisierungsansatzes, sind rote bzw. weiße Dreiecke für A9 beispielhaft markiert.

ihre Verteilung analysiert wurden, sich bereits ohne Zugabe des Polymerisierungspuffers hauptsächlich in der assemblierten Fraktion befanden, kann davon ausgegangen werden, daß die Versuchsbedingungen zugunsten einer *in vitro* Assemblierung von Aktinmonomeren zu Filamenten vorlagen.

Nach Trennung der löslichen Fraktion von den neu synthetisierten Filamentstrukturen wurden die einzelnen Fraktionen des Assays detailliert auf die Verteilung der ERM-Proteine untersucht. Auffällig war, daß es zwischen den einzelnen ERM-Proteinen praktisch keine Unterschiede hinsichtlich ihres Vorkommens in den Fraktionen des Kontrollansatzes ohne Polymerisierungspufferzugabe gab. Alle ERM-Proteine wurden hier ausschließlich in der zytoplasmatischen Fraktion detektiert, nicht aber Aktin-assoziiert (Abb. 47). Es folgt, daß die Umverteilung der ERM-Proteine während des Assays auf eine Bindung an neugebildete Aktinfilamente zurückgeht. Bei den Reaktionen mit Polymerisierungspuffer enthält lediglich

die neu gebildete Aktinsediment-Fraktion Ezrin und Moesin. Auch Radixin kommt in Fraktion A vor, wenngleich auch zusätzlich in allen anderen Fraktionen mit Ausnahme der Aktinsediment-Fraktion des Kontrollansatzes. Dieses Ergebnis spricht deutlich dafür, daß eine Aktinassemblierung *in vitro* stattgefunden haben muß, auch wenn der Aktinnachweis in den einzelnen Fraktionen nur wenige Unterschiede offenbarte. Zwischen den einzelnen PKC η -Zelllinien und A9 konnten weder hinsichtlich der Aktinassemblierung noch der ERM-Verteilung Unterschiede nachgewiesen werden. Eine Ursache dafür kann in einer Kreuzreaktivität der einzelnen ERM-Antikörper aufgrund ausgeprägter Homologie der Proteine gesehen werden. Interessanterweise scheinen die ERM-Proteine nur dann C-terminal Threonin phosphoryliert zu werden, wenn sie direkt an Aktinfilamente binden. Der für diese Analysen zur Verfügung gestellte monoklonale Antikörper (freundliche Zuwendung von S. Tsukita, Japan) erkennt spezifisch das phosphorylierte C-terminale Threonin in einem konservierten Motiv der ERM-Proteine (Ezrin T566, Radixin T564, Moesin T547). Auch hier gab es keinen Unterschied im Hinblick auf die modifizierte PKC η -Aktivität, was in Einklang mit den Ergebnissen der *in vitro* Radixin-Phosphorylierungsreaktion steht (Abb. 38).

In Abb. 48 ist ein Modell dargestellt, wie unter Einbezug der Ergebnisse des *in vitro* Aktin-Assemblierungsassays sowie aller in Kapitel 3.3. dargelegten Ergebnisse eine derartige Interaktion zwischen ERM-Proteinen und PKC η aussehen könnte. In diesem Modell kommt es z.B. durch einen externen Stimulus zur Loslösung der ERM von der Membran. Als Mediator- oder Gerüstprotein könnten sie nun Bindungspartner rekrutieren, wie z.B. PKC η , und zielgerichtet an bestimmte Orte in der Zelle transportieren, um eine Wechselwirkung der gebundenen Proteine mit weiteren Proteinen zu ermöglichen. In einem solchen Szenario könnte es zur Aktivierung (Phosphorylierung) von PKC η kommen. Als Konsequenz dessen, könnte der PKC η ERM- (Radixin) Komplex aufgelöst werden, wobei die ERM-Proteine nun löslich im Zytoplasma vorliegen sollten.

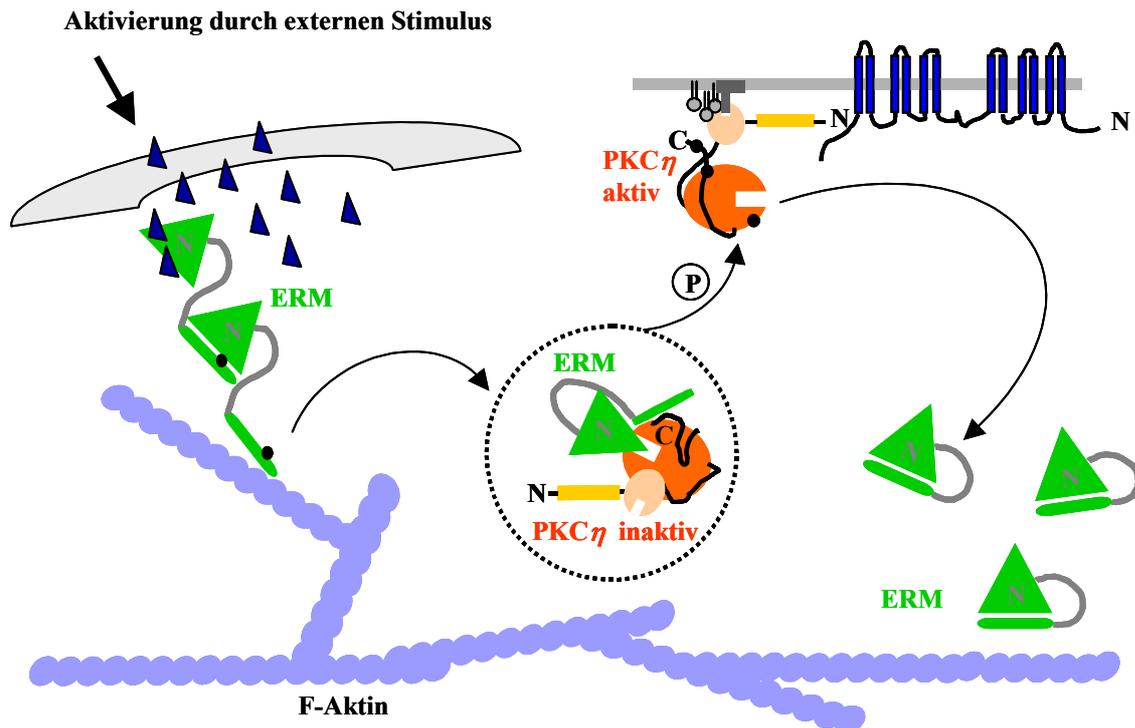


Abb. 48: Hypothetisches Modell der Aktivierung von PKC η durch ERM-Mediatorfunktion. Nach einem ex- oder internen Signalstimulus (Phosphatidylinositolphosphate) der Zelle wäre die Bildung eines Mediator-Komplexes denkbar (im Bild mit einer gestrichelten Linie eingekreist), durch den ERM Proteine PKC η zum Zweck der Aktivierung der Kinase zu anderen Kompartimenten rekrutieren, wie zum Beispiel der Plasmamembran. Der Mediator-Komplex könnte durch Phosphorylierung von PKC η und ein daraus resultierendes verändertes Bindungsverhalten zu den ERM Proteinen aufgelöst werden. Die Aktivierung von PKC η resultiert in einem höheren Anteil löslicher ERM Proteine.

In diesem Stadium läßt der *in vitro* Aktin-Assemblierungsassay noch viele Fragen offen. Diese ungeklärten Regulationsvorgänge zwischen PKC η und den ERM-Proteinen, sowie deren Bindung an Aktinfilamente sollen in Zukunft z.B. durch einen verfeinerten Ansatz entschlüsselt werden, indem aufgereinigte Komponenten zur Polymerisierungsreaktion hinzugefügt werden. Die Frage, ob die mit PKC η in der HA-2 Fraktion zusammen aufgereinigten ERM-Proteine wirklich eine Mediatorfunktion ausüben, indem sie PKC η z.B. zur Aktivierung durch PDK-1 an Stimulationsorte innerhalb der Zelle transportieren, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht endgültig geklärt werden und stellt deswegen eine Herausforderung für die Zukunft dar.

4. Diskussion

Die Regulation viraler Proteine durch Phosphorylierung hat in den letzten Jahren großes Interesse hervorgerufen. Eine Vielzahl derartig modifizierter Proteine sowie die zugehörigen Kinasen wurden bereits identifiziert. Von besonderer Bedeutung ist jedoch die Aufklärung der durch die Phosphorylierung erworbenen Eigenschaften und Funktionen dieser Proteine. Neben einfachen Auswirkungen der Proteinmodifikation, wie zum Beispiel der Stabilisierung viraler Proteine des Kartoffel- (Ivanov, 2001) oder Blumenkohlvirus (Leclerc, 1999), werden auch Protein-Protein-Interaktionen induziert oder verhindert. Für viele Viren, wie Hepatitis B und E oder Herpes Simplex, ist eine Phosphorylierung ihrer Strukturproteine essentiell für die Assemblierung zu Kapsiden (Tyagi, 2002), wohingegen die Phosphorylierung der HIV-Kapside vermutlich ihre Deassemblierung induziert und so zur Freisetzung des viralen Genoms führt (Cartier, 1999). Das humane Parainfluenzavirus (HPIV) verpackt sogar eine zelluläre Kinase, PKC ζ , in seine Virionen, die mit dem Ribonukleoproteinkomplex assoziiert und wichtig für die virale Genexpression ist (De, 1995).

Die meisten Phosphorylierungen viraler Nichtstrukturproteine, sowohl von RNA-Viren wie Rabies (Wu, 2003), Hepatitis D (Yeh, 1996), Humanes Parainfluenzavirus 3 (De, 1995), humanes T-Zell-Leukämie-Virus (Adachi, 1992) oder dem Encephalomyocarditis-Virus (Hirasawa, 2003), als auch von DNA-Viren, z.B. Cytomegalovirus (Wolf, 2001), bovines Herpesvirus 1 (Shaw, 2000), SV40 (Garcia, 2000) oder Herpes Simplex (Zhi, 1999) sind für die virale Replikation bedeutsam. Einen Hinweis darauf gibt die erhöhte DNA/RNA-Bindung im nicht- oder minder-phosphorylierten Zustand, die für NS1 des MVM (Nüesch, 1998a) und auch für das regulatorische Rep78-Protein des Adeno-assoziierten Virus (AAV) (Narasimhan, 2002) oder das Phosphoprotein P des Rabiesvirus (Basak, 2003) beschrieben wurden. Die Phosphorylierung könnte somit einen geeigneten Umschaltmechanismus zwischen Transkription und Replikationsfunktionen der viralen Proteine darstellen. Demzufolge sind solche Regulationsvorgänge besonders wichtig für die virale Vermehrung im Wirtsorganismus. Es liegt auf der Hand, daß sich dadurch Mechanismen entwickelt haben, die es den Viren erlauben, in zelluläre Signalkaskaden zu ihren Gunsten einzugreifen.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Regulation des großen Nichtstrukturproteins NS1 des autonomen Parvovirus (MVM) näher zu charakterisieren. Diesem Protein kommt eine zentrale Bedeutung in der viralen Replikation zu. Frühere Arbeiten zeigten nicht nur, daß NS1 in einer zeitlichen Abhängigkeit durch Phosphorylierung reguliert wird, sondern belegten auch die Bedeutung der posttranslationalen Modifikation dieses Initiatorproteins zur Stimulierung der MVM-DNA-Replikation (Nüesch, 1998a; Nüesch, 1998b; Corbau, 1999). Umfassende Analysen basierend auf NS1-Dephosphorylierungsmutanten mit definiertem biochemischem Profil, aber auch *in vitro* Analysen mit Kinase-freien biochemischen Assays

wiesen auf eine essentielle regulatorische Rolle der PKC-Familie, insbesondere PKC λ , hin. Allerdings belegten die Studien zur viralen DNA-Replikation auch, daß neben PKC λ weitere Kinasen notwendig sind, um die komplexen Aktivitäten des multifunktionalen NS1 zu steuern. Aus diesem Grund sollten weitere Kandidaten identifiziert und der Zusammenhang zwischen regulatorischen Kinasen und dem viralen Vermehrungszyklus in der Zelle erforscht werden. Anhand der viralen DNA-Replikation, bei der die Schlüsselfunktion von NS1 am besten untersucht ist, konnte ein weiteres Enzym, die *novel* Isoform PKC η , als NS1-stimulierende Kinase ermittelt werden. Die in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungen der PKC η -NS1-Interaktion werfen einige interessante Aspekte auf, die für das Verständnis der Parvovirus-Wirtszell-Interaktion und den Tropismus hilfreich sind.

Die Phosphorylierung von NS1 durch PKC λ regelt die Initiation der viralen DNA-Replikation und kontrolliert die Neusynthese des DNA-Stranges. Diese Synthese erfolgt nach Verdrängung des duplizierten Komplementärstranges und erfordert NS1-Entwindungsaktivitäten (Nüesch, 2001). Trotz der prozessiven Helikaseaktivität des PKC λ -phosphorylierten NS1 (Dettwiler, 1999; Nüesch, 2003) findet ohne PKC η keine fortlaufende DNA-Synthese statt. Der Mechanismus, durch den PKC η die NS1-abhängige MVM-DNA-Amplifikation kontrolliert, ist jedoch noch aufzuklären. Die Entwindungsreaktion sowie die endonukleolytische Spaltung des linken *origins* unter physiologischen Bedingungen konnten auch *in vitro* allein mit dephosphoryliertem NS1 und aktiver PKC λ rekonstituiert werden (Nüesch, 2001). Das zeigt, daß PKC η für eine Reihe von NS1-Funktionen, wie der ATP-Bindung und Hydrolyse, der Oligomerisierung oder der Orts-spezifischen Interaktion mit dem DNA-Bindungsmotiv nicht benötigt wird. Darüber hinaus schließt es auch eine Relevanz von PKC η für die endonukleolytische Spaltung des Einzelstrangs am 5'-Terminus, für die Trans-Esterifikation mit dem freien 5'-Ende der gespaltenen DNA sowie für die Interaktion mit dem zellulären Kofaktor PIF aus. Von der prozessiven Helikasefunktion des NS1 nimmt man an, daß sie unmittelbar vor der Replikationsgabel stattfindet, um die Neusynthese des DNA-Stranges durch Polymerase δ zu erlauben. Diese Helikasefunktion ist ebenfalls unabhängig von PKC η (Dettwiler, 1999). Es läßt sich daher spekulieren, daß PKC η möglicherweise die Interaktion von NS1 mit der zellulären DNA-Replikationsmaschinerie reguliert. Dabei könnte man sich vorstellen, daß das Öffnen der viralen Duplex-DNA-Intermediate mit der Neusynthese des Komplementärstranges gekoppelt wird. Erst vor kurzem wurde gezeigt, daß NS1 mit verschiedenen Komponenten des Replikationskomplexes interagiert. Dazu zählen das einzelsträngige DNA-bindende Protein RPA und der RF-C-Komplex aus zellulären akzessorischen Proteinen (Christensen, 2002). Außerdem käme eine Interaktion mit dem aus vier Untereinheiten aufgebauten DNA-Polymerase δ -Komplex in Frage. Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen vermuten, daß die Interaktion von NS1 mit einigen dieser Faktoren durch PKC η -abhängige Phosphorylierung reguliert wird. Phosphorylierungsreaktionen können Protein-Protein-Interaktionen kontrollieren, da die

Übertragung einer negativen Ladung oft die Konformation des Polypeptids und damit auch die Affinität zu verschiedenen Bindungspartnern ändert (Marks, 1996). Bezüglich der MVM-Replikation ist daher vorstellbar, daß NS1 erst durch die von PKC η -phosphorylierten Serin-/Threoninreste bestimmte Faltungsimpulse erhält, die eine Assemblierung der komplexen Replikationsmaschinerie an den Orten ermöglicht, an denen NS1 am *origin* gebunden ist. In diesem Fall wäre auch denkbar, daß NS1 die zelluläre Replikationsmaschinerie aktiv rekrutiert und direkt zum viralen *origin* oder zumindest zu den Orten der viralen Replikation, den APAR *bodies*, bringt. Diese Vermutung wird durch konfokale Immunfluoreszenzdaten unterstützt, welche neben NS1 die Akkumulierung von zellulären Faktoren in diesen subnukleären Strukturen zeigen (Bashir, 2001). Diesbezüglich wäre es interessant herauszufinden, wie die virale DNA-Replikation in diesen APAR-*bodies* verankert ist und ob hierzu eine Modifizierung von NS1 benötigt wird.

Um den Einfluß von PKC η auf die virale DNA-Replikation *in vivo* zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit stabil-transfizierte Zelllinien hergestellt, die sich aufgrund der Expression von Mutanten der Kinase in ihrer PKC η -Aktivität voneinander unterscheiden. Die Hemmung der endogenen PKC η nach MVM-Infektion bewirkte dabei eine drastisch reduzierte Akkumulation intermediärer viraler DNA-Replikationsformen auch aufgrund mangelnder amplifizierter Transkriptionsmatrizen von NS1. Daher waren unter diesen Bedingungen extensive Kollokalisationsstudien in den subnukleären Strukturen schwer durchzuführen. Allerdings könnte das NS1-Phosphorylierungsmuster in Gegenwart einer dominant negativen PKC η -Mutante (PKC η DN) Hinweise für multiple Regulationsvorgänge durch PKC η liefern. Aus diesem Grund wurde eine tryptische 2D-Phosphopeptidanalyse von [³²P] ortho-Phosphat metabolisch markiertem NS1 in A9-Zellen (in Gegenwart aktiver PKC η) sowie in der mit einer dominant negativen PKC η -Mutante stabil-transfizierten A9-Zelllinie durchgeführt. Das Phosphorylierungsmuster zeigte nicht nur ein einzelnes fehlendes Peptid im Vergleich zu der NS1-Phosphorylierung in A9-Zellen, sondern drei spezifische tryptische Phosphopeptide, die in Gegenwart von PKC η DN deutlich unterpräsentiert waren. Hier wäre ein Vergleich mit dem Phosphorylierungsmuster nach *in vitro* Phosphorylierung von NS1 durch PKC η interessant, um zu überprüfen, ob genau diese drei Phosphopeptide von NS1 detektiert werden können. Jedoch ist so ein Vergleich problematisch, da sich aufgrund der ausbleibenden Phosphorylierungen durch andere NS1-aktivierende Kinasen das Wanderungsverhalten der durch PKC η *in vitro* generierten Phosphopeptide ändern kann und nicht punktgenau zu den Peptiden nach *in vivo* Phosphorylierung verläuft. Ähnliche Experimente wurden auch für die durch PKC λ -phosphorylierten Aminosäuren in NS1 durchgeführt (Corbau, 1999). Im Zusammenhang mit einer gezielten Mutagenese führten diese Experimente zur Identifizierung spezifischer durch PKC λ -phosphorylierter Aminosäuren (Dettwiler, 1999). Die Kenntnis der von PKC η -genutzten Phosphorylierungsstellen in NS1 könnte zur Charakterisierung der modulierten Funktion

führen und eine weitere Lücke in der Domänenstruktur dieses komplexen Proteins füllen. Die ausgeprägte Abhängigkeit der NS1-Aktivierung von PKC η bereits *in vitro* ist bemerkenswert, konnten doch andere Mitglieder der PKC-Familie, wie die konventionellen PKC α , PKC β I/ β II und PKC γ , oder die am nächsten verwandte *novel* PKC ε (Kashiwagi, 2002) nicht die fehlende Funktion des unphosphorylierten NS1⁰ komplementieren, obgleich sie das Protein *in vitro* ebenfalls phosphorylierten (Dettwiler, 1999). Eine solche strikte Abhängigkeit hat sicherlich Auswirkungen für die Virusvermehrung *in vivo* und könnte den Wirtszelltropismus des Virus (mit)bestimmen, da PKC η im Gegensatz zu der anderen NS1-regulierenden Kinase, PKC λ , nicht ubiquitär exprimiert wird.

Die Isoform PKC η ist als Kalzium-unabhängige Kinase zur *novel* PKC-Subfamilie klassifiziert worden, wobei sie unter den PKC-Isoenzymen die höchste Homologie zu PKC ε aufweist (Kashiwagi, 2002). Die cDNA von PKC η wurde aus murinem Hautgewebe isoliert und auf Chromosom 12 kartiert (Chida, 1998). PKC η kann nur Gewebe-spezifisch nachgewiesen werden. Die Abhängigkeit von PKC η vom Differenzierungsgrad der Zelle spiegelt sich in der überwiegenden Expression der Kinase in Zellen epithelialen Ursprungs (Greif, 1992; Bacher, 1991; Osada, 1990) und neuronalen Vorläuferzellen (Esdar, 1999); (Oehrlein, 1998) wieder. Diese Zellen kommen in der Haut, Zunge, Speiseröhre, Magen, Luftröhre und Bronchien vor, ein Umstand, der diese Organe zu Kandidaten für den primären Ort der Virusvermehrung macht. In Keratinozyten spielt PKC η eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung (Ohba, 1998), indem durch Aktivierung der Ras/MEKK1/MEK3-Kaskade (Efimova, 2002) sowie durch Interaktion von PKC η mit der Tyrosinkinase Fyn (Cabodi, 2000) eine Wachstumshemmung der Keratinozyten induziert wird. Die PKC η -Funktion ist ebenso für die Wachstumskontrolle in Hefe wichtig (Nomoto, 1997). In Skelettmuskelzellen wurde eine erhöhte Expression der Kinase in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad beobachtet (Boczan, 2000). Interessanterweise konnte in verschiedenen Brustkrebstumoren eine Korrelation der PKC η -Expression mit dem Auftreten von MDR1 (*multi drug resistance associated proteins*) festgestellt werden (Beck, 1998). Außerdem wird PKC η wie andere PKC-Isoformen durch die Präsenz von Tumorpromotoren wie TPA stimuliert. Diese Induktion von PKC η -Aktivität in transformierten Zellen könnte ein Grund dafür sein, daß die Vermehrung der autonomen Parvoviren vorwiegend in neoplastisch-transformierten Zellen stattfindet (Übersicht bei Rommelaere, 1991). Dementsprechend könnten wegen ihrer Disregulation in vielen transformierten Zellen diese Protein-Kinasen mögliche Kandidaten für onkotropische Determinanten darstellen. Es ist dabei denkbar, daß eine neoplastische Transformation spezieller Gewebe zur Aktivierung von PKC und somit zu einer erhöhten Permissivität gegenüber einer Parvovirusinfektion beiträgt. Solche Überlegungen werden durch Beobachtungen in anderen viralen Systemen untermauert. Beispielsweise hängt die Zellpermissivität für Parainfluenzaviren von PKC ζ ab (De, 1995). Natürlich muß eine solche hypothetische Rolle für PKC η noch experimentell belegt werden.

