



HPI



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Analysen zur Interaktion zwischen dem adenoviralen DNA-Bindeprotein (E2A) und den PML-Isoformen I bis VI

Bachelorthesis

im Studiengang Biotechnologie

Fakultät Life Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

vorgelegt von

Dorsa Farhadnia

Matrikelnummer XXXXXXXXXX

Hamburg, den 07. Februar 2018

- | | | |
|---------------|-------------------------|---------------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Stephan Noll | (HAW Hamburg) |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Thomas Dobner | (Heinrich-Pette-Institut) |

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor für „virale Transformation“ des Heinrich-Pette-Instituts.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung	IX
1. Einleitung.....	1
1.1. Adenoviren.....	1
1.1.1. Klassifizierung und Pathogenese	1
1.1.2. Aufbau und Genomstruktur	2
1.1.3. Replikationszyklus.....	4
1.1.4. Adenovirale Replikation	5
1.2. Das DNA-Bindeprotein E2A	7
1.2.1. Funktionen von E2A im adenoviralen Replikationszyklus	8
1.3. PML NB.....	9
1.3.1. PML Protein.....	10
1.3.2. Auswirkungen der adenoviralen Infektion auf die PML NBs	11
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit.....	12
2. Material.....	13
2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	13
2.2. Zelllinien	16
2.2.1. Bakterienstamm	16
2.2.2. Eukaryotische Zelllinien	16
2.3. Nährmedien und Zusätze	17
2.4. Adenoviren.....	17
2.5. Antikörper	18
2.5.1. Primärantikörper	18
2.5.2. Sekundärantikörper.....	18
2.6. Kommerzielle Reagenzsysteme und Standards.....	18
2.7. Chemikalien.....	19
2.8. Software und Datenbanken.....	19
3. Methoden	20
3.1. Zellbiologische Methoden.....	20
3.1.1. Kultivierung und Passagieren von adhärenen Säugetierzellen	20
3.1.2. Einfrieren und Auftauen von Säugetierzellen.....	21
3.1.3. Bestimmung der Zellzahl und Zelleinsaat	21
3.1.4. Zellernte adhärenter Zellen	22
3.1.5. Agaroseimmobilisierung von adhärenen Zellen für das LCI.....	22
3.2. Molekularbiologische Methoden	23
3.2.1. Herstellung von Zelllysaten	23
3.2.2. Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration.....	23
3.2.3. Ko-Immunpräzipitation.....	24
3.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
3.2.5. Western Blot	27
3.2.6. Immunfärbung und Chemilumineszenzdetektion	28
3.3. Virologische Methode	29

3.3.1.	Infektion mit Adenovirus.....	29
3.4.	Mikroskopische Methode.....	29
3.4.1.	Live Cell Imaging.....	29
4.	Ergebnisse.....	30
4.1.	<i>Live Cell Imaging</i> Aufnahmen zur Analyse der Interaktion zwischen E2A und den PML-Isoformen I bis VI.....	30
4.1.1.	Morphologie und Lokalisation von E2A.....	32
4.1.2.	Morphologie und Lokalisation von PML NBs.....	33
4.1.3.	Ko-Lokalisation von E2A und PML NBs.....	36
4.2.	Untersuchung der E2A Interaktion mit den PML-Isoformen I bis VI mittels Ko-Immunpräzipitation.....	38
4.2.1.	Ko-Immunpräzipitation mit Bindungsrichtung EYFP-PML → E2A.....	38
4.2.2.	Ko-Immunpräzipitation mit Bindungsrichtung E2A → EYFP-PML.....	40
4.3.	Ko-Lokalisation von E2A und PML NBs in HepaRG_EYFP-PML IV.....	42
5.	Diskussion.....	45
5.1.	<i>Live Cell Imaging</i> von HAdV-5 infizierten PML-Isoformen I bis VI exprimierenden HepaRG Zellen.....	45
5.1.1.	Auswirkung der HAdV-5 Infektion auf die PML NBs der einzelnen PML-Isoformen I bis VI.....	45
5.2.	Das DNA-Bindeprotein E2A interagiert mit PML I und PML IV.....	46
5.3.	Optimierung der Methoden zur zukünftigen Untersuchung der E2A - PML Interaktion.....	48
	Literaturverzeichnis.....	IX
	Danksagung.....	XVI
	Eidesstaatliche Erklärung.....	XVII
	Anhang.....	XVIII

Abkürzungsverzeichnis

AdV	Adenovirus
AdV-Pol	Adenovirale DNA-Polymerase
APS	Ammoniumpresulfat
BSA	Bovine Serum Albumin
CAR	Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DAXX	Death Domain-associated Protein 6
dCMP	Cytosin-Nukleosidmonophosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM ⁻	DMEM ohne FKS
DMEM ₀	DMEM ohne Zusätze
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelsträngige DNA
ECL	Enhanced-Chemilumineszent-Substrat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
H ₂ O _{dd}	Doppelt destilliertes und autoklaviertes Wasser
HAdV	Humanes Adenovirus
HCl	Hydrogenchlorid
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus Typ 1
IgG _H	Heavy-Chain Immunglobulin G
ITR	Invertierte terminale Repetitionen
K _m	Michaeliskonstante
LCI	Live Cell Imaging
MLP	Major Late Promoter
MOI	Multiplicity of Infection
NB	Nuclear Body
ND10	Nuclear Domain 10
NES	Kernexportsignal

Abkürzungsverzeichnis

NF I	Nuclear Factor I
NPC	Nuclear Pore Complex Protein
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
ORI	Replikationsursprung
p.i.	Post Infection
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	PBS-Tween
PML	Promyelocytic Leukemia Protein
PML OD	PML Oncogenic Domain
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	PML Oncogenic Domain
pTP	Precursor Terminal Protein
RC	Replikationszentrum, Replication Center
RING	Really Interesting New Gene
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RIPA _p	RIPA-Puffer zusätzlich der Proteaseinhibitoren
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDCLM	Spinning Disk Confocal Laser Microscopy
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA	Small Hairpin RNA
SP100	Speckled Protein of 100 kDa
ssDNA	Einzelsträngige DNA
SUMO	Small Ubiquitin-related Modifier
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGS	Tris-Glycin-SDS
TP	Terminales Protein
TRIM19	Tripartite Motif 19
wt	Wildtyp

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: GERÄTELISTE	13
TABELLE 2: LISTE DER VERBRAUCHSMATERIALIEN UND –LÖSUNGEN	15
TABELLE 3: VERWENDETER BAKTERIENSTAMM	16
TABELLE 4: VERWENDETE EUKARYOTISCHE ZELLINIEN	16
TABELLE 5: NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE	17
TABELLE 6: VERWENDETE ADENOVIREN	17
TABELLE 7: VERWENDETE PRIMÄRANTIKÖRPER	18
TABELLE 8: VERWENDETE SEKUNDÄRANTIKÖRPER	18
TABELLE 9: VERWENDETE KOMMERZIELLE REAGENZSYSTEME UND STANDARDS	18
TABELLE 10: SOFTWARE UND DATENBANKEN	19
TABELLE 11: MEDIUMVOLUMEN (V(MEDIUM)) DER JEWEILIGEN KULTIVIERUNGSGEFÄßE 20	
TABELLE 12: ZUSAMMENSETZUNG PBS	21
TABELLE 13: PUFFERZUSAMMENSTELLUNG VON RIPA-PUFFER UND RIPA_p	23
TABELLE 14: ZUSAMMENSETZUNGEN DER SDS-PAGE-GELE UND DEREN PUFFER	27
TABELLE 15: ZUSAMMENSETZUNG DES TOWBIN-BLOTPUFFERS FÜR DEN WESTERN BLOT 28	
TABELLE 16: ZUSAMMENSETZUNG DER PUFFER FÜR DIE IMMUNFÄRBUNG	29

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER STRUKTUR EINES ADENOVIRUS.....	3
ABBILDUNG 2: GENOMORGANISATION DES HAdV-5	4
ABBILDUNG 3: ADENOVIRALE DNA REPLIKATION	6
ABBILDUNG 4: TERTIÄRSTRUKTUR DES ADENOVIRALEN DNA-BINDEPROTEINS E2A.....	8
ABBILDUNG 5: ORGANISATION DER EXONS IN DEN PML-ISOFORMEN I BIS VI	11
ABBILDUNG 6: LCI-AUFNAHMEN DER E2A UND PML NBS LOKALISATION IN HAdV-5_mCHERRY INFIZIERTEN HEPARG_EYFP-PML I BIS VI (A BIS F) UND HEPARG_SHPML (G) IM ÜBERBLICK.....	32
ABBILDUNG 7: LCI-AUFNAHMEN DER AUSBILDUNG VON REPLIKATIONSZENTREN IN HEPARG_EYFP-PML III, IV UND VI.....	33
ABBILDUNG 8: LCI-AUFNAHMEN VON HAdV-5_mCHERRY INFIZIERTEN HEPARG_EYFP-PML I UND II IM ZEITLICHEN VERLAUF NACH DER INFEKTION	36
ABBILDUNG 9: LCI-AUFNAHMEN DER E2A BINDUNG AN PML I IN HEPARG_EYFP-PML I NACH HAdV-5_mCHERRY INFEKTION	37
ABBILDUNG 10: KO-IMMUNPRÄZIPITATION ZWISCHEN PML-ISOFORMEN I BIS VI UND E2A MIT BINDUNGSRICHTUNG EYFP → E2A	40
ABBILDUNG 11: KO-IMMUNPRÄZIPITATION ZWISCHEN PML-ISOFORMEN I BIS VI UND E2A MIT BINDUNGSRICHTUNG E2A → EYFP	42
ABBILDUNG 12: LCI-AUFNAHMEN DER E2A BINDUNG AN PML IV IN HEPARG_EYFP-PML IV NACH HAdV-5_mCHERRY INFEKTION	44
ABBILDUNG 13: LCI-AUFNAHMEN DER E2A UND PML NBS IN HAdV-5_mCHERRY INFIZIERTEN HEPARG_EYFP-PML I	XVIII
ABBILDUNG 14: LCI-AUFNAHMEN DER E2A UND PML NBS IN HAdV-5_mCHERRY INFIZIERTEN HEPARG_EYFP-PML II.....	XIX
ABBILDUNG 15: LCI-AUFNAHMEN DER E2A UND PML NBS IN HAdV-5_mCHERRY INFIZIERTEN HEPARG_EYFP-PML III	XX
ABBILDUNG 16: LCI-AUFNAHMEN DER E2A UND PML NBS IN HAdV-5_mCHERRY INFIZIERTEN HEPARG_EYFP-PML IV	XXI
ABBILDUNG 17: LCI-AUFNAHMEN DER E2A UND PML NBS IN HAdV-5_mCHERRY INFIZIERTEN HEPARG_EYFP-PML V	XXII
ABBILDUNG 18: LCI-AUFNAHMEN DER E2A UND PML NBS IN HAdV-5_mCHERRY INFIZIERTEN HEPARG_EYFP-PML VI	XXIII

**ABBILDUNG 19: LCI-AUFNAHMEN DER E2A UND PML NBS IN HAdV-5_mCHERRY
INFIZIERTEN HEPARG_shPML XXIV**

Zusammenfassung

Das humane Adenovirus wurde seit seiner Entdeckung intensiv erforscht und dient seitdem als Modellsystem für andere Viren. Als unbehülltes Virus mit einem linearen, doppelsträngigen DNA-Genom wird dessen Einsatz seit längerer Zeit in der Gentherapie diskutiert sowie dessen Rolle in der adeno-assoziierten Zelltransformation. Durch die Erforschung der DNA-Replikation können u.a. neue Lösungsansätze für die Tumorthherapie und antivirale Wirkstoffe entwickelt werden. Das adenovirale DNA-Bindeprotein E2A ist an der Replikation der DNA während des lytischen Infektionszyklus beteiligt. Es kann mit weiteren E2A Molekülen zu einem großen Proteinkomplex multimerisieren. Während der Replikation bindet E2A an den freiwerdenden DNA-Strang und schützt diesen vor Degradation [1].

PML *Nuclear Bodies* (NBs) sind zellkern-assoziierte Multiproteinkomplexe, die neben den drei konstitutiven Proteinen PML, SP100 und DAXX noch viele weitere funktionelle Proteine beinhalten. Diese spielen eine zentrale Rolle in dem antiviralen Abwehrmechanismus, dem proteasomalen Abbau und der Apoptose der Zelle. Daher dienen sie für einige virale regulatorische Proteine als Angriffspunkt während des produktiven Infektionszyklus. Überraschenderweise wurde jedoch mehrmals die räumliche Anlagerung des viralen DNA-Genoms an die PML NBs beobachtet [2]–[4].

PML lässt sich in sechs nuklearen Isoformen I bis VI untergliedern, die abgesehen von ihren Strukturabweichungen unterschiedliche Funktionen besitzen. Zur Identifizierung der genauen PML isoformabhängigen Interaktionen zwischen den PML NBs und des adenoviralen DNA-Genoms über das DNA-Bindeprotein E2A, wurden Ko-Immunpräzipitationsversuche durchgeführt und mittels *Live Cell Imaging* Aufnahmen die Ko-Lokalisation beobachtet in mit Adenovirus infizierten Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine mögliche Interaktion zwischen E2A und den PML-Isoformen I und IV vorliegt. Möglicherweise sind die Bindungsstellen der PML-Isoformen I und IV in dem gemeinsamen Exon 8a kodiert.

1. Einleitung

1.1. Adenoviren

Die Entdeckung des humanen Adenovirus (HAdV) erfolgte durch deren Isolation aus adenoidem Gewebe und Tonsillenzellen einer an Atemwegsinfektion erkrankten Person und gleichzeitigem Nachweis des zytopathischen Effekts 1953 von den Virologen Wallace P. Rowe und Robert J. Huebner [5], [6]. Seitdem wurden anhand des HAdV viele neue Erkenntnisse im Bereich der viralen Strukturen, Genexpression und -organisation in eukaryotischen Zellen gewonnen. Beispielsweise wurde das RNA-Spleißen durch Infektionsexperimenten am humanen Adenovirus 2 (HAdV-2) entdeckt, bei dem die in der späten Phase der Infektion vorkommende mRNA ausschließlich aus mosaikartigen Sequenzen (Exons) der mRNA-Transkripte aus der frühen Phase der Infektion besteht [7], [8]. Sobald die onkogene Eigenschaft vom HAdV-12 in infizierten immunsupprimierten Nagetieren nachgewiesen wurde, nahmen die Untersuchungen, trotz der nicht auftretenden Tumorgenese in deren jeweiligen Wirtsklassen zu, um mehr Erkenntnisse im Bereich der viralen Transformation zu gewinnen [9]. Aufgrund der hohen Stabilität des Adenovirus (AdV) und der besonders effizienten Transduktion von DNA, erlangte das AdV eine große Bedeutung als viralen Vektor in der Gentherapie, u.a. als transportierende Vakzinieren, sogenannte „*vaccine vectors*“ [10], [11]. Zudem steigt dessen Bedeutung in der Krebstherapieforschung durch die Modifikation zu onkolytischen Viren, bei denen die Replikation in normalen Zellen blockiert ist, während in Tumorzellen der Zelltod induziert wird [12]. HAdV-5 und HAdV-2 sind die am besten untersuchten AdV und eignen sich deshalb nicht nur als virales Experimentalsystem, sondern haben sich im Laufe der Zeit auch zum Modellsystem für andere Viren etabliert.

1.1.1. Klassifizierung und Pathogenese

Das AdV gehört der Familie *Adenoviridae* an, in weitere fünf Gattungen unterteilt ist: *Mastadenoviren* infizieren Säugetiere, *Aviadenoviren* infizieren Vögel, *Atadenoviren* infizieren Reptilien, *Siadenoviren* infizieren Amphibien und *Ichtadenoviren* infizieren Fische [13]. Bisher sind über 70 HAdV-Serotypen bekannt, die in sieben Spezies der *Mastadenoviren* A – G untergliedert werden [14]–[17].

Die Mehrheit der HAdV-Typen sind weltweit in der Bevölkerung verbreitet und führen zur Antikörperausbildung bei ca. 90% der über 6-Jährigen [18]. Die Infektion kann über mehrere Jahre im menschlichen Körper persistieren, bis es zum Ausbruch kommt. Dabei ist meist der

Einleitung

respiratorische Trakt sowie der Gastrointestinaltrakt betroffen. In immunkompetenten Erwachsenen verläuft die Infektion häufig mild, während Kinder öfter unter den miteinhergehenden Krankheitsbeschwerden leiden. Aufgrund der großen genetischen Vielfalt der HAdV, welche mit einem hohen Grad an Zelltropismus einhergeht, ist die Infektion verschiedener Zelltypen möglich [16]. So kann je nach HAdV-Typ eine Infektion ein akutes respiratorisches Syndrom, Pharyngitis, Keratokonjunktivitis epidemica, Gastroenteritis, Enzephalitis, Pneumonien und hämorrhagische Zystitis verursachen [19], [20]. Lebensbedrohlich, mit einer erhöhten Sterberate von 5%, kann eine HAdV-Infektion hauptsächlich bei immunsupprimierten Kindern, die kürzlich eine Organ- oder Stammzelltransplantation erhalten haben, werden [19]. Eine therapeutische Behandlung einer HAdV-Infektion ist bisher nicht möglich und präventive Maßnahmen durch Schutzimpfungen gegen den Typen HAdV-4 und HAdV-7 werden nur vom Militär ergriffen [16].

1.1.2. Aufbau und Genomstruktur

Das HAdV-5 ist ein unbehülltes Virus mit einer geometrischen Struktur eines Ikosaeders und einem Durchmesser von 80 – 110 nm [21]. Das Kapsid besteht aus 252 Kapsomere, die sich aus 240 Hexonen zusammensetzen an deren 12 Eckpunkten jeweils ein Penton positioniert ist. Das Penton ist ein Proteinkomplex aus einer Pentonbasis und einer antennenartig herausragenden Fiber. Diese Fortsätze können eine Länge von 9 – 77,5 nm betragen und weisen knaufähnliche Strukturen an ihren Enden auf, welche die rezeptorvermittelte Endozytose auf der Zelloberfläche der Wirtszelle einleiten [22]. Die kompakte Zusammenlagerung der Hexonen zum Kapsid verleiht dem adenoviralen Partikel seine besondere Stabilität, die durch die Anlagerung weiterer Proteine von außen (Protein IIIa, IX) und innen (Protein V, VI, VIII) ebenfalls stabilisiert wird [23]. Im Kapsidinneren komplexieren die Core-Proteine V, VII und Mu mit der DNA zu einem Nukleoproteinkomplex und ermöglichen eine dichte Verpackung des Genoms, wobei hauptsächlich das Protein VII für die Kondensation der DNA verantwortlich ist [24].

Einleitung

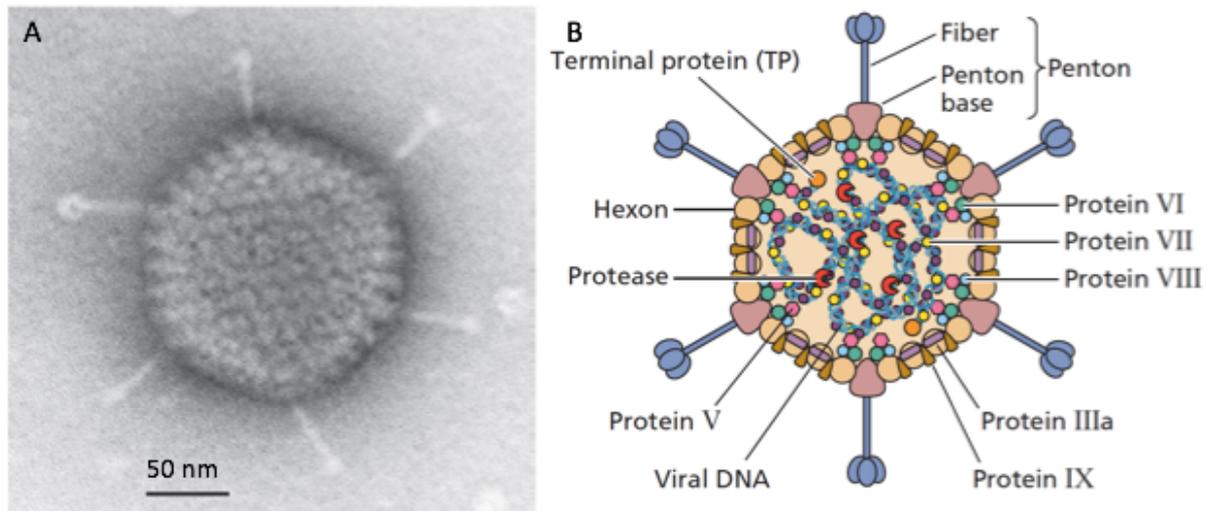


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur eines Adenovirus

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines HAdV-5 Viruspartikels. (B) Querschnitt eines HAdV-5 mit Spezifizierung der an der Kapsidzusammensetzung beteiligten Proteine sowie DNA-assoziierten Proteine [25].

Das Genom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA (dsDNA) mit einer Länge von 34 – 37 kBp [16]. Jeweils am 3'-Ende der DNA befindet sich eine 36 – 200 Bp lange invertierte terminale Sequenzwiederholung (ITR), die den Replikationsursprung darstellt [14]. Ebenfalls charakteristisch ist das terminale Protein (TP) jeweils am 5'-Terminus des Genoms. Das TP fungiert als Primer in der viralen DNA-Replikation [16]. Das Genom kodiert auf beiden DNA-Strängen insgesamt 40 Proteine. Die mRNA wird durch alternatives Spleißen prozessiert. Die Transkriptionseinheiten teilen sich auf in die frühen Gene (*early genes*) E1 – E4, die zur viralen Replikation benötigt werden und gleichzeitig die antivirale Reaktion der Wirtszelle herunterregulieren, und den späten Genen (*late genes*) L1 – L4, die für strukturelle Proteine zur Virionproduktion kodieren [14].

Einleitung

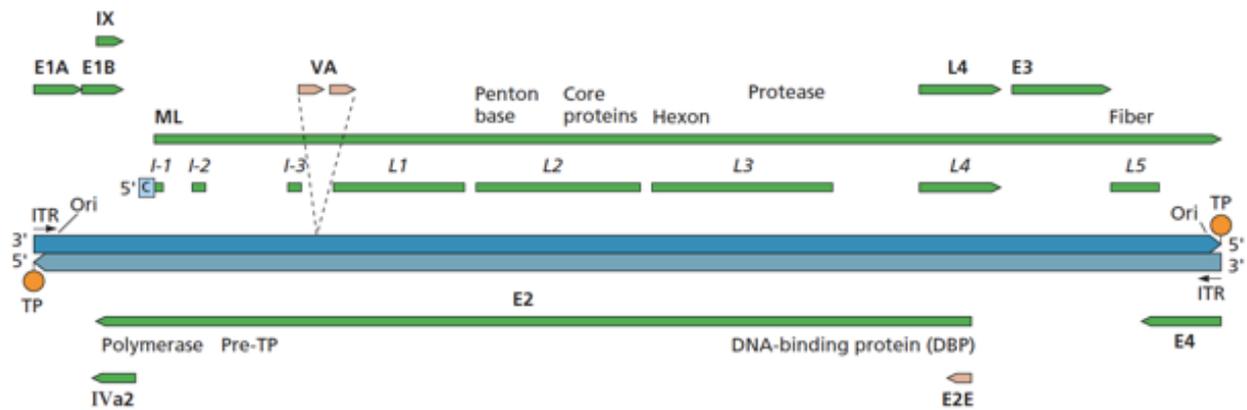


Abbildung 2: Genomorganisation des HAdV-5

Die lineare, dsDNA ist als blauer Balken mit den jeweiligen ITR, dem TP und Replikationsursprung (Ori) an beiden Enden dargestellt. Die grünen, sowie beige Pfeile mit der fettgedruckten Beschriftung sind die nach der Transkription vorliegenden mRNA-Primärtranskripte. Diese umfassen die späten Gene und das frühe Gen E2. Die proteinkodierenden Sequenzen der späten Gene (*major late*; ML) und des frühen Gens E2 sind ebenfalls angegeben. Die kursive Beschriftung kennzeichnet die prozessierte mRNA der ML-Gene nach dem RNA Spleißen. E: *early* (früh); ITR: *inverted terminal repeat* (invertierte Sequenzwiederholung); L: *late* (spät); ML: *major late promoter* (später Promotor); VA: Virus-assoziierte RNA [26].