Für den Fall, daß sich eine Korrelation zwischen der Permissivität einer Zelllinie für MVM und der Präsenz von PKC η abzeichnet, wäre sicher auch eine Übertragung auf andere Parvovirusssysteme hinsichtlich potentieller Anwendungen in der Krebstherapie erstrebenswert. Zum Beispiel könnte die mögliche Effizienz parvoviraler Vektoren zur Abtötung spezifischer Tumorzellen- und Gewebe überprüft werden, indem die Expression von PKC η als Markerprotein herangezogen wird. Doch die Voraussetzung dazu wäre, daß PKC η nicht nur für MVM eine funktionelle Relevanz besitzt, sondern auch für andere Parvovirusstämme.

Die Hemmung endogener PKC η wirkte sich hauptsächlich auf die virale DNA-Amplifikation aus. Die Expression von Kinase-inaktiven PKC η -Mutanten führte aber auch zu negativen Einflüssen auf andere virale Funktionen, wie zum Beispiel die Virusaufnahme der Zellen. Im Gegensatz dazu war die Zelllinie, die konstitutiv aktive PKC η A160E exprimiert, ebenso kompetent zur Virusaufnahme, wie A9-Fibroblastenzellen. Über welchen Mechanismus die Inaktivierung von PKC η den Eintritt der Viren verhindert, kann nur spekuliert werden, insbesondere, da der MVM-Rezeptor nicht bekannt ist. Möglicherweise ist der beobachtete Effekt bei der Aufnahme von MVM-Partikeln in die A9-Derivatzelllinien beispielhaft für einen Einfluß von PKC η auf Rezeptor-aktivierte Prozesse. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, daß die PKC-Aktivität mit der Menge an Zelloberflächenrezeptoren korrelieren kann, wie für den Retinolsäurerezeptor (RAR) gezeigt wurde (Boskovic, 2002). In gleichem Maße kann die Internalisierung ausgewählter zellulärer Rezeptoren (Beeler, 1995) beeinflusst werden, wie die des Serotonin Rezeptors 5-HT_{2A} (Bhattacharyya, 2002). Außerdem können PKC den intrazellulären Transport des Rezeptors für den Insulin-Wachstumsfaktor IGFII (Hu, 1990) regulieren und Rezeptor-Recycling fördern (Shih, 1999; Bao, 2000). So ist es vorstellbar, daß auch die Anzahl der MVM-Rezeptoren auf der Zelle unter Bedingungen mit reduzierter PKC η -Aktivität (wie in Anwesenheit der inaktiven η -Mutanten) limitierend werden könnte. Möglicherweise wird der intrazelluläre Transport des Rezeptors gehemmt. Für Myelomazellen wurde nachgewiesen, daß PKC δ und PKC η die Ausschüttung des Interleukin 6 Rezeptors kontrollieren (Thabard, 2001), der somit als möglicher Kandidat für den MVM-Rezeptor in Frage käme. Da NS1 virale und zelluläre Promotoren zu regulieren vermag, bietet es sich an, die Besonderheiten des PKC η -Promotors zu betrachten: Dem PKC η -Promotor fehlen typische TAAT-, CAAT- und GC-Box-Sequenzen (Quan, 1999). Er wird durch Ets, Hitzeschockfaktoren und AP-1 reguliert und besitzt ebenso wie der P4-Promotor zur NS1/2-Expression Bindungsstellen für Sp1. Damit könnte eine potentielle Modulation der PKC η -Promotor-Aktivität durch die beschriebene Interaktion von NS1 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 induziert werden (Kradly, 1995). Eine erhöhte Expression von PKC η nach Infektion könnte dabei nicht nur die DNA-Amplifikation, sondern auch die Virusaufnahme begünstigen. Allerdings sind auch negative Einflüsse von PKC auf die Präsenz von Oberflächenrezeptoren in der Literatur zu finden. So wird zum

Beispiel der Transferrin-Rezeptor, der als Rezeptor für das Canine Parvovirus identifiziert worden ist (Parker, 2001), nach längerer Aktivierung von PKC durch Phorbol ester herabreguliert (Schonhorn, 1995). Solche konzeptionellen Widersprüche unterstreichen die Notwendigkeit, den Einfluß von MVM auf die Regulation von PKC η im Detail zu untersuchen.

Neben einer Mengenzunahme kann die Stimulation einer Protein-Kinase über ihre posttranslationalen Modifikationen oder auch durch ihr verändertes Verhalten nach einer Translokation bestimmt werden. Die meisten Isoformen der PKC-Familie unterliegen einer intrazellulären Translokation nach aktivierendem Stimulus, die sich oft an ihrer Bindung zu unlöslichen Membranstrukturen äußert. In nicht stimulierten Endothelzellen zum Beispiel wird PKC η überwiegend in der perinukleären Region sowie dem Golgi nachgewiesen, während eine Induktion mit TPA hier zur Verschiebung eines signifikanten Anteils der Kinase zur nukleären Membran und in den Nukleus führt (Harrington, 2000). Im Gegensatz zu anderen *novel* oder konventionellen PKC-Isoformen wird PKC η durch TPA-Stimulus transloziert, aber nicht herabreguliert (Chen, 1997), was auch in der vorliegenden Arbeit in A9-Zellen gezeigt werden konnte. Demgegenüber berichteten (Gschwendt, 1992) als bisher einzige Autoren von einer Herabregulierung von PKC η nach TPA-Stimulus in muriner Epidermis. Auch das im Zellkern von Hautzellen nachgewiesene humane Homolog PKC-L der murinen Isoform η , wurde nach TPA-Behandlung nicht herabreguliert (Greif, 1992).

Die Aktivierung von PKC η kann nachfolgend eine Degradation der Kinase auslösen (Kang, 2000). Die Autoren beobachteten neben degradierten Fragmenten auch eine höher molekulare Form der Kinase durch Ubiquitynylierung in Gegenwart von Proteasom-inhibitoren. Eine solche Modifikation könnte eventuell eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit nachgewiesene höher molekulare Bande endogener PKC η (MW 180 kDa) in A9-Zellen sein. Ein proteolytisches PKC η -Fragment wird auch in apoptotischen Lymphozyten generiert (Morrow, 1999). Interessanterweise wurden die PKC η -Mutanten A160E und T512A nur mit ihrem berechneten MW von circa 80 kDa nachgewiesen. Für den Fall, daß die endogene PKC η durch posttranslationale Modifikationen in den Maus-Fibroblastenzellen ihr erhöhtes Molekulargewicht erhält, kann geschlußfolgert werden, daß die Mutanten in derselben Zelllinie nicht modifiziert werden. Eine Ursache hierfür könnte in der Überexpression der auf der humanen PKC η -Gensequenz-basierenden Mutanten liegen. Andere humane und auch murine Zelllinien wurden ebenfalls auf die Präsenz von PKC η untersucht und zeigten kein abnormales Molekulargewicht (Daten nicht gezeigt). Als posttranslationale Modifikationen, die eine erhebliche Zunahme des Molekulargewichts eines Proteins verursachen könnten, kämen die Myristylierung, Palmytylierung oder Sumoylierung in Frage. Für alle genannten Modifikationen bietet die PKC η -Gensequenz eine Vielzahl von Konsensusmotiven. Sollte nach MVM-Infektion eine Stimulierung der endogenen PKC η zur Gewährleistung einer

optimalen Replikation stattfinden, müßten zumindest einige dieser Kriterien, wie die erhöhte Expression, eine intrazelluläre Translokation oder die Degradation der Kinase zu beobachten sein. Durch Immunfluoreszenzanalyse konnte in dieser Arbeit eine Umverteilung von PKC η nach MVM-Infektion in A9-Fibroblastenzellen gezeigt werden. Die endogene Kinase translozierte in etwa 50-60% der infizierten Zellen innerhalb des Zytoplasmas zur nukleären Membran, die somit als lokaler Ort der Stimulierung angesehen werden kann. In der Literatur ist am selben Ort in murinen Fibroblastenzellen NIH3T3 eine Komplexbildung von PKC η mit Zyklin E und Cdk2 beschrieben worden (Shtutman, 2003). Die Überexpression der konstitutiv aktiven Mutante PKC η A160E führte zu einer Anreicherung der Kinase an der Plasmamembran, nicht jedoch der nukleären Membran. Die inaktive Mutante PKC η T512A zeigte eine weitgehend zytoplasmatische Verteilung und Akkumulierung in Membran *ruffles*. Eine gleichzeitige Anfärbung mit Markerproteinen für das endoplasmatische Retikulum (z.B. ER-Membranprotein SSR α : *signal sequence receptor α*) oder Golgi (GM130, TGN38-Marker) wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, wäre jedoch zur genaueren Charakterisierung der Mutanten von potentiell Interesse, da z.B. auch die in Keratinozyten konstitutiv exprimierte PKC η in Affennierenzellen (COS) am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Chida, 1994). Beide PKC-Mutanten, η A160E und η T512A, wurden durch biochemische Fraktionierung in denselben Zellfraktionen jedoch in unterschiedlichen Mengen nachgewiesen. Es läßt sich schließen, daß die Zellen möglicherweise an überexprimierter PKC η übersättigt sind, so daß die Mutanten innerhalb der Zelle sowohl an den Orten ihrer Aktivierung als auch ihrer Synthese vorliegen könnten. Da der Anteil konstitutiv aktiver PKC η A160E im Vergleich zur inaktiven η T512A in der nukleären Membranfraktion deutlich vermehrt vorkommt, können diese Daten als Bestätigung gewertet werden, daß in der Tat nach MVM-Infektion die nukleäre Membran der Zielort für die Funktionen der aktivierten endogenen Kinase ist. Die nur mittels Immunfluoreszenz nachweisbare dominant negative Mutante PKC η DN zeigte eine deutliche Akkumulation innerhalb der nukleären Membran, so daß davon ausgegangen werden kann, daß nach MVM-Infektion spezifische Liganden für die Bindung der regulatorischen Domäne von PKC η in diesem Kompartiment freigesetzt werden. Als spezifische PKC η -aktivierende Lipide wurden in der Hautepidermis z.B. Cholesterolsulfat und Sulfatid nachgewiesen (Kuroki, 2000).

Es wäre sehr aufschlußreich zu klären, welche Funktion PKC η an der nukleären Membran ausführt. Durch den im viralen Infektionszyklus eher späten Zeitpunkt der beobachteten Translokation und der Bedeutung von PKC η für die bereits zu frühen Zeitpunkten einsetzende virale Replikation, kann spekuliert werden, daß es sich hier um eine über die Replikation hinausgehende Funktion von PKC η handeln muß. Andererseits könnte die MVM-induzierte Translokation von PKC η möglicherweise auch eine positive Feedback-Kontrolle auslösen, indem das aktivierte Enzym durch NS1-Modifikation die MVM-DNA-

Replikation stimuliert. Es besteht auch die Möglichkeit, daß die Ansammlung von PKC η einfach aus den beobachteten Zytoskelettumstrukturierungen resultiert.

Eine wichtige Voraussetzung für Parvoviren, eine produktive Infektion einzuleiten, besteht darin, daß die infizierten Zellen die S-Phase des mitotischen Zyklus durchlaufen. Dies liegt darin begründet, daß für die Herstellung der ersten Transkriptionsmatrizen Zyklin A gebraucht wird (Bashir, 2000). Im Gegensatz zu anderen Viren, wie z.B. Cytomegalievirus (Wiebusch, 2003), Humanes T-Zell-Leukämie-Virus (Ohtani, 2000), HPV (Übersicht bei zur Hausen, 2000), SV40 (Okuda, 1984) oder Adenoviren (Egan, 1989) sind Parvoviren nicht in der Lage, aktiv die Progression des Zellzyklus zu induzieren. Erst nach Einsetzen der Neusynthese der NS-Proteine können sie den Zellzyklus der Wirtszelle beeinflussen, indem sie einen Arrest in der späten S-Phase des Zellzyklus hervorrufen (Op de Beek, 1995). Dies wirft einen interessanten neuen Aspekt der Aktivierung von PKC η auf. Man könnte vermuten, daß der Zeitpunkt der MVM-induzierten Aktivierung dieser Kinase durch den Verlauf des viralen Infektionszyklus bewußt so gewählt wird, daß sie erst in der S-Phase erfolgen kann. Dadurch könnte ein möglicher negativer Einfluß von PKC η auf den Zellzyklus verhindert werden. In Keratinozyten (Ohba, 1998) sowie in NIH3T3-Zellen (Livneh, 1996) hemmt PKC η nämlich die Progression des Zellzyklus während der G1/S-Phase, was sich auf die MVM-Infektion negativ auswirken würde. Analog wurde auch in murinen Keratinozyten (Ishino, 1998), Lungenzellen (Ohba, 1998) und Sf9-Zellen (Kashiwagi, 2000) ein G1-Arrest nach PKC η -Aktivität beobachtet. Durch Assoziation mit Zyklin E/ Cdk2/ p21 in der perinukleären Region hemmt PKC η hier die Cdk2-Aktivität. Die Interaktion von PKC η mit diesem Komplex involviert die katalytische Domäne der Kinase (Kashiwagi, 2002) und resultierte in abnehmender Phosphorylierung des Retinoblastomproteins durch Cdk2. Außerdem korreliert die PKC η -Expression mit der Expression von Zyklin E und D in MCF-7 epithelialen Brust-Adenokarzinomzellen (Fima, 2001). Die Kinaseaktivität dieser beiden Zykline war in den PKC η -exprimierenden Zellen höher. Allerdings stimulierte PKC η ebenfalls die Expression vom Cdk-Inhibitor p21^{WAF1}, was jedoch keine hemmenden Auswirkungen auf den Zellzyklus hatte. Die Autoren vermuten, daß für die Hemmung des Zellzyklus durch diesen Inhibitor erst ein Schwellenwert erreicht werden muß, andernfalls könnte p21^{WAF1} auch als Assemblierungsfaktor für Zyklin/Cdk dienen. Die durch PKC η -induzierte erhöhte Zyklin E-Produktion in epithelialen Brustkarzinomzellen führte ebenfalls zu einer Kolo-kalisierung im perinukleären Raum in Serum starvierten Zellen (Shtutman, 2003). Dabei stellt sich die Frage, ob die PKC η -Translokation in den perinukleären Bereich nach MVM-Infektion einen Einfluß auf die Zykline hat. Eine Charakterisierung der PKC η -Mutanten mit Zyklin E, Zyklin A, Cdk2 sowie anderen Zellzyklus-komponenten in A9-Zellen wäre dabei sicherlich interessant. Es wäre auch vorstellbar, daß in A9-Zellen die Aktivierung von PKC η mit einer erhöhten Expression von Zyklin E einhergeht und dadurch eine tumorigene Zellumgebung für die Parvoviren

geschaffen werden könnte, da Zyklin E eine bedeutende Rolle in der Zellzyklusprogression und Aggressivität von Tumoren zukommt (Erlandsson, 2003; Farley, 2003). Eine Hemmung der MVM-Replikation aufgrund eines verzögerten S-Phase-Eintritts der η -Kinase-inaktiven Zelllinien kann jedoch ausgeschlossen werden, da die stabil transfizierten Zelllinien mit nur geringfügig von A9 oder der konstitutiv aktiven Zelllinien η A160E abweichenden Kinetik passagiert werden können. Vielmehr wäre ein möglicher Zusammenhang zwischen PKC η und der nach MVM-Infektion nachgewiesenen inhibierten Phosphorylierung eines unbekanntes zellulären Proteins von 14kDa (p14) zu Beginn der S-Phase zu untersuchen (Anouja, 1997). Die Autoren vermuten, daß die Funktion des p14 möglicherweise mit der Unterdrückung der zellulären DNA-Synthese in Zusammenhang steht.

Eine Rolle von PKC η in der Regulation der kontinuierlichen Reinitiation der viralen DNA-Replikation ist zwar sehr spekulativ doch trotzdem erwähnenswert. Bei der viralen DNA-Replikation müssen zwei Probleme überwunden werden: die zellulären prä-Replikationskomplexe sind an die viralen *origins* zu rekrutieren und die zelluläre Replikation muß unterbunden werden, da sie mit der viralen DNA-Synthese kompetitieren würde. Zudem ist eine kontinuierliche Reinitiation der viralen DNA-Replikation erforderlich. Die zelluläre DNA-Replikation ist normalerweise auf eine Runde pro S-Phase beschränkt. Der Grund dafür liegt in der Verhinderung einer erneuten prä-Replikationskomplexbildung aus dem ORC (*origin recognition complex*), Cdc6 (*cell division cycle*) und Cdt (*licensing* Faktor). Dieser Komplex rekrutiert die MCM- (*minichromosome maintenance*) Helikase zum Chromatin. Nach Initiation der Replikation löst sich MCM aus dem Replikationskomplex und liegt frei im Zellkern vor. Blow (1988) zeigten, daß der die Bildung des chromosomalen prä-Replikationskomplexes auslösende Faktor, ebenso wie PKC η , zytosolisch vorliegt. Eine neuerliche prä-Replikationskomplexbildung wird durch Bindung des freiwerdenden MCM innerhalb eines Ran-GTP-Crm1-MCM-Komplexes verhindert. Interessanterweise steht die Assemblierung des Ran-GTP-Crm1-MCM-Komplexes in *Xenopus* unter Kontrolle aktivierter Cdk2 am Übergang der G1- zur S-Phase (Yamaguchi, 2003). Eine mögliche Inaktivierung von Cdk2 könnte so zu ungehemmter viraler Replikation führen. Wie bereits beschrieben, wäre PKC η für eine solche Funktion in der perinukleären Peripherie optimal positioniert. Außerdem ist bereits in Keratinozyten belegt worden, daß eine Hemmung der Cdk2-Aktivität durch PKC η erfolgen kann (Kashiwagi, 2002).

Die komplexe Wirkungsweise von PKC η auf die Zelle und die daraus resultierenden positiven wie negativen Einflüssen auf den viralen Zyklus verlangen nach einer gezielten Regulation dieser Kinase durch das Virus. Das wird auch durch die vorgelegte Arbeit unterstützt, die zeigt, daß sich nicht nur die biochemischen Eigenschaften der endogenen PKC η sondern auch ihre intrazelluläre Verteilung im Laufe der Infektion verändern. Die Erforschung der Regulation von PKC η durch MVM ist nicht nur aus Sicht des Virologen von

Interesse, sondern könnte auch unter physiologischen Bedingungen, das heißt ohne die Anwendung oft relativ unspezifischer Aktivatoren/Inhibitoren, Hinweise auf die Signalabläufe in der Zelle geben. Der wichtigste beschriebene Aktivator der PKC wurde in der *Phosphoinositid-dependent-Kinase* (PDK-1) gefunden (Le Good, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, daß der Aktivierung von PKC η eine Aktivierung dieser Aktivator-Kinase PDK-1 vorausgeht, die sich nach MVM-Infektion an spezifischen Membranstrukturen sowie im Nukleus anreichert. Diese Stimulierung und Umverteilung von PDK-1 geht wahrscheinlich auf die von der Wirtszelle aufgenommenen viralen Kapside zurück und wird möglicherweise über längere Zeit als Signalstimulus aufrecht erhalten. Darüber hinaus gelang es, die mit der Aktivierung durch die virale Infektion verbundene erhöhte Unlöslichkeit endogener PKC η durch eine inaktive PDK-Mutante S244A zu unterbinden. Die direkte Interaktion zwischen PDK-1 und den einzelnen PKC-Isoformen in der Zelle, wurde in der Arbeitsgruppe von Parker (Le Good, 1998) durch Koimmunpräzipitation gezeigt. In A9-Zellen findet die Aktivierung von PKC η durch PDK an der Plasmamembran statt, da hier durch die inaktive PDK-Mutante eine Kolokalisation mit endogener PKC η gezeigt werden konnte. Eine plausible Erklärung hierfür mag darin gesehen werden, daß beide Kinasen PDK-S244A und PKC η zwar zu denselben Stimulationsorten innerhalb der Zelle transportiert werden, jedoch aufgrund der fehlenden Kinaseaktivität der PDK-Mutante eine Aktivierung von PKC η und ein nachfolgender Abtransport dieser Isoform ausbleibt.

Im Anschluß an die PDK-Phosphorylierung werden *novel* PKC durch eine weitere Phosphorylierung am hydrophoben Motiv sowie einer Autophosphorylierung am *Turn*-Motiv aktiviert (Newton, 2003). Für PKC δ konnte gezeigt werden, daß diese Phosphorylierung am hydrophoben Motiv durch die atypische PKC ζ erfolgt (Ziegler, 1999). Während bisher keine Hinweise für einen Beitrag von PKC ζ zum viralen Zyklus gefunden wurden, konnten vorausgehende Arbeiten in unserem Labor nachweisen, daß die andere bekannte atypische Isoform, PKC λ , für die virale DNA-Replikation gebraucht und durch MVM modifiziert wird (Nüesch, 2003). Diese Kinase liegt in A9-Zellen zunächst nur im Nukleus aktiv vor. Es gibt jedoch Hinweise, daß sie nach MVM-Infektion auch im Zytoplasma aktiviert wird. Mittels spezifischer GFP-markierter Mutanten konnte dabei gezeigt werden, daß diese Regulation wahrscheinlich durch Kern-Zytoplasma-Transport ermöglicht wird, der durch die vorhandenen Signale für den nukleären Import/Export gesteuert wird (Perander, 2001). Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, daß PKC λ in Analogie zu den PKC ζ -Befunden möglicherweise für die Phosphorylierung des hydrophoben Motivs von PKC η in Frage käme. Ein *in vivo* Markierungsexperiment der Volllänge-PKC η -Mutanten mit [32 P] ortho-Phosphat belegte, daß die Phosphorylierung von PKC η T512A in Gegenwart einer dominant negativen Mutante von PKC λ deutlich schwächer ausfiel im Vergleich zur Phosphorylierung derselben Mutante bei Vorliegen aktiver PKC λ . Dieses vorläufige Ergebnis eröffnet weitere Einblicke

in die komplexe Aktivierungskaskade der PKC-Isoformen und bedarf dringend weiterer Untersuchungen. Es bietet sich an, für dieses Experiment zwei weitere PKC η -Mutanten miteinzubeziehen: eine Mutante mit zerstörtem hydrophobem Motiv (S674A) sowie eine Doppelmutante (T512A, S674A). Unter Einbeziehung dieser Kontrollen kann zurückverfolgt werden, welche Motive das beobachtete Phosphorylierungssignal der η T512A-Mutante im *in vivo* Markierungsexperiment ausmachen. Durch diese Versuchsbedingungen ließe sich ebenfalls untersuchen, ob die Reihenfolge der Phosphorylierungsschritte in der katalytischen Domäne der PKC tatsächlich dem von Newton (2003) propagierten Modell entspricht oder, ob es eventuell in Abhängigkeit vom Isoenzym Abweichungen davon gibt. Vorstellbar wäre ebenfalls, daß aufgrund der ausgesprochen hohen Konservierung des hydrophoben Motivs wie bei anderen, durch PDK-stimulierten Kinasen der AGC-Familie, die Phosphorylierung des hydrophoben Motivs dem des Aktivierungsloops vorausgeht (Frodin, 2002). Diese Annahme könnte mittels Koimmunpräzipitation von PKC η und PDK-1 ermittelt werden, wobei die unterschiedliche Affinität der PDK-1 zur nicht phosphorylierten (S674A) beziehungsweise phosphorylierten Mutante (S674E) Hinweise geben könnte.

Obwohl PKC η in der Lage war, NS1 für seine Replikationsfunktionen zusammen mit PKC λ zu aktivieren, konnte keine vollständige Rekonstituierung des phosphorylierten Proteins erreicht werden. Zudem wurden bei der Aufreinigung der endogenen PKC η Mediatorproteine identifiziert, die einen stimulierenden Einfluß auf die Kinase ausüben könnten. Es ist deshalb möglich, daß in der Zelle Kofaktoren für eine optimale Phosphorylierung von NS1 benötigt werden. Nicht nur die subzelluläre Umverteilung und Aktivierung (Ohno, 2001), sondern auch die Interaktion mit ausgewählten Partnerproteinen (Jaken, 2000) sind dafür verantwortlich, daß PKC-Isoenzyme in der Zelle ein sehr breites Spektrum an Signalkaskaden auslösen können (Schonwasser, 1998; Übersicht bei Toker, 1998). Dementsprechend kann eine einzige Isoform in Abhängigkeit vom Zellursprung und dem auslösenden Stimulus an multiplen (teilweise sogar gegensätzlichen) Signalwegen beteiligt sein. In neuronalen Vorläuferzellen konnte GAP-43 (Esdar, 1999) in humanen embryonischen Nierenzellen die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2 des Insulin-Signal-Transduktionsweges (Strack, 2002) als Substrate von PKC η identifiziert werden. Auch der Aktivierungsloop von PKC μ wird von PKC η phosphoryliert, wodurch eine Stimulierung der p42 MAPK-Kaskade ausgelöst und die durch PKC η -vermittelte Aktivierung von JNK reduziert wird (Brandlin, 2002). Als PKC η -stimulierende Faktoren sind PDGF und FGF beschrieben worden (Fima, 1999). Unklar hingegen ist dabei, inwiefern die Aktivierung von PKC η auch Mediator- oder Gerüstproteine benötigt, die die Kinase zu Orten der Ligandenfreisetzung, zu Protein-Interaktionspartnern oder potentiellen Substraten innerhalb der Zelle bringt oder ihre Substratspezifität bestimmt. Interessanterweise wurde für PKC η eine Interaktion mit PKD über deren PH-Domäne nachgewiesen (Waldron, 1999), von der vermutet wird, daß sie für die subzelluläre Verteilung der Kinasen wichtig sein könnte. PKD besitzt mehrere regulatorische Domänen, die es als

Gerüstprotein für PKC η und andere Bindungspartner klassifizieren könnten. Diese Interaktionsstudien belegten auch eine unerwartet hohe Spezifität der PKD PH-Domäne, da ihre Bindungsaffinität zu unterschiedlichen PKC-Isoformen stark voneinander abweicht (Waldron, 1999). In *Drosophila* wurde das sogenannte InaD-Protein identifiziert, das mit seinen 5 PDZ-Domänen als Gerüstprotein für PLC- β , eye-PKC und TRP dient (Huber, 1996). Insbesondere für die atypischen PKC sind eine Reihe weiterer funktioneller Bindungsproteine beschrieben worden, die für die Aktivierung (LIP, ZIP, ras), Inhibierung (par-4) oder das Targeting verantwortlich sind (Übersicht bei Jaken, 2000). Es wird vermutet, daß kleinen GTPasen (smg) der Rho-Familie eine Rolle im subzellulären *Targeting* von PKC η zukommt (Hahn, 2003).

Im Rahmen der Identifizierung von PKC η als aktivierende Kinase für NS1-Replikationsfunktionen sind in derselben Fraktion (HA-2C) große Mengen an ERM-(Ezrin Radixin Moesin-Familie) Proteinen nachgewiesen worden. Daher ergab sich die Fragestellung, ob diese Proteine als Mediatorproteine für PKC η in Frage kommen. Der Sachverhalt wurde mit vielfältigen, sehr verschiedenartigen Experimenten untersucht. So lieferte die Löslichkeits-Fraktionierung der PKC η -Mutanten-Zelllinien Hinweise auf eine von der PKC η -Aktivität abhängige Membranassoziation der ERM-Proteine. Es wurde gezeigt, daß die ERM-Proteine bei Vorliegen inaktiver PKC η eine reduzierte Löslichkeit aufweisen. Der Einfluß von PKC η auf die ERM-Proteine ist vermutlich nicht direkter Natur, da zumindest eine *in vitro* Phosphorylierung von Radixin durch PKC η ausblieb. Von den PKC-Isoformen konnten lediglich PKC α (Ng, 2001), PKC θ (Pietromonaco, 1998) und wie im *in vitro* Phosphorylierungsassay in dieser Arbeit gezeigt, PKC ϵ , die ERM-Proteine C-terminal phosphorylieren. Es ist deshalb möglich, daß indirekt noch weitere PKCs in der Modulation von oder durch MVM beteiligt sind. Auch die nach *in vitro* Assemblierung von Aktin nachgewiesene C-terminale Phosphorylierung der ERM-Proteine unterschied sich nicht in den PKC η -Mutanten-Zelllinien. Aufgrund von Immunfluoreszenzdaten ist es wahrscheinlich, daß es *in vivo* zu einer Interaktion beider Proteine miteinander kommt, jedoch nicht zur Kinase-Substrat-Reaktion. Die Kolokalisation von Radixin und PKC η findet an der Plasmamembran statt und war lediglich mit den Volllänge-Mutanten sichtbar, nicht jedoch mit der verkürzten η DN. Es läßt sich schlußfolgern, daß für die Interaktion die katalytische Domäne der Kinase notwendig ist. In weiterführenden Experimenten könnte die Relevanz dieser Kolokalisation beispielsweise mit der FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) -Technologie analysiert werden. Auch die Verwendung bereits klonierter Radixin-Deletionsmutanten (Lachmann, unveröffentlicht) bietet sich an, um die möglichen Interaktionsdomänen von Radixin zu identifizieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Interaktion zwischen beiden Proteinen mittels Immunpräzipitation nach Überexpression unter Kontrolle des viralen P38-Promotors in A9-Zellen für die Mutante PKC η T512A gezeigt werden. Wenngleich sich die durch Silberfärbung und Western Blotting sichtbar gemachte Bande nur

marginal vom unspezifischen Hintergrund unterschied, so zeigen derzeit im Labor fortgesetzte Experimente eine deutliche Bestätigung dieses Befundes (Nüesch, persönliche Mitteilung). Mittels transienter Transfektionsexperimente ließ sich in humanen Zellen eine deutliche Kopräzipitation mit der inaktiven PKC η T512A, nicht aber mit aktiver PKC η wt oder PKC η A160E erzielen. Dabei scheint die C-terminale Phosphorylierungsstelle (T564) in Radixin eine entscheidende Rolle zu spielen (Nüesch, unveröffentlichte Daten). Es ist erstrebenswert, diese potentielle Interaktion von PKC η T512A auch für Ezrin und Moesin zu untersuchen, wobei es von großer Bedeutung wäre, wenn sich die Interaktion allein auf Radixin beschränkte. Für das homologe Ezrin wurde bereits eine c-AMP-abhängige Funktion als Verankerungsprotein der Protein-Kinase A nachgewiesen (Dransfield, 1997). In Blot *Overlay*-Experimenten zeigte sich jedoch, daß Radixin und Moesin auch in der Lage sind, die regulatorische Untereinheit der PKA ebenso wie Ezrin zu binden. Für Ezrin konnte außerdem gezeigt werden, daß es mit der p85-Untereinheit der PI3-K interagiert und oberhalb des PI3-K Signalweges bedeutsam ist (Gautreau, 1999). Bezüglich der potentiellen Rolle von ERM als PKC-Mediatorproteine blieben noch zahlreiche Fragen offen. Analog zu den PKC η -Studien sollen sie mit Hilfe von Zelllinien, die dominant negative ERM-Mutanten exprimieren, beantwortet werden. Dabei kann das Replikationsverhalten von MVM in diesen Zelllinien als Indikator gewertet werden, ob diese Proteine wirklich für die postulierten Vorgänge benötigt werden.

Durch neuere Interaktionsstudien verdichten sich die Indizien, daß ERM-Proteine eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung insbesondere für Aktin-Assemblierungs- und Deassemblierungsvorgänge *in vivo* spielen (Heuser, 2001). Kürzlich wurde gezeigt, daß Moesin antagonistisch zum Rho-Signalweg fungiert und damit eine essentielle Bedeutung für die epitheliale Morphologie besitzt (Speck, 2003). Außerdem wurde nachgewiesen, daß *knock outs* von Moesin in *Drosophila* lethal sind (Miller, 2003). Die Moesin-defizienten Klone wiesen Defekte bei der Ausbildung der Zellpolarität und der Organisation des Aktinzytoskeletts auf. Dieser Befund liefert neue Hinweise, daß die ERM-Proteine individuelle Eigenschaften besitzen und nicht nur, wie bisherige Untersuchungen in Vertebraten zu belegen schienen, funktionell redundant agieren (Doi, 1999). Im Einklang mit diesen Erkenntnissen könnten die ERM-Proteine durchaus auch eine Vermittlerfunktion zwischen PKC-, Zytoskelett und Membranstrukturen ausüben.

Wie bereits zu Beginn angedeutet, könnten MVM- induzierte Veränderungen in der PDK-1/PKC-Signalkaskade auch zu Umstrukturierungen im Zytoskelett führen, was insbesondere im Fall der atypischen PKC λ und ζ eindrücklich belegt ist (Ueberall, 1999). Für PKC η kann die Aktivierung nicht nur Auswirkungen auf Zelldifferenzierung und Zellzyklus-Progression, sondern auch auf die Zellphysiologie und -Morphologie haben. In EL4-Zellen verursachte die Expression einer konstitutiv aktiven PKC η eine veränderte, flache Morphologie wie sie

ähnlich auch nach Phorbol-ester-Stimulus beobachtet wird (Resnick, 1998). Dabei förderte die Mutante die Bildung von Membran *ruffles* und neuen F-Aktin Strukturen im Zytoskelett. Ähnlich kam es auch nach Infektion mit PKC η -Mutanten-exprimierenden Adenovirus-Vektoren in Lungenzellen (*squamous cells*) zu einer Streckung und Abflachung der Zellen sowie zur Stimulierung des Differenzierungsmarkers Transglutaminase 1 (Ohba, 1998). Da analoge morphologische Umbildungen auch bei den MVM-infizierten A9-Zellen auftreten (Corbau, 2000), wurde der Fragestellung nachgegangen, ob PKC η in diesen Fibroblastenzellen an den Veränderungen im Zytoskelett nach MVM-Infektion beteiligt ist. Zu diesem Zweck sollten die Umstrukturierungen im A9-Zytoskelett zuerst anhand von spezifischen Strukturen und Markerproteinen ermittelt und mit den entsprechenden Strukturen nicht infizierter A9-Zellen verglichen werden. Die mittels Immunfluoreszenz und biochemischer Fraktionierung erfolgte Analyse zeigte, daß bestimmte Strukturen in der infizierten Zelle vollständig intakt sind oder sogar verlängert werden (Mikrotubuli), während die Intermediär- und Mikrofilamente drastischen Veränderungen unterliegen. Interessanterweise induziert bei einer HIV-Infektion das virale Vif-Protein direkt den Kollaps der Vimentin-Intermediärfilamentstruktur in ein perinukleäres Agglomerat (Karczewski, 1996). Der beobachtete Kollaps der Vimentinfilamente in eine ringförmige Struktur um den Nukleus kann wahrscheinlich als Sekundäreffekt der Mikrofilament-Veränderungen angesehen werden. Analoge Phänomene wurden auch bei der Zerstörung von Mikrotubuli beobachtet (Ho, 1998; Sorci, 2000). Alternativ zu dieser Hypothese wäre auch ein negativer Einfluß der MVM-Proteine auf das zelluläre Reservoir struktureller Verknüpfungsproteine zwischen den Filamenten oder deren Aktivität in Betracht zu ziehen. Anhaltspunkte für diese Vermutung ergaben sich aus der Analyse von Bindungspartnern des NS1 sowie von NS1-Dephosphorylierungsmutanten. Es konnte gezeigt werden, daß eine weniger zytotoxische NS1-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp-Protein nicht mehr an Tropomyosin binden kann (Nüesch, unveröffentlichte Daten). Aus diesem Grund sind insbesondere die MVM-induzierten Auswirkungen auf die Mikrofilamente detaillierter untersucht worden.

Mikroskopisch zeigten die Aktinfilamente eine verminderte Anzahl an Strebfasern und einen Rückgang an Pseudopodien von der Zelloberfläche. Der Abbau von Aktinfilamenten konnte auch durch eine charakteristische Abnahme von WASP, einem die Aktin-Synthese-stimulierenden Protein, bestätigt werden. Gleichzeitig nahm die Menge des den Aktin-Abbau (*severing*) fördernden Proteins Gelsolin zu, was für einen regulierten Eingriff in das Gleichgewicht der Aktin-Synthese und des Aktin-Abbaus angesehen werden kann. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, daß das, als NS1-Interaktionspartner identifizierte Protein, Tropomyosin, die Konformation von Gelsolin-Aktin-Komplexen in dem Maße verändern kann, daß ein *capping* durch Gelsolin verhindert wird (Nyakern-Meazza, 2002). Nun liegt es

nahe zu schlußfolgern, daß NS1 zur Inaktivierung von Tropomyosin beiträgt und damit ein *capping* der Filamente und einen Block der Neusynthese oder Verlängerung bestehender Filamente bewirkt. Neben der Interaktion mit Gelsolin zur Unterbindung des *cappings* ist Tropomyosin auch ein physiologischer Inhibitor des ADF/cofilin- (*actin depolymerizing factor*) abhängigen Aktin *severings*. Tropomyosin stellt somit ein Schlüsselprotein dar, dessen Ausschaltung eine rasche Beendigung des Mikrofilament-Wachstums zur Folge hat. Ein weiterer Beleg für den Einfluß der viralen Proteine auf diese Prozesse wurde mittels *in vitro* Assemblierungsstudien gewonnen. Durch Vergleich der Aktin Assemblierung von Zellextrakten nach Mock-, bzw. ein- oder zweitägiger MVM-Infektion konnte gezeigt werden, daß zwar in allen Reaktionen Aktinfilamente gebildet wurden, jedoch unterschieden sie sich hinsichtlich ihres Sedimentationsverhaltens in einem Sucrosegradienten voneinander. Dabei war eine inverse Korrelation zwischen der Zeitdauer der viralen Infektion und der Fähigkeit zur Synthese von kleineren, bei $\rho = 1,38 \text{ g/cm}^3$ sedimentierenden Aktinfilamenten erkennbar. Die Charakterisierung dieser Aktinstrukturen steht bisher noch aus.

Die zellulären Filamente können auf vielfältigste Art und Weise von viralen Infektanten benötigt und entsprechend deren Bedürfnissen verändert werden. Einerseits müssen Viren nach dem Eintritt in die Wirtszelle zu den Orten ihrer Replikation im Zytoplasma beziehungsweise zum Nukleus transportiert werden, oder aber nach Beendigung des Infektionszyklus aus der Zelle ausgeschleust werden. Zudem müssen die viralen Proteine vom Ort ihrer Synthese zum Zielort in der Zelle umverteilt werden. Bei MVM setzt das einen Transport der Kapsidproteine nach ihrer Synthese im Zytoplasma in den Zellkern voraus. Hier erfolgt die Assemblierung und Verpackung bevor die Kapside als infektiöse Viruspartikel wieder aus der Zelle geschleust werden. Die regulatorischen Nichtstrukturproteine unterliegen wahrscheinlich noch viel komplexeren Transportvorgängen, scheinen sie doch die unterschiedlichsten Auswirkungen auf den viralen Zyklus und die Wirtszelle auszuüben (siehe Kapitel 1.1.6). Solche Transportprozesse über lange Distanzen laufen häufig entlang der Mikrotubuli ab, wie für Herpes Simplex Virus, Adenoviren, Coxsackieviren oder Parvoviren gezeigt werden konnte (Stidwill, 2000). Diese Filamente müßten dementsprechend während der viralen Infektion intakt bleiben. Die interessantere Frage ist zweifellos, was für einen Zweck der Abbau oder die Adaptation bestehender Filamente in sich birgt. Mikrofilamente scheinen für eine Vielzahl an Viren für derartige Vorgänge prädestiniert zu sein (Way, 1998; Dreschers, 2001). Umhüllte Viren sind oft auf Aktin für Virus *Budding*- und Maturationsprozesse angewiesen (Burke, 1998; Ravkov, 1997) und verpacken es zum Teil in ihren Virionen (Burke, 1998). Auch die Virus-Transmission von Zelle zu Zelle kann durch Aktinfilamente erfolgen (Cudmore, 1995). Neben anderen Paramyxoviren ist auch für das humane Parainfluenzavirus (HPIV3) beschrieben worden, daß es Aktin-Mikrofilamente für

seine Transkription/Replikation benötigt (De, 1999). Nach MVM-Infektion konnten in A9-Zellen zytoplasmatische Aktin *patches* nachgewiesen werden, deren Funktion bisher unbekannt ist, aber möglicherweise einen Schlüssel zum Verständnis der Parvovirus-induzierten Mikrofilament-Umstrukturierungen darstellt. So wäre es vorstellbar, daß die gebildeten Aktin *patches* ähnlich wie Lipid *rafts* einen Pool an zellulären Signalmolekülen beherbergen. In Hefe konnten zwei Kinasen nachgewiesen werden, die an solchen kortikalen Aktinstrukturen lokalisiert sind (Cope, 1999). Abhängig von der Menge an Phosphotyrosinen akkumuliert Aktin auch in Lipidstrukturen (*lipid patches*), die bekanntermaßen bedeutsam sind für das Auslösen und die Weitergabe von Signalen (Harder, 1999). Viele Signalübermittler sind durch PH-Domänen gekennzeichnet, die $\beta\gamma$ -Komplexe heterotrimerer G Proteine, PIP₂, die C1-Domäne von PKC sowie filamentöses (F)-Aktin binden können (Yao, 1999). Eine Analyse möglicher Komponenten der Aktin *patches* in A9-Zellen erscheint in diesem Zusammenhang durchaus sinnvoll und sollte mittels Elektronenmikroskopie oder biochemischer Aufkonzentrierung der *patches* und entsprechender Proteinanalyse möglich sein. Es wäre vorstellbar, daß auch die bereits diskutierten ERM-Proteine in diesen Strukturen vorhanden sind, da sie zumindest mikroskopisch eine ähnliche Verteilung zeigen. Dabei erscheinen die Verknüpfungen zwischen den Veränderungen in den Signalkaskaden und den Zytoskelettstrukturen immer mehr als gekoppelte Vorgänge, die für den Erfolg einer viralen Infektion verantwortlich sind.

Bisher konnte aufgrund der extrem komplexen Regulationen sowohl von Synthese- und Abbauprozessen einzelner Filamentformen, als auch von deren intrazellulärer Ausrichtung und Verankerung an der Plasmamembran sowie der miteinander vernetzten Natur der Zytoskelettstrukturen noch kein direkter Einfluß von PKC η auf die MVM-induzierten Veränderungen nachgewiesen werden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß PKC η an den induzierten Signalkaskaden, die die morphologischen und strukturellen Veränderungen der Wirtszelle verursachen, indirekt beteiligt ist. Ein wesentlicher Aspekt, der sich als problematisch bei der Auswertung der erzielten Ergebnisse auswirkte, ist, daß es in den Zelllinien mit herabgesetzter PKC η -Kinaseaktivität aufgrund der Effekte der Kinase auf die virale Replikation nicht zum Fortschreiten der Virusinfektion kam. Dadurch kamen die zytotoxischen Eigenschaften des NS1 (eventuell im Zusammenspiel mit anderen viralen Komponenten) nicht in dem Maße zum Tragen, wie in den vergleichbaren A9 oder der konstitutiv aktiven Zelllinie PKC η A160E. Nimmt man an, daß PKC η doch an den Umstrukturierungen des Zytoskeletts beteiligt ist, bedarf es trotzdem der auslösenden Stimuli oder eines möglicherweise viral-induzierten Signalkaskaden *cross talk*, der ohne MVM-Infektion auch in Anwesenheit der zellulären Partnerproteine und Kinasen nicht vorliegt. Somit waren die Mutanten PKC η -Zelllinien nicht optimal geeignet, um die späten

Auswirkungen auf die Zelle zu studieren. Bei Beteiligung von PKC η an Filamentveränderungen hätte andererseits erwartet werden können, daß die Zelllinie, welche die konstitutiv aktive PKC η A160E exprimiert, morphologische Veränderungen vielleicht schon zu einem früheren Zeitpunkt aufweisen müßte, was jedoch nicht experimentell belegt werden konnte. Der Abbau von zellulären Strebfasern, wie er nach MVM-Infektion beobachtet wurde, wird unter anderem den atypischen PKC zugeschrieben (Ueberall, 1999). Dabei spielt PKC λ in der Signalkaskade oberhalb, PKC ζ hingegen unterhalb PI3-K und Rac beim Vermitteln des H-Ras-induzierten Stimulus eine Rolle. Somit mag die Annahme nicht grundlegend falsch sein, daß für die Virus-induzierten Umstrukturierungen des Zytoskeletts potentiell auch die Kinasen herangezogen werden, die aufgrund ihrer Aktivierung von NS1 für die Replikation bereits mit dem viralen Protein interagieren. Insofern wären ähnliche Analysen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, möglicherweise für Zelllinien, die PKC λ -Mutanten exprimieren, sinnvoller. Es bleibt jedoch auch hier zu klären, ob eine dominant negative Mutante von PKC λ das Fortschreiten der viralen Infektion hin zu zytotoxischen Auswirkungen auf die Wirtszelle in einem höheren Maße ermöglicht, als die Kinase-inaktiven PKC η -Mutanten. Da hauptsächlich das Aktin-Mikrofilamentnetz von den durch MVM-induzierten Zytoskelettumstrukturierungen betroffen war, sollte darüber hinaus untersucht werden, inwiefern Kinasen der Ras-Familie für die beobachteten Veränderungen der Wirtszelle verantwortlich sind.