1.1.3. Replikationszyklus

Die Übertragung der HAdV verläuft meist über eine Tröpfcheninfektion, wodurch die Viren über den respiratorischen Trakt in den Organismus gelangen. Das Virus wird über eine rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen [27]. Hierbei bindet das knaufähnliche Ende der Fiber mit sehr hoher Affinität an das Transmembranprotein Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) [28], [29]. Zusätzlich assoziiert die Pentonbasis mit dem Vitronektin-bindenden $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrinrezeptor und initiiert die Endozytose durch die Einstülpung des Virus in die Clathrin-umhüllten Endosomen [23], [27], [30]. Daraufhin bewirkt das Ansäuern des Endosomens die partielle Disassemblierung des Kapsids, infolgedessen verschiedene strukturelle Proteine (u.a. Protein VI) freigesetzt werden [31]. Das nun ungebundene virale Strukturprotein VI reduziert den pH-Wert im Endosomen und bewirkt die Lyse der Endosomenmembran, wonach das teilweise disassemblierte Kapsid in das Zytoplasma entlassen wird [32], [33]. Das virale Strukturprotein Hexon bindet an Dynein und wird über den Mikrotubulus-assoziierten Transportmechanismus zum Nukleus befördert. Das postendosomale Kapsid bindet schließlich an den Proteinkomplex der Kernporen (*nuclear pore complex*; NPC) und die mit dem viralen Protein VII assoziierte DNA wird in das Zellkerninnere importiert [32], [34], [35].

Der adenovirale Replikationszyklus gliedert sich in eine frühe (*early phase*) und späte Infektionsphase (*late phase*). In der frühen Phase findet die Transkription der frühen Gene (*early genes*) statt, die sich wiederum in die *immediate early genes* (E1) und *early genes* (E2 –

Einleitung

E4) unterteilen lassen. Die späten Gene (*late genes*) L1 – L5 benötigen nur einen Promoter (*major late promoter*; MLP) und kodieren für Strukturproteine [36]. Die Transkription des als erstes zu exprimierenden E1A-Gens findet mit Hilfe der zellulären RNA Polymerase II im Nukleus statt [37]. Dessen Transkriptionsprodukt wird in das Zytoplasma exportiert, wo die Translation zweier alternativ gespleißten mRNAs zu zwei E1A-Proteinen mit unterschiedlicher Länge (285 Aminosäuren und 243 Aminosäuren bei HAdV-5) stattfindet. Das 285 Aminosäuren große E1A-Protein besitzt eine transkriptionelle Transaktivatorfunktion und schafft eine optimale Umgebung für die virale Replikation [38], [39]. Humane Adenoviren infizieren bevorzugt ruhende Epithelzellen, die durch die Einwirkung von E1A in die S-Phase des Zellzyklus übergehen, in welcher die DNA-Synthese stattfinden kann [40]. Zudem wird die antivirale Reaktion der Wirtszelle durch E1A herunterreguliert und durch dessen Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, wird die Transkription der frühen Gene E2 – E4 gefördert. Das frühe E2-Gen kodiert für Proteine der viralen Genomreplikation, der sogenannten adenoviralen DNA-Polymerase (AdV-Pol), *precursor Terminal Protein* (pTP) und das DNA-Bindeprotein E2A [41]. Mit der viralen Replikation beginnt die späte Infektionsphase, in welcher die virale Genomreplikation, Kapsidassemblierung und Freisetzung der im Nukleus zusammengebauten Virionen durch Zelllyse stattfindet [20].

1.1.4. Adenovirale Replikation

Der adenovirale Replikationsmechanismus zeichnet sich durch eine mittels Protein-Primer initiierte semikonservative Replikation mit der damit einhergehenden Strangverdrängung aus [23]. Die Hauptakteure der DNA-Synthese sind die drei viralen Proteine pTP, AdV-Pol und E2A, welche von dem frühen E2-Gen kodiert werden. Durch das Zusammenspiel mit den zellulären Transkriptionsfaktoren *Nuclear Factor I* (NF I) und Oct-1 kann eine effiziente Initiation gewährleistet werden. Während NF I spezifisch AdV-Pol bindet [42], geht Oct-1 eine spezifische Bindung mit pTP ein [43], woraus die Formierung des stabilen Heterodimers pTP-AdV-Pol resultiert [44]. Im ersten Schritt der Replikation wird ein Cytosin-Nukleosidmonophosphat (dCMP) kovalent an einen Serinrest des Proteins pTP durch die AdV-Pol gebunden, das nun als Protein-Primer der DNA-Synthese fungiert. Das dCMP des pTP-AdV-Pol-Heterodimers bindet an dem vierten Nukleotid der ITRs des Matrizenstranges und synthetisiert bis zum sechsten Nukleotid unter Entstehung einer Replikationsgabel. Es bildet sich ein pTP-CAT-Komplex, das durch den „*jumping back*“-Mechanismus zurück an die ersten drei Nukleotide gleitet und den Beginn der Elongation markiert [45]. Sobald die AdV-Pol bis zu sieben Nukleotide synthetisiert hat, bewirkt die entstandene Nukleotidsequenz eine Konformationsänderung des pTPs, welche die Dissoziation der AdV-Pol vom pTP bewirkt

1.2. Das DNA-Bindeprotein E2A

Das in der frühen Infektionsphase transkribierte E2-Gen des HAdV-5 kodiert u.a. das DNA-Bindeprotein E2A, welches regulatorische Funktionen in der viralen DNA-Replikation besitzt. Das Molekulargewicht von E2A beträgt 59,139 kDa, wobei es bei der Gelelektrophorese (3.3.4.) das Mobilitätsverhalten eines 72 kDa großen Proteins aufweist. Die Aminosäuresequenz von E2A weist eine Länge von 529 Aminosäuren auf. Diese teilt sich auf in den phosphorylierten N-terminalen Bereich (1 – 173 Aminosäuren) und den C-Terminus (174 – 529 Aminosäuren), welche hochkonserviert vorliegt und die meisten modulatorischen Funktionen des Proteins ausübt. Besonders charakteristisch ist die am Ende des C-Terminus (510 – 529 Aminosäuren) gelegene hakenförmige Sekundärstruktur, die sich in einen hydrophoben Spalt eines weiteren E2A-Molekül verankert und durch Multimerisierung zur Formation eines kettenartigen Multiproteinkomplexes, den sogenannten Replikationszentren (*Replication Center*; RC) führt. E2A kann in verschiedenen morphologischen Konformationen auftreten. Dies ist auf einen bestimmten C-terminalen Bereich (512 – 515 Aminosäuren) (*hinge region*) zurückzuführen, der dem hakenförmigen C-Terminus eine gewisse Flexibilität in der Ausführung rotierender Kreisbewegungen verleiht und die Multimerisierung begünstigt. Basierend auf der hochaffinen Bindung eines E2A-Moleküls an bis zu 15 Nukleotide ist E2A zur sequenzunspezifischen Assoziation an eine ssDNA sowie RNA befähigt [47], [48]. Im Gegensatz zur stabilen Bindung an ssDNA, wird dsDNA nur an den Enden gebunden und weist somit eine minder stabile Bindung auf [49], [50]. Die Interaktion beruht auf einen oberflächlichen Kontakt zwischen dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der ssDNA und dem positiv geladenen dreisträngigen β -Faltblatt von E2A [1].

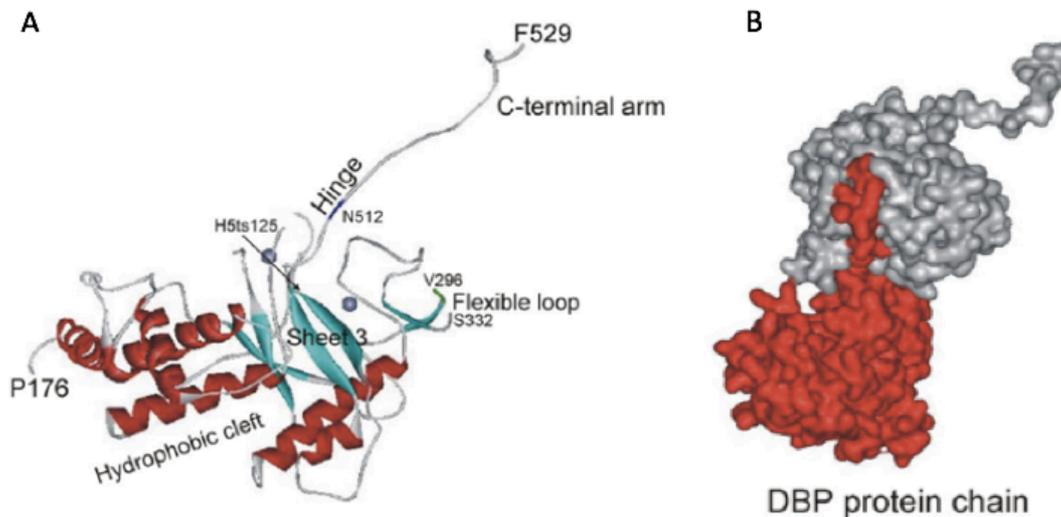


Abbildung 4: Tertiärstruktur des adenoviralen DNA-Bindeproteins E2A

(A) Kristallstruktur von E2A bestehend aus sieben α -Helices (rot), drei β -Faltblätter (grün) und zwei Zinkatome (graue Kreise). Zudem ist der herausragende, C-terminale Haken sichtbar, der durch die Bindung an den hydrophoben Spalt eines anderen E2A-Moleküls dieses binden kann. (B) Darstellung der Kristallstruktur von E2A, zusammengesetzt aus einer N-terminalen (rot) und einer C-terminalen (grau) Domäne [1].

1.2.1. Funktionen von E2A im adenoviralen Replikationszyklus

E2A besitzt vielfältige Funktionen. So dient es als Transkriptionsregulator für den Wechsel der Transkription von frühen zu späten Genen [20]. Zudem wirkt es in der Assemblierung der viralen Partikel, der Rekombination, sowie der Ermittlung des Wirtstropismus mit [46], [51]. Eine wesentliche Funktion spielt E2A jedoch bei der Initiation und Elongation während der semikonservativen DNA-Replikation. Die Elongation der viralen dsDNA erfolgt nur mit Hilfe von E2A. Dabei erhöht es die Geschwindigkeit und Prozessivität der AdV-Pol sowie die Widerstandsfähigkeit gegen Inhibitoren [52], [53]. Die bedeutendste Funktion von E2A ist jedoch dessen Fähigkeit die dsDNA zu entwinden und für die DNA-Synthese zugänglich zu machen. Dieser Adenosintriphosphat-unabhängige Prozess verläuft ohne Einsatz einer Helikase in Zusammenarbeit mit der Topoisomerase 1, welche die Superspiralisierung der DNA aufhebt [42], [54], [55]. Eine Anlagerung der E2A-Proteinkette an die ssDNA verhindert die Ausbildung einer Sekundärstruktur und die Renaturierung der DNA [55]. Durch diese tiefeingreifende Konformationsänderung wird die effiziente DNA-Synthese sichergestellt und gleichzeitig wird die DNA vor Nukleasen geschützt [1]. Dieser Prozess ist auf die Multimerisierung der E2A-Moleküle zu E2A-Proteinketten zurückzuführen, welche wiederum durch die hohe Flexibilität des C-terminalen Hakens bedingt ist. Denn eine Reduktion der Flexibilität führt zum Zerfall der E2A-Proteinkette zu Monomeren und bewirkt das Ausbleiben der Entwindung sowie Elongation [56], [57]. Somit ist die Multimerisierung der E2A-Moleküle für eine erfolgreiche Elongation notwendig. In der Initiation besitzt E2A eine stabilisierende

Einleitung

Wirkung auf den pTP-AdV-Pol-Komplex, da E2A die AdV-Pol vor einer thermalen Inaktivierung bewahrt [53]. Zudem kann die spezifische Bindung von NF I an die Bindungsstelle in der ITR gesteigert werden, durch die Senkung der Michaeliskonstante (K_m) bei der Assoziation von pTP-CAT-Komplex an die Sequenzwiederholung [58]. Daraus resultiert eine hocheffiziente NF I - Oct 1-abhängige Rekrutierung des pTP-AdV-Pol-Komplexes an die korrekte Bindungsstelle der ssDNA, aufgrund der stimulierten NF I-ssDNA-Bindung [59], [60]. Bei Deletion der hakenförmigen Aminosäuresequenz am C-Terminus wurde festgestellt, dass trotz ausbleibender Elongation die stimulierenden Einflüsse von E2A auf die Prozesse der Initiation noch vorhanden sind [1]. Schlussfolgernd scheint nicht nur die Form, sondern auch die Flexibilität des C-terminalen Endes von E2A die Multimerisierung zu ermöglichen, welche zwar eine Bedingung für die DNA-Synthese während der Elongation, aber nicht für die Initiation darstellt.

1.3. PML NB

Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies (PML NBs) sind auch bekannt unter der Bezeichnung *Nuclear Domain 10* (ND10) oder *PML Oncogenic Domain* (PML OD) und treten als Multiproteinkomplexe in punktförmigen Strukturen auf. Bis zu 15 NBs sind in der nuklearen Matrix lokalisiert, deren kugelförmige Morphologie einen Durchmesser von 0,2 – 1,0 μm besitzt [61]. Dabei bilden die PML NBs in Abhängigkeit von dem Zelltyp, der Phase des Zellzyklus und den zellulären Stresszuständen, variierende Morphologien aus [62]–[64]. Nichtsdestotrotz besitzen alle NBs eine elektronendichte äußere Hülle und bilden einen inneren Hohlkörper aus. Aufgrund dessen dynamischen Beschaffenheit, ist das Rekrutieren und Deponieren einer Vielzahl an Proteinen möglich. Bisher sind 166 in den PML NBs befindende Proteine bekannt, deren Zusammenstellung durch Transformation, Stress, Interferonkonzentration und virale Infektion beeinflusst wird [65]. Zusätzlich assoziieren die drei sogenannten interferonregulierten *prototype* Proteine *Promyelocytic Leukemia Protein* (PML), *Speckled Protein of 100 kDa* (SP100) und *Death Domain-associated Protein 6* (DAXX) permanent mit den PML NBs [66]. Dabei spielen PML und SP100 eine fundamentale Rolle in der Formation der NBs und sind hierfür unentbehrlich [61]. PML NBs sind in verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt wie in der Seneszenz, der Apoptose, dem proteasomalen Abbau und dem antiviralen Abwehrmechanismus [67]–[70]. Somit scheinen PML NBs eine unterstützende Funktion in dem zellulären Abwehrmechanismus zu haben.

1.3.1. PML Protein

Die Entdeckung des Tumorsuppressorproteins PML erfolgte in dem Zusammenhang mit der Promyelozytenleukämie, welche durch eine reziproke Translokation mittels Zusammenlagerung des Retinsäurerezeptor- α mit dem PML-Gen verursacht wird [71]. Zwischen Exon 1 und 3 am N-terminalen Ende des Proteins liegen eine *Really Interesting New Gene* (RING)-Zinkfinger Domäne, zwei RING-ähnliche Strukturen (R), zwei B-Box Zinkfinger-Domänen (B) und eine superspiralisierende α -Helices-Domäne (CC) [72]. Diese bilden zusammen das RBCC/TRIM Motiv, das die Zugehörigkeit von PML, auch *Tripartite Motif 19* (TRIM19) genannt, an die Familie der TRIM-Proteine begründet. Durch das alternative Spleißen resultieren aus dem PML-Gen bisher zwölf bekannte humane PML Isoformen, von denen PML-Isoform I bis VI in der nuklearen Matrix lokalisiert sind. Alle PML Isoformen weisen einen identischen N-Terminus auf, während sie sich am C-terminalen Ende unterscheiden. Die unterschiedlichen Funktionen sind somit auf den variablen Teil der Aminosäuresequenz zurückzuführen [73]. Desweiteren werden die PML Proteine posttranslationalen Modifikationen unterzogen, dazu zählen die Phosphorylierung, die Markierung von Proteinen mit dem *Small Ubiquitin-related Modifier* (SUMO) Protein mittels der SUMOylierung, Ubiquitin-Markierungen durch die Ubiquitinierung und die Acetylierung [62], [74]. Die Ausbildung der PML NBs basiert auf die Dimerisierung von PML Proteinen zwischen ihren RBCC-Motiven und bilden nach Multimerisierung einen NB, welcher durch PML SUMOylierung zu einem dynamischen PML NB heranreift. Somit ist PML ein essentieller Baustein für die Bildung der PML NBs und gleichzeitig für die Rekrutierung und Konzentrierung der Partnerproteine im Inneren des PML NBs verantwortlich [61].

Einleitung

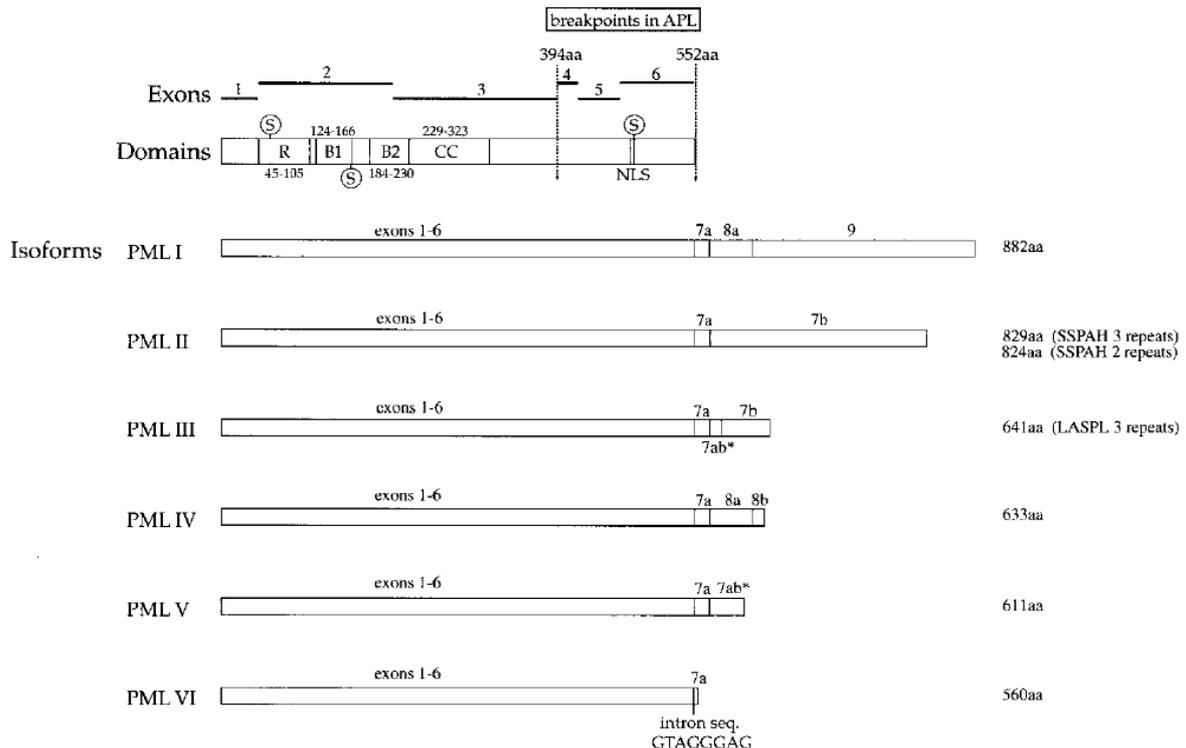


Abbildung 5: Organisation der Exons in den PML-Isoformen I bis VI

Darstellung der Strukturdomänen in dem PML Protein, sowie die Assemblierung der Exons in den PML-Isoformen I bis VI resultierend aus dem alternativen Spleißen der Primär-mRNA während der Reifung [73].

1.3.2. Auswirkungen der adenoviralen Infektion auf die PML NBs

Die Gene vieler DNA-Viren, wie das HAdV, Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) humane Cytomegalovirus und Epstein-Barr Virus, und deren Replikationszentren (RC), sind während der frühen Infektionsphase dicht an die PML NBs lokalisiert [2]–[4]. Beispielsweise führt das virale Protein ICP0 von HSV-1 zur vollständigen Auflösung der PML NBs [75]. Während der viralen Infektion mit dem HAdV-5 konnte bereits festgestellt werden, dass die PML NBs in Interaktion mit einigen frühen viralen Genen treten [2]. Das frühe adenovirale Protein E1A hat durch die spezifische Bindung an PML II einen positiven Effekt auf die Transaktivierung der viralen Genexpression [76]. Das transkribierte frühe adenovirale Gen E4 resultiert in sieben multifunktionelle Proteine, von denen E4orf3 eine besondere strukturelle Deformation der PML NBs bewirkt. Das in der frühen Infektionsphase translatierte virale Protein bindet spezifisch an PML II und verursacht die Verformung der rundlichen PML NBs zu faserartigen Strukturen (*tracks*) und verhindert somit die PML NB Bildung [77], [78]. Im Zuge der morphologischen Modifikation durch E4orf3 wird die PML-abhängige Interferon-induzierte antivirale Abwehrreaktion der PML NBs blockiert [79]. Außerdem wird die Rückbildung der PML NBs aus den faserartigen Strukturen zu der kugelförmigen Gestalt durch das in der späten Infektionsphase auftretende Strukturprotein pIX verhindert [80].

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Im Hinblick auf die bereits entdeckten Interaktionen zwischen den PML NBs und den adenoviralen Proteinen während einer HAdV-5 Infektion, soll die Beziehung von dem viralen DNA-Bindeprotein E2A zu den zellulären PML NBs untersucht werden. Hierfür wurden zunächst mittels Ko-Immunpräzipitation Protein-Protein-Bindungsstudien zwischen E2A und den einzelnen im Nukleus vorkommenden PML-Isoformen I bis VI mittels der Ko-Immunpräzipitationsmethode untersucht.

Zudem wurden E2A und die jeweiligen PML Isoformen auf eine Ko-Lokalisation durch *Live Cell Imaging* (LCI) Aufnahmen im dreidimensionalen Raum analysiert und die PML NBs auf eine veränderte Morphologie, Anzahl und Verteilung während der adenoviralen Infektion untersucht.

Material

2. Material

2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Geräteliste

Material

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Begasungsbrutschrank	BBD 6220	Heraeus Holding GmbH
Blotkammer	Trans-Blot [®] Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories Inc.
Filmentwickler	GBX Developer	Kodak
Gefrierschrank		Liebherr
Gelelektrophoresekammer	Multigel System Biometra	Analytik Jena AG
Hybridisationsofen	HB-1000	UVP Laboratory Products
Inkubationsschüttler	Innova 4330	New Brunswick Scientific Co.
Inkubations-/Inaktivierungsbad	1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Kühlzentrifuge	5417 R	Eppendorf AG
LCI Fluoreszenzmikroskop	Spinning Disk Confocal Fluorescence Microscope	Andor, Nikon
Lichtmikroskop	Leica DMIL	Leica
Schüttler	Vortex 1	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Stromquelle der Gelelektrophoresekammer	PowerPac [™] Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc.
Taumelschüttler	3011	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Thermomixer	comfort	Eppendorf AG
Tischzentrifuge	Prism Mini Centrifuge	BioLab
Überkopfschüttelapparat	Reagenzglasrotator 3025	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Ultraschallhomogenisator	Branson Sonifier [®] S-450 A	Branson
Wasserbad		
Western Blot-Blotkammer	Trans-Blot [®] Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories Inc.
Zählkammer	Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. AG
Zentrifuge	Multifuge 3S-R	Heraeus Holding GmbH

Material

Tabelle 2: Liste der Verbrauchsmaterialien und –lösungen

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
1 mL, 1,8 mL Kryoröhrchen	CryoPure	Sarstedt AG & Co.
1,5 mL, 2,0 mL Reaktionsgefäß	SafeSeal	Sarstedt AG & Co.
100 mm, 150 mm Zellkulturplatte, Polystyrol		Sarstedt AG & Co.
15 mL, 50 mL Zentrifugenröhrchen	Schraubröhre	Sarstedt AG & Co.
35 mm Zellkulturplatte	µ-Dish 35 mm, high	Ibidi®
DMSO	Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich
Fibronektin		Sigma-Aldrich
Filterpapier	Blotterpapier	VWR
Gefrierbehälter	Mr. Frosty™	Nalgene®
Halbmikroküvetten		Sarstedt AG & Co.
Nitrocellulosemembran	Amersham Protran 0,45 µm NC	GE Healthcare
Pansorbin® Zellen	Pansorbin® Cells	Merck KGaA
Photospektrometer	NanoDrop Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Pipetten	PIPETMAN Classic	Gilson Inc.
Pipettenspitzen	BioSphere	Sarstedt AG & Co.
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu	Integra Biosciences AG
Protein A-Sepharose® - Beads	Protein A-Sepharose® CL-4B from <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich
Röntgenfilme	RP New Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive	CEA
Spektrometer	SmartSpec Plus Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories Inc.
Standardmarker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	Thermo Fisher Scientific Inc.
Trypsin/EDTA	Trypsin/EDTA	Pan Biotech GmbH
Zellschaber		Sarstedt AG & Co.