Ein weiterer Aspekt der hinsichtlich der PKC η -Aktivität während einer MVM-Infektion von A9-Fibroblastenzellen in Betracht gezogen werden sollte, ist ein möglicher schützender Effekt vor frühzeitigem Zelltod als Reaktion der Wirtszelle auf die virale Infektion. In verschiedenen Zellsystemen, wie zum Beispiel in Makrophagen, konnte nachgewiesen werden, daß PKC η , ebenso wie PKC β II und PKC δ , einem Stickstoffoxid (NO)-induziertem Zelltod durch Apoptose entgegenwirkt (Jun, 1999). Verschiedene Autoren berichteten von einer Hemmung der Caspase 3-Aktivierung durch PKC η nach TNF- α (Akkaraju, 2000) oder UVB (Matsumura, 2003) -Stimulus. In Vorläufer-B-Lymphozyten hingegen induzierte Caspase 3 die proteolytische Spaltung von PKC η in ein aktives Kinase-Fragment (Morrow, 1999). Dieses katalytisch aktive Fragment war auch für den beobachteten Zellzyklusarrest an der Grenze der G1- Phase zur S-Phase verantwortlich und unterstreicht die Bedeutung von PKC η für die Zellteilung und den Zelltod. Parvoviren können in bestimmten Zellen wie promonozytischen U937 (Rayet, 1998), Keratinozyten oder Rattenfibroblasten (Ran, 1999) einen apoptotischen Zelltod induzieren, wobei auch berichtet wurde, daß zwar Apoptose eingeleitet wird, der Zelltod jedoch durch Nekrose eintritt (Ran, 1999). Die in dieser Arbeit verwendeten A9-Zellen unterliegen bei einer MVM-Infektion Nekrose. Es wäre dementsprechend sinnvoll, das Virus-Wirtszellsystem MVM in A9 auch auf diesen Aspekt zu untersuchen.

Die Identifizierung von PKC η im Rahmen dieser Arbeit als Schlüsselenzym für die Regulation des multifunktionalen NS1 von MVM hat zwar die Frage nach einer notwendigen zellulären Komponente für die DNA-Replikation beantwortet, doch gleichzeitig wurden eine Vielzahl neuer interessanter Fragestellungen zur Parvovirus-Wirtszell-Interaktion aufgeworfen. Eine weitere Entschlüsselung der MVM-induzierten Regulationsvorgänge von PKC η wäre dabei wünschenswert. Von großem Interesse ist sicherlich die Bedeutung der ERM-Proteine für die Aktivierung von PKC η , da eine nachgewiesene Beteiligung dieser Proteine neue Aspekte in die Charakterisierung der Signalkaskaden bringen würde. Für die Veränderungen des Zytoskeletts konnte kein direkter Einfluß von PKC η verantwortlich gemacht werden. Zurückblickend erscheint es hingegen denkbar, daß auch die Veränderungen der Mikrofilamente die Aktivität von PKC η beeinflussen könnten. Die Klärung dieser und anderer Fragen bedürfen weiterer intensiver Forschung.

5. Literaturverzeichnis

- Adachi, Y., Copeland, T. D., Takahashi, C., Nosaka, T., Ahmed, A., Oroszlan, S., and Hatanaka, M. (1992). Phosphorylation of the Rex protein of human T-cell leukemia virus type I. *J Biol Chem* **267**(30), 21977-81.
- Agbandje, M., Parrish, C.R., and Rossmann, M.G. (1995). The structure of parvoviruses. *Sem. Virol.* **6**, 299-309.
- Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A. L., Wang, F., Tattersall, P., and Rossmann, M. G. (1998). Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. *Structure* **6**(11), 1369-81.
- Ahn, J. K., Pitluk, Z.W., Ward, D.C. (1992). The GC box and TATA transcription control elements in the P38 promoter of the minute virus of mice are necessary and sufficient for transactivation by the nonstructural protein NS1. *J. Virol.* **66**, 3776-3783.
- Akimoto, K., Mizuno, K., Osada, S., Hirai, S., Tanuma, S., Suzuki, K., and Ohno, S. (1994). A new member of the third class in the protein kinase C family, PKCL, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 12677-12683.
- Akimoto, K., Takahashi, R., Moriya, S., Nishioka, N., Takayanagi, J., Kimura, K., Fukui, Y., Osada, S., Mizuno, K., Hirai, S., Kazlauskas, A., and Ohno, S. (1996). EGF or PDGF receptors activate atypical PKC λ through phosphatidylinositol 3-kinase. *Embo J* **15**(4), 788-98.
- Akkaraju, G. R., and Basu, A. (2000). Overexpression of protein kinase C- η attenuates caspase activation and tumor necrosis factor- α -induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **279**(1), 103-7.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol* **7**(4), 261-9.
- Altman, A., and Villalba, M. (2002). Protein Kinase C- θ (PKC θ): A Key Enzyme in T Cell Life and Death. *J Biochem (Tokyo)* **132**(6), 841-6.
- Anouja, F., Wattiez, R., Mousset, S., and Caillet-Fauquet, P. (1997). The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins. *J. Virol.* **71**, 4671-4678.
- Anthonsen, M. W., Andersen, S., Solhaug, A., and Johansen, B. (2001). Atypical lambda/iota PKC conveys 5-lipoxygenase/leukotriene B4-mediated cross-talk between phospholipase A2s regulating NF-kappa B activation in response to tumor necrosis factor- α and interleukin-1beta. *J Biol Chem* **276**(38), 35344-51.
- Apsi, X. (2002). Funktion des SGT/NS1-Komplexes im Lebenszyklus autonomer Parvoviren. *Doktorarbeit, DKFZ*.
- Arcangeletti, M. C., Pinardi, F., Missorini, S., De Conto, F., Conti, G., Portincasa, P., Scherrer, K., and Chezzi, C. (1997). Modification of cytoskeleton and prosome networks in relation to protein synthesis in influenza A virus-infected LLC-MK2 cells. *Virus Res* **51**(1), 19-34.
- Asai A, S. S., M Barker, M Vanderlaan, JW Gray, and T Hoshino (1990). Cell kinetics of rat 9L brain tumors determined by double labeling with iodo- and bromodeoxyuridine. *J. Neurosurg.* **73**, 254-258.
- Astell, C. R., Thomson, M., Merchlinsky, M., Ward, D.C. (1983). The complete DNA sequence of minute virus of mice, and autonomous parvovirus. *Nucleic Acid Res.* **11**, 999-1018.
- Astell, C. R., Gardiner, E.M., Tattersall, P. (1986). The DNA sequence of the lymphotropic variant of minute virus of mice, MVM(i), and its comparison to that of the fibrotropic prototype strain. *J. Virol.* **57**, 656.
- Atchison, R. W., Casto, B.C., Hannon, W.H. (1965). Adenovirus-associated defective parvovirus particles. *Science* **149**, 754-756.
- Autero, M., Heiska, L., Ronnstrand, L., Vaheri, A., Gahmberg, C. G., and Carpen, O. (2003). Ezrin is a substrate for Lck in T cells. *FEBS Lett* **535**(1-3), 82-6.

- Bacher, N., Zisman, Y., Berent, E., and Livneh, E. (1991).** Isolation and characterization of PKC-L, a new member of the protein kinase C-related gene family specifically expressed in lung, skin, and heart. *Mol Cell Biol* **11**(1), 126-33.
- Baier-Bitterlich G, Ueberall, F., Bauer, B., Fresser, F., Wachter, H., Grunicke, H., Utermann, G., Altman, A., and Baier, G. (1996).** Protein kinase C theta isozyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1842-1850.
- Ball-Goodrich, L. J., and Tattersall, P. (1992).** Two amino acid substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibrotropism by the lymphotropic strain of minute virus of mice. *J. Virol.* **66**, 3415-3423.
- Bao J, Alroy, I., Waterman, H., Schejter, D. E., Brodie, C., Gruenberg, J., and Yarden, Y. (2000).** Threonine phosphorylation diverts internalized epidermal growth factor receptors from a degradative pathway to the recycling endosome. *J Biol Chem* **275**, 26178-26186.
- Basak, S., Raha, T., Chattopadhyay, D., Majumder, A., Shaila, M. S., and Chattopadhyay, D. J. (2003).** Leader RNA binding ability of Chandipura virus P protein is regulated by its phosphorylation status: a possible role in genome transcription- replication switch. *Virology* **307**(2), 372-85.
- Bashir, T., Horlein, R., Rommelaere, J., and Willwand, K. (2000).** Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10), 5522-7.
- Bashir T, Rommelaere, J., and Cziepluch C (2001).** In vivo accumulation of cyclin A and cellular replication factors in autonomous parvovirus minute virus of mice-associated replication bodies. *J. Virol.* **75**, 4394-4398.
- Beck, J. F., Bohnet, B., Brugger, D., Dietl, J., Scheper, R. J., Bader, P., Niethammer, D., and Gekeler, V. (1998).** Expression analysis of protein kinase C isozymes and multidrug resistance associated genes in ovarian cancer cells. *Anticancer Res* **18**(2A), 701-5.
- Beeler, J. F., and Cooper, R. H. (1995).** Regulation of hepatocyte plasma membrane alpha 1-adrenergic receptors by 4 beta-phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochem J* **305**(Pt 1), 73-9.
- Behn-Krappa, A., and Newton, A. C. (1999).** The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. *Curr Biol* **9**(14), 728-37.
- Berns, K. I., Pinkerton, T. C., Thomas, G. F., and Hoggan, M. D. (1975).** Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology* **68**(2), 556-60.
- Berns, K. I., Bergoin, M., Bloom, M., Lederman, M., Muzyczka, N., Siegl, G., Tal, J., Tattersall, P. (1994).** Parvoviridae. VIth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses. In: Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.L., Ghadrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D. eds *Archives of Virology*(suppl 10), 166-178.
- Berns, K. I., Bergoin, M., Bloom, M., Lederman, M., Muzyczka, N., Siegl, G., Tal, J., Tattersall, P. (1995).** Parvoviridae, in *Virus Taxonomy. Archives of Virology Supp.* **10** (Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.L., Ghadrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D. eds) Springer, New York), 166-178.
- Bhattacharyya, S., Puri, S., Miledi, R., and Panicker, M. M. (2002).** Internalization and recycling of 5-HT_{2A} receptors activated by serotonin and protein kinase C-mediated mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14470-14475.
- Blobe, G. C., Stribling, D. S., Fabbro, D., Stabel, S., and Hannun, Y. A. (1996).** Protein kinase C beta II specifically binds to and is activated by F- actin. *J Biol Chem* **271**(26), 15823-30.
- Blow, J. J., and Laskey, R. A. (1988).** A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature* **332**(6164), 546-8.
- Boczan, J., Boros, S., Mechler, F., Kovacs, L., and Biro, T. (2000).** Differential expressions of protein kinase C isozymes during proliferation and differentiation of human skeletal muscle cells in vitro. *Acta Neuropathol (Berl)* **99**(2), 96-104.

- Bodendorf, U., Cziepluch, C., Jauniaux, J.-C., Rommelaere, J., and Salome, N. (1999).** Nuclear export factor CRM1 interacts with nonstructural proteins NS2 from parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **73**, 7769-7779.
- Bonizzi, G., Piette, J., Schoonbroodt, S., Merville, M. P., and Bours, V. (1999).** Role of the protein kinase C lambda/iota isoform in nuclear factor- kappaB activation by interleukin-1beta or tumor necrosis factor-alpha: cell type specificities. *Biochem Pharmacol* **57**(6), 713-20.
- Bonnard, G. D., Manders, E. K., Campbell, D. A., Jr., Herberman, R. B., and Collins, M. J., Jr. (1976).** Immunosuppressive activity of a subline of the mouse EL-4 lymphoma. Evidence for minute virus of mice causing the inhibition. *J Exp Med* **143**(1), 187-205.
- Bornancin, F., and Parker, P. J. (1997).** Phosphorylation of protein kinase C-alpha on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *J Biol Chem* **272**(6), 3544-9.
- Boskovic, G., Desai, D., and Niles, R. M. (2002).** Regulation of retinoic acid receptor alpha by protein kinase C in B16 mouse melanoma cells. *J Biol Chem* **277**(29), 26113-9.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brandenburger, A., Legendre, D., Avalosse, B., and Rommelaere, J. (1990).** NS1 and NS2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMP. *Virology* **174**, 576-584.
- Brandlin, I., Hubner, S., Eiseler, T., Martinez-Moya, M., Horschinek, A., Hausser, A., Link, G., Rupp, S., Storz, P., Pfizenmaier, K., and Johannes, F. J. (2002).** Protein kinase C (PKC)eta-mediated PKC mu activation modulates ERK and JNK signal pathways. *J Biol Chem* **277**(8), 6490-6.
- Bretscher, A., Edwards, K., and Fehon, R. G. (2002).** ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(8), 586-99.
- Brockhaus, K., Plaza, S., Pintel, D. J., Rommelaere, J., and Salome, N. (1996).** Non-structural proteins NS2 of minute virus of mice associate in vivo with 14-3-3 protein family members. *J. Virol.* **70**, 7527-7534.
- Brown, K. E., Anderson, S. M., and Young, N. S. (1993).** Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* **262**(5130), 114-7.
- Brownstein, D. G., Smith, A. L., Johnson, E. A., Pintel, D. J., Naeger, L. K., and Tattersall, P. (1992).** The pathogenesis of infection with minute virus of mice depends on expression of the small nonstructural protein NS2 and on the genotype of the allotropic determinants VP1 and VP2. *J Virol* **66**(5), 3118-24.
- Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A., and Stevenson, M. (1998).** Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med* **188**(11), 2113-25.
- Buller, R. M., Janik, J. E., Sebring, E. D., and Rose, J. A. (1981).** Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* **40**(1), 241-7.
- Burke, E., Dupuy, L., Wall, C., and Barik, S. (1998).** Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. *Virology* **252**(1), 137-48.
- Cabodi, S., Calautti, E., Talora, C., Kuroki, T., Stein, P. L., and Dotto, G. P. (2000).** A PKC-eta/Fyn-dependent pathway leading to keratinocyte growth arrest and differentiation. *Mol Cell* **6**(5), 1121-9.
- Caillet-Fauquet, P., Perros, M., Brandenburger, A., Spegelaere, P., and Rommelaere, J. (1990).** Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO* **9**, 2989-2995.
- Candurra, N. A., Lago, M. J., Maskin, L., and Damonte, E. B. (1999).** Involvement of the cytoskeleton in Junin virus multiplication. *J Gen Virol* **80**(Pt 1), 147-56.
- Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (1997).** Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol* **269**(4), 459-67.
- Carmo-Fonseca, M. (2002).** New clues to the function of the Cajal body. *EMBO Rep* **3**(8), 726-7.

- Cartier, C., Sivard, P., Tranchat, C., Decimo, D., Desgranges, C., and Boyer, V. (1999).** Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *J Biol Chem* **274**(27), 19434-40.
- Casamayor, A., Morrice, N. A., and Alessi, D. R. (1999).** Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochem J* **342**(Pt 2), 287-92.
- Cater, J. E., Pintel, D.J. (1992).** The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells. *J. Gen. Virol.* **73**, 1839-1843.
- Chen, C. C. (1993).** Protein kinase C alpha, delta, epsilon and zeta in C6 glioma cells. TPA induces translocation and down-regulation of conventional and new PKC isoforms but not atypical PKC zeta. *FEBS Lett* **332**(1-2), 169-73.
- Chen, C. C., and Chen, W. C. (1996).** ATP-evoked inositol phosphates formation through activation of P2U purinergic receptors in cultured astrocytes: regulation by PKC subtypes alpha, delta, and theta. *Glia* **17**(1), 63-71.
- Chen, C. C., Wang, J. K., and Chen, W. C. (1997).** TPA induces translocation but not down-regulation of new PKC isoform eta in macrophages, MDCK cells and astrocytes. *FEBS Lett* **412**(1), 30-4.
- Chida, K., Sagara, H., Suzuki, Y., Murakami, A., Osada, S., Ohno, S., Hirosawa, K., and Kuroki, T. (1994).** The eta isoform of protein kinase C is localized on rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **14**(6), 3782-90.
- Chida, K., Nakada, T., Otsuka, H., Kuroki, T., and Satoh, H. (1998).** Assignment of protein kinase C eta (Pkc η) to mouse chromosome band 12C3-D2 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **82**(1-2), 30-1.
- Cho, W. (2001).** Membrane targeting by C1 and C2 domains. *J Biol Chem* **276**(35), 32407-10.
- Chou, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C. S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S., and Toker, A. (1998).** Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* **8**(19), 1069-77.
- Chou, Y. H., and Goldman, R. D. (2000).** Intermediate filaments on the move. *J Cell Biol* **150**(3), F101-6.
- Christensen, J., and Tattersall, P. (2002).** Parvovirus initiator protein NS1 und RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system. *J. Virol.* **76**, 6518-6531.
- Christensen, J., Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1995a).** Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner. *J. Virol.* **69**, 5422-5430.
- Christensen, J., Pederson, M., Aasted, B., and Alexanderson, S. (1995b).** Purification and characterization of the major non-structural protein (NS1) of Aleutian mink disease parvovirus. *J. Virol.* **69**, 1802-1809.
- Christensen, J., Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1997a).** A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication. *J. Virol.* **71**, 1405-1416.
- Christensen, J., Cotmore, S. F., Tattersall, P. (1997b).** Parvovirus initiation factor PIF: a novel human DNA binding factor which coordinately recognizes two ACGT motifs. *J. Virol.* **71**, 5733-5741.
- Clemens, K. E., Pintel, D.J. (1987).** Minute virus of mice (MVM) mRNAs predominantly polyadenylate at a single site. *Virology* **160**, 511-514.
- Clemens, K. E., Cerutis, D. R., Burger, L. R., Yang, C.Q., Pintel, D.J. (1990).** Cloning of minute virus of mice cDNAs and preliminary analysis of individual viral proteins expressed in murine cells. *J. Virol.* **64**, 3967-3973.
- Cooper, J. A., and Schafer, D. A. (2000).** Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol* **12**(1), 97-103.
- Cope, M. J., Yang, S., Shang, C., and Drubin, D. G. (1999).** Novel protein kinases Ark1p and Prk1p associate with and regulate the cortical actin cytoskeleton in budding yeast. *J Cell Biol* **144**(6), 1203-18.
- Corbau, R., Nüesch, J. P. F., Salome, N., and Rommelaere, J. (1999).** Phosphorylation of the viral non-structural protein NS1 during MVMp infection of A9 cells. *Virology* **259**, 402-415.

- Corbau, R., Duverger, V., Rommelaere, J., and Nüesch J. P. F. (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.
- Cornelis, J. J., Becquart, P., Duponchel, N., Salome, N., Avalosse, B. L., Namba, M., and Rommelaere J. (1988a).** Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvovirus H-1 and minute virus of mice. *J. Virol.* **62**, 1679-1686.
- Cornelis, J. J., Spruyt, N., Spegelaere, P., Guetta, E., Darawshi, T., Cotmore, S.F., Tal, J., Rommelaere, J. (1988b).** Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J. Virol.* **62**, 3438-3444.
- Cornelis, J. J., Chen, Y.Q., Spruyt, N., Duponchel, N., Cotmore, S. F., Tattersall, P., and Rommelaere, J. (1990).** Susceptibility of human cells to killing by the parvovirus H-1 and minute virus of mice correlates with viral transcription. *J. Virol.* **64**, 2537-2544.
- Corsini, J., Carlson, J. O., Maxwell, F., and Maxwell, I. H. (1995).** Symmetric-strand packaging of recombinant parvovirus LuIII genomes that retain only the terminal regions. *J Virol* **69**(4), 2692-6.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1986).** Organization of non-structural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **58**, 724-732.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1987).** The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33**, 91-174.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1988).** The NS1 polypeptide of minute virus of mice is covalently attached to the 5' termini of duplex replicative-form DNA and progeny single strands. *J. Virol.* **62**, 851-860.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1989).** A genome-linked copy of the NS1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J. Virol.* **63**, 3902-3911.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1990).** Alternate splicing in a parvoviral non-structural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics. *Virology* **177**, 477-487.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1994).** An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *Embo J* **13**(17), 4145-52.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1995).** DNA replication in the autonomous parvoviruses. *Seminars in Virology* **6**, 271-281.
- Cotmore, S. F., D'Abramo, A. M., Jr., Carbonell, L. F., Bratton, J., and Tattersall, P. (1997).** The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells. *Virology* **231**(2), 267-80.
- Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (1998).** High-mobility group 1/2 proteins are essential for initiating rolling-circle-type DNA replication at a parvovirus hairpin origin. *J. Virol.* **72**, 8477-8484.
- Cotmore, S. F., Christensen, J., and Tattersall, P. (2000).** Two widely spaced initiator binding sites create an HMG1-dependent parvovirus rolling-hairpin replication origin. *J Virol* **74**(3), 1332-41.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (2003).** Resolution of Parvovirus Dimer Junctions Proceeds through a Novel Heterocruciform Intermediate. *J Virol* **77**(11), 6245-54.
- Cozzone, A. J. (1998).** Post-translational modification of proteins by reversible phosphorylation in prokaryotes. *Biochimie* **80**(1), 43-8.
- Crawford, L. V. (1966).** A minute virus of mice. *Virology* **26**, 602-612.
- Cudmore, S., Cossart, P., Griffiths, G., and Way, M. (1995).** Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* **378**(6557), 636-8.
- Cziepluch, C., Kordes, E., Poirey, R., Grewenig, A., Rommelaere, J., and Jauniaux, J. C. (1998).** Identification of a novel cellular TPR-containing protein, SGT, that interacts with the nonstructural protein NS1 of parvovirus H-1. *J Virol* **72**(5), 4149-56.
- Cziepluch, C., Lampel, S., Grewenig, A., Grund, C., Lichter, P., and Rommelaere, J. (2000).** H-1 parvovirus-associated replication bodies: a distinct virus-induced nuclear structure. *J Virol* **74**(10), 4807-15.
- Daeffler, L., Hoerlein, R., Rommelaere, J., and Nüesch, J.P.F. (2003).** Modulation of MVMp cytotoxic activities through the targeting of NS1 phosphorylation sites. *J Virol.*, *Manuskript eingereicht.*

- De, B. P., Gupta, S., and Banerjee, A. K. (1995).** Cellular protein kinase C isoform zeta regulates human parainfluenza virus type 3 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11), 5204-8.
- De, B. P., and Banerjee, A. K. (1999).** Involvement of actin microfilaments in the transcription/replication of human parainfluenza virus type 3: possible role of actin in other viruses. *Microsc Res Tech* **47**(2), 114-23.
- 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 Nov* **75**(22), 11071-11078.
- Dekker, L. V. (1997).** Catalytic Specificity of Protein Kinase C Isozymes. *Protein Kinase C, Molecular Biology Intelligence Unit, Editors: Parker, P., Dekker, L.V., Springer Verlag, Heidelberg*, 57-74.
- Deleu, L., Fuks, F., Spitzkovsky, D., Horlein, R., Faisst, S., and Rommelaere, J. (1998).** Opposite transcriptional effects of cyclic AMP responsive elements on confluent or p27-kip-expressing cells versus serum-starved or growing cells. *Mol. and Cell. Biol.* **18**, 409-419.
- Deleu, L., Pujol, A., Faisst, S., and Rommelaere, J. (1999).** Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice (MVM) at the early S phase is required for productive infection. *J. Virol.* **73** (5), 3877-85.
- Deleu, L., Pujol, A., Nüesch, J. P. F., and Rommelaere, J. (2001).** Inhibition of transcription-regulating properties of nonstructural protein 1 (NS1) of parvovirus minute virus of mice by a dominant-negative mutant form of NS1. *J Gen Virol* **82**(Pt 8), 1929-34.
- Dettwiler, S., Rommelaere, J., and Nüesch J. P. F. (1999).** DNA unwinding functions of minute virus of mice NS1 protein are modulated by the lambda isoform of protein kinase C. *J. Virol.* **73**, 7410-7420.
- Diaz-Meco, M., Municio, M. M., Sanchez, P., Lozano, J., and Moscat, J. (1996).** Lambda-interacting protein, a novel protein that specifically interacts with the zinc finger domain of the atypical protein kinase C isotype L/I and stimulates its kinase activity in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 105-114.
- Doerig, C., Hirt, B., Beard, P., Antonietti, J.-P. (1988).** Minute virus of mice non-structural protein NS-1 is necessary and sufficient for trans-activation of the viral P39 promoter. *J. Gen. Virol.* **69**, 2563-2573.
- Doi, Y., Itoh, M., Yonemura, S., Ishihara, S., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (1999).** Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *J Biol Chem* **274**(4), 2315-21.
- Dransfield, D. T., Bradford, A. J., Smith, J., Martin, M., Roy, C., Mangeat, P. H., and Goldenring, J. R. (1997).** Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein. *Embo J* **16**(1), 35-43.
- Dreschers, S., Roncarati, R., and Knebel-Morsdorf, D. (2001).** Actin rearrangement-inducing factor of baculoviruses is tyrosine phosphorylated and colocalizes to F-actin at the plasma membrane. *J Virol* **75**(8), 3771-8.
- Dupressoir, T., Vanacker, J. M., Cornelis, J. J., Duponchel, N., and Rommelaere, J. (1989).** Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **49**(12), 3203-8.
- Duprex, W. P., McQuaid, S., and Rima, B. K. (2000).** Measles virus-induced disruption of the glial-fibrillary-acidic protein cytoskeleton in an astrocytoma cell line (U-251). *J Virol* **74**(8), 3874-80.
- Dutil, E. M., Keranen, L. M., DePaoli-Roach, A. A., and Newton, A. C. (1994).** In vivo regulation of protein kinase C by trans-phosphorylation followed by autophosphorylation. *J Biol Chem* **269**(47), 29359-62.
- Dutil, E. M. A. Toker, and A. C. Newton (1998).** Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PKD-1). *Curr. Biol.* **8**, 1366-1375.
- Edwards, A. S., and Newton, A. C. (1997).** Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. *J Biol Chem* **272**(29), 18382-90.

- Efimova, T., Deucher, A., Kuroki, T., Ohba, M., and Eckert, R. L. (2002).** Novel protein kinase C isoforms regulate human keratinocyte differentiation by activating a p38 delta mitogen-activated protein kinase cascade that targets CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* **277**(35), 31753-60.
- Egan, C., Bayley, S. T., and Branton, P. E. (1989).** Binding of the Rb1 protein to E1A products is required for adenovirus transformation. *Oncogene* **4**, 383-388.
- Eichwald, V., Daeffler, L., Klein, M., Rommelaere, J., and Salomé, N. (2002).** The NS2 proteins of minute virus of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells. *J. Virol.* **76**, 10307-10319.
- England, K., and Rumsby, M. G. (2000).** Changes in protein kinase C epsilon phosphorylation status and intracellular localization as 3T3 and 3T6 fibroblasts grow to confluency and quiescence: a role for phosphorylation at ser-729? *Biochem. J.* **352**, 19-26.
- Erlandsson, F., Wahlby, C., Ekholm-Reed, S., Hellstrom, A. C., Bengtsson, E., and Zetterberg, A. (2003).** Abnormal expression pattern of cyclin E in tumour cells. *Int J Cancer* **104**(3), 369-75.
- Esdar, C., Oehrlein, S. A., Reinhardt, S., Maelicke, A., and Herget, T. (1999).** The protein kinase C (PKC) substrate GAP-43 is already expressed in neural precursor cells, colocalizes with PKCeta and binds calmodulin. *Eur J Neurosci* **11**(2), 503-16.
- Everett, R. D. (2001).** DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene* **20**(49), 7266-73.
- Faisst, S. R., Faisst, S., Grangette, C., Schlehofer, J.R., Rommelaere, J. (1993).** NFkB upstream regulatory sequences of the HIV-1 LTR are involved in the inhibition of HIV-1 promoter activity by the NS proteins of autonomous parvoviruses H-1 and MVMp. *Virology* **197**, 770-773.
- Farley, J., Smith, L. M., Darcy, K. M., Sobel, E., O'Connor, D., Henderson, B., Morrison, L. E., and Birrer, M. J. (2003).** Cyclin E expression is a significant predictor of survival in advanced, suboptimally debulked ovarian epithelial cancers: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer Res* **63**(6), 1235-41.
- Feldherr, C. M., Kallenbach, E., and Schultz, N. (1984).** Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol* **99**(6), 2216-22.
- Fima, E., Shahaf, G., Hershko, T., Apte, R. N., and Livneh, E. (1999).** Expression of PKCeta in NIH-3T3 cells promotes production of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6. *Eur Cytokine Netw* **10**(4), 491-500.
- Fima E, M. S., Libros, P., Missel, A., Shafaf, G., Kahana, G., and Livneh E. (2001).** PKCeta enhances cell cycle progression, the expression of G1 cyclins and p21 in MCF-7 cells. *Oncogene* **20**, 6794-6804.
- Fox, J. M., and Bloom, M. E. (1999).** Identification of a cell surface protein from Crandell feline kidney cells that specifically binds Aleutian mink disease parvovirus. *J Virol* **73**(5), 3835-42.
- Frischknecht, F., and Way, M. (2001).** Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. *Trends Cell Biol* **11**(1), 30-38.
- Frodin, M., Jensen, C. J., Merienne, K., and Gammeltoft, S. (2000).** A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *Embo J* **19**(12), 2924-34.
- Frodin, M., Antal, T. L., Dummler, B. A., Jensen, C. J., Deak, M., Gammeltoft, S., and Biondi, R. M. (2002).** A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *Embo J* **21**(20), 5396-407.
- Fu, Y., Ishii, K. K., Munakata, Y., Saitoh, T., Kaku, M., and Sasaki, T. (2002).** Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J Virol* **76**(11), 5395-403.
- Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W., and Moss, B. (1986).** Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(21), 8122-6.
- Fuks, F., Deleu, L., Dinsart, C., Rommelaere, J., Faisst, S. (1996).** ras oncogene-dependent activation of the P4 promoter of minute virus of mice through a proximal P4 element interacting with the ets family of transcription factors. *J. Virol.* **70**, 1331-1339.

- Gao, T., Toker, A., and Newton, A. C. (2001).** The carboxyl terminus of protein kinase c provides a switch to regulate its interaction with the phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1. *J Biol Chem* **276**(22), 19588-96.
- Gao, T., and Newton, A. C. (2002).** The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *J Biol Chem* **277**(35), 31585-92.
- Garcia, A., Cereghini, S., and Sontag, E. (2000).** Protein phosphatase 2A and phosphatidylinositol 3-kinase regulate the activity of Sp1-responsive promoters. *J Biol Chem* **275**(13), 9385-9.
- Gard, D. L., Cha, B. J., and King, E. (1997).** The organization and animal-vegetal asymmetry of cytokeratin filaments in stage VI *Xenopus* oocytes is dependent upon F-actin and microtubules. *Dev Biol* **184**(1), 95-114.
- Gardiner, E. M., Tattersall, P. (1988a).** Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **62**, 2605-2613.
- Gardiner, E. M., and Tattersall, P. (1988b).** Evidence that developmentally regulated control of gene expression by a parvoviral allotropic determinant is particle mediated. *J Virol* **62**(5), 1713-22.
- Gautreau, A., Poulet, P., Louvard, D., and Arpin, M. (1999).** Ezrin, a plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13), 7300-5.
- Gavin, R. H. (1997).** Microtubule-microfilament synergy in the cytoskeleton. *Int Rev Cytol* **173**, 207-42.
- Gerrard, S. R., Rollin, P. E., and Nichol, S. T. (2002).** Bidirectional infection and release of Rift Valley fever virus in polarized epithelial cells. *Virology* **301**(2), 226-35.
- Gey, G. O., Coffman, W.D., Kubicek, M.T. (1952).** Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* **12**, 364-365.
- Giese, N. A., Raykov, Z., DeMartino, L., Vecchi, A., Sozzani, S., Dinsart, C., Cornelis, J. J., and Rommelaere, J. (2002).** Suppression of metastatic hemangiosarcoma by a parvovirus MVMP vector transducing the IP-10 chemokine into immunocompetent mice. *Cancer Gene Ther* **9**(5), 432-42.
- Goode, B. L., Drubin, D. G., and Barnes, G. (2000).** Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol* **12**(1), 63-71.
- Goodnight, J., Mischak, H., and Mushinski, J. F. (1994).** Selective involvement of protein kinase C isozymes in differentiation and neoplastic transformation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**, 63-71.
- Goodnight, J.-A., Mischak, H., Kolch, W., and Múshinski, J. F. (1995).** Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in HIH3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **270**, 9991-10001.
- Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973).** A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**(2), 456-67.
- Greif, H., Ben-Chaim, J., Shimon, T., Bechor, E., Eldar, H., and Livneh, E. (1992).** The protein kinase C-related PKC-L(eta) gene product is localized in the cell nucleus. *Mol Cell Biol* **12**(3), 1304-11.
- Gschwendt, M., Leibersperger, H., Kittstein, W., and Marks, F. (1992).** Protein kinase C zeta and eta in murine epidermis. TPA induces down- regulation of PKC eta but not PKC zeta. *FEBS Lett* **307**(2), 151-5.
- Gschwendt, M., Dieterich, S., Rennecke, J., Kittstein, W., Mueller, H. J., and Johannes, F. J. (1996).** Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett* **392**(2), 77-80.
- Guetta, E., Graziani, Y., Tal, J., (1986).** Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice. *J Natl Cancer Inst* **76**(6), 1177-1180.
- Gysin, S., and Imber, R. (1997).** Phorbol-ester-activated protein kinase C-alpha lacking phosphorylation at Ser657 is down-regulated by a mechanism involving dephosphorylation. *Eur J Biochem* **249**(1), 156-60.
- Hahn, C. S. (2003).** Rho GTPases signaling in lymphocytes. <http://www.healthsystem.virginia.edu/internet/cmb/faculty/csh2s.cfm>.
- Hall, A. (1998).** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**(5350), 509-14.

- Hall, S. M., Cohen, B. J., Mortimer, P. P., Anderson, M. J. Pattison, J. R., Shirley, J. A., Peto T. E. A. (1990). Prospective study of human parvovirus (B19) infection in pregnancy. *Br. Med. J.* **300**, 1166-1170.
- Hamada, K., Shimizu, T., Matsui, T., Tsukita, S., and Hakoshima, T. (2000). Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *Embo J* **19**(17), 4449-62.
- Harder, T., and Simons, K. (1999). Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation. *Eur J Immunol* **29**(2), 556-62.
- Hardt, N., Dinsart, C., Spadari, S., Pedrali Noy, G., and Rommelaere, J. (1983). Interrelation between viral and cellular DNA synthesis in mouse cells infected with the parvovirus minute virus of mice. *J-Gen-Virol* **64**(Pt 9), 1991-8.
- Harrington, E. O., K. D., J. L. Brunelle, and J. A. Ware (2000). Endothelial proliferation, migration, and differentiation are blunted by conditionally expressed protein kinase C pseudosubstrate peptides. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **271**, 499-508.
- Harris, C. E., Brunstein, R., and Astell, C. R. (1999). A novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus of mice. *J. Virol.* **73**, 72-80.
- Hecker, C., Weise, C., Schneider-Schaulies, J., Holmes, H. C., and ter Meulen, V. (1997). Specific binding of HIV-1 envelope protein gp120 to the structural membrane proteins ezrin and moesin. *Virus Res* **49**(2), 215-23.
- Helt, A. M., and Galloway, D. A. (2003). Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* **24**(2), 159-69.
- Heuser, J. E., and Donaldson, J. G. (2001). Membrane-cytoskeletal dynamics in a new dimension. *Nat Cell Biol* **3**(6), E140-2.
- Hirasawa, K., Kim, A., Han, H. S., Han, J., Jun, H. S., and Yoon, J. W. (2003). Effect of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase on the Replication of Encephalomyocarditis Virus. *J Virol* **77**(10), 5649-56.
- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* **26**(2), 365-9.
- Ho, C. L., Martyrs, J. L., Mikhailov, A., Gundersen, G. G., and Liem, R. K. (1998). Novel features of intermediate filament dynamics revealed by green fluorescent protein chimeras. *J Cell Sci* **111**(Pt 13), 1767-78.
- Hoggan, M. D., Blacklow, N. R., and Rowe, W. P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**(6), 1467-74.
- Houseweart, M. K., and Cleveland, D. W. (1998). Intermediate filaments and their associated proteins: multiple dynamic personalities. *Curr Opin Cell Biol* **10**(1), 93-101.
- Houseweart, M. K., and Cleveland, D. W. (1999). Cytoskeletal linkers: new MAPs for old destinations. *Curr Biol* **9**(22), R864-6.
- Hu, K. Q., Backer, J. M., Shagian, G., Feener, E. P., and King, G. L. (1990). Modulation of the insulin growth factorII/mannose 6-phosphate receptro in microvascular endothelial cells by phorbol ester via protein kinase C. *J Biol Chem* **265**, 13864-13870.
- Huber, A., Sander, P., and Paulsen, R. (1996). Phosphorylation of the InaD gene product, a photoreceptor membrane protein required for recovery of visual excitation. *J Biol Chem* **271**(20), 11710-7.
- Inagaki, N., Tsujimura, K., Tanaka, J., Sekimata, M., Kamei, Y., and Inagaki, M. (1996). Visualization of protein kinase activities in single cells by antibodies against phosphorylated vimentin and GFAP. *Neurochem Res* **21**(7), 795-800.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**(1), 23-8.
- Ishino, K., Ohba, M., Kashiwagi, M., Kawabe, S., Chida, K., and Kuroki, T. (1998). Phorbol ester-induced G1 arrest in BALB/MK-2 mouse keratinocytes is mediated by delta and eta isoforms of protein kinase C. *Jpn J Cancer Res* **89**(11), 1126-33.
- Ivanov, K. I., Puustinen, P., Merits, A., Saarma, M., and Makinen, K. (2001). Phosphorylation down-regulates the RNA binding function of the coat protein of potato virus A. *J Biol Chem* **276**(17), 13530-40.

- Jacinto, E., and Hall, M. N. (2003).** Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(2), 117-26.
- Jaken S, and Parker, P. (2000).** Protein kinase C binding partners. *Bioessays* 22, 245-254.
- Jiang, W. G., Hiscox, S., Singhrao, S. K., Puntis, M. C., Nakamura, T., Mansel, R. E., and Hallett, M. B. (1995).** Induction of tyrosine phosphorylation and translocation of ezrin by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Biochem Biophys Res Commun* 217(3), 1062-9.
- Johnson, J. E., Giorgione, J., and Newton, A. C. (2000).** The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry* 39(37), 11360-9.
- Jongeneel, C. V., Sahli, R., McMaster, G.K., Hirt, B. (1986).** A precise map of the splice junctions in the RNAs of the minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J. Virol.* 59, 564-573.
- Joshi, H. C. (1998).** Microtubule dynamics in living cells. *Curr Opin Cell Biol* 10(1), 35-44.
- Jun, C. D., Pae, H. O., Kwak, H. J., Yoo, J. C., Choi, B. M., Oh, C. D., Chun, J. S., Paik, S. G., Park, Y. H., and Chung, H. T. (1999).** Modulation of nitric oxide-induced apoptotic death of HL-60 cells by protein kinase C and protein kinase A through mitogen-activated protein kinases and CPP32-like protease pathways. *Cell Immunol* 194(1), 36-46.
- Kaludov, N., Brown, K. E., Walters, R. W., Zabner, J., and Chiorini, J. A. (2001).** Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* 75(15), 6884-93.
- Kang, B. S., O. F., Sando, J. J., and Hahn, C. S. (2000).** Activation-dependent degradation of protein kinase C eta. *Oncogene* 19, 4263-4272.
- Kang, G., Desikan, P., and Mathan, M. (2002).** Cytoskeletal changes during poliovirus infection in an intestinal cell line. *Indian J Med Res* 115, 37-45.
- Karczewski, M. K., and Strebel, K. (1996).** Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J Virol* 70(1), 494-507.
- Kashiwagi, M., M. O., Watanabe, H., Ishino, K., Kasahara, K., Sanai, Y., Taya, Y., and Kuroki, T. (2000).** PKCeta associates with cyclin E/cdk2/p21 complex, phosphorylates p21 and inhibits cdk2 kinase in keratinocytes. *Oncogene* 19, 6334-6341.
- Kashiwagi, M., M. O., Chida, K., and Kuroki, T. (2002).** Protein kinase C eta (PKCeta): Its involvement in keratinocyte differentiation. *J. Biochem.* 132, 853-857.
- Kazanietz, M. G. (2002).** Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol Pharmacol* 61(4), 759-67.
- Kestler, J., Neeb, B., Struyf, S., van Damme, J., Cotmore, S.F., D'Abramo, A., Tattersall, P., Rommelaere, J., Dinsart, C., and Cornelis, J. J. (1999).** Cis-requirements for the efficient production of recombinant DNA vectors based on autonomous parvoviruses. *Human Gene Therapy* 10, 1619-1632.
- Kilham, L., and Olivier, L. J. (1959).** A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology* 7, 428-437.
- Klumpp, S., and Kriegstein, J. (2002).** Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur J Biochem* 269(4), 1067-71.
- Kordes, E., Savelyeva, L., Schwab, M., Rommelaere, J., Jauniaux, J. C., and Cziepluch, C. (1998).** Isolation and characterization of human SGT and identification of homologues in *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*. *Genomics* 52(1), 90-4.
- Kornberg, A, and Baker, T. (1992).** "DNA replication." Second ed. WH Freeman Co, New York.
- Kotsakis, A., Pomeranz, L. E., Blouin, A., and Blaho, J. A. (2001).** Microtubule reorganization during herpes simplex virus type 1 infection facilitates the nuclear localization of VP22, a major virion tegument protein. *J Virol* 75(18), 8697-711.
- Krady, J. K., and Ward, D. (1995).** Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1. *Mol. Cell. Biol.* 15, 524-533.

- Krieg, J., and Hunter, T. (1992).** Identification of the two major epidermal growth factor-induced tyrosine phosphorylation sites in the microvillar core protein ezrin. *J Biol Chem* **267**(27), 19258-65.
- Kuroki, T., Ikuta, T., Kashiwagi, M., Kawabe, S., Ohba, M., Huh, N., Mizuno, K., Ohno, S., Yamada, E., and Chida, K. (2000).** Cholesterol sulfate, an activator of protein kinase C mediating squamous cell differentiation: a review. *Mutat Res* **462**(2-3), 189-95.
- Kurtzman, G. J., Ozawa, K., Hanson, G.R., Cohen, B., Oseas, R., Young, N., (1987).** Chronic bone marrow failure due to persistent B19 infection. *N Engl J Med* **317**, 287-294.
- Kuznetsov, S. A., Langford, G. M., and Weiss, D. G. (1992).** Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. *Nature* **356**(6371), 722-5.
- Kwiatkowski, D. J. (1999).** Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr Opin Cell Biol* **11**(1), 103-8.
- Lachmann, S., Rommeleare, J., and Nüesch, J. P. F. (2003).** Novel PKC η is required to activate replicative functions of the major nonstructural protein NS1 of Minute Virus of Mice. *J Virol* **77**(14), im Druck.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- Le Good, J., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P., and Parker, P. J. (1998).** Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**, 2042-2045.
- Leclerc, D., Chapdelaine, Y., and Hohn, T. (1999).** Nuclear targeting of the cauliflower mosaic virus coat protein. *J Virol* **73**(1), 553-60.
- Lee, H. W., Smith, L., Pettit, G. R., Vinitsky, A., and Smith, J. B. (1996).** Ubiquitination of protein kinase C- α and degradation by the proteasome. *J Biol Chem* **271**(35), 20973-6.
- Legendre, D., and Rommelaere, J. (1992).** Terminal regions of the NS1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans-inhibition. *J. Virol.* **66**, 5705-5713.
- Legendre, D., and Rommelaere, J. (1994).** Targeting of promoters for trans-activation by a carboxy-terminal domain of the NS1 protein of the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **68**, 7974-7985.
- Legrand, C., Rommelaere, J., and Caillet-Fauquet, P. (1993).** MVM(p) NS-2 protein expression is required with NS-1 for maximal cytotoxicity in human transformed cells. *Virology* **195**(1), 149-55.
- Lehel, C., Olah, Z., Jakab, G., Szallasi, Z., Petrovics, G., Harta, G., Blumberg, P. M., and Anderson, W. B. (1995).** Protein kinase C epsilon subcellular localization domains and proteolytic degradation sites. A model for protein kinase C conformational changes. *J Biol Chem* **270**(33), 19651-8.
- Li, W., and Crouch, D. H. (2000).** Cloning and expression profile of chicken radixin. *Biochim Biophys Acta* **1491**(1-3), 327-32.
- Li, X., and Rhode, S.L. III (1990).** Mutation of lysine 405 to serine in the parvovirus H-1 NS1 abolishes its functions for viral DNA replication, late promoter trans-activation, and cytotoxicity. *J. Virol.* **64**, 4654-4660.
- Linsler, P., Bruning, H., and Armentrout, R. W. (1977).** Specific binding sites for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells. *J. Virol.* **24**, 211-221.
- Liu, W. J., Q. Y., Zhao, K. N., Liu, Y. H., Liu, X. S., and Frazer, I. H. (2001).** Association of bovine papillomavirus type 1 with microtubules. *Virology* **282**(2), 237-44.
- Livneh E, T. S., Bechor, E., Doki, Y., Schieren, I. and Weinstein, I. B. (1996).** Linking protein kinase C to the cell cycle: ectopic expression of PKC ϵ in NIH3T3 cells alters the expression of cyclins and Cdk inhibitors and induces adipogenesis. *Oncogene* **12**, 1545-1555.
- Lombardo, E., Ramirez, J. C., Agbandje-McKenna, M., and Almendral, J. M. (2000).** A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly. *J Virol* **74**(8), 3804-14.
- Lombardo, E., Ramirez, J. C., Garcia, J., and Almendral, J. M. (2002).** Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J Virol* **76**(14), 7049-59.