2.2. Zelllinien

2.2.1. Bakterienstamm

Tabelle 3: verwendeter Bakterienstamm

Bezeichnung	Charakteristika
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	supE44, Δ lacU169, (Δ 80dlacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 [81]

2.2.2. Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 4: verwendete eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Charakteristika
HepaRG_shPML	Humane pseudo-primäre Leberzelllinie, isoliert aus einem hepatozellulären Karzinom und mittels shRNA in der PML-kodierenden Sequenz depletiert [82]
HepaRG_EYFP-PML I - VI	HepaRG shPML wurde mit den einzelnen EYFP-getaggen PML-Isoformen I bis VI transduziert, die Expressionslevels der jeweiligen Isoformen entsprechen der endogenen Levels und wurden von Roger D. Everett bereitgestellt [83]

2.3. Nährmedien und Zusätze

Tabelle 5: Nährmedien und Zusätze

Nährmedium/Zusatz	Bezeichnung	Hersteller
Nährmedium (HepaRG)	William's E Medium	Thermo Fisher Scientific Inc.
FKS	FBS Superior	Merck KGaA
Penicillin/Streptomycin	Penicillin-Streptomycin	Pan Biotech GmbH
G418	G 418 Natriumsulfat	Sigma-Aldrich
Hydrokortison		
Insulin	Bovine Insulin	Sigma-Aldrich
Puromycin	Puromycin dihydrochloride	Calbiochem® Merck KGaA
Glutamin	gibco™ GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific Inc.

2.4. Adenoviren

Tabelle 6: verwendete Adenoviren

Bezeichnung	Charakteristika
HAdV-5_wt	Wildtyp (wt) des humanen Adenovirus 5 mit deletierter E3-Region
HAdV-5_mCherry	Wildtyp des humanen Adenovirus 5 mit deletierter E3-Region und mCherry-getagtem E2A-Protein am N-terminalen offenen Leserahmen

2.5. Antikörper

2.5.1. Primärantikörper

Tabelle 7: verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Charakteristika	Hersteller
AC-15	Monoklonaler Mausantikörper gegen β -Aktin gerichtet	Sigma-Aldrich
B6-8	Monoklonaler Mausantikörper gegen HAdV-5 E2A gerichtet	Eigenproduktion
Anti-GFP/EYFP	Polyklonaler Hasenantikörper gegen GFP/EYFP gerichtet	Abcam plc.

2.5.2. Sekundärantikörper

Tabelle 8: verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Charakteristika	Hersteller
HRP-Anti-Mouse IgG	HRP-gekoppelter Antikörper, gerichtet gegen Maus IgG-Antikörper in Schafen	Amersham Life Science
HRP-Anti-Rabbit IgG	HRP-gekoppelter Antikörper, gerichtet gegen Kaninchen IgG-Antikörper in Schafe	Amersham Life Science

2.6. Kommerzielle Reagenzsysteme und Standards

Tabelle 9: verwendete Kommerzielle Reagenzsysteme und Standards

Reagenz/Kit	Bezeichnung	Hersteller
Gelelektrophorese Standard	PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	Thermo Fisher Scientific Inc.
Proteinassay Kit	Bradford Protein Assay	Bio-Rad Laboratories Inc.
Chemilumineszenzkit	SuperSignal® Westpico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc.

2.7. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Agilent Technologies Inc., AppliChem, Biomol GmbH, Enzo Life Science GmbH, InvivoGen, Merck KGaA, New England Biolabs Inc., Roche Diagnostics International AG und Sigma-Aldrich bereitgestellt.

2.8. Software und Datenbanken

Tabelle 10: Software und Datenbanken

Name	Quelle	Anwendung
Illustrator CS2	Adobe	Bildbearbeitung
Photoshop CS5.1	Adobe	Bildbearbeitung
FileMaker Pro 8.5	FileMaker Inc.	Datenbank
ImageJ 1.51d	ImageJ	Bildbearbeitung
PubMed	NCBI	Literaturdatenbank
UniProt		Protein Datenbank
CLC Main Workbench 7.0	CLC Bio	Sequenzenanalyse
NIS Elements	Nikon Corporation	Mikroskop Software zur Aufnahme
NIS Elements Viewer	Nikon Corporation	Mikroskop Software zur Betrachtung

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Kultivierung und Passagieren von adhärennten Säugetierzellen

Die mittels shRNA hergestellte HepaRG-Zelllinie mit runterregulierter Expression der PML-Isoformen I bis VI (HepaRG_shPML) wurde auf Zellkulturplatten (35 mm Zellkulturplatte, ibidi®; 100 mm/150 mm Zellkulturplatte, Sarstedt) in William's Medium E (gibco™) mit 10% (v/v) fetales Kälberserum (FKS, Pan), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/mL Penicillin; 10 mg/mL Streptomycin, Pan), 5 µg/mL bovines Insulin (Sigma-Aldrich), 25% (w/v) Hydrokortison (Sigma-Aldrich), 0,5 µg/mL Puromycin (Calbiochem® Merck) und 200 mM GlutaMAX™ (gibco™) (Kultivierungsmedium) kultiviert. Für die EYFP-getaggten PML-Isoformen I bis VI exprimierenden HepaRG-Zellen (HepaRG_EYFP-PML I–VI) wurde das Kultivierungsmedium verwendet und zusätzlich G418 (100 mg/ml, Sigma-Aldrich) hinzugefügt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus) mit einem CO₂-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%.

Tabelle 11: Mediumvolumen (V(Medium)) der jeweiligen Kultivierungsgefäße

V(Medium)	35 mm Zellkulturplatte	2 mL
	100 mm Zellkulturplatte	7 mL
	150 mm Zellkulturplatte	20 mL

Subkultivierung der HepaRG-Zellen erfolgte bei einer 60%igen Konfluenz. Da diese Zellen bei einer hohen Zelldichte auszdifferenzieren und in den dreidimensionalen Raum zu wachsen [82]. Hierzu wurde zunächst das Medium der auf Zellkulturplatten kultivierten Zellen mit Hilfe einer an einer Vakuumpumpe angeschlossenen Glas-Pasteurpipette abgesaugt. Anschließend folgte ein Waschschrift, bei dem die Zellen mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) abgspült und das überschüssige PBS ebenfalls abgesaugt wurde. Die Zellen wurden dann mit 3 mL 0,025% (v/v) Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Pan) für 3–10 min im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde nach Ermessen das Ablösen der Zellen durch Klopfen an der Platte unterstützt. Durch Zugabe des Kultivierungsmediums wird die Enzymaktivität des Trypsins durch das FKS inhibiert. Die resuspendierten Zellen wurden nach

Methoden

entsprechender Verdünnung mit einer Zelldichte von ca. 10–50% in frischen Kulturgefäßen ausgesät.

Tabelle 12: Zusammensetzung PBS

PBS Phosphate-Buffered Saline	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM
	Na ₂ HPO ₄	4 mM
	KH ₂ PO ₄ (pH 7,0-7,7)	1,5 mM

3.1.2. Einfrieren und Auftauen von Säugetierzellen

Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden diese zunächst von der Kulturplatte abgelöst (3.1.1.) und die resuspendierten Zellen in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) überführt. Die Zellsuspension wurde bei 2.000 rpm für 3 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Multifuge 3S-R, Heraeus) und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das Zellpellet in 2 mL FKS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich), einem Kryoprotektivum, resuspendiert und zügig in die bereits etikettierten Kryo-Röhrchen (Sarstedt) überführt. Diese wurden in dem Gefrierbehälter „Mr. Frosty“ (Nalgene) mit einer Kühlrate von 1 °C/min langsam im Gefrierschrank (Liebherr) bis -80 °C heruntergekühlt und gelagert.

Das Auftauen der Zellproben erfolgte möglichst schnell bei 37 °C im Wasserbad (1003, GFL), damit die Zellen nur für eine geringe Zeit der Toxizität des DMSOs ausgesetzt sind. Die Zellsuspension wurde dann direkt auf eine 150 mm Zellkulturplatte (Sarstedt) mit entsprechendem Kulturmedium gegeben und bei Kultivierungsbedingungen gelagert (3.1.1.).

3.1.3. Bestimmung der Zellzahl und Zelleinsaat

Zur Bestimmung der Zelldichte wurden die abtrypsinierten Zellen mit Kultivierungsmedium in ein 15 mL oder 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Nach angemessener Vermischung der Zellsuspension wurden die Zellen auf einer Neubauer Zählkammer mit 0,1 mm Schichttiefe (Neubauer improved, Paul Marienfeld) unter einem Lichtmikroskop (10x/0.22 Objektiv; Leica DMIL, Leica) ausgezählt. Hierzu wurde die Anzahl der Zellen in allen vier Großquadraten bestimmt und der Mittelwert gebildet. Die Zellkonzentration errechnet sich durch die Multiplikation des bestimmten Mittelwerts mit dem Verdünnungsfaktor und 10⁴. Zur Berechnung der Zelleinsaat wurde die gewünschte Gesamtzellzahl durch die vorhandene Zellkonzentration dividiert, um das aufzugebende Volumen zu berechnen. Dieses berechnete Volumen der Zellsuspension wurde auf die Kultivierungsplatte ausgesät [84].

$$\frac{\text{gewünschte Gesamtzellzahl [Zellen]}}{\text{Zellkonzentration [Zellen/mL]}} = \text{Volumen [mL]}$$

Für das *Live Cell Imaging* (LCI) wurde eine Zellkulturplatte mit einem Durchmesser von 35 mm (ibidi®) zunächst mit 1% (v/v, in PBS) Fibronectin (Sigma-Aldrich) für 45 min bei RT unverschlossen inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und $2,5 \times 10^5$ Zellen in Kultivierungsmedium resuspendiert und auf eine 35 mm Zellkulturplatte (μ -Dish 35 mm, Ibidi®) überführt (3.1.1.).

3.1.4. Zellernte adhärenter Zellen

Nach Infektion (3.3.1.) der adhärenter Zellen und der darauffolgenden Inkubation, wurden diese mittels eines Zellschabers (Sarstedt) von der bewachsenen Fläche des Kulturgefäßes abgeschabt. Die mechanisch abgelösten Zellen wurden anschließend in 15 mL oder 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei 2.000 rpm für 3 min bei RT (Multifuge 3S-R, Heraeus) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen, indem der Puffer auf das Pellet gegeben und bei denselben Bedingungen, wie zuvor beschrieben, zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Zellpellet wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ohne Gefrierschutzmittel eingefroren (Liebherr).

3.1.5. Agaroseimmobilisierung von adhärenter Zellen für das LCI

Um LCI-Aufnahmen einer Zelle über mehrere Stunden zu gewährleisten, ist eine gewisse Immobilisierung der Zellen notwendig, da sie ansonsten aus dem Fokus oder dem Sichtfeld wandern. Hierfür wurde ein 7,7% (w/v, in doppelt destilliertem, autoklaviertem Wasser [$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$]) Agarosegel hergestellt, das bis zur Anwendung bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad gelagert wurde. 24 h nach der Infektion der Zellen (*post infection*; p.i.) (3.3.1.) wurde das Medium abgenommen, das Agarosegel ca. 1:2 in William's Medium E (25% Hydrokortison, 10% PBS, 10% FKS) verdünnt und zügig zur Überschichtung auf die Zellen gegeben. Überschüssiges Gel wurde entnommen und nach Polymerisierung mit 2 mL des Kultivierungsmediums versetzt. Bis zu den mikroskopischen Aufnahmen (3.4.1.), wurden die Zellen bei den zuvor beschriebenen Kultivierungsbedingungen inkubiert.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Herstellung von Zelllysaten

Zur Vorbereitung von Zelllysaten, wurden die geernteten Zellen (3.1.4.) auf Eis aufgetaut bzw. direkt nach dem Ernten auf Eis weiterverarbeitet. Der Lysepuffer setzt sich zusammen aus dem Radioimmunopräzipitationsassay-Puffer (RIPA-Puffer) und den folgenden Proteaseinhibitoren: 1:100 Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; 0,2 mM), 1:1000 Aprotinin (5 mg/mL), 1:1000 Leupeptin (20 mg/mL) und 1:1000 Pepstatin (1 mg/mL). Die Zellpellets wurden in dem Lysepuffer resuspendiert und in 1,5 mL Reaktionsgefäße (Sarstedt) überführt. Während der 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Proben alle 10 min durch Vortexen vermischt. Anschließend folgte der mechanische Zellaufschluss mittels hochfrequenter Ultraschallschwingungen des Ultraschallhomogenisators (0,8 Impuls/s, Branson Sonifier[®] S-450A, Branson). Die Separation der entstandenen Zelltrümmer aus der Zellsuspension erfolgte durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 3 min bei 4 °C (Kühlzentrifuge, Eppendorf). Daraufhin wurde der Überstand in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und das Zellpellet verworfen.

Tabelle 13: Pufferzusammenstellung von RIPA-Puffer und RIPA_p

RIPA-Puffer Radioimmuno- präzipitationsassay Puffer	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	NP 40	1% (v/v)
	SDS	0,1% (v/v)
	Desoxycholsäure	0,5% (w/v)
RIPA_p	RIPA-Puffer	50 mL
	PMSF	1% (v/v)
	Aprotinin	0,1% (v/v)
	Leupeptin	0,1% (v/v)
	Pepstatin	0,1% (v/v)

3.2.2. Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte durch die kalorimetrische Methode basierend auf dem Bradford-Protein-Assay [85]. Der im Bradfordreagenz enthaltene Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* G-250 bindet an die basischen, sowie aromatischen Aminosäurereste der Proteine Arginin und verschiebt somit das Adsorptionsmaximum auf 595 nm.

Methoden

Die in den Zelllysaten (3.2.1.) enthaltene Proteinkonzentration wurde anhand einer Standardkurve ermittelt. Hierzu wurde in Halbmikroküvetten (Sarstedt) eine *Bovine Serum Albumin* (BSA) Standardreihe mit den Konzentrationen 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, 8 mg/mL und 16 mg/mL hergestellt. Zur OD-Messung der Proteinmenge wurde jeweils 1 μ L des Zelllysates in 800 μ L H₂O_{dd} verdünnt, welches gegen eine Referenz mit ausschließlich H₂O_{dd} gemessen wurde. Allen Proben wurden je 200 μ L des Bradford-Reagenz (Bradford Protein Assay, Bio-Rad) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte am Spektrophotometer (SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-Rad) bei 595 nm.

3.2.3. Ko-Immunpräzipitation

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurden Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt. Prinzipiell basiert diese Methode auf die Immobilisierung von spezifischen Antikörpern an eine poröse Matrix zur Detektion von Antigenen nach deren Aufreinigung. Die Besonderheit an der Ko-Immunpräzipitation ist, dass die nativen Bindungsbeziehungen zwischen dem Antigen und weiterer Makromoleküle im Vordergrund stehen. Hierbei wurde ein monoklonaler Antikörper an Protein A-Sepharose[®]-Beads (Protein A-Sepharose[®] CL-4B from *Staphylococcus aureus*, Sigma-Aldrich) immobilisiert. Bei den Sepharose[®]-Beads handelt es sich um lyophilisierte und quervernetzte Agarosekügelchen, die mit dem Protein A aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* beschichtet sind. Das Protein A ermöglicht die Bindung der Immunglobuline an die poröse stationäre Phase. Nach der Inkubation der Beads mit dem Zelllysate und folgender Präzipitation des Komplexes wurde dieses gelelektrophoretisch (3.2.4.) aufgetrennt und über Western Blot (3.2.5.) und der Chemilumineszenz auf Röntgenfilmen visualisiert (3.2.6.).

Alle Schritte der Ko-Immunpräzipitation erfolgten auf Eis. Zu Beginn wurden die Sepharose[®]-Beads (3 mg/Probe) eingewogen und mit RIPA_P-Puffer (**Tab. 13**) für 30 min in einem überkopfdrehenden Schüttelapparat (Reagenzglasrotator 3025, GFL) im Kühlraum bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Beads dreimal gewaschen, indem sie dreimal bei 600 rcf für 3 min bei 4 °C (Kühlzentrifuge, Eppendorf) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erneut mit RIPA_P-Puffer versetzt wurden. Dann folgte die Inkubation der Beads mit einem gewünschten Antikörper im Überkopfschüttelapparat (Reagenzglasrotator 3025, GFL) für 1 h im Kühlraum bei 4 °C. Nach der Inkubation wurden die antikörpergekoppelten Beads erneut dreimal mit RIPA_P-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 600 rcf für 3 min bei 4 °C,

Methoden

Kühlzentrifuge). Um unspezifisch an Protein A bindende Proteine aus dem Zelllysate zu entfernen kamen Pansorbin[®] Cells (Pansorbin[®] Cells, Merck) zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um *Staphylococcus aureus* Zellen, die durch Hitzeeinwirkung getötet und mittels Formalin fixiert wurden. Die Oberfläche dieser Zellen weist eine hohe Dichte an Protein A auf, womit unspezifisch bindende Proteine interagieren und so aus dem Zelllysate isoliert werden können. Das entsprechende Volumen an Zelllysate mit einer Gesamtproteinmenge von 1.200 µg wurde zu je 50 µL Pansorbin[®] Cells gegeben (3.2.2.), welche zuvor dreimal mit dem RIPA_P-Puffer gewaschen worden sind (Zentrifugation bei 6.000 rpm für 3 min bei 4 °C, Kühlzentrifuge, Eppendorf). Das Zelllysate wurde für 1 h mit den Pansorbin[®] Cells in dem Überkopfschüttelapparat im Kühlraum bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde durch Zentrifugation (Kühlzentrifuge, Eppendorf) bei 6.000 rpm für 3 min bei 4 °C Pansorbin[®] Cells vom Zelllysate separiert und das von unspezifisch bindenden Proteinen befreite Zelllysate auf die antikörpergekoppelten Sepharose[®]-Beads überführt. Diese wurden über Nacht im Überkopfschüttelapparat bei 4 °C im Kühlraum inkubiert. Am Folgetag wurden die Beads dreibis fünfmal mit RIPA_P-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 600 rpm für 3 min bei 4 °C, Kühlzentrifuge). Die Beads wurden für die gelelektrophoretische Auftragung direkt weiterverwendet (3.2.4.).

3.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht im elektrischen Feld unter denaturierenden Bedingungen [86]. Das β-Mercaptoethanol bricht die Disulfidbrückenbindungen der Quartär- sowie Tertiärstruktur der Proteine. Diese liegen folglich in einem denaturierten Zustand vor und werden von dem zunehmend anionisch geladenem SDS mizellenartig umlagert, sodass die Eigenladung der Proteine durch die negative Ladung des SDS komplett überlagert wird. Somit liegt ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Ladung und des Molekulargewichts der Proteine vor. Die Auftrennung basiert auf dem Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix, wodurch die relative Wanderungsstrecke der Protein-SDS-Komplexe im elektrischen Feld in Richtung positivgeladene Anode Aufschluss über das Molekulargewicht gibt. Zur Steigerung der Auflösung wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese verwendet, bei welcher das Trenngel mit einem Sammelgel geringerer Porosität überschichtet ist. Das im Lämmli-Puffer enthaltene Glycerol erhöht die Dichte der mit dem Probenpuffer behandelten Proteinproben und führt dazu, dass diese in die Bindungstaschen des Sammelgels fallen und sich dort konzentrieren

Methoden

können. Hiermit wird das einheitliche Wandern der Proteine in das Trenngel gewährleistet. Im Sammelpuffer wird der „*stacking*“-Effekt durch die schnell wandernden Chloridionen und den langsam wandernden Glycinionen im Trenngelpuffer hervorgerufen. Die Proteine werden im Trenngel oben von den Glycinionen belagert, während sich die Chloridionen unter der Proteinbande befinden. So werden die von den Ionen umlagerten Proteine gestapelt, wodurch scharfe Proteinbanden ermöglicht werden.

Zur Herstellung der Gele wurden zunächst 7 mL des Trenngels in den Spalt zwischen zwei dicht aneinander positionierten Glasplatten gegossen und mit einer Schicht 99% Isopropanol überdeckt. Dies beseitigt jegliche Bläschen und führt zu einem ebenen Übergang zum Sammelgel. Sobald das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt, 3 mL des Sammelgels auf das Trenngel gegossen und direkt im Anschluss die Probenkämme in das Sammelgel eingeführt. Nach dessen Aushärtung wurden die Kämme entnommen und der apparative Aufbau der Gelelektrophoresekammern (Multigel System Biometra, Analytik Jena) nach Herstellerangaben vorgenommen. Nach Gewinnung der Zelllysate (3.2.1.) wurden die Proteinproben mit einem 5-fachem Lämmli-Ladepuffer versetzt, während die durch die Ko-Immunpräzipitation gewonnenen Präzipitate (3.2.3.) mit 15 µL eines 2-fachen Lämmli-Ladepuffers behandelt und für 5 min bei 95 °C im Thermomixer (comfort, Eppendorf) inkubiert wurden. Anschließend können die Proben entweder nach kurzzeitiger Abkühlung direkt auf das Sammelgel aufgetragen oder bei -20 °C im Gefrierschrank (Liebherr) bis zur Auftragung gelagert werden. Die Gele wurden in den Gelelektrophoresekammern in Tris-Glycin-SDS-Puffer (TGS) bei konstanter elektrischer Stromstärke von erst 10 mA pro Gel an der Stromquelle PowerPac™ Power Supply (Bio-Rad) betrieben bis die Proteine in das Trenngel übergegangen sind. Dann wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel angehoben. Als Standardmarker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (ThermoFisher) verwendet.

Tabelle 14: Zusammensetzungen der SDS-PAGE-Gele und deren Puffer

Acrylamidstamm- lösung	Acrylamid	29% (w/v)
	N,N'-Methylenbisacrylamid	1% (w/v)
5% Sammelgel	Acrylamidstamm- lösung	40% (v/v)
	Tris-HCl (pH 6,8)	250 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	APS	0,1% (w/v)
	TEMED	0,04% (v/v)
10% Trenngel	Acrylamid (30%)	40% (v/v)
	Tris-HCl (pH 8,8)	250 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	APS	0,1% (w/v)
	TEMED	0,6% (v/v)
5x Lämmli- Ladepuffer	Tris-HCl (pH 6,8)	250 mM
	SDS	10% (w/v)
	Bromphenolblau	0,5% (w/v)
	Glycerol	50% (v/v)
	2-Mercaptoethanol	3,75% (v/v)
2x Lämmli- Ladepuffer	Tris-HCl (pH 6,8)	100 mM
	SDS	4% (w/v)
	Bromphenolblau	0,5% (w/v)
	Glycerol	50% (v/v)
	2-Mercaptoethanol	3,75% (v/v)
TGS- Laufpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1% (v/v)

3.2.5. Western Blot

Bei diesem Blotverfahren werden die im Gel immobilisierten Proteine nach der SDS-PAGE (3.2.4.) zunächst auf Blotmembrane übertragen, damit diese durch die anschließende Immundetektion (3.2.6.) visualisiert werden können. Der elektrophoretische Transfer der im Gel befindlichen Proteine auf eine adsorbierende Nitrocellulosemembran (Amersham Protran 0,45 µm NC, GE Healthcare) erfolgte nach dem *full-wet*-Verfahren in der Blotkammer Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Die denaturierten Proteine werden aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung des Pluspols transferiert und an der Blotmembran durch hydrophobe und ionische Wechselwirkungen gebunden.