- Lorson, C., Burger, L.R., Mouw, M., and Pintel, D. (1996).** Efficient transactivation of the minute virus of mice P38 promoter requires upstream binding of NS1. *J. Virol.* **70**, 834-842.
- Lorson, C., and Pintel, D. J. (1997).** Characterization of the minute virus of mice P38 core promoter elements. *J Virol* **71**(9), 6568-75.
- Lorson, C., Pearson, J., Burger, L., and Pintel, D.J. (1998).** An Sp1-binding site and TATA element are sufficient to support full transactivation by proximally bound NS1 protein of minute virus of mice. *Virology* **240**, 326-337.
- Lu, Z., Hornia, A., Jiang, Y. W., Zang, Q., Ohno, S., and Foster, D. A. (1997).** Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. *Mol. Cel. Biol.* **17**, 3418-3428.
- Lu, Z., Liu, D., Hornia, A., Devonish, W., Pagano, M., and Foster, D. A. (1998).** Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* **18**(2), 839-45.
- Lum, G. S., and Schreier, A.W. (1963).** Study of a virus isolated from a chloroleukemic Wistar rat. *Cancer Research* **23**(3), 1742-1747.
- Mackay, D. J., Esch, F., Furthmayr, H., and Hall, A. (1997).** Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. *J Cell Biol* **138**(4), 927-38.
- Marks F, and Gschwendt, M. (1996).** "Protein phosphorylation." (M. F, Ed.) VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany.
- Marks, F., and Gschwendt, M. (1996).** Protein kinase C. *In* "Protein phosphorylation" (M. F, Ed.) VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinhiem, Germany.
- Matera, A. G. (1999).** Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol* **9**(8), 302-9.
- Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., and Tsukita, S. (1998).** Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* **140**(3), 647-57.
- Matsui, T., Yonemura, S., and Tsukita, S. (1999).** Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidyl- inositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* **9**(21), 1259-62.
- Matsumura, M., Tanaka, N., Kuroki, T., Ichihashi, M., and Ohba, M. (2003).** The eta isoform of protein kinase C inhibits UV-induced activation of caspase-3 in normal human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **303**(1), 350-6.
- Maxwell, I. H., Spitzer, A.L., Maxwell, F., Pintel, D.J. (1995).** The capsid determinant of fibrotropism for the MVMP strain of minute virus of mice functions via VP2 and VP1. *J. Virol.* **69**, 5829-5832.
- McMaster, G. K., Beard, P., Engers, H. D., and Hirt, B. (1981).** Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to the minute virus of mice. *J Virol* **38**(1), 317-26.
- Meriane, M., Mary, S., Comunale, F., Vignal, E., Fort, P., and Gauthier-Rouviere, C. (2000).** Cdc42Hs and Rac1 GTPases induce the collapse of the vimentin intermediate filament network. *J Biol Chem* **275**(42), 33046-52.
- Miller, C. L., and Pintel D. J. (2002).** Interaction between parvovirus NS2 protein and nuclear export factor Crm1 is important for viral egress from the nucleus of murine cells. *J. Virol.* **76**, 3257-3266.
- Miller, K. G. (2003).** A role for moesin in polarity. *Trends Cell Biol* **13**(4), 165-8.
- Mintz, P. J., and Spector, D. L. (2000).** Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles. *J Struct Biol* **129**(2-3), 241-51.
- Mitchell, L. A. (2002).** Parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein as a transactivator of interleukin-6 synthesis: common pathway in inflammatory sequelae of human parvovirus infections? *J Med Virol* **67**(2), 267-74.
- Mochly-Rosen, D., and Gordon, A. S. (1998).** Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *Faseb J* **12**(1), 35-42.
- Moffatt, S., Yaegashi, N., Tada, K., Tanaka, N., and Sugamura, K. (1998).** Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol* **72**(4), 3018-28.
- Morgan, W. R., Ward, D.C. (1986).** Three splicing patterns are used to excise the small intron common to all minute virus of mice RNAs. *J. Virol.* **60**, 1170-1174.

- Morrow, T. A., Muljo, S. A., Zhang, J., Hardwick, J. M., and Schlissel, M. S. (1999).** Pro-B-cell-specific transcription and proapoptotic function of protein kinase Ceta. *Mol Cell Biol* **19**(8), 5608-18.
- Moscat, J., and Diaz-Meco, M. T. (2000).** The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep* **1**(5), 399-403.
- Moss, B., Elroy Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W.A., and Fuerst, T.R. (1990).** Product Review. New mammalian expression vectors. *Nature* **348**, 91-92.
- Mousset, S., Ouadrhiri, Y., Caillet Fauquet, P., and Rommelaere, J. (1994).** The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice non-structural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression. *J. Virol.* **68**, 6446-6453.
- Mouw, M. and Pintel, D. (1998).** Amino acids 16-275 of minute virus of mice NS1 include a domain that specifically binds (ACCA)₂₋₃-containing DNA. *Virology* **251**, 123-131.
- Mullins, R. D., Heuser, J. A., and Pollard, T. D. (1998).** The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11), 6181-6.
- Mullins, R. D. (2000).** How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr Opin Cell Biol* **12**(1), 91-6.
- Murakami, A., Chida, K., Suzuki, Y., Kikuchi, H., Imajoh-Ohmi, S., and Kuroki, T. (1996).** Absence of down-regulation and translocation of the eta isoform of protein kinase C in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **106**(4), 790-4.
- Muranyi, W., Haas, J., Wagner, M., Krohne, G., and Koszinowski, U. H. (2002).** Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science* **297**(5582), 854-7.
- Naeger, L. K., Cater, J., and Pintel, D.J. (1990).** The small non-structural protein (NS2) of minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner. *J. Virol.* **64**, 6166-6175.
- Narasimhan, D., Collaco, R., Kalman-Maltese, V., and Trempe, J. P. (2002).** Hyperphosphorylation of the adeno-associated virus Rep78 protein inhibits terminal repeat binding and helicase activity. *Biochim Biophys Acta* **1576**(3), 298-305.
- Nejmeddine, M., Trugnan, G., Sapin, C., Kohli, E., Svensson, L., Lopez, S., and Cohen, J. (2000).** Rotavirus spike protein VP4 is present at the plasma membrane and is associated with microtubules in infected cells. *J Virol* **74**(7), 3313-20.
- Newton, A. C. (1996).** Protein kinase C: ports of anchor in the cell. *Curr Biol* **6**(7), 806-9.
- Newton, A. (1997).** Regulation of protein kinase C. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 161-167.
- Newton, A. C., and Johnson, J. E. (1998).** Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim Biophys Acta* **1376**(2), 155-72.
- Newton, A. C. (2003).** Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* **370**(Pt 2), 361-71.
- Ng, T., Parsons, M., Hughes, W. E., Monypenny, J., Zicha, D., Gautreau, A., Arpin, M., Gschmeissner, S., Verveer, P. J., Bastiaens, P. I., and Parker, P. J. (2001).** Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *Embo J* **20**(11), 2723-41.
- Nishizuka, Y. (1988).** The heterogeneity and differential expression of multiple species of the protein kinase C family. *Biofactors* **1**(1), 17-20.
- Nixon, J. B., and McPhail, L. C. (1999).** Protein kinase C (PKC) isoforms translocate to Triton-insoluble fractions in stimulated human neutrophils: correlation of conventional PKC with activation of NADPH oxidase. *J Immunol* **163**(8), 4574-82.
- Nomoto, S., Watanabe, Y., Ninomiya-Tsuji, J., Yang, L. X., Nagai, Y., Kiuchi, K., Hagiwara, M., Hidaka, H., Matsumoto, K., and Irie, K. (1997).** Functional analyses of mammalian protein kinase C isozymes in budding yeast and mammalian fibroblasts. *Genes Cells* **2**(10), 601-14.
- Nüesch, J. P., Cotmore, S.F., and Tattersall, P. (1992).** Expression of functional parvoviral NS1 from recombinant vaccinia virus: effects of mutations in the nucleotide-binding motif. *Virology* **191**, 406-416.
- Nüesch, J. P., and Tattersall, P. (1993).** Nuclear targeting of the parvoviral replicator protein molecule NS1: evidence for self-association prior to nuclear transport. *Virology* **196**, 637-651.

- Nüesch, J. P. F., Cotmore, S.F., and Tattersall, P. (1995). Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology* **209**, 122-135.
- Nüesch, J. P. F., Corbau, R., Tattersall, P., and Rommelaere, J. (1998a). Biochemical activities of minute virus of mice nonstructural protein NS1 are modulated by the phosphorylation state of the polypeptide. *J. Virol.* **72**, 8002-8012.
- Nüesch, J. P. F., Dettwiler, S., Corbau, R., and Rommelaere, J. (1998b). Replicative functions of minute virus of mice NS1 protein are regulated in vitro by phosphorylation through protein kinase C. *J. Virol.* **72**, 9966-9977.
- Nüesch, J. P. F., Christensen, J., and Rommelaere, J. (2001). Initiation of minute virus of mice DNA replication is regulated at the level of origin unwinding by atypical protein kinase C phosphorylation of NS1. *J. Virol.* **75**, 5730-5739.
- Nüesch, J. P. F., Lachmann, S., Corbau, R., and Rommelaere, J. (2003). Regulation of minute virus of mice NS1 replicative functions by atypical PKC λ in vivo. *J Virol* **77**(1), 433-42.
- Nyakern-Meazza, M., Narayan, K., Schutt, C. E., and Lindberg, U. (2002). Tropomyosin and gelsolin cooperate in controlling the microfilament system. *J Biol Chem* **277**(32), 28774-9.
- Oehrlein, S. A., Maelicke, A., and Herget, T. (1998). Expression of protein kinase C gene family members is temporally and spatially regulated during neural development in vitro. *Eur J Cell Biol* **77**(4), 323-37.
- Ogg, S. C., and Lamond, A. I. (2002). Cajal bodies and coilin--moving towards function. *J Cell Biol* **159**(1), 17-21.
- Ogston, P., Raj, K., and Beard, P. (2000). Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV-16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV-16 E2 protein. *J Virol* **74**(8), 3494-504.
- Ohba, M., Ishino, K., Kashiwagi, M., Kawabe, S., Chida, K., Huh, N. H., and Kuroki, T. (1998). Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C. *Mol Cell Biol* **18**(9), 5199-207.
- Ohno, S. (2001). Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 641-648.
- Ohshima, T., Yoshida, E., Nakajima, T., Yagami, K. I., and Fukamizu, A. (2001). Effects of interaction between parvovirus minute virus of mice NS1 and coactivator CBP on NS1- and p53-transactivation. *Int J Mol Med* **7**(1), 49-54.
- Ohtani, K., Iwanaga, R., Arai, M., Huang, Y., Matsumura, Y., and Nakamura, M. (2000). Cell type-specific E2F activation and cell cycle progression induced by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *J Biol Chem* **275**(15), 11154-63.
- Okuda A, S. H., Kimura G. (1984). Abortive transformation of rat 3Y1 cells by simian virus 40: viral function overcoming inhibition of cellular proliferation under various conditions of culture. *Virology* **133**(1), 35-45.
- Ono, S., and Ono, K. (2002). Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics. *J Cell Biol* **156**(6), 1065-76.
- Op de Beeck, A., Anouja, F., Mousset, S., Rommelaere, J., Caillet-Fauquet, P. (1995). The nonstructural proteins of the autonomous parvovirus minute virus of mice interfere with the cell cycle, inducing accumulation in G2. *Cell Growth Differ.* **6**, 781-787.
- Op de Beeck, A., and Caillet-Fauquet, P. (1997). The NS1 protein of the autonomous parvovirus minute virus of mice blocks cellular DNA replication: a consequence of lesions to the chromatin? *J. Virol.* **71**, 5323-5329.
- Osada, S., Mizuno, K., Saido, T. C., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T., and Ohno, S. (1990). A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J Biol Chem* **265**(36), 22434-40.
- Ott, D. E., Coren, L. V., Kane, B. P., Busch, L. K., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Chertova, E. N., Arthur, L. O., and Henderson, L. E. (1996). Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* **70**(11), 7734-43.

- Paradiso, P. R. (1981).** Infectious process of the parvovirus H-1: correlation of protein content, particle density, and viral infectivity. *J Virol* **39**(3), 800-7.
- Parekh, D., Ziegler, W., Yonezawa, K., Hara, K., and Parker, P. J. (1999).** Mammalian TOR controls one of two kinase pathways acting upon nPKCdelta and nPKCepsilon. *J Biol Chem* **274**(49), 34758-64.
- Parekh, D., Ziegler, W., and Parker, P. J. (2000).** Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* **19**, 496-503.
- Parker, J. P., and Dekker L. V. (1997).** Protein Kinase C, Springer Verlag, New York, USA.
- Parker, J. S., and Parrish, C. R. (2000).** Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol* **74**(4), 1919-30.
- Parker, J. S., Murphy, W. J., Wang, D., O'Brien, S. J., and Parrish, C. R. (2001).** Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. *J Virol* **75**(8), 3896-902.
- Perander, M., Bjorkoy, G., and Johansen, T. (2001).** Nuclear import and export signals enable rapid nucleocytoplasmic shuttling of the atypical protein kinase C L. *J. Biol. Chem.* **276**, 13015-13024.
- Perros, M., Deleu, L., Vanacker, J.-M., Kherrouche, Z., Spruyt, N., Faisst, S., Rommelaere, J. (1995).** Upstream CREs participate in the basal activity of minute virus of mice promoter P4 and in its stimulation in ras-transformed cells. *J. Virol.* **69**, 5506-5515.
- Pietromonaco, S. F., Simons, P. C., Altman, A., and Elias, L. (1998).** Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J Biol Chem* **273**(13), 7594-603.
- Pines, J. (1999).** Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* **1**(3), E73-9.
- Pintel, D. J., Dadachanji, D., Astell, C.R., Ward, D.C. (1983).** The genome of minute virus of mice, an autonomous parvovirus, encodes two overlapping transcription units. *Nucl. Acids. Res.* **11**, 1019-1038.
- Pokrovskaja, K., Trivedi, P., Klein, G., and Szekely, L. (1997).** Epstein-Barr virus-encoded LMP-1 protein upregulates the pNDCF group of nucleoskeleton-cytoskeleton-associated proteins. *J Gen Virol* **78**(Pt 8), 2031-40.
- Pollard, T., Blanchoin, L., and Mullins, R. D. (2001).** Actin dynamics. *J Cell Sci* **114**(Pt1), 3-4.
- Prekeris, R., Mayhew, M. W., Cooper, J. B., and Terrian, D. M. (1996).** Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J Cell Biol* **132**(1-2), 77-90.
- Pujol, A., Deleu, L., Nüesch, J. P. F., Cziepluch, C., Jauniaux, J.-C., and Rommelaere, J. (1997).** Inhibition of parvovirus minute virus of mice replication by a peptide involved in the oligomerization of the nonstructural protein NS1. *J. Virol.* **71**, 7393-7403.
- Pullen, N., Dennis, P. B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S. C., Hemmings, B. A., and Thomas, G. (1998).** Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* **279**(5351), 707-10.
- Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V., and Srivastava, A. (1999).** Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* **5**(1), 71-7.
- Quan, T., and Fisher, G. J. (1999).** Cloning and characterization of the human protein kinase C-eta promoter. *J Biol Chem* **274**(40), 28566-74.
- Raab, U., Beckenlehner, K., Lowin, T., Niller, H. H., Doyle, S., and Modrow, S. (2002).** NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. *Virology* **293**(1), 86-93.
- Ran, Z., Rayet, B., Rommelaere, J., and Faisst, S. (1999).** Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis. *Virus Res* **65**(2), 161-74.
- Ravkov, E. V., Nichol, S. T., and Compans, R. W. (1997).** Polarized entry and release in epithelial cells of Black Creek Canal virus, a New World hantavirus. *J Virol* **71**(2), 1147-54.

- Rayet, B., Lopez-Guerrero, J.-A., Rommelaere, J., and Dinsart, C. (1998).** Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: Connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J. Virol.* **72**, 8893-8903.
- Rempel, R. E., Anderson, M. K., Evans, E., and Traktman, P. (1990).** Temperature-sensitive vaccinia virus mutants identify a gene with an essential role in viral replication. *J Virol* **64**(2), 574-83.
- Resnick, M. S., Kang, B. S., Luu, D., Wickham, J. T., Sando, J. J., and Hahn, C. S. (1998).** Differential downstream functions of protein kinase Ceta and -theta in EL4 mouse thymoma cells. *J Biol Chem* **273**(42), 27654-61.
- Rhode, S. L. I., and Richard, S. M. (1987).** Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J. Virol.* **61**, 2807-2815.
- Richards, R. G., Armentrout, R. W. (1979).** Early events in parvovirus replication: lack of integration by minute virus of mice into host cell DNA. *J. Virol.* **30**, 397-399.
- Rommelaere, J., and Almendral del Rio, J. M. (2000).** Parvoviridae. *The Springer Index of Viruses, Herausgeber Springer Verlag Heidelberg, Editor: Tidona C.A. und Darai, G.*
- Rommelaere, J., Cornelis, J. J. (1991).** Antineoplastic activity of parvoviruses. *J. Virol. Methods* **33**, 233-251.
- Ros, C., Burckhardt, C. J., and Kempf, C. (2002).** Cytoplasmic trafficking of minute virus of mice: low-pH requirement, routing to late endosomes, and proteasome interaction. *J Virol* **76**(24), 12634-45.
- Rubio, M. P., Guerra, S., and Almendral, J. M. (2001).** Genome replication and postencapsidation functions mapping to the nonstructural gene restrict the host range of a murine parvovirus in human cells. *J Virol* **75**(23), 11573-82.
- Sagara, J., Tsukita, S., Yonemura, S., and Kawai, A. (1995).** Cellular actin-binding ezrin-radixin-moesin (ERM) family proteins are incorporated into the rabies virion and closely associated with viral envelope proteins in the cell. *Virology* **206**(1), 485-94.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989).** "Molecular cloning: A laboratory manual." 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Santaren, J. F., Ramirez, J. C., and Almendral, J. M. (1993).** Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMP: Involvement of phosphorylated VP2 subtypes in viral morphogenesis. *J. Virol.* **67**, 5126-5138.
- Sanz, L., Sanchez, P., Lallena, M. J., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (1999).** The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *Embo J* **18**(11), 3044-53.
- Schechtman, D., and Mochly-Rosen, D. (2001).** Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene* **20**(44), 6339-47.
- Scheer, U., and Hock, R. (1999).** Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* **11**(3), 385-90.
- Scheuring, U. J., Corbeil, J., Mosier, D. E., and Theofilopoulos, A. N. (1998).** Early modification of host cell gene expression induced by HIV-1. *Aids* **12**(6), 563-70.
- Schoborg, R. V., and Pintel, D.J. (1991).** Accumulation of MVM gene products is differentially regulated by transcription initiation. *Virology* **181**, 22-34.
- Schonhorn, J. E., Akompong, T. and Wessling-Resnick, M. (1995).** Mechanism of transferrin receptor down-regulation in K562 cells in response to protein kinase C activation. *J Biol Chem* **270**, 3698-3705.
- Schonwasser, D. C., Marais, R. M., Marshall, C. J., and Parker, P. J. (1998).** Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol* **18**(2), 790-8.
- Selinka, H. C., Giroglou, T., and Sapp, M. (2002).** Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* **299**(2), 279-287.
- Shade, R. O., Blundell, M. C., Cotmore, S. F., Tattersall, P., and Astell, C. R. (1986).** Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J Virol* **58**(3), 921-36.
- Shaw, A. M., Braun, L., Frew, T., Hurley, D. J., Rowland, R. R., and Chase, C. C. (2000).** A role for bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein E (gE) tyrosine phosphorylation in replication of BHV-1 wild-type virus but not BHV-1 gE deletion mutant virus. *Virology* **268**(1), 159-66.

- Shearman, M. S., Naor, Z., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1987). Differential expression of multiple protein kinase C subspecies in rat central nervous tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **147**(3), 911-9.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**(12), 1501-12.
- Shih, M., Lin, F., Scott, J. D., Wang, H. Y., and Malbon, C. C. (1999). Dynamic complexes of beta2-adrenergic receptors with protein kinases and phosphates and the role of gravin. *J Biol Chem* **274**, 1588-1595.
- Shtutman, M., Hershko, T., Maissel, A., Fima, E., and Livneh, E. (2003). PKCeta associates with cyclin E/Cdk2 complex in serum-starved MCF-7 and NIH-3T3 cells. *Exp Cell Res* **286**(1), 22-9.
- Siegl, G., Bates, R. C., Berns, K. I., Carter, B. J., Kelly, D. C., Kurstak, E., Tattersall, P. (1985). Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* **23**(2), 61-73.
- Simons, P. C., Pietromonaco, S. F., Reczek, D., Bretscher, A., and Elias, L. (1998). C-terminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun* **253**(3), 561-5.
- Small, J. V., Rottner, K., and Kaverina, I. (1999). Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **11**(1), 54-60.
- Sodeik, B. (2000). Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol* **8**(10), 465-72.
- Sol, N., Morinet, F., Alizon, M., and Hazan, U. (1993). Trans-activation of the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1 by the parvovirus B19 NS1 gene product. *J Gen Virol* **74**(Pt 9), 2011-4.
- Sol, N., Le Junter, J., Vassias, I., Freyssinier, J. M., Thomas, A., Prigent, A. F., Rudkin, B. B., Fichelson, S., and Morinet, F. (1999). Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. *J Virol* **73**(10), 8762-70.
- Sonnenburg, E. D., Gao, T., and Newton, A. C. (2001). The phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1, phosphorylates conventional protein kinase C isozymes by a mechanism that is independent of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **276**(48), 45289-97.
- Sorci, G., Agneletti, A. L., and Donato, R. (2000). Effects of S100A1 and S100B on microtubule stability. An in vitro study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines. *Neuroscience* **99**(4), 773-83.
- Spalholz, B. A., Tattersall, P. (1983). Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J Virol* **46**, 937.
- Speck, O., Hughes, S. C., Noren, N. K., Kulikauskas, R. M., and Fehon, R. G. (2003). Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity. *Nature* **421**(6918), 83-7.
- Spegelaere, P., van Hille, B., Spruyt, N., Faisst, S., Cornelis, J.J., Rommelaere, J. (1991). Initiation of transcription from the minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-ras oncogene. *J Virol* **65**, 4919-4928.
- Standaert, M. L., Bandyopadhyay, G., Perez, L., Price, D., Galloway, L., Poklepovic, A., Sajan, M. P., Cenni, V., Sirri, A., Moscat, J., Toker, A., and Farese, R. V. (1999). Insulin activates protein kinases C-zeta and C-lambda by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. *J Biol Chem* **274**(36), 25308-16.
- Standaert, M. L., Ortmeyer, H. K., Sajan, M. P., Kanoh, Y., Bandyopadhyay, G., Hansen, B. C., and Farese, R. V. (2002). Skeletal muscle insulin resistance in obesity-associated type 2 diabetes in monkeys is linked to a defect in insulin activation of protein kinase C-zeta/lambda/iota. *Diabetes* **51**(10), 2936-43.
- Stapleton, G., Malliri, A., and Ozanne, B. W. (2002). Downregulated AP-1 activity is associated with inhibition of Protein-Kinase-C-dependent CD44 and ezrin localisation and upregulation of PKC theta in A431 cells. *J Cell Sci* **115**(Pt 13), 2713-24.
- Stidwill, R. P., and Greber, U. F. (2000). Intracellular Virus Trafficking Reveals Physiological Characteristics of the Cytoskeleton. *News Physiol Sci* **15**, 67-71.
- Storz, P., and Toker, A. (2002). 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) in PI 3-kinase signaling. *Front Biosci* **7**, d886-902.

- Strack, V., Krutzfeldt, J., Kellerer, M., Ullrich, A., Lammers, R., and Haring, H. U. (2002).** The Protein-tyrosine-phosphatase SHP2 is phosphorylated on serine residues 576 and 591 by protein kinase C isoforms alpha, beta 1, beta 2, and eta. *Biochemistry* **41**(2), 603-8.
- Suikkanen, S., Saajarvi, K., Hirsimaki, J., Valilehto, O., Reunanen, H., Vihinen-Ranta, M., and Vuento, M. (2002).** Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus. *J Virol* **76**(9), 4401-11.
- Summerford, C., and Samulski, R. J. (1998).** Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* **72**(2), 1438-45.
- Summerford, C., Bartlett, J. S., and Samulski, R. J. (1999).** AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* **5**(1), 78-82.
- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kemphues, K. J., Miwa, J., and Ohno, S. (1998).** Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **125**(18), 3607-14.
- Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S., and Takai, Y. (1997).** Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* **272**(37), 23371-5.
- Tattersall, P., and Ward, D.C. (1976).** Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* **263**, 106-109.
- Tattersall P, Shatkin, A. J., Ward, D. C. (1977).** Sequence homology between the structural polypeptides of minute virus of mice. *J Mol Biol* **111**(4), 375-94.
- Tattersall, P., Bratton, J. (1983).** Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J. Virol.* **46**, 944-955.
- Thabard, W., Collette, M., Bataille, R., and Amiot, M. (2001).** Protein kinase C delta and eta isoenzymes control the shedding of the interleukin 6 receptor alpha in myeloma cells. *Biochem J* **358**(Pt 1), 193-200.
- Thomson, B. J., Weindler, F. W., Gray, D., Schwaab, V., and Heilbronn, R. (1994).** Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* **204**(1), 304-11.
- Tobaben S, Thakur, P., Fernandez-Chacon, R., Sudhof, T. C., Rettig, J., and Stahl, B. (2001).** A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron* **31**, 987-999.
- Toker A (1998).** Signaling through protein kinase C. *Front. Biosci.* **3**, D1134-1147.
- Toker, A., Meyer, M., Reddy, K. K., Falck, J. R., Aneja, R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D. J., Ballas, L. M., and Cantley, L. C. (1994).** Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J Biol Chem* **269**(51), 32358-67.
- Toker, A., Meyer, M., Reddy, K. K., Falck, J. R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D. J., Ballas, L. M., and Cantley, L. C. (1995).** Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5,-P3. *J. Biol. Chem.* **270**, 32358-32366
- Toolan, H. W., Buttle, G. A. H., Kay, H. E. M. (1962).** Isolation of the H-1 and H-3 viruses directly from human embryos. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **3**, 368.
- Toolan, H. W. (1967).** Lack of oncogenic effect of H-viruses for hamsters. *Nature (London)* **208**, 214.
- Tsukita, S., and Yonemura, S. (1999).** Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem* **274**(49), 34507-10.
- Tullis, G. E., Labieniec-Pintel, L., Clemens, K. E., Pintel, D. J. (1988).** Generation and characterization of a temperature-sensitive mutation in the NS-1 gene of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **62**, 2736-2744.
- Turowski, P., Myles, T., Hemmings, B. A., Fernandez, A., and Lamb, N. J. (1999).** Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55. *Mol Biol Cell* **10**(6), 1997-2015.

- Tyagi, S., Korkaya, H., Zafrullah, M., Jameel, S., and Lal, S. K. (2002). The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *J Biol Chem* **277**(25), 22759-67.
- Ueberall, F., Hellbert, K., Kampfer, S., Maly, K., Villunger, A., Spitaler, M., Mwanjewe, J., Baier-Bitterlich, G., Baier, G., and Grunicke, HH (1999). Evidence that atypical protein kinase C-L and atypical protein kinase C-Z participate in ras-mediated reorganization of the F-actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **144**, 413-425.
- Urzainqui, A., Serrador, J. M., Viedma, F., Yanez-Mo, M., Rodriguez, A., Corbi, A. L., Alonso-Lebrero, J. L., Luque, A., Deckert, M., Vazquez, J., and Sanchez-Madrid, F. (2002). ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity* **17**(4), 401-12.
- Vaiskunaite, R., Adarichev, V., Furthmayr, H., Kozasa, T., Gudkov, A., and Voyno-Yasenetskaya, T. A. (2000). Conformational activation of radixin by G13 protein alpha subunit. *J Biol Chem* **275**(34), 26206-12.
- van Hille, B., Duponchel, N., Salome, N., Spruyt, N., Cotmore, S.F., Tattersall, P., Cornelis, J.J., Rommelaere, J. (1989). Limitations to the expression of parvoviral nonstructural proteins may determine the extent of sensitization of EJ-ras-transformed rat cells to minute virus of mice. *Virology* **171**, 89-97.
- Van Minnebruggen, G., Van de Walle, G. R., Favoreel, H. W., Nauwynck, H. J., and Pensaert, M. B. (2002). Temporary disturbance of actin stress fibers in swine kidney cells during pseudorabies virus infection. *Vet Microbiol* **86**(1-2), 89-94.
- Van Pachterbeke, C., Tuynder, M., Cosyn, J. P., Lespagnard, L., Larsimont, D., and Rommelaere, J. (1993). Parvovirus H-1 inhibits growth of short-term tumor-derived but not normal mammary tissue cultures. *Int J Cancer* **55**(4), 672-7.
- Vanacker, J.-M., Laudet, V., Adelmant, G., Stehelin, D., Rommelaere, J. (1993). Interconnection between thyroid hormone receptor signalling pathways and parvovirus cytotoxic functions. *J. Virol.* **67**, 7668-7672.
- Vanhaesebroeck, B., and Waterfield, M. D. (1999). Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* **253**(1), 239-54.
- Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D. R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* **346 Pt 3**, 561-76.
- Veronese S, Gambacorta, M. and Falini, B. (1989). In situ demonstration of tissue proliferative activity using anti-bromo-deoxyuridine monoclonal antibody. *J. Clin. Pathol.* **42**, 820-826.
- Vihinen-Ranta, M., Kalela, A., Makinen, P., Kakkola, L., Marjomaki, V., and Vuento, M. (1998). Intracellular route of canine parvovirus entry. *J Virol* **72**(1), 802-6.
- Vihinen-Ranta, M., Yuan, W., and Parrish, C. R. (2000). Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. *J Virol* **74**(10), 4853-9.
- Waldron, R. T., Iglesias, T., and Rozengurt, E. (1999). The pleckstrin homology domain of protein kinase D interacts preferentially with the eta isoform of protein kinase C. *J Biol Chem* **274**(14), 9224-30.
- Walz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Durst, M., Rabreau, M., and Schlehofer, J. R. (1997). Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J Gen Virol* **78**(Pt 6), 1441-52.
- Watts, N. R., Sackett, D. L., Ward, R. D., Miller, M. W., Wingfield, P. T., Stahl, S. S., and Steven, A. C. (2000). HIV-1 rev depolymerizes microtubules to form stable bilayered rings. *J Cell Biol* **150**(2), 349-60.
- Way, M. (1998). Interaction of vaccinia virus with the actin cytoskeleton. *Folia Microbiol* **43**(3), 305-10.
- Wetsel, W. C., Khan, W. A., Merchenthaler, I., Rivera, H., Halpern, A. E., Phung, H. M., Negro-Vilar, A., and Hannun, Y. A. (1992). Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol* **117**(1), 121-33.
- Wetzel, K., Menten, P., Opdenakker, G., Van Damme, J., Grone, H. J., Giese, N., Vecchi, A., Sozzani, S., Cornelis, J. J., Rommelaere, J., and Dinsart, C. (2001). Transduction of human MCP-3 by a parvoviral vector induces leukocyte infiltration and reduces growth of human cervical carcinoma cell xenografts. *J Gene Med* **3**(4), 326-37.

- White, W. O., Seibenhener, M. L., and Wooten, M. W. (2002). Phosphorylation of tyrosine 256 facilitates nuclear import of atypical protein kinase C. *J Cell Biochem* **85**(1), 42-53.
- Wiebusch, L., Asmar, J., Uecker, R., and Hagemeyer, C. (2003). Human cytomegalovirus immediate-early over protein 2 (IE2)-mediated activation of cyclin E is cell-cycle-independent and forces S-phase entry in IE2-arrested cells. *J Gen Virol* **84**(Pt 1), 51-60.
- Willwand, K., and Hirt, B. (1991). The minute virus of mice capsid specifically recognizes the 3' hairpin structure of the viral replicative-form DNA: mapping of the binding site by hydroxyl radical footprinting. *J Virol* **65**(9), 4629-35.
- Wilson, G. M., Jindal, H. K., Yeung, D. E., Chen, W., and Astell, C. R. (1991). Expression of minute virus of mice major non-structural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities. *Virology* **185**, 90-98.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A., and Knust, E. (2000). Drosophila atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol* **150**(6), 1361-74.
- Wolf, D. G., Courcelle, C. T., Prichard, M. N., and Mocarski, E. S. (2001). Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4), 1895-900.
- Wolter, S., Richards, R., and Armentrout, R. W. (1980). Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus. *Biochim Biophys Acta* **607**(3), 420-31.
- Wu, X., Lei, X., and Fu, Z. F. (2003). Rabies virus nucleoprotein is phosphorylated by cellular casein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun* **304**(2), 333-8.
- Wu, Y. X., Uezato, T., and Fujita, M. (2000). Tyrosine phosphorylation and cellular redistribution of ezrin in MDCK cells treated with pervanadate. *J Cell Biochem* **79**(2), 311-21.
- Xu, R. X., Pawelczyk, T., Xia, T. H., and Brown, S. C. (1997). NMR structure of a protein kinase C-gamma phorbol-binding domain and study of protein-lipid micelle interactions. *Biochemistry* **36**(35), 10709-17.
- Yaegashi, N., Niinuma, T., Chisaka, H., Uehara, S., Moffatt, S., Tada, K., Iwabuchi, M., Matsunaga, Y., Nakayama, M., Yutani, C., Osamura, Y., Hirayama, E., Okamura, K., Sugamura, K., and Yajima, A. (1999). Parvovirus B19 infection induces apoptosis of erythroid cells in vitro and in vivo. *J Infect* **39**(1), 68-76.
- Yamaguchi, R., and Newport, J. (2003). A Role for Ran-GTP and Crm1 in Blocking Re-Replication. *Cell* **113**(1), 115-25.
- Yang, T. J. (1987). Parvovirus-induced regression of canine transmissible venereal sarcoma. *Am J Vet Res* **48**(5), 799-800.
- Yao, L., Janmey, P., Frigeri, L. G., Han, W., Fujita, J., Kawakami, Y., Apgar, J. R., and Kawakami, T. (1999). Pleckstrin homology domains interact with filamentous actin. *J Biol Chem* **274**(28), 19752-61.
- Yeh, T. S., Lo, S. J., Chen, P. J., and Lee, Y. H. (1996). Casein kinase II and protein kinase C modulate hepatitis delta virus RNA replication but not empty viral particle assembly. *J Virol* **70**(9), 6190-8.
- Young, P. J., Jensen, K. T., Burger, L. R., Pintel, D. J., and Lorson, C. L. (2002). Minute virus of mice NS1 interacts with the SMN protein, and they colocalize in novel nuclear bodies induced by parvovirus infection. *J Virol* **76**(8), 3892-904.
- Zadori, Z., Szelei, J., Lacoste M. C., Li, Y., Garipey, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I. R., Tijssen, P. (2001). A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell* **1**(2), 291-302.
- Zhi, Y., Sciabica, K. S., and Sandri-Goldin, R. M. (1999). Self-interaction of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27. *Virology* **257**(2), 341-51.
- Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Le Good, J. A., Whelan, R. D., Kelly, J. J., Frech, M., Hemmings, B. A., and Parker, P. J. (1999). Rapamycin-sensitive phosphorylation of PKC on a carboxy-terminal site by an atypical PKC complex. *Curr Biol* **9**(10), 522-9.
- zur Hausen, H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **92**(9), 690-8.

6. Anhang

6.1. Plasmidkonstruktion und Klonierung von PKC η -Mutanten

6.1.1. Klonierung von PKC η cDNA

Unter Verwendung des SMARTTM PCR cDNA Synthese KIT (Becton Dickinson, Heidelberg) wurde aus einer mRNA-Präparation von humanem Plazentagewebe eine cDNA-Bibliothek hergestellt. Die cDNA für PKC η konnte durch zwei unabhängige PCR Reaktionen mit überlappenden Primern amplifiziert werden. Die für den N- Terminus kodierende Sequenz für PKC η wurde durch PCR-Reaktion mit den Primern: A: 5'-ATGTCGTCTGGCACCATGAA GTTCAATGGCTATTTGAGGGTCCG-3', und B: 5'-CCACAGTTAGGGGCCACGTTGCTTGACATCGAATA TGCA-3' gewonnen, die C-terminale Hälfte des Gens hingegen mit den Primern C: 5'-TGCATATTCGATGTCAAGCGAACGTGGCCCCTAACTGTGG-3' und D: 5'-CTATGGTTGCAATTCTGGAGACACATAGGAAAAGTTTCTA-3'. Die Primer A, B, C und D waren entsprechend der Genbanksequenz NM_006255 für hPKC η ausgewählt worden. Beide PCR-Fragmente wurden anschließend aufgrund der überlappenden Sequenzen der Primer B und C in einer einzigen PCR-Reaktion kombiniert, wobei unter Benutzung der Primer A und D das Gen für hPKC η vollständig generiert werden konnte. Hernach wurde das PCR-Produkt in den pCR-2.1 Vektor (siehe 6.2./C, Abb. 50) ligiert. Diese Arbeiten wurden von Dr. Nüesch (DKFZ) ausgeführt.

6.1.2. PKC η -Varianten

Aminosäurespezifische Mutanten von PKC η wurden durch chimäre PCR des cDNA-Klons von hPKC η mit den N- und C- terminalen Primern 5'-CGGGCCCCGGGATATGTCGTCTGGCACCATGAAG-3' und 5'-GGCGCGCGGCCCGCCTATGGTTGCAATTCTGGAGAC-3' zusammen mit zwei, die Mutationsstellen enthaltenden, Primern hergestellt. Zur Generierung der Mutanten wurden folgende komplementären und teilweise überlappenden Primer eingesetzt: für **PKC η A160E** (Alanin der Pseudosubstratregion wird gegen Glutaminsäure ausgetauscht): 5'-CAGGAAGCGCCAAAGGG**GA**ATGCGAAGGCGAGTCCACC-3' und 5'-GGACTCGCCTTCGCAT**TTCC**CTTTGGCGCTTCTGGTA-3', für **PKC η T512A** (Threonin der PDK-1 Phosphorylierungsstelle wird durch Alanin ersetzt) 5'-GTCACCACGGCCGCATTCTGTGGCACGCCAGAC-3' und 5'-GGCGTGCCACAGAATGCGGCCGTGGTGACACCATTG-3'. Diese Mutanten wurden in den pCR-2.1 Vektor (Abb. 50; Invitrogen, Groningen NL) subkloniert und anschließend als *Sma*I - *Not*I Fragmente in den Expressionsvektor pP38Flag (Abb. 52; siehe 6.2./E) transferiert. Darüber hinaus wurde in

einer einzelnen PCR-Reaktion mit den Primern 5'-CGG GCCCGGGATATGTCGTC TGGCACCATGAAG-3' und 5'-TACGTCTAGATATCTTACCCCACAGTTAGGGGCC ACGTT-3' eine Deletionsmutante **PKC η -DN** hergestellt, die lediglich für die regulatorische Domäne (AS 1 bis 296) kodiert. Auch diese Mutante wurde in den Vektor pCR-2.1 subkloniert, jedoch danach als *SmaI* - *XbaI* Fragment in den mit den gleichen Enzymen verdauten Expressionsvektor pP38-*Flag* transferiert (Abb. 52). Durch die Wahl der Primer ergab sich bei dieser Mutante eine C-terminale Verlängerung um folgende Aminosäuren: RYLELLHMHVHFSGKEN. Alle Mutanten wurden auf die Richtigkeit ihrer Sequenz überprüft. Alle PKC η -Mutanten wurden ebenfalls als N-terminale Fusionsproteine mit dem *Myc*-Epitop kloniert. Dazu wurde in einer PCR-Reaktion neben den spezifischen C-terminalen Primern der Mutanten (siehe oben) ein weiterer Primer verwendet, der im Anschluß an eine *SmaI* Restriktionsstelle die Sequenz für das *Myc*-Epitop enthält: CCCGGGATGGAACAAAACACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATATGTCGTCTG GCACCATGAAGTTC. So konnten alle *Myc*-PKC η -Mutanten ebenfalls als *SmaI*, *NotI* bzw. *SmaI*, *XbaI* Fragmente in den entsprechenden Expressionsvektor kloniert werden.

6.2. Expressionsvektoren

A) *pTM-His*: Das in Abb. 49 A gezeigte Plasmid pTM-His ist ein Derivat von pTM-1 und erlaubt die Expression von N-terminal [His]₆-fusionierten Proteinen mittels Vaccinia Viren. Um Fremdgene einzuführen, wurden PCR- Reaktionen durchgeführt, die am N- und C-Terminus des entsprechenden Gens mit der multiplen Klonierungsstelle des Vektors kompatible Restriktionsschnittstellen generieren. Die N-terminale Restriktionsschnittstelle wurde dabei so gewählt, daß die inserierten cDNA-Sequenzen von PKC oder NS1 im selben Leserahmen zum [His]₆-Motiv lagen. Alle PCR-Reaktionen wurden entsprechend den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen mit dem *Advantage HF PCR amplification KIT* (Bekton Dickinson) durchgeführt und die entsprechenden Produkte in den pCR-2.1-Vektor (Invitrogen) subkloniert (Abb. 50). Zur Generierung des [His]₆-hPKC η -Fusionsproteins wurde eine PCR-Reaktion mit den Primern 5'-TACGGATATCCATGGCGTCTGGCACC ATGAAGTTCAATG-3' und 5'-TACGTCTAGATATCCTATGGTTGCAATTCTGGAG ACACA-3' durchgeführt. Das Fragment wurde anschließend in den Vektor pCR-2.1 subkloniert und zum Transfer in den Expressionsvektor durch *NcoI* - *EcoRV* Verdau exzisiert. Hiernach erfolgte die Insertion des Fragments in den *NcoI* und *SmaI* restringierten dephosphorylierten pTM-His Vektor.

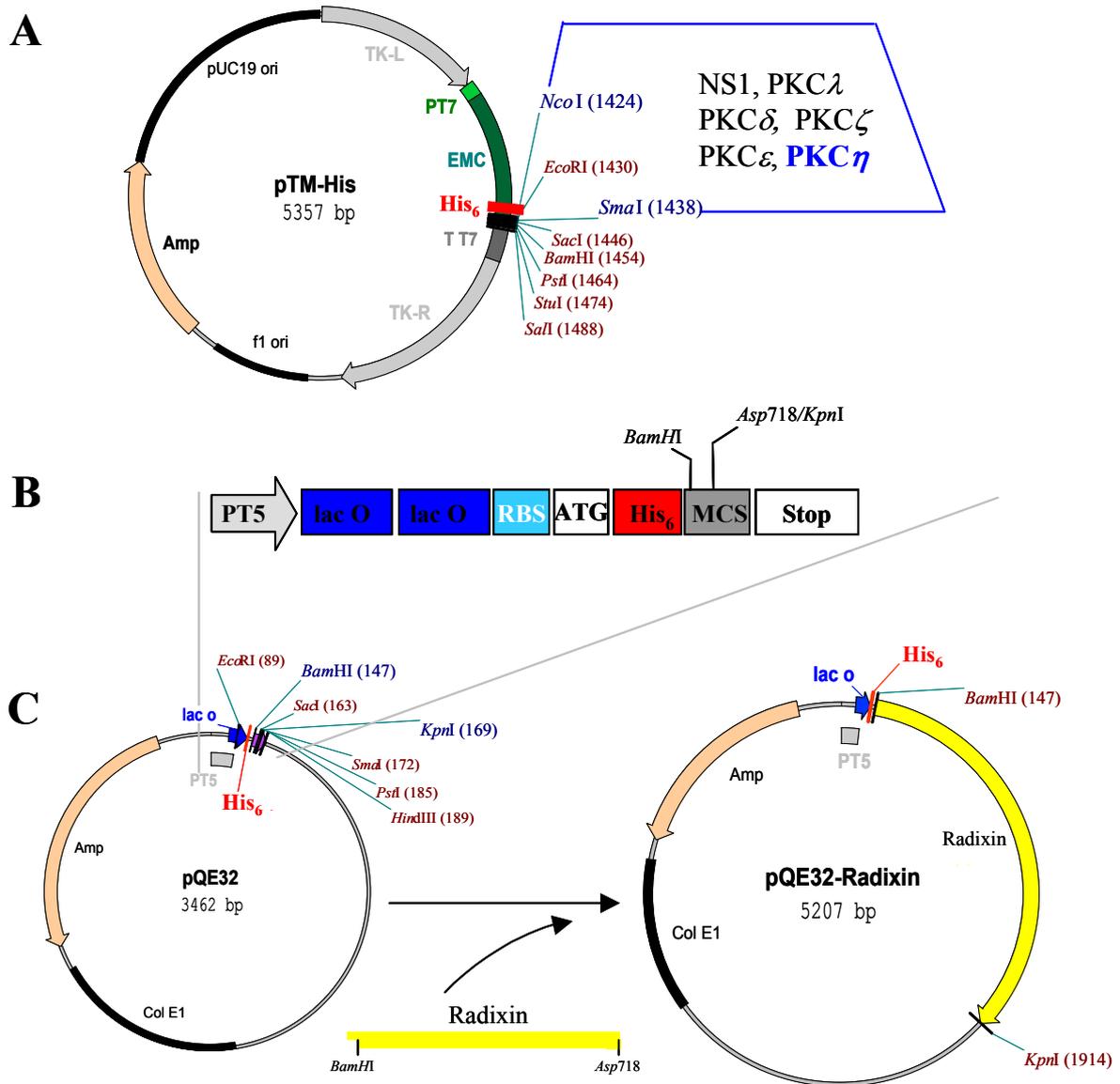


Abb. 49: Darstellung von Expressionsvektoren für $[\text{His}]_6$ Fusionsproteine. A) Zirkuläre Darstellung von **pTM-His**. Vaccinia Virus Vektor mit multipler Klonierungsstelle (MCS) zur Klonierung von Genen in den Leserahmen des N-terminalen $[\text{His}]_6$ Motivs. Die Expression erfolgte über den Bakteriophagen T7 Promoter, wobei die Translation zusätzlich durch die EMCV Leadersequenz *cap*-unabhängig verstärkt wird. Die flankierenden Thymidinkinase-Gensequenzen (TK) dienen zur homologen Rekombination ins Vaccinia – Virusgenom (190 kb), was zu einem Verlust der Thymidinkinaseaktivität führt. Dies ermöglicht die Selektion rekombinanter Vaccinia Viren durch BrdU Inkorporation. B) **Insertionsregion des pQE32 Vektors mit Motivangabe.** Ähnlich wie bei pTM-His erfolgt auch hier die *in frame* Klonierung von Fremdsequenzen über eine MCS am C-Terminus des $[\text{His}]_6$ Motivs. Die Expression der Fremdsequenz wird durch den T5 Promoter (PT5) und das Lac Operon (*lac O*) gesteuert. Im Gegensatz zu Eukaryonten ist für die bakterielle Expression die Distanz des Startcodons zur Shine-Dalgarno-Sequenz kritisch. C) **Zirkuläre Darstellung des bakteriellen Expressionsvektors pQE32.** Beispielhaft zur Herstellung von $[\text{His}]_6$ Fusionsproteinen mit pQE32 ist hier die Insertion von Radixin gezeigt, daß als *BamHI*, *Asp718* PCR-Fragment in den *BamHI*, *KpnI* verdauten Vektors ligiert wurde. RBS: ribosomale Bindungsstelle, Col E1- Replikationsorigin, Amp- Ampicillin Resistenzgen.