Methoden

Die Gele wurden nach der SDS-PAGE zurechtgeschnitten und in folgender Abfolge von der Kathode zur Anode in die Blotkassetten gestapelt: Kunststoffkissen, ein Filterpapier (VWR), Polyacrylamidgel, Nitrocellulosemembran, Filterpapier, Kunststoffkissen. Der Transfer fand bei einer konstanten elektrischen Stromstärke von 400 mA pro Blotkammer für 1 h in Towbin-Blotpuffer statt. Nach Abschluss des Transfers wurden die Blotmembrane für die Immundetektion (3.2.6.) weiterverwendet.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Towbin-Blotpuffers für den Western Blot

Towbin- Blotpuffer	Tris-HCl (pH 8,3)	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,05 (w/v)
	Methanol	20% (v/v)

3.2.6. Immunfärbung und Chemilumineszenzdetektion

Die in die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine werden mittels der Antikörperfärbung und anschließender Chemilumineszenzdetektion erkennbar gemacht. Die geblotteten Membrane (3.2.5.) wurden zunächst für mindestens 45 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C im Kühlraum mit einem Blockingpuffer auf einem Taumelschüttler (3011, GFL) inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu blockieren. Die noch freien Bindungsstellen wurden durch die Beseitigung der restlichen ungebundenen Proteine in der Milchpulverlösung freigelegt, indem die Membrane dreimal für je 5 min mit PBS-Tween (PBST) auf dem Taumelschüttler bei RT gewaschen wurden. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 2 h schüttelnd bei 4 °C im Kühlraum zum Nachweis der Position der immobilisierten Proteine auf der Membran. Nach der Antigen-Antikörper-Bindung wurden nicht nur restliche Primärantikörper, sondern auch unspezifisch gebundene Antikörper durch erneutes Waschen der Membran entfernt (dreimal je 5 min schüttelnd in PBST bei RT). Der Meerrettichperoxidase (HRP)-markierte Sekundärantikörper wurde 1:10.000 in einer 3%igen (w/v) Milchpulverlösung in PBST verdünnt und für 1 bis 2 h schüttelnd bei RT inkubiert. Der Protein-Antikörper-Komplex verhält sich als Antigen zu dem Enzym-konjugierten Sekundärantikörper. Ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Sekundärantikörper wurden durch erneutes dreimaliges Waschen (je 5 min schüttelnd in PBST bei RT) entfernt. Auf die Immunfärbung folgte die Chemilumineszenzdetektion, bei welcher durch Zugabe des Enhanced-Chemilumineszenz-Reagenz (ECL) (SuperSignal® Westpico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers die ECL-Reaktion initiiert wurde. Am Ort des Protein-Antikörper-Komplexes wurde das im Chemilumineszent-Substrat vorhandene Luminol durch die Meerrettich-Peroxidase unter Lichtemission oxidiert, sodass die

Methoden

genaue Position des Proteins detektiert wurde. Die Chemilumineszenz wurde mittels Röntgenfilmen (RP New Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive, CEA) aufgenommen, welche in dem Entwickler entwickelt wurden. Nach der Filmentwicklung wurden Abbildungen der Blots mit Bildbearbeitungsprogrammen (Adobe Photoshop CS5.1, Adobe Illustrator CS2) erstellt.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Puffer für die Immunfärbung

Blockingpuffer	Milchpulver	5% (w/v)
	PBS	200 mM
Waschpuffer PBST	Tween-20	0,1% (v/v)
	PBS	200 mM

3.3. Virologische Methode

3.3.1. Infektion mit Adenovirus

Am Vortag der Infektion wurden entsprechende Zellen in einer bestimmten Anzahl ausgesät (3.1.3.) und unter Kultivierungsbedingungen inkubiert (3.1.1.). Vor der Infektion wurde zunächst das Kultivierungsmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das berechnete Volumen des in DMEM resuspendierten Virus mit einer MOI (*Multiplicity of Infection*) von 70 in Kultivierungsmedium ohne FKS vermischt und auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h unter Kultivierungsbedingungen, wurde das entsprechende Kultivierungsmedium mit FKS dazugegeben und für 24 h p.i. geerntet (3.1.4.) oder für mikroskopische Aufnahmen (3.4.1.) weiterverwendet.

3.4. Mikroskopische Methode

3.4.1. Live Cell Imaging

Das LCI wurde ungefähr 4 h nach der Agaroseimmobilisierung der Zellen (3.1.5.) durchgeführt, sodass 24 h p.i. die ersten Aufnahmen erfolgten. Basierend auf die Methode der *Spinning Disk Confocal Laser Microscopy* (SDCLM), wurden das grünfluoreszierende Protein (GFP) bei 488 nm und das rotfluoreszierende mCherry Fluorophore bei 561 nm bei einer Stärke von 5% detektiert. Die Aufnahmen erfolgten in einem Zeitraum von 16 h in 30-minütigen Intervallen. Bei einer 100-fachen Vergrößerung wurden 10 bis 20 Punkte in der z-Achse im Abstand von 0,4 μm vorgenommen, um dreidimensionale Aufnahmen durchzuführen. Die Aufnahmen erfolgten während der Inkubation gemäß den Kultivierungsbedingungen bei 37 °C, 5% CO₂-

Ergebnisse

Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in einem speziell angefertigten Inkubationsbrutschrank am Mikroskop.

4. Ergebnisse

4.1. *Live Cell Imaging* Aufnahmen zur Analyse der Interaktion zwischen E2A und den PML-Isoformen I bis VI

Bei bekannter Lokalisation von E2A-Multimeren in großer räumlicher Nähe zu den PML NBs, soll die Beziehung dieser beider Proteinkomplexe im Verlauf einer Infektion durch das LCI untersucht werden. Bisher wurden hierzu nur Experimente mit endogenem PML durchgeführt und dabei nicht in den einzelnen PML Isoformen unterschieden.

Die Methode des LCI ermöglicht dreidimensionale Aufnahmen über einen längeren Zeitraum, gibt Aufschluss auf die Proteinlokalisierung und kann die Dynamik der Proteine im Verlauf einer Infektion darstellen. Somit hat es sich als ein optimiertes mikroskopisches Verfahren für Lokalisationsanalysen etabliert. Durch die Anwendung der SDCLM-Technik erfolgen Aufnahmen in der z-Achse, die einen deutlichen Mehrwert für die Auswertung darstellen. Da hier nach einer möglichen Ko-Lokalisation zwischen E2A und den PML-Isoformen I bis VI in der nuklearen Matrix untersucht wird, sind zweidimensionale Aufnahmen zwar möglich jedoch unzureichend. Basierend auf das Verfahren der Zeitraffer-Mikroskopie lässt das LCI Analysen zur Dynamik der RC-Bildung und Interaktion zu den PML NBs während der Infektion zu.

Für die Mikroskopie von lebenden Zellen über einen längeren Zeitraum sind besondere Voraussetzungen zu erfüllen. Über den ganzen Zeitraum der mikroskopischen Aufnahmen müssen die für die Zellen erforderlichen Kultivierungsbedingungen vorliegen. Durch einen speziell am Mikroskop angefertigten Inkubationsbrutschrank kann die Temperatur, die relative Luftfeuchtigkeit und der CO₂-Gehalt reguliert werden. Zudem ist eine Agaroseimmobilisierung der Zellen notwendig, damit diese nicht aus dem Sichtfeld des Mikroskops hinauswandern. Zur Visualisierung der gewünschten Proteine im LCI sind fluoreszierende Proteine (GFP, EYFP oder mCherry) nötig, die als Tag an die zu analysierenden Proteine angefügt werden. Durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge beginnen die Protein-Tags zu fluoreszieren an. Eine Fixierung der Zellen mit anschließender Immunfärbung ist im Rahmen eines LCI nicht möglich.

Ergebnisse

HepaRG_EYFP-PML I bis VI Zellen wurden mit dem HAdV-5_mCherry infiziert (3.3.1.), mittels Agarose immobilisiert (3.1.5.) und 24 h p.i. mit dem LCI begonnen (3.4.1.). Die PML NBs können aufgrund des EYFP-Tags bei einer Wellenlänge von 488 nm detektiert werden. Durch die Infektion mit dem rotfluoreszierenden mCherry markierten E2A des HAdV-5 Wildtyps (wt), kann die dynamische E2A Expression und Formation der RC bei einer Wellenlänge von 561 nm visualisiert werden. Zusätzlich wurden LCI-Aufnahmen von HepaRG_shPML durchgeführt, um gegebenenfalls im Vergleich dazu den Einfluss der PML NBs auf E2A zu überprüfen. Restliche endogene PML NBs nach dem *Knockdown* können in diesen Zellen aufgrund eines fehlenden EYFP-Tags nicht detektiert werden.

Durch LCI werden Aufnahmen entlang der z-Achse zur dreidimensionalen Darstellung im zeitlichen Verlauf gemacht, die vor allem für Ko-Lokalisationsanalysen wichtig sind. Eine mögliche Interaktion zwischen den Proteinkomplexen kann in allen Ebenen ihres dreidimensionalen Körpers stattfinden. Somit ist die Betrachtung der Zellen im dreidimensionalen Raum nötig, um eventuelle Ko-Lokalisationen nicht durch die Beschränkung auf eine zweidimensionale Ansicht zu übersehen. Für eine vollständige Analyse wären daher alle zeitlichen Aufnahmen in jeder aufgenommenen z-Achse erforderlich. Die daraus resultierenden Videos setzen sich aus zahlreichen Bildern zusammen, die aufgrund ihrer Fülle an Informationen für diese Arbeit zu übersichtlichen Abbildungen jeder infizierten HepaRG_EYFP-PML Isoformen zusammengestellt wurden (**Abb. 13 – Abb. 19**). Hierfür wurde ein besonders anschauliches Bild der Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Infektion und in einer angemessenen z-Ebene ($z = 0$) gewählt und als Großaufnahme (A) und dreidimensionale Ansicht (B) zur Demonstration der Ergebnisse abgebildet. Zusätzlich sind Aufnahmen entlang der z-Koordinate zu diesem Zeitpunkt (C), sowie stündliche Aufnahmen (Ausnahme bei HepaRG_EYFP-PML V, halbstündig) ab Beginn der Mikroskopie in der Ebene $z = 0$ (D) dargestellt. Die Auswahl eines besonders anschaulichen Bildes zu jeder infizierten HepaRG_EYFP-PML- und HepaRG_shPML-Zellen ergibt Großaufnahmen (A) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (h p.i.). Da jede einzelne Zelle auf einer Zellkulturplatte nicht mit derselben Anzahl von Viruspartikel infiziert werden kann und somit keiner identischen Infektion unterliegt, ist der Infektionszeitpunkt kein Maßstab zum Vergleich der Zelllinien untereinander. Daher wurden Zellen mit einer deutlichen E2A-Expression ausgewählt, welche auf eine Infektion mit einer ausreichenden Anzahl an Viruspartikel zurückzuführen ist (**Abb. 6**).

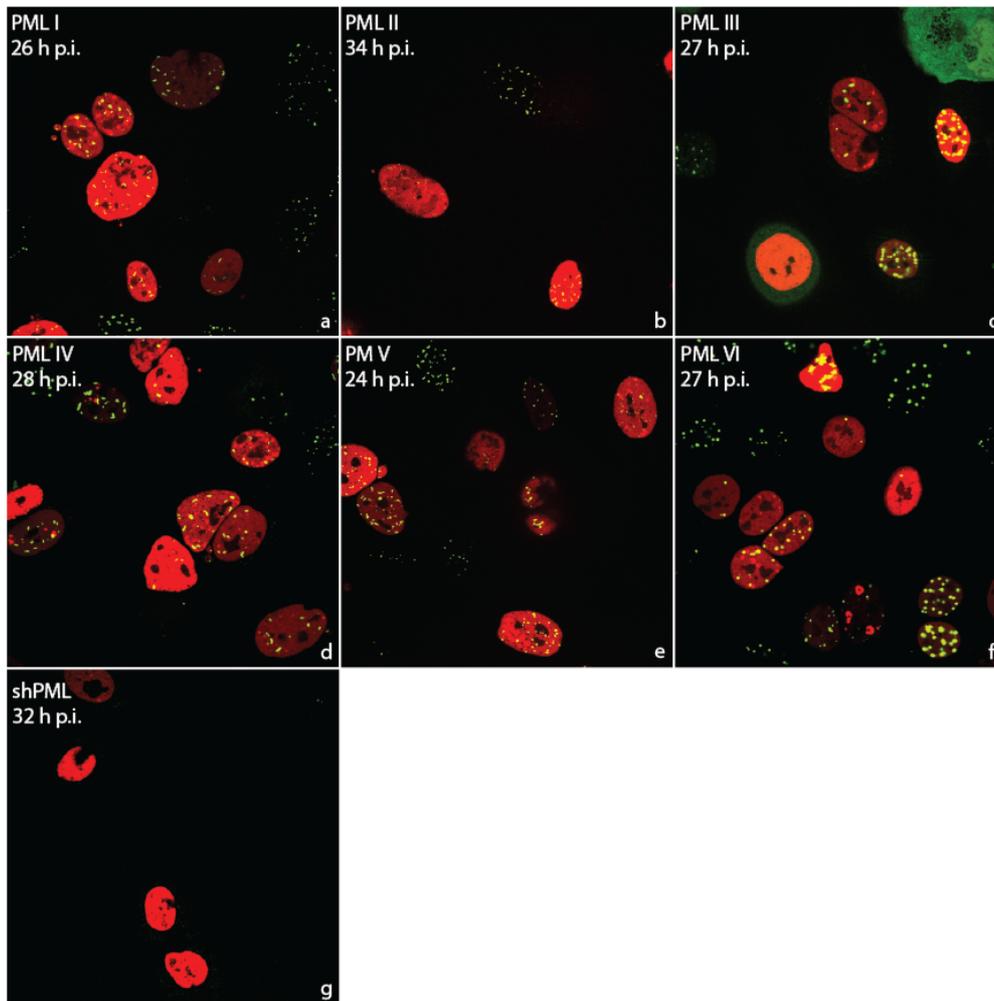


Abbildung 6: LCI-Aufnahmen der E2A und PML NBs Lokalisation in HAdV-5_mCherry infizierten HepaRG_EYFP-PML I bis VI (a bis f) und HepaRG_shPML (g) im Überblick

Zusammenstellung der Großaufnahmen (A) aus **Abb. 13 - Abb. 19**. $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden auf eine 35 mm Zellkulturplatte ausgesät, am Folgetag mit dem HAdV-5_mCherry infiziert (MOI 70) und 24 h p.i. immobilisiert sowie mikroskopiert. Die Aufnahmen erfolgten alle 30 min für 16 h, bei einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurden das DNA-Bindeprotein E2A mittels des mCherry-Tags (rotfluoreszierend) und die EYFP-getaggten PML-Isoformen (grünfluoreszierend) bei einer Laserintensität von 5% detektiert.

4.1.1. Morphologie und Lokalisation von E2A

Im Allgemeinen ist zu beobachten, dass E2A in den HepaRG-Zelllinien zwei unterschiedliche Phänotypen aufweist. Zur Demonstration wurden die eindimensionalen Großaufnahmen (A) der infizierten HepaRG_EYFP-PML Isoformen I bis VI und die HepaRG_shPML abgebildet (**Abb. 6**). Unabhängig von der exprimierten PML Isoform in den Zellen, kann zwischen einer diffusen nukleären E2A Lokalisation und einer sowohl diffusen als auch in kreisförmigen Strukturen konzentrierten nukleären E2A-Lokalisation im Zellkerninneren unterschieden werden, sowohl in den PML exprimierenden Zellen als auch in Zellen mit herunterregulierter PML-Expression (HepaRG_shPML) (**Abb. 6, a - g**). Die diffuse Verteilung von E2A ist in allen HepaRG_EYFP-PML Isoformen I bis VI, sowie den HepaRG_shPML zu detektieren. Das diffuse E2A ist gleichmäßig im Nucleus verteilt, bis auf einige Aussparungen, in denen sich

Ergebnisse

keine DNA befindet (Nukleoli). Während der viralen Replikation nimmt der Anteil an E2A mit der Zeit zu, die Replikationszentren bilden sich aus und werden im Laufe der Infektion größer, wie vor allem in **Abb. 8** am Beispiel von HepaRG_EYFP-PML I und II im zeitlichen Verlauf der Infektion ersichtlich ist.

Die E2A-Anreicherung erscheint häufig in fleckenartigen Strukturen (**Abb. 6**, a, d, e, g), während es in einigen Zellen eine Hufeisenform annimmt oder ringförmig (RC) in Erscheinung tritt. Die Ausbildung der Replikationszentren aus einer hufeisenförmigen Struktur erfolgt in den HepaRG_EYFP-PML Isoformen III, IV und VI und wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektionsphase deutlich (**Abb. 7**). Zunächst erscheint eine hufeisenförmige Morphologie von E2A in den HepaRG_EYFP-PML Isoformen III, IV und VI (**Abb. 7**, a - c), während Replikationszentren zu einem späteren Zeitpunkt gebildet werden (**Abb. 7**, d - f).

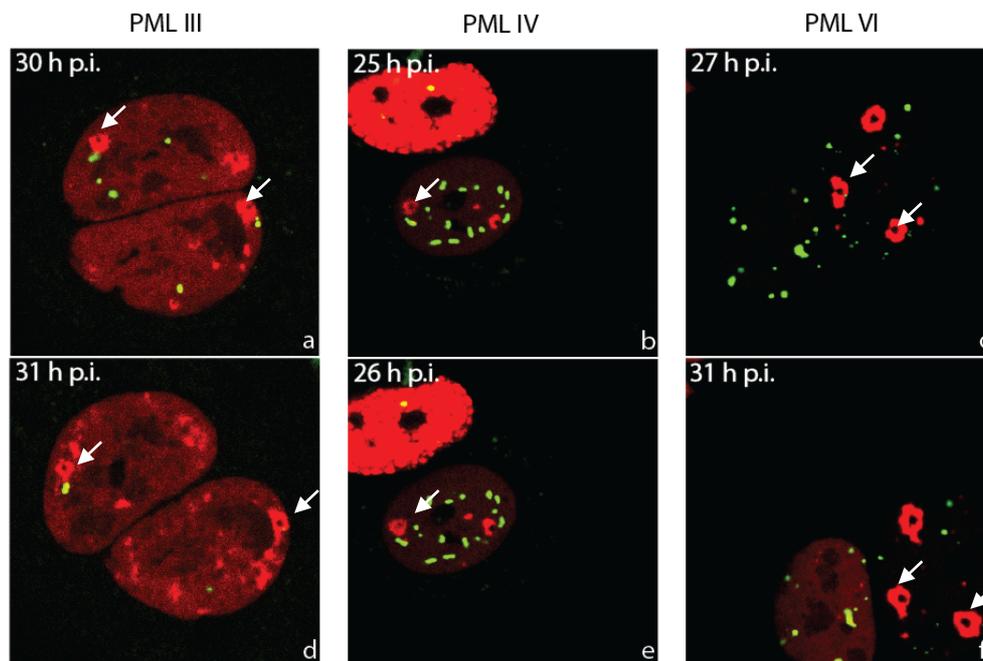


Abbildung 7: LCI-Aufnahmen der Ausbildung von Replikationszentren in HepaRG_EYFP-PML III, IV und VI

Zusammenstellung bestimmter Zeitpunkte ($z = 0$) aus den zeitlichen Aufnahmen (D) aus **Abb. 15**, **Abb. 16** und **Abb. 18**. $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden auf eine 35 mm Zellkulturplatte ausgesät, am Folgetag mit dem HAdV-5_mCherry infiziert (MOI 70) und 24 h p.i. immobilisiert sowie mikroskopiert. Die Aufnahmen erfolgten alle 30 min für 16 h, bei einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurde der mCherry-Tag (rotfluoreszierend) am DNA-Bindeprotein E2A und die EYFP-getaggten PML Isoformen (grünfluoreszierend) bei einer Laserintensität von 5% detektiert. Die weißen Pfeile weisen auf die E2A-Morphologie.

4.1.2. Morphologie und Lokalisation von PML NBs

Die aus den PML-Isoformen I bis VI gebildeten PML NBs in den HepaRG-Zelllinien weisen eine punktförmige Struktur in nicht infizierten Zellen auf, in denen keinerlei E2A exprimiert wird (**Abb. 6**). In den PML III exprimierenden Zellen ist eine diffuse Lokalisation von PML auch im Zytoplasma erkennbar (**Abb. 6**, c). Da abgesehen von PML I keiner der PML

Ergebnisse

Isoformen ein Kernexportsignal (NES) beinhaltet [87], kann angenommen werden, dass diese Zelle deformiert ist und sich nicht in einem normalen gesunden Zustand befindet oder zytoplasmatische PML Isoformen durch die Bindung an virale Proteine in das Zellkerninnere gelangen. Eine besondere Morphologie und Lokalisation ist in den HepaRG_EYFP-PML I und II zu beobachten, die durch die Abbildung der Zellen im zeitlichen Verlauf der Infektion ersichtlich ist **Abb. 8**. In HepaRG_EYFP-PML Isoform II Zellen werden die PML NBs in infizierten Zellen während der Infektion morphologisch zu faserigen Strukturen verformt, den sogenannten *tracks* (**Abb. 8**, B, weißer Pfeil), die PML NBs der anderen PML Isoformen behalten jedoch auch in infizierten Zellen ihre runde Form bei. In den PML I und PML II exprimierenden HepaRG-Zellen ist mit fortschreitender Infektion auch eine Abnahme der Anzahl sowie Größe der PML NBs zu erkennen (**Abb. 8**).

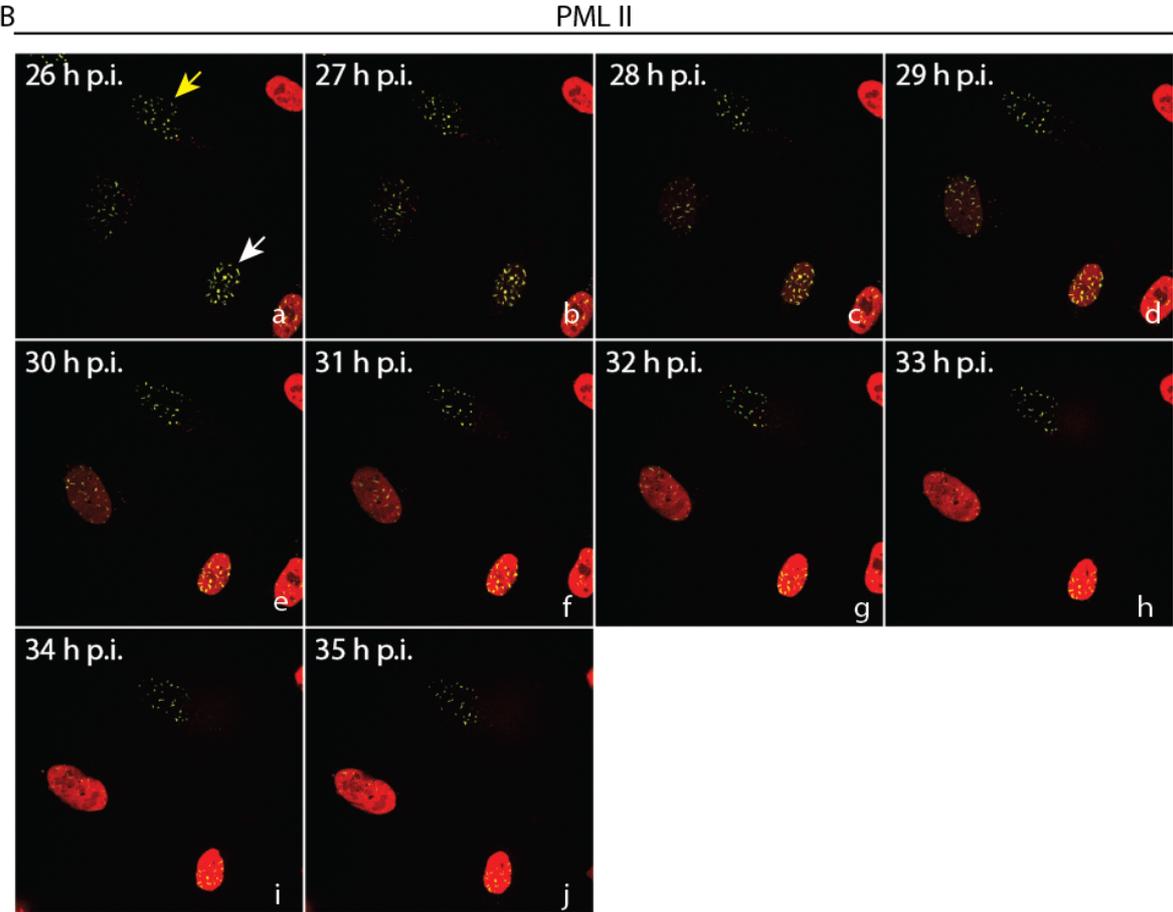
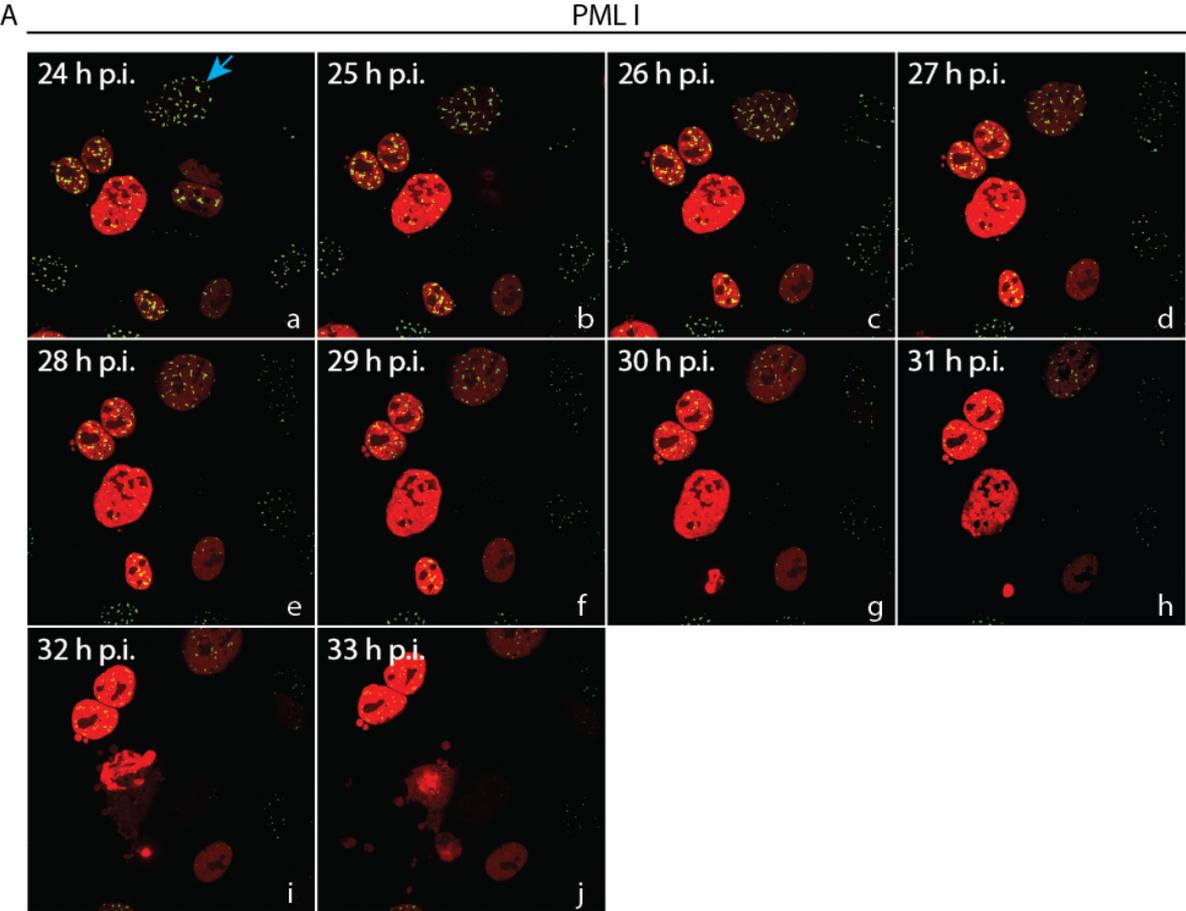


Abbildung 8: LCI-Aufnahmen von HAdV-5_mCherry infizierten HepaRG_EYFP-PML I und II im zeitlichen Verlauf nach der Infektion

Zusammenstellung der zeitlichen Aufnahmen (D) aus **Abb. 13** und **Abb. 14**. $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden auf eine 35 mm Zellkulturplatte ausgesät, am Folgetag mit dem HAdV-5_mCherry infiziert (MOI 70) und 24 h p.i. immobilisiert sowie mikroskopiert. Die Aufnahmen erfolgten alle 30 min für 16 h, bei einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurde der mCherry-Tag (rotfluoreszierend) am DNA-Bindeprotein E2A und die EYFP-getaggen PML-Isoformen (grünfluoreszierend) bei einer Laserintensität von 5% detektiert. (A) HepaRG_EYFP-PML I 24 h p.i. bis 33 h p.i. (B) HepaRG_EYFP-PML II 26 h p.i. bis 35 h p.i. Blauer Pfeil: Zelle mit in Größe und Anzahl reduzierenden PML NBs. Weißer Pfeil: Zelle in der sich *tracks* ausbilden. Gelber Pfeil: Artefakt.

4.1.3. Ko-Lokalisation von E2A und PML NBs

Für die HepaRG_EYFP-PML Isoformen II, III, V und VI lässt sich keine besonders auffallende Interaktion zwischen den PML NBs und den multimerisierten E2A-Proteinkomplexen erkennen. Eine Ko-Lokalisation tritt genauso häufig auf wie eine fehlende Annäherung dieser Proteinkomplexe (**Abb. 6**, b, c, e, f). Eine Lokalisation von E2A in dichter Nachbarschaft zu PML NBs wird zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Infektion durch die Darstellung der Zellen entlang der z-Koordinate besonders anschaulich. In HepaRG_EYFP-PML I-Zellen kann eine unmittelbare Anlagerung der E2A-Multimere an die PML NBs beobachtet werden (**Abb. 9**, welche mit der Zeit größer werden ohne eine Entfernung vom Interaktionspartner PML (**Abb. 9**, A).

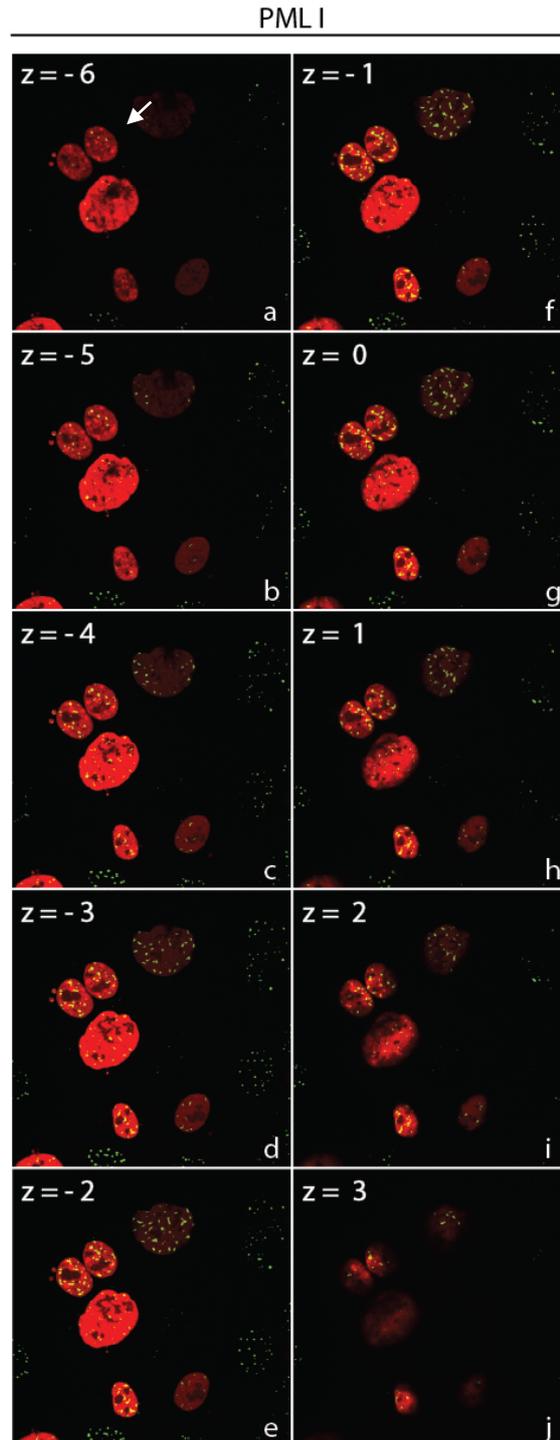


Abbildung 9: LCI-Aufnahmen der E2A Bindung an PML I in HepaRG_EYFP-PML I nach HAdV-5_mCherry Infektion

Auszug der Aufnahmen entlang der z-Koordinate aus **Abb. 13**. $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden auf eine 35 mm Zellkulturplatte ausgesät, am Folgetag mit dem HAdV-5_mCherry infiziert (MOI 70) und 24 h p.i. immobilisiert sowie 26 h p.i. mikroskopiert. Die Aufnahmen erfolgten alle 30 min für 16 h, bei einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurden der mCherry-Tag (rotfluoreszierend) am DNA-Bindeprotein E2A und die EYFP-getaggt PML I Isoform (grünfluoreszierend) bei einer Laserintensität von 5% detektiert. Die Aufnahmen in der z-Koordinate erfolgten in einem Abstand von $0,4 \mu\text{m}$. Weißer Pfeil: Beispielzelle für Bindungsinteraktion.

4.2. Untersuchung der E2A Interaktion mit den PML-Isoformen I bis VI mittels Ko-Immunpräzipitation

In humanen Zellen lokalisieren sechs PML Isoformen (I bis VI) im Nukleus. Zur Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen diesen PML Isoformen und dem DNA-Bindeprotein E2A, wurden Infektionsexperimente mit HepaRG_shPML- und HepaRG_EYFP-PML I – VI-Zellen durchgeführt. Die PML-kodierende Region in den HepaRG-Zellen ist mittels der Methode der RNA-Interferenz depletiert (HepaRG_shPML) und anschließend die einzelnen EYFP-getaggten PML-Isoformen I bis VI in diese mittels lentiviraler Partikel transduziert worden (HepaRG_EYFP-PML I bis VI). Diese Zellen wurden für die vorliegenden Versuche bereitgestellt. Es folgte die Infektion mit dem HAdV-5 Wildtyp (HAdV-5_wt), dessen E3-Leserahmen depletiert ist, sodass die Zelllyse und das Austreten der im Zuge des Replikationszyklus produzierten Viruspartikel verhindert ist. Die Ko-Immunpräzipitationsversuche wurden in zwei Bindungsrichtungen durchgeführt, sodass zum einen das antikörpergebundene EYFP-PML an die Matrix immobilisiert wurde, um die Bindung von E2A an EYFP-PML zu untersuchen (EYFP-PML → E2A), und zum anderen wurde antikörpergebundenes E2A an die Matrix immobilisiert, zur Untersuchung der Bindung von EYFP-PML an E2A (E2A → EYFP-PML). Zur Immobilisierung und späterer Immunfärbung von EYFP-PML, wurde der EYFP-bindende GFP-Antikörper verwendet. Durch diese Verfahrensweise kann das Unterbleiben einer Bindung aufgrund von sterischer Behinderung ausgeschlossen werden.

4.2.1. Ko-Immunpräzipitation mit Bindungsrichtung EYFP-PML → E2A

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen sind einige Kontrollen notwendig, wodurch die Vergleichbarkeit und Validität der Proben und des Experiments untersucht werden können. Die Infektion mit dem HAdV-5_wt ist erfolgreich durchgeführt worden, da die Proteinmengen von dem viralen DNA-Bindeprotein E2A exprimiert worden sind (**Abb. 10**, A). Das *housekeeping* Protein β -Aktin im Rohlysat (Input) dient zur Kontrolle der eingesetzten Gesamtproteinmenge und zeigt, dass die einzelnen Proben im Versuch in vergleichbarer Konzentration verwendet wurden. Diese beiden Kontrollen ermöglichen das Vergleichen der Proben untereinander und somit der Validität des Versuches. Eine unspezifische Bindung von E2A an PML oder dem EYFP-Tag kann ausgeschlossen werden, da ansonsten eine E2A-Bindung an alle PML Isoformen vorliegen würde (**Abb. 10**, B, Banden 2 – 7). Die HepaRG_shPML Zellen dienen zur Kontrolle der unspezifischen Interaktion zwischen E2A und dem an den Beads immobilisierten GFP-Antikörper (**Abb. 10**, B, Bande 1). Im Input lässt sich in den HepaRG_shPML zudem kein EYFP-getaggttes PML detektieren (**Abb. 10**, A, Bande

Ergebnisse

1), da die endogenen PML Proteine, dessen Genexpression mittels *Knockdown* herunterreguliert ist, keinen EYFP-Tag besitzen und durch eine GFP-Immunfärbung nicht detektiert werden können. Aufgrund dessen ist die Abwesenheit kein Indiz dafür, dass die PML Proteine vollkommen depletiert worden sind. Hierzu wäre eine PML-Immunfärbung hilfreich, um den tatsächlichen Anteil an dem restlichen endogenen PML in den HepaRG_shPML Zellen zu detektieren. Die PML-Immunfärbung hat jedoch aufgrund der Verwendung eines zu schwachen Antikörpers nicht funktioniert. Bei Betrachtung der EYFP-getaggten PML Isoformen, deren Expression an die Expressionslevels der endogenen PML Isoformen angepasst sind, lassen sich Unterschiede erkennen. So werden endogenes PML I und VI in den Zellen am stärksten, PML II und V weniger stark und PML III und IV am schwächsten exprimiert (**Abb. 10**, A, Bande 2 - 7). Die Präzipitation der EYFP-getaggten PML Isoformen und anschließende Detektion von E2A im Western Blot zeigt, dass es mit den PML-Isoformen I und IV interagiert (**Abb. 10**, B, Bande 2 und 5). Die präzipitierte E2A-Bande bei den PML IV exprimierenden Zellen ist schwächer als die der PML I exprimierenden Zellen (**Abb. 10**, B, Bande 2, 5), die auf die unterschiedlichen Genexpressionslevels der endogenen PML-Isoformen zurückzuführen ist (**Abb. 10**, A, Bande 2 und 5).

Ergebnisse

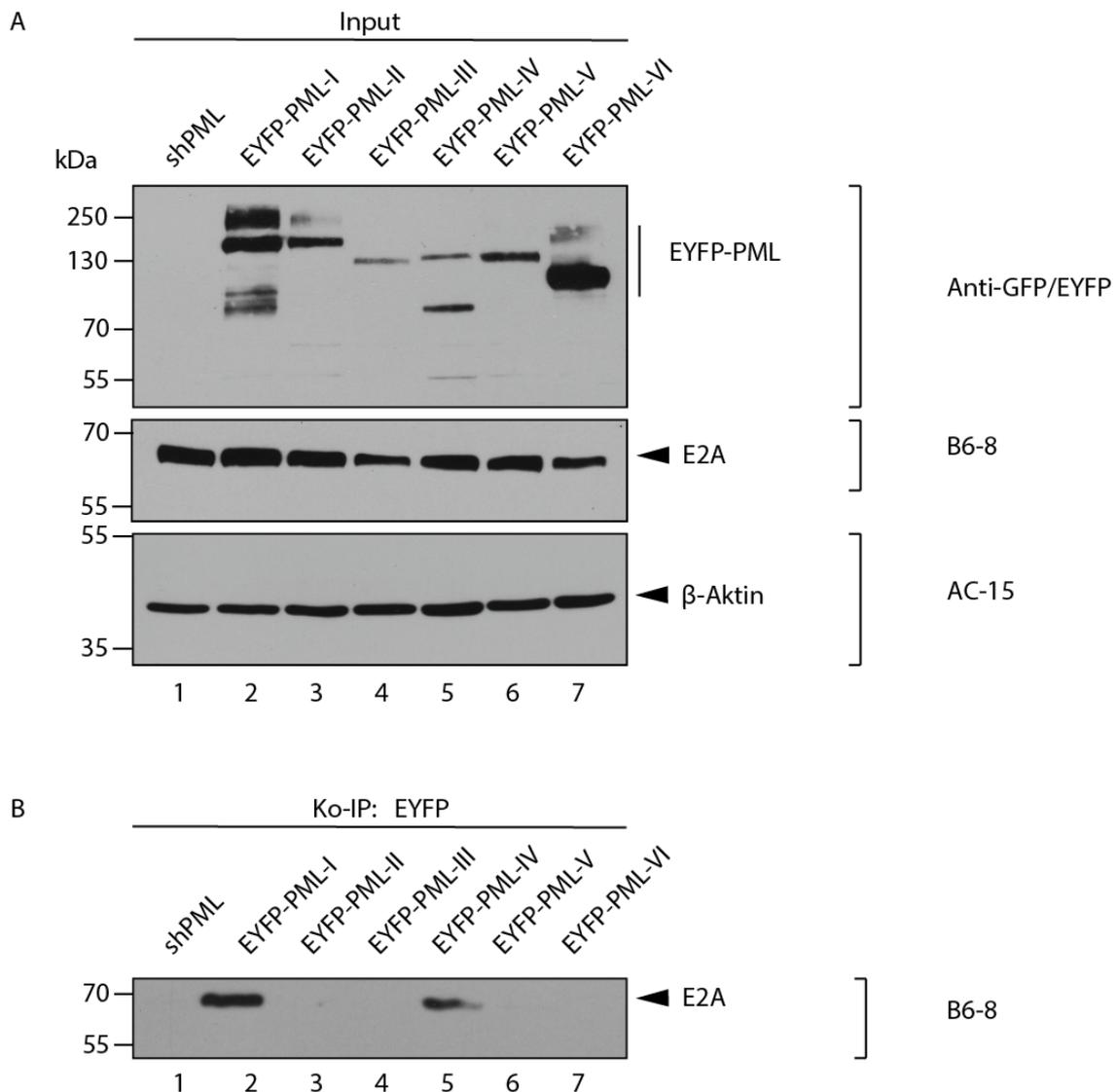


Abbildung 10: Ko-Immünpräzipitation zwischen PML-Isoformen I bis VI und E2A mit Bindungsrichtung EYFP \rightarrow E2A

Von HepaRG_shPML und HepaRG_EYFP-PML I – VI wurden je 4×10^6 Zellen auf 100 mm Zellkulturplatten ausgesät und am Folgetag mit HAdV-5_wt und einer MOI von 50 infiziert. 24 h p.i. wurden die Zellen geerntet und lysiert. Für die Ko-Immünpräzipitation der EYFP-getaggen PML-Isoformen wurde der Anti-GFP/EYFP-Antikörper an die Protein A-Sepharose[®]-Beads immobilisiert und mit je 1200 μ g Protein aus den jeweiligen Rohlysaten inkubiert. Die Präzipitate und Proteinextrakte aus dem Input wurden gelelektrophoresisch in 10%igen Gelen aufgetrennt (Auftragsmenge: 100 μ g EYFP-PML, 10 μ g E2A, 40 μ g β -Aktin) und mittels Western Blot und Immunfärbung visualisiert. (A) Proteinlevels von EYFP-PML I – VI, E2A und β -Aktin aus dem Input wurden mit den primären Antikörpern Anti-EYFP, B6-8 und AC-15 detektiert. (B) Ko-präzipitiertes Protein (E2A) wurde mit dem primären Antikörper B6-8 inkubiert.

4.2.2. Ko-Immünpräzipitation mit Bindungsrichtung E2A \rightarrow EYFP-PML

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus 4.1.1. wurde der Ko-Immünpräzipitationsversuch unter einer leichten Veränderung des Versuchsaufbaus wiederholt. In diesem Zusammenhang wurde E2A präzipitiert und das an den PML-Isoformen I bis VI getaggte EYFP durch Immunfärbung detektiert.

Ergebnisse

Durch die Ko-Immünpräzipitation in Bindungsrichtung E2A → EYFP-PML lässt sich die Bindung zwischen E2A und EYFP-PML I reproduzieren (**Abb. 11**, B, Bande 1), während keine Bindung zwischen E2A und EYFP-PML IV vorliegt (**Abb. 7**, B, Bande 4). Die Proteinmengen von endogenem β -Aktin im Input zeigen, dass vergleichbare Proteinmengen der einzelnen Proben für den Versuch verwendet wurden (**Abb. 11**, A, Bande 1 - 6). Der Nachweis der E2A-Proteinmenge im Input zeigt, dass bis auf HepaRG_EYFP-PML IV, alle Proben gleichmäßig mit dem HAdV-5_wt infiziert wurden (**Abb. 11**, A, Bande 1 – 3, 5, 6). Die E2A-Bande bei EYFP-PML IV ist sehr schwach, sodass angenommen werden kann, dass eine effiziente und vergleichbare Infektion nicht stattgefunden hat (**Abb. 11**, A, Bande 4). Eine unspezifische Bindung von E2A an PML Proteine oder dem EYFP-Tag liegt nicht vor, da nur eine Bindung an eine PML Isoform vorliegt und die Spezifität der Bindung an die jeweilige PML Isoform bekräftigt (**Abb. 11**, B, Bande 1 – 6). Aufgrund einer zu geringen Menge an Zelllysate der HepaRG_shPML wurde diese Probe nur im IP miteinbezogen.

Ergebnisse

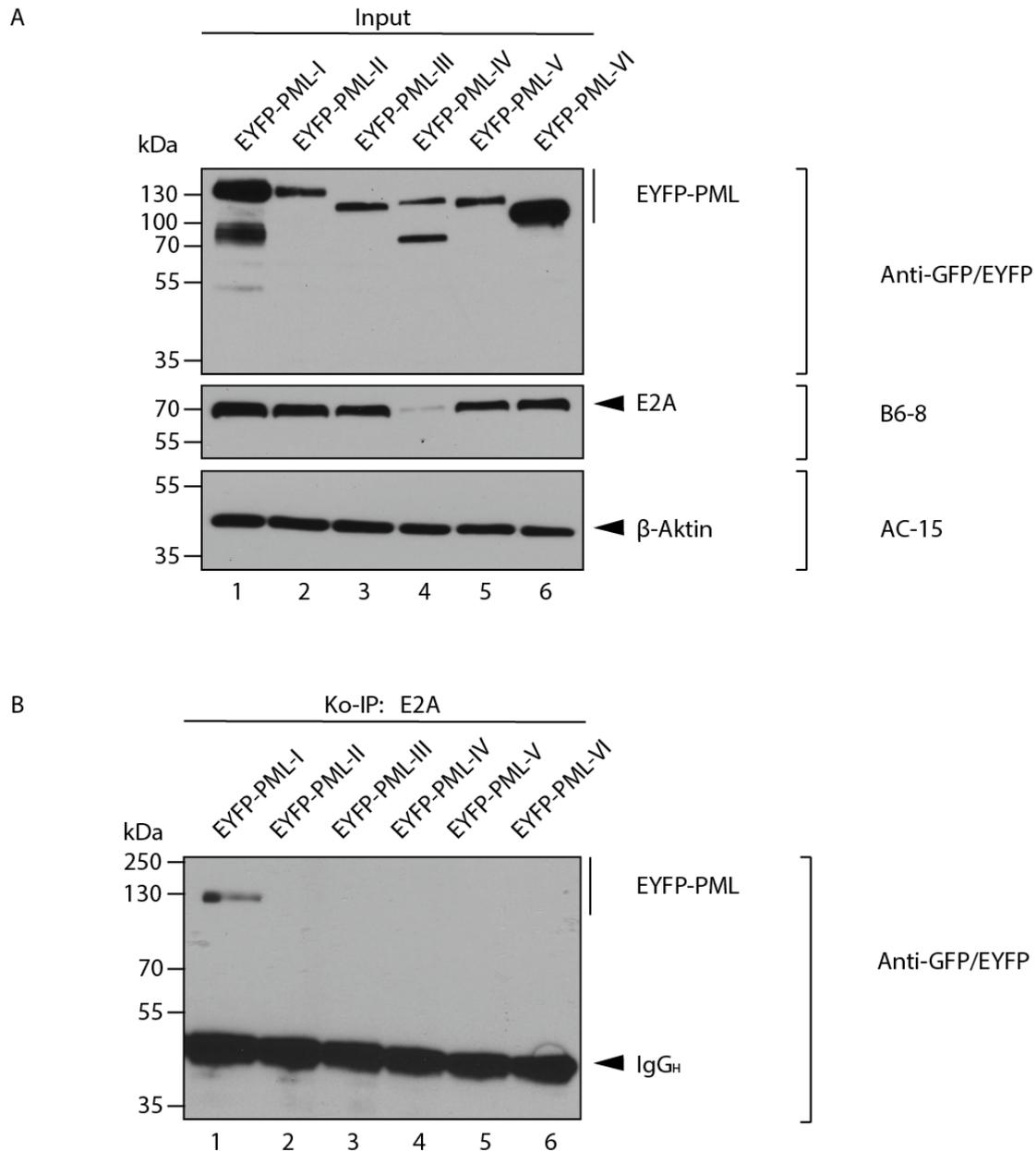


Abbildung 11: Ko-Immünpräzipitation zwischen PML-Isoformen I bis VI und E2A mit Bindungsrichtung E2A → EYFP

Von HepaRG_shPML und HepaRG_EYFP-PML I – VI wurden je 4×10^6 Zellen auf 100 mm Zellkulturplatten ausgesät und am Folgetag mit HAdV-5_wt und einer MOI von 50 infiziert (HepaRG_shPML ausgeschlossen). 24 h p.i. wurden die Zellen geerntet und lysiert. Für die Ko-Immünpräzipitation von E2A wurde der B6-8-Antikörper an die Protein A-Sepharose®-Beads immobilisiert und mit je 1200 μ g Protein aus den jeweiligen Rohlysaten inkubiert. Die Präzipitate und Proteinextrakte aus dem Input wurden gelelektrophoresisch in 10%igen Gelen aufgetrennt (Auftragsmengen: 100 μ g EYFP-PML, 10 μ g E2A, 40 μ g β -Aktin) und mittels Western Blot und Immunfärbung visualisiert. (A) Ko-präzipitiertes Protein (EYFP-PML I - VI) wurde mit dem primären Antikörper Anti-GFP/EYFP inkubiert. (B) Proteinlevels von EYFP-PML I – VI, E2A und β -Aktin aus dem Rohlysat wurden mit den primären Antikörpern Anti-EYFP, B6-8 und AC-15 detektiert.