B) *pQE32*: Der Vektor pQE32 (Abb. 49 B,C) wurde zur bakteriellen Expression von [His]₆-Fusionsproteinen verwendet. Der der [His]₆-kodierenden Sequenz nachfolgende Polylinker mit Restriktionsschnittstellen für *EcoRI*, *BamHI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *PstI* oder *HindIII* ermöglicht das Einfügen von Fremdsequenzen im gleichen Leserahmen zur His-Sequenz. So wurde ein in pCR-2.1 zwischenkloniertes Radixin PCR-Produkt (Primer: 5'-GCGCGGATCCCCATGGCGAAGCCAATCAATGT-3' und 5'-GGCCGGTACCTCACATGGCTTCAAACATCATCG-3') mit *BamHI* und *Asp718* exzisiert und in den *BamHI* – *KpnI* verdauten dephosphorylierten pQE32-Vektor ligiert. Die Expression des Fusionsproteins [His]₆-Radixin sowie der [His]₆-PKC-Fusionsproteine erfolgte unter Kontrolle des Lac-Operons.

C) *pCR-2.1*: Dieses Plasmid (Invitrogen) erlaubt das direkte Einfügen aufgrund eines terminalen überhängenden Adenosins an den 3'-Enden neu generierter PCR-Produkte ohne vorherigen Restriktionsverdau. Die Insertionsregion liegt in einer multiplen Klonierungsstelle und wird von zwei *EcoRI* Schnittstellen flankiert (Abb. 50). Plasmide mit aufgenommener Fremdsequenz können durch Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden. Im Anschluß an sämtliche, im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten PCR-Reaktionen, erfolgte die Subklonierung der generierten Fragmente in pCR-2.1 und die nachfolgende Exzision der Gene mit den gewünschten Restriktionsenzymen. Darüber hinaus wurden die Vektoren pCR-2.1hPKC η A160E, pCR-2.1hPKC η T512A und pCR-2.1hPKC η DN als Basis für *in vitro* Transkriptions-/ Translationsreaktionen eingesetzt.

D) *DsRedN1-Flag*: In die multiple Klonierungsstelle des DsRedN1-Plasmids wurde nach *NheI* und *HindIII* Verdau ein hybridisiertes doppelsträngiges Oligonukleotid eingeführt, welches für das *Flag*-Epitop (MADYKDDDDKA) kodiert (siehe Abb. 51). An die für das *Flag*-Epitop-kodierende Sequenz schließt sich ein Polylinker mit zahlreichen Restriktionsschnittstellen an, wie *HindIII*, *EcoRI*, *Sall*, *AccI*, *KpnI*, *SacII*, *ApaI*, *SmaI*, der das Klonieren von PKC-Genen im gleichen Leserahmen zum N-terminalen Epitop erlaubt. An diesen Polylinker (inserierte Sequenz: 5'-GCTAATGGCTGACTACAAGGACGACGATGACAAGGCCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGAT-3') wurde durch *BamHI* und *NotI* Verdau des Plasmids die kodierende Sequenz für PKC λ (PCR Primer: 5'-CGCGGGATCCAATGATAACACACTTTGAGC-3' und 5'-GTAAGAATGCGGCCGCCCTCGAGTCAGACACACTCTTCTGCAG-3') eingefügt. Um das *Flag*-Fusionsprotein auch unter Kontrolle des pP38-Promotors exprimieren zu können, wurde die entsprechende Sequenz als *Eco47III* - *NotI* Fragment exzisiert und in den *HpaI* und *NotI* verdauten pP38-Vektor eingefügt.

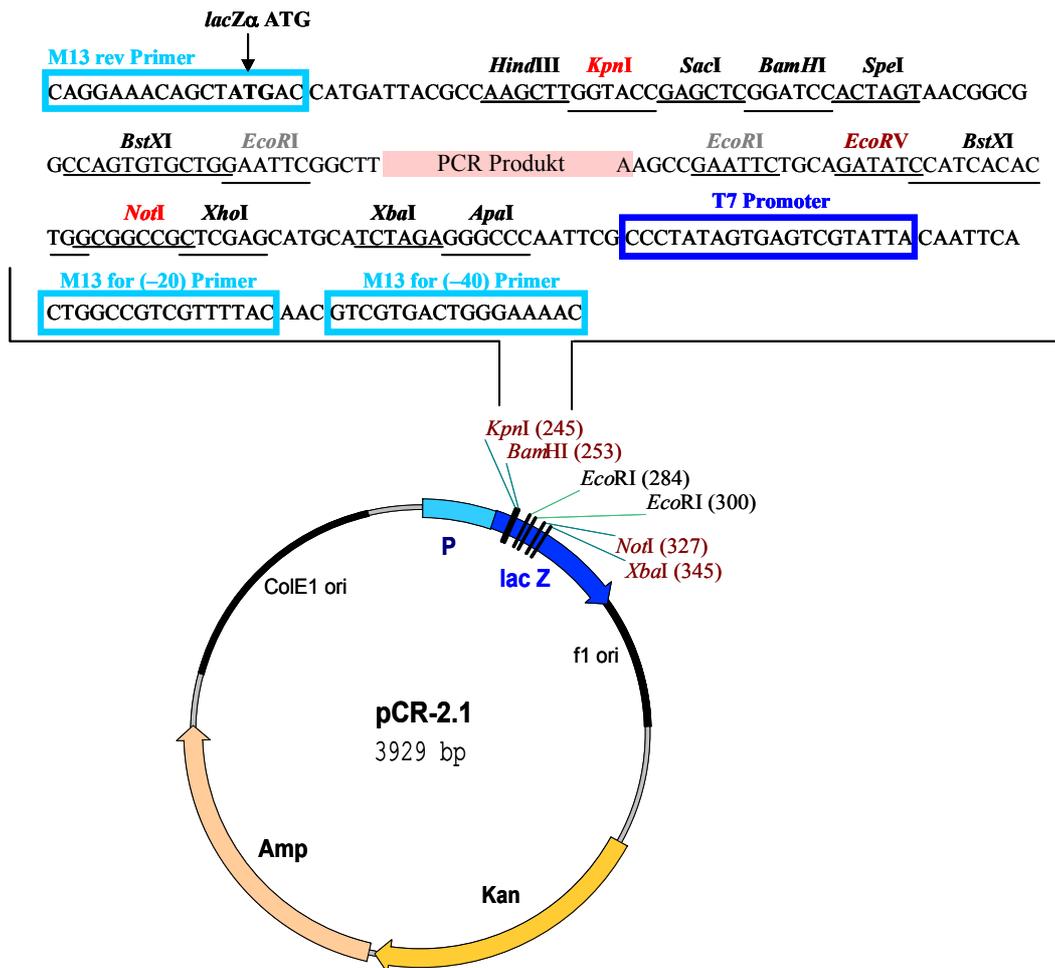


Abb. 50: Darstellung des Clontech Vektors pCR-2.1 und Detailausschnitt der multiplen Klonierungsstelle (MCS) mit Angabe der wichtigsten Restriktionsschnittstellen und M13 Primerbindungssequenzen. Alle PCR Produkte besitzen nach Amplifikation mit der Taq-Polymerase ein überhängendes Adenosin. Die Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert und hinter den 3' T-Überhang der Vektorsequenz in die MCS ligiert (rosa). Nach Transformation in *E. coli* (Top10F') erfolgte ein Blau-Weiß *Screening* nach Kolonien, die Vektoren mit einem inserierten PCR Produkt aufgenommen hatten (Verlust der LacZ Expression). Die Präsenz des Inserts wurde durch die flankierenden *EcoRI* (grau) Schnittstellen bestätigt und durch weitere spezifische Restriktionsverdau auch auf die Orientierung im Vektor überprüft. Der Transfer von PKC η in den pTM-His Vektor erfolgte als *NcoI* (am 5'-Ende des PCR-Produktes) und *EcoRV* (violett) Fragment in den *NcoI* – *StuI* verdauten dephosphorylierten Vektor. Alternativ dazu wurde die PKC η kodierende Sequenz (oder der Mutanten η A160E, η T512A) als *SmaI* – *NoI* Fragment in den ebenso geschnittenen pP38Flag Vektor transferiert. Die Klonierung der Deletionsmutante η DN in pP38Flag erfolgte als *SmaI*, *XbaI* Fragment. Zur Herstellung von pP38FlagRadixin wurde das korrekt orientierte Radixin PCR-Produkt durch *KpnI*, *NoI* (rot) exzisiert. Zur Überprüfung inserierter Gene wurden genspezifische oder M13 Universalprimer (hellblau) zur Sequenzierung benutzt. Darüberhinaus wurden pCR-2.1 Klone zur *in vitro* Transkription/Translation von PKC η Mutanten unter Verwendung des T7 Promoters (dunkelblaues Kästchen) eingesetzt.

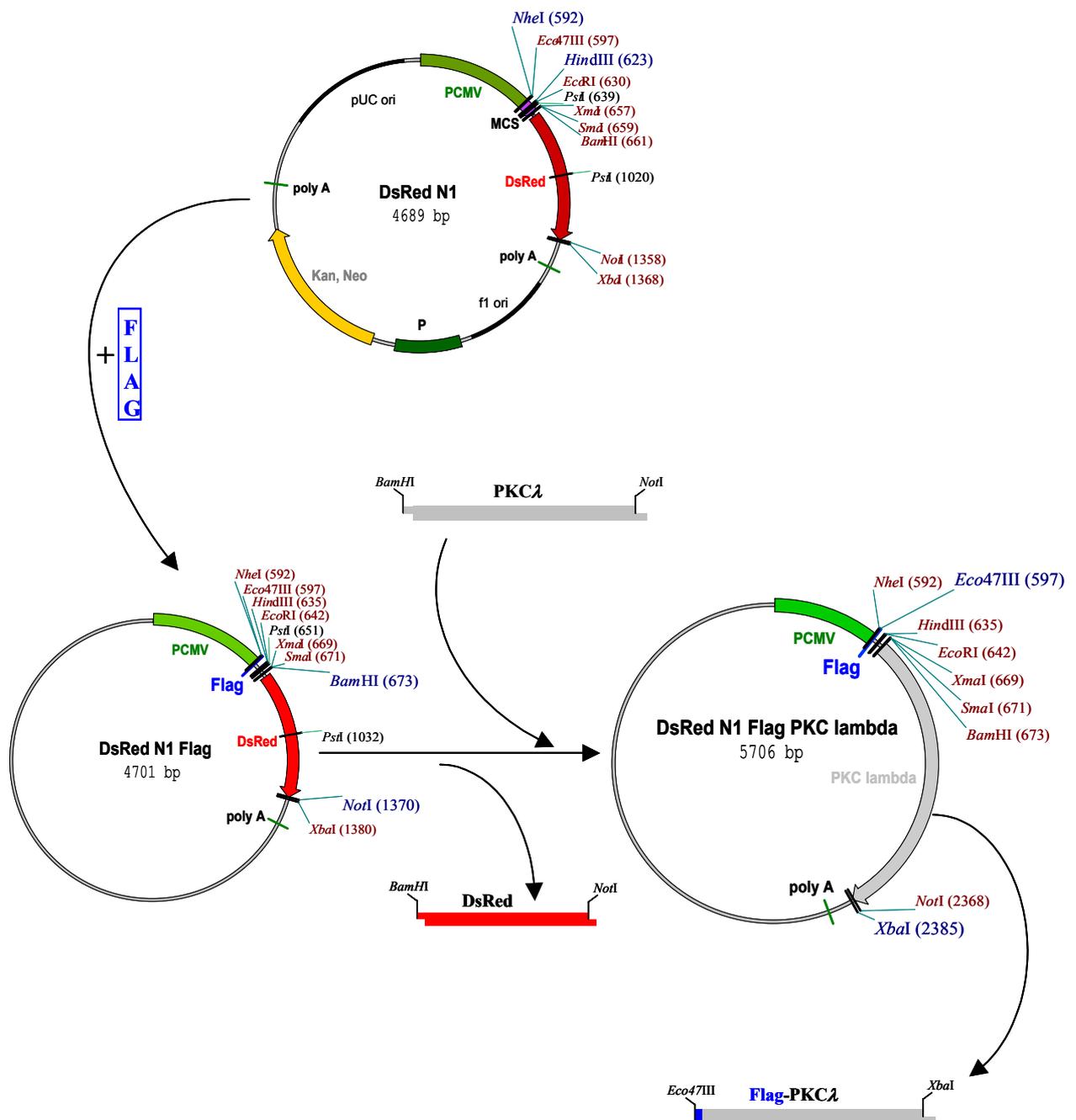


Abb. 51: Zirkuläre Darstellung des DsRed N1 Plasmids und Klonierungsstrategie zur Herstellung einer Flag-PKC λ Expressionskassette. In den Polylinker des DsRed N1 wurde nach *NheI* und *HindIII* Verdau ein doppelsträngiges Oligonukleotid, kodierend für das Flag Epitop, eingesetzt, wobei die flankierenden Restriktionsschnittstellen erhalten blieben (neuer Vektor: DsRed N1 Flag). Im nächsten Schritt wurde das DsRed Gen durch *BamHI*, *NotI* Verdau exzisiert und mit einem entsprechenden Fragment kodierend für PKC λ ausgetauscht. Da das Flag Epitop im selben Leserahmen wie PKC λ (unter Kontrolle des starken CMV Promoters) exprimiert wird, konnte die entsprechende Sequenz mit *Eco47III* und *XbaI* als Kassette herausgeschnitten und in den pP38 Expressionsvektor transferiert werden.

E) *pP38*: Das Plasmid, pdBMVMp-1200, welches durch partielle Deletion der Kapsidproteingene und Insertion eines Polylinkers bei ~ 2800 bp konstruiert wurde, diente als Ausgangsvektor zur Generierung von pP38 (siehe Abb. 52). Durch Deletion des *PmeI* - *PvuII* Fragments aus pdBMVMp-1200 wurde der parvovirale P4-Promotor sowie ein großer Teil der NS1- und NS2-kodierenden Sequenz entfernt. Das resultierende Plasmid pP38 erlaubt so die Expression inserierter Gene unter Kontrolle des von NS1 transaktivierten späten parvoviralen P38-Promotors. Anschließend erfolgte die Insertion der *Flag*-PKC λ kodierenden Sequenz aus DsRedN1*Flag*PKC λ als *Eco47III*-*XbaI* Fragment in den *HpaI*, *XbaI* restringierten dephosphorylierten Vektor pP38. Das entstandene Plasmid wurde demnach als pP38*Flag*PKC λ bezeichnet. Durch Restriktion mit den Enzymen *SmaI* und *NotI* konnte das PKC λ -Gen zum Beispiel mit den kodierenden Sequenzen der PKC η -Volllänge-Mutanten aus pCR-2.1 Vektoren ausgetauscht werden. Dadurch konnten die PKC η -Mutanten als Fusionsproteine im gleichen Leserahmen zum *Flag*-Epitop exprimiert werden. (resultierende Plasmide: pP38*Flag*PKC η A160E, pP38*Flag*PKC η T512A). Die Deletionsmutante PKC η DN wurde hingegen als *SmaI* - *XbaI* Fragment in den pP38*Flag*-Expressionsvektor kloniert. Analog erfolgte auch der Austausch mit der kodierenden Sequenz für Radixin (PCR-Primer: 5'-GCGCGGATCCCATGGCGAAGCCAATCAATGTAAGAG-3' und 5'-CCGACGCCGGCGTCACATGGCTTCAAACATCATCGAT-3'), die als *KpnI*, *NotI* Fragment aus pCR-2.1 ausgeschnitten und in den *SmaI*, *NotI* restringierten, dephosphorylierten Vektor pP38*Flag*PKC λ inseriert wurde.

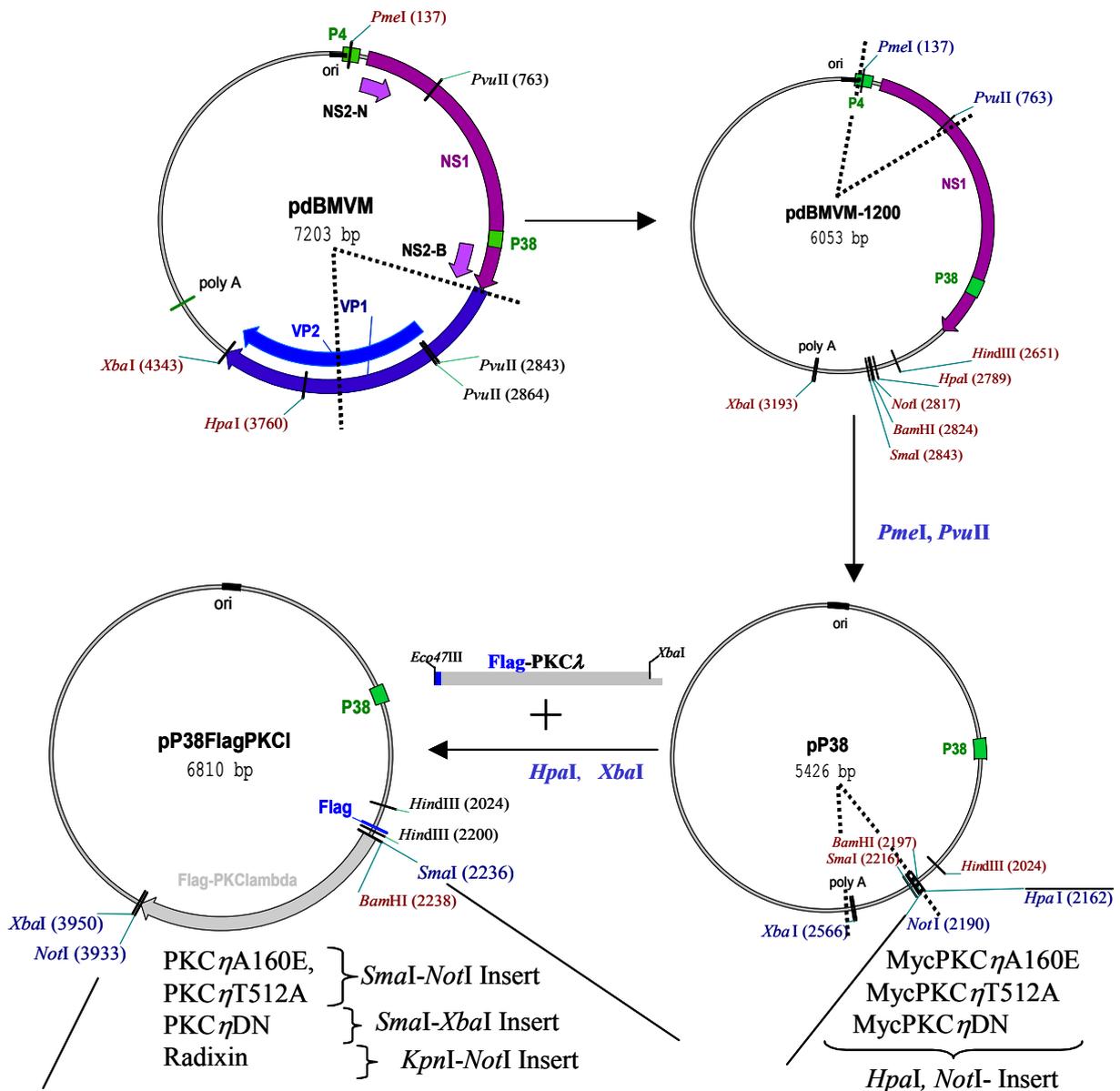


Abb. 52: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte zur Herstellung von pP38Flag-Konstrukten. Als Ausgangsvektor diente der Vektor pdBMVM, der das vollständige parvovirale Genom enthält. Die einzelnen Genregionen sind farbig markiert. Die Promotoren P4 und P38 sind grün dargestellt. Durch Deletion von 1200 bp am N-Terminus der Kapsidgene und Insertion eines Polylinkers wurde pdBMVM-1200 (Kestler *et al.*, 1999) generiert. Die deletierten Sektionen sind jeweils mit gestrichelten Linien angezeigt. Von pdBMVM-1200 wurden nun der P4 Promoter und große Teile der Nichtstrukturproteingene durch *PmeI*, *PvuII* Verdau entfernt. Der verbleibende Vektor wurde als pP38 bezeichnet, da er ausschließlich die Expression von Fremdgenen unter Kontrolle des späten parvoviralen Promoters erlaubt. Durch *HpaI*, *XbaI* Restriktion konnte die FlagPKC λ Expressionskassette aus DsRed eingefügt werden. Der Polylinker zwischen den kodierenden Sequenzen für das Flag Epitop und PKC λ ermöglichte einen leichten Austausch des PKC λ Gens mit PKC η oder Radixin Sequenzen. Die Dabei verwendeten Restriktionsenzyme sind angegeben. Die Myc- markierten Gensequenzen wurden direkt über PCR amplifiziert und via Blunt-end, *NotI* Restriktion in den *HpaI*, *NotI* verdauten pP38-Vektor eingefügt.

Die selbständige und eigenhändige Anfertigung der Dissertation versichere ich an Eides Statt.
Alle verwendeten Hilfsmittel habe ich vollständig angegeben.

Heidelberg, den 27. Mai 2003

(Sylvie Lachmann)