4.3. Ko-Lokalisation von E2A und PML NBs in HepaRG_EYFP-PML IV

Die aus dem Ko-Immünpräzipitationsversuch resultierende Bindung zwischen E2A und PML IV in HepaRG_EYFP-PML IV-Zellen ist durch eine deutliche Ko-Lokalisation in den LCI-Aufnahmen nicht erkennbar (**Abb. 12**). In Zellen mit einem geringen Anteil diffus lokalisiertem

Ergebnisse

E2A, ist eine direkte Anlagerung der E2A-Multimere an die PML NBs sichtbar. Sobald jedoch diffuses E2A in größerem Umfang in der Zelle vertreten ist, liegt keine Ko-Lokalisation vor. Zudem scheinen die Replikationszentren in der Zelle mit geringem Anteil an diffus lokalisiertem E2A nicht weiter an Größe zu gewinnen. Eine dichte Anlagerung der PML NBs in HepaRG_EYFP-PML II lässt sich in der oberen Zelle erkennen. Aufgrund der auffälligen Ausrichtung der Interaktion, bei welcher die PML NBs nach unten gerichtet und direkt oberhalb dieser die E2A-Proteinkomplexe gebunden sind, kann angenommen werden, dass es sich um ein Artefakt in der mikroskopischen Aufnahme handelt.

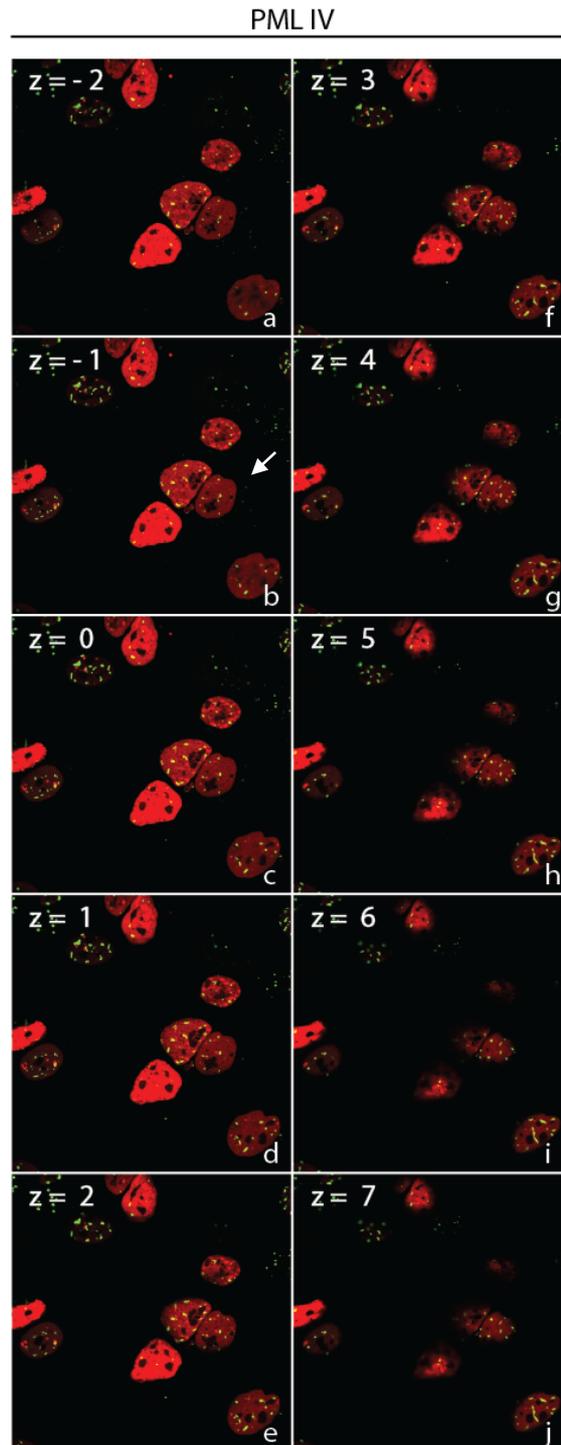


Abbildung 12: LCI-Aufnahmen der E2A Bindung an PML IV in HepaRG_EYFP-PML IV nach HAdV-5_mCherry Infektion

Auszug der Aufnahmen entlang der z-Koordinate aus **Abb. 16**. $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden auf eine 35 mm Zellkulturplatte ausgesät, am Folgetag mit dem HAdV-5_mCherry infiziert (MOI 70) und 24 h p.i. immobilisiert sowie 28 h p.i. mikroskopiert. Die Aufnahmen erfolgten alle 30 min für 16 h, bei einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurden der mCherry-Tag (rotfluoreszierend) am DNA-Bindeprotein E2A und die EYFP-getaggt PML-Isoform (grünfluoreszierend) bei einer Laserintensität von 5% detektiert. Die Aufnahmen in der z-Koordinate erfolgten in einem Abstand von $0,4 \mu\text{m}$. Weißer Pfeil: Beispielzelle für Bindungsinteraktion.

5. Diskussion

5.1. *Live Cell Imaging* von HAdV-5 infizierten PML-Isoformen I bis VI exprimierenden HepaRG Zellen

Bisher konnten bereits mehrere Interaktionen zwischen den PML NBs mit viralen Proteinen von DNA Viren festgestellt werden. Unter anderem führt die adenovirale Infektion einer Zelle zu Veränderungen in Anzahl und Form der PML NBs. Das frühe E4orf3 Protein bewirkt eine Deformierung der PML NBs zu faserigen Strukturen durch die Bindung an PML II, das einen positiven Effekt auf die adenovirale DNA Replikation ausübt [77]–[79]. Ebenso bindet das frühe Protein E1A an PML II und verstärkt die virale Transkription [76]. Unter dem Gesichtspunkt, dass die Replikationszentren einiger DNA Viren mit den PML NBs während der DNA-Replikation ko-lokalisieren [2]–[4], wurde in dieser Arbeit die Interaktion der adenoviralen Replikationszentren, die durch das frühe E2A Protein gebildet werden, mit den PML NBs untersucht. Dabei wurde die Beziehung von E2A zu den einzelnen, im Nukleus vertretenen PML-Isoformen I bis VI analysiert.

5.1.1. Auswirkung der HAdV-5 Infektion auf die PML NBs der einzelnen PML-Isoformen I bis VI

Zunächst konnte beobachtet werden, dass das DNA-Bindeprotein E2A in zwei unterschiedlichen phänotypischen Gestalten in Erscheinung tritt, unabhängig von der Anwesenheit der PML NBs. Die in den HepaRG_EYFP-PML III, IV und VI auftretende hufeisenförmige E2A-Multimerisierung, scheint ein Übergangszustand zu den ringförmigen Replikationszentren zu sein. Denn genau in diesen Zellen entwickelte sich diese Hufeisenform mit der Zeit zu einem geschlossenen Ring, der jedoch häufig nicht dauerhaft bestand. Die Ausbildung zu fleckenartigen Replikationszentren können jedoch in allen PML I bis VI exprimierenden HepaRG Zellen, sowie den HepaRG_shPML Zellen beobachtet werden. Diese Formation von E2A zu Replikationszentren bekräftigt, dass der mCherry-Tag an dem E2A Protein die Multimerisierung nicht negativ beeinflusst. Diese Erkenntnis ist mit der Theorie konsistent, da sich der Tag am N-terminalen offenen Leserahmen (*Open Reading Frame*; ORF) befindet. Die hakenförmige Struktur am C-terminalen Ende von E2A wird von dem Tag insofern nicht beeinträchtigt, dass es weiterhin seine Form und Flexibilität in gewisser Weise beibehält, welche für die Ausbildung von E2A-Multimeren unabdingbar sind.

Die PML NBs weisen einen mit der Literatur übereinstimmenden Phänotyp auf. In nicht infizierten Zellen, die an dem fehlenden E2A Protein erkannt werden können, nehmen sie eine

punktförmige Struktur ein. Durch die Infektion mit dem HAdV-5_mCherry wird diese Gestalt ausschließlich in HepaRG_EYFP-PML II-Zellen umgeformt. Wie bereits befürchtet, deformieren sich die PML NBs in diesen Zellen zu einer faserigen Gestalt, den sogenannten *tracks*. Auch diese Erkenntnis ist mit der Literatur konsistent. Die Hypothese zur Hemmung der antiviralen Reaktion der PML NBs, kann auf die miteinhergehende Reduzierung der Größe und Anzahl der PML NBs während der Infektion zurückgeführt werden. Diese Beobachtung konnte in den HepaRG_EYFP-PML II Zellen gemacht werden, sodass diese möglicherweise mit der Bindung von E4orf3 an PML II im Zusammenhang steht. Alles in allem sollte beachtet werden, dass die durch *Knockdown* hergestellten und zur Verfügung gestellten HepaRG_shPML-Zellen in denen anschließend die einzelnen EYFP-getagten PML-Isoformen I bis VI transfiziert worden sind (HepaRG_EYFP-PML I bis VI), einen kleinen Restanteil aller PML Isoformen beinhalten und somit eindeutige Unterschiede zwischen den Zelllinien abschwächen können.

Die LCI Methode ermöglicht eine umfassende Interaktionsanalyse von Proteinkomplexen und eignet sich besonders für diese Untersuchungen. Abgesehen von der dreidimensionalen Ansicht, lässt sich die Dynamik in der Entstehung von Replikationszentren durch die Zeitraffer-Mikroskopie genau verfolgen. Jedoch sind die einzelnen Aufnahmen der Zellen hinsichtlich der Zeit nur bedingt miteinander vergleichbar. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass selbst bei einer Infektion mit einer einheitlichen MOI unterschiedlich viele virale Partikel in eine Zelle eindringen können. Somit wird in dieser Arbeit nicht detailliert auf die Zeitspanne der Formation von Replikationszentren eingegangen.

5.2. Das DNA-Bindeprotein E2A interagiert mit PML I und PML IV

Die Ko-Lokalisationsuntersuchungen mittels LCI haben ergeben, dass das DNA-Bindeprotein E2A sich eindeutig in unmittelbarer Nachbarschaft zu PML I befindet. Eine dichte Anlagerung von E2A an PML IV scheint besonders in Zellen mit einem geringen Anteil an diffus lokalisiertem E2A vorzuliegen. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig, da insbesondere im Hinblick auf die zwei vorhandenen Isoformen von PML IV (PML IV und PML IVa) Unterschiede zu erwarten sein können. PML IVa unterscheidet sich von PML IV bezüglich des fehlenden Exons 5 (416 – 466 Aminosäuren) [88]. Durch die Ko-Immunpräzipitationsexperimente lässt sich die Bindung zwischen E2A und PML I in beiden Bindungsrichtungen bestätigen. Eine Bindung von E2A an PML IV erfolgte nur in einer Bindungsrichtung (EYFP-PML → E2A). Der fehlgeschlagene Nachweis dieser Bindung im

Diskussion

Ko-Immunpräzipitationsexperiment mit Bindungsrichtung E2A → EYFP-PML kann mit einer geringen E2A Genexpression im Zuge einer unzureichenden Infektion begründet werden. Hier konnte möglicherweise im Vergleich zu den anderen Proben eine deutlich geringere Menge von E2A an die immobilisierten B6-8-Antikörper binden. Dementsprechend wären dem PML IV Proteinen deutlich weniger Bindungsstellen geboten als bei PML I der Fall wäre. Darüber hinaus ist die endogene Genexpression von PML IV generell geringer als PML I. Eine ungleiche Menge an Beads bzw. B6-8-Antikörper in den Proben kann als Ursache, aufgrund der gleichmäßig dicken *Heavy Chain*-Banden des Antikörpers, ausgeschlossen werden.

Da die E2A Interaktion mit den PML NBs isoformabhängig ist, lässt sich vermuten, dass eine mögliche Bindungsstelle an dem PML Protein nicht auf den in allen PML Proteinen identischen N-terminalen Bereich (Exon 1 bis 7a) zurückzuführen ist. Bei näherer Betrachtung der Genstruktur dieser beiden PML Isoformen konnte der gemeinsame Genabschnitt Exon 8a im C-Terminus entdeckt werden, das den anderen im Nukleus lokalisierten PML Isoformen fehlt (**Abb. 5**). Dies resultiert in der Annahme, dass Exon 8a die spezifische PML I und IV Bindungsstelle für E2A kodiert. Somit sollten PML IV und PML IVa, die über das Exon 8a verfügen, gleichermaßen wie PML I an E2A binden. Zum Exon 8a ist bekannt, dass es die SUMOylierungsstelle K616 kodiert, welche die SUMOylierung des Proteins bewerkstelligt, selbst bei Verlust der drei HauptSUMOylierungsstellen K65, K160 und K490 [88].

Die PML NBs besitzen zwar unterschiedliche Funktionen, jedoch bezwecken sie alle den zellulären Abwehrmechanismus. Die unzähligen funktionellen Proteine im Inneren der PML NBs sind an den Prozessen Seneszenz, Apoptose, antiviralem Abwehrmechanismus und proteasomalen Abbau beteiligt [67]–[70]. Die Funktionen der spezifischen PML Isoformen sind während einer viralen Infektion noch relativ unbekannt. PML I scheint in der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen miteinzuwirken und in die virale Replikation von HSV-1 integriert zu sein [88]. Während der HSV-1 Infektion interagiert das frühe virale Protein ICP0, das eine transkriptionale Transaktivatorfunktion in der Replikation besitzt, mit PML I und induziert eine Degradierung dieser PML Isoform [89]. Möglicherweise kann die Wechselbeziehung zwischen dem adenoviralen Protein E2A und PML I ähnlich verlaufen. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung der Abnahme der Größe und Anzahl der PML NBs während der adenoviralen Replikation in den HepaRG_EYFP-PML I-Zellen unterstützt. Im Gegensatz ist PML IV die bisher am meisten untersuchte PML Isoform. PML IV rekrutiert das Tumorsuppressorprotein p53 in die PML NBs und bewirkt einen positiven

Effekt auf die Apoptose und Seneszenz [88], [90], [91]. Zudem spielt PML IV eine Rolle in DNA Reparaturmechanismen [92]. Durch die Bindung von E2A an PML IV wird möglicherweise die antivirale Reaktion der PML NBs herunterreguliert, um einen negativen Einfluss auf die virale Replikation vorzubeugen.

5.3. Optimierung der Methoden zur zukünftigen Untersuchung der E2A - PML Interaktion

Für die weitere Untersuchung der Interaktion zwischen dem DNA-Bindeprotein E2A und den PML-Isoformen I bis VI mittels LCI sowie Ko-Immunpräzipitation, wäre es von Vorteil mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Knock Out-Methode (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) den PML-kodierenden Genabschnitt herauszuschneiden und anschließend die einzelnen PML-Isoformen I bis VI den endogenen Genexpressionslevels entsprechend in diese Zellen zu transduzieren. Somit kann ausgeschlossen werden, dass geringe Mengen aller im Nukleus lokalisierten PML Isoformen in den HepaRG_EYFP-PML-Zellen vorzufinden sind. Dies führt zu eindeutigeren Ergebnissen. Zudem sollte eine statistische Auswertung der LCI Aufnahmen vorgenommen werden, um die Beobachtungen dieser Arbeit zu reproduzieren und quantitativ zu stützen.

Für zukünftige Ko-Immunpräzipitationsversuche empfiehlt sich die Verwendung von einem isoformabhängigen PML Antikörper für die Immunfärbung nach dem Western Blot von HepaRG-Zellen zur Detektion der endogenen Expressionslevels der PML-Isoformen I bis VI. Hierdurch kann die Expression der EYFP-getaggten PML Isoformen in den HepaRG_EYFP-PML I bis VI mit den Expressionslevels der endogenen PML Isoformen zur Kontrolle verglichen werden. Um die Ergebnisse der Ko-Immunpräzipitationsexperimente zu reproduzieren sind Transfektionsversuche empfehlenswert, bei denen E2A mit den einzelnen PML-Isoformen in Zellen transfiziert und anschließend ko-immunpräzipitiert werden. Hierbei sollten die Genexpressionslevels der einzelnen PML-Isoformen I bis VI aneinander angepasst werden, um einen deutlichen Nachweis einer Bindung zu ermöglichen. Zudem sollte nach jeder Ko-Immunpräzipitation ein *Enrichment* durchgeführt werden, um die Bindung der immobilisierten Antikörper an die Beads zu kontrollieren. Diese Methode stellt einen Nachweis für eine erfolgreiche Bindung der an die immobilisierten Antikörper gebundenen Proteine dar, an denen das gesuchte Protein präzipitiert werden soll. Dies kann durch das *Strippen* der Nitrocellulosemembran durchgeführt werden, bei welcher eine mehrfache Immunfärbung durch das Abwaschen des ersten sowie zweiten Antikörpers mit einem sogenannten *Stripping* Puffers vorgenommen wird.

Diskussion

Zur Überprüfung der Hypothese, dass das Exon 8a in PML I und PML IV die mögliche Bindungssequenz für E2A darstellt, besteht die Möglichkeit die Ko-Immunpräzipitation mit fehlendem Exon 8a PML I und IV im selben Versuchsaufbau zu wiederholen. Hierfür müsste mittels einer inversen PCR dieser Genabschnitt aus den vorhandenen PML I- und PML IV-Plasmiden entfernt und die entstehende Plasmid-DNA mit dem fehlenden Exon 8a amplifiziert werden. Anschließend kann diese entweder in einem Infektionsexperiment in HepaRG_shPML transduziert und nach HAdV-5_wt-Infektion ko-immunpräzipitiert werden oder im Rahmen eines Transfektionsexperiments mit HAdV-5_wt ko-transfiziert werden mit folgender Ko-Immunpräzipitation.

Literaturverzeichnis

- [1] R. Jong, P. van der Vliet, und A. B. Brenkman, „Adenovirus DNA Replication: Protein Priming, Jumping Back and the Role of the DNA Binding Protein DBP“, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, Bd. 272, S. 187–211, Feb. 2003.
- [2] R. D. Everett und M. K. Chelbi-Alix, „PML and PML nuclear bodies: Implications in antiviral defence“, *Biochimie*, Bd. 89, Nr. 6, S. 819–830, Juni 2007.
- [3] A. M. Ishov und G. G. Maul, „The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition.“, *J. Cell Biol.*, Bd. 134, Nr. 4, S. 815–826, Aug. 1996.
- [4] N. Tavalai und T. Stamminger, „New insights into the role of the subnuclear structure ND10 for viral infection“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, Bd. 1783, Nr. 11, S. 2207–2221, Nov. 2008.
- [5] M. R. Hilleman und J. H. Werner, „Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness“, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N.*, Bd. 85, Nr. 1, S. 183–188, Jan. 1954.
- [6] W. P. Rowe, R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott, und T. G. Ward, „Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture“, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N.*, Bd. 84, Nr. 3, S. 570–573, Dez. 1953.
- [7] S. M. Berget, C. Moore, und P. A. Sharp, „Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 74, Nr. 8, S. 3171–3175, Aug. 1977.
- [8] L. T. Chow, R. E. Gelinas, T. R. Broker, und R. J. Roberts, „An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA“, *Cell*, Bd. 12, Nr. 1, S. 1–8, Sep. 1977.
- [9] J. J. Trentin, Y. Yabe, und G. Taylor, „The quest for human cancer viruses: A new approach to an old problem reveals cancer induction in hamsters by human adenoviruses“, *Science*, Bd. 137, S. 719–721, 1967.
- [10] M. O. Lasaro und H. C. Ertl, „New Insights on Adenovirus as Vaccine Vectors“, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, Bd. 17, Nr. 8, S. 1333–1339, Aug. 2009.
- [11] C. S. Lee u. a., „Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine“, *Genes Dis.*, Bd. 4, Nr. 2, S. 43–63, Juni 2017.
- [12] J.-W. Choi, J.-S. Lee, S. W. Kim, und C.-O. Yun, „Evolution of oncolytic adenovirus for cancer treatment“, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Bd. 64, Nr. 8, S. 720–729, Juni 2012.
- [13] „Virus Taxonomy: 2016 Release“, *Taxonomy Release History*, Aug-2016. [Online]. Verfügbar unter: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases#fragment-12227_taxonomy_release_history_panel_release_info. [Zugegriffen: 04-Jan-2018].

- [14] A. J. Davison, M. Benkő, und B. Harrach, „Genetic content and evolution of adenoviruses“, *J. Gen. Virol.*, Bd. 84, Nr. 11, S. 2895–2908, 2003.
- [15] E. Hage, U. Gerd Liebert, S. Bergs, T. Ganzenmueller, und A. Heim, „Human mastadenovirus type 70: a novel, multiple recombinant species D mastadenovirus isolated from diarrhoeal faeces of a haematopoietic stem cell transplantation recipient“, *J. Gen. Virol.*, Bd. 96, Nr. 9, S. 2734–2742, 2015.
- [16] T. Lion, „Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients“, *Clin. Microbiol. Rev.*, Bd. 27, Nr. 3, S. 441–462, Jan. 2014.
- [17] H. Yoshitomi, N. Sera, G. Gonzalez, N. Hanaoka, und T. Fujimoto, „First isolation of a new type of human adenovirus (genotype 79), species Human mastadenovirus B (B2) from sewage water in Japan“, *J. Med. Virol.*, Bd. 89, Nr. 7, S. 1192–1200, Juli 2017.
- [18] E. D’Ambrosio, N. Del Grosso, A. Chicca, und M. Midulla, „Neutralizing antibodies against 33 human adenoviruses in normal children in Rome.“, *J. Hyg. (Lond.)*, Bd. 89, Nr. 1, S. 155–161, Aug. 1982.
- [19] A. Arnold und E. MacMahon, „Adenovirus Infections“, *Medicine*, 2017.
- [20] W.-S. Ryu, „Chapter 8 - Adenoviruses“, in *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*, Boston: Academic Press, 2017, S. 111–124.
- [21] T. Shenk, „Adenoviridae: the viruses and their replication“, *Virology*, S. 2265–2300, 2001.
- [22] A. M. King, E. Lefkowitz, M. J. Adams, und E. B. Carstens, „Family Adenoviridae“, in *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier, 2011, S. 125–141.
- [23] J. Flint, V. R. Racaniello, G. F. Rall, A. M. Skalka, und L. W. Enquist, in *Principles of Virology*, Bd. 4, Washington DC: ASM Press, 2015, S. 278–280.
- [24] A. N. Giberson, A. R. Davidson, und R. J. Parks, „Chromatin structure of adenovirus DNA throughout infection“, *Nucleic Acids Res.*, 2012.
- [25] J. Flint, V. R. Racaniello, G. F. Rall, A. M. Skalka, und L. W. Enquist, in *Principles of Virology*, Bd. 4, Washington DC: ASM Press, 2015, S. 100.
- [26] J. Flint, V. R. Racaniello, G. F. Rall, A. M. Skalka, und L. W. Enquist, in *Principles of Virology*, Bd. 4, Washington DC: ASM Press, 2015, S. 502.
- [27] U. F. Greber, M. Willetts, P. Webster, und A. Helenius, „Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells“, *Cell*, Bd. 75, Nr. 3, S. 477–486, Nov. 1993.
- [28] J. M. Bergelson u. a., „Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5“, *Science*, Bd. 275, Nr. 5304, S. 1320–1323, Feb. 1997.
- [29] P. W. Roelvink, G. M. Lee, D. A. Einfeld, I. Kovesdi, und T. J. Wickham,

„Identification of a Conserved Receptor-Binding Site on the Fiber Proteins of CAR-Recognizing Adenoviridae“, *Science*, Bd. 286, Nr. 5444, S. 1568–1571, Nov. 1999.

[30] C. M. Wiethoff und G. R. Nemerow, „Adenovirus membrane penetration: Tickling the tail of a sleeping dragon“, *Virology*, Bd. 479–480, Nr. Supplement C, S. 591–599, Mai 2015.

[31] C. J. Burckhardt, M. Suomalainen, P. Schoenenberger, K. Boucke, S. Hemmi, und U. F. Greber, „Drifting Motions of the Adenovirus Receptor CAR and Immobile Integrins Initiate Virus Uncoating and Membrane Lytic Protein Exposure“, *Cell Host Microbe*, Bd. 10, Nr. 2, S. 105–117, Aug. 2011.

[32] K. H. Bremner, J. Scherer, J. Yi, M. Vershinin, S. P. Gross, und R. B. Vallee, „Adenovirus Transport through a Direct Cytoplasmic Dynein-Hexon Interaction“, *Cell Host Microbe*, Bd. 6, Nr. 6, S. 523–535, Dez. 2009.

[33] C. M. Wiethoff, H. Wodrich, L. Gerace, und G. R. Nemerow, „Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption following Capsid Disassembly“, *J. Virol.*, Bd. 79, Nr. 4, S. 1992–2000, Feb. 2005.

[34] S. Cohen, S. Au, und N. Panté, „How viruses access the nucleus“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, Bd. 1813, Nr. 9, S. 1634–1645, Sep. 2011.

[35] K. A. Karen und P. Hearing, „Adenovirus Core Protein VII Protects the Viral Genome from a DNA Damage Response at Early Times after Infection“, *J. Virol.*, Bd. 85, Nr. 9, S. 4135–4142, Mai 2011.

[36] J. Flint, „The topography and transcription of the adenovirus genome“, *Cell*, Bd. 10, Nr. 2, S. 153–166, Feb. 1977.

[37] D. T. Rowe, F. L. Graham, und P. E. Branton, „Intracellular localization of adenovirus type 5 tumor antigens in productively infected cells“, *Virology*, Bd. 129, Nr. 2, S. 456–468, Sep. 1983.

[38] J. B. Lewis und M. B. Mathews, „Control of adenovirus early gene expression: A class of immediate early products“, *Cell*, Bd. 21, Nr. 1, S. 303–313, Aug. 1980.

[39] J. R. Nevins, „Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product“, *Cell*, Bd. 26, Nr. 2, Part 2, S. 213–220, Okt. 1981.

[40] A. J. Berk, „Adenoviridae: the viruses and their replication“, in *Fields Virology*, 5. Aufl., Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

[41] R. N. de Jong und P. C. van der Vliet, „Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication“, *Gene*, Bd. 236, Nr. 1, S. 1–12, Aug. 1999.

[42] K. Nagata, R. A. Guggenheimer, T. Enomoto, J. H. Lichy, und J. Hurwitz, „Adenovirus DNA replication in vitro: identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 79, Nr. 21, S. 6438–6442, Nov. 1982.

- [43] G. J. M. Pruijn, W. van Driel, und P. C. van der Vliet, „Nuclear factor III, a novel sequence-specific DNA-binding protein from HeLa cells stimulating adenovirus DNA replication“, *Nature*, Bd. 322, Nr. 6080, S. 322656a0, Aug. 1986.
- [44] T. Enomoto, J. H. Lichy, J. E. Ikeda, und J. Hurwitz, „Adenovirus DNA replication in vitro: purification of the terminal protein in a functional form.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 78, Nr. 11, S. 6779–6783, Nov. 1981.
- [45] A. King und P. van der Vliet, „A precursor terminal protein-trinucleotide intermediate during initiation of adenovirus DNA replication: Regeneration of molecular ends in vitro by a jumping back mechanism“, *EMBO J.*, Bd. 13, S. 5786–92, Jan. 1995.
- [46] R. C. Hoeben und T. G. Uil, „Adenovirus DNA Replication“, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, Bd. 5, Nr. 3, S. a013003, Jan. 2013.
- [47] V. G. Cleghon und D. F. Klessig, „Association of the adenovirus DNA-binding protein with RNA both in vitro and in vivo.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 83, Nr. 23, S. 8947–8951, Dez. 1986.
- [48] H. S. Ginsberg, U. Lundholm, und T. Linné, „Adenovirus DNA-binding protein in cells infected with wild-type 5 adenovirus and two DNA-minus, temperature-sensitive mutants, H5ts125 and H5ts149., Adenovirus DNA-binding protein in cells infected with wild-type 5 adenovirus and two DNA-minus, temperature-sensitive mutants, H5ts125 and H5ts149.“, *J. Virol. J. Virol.*, Bd. 23, Nr. 1, S. 142, 142–151, Juli 1977.
- [49] D. M. Fowlkes, S. T. Lord, T. Linné, U. Pettersson, und L. Philipson, „Interaction between the adenovirus DNA-binding protein and double-stranded DNA“, *J. Mol. Biol.*, Bd. 132, Nr. 2, S. 163–180, Aug. 1979.
- [50] M. H. Stuiver, W. G. Bergsma, A. C. Arnberg, H. van Amerongen, R. van Grondelle, und P. C. van der Vliet, „Structural alterations of double-stranded DNA in complex with the Adenovirus DNA-binding protein: Implications for its function in DNA replication“, *J. Mol. Biol.*, Bd. 225, Nr. 4, S. 999–1011, Juni 1992.
- [51] J. C. Nicolas, P. Sarnow, M. Girard, und A. J. Levine, „Host range temperature-conditional mutants in the adenovirus DNA binding protein are defective in the assembly of infectious virus“, *Virology*, Bd. 126, Nr. 1, S. 228–239, Apr. 1983.
- [52] J. Field, R. M. Gronostajski, und J. Hurwitz, „Properties of the adenovirus DNA polymerase“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 259, Nr. 15, S. 9487–9495, Aug. 1984.
- [53] J. O. Lindenbaum, J. Field, und J. Hurwitz, „The adenovirus DNA binding protein and adenovirus DNA polymerase interact to catalyze elongation of primed DNA templates.“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 261, Nr. 22, S. 10218–10227, Mai 1986.
- [54] A. Monaghan, A. Webster, und R. T. Hay, „Adenovirus DNA binding protein: helix destabilising properties., Adenovirus DNA binding protein: helix destabilising properties.“, *Nucleic Acids Res. Nucleic Acids Res.*, Bd. 22, Nr. 5, S. 742, 742–748, März 1994.
- [55] D. C. Zijderveld, F. d’Adda di Fagagna, M. Giacca, H. T. Timmers, und P. C. van der Vliet, „Stimulation of the adenovirus major late promoter in vitro by transcription factor USF

is enhanced by the adenovirus DNA binding protein.“, *J. Virol.*, Bd. 68, Nr. 12, S. 8288–8295, Jan. 1994.

[56] B. van Breukelen, P. N. Kanellopoulos, P. A. Tucker, und P. C. van der Vliet, „The Formation of a Flexible DNA-binding Protein Chain Is Required for Efficient DNA Unwinding and Adenovirus DNA Chain Elongation“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 275, Nr. 52, S. 40897–40903, Dez. 2000.

[57] J. Dekker u. a., *Multimerization of the adenovirus DNA-binding protein is the driving force for ATP-independent DNA unwinding during strand displacement synthesis*, Bd. 16. 1997.

[58] Y. M. Mul und P. der V. Van, „The adenovirus DNA binding protein effects the kinetics of DNA replication by a mechanism distinct from NFI or Oct-1., The adenovirus DNA binding protein effects the kinetics of DNA replication by a mechanism distinct from NFI or Oct-1.“, *Nucleic Acids Res. Nucleic Acids Res.*, Bd. 21, 21, Nr. 3, 3, S. 641, 641–647, Feb. 1993.

[59] P. H Cleat und R. Hay, *Co-operative interactions between NFI and the adenovirus DNA binding protein at the adenovirus origin of replication*, Bd. 8. 1989.

[60] M. H. Stuiver und P. C. van der Vliet, „Adenovirus DNA-binding protein forms a multimeric protein complex with double-stranded DNA and enhances binding of nuclear factor I.“, *J. Virol.*, Bd. 64, Nr. 1, S. 379–386, Jan. 1990.

[61] V. Lallemand-Breitenbach und H. de Thé, „PML Nuclear Bodies“, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, Bd. 2, Nr. 5, S. a000661, Jan. 2010.

[62] R. Bernardi und P. P. Pandolfi, „Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 8, Nr. 12, S. 1006–1016, Dez. 2007.

[63] M. Lang u. a., „Three-Dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies“, *J. Cell Sci.*, Bd. 123, S. 392–400, Feb. 2010.

[64] F. P. M. Yisel A Rivera-Molina und Q. T. Nez, „Nuclear domain 10 of the viral aspect“, *World J. Virol.*, Bd. 2, Nr. 3, S. 110–122, Aug. 2013.

[65] E. D. Van, K. Laukens, T. H. Dang, und X. O. Van, „A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics., A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics“, *Int. J. Biol. Sci. Int. J. Biol. Sci.*, Bd. 6, 6, Nr. 1, 1, S. 51, 51–67, 2010.

[66] T. Regad und M. K. Chelbi-Alix, „Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections“, *Oncogene*, Bd. 20, Nr. 49, S. 1204854, Okt. 2001.

[67] R. Bernardi, A. Papa, und P. P. Pandolfi, „Regulation of apoptosis by PML and the PML-NBs“, *Oncogene*, Bd. 27, Nr. 48, S. onc2008305, Okt. 2008.

[68] R. D. Everett, „Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response“, *Cell. Microbiol.*, Bd. 8, Nr. 3, S. 365–374, März 2006.

- [69] D. G. Negorev *u. a.*, „Sp100 as a Potent Tumor Suppressor: Accelerated Senescence and Rapid Malignant Transformation of Human Fibroblasts through Modulation of an Embryonic Stem Cell Program“, *Cancer Res.*, Bd. 70, Nr. 23, S. 9991–10001, Dez. 2010.
- [70] A. Rabellino und P. P. Scaglioni, „PML Degradation: Multiple Ways to Eliminate PML“, *Front. Oncol.*, Bd. 3, 2013.
- [71] H. de Thé, M. Le Bras, und V. Lallemand-Breitenbach, „Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies“, *J. Cell Biol.*, Bd. 198, Nr. 1, S. 11–21, Juli 2012.
- [72] P. Kastner *u. a.*, „Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins., Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins.“, *EMBO J. EMBO J.*, Bd. 11, 11, Nr. 2, 2, S. 629, 629–642, Feb. 1992.
- [73] K. Jensen, C. Shiels, und P. S. Freemont, „PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif“, *Oncogene*, Bd. 20, Nr. 49, S. 1204765, Okt. 2001.
- [74] X. Cheng und H. Y. Kao, „Post-translational modifications of PML: consequences and implications., Post-translational modifications of PML: consequences and implications“, *Front. Oncol. Front. Oncol.*, Bd. 2, 2, S. 210–210, 2012.
- [75] G. G. Maul, H. H. Guldner, und J. Spivack, „Modification of discrete nuclear domains induced by herpes virus type I immediate early gene 1 product (ICPO)“, *J. Gen. Virol.*, Bd. 74 (Pt 12), S. 2679–90, Jan. 1994.
- [76] J. Berscheminski, P. Groitl, T. Dobner, P. Wimmer, und S. Schreiner, „The Adenoviral Oncogene E1A-13S Interacts with a Specific Isoform of the Tumor Suppressor PML To Enhance Viral Transcription“, *J. Virol.*, Bd. 87, Nr. 2, S. 965–977, Jan. 2013.
- [77] V. Doucas *u. a.*, „Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure.“, *Genes Dev.*, Bd. 10, Nr. 2, S. 196–207, Jan. 1996.
- [78] A. Hoppe, S. J. Beech, J. Dimmock, und K. N. Leppard, „Interaction of the Adenovirus Type 5 E4 Orf3 Protein with Promyelocytic Leukemia Protein Isoform II Is Required for ND10 Disruption“, *J. Virol.*, Bd. 80, Nr. 6, S. 3042–3049, März 2006.
- [79] A. J. Ullman, N. C. Reich, und P. Hearing, „Adenovirus E4 ORF3 Protein Inhibits the Interferon-Mediated Antiviral Response“, *J. Virol.*, Bd. 81, Nr. 9, S. 4744–4752, Jan. 2007.
- [80] M. Rosa-Calatrava *u. a.*, „Adenovirus protein IX sequesters host-cell promyelocytic leukaemia protein and contributes to efficient viral proliferation“, *EMBO Rep.*, Bd. 4, Nr. 10, S. 969–975, Okt. 2003.
- [81] D. Hanahan, „Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids“, *J. Mol. Biol.*, Bd. 166, Nr. 4, S. 557–580, Juni 1983.
- [82] P. Gripon *u. a.*, „Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus., Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. Am. Proc. Natl.*

Acad. Sci. U. S. Am., Bd. 99, 99, Nr. 24, 24, S. 15655, 15655–15660, Nov. 2002.

[83] K. J. Hands, D. Cuchet-Lourenco, R. D. Everett, und R. T. Hay, „PML isoforms in response to arsenic: high-resolution analysis of PML body structure and degradation., PML isoforms in response to arsenic: high-resolution analysis of PML body structure and degradation“, *J. Cell Sci. J. Cell Sci.*, Bd. 127, 127, Nr. Pt 2, 2, S. 365, 365–375, Jan. 2014.

[84] G. Gstraunthaler und T. Lindl, „B.2.6 Berechnung von Zellsuspensionen für die Zelleinsaat“, in *Zell- und Gewebekultur*, 7. Aufl., Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013, S. 313.

[85] M. M. Bradford, „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding“, *Anal. Biochem.*, Bd. 72, S. 248–254, Mai 1976.

[86] U. K. Laemmli, „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4“, *Nature*, Bd. 227, Nr. 5259, S. 680–685, Aug. 1970.

[87] W. Condemine, Y. Takahashi, M. L. Bras, und H. de Thé, „A nucleolar targeting signal in PML-I addresses PML to nucleolar caps in stressed or senescent cells“, *J. Cell Sci.*, Bd. 120, Nr. 18, S. 3219–3227, Sep. 2007.

[88] S. Nisole, M. A. Maroui, X. H. Mascle, M. Aubry, und M. K. Chelbi-Alix, „Differential Roles of PML Isoforms., Differential Roles of PML Isoforms“, *Front. Oncol. Front. Oncol.*, Bd. 3, 3, S. 125–125, 2013.

[89] D. Cuchet-Lourenço, E. Vanni, M. Glass, A. Orr, und R. D. Everett, „Herpes Simplex Virus 1 Ubiquitin Ligase ICP0 Interacts with PML Isoform I and Induces Its SUMO-Independent Degradation“, *J. Virol.*, Bd. 86, Nr. 20, S. 11209–11222, Okt. 2012.

[90] H. R. Chang *u. a.*, „The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance“, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, Mai 2017.

[91] A. Guo *u. a.*, „The function of PML in p53-dependent apoptosis“, *Nat. Cell Biol.*, Bd. 2, Nr. 10, S. 730, Okt. 2000.

[92] R. Bernardi und P. P. Pandolfi, „Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 8, Nr. 12, S. nrm2277, Dez. 2007.

Danksagung

Danksagung

Zunächst gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. Thomas Dobner für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe „virale Transformation“ des Heinrich-Pette-Instituts (HPI) das mir gestellte Projekt zu absolvieren und für die Einnahme der Position des Zweitgutachters.

Ganz freundlichen Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Stephan Noll von der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg (HAW Hamburg) für die Betreuung und Übernahme des Erstgutachtens.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Wing Hang Ip (HPI) für die sorgfältige und umfassende Einarbeitung und fortlaufende Betreuung während der Erarbeitung meiner Thesis bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Arbeitskollegen für ihre zuvorkommende Hilfsbereitschaft und die harmonische Arbeitsatmosphäre, die mir einen angenehmen Laboralltag bereitet hat. Ganz besonders gilt mein Dank an Fabian Hausmann für die Hilfestellung in der Mikroskopie.

Eidesstaatliche Erklärung

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Bachelorthesis mit dem Titel „Analysen zur Interaktion zwischen dem adenoviralen DNA-Bindeprotein (E2A) und den PML-Isoformen I bis VI“ ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, den 07.02.2018

(Dorsa Farhadnia)

Anhang

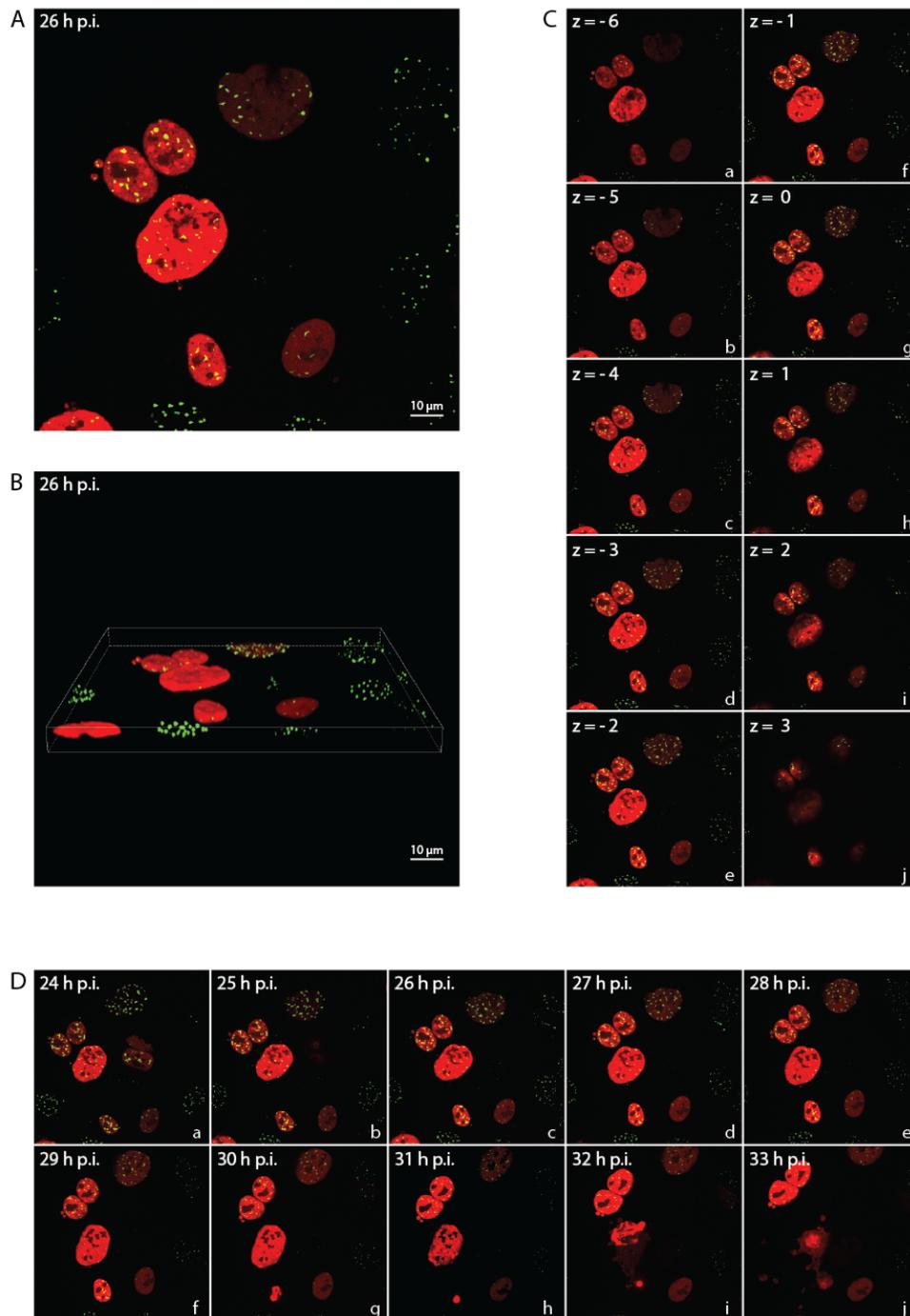


Abbildung 13: LCI-Aufnahmen der E2A und PML NBs in HAΔV-5_mCherry infizierten HepaRG_EYFP-PML I

2,5 x 10⁵ Zellen wurden auf eine 35 mm Zellkulturplatte ausgesät, am Folgetag mit dem HAΔV-5_mCherry infiziert (MOI 70) und 24 h p.i. immobilisiert sowie mikroskopiert. Die Aufnahmen erfolgten alle 30 min für 16 h, bei einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurden der mCherry-Tag (rotfluoreszierend) am DNA-Bindeprotein E2A und die EYFP-getaggtten PML-Isoformen (grünfluoreszierend) bei einer Laserintensität von 5% detektiert. (A) Überblick der Aufnahme bei 26 h p.i. (z = 0). (B) Dreidimensionaler Überblick bei 26 h p.i. (z = 0). (C) Aufnahmen entlang der z-Koordinate im Abstand von 0,4 μm (26 h p.i.). (D) Aufnahmen ab 24 h p.i. im zeitlichen Verlauf im Stundentakt (z = 0).

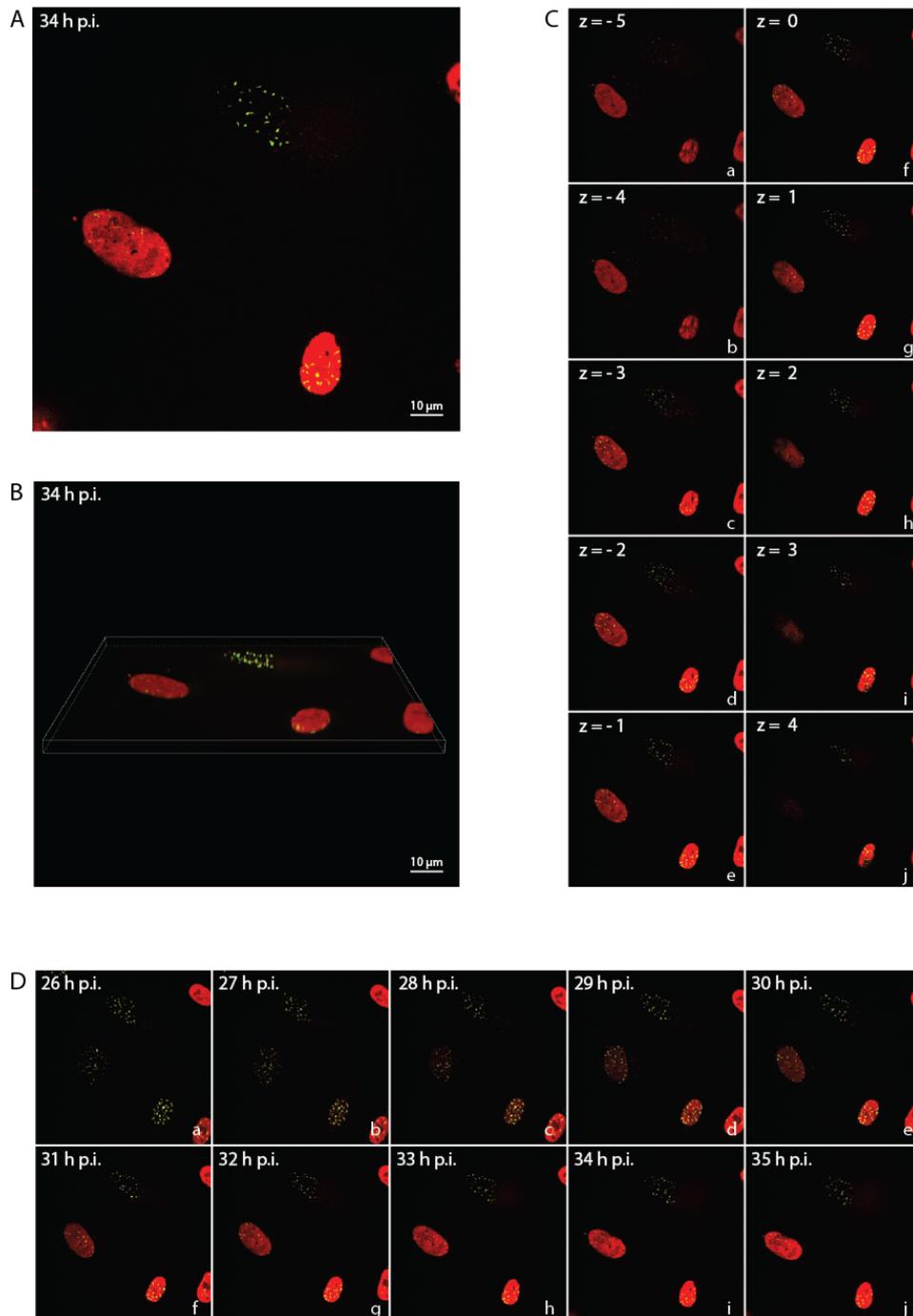


Abbildung 14: LCI-Aufnahmen der E2A und PML NBs in HAdV-5_mCherry infizierten HepaRG_EYFP-PML II

2,5 x 10⁵ Zellen wurden auf eine 35 mm Zellkulturplatte ausgesät, am Folgetag mit dem HAdV-5_mCherry infiziert (MOI 70) und 24 h p.i. immobilisiert sowie mikroskopiert. Die Aufnahmen erfolgten alle 30 min für 16 h, bei einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurden der mCherry-Tag (rotfluoreszierend) am DNA-Bindeprotein E2A und die EYFP-getagten PML-Isoformen (grünfluoreszierend) bei einer Laserintensität von 5% detektiert. (A) Überblick der Aufnahme bei 34 h p.i. (z = 0). (B) Dreidimensionaler Überblick bei 34 h p.i. (z = 0). (C) Aufnahmen entlang der z-Koordinate im Abstand von 0,4 µm (34 h p.i.). (D) Aufnahmen ab 26 h p.i. im zeitlichen Verlauf im Stundentakt (z = 0).

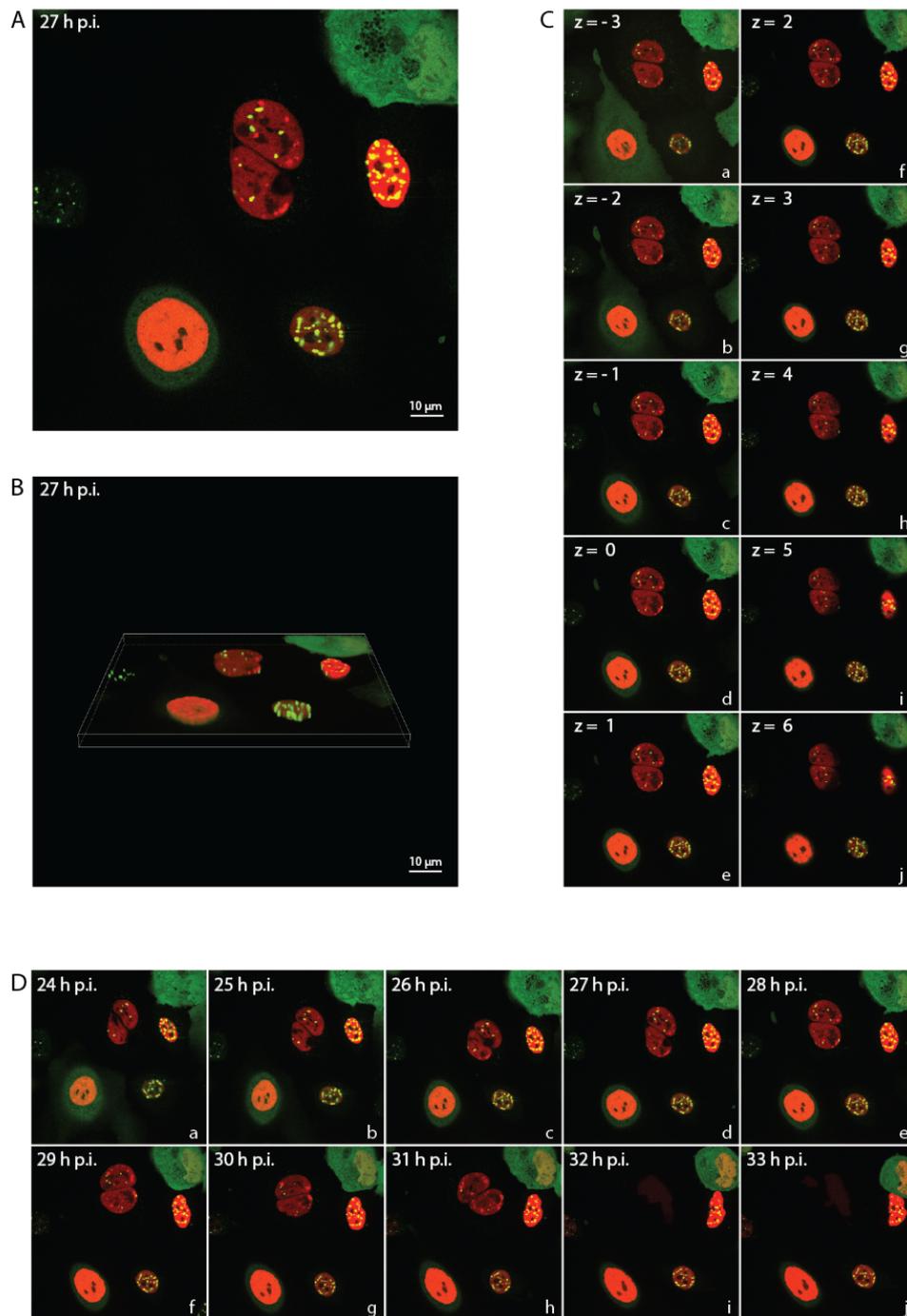


Abbildung 15: LCI-Aufnahmen der E2A und PML NBs in HAΔV-5_mCherry infizierten HepaRG_EYFP-PML III

2,5 x 10⁵ Zellen wurden auf eine 35 mm Zellkulturplatte ausgesät, am Folgetag mit dem HAΔV-5_mCherry infiziert (MOI 70) und 24 h p.i. immobilisiert sowie mikroskopiert. Die Aufnahmen erfolgten alle 30 min für 16 h, bei einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurden der mCherry-Tag (rotfluoreszierend) am DNA-Bindeprotein E2A und die EYFP-getagten PML-Isoformen (grünfluoreszierend) bei einer Laserintensität von 5% detektiert. (A) Überblick der Aufnahme bei 27 h p.i. (z = 0). (B) Dreidimensionaler Überblick bei 27 h p.i. (z = 0). (C) Aufnahmen entlang der z-Koordinate im Abstand von 0,4 μm (27 h p.i.). (D) Aufnahmen ab 24 h p.i. im zeitlichen Verlauf im Stundentakt (z = 0).

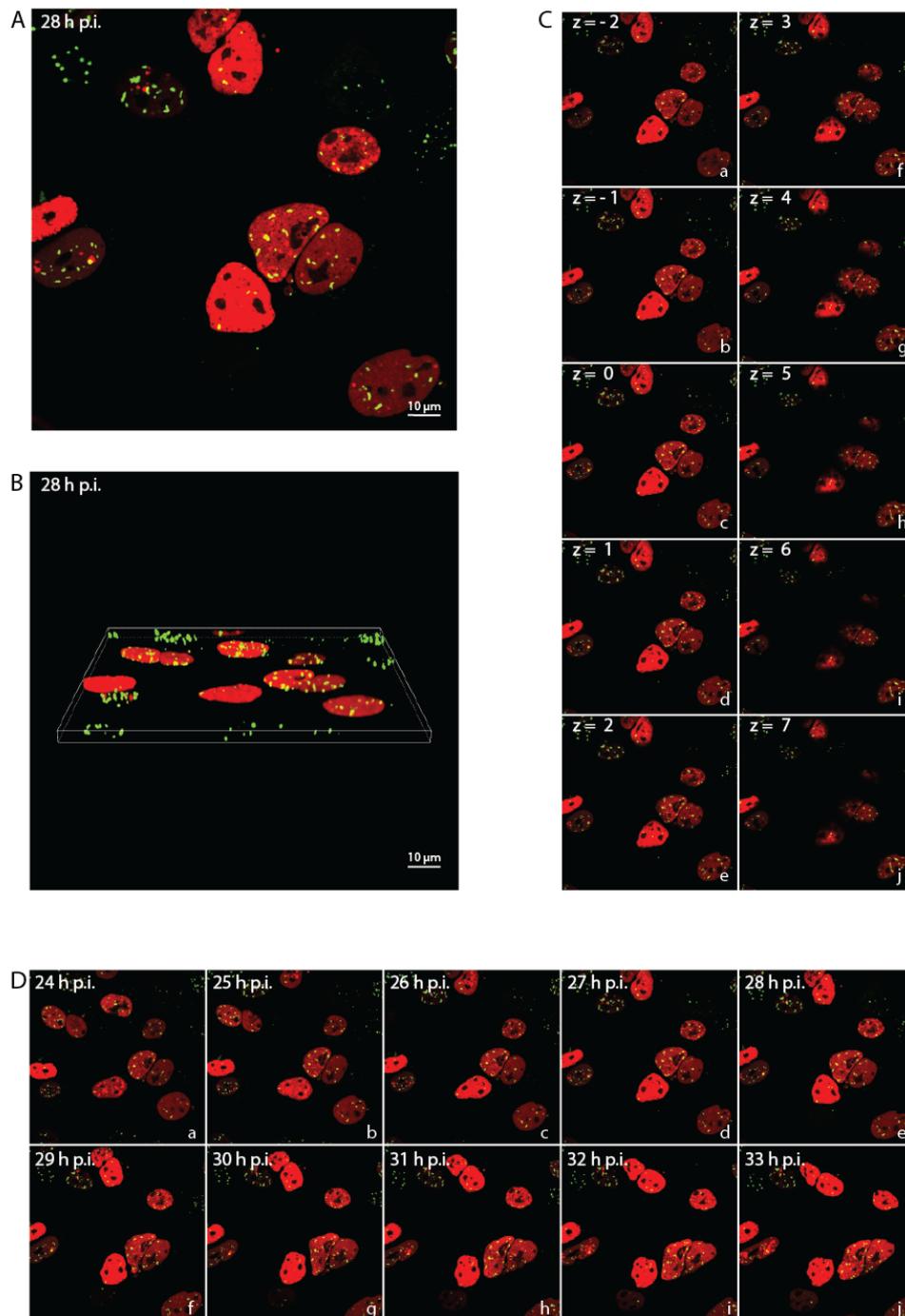


Abbildung 16: LCI-Aufnahmen der E2A und PML NBs in HAΔV-5_mCherry infizierten HepaRG_EYFP-PML IV

2,5 x 10⁵ Zellen wurden auf eine 35 mm Zellkulturplatte ausgesät, am Folgetag mit dem HAΔV-5_mCherry infiziert (MOI 70) und 24 h p.i. immobilisiert sowie mikroskopiert. Die Aufnahmen erfolgten alle 30 min für 16 h, bei einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurden der mCherry-Tag (rotfluoreszierend) am DNA-Bindeprotein E2A und die EYFP-getagten PML-Isoformen (grünfluoreszierend) bei einer Laserintensität von 5% detektiert. (A) Überblick der Aufnahme bei 28 h p.i. (z = 0). (B) Dreidimensionaler Überblick bei 28 h p.i. (z = 0). (C) Aufnahmen entlang der z-Koordinate im Abstand von 0,4 μm (28 h p.i.). (D) Aufnahmen ab 24 h p.i. im zeitlichen Verlauf im Stundentakt (z = 0).

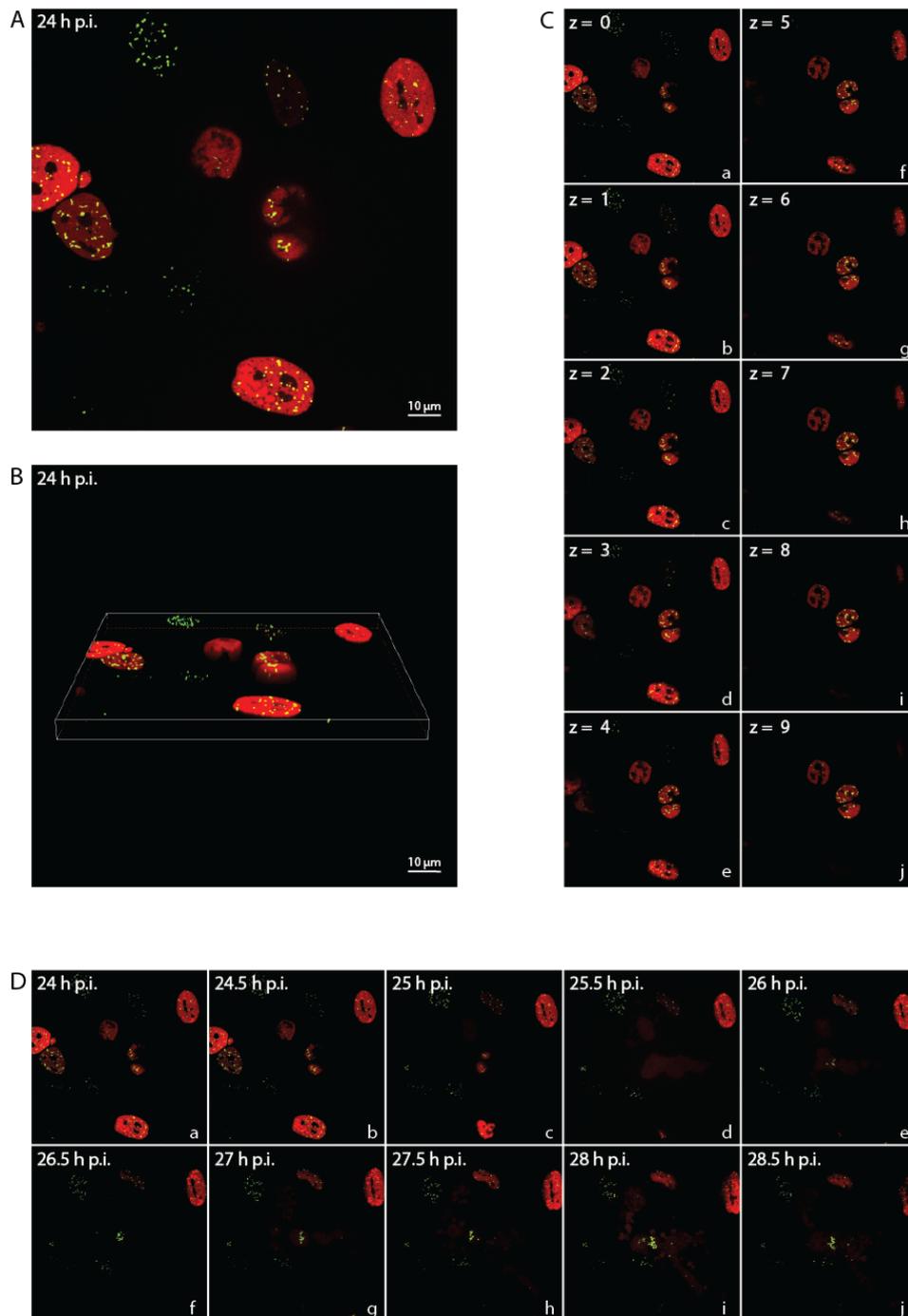


Abbildung 17: LCI-Aufnahmen der E2A und PML NBs in HAdV-5_mCherry infizierten HepaRG_EYFP-PML V

$2,5 \times 10^5$ Zellen wurden auf eine 35 mm Zellkulturplatte ausgesät, am Folgetag mit dem HAdV-5_mCherry infiziert (MOI 70) und 24 h p.i. immobilisiert sowie mikroskopiert. Die Aufnahmen erfolgten alle 30 min für 16 h, bei einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurden der mCherry-Tag (rotfluoreszierend) am DNA-Bindeprotein E2A und die EYFP-getagten PML-Isoformen (grünfluoreszierend) bei einer Laserintensität von 5% detektiert. (A) Überblick der Aufnahme bei 24 h p.i. ($z = 0$). (B) Dreidimensionaler Überblick bei 24 h p.i. ($z = 0$). (C) Aufnahmen entlang der z-Koordinate im Abstand von $0,4 \mu\text{m}$ (24 h p.i.). (D) Aufnahmen ab 24 h p.i. im zeitlichen Verlauf im halbstündigen Takt ($z = 0$).

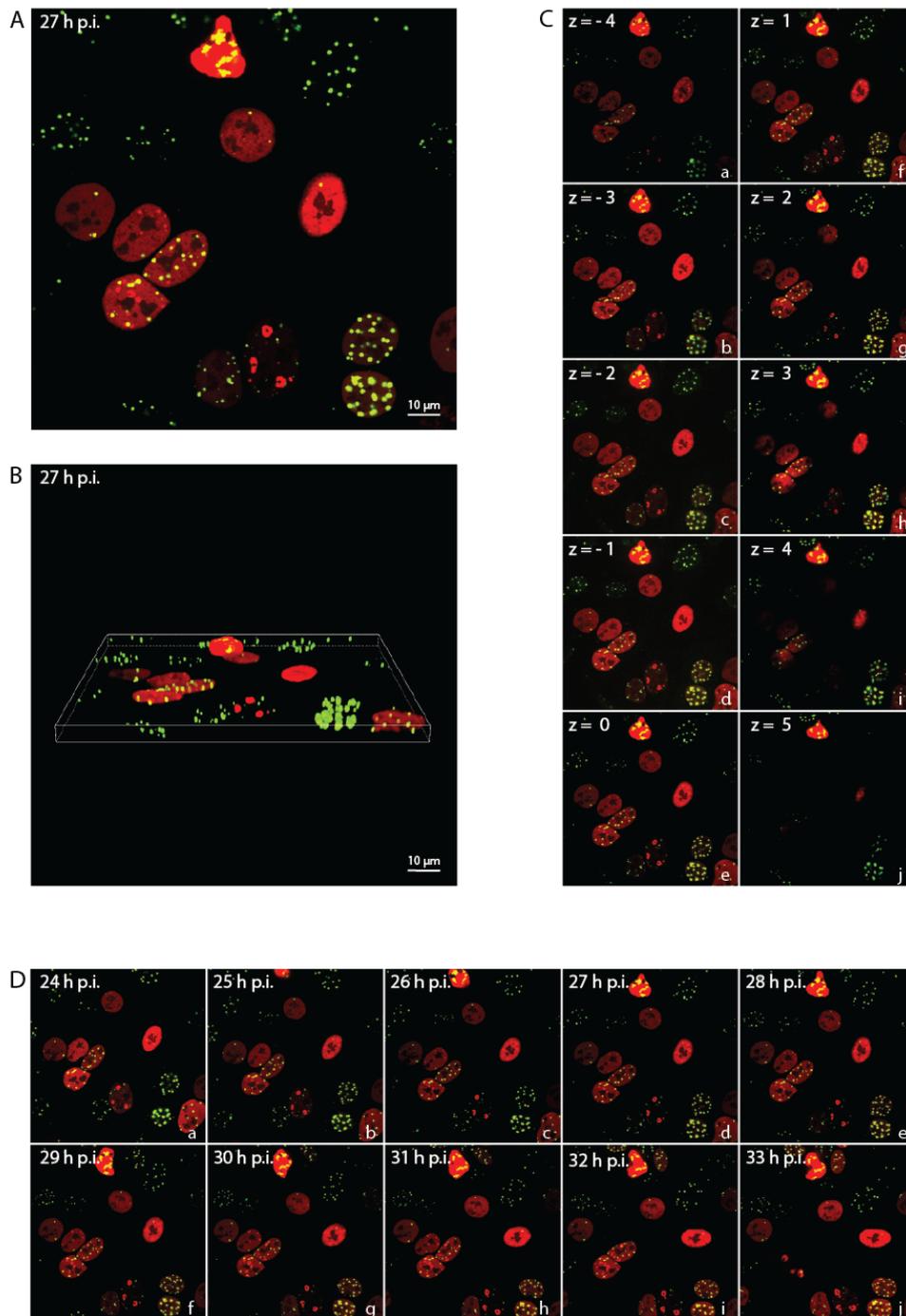


Abbildung 18: LCI-Aufnahmen der E2A und PML NBs in HAΔV-5_mCherry infizierten HepaRG_EYFP-PML VI

2,5 x 10⁵ Zellen wurden auf eine 35 mm Zellkulturplatte ausgesät, am Folgetag mit dem HAΔV-5_mCherry infiziert (MOI 70) und 24 h p.i. immobilisiert sowie mikroskopierte. Die Aufnahmen erfolgten alle 30 min für 16 h, bei einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurden der mCherry-Tag (rotfluoreszierend) am DNA-Bindeprotein E2A und die EYFP-getagten PML-Isoformen (grünfluoreszierend) bei einer Laserintensität von 5% detektiert. (A) Überblick der Aufnahme bei 27 h p.i. (z = 0). (B) Dreidimensionaler Überblick bei 27 h p.i. (z = 0). (C) Aufnahmen entlang der z-Koordinate im Abstand von 0,4 μm (27 h p.i.). (D) Aufnahmen ab 24 h p.i. im zeitlichen Verlauf im Stundentakt (z = 0).

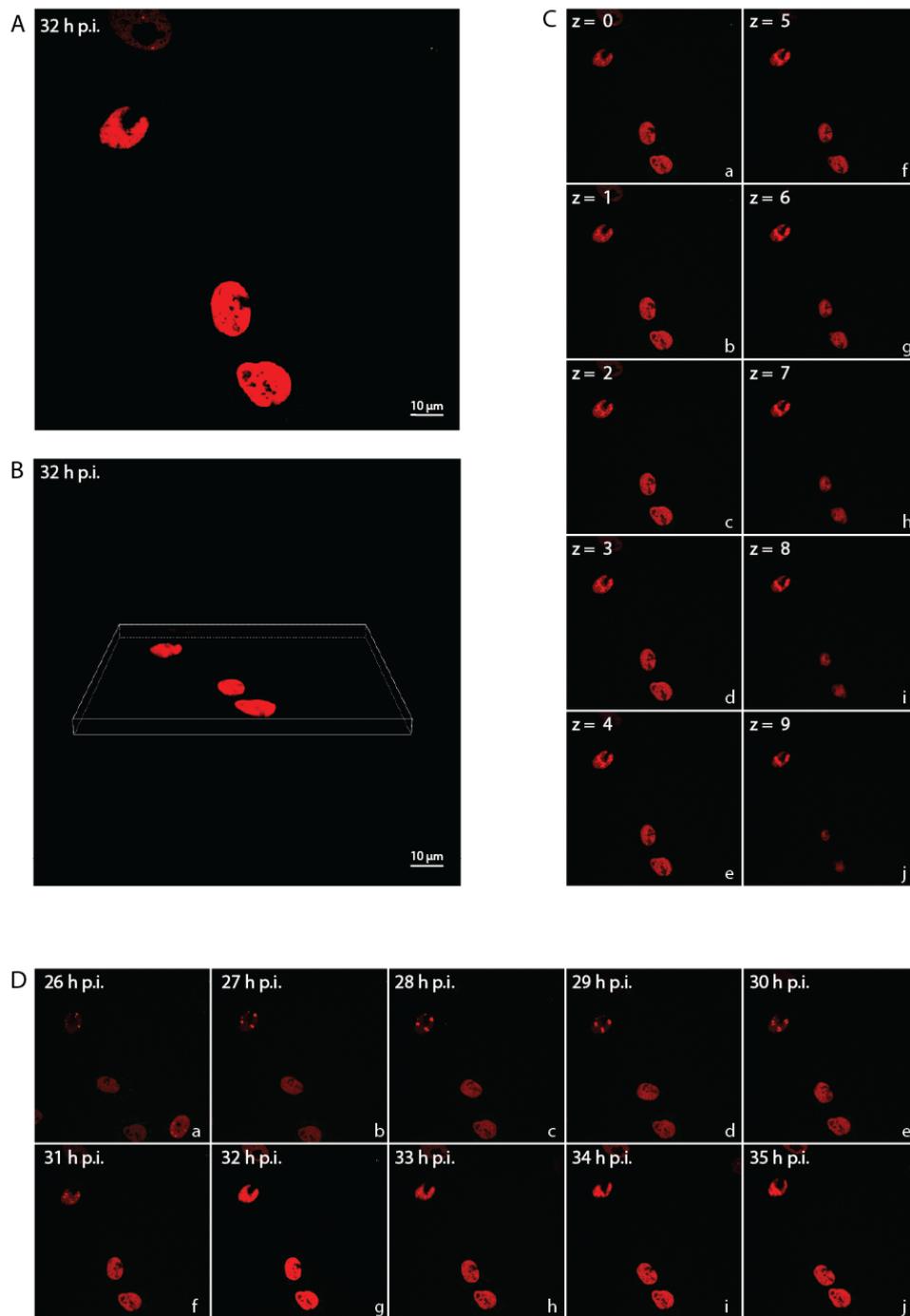


Abbildung 19: LCI-Aufnahmen der E2A und PML NBs in HAdV-5_mCherry infizierten HepaRG_shPML
 $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden auf eine 35 mm Zellkulturplatte ausgesät, am Folgetag mit dem HAdV-5_mCherry infiziert (MOI 70) und 24 h p.i. immobilisiert sowie mikroskopiert. Die Aufnahmen erfolgten alle 30 min für 16 h, bei einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurden der mCherry-Tag (rotfluoreszierend) am DNA-Bindeprotein E2A und die EYFP-getaggten PML-Isoformen (grünfluoreszierend) bei einer Laserintensität von 5% detektiert. (A) Überblick der Aufnahme bei 32 h p.i. ($z = 0$). (B) Dreidimensionaler Überblick bei 32 h p.i. ($z = 0$). (C) Aufnahmen entlang der z-Koordinate im Abstand von $0,4 \mu\text{m}$ (32 h p.i.). (D) Aufnahmen ab 26 h p.i. im zeitlichen Verlauf im Stundentakt ($z = 0$).